

# **Entwicklung synthetischer Antitumor-Vakzine nach dem Vorbild der tumorassoziierten Struktur des Mucins MUC1 und deren immunologische Evaluierung**

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

**Björn Palitzsch**

geboren in Erlabrunn (Erzgebirge)

Mainz, im November 2014





Dekan: Prof. Dr. Xxxxxx Xxxx  
1. Berichterstatter: Prof. Dr. Horst Kunz  
2. Berichterstatter: Prof. Dr. Xxxxxx Xxxx

Tag der mündlichen Prüfung: 17.12.2014



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



*„Blut ist ein ganz besonderer Saft.“*

Johann Wolfgang von Goethe\*

---

\* hier zitiert aus: **E. A. von Behring, S. Kitasato**, Ueber das Zustandekommen der Diphtherie-Immunität und der Tetanus-Immunität bei Thieren. *Dtsch. med. Wochenschr.* **1890**, 16 (49), 1113-1114.



*für Pia*

## Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b> .....	<b>1</b>
1.1	Maligne Tumorerkrankungen .....	1
1.2	Vakzinierung als Immuntherapie gegen Tumore .....	2
1.3	Das Mucin MUC1 als Zielstruktur in der aktiven Tumor-Immuntherapie .....	3
<b>2</b>	<b>Zielsetzung</b> .....	<b>8</b>
<b>3</b>	<b>Allgemeiner Teil</b> .....	<b>10</b>
3.1	Aufbau von synthetischen Antitumorvakzinen auf der Basis des Mucins MUC1 .....	10
3.2	Synthese der tumorassozierten Kohlenhydratantigene .....	11
3.2.1	T <sub>N</sub> -Serin-Antigen .....	12
3.2.2	Sialyl-T <sub>N</sub> -Serin-Antigen .....	18
3.3	Synthese eines Triethylenglycol-Abstandhalters als Baustein für die Festphasenpeptidsynthese 24	
3.4	Synthese der Peptide und Glycopeptide .....	26
3.4.1	Festphasensynthese von Peptiden und Glycopeptiden .....	27
3.4.2	Materialien, Reagenzien und allgemeiner Ablauf für die Festphasenpeptidsynthese nach der Fmoc-Strategie .....	28
3.4.3	Aufbau funktionalisierter Glycopeptide nach dem Vorbild der tumorassozierten Form des Mucins MUC1 .....	34
3.5	Aktivierungs- und Effektormechanismen des Immunsystems .....	40
3.5.1	Mechanismen des angeborenen Immunsystems .....	40
3.5.2	Mechanismen der adaptiven Immunantwort .....	42
3.5.3	Induktion einer humoralen Immunantwort .....	45
3.5.4	Schlussfolgerungen zur Entwicklung von Antitumor-Vakzinen .....	49
3.6	Synthese und immunologische Evaluierung von proteinkonjugierten Vakzinen .....	50
3.6.1	Allgemeine Vorschrift zur Konjugation von Glycopeptiden an Proteine mit Quadratsäurediethylester .....	51
3.6.2	Rinderserumalbumin-Konjugate als Grundlage für ELISA-Untersuchungen .....	53
3.6.3	Synthese von MUC1-Glycopeptid-TTox-Konjugaten zur Verwendung als Antitumor- Impfstoffe .....	57



3.6.4	Herstellung von Vakzinformulierungen .....	59
3.6.5	Allgemeiner Immunisierungsplan für TTox-Konjugate.....	60
3.6.6	Immunologische Evaluierung der TTox-Konjugate .....	62
<b>3.7</b>	<b>Untersuchungen zur Spezifität von Vakzin-induzierten MUC1-Antikörpern.....</b>	<b>70</b>
3.7.1	Untersuchung der Bindungsspezifität von Vakzin-induzierten Antikörpern durch Analyse des Bindungsvermögens zu normalen humanen Epithelzellen .....	71
3.7.2	Untersuchung der Bindungsspezifität Vakzin-induzierter Antikörper durch immun-histochemische Färbungen humaner Pankreaskarzinomzellschnitte .....	81
<b>3.8</b>	<b>Synthese und immunologische Evaluierung vollsynthetischer Mehrkomponenten-Vakzine ....</b>	<b>87</b>
3.8.1	Entwicklung einer Dreikomponenten-Vakzine mit einem CpG-Motiv als internem Adjuvans 88	
3.8.2	Entwicklung einer Vierkomponenten-Vakzine mit drei verschiedenen T-Helferzell-Epitopen 96	
3.8.3	Entwicklung einer Fünfkomponenten-Vakzine mit drei cytotoxischen MUC1 T-Zell-Epitopen 107	
<b>4</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>122</b>
<b>5</b>	<b>Experimenteller Teil .....</b>	<b>132</b>
5.1	Allgemeines und Messgeräte zur organischen Synthese .....	132
5.2	Synthese der tumorassoziierten Kohlenhydratantigene.....	137
5.2.1	Synthese des T <sub>N</sub> -Serin-Antigens .....	137
5.2.2	Synthese des Sialyl-T <sub>N</sub> -Serin-Antigens.....	146
5.3	Synthese der Spaceraminosäure.....	154
5.4	Synthese der Peptide und Glycopeptide .....	159
5.4.1	Standardprotokoll der Festphasenpeptid- und Festphasenglycopeptidsynthese .....	159
5.4.2	Synthese der Peptide ohne Spaceraminosäure .....	160
5.4.3	Synthese der Glycopeptide mit N-terminalem Spacer.....	164
5.4.4	Synthese der Zweikomponenten-Vakzine.....	176
5.5	Synthese der Proteinkonjugate .....	184
5.6	Synthese der Dreikomponenten-Vakzine mit einem CpG-Motiv als TLR9-Ligand.....	195
5.7	Synthese der Fünfkomponenten-Vakzine mit drei MHC I T-Zell-Epitopen .....	198
5.8	Synthese der Vierkomponenten-Vakzine mit drei MHC II-T-Zell-Epitopen.....	202
5.9	Immunologische Evaluierung.....	210

5.9.1	Verwendete Materialien .....	210
5.9.2	Durchführung der Immunisierungen .....	213
<b>5.10</b>	<b>Nachweis von spezifischen Antikörpern durch ELISA-Experimente.....</b>	<b>215</b>
<b>5.11</b>	<b>Durchflusszytometrische Analyse zum Nachweis von tumorspezifischen Serum-Antikörpern</b> <b>216</b>	
<b>5.12</b>	<b>Färbungen von Zellen für die Fluoreszenzmikroskopie .....</b>	<b>217</b>
<b>5.13</b>	<b>Immunhistochemische Färbung von Pankreaskarzinomzellschnitten .....</b>	<b>217</b>
<b>6</b>	<b>Abbildungsverzeichnis.....</b>	<b>222</b>
<b>7</b>	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>228</b>
<b>8</b>	<b>Spektroskopischer Anhang .....</b>	<b>242</b>



## Abkürzungsverzeichnis

[ $\alpha$ ]	spezifischer Drehwert	DCC	<i>N,N'</i> -Dicyclohexylcarbodiimid
absol.	absolut	dest.	destilliert
ABTS	2,2'-Azino-di-3-ethylbenz-thiazolin-6-sulfonsäure	DHB	2,5-Dihydroxybenzoesäure
Ac	Acetyl	DIPEA	Diisopropylethylamin
AcOH	Essigsäure	DMAP	4-Dimethylaminopyridin
AK	Antikörper	DMF	<i>N,N</i> -Dimethylformamid
AS	Aminosäure	DMSO	Dimethylsulfoxid
ax	axial	EE	Essigsäureethylester
BB	Breitband	ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
BCR	B-Cell Receptor, B-Zell-Rezeptor	eq	äquatorial
ber.	berechnet	eq.	Äquivalente
Bn	Benzyl	ESI-MS	Electrospray Ionisation Mass Spectrometry
BSA	Bovine Serum Albumine, Rinderserumalbumin	Et	Ethyl
Bzn	Benzyliden	Fmoc	9 <i>H</i> -Fluoren-9-yl-methoxy-carbonyl
c	Konzentration	Fmoc-OSu	<i>N</i> -(9 <i>H</i> -Fluoren-9-yl)-methoxy-carbonylsuccinimidylcarbonat
CAN	Cerammoniumnitrat	Gal	D-Galactose
CFA	Complete Freund's Adjuvant, komplettes Freund'sches Adjuvant	GalNAc	<i>N</i> -Acetyl-D-galactosamin
COSY	Correlated Spectroscopy	ges.	gesättigt
d, dd	Dublett, Dublett von Dublett	h	Stunde
$\delta$	chemische Verschiebung	HATU	<i>O</i> -(7-Aza-benzotriazol-1-yl)- <i>N,N,N',N'</i> -tetramethyluroniumhexafluoro-phosphat
DC	Dünnschichtchromatographie		
DC	Dendritische Zellen		

HBTU	<i>O</i> -(1 <i>H</i> -7-Azabenzotriazol-1-yl)- <i>N,N,N',N'</i> -tetramethyluroniumhexafluoro-phosphat	mAK	monoklonaler Antikörper
		MALDI	Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation
		mbar	Millibar
<sup>6</sup> Hex	Cyclohexan	Me	Methyl
HLA	Humanes Leukozyten Antigen	MHC	Major Histocompatibility Complex
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Correlation	min	Minuten
<i>HOAt</i>	<i>1-Hydroxy-7-aza-benzotriazol</i>	M	Molarität
<i>HOBT</i>	<i>1-Hydroxybenzotriazol</i>	MS	Massenspektrometrie
<i>HPLC</i>	<i>High Performance Liquid Chromatography</i>	MS	Molsieb
		NeuNAc	Neuraminsäure
HSQC	<i>Heteronuclear Single Quantum Coherence</i>	NMM	<i>N</i> -Methylmorpholin
		NMP	<i>N</i> -Methylpyrrolidon
Hz	Hertz	NMR	Nuclear Magnetic Resonance
Ig	Immunglobulin	OTf	Trifluormethansulfonat, Triflat
IL	Interleukin		
<i>i</i> Pr	Isopropyl	PAMP	Pathogen-Associated Molecular Pattern
i. Vak.	im Vakuum		
i. Hochvak.	im Hochvakuum	<i>p</i>	<i>para</i>
J	Kopplungskonstante	p.a.	pro analysi
kat.	katalytisch	PBS	Phosphate Buffered Saline
KLH	Keyhole Limpet Hemocyanin, Hämocyanin der Schlüssel lochnapfschnecke	Ph	Phenyl
		ppm	parts per million
		q	Quartett
konz.	konzentriert	quant.	quantitativ
λ	Wellenlänge	R <sub>f</sub>	Retentionsfaktor
lat.	lateinisch	R <sub>t</sub>	Retentionszeit
Lit.	Literaturangabe	RP	Reverse Phase
m	Multipllett	Raumtemp.	Raumtemperatur

s	Singulett
SA	Streptavidin
SA-HPO	Streptavidine-horse raddish peroxidase
s <sub>b</sub>	breites Singulett
Schmp.	Schmelzpunkt
t	Triplett
TACA	Tumorassoziertes Kohlen- hydratantigen
tBu	<i>tert</i> -Butyl
TCR	T-Cell Receptor, T-Zell Rezeptor
Tentagel	Poylethylenglycol-Polystyrol- Copolymer
TFA	Trifluoressigsäure
TFE	Trifluorethanol
THF	Tetrahydrofuran
TIS	Triisopropylsilan
TLR	Toll like receptor
TOCSY	Total Correlation Spectroscop y
TOF	Time of Flight
Trt	Trityl
<i>p</i> -TsOH	para-Toluolsulfonsäure
UV	Ultraviolett







# 1 Einleitung

## 1.1 Maligne Tumorerkrankungen

In einem gesunden Organismus besteht ein fortwährendes Gleichgewicht zwischen der Bildung neuer Zellen und dem geordnetem Abbau alter Zellen. Dieser Zustand der Homöostase sorgt dafür, dass Gewebe, die zum Aufbau der Organe eines Organismus beitragen, kontrolliert gebildet und regeneriert werden. Alle Informationen, die zum Aufbau eines Organismus benötigt werden, sind in den Desoxyribonukleinsäuren (DNS) gespeichert. Daher ist die Replikation dieser polymeren Biomoleküle streng reguliert und wird durch verschiedene Mechanismen überwacht. Dennoch ist die DNS-Replikation nicht perfekt. Im Laufe der Evolution konnten so durch Zufall neue Proteine und Enzyme mit verbesserten Eigenschaften entstehen. Fehler in der DNS-Replikation können aber auch fatale Folgen haben. Entsteht eine Mutation in einem sogenannten Onkogen, das für die Regulation der Homöostase verantwortlich ist, kann das kontrollierte Wachstum einer Zelle entgleisen.<sup>[1]</sup> Die Zelle teilt sich dann im ungünstigsten Fall unkontrolliert weiter. Durch gesteigerte Replikationsraten ist die Entstehung neuer Mutationen noch weiter begünstigt, so dass solche Zellen oft ihre normale Zellfunktion verlieren und unkontrolliert intakte Gewebe überwuchern. Die dabei entstehenden Tumore verdrängen durch radikales Wachstum gesundes Gewebe. Zusätzlich können sich Tumorzellen durch veränderte Oberflächenstrukturen aus dem Zellverband lösen und in andere Gewebe einwandern.<sup>[2]</sup> Die Veränderungen der DNS können durch eine Fülle von äußeren Einflüssen, wie z.B. DNS-schädigende Chemikalien, energiereiche Strahlung (UV-Licht, ionisierende Strahlung), Viren, aber auch durch ungesunde Lebensweise hervorgerufen werden.<sup>[3]</sup>

Nach den Herz-Kreislaufkrankungen sind Krebserkrankungen die zweithäufigste Todesursache in der entwickelten Welt.<sup>[4]</sup> Die meisten konventionellen Therapieansätze beschränken sich auf die chirurgische Entfernung von Tumorgewebe, die Chemotherapie und die Bestrahlung betroffener Gewebe. Alle drei Therapieansätze sind aufgrund ihrer starken Nebenwirkungen mit großen Beeinträchtigungen für die Patienten verbunden. Zudem ist eine chirurgische Entfernung des Tumors oft nicht möglich, wenn z.B. lebenswichtige Organe oder große

Blutgefäße betroffen sind. Sowohl die Behandlung mit Cytostatika, als auch die Bestrahlung sind wenig spezifisch und schädigen gesundes Gewebe gleichermaßen. Therapieansätze, die gezielt gegen Tumorgewebe gerichtet sind, wären daher ein Meilenstein für die Behandlung von Krebserkrankungen.

## 1.2 Vakzinierung als Immuntherapie gegen Tumore

Die Entdeckung, dass die Immunisierung mit abgeschwächten Krankheitserregern Schutz vor Infektionskrankheiten bietet, markiert einen der wichtigsten Errungenschaften in der modernen Medizin. Das Übertragen von infektiösen Krankheitserregern auf oberflächliche Wunden von gesunden Menschen wurde als sogenannte Variolation bzw. Inoculierung schon seit Jahrhunderten in Asien und im Nahen Osten durchgeführt.<sup>[5]</sup> Dabei wurde z.B. Wundsekret aus Pocken (*Variola*) von einem Patienten, bei dem die Erkrankung eher mild verläuft, auf kleine Wunden in der Haut von gesunden Menschen übertragen. Edward Jenner behandelte erstmals 1796 Menschen mit Pockensekret aus Kuhpocken und konnte dadurch bei den geimpften Personen Immunität gegenüber den verheerenderen Windpocken erreichen. Er nannte seinen Impfstoff Vakzine (von lateinisch *vacca* "Kuh") und die Technik der Immunisierung Vakzination (von lateinisch *vaccinus* "von Kühen stammend") und prägte damit diese bis heute allgemeingültigen Begriffe.<sup>[6]</sup> Im Jahr 1876 gelang es Robert Koch erstmals den Milzbranderreger (*bacillus anthracis*) außerhalb eines Organismus zu kultivieren. Dadurch konnte erstmalig die Existenz bakterieller Krankheitserreger nachgewiesen und deren Lebenszyklus beschrieben werden.<sup>[7]</sup> Daraufhin gelang es Lewis Pasteur und seinem Mitarbeiter Émile Roux im Jahr 1881 einen im Labor hergestellten veterinärmedizinischen Impfstoff gegen Milzbrand zu erzeugen. Im Jahr 1885 konnte Pasteur den ersten im Labor hergestellten Impfstoff für humanmedizinische Zwecke gegen den Tollwuterreger (*Rabiesvirus*) herstellen. Weitere wichtige Erfolge waren die durch Kooperation von Emil von Behring und Kitasato Shibasaburō mit Paul Ehrlich entwickelten Seren zur passiven Immunisierung gegen Diphtherie (*Corynebacterium diphtheriae*) und Tetanus (*Clostridium tetani*) im Jahr 1890.<sup>[8,9]</sup>

Seit diesen ersten Entwicklungen hat sich die Vakzinierung zu einem bedeutendem Werkzeug bei der Behandlung zahlreicher Krankheiten entwickelt. Dennoch bleibt der Einsatz von

Impfungen bis zur heutigen Zeit auf die Behandlung bzw. Prophylaxe von Infektionskrankheiten beschränkt, die durch bakterielle, virale oder protozoische Erreger hervorgerufen werden. Eine Schutzimpfung gegen Tumore zu entwickeln, ist ein schwieriges Unterfangen. Denn das Immunsystem hat sich im Laufe der Evolution so entwickelt, dass es körpereigenes Gewebe toleriert und dagegen pathogene Strukturen erkennt und unschädlich macht. Es ist also dazu in der Lage zwischen körpereigen und fremd zu unterscheiden. Da es sich bei Tumoren um körpereigenes Gewebe handelt, werden diese aufgrund der Selbsttoleranz des Immunsystems nicht als Pathogen erkannt.<sup>[10]</sup> Das Immunsystem müsste durch eine Antitumor-Vakzine so manipuliert werden, dass es zwischen Selbst und verändertem Selbst, d.h. zwischen normalem Gewebe und neoplastischem Tumorzellen unterscheiden kann.<sup>[11]</sup> Eine mögliche Leitstruktur, mit der diese Unterscheidung bewerkstelligt werden kann, ist das Mucin MUC1.

### **1.3 Das Mucin MUC1 als Zielstruktur in der aktiven Tumor-Immuntherapie**

Mucine (von lateinisch *mucus* "Schleim") sind stark glycosylierte Proteine, die auf der Oberfläche von Epithelzellen vorkommen. Sie ragen bis zu 500 nm über die Zelloberfläche hinaus und bilden aufgrund ihres starken Kohlenhydratanteils, der über 50 Gewichtsprozent ausmacht und sehr viel Wasser aufnehmen kann, eine gleitfähige schleimartige Schicht, die das darunterliegende Epithelgewebe vor äußeren Einflüssen, wie z.B. Reibung mit anderen Geweben, aber auch vor enzymatischem Abbau und Pathogenen schützt.<sup>[12]</sup> Da die Mucine in gesunden Zellen nur auf der apikalen Seite exprimiert werden, sorgen sie zudem für einen geordneten Zellverband und hindern einzelne Zellen daran, diesen zu verlassen. Die Mucine kommen in Membran-gebundener und sekretorischer Form vor. In der Membran verankert, zählen sie zu den Membranproteinen des Typs 1, d.h. der C-Terminus liegt intrazellulär und der N-Terminus extrazellulär. Der kurze intrazelluläre Teil weist mehrere Phosphorylierungsstellen an Tyrosin auf.<sup>[13]</sup> Der Hauptteil des Proteins wird aus einer variablen Anzahl von Wiederholungseinheiten aufgebaut (VNTR-Sequenz, englisch "*variable number of tandem repeats*"). Anhand der Tandem Repeat-Sequenz können verschiedene Mucine unterschieden werden, wobei bis heute über 20 verschiedene Mucine bekannt sind.<sup>[14]</sup> Das in dieser Arbeit relevante Mucin MUC1 ist aus zwei Proteinsträngen aufgebaut, die nicht-kovalent über eine extrazellulär

liegende SEA-Domäne (englisch "*sperm protein, enterokinase and agrin*", (Zelloberflächenproteine in denen diese Domänen erstmals entdeckt wurden) miteinander verbunden sind<sup>[15]</sup> und wird vor allem von Epithelzellen der Brust, der Ovarien, des Pankreas und des Darms exprimiert. Den größten Teil des MUC1 bildet die aus 20 bis 120 Wiederholungen der Tandem Repeat-Sequenz aufgebaute VNTR-Region. Die Tandem Repeat-Sequenz besteht dabei aus den 20 Aminosäuren PAHGVTSPDTRPAPGSTAP und besitzt fünf potentielle *O*-Glycosylierungsstellen an Serin und Threonin sowie fünf Proline, die durch Helix-brechende Eigenschaften für eine gestreckte Konformation des Peptids sorgen.<sup>[16]</sup> Die massive *O*-Glycosylierung des MUC1 findet schrittweise im Golgi-Apparat statt.<sup>[17]</sup> Dabei können verschiedene Glycosylierungsschritte erfolgen, die mit Core-1 bis -8 beschrieben werden. Der erste Schritt bei diesen enzymatischen *O*-Glycosylierungen ist immer die Anbindung eines *N*-Acetylgalactosamins an Serin oder Threonin. Über die 3- und die 6-Position des Galactosamins können anschließend Verzweigungen aufgebaut werden.<sup>[18,19]</sup> Der Kettenaufbau wird durch die Übertragung von Sialinsäure oder Fucose beendet (Abb. 1.1).<sup>[20]</sup>

In Tumorzellen wird das MUC1 stark überexprimiert. Zusätzlich sind die Glycanreste des MUC1 in Tumorzellen durch die Herabregulierung der Aktivität der Core-2  $\beta$ 1,6-*N*-Acetylglucosamin-Transferase und die gleichzeitig gesteigerte Aktivität der  $\alpha$ -2,6- und der  $\alpha$ -2,3-Sialyltransferase stark verkürzt und vorzeitig sialyliert.<sup>[21–25]</sup> Man bezeichnet diese verkürzten Glycane als tumorassoziierte Kohlenhydratantigene und das unterglycosylierte MUC1 als tumorassoziiertes MUC1. In Folge der reduzierten Glycosylierung ist beim tumorassoziierten MUC1 das Peptidrückgrat dem Immunsystem leicht zugänglich und hat eine deutlich weniger gestreckte Konformation im Vergleich zum normalen MUC1 (Abb. 1.1). Zudem sind Tumorzellen durch die geringere Zelladhäsion in Folge der reduzierten Glycosylierung und der höheren Sialylierung weniger adhärent und können daher als metastasierende Zellen leicht den Zellverband verlassen und in andere Gewebe eindringen (Abb. 1.1).



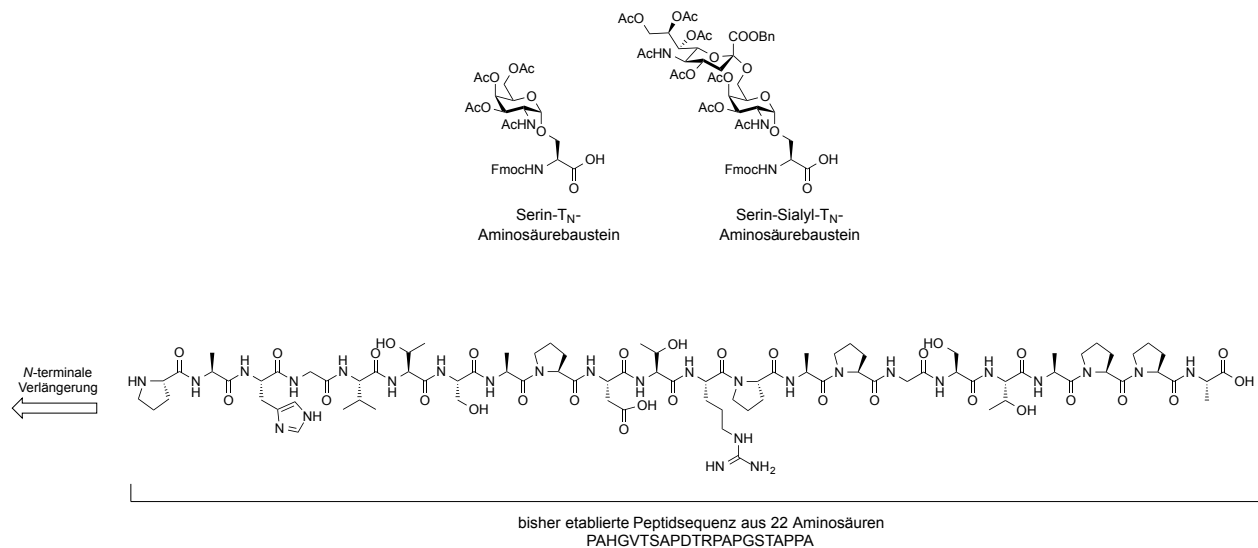
morimmuntherapie muss das Immunsystem nun so beeinflusst werden, dass es die tumorassoziierte Struktur als fremd erkennt und exklusiv gegen diese aktiviert wird. Da selbst auf einer einzelnen Tumorzelle normales MUC1 neben tumorassoziertem MUC1 vorkommt, ist eine Isolierung von reinem tumorassoziertem MUC1 aus malignen Zellen nicht möglich. Eine Immunisierung mit solchen isolierten Strukturen kann zu schweren Autoimmunreaktionen gegen gesundes Gewebe führen. Um eine spezifische Immunantwort zu induzieren, die ausschließlich gegen das tumorassoziierte MUC1 gerichtet ist, müssen die Glycopeptidantigene durch chemische Synthese so hergestellt werden, dass sie die tumorassoziierte Struktur akkurat nachbilden.



## 2 Zielsetzung

In vorangegangenen Arbeiten konnte gezeigt werden, dass vor allem durch die Anbindung vollsynthetischer MUC1-Glycopeptidantigene an Tetanus Toxoid wirksame Impfstoffe erzeugt werden, die im Tierversuch starke Immunantworten hervorrufen. Die dabei induzierten Antikörper binden mit hoher Affinität an humanen Tumorzellen.

Ziel dieser Arbeit ist die Synthese der tumorassoziierten Kohlenhydratantigene  $T_N$  und Sialyl- $T_N$  als geschützte Aminosäurebausteine (Abb. 2.1) und deren Verwendung in der Festphasenpeptidsynthese zum Aufbau neuer Glycopeptidantigene, um die Bindungsaffinitäten Vakzin-induzierter Antikörper weiter zu optimieren. Bisher lieferte eine um zwei Aminosäuren verlängerte Variante der Tandem Repeat-Sequenz (Abb. 2.1) die besten Resultate bei den immunologischen Untersuchungen. Durch *N*-terminale Verlängerung dieser Sequenz soll untersucht werden, ob die Bindungseigenschaften der Vakzin-induzierten Antikörper weiter verbessert werden können. Dabei sollen auch neue Glycosylierungsmuster evaluiert werden.



**Abb. 2.1:** Die geschützten Aminosäurebausteine  $T_N$  und Sialyl- $T_N$  (oben) und die bisher etablierte Peptidsequenz (unten).

Durch Konjugation dieser Glycopeptidantigene an Tetanus Toxoid sollen Protein-gebundene Vakzine hergestellt werden, die in einer Kooperation mit der Arbeitsgruppe von *Prof. Dr. Xxxxx* *Xxxxxxx* am *Institut für Immunologie der Universitätsmedizin Mainz* in Vakzinierungsstudien mit Versuchstieren immunologisch evaluiert werden. Im Fokus der immunologischen Untersuchun-



gen soll neben der Affinität der Vakzin-induzierten Serumantikörper zu humanen Tumorzellen vor allem die Spezifität der Antikörperbindung gegenüber normalem MUC1 stehen.

Bisherige Immunisierungen wurden mit komplettem Freund'schen Adjuvans durchgeführt. Da dieses Adjuvans aufgrund seiner starken Nebenwirkungen im Menschen nicht anwendbar ist und selbst im Tierversuch nur bedingt eingesetzt werden kann, sollen neue Formulierungsformen der Antitumorvakzine getestet werden.

Dazu sollen auch neue vollsynthetische Impfstoffe entwickelt werden, die im Vergleich zu den Proteinkonjugaten besser charakterisierbar sind und ohne externe immunstimulierende Adjuvantien auskommen. Dabei sollen vor allem neue T-Helferzell-Epitope, aber auch andere immunstimulierende Liganden verwendet werden. Die einzelnen Vakzinkomponenten sollen durch flexible immunologisch unbedenkliche Spaceramino­säuren getrennt werden, um eine gegenseitige konformative Beeinflussung zu verhindern. Durch Verknüpfung cytotoxischer T-Zell-Epitope aus der MUC1-Aminosäuresequenz mit MUC1-Glycopeptidantigenen und T-Helferzell-Epitopen sollen Mehrkomponentenvakzine aufgebaut werden, die neben einer humoralen Immunantwort auch eine cytotoxische T-Zellantwort gegen Epitheltumore erzeugen. Dadurch soll eine breitere Aktivierung des Immunsystems erreicht werden, die eine effiziente Bekämpfung bestehender Tumore ermöglicht.

### 3 Allgemeiner Teil

#### 3.1 Aufbau von synthetischen Antitumorvakzinen auf der Basis des Mucins MUC1

Die tumorassoziierte Form des Mucins MUC1 stellt ein markantes Unterscheidungsmerkmal zwischen gesunden Epithelzellen und Tumorepithelzellen dar. Um dieses Unterscheidungsmerkmal im Rahmen einer aktiven Immuntherapie gegen Tumore zu nutzen, bietet es sich an, glycosylierte Partialesequenzen aus der tumorassoziierten Form des MUC1 wie sie auf der Oberfläche von epithelialen Tumorzellen vorkommen, als B-Zell-Epitope in Antitumorvakzinen einzusetzen.<sup>[26]</sup> Eine Isolierung von tumorassoziiertem MUC1 in reiner Form aus Tumorgewebe von Patienten ist allerdings nicht möglich, da Tumorzellen aufgrund ihrer biologischen Mikroheterogenität immer beide Formen nebeneinander exprimieren. Aus diesem Grund kann es bei der Verwendung von biologisch isoliertem MUC1 im Rahmen einer aktiven Immuntherapie zur Induktion von unerwünschten Autoimmunreaktionen gegen gesundes Epithelgewebe kommen. Organisch-chemische Synthese ermöglicht den Zugang zu reinen und vollständig charakterisierbaren MUC1-Glycopeptiden in ausreichender Menge. Weiterhin bietet die Festphasenglycopeptidsynthese den Vorteil, dass sowohl Peptidsequenzen als auch Glycosylierungsmuster variiert werden können. Dadurch kann der Einfluss der Struktur des MUC1-Glycopeptids auf die Wirkung als B-Zell-Epitop gezielt untersucht und optimiert werden.

Bei der tumorassoziierten Form des MUC1 ist zwar aufgrund der reduzierten Glycosylierung dieser Proteine das Peptidrückgrat für das Immunsystem zugänglich, da es sich aber um körpereigene Strukturen handelt, weisen diese nur eine geringe Immunogenität auf. Für eine Verwendung als Antitumorvakzine sind synthetisch hergestellte MUC1-Glycopeptide alleine daher nicht in der Lage, das Immunsystem effektiv gegen Tumore zu aktivieren. Um eine T-Zell vermittelte adaptive Immunantwort zu gewährleisten, müssen die MUC1-Glycopeptidepitope mit potenten T-Helferzell-Epitopen verknüpft werden. Dazu können MUC1-Glycopeptide an stark immunogene Proteine wie z.B. Tetanus Toxoid<sup>[27]</sup> oder an einzelne T-Helferzell-Epitope<sup>[28]</sup> konjugiert werden. Eine weitere Möglichkeit zur Steigerung der Wirksamkeit von Vakzinen ist die Konjugation mit immunogenen Substanzen, wie z.B. Toll-like-Rezeptorliganden.<sup>[29,30]</sup> Diese Liganden sorgen durch Bindung an Toll-like-Rezeptoren für eine allgemeine Entzündungsreakti-

on durch Mechanismen des angeborenen Immunsystems.<sup>[31]</sup> Im Zuge dieser unspezifischen Entzündungsreaktion wird auch das adaptive Immunsystem effektiv aktiviert. Die durch Antitumorvakzine induzierte Immunantwort kann auch durch multivalente Antigenpräsentation gesteigert werden. Dazu müssen MUC1-B-Zell-Epitope und T-Helferzell-Epitope oder eine Kombination von beidem an geeignete Trägersysteme konjugiert werden.<sup>[32,33]</sup> Für eine effektive Funktion der einzelnen Komponenten ist es wichtig, dass diese in ihrer natürlichen Konformation vorliegen. Daher ist es sinnvoll die einzelnen Komponenten in einer Vakzine durch flexible Abstandhalter zu trennen.

Bei der Proteinbiosynthese werden *O*-Glycosylierungen als posttranslationale Modifikationen nach der Synthese der Proteine im Golgi-Apparat eingefügt.<sup>[34]</sup> Um bei der Synthese der MUC1-Glycopeptide einen variablen Aufbau zu ermöglichen, werden die Glycosylierungen über entsprechende Kohlenhydrataminosäurebausteine bereits während der Peptidsynthese eingeführt.

### 3.2 Synthese der tumorassoziierten Kohlenhydratantigene

Die Tandem Repeat-Sequenz besteht aus 20 Aminosäuren und besitzt insgesamt fünf potentielle *O*-Glycosylierungsstellen. Davon entfallen zwei Glycosylierungsstellen auf Hydroxyseitenketten des Serins und drei auf die des Threonins. Im Gegensatz zu gesunden Zellen ist bei epithelialen Tumorzellen die Aktivität der  $\beta$ 1,6-*N*-Acetylglucosamin-Transferase stark herabgesetzt, während die Aktivitäten von Sialyltransferasen gleichzeitig stark erhöht sind.<sup>[24]</sup> Dadurch sind die Glycanseitenketten des tumorassoziierten MUC1 stark verkürzt, und die Kettenverlängerung wird früh durch die Übertragung eines endständigen Sialinsäurerests beendet.<sup>[24][35]</sup> Für die Glycopeptidsynthesen im Rahmen dieser Arbeit wird das T<sub>N</sub>-Serin-Antigen als einfachstes aller tumorassoziierten Kohlenhydratantigene und dessen sialylierte Form, das Sialyl-T<sub>N</sub>-Serin-Antigen, verwendet. Beide Bausteine wurden *O*-glycosidisch an Serin gebunden hergestellt. An Threonin gebundenes T<sub>N</sub>-Serin-Antigen wurde Dr. XXXXXXXX XXXXXXXX, Institut für Organische Chemie, Universität Mainz zur Verfügung gestellt. In Abb. 3.1 sind die verwendeten Glycosylaminosäurebausteine für Festphasenglycopeptidsynthese gezeigt.

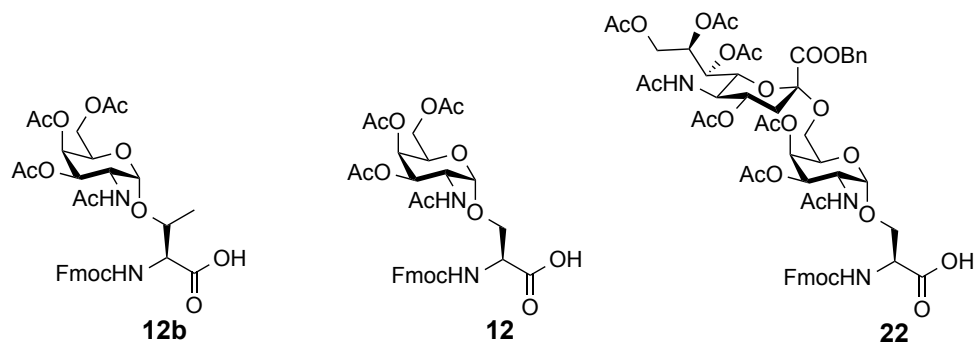


Abb. 3.1: T<sub>N</sub>-Threonin-Antigen 12b, T<sub>N</sub>-Serin-Antigen 12 und Sialyl-T<sub>N</sub>-Serin-Antigen 22 als Glycosylaminosäurebausteine für die Festphasenglycopeptidsynthese.

### 3.2.1 T<sub>N</sub>-Serin-Antigen

Für die Synthese des *N*-Acetylgalactosamin-Aminosäure-Bausteins werden zunächst zwei Vorprodukte hergestellt, die in einer nachfolgenden Glycosylierungsreaktion vereint werden und dann in weiteren linearen Synthesen zum Festphasensynthesebaustein umgesetzt werden. Zur Verwendung als Glycosylakzeptor muss die Aminosäure Serin zunächst am *N*-Terminus durch die Fmoc-Schutzgruppe und am *C*-Terminus durch die *tert*-Butyl-Schutzgruppe blockiert werden. Dies ist ein wichtiger Schritt, denn zum einen wird die für die Festphasenglycopeptidsynthese nach dem Fmoc-Protokoll<sup>[36]</sup> entscheidende Fmoc-Gruppe eingeführt und zum anderen wird durch die beiden Schutzgruppen der pH-Bereich festgelegt, in dem alle nachfolgenden Reaktionen ablaufen müssen. Zur Einführung der Fmoc-Gruppe wird *L*-Serin **1** mit einer äquimolaren Menge an *N*-(9*H*-Fluoren-9-yl-methoxycarbonyl)-succinimidylcarbonat und zwei Äquivalenten Triethylamin mit einer Ausbeute von 87% zum Fmoc-Serin-Derivat **2** umgesetzt.<sup>[37]</sup> Die *C*-terminale *tert*-Butylgruppe wird über eine Kupfer(I)-katalysierte Veresterung durch Aktivierung mit Dicyclohexylcarbodiimid (DCC) zum Aminosäureester Fmoc-Serin-*Ot*Bu **3** umgesetzt.<sup>[38,39]</sup> Der Umsatz der Reaktion wird alle 30 min durch Dünnschichtchromatographie verfolgt, und die Reaktion wird beendet, sobald die Entstehung des seitenkettengeschützten *tert*-Butylethers zu beobachten ist. Der orthogonal blockierte Glycosylakzeptor **3**, der nun ausschließlich über die freie Hydroxylfunktion reagieren kann, wird mit einer Ausbeute von 70% über zwei Stufen erhalten (Abb. 3.2).

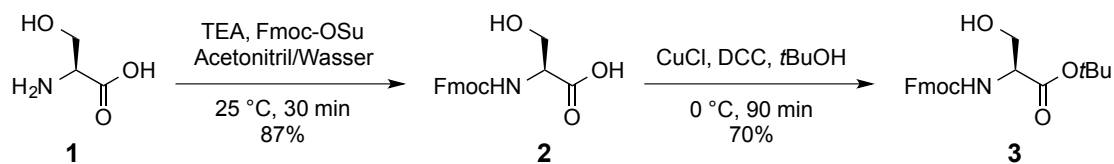


Abb. 3.2: Darstellung des *N*- und *C*-terminal blockierten L-Serins 3.

Der Glycosylakzeptor wird aus *D*-Galactose hergestellt. Dazu wird diese zunächst in einer zweistufigen Eintopfreaktion mit Essigsäureanhydrid und katalytischen Mengen Perchlorsäure peracetyliert. Der Reaktionsansatz wird anschließend ohne weitere Reinigung mit 33%iger Bromwasserstoffsäure in Eisessig versetzt. Mit einer Ausbeute von 93% wird selektiv das  $\alpha$ -Bromid erhalten (Abb. 3.3).<sup>[40]</sup>

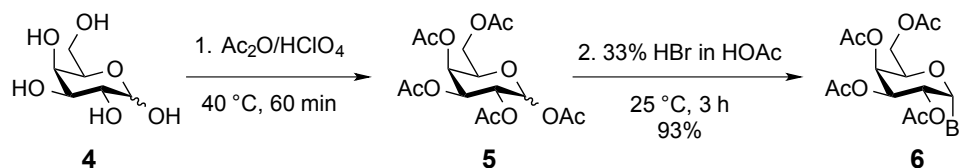
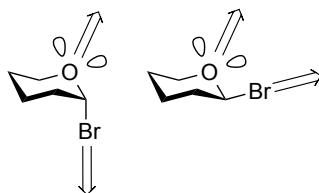


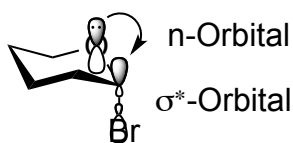
Abb. 3.3: Darstellung des acetylierten  $\alpha$ -Galactosylbromids 6.

Diese Selektivität kann durch den anomeren Effekt begründet werden. Zunächst wird durch die Bromwasserstoffsäure die anomere Acetylgruppe protoniert und anschließend eliminiert. Dabei entsteht ein intermediäres mesomeriestabilisiertes Carbeniumion, das nun nukleophil von einem Bromidion angegriffen werden kann. Aus sterischen Gründen ist bei cyclischen Kohlenhydraten in Sesselform die  $\beta$ -Konfiguration bevorzugt. Allerdings wird bei elektronegativen Substituenten an der C1-Position von cyclischen Kohlenwasserstoffen öfter beobachtet, dass die axiale Position bevorzugt ist. Durch die Betrachtung der Dipolmomente der freien Elektronenpaare am Ringsauerstoff sowie des Dipolmoments der anomeren Gruppe kann diese Präferenz begründet werden. Steht die elektronegative Gruppe am anomeren C-Atom in der axialen Position, heben sich die Dipolmomente gegenseitig auf. Dagegen addieren sie sich, wenn die elektronegative Gruppe in der äquatorialen Position steht. Die Addition der Dipolmomente ist energetisch ungünstiger und damit weniger bevorzugt (Abb. 3.4).



**Abb. 3.4:** Partielle Aufhebung der Dipolmomente bei axialer Stellung (links) und Addition der Dipolmomente bei äquatorialer Anordnung (rechts) der anomeren Gruppe.

Die bevorzugte axiale Anordnung des Bromids kann auch durch die energetisch günstigere Wechselwirkung der freien Elektronenpaare des Ringsauerstoffs mit dem nicht besetzten  $\sigma^*$ -Orbital der C1-Bromid-Bindung erklärt werden. Diese Wechselwirkung führt zu einer Delokalisierung der Bindungselektronen und ist damit energetisch günstiger. Die Delokalisation ist nur möglich, wenn die beiden Orbitale periplanar (parallel) zueinander stehen. Wenn das Bromid äquatorial angeordnet ist, können die Bindungselektronen des n-Orbitals des Ringsauerstoffs zwar auch in das nun axial stehende nicht besetzte  $\sigma^*$ -Orbital der C1-Wasserstoff-Bindung delokalisieren, jedoch ist diese Wechselwirkung aufgrund der geringeren Elektronegativität des Wasserstoffs in diesem Fall energetisch ungünstiger. Dieser Effekt wird auch als Hyperkonjugation bezeichnet (Abb. 3.5).<sup>[41]</sup>



**Abb. 3.5:** Hyperkonjugation bei axialer Anordnung des Bromids.

Das  $\alpha$ -Bromid **6** wird nun in einer reduktiven Eliminierung durch Reaktion mit Essigsäure und Zinkstaub, der zuvor durch Kupfersulfatlösung aktiviert wurde, mit einer Ausbeute von 65% zum 3,4,6-Tri-*O*-acetylgalactal **7** umgesetzt (Abb 3.6).<sup>[42]</sup>

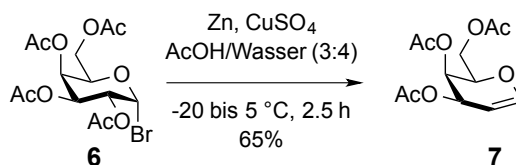


Abb. 3.6: Reduktive Eliminierung zum 3,4,6-Tri-*O*-acetylgalactal **7**.

Der Glycosyldonor muss später  $\alpha$ -*O*-glycosydisch mit dem blockierten Serringlycosylakzeptor verknüpft werden. Damit dies gelingt, darf der Substituent des Glycosyldonors in der C2-Position nicht nachbargruppenaktiv sein, da die Reaktion sonst bevorzugt in Richtung des  $\beta$ -Anomers verläuft. Gleichzeitig sollte der C2-Substituent sich nach der Glycosylierung leicht in die *N*-Acetylamidogruppe überführen lassen. Über die Doppelbindung des Galactals **7** kann in einer von *R. U. Lemieux* ausgearbeiteten Azidonitratisierungsreaktion neben der Nitratgruppe in der C1-Position selektiv eine Azidfunktion in der Position C2 eingefügt werden, die beiden Anforderungen gerecht wird.<sup>[43]</sup> Dazu wird das Galactal **7** bei einer Temperatur von  $-18$  °C unter Ausschluss von Licht und Wasser mit Cer(IV)ammoniumnitrat und Natriumazid in absolutem Acetonitril unter Argonatmosphäre umgesetzt. Da das zuvor am Hochvakuum getrocknete Cer(IV)ammoniumnitrat zur Verklumpung neigt, ist es wichtig, den Reaktionsansatz über die gesamte Reaktionsdauer mit einem KPG-Rührer kräftig zu mischen. Das Azidonitrat **8** konnte als anomeres Gemisch in einer Ausbeute von 72% erhalten werden (Abb. 3.7).

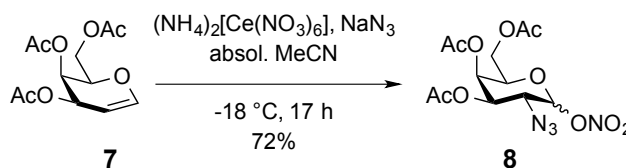


Abb. 3.7: Azidonitratisierung nach Lemieux.

Für die Azidonitratisierung wird ein radikalischer Mechanismus vorgeschlagen.<sup>[44]</sup> Dabei wird das Azid durch Oxidation mit Cer(IV)ammoniumnitrat zum Azidradikal umgesetzt. Dieses reagiert nun unter Ausbildung der cyclischen Zwischenstufe **7a** mit der Doppelbindung des Galactals, wobei das Radikal erhalten bleibt. Das Azidradikal reagiert in der sterisch günstigeren äquatorialen Position. Durch einen Einelektronentransfer auf ein weiteres Cer(IV)-Ion wird das

gebildete Radikal zum intermediären Oxocarbeniumion **7b** oxidiert, das nun durch Reaktion mit einem Nitrat zum anomeren Azidonitrat **8** umgesetzt wird (Abb. 3.8).

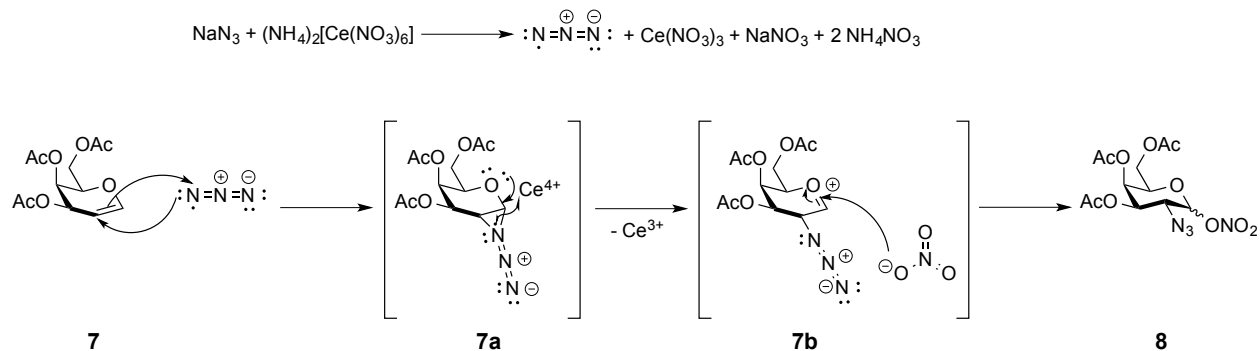


Abb. 3.8: Vorgeschlagener Mechanismus der Azidonitratisierung nach Lemieux.

In einer weiteren Reaktion mit wasserfreiem Lithiumbromid in absolutem Acetonitril wird das gemischte Anomer **8** zum Glycosyldonor **9** umgesetzt. Aufgrund des zuvor beschriebenen anomeren Effekts wird mit einer Ausbeute von 87% bevorzugt das  $\alpha$ -Anomer erhalten (Abb. 3.9).<sup>[43]</sup>

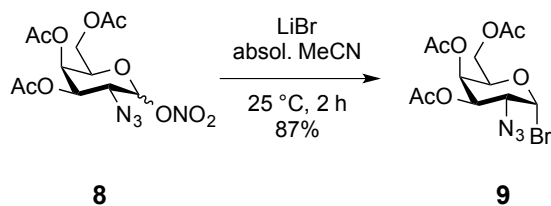


Abb. 3.9: Synthese des Azidobromids **9**.

Da das Azidobromid **9** leicht hydrolysiert, wird es in der folgenden *Königs-Knorr*-Glycosylierung nach *Paulsen* direkt mit dem *N*- und *C*-terminal blockiertem Seringlycosylakzeptor **3** umgesetzt (Abb. 3.10).<sup>[45,46]</sup> Dazu werden wasserfreies Silberperchlorat und Silbercarbonat als Promotoren eingesetzt, die durch Eliminierung von Silberbromid das mesomeriestabilisierte Oxocarbeniumion **9a** generieren. Dieses kann anschließend von der funktionellen Hydroxygruppe des blockierten Serins **3** nucleophil angegriffen werden. Da die Azid-Gruppe in der C2-Position



keinen Nachbargruppeneffekt ausübt, entsteht aufgrund des anomeren Effekts bevorzugt das  $\alpha$ -Anomer (Abb. 3.11).

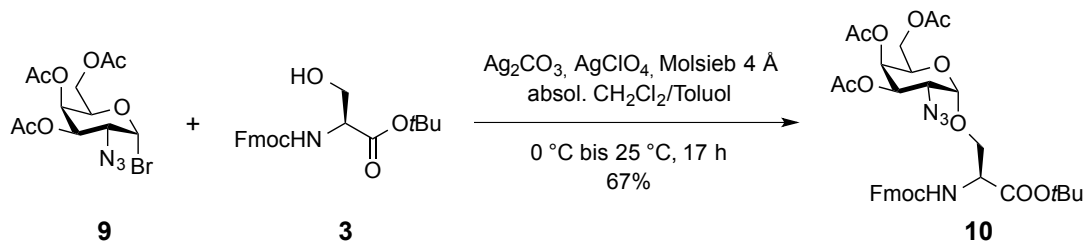


Abb. 3.10: Herstellung der Glycosylaminosäure **10** nach *Königs-Knorr* in einer Variante nach *Paulsen*.

Um die Stereoselektivität der Reaktion weiter in Richtung des kinetisch stabileren  $\alpha$ -Anomers zu lenken, wird die Reaktion zunächst bei 0 °C unter Eiskühlung gestartet. Erst im Laufe der Reaktion wird langsam auf Raumtemperatur erwärmt. Wegen der räumlich anspruchsvollen Reaktionspartner entsteht trotzdem ein geringer Anteil des sterisch begünstigten  $\beta$ -Anomers. Aufgrund der Lichtempfindlichkeit der Silbersalze wird die Reaktion unter Lichtausschluss durchgeführt. Die während der Reaktion entstehende Säure wird durch das Carbonat des Silbercarbonatsalzes neutralisiert. Die  $\alpha$ -Glycosyl-aminosäure **10** konnte in einer Ausbeute von 67% isoliert werden.

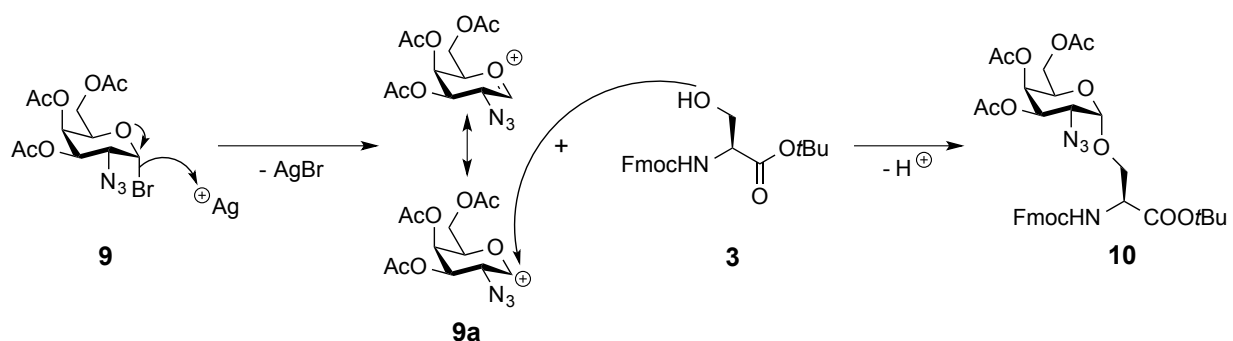


Abb. 3.11: Mechanismus der Glycosylierungsreaktion.

Um das komplett blockierte T<sub>N</sub>-Serin-Antigen zu erhalten, muss die Azidgruppe in der C2-Position reduziert und gleichzeitig acetyliert werden. Dazu wird die  $\alpha$ -Glycosylaminosäure **10** mit Zink, das zuvor durch Kupfersulfatlösung aktiviert wurde, in einem Lösungsmittelgemisch

aus Tetrahydrofuran, Essigsäureanhydrid und Essigsäure (3:2:1) umgesetzt. Die Reaktion lieferte das vollständig geschützte T<sub>N</sub>-Serin-Antigen **11** in einer Ausbeute von 68% (Abb. 3.12).<sup>[47]</sup>

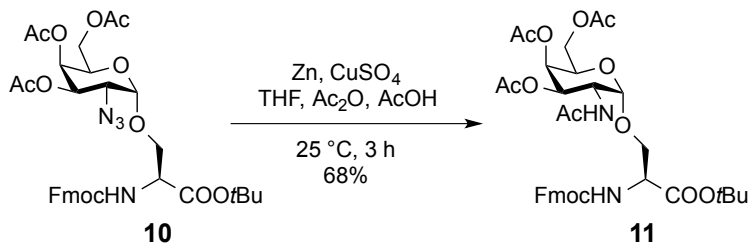


Abb. 3.12: Reduktion und *N*-Acetylierung zum vollständig blockiertem T<sub>N</sub>-Serin-Antigen.

Damit das vollständig blockierte T<sub>N</sub>-Serin-Antigen **11** als Baustein in der Glycopeptidfestphasensynthese eingesetzt werden kann, muss die säurelabile *tert*-Butylschutzgruppe am C-Terminus durch eine Acidolyse mit Trifluoressigsäure in Wasser und Dichlormethan entfernt werden. Der C-terminal deblockierte α-Glycosylaminosäurebaustein **12** konnte dabei quantitativ erhalten werden (Abb. 3.13).<sup>[48]</sup>

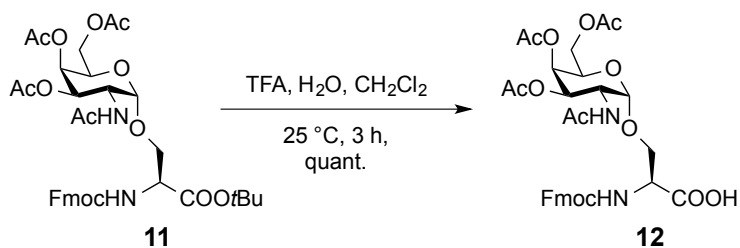


Abb. 3.13 Acidolyse der C-terminalen *tert*-Butylschutzgruppe.

Insgesamt konnte der T<sub>N</sub>-Baustein ausgehend von D-Galactose in einer Ausbeute von 17% über acht lineare Stufen hergestellt werden.

### 3.2.2 Sialyl-T<sub>N</sub>-Serin-Antigen

Aufgrund der Herabregulierung der β1,6-*N*-Acetylglucosamin-Transferase und der gesteigerten Aktivität von Sialyltransferasen sind in Epitheltumorzellen die Glycosylierungen der Mucine

verkürzt und meist vorzeitig sialyliert. Das Sialyl-T<sub>N</sub>-Serin-Antigen ist das einfachste tumorassoziierte Kohlenhydratantigen, das diese beiden Eigenschaften in sich vereint und könnte dadurch besonders geeignet für den Aufbau von Antitumorvakzinen sein. Die Synthese der Kohlenhydratantigene wird nach dem Baukastenprinzip bewerkstelligt. Daher wird als Ausgangsprodukt für die Synthese des Sialyl-T<sub>N</sub>-Bausteins das zuvor hergestellte vollständig geschützte T<sub>N</sub>-Serin-Antigen **11** als Glycosylakzeptor verwendet. Damit dieser Baustein über die C6-Position O-glycosydisch mit dem Sialyldonor verknüpft werden kann, müssen zunächst die Acetylenschutzgruppen in der 3-, 4- und 6-Position entfernt werden. Dazu wird der Baustein **11** in methanolischer Natriummethanolat umgesetzt, wobei die Deacetylierung ab einem pH-Wert von 8.5 erfolgt. Dieser pH-Wert sollte aufgrund der Basenlabilität der Fmoc-Gruppe und der sonst einsetzenden  $\beta$ -Eliminierung von N-Acetylgalactose nicht überschritten werden.<sup>[49,50]</sup> Da im Laufe der Reaktion kontinuierlich Natriummethanolat verbraucht wird, muss der pH-Wert in regelmäßigen Abständen durch Zugabe von methanolischer Natriummethanolatlösung sorgfältig neu eingestellt werden (Abb. 3.14).

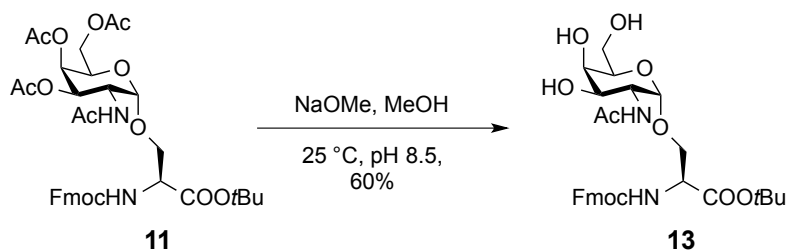


Abb. 3.14: Synthese des Sialylakzeptors **13**.

Mechanistisch betrachtet beginnt die Deacetylierung aufgrund der höheren Reaktivität des primären Esters an der C6-Position. Nach einem nucleophilen Angriff des Methanolats wird durch eine Umesterung Essigsäuremethylester abgespalten. Das primäre Alkoholat **11a** reagiert nun mit dem Carbonylkohlenstoff der benachbarten Acetylgruppe. Auf diese Weise wandern nun alle Acetylgruppen zur C6-Position und werden dort durch Umesterung mit Natriummethanolat als Essigsäuremethylester abgespalten (Abb. 3.15).

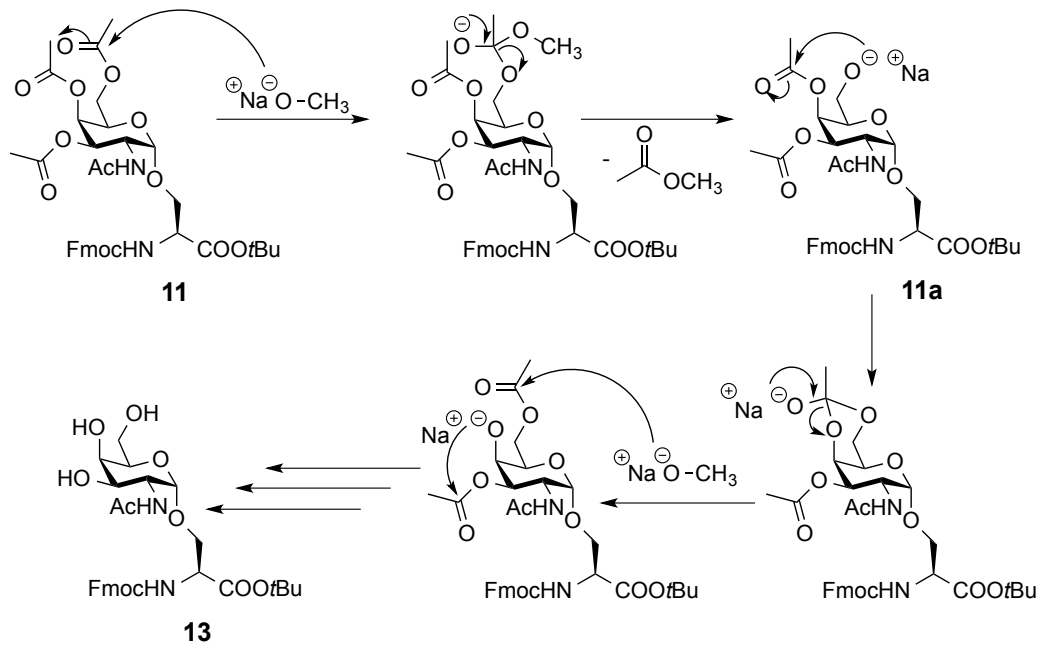


Abb. 3.15: Mechanismus der Deacetylierung.

Zur Synthese des Sialyl-T<sub>N</sub>-Serin-Antigens wird ein Sialinsäuredonor benötigt, der mit der 6-Hydroxyfunktion des Glycosylakzeptors **13** zum  $\alpha$ -Anomer reagiert. In guten Ausbeuten gelingt dies mit dem Ethylxanthogenatdonor **18**, der von A. Marra und P. Sinay<sup>[51]</sup> entwickelt wurde und sich im Arbeitskreis von Prof. Kunz als zuverlässige Methode etabliert hat.<sup>[52]</sup> Der Sialinsäuredonor **18** wird in einer vierstufigen Reaktionssequenz ausgehend von *N*-Acetylneuraminsäure **14** hergestellt.

Dazu wird *N*-Acetylneuraminsäure **14** quantitativ durch Reaktion mit Essigsäureanhydrid in Pyridin zum peracetylierten Derivat **15** umgesetzt (Abb. 3.16).<sup>[53]</sup> Durch Deprotonierung mit Caesiumcarbonat und anschließende Reaktion mit Benzylbromid konnte das vollständig blockierte *N*-Acetylneuraminsäurederivat **16** in 70%iger Ausbeute hergestellt werden (Abb. 3.16).<sup>[53,54]</sup>

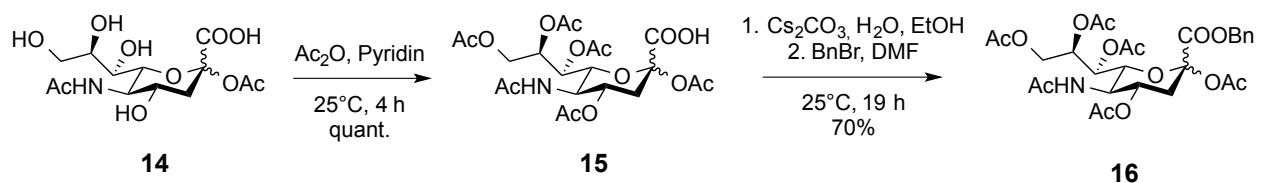


Abb. 3.16: Blockierung der *N*-Acetylneuraminsäure.

Dieses wird mit Acetylchlorid und katalytischen Mengen Wasser zum Chlorid **17** und anschließend mit Kaliumxanthogenat in Ethanol zum Glycosyldonor **18** umgesetzt (Abb. 3.17).<sup>[51,53]</sup>

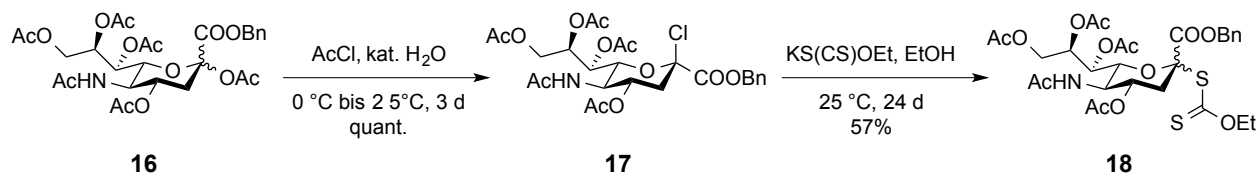


Abb. 3.17: Darstellung des Sialinsäuredonors **18**.

Zur Aktivierung des Xanthogenates **18** für die Glycosylierungsreaktion wird dieses mit einer frisch hergestellten Methylsulphenylbromid-Lösung in Gegenwart von Silbertriflat umgesetzt. Das dabei *in situ* entstehende Methylsulphenyltriflat reagiert mit dem Thiocarbonat-Schwefel zum Disulfid **18a**. Durch Eliminierung des Dithioxanthogenats entsteht nun das intermediäre mesomeriestabilisierte Glycosyloxocarbeniumion **18b** (Abb. 3.18).<sup>[55,56]</sup>

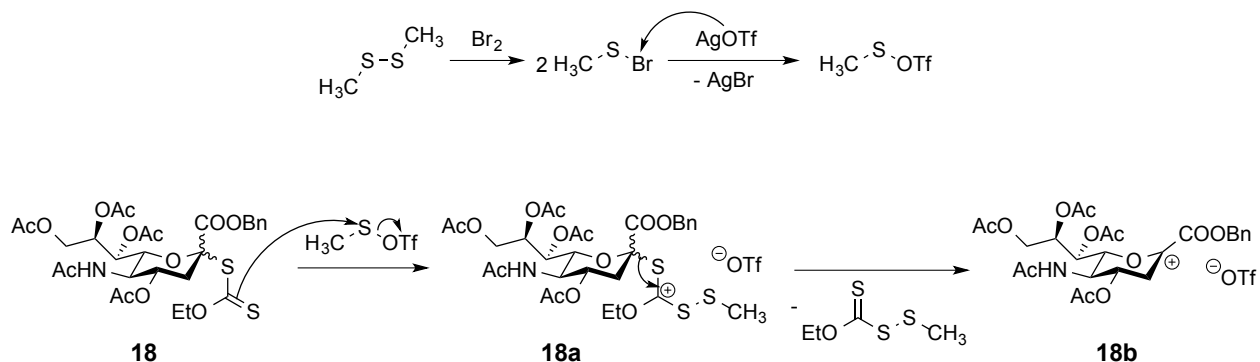


Abb. 3.18: Aktivierung des Glycosyldonors **18** mit Methylsulphenylbromid.

Die stereoselektive Reaktion des aktivierten Donors **18b** mit dem Glycosylakzeptor **13** ist unter vielen Gesichtspunkten schwierig. Der aktivierte Glycosyldonor **18b** kann leicht durch Eliminierung eines Protons in der Position C3 zum Glycal **18c** umgesetzt werden, da die elektronenziehende Carboxyfunktion das Oxocarbeniumion **18b** destabilisiert. (Abb. 3.19). Um drohenden Ausbeuteverlust zu steuern, wird der Glycosyldonor **18** im zweifachen Überschuss in der Reaktion eingesetzt.<sup>[57]</sup>

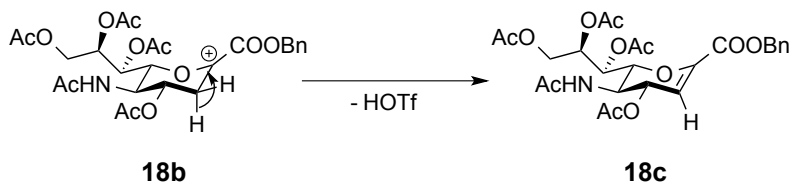


Abb. 3.19: Nebenreaktion des aktivierten Glycosyldonors **18b** zum Glycal **18c**.

Auch das sterisch anspruchsvolle tertiäre Oxocarbenium des aktivierten Glycosyldonors **18b** hemmt die Reaktion. Das Fehlen einer dirigierenden Nachbargruppe an der C3-Position erschwert zusätzlich eine stereoselektive Umsetzung. Die Stereoselektivität der Glycosylierung kann lediglich durch die Wahl des Lösungsmittels und der Temperatur in Richtung des gewünschten  $\alpha$ -Anomers beeinflusst werden.<sup>[58]</sup> Bei hohen Temperaturen koordiniert Acetonitril bevorzugt in der thermodynamisch begünstigten  $\beta$ -Position an das Oxocarbenium des aktivierten Glycosyldonors **18e**. Dies führt bei der Glycosylierung bevorzugt zum ungewünschten  $\beta$ -Sialosid. Bei tiefen Temperaturen dagegen (kinetische Kontrolle) lagert sich Acetonitril bevorzugt in axialer Position an das Oxocarbenium des aktivierten Glycosyldonors **18d** an. Folglich entsteht bei tiefen Temperaturen das gewünschte  $\alpha$ -Sialosid **19a** bevorzugt gegenüber dem  $\beta$ -Sialosid **19b** (Abb. 3.20).<sup>[57,59]</sup>

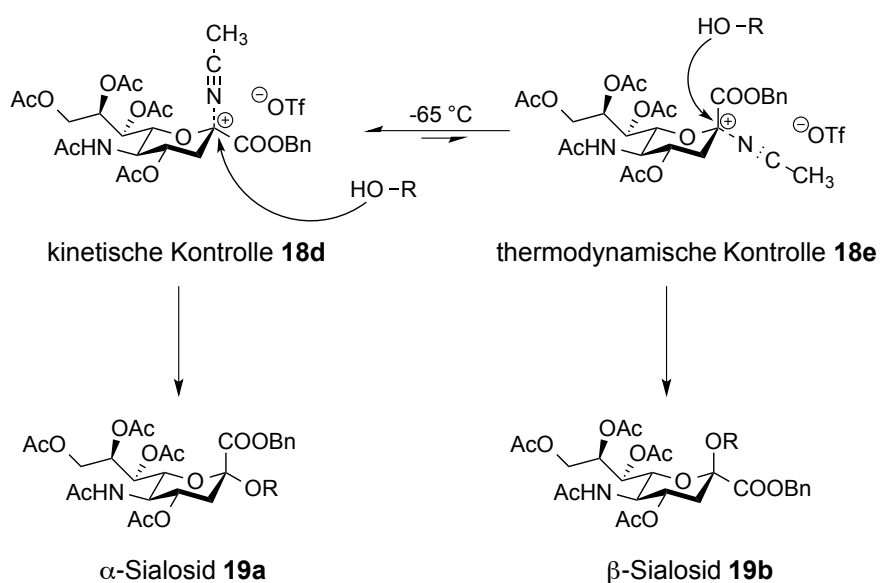


Abb. 3.20: Kontrolle der Stereoselektivität bei der Sialylierung über den Nitrileffekt.

Die Regioselektivität der Reaktion kann sowohl durch die höhere Reaktivität der primären OH-Gruppe in der 6-Position als auch durch deren geringere sterische Hinderung begründet werden.<sup>[60]</sup> Da die Reaktion bei  $-65\text{ }^{\circ}\text{C}$  und damit unterhalb des Schmelzpunkts von Acetonitril durchgeführt wird, muss ein Lösungsmittelgemisch verwendet werden, das einen niedrigeren Gefrierpunkt hat. Für die Sialylierung wird Acetonitril/Dichlormethan im Verhältnis 2 : 1 verwendet. Unter diesen Bedingungen konnte eine Ausbeute von 47% bezogen auf den Glycosylakzeptor **13** erzielt werden. Zusätzlich konnten bei der flashchromatographischen Reinigung an Kieselgel 45% nicht umgesetzter Glycosylakzeptor **13** wiedergewonnen werden. Insgesamt ergibt sich daher eine Ausbeute von 85% bezogen auf den Umsatz des Glycosylakzeptors **13** (Abb. 3.21).

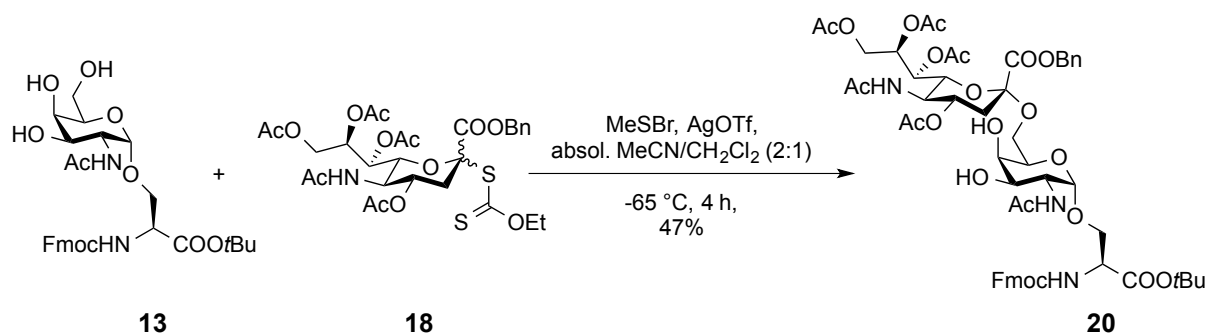


Abb. 3.21: Sialylierungsreaktion Sialyl-T<sub>N</sub>-Serin-Antigen Derivat **20**.

Damit der Baustein in der Festphasenglycopeptidsynthese eingesetzt werden kann, müssen die Hydroxygruppen an der Position C3 und C4 durch Umsetzung des Sialyl-T<sub>N</sub>-Derivats **20** mit Acetanhydrid in Pyridin und katalytischen Mengen 4-Dimethylamino)-pyridin (DMAP) acetyliert werden.<sup>[38]</sup> Abschließend muss der *tert*-Butyl-geschützte C-Terminus mit Trifluoressigsäure in Dichlormethan und Wasser deblockiert werden. Damit konnte der Sialyl-T<sub>N</sub>-Serin-Festphasenbaustein **22** in quantitativer Ausbeute über die beiden letzten Stufen erhalten werden (Abb. 3.22).

Mit der Synthese des T<sub>N</sub>-Serin-Bausteins **12** und des Sialyl-T<sub>N</sub>-Serin-Bausteins **22** sind zwei tumorassoziierte Kohlenhydratantigene verfügbar, die nun flexibel in der Festphasensynthese zum Aufbau von Glycopeptiden eingesetzt werden können.

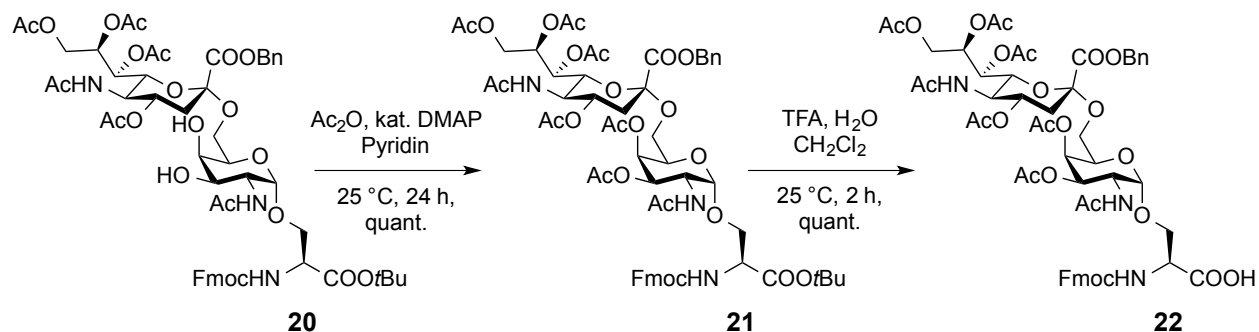


Abb. 3.22: Acetylierung der C3- und C4-Position und Deblockierung des C-Terminus zum Sialyl-T<sub>N</sub>-Festphasenbaustein 22.

### 3.3 Synthese eines Triethylglycol-Abstandhalters als Baustein für die Festphasenpeptidsynthese

Da die tumorassoziierten Glycopeptide aus Partialsequenzen des Mucins MUC1 selbst nicht besonders immunogen sind, werden sie mit immunogenen T-Helferzell-Epitopen verknüpft bzw. an immunogene Proteine konjugiert. Auch eine Verknüpfung von MUC1-B-Zell-Epitop, T-Helferzell-Epitop mit einem zusätzlichen immunstimulierenden Adjuvans zu einer Dreikomponentenvakzine ist möglich. Unabhängig vom Aufbau der Vakzine muss für eine optimale Wirkung sichergestellt sein, dass alle einzelnen Komponenten weitgehend ihre natürliche Konformation einnehmen können und sich gegenseitig nicht beeinflussen. Aus diesem Grund ist es sinnvoll, einzelne Vakzinkomponenten durch einen Abstandhalter zu trennen (Abb. 3.23). Dabei werden an einen solchen Abstandhalter drei zentrale Forderungen gestellt. Der Abstandhalter muss in der Festphasenpeptidsynthese leicht als Baustein eingesetzt werden können und daher über einen Fmoc-geschützten *N*-Terminus sowie einen *C*-Terminus verfügen, damit er über eine natürliche Peptidbindung eingebaut werden kann. Unter physiologischen Bedingungen soll der Abstandhalter eine gewisse Distanz zwischen zwei Vakzinkomponenten herstellen und zugleich sehr flexibel sein. Für eine Verwendung im Menschen sollte der Abstandhalter selbst nicht immunogen und physiologisch unbedenklich sein. All diesen Anforderungen wird die in der Arbeitsgruppe Kunz etablierte Triethylglycolspaceraminosäure **29** gerecht.<sup>[61,62]</sup>



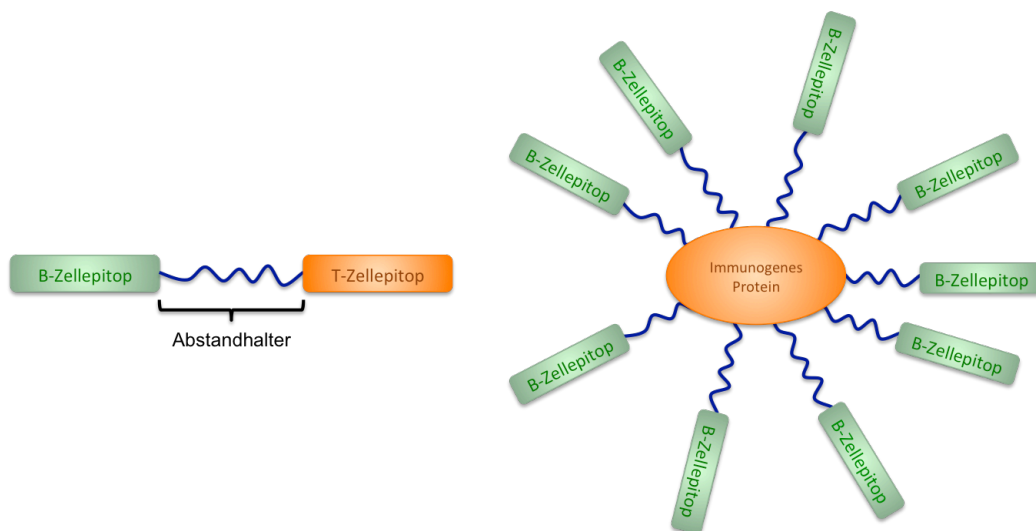


Abb. 3.23: Verwendung eines Abstandhalters zum Aufbau von Vakzinen.

Die Synthese des Spaceraminosäurebausteins für die Festphasensynthese beginnt mit der Addition von Triethylglycol **23** an Acrylsäure-*tert*-butylester **24** in THF. Die Hydroxyfunktion des resultierenden Additionsprodukts **25** wird anschließend durch Reaktion mit Mesylchlorid und Triethylamin in Dichlormethan mesyliert und in einer nucleophilen Substitution mit Natriumazid substituiert. Das Azid **26** wird nun mit Wasserstoff und Raney-Nickel als Katalysator in Isopropanol zum Amin **27** reduziert. Für den Einsatz in der Festphasenpeptidsynthese muss der *N*-Terminus der Spaceraminosäure durch Reaktion mit Fmoc-OSu in Aceton/Wasser blockiert werden. Abschließend wird die *C*-terminale *tert*-Butyl-Schutzgruppe durch Umsatz mit Trifluoressigsäure in Wasser entfernt (Abb. 3.24).

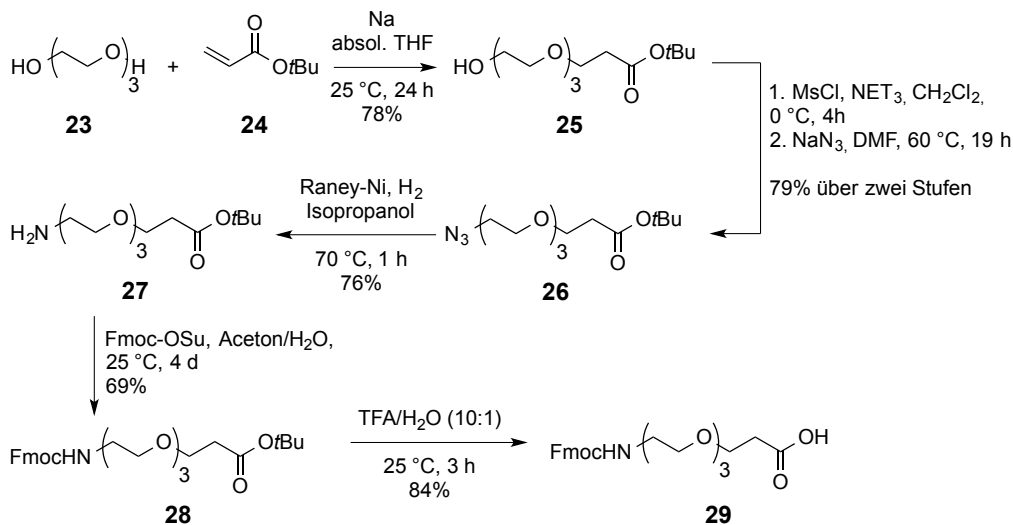


Abb. 3.24: Synthese des Fmoc-Spaceraminosäurebausteins 29.

Der Fmoc-geschützte Triethylenglycolaminosäurebaustein konnte mit einer Gesamtausbeute von 27% über sechs Stufen hergestellt werden.<sup>[61,62]</sup>

### 3.4 Synthese der Peptide und Glycopeptide

Die synthetischen Antitumorvakzine auf der Basis des Mucins MUC1, die im Rahmen dieser Arbeiten synthetisiert werden sollen, sind aus verschiedenen Komponenten aufgebaut. Jedoch haben alle Vakzine die Gemeinsamkeit, dass sie eine Partiaalsequenz des Mucins MUC1 beinhalten, die eine teilweise Glycosylierung mit tumorassoziierten Kohlenhydraten aufweist, wie sie auf Tumorzellen vorkommt.<sup>[23,63]</sup> Diese Sequenz kann von B-Zellen durch Bindung an den B-Zellrezeptor erkannt werden und dient als B-Zell-Epitop. Da es sich bei diesen Glycopeptidsequenzen um körpereigene Strukturen handelt, ist das B-Zell-Epitop allein aufgrund seiner geringen Immunogenität nicht dazu in der Lage, als vollwertiges Antigen zu fungieren, um eine starke Immunantwort auszulösen. Dementsprechend muss das B-Zell-Epitop, das ein Hapten darstellt, an ein potentes Immunogen gebunden werden.<sup>[64,65]</sup> Dazu eignen sich neben immunogenen Proteinen auch einzelne T-Helferzell-Epitope oder auch Kombinationen von T-Helferzell-Epitopen mit immunstimulierenden Adjuvantien. Ein funktionierendes T-Zell-Epitop ist in jedem Fall zwingend notwendig, um über eine von T-Zellen vermittelte B-Zellantwort die Produktion protektiver Antikörper anzuregen.<sup>[66]</sup> Nach der Darstellung der tumorassoziierten

Kohlenhydratantigenbausteine ist somit deren Einsatz im Zuge der Festphasensynthese zum Aufbau von Glycopeptiden der nächste Schritt bei der Synthese von Antitumorvakzinen.

### 3.4.1 Festphasensynthese von Peptiden und Glycopeptiden

Die Verkürzung und vorzeitige Sialylierung der Glycosylseitenketten des MUC1 auf der Oberfläche von Epitheltumorzellen lässt sich auf eine geänderte Enzymaktivität in den Tumorzellen zurückführen. Während die  $\beta$ 1,6-*N*-Acetylglucosamin-Transferase herabreguliert ist, werden Sialyltransferasen hochreguliert. Da die Aktivität dieser Enzyme nie vollständig an- bzw. abgeschaltet ist, kann zu einem geringen Anteil auch normales MUC1 auf Tumorzellen exprimiert werden. Dies macht eine reine Isolierung von natürlichen tumorassoziertem MUC1 nahezu unmöglich. Um eine Autoimmunantwort gegen gesundes Gewebe zu verhindern, ist es daher zwingend notwendig, chemisch exakt definierte Strukturen in potentiellen Antitumorvakzinen herzustellen, die ausschließlich auf der tumorassozierten Form des MUC1 basieren. Auch für die genaue Aufklärung von Struktur-Wirkungsbeziehungen sind exakt definierte Glycopeptide unabkömmlich. Die chemische Totalsynthese ist daher die einzige Möglichkeit, um Glycopeptide mit variablen Glycosylierungsmuster, chemisch rein und in ausreichender Menge zu erhalten.

Die von *R. B. Merrifield* im Jahr 1963 erstmals durchgeführte Synthese von Peptiden an der festen Phase hat sich zur effizientesten Methode zur Darstellung von Peptiden mit einer Länge von bis zu 50 Aminosäuren entwickelt.<sup>[67]</sup> Dabei ist die Startaminosäure über einen Anker an ein Polymer gebunden. Der Vorteil besteht darin, dass der wachsende Peptidstrang während der Synthese an der polymeren festen Phase verbleibt. Dadurch können überschüssige Aminosäuren und Reagenzien durch Filtrieren einfach abgetrennt werden, während der gebundene Peptidstrang im Reaktor verbleibt und sofort für einen neuen Kupplungszyklus bereitsteht. Die in dieser Arbeit hergestellten Peptide werden an der festen Phase nach dem Fmoc-Protokoll hergestellt. Die Startaminosäure ist dabei C-terminal an eine polymere Matrix gebunden und der N-Terminus der Startaminosäure ist mit der basenlabilen Fmoc-Schutzgruppe blockiert. Funktionelle Aminosäureseitenketten sind orthogonal stabil mit säurelabilen Schutzgruppen blockiert.<sup>[68]</sup> Dadurch kann nach jedem Kupplungszyklus selektiv der N-Terminus deblockiert

werden und mit der nächsten Aminosäure umgesetzt werden. Wenn die entsprechenden Fmoc-Bausteine vorhanden sind, können durch Automatisierung dieses Ablaufs Peptide schnell und effizient hergestellt werden. Im folgenden Kapitel werden zunächst die verwendeten Schutzgruppen und Kupplungsreagenzien beschrieben.

### 3.4.2 Materialien, Reagenzien und allgemeiner Ablauf für die Festphasenpeptidsynthese nach der Fmoc-Strategie

Damit die Synthese von Peptiden und Glycopeptiden erfolgreich verläuft, müssen alle Komponenten der Synthese optimal aufeinander abgestimmt sein. Die Schutzgruppen der einzelnen Bausteine sowie die Bindung des Peptidstrangs zum Harz müssen unter den Kupplungsbedingungen stabil sein. Gleichzeitig müssen die Kupplungsreagenzien unter diesen Bedingungen optimal funktionieren. Bei der Kupplung von glycosylierten Aminosäuren muss darauf geachtet werden, dass unter den Reaktionsbedingungen keine  $\beta$ -Eliminierung des Kohlenhydrats eintritt. Als basenlabile Schutzgruppe zur Blockierung des *N*-Terminus hat sich die Fluorenylmethoxycarbonyl-(Fmoc)-Schutzgruppe etabliert. Diese lässt sich unter milden Bedingungen in einer verdünnten Piperidinlösung zuverlässig und in nahezu quantitativer Umsetzung als Dibenzofulven-Piperidin-Addukt **33** abspalten (Abb. 3.25).<sup>[36,69]</sup>

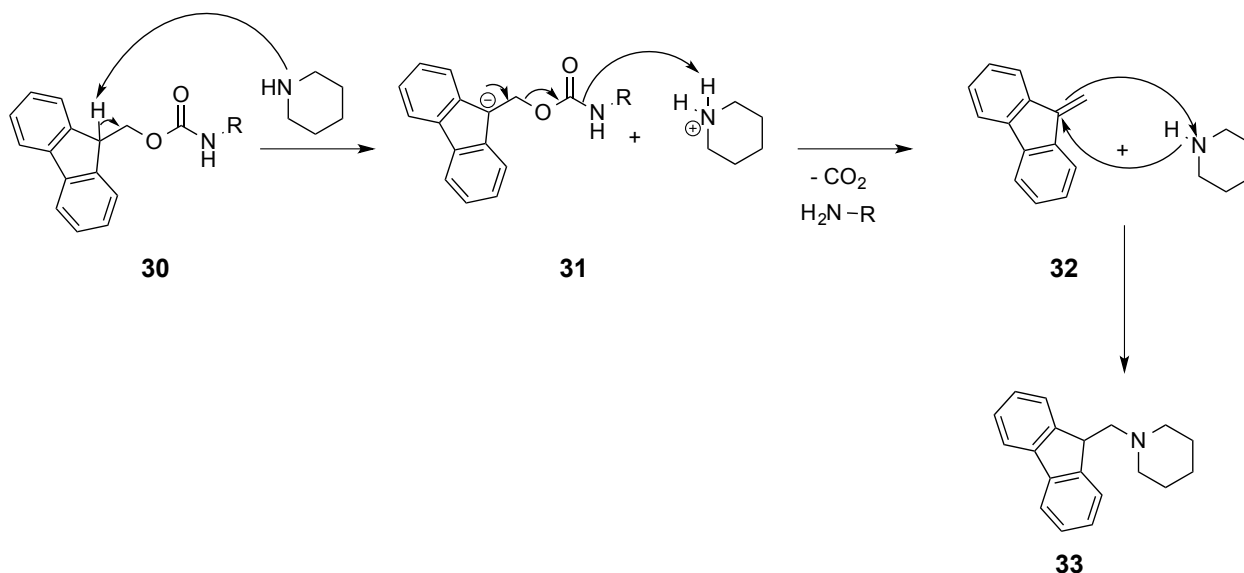


Abb. 3.25: Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe durch Piperidin.

Da das Dibenzofulven-Piperidin-Addukt **33** stark UV-aktiv ist, kann durch einen UV-Detektor über die Messung der UV-Absorption der Abspaltlösung ein Rückschluss über die Effektivität des vorherigen Kupplungsschritts getroffen werden. Über das erhaltene Abspaltprotokoll kann auch sichergestellt werden, dass die Fmoc-Schutzgruppe komplett entfernt wurde und der nächste Kupplungsschritt durchgeführt werden kann. Da lediglich eine Aussage über den vorangegangenen Kupplungsschritt getroffen wird, kann der Fehler im Falle einer unvollständigen Kupplung nicht mehr behoben werden. In Abb 3.26 ist ein typisches Abspaltprotokoll dargestellt. Die in etwa gleiche Intensität nach der Fmoc-Abspaltung zeigt, dass bei der vorangegangenen Kupplung alle Peptidstränge des Harzes erfolgreich um eine Fmoc-Aminosäure verlängert werden konnten.

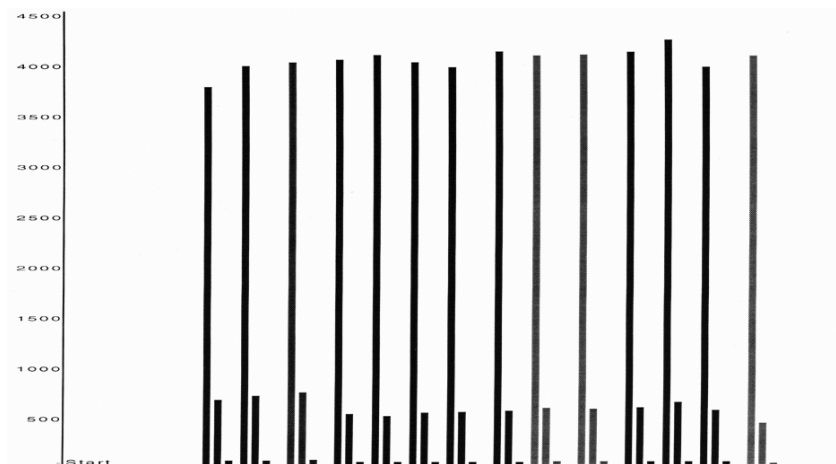


Abb. 3.26: Fmoc-Abspaltprotokoll einer Festphasenpeptidsynthese.

Die funktionellen Seitenketten der bei der Festphasensynthese verwendeten Aminosäurebausteine sind mit säurelabilen Schutzgruppen blockiert und damit während der Synthese stabil. Sie können nach der Kupplung der Aminosäuren entfernt werden. Für die Festphasensynthesen im Rahmen dieser Arbeit werden folgende Schutzgruppen für die Aminosäuren verwendet: *tert*-Butyl (*t*Bu **34**), *tert*-Butyloxycarbonyl (Boc, **35**), Tri-phenylmethyl (Trt, **36**) und 2,2,4,6,7-Pentamethyldihydrobenzofuran-5-sulfonyl (Pbf, **34**) (Abb. 3.27).

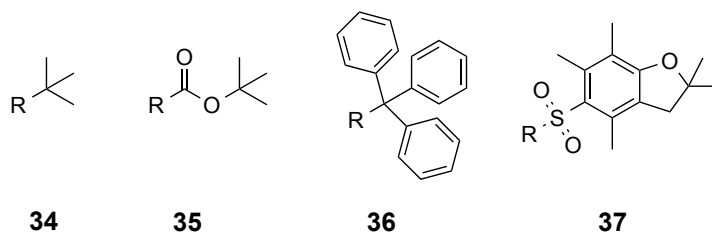


Abb. 3.27: Säurelabile Seitenkettenschutzgruppen.

Die bei der Festphasensynthese verwendeten polymeren Träger haben einen entscheidenden Einfluss auf den Erfolg der Synthese und müssen mehreren Anforderungen gerecht werden. Zum einen muss das Polymer eine hohe mechanische Stabilität aufweisen und darf auch bei über teilweise mehrere Tage dauernde Synthesen nicht destabilisiert werden. Zum anderen ist eine gute Quellfähigkeit des Harzes in dem verwendeten organischen Lösungsmitteln *N,N'*-Dimethylformamid und Dichlormethan außerordentlich wichtig. Durch eine starke Solvatisierung des Harzes und der daran gebundenen Peptidstränge wird die Diffusion von Kupplungsreagenzien und Edukten erheblich erleichtert. Im Rahmen dieser Arbeit wird TentaGel-Harz **38** der Firma Rapp Polymere verwendet. Dieses besteht aus einem vernetzten Polystyrolrückgrat mit aufgepfropften Polyethylenglycolseitenketten. An diesen Polyethylenglycolketten ist die Startaminosäure über einen Anker angebunden. Die Flexibilität der Seitenketten erleichtert die Synthese von sterisch anspruchsvollen Strukturen (Abb. 3.28).<sup>[70,71]</sup>

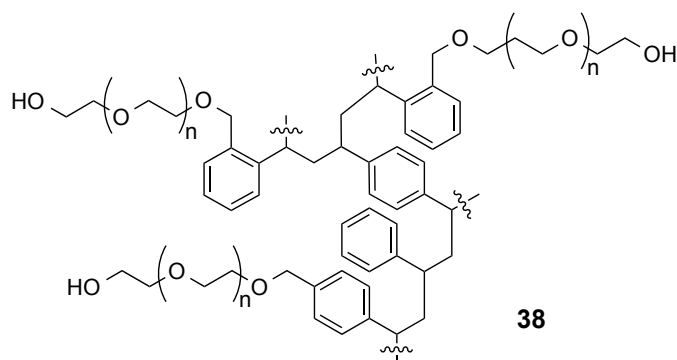


Abb. 3.28: Struktur des TentaGel-Harzes 38.

Auch an die Anker, die den Peptidstrang mit dem polymeren Träger verbinden, werden besondere Anforderungen gestellt. Während der Synthese muss die Anbindung unter basischen

Bedingungen stabil sein und gleichzeitig muss die Bindung nach der Synthese sehr leicht unter schwach sauren Bedingungen zu spalten sein. Für einige Anwendungen kann es von Vorteil sein, wenn der Anker so säurelabil ist, dass eine Abspaltung vom Harz unter Erhalt der säurelabilen Seitenkettenschutzgruppen im Peptid gelingt. Meistens jedoch erfolgt die Abspaltung der Schutzgruppen zusammen mit der Abspaltung vom Harz in einem Schritt. In dieser Arbeit werden ausschließlich Harze mit einem Tritylanker eingesetzt. Dieser lässt sich bereits durch Essigsäure in Dichlormethan unter Erhalt der Seitenkettenschutzgruppen abspalten. Der Trityl-Anker verhindert durch seinen sterischen Anspruch die bei der Festphasenpeptidsynthese oft als Nebenreaktion auftretende Diketopiperazinbildung.<sup>[72]</sup> Diese Nebenreaktion tritt oft bei Harzen auf, die mit sterisch wenig anspruchsvollen Aminosäuren wie Alanin und Glycin oder Prolin beladen sind (Abb 3.29). Bei der Zugabe von Base zur Abspaltung der Fmoc-Gruppe von einem Dipeptid, kann es zu einem basenkatalysierten Angriff des freien *N*-Terminus am Carbonylsauerstoff der Esterbindung kommen. Dabei wird die Esterbindung gespalten, und es entsteht ein 2,5-Diketopiperazin.<sup>[73]</sup>

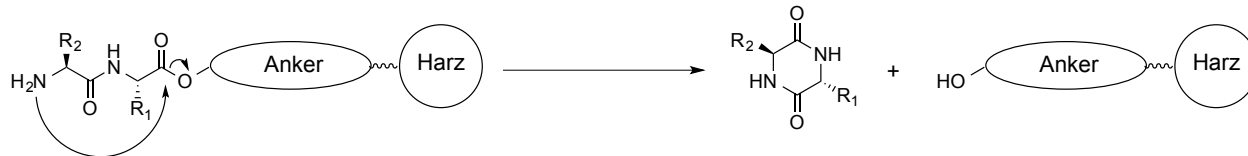


Abb. 3.29: Mechanismus der Diketopiperazinbildung.

Im Gegensatz zur Peptidbiosynthese in der Natur läuft die Festphasenpeptidsynthese nach dem Fmoc-Protokoll vom C-Terminus in Richtung *N*-Terminus. Zur Anbindung der Aminosäure an den harzgebundenen Peptidstrang wird der bis auf den C-Terminus voll blockierte Aminosäurebaustein durch Aktivierung mit einem Kupplungsreagenz *in situ* in einen Reaktivester überführt und mit dem freien *N*-Terminus der harzgebundenen Aminosäure zur Reaktion gebracht. Zur Aktivierung des C-Terminus werden in dieser Arbeit Uroniumsalze verwendet. Diese haben gegenüber den Carbodiimiden (z.B. Dicyclohexylcarbodiimid) den Vorteil, dass sie reaktiver sind und während der Synthese keine schwerlöslichen Nebenprodukte (Harnstoffe) bilden. In dieser Arbeit werden für die Kupplung der einfachen Aminosäuren *O*-(1*H*-Benzotriazol-1-yl)-*N,N,N',N'*-tetramethyluroniumhexafluorophosphat (HBTU)<sup>[74,75]</sup> und für die Kupplung der Spaceramino-säuren und der Glycosylamino-säuren das reaktivere 7-Azabenzotriazol-derivat (HATU)<sup>[76]</sup>

verwendet. Zur weiteren Beschleunigung der Aktivesterbildung und zur Vermeidung von Racemisierungen werden zu den Uroniumsalzen 1-Hydroxy-benzotriazol (HOBt)<sup>[77]</sup> bzw. 1-Hydroxy-7-azabenzotriazol (HOAt)<sup>[78]</sup> als Zusatz verwendet (Abb. 3.30).

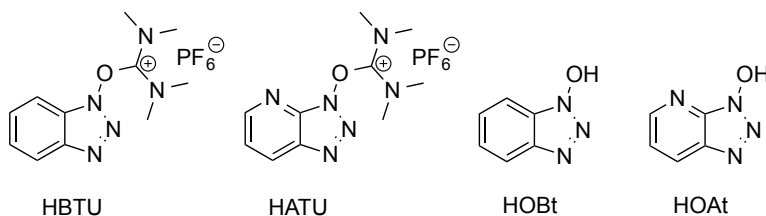


Abb. 3.30: Verwendete Kupplungsreagenzien und Zusätze.

Für die Kupplung wird der Aminosäurebaustein im zehnfachen Überschuss zusammen mit dem Kupplungsreagenz HBTU, dem Zusatz HOBt und der Hünigsbase *N,N*-Diisopropylamin (DIPEA) zum harzgebundenen Peptidstrang in den Reaktor gepumpt. Dabei wird zunächst die Carbonsäure des Fmoc-Aminosäurebausteins durch die sterisch anspruchsvolle Base deprotoniert. Das Carboxylat reagiert nun mit dem Carbonylkohlenstoff des Uroniumsalzes HBTU. Das entstandene Intermediat **39** reagiert mit dem in deprotonierter Form vorliegenden HOBt unter Ausbildung des Reaktivesters **40**. Aufgrund seines räumlichen Anspruchs reagiert der Reaktivester **40** nun selektiv mit dem freien *N*-Terminus des harzgebundenen Amins unter Ausbildung der neuen Amidbindung **41** (Abb. 3.31). Die Kupplungszeit für diese Reaktion beträgt etwa 20 Minuten.



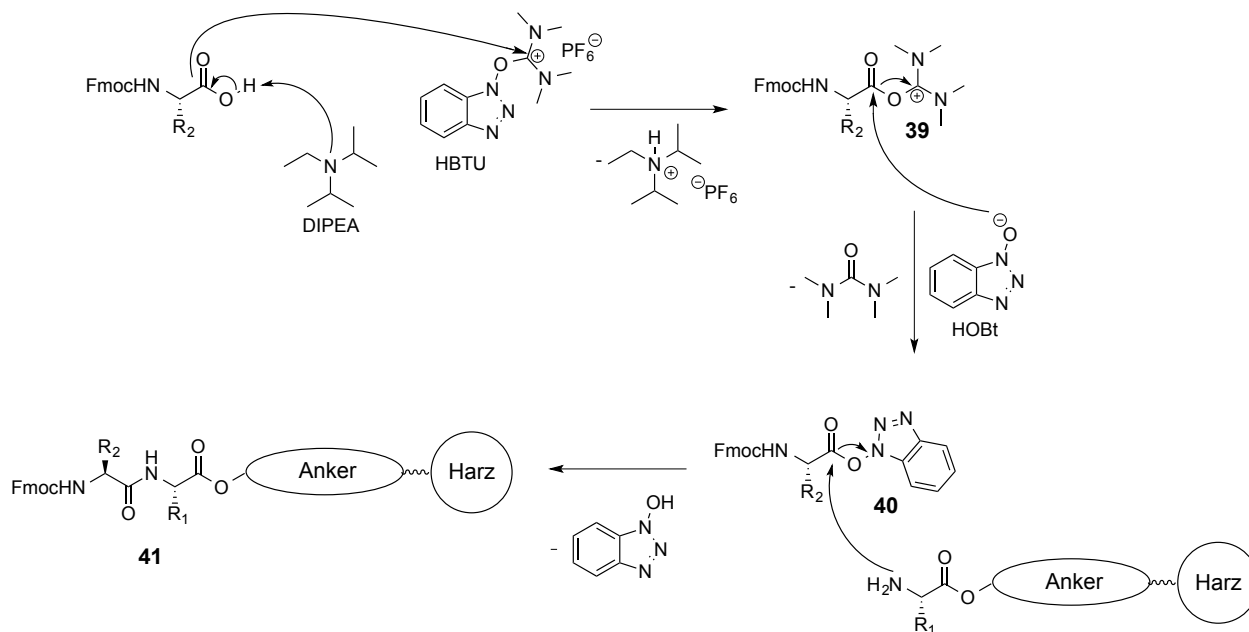


Abb. 3.31: Mechanismus der Reaktivesterbildung und Ausbildung der Amidbindung bei der Festphasenpeptidsynthese.

Da die Glycosylaminosäuren **12** und **22** sowie die Spaceraminosäure **29** selbst in mehrstufigen Synthesen hergestellt werden müssen, werden diese nur im zweifachen Überschuss in der Festphasenpeptidsynthese eingesetzt. Um trotzdem eine möglichst quantitative Ausbeute zu erzielen, wird zum einen die Kupplungszeit auf acht Stunden erhöht und zum anderen werden die reaktiveren Kupplungsreagenzien HATU und HOAt verwendet. Wegen des sterischen Anspruchs der Glycosylaminosäurebausteine werden die nachfolgenden beiden Aminosäuren in Doppelkupplung angebunden. Dabei wird zweimal mit zehn Äquivalenten der Aminosäure gekuppelt und erst nach den beiden Kupplungen erfolgt der Capping-Schritt.

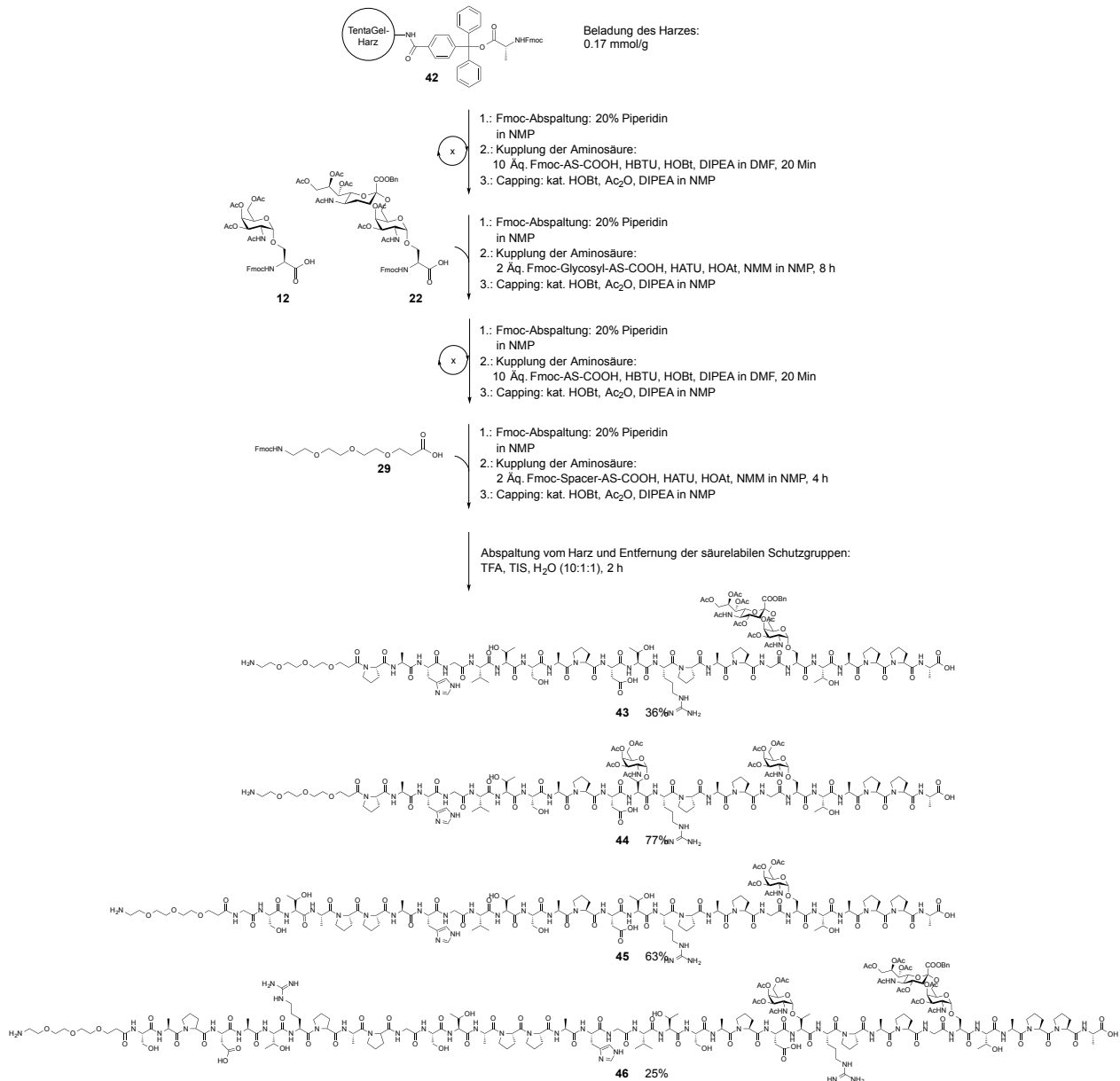
Beim sogenannten Capping werden die freien Amingruppen von Peptidsträngen, die zuvor nicht mit dem Fmoc-geschützten Aminosäurebaustein reagiert haben, durch Umsetzung mit Essigsäureanhydrid, DIPEA und HOBT *N*-acetyliert. Dadurch können Fehlsequenzen in der fortlaufenden Synthese nicht weiter verlängert werden. Ein weiterer Vorteil besteht darin, dass sich die *N*-acetylierten Fehlsequenzen leichter vom nicht acetylierten Zielpeptid abtrennen lassen.

### 3.4.3 Aufbau funktionalisierter Glycopeptide nach dem Vorbild der tumorassoziierten Form des Mucins MUC1

Das Mucin MUC1 ist ein Transmembranprotein des Typs 1 und verfügt in der Nähe des C-Terminus über eine hydrophobe Sequenz, mit der es in der Zellmembran verankert ist. Der weitaus größte Teil des Proteins befindet sich im extrazellulären Raum und besteht hauptsächlich aus 20 bis 120 Wiederholungen der Tandem Repeat-Sequenz, die aus zwanzig Aminosäuren aufgebaut ist (Aminosäuresequenz: PAHGVTSAPDTRPAPGSTAP) und fünf potentielle O-Glycosylierungsstellen an Serin und Threonin aufweist.<sup>[23,35]</sup> Diese Glycosylierungsstellen sind beim tumorassoziierten MUC1 nur teilweise und mit unterschiedlichen tumorassoziierten Kohlenhydraten glycosyliert. Arbeitsgruppen, die an Antitumorvakzinen auf Basis des Mucins MUC1 arbeiten, nutzen unterschiedliche Ausschnitte aus der Tandem Repeat-Sequenz mit variablen Glycosylierungen als B-Zell-Epitop, um daraus durch Kombination mit T-Zell-Epitopen und zusätzlichen Immunstimulanzien wirkungsvolle synthetische Vakzine herzustellen.<sup>[27,30,53]</sup> Allen Ausschnitten ist jedoch gemeinsam, dass sie meist die zwei Motive PDTRP<sup>[63,79]</sup> und GSTAP<sup>[27,63]</sup> beinhalten, die als immundominante Bindungsmotive für MUC1-spezifische Antikörper gelten.<sup>[80,81]</sup> Durch NMR-Experimente ist bekannt, dass das Motiv STAPPA zusammen mit einer Glycosylierung am Serin oder Threonin einen großen konformationsgebenden Einfluss auf die N-terminal liegenden immundominanten Domänen hat.<sup>[79,82]</sup>

Neben der Auswahl der tumorassoziierten Kohlenhydrate und des Glycosylierungsmusters spielt also auch die Peptidsequenz eine entscheidende Rolle für die Konformation des B-Zell-Epitops und damit für die Tumorselektivität der induzierten Antikörper. In der Arbeitsgruppe Kunz hat sich als B-Zell-Epitop eine C-terminal um zwei Aminosäuren verlängerte Variante der Tandem Repeat-Sequenz etabliert, die das STAPPA-Motiv komplettiert (PAHGVTSAPDTRPAPGSTAP-PA) und die in der Position Serin-17 oder Threonin-18 eine Glycosylierung aufweist.<sup>[32,33,81]</sup> Ausgehend von dieser Aminosäuresequenz soll im Rahmen dieser Arbeit sowohl das Glycosylierungsmuster als auch die Sequenz durch N-terminale Verlängerung variiert werden. Die Untersuchung der Bindungsaffinität von Vakzin-induzierten anti-MUC1-Antikörpern zu humanen Tumorzellen lässt dann Rückschlüsse auf den Einfluss dieser Parameter auf die Tumorselektivität des B-Zell-Epitops zu, was zur Optimierung der Vakzine genutzt werden kann.

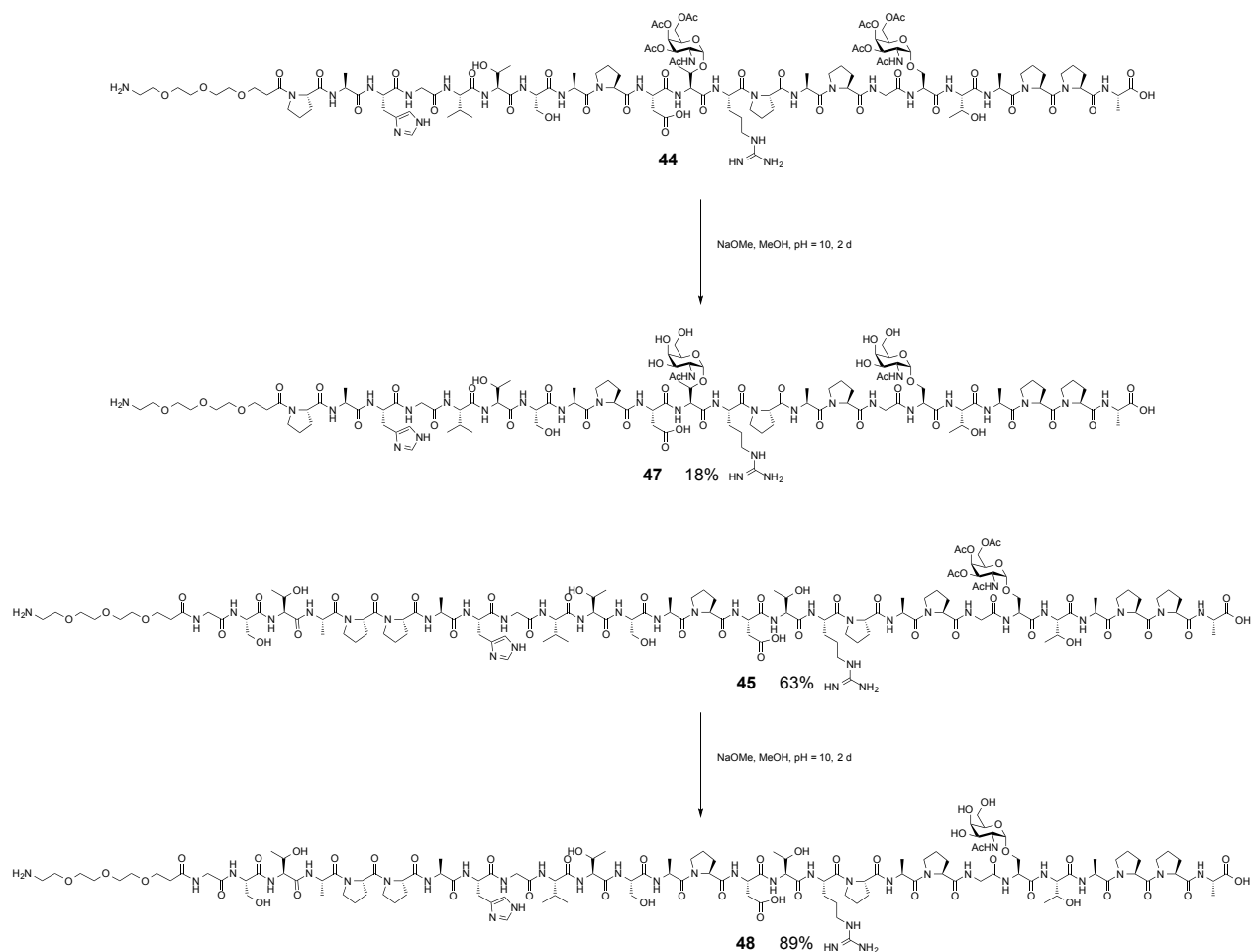
Ausgangspunkt der Synthese der MUC1-Glycopeptide ist ein mit Fmoc-Alanin vorbeladenes Tentagel Harz mit einem Trityl-Anker **42**, das eine niedrige Harzbeladung von 0.017 mmol/g aufweist und damit bestens für die Synthese von längeren bzw. räumlich anspruchsvollen Peptiden geeignet ist. Die Anbindung der Aminosäuren, Glycosylamino-säuren und der Spacer wird unter den in Kapitel 3.4.2 beschriebenen Bedingungen durchgeführt. Am Ende der Synthese darf das endständige Amin nicht acetyliert werden, da das Glycopeptid im weiteren Verlauf der Synthese über den *N*-Terminus weiter funktionalisiert wird. Bei der acidolytischen Abspaltung des Glycopeptids vom Harz werden gleichzeitig alle säurelabilen Schutzgruppen von den Aminosäureseitenketten entfernt, und man erhält das freie Peptid, das nun nur noch an den Kohlenhydraten durch Acetylschutzgruppen blockiert ist. Bevor die Glycopeptide im nächsten Schritt umgesetzt werden können, werden sie durch präparative RP-HPLC gereinigt. Dabei wurden die Glycopeptide **43**, **44**, **45** und **46** in Ausbeuten von 25% bis 77% erhalten (Abb. 3.32). Der T<sub>N</sub>-Threonin-Baustein wurde von *Dr. XXXXXXXX XXXXXXXX*<sup>[83]</sup> zur Verfügung gestellt.



**Abb. 3.32: Synthese der Glycopeptide mit N-terminalem Spacer an der festen Phase.**

Bei der Entfernung der Schutzgruppen werden zwei unterschiedliche Methoden verwendet. Glycopeptide, die nur den T<sub>N</sub>-Serin-Antigen-Baustein enthalten, werden in Methanol gelöst, und es wird solange eine konzentrierte methanolische Natriummethanolatlösung zugegeben, bis ein pH-Wert von 10 eingestellt ist. Dabei muss sehr genau auf den pH-Wert geachtet werden, da ein zu hoher pH-Wert die β-Eliminierung des Kohlenhydrats zur Folge haben kann. Da im Laufe der Reaktion der pH-Wert absinkt, muss dieser immer wieder überprüft und bei Bedarf nachreguliert werden. Die Reaktionskontrolle kann mittels analytischer RP-HPLC durchgeführt werden.

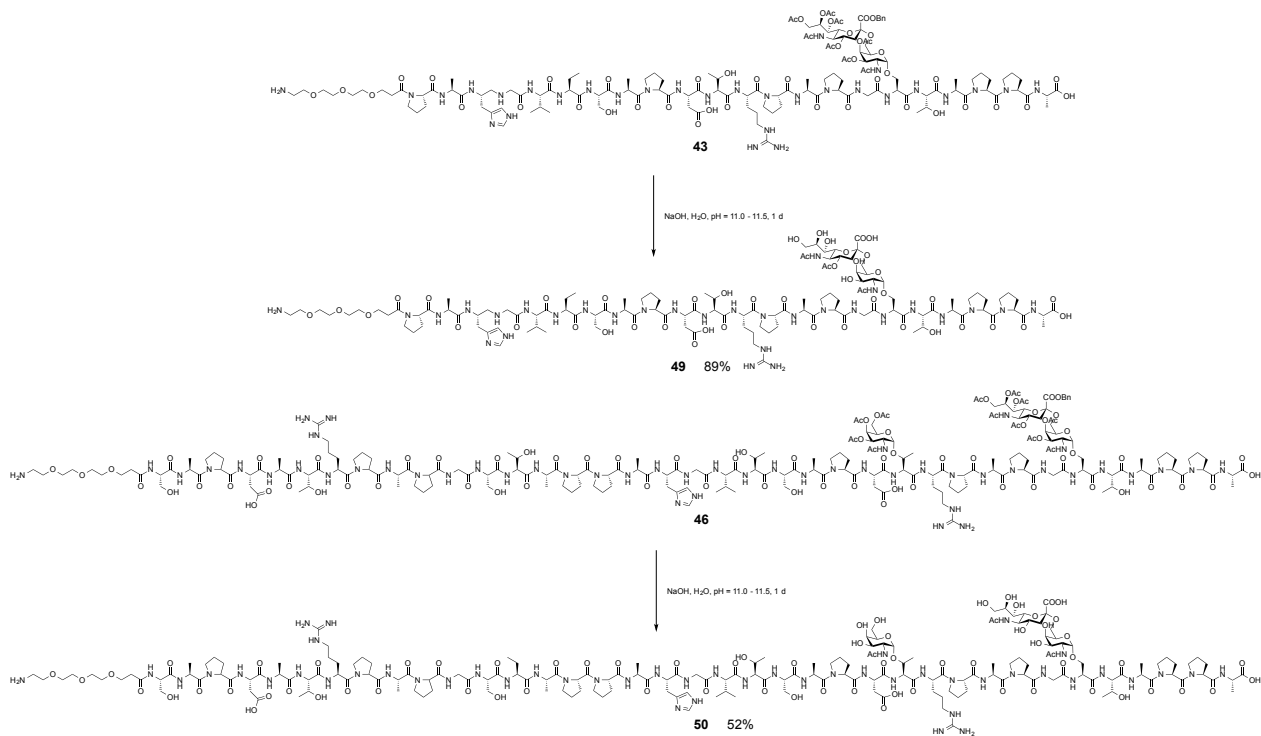
Nach Beendigung der Reaktion muss das noch vorhandene Natriummethanolat durch Zugabe von Essigsäure unbedingt neutralisiert werden, damit bei der anschließenden Entfernung des Lösungsmittels im Vakuum der pH-Wert nicht zu basisch wird. Die Rohprodukte werden durch präparative RP-HPLC gereinigt. Dabei konnten die Glycopeptide **47** und **48** in einer Ausbeute von 18% bzw. 89% erhalten werden (Abb. 3.33).



**Abb. 3.33:** Entfernung der Acetylschutzgruppen des T<sub>N</sub>-Serin-Antigens am Glycopeptid.

Glycopeptide, die ein Sialyl-T<sub>N</sub>-Serin-Antigen enthalten, können nicht mit Natriummethanolat deblockiert werden. Der Grund hierfür ist der Benzylester in der 1-Position der Sialinsäure. Dieser würde mit Natriummethanolat in einer Umesterung zum noch stabileren Methylester reagieren. Daher wird zur Deblockierung wässrige Natriumhydroxidlösung mit einem pH von 11 bis 11.5 verwendet. Dieser Wert sollte unter keinen Umständen überschritten werden, da es

sonst ebenfalls zur  $\beta$ -Eliminierung des Kohlenhydrats kommen kann. Auch hier muss bei der Aufarbeitung der Ansätze darauf geachtet werden, dass der pH-Wert vor dem Einengen der Lösung neutral ist, da es sonst zu einer Erhöhung des pH-Wertes kommt. Nach Reinigung der Rohprodukte durch RP-HPLC konnten die Glycopeptide **49** und **50** in einer Ausbeute von 89% bzw. 52% erhalten werden (Abb. 3.34).



**Abb. 3.34:** Entfernung der Acetyl- und Benzylschutzgruppen des Sialyl-T<sub>N</sub>-Serin-Antigens am Glycopeptid.

Durch die Festphasensynthese konnten die Glycopeptide **47**, **48**, **49** und **50** im Milligramm-Maßstab in hoher Reinheit erhalten werden. Dies wurde durch Massenspektrometrie (ESI-MS), hochaufgelöste Massenspektrometrie (HR-ESI-MS) sowie durch zweidimensionale NMR-Spektroskopie belegt. Die hohe Reinheit dieser Strukturen ist exemplarisch anhand der analytischen Daten des Glycopeptids **50** demonstriert. In Abbildung 3.35 A) ist das HPLC-Eluogramm, in B) das ESI-Massenspektrum sowie der relevante Ausschnitt des HR-ESI-Massenspektrums (Abb. 3.35 C) des deblockierten Glycopeptids **50** gezeigt.

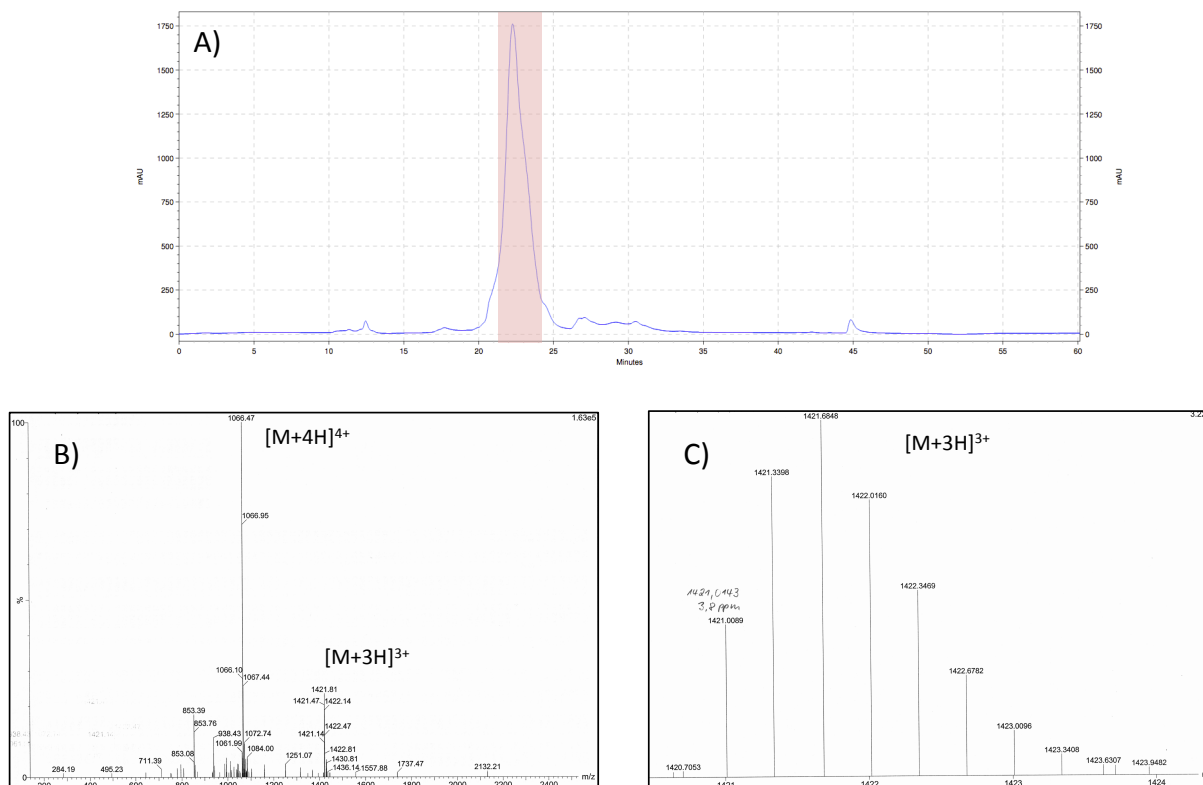


Abb. 3.35: A) HPLC-Eluogramm, B) ESI-Massenspektrum und C) HR-ESI-Massenspektrum von Glycopeptid 50.

In Abbildung 3.36 A) ist das  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum des Glycopeptids **50** gezeigt. Dort ist im vergrößerten Bereich das NMR-Signal (Dublett von Dublett) des äquatorialen H-3 Protons der Sialinsäure gezeigt, das ein wichtiges Schlüsselsignal für das Sialyl- $\text{T}_\text{N}$ -Serin-Antigen ist. In Abbildung 3.36 B ist das HSQC-Spektrum von Verbindung **50** gezeigt. Als wichtiges Schlüsselsignal ist dort das Kreuzsignal des Protons H-1 mit dem C-1 Atom der *N*-Acetylgalactose mit einem grünen Pfeil markiert. Im  $^{13}\text{C}$ -Spektrum erscheinen diese Signale beim  $\alpha$ -Anomer knapp unter 100 ppm. Ebenfalls in diesem Bereich, knapp unter 100 ppm liegt das Signal des C-2 Atoms der Sialinsäure. Alle drei Signale sind im  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum (Abb. 3.36 B) sehr gut aufgelöst und klar erkennbar. Die analytischen Daten zu den Glycopeptiden **47**, **48**, **49** und **50** befinden sich im spektroskopischen Anhang.

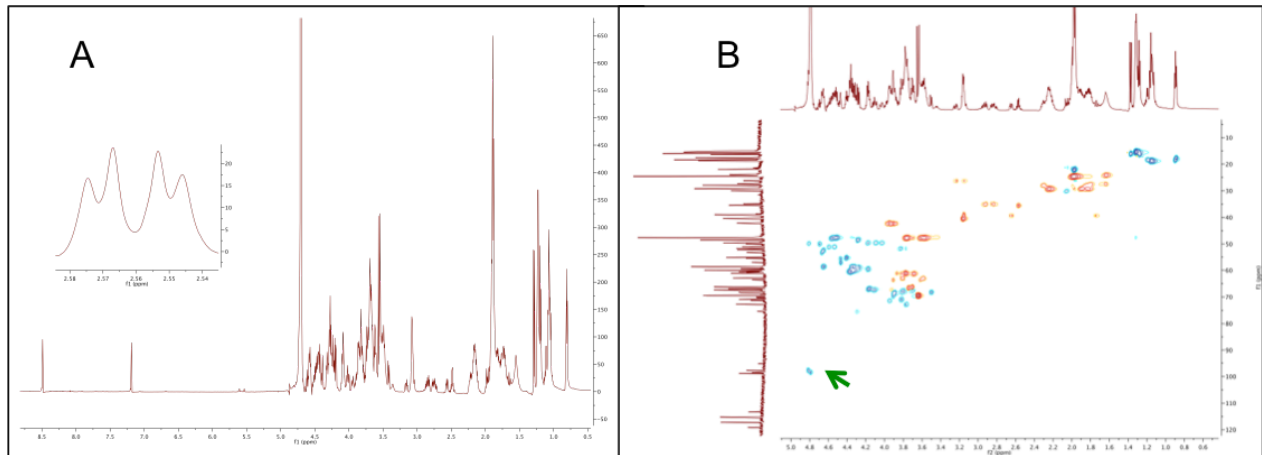


Abb. 3.36: A)  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum und B) HSQC-Spektrum von Glycopeptid 50.

Die deblockierten Glycopeptide können nun durch Verknüpfung mit T-Zell-Epitopen oder immunstimulierenden Substanzen zum Aufbau von synthetischen Antitumorvakzinen verwendet werden. In diesen Vakzinen fungieren die Glycopeptide als B-Zell-Epitope und dienen somit als spezifische Erkennungsstrukturen für B-Zellrezeptoren.

### 3.5 Aktivierungs- und Effektormechanismen des Immunsystems

Das Immunsystem hat sich über viele Millionen Jahre als komplexes Netzwerk von Effektormechanismen entwickelt und ist in der Lage, zwischen fremden und körpereigenen Strukturen zu unterscheiden. Es kann gezielt pathogene Strukturen bekämpfen, während körpereigene Strukturen durch die Selbsttoleranz des Immunsystems geschützt sind.<sup>[84]</sup> Für die Entwicklung von Antitumorvakzinen, die das körpereigene Immunsystem so manipulieren sollen, dass es selektiv gegen körpereigene Tumore aktiviert wird, ist eine genaue Kenntnis dieser Mechanismen unerlässlich.

#### 3.5.1 Mechanismen des angeborenen Immunsystems

Das Immunsystem lässt sich grob in zwei Bereiche unterteilen, die sich in ihrer Wirkungsweise ideal ergänzen: das angeborene und das adaptive Immunsystem. Das angeborene Immunsystem



ist auf die Erkennung von wenigen, klar definierten Strukturen beschränkt, kann aber binnen kürzester Zeit aktiviert werden.<sup>[85]</sup> Die Aktivierung des adaptiven Immunsystems dagegen dauert mehrere Tage. Dafür wird in dieser Zeit eine präzise Immunantwort moduliert, die gezielt auf das Antigen zugeschnitten ist und eine effektivere Erkennung und Beseitigung des Pathogens gewährleistet. Meistens geht die angeborene Immunantwort der adaptiven voraus<sup>[86]</sup> und sorgt durch Ausschüttung von entzündungsvermittelnden Substanzen für das Einleiten einer adaptiven Immunantwort.<sup>[85,87]</sup>

Wichtige zelluläre Bestandteile des angeborenen Immunsystems sind vor allem zur Phagozytose befähigte Zellen, dazu zählen unter anderem Monozyten, Makrophagen, neutrophile Granulozyten und dendritische Zellen.<sup>[88–92]</sup> Diese Zellen sind durch spezielle membrangebundene Rezeptoren auf der Zelloberfläche dazu in der Lage, konservierte Strukturen von körperfremden Pathogenen, sogenannte "*Pathogen Associated Molecular Patterns*" (PAMPs)<sup>[93]</sup>, zu identifizieren und diese nach erfolgter Erkennung durch Phagozytose zu internalisieren und unschädlich zu machen. In Abbildung 3.37 sind die gängigsten Rezeptoren und die daran bindenden Antigene aufgelistet.<sup>[85,94–96]</sup> Eine besondere Rolle haben dabei dendritischen Zellen, da sie besonders effektiv Entzündungen vermitteln können und dazu in der Lage sind, naive T- und B-Zellen zu aktivieren und damit wichtige Aktivatoren der adaptiver Immunantwort sind.

Rezeptor	Antigen
CD14	Lipopolysaccharid (LPS)
Scavenger-Rezeptor	<i>Hepacivirus</i>
Mannose-/Glycan-Rezeptor	bakterielle Zellwandbestandteile
TLR-2	Pam <sub>3</sub> Cys, MALP-2 u. 4
TLR-4	Lipopolysaccharid
TLR-8	Guanin-reiche Oligonukleotide
TLR-9	Unmethylierte CpG-DNA

**Abb. 3.37: Wichtige Rezeptoren zur Erkennung von PAMPs.**<sup>[85,94,95]</sup>

Weitere wichtige zelluläre Bestandteile des angeborenen Immunsystems sind eosinophile- und basophile Granulozyten, Mastzellen und NK-Zellen.<sup>[88–90,96]</sup> Letztere können durch verschiedene Rezeptoren vor allem virusbefallene Zellen unabhängig vom MHC-Rezeptor erkennen. Eosinophile und basophile Granulozyten sowie Mastzellen spielen vor allem eine Rolle bei der Abwehr von Pathogenen, die zu groß für eine Aufnahme durch Phagozyten sind. Dies erreichen sie durch das Ausschütten von Granula, die toxische Substanzen enthalten wie. z.B. Histamin, Sauerstoffradikale, toxische Proteine und proinflammatorische Zytokine.

Ein weiteres wichtiges Instrument zur frühzeitigen Pathogeneliminierung sind Antikörper der frühen Immunantwort im Zusammenhang mit dem Komplementsystem.<sup>[97]</sup> Beim Auftreten einer Inflammation können vorhandene Plasmazellen zur schnellen Produktion von Antikörpern des IgM-Isotyps angeregt werden. Diese Antikörper der frühen Immunantwort sind meist weniger spezifisch und liegen im Blut und in der Lymphe als Pentamere vor. Bindet ein IgM-Pentamer an einem Mikroorganismus, können nacheinander in einer komplizierten Reaktionskaskade verschiedene, im Blut vorhandene Komplementfaktoren an den Antikörper binden und einen sogenannten Membran-Angriffs-Komplex (MAK) bilden, der zur Lyse des Mikroorganismus führt.<sup>[98]</sup>

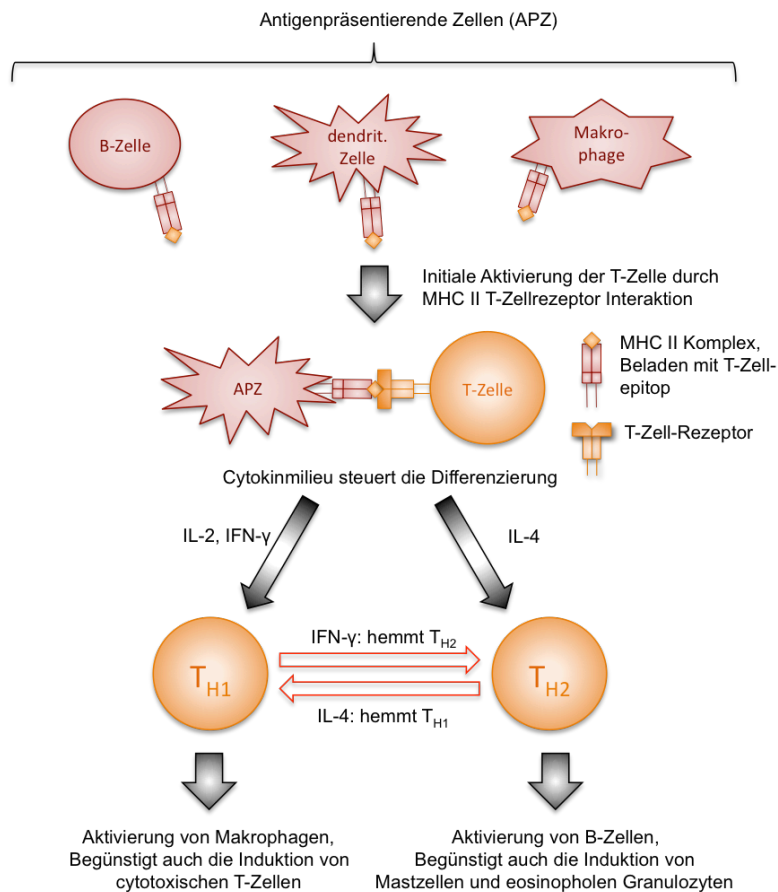
Für die Entwicklung von Antitumorvakzinen können vor allem TLR-Liganden von Nutzen sein, da sie die Immunogenität der Vakzine durch eine schnelle Rekrutierung von antigenpräsentierenden Zellen, wie z.B. dendritischen Zellen, steigern und die Induktion einer adaptiven Immunantwort somit beschleunigen können.<sup>[99]</sup>

### 3.5.2 Mechanismen der adaptiven Immunantwort

Ver mehrt sich ein pathogener Organismus so schnell, dass er durch das angeborene Immunsystem nicht beseitigt werden kann, wird eine adaptive Immunantwort induziert.<sup>[100]</sup> Charakteristisch für diese Immunantwort ist die präzise Erkennung von Antigenen durch die sogenannte Affinitätsreifung (engl. "*affinity maturation*")<sup>[101]</sup>, die gezielte Beseitigung des Pathogens durch angepasste Abwehrmechanismen ( $T_{H1}$  vs.  $T_{H2}$ , vgl. Abb. 3.38)<sup>[102]</sup> und die Ausbildung eines immunologischen Langzeitgedächtnisses.<sup>[103]</sup> Da eine fälschlicherweise induzierte adaptive Immunantwort schwerwiegende Folgen nach sich ziehen kann, ist die Aktivierung des adaptiven

Immunsystems streng reguliert, und es sind mehrere verschiedene Signale zur Induktion einer adaptiven Immunantwort notwendig. Die wichtigsten zellulären Komponenten der adaptiven Immunantwort sind dendritische Zellen, B-Zellen und vor allem T-Zellen.<sup>[104]</sup> Alle kernhaltigen Zellen besitzen auf ihrer Oberfläche sogenannte Haupthistokompatibilitätskomplexe (engl.: "*Major Histocompatibility Complex*", MHC).<sup>[105-107]</sup> Diese Komplexe werden mit kurzen Peptiden beladen, die beim Abbau von Proteinen entstehen. Die beladenen MHC-Komplexe werden einige Zeit auf der Zelloberfläche präsentiert und dann wieder internalisiert, erneut beladen und wieder auf der Zelloberfläche präsentiert. Damit geben die MHC-Komplexe ein momentanes Abbild aller Prozesse wieder, die gerade in einer Zelle ablaufen.<sup>[105,108]</sup> T-Zellen können mit ihrem T-Zellrezeptor, den Peptid-beladenen MHC-Komplex erkennen. Während ihrer Entstehung im Thymus werden T-Zellen so selektioniert, dass sie mit ihrem T-Zellrezeptor ausschließlich MHC-Komplexe erkennen, die mit körperfremden Peptid beladen sind und nicht solche die mit körpereigenem Peptiden beladen sind.<sup>[109-111]</sup> Der T-Zellrezeptor kann also nur an den MHC-Komplex binden, wenn dieser mit einem körperfremden Peptid beladen ist, dass z.B. vom Verdau eines Pathogens stammt. Von entscheidender Bedeutung ist, dass der T-Zellrezeptor körperfremde Peptide nur dann erkennt, wenn sie in einem MHC-Komplex präsentiert werden. Dieses Phänomen wird auch als MHC-Restriktion bezeichnet.<sup>[112]</sup> Erkennt ein T-Zellrezeptor einen beladenen MHC-Komplex, ist dies der erste Schritt zur Aktivierung der T-Zelle. Bei den MHC-Komplexen wird zwischen zwei Klassen unterschieden: MHC Klasse I und MHC Klasse II. Erstere kommen auf allen kernhaltigen Zellen vor und werden von CD8<sup>+</sup> T-Zellen, sog. cytotoxischen T-Zellen, erkannt. Die etwa 8-12 Aminosäuren langen MHC Klasse I-Peptide stammen vom Verdau cytosolischer Proteinen im Proteasom, dadurch werden über den MHC I-Komplex Antigene von intrazellulären Pathogenen, wie z. B. Viren, erfasst.<sup>[105]</sup> Im Gegensatz dazu kommen MHC II-Komplexe nur auf professionellen antigenpräsentierenden Zellen (v. a. dendritischen Zellen) vor und werden von CD4<sup>+</sup> T-Zellen erkannt. Die etwa 14-20 Aminosäuren langen Peptide, die in MHC Klasse II-Komplexen präsentiert werden, stammen von Proteinen, die nach der Aufnahme durch Phagozytose in Lysosomen verdaut werden und damit von extrazellulären Pathogenen.<sup>[105,113]</sup> Mit der Ausnahme der CD8<sup>+</sup> T-Zellen haben T-Zellen generell eine unterstützende Aufgabe und werden daher auch als T-Helferzellen bezeichnet, sie spielen vor allem bei der Abwehr von extrazellulären Pathogenen eine Rolle. In Abhängigkeit vom

Cytokinmilieu, das im Zuge einer Inflammation durch ein Pathogen moduliert wird, entwickeln sich T-Helferzellen so, dass sie entweder eine zelluläre Immunantwort (T-Helferzelle des Typs 1,  $T_{H1}$ ) oder eine humorale Immunantwort (T-Helferzelle des Typs 2,  $T_{H2}$ ) unterstützen.<sup>[114]</sup> Bei einer zellulären Immunantwort werden in erster Linie Makrophagen und cytotoxische T-Zellen aktiviert, die vor allem von pathogenen Organismen befallene Zellen unschädlich machen.<sup>[115]</sup> Die Leitzytokine dieser Immunantwort sind Interleukin-2 (IL-2), Interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) und Tumornekrosefaktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) (Abb. 3.38). Bei einer humoralen Immunantwort werden neben  $T_{H2}$ -Zellen vor allem B-Zellen induziert, die in hohem Maße Antikörper produzieren und diese in das lymphatische Gewebe und in den Blutstrom sezernieren. Durch Bindung an pathogene Strukturen neutralisieren die Antikörper ihr Ziel. Zusätzlich haben sie eine opsonisierende Wirkung und können dadurch weitere Mechanismen in Gang setzen, die zur Beseitigung von pathogenem Gewebe beitragen. Die Leitzytokine einer humoralen Immunantwort sind IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 und IL-13 (Abb. 3.38).<sup>[115,116]</sup>



**Abb. 3.38: Murine  $T_{H1}$ - $T_{H2}$  T-Zell-Differenzierung durch Cytokine.**

Obwohl sich die humorale und die zelluläre Antwort gegenseitig hemmen, gibt es auch Mischformen.<sup>[117]</sup> Die Regelung, welche Immunantwort induziert wird, hängt wie bereits erwähnt vom Cytokinmilieu ab und ist noch nicht in allen Details genau verstanden und Gegenstand der aktuellen Forschung.

### 3.5.3 Induktion einer humoralen Immunantwort

Zur Induktion einer T-Zell-vermittelten humoralen Immunantwort sind drei verschiedene Signale nötig. Eine B-Zelle muss zunächst mit Hilfe ihres B-Zell-Rezeptors (BZR), einem membrangebundenen Antikörper, ein Antigen erkennen. Daraufhin wird der B-Zell-Rezeptor/Antigen-Komplex internalisiert und das Antigen wird im Lysosom verdaut und prozessiert. Über MHC II-Komplexe werden Teilstrukturen des Antigens in Form von kurzen Peptiden (14 bis 20 Aminosäuren) auf der Oberfläche, der B-Zelle präsentiert. Die B-Zelle muss nun eine passende CD4<sup>+</sup> T-Zelle finden, die mit ihrem T-Zellrezeptor die Kombination aus MHC Klasse II-Komplex und Peptid präzise erkennt (erstes Signal) und an diesen bindet.<sup>[118]</sup> B-Zelle und T-Zelle erkennen also das gleiche Antigen, jedoch muss das Epitop, welches der BZR erkennt nicht identisch mit dem Peptidepitop des MHC-Komplexes sein, das der TZR erkennt. Nach der Bindung des MHC Klasse II-Komplexes wird die T-Zelle aktiviert, und sie exprimiert an ihrer Oberfläche den kostimulatorischen Rezeptor CD154 (CD40-Ligand, CD40L), der auf der B-Zell den Rezeptor CD40 bindet (zweites Signal).<sup>[119]</sup> Dies wiederum induziert bei der B-Zelle die Expression eines weiteren kostimulatorischen Rezeptors (CD80 bzw. B7.1) auf der Oberfläche der B-Zelle. Bindet der CD80-Rezeptor nun CD28, das auf der Oberfläche von T-Helferzellen exprimiert wird, induziert dies die Ausschüttung von Cytokinen (IL-4, IL-5, IL-6, etc.) seitens der T-Zelle. Diese wirken autokrin auf die T-Zelle und vor allem auch auf die B-Zelle.<sup>[120]</sup>

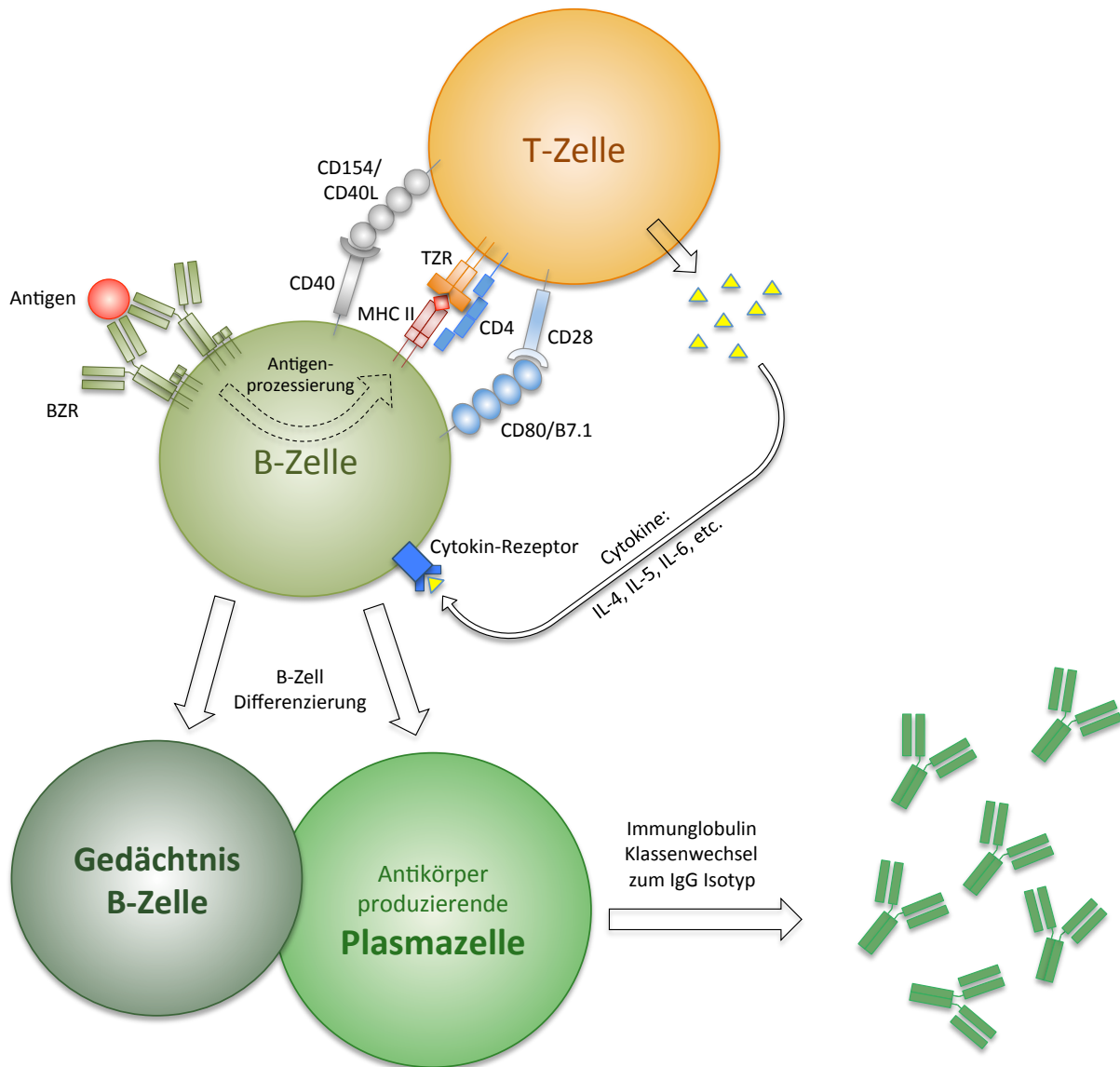
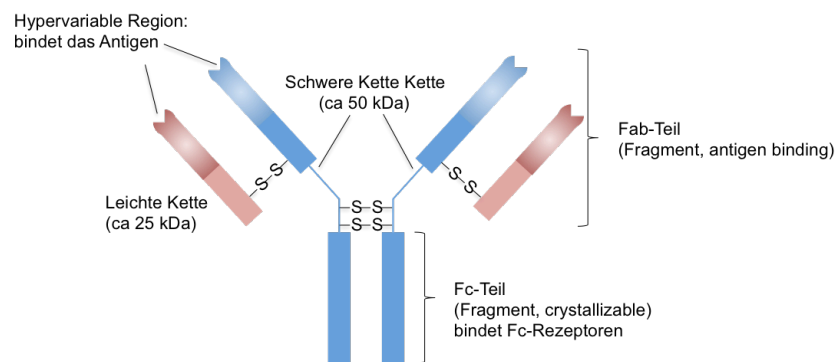


Abb. 3.39: Modell der T- und B-Zell Kooperation.

Die B-Zelle wird daraufhin vollständig aktiviert und kann sich entweder zu einer Antikörper sezernierenden Plasmazelle oder zu einer Gedächtnis B-Zelle differenzieren (vgl. Abb. 3.39).

Der Antikörper-Isotyp, den eine Plasmazelle produziert, hat einen entscheidenden Einfluss auf die Effektormechanismen der Immunantwort und wird durch das vorliegende Cytokinmilieu moduliert, welches entscheidend von der T-Helferzelle geprägt wird. Die genaue Regelung des Immunglobulin-Klassenwechsels ist noch nicht in allen Details erforscht.<sup>[121,122]</sup> Von den fünf Immunglobulin-Klassen (IgA, IgD, IgE, IgG und IgM) sind vor allem die Isotypen IgM und IgG relevant.<sup>[123]</sup> IgM ist der Antikörperisotyp der frühen Immunantwort und kann vor allem das Komplementsystem aktivieren. Die IgM-Antikörper kommen hauptsächlich im Blutstrom als

Pentamere vor. Die IgG-Isotypen haben von allen Antikörpern die längste Halbwertszeit und das größte Potential zur Induktion von immunologischen Effektormechanismen. Aufgrund dieser Eigenschaften sind sie für den Einsatz als Immuntherapeutikum die attraktivste Isotyp-Klasse. IgG-Antikörper werden in vier Subklassen unterteilt (Nomenklatur *Mus musculus*: IgG1, IgG2a, IgG2b und IgG3, *Homo sapiens*: IgG1, IgG2, IgG3 und IgG4) und haben unterschiedliche Eigenschaften.<sup>[124]</sup> Sie kommen vor allem im Blut und in der extrazellulären Flüssigkeit vor und werden nur im Rahmen einer adaptiven T-Zell-vermittelten Immunantwort gebildet. Die Effektormechanismen von IgG-Antikörpern sind die Induktion des Komplementsystems (engl.: "*Complement-dependent cytotoxicity*", CDC), die Antikörper-abhängige zelluläre Cytotoxizität (engl.: "*Antibody-dependent cellular cytotoxicity*", ADCC) und die Aktivierung von Makrophagen über Fc $\gamma$ -Rezeptoren.<sup>[125]</sup>



**Abb. 3.40: Aufbau eines IgG-Antikörpers.**

Die Fähigkeit zur ADCC und zur Aktivierung vieler anderer Mechanismen von Antikörpern (Makrophagenaktivierung, Degranulation von Granulozyten und Mastzellen, etc.) wird maßgeblich durch sogenannte Fc $\gamma$ -Rezeptoren (Fragment, crystallizable) gesteuert, die auf der Oberfläche von vielen immunkompetenten Zellen, wie z.B. NK-Zellen, Makrophagen, dendritischen Zellen, Granulozyten und Mastzellen exprimiert werden. Die Fc-Rezeptoren können den Fc-Teil von Antikörpern binden (Abb. 3.40).<sup>[126]</sup>

<b>Humane Antikörper</b>					
	IgM	IgG1	IgG2	IgG3	IgG4
Verteilung im normalen Serum <sup>[127,128]</sup>		60	25	10	5
Immuantwort auf <sup>[128]</sup>		Proteine	Kohlenhydrate	Proteine	chron. Entzündungen
Halbwertszeit im Serum <sup>[128]</sup>		≈ 21 d	≈ 21 d	≈ 7 d	≈ 21 d
Komplement Aktivierung <sup>[128]</sup>	+++	++	-	+++	-
Affinität zu FcγRI <sup>[126]</sup>		+++	-	+++	-
Affinität zu FcγRIIb <sup>[126]</sup>		±			
Affinität zu FcγRIIIa/b <sup>[126]</sup>		+	-	+	-
Affinität zu FcγRn <sup>[129]</sup>		+	+	+	+
IL-4 <sup>[130,131]</sup>					+++
IL-10 <sup>[131]</sup>		+++		+++	
<b>Murine Antikörper</b>					
	IgM	IgG1	IgG2a	IgG2b	IgG3
Immuantwort auf <sup>[132,133]</sup>		Proteine	Viren/ Bakterien	Viren/ Bakterien	Kohlenhydrate
Halbwertszeit im Serum <sup>[134]</sup>		6-8 d	6-8 d	4-6 d	6-8 d
Komplement Aktivierung	++	±	+++	+++	+
Affinität zu FcγRI <sup>[129]</sup>		±	+++	+	±
Affinität zu FcγRIIb <sup>[129]</sup>		+	+	+	-
Affinität zu FcγRIII <sup>[129]</sup>		++	+	+	-
Affinität zu FcγRIV <sup>[129]</sup>		-	+	+	-
IL-4 <sup>[126,130]</sup>	---	+++	---	+++	---
TGF-β <sup>[133]</sup>				+++	
INF-γ <sup>[130,133]</sup>	++	---	+++	---	---

**Abb. 3.41: Eigenschaften humaner und muriner IgM- und IgG- Antikörper.**

Im Menschen gibt es verschiedene Subtypen von Fcγ-Rezeptoren (FcγRI, FcγRIIa/b, FcγRIIIa/b und FcγRn) und bei der Maus sind die Rezeptoren FcγRI, FcγRIIb, FcγRIII und FcγRIV bekannt.<sup>[124]</sup> Sowohl im Menschen als auch in der Maus unterscheiden sich die Subtypen in der Bindungsaffinität zum Fc-Teil der Antikörper und in ihrer Wirkung als Aktivator oder Inhibitor. Dabei gibt es zwischen den Spezies Mensch und Maus Gemeinsamkeiten, aber auch Unterschiede. Der FcγRI-



Rezeptor bindet zum Beispiel in beiden Spezies den Fc-Teil von IgG-Antikörpern mit hoher Affinität und wirkt aktivierend. Allerdings bindet er beim Menschen nur Antikörper des Isotyps IgG1 mit hoher Affinität und bei der Maus lediglich IgG2a-Antikörper mit hoher Affinität. Der FcγRIIb-Rezeptor dagegen ist bei beiden Spezies ein inhibitorischer Rezeptor und bindet im Menschen alle IgG-Subtypen moderat und in der Maus die Subtypen IgG2a und IgG2b mit moderater Affinität.<sup>[129]</sup>

Damit wird deutlich, dass die induzierten Antikörper-Isotypen einen entscheidenden Hinweis auf die immunologische Wirksamkeit der Vakzine liefern können. Es wird aber auch deutlich, dass Erkenntnisse, die aus Immunisierungsstudien von Mäusen gewonnen werden, nur bedingt auf den Menschen übertragen werden können. In Abbildung 3.41 sind einige Merkmale von murinen und humanen Antikörperklassen zusammengefasst.<sup>[124]</sup>

### 3.5.4 Schlussfolgerungen zur Entwicklung von Antitumor-Vakzinen

Die in den vorangegangenen Kapitel beschriebenen Zusammenhänge führen zu dem Schluss, dass strukturspezifische Immunantworten vor allem durch die Induktion von hochspezifischen Antikörpern bewerkstelligt werden. Damit ist die tumorassoziierte MUC1-Glycopeptid-Sequenz als B-Zell-Epitop der zentrale Bestandteil der Antitumor-Vakzine. Da es sich bei diesem Glycopeptid um eine endogene Struktur handelt, ist sie selbst nicht besonders immunogen, weil sie keine wirksamen T-Zell-Epitope enthält. Die T-Zellaktivierung ist aber zur Ausbildung einer adaptiven Immunantwort (Affinitätsreifung, Ausbildung eines immunologischen Gedächtnisses)<sup>[101,103]</sup> unabdingbar. Deswegen sind T-Helferzell-Epitope der zweite zentrale Bestandteil von Antitumorvakzinen. In den nächsten Kapiteln wird die Synthese von T-Zell-Epitopen und die Anbindung von MUC1-Glycopeptiden an immunogene Proteine, die zahlreiche T-Zell-Epitope enthalten, beschrieben.

Neben dem B- und T-Zell-Epitop als zentrale Bestandteile der Vakzine können zusätzliche Adjuvantien die Effektivität der Vakzine steigern. Die Wirksamkeit solcher Hilfsstoffe lässt sich auf zwei verschiedene Effekte zurückführen. Zum einen können Adjuvantien starke Immunogene sein, die das angeborene Immunsystem aktivieren und eine starke allgemeine Inflammation hervorrufen (z.B. Liganden von TLR-Rezeptoren: nicht methylierte CpG-DNA (TLR-9-Ligand) oder

Pam<sub>3</sub>Cys (TLR-2-Ligand)), die sich positiv auf die adaptive Immunantwort auswirkt.<sup>[99]</sup> Zum anderen können Adjuvantien auch Formulierungen der Vakzine sein, die zu einer langsamen Freisetzung des Impfstoffes und damit zu einem langandauernden immunologischen Reiz im Körper führen (Depoteffekt). Dazu zählt z.B. das inkomplette Freund'sche Adjuvans, eine Wasser-in-Öl-Emulsion.<sup>[135,136]</sup> Ähnliche Depoteffekte können auch durch Konjugation der Vakzine an polymere Träger erreicht werden.<sup>[33]</sup>

Komplettes Freund'sches Adjuvans beinhaltet neben der Wasser-in-Öl-Emulsion noch Zellwandbestandteile des *Mycobacterium tuberculosis*. Daher ist es ein ausgesprochen starkes Adjuvans. Aufgrund seiner gravierenden Nebenwirkungen ist sein Einsatz im Menschen nicht mehr zulässig und muss sogar im Tierversuch sorgfältig abgewogen werden.<sup>[135]</sup>

### 3.6 Synthese und immunologische Evaluierung von proteinkonjugierten Vakzinen

Viele klassische Impfstoffe gegen Krankheiten, die durch virale oder bakterielle Krankheitserreger ausgelöst werden (z.B. Pocken, Keuchhusten, Tuberkulose und Masern) bestehen aus inaktivierten Proteinen (sog. Toxoide).<sup>[137]</sup> Die hohe Toxizität der nativen Proteine macht einen direkten Einsatz als Impfstoff unmöglich. Daher werden die Toxine durch Erwärmung in Gegenwart von Formaldehyd detoxifiziert. Dabei reagieren freie Aminogruppen mit Formaldehyd zu Aldimin-Gruppen und zu Vernetzungen. Durch diese Modifikationen verlieren die Proteine ihre toxische, nicht aber ihre antigene Wirkung.

Im Gegensatz zu diesen klassischen Toxoidimpfstoffen muss die Immunogenität der endogenen MUC1-Glycopeptide erhöht werden, damit die Toleranz des Immunsystems gegen das körpereigene Tumorgewebe gebrochen werden kann. In den letzten Jahren gab es zahlreiche Bemühungen, um durch die Verknüpfung von verschiedenen Proteinen (BSA (Bovine Serum Albumin), KLH (Keyhole Lympet Hemocyanin), TTox (Tetanus Toxoid)) mit Bestandteilen des tumorassoziierten MUC1 wirksame Antitumor-Vakzine herzustellen.<sup>[27,138-140]</sup> Dabei zeigte sich in Immunisierungsstudien an Mäusen, dass Konjugate von MUC1-Glycopeptiden mit Tetanus Toxoid die höchsten Serumantikörpertiter hervorbringen und, dass diese Antikörper nicht nur spezifisch das zur Impfung eingesetzte MUC1-Glycopeptidantigen binden, sondern auch humanen Tumorzellen erkennen können.<sup>[81]</sup> Aufgrund dieser Erkenntnisse wurden mit dem Ziel

der weiteren Optimierung der Erkennung von Tumorgewebe die in Kapitel 3.4.3 beschriebenen Glycopeptide an TTox konjugiert und die Wirkung der Vakzine durch Evaluierung im Mausmodell untersucht.

### 3.6.1 Allgemeine Vorschrift zur Konjugation von Glycopeptiden an Proteine mit Quadratsäurediethylester

Aufgrund der Vielzahl von Funktionalitäten in Proteinen ist eine gezielte Verknüpfung von Peptiden an Proteine nicht einfach. Bei der Verknüpfung von Glycopeptiden kommt erschwerend hinzu, dass die Reaktion unter Bedingungen durchgeführt werden muss, bei denen die Stabilität des Glycopeptids gewährleistet ist. Die Anbindung sollte also am besten unter nahezu physiologischen Bedingungen im wässrigen Medium erfolgen. So kann garantiert werden, dass funktionalisierte Bereiche auch nach der Reaktion und beim Einsatz als Impfstoff im Organismus an der Proteinoberfläche liegen und leicht zugänglich sind. Zudem sollte die Reaktion chemoselektiv über den *N*-Terminus der Spaceraminosäure erfolgen, damit die Konformation des B-Zell-Epitops erhalten bleibt. Weiterhin sollte die Anbindung möglichst über immunologisch unbedenkliche Verbindungen erfolgen. Die von *L. F. Tietze* entwickelte Methode zur Verknüpfung primärer Amine über Quadratsäurediethylester<sup>[141,142]</sup> wird all diesen Anforderungen gerecht und hat sich seit ihrer ersten Anwendung durch *S. Dziadek* im Arbeitskreis Kunz bewährt.<sup>[60,139]</sup> Die Selektivität der Konjugationsmethode beruht auf den vom pH-Wert abhängigen nukleophilen Angriff auf den Quadratsäurediester. Bei einem pH-Wert von 8.0 reagiert lediglich ein Amin unter Abspaltung von Ethanol. Erst ab einem pH-Wert von 9.5 kann die zweite nukleophile Substitution durch ein weiteres primäres Amin erfolgen. Da in der MUC1-Tandem Repeat-Sequenz neben dem *N*-Terminus kein weiteres reaktives Amin vorkommt, können die deblockierten Glycopeptide **47**, **48**, **49** und **50** selektiv mit Quadratsäurediethylester in Wasser/Ethanol (1:1) und in Gegenwart von Natriumcarbonat zu den Quadratsäuremonoamidethylestern **52**, **53**, **54** und **55** umgesetzt und nach präparativer HPLC in Ausbeuten von 31-78% erhalten werden (Abb. 3.42).

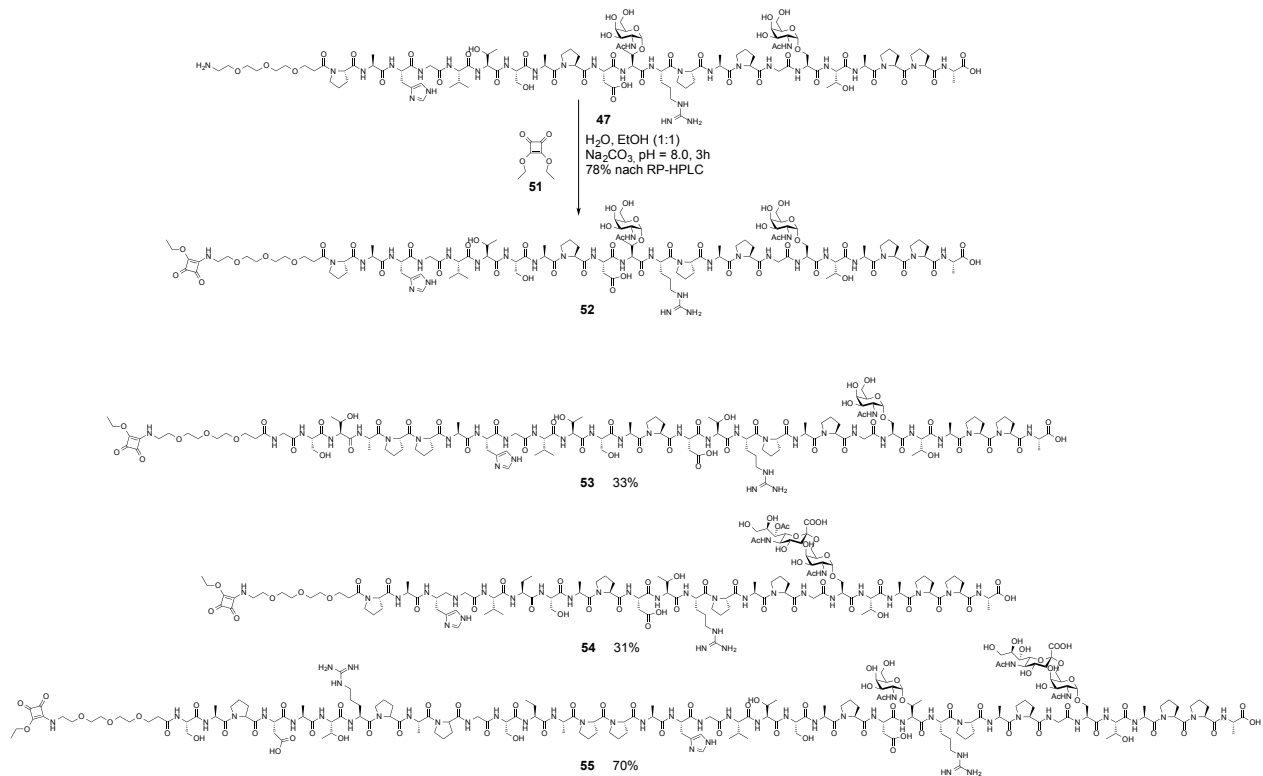


Abb. 3.42: Synthese der Quadransäuremonoamidethylester **52**, **53**, **54** und **55**.

Durch Erhöhung des pH-Wertes können die Quadransäuremonoamidethylester **52**, **53**, **54** und **55** nun im wässrigen Medium durch Reaktion mit freien Aminen auf der Oberfläche von Trägerproteinen (*N*-Terminus, freie  $\epsilon$ -Aminogruppen von Lysin) zu Neoglycoproteinen reagieren. Zur Konjugation der MUC1-Glycopeptide an Proteine wie BSA oder TTox werden die mit Quadransäure funktionalisierten Glycopeptide **52**, **53**, **54** und **55** im Überschuss mit dem Protein in wässrigem Natriumphosphat-Puffer bei pH 9.5 fünf Tage bei Raumtemperatur gerührt. Nach der Reaktion werden nicht umgesetzte Glycopeptide sowie die Salze der Pufferlösung durch Ultrafiltration über eine Membran abgetrennt, die für Moleküle bis zu einer Größe von 30 kDa durchgängig ist. Dabei wird solange entionisiertes Wasser nachgefüllt bis das Filtrat neutral ist. Nach der Gefriertrocknung des Überstands erhält man die Neoglycoproteine als farblose Lyophilisate.

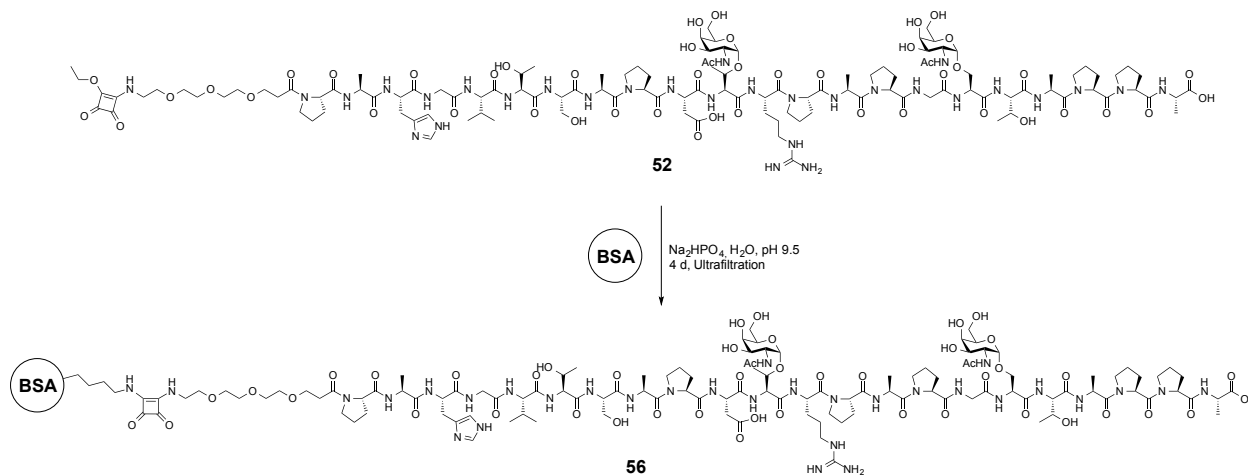


Abb. 3.43 Darstellung eines BSA-Konjugates.

### 3.6.2 Rinderserumalbumin-Konjugate als Grundlage für ELISA-Untersuchungen

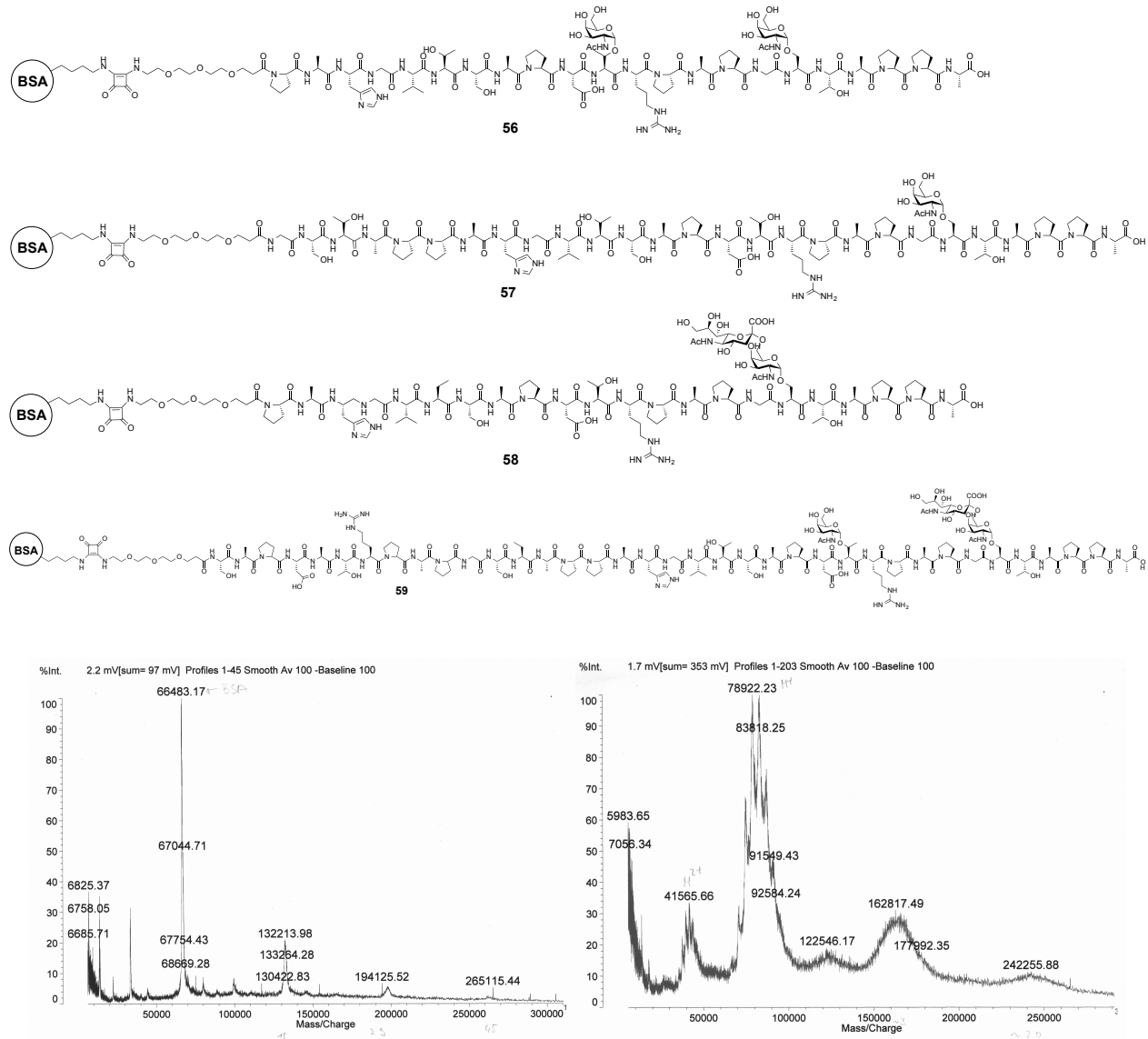
Zum Nachweis von Serumantikörpern unter physiologischen Bedingungen hat sich die robuste ELISA-Technik (engl.: "*Enzyme-linked Immunosorbent Assay*") bewährt. Dabei werden die Antigene auf Mikrotiterplatten immobilisiert. Diese Mikrotiterplatten werden mit Proben, die Antikörper enthalten, inkubiert. In Waschschrritten werden Antikörper, die nicht an Antigen gebunden sind, entfernt. Das Antigen-Antikörperkonjugat wird anschließend über einen Sekundärantikörper nachgewiesen, an dem ein Enzym gekoppelt ist, das durch eine Farbreaktion die gebunden Primärantikörper nachweist.<sup>[143,144]</sup>

Die MUC1-Glycopeptide allein können nicht als Beschichtungsmaterialien für die Mikrotiterplatten verwendet werden, da sie aufgrund der geringen Größe nur unzureichend adhären sind. Beim Einsatz von MUC1-Glycopeptid-TTox-Konjugaten als Vakzine entstehen neben Antikörpern, die das MUC1-Glycopeptid erkennen, auch immer Antikörper gegen das TTox selbst. Daher sind die TTox-Konjugate als antigenspezifische Beschichtungsmaterialien für den Nachweis von spezifischen MUC1-Glycopeptid-Antikörpern nicht geeignet. Zudem spricht auch der hohe Preis des Tetanus Toxoids gegen einen Einsatz als Beschichtungsmaterial.

Rinder-Serumalbumin (BSA) ist ein aus 583 Aminosäuren aufgebautes Plasmaprotein mit einem Molekulargewicht von 66 kDa. Als günstig verfügbares Protein, das 59 Lysine enthält, eignet es sich hervorragend für die Synthese von MUC1-Glycopeptid-BSA-Konjugaten und für den Einsatz

als Antigen-präsentierendes Beschichtungsmaterial in ELISA-Experimenten. Im Rahmen seiner Dissertation konnte A. Kaiser zudem zeigen, dass Antikörper, die durch TTox-Konjugate induziert wurden, nicht an BSA-Moleküle allein binden.<sup>[145]</sup>

Die Anbindung der MUC1-Glycopeptide an BSA erfolgt durch Umsetzung eines 23-fachen Überschusses des Glycopeptid-Monosquarats nach der in Kapitel 3.6.1 beschriebenen Vorschrift. Abb. 3.44 zeigt die in dieser Arbeit hergestellten BSA-Konjugate **56**, **57**, **58** und **59**.



**Abb. 3.44:** In dieser Arbeit hergestellte BSA-Konjugate **56** - **59** (oben) und MALDI-TOF-Spektrum von BSA (unten links) und von Struktur **59** (unten rechts).

Stellvertretend für alle BSA-Konjugate wurde von Struktur **59** durch MALDI-TOF-Massenspektrometrie der Grad der Funktionalisierung ermittelt. Die Messung ergab, dass von

den 59 Lysinen, die in der Aminosäuresequenz des BSA enthalten sind und für eine Anbindung von Glycopeptiden zur Verfügung stehen, etwa 3 bis 22 mit einem solchen Glycopeptid ( $M = 4395.05 \text{ g/mol}$ ) reagierten. Dies entspricht Gesamtmassen von 78000 bis 177000 kDa (siehe Abb. 3.44).

Aufgrund der mäßigen Immunogenität von BSA eignen sich die BSA-Konjugate nicht für den Einsatz als Vakzine. Sie werden daher ausschließlich als Beschichtungsmaterialien in ELISA-Experimenten verwendet. Im Rahmen dieser Arbeit werden standardmäßig zwei verschiedene ELISA Experimente durchgeführt. In einem Standard-ELISA werden nach jeder Auffrischungsimpfung die Titer der induzierten IgG-Serumantikörper bestimmt. Dabei wird das Antiserum in einer seriellen Verdünnungsreihe in zwölf Schritten 1:1 seriell titriert. Die Anfangsverdünnung des Serums liegt dabei im Bereich von 1 : 50 bis 1 : 400. Nach der letzten Auffrischungsimpfung wird zusätzlich auf das Vorhandensein von verschiedenen Antikörper-Isotypen im Antiserum geprüft (IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3, IgM, IgA, IgD). Der Ablauf des ELISA-Experiments ist identisch, es werden lediglich andere Sekundärantikörper verwendet, die spezifisch für den jeweiligen Fc-Teil des entsprechenden Serumantikörpers sind. Aus Kostengründen wird bei den Isotyp-ELISAs lediglich eine Verdünnungsreihe von vier Schritten durchgeführt.

Um eine unspezifische Bindung der Serumantikörper auszuschließen, wird als Negativkontrolle das Präimmunserum einer nicht immunisierten Maus getestet. Um eine unspezifische Bindung des Sekundärantikörpers auszuschließen, wird dieser allein in einer zweiten Negativkontrolle ohne Serum getestet.

Zur Beschichtung der 96-Well-Mikrotiterplatten werden die BSA-Konjugate in einer wässrigen Pufferlösung bei pH 9.3 mit einer Konzentration von 20  $\mu\text{g/ml}$  inkubiert. Die immobilisierten BSA-Konjugate dienen als antigenspezifische Plattform für die Vakzin-induzierten Serum-Antikörper, die an die MUC1-Glycopeptid-Epitope binden. Antikörper, die nicht binden, werden in nachfolgenden Waschsritten entfernt. Die verwendeten Sekundärantikörper sind an ihrem Fc-Teil biotinyliert und erkennen spezifisch den Fc-Teil des Primärantikörpers. Nach der Inkubation des Sekundärantikörpers werden nicht gebundene Antikörper in nachfolgenden Waschsritten entfernt. Um ein detektierbares Signal zu generieren, wird mit einem Konjugat aus Streptavidin und dem Enzym Meerrettichperoxidase (HPO) inkubiert. Das Streptavidin bindet hochspezifisch an das Biotin. Die Meerrettichperoxidase kann das farblose Substrat 2,2'-

Azinobis-(3-ethylbenzthiazolin-6-sulfonsäure) (ABTS) durch Oxidation zu einem grünen Radikalkation oxidieren. Diese Farbreaktion kann bei einer Wellenlänge von 410 nm photometrisch quantifiziert werden. In Abbildung 3.45 ist das Funktionsprinzip eines ELISA-Experiments schematisch dargestellt.

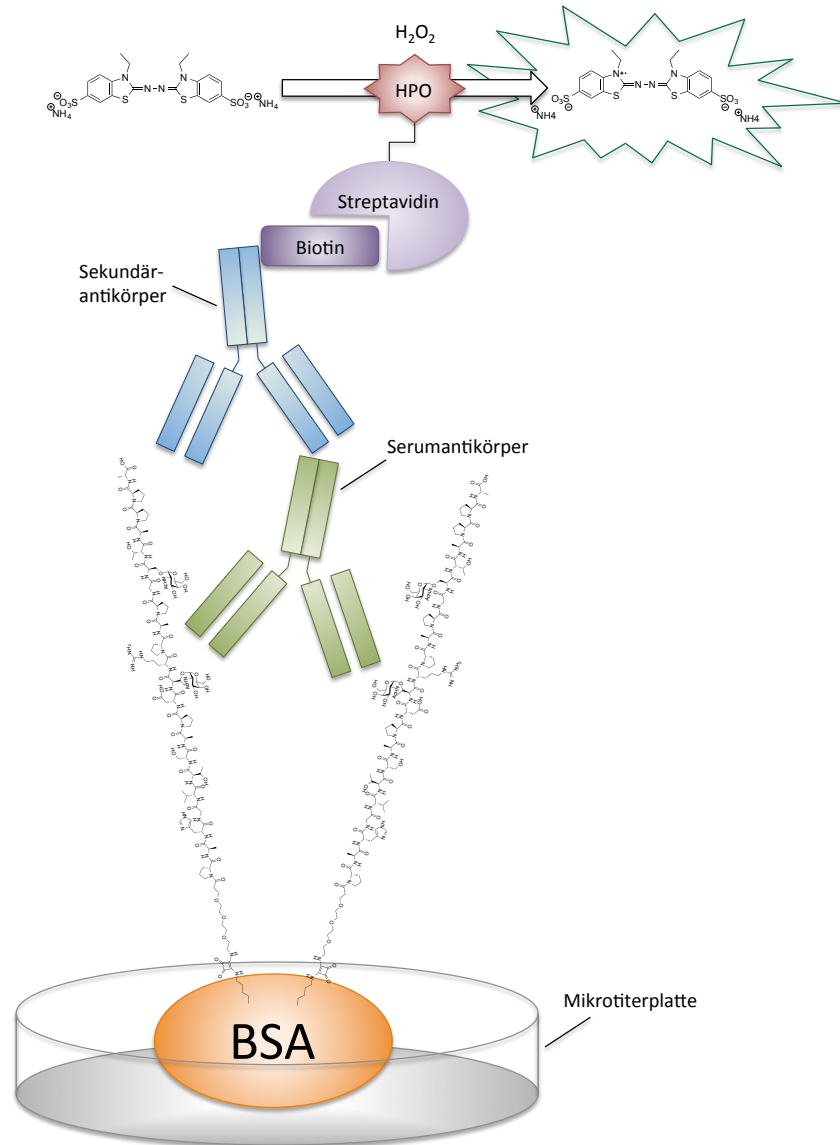


Abb. 3.45: Schematische Darstellung des ELISA.

Abb. 3.46 zeigt eine entwickelte Platte, die zur photometrischen Bestimmung der Absorption bei 410 nm bereit ist.



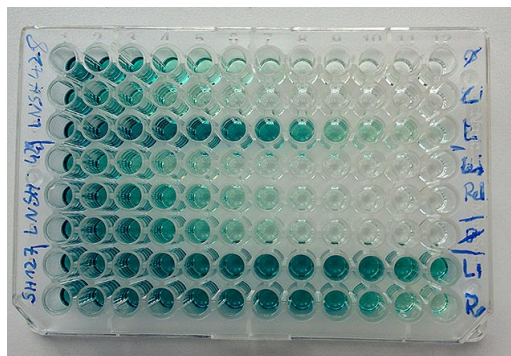


Abb. 3.46: Beispielhafte Darstellung einer entwickelten ELISA 96-Mikrotiterplatte.

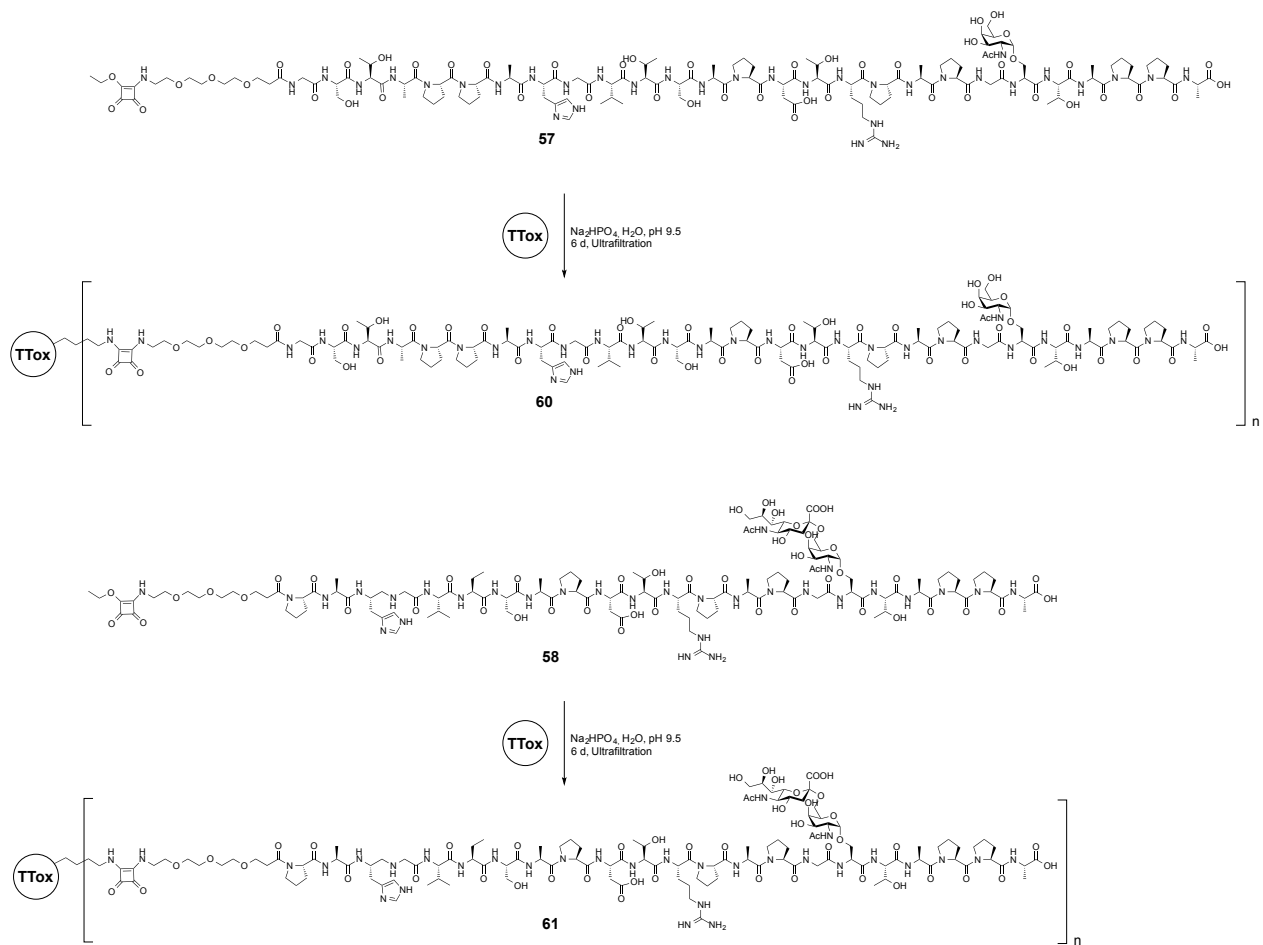
### 3.6.3 Synthese von MUC1-Glycopeptid-TTox-Konjugaten zur Verwendung als Antitumor-Impfstoffe

Da die tumorassoziierte Form des MUC1 eine körpereigene Substanz ist, wird sie nicht als pathogen erkannt und daher vom Immunsystem toleriert. Um das körpereigene Immunsystem so zu manipulieren, dass es gezielt gegen körpereigene Tumore agieren kann, müssen die tumorassoziierten MUC1-B-Zell-Epitope mit Substanzen verknüpft werden, die starke T-Zell-vermittelte Immunantworten auslösen.

Tetanustoxin ist ein hochgradig aktives Nervengift aus dem Bakterium *Clostridium tetani*. Es ist zudem ein extrem wirksames Immunogen, das eine Fülle von wirksamen T-Zell-Epitopen enthält. Durch Behandlung mit Formaldehyd wird das Toxin detoxifiziert. Das dabei entstehende Tetanus Toxoid hat keine pathogene Wirkung mehr, ist aber immer noch ein sehr wirksames Antigen. Als immunogenes Trägermaterial für MUC1-Antitumorvakzine bietet es zahlreiche Vorzüge. Das aus 1312 Aminosäuren aufgebaute Tetanus Toxoid hat eine Masse von etwas über 150 kDa und besitzt 107 freie Lysingruppen, die theoretisch zur Anbindung von MUC1-Glycopeptiden zur Verfügung stehen. Zur Aktivimmunisierung gegen Wundstarrkrampf ist es schon seit dem Beginn des 20. Jahrhunderts als wirksamer Impfstoff bekannt.<sup>[146]</sup> Es enthält eine Vielzahl von T-Helferzell-Epitopen, die eine starke T-Zell-vermittelte Immunantwort auslösen. Diese Eigenschaft des TTox wird in der klinischen Anwendung im Mensch bereits in zahlreichen Multikomponenten Vakzinen ausgenutzt, wo es als immunogenes Trägerprotein die Wirksamkeit von Impfstoffen z.B. gegen *Haemophilus influenzae* (Pfeiffer-Influenzabakterium)<sup>[147]</sup>, *Neisseria meningitidis* (Meningokokken)<sup>[148]</sup> oder *Streptococcus pneumoniae* (Pneumokokken)<sup>[149]</sup>

deutlich erhöht. Die breite klinische Anwendung von TTox als Bestandteil von Impfstoffen ist für die Entwicklung von Antitumor-Vakzinen ein großer Vorteil.

Die Konjugation der MUC1-Glycopeptide an TTox wird auch über die in Kapitel 3.6.1 beschriebene Methode mit Quadratsäurediethylester bewerkstelligt. Da das TTox im Vergleich zu BSA mit 107 Lysinen über wesentlich mehr freie Amingruppen verfügt, werden für die Anbindung 55 Äquivalente des MUC1-Glycopeptids in der Reaktion eingesetzt. Analog zu den BSA-Konjugaten werden auch die TTox-Konjugate durch Ultrafiltration über einer 30 kDa Membran gereinigt. Abbildung 3.47 zeigt die in dieser Arbeit dargestellten TTox-Konjugate **60**, **61** und **62**.



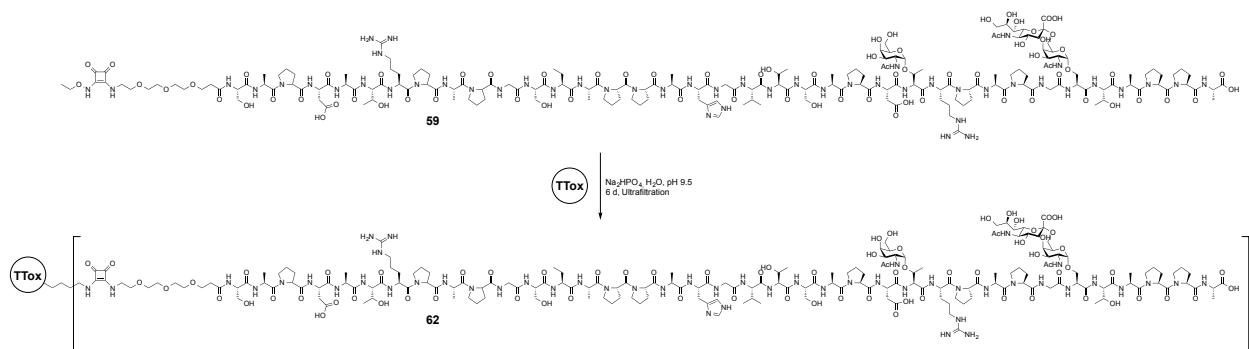


Abb. 3.47: Synthese der TTox-Konjugate 60, 61 und 62.

Nach der Gefriertrocknung werden TTox-Konjugate als farblose Lyophilisate erhalten. Diese können nun als Impfstoffe in Immunisierungsstudien im Mausmodell eingesetzt werden.

### 3.6.4 Herstellung von Vakzinformulierungen

Die TTox-Konjugate **60**, **61** und **62** können nicht einfach in wässriger Pufferlösung mit physiologischem pH appliziert werden, da dies durch den schnell erfolgenden Abbau der stark immunogenen Substanz nur zu einem kurzen immunologischen Signal führen würde. Für die Ausbildung einer adaptiven Immunantwort wird ein starker, möglichst lang anhaltender immunologischer Reiz benötigt. Dies kann durch Applikation der Vakzine in Formulierungen mit sog. Adjuvantien erfolgen, die eine langsame Freisetzung des Impfstoffs gewährleisten. Als besonders effizient hat sich dabei das inkomplette Freund'sche Adjuvans erwiesen, eine einfache Wasser-in-Öl-Emulsion, die einen langanhaltenden Depoteffekt von applizierten Impfstoffen ermöglicht.<sup>[135]</sup> Zur Formulierung der injektionsbereiten Darreichungsform wird das lyophilisierte TTox-Konjugat zunächst unter sterilen Bedingungen in PBS-Puffer gelöst und anschließend mit dem gleichen Volumen sterilem Paraffinöl versetzt. Durch Einwirkung von Ultraschall wird aus dem zweiphasigen Gemisch unter Eiskühlung eine stabile Emulsion erzeugt. Diese wird unter sterilen Bedingungen in eine Spritze überführt und kann zur Impfung dienen. Bei der Herstellung von Vakzin-Formulierungen mit komplettem Freund'schen Adjuvans (CFA) werden zusätzlich Lysate von Zellwandbestandteilen aus dem Bakterium *M. tuberculosis* in der wässrigen Phase gelöst. Aufgrund der enormen Immunogenität dieser Lysate ist beim Umgang

mit CFA besondere Vorsicht geboten. Zudem dürfen CFA-Formulierungen aufgrund ihrer Wirksamkeit nur subkutan appliziert werden.

### 3.6.5 Allgemeiner Immunisierungsplan für TTox-Konjugate

Zur erfolgreichen Durchführung einer Immunisierungsstudie im Tiermodell müssen eine Vielzahl von Parametern beachtet werden, wie z. B. die Auswahl des Tiermodells, die applizierte Menge der Vakzine sowie die Art der Applikation, die Impfabstände und auch der Zeitpunkt der Blutentnahme zur Überprüfung auf Serumantikörper. Alle diese Faktoren haben einen großen Einfluss auf das Ergebnis einer Vakzinierungsstudie.

In der immunologischen Forschung hat sich die Maus als Versuchstier aufgrund der hohen Gemeinsamkeiten zwischen murinem und humanem Genom und der einfachen Bedingungen, unter denen die Versuchstiere gehalten werden können, seit Jahren bewährt. In den Versuchen zur Evaluierung der Antitumorvakzine kommen weibliche Balb/c-Mäuse im Alter von 8 bis 12 Wochen zum Einsatz. Balb/c-Mäuse haben für die Immunisierungsversuche den Vorteil, dass sie bei Kontakt mit Immunogenen verstärkt zur Ausbildung einer IL-4-dominierten humoralen Immunantwort und damit zur Induktion von hohen Antikörpertitern neigen.<sup>[150]</sup>

Auch die Dosis des Antigens hat einen entscheidenden Einfluss auf die Qualität der Immunantwort. Ist die Dosis zu gering, kann nur ein unvollständiger immunologischer Reiz entstehen. Ist die Dosis zu hoch, kann dies zu einer aktiven Ruhigstellung (Anergie) des Immunsystems und damit zur Toleranz gegen das Antigen führen.<sup>[151]</sup> Erfahrungswerte zeigen, dass eine optimale Dosis, die eine starke Immunantwort hervorruft, bei 10 µg TTox-Konjugat pro Maus liegt.<sup>[145,152]</sup>

Hat ein Organismus erstmalig mit einem Antigen Kontakt, dauert es etwa zwei Tage bis erste B-Zellen mit der Produktion von IgM-Antikörpern beginnen. Ab dem vierten Tag der Infektion steigt der IgM-Titer gewöhnlich rasant an. Zur Induktion von IgG-Antikörpern müssen B-Zellen durch entsprechende Signale von T-Zellen aktiviert werden (vgl. Kapitel 3.5.3). Daher steigt der IgG-Titer erst ab Tag sechs der Infektion langsam an und erreicht etwa nach 14 Tagen einen Höhepunkt. Dieser hohe IgG-Titer fällt erst im Verlauf von 3 bis 4 Wochen langsam ab. Abbildung 3.48 zeigt exemplarisch den Verlauf der IgM- und IgG-Titer eines Menschen nach einer erstmaligen Infektion mit Denguefieber (*Flavivirus*).<sup>[153]</sup>

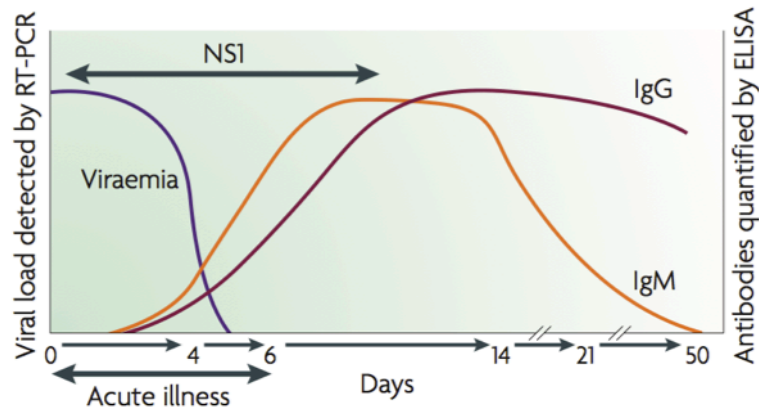


Abb. 3.48: Entwicklung der Antikörpertiter nach einer Erstinfektion mit Dengueviren.<sup>[153]</sup>

Wird eine Auffrischungsimpfung dann durchgeführt, wenn die B-Zellen gerade hohe IgG-Titer erzeugen, führt dies zur Suppression der aktivierten B-Zellen durch T-Zellen und damit zu einer geschwächten Immunantwort.<sup>[154,155]</sup> Aus diesem Grund werden Auffrischungsimpfungen erst nach drei Wochen durchgeführt, wenn die Aktivierung der B-Zellen nachlässt. Nach erneutem Antigenkontakt steigen die Antikörpertiter meist binnen weniger Tage schnell wieder an. Daher werden Blutproben aus den Versuchstieren bereits fünf Tage nach der Auffrischungsimpfung entnommen.

Die Applikation der Vakzine hat einen maßgeblichen Einfluss auf die Pharmakokinetik des Impfstoffs. Da im Allgemeinen ein langanhaltender immunologischer Reiz erwünscht ist, wird die Vakzine nicht intravenös (sehr schnelle Metabolisierung) sondern intraperitoneal (mäßige Metabolisierung) bzw. subkutan (langsame Metabolisierung) appliziert. Um eine allgemeine Inflammation zu erzeugen, die eine adaptive Immunantwort zur Folge hat, wird die erste Immunisierung in komplettem Freund'schen Adjuvans (CFA) appliziert. Aufgrund der hohen Immunogenität von CFA ist dies nur subkutan möglich. Abbildung 3.49 fasst den Ablauf des allgemeinen Immunisierungsplans zusammen.

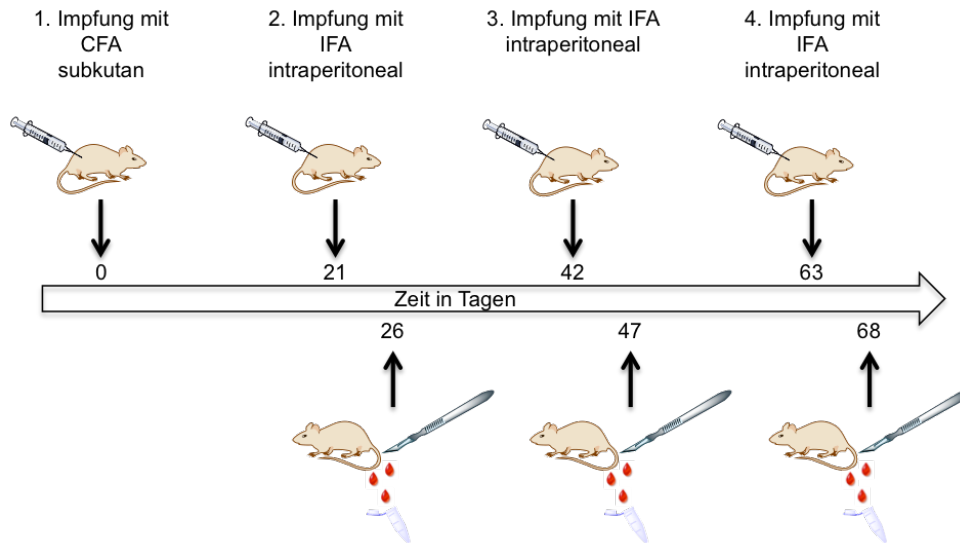


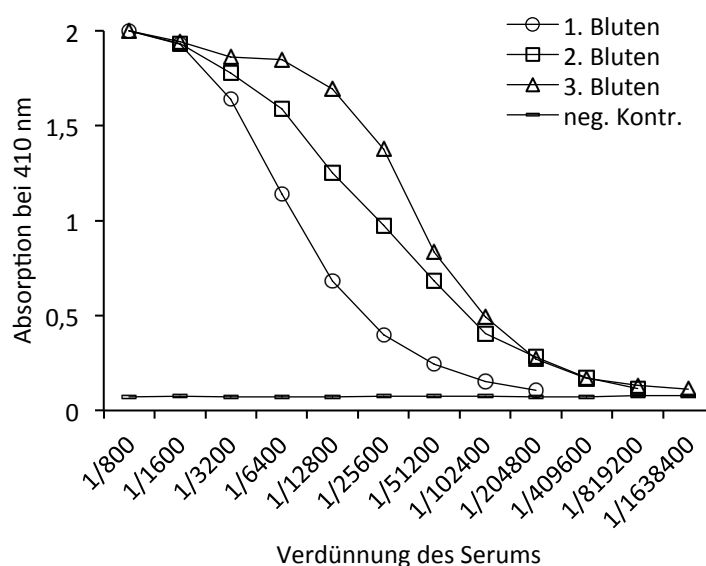
Abb. 3.49: Zeitplan zur Immunisierungsstudie.

Die Arbeiten an den Tierversuchen wurden in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Xxxxx Xxxxxxx am Institut für Immunologie der Universitätsmedizin Mainz durch Zusammenarbeit mit Dr. Xxxxxxx Xxxxxxxx, Xxxxxxxx Xxxxxxxx und Xxxxxx Xxxxxxx durchgeführt.

### 3.6.6 Immunologische Evaluierung der TTox-Konjugate

In vorangegangenen Arbeiten wurden zum Aufbau der MUC1-B-Zell-Epitope Peptidsequenzen synthetisiert, die nur einen Teilabschnitt der Tandem Repeat-Sequenz oder maximal eine C-terminal um zwei Aminosäuren verlängerte Version der kompletten Tandem Repeat-Sequenz enthielten.<sup>[60,83,145,152]</sup> Durch NMR-spektroskopische Strukturaufklärungsstudien konnte gezeigt werden, dass die immundominante Domäne mit dem Motiv APDTRP einen charakteristischen Knäuf ausbildet, wenn mehrere Tandem Repeat-Sequenzen in einem Peptidstrang hintereinander liegen.<sup>[156]</sup> Daher sollen im Vergleich zu der bekannten 22 Aminosäuren langen Sequenz (Struktur **61**) auch N-terminal verlängerte Sequenzen getestet werden (Vakzine **60** und **62**). Das B-Zell-Epitop des TTox-Konjugats **60** hat eine N-terminal um sieben Aminosäuren verlängerte Peptidsequenz, bezogen auf die Tandem Repeat-Sequenz. Dadurch wird die immundominante APDTRP-Domäne durch zwei vollständige STAPPA-Sequenzmotive eingerahmt und verfügt zusätzlich an der C-terminalen STAPPA Sequenz über eine Glycosylierung im T<sub>N</sub>-Serin-Antigen.

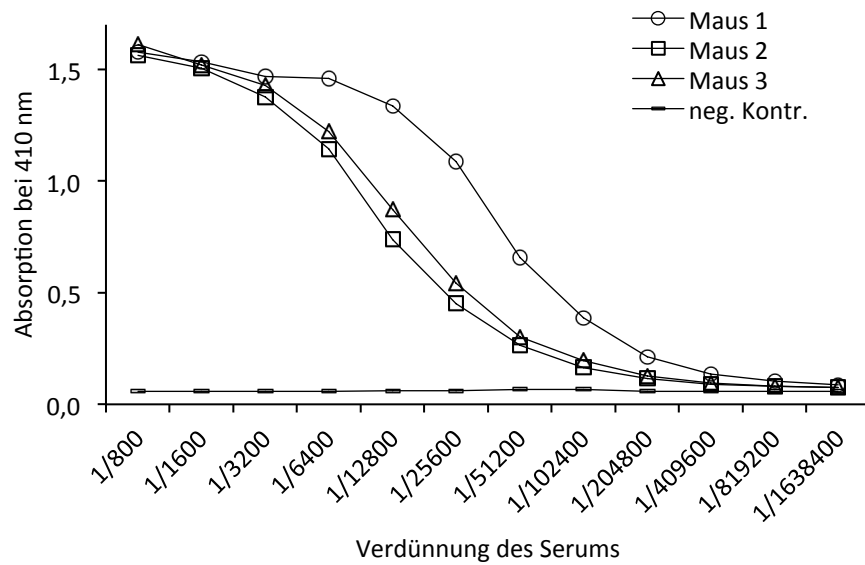
TTox-Konjugat **62** hat ein B-Zell-Epitop mit einer N-terminal um 16 Aminosäuren verlängerten Peptidsequenz. Innerhalb dieser Sequenz befinden sich zwei immundominante APDTRP-Domänen, wobei die C-terminal gelegene eine Glycosylierung durch ein T<sub>N</sub>-Threonin-Antigen aufweist. Zusätzlich befindet sich mit dem Sialyl-T<sub>N</sub>-Serin-Antigen eine weitere Glycosylierung an dem C-terminalen STAPPA-Motiv. Die immunologische Evaluierung der TTox-Konjugate der beiden neuen Glycopeptidepitope **60** und **62** sollen im Vergleich zu TTox-Konjugat **61** zeigen, welchen Einfluss die Verlängerung der B-Zell-Epitope auf die Affinität der induzierten Serumantikörper zu humanen Tumorzellen haben. Dazu werden pro Vakzine jeweils drei Mäuse, wie in Kapitel 3.6.5 beschrieben, immunisiert. Da komplettes Freund'sches Adjuvans (CFA) im Menschen aufgrund seiner starken Nebenwirkung nicht angewendet werden darf, wird bei den TTox-Konjugaten **61** und **62** auf CFA verzichtet. Stattdessen werden diese Vakzine lediglich mit IFA appliziert, um die Wirksamkeit dieser Vakzine ohne das im Menschen nicht zulässige Adjuvans zu ermitteln.



**Abb. 3.50:** Erhöhung der Titer von Serumantikörpern durch Auffrischungsimpfungen, Vakzine **60**, Maus **1**, BSA-Coat **57**. Erstimpfung mit komplettem Freund's Adjuvans (CFA), Auffrischungsimpfungen mit inkomplettem Freund's Adjuvans (IFA).

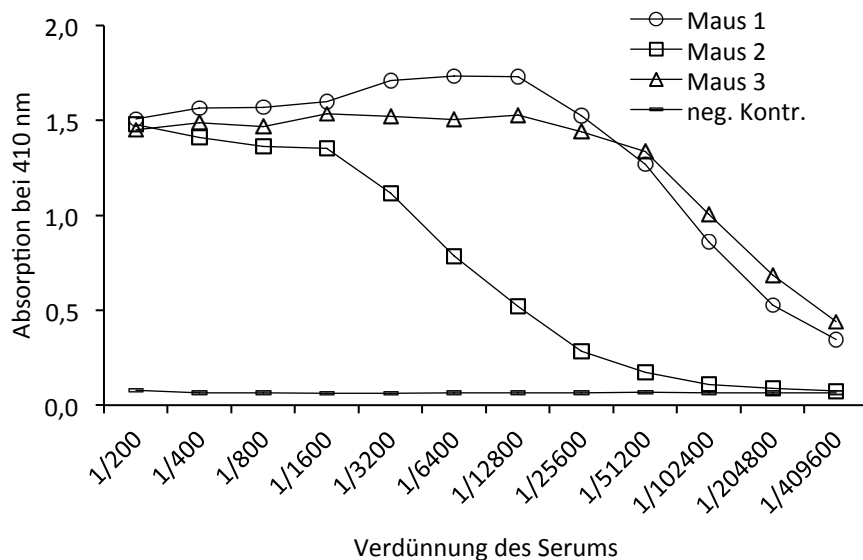
Zum Nachweis der MUC1-spezifischen Serumantikörper, die gegen das B-Zell-Epitop des MUC1-TTox-Konjugates induziert werden, verwendet man bei den ELISA-Analysen die BSA-Konjugate mit dem gleichen MUC1-Glycopeptid. Abbildung 3.50 zeigt exemplarisch die durch Vakzine **60** induzierten IgG-Serumantikörper von Maus **1** je fünf Tage nach der ersten, zweiten und dritten

Auffrischungsimpfung. Das Auftreten hoher Titer von Antikörpern des IgG-Isotyps zeigt, dass bereits nach der ersten Auffrischungsimpfung eine adaptive T-Zell-vermittelte Immunantwort durch Vakzine **60** induziert wurde. Nach jeder Auffrischungsimpfung verschieben sich die Endpunkttiter zu höheren Verdünnungen hin. Dies ist ein Hinweis auf die Ausbildung eines immunologischen Gedächtnisses, denn das Vorhandensein von Gedächtnis-B-Zellen führt bei erneutem Antigenkontakt sehr schnell zur Induktion hoher IgG-Antikörpertiter.

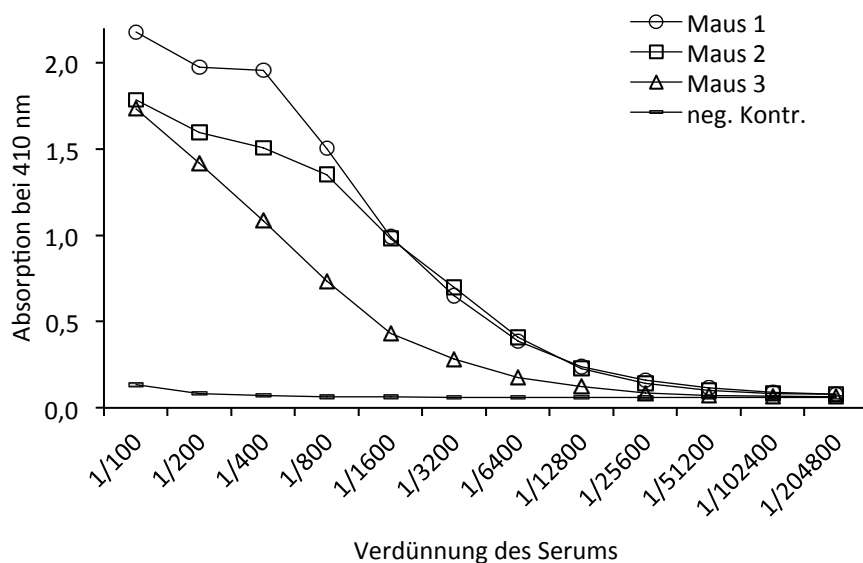


**Abb. 3.51: IgG-Antikörpertiter induziert durch Vakzine 60 nach dem 3. Bluten, BSA-Coat 57. Erstimpfung mit komplettem Freund's Adjuvans (CFA), Auffrischungsimpfungen mit inkomplettem Freund's Adjuvans (IFA).**





**Abb. 3.52: IgG-Antikörpertiter induziert durch Vakzine 61 nach dem 3. Bluten, BSA-Coat 58. Erst- und Auffrischungsimpfungen nur mit unvollständigen Freund's Adjuvans (IFA).**

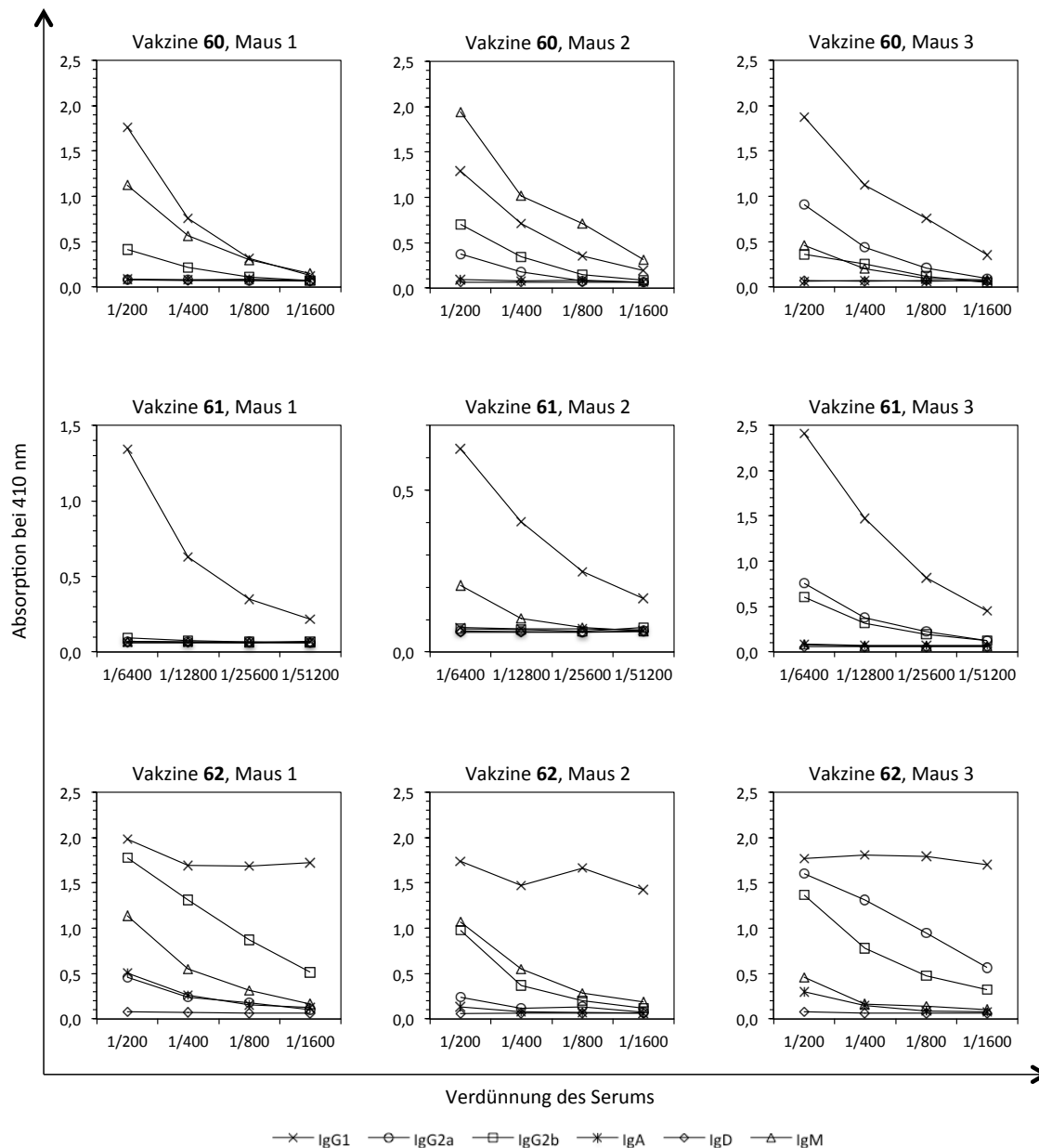


**Abb. 3.53: IgG-Antikörpertiter induziert durch Vakzine 62 nach dem 3. Bluten, BSA-Coat 59. Erst- und Auffrischungsimpfungen nur mit unvollständigen Freund's Adjuvans (IFA).**

Die Ergebnisse der ELISA-Analysen zur Bestimmung der IgG-Antikörpertiter nach dem dritten Bluten (vierte Immunisierung) sind für alle drei Mäuse in Abb. 3.51 für Vakzine **60**, in Abb. 3.52 für Vakzine **61** und in Abb. 3.53 für Vakzine **62** gezeigt. Ähnlich wie in literaturbekannten Arbeiten beschrieben, induzierten alle drei Vakzine hohe Titer von Antikörpern des IgG-

Isotyps.<sup>[27,81]</sup> Bemerkenswert ist, dass Vakzine **61** und **62**, die lediglich mit inkomplettem Freund'schen Adjuvans appliziert wurden, Antikörpertiter induzierten, die vergleichbar zu den Titern von Vakzine **60** sind, die mit komplettem Freund'schen Adjuvans appliziert wurde. Dies zeigt, dass TTox-Konjugate auch ohne externes immunstimulierendes Adjuvans immunogen genug sind, um eine außerordentlich starke Immunantwort auszulösen. Dieses Ergebnis kann von großer Relevanz sein, da die Anwendung TTox-basierter Vakzine mit IFA im Menschen bereits vielfach erprobt ist.

In den bisherigen ELISA-Untersuchungen wurden allgemein Antikörper des IgG-Isotyps durch einen Schaf-anti-Maus-IgG-Sekundärantikörper nachgewiesen. Der Einsatz von Subtyp-spezifischen Sekundärantikörpern ermöglicht die genaue Analyse der durch die Vakzine induzierten Antikörperisotypen. Dadurch können Rückschlüsse auf die Art der Immunantwort, die eine Vakzine induziert hat, geschlossen werden. Da die einzelnen Isotypen auch unterschiedliche Effektormechanismen hervorrufen, ist die Analyse des Antikörperisotypspektrums zusätzlich von besonderem Interesse (siehe Kap. 3.5.3).



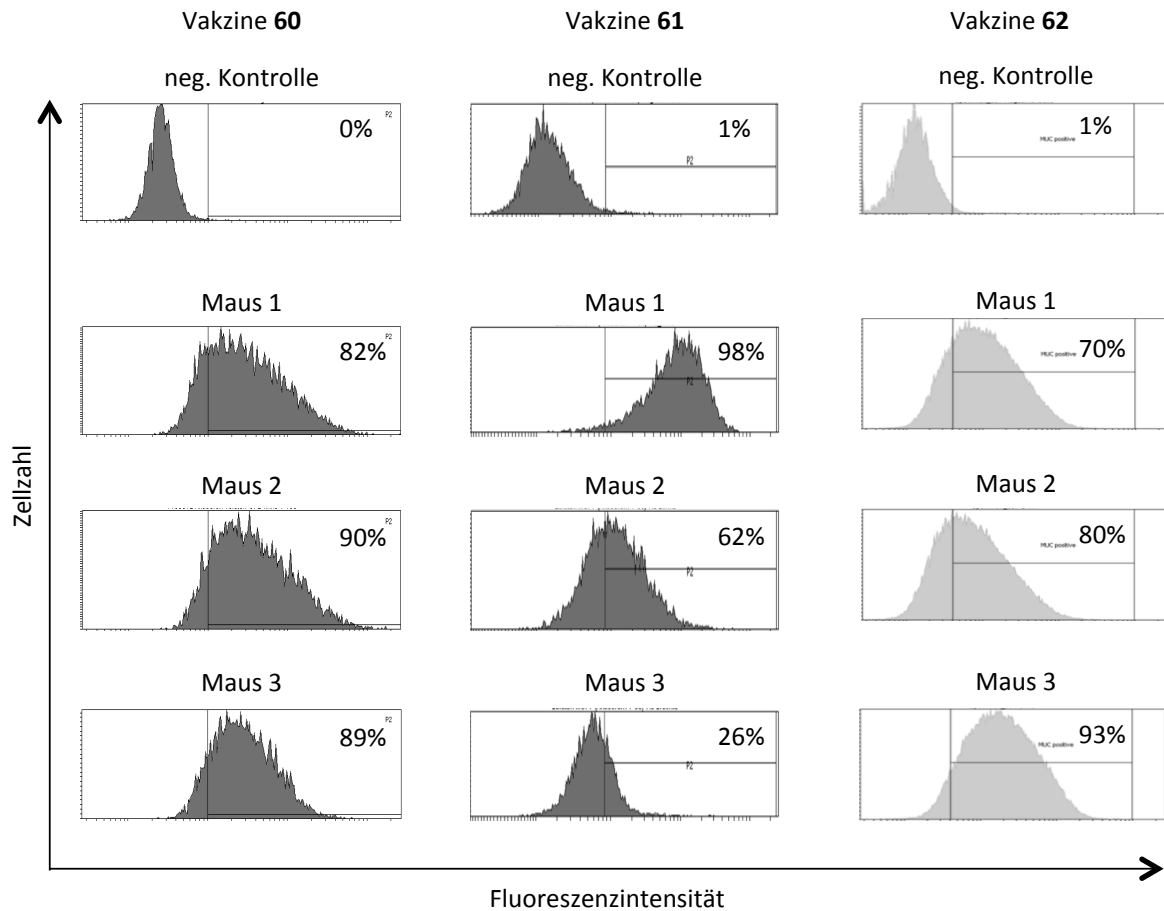
**Abb. 3.54: Bestimmung der durch Vakzine 60 (oben), 61 (mittig) und 62 (unten) induzierten Antikörperisotypen fünf Tage nach der letzten Immunisierung durch ELISA-Experimente.**

In Abbildung 3.54 sind die durch Vakzine **60**, **61** und **62** induzierten Antikörperisotypen jeweils für alle drei immunisierten Mäuse gezeigt. Der bei nahezu allen Mäusen dominierende Antikörper ist der IgG1-Subtyp. Neben diesem Subtyp können teilweise noch leicht erhöhte Titer für die IgG2a-, IgG2b-, und den IgM-Subtyp gemessen werden. Die nachgewiesene Dominanz des IgG-Subtyps spricht dafür, dass die MUC1-TTox-Vakzine eine T-Zell-vermittelte adaptive Immunantwort induzieren konnten und dass dadurch auch ein immunologisches Gedächtnis mit

Langzeitschutz aufgebaut wurde. Bezogen auf die Fähigkeit zur Auslösung von antikörperabhängigen Effektorfunktionen hat der IgG2a-Subtyp das größte Potential, da dieser Isotyp besonders effektiv bei der Vermittlung von Komplement-abhängiger Cytotoxizität (CDC), Antikörperabhängiger zellvermittelter Cytotoxizität (ADCC) und Fc-Rezeptor-abhängigen Funktionen ist (vgl. Abb. 3.41). Die überwiegende Induktion von immunologisch weniger potenten IgG1-Antikörpern nach Vakzinierung in der Balb/c Maus ist ein in der Literatur seit langem bekannter Effekt und gehört zu den genetischen Eigenheiten dieses durch Inzucht von Albinomäusen erzeugten Mausstammes. Dieser Parameter kann somit durch die Eigenschaften der Vakzine nur in geringem Ausmaß beeinflusst werden.<sup>[157,158]</sup>

In den bisherigen ELISA-Experimenten konnte vor allem gezeigt werden, dass die induzierten Serumantikörper mit hoher Selektivität an das immunisierte MUC1-Glycopeptid-B-Zell-Epitop binden. Dies ist ein erster Erfolg, aber noch keine hinreichende Bedingung für die erfolgreiche Entwicklung von MUC1-Antitumorvakzinen. Von entscheidender Bedeutung ist, dass die induzierten Antikörper dazu in der Lage sind, mit hoher Affinität an humane Tumorzellen zu binden. Um die Intensität der Bindung an humane Tumorzellen zu evaluieren, werden verdünnte Antiseren der immunisierten Mäuse mit Zellen der humanen Brustkrebszelllinien MCF-7 oder T47D inkubiert. Tumor-spezifische Serumantikörper binden an das tumor-assoziierte MUC1 auf der Zelloberfläche, unspezifische Serumantikörper werden in anschließenden Waschschritten entfernt. Die gebundenen Serumantikörper werden dann durch einen mit Fluoreszenzfarbstoff markierten (AlexaFluor 488) Ziege--anti-Maus IgG-Sekundärantikörper angefärbt. Überschüssige Sekundärantikörper werden wiederum in nachfolgenden Waschschritten entfernt. Durch eine separate Negativkontrolle wird eine unspezifische Bindung des Sekundärantikörpers an die Tumorzellen ausgeschlossen. Die so gefärbten Zellen werden in einem Durchflusszytometer analysiert. Dabei wird jede einzelne Zelle mit einem Laser zur Fluoreszenz angeregt, und die Fluoreszenzintensität wird anschließend im Vergleich zu einer nicht gefärbten Zelle gemessen. Die Ergebnisse werden in einem Histogramm dargestellt, in dem auf der x-Achse die Fluoreszenzintensität als Maß für die Bindungsaffinität des Antikörpers zu seinem Antigen angegeben wird, und auf der y-Achse wird die Anzahl der registrierten Zellen dargestellt. Anhand der Negativkontrolle wird die Intensität der Fluoreszenz definiert, die als negativ gilt, d.h. bei der keine Bindung des Serumantikörpers stattfindet. Alle Werte oberhalb

dieses Bereichs werden als positiv definiert. Der Anteil der Zellen, die spezifisch durch die Serumantikörper markiert werden können, wird dann im Histogramm als Prozentsatz angegeben.



**Abb. 3.55: Durchflusszytometrische Bestimmung der Bindung von Serumantikörpern induziert durch Vakzine 60 (linke Spalte), 61 (mittlere Spalte) und 62 (rechte Spalte) an humanen Brustkrebszellen (T47D). Gezeigt sind die 1 : 250 verdünnten Seren nach dem zweiten Bluten. Negativkontrolle: Färbung der Zellen allein mit Sekundärantikörper.**

Die Ergebnisse der durchflusszytometrischen Analyse von humanen T47D-Brustkrebszellen mit den durch Vakzine **60**, **61** und **62** induzierten Antiseren sind in Abb. 3.55 gezeigt. Abgesehen von Maus 3, die mit Vakzine **61** immunisiert wurde, wurden in allen anderen Mäusen Antikörper induziert, die stark an humane Brustkrebszellen binden. Diese Ergebnisse stehen in Analogie zu vorangegangenen Vakzinierungsstudien mit TTox-Konjugaten.<sup>[27,81,83]</sup> Durch die Immunisierung von MUC1-TTox-Konjugaten mit *N*-terminal verlängerter MUC1-Tandem Repeat-Sequenz (Vakzine **60** und **62**) sollte der Einfluss der Peptidsequenz auf die Bindungsaffinität der induzierten Antikörper im Vergleich zu bisher verwendeten, kürzeren Sequenzen (Vakzine **61**) untersucht

werden. Die Ergebnisse der Durchflusszytometrie (Abb. 3.55) zeigen, dass gegen die verlängerten Glycopeptidepitope in allen immunisierten Mäusen Antikörper induziert wurden, die auch humane Tumorzellen mit hoher Affinität binden können. Im Vergleich dazu sind die Resultate in den drei Mäusen, die mit Vakzine **61** (MUC1-B-Zell-Epitop mit 22 Aminosäuren) immunisiert wurden deutlich heterogener: Lediglich in Maus 1 wurden Antikörper induziert, die humane Tumorzellen mit hoher Affinität erkennen. Dagegen binden die Serumantikörper von Maus 2 nur mit moderater Affinität und die Serumantikörper von Maus 3 nur mit geringer Affinität an humane Tumorzellen. Bereits in vorangegangenen Immunisierungsstudien zeigte sich häufig, dass kurze B-Zell-Epitope in den einzelnen Mäusen recht unterschiedliche Resultate liefern (vgl. Dissertation *S. Hartmann*<sup>[83]</sup> Immunisierung von Vakzine **78** und **79** auf Seite 61 bzw. Dissertation *N. Gaidzik*<sup>[152]</sup> Immunisierung von Vakzine **63** auf Seite 284). Insofern spiegeln sich die Beobachtungen von *J. D. Fontenot et. al.*<sup>[156]</sup> in den Ergebnissen der durchflusszytometrischen Analyse wider, die zeigen, dass sich ein charakteristischer Knauf der immundominanten APDTRP-Domäne stabil ausbildet, wenn mehrere Tandem Repeat-Sequenzen in einem Peptidstrang vorliegen. Nur gegen ein konformell stabiles B-Zell-Epitop kann eine robuste Antikörperantwort erfolgen, die in verschiedenen Individuen gleichbleibende Resultate hervorruft.

Durch die immunologische Evaluierung der Vakzine **60**, **61** und **62** konnte gezeigt werden, dass TTox-Konjugate durch Induktion von T-Zell-vermittelten Immunantworten beeindruckende Titer von hochaffinen Antikörpern induzieren können. Es konnte weiterhin gezeigt werden, dass die Wirksamkeit der Vakzine auch ohne das bei der Behandlung von Menschen nicht zulässige komplette Freund'sche Adjuvans gegeben ist. Zudem konnte demonstriert werden, dass die N-terminale Verlängerung der B-Zell-Glycopeptidepitope zu stabileren Bindungsaffinitäten der induzierten Antikörper gegenüber humanen Tumorzellen führt, die in allen getesteten Versuchstieren reproduzierbar auf konstant hohem Niveau sind.

### **3.7 Untersuchungen zur Spezifität von Vakzin-induzierten MUC1-Antikörpern**

In den bisher durchgeführten Untersuchungen wurde ausschließlich überprüft, ob die Vakzin-induzierten Antikörper dazu in der Lage sind, Tumorzellen mit hoher Affinität zu erkennen. Auf

dem Weg zur Entwicklung von Antitumor-Vakzinen ist dies zwar eine notwendige Bedingung und von fundamentaler Bedeutung, damit solche Vakzine erfolgreich im Menschen eingesetzt werden können, es muss aber sichergestellt sein, dass die induzierten Antikörper ausschließlich an die tumorassoziierte Form des MUC1 binden und normales MUC1 nicht erkennen. Da MUC1 nicht nur auf zahlreichen Epithelgeweben, sondern auch auf hämatopoetischen Zellen vorkommt,<sup>[159]</sup> könnte eine Erkennung von normalem MUC1 schwerwiegende Autoimmunerkrankungen zur Folge haben. Daher werden im folgenden Kapitel Untersuchungen beschrieben, die prüfen, ob die Vakzin-induzierten Antikörper nicht nur mit hoher Affinität, sondern auch selektiv an Tumorgewebe binden und dabei Epithelgewebe mit normalem MUC1 tolerieren.

### **3.7.1 Untersuchung der Bindungsspezifität von Vakzin-induzierten Antikörpern durch Analyse des Bindungsvermögens zu normalen humanen Epithelzellen**

Da es sich bei Tumorzellen um immortalisierte Zellen mit unbeschränkter Teilungsrate handelt, ist eine Zellkultur dieser Zellen sehr einfach. Dagegen ist eine Zellkultur von normalen Epithelzellen nicht ohne Weiteres möglich. Neben kostenintensiven Zusätzen in Form von Wachstumsfaktoren und Hormonen benötigt man zur Kultur von normalen Epithelzellen viel Erfahrung, um diese Zellen stabil unter künstlichen Laborbedingungen zu kultivieren. Durch Kooperation mit *Xxxxx Xxxxx* aus der Arbeitsgruppe von *Prof. Dr. Xxxxxx Xxxxxx* an der *Fakultät für Angewandte Naturwissenschaften* an der *FH Köln* konnten humane Brustepithelzellen (englisch: "*human mammary epithelial cell*", HMEC) in Experimenten verwendet werden, in denen das Bindungsvermögen von Vakzin-induzierten Antikörpern zu normalem MUC1 untersucht wurde. Zuvor muss jedoch sichergestellt sein, dass die HMEC-Zellen überhaupt normales MUC1 exprimieren. Dazu wurde in Kooperation mit *Xxxxxxxx Xxxxxxxx* aus der Arbeitsgruppe von *Prof. Dr. Xxxxx Xxxxxxx* vom *Institut für Immunologie der Universitätsmedizin Mainz* die Expression von MUC1 in HMEC-Zellen auf DNA-Ebene durch Polymerase-Kettenreaktion (Engl.: "*polymerase chain reaction*", PCR) nachgewiesen. Hierzu wird die DNA aus den entsprechenden Zellen extrahiert. Mit Hilfe spezifischer Promotoren wird ein etwa 150 Basenpaare langer DNA-Abschnitt aus der DNA-Sequenz des MUC1 durch PCR vervielfältigt. Anschließend werden die Proben der PCR durch Elektrophorese in einem Ethidiumbromid

enthaltendem Agarose-Gel nach der Größe aufgetrennt. Das im Gel enthaltene Ethidumbromid interkaliert spezifisch in die DNA und kann anschließend durch UV-Licht zur Fluoreszenz angeregt werden. Dabei erscheinen die Orte mit hoher DNA als helle Abschnitte auf dem Agarosegel. Da sich im Schnitt ein Molekül Ethidumbromid pro 10 Basenpaaren anlagert, kann die Fluoreszenz auch zur Quantifizierung der DNA benutzt werden. Zur Kontrolle der Größe der PCR-Produkte wird ein Marker mit DNA-Sequenzen verschiedener Massen, die sich um 100 Basenpaare unterscheiden, parallel aufgetragen.

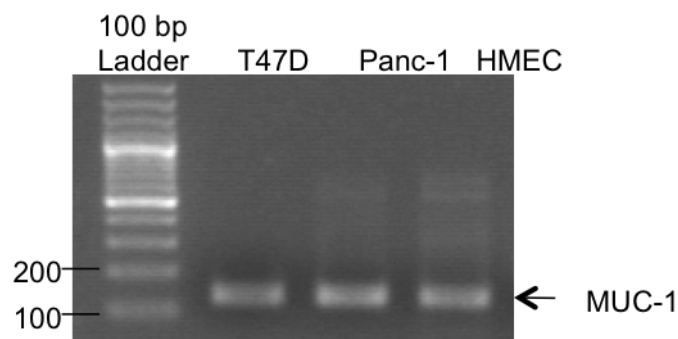


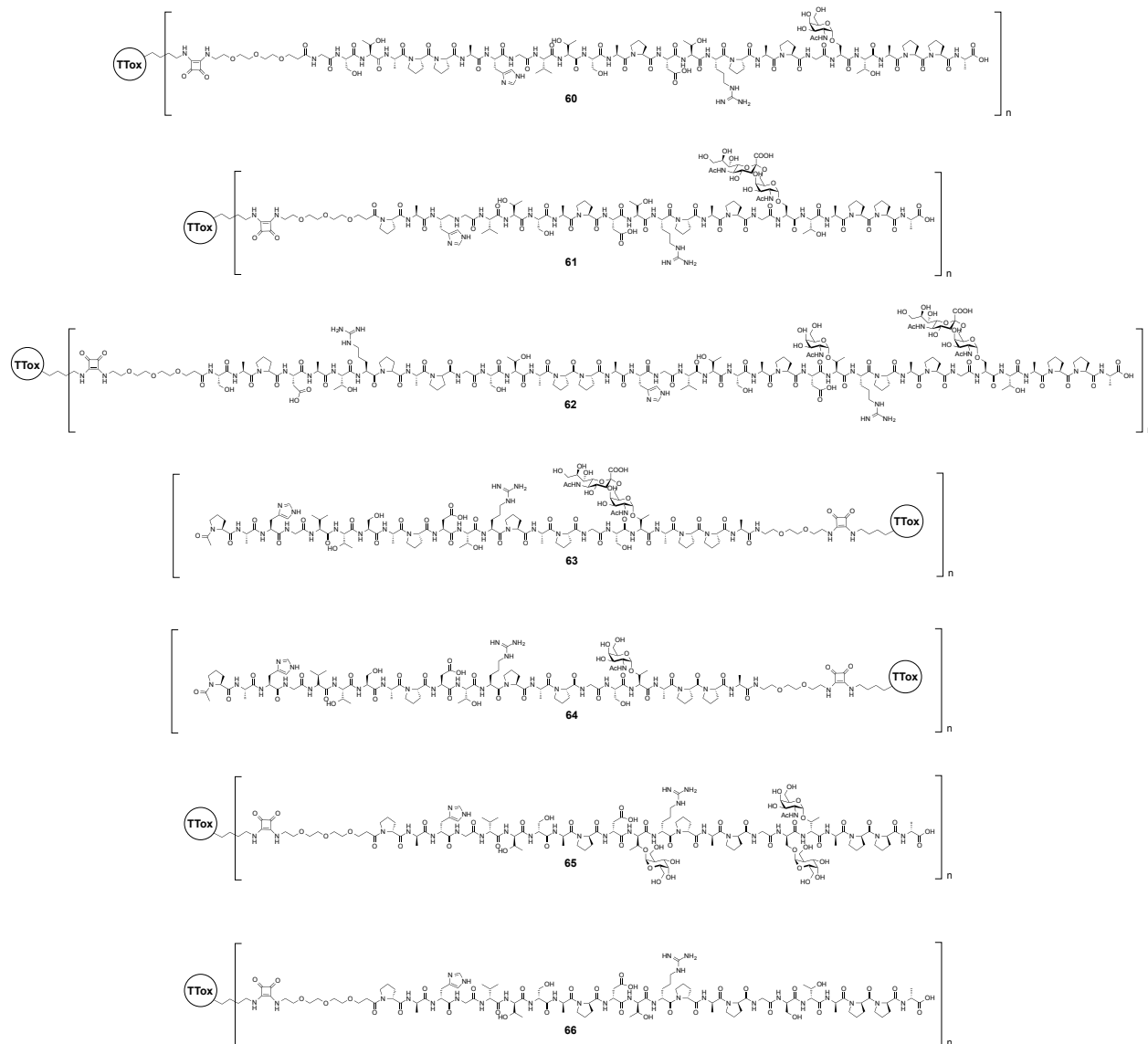
Abb. 3.56: Nachweis der MUC1-Expression in T47D-, Panc-1- und HMEC-Zellen durch PCR.

Das Ergebnis der PCR-Analyse ist in Abbildung 3.56 dargestellt. In der ersten Spalte ist der Größenmarker dargestellt, in Spalte zwei bis vier ist das Produkt der PCR von T47D-, Panc-1- und HMEC-Zellen aufgetragen. In allen Zelllinien konnten etwa gleichwertige Anteile der MUC1-PCR-Produkte nachgewiesen werden. Daraus kann geschlossen werden, dass alle Zelllinien MUC1 exprimieren und damit eine wichtige Ausgangsbedingung für die Untersuchung der Selektivität der Vakzin-induzierten Antikörper gegeben ist.

Zur Überprüfung der Bindungselektivität werden Antikörper getestet, die durch verschiedene B-Zell-Epitope induziert wurden, diese sind in Abbildung 3.57 gezeigt. Unter den getesteten Antikörpern befindet sich auch der monoklonale Antikörper (I/30), der von *Dr. Nikola Gaidzik*<sup>[152]</sup> im Rahmen ihrer Dissertation hergestellt wurde. Dieser Antikörper wurde durch eine Vakzine induziert, die identisch mit Vakzine **61** ist. Zudem werden diverse Serumantikörper getestet, die durch Vakzine induziert wurden, die im Rahmen der Dissertation von *Dr. XXXXXXXXX XXXXXXXXX* hergestellt wurden (Vakzine **63**, **64**, **65** und **66** in Abb. 3.57). Das Quadratsäurekonjugat von Vakzine **65** wurde von *Dr. Hui Cai* aus der Arbeitsgruppe von *Dr. Ulrika Westerlind* am



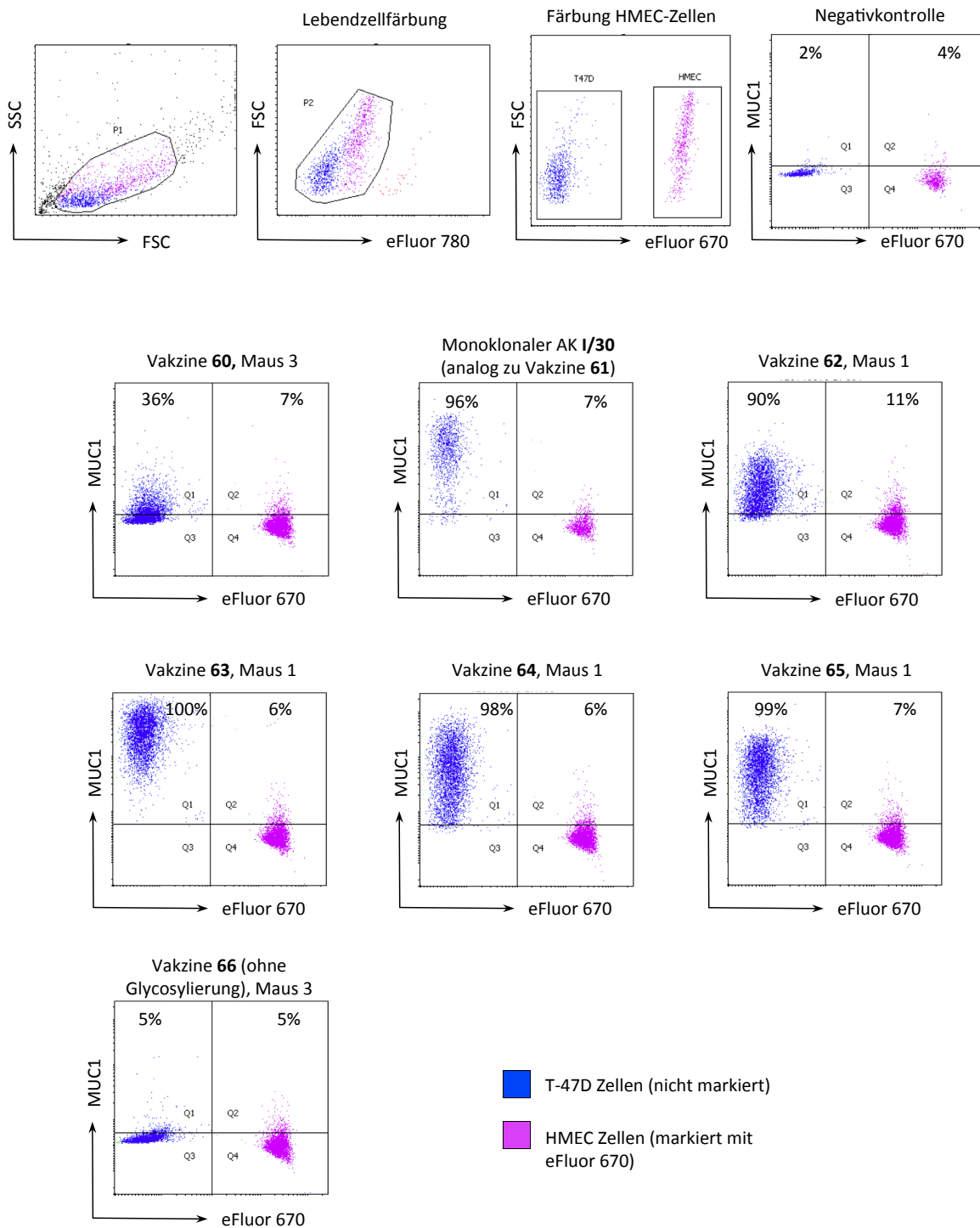
Leibniz-Institut für Analytische Wissenschaften (ISAS) hergestellt, die Konjugation an TTox wurde von Dr. XXXXXXXX XXXXXXXX durchgeführt.



**Abb. 3.57: Auflistung der Vakzine, deren Bindungsselektivität durch Analyse der Vakzin-induzierten Antikörper bestimmt wurde.**

Zur Überprüfung der Bindungsselektivität der Antikörper wurden normale Brustepithelzellen (HMEC) und Brusttumorzellen (T47D) im Verhältnis 1:1 gemischt. Damit die beiden Zellpopulationen im Durchflusszytometer eindeutig unterscheidbar sind, werden die HMEC-Zellen vorher mit einem Zellfluoreszenzfarbstoff (eFluor670) gefärbt. Anschließend werden die Zellen mit den Vakzin-induzierten Antikörpern bzw. dem mAK I/30 inkubiert. Die auf den Zellen gebundenen

Antikörper wurden mit einem mit Fluoreszenzfarbstoff (AlexaFluor 488) markiertem Ziege-anti-Maus-IgG-Antikörper gefärbt. Vor der Durchflusszytometrie wurden die Zellen mit einem Farbstoff (Fixable Viability Dye eFluor 780) behandelt, der ausschließlich tote Zellen anfärbt, damit diese vom Messergebnis ausgeschlossen werden können. Anhand einer Negativkontrolle, bei der die Zellen nur mit dem Sekundärantikörper gefärbt wurden, wird die Fluoreszenzintensität bestimmt, die als negativ gilt, d.h. bei der keine Bindung der Antikörper erfolgt. Die Ergebnisse der Durchflusszytometrie sind in Abb. 3.57 in der sog. Punktauftragung (engl. "dotplot") gezeigt. Dabei wird jede gemessene Zelle als Punkt dargestellt. Im ersten Diagramm ist das Vorwärtsstreulicht (engl.: "*forward scatter*", FSC - ein Maß für die Größe der Zelle) gegen das Seitwärtsstreulicht (engl.: "*side scatter*" - ein Maß für die Granularität und Komplexität einer Zelle) aufgetragen. Man erkennt, dass die normalen Epithelzellen (HMEC) etwas größer sind, als die Brusttumorzellen (T47D) und aufgrund ihrer starken Zelladhärenz sowie ihrer Neigung zur Ausbildung von Zellverbänden deutlich komplexer sind und daher ein breiter gestreutes Seitwärtstreulicht (SSC-Achse) verursachen. Die Negativkontrolle (Auftragung eFluor 670 gegen MUC1) zeigt eine sehr kleine unspezifische Bindung des Sekundärantikörpers sowohl bei den HMEC-Zellen (4%), als auch bei den T47D-Zellen (2%). Die überwiegende Mehrheit der getesteten Antikörper, die durch glycosylierte Vakzine induziert wurden, binden wie erwartet mit hoher Affinität an die humanen Brusttumorzellen. Dabei konnten 90 - 100% der Tumorzellen durch die getesteten Antikörper markiert werden. Eine Ausnahme stellt das Serum von Maus 3 dar, das durch Vakzine **60** induziert wurde, welches nur an 36% der Tumorzellen Bindung zeigte. Im Gegensatz dazu konnte keiner der getesteten Antikörper signifikant an die normalen Epithelzellen (HMEC) binden. Es wurden lediglich zwischen 5 und 11% der HMEC-Zellen angefärbt, wobei ein Teil der Fluoreszenz durch unspezifische Bindung des Sekundärantikörpers hervorgerufen wird.

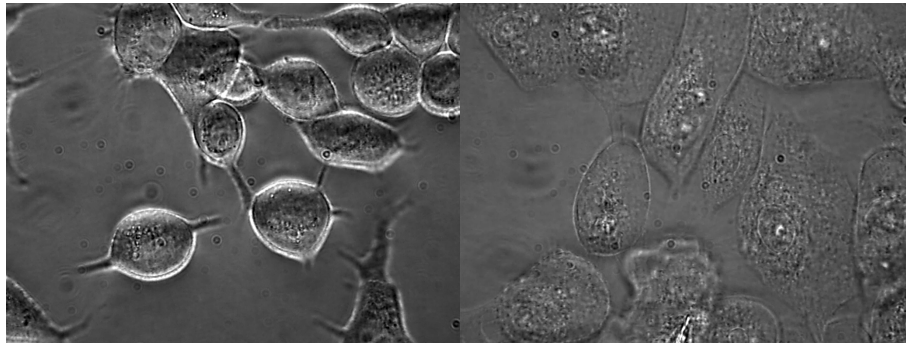


**Abb. 3.58:** Ergebnisse der durchflusszytometrischen Analyse zur Untersuchung der Selektivität von Vakzin-induzierten Antikörpern an HMEC- und T47D-Zellen. Getestet wurden Serumantikörper, die durch Vakzine 60 und 62 - 66 induziert wurden. Bei dem mA K I/30 handelt es sich um einen monoklonalen Antikörper, der durch die Hybridomtechnik nach Immunisierung mit Vakzine 61 erzeugt wurde. Die Strukturen der B-Zell-Epitope zu den Vakzinen 60 - 66 finden sich in Abb.

Die Ergebnisse der Durchflusszytometrie zeigen sehr eindeutig, dass die Vakzin-induzierten Antikörper hochselektiv an Tumorzellen binden und dabei fast vollständig normale Epithelzellen tolerieren, d.h. an diese nicht binden. Damit ist eine weitere außerordentlich wichtige Voraussetzung auf dem Weg zur Entwicklung von Antitumor-Vakzinen erfüllt.

Da diese Voraussetzung der Bindungselektivität von herausragender Bedeutung ist, sollen die Ergebnisse der Durchflusszytometrie in weiteren Zellbindungsstudien durch Fluoreszenzmikroskopie unter physiologischen Bedingungen bestätigt werden. Dazu wurden in Kooperation mit *Xxxxx Xxxxx* aus der Arbeitsgruppe von *Prof. Dr. Xxxxxx Xxxxxx* an der *Fakultät für Angewandte Naturwissenschaften* an der *FH Köln* HMEC- und MCF-7-Tumorzellen mit verschiedenen Serumantikörpern sowie dem monoklonalem Antikörper I/30 inkubiert. Analog zur Färbung der Zellen für die Durchflusszytometrie dient ein mit Fluoreszenzfarbstoff (AlexaFluor488) markierter Ziege-anti-Maus-IgG-Antikörper als Sekundärantikörper. Zusätzlich werden die Zellkerne der HMEC-Zellen durch einen in die DNA interkalierenden blauen Fluoreszenzfarbstoff (4',6-Diamidin-2-phenylindol, DAPI) angefärbt.

Bereits im Durchlichtmikroskop sind die morphologischen Unterschiede zwischen normalen Brustepithelzellen (HMEC) und Brusttumorzellen (MCF-7) gut zu erkennen (Abb. 3.59).



**Abb. 3.59: Durchlichtmikroskopische Aufnahme von humanen Brustkrebszellen (MCF-7, links) und normalen MUC1-exprimierenden Brustepithelzellen (HMEC, rechts).**

Durch die reduzierte Glycosylierung des MUC1 erscheinen die MCF-7-Tumorzellen als plastische, nahezu runde Zellen und zeigen kaum Zelladhäsion. Dagegen haben die normalen Epithelzellen (HMEC) aufgrund des vollständig glycosylierten MUC1 eine komplett andere Morphologie. Durch die starke Adhärenz am Objektträger erscheinen sie relativ flach, versuchen eine

möglichst große Oberfläche einzunehmen und bilden geschlossene Zellverbände aus. An den gezeigten Aufnahmen wird ersichtlich, dass Tumorzellen aufgrund der fehlenden Möglichkeit zur Zelladhäsion leicht dazu neigen, sich aus dem Zellverband zu lösen und Metastasen auszubilden.<sup>[160]</sup>

In einer Negativkontrolle werden zunächst beide Zelllinien nur mit dem Fluoreszenzfarbstoffmarkiertem Sekundärantikörper angefärbt, um eine unspezifische Bindung dieses Antikörpers auszuschließen (Abb. 3.60). Damit die Zellen trotzdem im Fluoreszenzmikroskop sichtbar sind, werden die Zellkerne mit DAPI angefärbt.

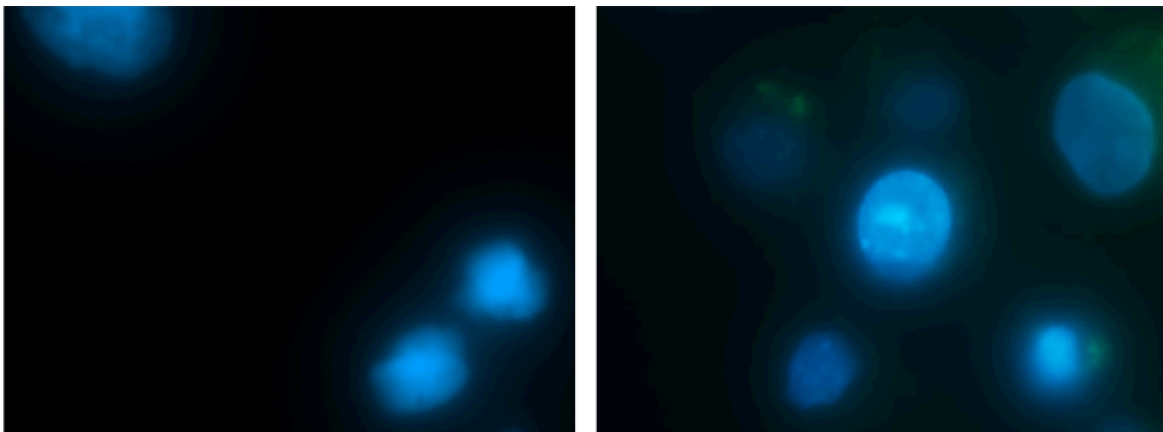
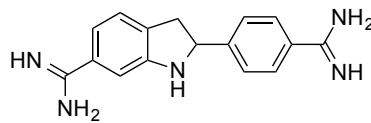
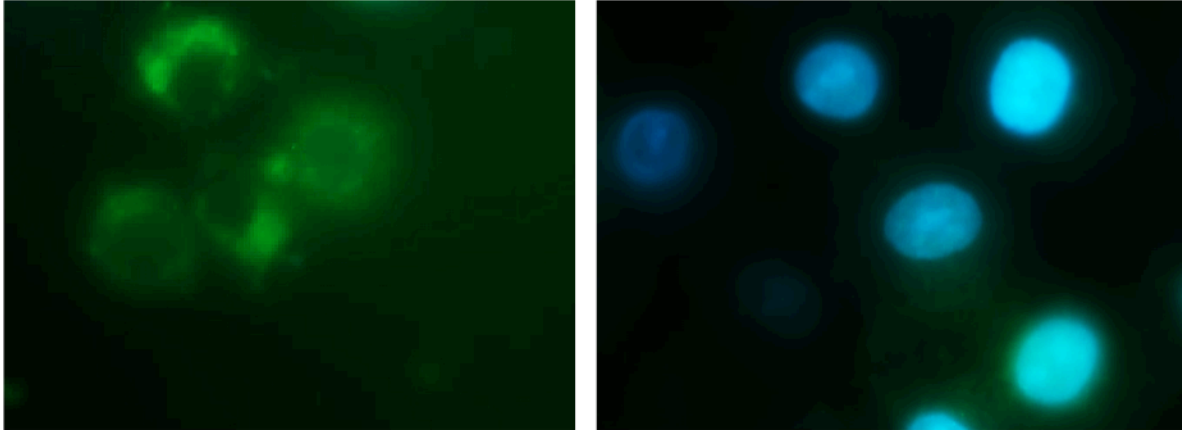
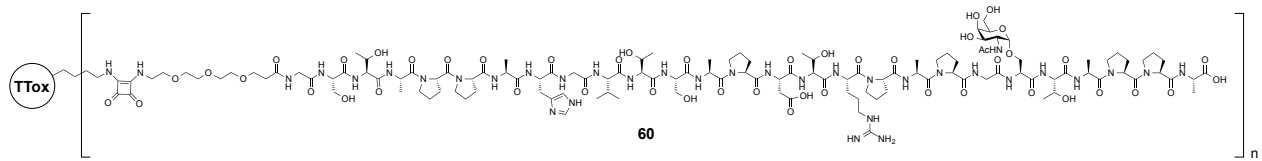
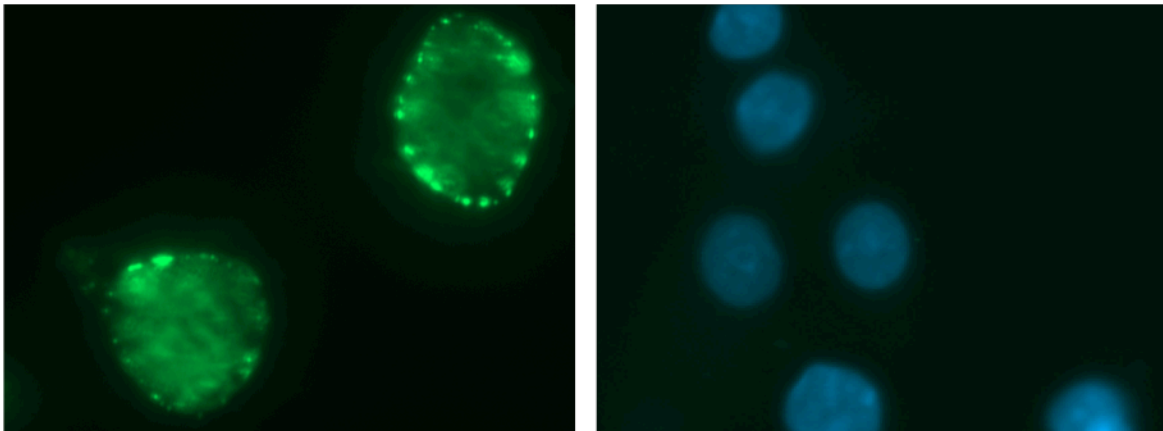
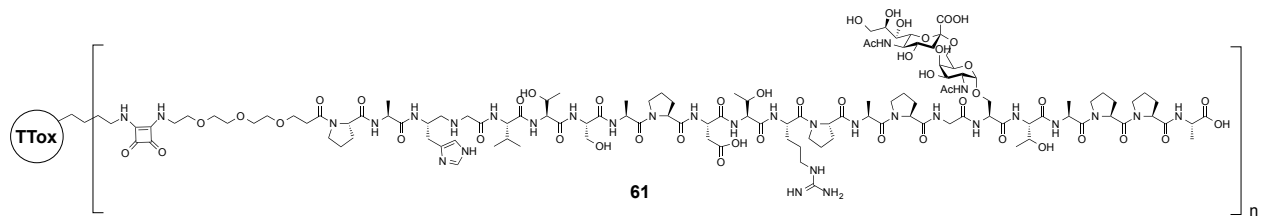


Abb. 3.60: Struktur von 4',6'-Diamidin-2-phenylindol (DAPI, oben) und Negativkontrolle durch Inkubation des Sekundärantikörpers mit MCF-7 Zellen (unten links) und HMEC-Zellen (unten rechts). Die Zellkerne wurden mit DAPI angefärbt.

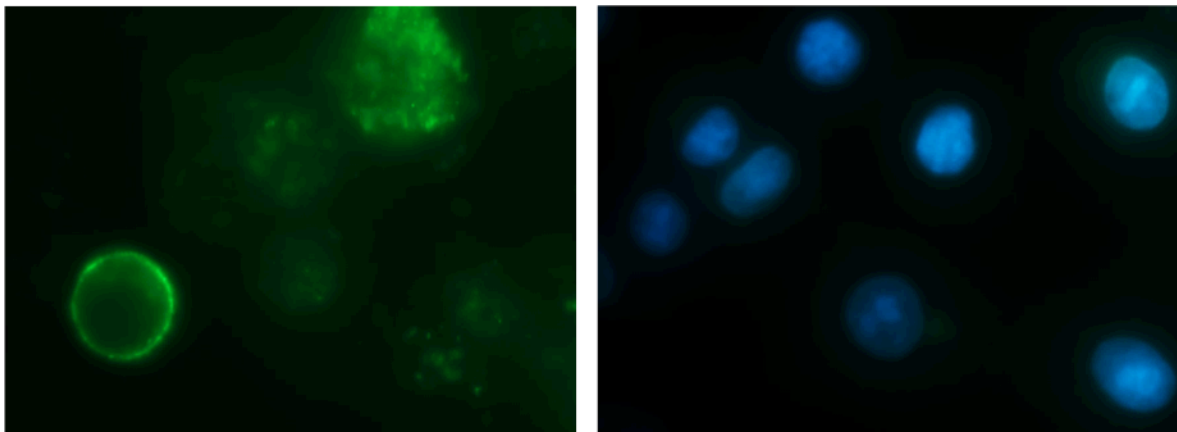
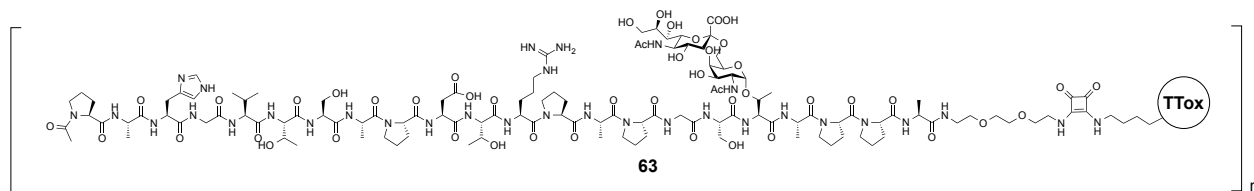
Bei allen getesteten Seren zeigt sich die Bindungsselektivität der Vakzin-induzierten Antikörper deutlich. Die Zellmembranen der MCF-7-Brusttumorzellen werden stark angefärbt. Dagegen kann bei den normalen Brustepithelzellen (HMEC) keine grüne Fluoreszenzfärbung nach identischem Färbeprotokoll beobachtet werden. Damit die HMEC-Zellen trotzdem im Fluoreszenzmikroskop sichtbar sind, werden die Zellkerne mit DAPI blau angefärbt (Abb. 3.61 bis 3.65).



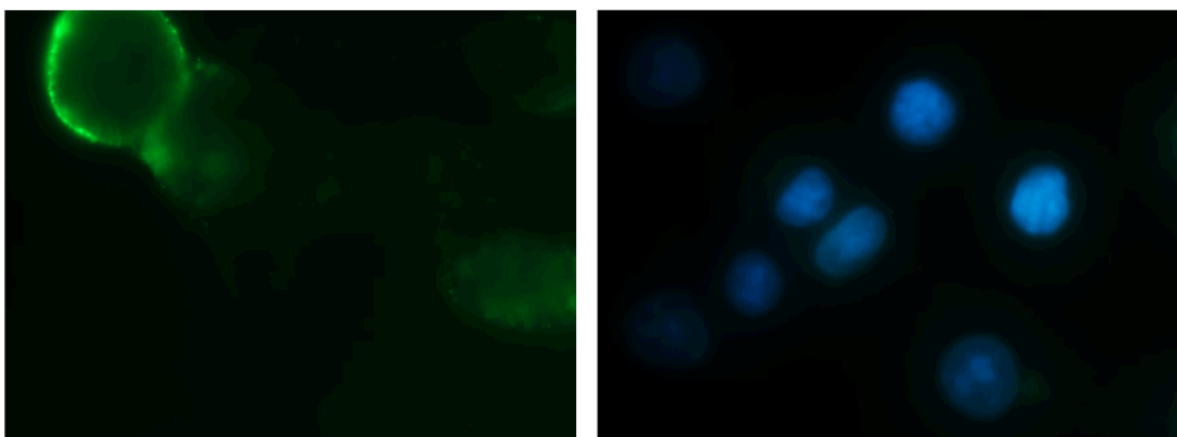
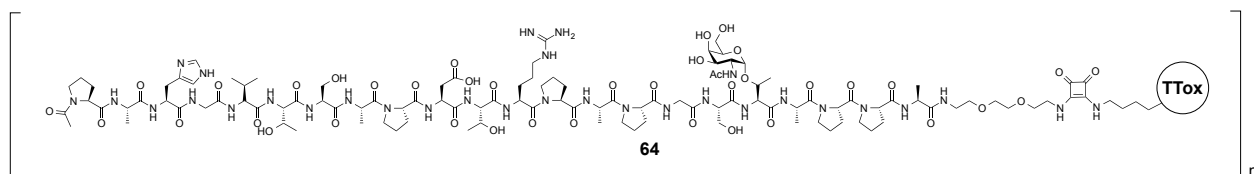
**Abb. 3.61:** Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme von MCF-7-Brustumorzellen (links) und normalen HMEC-Brustepithelzellen (rechts), die mit Serumantikörpern (induziert durch Vakzine 60, Maus 3) und dem fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörper inkubiert wurden. Die Zellkerne der HMEC-Zellen wurden mit DAPI blau angefärbt.



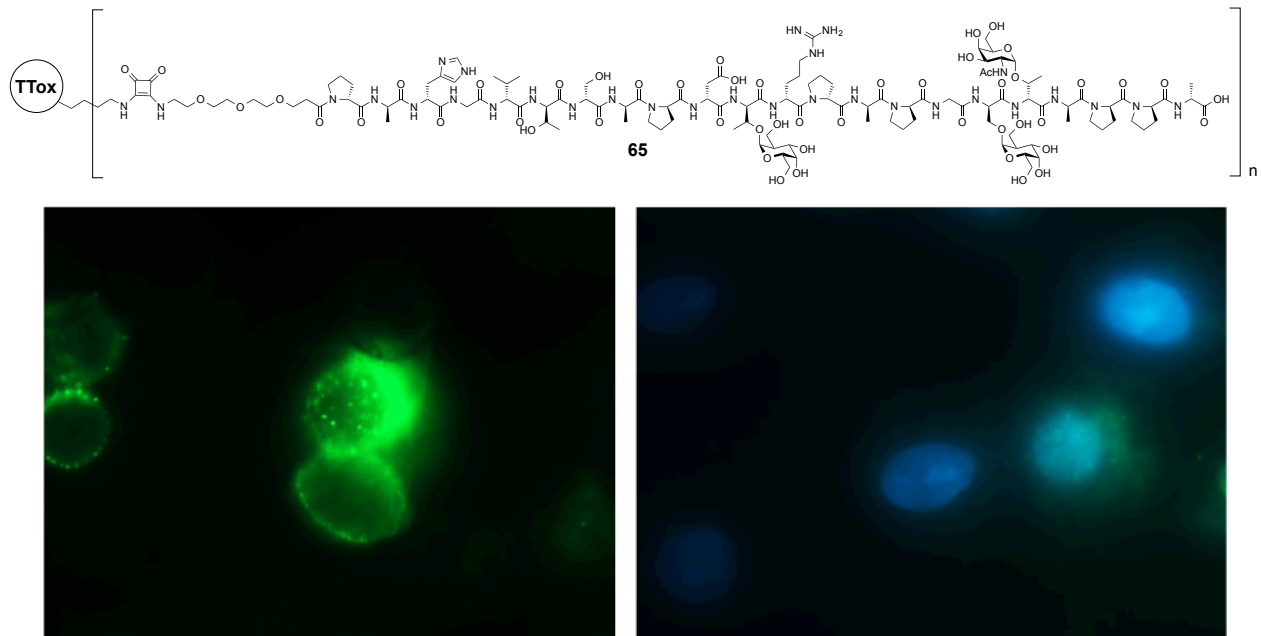
**Abb. 3.62:** Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme von MCF-7-Brustumorzellen (links) und normalen HMEC-Brustepithelzellen (rechts), die mit dem monoklonalen Antikörper I/30 (induziert durch Vakzine 61) und dem fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörper inkubiert wurden. Die Zellkerne der HMEC-Zellen wurden mit DAPI blau angefärbt.



**Abb. 3.63:** Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme von MCF-7-Brustumorzellen (links) und normalen HMEC-Brustepithelzellen (rechts), die mit Serumantikörpern (induziert durch Vakzine 63, Maus 1) und dem fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörper inkubiert wurden. Die Zellkerne der HMEC-Zellen wurden mit DAPI blau angefärbt.



**Abb. 3.64:** Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme von MCF-7-Brustumorzellen (links) und normalen HMEC-Brustepithelzellen (rechts), die mit Serumantikörpern (induziert durch Vakzine 64, Maus 1) und dem fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörper inkubiert wurden. Die Zellkerne der HMEC-Zellen wurden mit DAPI blau angefärbt.



**Abb. 3.65:** Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme von MCF-7-Brusttumorzellen (links) und normalen HMEC-Brustepithelzellen (rechts), die mit Serumantikörpern (induziert durch Vakzine 65, Maus 1) und dem fluoreszenzmarkierten Sekundäntikörper inkubiert wurden. Die Zellkerne der HMEC-Zellen wurden mit DAPI blau angefärbt.

Die Fluoreszenzmikroskopieaufnahmen bestätigen eindrucksvoll das Ergebnis der durchflusszytometrischen Analyse. Alle getesteten Antikörper binden selektiv an die Tumorzellen und zeigen keine Bindung zu den normalen Epithelzellen. Damit ist eine wichtige Voraussetzung zum Einsatz der Antitumorvakzine im Menschen gegeben.

Die in diesem Kapitel gezeigten Experimente liefern aber auch noch weitere interessante Erkenntnisse. Auf der einen Seite beweist die Tatsache, dass Antikörper, die durch die nicht-glycosylierte Vakzine **66** (Abb. 3.57) induziert wurden, nicht dazu in der Lage sind an humane Tumorzellen zu binden, dass die tumorassoziierten Kohlenhydratantigene (TACAs) ein ausschlaggebender Faktor im B-Zell-Epitop sind. Denn nur gegen B-Zell-Epitope mit einer tumorassoziierten Glycosylierung konnten Antikörper erzeugt werden, die mit hoher Spezifität an die Tumorzellen binden (Abb. 3.58).

Auf der anderen Seite kann man aus der Tatsache, dass Antikörper, die durch Glycopeptidantigene mit einem Sialyl-T<sub>N</sub>-Serin-Antigen (Vakzine **61** bis **63**) induziert wurden, nicht an den HMEC-Zellen binden, darauf schließen, dass Vakzin-induzierten Antikörper nicht ausschließlich den Kohlenhydratanteil des tumorassoziierten Antigens erkennen. Ansonsten könnten die



induzierten Antikörper zumindest partiell an die äußeren Enden der Kohlenhydratseitenketten des normalen MUC1 binden, da diese einen endständigen Sialinsäurerest tragen (vgl. Abb. 1.1). Antikörper, die durch Vakzine **60** bis **65** induziert wurden, erkennen also entweder das Peptidrückgrat in Kombination mit dem tumorassoziierten Kohlenhydratantigen, oder dass tumorassoziierte Kohlenhydratantigen induziert im Peptid eine charakteristische Konformation, die von den Antikörpern erkannt wird. Die Ergebnisse zeigen deutlich, dass sowohl das tumorassoziierte Kohlenhydratantigen, als auch die Peptidsequenz von entscheidender Bedeutung sind. Denn nur durch die richtige Kombination beider Komponenten können die Gegebenheiten des tumorassoziierten MUC1 auf der Tumorzelle so nachgebildet werden, dass gegen die voll-synthetischen B-Zell-Epitope Antikörper induziert werden, die dazu in der Lage sind, spezifisch an das tumorassoziierte MUC1 von humanen Tumorzellen zu binden.

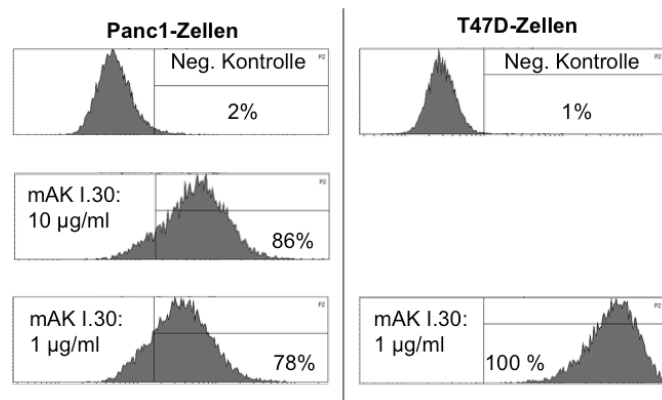
### **3.7.2 Untersuchung der Bindungsspezifität Vakzin-induzierter Antikörper durch immunhistochemische Färbungen humaner Pankreaskarzinomzellschnitte**

Die im vorangegangenen Kapitel beschriebenen Untersuchungen zeigen eindrucksvoll die Bindungsspezifität der induzierten Antikörper. Das normale MUC1 auf gesunden Epithelzellen wird nahezu vollständig toleriert, während das MUC1 von Brusttumorzellen mit großer Spezifität erkannt wird. Da es sich bei den getesteten Zellen jedoch um mehr oder weniger artifizielle Zelllinien handelt, soll geprüft werden, ob die bisherigen Ergebnisse auch an humanem Tumorgewebe bestätigt werden können. Eine Kooperation mit *Dr. Xxxx Xxxxxxxx* am *Pathologischen Institut Celle* eröffnete die Möglichkeit, die Bindungsspezifität der Antikörper an Zellschnitten von humanen Pankreaskarzinomen zu prüfen.

Laut einem Bericht der *American Cancer Society* wurde Pankreaskrebs in den USA im Jahr 2010 43140 mal diagnostiziert. Gleichzeitig starben allein in den USA im Jahr 2010 etwa 36800 Menschen an dieser Krankheit.<sup>[4]</sup> Die relative 5-Jahres-Überlebensrate nach der Erstdiagnose lag im Jahr 2012 bei 6%. Etwa 95% aller malignen Tumore des Pankreas sind duktales Adenokarzinome. Von diesen Tumoren können etwa 80% nicht chirurgisch behandelt werden, da der Tumor meist nahe an Blutgefäßen auftritt.<sup>[161]</sup> Die Gründe für diese drastischen Zahlen liegen vor allem an der schlechten Diagnostizierbarkeit dieser Krankheit. Meist werden Pankreastumo-

re erst im fortgeschrittenem Stadium durch Ultraschall oder Computertomographie entdeckt, da bis heute keine spezifische Nachweismethode existiert und die Krankheit im Anfangsstadium in der Regel ohne merkliche Symptome verläuft. Daher wäre schon der diagnostische Nutzen der tumorspezifischen MUC1-Antikörper von großer Bedeutung.

Um sicher zu gehen, dass die Antikörper an Pankreastumorzellen binden können, wurden in einem Vorversuch Zellen der Pankreastumorzelllinie Panc1 nach dem im vorangegangenen Kapitel beschriebenen Protokoll mit dem monoklonalem Antikörper I/30 gefärbt und die Bindung der Antikörper im Durchflusszytometer analysiert. Der monoklonale Antikörper I/30 wurde dabei in verschiedenen Konzentrationen getestet. Selbst in der geringeren Konzentration ( $c = 1 \mu\text{g/ml}$ ) bindet der Antikörper mit hoher Affinität an die Pankreastumorzellen (Abb. 3.66). Verglichen mit der Positivkontrolle auf T47D-Tumorzellen fällt die Bindungsaffinität bei den Panc1-Zellen etwas geringer aus. Dies liegt aber an der geringeren Expression von MUC1 in dieser Zelllinie.<sup>[162]</sup>



**Abb. 3.66:** Durchflusszytometrische Analyse zur Bindungsaffinität des monoklonalen Antikörpers I/30 an Panc1-Zellen (links) und T47D-Zellen (rechts).

Die Färbung der Zellschnitte wurde vollautomatisch an einem *BenchMark XT IHC*-Färbeautomaten der Fa. *Ventana* durchgeführt. Der mAK I/30 wurde mit einer Konzentration von  $1 \mu\text{g/ml}$  und die Antiseren in einer Verdünnung von 1:250 eingesetzt. Zur Detektion der Serumantikörper wurde dabei ein *ultraView Universal DAB Detection Kit* der Fa. *Ventana* verwendet. Dieses Kit enthält einen Ziege-anti-Maus-IgG Sekundärantikörper, der mit einer Meerrettichperoxidase gekoppelt ist. Das Enzym kann 3,3'-Diaminobenzidin (DAB) in Gegenwart

von Wasserstoffperoxid zu einem charakteristischen, rotbraunem Polymer umsetzen, das im Durchlichtmikroskop sichtbar ist (Abb. 3.67).

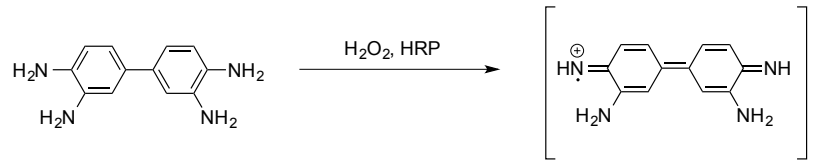
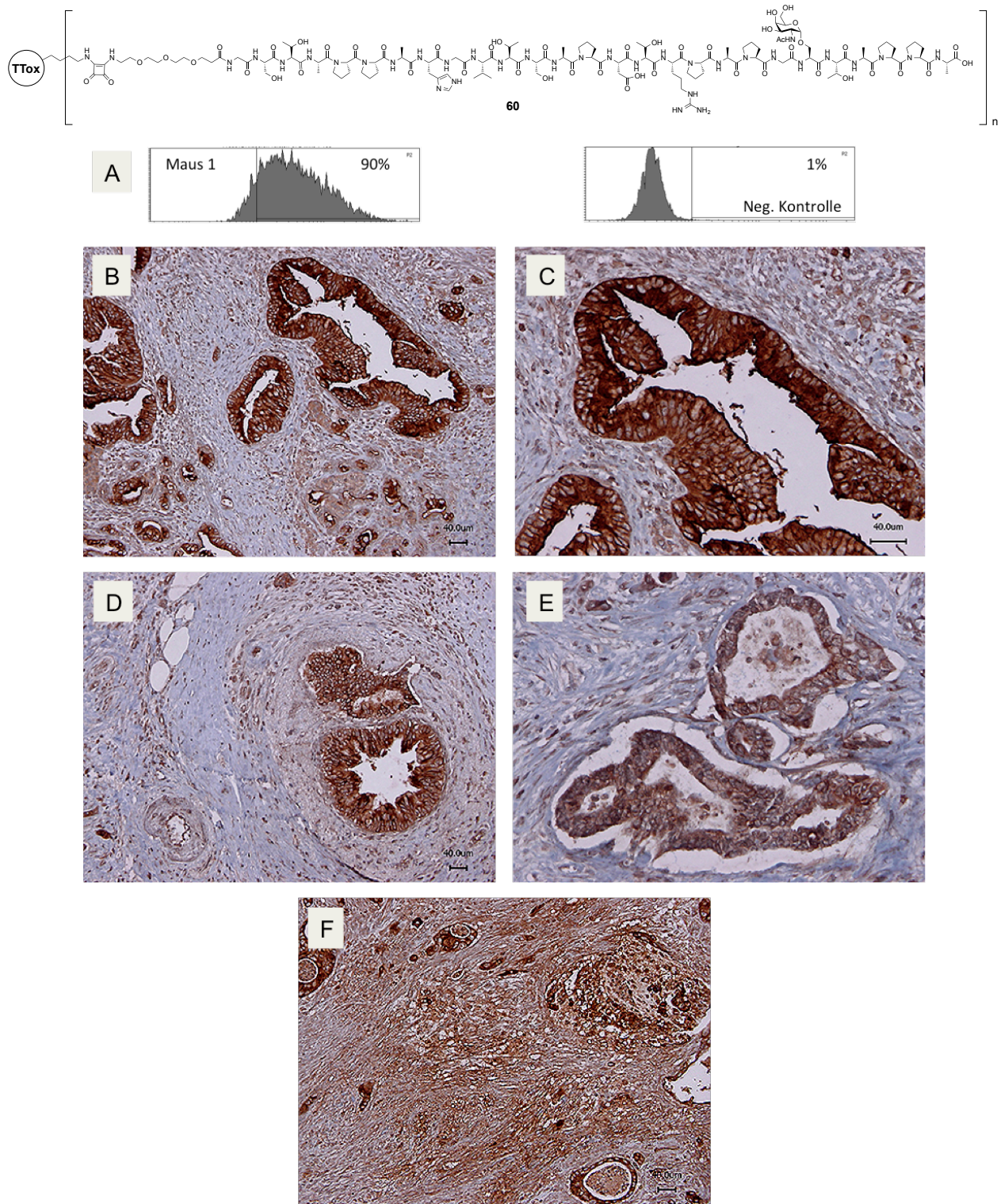


Abb. 3.67: Farbreaktion des 3,3'-Diaminobenzidin (DAB) katalysiert durch die Meerrettichperoxidase (HRP).

Die immunhistochemischen Färbungen zeigen, dass alle getesteten Serumantikörper (induziert durch Vakzine **60**, **63** und **64**) sowie der monoklonale Antikörper I/30 spezifisch an verschiedene Pankreastumore zu binden können und dabei gesundes Normalgewebe nur in sehr geringem Maße anfärben (Abb. 3.68 bis 3.71). Eine unspezifische Färbung durch den Sekundärantikörper wurde durch eine Negativkontrolle ausgeschlossen. Allerdings könnte die Fixierung des Gewebes mit Formaldehyd unter erhöhter Temperatur und die Einbettung der Gewebsschnitte in Paraffin zur Veränderung der empfindlichen Glycokalyx führen und damit auch eine Ursache für die leichte unspezifische Hintergrundfärbung sein.



**Abb. 3.68:** Bindung der durch Vakzine 60 induzierten Serumantikörper (Maus 1, Verdünnung 1:250) an Panc1-Pankreastumorzellen (A). Färbung von duktaalen Adenokarzinomen in 100-facher Vergrößerung (B, D), 200-facher Vergrößerung (C) und 400-facher Vergrößerung (E) sowie die Färbung eines fortgeschrittenen Adenokarzinoms in 100-facher Vergrößerung (F).



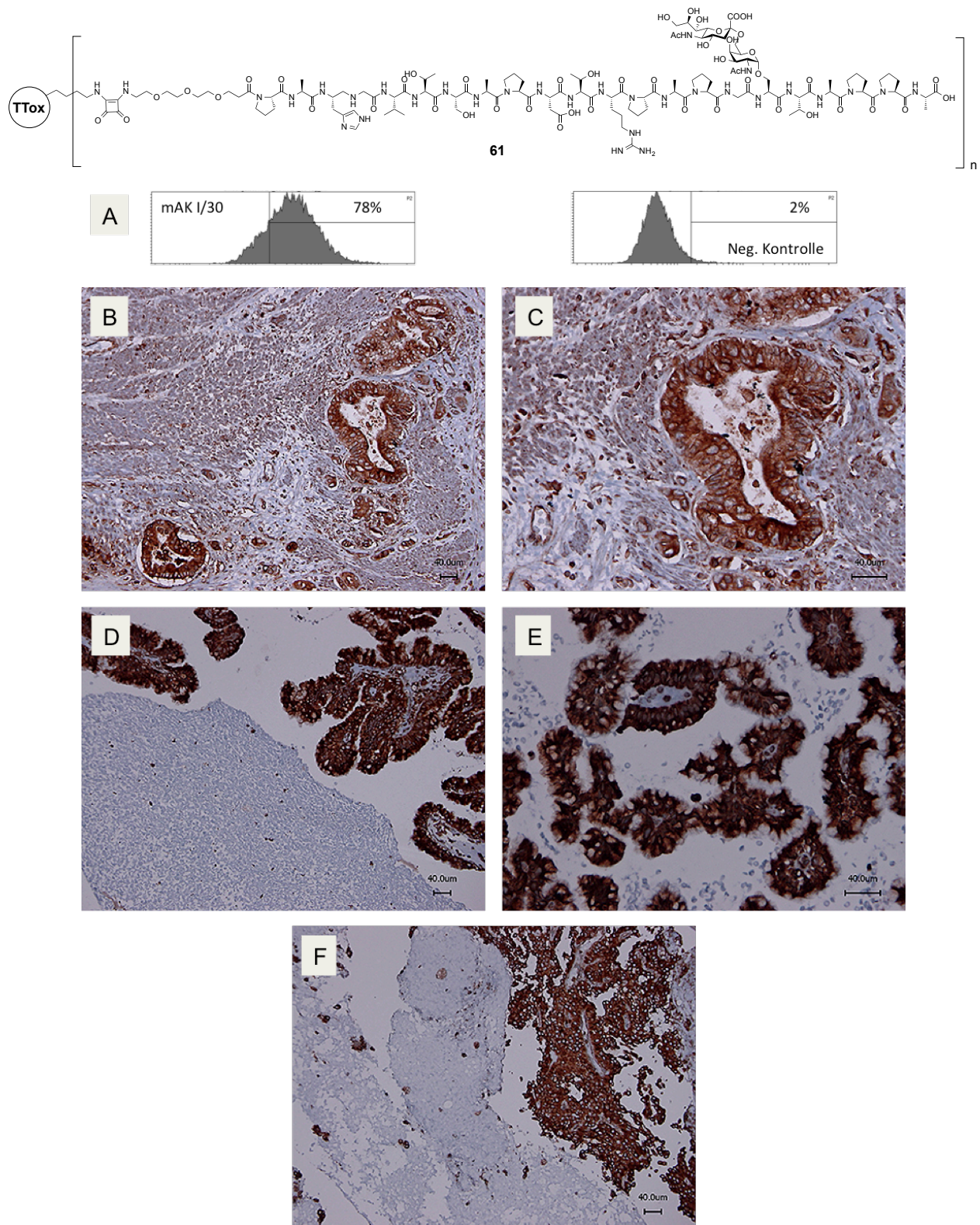
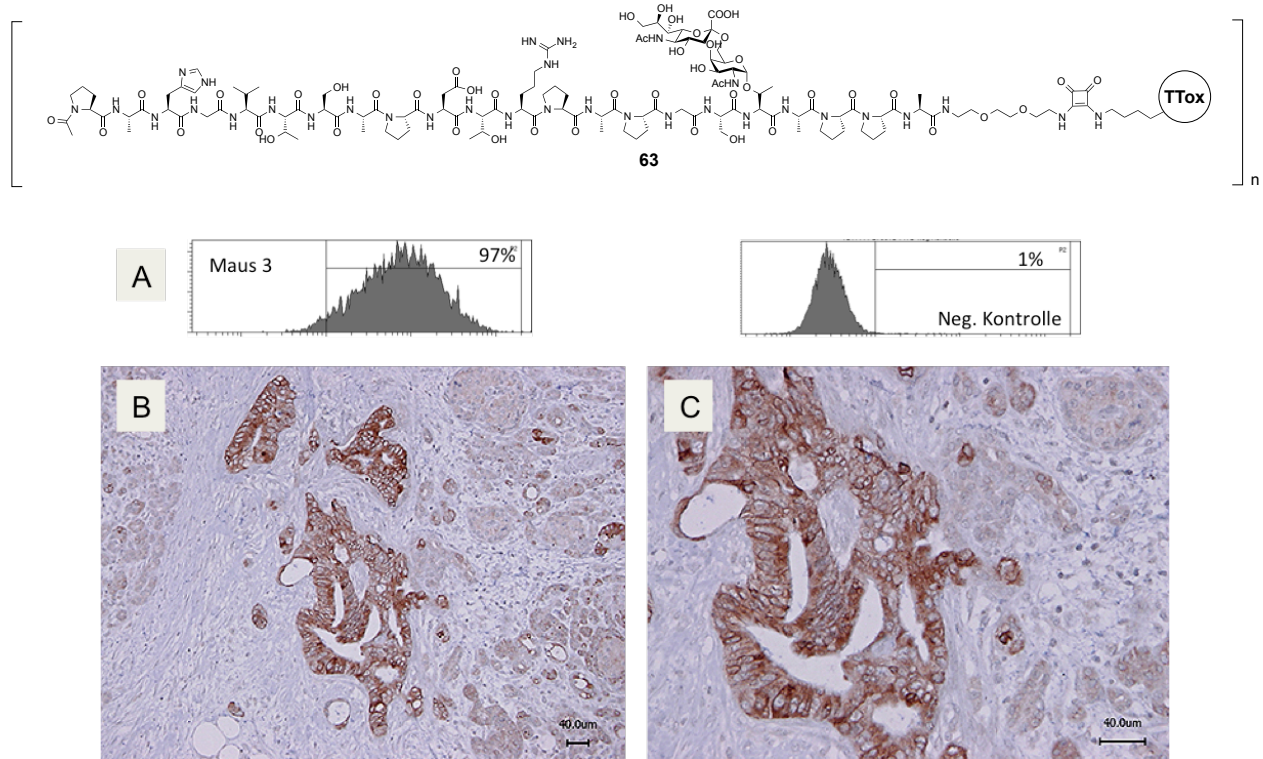
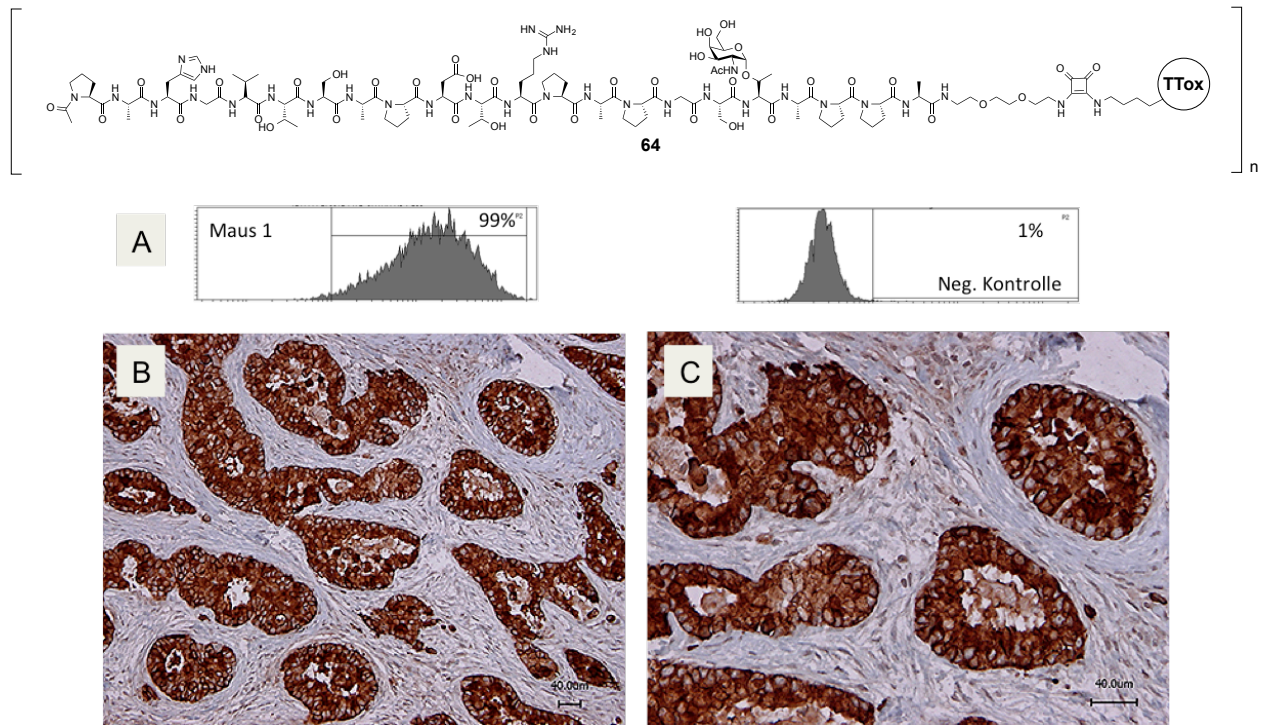


Abb. 3.69 Bindung des monoklonalen Antikörpers I/30 (induziert durch Vakzine 61, Konzentration 1  $\mu\text{g/ml}$ ) an Panc1-Pankreastumorzellen (A). Färbung eines duktaalen Adenokarzinoms in 100- und 200-facher Vergrößerung (B, C). Färbung eines muzinösen Cystadenokarzinoms in 100- und 200-facher Vergrößerung (D, E). Färbung eines solid-zystischen Pankreastumors in 100-facher Vergrößerung (F).





**Abb. 3.70:** Bindung der durch Vakzine 63 induzierten Serumantikörper (Maus 3, Verdünnung 1:250) an Panc1-Pankreastumorzellen (A). Färbung eines duktales Adenokarzinoms in 100- und 200-facher Vergrößerung (B, C).



**Abb. 3.71:** Bindung der durch Vakzine 64 induzierten Serumantikörper (Maus 1, Verdünnung 1:250) an Panc1-Pankreastumorzellen (A). Färbung eines duktales Adenokarzinoms in 100- und 200-facher Vergrößerung (B, C).

Die immunhistochemischen Färbungen verschiedener Pankreaskarzinome sowie die Untersuchungen zur Bindung der Antikörper an HMEC-Zellen zeigen eindrucksvoll das Potential der Antitumor-Vakzine. Die organisch-chemische Synthese ermöglicht also den definierten Aufbau tumorassoziierter Glycopeptidstrukturen, so dass sie zur Synthese von Antitumor-Vakzinen verwendet werden können. Durch Impfung dieser Vakzine werden Antikörper induziert, die nicht nur das synthetische Glycopeptidantigen erkennen, sondern auch hochaffin an das tumorassoziierte MUC1 auf humanen Tumorzellen binden und dabei gesundes Gewebe mit normalem MUC1 nicht angreifen.

### **3.8 Synthese und immunologische Evaluierung vollsynthetischer Mehrkomponenten-Vakzine**

Antitumor-Vakzine auf der Basis des MUC1, die immunogene Proteine als Träger verwenden, gelten derzeit als die wirksamsten Vakzinkandidaten (Kapitel 3.6). Besonders die Konjugation von MUC1-Glycopeptiden mit Tetanus Toxoid liefert äußerst potente Antitumorvakzine, die beeindruckende Titer von tumorspezifischen Antikörpern erzeugen.<sup>[27,81]</sup> Die Wirksamkeit dieser Konjugate beruht auf der hohen Anzahl von potenten T-Helferzell-Epitopen, die in der Sequenz des TTox enthalten sind. Die T-Zell-Epitope sorgen für eine breite Aktivierung von T-Helferzellen, die wiederum die Aktivierung von Antikörper-produzierenden B-Zellen effizient unterstützen. Da das hoch immunogene TTox mit einer Masse von etwa 150 kDa selbst ebenfalls unzählige B-Zell-Epitope enthält, wird auch eine massive Immunantwort gegen das Trägerprotein selbst induziert. Besonders kritisch ist dabei die Tatsache, dass bei der Detoxifizierung des Toxins durch Behandlung mit Formaldehyd bei erhöhter Temperatur unbekannte Epitope entstehen können, gegen die potentiell autoimmunreaktive Antikörper gebildet werden können. Eine starke Aktivierung des Immunsystems, wie sie durch TTox hervorgerufen wird, birgt immer auch die Gefahr, dass die aktive Suppression von potentiell autoimmunreaktiven B-Zellen aufgehoben wird.<sup>[163]</sup> Ein weiterer Nachteil der auf Proteinen basierenden Vakzine sind die enormen Kosten, welche zum einen durch die aufwendige biotechnologische Herstellung der Toxine, aber auch

durch die Aufrechterhaltung der Kühlkette bei der Lagerung und beim Transport Vakzine auf Proteingrundlage entstehen.<sup>[164]</sup>

Aus diesen Gründen wird in jüngster Zeit verstärkt an der Entwicklung vollsynthetischer Antitumor-Impfstoffe gearbeitet.<sup>[28–30,32,33,165]</sup> Durch die vergleichsweise kleinen Strukturen ist eine bessere Charakterisierbarkeit der Vakzine gegeben. Auch immunologisch gesehen sind die vollsynthetischen Impfstoffe, die meist nur ein T-Helferzell-Epitop enthalten, wesentlich unbedenklicher, da sie nur eine hochspezifische, präzise Immunantwort gegen wohldefinierte Strukturen induzieren.

Die Induktion einer spezifischen Immunantwort mit möglichst kleinen und präzisen Strukturen, die dennoch stark genug ist, die Toleranz des Immunsystems gegenüber körpereigenem Tumorgewebe zu brechen, ist jedoch kein einfaches Unterfangen. Im folgenden Kapitel werden neue Konzepte zur Entwicklung von vollsynthetischen, auf MUC1 basierenden Antitumorvakzinen vorgestellt, die möglichst spezifische Immunantworten gegen Tumorgewebe induzieren sollen. Dabei soll auf die Verwendung von Adjuvantien verzichtet werden, die eine breite und ungerichtete Aktivierung des Immunsystems verursachen.

### **3.8.1 Entwicklung einer Dreikomponenten-Vakzine mit einem CpG-Motiv als internem Adjuvans**

Um eine vollsynthetische Antitumorvakzine auf MUC1 Basis aufzubauen, sind zwei fundamentale Komponenten notwendig. Zum einen muss die Vakzine ein B-Zell-Epitop enthalten, das aus einem tumorassoziierten Glycopeptidantigen besteht, wie es auf der Oberfläche von Tumorzellen vorkommt (vgl. Kapitel 3.4.3). Zum anderen ist es sinnvoll, dieses B-Zell-Epitop kovalent mit einem wirksamen T-Helferzell-Epitop zu verknüpfen. Zwar könnte die Tandem Repeat-Sequenz selbst auch potentielle T-Helferzell-Epitope enthalten. Da es sich jedoch um körpereigene Strukturen handelt, die durch die natürliche Toleranz des Immunsystems geschützt sind, dürften deren T-Zellepitope nicht besonders wirksam sein (vgl. Kapitel 3.5.2). Damit die beiden Epitope sich nicht gegenseitig in ihrer Konformation und in ihrer Wirkung beeinflussen, ist es aufgezeigt, die beiden Komponenten durch flexible, wasserlösliche Abstandhalter zu trennen (vgl. Kapitel 3.3). Mit Vakzinen mit diesem Aufbau konnten schon



beachtliche Erfolge in Immunisierungsstudien erzielt werden. Die dabei eingesetzten innovativen T-Zell-Epitope sind sowohl im Mensch als auch in der Maus wirksam und neigen durch hydrophobe Aminosäuresequenzen zur Selbstaggregation im wässrigen Medium. Sie zeigen damit einen selbst-adjuvierenden Effekt.<sup>[28,83]</sup>

Sowohl die Antikörpertiter, die von diesen Vakzine ausgelöst werden, als auch die erzielten Bindungsaffinitäten der Antikörper zu Tumorzelllinien sind jedoch um Größenordnungen geringer im Vergleich zu den von MUC1-TTox-Vakzinen induzierten Antiseren. Daher wird versucht, das immunologische Potential solcher Vakzine durch zusätzliche Adjuvantien zu erhöhen. Durch die Entwicklung von Dreikomponenten-Vakzinen, die zusätzliche Immunstimulatoren, wie z.B. Pam<sub>3</sub>Cys-SK<sub>4</sub> oder MALP2 (engl. "*makrophage activating lipopeptide 2*") beinhalten und durch Aktivierung des Toll-like-Rezeptors 2 eine allgemeine Inflammation bewirken, konnte die Immunogenität weiter gesteigert werden.<sup>[29,30,165,166]</sup> Der Nachteil dieser Vakzine ist, dass der Toll-like-Rezeptor 2 auf der Zelloberfläche vieler immunkompetenter Zellen exprimiert wird. Damit wird jede Zelle, die mit dem TLR-2-Ligand in Berührung kommt aktiviert. Dies kann auch zur Aktivierung von potentiell autoimmunreaktive Zellen führen.<sup>[167]</sup>

Um diese Problematik zu umgehen, soll eine vollsynthetische Dreikomponenten-Vakzine aufgebaut werden, die nur immunkompetente Zellen aktiviert, die dazu in der Lage sind, eine Immunantwort gegen tumorassoziiertes MUC1 zu induzieren. Dafür sollen einzelsträngige nicht-methylierte CpG-Oligodesoxynukleotide (C: Cytidin, p: Phosphat, G: Guanosin) als Adjuvans eingesetzt werden. In der DNA von Wirbeltieren ist nur jedes 60. Dinukleotid vom Typ CpG und das Cytidin liegt meist in methylierter Form vor. Dagegen ist im Genom von Viren jedes 16. Dinukleotid vom Typ CpG und das Cytidin liegt meist in nicht methylierter Form vor.<sup>[168]</sup> Der Toll-like-Rezeptor 9 (TLR-9 bzw. CD289) wird vor allem in B-Zellen, Monozyten und dendritischen Zellen exprimiert und erkennt solche bakteriellen bzw. viralen DNA-Abschnitte. Durch Bindung von CpG-Motiven wird der TLR-9-Rezeptor aktiviert. Daraufhin werden proinflammatorische Cytokine ausgeschüttet, die autkrin auf die B-Zelle selbst wirken und diese aktivieren. Der Vorteil der Aktivierung des TLR-9 Rezeptors besteht darin, dass dieser im Gegensatz zu TLR-2-Rezeptoren intrazellulär in Endosomen exprimiert wird. Das heißt bezogen auf den Einsatz in einer Antitumorvakzine werden nur diejenigen Zellen durch den TLR-9-Liganden aktiviert, die mit ihren Rezeptoren das B- und/oder T-Zell-Epitop der Vakzine erkennen und daraufhin die

Vakzine internalisieren.<sup>[169]</sup> Dies soll eine breite und ungerichtete Aktivierung des Immunsystems verhindern, aber dennoch die spezifische Aktivierung ermöglichen.

Für eine optimale Funktion ist die Auswahl des CpG-Oligodesoxynukleotids von entscheidender Bedeutung, da die CpG-Motive, die ein TLR-9 Rezeptor erkennt, in verschiedenen Wirbeltieren voneinander abweichen. Zudem gibt es CpG-Motive, die bevorzugt NK-Zellen oder B-Zellen aktivieren. Für die Synthese der Dreikomponentenvakzine wird daher das literaturbekannte CpG-Motiv ODN1826 **67** verwendet, das aus 20 Nukleotiden besteht und zwei CpG-Motive enthält (5'-tccatgacggttctcgcggtt-3'). Es ist dafür bekannt, B-Zellen stark zu aktivieren. Um einer höheren pharmakologischen Stabilität zu erzielen, sind die Nukleotide des CpG-Motivs nicht über normalen Phosphorester verknüpft sondern über Phosphorthioate.<sup>[170]</sup> Da das CpG-Motiv über die in Kapitel 3.6.1 beschriebene Konjugationsmethode mit Quadratsäure an die Glycopeptidvakzine konjugiert werden soll, verfügt das CpG-Motiv **67** am 5'-Ende über einen 6-Aminohexanyllinker (Abb. 3.72). Das kopplungsfähige CpG-Motiv **67** wurde von der *Fa. Purimex* aus Grebenstein bezogen.

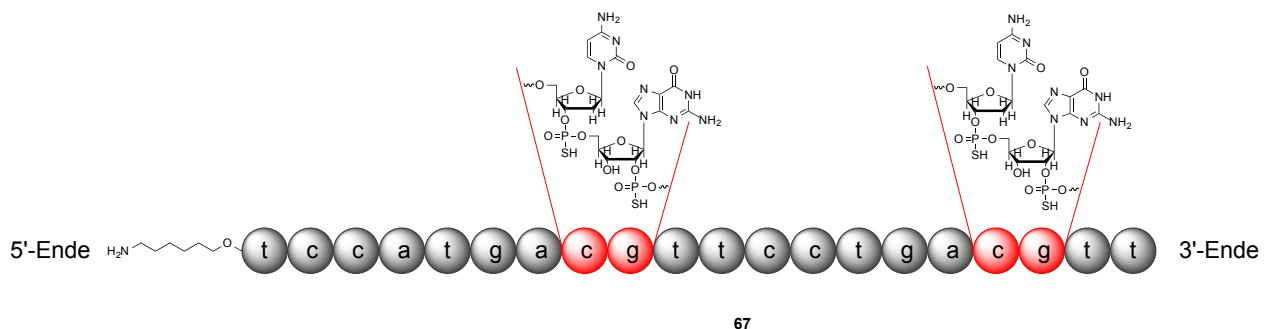


Abb. 3.72 CpG-Motiv ODN 1826 mit Aminolinker am 5'-Ende.

Da die Quadratsäurekonjugation über die Verknüpfung zweier Amine unter Ausbildung eines Quadratsäurediamids verläuft, dürfen das T-Helferzell-Epitop und das B-Zell-Epitop keine weiteren freien Aminogruppen enthalten. Das 20 Aminosäuren lange T-Helferzell-Epitop (SEFAYGSFVRTVSLPVGAD E) aus dem *Mycobacterium tuberculosis*, das sowohl im Menschen als auch in der Maus wirksam ist, erfüllt dieses Kriterium und ist zudem in der Literatur als effizientes T-Helferzell-Epitop beschrieben.<sup>[171]</sup> Auch der gewählte Ausschnitt aus der Tandem Repeat-Sequenz des MUC1 enthält keine Aminosäuren mit freien Aminogruppen.

Der Aufbau des T-Helferzell-Epitops und des MUC1-Glycopeptids erfolgt als lineare Synthese an der festen Phase (Abb. 3.73) unter den in Kapitel 3.4.3 beschriebenen Bedingungen.

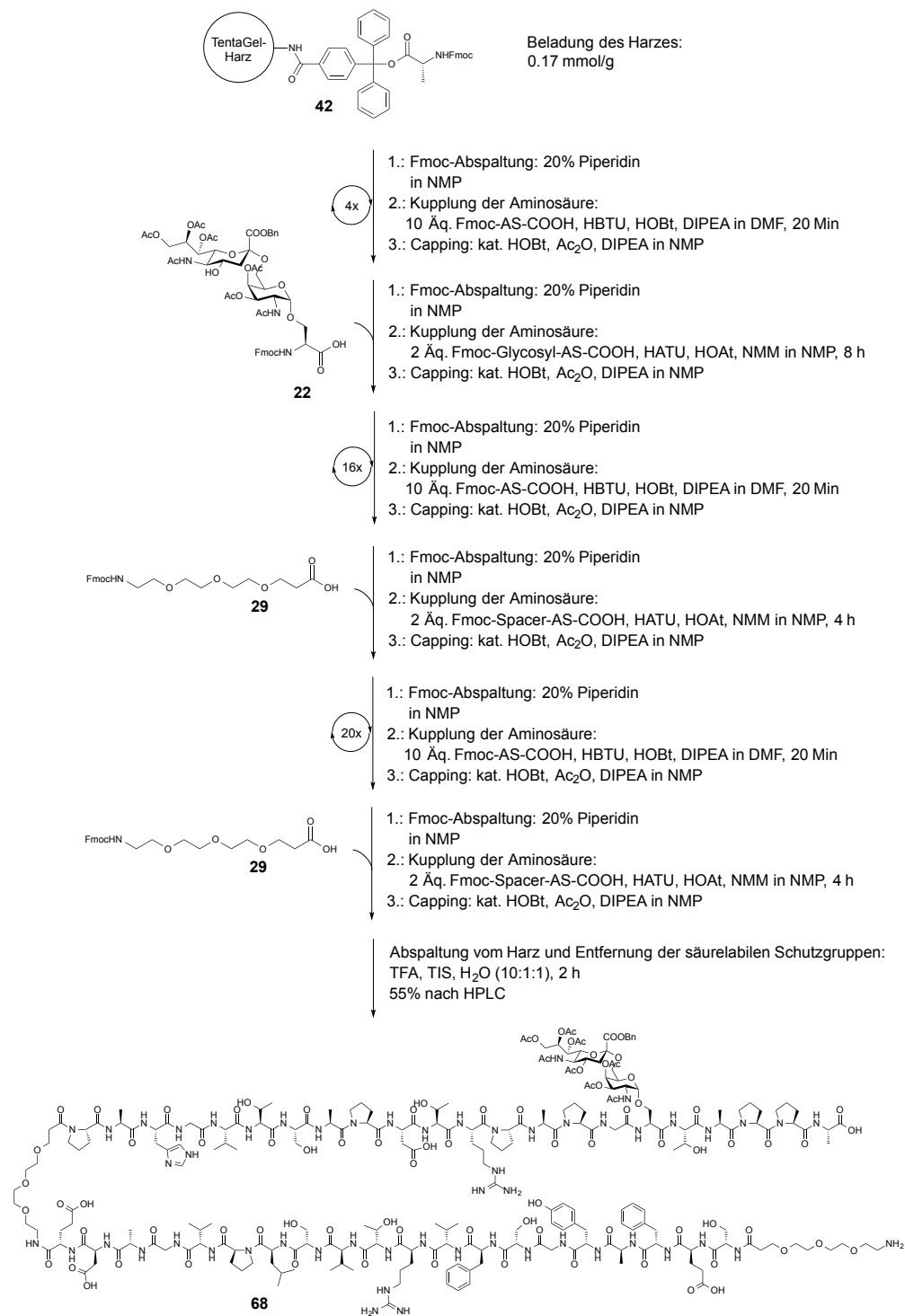


Abb. 3.73: Synthese des Glycopeptids 68 an der festen Phase.

Zwischen dem T- und B-Zell-Epitop sowie am *N*-Terminus wird jeweils die Triethylglycol-spaceramino­säure **29** eingebaut. Diese verhindert eine gegenseitige Beeinflussung der beiden Epitope. Das Glycopeptid wurde nach präparativer HPLC in einer Ausbeute von 55 Prozent erhalten. Die *O*-Acetylschutzgruppen der Kohlenhydrate sowie der Benzylester der Sialinsäure werden durch Umsetzung mit wässriger Natronlauge bei pH 11 entfernt. Nach präparativer Reinigung durch HPLC wurde das deblockierte Glycopeptid **69** in einer Ausbeute von 41% erhalten (Abb. 3.74).

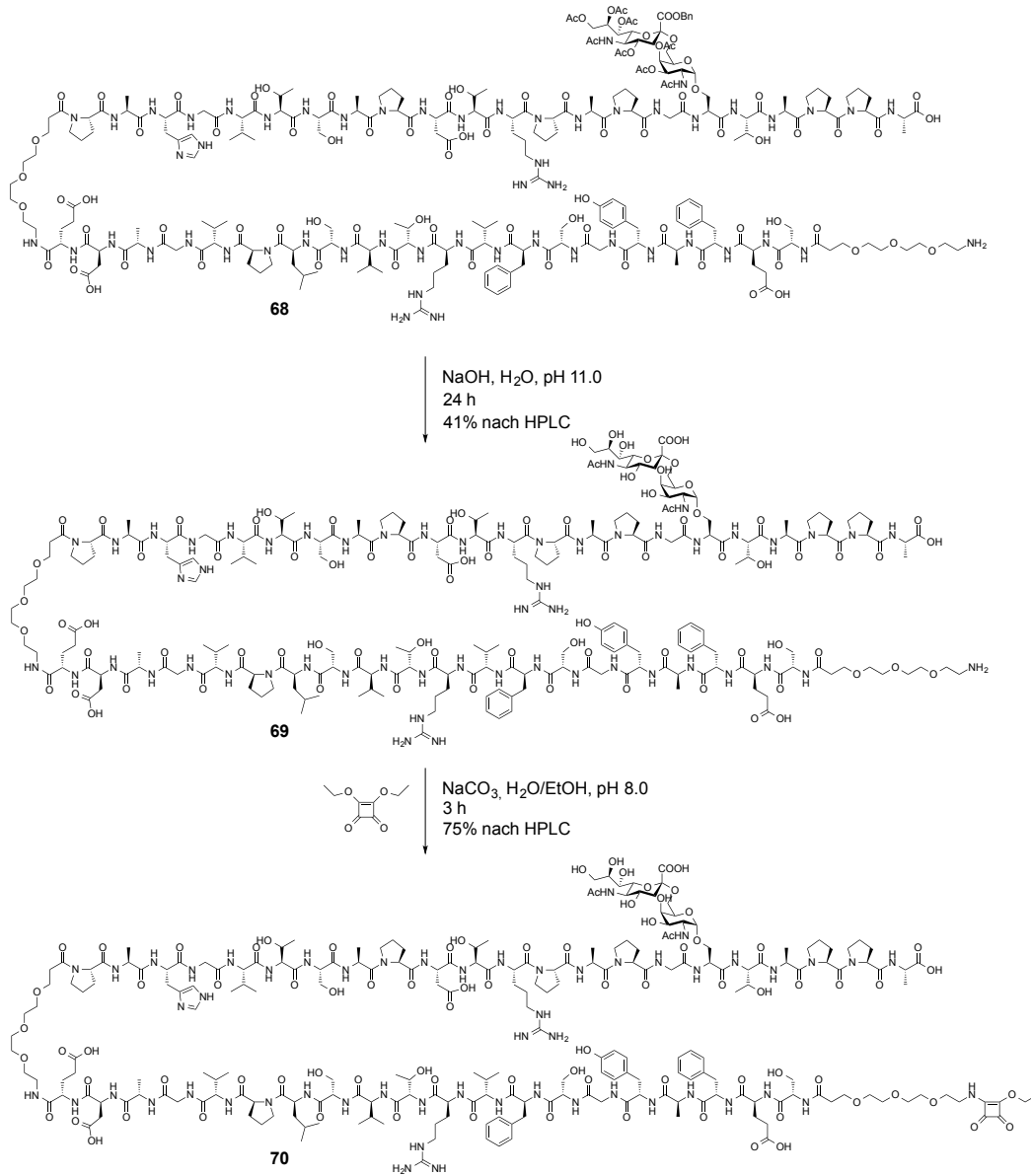


Abb. 3.74: Deblockierung des Glycopeptids **68** und Synthese des Quadratsäuremonoamidethylesters **70**.

Das Glycopeptid **69** wird anschließend durch hochaufgelöste Massenspektrometrie (HR-ESI) und 2D-NMR-Spektroskopie (COSY, HSQC) vollständig charakterisiert, bevor es durch Reaktion mit Quadratsäurediethylester in Wasser/Ethanol in Gegenwart von Natriumcarbonat bei einem pH von 8.0 zum Quadratsäuremonoamidethylester **70** umgesetzt wird (Abb. 3.74). Nach präparativer HPLC wird der Quadratsäuremonoamidethylester des Glycopeptids **70** in einer Ausbeute von 75% erhalten. Anschließend wird das Monosquarat des Glycopeptids **70** mit dem CpG-Motiv **67** über den 6-Aminohexanyllinker konjugiert. Dazu werden beide Komponenten in äquimolarem Verhältnis für sechs Tage bei Raumtemperatur in einer wässrigen Natriumphosphatpufferlösung bei pH 9.5 gerührt. Nach Beendigung der Reaktion werden die Salze durch Ultrafiltration über einer 3 kDa-Membran entfernt. Dabei wird solange mit destilliertem Wasser filtriert bis der pH-Wert des Filtrats neutral ist. Nach Lyophilisation des Überstands wird die Vakzine **71** in einer Ausbeute von 97% erhalten (Abb. 3.74).

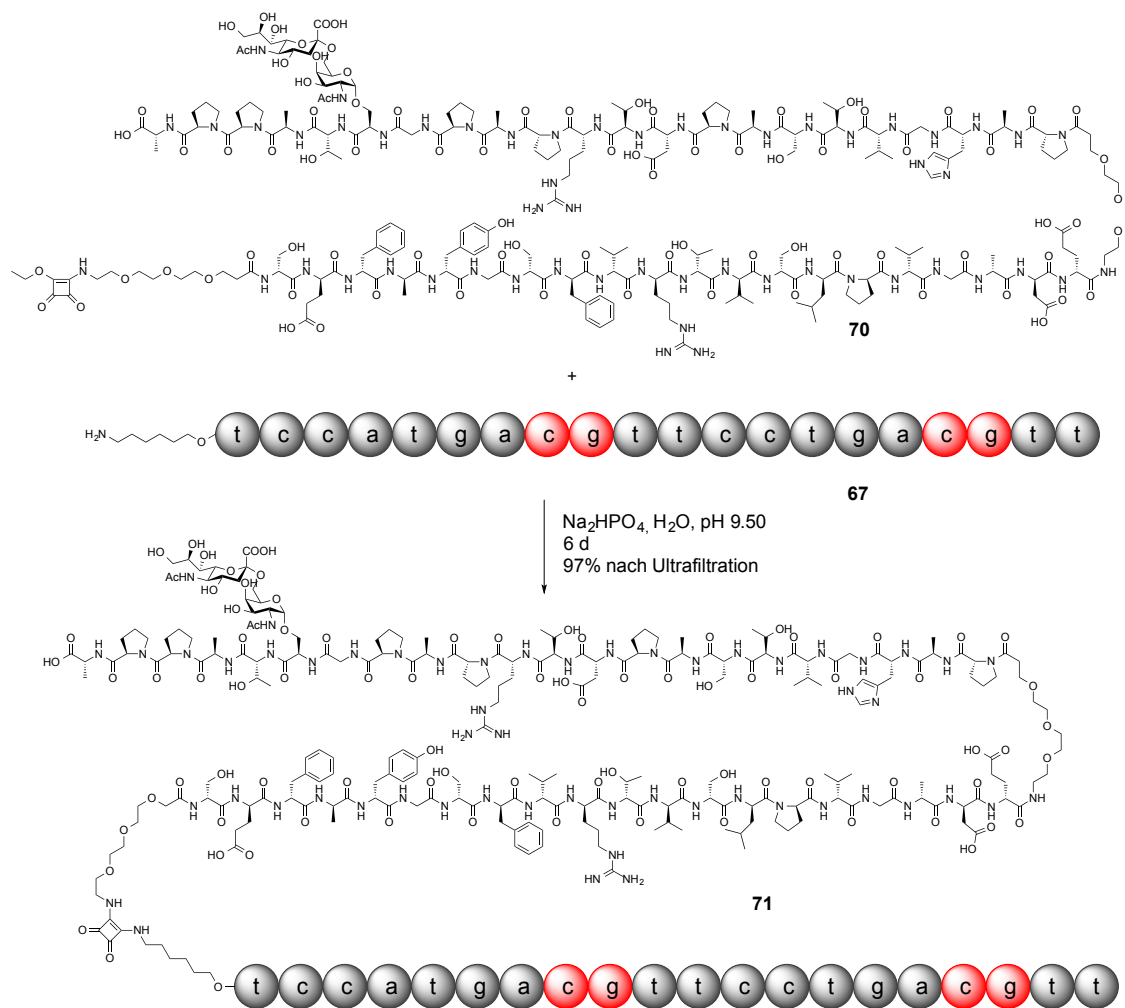
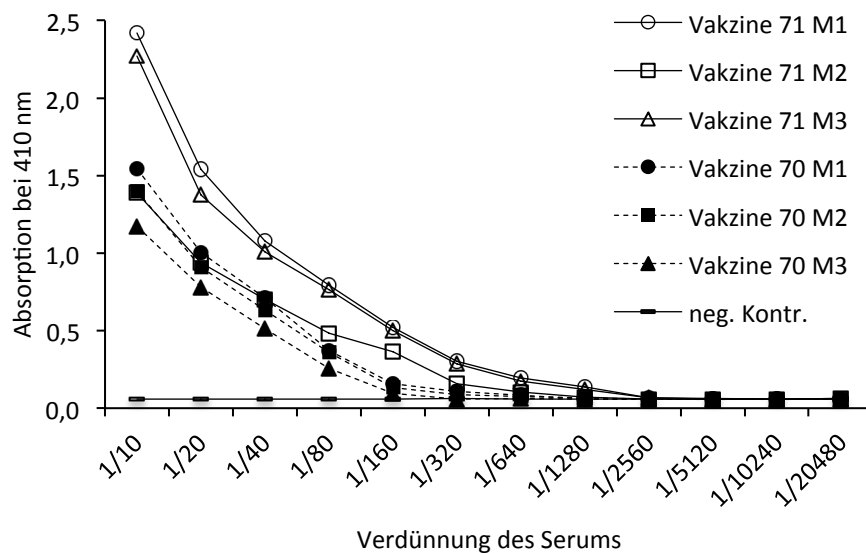


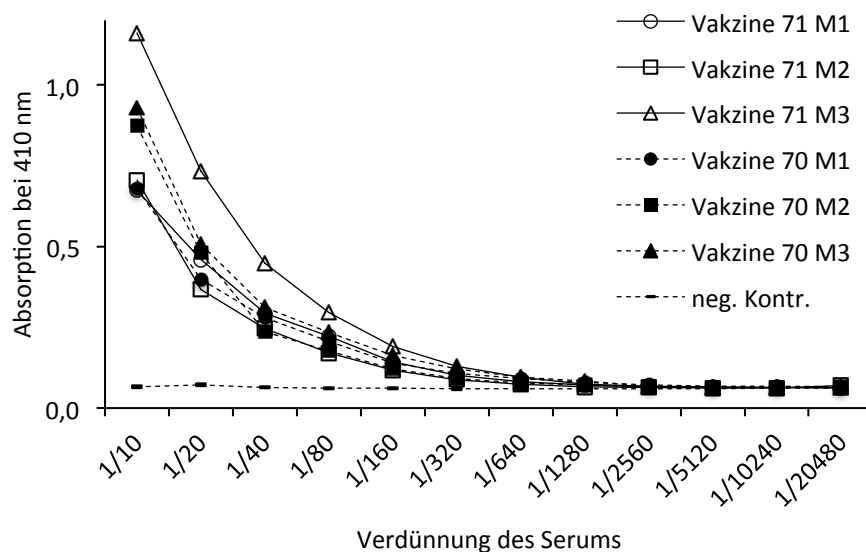
Abb. 3.75: Reaktion des CpG-Motivs **67** mit dem Monosquarat des Glycopeptids **70** zur fertigen Dreikomponentenvakzine **71**.

Die Vakzine **71** wurde durch Massenspektrometrie (MALDI-TOF) und 2D-NMR-Spektroskopie (COSY, HSQC) charakterisiert.

Zur immunologischen Evaluierung der Vakzine **71** wurden drei weibliche Balb/c-Mäuse im Alter von acht Wochen nach dem in Kapitel 3.6.5 beschriebenem Vorgehen immunisiert. Als Vergleich wurden drei weitere Balb/c Mäuse mit der Zweikomponentenvakzine **70** immunisiert, die kein CpG-Motiv enthält. Um die immunstimulatorische Wirkung des CpG-Liganden zu evaluieren, wurden alle Impfungen lediglich in imkomplettem Freund'schen Adjuvans (IFA) verabreicht, das selbst keine immunstimulatorische Wirkung besitzt. Die Titerbestimmung der murinen IgG-Antikörper fünf Tage nach der ersten und dritten Auffrischungsimpfung zeigt, dass in beiden Gruppen nur geringe Titer an Antikörper gegen das Glycopeptidantigen induziert wurden (Abb. 3.76 und Abb. 3.77). Zwar sind die Titer der durch Vakzine **71** induzierten Serumantikörper in allen drei Mäusen nach der ersten Auffrischungsimpfung höher als die Titer der durch Vakzine **70** induzierten Antikörper. Allerdings nivelliert sich dieser Effekt nach der dritten Auffrischungsimpfung nahezu vollständig. Auch eine Steigerung der IgG-Antikörper durch die Auffrischungsimpfung ist nicht zu erkennen. Die Endpunkttiter liegen bei nahezu allen Serumproben bei Werten um etwa 1500.



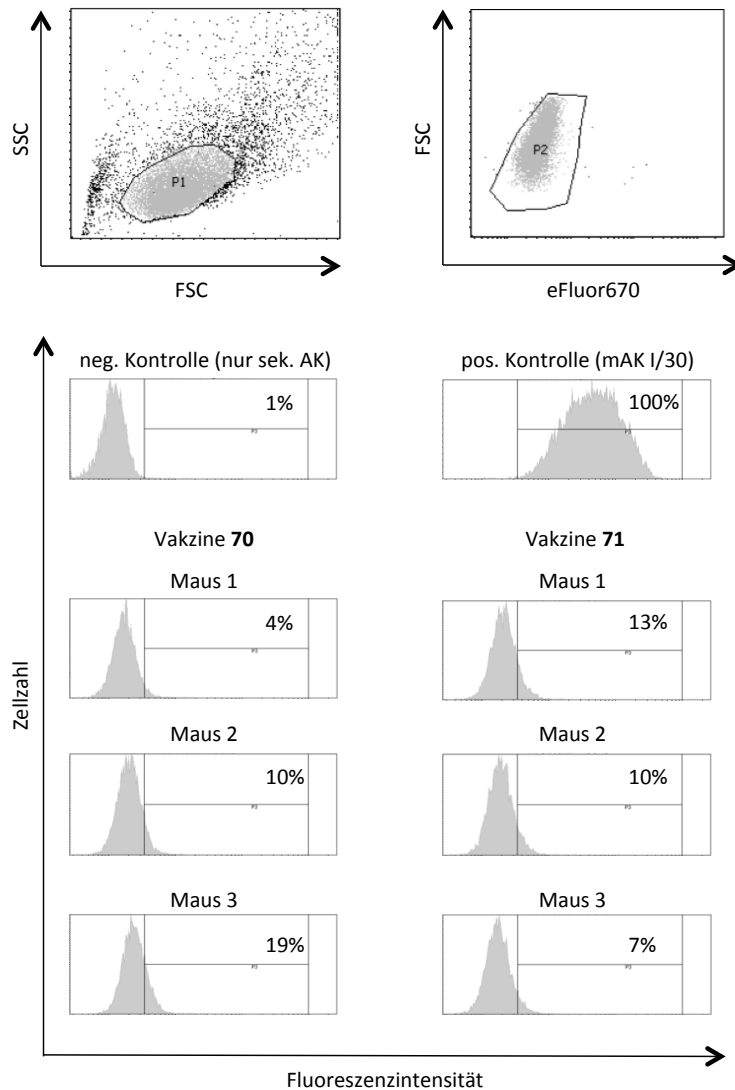
**Abb. 3.76:** Bestimmung der durch Vakzine 70 und 71 induzierten IgG-Serumantikörper nach der ersten Auffrischungsimpfung durch ELISA-Analysen (verwendeter BSA-Coat: 58).



**Abb. 3.77: Bestimmung der durch Vakzine 70 und 71 induzierten IgG-Serumantikörper nach der dritten Auffrischungsimpfung durch ELISA-Analysen (verwendeter BSA-Coat: 58).**

Durch Inkubation von verdünnten Serumproben (1:50) mit humanen T47D-Brusttumorzellen und anschließende Färbung der zellgebundenen Serumantikörper mit einem Fluoreszenzfarbstoff-markierten Sekundärantikörper (vgl. Kapitel 3.6.6) wurden die Bindungsaffinitäten der durch Vakzine **70** und **71** induzierten Serumantikörper an humanen Tumorzellen bestimmt. Wie aufgrund der geringen IgG-Titer zu erwarten war, sind die Bindungsaffinitäten der induzierten Serumantikörper bei beiden Vakzinen relativ gering (Abb. 3.78). Lediglich zwischen 4 und 19% der humanen Brusttumorzellen wurden durch die Serumantikörper markiert. Aufgrund der Ergebnisse werden für die Serumantikörper, die durch Vakzine **70** und **71** induziert wurden, kein ELISA zur Bestimmung des Isotyps durchgeführt.

Die Ergebnisse zeigen, dass beide Vakzine nicht optimal wirken. Aufgrund der Tatsache, dass auch die Kontrollvakzine **70** eine ähnlich schwache Immunantwort hervorgebracht hat, liegt die Schlussfolgerung nahe, dass das T-Zell-Epitop aus *M. tuberculosis* nicht optimal gewirkt hat. Dies könnte die Ursache für die niedrigen IgG-Antikörpertiter sein, die von beiden Vakzinen induziert wurden. Dadurch kann die Wirkung des CpG-Motivs als Adjuvans nach diesem Experiment nicht abschließend beurteilt werden. Aufgrund der hohen Kosten der CpG-Oligodesoxynukleotide wurde auf weitere Versuche mit diesem Adjuvans im Rahmen dieser Arbeit verzichtet.



**Abb. 3.78:** Durchflusszytometrische Bestimmung der Bindungsaffinität der durch Vakzine 70 und 71 induzierten Serumantikörper zu T47D Tumorzellen (eFluor670 färbt ausschließlich tote Zellen an, Negativkontrolle: nur Sekundärantikörper, Positivkontrolle: monoklonaler Antikörper I/30 (Konzentration 1 µg/ml)).

### 3.8.2 Entwicklung einer Vierkomponenten-Vakzine mit drei verschiedenen T-Helferzell-Epitopen

*Ergebnisse dieses Kapitels wurden bereits veröffentlicht.*<sup>[172]</sup>

Bei vielen bisherigen vollsynthetischen MUC1-Mehrkomponentenvakzinen wird versucht, die Immunogenität der Vakzine und damit deren Wirksamkeit durch den Einbau von Toll-like 2 Rezeptorliganden zu erhöhen.<sup>[29,30,165,166]</sup> Die Synthese und Reinigung von solchen Lipopeptid-

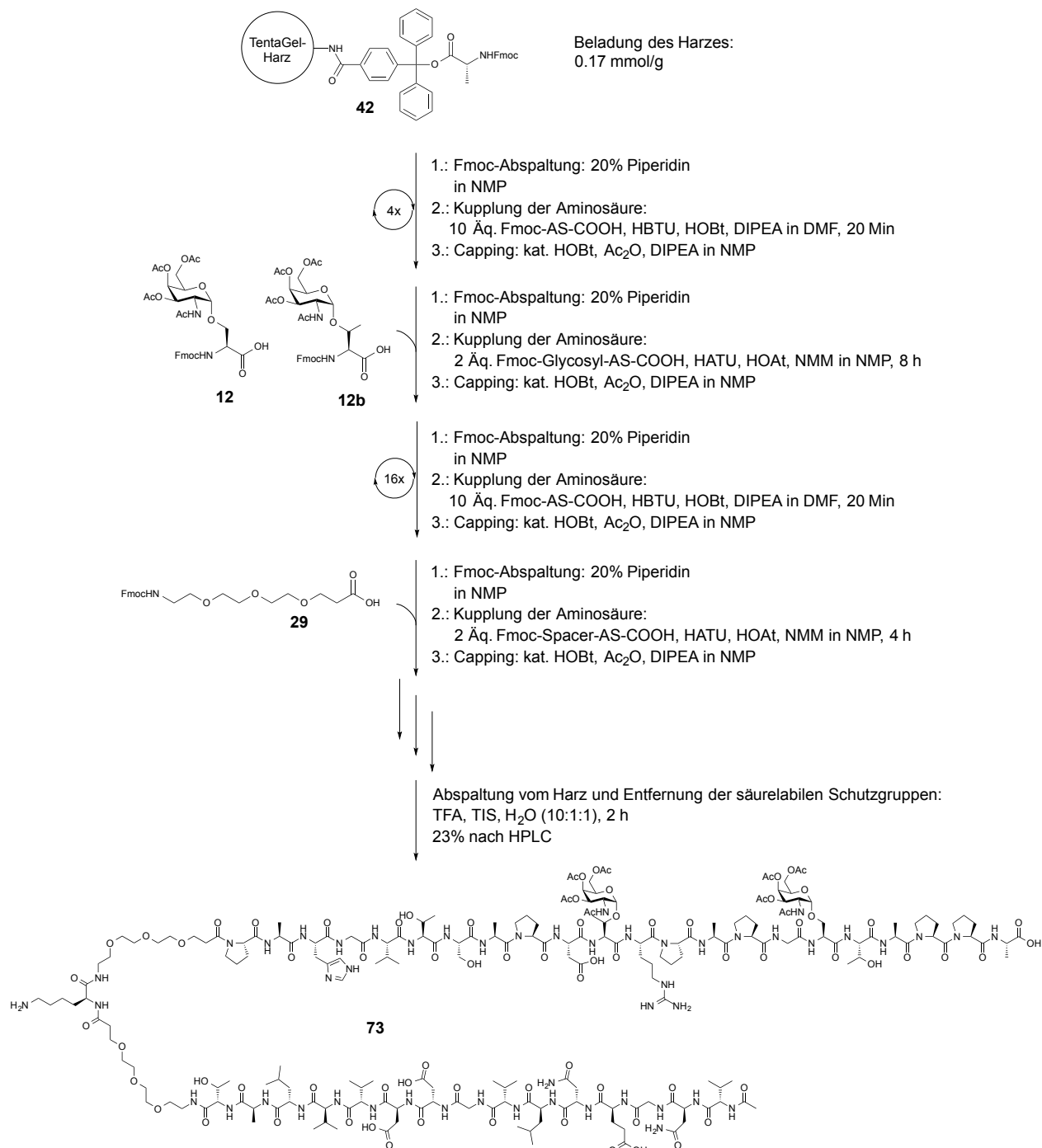




Bei der Auswahl der T-Helferzell-Epitope muss darauf geachtet werden, dass diese keine freien Aminogruppen enthalten, da eine chemoselektive Konjugation der beiden Peptidkomponenten sonst auf diesem Weg nicht möglich ist. Zudem sollen die T-Zell-Epitope sowohl in der Maus, als auch im Mensch wirksam sein. Ein weiteres Kriterium bei der Auswahl der T-Zell-Epitope bildet das durch die Epitope erzeugte Cytokinprofil. Dabei stehen die Cytokine Interleukin-2 (IL-2), Interleukin-4 (IL-4) und Interferon-  $\gamma$  (INF- $\gamma$ ) im Mittelpunkt der Auswahlkriterien. IL-2 ist der wichtigste Wachstums- und Überlebensfaktor für T-Zellen. IL-4 aktiviert vor allem B-Zellen und INF- $\gamma$  induziert in Mäusen die Expression der besonders wirksamen Antikörper des Istotyps IgG2a (vgl. Kapitel 3.5.2 und 3.5.3). Für die Synthese der Vakzine werden daher folgende T-Helferzell-Epitope ausgewählt: Peptid 1 ist ein 15 Aminosäuren umfassendes T-Zell-Epitop aus dem Membranprotein F1<sub>123-137</sub> des bakteriellen Erregers der Beulenpest (*Yersinia pestis*, Cytokinprofil: INF- $\gamma$  > IL-2 > IL-4).<sup>[173]</sup> Peptid 2 ist ein 14 Aminosäuren umfassendes T-Zell-Epitop aus dem V-Serin-Antigen<sub>106-120</sub> des bakteriellen Erregers der Beulenpest (*Yersinia pestis*, Cytokinprofil: INF- $\gamma$  >> IL-2 > IL-10 > IL-4).<sup>[174]</sup> Peptid 3 ist ein 20 Aminosäuren umfassendes T-Zell-Epitop aus dem  $\alpha$ -Kristallin-Chaperon-Homologen-Protein<sub>91-110</sub> des bakteriellen Erregers der Tuberkulose (*Mycobacterium tuberculosis*, Cytokinprofil: IL-4 >> IFN-  $\gamma$ ).<sup>[171]</sup>

Das durch Spaceraminosäuren getrennte Konjugat aus MUC1-Glycopeptid-B-Zell-Epitop und Peptid 1 **73** wird durch automatisierte Festphasenglycopeptidsynthese an einem mit Fmoc-Alanin vorbeladenem TentaGel-Harz unter den in Kapitel 3.4.3 beschriebenen Bedingungen hergestellt (Abb. 3.80). Damit die beiden Peptidstränge später chemoselektiv über die  $\epsilon$ -Lysin-Aminogruppen verknüpft werden können, muss der *N*-Terminus des Peptids am Ende der Festphasensynthese *N*-acetyliert werden. Nach Abspaltung vom Harz und gleichzeitiger Entfernung der säurelabilen Schutzgruppen durch Umsetzung des harzgebundenen Glycopeptids mit einem Gemisch aus Trifluoressigsäure, Wasser und TIS (10:1:1) erhält man das *O*-Acetylgeschützte Glycopeptid **73** nach Reinigung durch präparative HPLC in einer Gesamtausbeute von 23%. Die *O*-Acetyl geschützten Kohlenhydrate des Glycopeptids **73** werden durch Umsetzung mit einer methanolischen Natriummethanolatlösung bei einem pH-Wert von maximal 10.5 entfernt (Abb. 3.81). Nach Reinigung durch präparative HPLC wird das freie Glycopeptid **74** in einer Ausbeute von 36% erhalten. Damit ist das erste Peptid-Konjugat **74** fertiggestellt. Es wird

auf dieser Stufe durch hochaufgelöste Massenspektrometrie (HR-ESI-MS) sowie durch 2D-NMR-Spektroskopie (COSY, HSQC) charakterisiert.



**Abb. 3.80:** Schematische Darstellung der automatisierten Festphasenglycopeptidsynthese von Glycopeptid **73**.

Auch das zweite Peptid-Konjugat **75**, das zwei weitere T-Helferzell-Epitope (Peptid 2 und 3, Abb. 3.79) beinhaltet, wird durch lineare Synthese an der festen Phase an einem mit Fmoc-Alanin



(COSY, HSQC) charakterisiert. Es kann nun durch Konjugation mit dem Peptidkonjugat **74** zur angestrebten Vierkomponenten-Vakzine umgesetzt werden.

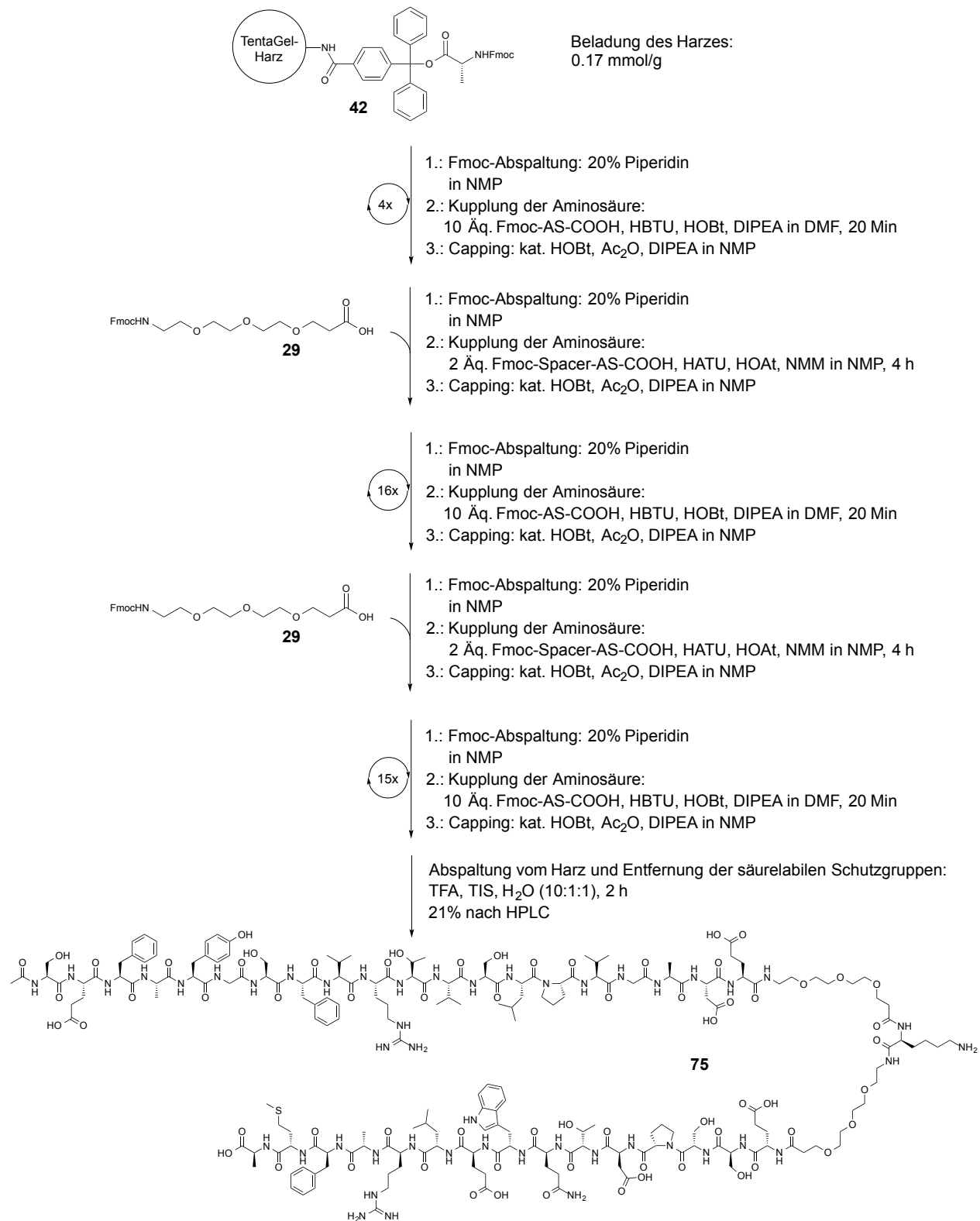
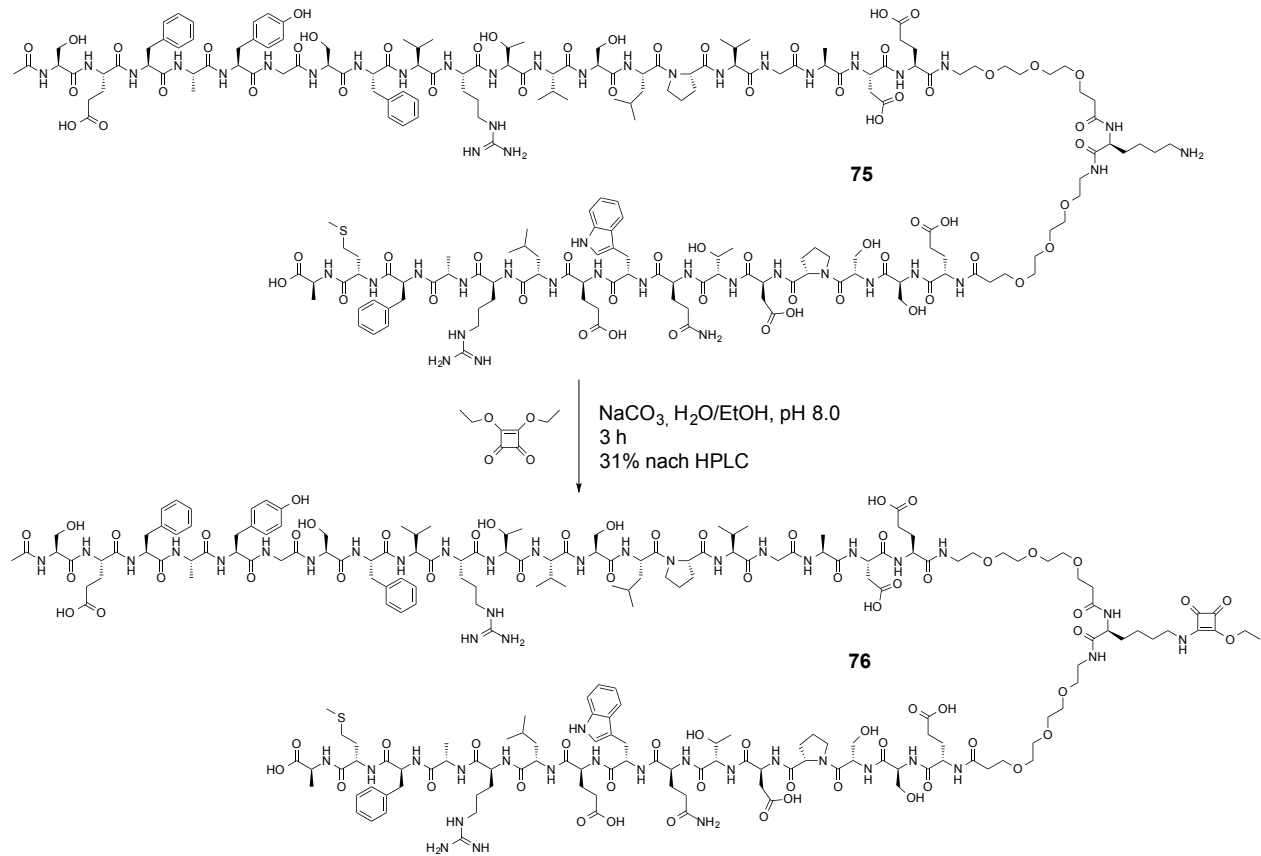


Abb. 3.82: Schematische Darstellung der automatisierten Festphasenpeptidsynthese von Peptid **75**.



**Abb. 3.83: Synthese des Quadratsäuremonoamidethylesters 76.**

Dazu werden die beiden Peptidkonjugate **74** und **76** in äquimolarem Verhältnis bei pH 9.5 in wässriger Natriumhydrogenphosphatpufferlösung fünf Tage bei Raumtemperatur gerührt. Nach Beendigung der Reaktion wird die Vierkomponenten-Vakzine **77** durch Ultrafiltration über einer 3 kDa-Membran gereinigt. Dabei wird entionisiertes Wasser durch die Membran filtriert bis das Filtrat neutral ist. Nach der Gefriertrocknung wurde die Vierkomponenten-Vakzine **77** in einer Ausbeute von 96% als farbloses Lyophilisat erhalten (Abb. 3.84).

Zur immunologischen Evaluierung der Vierkomponenten-Vakzine **77** werden drei weibliche Balb/c-Mäuse im Alter von acht Wochen nach dem in Kapitel 3.6.5 beschriebenem Immunisierungsplan vakziniert. Um den Effekt der verstärkten T-Zell-Aktivierung zu ermitteln, werden zusätzlich drei weitere Balb/c-Mäuse mit der Zweikomponentenvakzine **74** immunisiert. Beide Vakzine werden je viermal im Abstand von drei Wochen mit je 50 µg der Vakzine in einer Emulsion aus 40 µl inkomplettem Freund'schen Adjuvans *intra peritoneal* verabreicht.

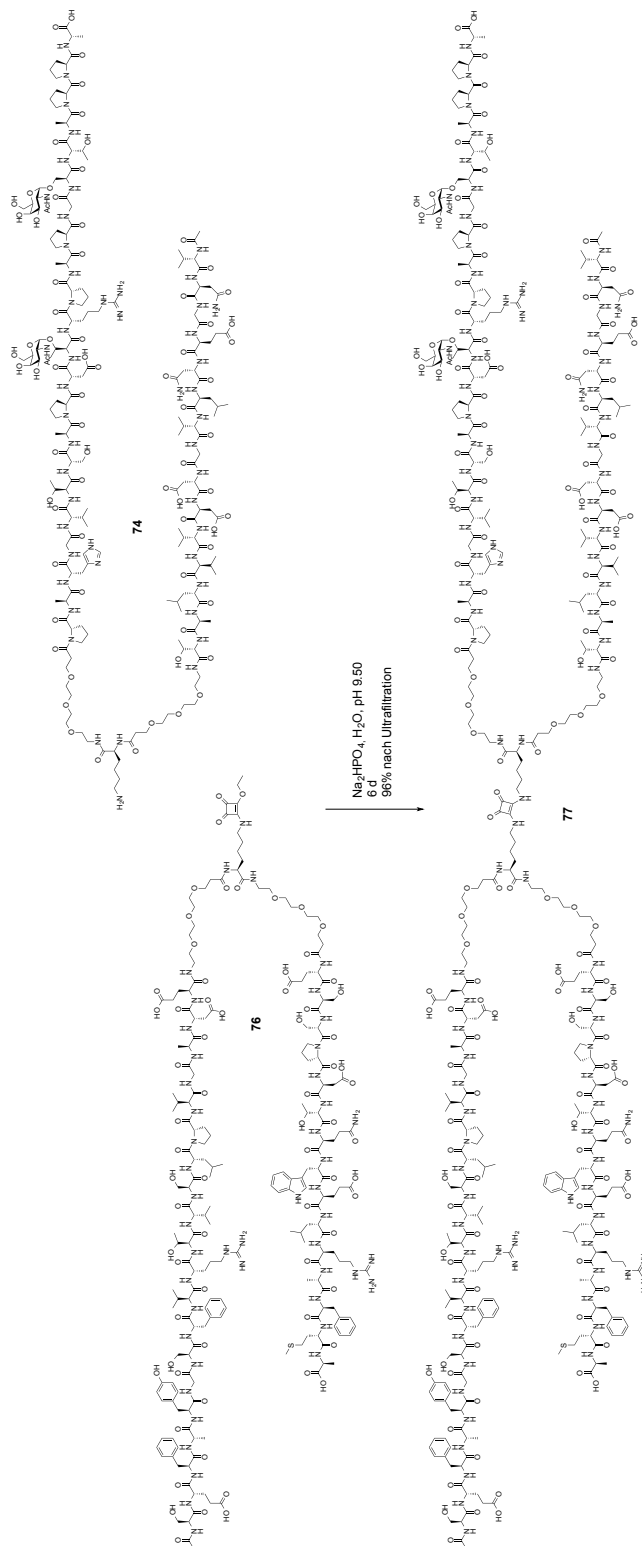


Abb. 3.84: Konjugation von Glycopeptid 74 mit Peptid 76 zur Vakzine 77.

Jeweils fünf Tage nach der zweiten, dritten und vierten Immunisierung werden bei allen Mäusen Blutproben aus der seitlichen Schwanzvene entnommen. In ELISA-Experimenten werden die gewonnenen Seren auf Glycopeptidantigen-spezifische Serumantikörper geprüft.

Bereits fünf Tage nach der ersten Auffrischungsimpfung sind die IgG-Antikörpertiter, die durch die Vierkomponenten-Vakzine **77** induziert wurden, in allen drei Mäusen deutlich höher, als die IgG-Antikörpertiter, die durch die Zweikomponenten-Vakzine **74** induziert wurden. Dieser Trend wird nach der letzten Auffrischungsimpfung noch deutlicher (Abb. 3.85).

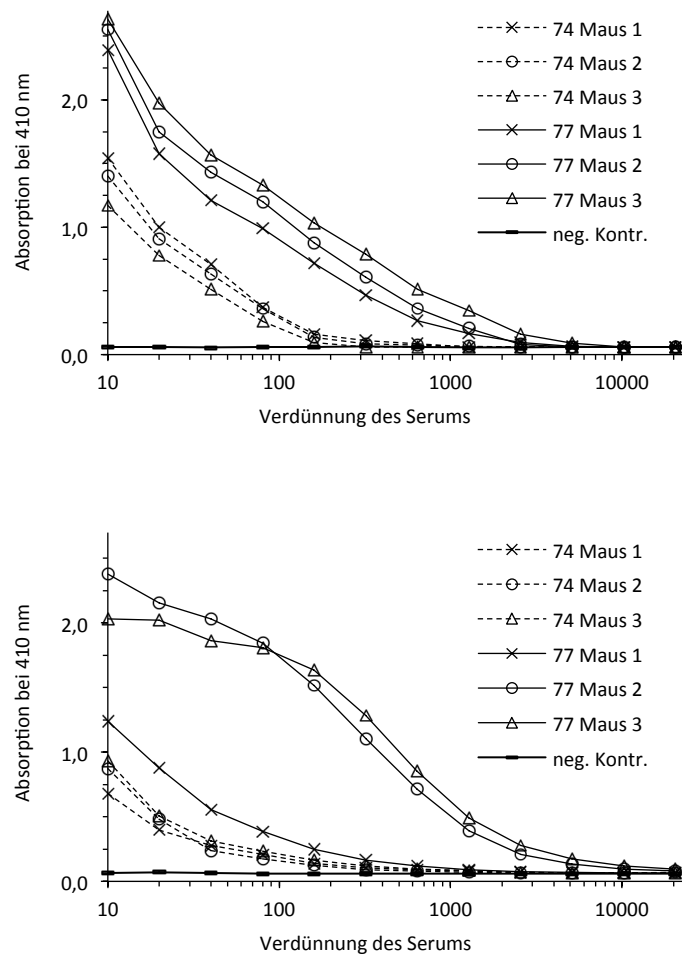
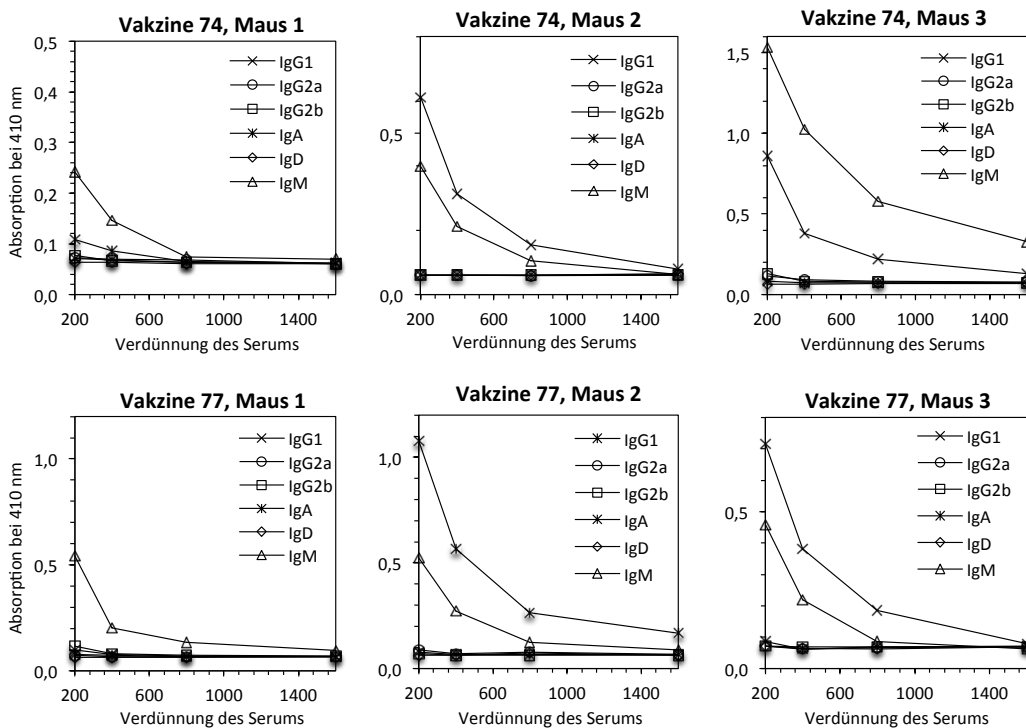


Abb. 3.85: ELISA-Analyse der IgG-Antikörpertiter, die durch Vakzine **74** und **77** induziert worden sind nach der ersten (oben) und nach der dritten (unten) Auffrischungsimpfung (BSA-Coat 56).

Die ELISA-Experimente zeigen, dass die zusätzlichen T-Helferzell-Epitope in Vakzine **77** zu einer effizienteren T-B-Zellkooperation führen, wodurch im weiteren Verlauf der Immunantwort höhere Antikörpertiter von protektiven IgG-Antikörpern induziert werden können. Die Analyse



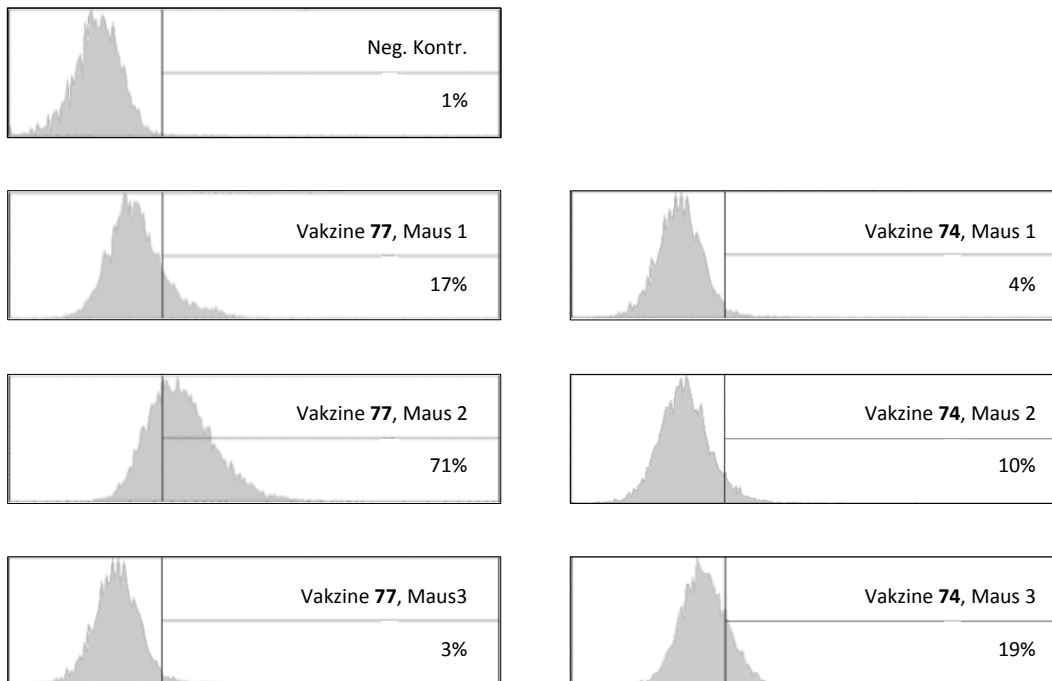
der induzierten Immunglobulin-Isotypen zeigt, dass durch die Vierkomponenten-Vakzine **77** in allen drei immunisierten Mäusen neben Antikörpern des Isotyps IgM überwiegend Antikörper des Isotyps IgG<sub>1</sub> induziert werden konnten. Dagegen überwiegen bei der Zweikomponenten-Vakzine **74** in zwei von drei Mäusen die Antikörper des IgM-Isotyps (Abb. 3.86).



**Abb. 3.86: Bestimmung der durch Vakzine 74 (oben) und 77 (unten) induzierten Antikörper-Isotypen fünf Tage nach der letzten Immunisierung durch ELISA-Experimente.**

Die dominierende Induktion von Antikörpern des Isotyps IgG<sub>1</sub> durch Vakzine **77** zeigt, dass die T-Helferzell-Epitope überwiegend eine Th<sub>2</sub>-gerichtete T-Zellantwort induzierten (vgl. Kapitel 3.5.2). Aufgrund der Eigenschaften der einzelnen T-Helferzell-Epitope (dominierende Induktion von IFN- $\gamma$ )<sup>[171,173,174]</sup> wäre eine verstärkte Induktion von Antikörpern des Isotyps IgG<sub>2a</sub> erwartet worden. Die überwiegende Induktion von IgG<sub>1</sub>-Antikörpern ist in diesem Zusammenhang auf das verwendete Balb/c-Mausmodell zurückzuführen, dass aufgrund seiner genetischen Eigenschaften bei einer Inflammation bevorzugt Interleukin-4 induziert und damit eine Th<sub>2</sub>-gerichtete Immunantwort fördert.<sup>[117,130]</sup> Die an T47D-Tumorzellen getestete Bindungsaffinität (vgl. Kapitel 3.6.6) der durch Vakzine **74** und **77** induzierten Antikörper liefert gemischte Resultate. Die Antikörper, die durch Vakzine **74** induziert wurden, können die humanen

Tumorzellen nur mit geringer Affinität binden. Dagegen binden die Antikörper, die durch Vakzine **77** induziert wurden teilweise mit hoher Affinität (Serum von Maus 2) an die T47D-Tumorzellen (Abb. 3.87).



**Abb. 3.87:** Ergebnisse der durchflusszytometrischen Analyse zur Bestimmung der Bindungsaffinität der durch Vakzine **74** und **77** induzierten Serumantikörper an humanen T47D-Tumorzellen. Negativkontrolle: Färbung mit dem Fluoreszenzfarbstoff-markiertem Sekundärantikörper.

Die Versuche zeigen, dass durch die beiden zusätzlichen T-Zell-Epitope in Vakzine **77** nicht nur höhere IgG-Antikörpertiter induziert wurden, sondern auch bessere Bindungsaffinitäten zu humanen Tumorzellen erzielt werden konnten. Die Ergebnisse bestätigen deutlich, dass T-Helferzellen eine besondere Bedeutung bei der Aktivierung von B-Zellen zukommt. Bemerkenswert ist dabei auch, dass diese Ergebnisse ohne zusätzliche immunstimulierende Adjuvantien erreicht wurden.

### 3.8.3 Entwicklung einer Fünfkomponenten-Vakzine mit drei cytotoxischen MUC1 T-Zell-Epitopen

Alle bisher entwickelten MUC1-Antitumor-Vakzine zielen darauf ab, tumorspezifische Antikörper zu induzieren, die dann Antikörper-vermittelte Effektorfunktionen, wie z.B. CDC oder ADCC (vgl. Kapitel 3.5.3), gegen den Tumor initiieren sollen. Antikörper sind die einzigen Rezeptoren des Immunsystems, die flexibel gegen verschiedene Mischantigene, wie z. B. Glycopeptide gebildet werden können. Alle anderen Immunrezeptoren erkennen entweder nur definierte und konservierte immunogene Epitope (z.B. TLR-Rezeptoren, vgl. Kapitel 3.5.1) oder Peptide, die in Kombination mit dem MHC-Komplex präsentiert werden (T-Zellrezeptoren). Dieses Alleinstellungsmerkmal macht Antikörper zu einem wichtigen Instrument des Immunsystems, und sie sind daher auch der Schlüssel zur erfolgreichen Behandlung von zahlreichen Krankheiten in der modernen Medizin.<sup>[175]</sup> Aufgrund des hohen Molekulargewichts (ca. 150 kDa) besitzen Antikörper aber auch pharmakokinetische Eigenschaften, die gerade bei der Bekämpfung von Krebserkrankungen nachteilig sind. Bei soliden Tumoren verläuft die Angiogenese meist unkontrolliert, daher bildet sich ein ungeordnet wucherndes Geflecht von kleineren Blut- und Lymphgefäßen aus. Durch das ineffiziente Gefäßwachstum ist der lokale hydrostatische Druck in Tumoren gegenüber dem Normalgewebe häufig erhöht. Dadurch können bei der Immuntherapie von Tumoren hochmolekulare Therapeutika, wie z.B. Antikörper, nur unzureichend zu ihrem Wirkort gelangen.<sup>[176]</sup> Um diese Probleme zu umgehen, soll eine Vakzine entwickelt werden, die nicht nur tumorspezifische Antikörper, sondern auch cytotoxische CD8<sup>+</sup> T-Zellen induziert. Diese erkennen pathogene Zellen durch Bindung von mit Peptidepitopen beladenen MHC Klasse I-Rezeptoren mit ihrem T-Zellrezeptor. Nach erfolgreicher Erkennung schütten sie niedermolekulare cytotoxische Proteine, wie z.B. Perforin aus. Diese verursachen Schäden in der Zellmembran der Zielzelle und lösen daraufhin durch Aktivierung von Caspasen die Apoptose aus. Ein weiterer Mechanismus beruht auf der Wechselwirkung des Fas-Liganden auf cytotoxischen T-Zellen mit dem Fas-Rezeptor (CD95, APO-1), der vor allem auch auf Epithelzellen vorkommt. Auch dieser Mechanismus löst die Apoptose in der Zielzelle aus. Durch beide Mechanismen können cytotoxische T-Zellen auch größere Tumorgewebe kontrolliert durch Apoptose beseitigen.<sup>[177]</sup> Voraussetzung für die Induktion von

MUC1-spezifischen cytotoxischen T-Zellen ist das Vorhandensein von MHC-Klasse I-T-Zell-Epitopen in der Aminosäuresequenz von MUC1. In der Literatur gibt es zahlreiche Berichte, die bestätigen, dass MHC-Klasse I-T-Zell-Epitope in der MUC1-Sequenz vorhanden sind. Innerhalb der Tandem Repeat-Sequenz sind die Sequenzen STAPPAHGV und SAPDTRPA als cytotoxische T-Zell-Epitope beschrieben worden.<sup>[156,178-181]</sup> Ein weiteres cytotoxisches T-Zell-Epitop das im *N*-terminalen Bereich des MUC1 und damit außerhalb der VNTR-Region liegt, ist die Sequenz LLLTVLTVV<sub>13-21</sub>.<sup>[179,180,182]</sup>

Eine neue Vakzine soll nun so aufgebaut werden, dass die beiden cytotoxischen T-Zell-Epitope aus der Tandem Repeat-Sequenz in das MUC1-B-Zell-Epitop der Vakzine integriert werden. Dazu wird die Tandem Repeat-Sequenz *N*-terminal um 16 Aminosäuren verlängert. Das B-Zell-Epitop ist identisch mit Struktur **50**, die sich bereits in der MUC1-TTox-Vakzine **62** bewährt hat (vgl. Kapitel 3.6.6). In diesem MUC1-Glycopeptidantigen ist die immundominante APDTRP-Domäne durch ein T<sub>N</sub>-Threonin-Antigen und das konformationsinduzierende STAPPA-Motiv durch ein Sialyl-T<sub>N</sub>-Serin-Antigen glycosyliert. Diese Glycosylierungen verkörpern die tumorassoziierte Struktur des MUC1-B-Zell-Epitops. Gleichzeitig wird durch die *N*-terminale Verlängerung des B-Zell-Epitops sichergestellt, dass die beiden cytotoxischen T-Zell-Epitope STAPPAHGV und SAPDTRPA auch in nicht-glycosylierter Form vorliegen. Dadurch ist eine Antigenprozessierung und Präsentation der Peptide auf MHC Klasse I-Rezeptoren möglich (siehe Abb. 3.88). Die Anbindung des cytotoxischen T-Zell-Epitops LLLTVLTVV erfolgt über einen Triethylenglycolaminospacer am *N*-Terminus der Vakzine. Damit befindet sich dieses Epitop genau wie bei der MUC1-Sequenz am *N*-Terminus. Da diese endogenen Epitope aus dem MUC1 keine starke Immunogenität aufweisen, müssen die Vakzinkomponenten mit einem T-Helferzell-Epitop verknüpft werden. Dieses induziert T-Helferzellen, die durch Kostimulation und Cytokinausschüttung (IL-2, IL-4 und IFN- $\gamma$ ) sowohl B-Zellen als auch cytotoxische T-Zellen aktivieren. Dazu wird die TTox-Partialsequenz P30 (FNNFTVSFWLRVPKVSASHLE<sub>947-967</sub>) ausgewählt. Diese Sequenz beinhaltet drei verschiedene T-Helferzell-Epitope, die sowohl in der Maus als auch im Mensch wirksam sind.<sup>[183]</sup> Zudem wurde das T-Helferzell-Epitop bereits erfolgreich in vollsynthetischen Antitumorvakzinen zur gezielten Steigerung der Immunogenität verwendet.<sup>[28]</sup> Das T-Helferzell-Epitop soll zwischen dem *C*-terminalen MUC1-B-Zell-Epitop und dem *N*-terminalen cytotoxischen T-Zell-Epitop separiert durch Spaceraminosäuren eingebaut werden (Abb. 3.88).

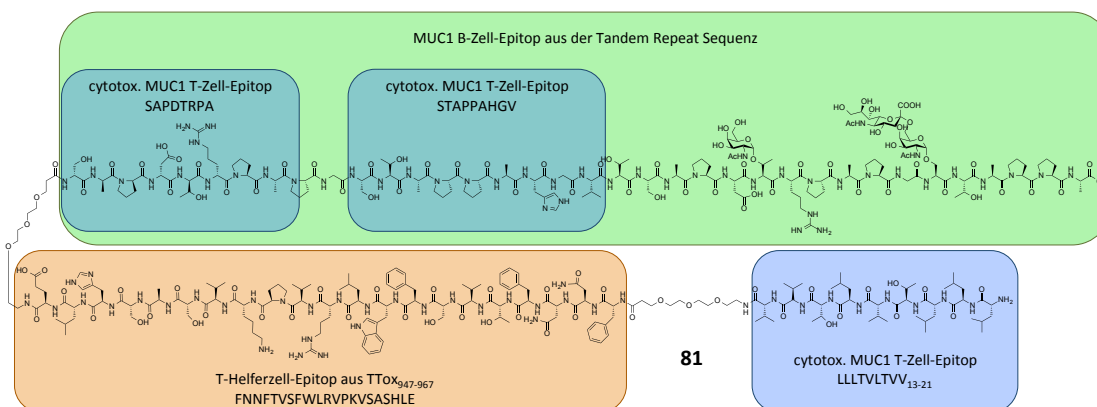
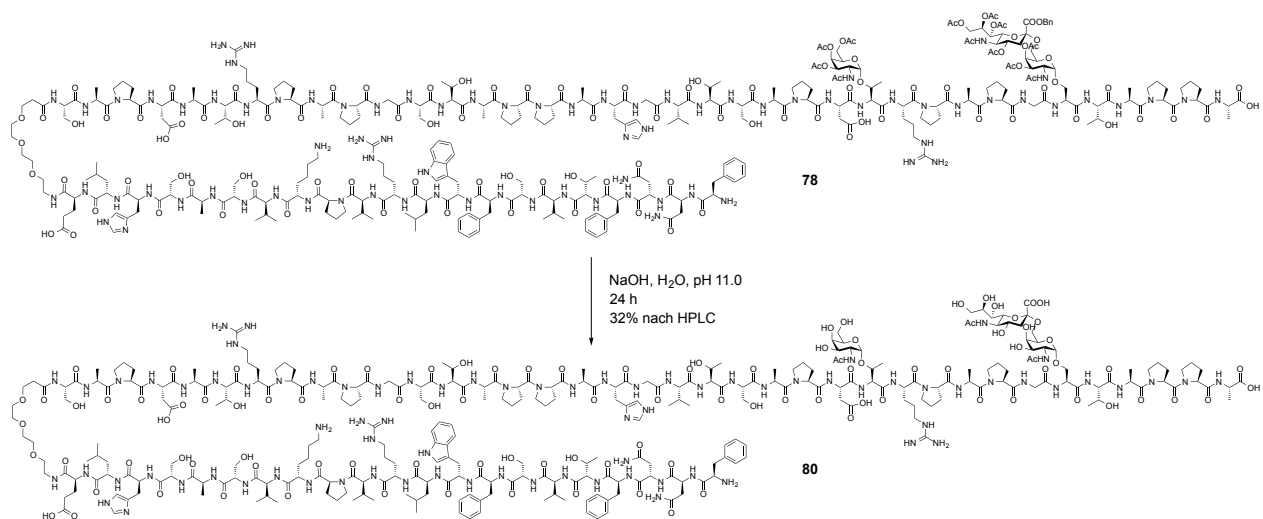
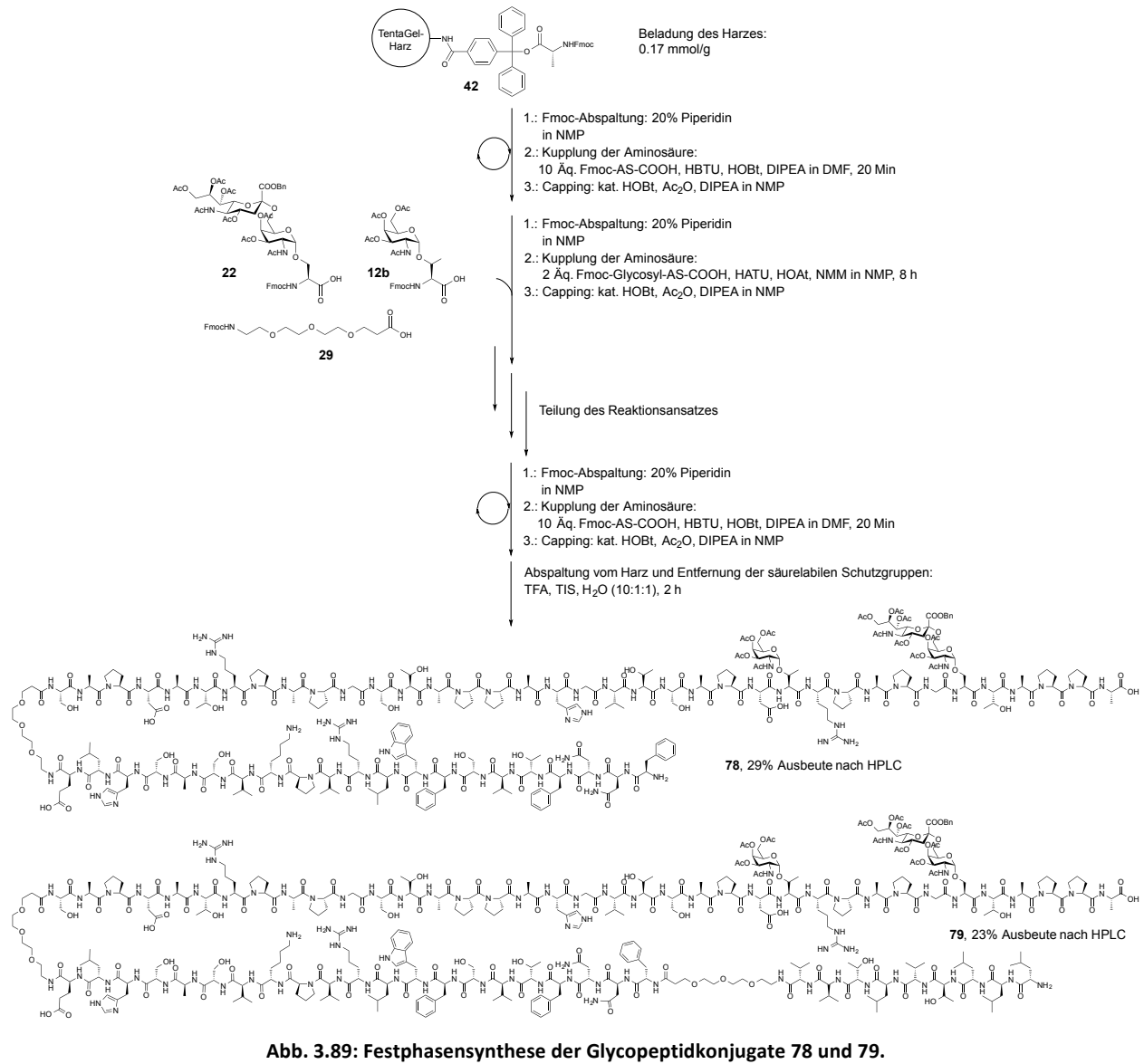
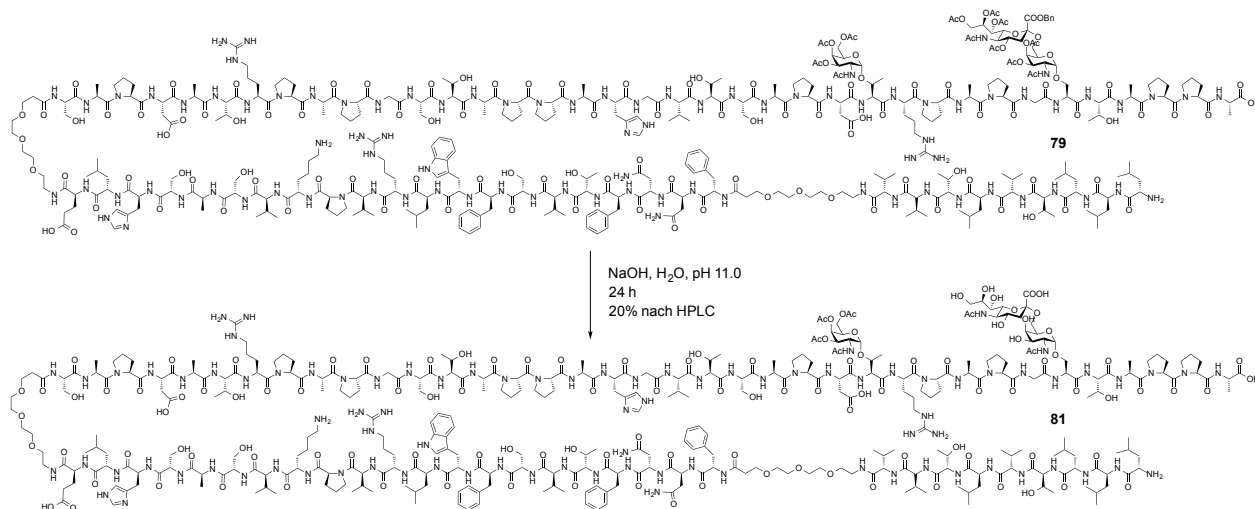


Abb. 3.88: Aufbau der Fünfkomponenten-Vakzine mit drei cytotoxischen T-Zell-Epitopen aus der Sequenz des MUC1.

Die Synthese der Fünfkomponenten-Vakzine erfolgt automatisiert linear an der festen Phase unter den in Kapitel 3.4.3 beschriebenen Bedingungen. Dabei wird ein mit Fmoc-Alanin vorbeladenes TentaGel-Harz mit einer Harzbeladung von 0.17 mmol/g eingesetzt (Abb. 3.89). Nach der Komplettierung des TTox-Epitops P30 wird der Ansatz geteilt. Ein Teil wird weiter zur Anbindung des *N*-terminalen cytotoxischen T-Zell-Epitops verwendet. Die andere Teil wird direkt vom Harz abgespalten (Abb. 3.89). Nach Reinigung durch präparative HPLC wurde das Glycopeptidkonjugat **78** in einer Gesamtausbeute von 29% und das Glycopeptidkonjugat **79** in einer Ausbeute von 23% erhalten. Anschließend werden bei beiden Konjugaten die Schutzgruppen der Glycane durch Umsetzung mit wässriger Natriumhydroxidlösung (pH 11.0 - 11.5) entfernt. Nach anschließender Reinigung durch HPLC wurde das vollständig deblockierte Konjugat **80** in einer Ausbeute von 32% und das Konjugat **81** in einer Ausbeute von 20% erhalten (Abb. 3.90 und 3.91). Beide Glycopeptidkonjugate wurden anschließend durch Massenspektrometrie (ESI-MS) und 2D-NMR-Spektroskopie (COSY, HSQC) charakterisiert.



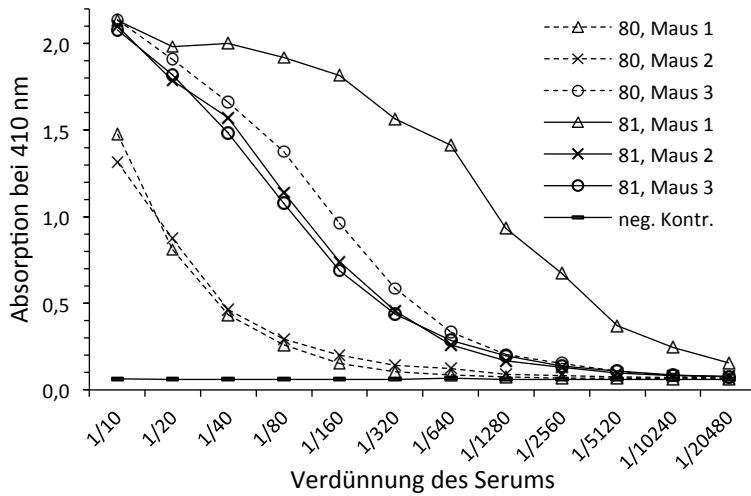


**Abb. 3.91: Entfernung der Schutzgruppen von Glycopeptid 79.**

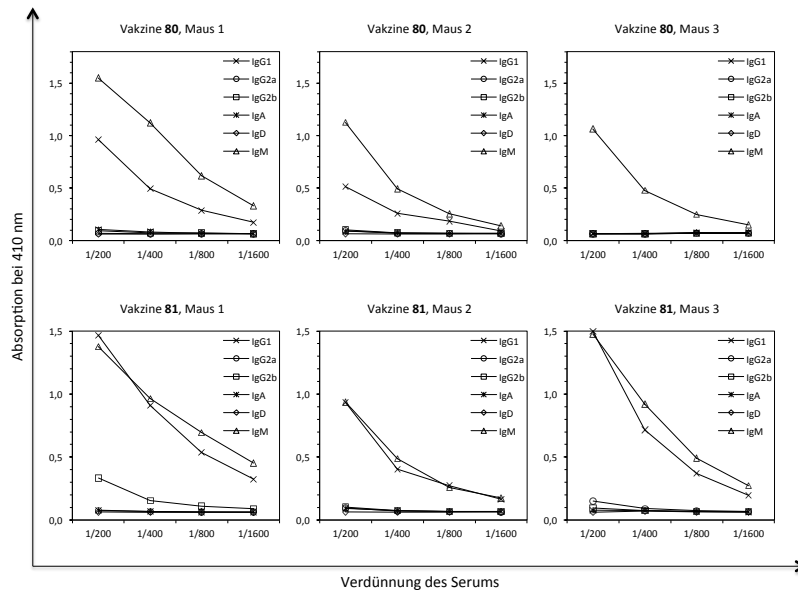
Zur immunologischen Evaluierung der Vakzine **80** und **81** werden jeweils drei weibliche Balb/c Mäuse im Alter von acht Wochen nach dem in Kapitel 3.6.5 beschriebenem Immunisierungsplan vakziniert. Im Gegensatz zu vorangegangenen Immunisierungen werden die Auffrischungsimpfungen dieses Mal im Abstand von zwei Wochen durchgeführt. Durch den Vergleich der Vakzine **80** mit Vakzine **81** soll vor allem das Potential zur Induktion von cytotoxischen T-Zellen des N-terminalen cytotoxischen T-Zell-Epitops von Vakzine **81** ermittelt werden. Die Experimente zur immunologischen Evaluierung der Vakzine **80** und **81** wurden in Kooperation mit xxxxxxxx xxxxxxxx aus der Gruppe von Prof. Dr. xxxxx xxxxxxxx am Institut für Immunologie der Universitätsmedizin Mainz durchgeführt.

Die Ergebnisse der ELISA-Experimente zur Bestimmung der Vakzin-induzierten IgG-Serumantikörpertiter zeigen, dass in allen Mäusen nach der vierten Auffrischungsimpfung signifikante IgG-Titer induziert wurden (Abb. 3.91). Dabei ist überraschend, dass die durch Vakzine **81** induzierten Antikörpertiter leicht erhöht waren im Vergleich zu den Antikörpertitern, die durch Vakzine **80** induziert wurden. Anscheinend war das zusätzliche T-Zell-Epitop dazu in der Lage, durch Aktivierung von cytotoxischen T-Zellen zusätzliche proinflammatorische Cytokine freizusetzen, die sich positiv auf die Bildung von IgG-Antikörpern auswirkten. Die Bestimmung der induzierten Immunglobulin-Isotypen zeigt, dass durch Vakzine **81** überwiegend Antikörper des Isotyps IgG<sub>1</sub> und IgM induziert wurden. Dagegen überwiegen bei Vakzine **80** die Antikörper des IgM-Isotyps. Die Induktion von Antikörpern des IgG-Isotyps zeigt, dass eine

adaptive T-Zell-vermittelte Immunantwort induziert werden konnte. Die unerwartet hohe Induktion von IgM-Antikörpern kann zwei mögliche Ursachen haben. Zum einen kann die Aktivierung von cytotoxischen T-Zellen zu einer verstärkten IFN- $\gamma$ -Produktion führen. Dadurch können in größerem Maße IgM-Antikörper induziert werden (vgl. Kapitel 3.5.3). Zum anderen können die kürzeren Impfintervalle zur Überaktivierung der IgG<sub>1</sub>-produzierenden Plasmazellen führen und damit eine verstärkte Induktion von IgM-Antikörpern durch die Aktivierung neuer B-Zellen zur Folge haben.



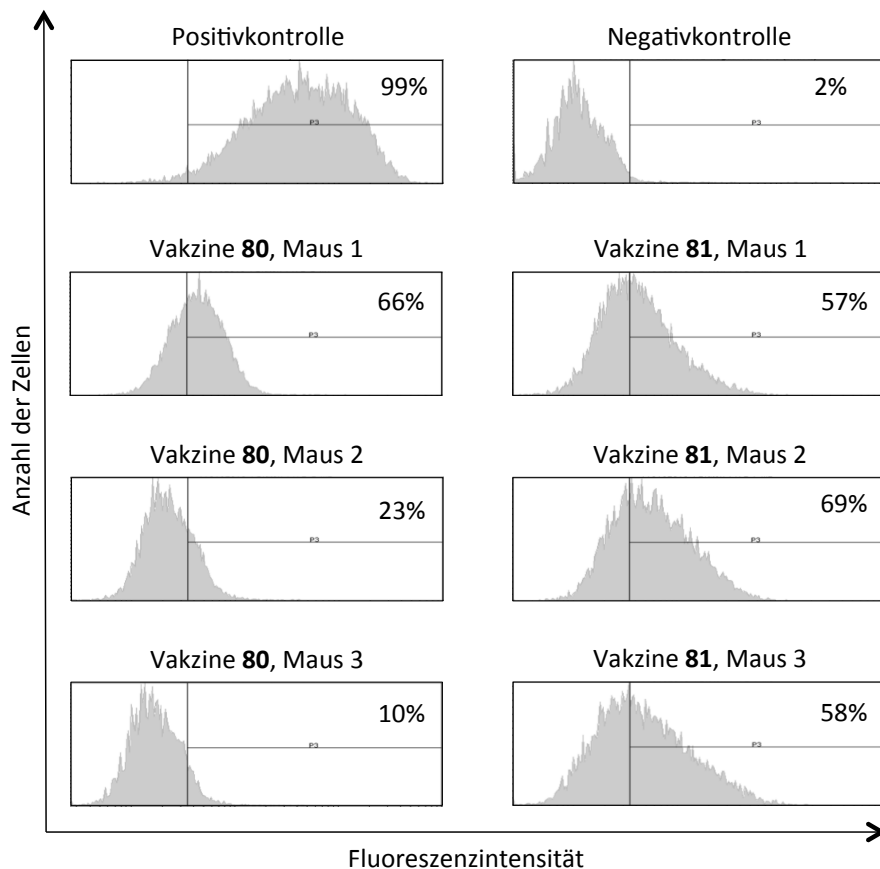
**Abb. 3.92: ELISA-Analyse der IgG-Antikörpertiter, die durch Vakzine 80 und 81 induziert wurden nach der vierten Auffrischungsimpfung (BSA-Coat 59).**



**Abb. 3.93: Bestimmung der durch Vakzine 80 (oben) und 81 (unten) induzierten Antikörperisotypen fünf Tage nach der letzten Immunisierung durch ELISA-Experimente (BSA-Coat 59).**



Die durchflusszytometrische Analyse der Bindungsaffinität von Vakzin-induzierten Serumantikörpern zu humanen T47D Tumorzellen zeigte, dass die durch Vakzine **81** induzierten Antikörper im Vergleich zu den Serumantikörpern, die durch Vakzine **80** induziert wurden, mit deutlich höherer Affinität an die Tumorzellen binden (Abb. 3.94).



**Abb. 3.94:** Ergebnisse der durchflusszytometrischen Analyse zur Bestimmung der Bindungsaffinität der durch Vakzine **80** und **81** induzierten Serumantikörper an humanen T47D-Tumorzellen. (Negativkontrolle: Färbung mit dem Fluoreszenzfarbstoff-markiertem Sekundärantikörper, Positivkontrolle: mAK I/30 c = 1 µg/ml).

Auch diese Ergebnisse sind eher überraschend. Das zusätzliche T-Zell-Epitop sollte sich eigentlich nicht auf die Bindungsaffinität auswirken. Es ist aber nicht auszuschließen, dass auch MUC1-spezifische Antikörper induziert wurden, die sich gegen das N-terminale cytotoxische T-Zell-Epitop richten. Auch könnte der höhere Anteil der IgG<sub>1</sub>-Antikörper für die stärkere Bindung an die Tumorzellen verantwortlich sein. Das würde belegen, dass die adaptive Immunreaktion die höhere Tumorselektivität aufweist.

Eine direkte Untersuchung von spezifischen T-Zellantworten in der Maus ist generell schwierig. Zudem ist die Übertragung von Ergebnissen aus dem Versuchsmodell Maus auf den Menschen nicht immer zulässig, da ein murines T-Zell-Epitop nicht zwangsweise auch im Mensch wirksam ist. Da es sich jedoch bei den untersuchten T-Zell-Epitopen um Strukturen handelt, von denen bekannt ist, dass sie auch im Menschen wirken, ist eine Übertragbarkeit der Ergebnisse gegeben.<sup>[179,182,184]</sup> Die direkte *in vivo*-Untersuchung von cytotoxischen T-Zellantworten ist nur über die durchflusszytometrische Analyse von Blutproben mit Peptid-beladenen, Floreszenzfarbstoff-markierten MHC-Klasse I-Penta- bzw.-Tetrameren möglich.<sup>[185]</sup> Da sich die meisten cytotoxischen T-Zellen jedoch in der Milz und in den Lymphknoten befinden, ist eine *ex vivo* Analyse dieser Zellen aufschlussreicher. Da die Verarbeitung solcher Gewebe zu Einzelzellsuspensionen für die zu untersuchenden T-Zellen eine enorme Belastung darstellt, müssen sich die Zellen erst in speziellen Zellmedien erholen. Sie werden dabei *in vitro* mit den einzelnen T-Zell-Epitopen restimuliert, bevor sie genauer auf ihre Eigenschaften analysiert werden können. Die dafür benötigten T-Zell-Epitope wurden durch Festphasenpeptidsynthese hergestellt (Abb. 3.95).

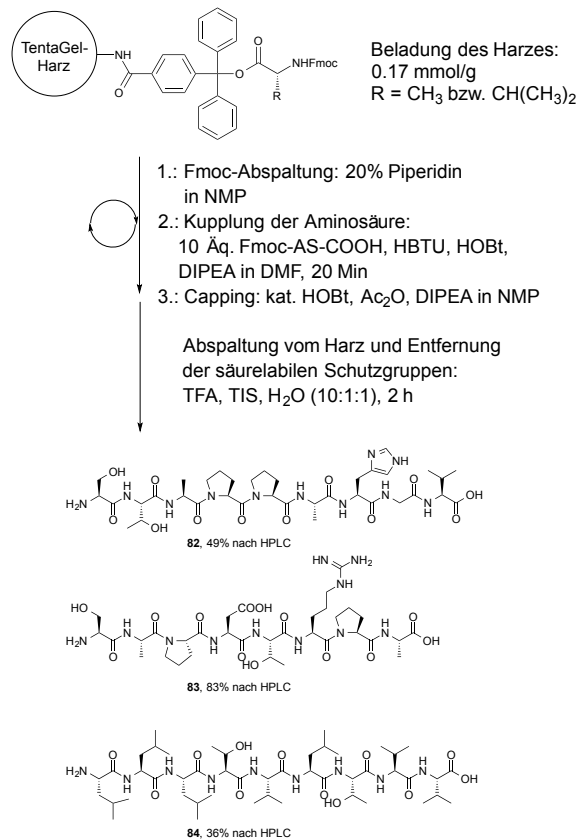


Abb. 3.95: Synthese der zur *ex vivo* Restimulation benötigten T-Zell-Epitope 82, 83 und 84.

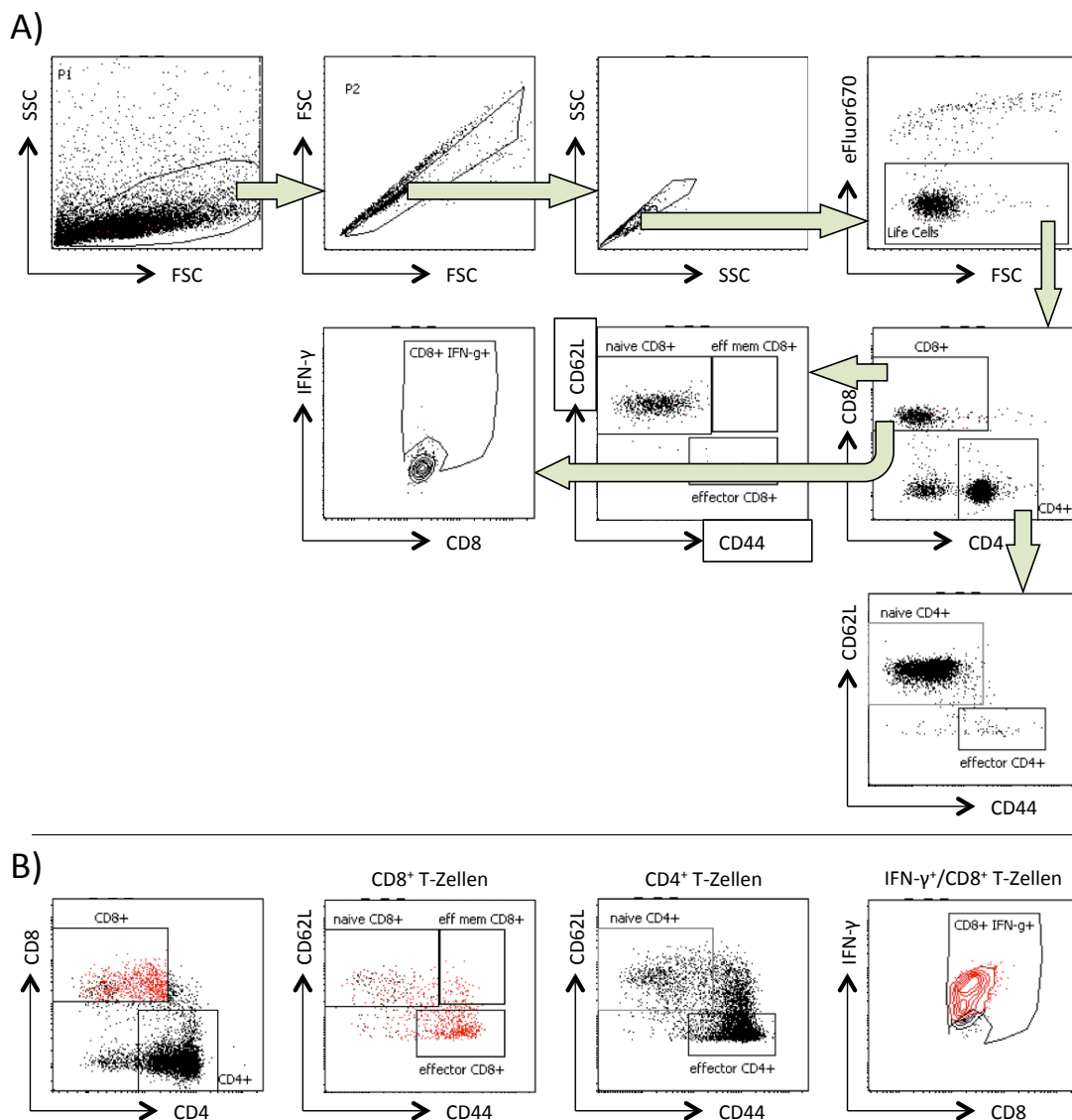
Zur Restimulation werden Einzelzellsuspensionen aus der Milz, den inguinalen und den mesenterialen Lymphknoten aller Mäuse angefertigt. Die Zellen werden in einer 96-Well-Mikrotiterplatte verteilt (50 000 Zellen pro Well) und anschließend wird jede Zellprobe mit einem der Peptidepitope (**82**, **83** oder **84**; Konzentration 1 µg/ml) restimuliert. Nach 24 Stunden werden die Zellen mit den in Abbildung 3.96 angegebenen, mit Fluoreszenzfarbstoff markierten Antikörpern gefärbt und anschließend durchflusszytometrisch analysiert.

Zielantigen des Antikörpers	Fluoreszenzfarbstoff
Viability Dye	eFluor 780
CD4	Brilliant Violett 780 (BV780)
CD8	(Phycoerythin-Cyanin7) PE-Cy7
CD62L	Allophycocyanin (APC)
CD44	Brilliant Violett 605 (BV605)
IFN-γ	(Phycoerythin-Cyanin7) PE

**Abb. 3.96:** Verwendete Antikörper zur Charakterisierung der T-Zellen nach der Restimulation *ex vivo*.

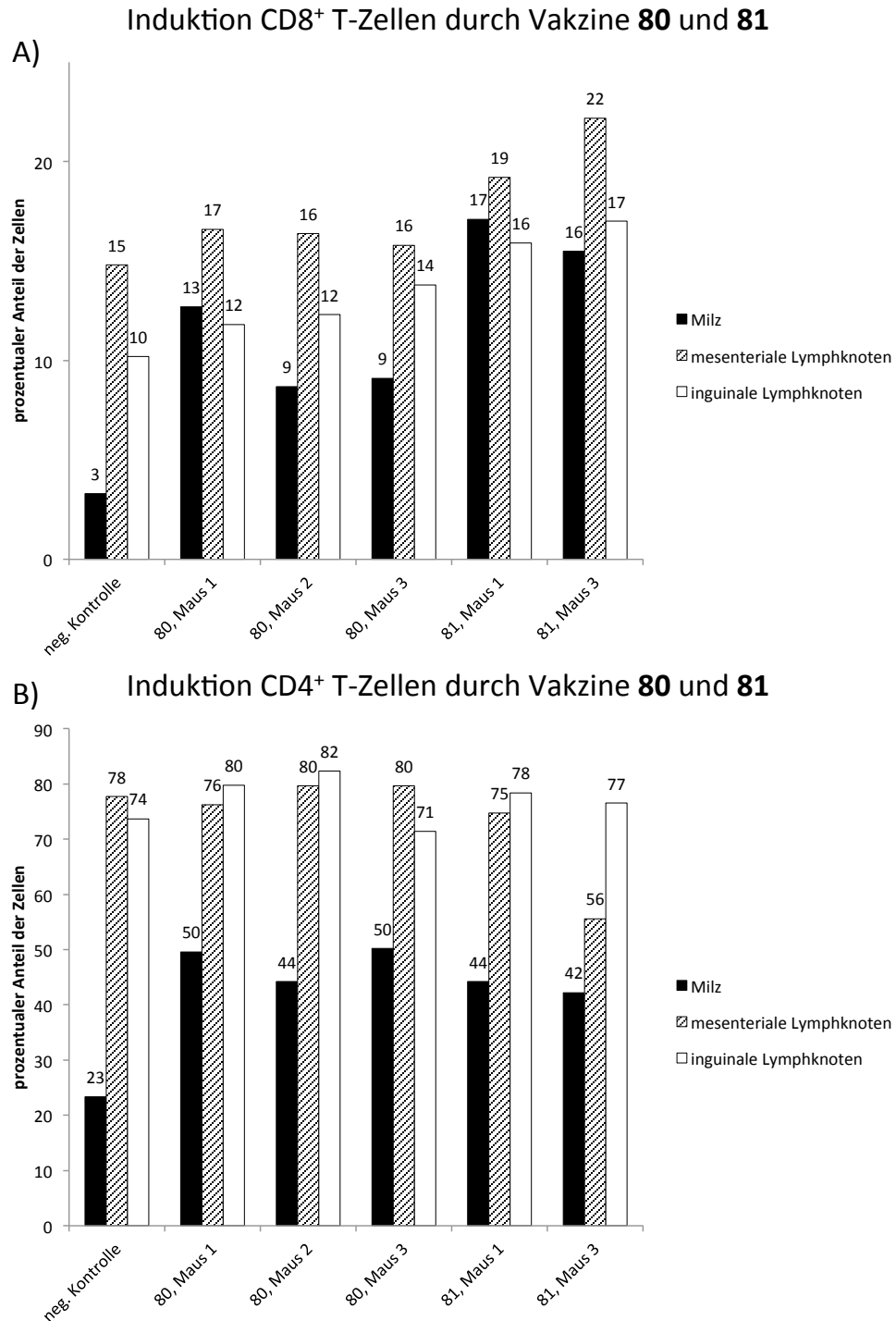
Der Viabilitätsfarbstoff eFluor 780 ist ein Fluoreszenzfarbstoff, der zum Anfärben von toten Zellen dient, um auszuschließen, dass solche vorliegen. Dies ist notwendig, da tote Zellen aufgrund ihrer hohen Autofluoreszenz Messergebnisse verfälschen können. Das Zelloberflächenglycoprotein CD4 ist der Korezeptor für MHC II-bindende T-Zellen und damit ein charakteristischer Marker für T-Helferzellen. Dagegen ist das Zelloberflächenglycoprotein CD8 ein Corezeptor für MHC I-bindende T-Zellen und damit ein charakteristischer Marker für cytotoxische T-Zellen. Die Zelloberflächenmoleküle CD44 (Hermes-Antigen) bzw. und CD62L (L-Selektin) sind Zelladhäsionsmoleküle, die für die Unterscheidung von verschiedenen T-Zellpopulationen eine wichtige Rolle spielen. Der Ligand CD62L bindet das Zelloberflächenprotein CD34, das verstärkt in sekundären lymphatischen Geweben exprimiert wird (Lymphknoten).<sup>[186]</sup> Es dient dazu, T-Zellen, die noch keinen Kontakt zu einem Antigen hatten, in den Lymphknoten zu halten, damit sie dort von einer antigenpräsentierenden Zelle aktiviert werden können. T-Zellen, die ausschließlich für CD62L positiv sind, werden daher als naive T-Zellen bezeichnet. Das Oberflächenmolekül CD44 ist ein Zelladhäsionsmolekül, das mehrere Strukturen binden kann, wie z.B. Hyaluronsäure.<sup>[187]</sup> Diese Strukturen werden vermehrt in entzündeten

Gewebe exprimiert und dienen dazu, aktivierte T-Zellen in solchen Geweben zu halten, damit sie dort ihre Effektorfunktionen ausführen. Aktivierte Effektor-T-Zellen sind daher einfach positiv für das Zelloberflächenmolekül CD44. Zellen die positiv für die Oberflächenmoleküle CD62L und CD44 sind, werden als Gedächtnis-T-Zellen bezeichnet. Sie sollen sowohl in Geweben als auch in den Lymphknoten präsent sein, um bei Bedarf eine schnelle Immunreaktion auszulösen. Interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) ist das wichtigste von cytotoxischen T-Zellen produzierte Interleukin und wird von Gedächtnis-T-Zellen, aber auch vor allem von Effektor-T-Zellen produziert.



**Abb. 3.97:** Darstellung der Gating-Strategie zur durchflusszytometrischen Analyse anhand der Negativkontrolle (Kontrollmaus immunisiert mit PBS, keine *ex vivo*-Restimulation) der inguinalen Lymphknoten (A). Darstellung der durchflusszytometrischen Analyse von Maus 1, immunisiert mit Vakzine 81 (inguinale Lymphknoten, *ex vivo* restimuliert mit Peptid 82, 83 und 84).

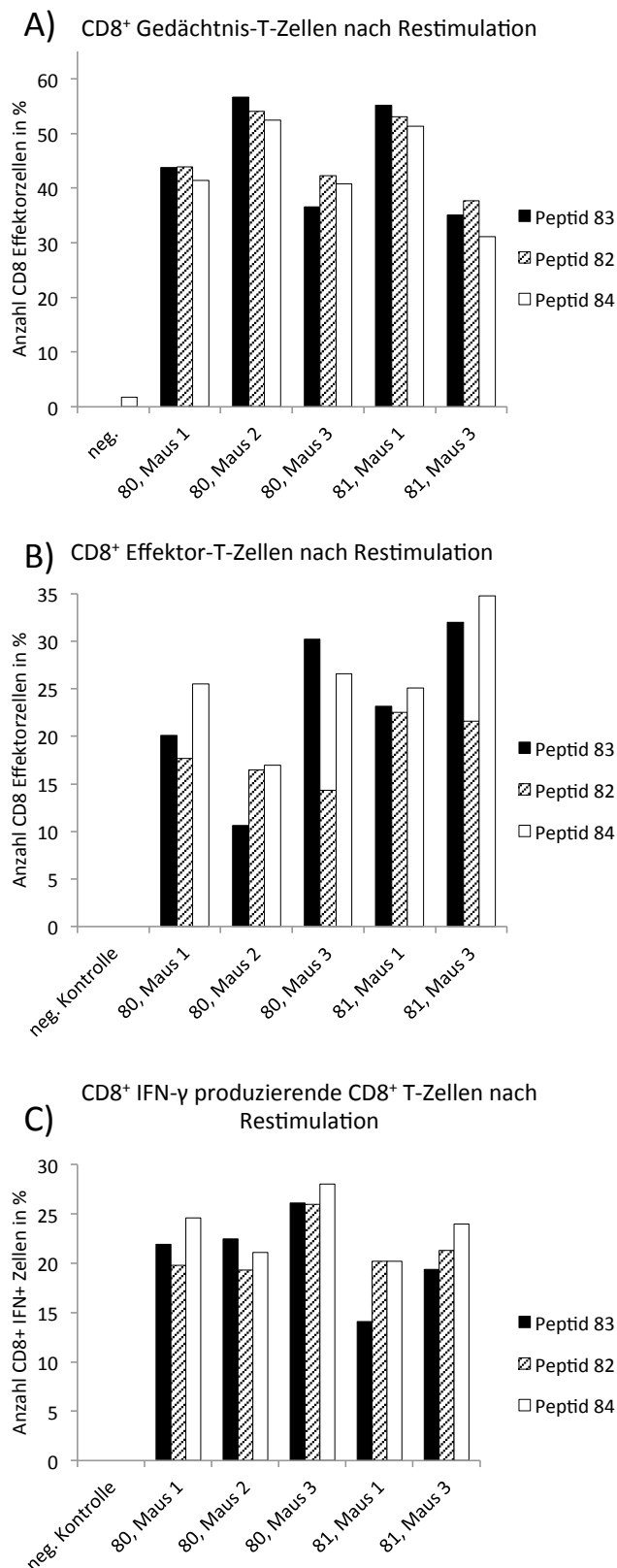
In Abb. 3.97 ist die verwendete Gating-Strategie zur Darstellung der durchflusszytometrischen Analyse gezeigt. Zur Vergleichbarkeit der Ergebnisse wurde eine Kontrollmaus nur mit PBS vakziniert. Ihr Serum dient in den folgenden Experimenten als Negativkontrolle (Abb. 3.97 A).



**Abb. 3.98: Prozentualer Anteil der cytotoxischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen (A) und der CD4<sup>+</sup> T-Helferzellen (B) in der Milz, den mesenterialen und den inguinalen Lymphknoten fünf Tage nach der vierten Auffrischungsimpfung. Gezeigt ist der prozentuale Anteil bezogen auf alle lebenden Zellen (Negativkontrolle: Kontrollmaus immunisiert mit PBS).**

Da die Maus 2, die mit Vakzine **81** immunisiert wurde, vor Abschluss der Vakzinierung verendete, konnten deren Organe nicht mehr für eine Restimulation verwendet werden. Die direkte Analyse der Zellen nach der Herstellung der Einzelzellsuspension ergab, dass in den untersuchten Geweben aller vakzinierter Mäuse im Vergleich zur Kontrollmaus, die nur mit PBS immunisiert wurde deutlich höhere Anteile von CD8<sup>+</sup> T-Zellen induziert werden konnten. Die mit Vakzine **81** immunisierten Mäuse haben deutlich höhere Anteile von cytotoxischen T-Zellen, als die mit Vakzine **80** immunisierten Mäuse (Abb. 3.98 A). Dies zeigt, dass vor allem das T-Zell-Epitop **84** (LLLTVLTVV) zusätzliche cytotoxische T-Zellen induzieren konnte. Dagegen blieb die Induktion von CD4<sup>+</sup> T-Helferzellen bei beiden Vakzinen (**80** und **81**) in allen untersuchten Geweben auf vergleichbarem Niveau (Abb. 3.98 B). Da beide Vakzine das gleiche T-Helferzell-Epitop enthalten, entspricht dieses Ergebnis den Erwartungen.

Da für die Restimulationsexperimente relativ hohe Zellzahlen benötigt werden, konnten diese nur mit den Milzzellen vollständig durchgeführt werden. Die Restimulation zeigt, dass Vakzine **80** und **81** gleichermaßen dazu in der Lage waren, CD8<sup>+</sup> Gedächtnis-T-Zellen zu induzieren, die positiv für CD62L und CD44 sind (vgl. Abb 3.97 A). Die einzeln getesteten cytotoxischen Peptidepitope **82**, **83** und **84** zeigten dabei ebenfalls keine Unterschiede in ihrem Aktivierungspotential. Der Anteil der cytotoxischen Gedächtnis-T-Zellen lag zwischen 31-54%, wobei das Potential zur Induktion von Gedächtniszellen in beiden Vakzinen etwa gleich war. Damit konnte gezeigt werden, dass die Vakzine **80** und **81** immunologischen Langzeitschutz nicht nur durch die Induktion von Gedächtnis-B-Zellen, sondern auch durch die Induktion protektiver cytotoxischer Gedächtnis-T-Zellen gewährleisten können. Bei der Induktion von Effektor-T-Zellen durch *ex vivo*-Restimulierung von Milzzellen zeigten die drei Peptidepitope jedoch deutliche Unterschiede in ihrem Aktivierungspotential. Die T-Zell-Epitope **83** und **84** zeigten im Durchschnitt ein deutlich größeres Potential zur Aktivierung von Effektor-T-Zellen, als das T-Zell-Epitop **82** (3.99 B). Überraschend ist die Tatsache, dass das T-Zell-Epitop **84** bei der Restimulation auch bei denjenigen Mäusen das stärkste Aktivierungspotential zur Induktion von Effektorzellen-T-Zellen zeigte, die nur mit Vakzine **80** immunisiert wurden und damit noch nie Kontakt mit diesem MHC Klasse I-Epitop hatten.



**Abb. 3.99:** Nachweis von CD8<sup>+</sup> Gedächtnis- (A), CD8<sup>+</sup> Effektor- (B) und IFN- $\gamma$  produzierenden T-Zellen aus der Milz nach der *ex vivo* Restimulation mit den Peptiden 82, 83 oder 84. Gemessen wurde der prozentuale Anteil von der CD8<sup>+</sup> T-Zellpopulation (vgl. Abb. 97 A).

Dies lässt die Vermutung zu, dass die hydrophobe Struktur des T-Zell-Epitops **84** (LLLTVLTVV) von den Milzzellen als besonders immunogen wahrgenommen wird. Die Untersuchung der INF- $\gamma$  Produktion der restimulierten Milzzellen zeigt, dass alle T-Zell-Epitope gleichermaßen dazu in der Lage sind, die Produktion von INF- $\gamma$  zu induzieren. Der Anteil der INF- $\gamma$  produzierenden CD8<sup>+</sup> T-Zellen lag dabei zwischen 14% und 28% (Abb. 3.99 C). Wobei auch hier im Durchschnitt das hydrophobe T-Zell-Epitop **84** das größte Potential zur Induktion von INF- $\gamma$  zeigt.

Die Ergebnisse zeigen, dass der zusätzliche Einbau von cytotoxischen T-Zell-Epitopen die Wirksamkeit der auf MUC1 basierenden Antitumor-Vakzine deutlich verbessern kann. Dabei hat sich besonders das T-Zell-Epitop **84** in der Fünf-Komponenten-Vakzine **81** bewährt. Es induziert in besonderem Maße cytotoxische Effektor-T-Zellen, die verstärkt INF- $\gamma$  produzieren. Auch auf die B-Zellantwort hat das zusätzliche T-Zell-Epitop eine positive Auswirkung, da Vakzine **81** höhere Antikörpertiter im Vergleich zur Vakzine **80** induzierten. Wegen des stark hydrophoben Charakters des Epitops **84** ist denkbar, dass durch hydrophobe Wechselwirkungen eine Aggregation von Vakzine **81** begünstigt wird, die zur multiplen Antigenpräsentation des B-Zell-Epitops beiträgt.

Durch die Induktion des cytotoxischen Arms des Immunsystems kann neben der von Antikörpern abhängigen Immunantwort ein weiterer potenter Abwehrmechanismus gegen Tumorgewebe aktiviert werden. Gerade bei der Bekämpfung von soliden Tumoren können cytotoxische T-Zellen durch die kontrollierte Beseitigung von pathogenen Geweben einen wichtigen Beitrag leisten, während tumorspezifische MUC1-Antikörper einzelne metastasierende Zellen schnell markieren und unschädlich machen können. Die Kombination dieser beiden Immunabwehrmechanismen könnte somit ein Schlüssel zur erfolgreichen Immuntherapie von Krebserkrankungen sein.





## 4 Zusammenfassung

Die spezifische Behandlung von Krebserkrankungen ist bis heute ein ungelöstes Problem, da die klassischen Therapieformen, wie z.B. chirurgische Entfernung, Bestrahlung oder Chemotherapie oft nicht effizient genug sind, um die Krankheit vollständig zu heilen. Zudem stellen sie aufgrund der unzureichenden Selektivität eine große Belastung für die Patienten dar. Zwar besitzt das Immunsystem die nötigen Instrumente, um Krebs gezielt zu erkennen und zu bekämpfen, jedoch werden diese nicht aktiviert, da das Immunsystem Tumore als körpereigenes Gewebe und nicht als fremd bzw. pathogen erkennt.

Ein markantes und bei vielen Krebserkrankungen auftretendes Unterscheidungsmerkmal zwischen gesunden Epithelzellen und epithelialen Tumorzellen besteht in der Glycosylierung des Mucins MUC1, einem Oberflächenglycoprotein, das vor allem auf Brust-, Pankreas-, Ovar- und Darmepithelzellen exprimiert wird. In Tumorzellen sind die *O*-Glycosylierungen des MUC1 durch die Herabregulierung der  $\beta$ 1,6-*N*-Acetylglucosamintransferase stark verkürzt und häufig wegen der gesteigerten Aktivität von Sialyltransferasen vorzeitig sialyliert. Dadurch ist das immunologisch relevante Peptidrückgrat des MUC1 in Tumorzellen freier zugänglich und bietet somit einen idealen Angriffspunkt für die Krebsimmuntherapie. Um dieses Unterscheidungsmerkmal auszunutzen, muss das Immunsystem durch Impfstoffe so manipuliert werden, dass es gezielt Antikörper produziert, die spezifisch gegen die tumorassoziierte Struktur, nicht aber gegen die normale Struktur des MUC1 gerichtet sind. Da selbst auf einer Tumorzelle normales MUC1 neben tumorassoziiertem MUC1 vorkommt, sind chemisch reine tumorassoziierte Glycoproteinstrukturen nur durch Totalsynthese zu erhalten, können aber nicht aus Tumorgewebe isoliert werden. Um die körpereigene Toleranz, die gegenüber diesen Strukturen besteht, zu überwinden, muss die Immunogenität der synthetischen MUC1-Glycopeptidantigene durch Verknüpfung mit Immunstimulanzien erhöht werden. Der prophylaktische Einsatz solcher Vakzine kann zur Ausbildung eines immunologischen Langzeitgedächtnis führen, das langanhaltenden Schutz durch die Induktion protektiver Antikörper bietet, die bereits einzelne Tumorzellen und kleinste Metastasen erkennen können. Zusätzlich könnten solche Antitumor-Vakzine auch in der aktiven Immuntherapie bei bereits ausgebrochener Krankheit zum Einsatz kommen.

Für den Aufbau der MUC1-Glycopeptidantigene durch die Festphasenglycopeptidsynthese wurden die tumorassoziierten Kohlenhydratantigene T<sub>N</sub>-Serin **12** und Sialyl-T<sub>N</sub>-Serin **22** als blockierte Fmoc-Glycosylaminosäurebausteine und die Spaceraminosäure **29** als Fmoc-Baustein in mehrstufigen Synthesen hergestellt (Abb. 4.1).

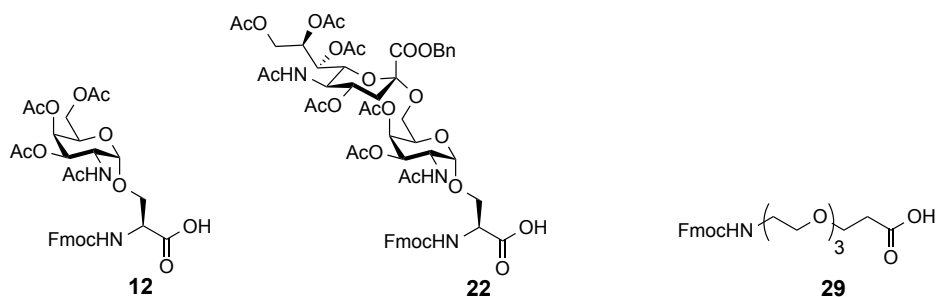


Abb. 4.1: Bausteine für die Festphasenpeptidsynthese: T<sub>N</sub>-, Sialyl-T<sub>N</sub>- und Spaceraminosäurebaustein.

Im ersten Teil dieser Arbeit wurden zwei neue sowie ein bereits bekanntes tumorassoziiertes Glycopeptidantigen durch automatisierte Peptidsynthese an der festen Phase hergestellt. Die Epitope wurden mit einem N-terminalen, flexiblen und immunologisch unbedenklichen Triethylenglycolspacer versehen und über Quadratsäure-Konjugation an freie ε-Aminogruppen der Lysin-Seitenketten von Tetanus Toxoid gebunden. Die beiden neuen TTox-Vakzine **60** und **62** wurden in Immunisierungsexperimenten an Mäusen mit der bereits bekannten TTox-Vakzine **61** verglichen, die in vorangegangenen Arbeiten<sup>[80,151]</sup> vielversprechende Resultate lieferte (Abb. 4.2).

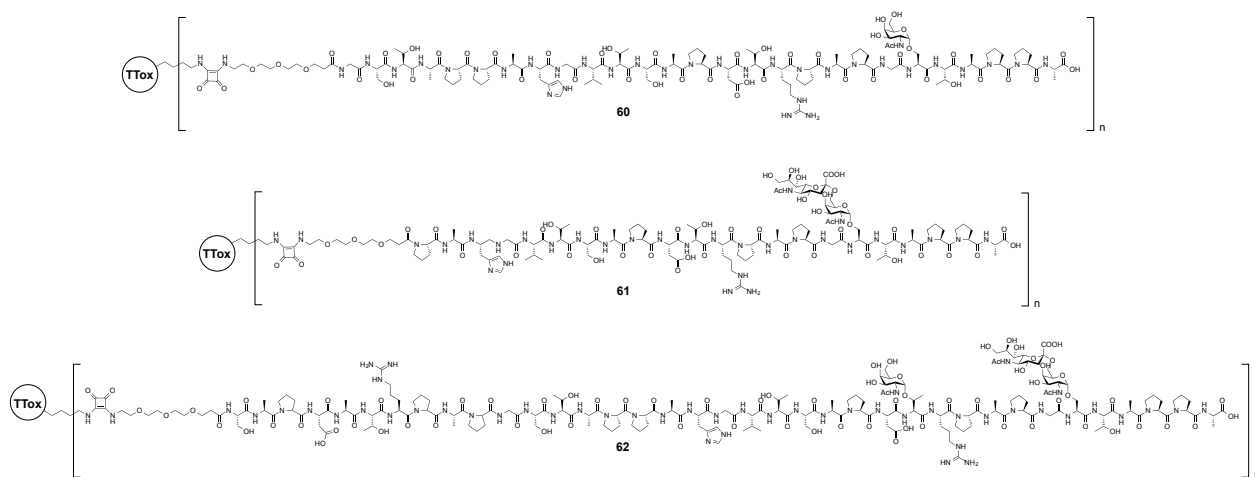


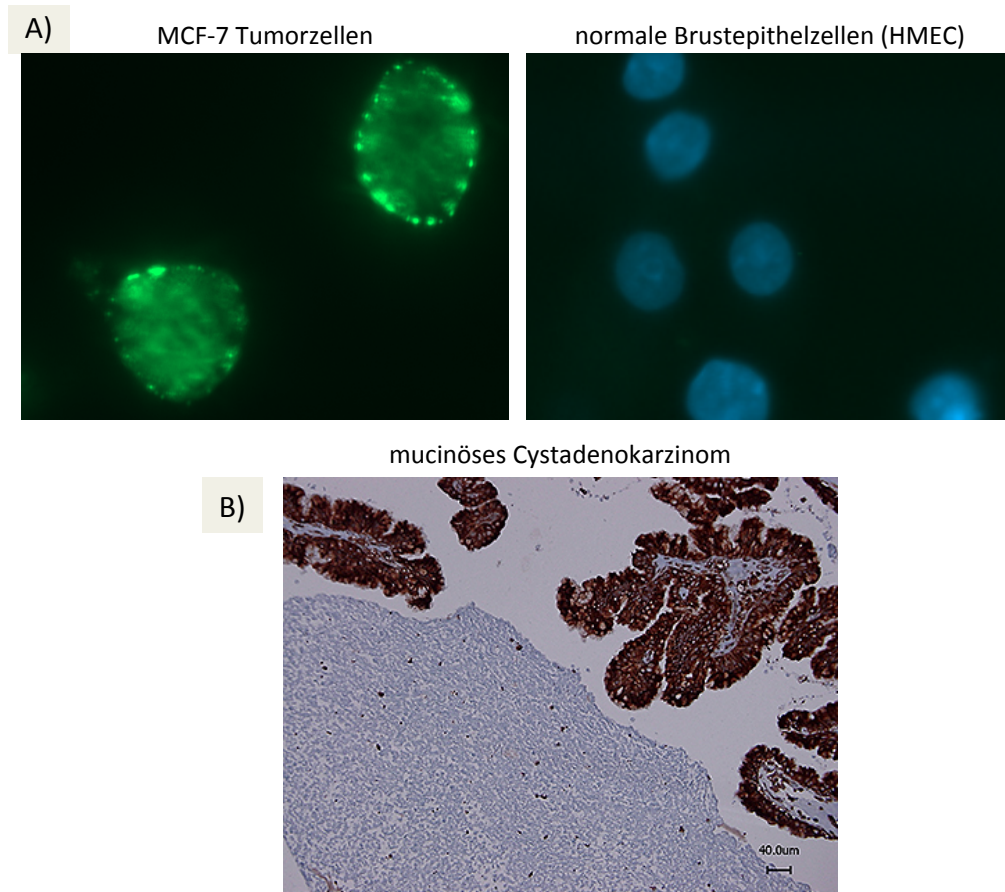
Abb. 4.2: Im Rahmen dieser Arbeit hergestellte TTox-Vakzine **60**, **61** und **62**.

In den Immunisierungsexperimenten zeigte sich, dass alle TTox-Vakzine hohe IgG-Antikörpertiter gegen ihr Glycopeptidantigen hervorriefen. Die Isotypanalyse der Serumantikörper ergab, dass neben geringeren IgM-, IgG<sub>2a</sub>-, und IgG<sub>2b</sub>-Isotyp-Mengen vor allem der Isotyp IgG<sub>1</sub> induziert wurde. Das Überwiegen von Antikörpern des IgG-Isotyps belegt, dass eine adaptive T-Zell-vermittelte Immunantwort induziert wurde und dass ein immunologisches Gedächtnis ausgebildet wurde. Die Überprüfung der Bindungsaffinität Vakzin-induzierter Serumantikörper an humane Brustkrebszellen zeigt, dass vor allem die TTox-Vakzine **60** und **62** mit *N*-terminal verlängerten Peptidepitopen in jeweils allen drei immunisierten Mäusen Antikörper induzierten, die mit hoher Affinität humane Tumorzellen markieren können. Dagegen fallen die Ergebnisse bei den drei Mäusen, die mit Vakzine **61** immunisiert wurden, heterogener aus (siehe S. 64 - 69). Diese Befunde deuten darauf hin, dass eine verlängerte Peptidsequenz zu stabileren B-Zell-Epitopen führt und dass die Wirkung der Vakzine durch die Verlängerung zuverlässiger ist.

In bisherigen Immunisierungen, so auch die von Vakzine **60**, wurden die Vakzine immer mit komplettem Freund'schen Adjuvans (CFA) appliziert. Aufgrund seiner starken Nebenwirkungen ist der Einsatz dieses Hilfsstoffs in Menschen verboten. Daher wurden Vakzine **61** und **62** nur mit inkomplettem Freund'schen Adjuvans (IFA) verabreicht und erzeugten dennoch Antikörpertiter in nahezu gleicher Höhe. Gerade für die Anwendung dieser Antitumor-Vakzine im Menschen ist dieses Ergebnis von großer Bedeutung (siehe Abb. 3.51 und 3.52, S. 65).

Ein weiteres wichtiges Kriterium für einen Einsatz der Antitumor-Vakzine im Menschen ist die selektive Erkennung von tumorassoziierten Strukturen durch die Antikörper. Die induzierten Antikörper müssen tumorassoziiertes MUC1 mit hoher Affinität erkennen, dürfen gleichzeitig aber nicht an gesundes MUC1 binden, um Autoimmunreaktion gegen gesundes Gewebe auszuschließen. In Zellbindungs-Assays wurde daher das Bindungsvermögen von verschiedenen Vakzin-induzierten Antiseren an humane Brustepithelzellen untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass die Antikörper spezifisch an humane Tumorzellen, jedoch nicht an normale Epithelzellen binden (Abb. 4.3 A). Diese eindeutigen Ergebnisse wurden auch bei immunhistochemischen Färbungen von humanen Pankreaskarzinomzellschnitten bestätigt. Die Antikörper binden spezifisch an verschiedene Pankreaskarzinome, umliegendes Normalgewebe wird durch den farbgebenden Sekundärantikörper nicht angefärbt (Abb. 4.3 B). Da Pankreaskarzinome nur

unzureichend behandelt werden können und es kaum verlässliche Mittel zur Diagnose dieser Tumore gibt, sind diese Resultate von besonderem Interesse.



**Abb. 4.3:** A) Färbung von humanen MCF-7-Brusttumorzellen (links) und normalen Brustepithelzellen (HMEC, rechts) mit dem mAK I/30 (grün), induziert durch Vakzine 61. Zur Erkennung der HMEC-Zellen wurde der Zellkern mit DAPI blau angefärbt. Kooperation mit Frau Prof. N. Teusch und Frau Xxxxx Xxxxx, Fachhochschule Köln. B) 100-fache Vergrößerung der Färbung eines humanen mucinösen Cystadenokarzinoms mit dem mAK I/30 (Kooperation mit Herrn PD Dr. X. Xxxxxxxx von Pathologisches Institut, Celle).

TTox-Glycopeptid-Konjugat-Vakzine sind bisher die erfolgreichsten Vakzinkandidaten und brachten in Immunisierungsstudien sehr hohe, toleranzbrechende Antikörpertiter hervor. Ein weiterer Vorteil ist, dass die Verwendung von TTox im Menschen bereits gut untersucht wurde. Da TTox sehr viele T-Zell-Epitope enthält, löst es dementsprechend eine sehr breite Immunantwort aus. Im Zuge solcher starken Immunantworten könnten potentiell autoimmunreaktive Zellen, die bislang vom Immunsystem unterdrückt wurden, aktiviert werden. Um Autoimmunre-

aktionen zu vermeiden, wurden im zweiten Teil der Arbeit vollsynthetische Antitumorvakzine entwickelt, die möglichst spezifische und weniger breite Immunantworten auslösen und im Gegensatz zu den Tetanus Toxoid-Vakzinen besser zu charakterisieren sind.

In einer linearen Synthese an der festen Phase wurde die Zweikomponentenvakzine **69** aus einem MUC1-B-Zell-Epitop und einem T-Helferzell-Epitop aus dem Erreger der Tuberkulose (*M. tuberculosis*) hergestellt, durch HPLC gereinigt und vollständig durch NMR-Spektroskopie sowie Massenspektrometrie charakterisiert werden (Abb. 4.4).

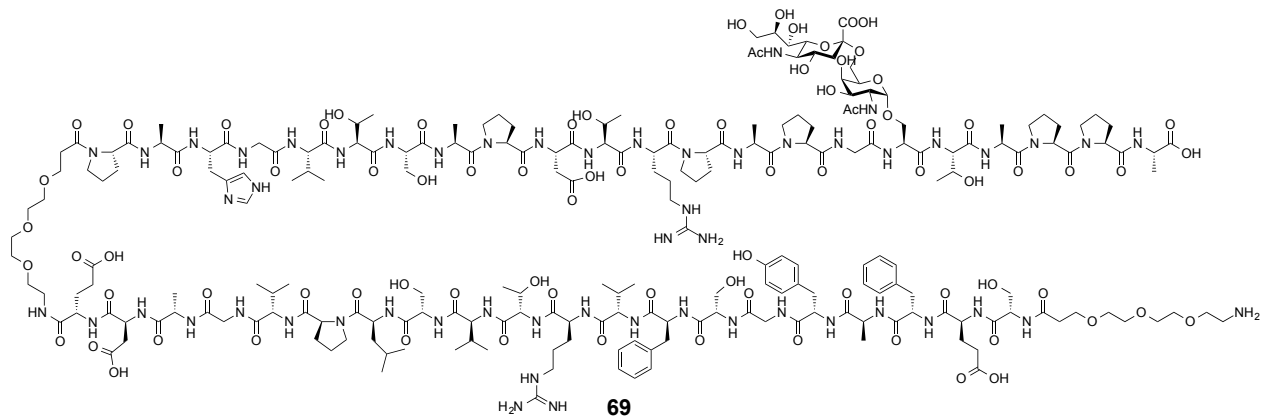


Abb. 4.4: Vollsynthetische Zweikomponenten-Vakzine (bakterielles T-Zell-Epitop-MUC1-B-Zell-Epitop).

Durch Quadratsäurekonjugation über den *N*-terminalen Spacer wurde die Zweikomponentenvakzine an ein bakterielles CpG-DNA-Motiv konjugiert. Dieses bindet und aktiviert den TLR-9 Rezeptor und soll als internes Adjuvans wirken (Abb. 4.5).

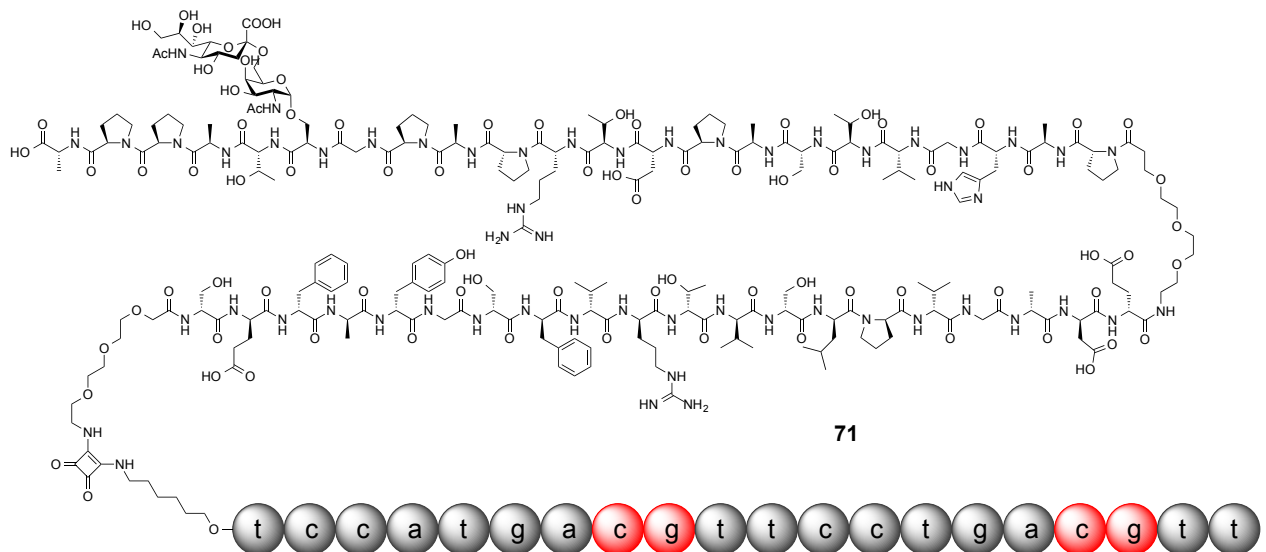
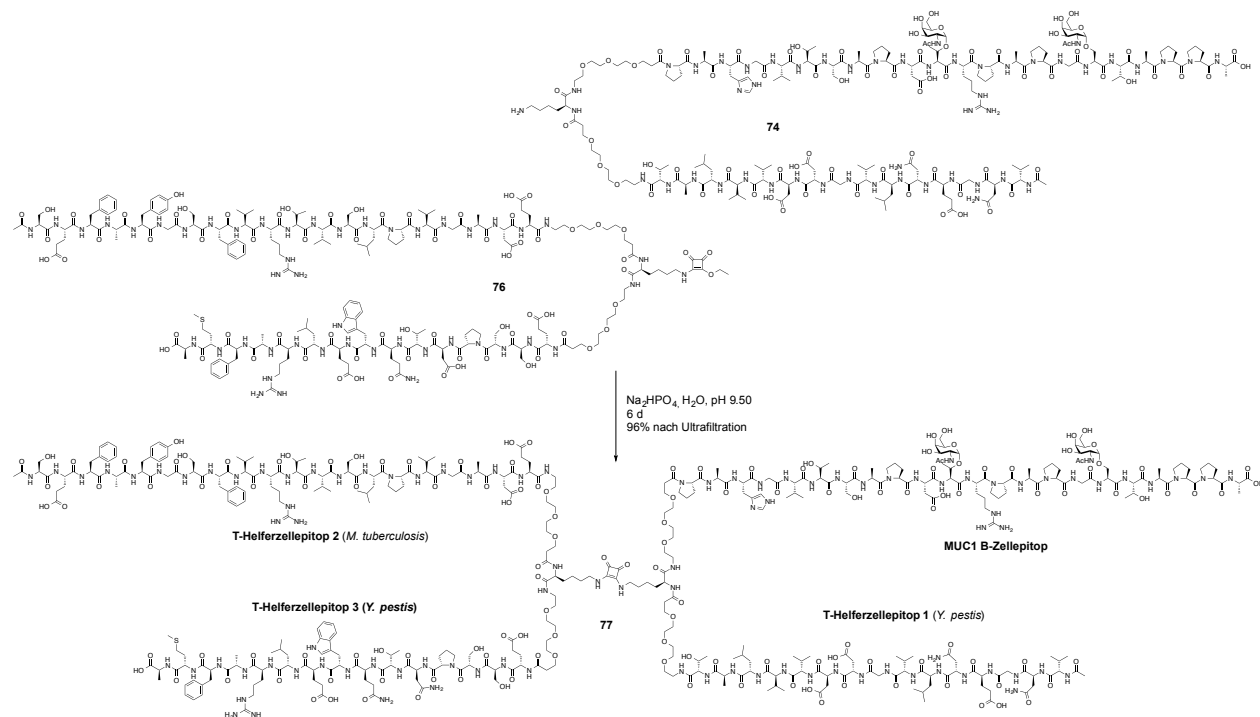


Abb. 4.5: Dreikomponenten-Vakzine mit einem CpG-DNA-Motiv als internem Adjuvans.

Da der TLR-9-Rezeptor intrazellulär lokalisiert ist, werden nur jene B-Zellen aktiviert, die mit ihrem B-Zellrezeptor das MUC1-Antigen bereits spezifisch erkannt und internalisiert haben. In Immunisierungsexperimenten erzeugte diese Dreikomponenten-Vakzine **71** jedoch nur geringfügig bessere Antikörpertiter als die Zweikomponenten-Vakzine **69**.

In einem neuen Konzept für vollsynthetische Vakzine wurde vor allem die Rolle von T-Helferzellen verstärkt (S. 96 ff). Dazu wurde ein MUC1-Glycopeptidantigen als B-Zell-Epitop mit drei verschiedenen bakteriellen T-Helferzell-Epitopen kombiniert. Zur Synthese dieser Vierkomponenten-Vakzine wurden zunächst zwei lineare Peptidkonjugate an der festen Phase aufgebaut. Ein Konjugat enthielt ein MUC1-B-Zell-Epitop und ein bakterielles T-Helferzell-Epitop. Das zweite Konjugat bestand aus zwei bakteriellen T-Helferzell-Epitopen. Die Konjugation der beiden Komponenten gelang durch Kreuzvernetzung von  $\epsilon$ -Aminogruppen der zentralen Lysinreste in den beiden Konjugaten über die Bildung eines Quadratsäureamids. Damit sich die einzelnen Epitope nicht gegenseitig in ihrer Konformation beeinflussen, wurden sie strukturell durch flexible, wasserlösliche Triethylenglycolspacer getrennt (Abb. 4.6).



**Abb. 4.6:** Konjugation zur Vierkomponenten-Vakzine mit einem MUC1-B-Zell-Epitop und drei verschiedenen T-Helferzell-Epitopen.

In Immunisierungsstudien induzierte die 4K-Vakzine **77** ohne Zugabe weiterer Immunstimulanzien etwa achtmal höhere IgG-Antikörpertiter als Vakzine **74**, die nur ein T-Helferzell-Epitop enthält (Abb. 4.7).

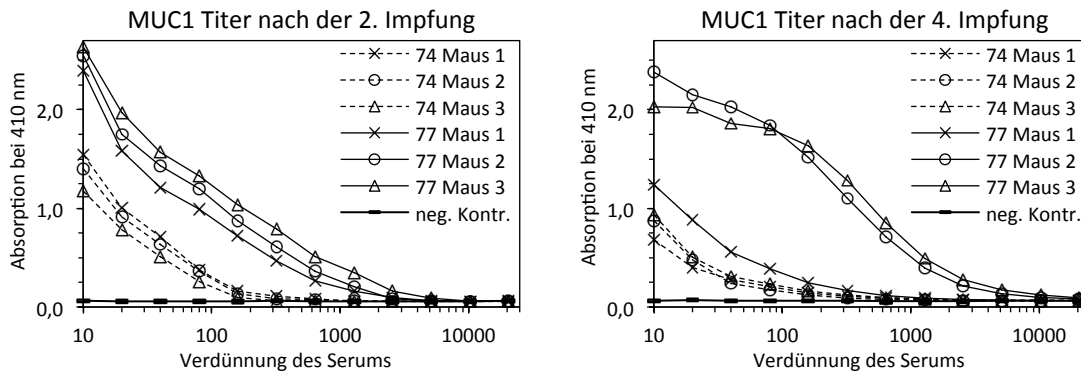


Abb. 4.7: Vakzin-induzierte Antikörpertiter nach der zweiten (links) und nach der vierten Immunisierung (rechts).

Die Ergebnisse zeigen, dass mit gesteigerter T-Helferzellaktivität auch B-Zellen effizienter aktiviert werden, wodurch höhere Antikörpertiter generiert werden. Das flexible Konzept zum Aufbau der 4K-Vakzine erlaubt zahlreiche Modifikationen und könnte für die personalisierte Medizin von Interesse sein, z.B. wenn in Vakzinen verschiedene T-Zell-Epitope benötigt werden, die zum HLA-Typ (Humanes Leukozyten Antigen) der Patienten passen. Durch die Überkreuzanordnung der Epitope sollte auch die metabolische Stabilität der Vakzine erhöht sein.

In einem weiteren Konzept für Antitumor-Vakzine wurde eine Fünfkomponenten-Vakzine synthetisiert (S. 107 ff), die neben tumorspezifischen MUC1-Antikörpern auch MUC1-spezifische cytotoxische T-Zellen induziert. Die Synthese dieser Vakzine erfolgte linear an der festen Phase. Das 36 Aminosäuren lange MUC1-B-Zell-Epitop enthält zugleich zwei cytotoxische T-Zell-Epitope aus der Tandem Repeat-Sequenz des MUC1 (STAPPAHGV und SAPDTRPA). Über eine N-terminale Spaceraminosäure ist das B-Zell-Epitop mit einem weiteren T-Helferzell-Epitop aus TTox (P30<sub>947-967</sub>) verbunden, das sowohl im Menschen, als auch in der Maus wirksam ist. Am N-Terminus der Vakzine befindet sich ein zusätzliches cytotoxisches T-Zell-Epitop aus der N-terminalen Region des membrangebunden MUC1 (LLTLVLTVV<sub>13-21</sub>, Abb. 4.8). Durch Immunisierung mit Vakzine **81** wurden in allen Mäusen robuste Titer von IgG-Antikörpern induziert, die humane Brusttumorzellen mit hoher Affinität markieren.



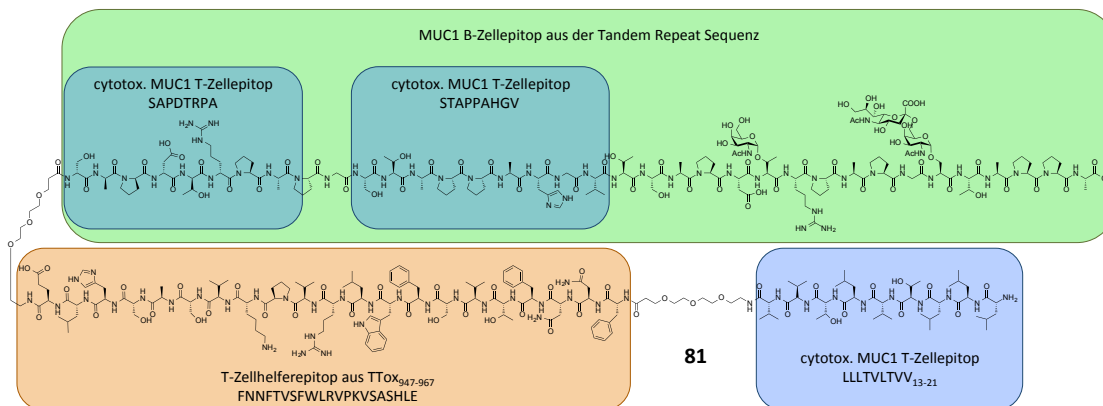


Abb. 4.8: Fünfkomponentenvakzine **81** mit MUC1-B-Zell-Epitop, T-Helferzell-Epitop und drei cytotoxischen T-Zell-Epitopen.

Fünf Tage nach der letzten Immunisierung zeigte eine *ex vivo*-Analyse der Milz und verschiedener Lymphknoten aus den immunisierten Mäusen, dass durch Vakzine **81** verstärkt cytotoxische T-Zellen aktiviert wurden (Abb. 4.9). Eine genauere Analyse der isolierten Zellen ergab, dass neben IFN- $\gamma$  produzierenden Effektor-T-Zellen auch cytotoxische Gedächtnis-T-Zellen induziert wurden. Gerade bei der Behandlung von soliden Tumoren im bereits fortgeschrittenen Stadium dürfte die Aktivierung von cytotoxischen T-Zellen von Vorteil sein, da diese Zellen in besonderem Maße pathogene Gewebe beseitigen können.

Induktion CD8<sup>+</sup> T-Zellen durch Vakzine **80** und **81**

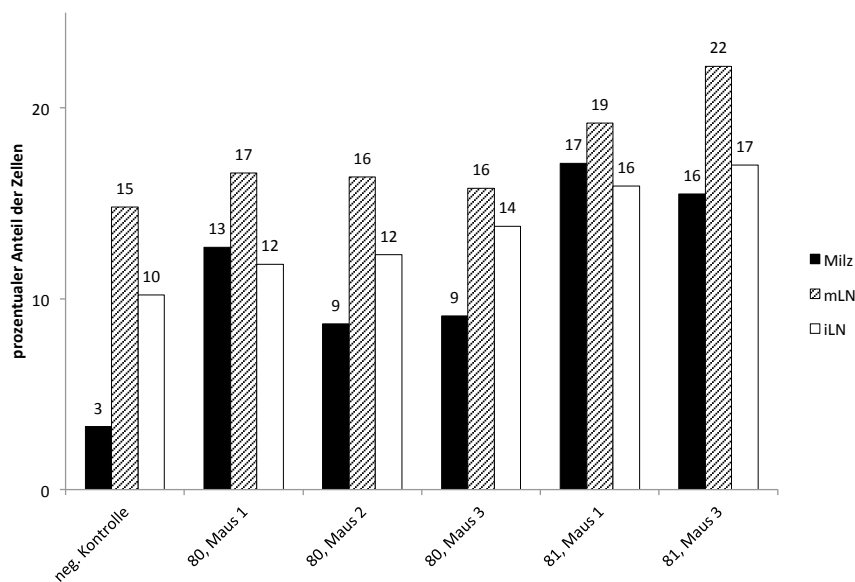


Abb. 4.9: Aktivierung von cytotoxischen T-Zellen (mLN: mesenteriale Lymphknoten, iLN: inguinale Lymphknoten).

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen damit nachdrücklich, dass durch vollsynthetische Glycopeptidantigene, die nach dem Vorbild der tumorassoziierten Struktur des MUC1

hergestellt wurden, Vakzine aufgebaut werden können, die tumorspezifische Immunantworten auslösen. Der nächste Schritt auf dem Weg zur Entwicklung von Antitumorvakzinen ist die Überprüfung der Wirksamkeit dieser Vakzine. Dazu müssen entweder entsprechende Tumormodelle in Versuchstieren entwickelt werden, oder es müssen erste klinische Studien in Patienten erfolgen.



## 5 Experimenteller Teil

### 5.1 Allgemeines und Messgeräte zur organischen Synthese

**Lösungsmittel:** Alle Lösungsmittel wurden in der Qualität *pro analysi* (p.a.) bezogen und vor Gebrauch destilliert. Absolute Lösungsmittel wurden durch Trocknen nach literaturbekannten Verfahren<sup>[188]</sup> 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 fanden 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 mit einer Quarzlampe im Hochvakuum ausgeheizt und unter Argonatmosphäre direkt für die Reaktion bereitgestellt.

**pH-Wert Bestimmung:** Die Bestimmung der pH-Werte erfolgte durch 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: B Acilit<sup>®</sup> (pH-Bereich: 0 - 6), Neutalit<sup>®</sup> (pH-Bereich: 5 - 10), Alkalit<sup>®</sup> (pH-Bereich 7.5 - 14), Universalindikatorpapier (pH-Bereich: 5 - 10).

**Dünnschichtchromatographie:** Für die dünnschichtchromatographischen Analysen an Normal- und Umkehrphase wurden Fertigplatten der Firma *Merck KG*, Darmstadt, beschichtet mit Kieselgel 60 F<sub>254</sub> bzw. Kieselgel 60 RPB18 F<sub>245</sub> 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)sulfattetrahydrat, 2.5 g Molybdätophosphorsäure 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:**<sup>[189]</sup> Für die Flashchromatographie der in Lösung befindlichen Verbindungen unter erhöhtem Druck (0.2 - 0.6 mbar) wurde Kieselgel mit einer Partikelgröße von 0.035-0.070  $\mu\text{m}$  der Firma *Acros Organics*, Nidderau, eingesetzt. Das Laufmittel wurde in der Regel durch Redestillation der Eluate anderer Chromatographien oder durch Destillation von technischen Lösungsmitteln gewonnen. Durch Zusatz der polaren oder unpolaren Komponente wurde das Lösungsmittelgemisch so eingestellt, dass die zu isolierende Substanz einen  $R_f$ -Wert von 0.05-0.20 aufwies.

**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  $\mu\text{m}$ , 250  $\times$  4.6 mm), *Phenomenex*, Torrance, USA.

- Jupiter C18 (5  $\mu\text{m}$ , 250 x 4.6 mm), *Phenomenex*, Torrance, USA.
- Luna PFP (5  $\mu\text{m}$ , 250 x 4.6 mm), *Phenomenex*, Torrance, USA.

Semipräparative RP-HPLC wurde teilweise mit Hilfe zweier *Jasco*-Gradientenpumpen (PU-2087Plus) und einem variablen *Jasco* Wellenlängendetektor durchgeführt. Dabei 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  $\mu\text{m}$ , 250 x 30 mm), *Phenomenex*, Torrance, USA.
- Jupiter C18 (300A, 10  $\mu\text{m}$ , 250 x 30 mm), *Phenomenex*, Torrance, USA.

Alternativ fanden semipräparative RP-HPLC Trennungen auch auf einem HPLC-System der Firma *Knauer*, Berlin, statt. 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  $\mu\text{m}$ , 250 x 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.

**Ultrafiltration:** Es kam eine *Stirred Ultrafiltration Cell* der Firma *Millipore*, Bedford, USA zum Einsatz. Die Filtrationen wurden mit einer Membran aus Polyethersulfonen mit einer Ausschlussgrenze von 30 kDa bzw. 3 kDa durchgeführt.

**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) extrapo-

liert. Gemessen wurde bei den Wellenlängen  $\lambda = 546$  nm und  $\lambda = 578$  nm. Lösungsmittel, Temperatur und Konzentration (g/100 mL), sind für die 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  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{14}\text{N}$ ,  $^{16}\text{O}$  und  $^{32}\text{S}$ .

- 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 gelöst in Acetonitril/Methanol/Wasser evtl. unter Zusatz von 0.1% TFA angesetzt. 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 (dihb, 17 mg/mL in  $\text{H}_2\text{O}$ /Acetonitril 1:1, + 0.1% TFA), bzw. Sinapinsäure (10 mg/mL in  $\text{H}_2\text{O}$ /Acetonitril 1:1, + 0.1% TFA).

**Kernresonanzspektroskopie:** Die  $^1\text{H}$ - und  $^{13}\text{C}$ -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  $^1\text{H}$ - und  $^{13}\text{C}$ -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 *PerkinQElmer* 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 zum 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 detektiert man bei einer Wellenlänge von  $\lambda = 301$  nm die UV-Absorption des bei der Fmoc-Abspaltung entstehenden Dibenzofulvenpiperidin-Addukts und beschreibt somit die Qualität der vorangegangenen Kupplung. 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 Peptide-grade 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.

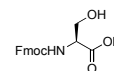
**Tetanus Toxoid:** (TTox) wurde von der Firma *CLS Behring*, Marburg, bezogen und in Natriumchlorid-Puffer (17 mg Tetanus Toxoid pro mL) ohne weitere Reinigung eingesetzt.



## 5.2 Synthese der tumorassoziierten Kohlenhydratantigene

### 5.2.1 Synthese des T<sub>N</sub>-Serin-Antigens

#### 5.2.1.1 *N*-(9*H*-Fluoren-9-yl)-methoxycarbonyl-L-serin (**2**)<sup>[190]</sup>



(Fmoc-Ser-OH)

Eine Lösung von 5.20 g (50.0 mmol) L-Serin und 6.96 ml (50 mmol) Triethylamin werden in 100 ml Wasser gelöst. Unter Rühren wird mit einer Lösung von 16.86 g (50 mmol) *N*-(9*H*-Fluoren-9-yl)-methoxycarbonyloxy-succinimid in 100 ml Acetonitril versetzt. Innerhalb von 15 Minuten werden weitere 6.96 ml (50 mmol) Triethylamin hinzu gegeben. Nach 30 Minuten Rühren bei Raumtemperatur wird im Vakuum eingeeengt und der Rückstand in 200 ml 1*N* Salzsäure gegossen. Der Niederschlag wird abfiltriert und in Dichlormethan aufgenommen. Die Lösung wird über Magnesiumsulfat getrocknet und im Vakuum eingeeengt. Durch Zugabe von Petrolether wird ein farbloser Feststoff ausgefällt. Der erhaltene Feststoff wird ohne weitere Reinigung umgesetzt.

*Ausbeute:* 11.30 g (34.5 mmol, 69%) farbloser, amorpher Feststoff.

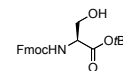
*R<sub>f</sub>* = 0.51 (EtOAc/AcOH, 10:1).

C<sub>18</sub>H<sub>17</sub>NO<sub>5</sub> (M = 327.33 g/mol) [327.11].

<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>), δ (ppm) = 7.69 (d, 2H, *J*<sub>H4,H3</sub> = *J*<sub>H5,H6</sub> = 7.7 Hz, 4-H-, 5-H-Fmoc), 7.57-7.54 (m, 2H, 1-H-, 8-H-Fmoc), 7.33 (t, 2H, *J*<sub>H3,H2/H4</sub> = *J*<sub>H6,H5/H7</sub> = 7.3 Hz, 3-H-, 6-H-Fmoc), 7.23 (t, 2H, *J*<sub>H2,H1/H3</sub> = *J*<sub>H7,H6/H8</sub> = 9.0 Hz, 2-H-, 7-H-Fmoc), 6.21 (d, 1H, *J*<sub>NH/Sα</sub> = 9.0 Hz, NH), 4.39 – 4.37 (m, 1H, S<sup>α</sup>), 4.31 (d, 2H, *J*<sub>Sβ/Sα</sub> = 7.1 Hz, S<sup>β</sup>), 4.14 (t, 1H, *J* = 6.9 Hz), 4.16 – 4.04 (t, 2H, *J*<sub>CH,CH2</sub> = 6.0 Hz, CH<sub>2</sub> (Fmoc)).

Weitere analytische Daten finden sich in der Literatur.<sup>[191]</sup>

### 5.2.1.2 *N*-(9*H*-Fluoren-9-yl)-methoxycarbonyl-*L*-*Tert*-butylester (**3**)<sup>[192]</sup>



(Fmoc-Ser-OtBu)

Eine Suspension aus 50.36 g (78.1 mmol) *N,N'*-Dicyclohexylcarbodiimid und 26.04 g (0.18 mmol) *tert*-Butanol sowie 1.60 g (0.02 mmol) wasserfreiem Kupfer-(I)-chlorid wird unter Argonatmosphäre und Lichtausschluss 5 Tage gerührt. Die grüne Reaktionsmischung wird mit 20 ml absolutem Dichlormethan verdünnt. Danach wird eine Lösung von 25.58 g (78.1 mmol) Fmoc-Ser-OH **2** in 50 ml absolutem Dichlormethan in einem Zeitraum von einer Stunde zugetropft. Es wird 1.5 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Die hellgrüne Suspension wird über einem Büchnertrichter filtriert, wonach der Filterkuchen mehrmals mit eiskaltem Dichlormethan gewaschen wird. Das Filtrat wird im Vakuum eingeeengt, wobei weiterer Dicyclohexylharnstoff ausfällt und durch erneute Filtration abgetrennt werden kann. Die Lösung wird dreimal mit 100 ml gesättigter Natriumhydrogencarbonat-Lösung und zweimal mit 100 ml gesättigter Natriumchlorid-Lösung gewaschen. Die organische Phase wird über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel anschließend im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wird durch Flashchromatographie an Kieselgel (Laufmittel: PE/EtOAc, 2:1) gereinigt.

*Ausbeute*: 9.16 g (23.9 mmol, 70%) farbloser, amorpher Feststoff.

$R_f = 0.28$  (PE/EtOAc, 2:1).

$C_{22}H_{25}NO_5$  ( $M = 383.44$  g/mol) [383.17].

*Drehwert*:  $[\alpha]_D^{27} = 12.6$  ( $c = 0.2$ ,  $CHCl_3$ ).

*ESI-MS* (positiv),  $m/z$ : 406.21 ( $[M+Na]^+$ , ber. 406.16).

$^1H$ -NMR (300 MHz,  $CDCl_3$ ),  $\delta$  (ppm) = 7.77 (d, 2H,  $J_{H4,H3} = J_{H5,H6} = 7.8$  Hz, 4-H-, 5-H-Fmoc), 7.61 (d, 2H,  $J_{H1,H2} = J_{H8,H9} = 7.6$  Hz, 1-H-, 8-H-Fmoc), 7.41 (t, 2H,  $J_{H3,H2/H4} = J_{H6,H5/H7} = 7.4$  Hz, 3-H-, 6-H-Fmoc), 7.23 (t, 2H,  $J_{H2,H1/H3} = J_{H7,H6/H8} = 7.4$  Hz, 2-H-, 7-H-Fmoc), 5.72 (d, 1H,  $J_{NH/S\alpha} = 6.7$  Hz, NH), 4.42 (d, 2H,  $J_{CH2/H9} = 6.9$  Hz,  $CH_2$ -Fmoc), 4.34 – 4.32 (m, 2H,  $S^\alpha$ , 9-H-Fmoc), 4.23 (t, 1H,  $J_{S\beta/S\alpha} = 6.9$

Hz, S<sup>β</sup>), 1.49 (s, 9H, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>).

### 5.2.1.3 2,3,4,6-Tetra-*O*-acetyl- $\alpha$ -D-galactopyranosylbromid (6)<sup>[193]</sup>



( $\alpha$ Ac<sub>4</sub>GalBr)

Zu einer Lösung aus 210 ml Essigsäureanhydrid und 1.25 ml Perchlorsäure werden 50 g D-Galactose so zugegeben, dass die Temperatur nicht über 40 °C steigt. Nach beendeter Zugabe wird weitere 60 Minuten bei Raumtemperatur gerührt. Im Anschluss werden 230 ml 33%ige Bromwasserstoffsäure in Eisessig zugegeben, und es wird weitere zwei Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktionslösung wird mit Dichlormethan verdünnt und auf Eiswasser gegossen. Die wässrige Phase wird mit Dichlormethan extrahiert. Anschließend werden die vereinigten organischen Extrakte mit gesättigter Natriumhydrogencarbonat-Lösung neutral gewaschen. Die organische Phase wird über Magnesiumsulfat getrocknet. Anschließend wird das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wird ohne weitere Reinigung umgesetzt.

*Ausbeute:* 101.05 g (245.7 mmol, 88%) gelbes Öl.

*R<sub>f</sub>* = 0.67 (Hex/EtOAc, 1:1).

C<sub>14</sub>H<sub>19</sub>BrO<sub>9</sub> (M = 411.20 g/mol) [410.02].

*ESI-MS* (positiv), m/z: 371.08 ([M-Br+K]<sup>+</sup>, ber. 371.07).

<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>),  $\delta$  (ppm) = 6.68 (d, 1H,  $J_{H1,H2}$  = 3.9 Hz, 1-H), 5.50 (d, 1H,  $J_{H4,H3}$  = 2.0 Hz, 4-H), 5.38 (dd, 1H,  $J_{H3,H4}$  = 3.2 Hz,  $J_{H3,H2}$  = 7.4 Hz, 3-H), 5.02 (dd, 1H,  $J_{H2,H1}$  = 3.9 Hz,  $J_{H2,H3}$  = 10.6 Hz, 2-H), 4.46 (t, 1H,  $J_{H5,H6a/b}$  = 6.5 Hz, 5-H), 4.17 – 4.09 (m, 2H, 6<sub>a,b</sub>-H), 2.13, 2.09, 2.04, 1.99 (4 x s, 12H, 4 x CH<sub>3</sub> (Ac)).

### 5.2.1.4 3,4,6-Tri-O-acetylgalactal (**7**)<sup>[194]</sup>



Eine auf  $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$  gekühlte Lösung aus 350 ml Essigsäure und 470 ml Wasser wird mit 130 g Zinkpulver und Kupersulfat-Lösung (13.0 g in 65 ml Wasser) versetzt. Nach dem Einsetzen der Wasserstoffentwicklung (Blasenbildung) werden in einem Zeitraum von 60 Minuten unter Eiskühlung 101.95 g (245.7 mol) 2,3,4,6-Tetra-O-acetyl- $\alpha$ -D-galactosyl-bromid **6**, gelöst in 130 ml Dichlormethan zugegeben. Die Suspension wird anschließend innerhalb von 90 Minuten auf  $5\text{ }^{\circ}\text{C}$  erwärmt. Im Anschluss wird im Büchnertrichter über *Hyflo*<sup>®</sup> filtriert. Der Filterkuchen wird mit 150 ml Essigsäure/Wasser (1:1) gewaschen. Nach der Phasentrennung wird die wässrige Phase dreimal mit 200 ml Dichlormethan extrahiert. Die vereinigten organischen Extrakte werden erst mit 250 ml Eiswasser und anschließend zweimal mit 200 ml kalter Natriumhydrogencarbonat-Lösung gewaschen. Anschließend wird über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das erhaltene gelbe Öl wird flashchromatographisch an Kieselgel (cHex/EtOAc, 2:1) gereinigt

*Ausbeute:* 39.26 g (144.21 mmol, 59%) zähes, farbloses Öl.

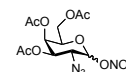
$R_f = 0.32$  (cHex/EtOAc, 2:1).

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

*ESI-MS* (positiv), m/z: 295.05 ( $[\text{M}+\text{Na}]^+$ , ber. 295.08).

$^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ),  $\delta$  (ppm) = 6.44 (dd, 1H,  $J_{\text{H}1,\text{H}2} = 6.3\text{ Hz}$ ,  $J_{\text{H}1,\text{H}3} = 1.6\text{ Hz}$ , 1-H), 5.54 -5.52 (m, 1H, 3-H), 5.41 - 5.40 (m, 1H, 3-H), 4.72 - 4.69 (m, 1H, 2-H), 4.32 - 4.28 (m, 1H, 5-H), 4.24 - 4.16 (m, 2H,  $6_{\text{a,b}}$ -H), 2.11, 2.06, 2.01, (3 x s, 9H, 3 x  $\text{CH}_3$  (Ac)).

### 5.2.1.5 3,4,6-Tri-O-acetyl-2-azido-2-desoxy- $\alpha/\beta$ -D-galactopyranosylnitrat (**8**)<sup>[43]</sup>



( $\alpha/\beta$ Ac<sub>3</sub>GalN<sub>3</sub>-ONO<sub>2</sub>)

Eine Lösung von 19.00 g (69.00 mmol) 3,4,6-Tri-O-acetylgalactal **7** in 350 ml absol. Acetonitril wird bei -25 °C unter Argon mit 111.80 g (204.00 mmol) trockenem Cer(IV)-ammoniumnitrat sowie 6.75 g (103.00 mmol) trockenem Natriumazid versetzt. Die Suspension wird 17 Stunden bei -18 °C gerührt. Anschließend wird die intensiv gelbe Suspension mit 350 ml Diethylether verdünnt und auf 350 ml Eiswasser gegossen. Die organische Phase wird dreimal mit 250 ml Wasser gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet und im Vakuum vom Lösungsmittel befreit. Das Rohprodukt wird durch Flashchromatographie an Kieselgel (Laufmittel: <sup>c</sup>Hex/EtOAc, 4:1) gereinigt.

*Ausbeute:* 10.94 g (29.10 mmol, 42%) farbloser amorpher Feststoff.

*R<sub>f</sub>* = 0.16 (<sup>c</sup>Hex/EtOAc, 4:1).

C<sub>12</sub>H<sub>16</sub>N<sub>4</sub>O<sub>10</sub> (M = 376.28 g/mol) [376.09].

*ESI-MS* (positiv), m/z: 395.19 ([M+N<sub>2</sub>+Na]<sup>+</sup>, ber. 395.07).

<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>), δ (ppm) = 6.33 (d, 1H, *J*<sub>H1 $\alpha$ ,H2 $\alpha$</sub>  = 4.1 Hz, 1 $\alpha$ -H), 5.58 (d, 1H, *J*<sub>H1 $\beta$ ,H2 $\beta$</sub>  = 8.8 Hz, 1 $\beta$ -H), 5.55 (d, 1H, *J*<sub>H4 $\alpha$ ,H3 $\alpha$</sub>  = 3.1 Hz, 4 $\alpha$ -H), 5.39 (d, 1H, *J*<sub>H4 $\beta$ ,H3 $\beta$</sub>  = 3.3 Hz, 4 $\beta$ -H), 5.25 (dd, 1H, *J*<sub>H3 $\alpha$ ,H4 $\alpha$</sub>  = 3.2 Hz, *J*<sub>H3 $\alpha$ ,H2 $\alpha$</sub>  = 11.4 Hz, 4 $\alpha$ -H), 4.96 (dd, 1H, *J*<sub>H3 $\beta$ ,H4 $\beta$</sub>  = 3.3 Hz, *J*<sub>H3 $\beta$ ,H2 $\beta$</sub>  = 10.6 Hz, 4 $\beta$ -H), 4.19-4.02 (m, 6H, 2 $\alpha$ -H, 5 $\beta$ -H, 6<sub>a,b</sub>-H), 3.83 (dd, 1H, *J*<sub>H2 $\beta$ ,H1 $\beta$</sub>  = 8.8 Hz, *J*<sub>H2 $\beta$ ,H3 $\beta$</sub>  = 10.7 Hz 2 $\beta$ -H), 2.17, 2.07, 2.03, (3 x s, 9H, 3 x CH<sub>3</sub> (Ac)).

### 5.2.1.6 3,4,6-Tri-*O*-acetyl-2-azido-2-desoxy- $\alpha$ -D-galactopyranosylbromid (**9**)<sup>[43]</sup>



( $\alpha$ Ac<sub>3</sub>GalN<sub>3</sub>-Br)

Unter starkem Rühren werden 12.75 g (146.8 mmol) trockenes Lithiumbromid in 200 ml absolutem Acetonitril gegeben. Die Suspension wird anschließend tropfenweise mit einer Lösung von 10.55 g (28.04 mmol) ( $\alpha/\beta$ Ac<sub>3</sub>GalN<sub>3</sub>-ONO<sub>2</sub>) **8** in 80 ml absolutem Acetonitril versetzt und 2 h bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wird mit 130 ml Dichlormethan verdünnt und zweimal mit je 120 ml gesättigter Natriumchlorid-Lösung extrahiert. Die organische Phase wird über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel anschließend im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wird durch Flashchromatographie an Kieselgel (Laufmittel: <sup>c</sup>Hex/EtOAc, 1:1) gereinigt.

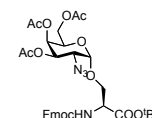
*Ausbeute:* 10.55 g (28.04 mmol, 87%) hellgelber Feststoff.

*R<sub>f</sub>* = 0.65 (<sup>c</sup>Hex/EtOAc, 1:1).

C<sub>12</sub>H<sub>16</sub>BrN<sub>3</sub>O<sub>7</sub> (M = 394.18 g/mol) [393.02].

<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>),  $\delta$  (ppm) = 6.47 (d, 1H,  $J_{H1,H\alpha}$  = 3.9 Hz, 1-H), 5.51 – 5.50 (m, 1H, 4-H), 5.35 (dd, 1H,  $J_{H3,H4}$  = 3.3 Hz,  $J_{H3,H2}$  = 10.9 Hz, 3-H), 4.50 – 4.46 (m, 1H, 5-H), 4.20-4.07 (m, 2H, 6<sub>a,b</sub>-H), 3.99 (dd, 2H,  $J_{H2,H1}$  = 3.7 Hz,  $J_{H2,H3}$  = 10.8 Hz, 2-H), 2.16, 2.06, 2.05, (3 x s, 9H, 3 x CH<sub>3</sub> (Ac)).

### 5.2.1.7 *N*-(9*H*-Fluoren-9-yl)-methoxycarbonyl-*O*-(3,4,6-tri-*O*-acetyl-2-azido-2-desoxy- $\alpha$ -D-galactopyranosyl)-L-serin-*tert*-butylester **10**<sup>[53]</sup>



(Fmoc-Ser( $\alpha$ Ac<sub>3</sub>GalN<sub>3</sub>)-OtBu)

Eine Lösung von 7.82 g (20.4 mmol) Fmoc-Ser-OtBu **3** in 70 ml absolutem Dichlormethan und 60 ml absolutem Toluol wird mit 20 g aktiviertem gepulvertem Molsieb (4 Å) eine Stunde unter Argonatmosphäre bei Raumtemperatur gerührt. Unter Eiskühlung und Lichtausschluss wird

die Suspension im Argongegenstrom mit 7.82 g (28.5 mmol) festem Silbercarbonat versetzt. Über ein Septum werden 1.10 g (4.89 mmol) trockenes Silberperchlorat (dreimal mit absolutem Toluol kodestilliert), gelöst in 30 ml absolutem Toluol, zugegeben, und die Mischung wird weitere 30 Minuten unter Eiskühlung gerührt. In einem Zeitraum von 30 Minuten wird eine Lösung aus 9.60 g (24.3 mmol)  $\alpha\text{Ac}_3\text{GalN}_3\text{-Br}$  **9** in einem Gemisch aus 150 ml absolutem Dichlormethan und absolutem Toluol (1:1) zugetropft. Nach der Zugabe wird das Eisbad entfernt und der Reaktionsansatz über Nacht unter Argonatmosphäre bei Raumtemperatur gerührt. Die gelbe Lösung wird mit 150 ml Dichlormethan verdünnt und über einen Büchnertrichter über *Hyflo*<sup>®</sup> filtriert. Anschließend wird das Filtrat zweimal mit 150 ml gesättigter Natriumhydrogencarbonat-Lösung und zweimal mit gesättigter Natriumchlorid-Lösung gewaschen. Die organische Phase wird über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wird durch Flashchromatographie an Kieselgel (Laufmittel:  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{EtOAc}$ , 10:1) gereinigt.

*Ausbeute:* 9.46 g (13.58 mmol, 67%) farbloser amorpher Feststoff.

$R_f = 0.72$  ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{EtOAc}$ , 10:1).

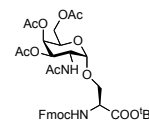
$\text{C}_{34}\text{H}_{40}\text{N}_4\text{O}_{12}$  (M = 696.70 g/mol) [696.26].

*ESI-MS* (positiv), m/z: 719.27 ( $[\text{M}+\text{Na}]^+$ , ber. 719.25), 1415.56 ( $[2 \times \text{M}+\text{Na}]^+$ , ber. 1415.51).

$^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ),  $\delta$  (ppm) = 7.77 (d, 2H,  $J_{\text{H}_4,\text{H}_3} = J_{\text{H}_5,\text{H}_6} = 7.5$  Hz, 4-H-, 5-H-Fmoc), 7.62 (m, 2H, 1-H-, 8-H-Fmoc), 7.40 (t, 2H,  $J_{\text{H}_3,\text{H}_2/\text{H}_4} = J_{\text{H}_6,\text{H}_5/\text{H}_7} = 7.3$  Hz, 3-H-, 6-H-Fmoc), 7.35 – 7.28 (m, 2H, 2-H-, 7-H-Fmoc), 5.87 (d, 1H,  $J_{\text{NH},\text{S}\alpha} = 7.9$  Hz, NH (Fmoc)), 5.43 (d, 1H,  $J_{\text{H}_4,\text{H}_3} = 2.4$  Hz, 4-H), 5.28 (dd, 1H,  $J_{\text{H}_3,\text{H}_4} = 3.3$  Hz,  $J_{\text{H}_3,\text{H}_2} = 11.2$  Hz, 3-H), 4.93 (d, 1H,  $J_{\text{H}_1,\text{H}_2} = 3.4$  Hz, 1-H), 4.44 – 4.36 (m, 3H, 5-H, 6<sub>a,b</sub>-H), 4.25-4.16 (m, 2H, 9-H-Fmoc, S <sub>$\alpha$</sub> ), 4.11 – 3.93 (m, 4H, CH<sub>2</sub>-Fmoc, S <sub>$\beta$</sub> ), 2.64 (d, 1H,  $J_{\text{H}_2,\text{H}_1} = 3.5$  Hz,  $J_{\text{H}_2,\text{H}_3} = 11.2$  Hz, 2-H), 2.13, 2.04, 1.96, (3 x s, 9H, 3 x CH<sub>3</sub> (Ac)), 1.49 (s, 9H, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>).

**5.2.1.8 N-(9H-Fluoren-9-yl)-methoxycarbonyl-O-(2-acetamido-3,4,6-tri-O-acetyl-2-acetamido-2-deoxy- $\alpha$ -D-galactopyranosyl)-L-serin-tert-butylester **11****<sup>[47]</sup>

(Fmoc-Ser( $\alpha$ Ac<sub>3</sub>GalNAc)-OtBu)



In einer Lösung von 180 ml Tetrahydrofuran, Acetanhydrid und Essigsäure (3:2:1) werden 4.73 g (6.79 mmol) Fmoc-Ser( $\alpha$ Ac<sub>3</sub>GalN<sub>3</sub>)-OtBu **10** gelöst. Die Lösung wird mit 6.90 g (120.00 mmol) aktiviertem Zinkstaub (Zinkstaub in 200 ml einer 0.2%igen Kupfersulfat-Lösung aufgeschlämmt und anschließend mit Ether mehrmals gewaschen) versetzt. Es wird über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wird der Reaktionsansatz mit 300 ml Tetrahydrofuran verdünnt und über *Hyflo*<sup>®</sup> filtriert. Das Filtrat wird im Vakuum vom Lösungsmittel befreit und nachfolgend fünfmal mit Toluol und zweimal mit Dichlormethan kodestilliert. Das Rohprodukt wird zweimal mit 150 ml gesättigter Natriumhydrogencarbonat-Lösung und dreimal mit 100 ml gesättigter Natriumchlorid-Lösung gewaschen. Die organische Phase wird über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wird durch Flashchromatographie an Kieselgel (Laufmittel: EtOAc/<sup>c</sup>Hex, 2:1) gereinigt.

*Ausbeute:* 3.22 g (4.62 mmol, 67%) farbloser, amorpher Feststoff.

*R<sub>f</sub>* = 0.18 (EtOAc/<sup>c</sup>Hex, 2:1).

C<sub>36</sub>H<sub>44</sub>N<sub>2</sub>O<sub>13</sub> (M = 712.74 g/mol) [712.28].

*Drehwert:*  $[\alpha]_D^{25} = 65.3$  (c = 1.0, CHCl<sub>3</sub>),  $[\alpha]_D^{20} = 59.5$  (c = 1.0, CHCl<sub>3</sub>).<sup>[195]</sup>

*ESI-MS* (positiv), m/z: 713.29 ([M+H]<sup>+</sup>, ber. 713.29), 735.27 ([M+Na]<sup>+</sup>, ber. 735.27), 751.24 ([M+K]<sup>+</sup>, ber. 751.24).

*HR-ESI-MS* (positiv), m/z: 735,2304 ([M+K]<sup>+</sup>, ber. 735.2304).

<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>, COSY, HSQC),  $\delta$  (ppm) = 7.76 (d, 2H,  $J_{H4,H3} = J_{H5,H6} = 7.4$  Hz, 4-H-, 5-H-Fmoc), 7.61 (d, 2H,  $J_{H1,H2} = J_{H8,H7} = 7.2$  Hz, 1-H-, 8-H-Fmoc), 7.39 (t, 2H,  $J_{H3,H2/H4} = J_{H6,H5/H7} = 7.4$  Hz, 3-H-, 6-H-Fmoc), 7.31 (t, 2H,  $J_{H2,H1/H3} = J_{H7,H6/H8} = 7.4$  Hz, 2-H-, 7-H-Fmoc), 5.82 (d, 1H,  $J_{NH,S\alpha} = 8.1$  Hz, NH(Fmoc)), 5.78 (d, 1H,  $J_{NH,H2} = 9.6$  Hz, NH-GalNAc), 5.37 (d, 1H,  $J_{H4,H3} = 2.9$  Hz, 4-H), 5.11 (dd, 1H,  $J_{H3,H4} = 3.1$  Hz,  $J_{H3,H2} = 11.3$  Hz, 3-H), 4.84 (d, 1H,  $J_{H1,H2} = 2.9$  Hz, 1-H), 4.59 (td, 1H,  $J_{H2,H1} =$

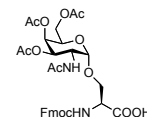


$J_{H2,HN-NAC} = 3.5$  Hz,  $J_{H2,H3} = 10.5$  Hz, 2-H), 4.44 (m, 1H,  $S_\alpha$ ), 4.41 (d, 2H,  $J_{CH2-Fmoc,9-H-Fmoc} = 7.1$  Hz,  $CH_2-Fmoc$ ), 4.23 (t, 1H,  $J_{9-H-Fmoc,CH2-Fmoc} = 7$  Hz, 9-H-Fmoc), 4.14 – 4.00 (m, 3H, 5-H,  $6_{a,b}$ -H), 3.90 (dd, 2H,  $J_{S\beta a,S\alpha} = 2.6$  Hz,  $J_{S\beta b,S\alpha} = 10.5$  Hz,  $S_\beta$ ), 2.64 (dd, 1H,  $J_{H2,H1} = 3.5$  Hz,  $J_{H2,H3} = 11.2$  Hz, 2-H), 2.15, 1.99, 1.98, 1.92 (4 x s, 12H, 4 x  $CH_3$  (Ac)), 1.48 (s, 9H,  $C(CH_3)_3$ ).

$^{13}C-NMR$  (100.7 MHz,  $CDCl_3$ , HSQC),  $\delta$  (ppm) = 170.88 (-COOtBu), 170.39, 170.27, 170.05, 168.93 (C=O-Acetyl), 155.81 (C=O-Urethan), 143.73, 143.69, 141.27 (C1a-, C8a-, C4a-, C5a-Fmoc), 127.78 (C2-, C7-Fmoc), 127.09 (C3-, C6-Fmoc), 125.01 (C1-, C8-Fmoc), 120.03 (C4-, C5-Fmoc), 98.79 (C1), 83.06 (-C( $CH_3$ ) $_3$ ), 69.31 ( $S_\beta$ ), 68.39 (C3), 67.24 ( $S_\alpha$ ), 61.92 (C6), 54.78 (C4). 47.50 ( $CH_2-Fmoc$ ), 47.06 (C9-Fmoc), 28.00 (C( $CH_3$ )), 23.21 (-NH-CO- $CH_3$ ), 20.75, 20.73, 20.62 (-CO- $CH_3$ ).

### 5.2.1.9 *N*-(9*H*-Fluoren-9-yl)-methoxycarbonyl-*O*-(2-acetamido-3,4,6-tri-*O*-acetyl-2-azido-2-desoxy- $\alpha$ -D-galactopyranosyl)-L-serin **12**<sup>[48]</sup>

(Fmoc-Ser( $\alpha$ Ac $_3$ GalNAc)-COOH)



Es werden 1.07 g (1.50 mmol) Fmoc-Ser( $\alpha$ Ac $_3$ GalN $_3$ )-OtBu **11** in 5 ml Dichlormethan gelöst und mit 5 ml Trifluoressigsäure sowie 0.8 ml bidestiliertem Wasser versetzt. Es wird 5 Stunden unter Argonatmosphäre bei Raumtemperatur gerührt und im Anschluss mit 30 ml Toluol verdünnt. Das Lösungsmittel wird im Vakuum entfernt und dreimal mit jeweils 15 ml Toluol kodestilliert. Das Rohprodukt wird anschließend durch Flashchromatographie an Kieselgel (Laufmittel:  $CH_2Cl_2/MeOH/AcOH$ , 94:5:1) gereinigt.

*Ausbeute*: 1.00 g (1.50 mmol, quantitativ) farbloser, amorpher Feststoff.

$R_f = 0.12$  ( $CH_2Cl_2/MeOH/AcOH$ , 94:5:1).

$C_{32}H_{36}N_2O_{13}$  (M = 712.74 g/mol) [712.28].

*Drehwert*:  $[\alpha]_D^{25} = +95.4$  (c = 1.00,  $CHCl_3$ ), Lit.:  $[\alpha]_D^{20} = +89.9$  (c = 1.0,  $CHCl_3$ ).<sup>[195]</sup>

ESI-MS (positiv), m/z: 679.21 ( $[M+Na]^+$ , ber. 679.21), 695.19 ( $[M+K]^+$ , ber. 695.18).

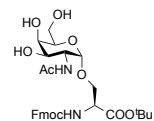
HR-ESI-MS (positiv), m/z: 679.2098 ( $[M+Na]^+$ , ber. 679.2115).

$^1H$ -NMR (300 MHz,  $CDCl_3$ ),  $\delta$  (ppm) = 7.75 (d, 2H,  $J_{H4,H3} = J_{H5,H6} = 7.5$  Hz, 4-H-, 5-H-Fmoc), 7.59 (d, 2H,  $J_{H1,H2} = J_{H8,H7} = 7.5$  Hz, 1-H-, 8-H-Fmoc), 7.38 (t, 2H,  $J_{H3,H2/H4} = J_{H6,H5/H7} = 7.5$  Hz, 3-H-, 6-H-Fmoc), 7.29 (t, 2H,  $J_{H2,H1/H3} = J_{H7,H6/H8} = 7.9$  Hz, 2-H-, 7-H-Fmoc), 6.26 (d, 1H,  $J_{NH,S\alpha} = 8.1$  Hz, NH(Fmoc)), 6.22 (d, 1H,  $J_{NH,H2} = 9.5$  Hz, NH-GalNAc), 5.36 (m, 1H, 4-H), 5.19 (dd, 1H,  $J_{H3,H4} = 2.9$  Hz,  $J_{H3,H2} = 11.3$  Hz, 3-H), 4.97 (d, 1H,  $J_{H1,H2} = 3.5$  Hz, 1-H), 4.64 (d, 2H,  $J_{CH2-Fmoc,9-H-Fmoc} = 8.1$  Hz,  $CH_2$ -Fmoc), 4.55 – 4.33 (m, 2H, 2-H,  $S_\alpha$ ), 4.22 (m, 3H, 9-H-Fmoc,  $S_\beta$ ), 4.10 – 4.03 (m, 3H, 5-H,  $6_{a,b}$ -H), 3.67 (d, 1H,  $J_{H2,H3} = 9.7$  Hz, 2-H), 2.36, 2.16, 1.99, (3 x s, 12H, 4 x  $CH_3$  (Ac)).

## 5.2.2 Synthese des Sialyl-T<sub>N</sub>-Serin-Antigens

### 5.2.2.1 *N*-(9H-Fluoren-9-yl)-methoxycarbonyl-*O*-(2-acetamido-2-acetamido-2-desoxy- $\alpha$ -D-galactopyranosyl)-L-serin-*tert*-butylester **13**<sup>[53]</sup>

(Fmoc-Ser( $\alpha$ GalNAc)-OtBu)



Einer Lösung von 3.60 g (5.6 mmol) Fmoc-Ser( $\alpha$ Ac<sub>3</sub>GalNAc)-OtBu **11** in 85 ml absolutem Methanol wird tropfenweise mit einer 1%-igen Natriummethanolat-Lösung (0.5 g Natrium in 25 ml Methanol) versetzt bis ein pH-Wert von 8.5 eingestellt ist. Der pH-Wert wird alle 30 Minuten überprüft und bei Bedarf durch weitere Zugabe von Natriummethanolat neu eingestellt. Nach 6 Stunden wird die Reaktionlösung durch Zugabe von Essigsäure neutralisiert und im Vakuum vom Lösungsmittel befreit. Das Rohprodukt wird durch Flashchromatographie an Kieselgel (Laufmittel: EtOAc/MeOH, 10:1) gereinigt.

*Ausbeute*: 1.96 g (3.34 mmol, 60%) farbloser, amorpher Feststoff.

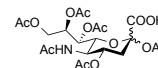
$R_f$  = 0.10 (EtOAc/MeOH, 20:1).

$C_{30}H_{38}N_2O_{10}$  (M = 586.63 g/mol) [586.25].

ESI-MS (positiv), m/z: 609.25 ( $[M+Na]^+$ , ber. 609.24), 1195.50 ( $[2xM+Na]^+$ , ber. 1195.49), 1781.76 ( $[3xM+Na]^+$ , ber. 1781.74).

$^1H$ -NMR (300 MHz,  $CDCl_3$ ),  $\delta$  (ppm) = 7.74 (d, 2H,  $J_{H4,H3} = J_{H5,H6} = 7.6$  Hz, 4-H-, 5-H-Fmoc), 7.59 (d, 2H,  $J_{H1,H2} = J_{H8,H7} = 6.3$  Hz, 1-H-, 8-H-Fmoc), 7.38 (t, 2H,  $J_{H3,H2/H4} = J_{H6,H5/H7} = 7.4$  Hz, 3-H-, 6-H-Fmoc), 7.29 (t, 2H,  $J_{H2,H1/H3} = J_{H7,H6/H8} = 7.2$  Hz, 2-H-, 7-H-Fmoc), 6.71 (d, 1H,  $J_{NH,S\alpha} = 5.4$  Hz, NH(Fmoc)), 6.15 (d, 1H,  $J_{NH,H2} = 6.8$  Hz, NH-GalNAc), 4.82 (sb, 1H, 4-H), 4.43 – 4.35 (m, 4H, 3-H, 1-H, 2-H,  $S_\alpha$ ), 4.13 - 3.80 (m, 8H,  $CH_2$ -Fmoc, 9-H-Fmoc, 5-H,  $6_{a,b}$ -H,  $S_\beta$ , 2-H), 2.04 (s, 3H,  $CH_3$  (Nac)), 1.45 (s, 9H,  $C(CH_3)_3$ ).

### 5.2.2.2 5-Acetamido-2,4,7,8,9-penta-O-acetyl-3,5-dideoxy- $\alpha/\beta$ -D-galacto-2-nonulopyranosid 15<sup>[196]</sup>



( $\alpha/\beta$ Ac<sub>5</sub>NeuNAcCOOH)

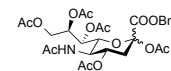
Zu einer Lösung von 8.10 g (26.2 mmol) N-Acetylneuraminsäure in 120 ml Pyridin werden unter Eiskühlung 60 ml Acetanhydrid zugetropft. Anschließend wird 5 Stunden bei Raumtemperatur gerührt, bevor das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und der Rückstand viermal mit jeweils 30 ml Toluol sowie dreimal mit jeweils 30 ml Dichlormethan kodestilliert wird. Das Rohprodukt wird ohne weitere Reinigung umgesetzt.

*Ausbeute:* 15.31 g (quant.) hellgelber, amorpher Feststoff.

$R_f = 0.36$  (EtOAc/ $CH_2Cl_2$ , 5:1).

$C_{21}H_{29}NO_{14}$  (M = 519.45 g/mol) [519.16].

### 5.2.2.3 Benzyl-5-acetamido-2,4,7,8,9-penta-O-acetyl-3,5-dideoxy- $\alpha/\beta$ -D-glycero-D-galacto-2-nonulopyranosid **16**<sup>[196]</sup>



( $\alpha/\beta$ Ac<sub>5</sub>NeuNAcCOOBn)

Eine Lösung von 13.60 g (26.2 mmol)  $\alpha/\beta$ Ac<sub>5</sub>NeuNAcCOOH **15** in 40 ml Ethanol wird mit einer Lösung von 4.37 g (13.10 mmol) Cäsiumcarbonat in 8 ml Wasser versetzt. Nach 30 Minuten Rühren bei Raumtemperatur wird das Lösungsmittel im Vakuum entfernt, der Rückstand viermal mit jeweils 40 ml Toluol kodestilliert und anschließend in 75 ml Dimethylformamid aufgenommen. Zu dieser Lösung werden 28 ml (235.7 mmol) Benzylbromid getropft. Anschließend wird weitere fünf Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Im Anschluss wird das Lösungsmittel im Hochvakuum entfernt und in 50 ml Ethylacetat aufgenommen. Dabei ausgefallenes Cäsiumbromid wird abfiltriert und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wird durch Flashchromatographie an Kieselgel (Laufmittel: EtOAc) gereinigt. Das zähflüssige Öl wird einmal mit 30 ml Toluol und viermal mit jeweils 30 ml Dichlormethan kodestilliert, um einen amorphen Feststoff zu erhalten.

*Ausbeute:* 11.10 g (18,21 mmol, 70%) farbloser, amorpher Feststoff.

*R<sub>f</sub>* = 0.20 – 0.45 (EtOAc).

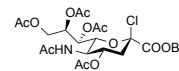
C<sub>28</sub>H<sub>35</sub>NO<sub>14</sub> (M = 609.58 g/mol) [609.21].

*Drehwert:*  $[\alpha]_D^{25} = -28.4$  (c = 1.00, CHCl<sub>3</sub>), Lit.:  $[\alpha]_D^{23} = -24.3$  (c = 1.00, CHCl<sub>3</sub>).<sup>[59]</sup>

*ESI-MS* (positiv), m/z: 632.19 ([M+Na]<sup>+</sup>, ber. 632.20), 1241.40 ([2xM+Na]<sup>+</sup>, ber. 1241.40).

<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>),  $\delta$  (ppm) = 7.34 (s, 5H, H<sub>Ar</sub>), 5.38 – 5.06 (m, 4H, H-4, H-6, H-7, H-8), 4.44 (dd, 1H,  $J_{H9a,H8} = 2.6$  Hz,  $J_{H9a,H9b} = 12.4$  Hz, H-9<sub>a</sub>), 4.16 – 4.09 (m, 2H, H-5, H-9<sub>b</sub>), 2.54 (dd, 1H,  $J_{H3\ddot{a}q,Hax} = 13.4$  Hz,  $J_{H3\ddot{a}q,H4} = 5.0$  Hz, H-3<sub>\ddot{a}q</sub>), 2.11, 2.10, 2.01, 1.89 (s, 19H, CH<sub>3</sub>-Ac, H-3<sub>ax</sub>).

#### 5.2.2.4 Benzyl-(5-acetamido-4,7,8,9-tetra-O-acetyl-2-chlor-3,5-dideoxy- $\alpha$ -D-glycero-D-galacto-2-nonulopyranosyl)onat **17**<sup>[196]</sup>



( $\alpha$ Ac<sub>5</sub>NeuNAcCOOBnCl)

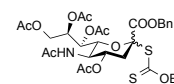
Eine Lösung aus 37.00 g (47.10 mmol) Acetylchlorid werden mit 0.3 ml Wasser versetzt und auf 0 °C gekühlt. Zu dieser Lösung werden bei 0 °C 11.10 g (18.21 mmol)  $\alpha/\beta$ Ac<sub>5</sub>NeuNAcCOOBn **16** gegeben und es wird drei Tage bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wird im Vakuum entfernt und der Rückstand fünfmal mit jeweils 30 ml Toluol sowie dreimal mit jeweils 30 ml Dichlormethan kodestilliert. Das Rohprodukt wird ohne weitere Reinigung in der nächsten Reaktion umgesetzt.

*Ausbeute:* 11.10 g (18,21 mmol, quant.) hellbrauner, amorpher Feststoff.

$R_f$  = 0.51 (EtOAc).

C<sub>26</sub>H<sub>32</sub>ClNO<sub>12</sub> (M = 585.98 g/mol) [585.16].

#### 5.2.2.5 O-Ethyl-S-[benzyl-(5-acetamido-4,7,8,9-tetra-O-acetyl-3,5-dideoxy- $\alpha$ -D-glycero-D-galacto-2-nonulopyranosyl)onat]dithiocarbonat **18**<sup>[196]</sup>



( $\alpha$ Ac<sub>5</sub>NeuNAcCOOBnXan)

Eine Lösung aus 11.10 g (18,21 mmol)  $\alpha$ Ac<sub>5</sub>NeuNAcCOOBnCl **17** in 180 ml absolutem Ethanol wird im Argongegenstrom mit 5.66 g (35.33 mmol) Kaliumethylxanthogenat versetzt und 24 Stunden unter Lichtausschluss und Argonatmosphäre bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktionslösung wird mit 200 ml Dichlormethan verdünnt und dreimal mit je 150 ml gesättigter Natriumchlorid-Lösung gewaschen. Die organische Phase wird über Magnesiumsulfat getrocknet und im Vakuum vom Lösungsmittel befreit. Das Rohprodukt wird durch Flashchro-

matographie an Kieselgel (Laufmittel: <sup>c</sup>Hex/EtOAc, 1:4 → EtOAc) gereinigt.

*Ausbeute:* 11.97 g (10.21 mmol, 57%) hellgelber, amorpher Feststoff.

*R<sub>f</sub>* = 0.22 (<sup>c</sup>Hex/EtOAc, 4:1).

C<sub>29</sub>H<sub>37</sub>NO<sub>13</sub>S<sub>2</sub> (M = 671.73 g/mol) [671.17].

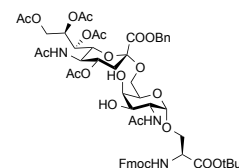
*Drehwert:*  $[\alpha]_D^{27} = 35.3$  (c = 1.0, CHCl<sub>3</sub>), Lit.:  $[\alpha]_D^{22} = +34.1$  (c = 1.0, CHCl<sub>3</sub>).<sup>[196]</sup>

*ESI-MS* (positiv), m/z: 694.17 ([M+Na]<sup>+</sup>, ber. 694.17), 710.15 ([M+K]<sup>+</sup>, ber. 710.13).

<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>), δ (ppm) = 7.39 – 7.36 (m, 5H, H<sub>Ar</sub>), 5.36 – 5.22 (m, 3H, H-7'', H-8'', NH), 4.85 (td, 1H, H-4''), 4.56 (dd, 1H, J<sub>H6'',H5''</sub> = 9.6 Hz, J<sub>H6'',H7''</sub> = 2.4 Hz, 4.16 – 4.09, H-6''), 4.46 – 4.10 (m, 4H, H-5'', H-9'', OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 2.66 (dd, 1H, J<sub>H3äq'',H3ax''</sub> = 13.0 Hz, J<sub>H3äq'',H4''</sub> = 4.4 Hz, H-3äq''), 2.12, 2.08, 2.04, 2.01 (s, 16H, CH<sub>3</sub>-Ac, H-3<sub>ax</sub>), 1.21 (t, 3H, OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>).

#### 5.2.2.6 *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)]-L-serin-*tert*-butylester **20** <sup>[196],[53]</sup>

(Fmoc-Ser(αAc<sub>4</sub>NeuNacCOOBn-(2→6)-αGalNac)-OtBu)



*Herstellung der Methylsulfenylbromid-Lösung (1.6 M in 1,2-Dichlorethan):* Zu einer Lösung aus 709 µl (7.99 mmol) Dimethyldisulfid in 10 ml absolutem 1,2-Dichlorethan werden 410 µl Brom geben und 18 Stunden unter Argonatmosphäre bei Raumtemperatur und Lichtausschluss gerührt.

*Glycosylierungsreaktion:* Eine Lösung aus 1.96 g (3.34 mmol) Fmoc-Ser(αGalNac)-OtBu **13**, 2.87 g (4.28 mmol) αAc<sub>5</sub>NeuNacCOOBnXan **18** und 4.00 g ausgeheiztem Molsieb (4 Å) in 80 ml absolutem Acetonitril und 40 ml absolutem Dichlormethan werden unter Argonatmosphäre und

Lichausschluss eine Stunde gerührt. Anschließend werden im Argongegenstrom 1.09 g (4.29 mmol) trockenes Silbertriflat zugegeben. Mit Trockeneis in Aceton wird die Suspension auf  $-65\text{ }^{\circ}\text{C}$  gekühlt. Zu dieser Suspension werden bei  $-65\text{ }^{\circ}\text{C}$  2.67 ml (4.28 mmol) eiskalte Methylsulfonylbromid-Lösung in 1,2-Dichlorethan (1.6 M) zugetropft. Die Suspension wird vier Stunden bei  $-65\text{ }^{\circ}\text{C}$  gerührt und im Anschluss durch Zugabe von 554 mg (4.35 mmol) Diisopropylethylamin neutralisiert. Es wird weitere 30 Minuten bei  $-65\text{ }^{\circ}\text{C}$  gerührt und dann langsam auf  $15\text{ }^{\circ}\text{C}$  erwärmt. Der Reaktionsansatz wird mit 150 ml Dichlormethan aufgenommen und über Hyflo<sup>®</sup> filtriert. Das Rohprodukt wird durch Flashchromatographie an Kieselgel (Laufmittel: EtOAc/MeOH, 10:1) gereinigt.

*Ausbeute:* 1.54 g (1.36 mmol, 41%) farbloser, amorpher Feststoff.

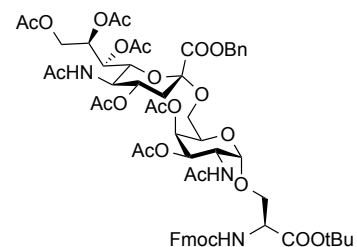
$R_f = 0.44$  (EtOAc/MeOH, 10:1).

$\text{C}_{56}\text{H}_{69}\text{N}_3\text{O}_{22}$  (M = 1136.15 g/mol) [1135.44].

*ESI-MS* (positiv),  $m/z$ : 1158.43 ( $[\text{M}+\text{Na}]^+$ , ber. 1158.43), 1195.50 ( $[2x\text{M}+\text{Na}]^+$ , ber. 1195.49), 1781.76 ( $[3x\text{M}+\text{Na}]^+$ , ber. 1781.74).

$^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ),  $\delta$  (ppm) = 7.88 (d, 2H,  $J_{\text{H}4,\text{H}3} = J_{\text{H}5,\text{H}6} = 8.2$  Hz, 4-H-, 5-H-Fmoc), 7.71 (d, 2H,  $J_{\text{H}1,\text{H}2} = J_{\text{H}8,\text{H}7} = 7.4$  Hz, 1-H-, 8-H-Fmoc), 7.42-7.29 (m, 4H, 3-H-, 6-H-Fmoc, 2-H-, 7-H-Fmoc), 7.05 (d, 1H,  $J_{\text{NH},\text{S}\alpha} = 5.4$  Hz, NH(Fmoc)), 6.15 (d, 1H,  $J_{\text{NH},\text{H}2} = 6.8$  Hz, NH-GalNAc), 4.70 (sb, 1H, 4-H), 4.38 – 3.94 (m, 4H, 3-H, 1-H, 2-H,  $\text{S}\alpha$ ,  $\text{CH}_2$ -Fmoc, 9-H-Fmoc, 5-H,  $6_{\text{a,b}}$ -H,  $\text{S}\beta$ , 2-H), 2.04 (s, 3H,  $\text{CH}_3$  (NAC)), 1.45 (s, 9H,  $\text{C}(\text{CH}_3)_3$ ).

**5.2.2.7 *N*-(9H-Fluoren-9-yl)-methoxycarbonyl-*O*-{2-acetamido-3,4-di-*O*-acetyl-2-desoxy-6-*O*-[benzyl-(5-acetamido-4,7,8,9-tetra-*O*-acetyl-3,5-didesoxy- $\alpha$ -D-glycero-D-galacto-2-nonulo-pyranosyl]}-L-serin-*tert*-butylester (21)**<sup>[52,195]</sup>



Eine Lösung von 1.54 g (1.36 mmol) (Fmoc-Ser( $\alpha$ Ac<sub>4</sub>NeuNacCOOBn-(2→6)- $\alpha$ GalNAc)-OtBu) **20** in 50 ml Pyridin wird auf 0 °C gekühlt und mit 15 ml Acetanhydrid und 28 mg DMAP versetzt. Der Reaktionsansatz wird zunächst eine Stunde bei 0 °C gerührt und dann über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wird mit 250 ml Dichlormethan verdünnt und überschüssiges Acetanhydrid durch Zugabe von 50 ml Eiswasser hydrolysiert. Die organische Phase wird dreimal mit 250 ml Natriumhydrogencarbonat-Lösung und einmal mit 100 ml gesättigter Natriumchlorid-Lösung gewaschen. Nach der Trocknung über Magnesiumsulfat wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und der Rückstand wird flashchromatographisch an Kieselgel (Ethylactat, Ethylacetat/ethanol 9:1) gereinigt.

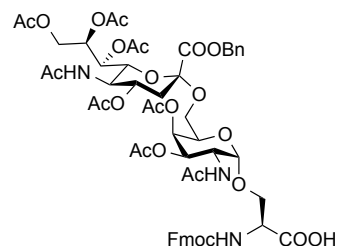
*Ausbeute:* 1.67 mg (1.27 mmol, 93%) farbloser amorpher Feststoff.

(Fmoc-Ser( $\alpha$ Ac<sub>4</sub>NeuNacCOOBn-(2→6)- $\alpha$ Ac<sub>2</sub>GalNAc)-OtBu)

C<sub>60</sub>H<sub>73</sub>N<sub>3</sub>O<sub>24</sub> (M = 1220.2410 g/mol) [1219.4584].

*ESI-MS* (positiv), m/z: 1242.50 ([M+Na]<sup>+</sup>, ber. 1242.45).

#### 5.2.2.8 *N*-(9*H*-Fluoren-9-yl)-methoxycarbonyl-*O*-{2-acetamido-2-desoxy-3,4-di-*O*-acetyl-6-*O*-[benzyl-(5-acetamido-4,7,8,9-tetra-*O*-acetyl-3,5-didesoxy- $\alpha$ -D-glycero-D-galacto-2-nonulopyranosyl]}-L-serin **22**<sup>[196]</sup>



(Fmoc-Ser( $\alpha$ Ac<sub>4</sub>NeuNacCOOBn-(2→6)- $\alpha$ GalNAc)-OOH)

Eine Lösung aus 0.59 g (0.47 mmol) Fmoc-Ser( $\alpha$ Ac<sub>4</sub>NeuNacCOOBn-(2→6)- $\alpha$ GalNAc)-OtBu **21** in 10 ml absolutem Dichlormethan wird nacheinander mit 970  $\mu$ l Wasser und 9.7  $\mu$ l Trifluoressigsäure versetzt. Der Reaktionsansatz wird drei Stunden bei Raumtemperatur gerührt, anschlie-



ßend durch Zugabe von 50 ml Toluol verdünnt und im Vakuum eingengt. Der Rückstand wird dreimal mit jeweils 30 ml Toluol und dreimal mit jeweils 30 ml Dichlormethan kodestilliert. Das Rohprodukt wird durch Flashchromatographie an Kieselgel (Laufmittel: EtOAc/MeOH, 2:1) gereinigt. Das Produkt wird nach der flashchromatographischen Reinigung in Essigsäureethylester gelöst und anschließend über einem Faltenfilter filtriert, um Kieselgel zu entfernen, welches sich teilweise in Methanol löst.

*Ausbeute:* 0.52 g (0.48 mmol, quant.) farbloser, amorpher Feststoff.

$R_f = 0.09$  (EtOAc).

$C_{52}H_{61}N_3O_{22}$  ( $M = 1080.05$  g/mol) [1080.05].

*Drehwert:*  $[\alpha]_D^{28} = +5.3$  ( $c = 1.2$ ,  $CHCl_3$ ), Lit.:  $[\alpha]_D^{23} = +6.27$  ( $c = 1.0$ ,  $CHCl_3$ ).<sup>[196]</sup>

*ESI-MS* (positiv),  $m/z$ : 1102.37 ( $[M+Na]^+$ , ber. 1102.36).

*HR-ESI-MS* (positiv),  $m/z$ : 1102.3635 ( $[M+Na]^+$ , ber. 1102.3645)

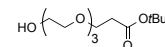
$^1H$ -NMR (400 MHz,  $CDCl_3$ , COSY, HSQC),  $\delta$  (ppm) = 7.76 (d, 2H,  $J_{H4,H3} = J_{H5,H6} = 7.0$  Hz, 4-H-, 5-H-Fmoc), 7.61 (d, 2H,  $J_{H1,H2} = J_{H8,H7} = 7.2$  Hz, 1-H-, 8-H-Fmoc), 7.37 – 7.30 (m, 9H, 3-H-, 6-H-Fmoc, 2-H-, 7-H-Fmoc,  $H_{ar}$ -Bn), 5.81 (d, 1H,  $J_{NH,S\alpha} = 7.9$  Hz, NH(Fmoc)), 5.74 (d, 1H,  $J_{NH,H2} = 10.2$  Hz, NH-GalNAc), 5.36 – 5.27 (m, 3H, H-7'', H-8'',  $CH_2$ -Bn<sub>a</sub>), 5.20 (d, 1H,  $J_{H4,H3} = 2.4$  Hz, H-4), 5.16 – 5.14 (m, 2H,  $CH_2$ -Bn<sub>b</sub>), 5.03 (dd, 1H,  $J_{H3,H4} = 2.7$  Hz,  $J_{H3,H2} = 11.4$  Hz, 3-H), 4.82 (m, 2H, H-1, H-4''), 4.55 (td, 1H,  $J_{H2,H1} = J_{H2,HN-NAC} = 3.5$  Hz,  $J_{H2,H3} = 10.4$  Hz, H-2), 4.48 – 4.30 (m, 7H,  $S_\alpha$ ,  $CH_2$ -Fmoc, H-9-Fmoc, H-6'', H-9a'', H-2), 4.25 – 4.21 (m, 4H,  $S_\beta$ -b, H-5, H-5'', H-9b''), 4.06 (m, 1H,  $S_\beta$ -a), 3.80 (dd, 1H,  $J_{H5,H6a} = 7.1$  Hz,  $J_{H5,H6b} = 10.3$  Hz, 6<sub>a,b</sub>-H), 3.15 (d, 1H,  $J_{H6b,H5} = 5.2$  Hz,  $J_{H6b,H5} = 10.2$  Hz), 2.57 (dd, 1H,  $J_{H3\ddot{a}q'',H4''} = 4.7$  Hz,  $J_{H3\ddot{a}q'',H3ax''} = 12.8$  Hz, 3-H<sub>äq</sub>), 2.03, 2.00, 1.98, 1.93 (4 x s, 18H, 6 x  $CH_3$  (Ac)), 1.89 (d, 1H,  $J_{H3ax'',H3\ddot{a}q''} = 12.7$  Hz).

$^{13}C$ -NMR (100.7 MHz,  $CDCl_3$ , HSQC),  $\delta$  (ppm) = 170.86 (-COOtBu), 171.13, 170.86, 170.75, 170.68, 170.58, 169.66 (C=O-Acetyl), 167.27 (C1''), 155.93 (C=O-Urethan), 143.73, 141.27 (C1a-, C8a-, C4a-, C5a-Fmoc), 134.71 ( $C_{quart.}$ -Bn), 127.74 (C2-, C7-Fmoc), 127.09 (C3-, C6-Fmoc), 125.07 (C1-, C8-Fmoc), 119.98 (C4-, C5-Fmoc), 98.93 (C1), 99.61 (C2''), 72.61 ( $S_\beta$ ), 68.89, 68.29, 68.10,

67.82, 67.23, 67.10 (C3, C4, C5, C4'', C6'', C7'', C8'', CH<sub>2</sub>-Fmoc, CH<sub>2</sub>-Bn), 63.47 (C6), 62,40 (C9''), 61.01 (S<sub>α</sub>), 49.12 (C5''), 37.73 (C3''), 23.24, 23.15, 21.02, 20.77, 20.69 (CH<sub>3</sub>CO).

### 5.3 Synthese der Spaceraminosäure

#### 5.3.1.1 12-Hydroxy-4,7,10-trioxadodecansäure-*tert*-butylester 25<sup>[61]</sup>



(HO(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>COOtBu)

Eine Lösung aus 25.6 g (188.0 mmol) wasserfreiem Triethylenglycol in 100 ml absolutem THF wird unter Argonatmosphäre mit 40 mg (0.9 mmol) Natrium versetzt. Nach vollständiger Reaktion des Natriums wird die Lösung über eine Spritze mit 9.6 ml (66.00 mmol) Acrylsäure-*tert*-butylester versetzt, und 24 Stunden bei Raumtemperatur unter Argonatmosphäre gerührt. Anschließend wird der Reaktionsansatz durch Zugabe von 1 M Salzsäure neutralisiert und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der Rückstand wird in 100 ml gesättigter Natriumchlorid-Lösung gelöst und dreimal mit jeweils 50 ml Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Extrakte werden über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wird im Hochvakuum getrocknet und ohne weitere Reinigung in der nächsten Reaktion umgesetzt.

*Ausbeute:* 14.28 g (53.70 mmol) 81%, farbloses Öl.

*R<sub>f</sub>* = 0.36 (EtOAc).

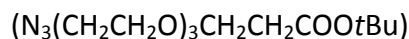
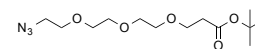
C<sub>13</sub>H<sub>26</sub>O<sub>6</sub> (M = 278.35 g/mol) [278.17].

*ESI-MS* (positiv), m/z: 1102.37 ([M+Na]<sup>+</sup>, ber. 1102.36).

*HR-ESI-MS* (positiv), m/z: 1102.3635 ([M+Na]<sup>+</sup>, ber. 1102.3645)

<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>), δ (ppm) = 3.73 – 3.67 (m, 4H, 3-CH<sub>2</sub>, 14-CH<sub>2</sub>), 3.65 – 3.58 (m, 10H, 5xOCH<sub>2</sub>), 2.50 (t, 2H, J<sub>CH<sub>2</sub>,CH<sub>2</sub></sub> = 6.6 Hz, 2-CH<sub>2</sub>), 1.43 (s, 9H, *t*Bu).

### 5.3.1.2 12-Azido-4,7,10-trioxadodecansäure-*tert*-butylester 26<sup>[196]</sup>



Eine Lösung aus 14.17 g (53.70 mmol) 12-Hydroxy-4,7,10-trioxadodecansäure-*tert*-butylester **25** in 20 ml absolutem Dichlormethan wird mit 18.9 ml Triethylamin versetzt und die Lösung mit einem Eisbad auf 0 °C gekühlt. Unter Eiskühlung werden 12.30 g (107.37 mmol) Methylsulfonylchlorid zugetropft, und es wird vier Stunden bei 0 °C gerührt. Das ausgefallene Triethylaminhydrochlorid wird über *Hyflo*<sup>®</sup> filtriert und der Rückstand zweimal mit jeweils 20 ml Dichlormethan gewaschen. Das Filtrat wird dreimal mit jeweils 25 ml Eiswasser gewaschen und zweimal mit jeweils 25 ml gesättigter Natriumchlorid-Lösung gewaschen. Die organische Phase wird über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Anschließend wird der Rückstand in 20 ml Dimethylformamid gelöst und mit 21.54 g (33.13 mmol) Natriumazid versetzt. Es wird über Nacht bei 60 °C gerührt und im Anschluss das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der orangefarbene Rückstand wird in 50 ml Wasser gelöst und fünfmal mit jeweils 40 ml Diethylether extrahiert. Die vereinigten organischen Extrakte werden über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wird durch Flashchromatographie an Kieselgel (Laufmittel: <sup>c</sup>Hex/EtOAc, 3:1) gereinigt.

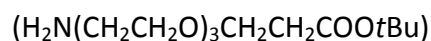
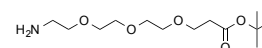
*Ausbeute:* 10.46 g (36.15 mmol, 67%) gelbliches Öl.

$R_f = 0.28$  (<sup>c</sup>Hex/EtOAc, 3:1).

$\text{C}_{13}\text{H}_{26}\text{N}_3\text{O}_5$  (M = 303.36 g/mol) [303.18].

<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>, COSY, HSQC), δ (ppm) = 3.72-3.66 (m, 4H, 3-CH<sub>2</sub>, 14-CH<sub>2</sub>), 3.65-3.56 (10H, 5xOCH<sub>2</sub>), 1.44 (s, 9H, *t*Bu).

### 5.3.1.3 12-Amino-4,7,10-trioxadodecansäure-*tert*-butylester 27<sup>[197]</sup>

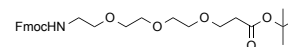


Eine Suspension aus 7.90 g Nickel-Aluminium-Legierung in 250 ml Wasser wird in kleinen Portionen so lange mit Natriumhydroxidplättchen versetzt, bis die Lösung nicht mehr schäumt. Die Suspension wird nun zehn Minuten bei Raumtemperatur und danach 30 Minuten bei 70 °C gerührt. Der schwarze Raney-Nickel wird durch Dekantieren vom Lösungsmittel getrennt, anschließend mit 150 ml Wasser neutral gewaschen und viermal mit jeweils 40 ml Isopropanol gewaschen. Der Katalysator wird rasch mit 10.42 g (343.50 mmol) 12-Azido-4,7,10-trioxadodecansäure-*tert*-butylester **26**, gelöst in 100 ml Isopropanol, versetzt. Durch wiederholtes Anlegen eines Vakuums und Belüftung mit Argon wird der Reaktionsansatz von Sauerstoff befreit. Anschließend wird die Reaktionslösung über Nacht unter Wasserstoffatmosphäre gerührt. Danach wird das Raney-Nickel durch Filtration über Hyflo® abgetrennt und der Filterkuchen mit 40 ml Isopropanol gewaschen. Das Filtrat wird im Vakuum vom Lösungsmittel befreit und ohne weitere Reinigung in der nächsten Reaktion eingesetzt.

*Ausbeute:* 7.28 g (26.25 mmol, 76%) gelbliches Öl.

$R_f = 0.18$  (Hex/EtOAc, 2:1).

$C_{13}H_{27}NO_5$  (M = 303.36 g/mol) [303.18].



#### 5.3.1.4 12-*N*-(9*H*-Fluoren-9-yl)-methoxycarbonylamido-4,7,10-trioxadodecansäure-*tert*-butylester **28**<sup>[197]</sup>

(FmocHN(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>COOtBu)

Eine Lösung aus 7.26 g (26.25 mmol) 12-Amino-4,7,10-trioxadodecansäure-*tert*-butylester **27** und 2.21 g (26.25 mmol) Natriumhydrogencarbonat wird unter starkem Rühren mit 9.06 g Fmoc-OSu versetzt und anschließend vier Tage bei Raumtemperatur gerührt. Nach Beendigung der Reaktion wird mit halbkonzentrierter Salzsäure auf pH = 6 eingestellt und das Aceton im Vakuum entfernt. Nach dem Abtrennen der organischen Phase wird die wässrige Phase viermal

mit jeweils 100 ml Dichlormethan extrahiert. Die vereinigten organischen Extrakte werden nacheinander mit 250 ml 1 M wässriger Salzsäure-Lösung und 250 ml Wasser gewaschen. Anschließend wird über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wird durch Flashchromatographie an Kieselgel (Laufmittel:  $^c$ Hex/EtOAc, 2:1  $\rightarrow$  1:1  $\rightarrow$  1:2) gereinigt.

*Ausbeute:* 9.03 g (18.07 mmol, 69%) schwach gelbes Öl.

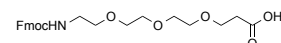
$R_f = 0.17$  ( $^c$ Hex/EtOAc, 2:1).

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

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

$^1H$ -NMR (400 MHz,  $CDCl_3$ ),  $\delta$  (ppm) = 7.76 (d, 2H,  $J_{H4,H3} = J_{H5,H6} = 7.6$  Hz, 4-H-, 5-H-Fmoc), 7.61 (d, 2H,  $J_{H1,H2} = J_{H8,H7} = 7.5$  Hz, 1-H-, 8-H-Fmoc), 7.42 – 7.37 (m, 2H, 3-H-, 6-H-Fmoc), 7.33 – 7.28 (m, 2H, 2-H-, 7-H-Fmoc), 5.44 (sb, 1H, NH(Fmoc)), 4.40 (d, 2H,  $J_{CH_2/CH} = 7.0$  Hz,  $CH_2$ -Fmoc), 4.22 (t, 1H,  $J_{H9,CH_2} = 6.8$  Hz, 9-H-Fmoc), 3.66-3.55 (m, 12H, 6 x  $OCH_2$ ), 3.38 (t, 2H,  $J_{CH_2,CH_2} = 5.2$  Hz, 12- $CH_2$ ), 2.48 (t, 2H,  $J_{CH_2,CH_2} = 6.5$  Hz, 2- $CH_2$ ), 1.43 (s, 9H,  $CH_3$ -*t*Bu).

### 5.3.1.5 12-*N*-(9*H*-Fluoren-9-yl)-methoxycarbonylamido-4,7,10-trioxadodecansäure **29**<sup>[60]</sup>



(FmocHN(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>COOH)

9.03 g (18.07 mmol) *N*-(9*H*-Fluoren-9-yl)-methoxycarbonylamido-12-amino-4,7,10-trioxadodecansäure-*tert*-butylester **28** werden in einer Mischung aus 67 ml Trifluoressigsäure und 6.7 ml Wasser gelöst und drei Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Danach wird die Reaktionslösung mit 60 ml Toluol verdünnt und im Vakuum vom Lösungsmittel befreit. Der Rückstand wird dreimal mit jeweils 40 ml Toluol und zweimal mit jeweils 40 ml Dichlormethan kodestilliert. Das Rohprodukt wird durch Flashchromatographie an Kieselgel (Laufmittel:  $CH_2Cl_2/MeOH/CH_3COOH$ , 19:1:0.5) gereinigt.

*Ausbeute:* 9.03 g (18.07 mmol, 84%) schwach gelbes Öl.

*R<sub>f</sub>* = 0.29 (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH/CH<sub>3</sub>COOH, 19:1:0.5).

C<sub>24</sub>H<sub>29</sub>NO<sub>7</sub> (M = 443.49 g/mol) [443.19].

*ESI-MS* (positiv), m/z: 466.16 ([M+Na]<sup>+</sup>, ber. 466.17).

<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>), δ (ppm) = 7.76 (d, 2H, *J*<sub>H4,H3</sub> = *J*<sub>H5,H6</sub> = 7.4 Hz, 4-H-, 5-H-Fmoc), 7.60 (d, 2H, *J*<sub>H1,H2</sub> = *J*<sub>H8,H7</sub> = 7.4 Hz, 1-H-, 8-H-Fmoc), 7.42 – 7.37 (m, 2H, 3-H-, 6-H-Fmoc), 7.33 – 7.28 (m, 2H, 2-H-, 7-H-Fmoc), 5.58 (sb, 1H, NH(Fmoc)), 4.42 (d, 2H, *J*<sub>CH2/CH</sub> = 6.8 Hz, CH<sub>2</sub>-Fmoc), 4.22 (t, 1H, *J*<sub>H9,CH2</sub> = 6.8 Hz, 9-H-Fmoc), 3.78 – 3.71 (m, 2H, 11-CH<sub>2</sub>), 3.62-3.56 (m, 10H, 5 x OCH<sub>2</sub>), 3.40 – 3.37 (m, 2H, 12-CH<sub>2</sub>), 2.60 (t, 2H, *J*<sub>CH2,CH2</sub> = 6.1 Hz, 2-CH<sub>2</sub>).

## 5.4 Synthese der Peptide und Glycopeptide

### 5.4.1 Standardprotokoll der Festphasenpeptid- und Festphasenglycopeptidsynthese

Die Peptide- und Glycopeptide wurden automatisiert mit einem Perkin Elmer ABI 433A-Peptidesynthesizer der Fa. *Applied Biosystems*, Carlsbad (USA) hergestellt. Der Aufbau der Peptide erfolgte vom C-Terminus beginnend nach dem Fmoc-Protokoll. Die Ansatzgrößen betragen 0.1 mmol oder 0.05 mmol. Für die Synthesen wurden Harze verwendet, die mit der entsprechenden Aminosäure vorbeladen waren. Die für die Synthesen eingesetzten Fmoc-Aminosäuren wurden von der Fa. *Orpegen Pharma*, Heidelberg, bezogen und verfügten über einen freien C-Terminus und gegebenenfalls säurelabile Schutzgruppen an den funktionellen Gruppen. Für die Synthese kamen folgende kommerzielle Fmoc-Aminosäuren zum Einsatz: Fmoc-Ala-OH, Fmoc-Arg(Pbf)-OH, Fmoc-Asn(Trt)-OH, Fmoc-Asp-OH, Fmoc-Gln(Trt)-OH, Fmoc-Glu(tBu)-OH, Fmoc-Gly-OH, Fmoc-His(Trt)-OH, Fmoc-Ile-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Lys(Boc)-OH, Fmoc-Phe-OH, Fmoc-Pro-OH, Fmoc-Ser(tBu)-OH, Fmoc-Thr(tBu)-OH, Fmoc-Trp(Boc)-OH, Fmoc-Tyr(tBu)-OH und Fmoc-Val-OH. Vor Kupplung der Aminosäure wird zunächst die N-terminale Fmoc-Schutzgruppe der am Harz gebundenen Aminosäure mit einer 20%igen Piperidin-Lösung in NMP abgespalten (3x 2.5 min). Für die Kupplung werden 10 Äquivalente der Aminosäure mit 10 Äquivalenten HBTU, HOBt und 20 Äquivalenten DIPEA in DMF über einen Zeitraum von 30 min abwechselnd geschüttelt und inkubiert (je 30 s Intervalle). Nach der Kupplung werden nicht umgesetzte Aminosäuren mit freiem N-Terminus durch 10 minütiges Schütteln mit einer Lösung aus Acetanhydrid (0.5 M), DIPEA (0.125 M) und HOBt (0.015 M) in NMP acetyliert, damit diese im nächsten Schritt nicht weiter reagieren können.

Die Kupplung der Spaceraminosäure sowie der Glycosylaminosäuren erfolgt manuell im Reaktor des Synthesizers unter geänderten Kupplungsbedingungen. Dabei wird zunächst die N-terminale Fmoc-Gruppe des Peptidstranges mit einer 20%igen Lösung von Piperidin in NMP abgespalten. Für die Kupplung werden 2 Äquivalente des Bausteins zusammen mit 2.4 Äquivalenten HATU, 2.4 Äquivalenten HOAt und 5.0 Äquivalenten NMM in 2 ml NMP in einer Kartusche gelöst. Die Kupplungsmischung wird anschließend in den Reaktor gepumpt und über einen Zeitraum von 8 h abwechselnd 30 Sekunden geschüttelt und 30 Sekunden inkubiert. Abschließend erfolgt wie oben beschrieben ein Acetylierungsschritt. Nach der Kupplung von sterisch anspruchsvollen

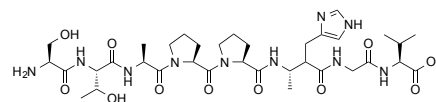
Glycosylaminosäuren wurden teilweise Doppelkupplungen durchgeführt. Dabei wird zweimal nacheinander dieselbe Fmoc-Aminosäure gekuppelt, und es erfolgt erst nach den beiden Kupplungsschritten ein Acetylierungsschritt. Nach Kupplung der letzten Aminosäure wird die *N*-terminale Fmoc-Gruppe abgespalten und der *N*-Terminus, wenn dies gewünscht ist acetyliert. Abschließend wird das Harz zuerst mit NMP und dann mit Dichlormethan gewaschen und anschließend im Stickstoffstrom getrocknet.

Zur Abspaltung des Peptids vom Harz und zur Entfernung aller säurelabilen Schutzgruppen wird das Harz in einen Merrifield-Glasreaktor überführt und 2 h mit einer Lösung aus 10 ml TFA, 1 ml Wasser und 1 ml TIS auf einer Schüttelplatte geschwenkt. Der flüssige Überstand wird durch Anlegen eines Vakuums durch die Glasfritte filtriert und das Harz zweimal mit 3 ml TFA nachgewaschen. Das Filtrat wird mit 30 ml Toluol verdünnt, im Vakuum vom Lösungsmittel befreit und mehrmals mit Toluol kodestilliert. Anschließend wird der Rückstand in 5 ml Wasser gelöst und lyophilisiert.

## 5.4.2 Synthese der Peptide ohne Spaceraminosäure

### 5.4.2.1 L-Serinyll-L-threonyll-L-alanyl-L-prolyll-L-prolyll-L-alanyl-L-histidylglycyl-L-valin 82

(NH<sub>2</sub>-Ser-Thr-Ala-Pro-Pro-Ala-His-Gly-Val-COOH)



Die Peptidsynthese erfolgt nach dem Standardprotokoll ausgehend von 625 mg (0.1 mmol) eines mit Fmoc-Val-O-Trt beladenen Tentagel-Harzes der Fa. *Rapp Polymere GmbH*, Tübingen, mit einer Beladung von 0.16 mmol/g. Die endständige Aminogruppe wird nicht acetyliert. Der nach dem Standardprotokoll nach dem Abspalten vom Harz erhaltene Rückstand wird durch semipräparative 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,  $R_t = 22.3$  min) gereinigt und anschließend lyophilisiert.



*Ausbeute:* 39.2 mg (49.47  $\mu\text{mol}$ , 49%) farbloses Lyophilisat.

$R_t = 22.3$  (Phenomenex Luna, Gradient A).

$\text{C}_{36}\text{H}_{57}\text{N}_{11}\text{O}_{12}$  ( $M = 835.92$  g/mol) [835.43].

*ESI-MS* (positiv),  $m/z$ : 836.42 ( $[\text{M}+\text{H}]^+$ , ber. 836.43).

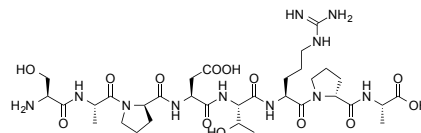
*HR-ESI-MS* (positiv),  $m/z$ : 836.4271 ( $[\text{M}+\text{H}]^+$ , ber. 836,4266) 0.6 ppm.

$^1\text{H-NMR}$  (600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , COSY, HSQC, HMBC),  $\delta$  (ppm) = 8.56 (d, 1H,  $J_{\text{H}_\epsilon, \text{H}_\delta} = 0.95$  Hz,  $\text{H}_\epsilon$ ), 7.26 (d, 1H,  $J_{\text{H}_\delta, \text{H}_\epsilon} = 0.50$  Hz,  $\text{H}_\delta$ ), 4.65 - 4.62 (m, 2H,  $\text{H}_\alpha$ ,  $\text{P}_\alpha^5$ ), 4.54 (q, 1H,  $J_{\text{A}_\alpha, \text{A}_\beta} = 7.07$  Hz,  $\text{A}_\alpha$ ), 4.33 - 4.32 (m, 2H,  $\text{T}_\alpha$ ,  $\text{P}_\alpha^4$ ), 4.24 (d, 1H,  $J_{\text{V}_\alpha, \text{V}_\beta} = 5.87$  Hz,  $\text{V}_\alpha$ ), 4.20 - 4.14 (m, 2H,  $\text{A}_\alpha$ ,  $\text{S}_\alpha$ ), 4.11 - 4.07 (m, 1H,  $\text{T}_\beta$ ), 3.99 - 3.87 (m, 4H,  $\text{S}_\beta$ ,  $\text{G}_\alpha$ ), 3.79 - 3.72 (m, 2H,  $\text{P}_\delta^4$ ), 3.58 - 3.54 (m, 2H,  $\text{P}_\delta^5$ ), 3.25 - 3.12 (m, 2H,  $\text{H}_\beta$ ), 2.32 - 2.26 (m, 1H,  $\text{P}_\beta^5$ ), 2.24 - 2.18 (m, 2H,  $\text{P}_\beta^4$ ), 2.17 - 2.11 (m, 1H,  $\text{V}_\beta$ ), 2.00 - 1.92 (m, 4H,  $\text{P}_\gamma^4$ ,  $\text{P}_\gamma^5$ ), 1.85 - 1.77 (m, 2H,  $\text{P}_\beta^4$ ,  $\text{P}_\beta^5$ ), 1.29 (d, 3H,  $J_{\text{A}_\beta, \text{A}_\alpha} = 7.08$  Hz,  $\text{A}_\beta$ ), 1.27 (d, 3H,  $J_{\text{A}_\beta, \text{A}_\alpha} = 7.21$  Hz,  $\text{A}_\beta$ ), 1.17 (d, 3H,  $J_{\text{T}_\gamma, \text{T}_\beta} = 6.43$  Hz,  $\text{T}_\gamma$ ), 0.90 - 0.87 (m, 6H,  $\text{V}_\gamma$ ).

$^{13}\text{C-NMR}$  (150.92 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , HSQC, HMBC),  $\delta$  (ppm) = 176.15 (V-COOH), 175.15, 174.89, 173.92, 172.23, 171.93, 171.07, 170.93, 168.05 (C=O), 133.45 ( $\text{H}_\epsilon$ ), 128.28 ( $\text{H}_\gamma$ ), 117.34 ( $\text{H}_\gamma$ ), 67.11 ( $\text{T}_\beta$ ), 60.14 ( $\text{S}_\beta$ ), 60.03 ( $\text{P}_\alpha^4$ ), 59.07 ( $\text{T}_\alpha$ ), 58.65 ( $\text{H}_\alpha$ ), 58.38 ( $\text{V}_\alpha$ ), 54.37 ( $\text{A}_\alpha$ ), 52.35 ( $\text{P}_\alpha^5$ ), 49.66 ( $\text{S}_\alpha$ ), 47.76 ( $\text{A}_\alpha$ ), 47.69 ( $\text{P}_\delta^4$ ), 47.67 ( $\text{P}_\delta^5$ ), 42.18 ( $\text{G}_\alpha$ ), 29.89 ( $\text{V}_\beta$ ), 29.29 ( $\text{P}_\beta^4$ ), 28.02 ( $\text{P}_\beta^5$ ), 26.29 ( $\text{H}_\beta$ ), 24.66 ( $\text{P}_\gamma^5$ ), 24.61 ( $\text{P}_\gamma^4$ ), 18.85 ( $\text{T}_\gamma$ ), 18.29 ( $\text{V}_{\gamma 1}$ ), 17.16 ( $\text{V}_{\gamma 2}$ ), 16.35 ( $\text{A}_\beta$ ), 15.25 ( $\text{A}_\beta$ ).

#### 5.4.2.2 L-Seriny-L-alanyl-L-prolyl-L-aspartyl-L-threonyl-L-arginyl-L-prolyl-L-alanin 83

( $\text{NH}_2$ -Ser-Ala-Pro-Asp-Thr-Arg-Pro-Ala-COOH)



Die Peptidsynthese erfolgt nach dem Standardprotokoll ausgehend von 588 mg (0.1 mmol) eines mit Fmoc-Ala-O-Trt beladenen Tentagel-Harzes der Fa. *Rapp Polymere GmbH*, Tübingen,

mit einer Beladung von 0.17 mmol/g. Der *N*-Terminus der entstehenden Aminogruppe wird nicht acetyliert. Der nach dem Standardprotokoll erhaltene Rückstand nach dem Abspalten vom Harz wird durch semipräparative 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,  $R_t = 24.4$  min) gereinigt und anschließend lyophilisiert.

*Ausbeute:* 67.2 mg (83.00  $\mu$ mol, 83%) farbloses Lyophilisat.

$R_t = 24.4$  (Phenomenex Luna, Gradient A).

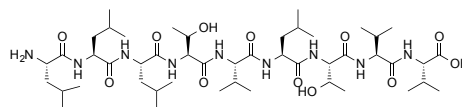
$C_{33}H_{55}N_{11}O_{13}$  ( $M = 813.87$  g/mol) [813.40].

*ESI-MS* (positiv),  $m/z$ : 904.38 ( $[M+5H_2O+H]^+$ , ber. 904.46), 452.70 ( $[M+5H_2O+2H]^{2+}$ , ber. 452.73).

$^1H$ -NMR (600 MHz,  $CDCl_3$ , COSY, HSQC, HMBC),  $\delta$  (ppm) = 4.62 (q, 1H,  $J_{A\alpha,A\beta} = 7.13$  Hz,  $A_\alpha^8$ ), 4.78 - 4.76 (m, 1H,  $D_\alpha$ ), 4.51 (dd, 1H,  $J_{R\alpha,R\beta1} = 13.73$  Hz,  $J_{R\alpha,R\beta2} = 2.61$  Hz,  $R_\alpha$ ), 4.36 - 4.34 (m, 2H,  $2xP_\alpha$ ), 4.29 (d, 1H,  $J_{T\alpha,T\beta} = 4.51$  Hz,  $T_\alpha$ ), 4.23 (q, 1H,  $J_{A\alpha,A\beta} = 7.32$  Hz,  $A_\alpha^2$ ), 4.18 - 4.14 (m, 1H,  $T_\beta$ ), 4.09 (dd, 1H,  $J_{S\alpha,S\beta1} = 4.10$  Hz,  $J_{S\alpha,S\beta2} = 5.89$  Hz,  $S_\alpha$ ), 3.96 (dd, 1H,  $J_{S\beta1,S\beta2} = 12.45$  Hz,  $J_{S\beta1,S\alpha} = 4.08$  Hz,  $S_{\beta1}$ ), 3.87 (dd, 1H,  $J_{S\beta2,S\beta1} = 12.45$  Hz,  $J_{S\beta2,S\alpha} = 6.06$  Hz,  $S_{\beta2}$ ), 3.79 - 3.72 (m, 2H,  $2xP_{\delta2}$ ), 3.62 - 3.53 (m, 2H,  $2xP_{\delta1}$ ), 3.12 (t, 2H,  $J_{R\delta,R\gamma} = 6.94$  Hz,  $R_\delta$ ), 3.02 - 2.89 (m, 2H,  $D_\beta$ ), 2.28 - 2.19 (m, 2H,  $2xP_{\beta2}$ ), 2.01 - 1.94 (m, 4H,  $2xP_\delta$ ), 1.92 - 1.86 (m, 1H,  $P_{\beta1}$ ), 1.83 - 1.76 (m, 2H,  $P_{\beta1}$ ,  $R_{\beta2}$ ), 1.72 - 1.66 (m, 1H,  $R_{\beta1}$ ), 1.64 - 1.55 (m, 2H,  $R_\gamma$ ), 1.37 (d, 3H,  $J_{A\beta,A\alpha} = 7.38$  Hz,  $A_\beta^2$ ), 1.35 (d, 3H,  $J_{A\beta,A\alpha} = 7.14$  Hz,  $A_\beta^8$ ), 1.13 (d, 3H,  $J_{T\gamma,T\beta} = 6.42$  Hz,  $T_\gamma$ ).

$^{13}C$ -NMR (150.92 MHz,  $CDCl_3$ , HSQC, HMBC),  $\delta$  (ppm) = 176.54, 173.78, 173.73, 172.73, 172.19, 171.86, 171.25, 171.22, 167.27 (C=O), 156.65 ( $R_\zeta$ ), 67.07 ( $T_\beta$ ), 60.21 ( $S_\beta$ ), 60.17 ( $2xP_\alpha$ ), 54.41 ( $S_\alpha$ ), 51.20 ( $R_\alpha$ ), 49.99 ( $D_\alpha$ ), 48.73 ( $A_\alpha^2$ ), 47.97 ( $2xP_\delta$ ), 47.95 ( $A_\alpha^8$ ), 40.54 ( $R_\delta$ ), 35.34 ( $D_\beta$ ), 29.30 ( $P_\beta$ ), 29.28 ( $P_\beta$ ), 27.56 ( $R_\beta$ ), 24.66 ( $P_\gamma$ ), 24.63 ( $P_\gamma$ ), 23.95 ( $R_\gamma$ ), 18.83 ( $T_\gamma$ ), 16.00 ( $A_\beta^2$ ), 15.27 ( $A_\beta^8$ ).

### 5.4.2.3 L-Leucyl-L-leucyl-L-leucyl-L-threonyl-L-valyl-L-leucyl-L-threonyl-L-valinyl-L-valin 84



(NH<sub>2</sub>-Leu-Leu-Leu-Thr-Val-Leu-Thr-Val-Val-Ala-COOH)

Die Peptidsynthese erfolgt nach dem Standardprotokoll ausgehend von 167 mg (0.1 mmol) eines mit H<sub>2</sub>N-Ser-O-Trt beladenen Tentagel-Harzes der Fa. *Rapp Polymere GmbH*, Tübingen, mit einer Beladung von 0.60 mmol/g. Der N-Terminus der entstehenden Aminogruppe wird nicht acetyliert. Der nach dem Standardprotokoll erhaltene Rückstand nach dem Abspalten vom Harz wird durch semipräparative RP-HPLC (Phenomenex Luna, Gradient: Wasser/Acetonitril + je 0.1% TFA, 0 min (80:20) → 30 min (60:40) → 40 min (0:100), 60 min, λ = 214 nm, Rt = 30.2 min) gereinigt und anschließend lyophilisiert.

*Ausbeute*: 35.1 mg (36.20 μmol, 36%) farbloses Lyophilisat.

*R<sub>t</sub>* = 30.02 (Phenomenex Luna, Gradient B).

C<sub>47</sub>H<sub>87</sub>N<sub>9</sub>O<sub>12</sub> (M = 970.26 g/mol) [970.65].

*ESI-MS* (positiv), m/z: 970.62 ([M+H]<sup>+</sup>, ber. 970.66).

*HR-ESI-MS* (positiv), m/z: 970.6567 ([M+H]<sup>+</sup>, ber. 970.6552) 1.5 ppm.

<sup>1</sup>H-NMR (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>, COSY, HSQC, HMBC), δ (ppm) = 4.45 - 4.36 (m, 2H, 2xL<sub>α</sub>), 4.26 - 4.24 (m, 2H, 2xT<sub>α</sub>), 4.09 - 4.07 (m, 1H, L<sub>α</sub>), 3.97 - 3.95 (m, 2H, 2xT<sub>β</sub>), 3.77 - 3.76 (m, 1H, L<sub>α</sub>), 2.06 - 1.93 (m, 3H, 3xV<sub>β</sub>), 1.65 - 1.54 (m, 4H, 4xL<sub>γ</sub>), 1.54 - 1.35 (m, 8H, 4xL<sub>β</sub>), 1.00 - 0.98 (m, 6H, 2xT<sub>γ</sub>), 0.92 - 0.81 (m, 42 H, 3xV<sub>γ</sub>, 4xL<sub>δ</sub>).

<sup>13</sup>C-NMR (150.92 MHz, CDCl<sub>3</sub>, HSQC, HMBC), δ (ppm) = 173.19, 172.44, 171.68, 171.45, 171.04, 170.00, 169.96, 168.98, 167.88 (C=O), 66.89, 66.86 (2xT<sub>β</sub>), 58.20, 58.17 (2xT<sub>β</sub>), 57.74, 51.43, 51.36, 51.11 (4xL<sub>α</sub>), 31.25, 31.07, 30.02 (3xV<sub>β</sub>), 22.45, 24.40 (4xL<sub>β</sub>), 24.63, 24.46 (4xL<sub>δ</sub>), 24.54, 23.92, 23.55, 23.45, 23.06, 22.53, 21.94, 21.77, 19.55, 19.53, 18.51, 18.31, 18.17, 18.13 (3xV<sub>γ</sub>,



Rückstand wird durch semipräparative 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,  $R_t = 21.1$  min) gereinigt und anschließend lyophilisiert.

*Ausbeute:* 55.0 mg (18.00  $\mu$ mol, 36%) farbloses Lyophilisat.

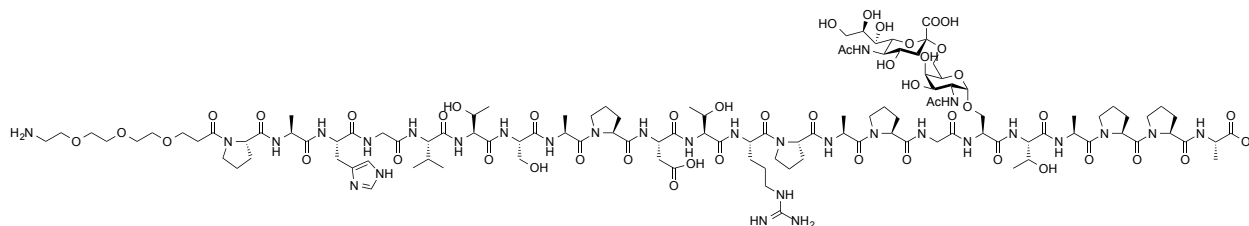
$R_t = 21.1$  (Phenomenex Luna, Gradient A).

$C_{133}H_{202}N_{30}O_{51}$  (M = 3037.24 g/mol) [3035.41].

*ESI-MS* (positiv), m/z: 1548.26 ( $[M+2H]^+$ , ber. 1548.22), 1032.50 ( $[M+3H]3^+$ , ber. 1032.48), 774.73 ( $[M+4H]4^+$ , ber. 774.61).

**5.4.3.2 12-Amino-4,7,10-trioxa-dodecanoyl-L-prolyl-L-alanyl-L-histidyl-glycyl-L-valyl-L-threonyl-L-seryl-L-alanyl-L-prolyl-L-aspartyl-L-threonyl-L-arginyl-L-prolyl-L-alanyl-L-prolyl-glycyl-{2-acetamido-2-desoxy-6-O-[5-acetamido-3,5-dideoxy- $\alpha$ -glycero-D-galacto-2nonulopyranosyl]onat}- $\alpha$ -D-galactopyranosyl}-L-seryl-L-threonyl-L-alanyl-L-prolyl-L-prolyl-L-alanin) 49**

(NH<sub>2</sub>-Spacer-PAHGVTSAPDTRPAPGS(ST<sub>N</sub>)TAPPA-COOH)



Zur Deblockierung der acetylierten Hydroxygruppen des Kohlenhydratantigens werden 35.1 mg (36.20  $\mu$ mol) des Glycopeptids **43** in 50 ml einer wässrigen Natriumhydroxidlösung bei pH 11.0 - 11.5 (ein Natriumhydroxidplättchen in 500 ml Wasser) gelöst und 24 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Nach Beendigung der Reaktion wird durch tropfenweise Zugabe von konzentrierter Essigsäure neutralisiert und das Lösungsmittel anschließend im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wird durch semipräparative RP-HPLC (Phenomenex Luna, 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,  $R_t = 20.1$  min) gereinigt und anschließend lyophilisiert.

*Ausbeute:* 30.0 mg (11.3  $\mu$ mol, 89%) farbloses Lyophilisat.

$R_t = 20.1$  (Phenomenex Luna, Gradient A).

$C_{116}H_{186}N_{30}O_{46}$  ( $M = 2736.93$  g/mol) [2735.31].

*Drehwert:*  $[\alpha]_D^{27} = -103.7$  ( $c = 0.60$ ,  $H_2O$ ), Lit:  $[\alpha]_D^{23} = -105.62$  ( $c = 0.10$ ,  $H_2O$ ).<sup>[152]</sup>

*ESI-MS* (positiv),  $m/z$ : 711.09 ( $[M+4Na]^{4+}$ , ber. 711.07), 933.00 ( $[M+2Na+H]^{3+}$ , ber. 933.10).

*HR-ESI-MS* (positiv),  $m/z$ : 933.0992 ( $[M+H]^+$ , ber. 933.0998) 0.6 ppm.

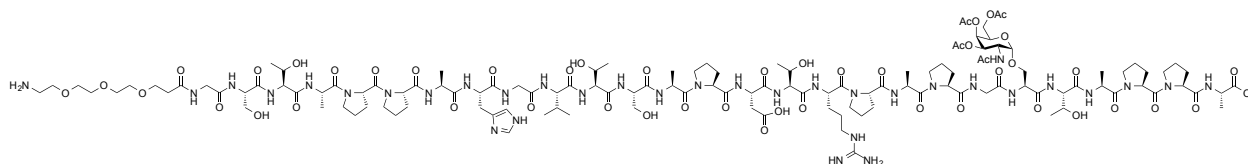
$^1H$ -NMR (600 MHz,  $D_2O$ , COSY, HSQC),  $\delta$  (ppm) = 8.58 (d, 1H,  $J_{H\epsilon, H\delta} = 0.90$  Hz,  $H_\epsilon$ ), 7.28 (d, 1H,  $J_{H\delta, H\epsilon} = 1.46$  Hz,  $H_\delta$ ), 4.82 (d, 1H,  $J_{H1, H2} = 3.50$  Hz,  $H1$ ), 4.71 - 4.61 (m, 3H,  $H_\alpha$  {4.66},  $D_\alpha$  {4.69},  $R_\alpha$  {4.61}), 4.58 - 4.50 (m, 4H,  $4x A_\alpha$ ), 4.42 - 4.24 (11H, m,  $3x T_\alpha$  {4.35, 4.37},  $2x S_\alpha$  {4.41, 4.26},  $6x P_\alpha$  {4.37 - 4.34}), 4.21 - 4.15 (m, 4H,  $V_\alpha$  {4.18},  $2x T_\beta$  {4.17, 4.16},  $A_\alpha$  {4.20}), 4.13 - 4.08 (m, 2H,  $T_\beta$ ), 4.04-4.02 (m, 1H,  $H_2$ ), 4.00-3.98 (m, 1H,  $G_{\alpha1}$ ), 3.96 - 3.88 (m, 6H,  $2x G_{\alpha1}$  {3.96},  $2x G_{\alpha2}$  {3.89},  $H7''$ ,  $H5$  {3.91}), 3.84 - 3.67 (m, 16H,  $H4$  {3.89},  $H9_2''$  {3.80},  $2x S_{\beta1}$  {3.78},  $6x P_{\delta1}$  {3.76},  $H5''$  {3.75},  $H4''$  {3.72},  $H6$  {3.71},  $H2$  {3.69},  $2x S_{\beta2}$  {3.68}), 3.67 - 3.51 (m, 21H,  $6x CH_2$ -O-Spacer {3.64, 3.58},  $6x P_{\delta2}$  {3.62},  $H6''$  {3.60},  $H9_1''$  {3.59},  $H8''$  {3.51}), 3.33 - 3.25 (m, 2H,  $H_2N$ - $CH_2$ -Spacer), 3.19 - 3.13 (m, 4H,  $H_{\beta1}$  {3.18},  $2x R_\delta$  {3.16},  $H_{\beta2}$  {3.15}), 2.95 - 2.83 (m, 2H,  $D_{\beta1}$  {2.93},  $D_{\beta2}$  {2.85}), 2.72 - 2.59 (m, 3H,  $CH_2$ -C=O-Spacer,  $H3''_{aq}$ ), 2.34 - 2.18 (m, 6H,  $6x P_{\beta1}$  {2.29 - 2.19}), 2.08 - 2.05 (m, 1H,  $V_\beta$ ), 2.00 - 1.97 (m, 12H,  $6x P_{\beta2}$ ,  $2x Ac$ -NH {1.99, 1.98}), 1.95 - 1.76 (m, 12H,  $12x P_\gamma$ ), 1.74 - 1.57 (m, 5H,  $2x R_\gamma$ , {1.63},  $2x R_\beta$  {1.72},  $H3''_{ax}$  {1.73}), 1.32 - 1.28 (m, 15H,  $5x A_\beta$ ), 1.17 - 1.13 (m, 9H,  $3x T_\gamma$ ), 0.91 (d, 3H,  $J_{V_{\gamma a}, V_\beta} = 6.35$  Hz,  $V_{\gamma a}$ ), 0.90 (d, 3H,  $J_{V_{\gamma b}, V_\beta} = 6.26$  Hz,  $V_{\gamma b}$ ).

$^{13}C$ -NMR (150.92 MHz,  $CDCl_3$ , HSQC),  $\delta$  (ppm) = 177.28, 177.06, 176.44, 174.98, 174.91, 174.66, 174.46, 174.19, 174.04, 173.97, 173.85, 173.78, 173.75, 173.48, 172.90, 172.54, 172.44, 172.23, 172.02, 171.94, 171.73, 171.56, 171.38, 171.24, 170.84 ( $26x C=O$ ), 133.47 ( $H_\epsilon$ ), 129.37 ( $H_\delta$ ), 99.19 ( $C2''$ ), 97.82 ( $C1$ ), 71.08 ( $C6''$ ), 69.75 ( $C5$ ), 69.63, 69.62, 69.61 ( $6x CH_2$ -O-Spacer), 69.41 ( $C7''$ ), 68.28 ( $C4$ ), 68.19 ( $C8''$ ), 67.65 ( $C4''$ ), 67.63 ( $C3$ ), 67.52, 67.03, 66.96 ( $T_\beta$ ), 66.16 ( $C6$ ), 62.87 ( $C9''$ ), 60.56, 60.52, 60.49, 60.47, 60.43, 60.40, ( $6x P_\alpha$ ), 60.09 ( $2x T_\alpha$ ), 59.53 ( $V_\alpha$ ), 58.89 ( $T_\alpha$ ), 58.68 ( $H_\alpha$ ),

55.18, 54.32 (2xS<sub>α</sub>), 51.76 (C5''), 51.13 (R<sub>α</sub>), 50.89 (C2), 50.07 (D<sub>α</sub>), 49.70, 47.75, 47.70, 47.65, 47.61 (5xA<sub>α</sub>), 42.29, 42.23 (2xG<sub>α</sub>), 39.53 (C3''), 35.66 (H<sub>β</sub>), 35.61 (H<sub>2</sub>N-CH<sub>2</sub>-Spacer), 34.96 (D<sub>β</sub>), 34.07 (C2-Spacer), 29.67, 29.43, 29.39, 29.32, 29.28, 29.20 (6xP<sub>β</sub>), 24.65, 24.62 (P<sub>γ</sub>), 22.05, 22.03 (2xA<sub>c</sub>-NH), 18.87, 18.84, 18.70 (3xT<sub>γ</sub>), 18.40 (V<sub>γa</sub>), 17.64 (V<sub>γb</sub>), 16.25, 15.37, 15.30 (3xA<sub>β</sub>).

**5.4.3.3 12-Amino-4,7,10-trioxa-dodecanoyl-L-glycyl-L-seryl-L-threonyl-L-alanyl-L-prolyl -L-prolyl-L-alanyl-L-histidyl-glycyl-L-valyl-L-threonyl-L-seryl-L-alanyl-L-prolyl-L-aspartyl-L-threonyl-L-arginyl-L-prolyl-L-alanyl-L-prolyl-glycyl-O-(2-acetamido-3,4,6-tri-O-acetyl-2-desoxy-α-D-galactopyranosyl)-L-seryl-L-threonyl-L-alanyl-L-prolyl-L-prolyl-L-alanin) 45**

(H<sub>2</sub>N-Spacer-GSTAPPAHGVTSAPDTRPAPGS(T<sub>N</sub>)TAPPA-COOH)



Die Peptidsynthese erfolgt nach dem Standardprotokoll ausgehend von 588 mg (0.1 mmol) eines mit Fmoc-Ala-O-Trt beladenen Tentagel-Harzes der Fa. *Rapp Polymere GmbH*, Tübingen, mit einer Beladung von 0.17 mmol/g. Die Kupplung der glycosylierten Aminosäure erfolgt manuell im Reaktor des Synthesizers. Dazu werden 131.3 mg (0.2 mmol) des T<sub>N</sub>-Bausteins zusammen mit 2.4 Äquivalenten HATU (91.2 mg, 0.24 mmol), 2.4 Äquivalenten HOAt (32.7 mg, 0.24 mmol) und 5.0 Äquivalenten NMM (55 µl, 0.5 mmol) in einer Kartusche eingewogen und in 2 ml NMP vollständig gelöst. Zur Beschleunigung des Lösungsvorgangs wird die Kartusche kurz in einem Ultraschallbad geschwenkt. Die Reaktionslösung wird anschließend in den Reaktor des Synthesizers gepumpt und 8h bei Raumtemperatur geschüttelt. Die Kupplung der nachfolgenden beiden Aminosäuren erfolgt als Doppelkupplung. Der N-Terminus wird nicht acetyliert. Der nach dem Abspalten vom Harz unter Standardbedingungen erhaltene Rückstand wird durch semipräparative 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<sub>t</sub> = 19.6 min) gereinigt und anschließend lyophilisiert.

*Ausbeute:* 231 mg (77.1  $\mu\text{mol}$ , 77%) farbloses Lyophilisat.

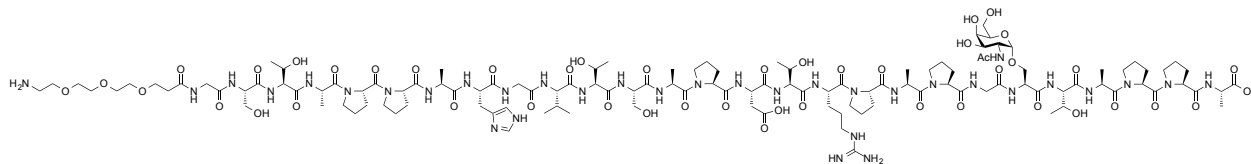
$R_t = 19.6$  (Phenomenex Luna, Gradient A).

$\text{C}_{122}\text{H}_{196}\text{N}_{34}\text{O}_{46}$  ( $M = 3001.17$  g/mol) [2999.44].

*ESI-MS* (positiv),  $m/z$ : 1501.21 ( $[\text{M}+2\text{H}]^+$ , ber. 1501.23), 1001.13 ( $[\text{M}+3\text{H}]^+$ , ber. 1001.15), 751.21 ( $[\text{M}+4\text{H}]^+$ , ber. 751.12).

**5.4.3.4 12-Amino-4,7,10-trioxa-dodecanoyl-L-glycyl-L-seryl-L-threonyl-L-alanyl-L-prolyl -L-prolyl-L-alanyl-L-histidyl-glycyl-L-valyl-L-threonyl-L-seryl-L-alanyl-L-prolyl-L-aspartyl-L-threonyl-L-arginyl-L-prolyl-L-alanyl-L-prolyl-glycyl-O-(2-acetamido-2-desoxy- $\alpha$ -D-galactopyranosyl-L-seryl-L-threonyl-L-alanyl-L-prolyl-L-prolyl-L-alanin **48****

( $\text{H}_2\text{N}$ -Spacer-GSTAPPAHGVTSAPDTRPAPGS( $\text{T}_N$ )TAPPA-COOH)



Zur Deblockierung der acetylierten Hydroxygruppen des Kohlenhydratantigens werden 231 mg (77.10  $\mu\text{mol}$ ) des Glycopeptids **45** in 20 ml absolutem Methanol gelöst. Zu dieser Lösung wird so lange eine 2.5%ige frisch hergestellte Natriummethanolatlösung (0.5 g Natrium in 25 ml Methanol) getropft, bis ein pH-Wert von 10 - 10.5 erreicht ist. Der pH-Wert wird alle 30 min überprüft und gegebenenfalls durch erneute Zugabe der Natriummethanolatlösung nachreguliert. Anschließend wird 3 d bei Raumtemperatur gerührt. Nach Beendigung der Reaktion wird durch Zugabe von konzentrierter Essigsäure neutralisiert und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wird durch semipräparative 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,  $\lambda = 214$  nm,  $R_t = 17.9$  min) gereinigt und anschließend lyophilisiert.

*Ausbeute:* 205 mg (71.30  $\mu\text{mol}$ , 89%) farbloses Lyophilisat.



$R_t = 17.9$  min (Phenomenex Luna, Gradient A).

$C_{122}H_{196}N_{34}O_{46}$  ( $M = 2875.10$  g/mol) [2873.40].

*Drehwert*:  $[\alpha]_D^{27} = -95.9$  ( $c = 0.20$ ,  $H_2O$ ).

*ESI-MS* (positiv),  $m/z$ : 736.08 ( $[M+H+3Na]^{+4}$ , ber. 736.10, 980.95 ( $[M+3Na]^+$ , ber. 980.93), 973.64 ( $[M+H+2Na]^+$ , ber. 973.80), 1448.98 ( $[M+H+Na]^+$ , ber. 1440.20).

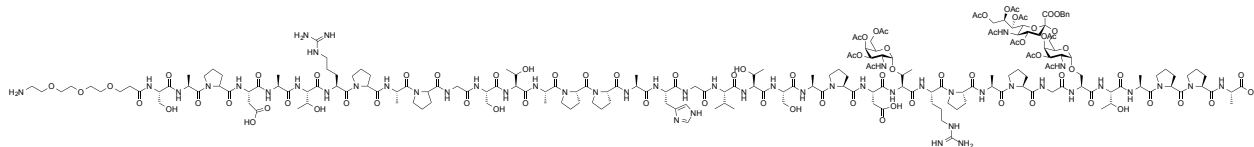
*HR-ESI-MS* (positiv),  $m/z$ : 980.9311 ( $[M+3Na]^{3+}$ , ber. 980.9316) -0.5 ppm.

$^1H$  NMR (600 MHz,  $D_2O$ , COSY, HSQC),  $\delta = 8.58$  (D, 1H,  $J_{H\epsilon, H\delta} = 1.10$  Hz,  $H_\epsilon$ ), 7.28 (d, 1H,  $J_{H\delta, H\epsilon} = 1.44$  Hz,  $H_\delta$ ), 4.83 (d, 1H,  $J_{H1, H2} = 3.55$  Hz,  $H1$ ), 4.71, - 4.64 (m, 3H,  $H_\alpha$  {4.66},  $D_\alpha$  {4.69},  $R_\alpha$  {4.63}), 4.62 - 4.49 (m, 5H,  $5xA_\alpha$ ), 4.42 - 4.25 (14H, m,  $4xT_\alpha$  {4.35, 4.37},  $3xS_\alpha$  {4.41, 4.26},  $7xP_\alpha$  {4.37 - 4.34}), 4.21 - 4.14 (m, 6H,  $V_\alpha$  {4.18},  $3xT_\beta$  {4.17, 4.16},  $A_\alpha$  {4.20}), 4.12- 4.09 (m, 2H,  $T_\beta$ ), 4.06 - 4.03 (m, 1H,  $H2$ ), 3.96 - 3.84 (m, 7H,  $3xG_{\alpha1}$  {3.96},  $3xG_{\alpha2}$  {3.89},  $H5$  {3.91}), 3.83 - 3.71 (m, 17H,  $H4$  {3.89},  $3xS_{\beta1}$  {3.78},  $8xP_{\delta1}$  {3.76},  $H6$  {3.71},  $H2$  {3.69},  $3xS_{\beta2}$  {3.68}), 3.69 - 3.54 (m, 20H,  $6xCH_2-O$ -Spacer {3.64, 3.58},  $8xP_{\delta2}$  {3.62}), 3.27 - 3.23 (m, 2H,  $H_2N-CH_2$ -Spacer), 3.19 - 3.13 (m, 4H,  $H_{\beta1}$  {3.18},  $2xR_\delta$  {3.16},  $H_{\beta2}$  {3.15}), 2.96 - 2.80 (m, 2H,  $D_{\beta1}$  {2.93},  $D_{\beta2}$  {2.85}), 2.56 - 2.55 (m, 2H,  $CH_2-C=O$ -Spacer), 2.35 - 2.20 (m, 8H,  $8xP_{\beta1}$  {2.29 - 2.19}), 2.16 - 2.13 (m, 1H,  $V_\beta$ ), 2.01 - 1.94 (m, 11H,  $8xP_{\beta2}$ ,  $Ac-NH$  {1.98}), 1.93, - 1.78 (m, 14H,  $7xP_\gamma$ ), 1.73 - 1.57 (m, 4H,  $2xR_\gamma$ , {1.63},  $2xR_\beta$  {1.72}), 1.33 - 1.28 (m, 18H,  $6xA_\beta$ ), 1.17 - 1.13 (m, 12H,  $4xT_\gamma$ ), 0.91 - 0.89 (m, 6H,  $V_\gamma$ ).

$^{13}C$ -NMR (100.70 MHz,  $CDCl_3$ , HSQC),  $\delta$  (ppm) = 177.29, 177.05, 174.89, 174.75, 174.23, 174.04, 173.98, 173.95, 173.86, 173.84, 173.77, 173.74, 173.47, 172.96, 172.90, 172.55, 172.23, 172.13, 172.00, 171.92, 171.72, 171.70, 171.55, 171.39, 171.24, 171.19, 171.13, 171.09, 170.87, 170.84 ( $29xC=O$ ), 156.68 ( $R_\zeta$ ), 133.47 ( $H_\epsilon$ ), 128.30 ( $H_\gamma$ ), 117.34 ( $H_\delta$ ), 97.90 ( $C1$ ), 70.62 ( $C5$ ), 70.55, 69.66, 69.62, 69.59, 69.42 ( $6xCH_2-O$ -Spacer), 66.97 ( $C4$ ), 68.40 ( $C3$ ), 67.77, 67.47, 67.02, 66.97 ( $4xT_\beta$ ), 66.49 ( $C6$ ), 61.16, 61.09, 61.02, 60.56, 60.51, 60.10, 60.07 ( $7xP_\alpha$ ), 59.53, 58.90, 58.82, 58.68 ( $4xT_\alpha$ ), 58.95 ( $H_\alpha$ ), 55.42, 55.18, 53.31 ( $3xS_\alpha$ ), 52.32 ( $R_\alpha$ ), 51.14 ( $C2$ ), 50.09 ( $D_\alpha$ ), 49.66, 49.63, 48.61, 47.92, 47.83, 47.74 ( $6xA_\alpha$ ), 43.96, 43.84, 42.47 ( $3xG_\alpha$ ), 35.61 ( $H_\beta$ ), 35.59 ( $H_2N-CH_2$ -Spacer), 34.97 ( $D_\beta$ ,  $C2$ -Spacer), 30.14, 29.39, 29.31, 29.26, 29.19, 29.13, 28.05 ( $7xP_\beta$ ), 24.70, 24.65 ( $P_\gamma$ ), 22.04 ( $Ac-NH$ ), 18.87, 18.79, 18.70, 18.40 ( $4xT_\gamma$ ), 17.64 ( $V_\gamma$ ), 16.38 ( $V_\gamma$ ), 16.03, 15.40, 15.37, 15.31 ( $4xT_\gamma$ ), 15.27, 15.08, 15.01 ( $4xA_\beta$ ).

**5.4.3.5 12-Amino-4,7,10-trioxa-dodecanoyl-L-seryl-L-alanyl-L-prolyl-L-aspartyl-L-threonyl-L-argyl-L-prolyl-L-alanyl-L-prolyl-glycyl-L-seryl-L-threonyl-L-alanyl-L-prolyl-L-prolyl-L-alanyl-L-histidyl-glycyl-L-valyl-L-threonyl-L-seryl-L-alanyl-L-prolyl-L-aspartyl-L-O-(2-acetamido-3,4,6-tri-O-acetyl-2-desoxy- $\alpha$ -D-galactopyranosyl)-threonyl-L-arginyl-L-prolyl-L-alanyl-L-prolyl-glycyl-{2-acetamido-3,4-di-O-acetyl-2-desoxy-6-O-[benzyl-(5-acetamido-4,7,8,9-tetra-O-acetyl-3,5-didesoxy- $\alpha$ -glycero-D-galacto-2-nonulopyranosyl)onat]- $\alpha$ -D-galactopyranosyl}-L-seryl-L-threonyl-L-alanyl-L-prolyl-L-prolyl-L-alanin 46**

(NH<sub>2</sub>-Spacer-SAPDTRPAPGSTAPPAHGVTSAPDT(T<sub>N</sub>)RPAPGS(ST<sub>N</sub>)TAPPA-COOH)



Die Peptidsynthese erfolgt nach dem Standardprotokoll ausgehend von 588 mg (0.1 mmol) eines mit Fmoc-Ala-O-Trt beladenen Tentagel-Harzes der Fa. *Rapp Polymere GmbH*, Tübingen, mit einer Beladung von 0.17 mmol/g. Die Kupplung der glycosylierten Aminosäure erfolgt manuell im Reaktor des Synthesizers. Dazu werden 233.4 mg (0.2 mmol) des Sialyl-T<sub>N</sub>-Serin-Bausteins zusammen mit 2.4 Äquivalenten HATU (91.2 mg, 0.24 mmol), 2.4 Äquivalenten HOAt (32.7 mg, 0.24 mmol) und 5.0 Äquivalenten NMM (50  $\mu$ l, 0.50 mmol) in einer Kartusche eingewogen und in 2 ml NMP vollständig gelöst. Zur Beschleunigung des Lösungsvorgangs wird die Kartusche kurz in einem Ultraschallbad geschwenkt. Die Reaktionslösung wird anschließend in den Reaktor des Synthesizers gepumpt und 8h bei Raumtemperatur geschüttelt. Die Kupplung der nachfolgenden beiden Aminosäuren erfolgt als Doppelkupplung. Die Kupplung des T<sub>N</sub>-Bausteins erfolgte analog zu der des Sialyl-T<sub>N</sub>-Bausteins. Die Kupplung des nachfolgenden Aspartats wird als Doppelkupplung durchgeführt. Der N-Terminus wird nicht acetyliert. Es wird nur ein Drittel des Harzes entnommen, der Rest wird für weitere Festphasensynthesen verwendet. Der nach dem Abspalten vom Harz unter Standardbedingungen erhaltene Rückstand wird durch semipräparative RP-HPLC (Phenomenex Luna, 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,  $R_t = 27.6$  min) gereinigt und anschließend lyophilisiert.

*Ausbeute:* 100.0 mg (21.07  $\mu$ mol, 63%) farbloses Lyophilisat.

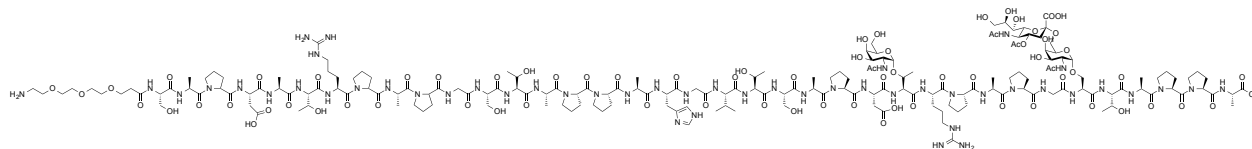
$R_t = 21.6$  min (Phenomenex Luna, Gradient A).

$C_{205}H_{313}N_{49}O_{80}$  ( $M = 4744.02$  g/mol) [4741.19].

*ESI-MS* (positiv),  $m/z$ : 1183.44 ( $[M+4H]^+$ , ber. 1183.55), 1577.72 ( $[M+3H]^3+$ , ber. 1577.73).

**5.4.3.6 12-Amino-4,7,10-trioxa-dodecanoyl-L-seryl-L-alanyl-L-prolyl-L-aspartyl-L-threonyl-L-argyl-L-prolyl-L-alanyl-L-prolyl-glycyl-L-seryl-L-threonyl-L-alanyl-L-prolyl-L-prolyl-L-alanyl-L-histidyl-glycyl-L-valyl-L-threonyl-L-seryl-L-alanyl-L-prolyl-L-aspartyl-L-O-(2-acetamido-2-desoxy- $\alpha$ -D-galactopyranosyl)-threonyl-L-arginyl-L-prolyl-L-alanyl-L-prolyl-glycyl-{2-acetamido-2-desoxy-6-O-[5-acetamido-3,5-dideoxy- $\alpha$ -glycero-D-galacto-2nonulopyranosyl]onat}- $\alpha$ -D-galactopyranosyl}-L-seryl-L-threonyl-L-alanyl-L-prolyl-L-prolyl-L-alanin 50**

( $NH_2$ -Spacer-SAPDTRPAGSTAPPAHGVTSAPDT( $T_N$ )RPAPGS( $ST_N$ )TAPPA-COOH)



Zur Deblockierung der acetylierten Hydroxygruppen des Kohlenhydratantigens werden 100.0 mg (21.07  $\mu$ mol) des Glycopeptids **46** in 50 ml einer wässrigen Natriumhydroxidlösung bei pH 11.0 - 11.5 (ein Natriumhydroxidplättchen in 500 ml Wasser) gelöst und 24 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Nach Beendigung der Reaktion wird durch tropfenweise Zugabe von konzentrierter Essigsäure neutralisiert und das Lösungsmittel anschließend im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wird durch semipräparative 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,  $R_t = 22.4$  min) gereinigt und anschließend lyophilisiert.

*Ausbeute:* 71.9 mg (10.08  $\mu\text{mol}$ , 52%) farbloses Lyophilisat.

$R_t = 22.4$  min (Phenomenex Luna, Gradient A).

$\text{C}_{182}\text{H}_{291}\text{N}_{49}\text{O}_{72}$  ( $M = 4317.60$  g/mol) [4315.06].

*Drehwert:*  $[\alpha]_D^{28} = -121.6$  ( $c = 0.31$ ,  $\text{H}_2\text{O}$ ).

*ESI-MS* (positiv),  $m/z$ : 1066.47 ( $[\text{M}+4\text{H}]^{4+}$ , ber. 1066.26), 1421.81 ( $[\text{M}+3\text{H}]^{3+}$ , ber. 1421.35).

*HR-ESI-MS* (positiv),  $m/z$ : 1421.0143 ( $[\text{M}+3\text{Na}]^{3+}$ , ber. 1421.0145) 0.1 ppm.

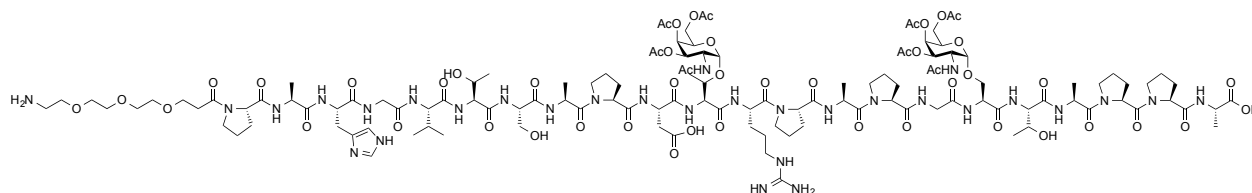
$^1\text{H-NMR}$  (600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , COSY, HSQC),  $\delta$  (ppm) = 8.57 (d, 1H,  $J_{\text{H}\epsilon, \text{H}\delta} = 1.17$  Hz,  $\text{H}_\epsilon$ ), 7.27 ( $s_{\text{br}}$ , 1H,  $\text{H}_\delta$ ), 4.82 (d, 1H,  $J_{\text{H}1, \text{H}2} = 3.81$  Hz,  $\text{H}1$ ), 4.81 (d, 1H,  $J_{\text{H}1, \text{H}2} = 3.73$  Hz,  $\text{H}1$ ), 4.71 - 4.62 (m, 5H,  $\text{H}_\alpha$  {4.66},  $2\text{D}_\alpha$  {4.69},  $2\text{xR}_\alpha$  {4.62}), 4.61 - 4.47 (m, 6H,  $6\text{xA}_\alpha$ ), 4.42 - 4.27 (19H, m,  $5\text{xT}_\alpha$  {4.35, 4.37},  $4\text{xS}_\alpha$  {4.41, 4.26},  $10\text{xP}_\alpha$  {4.37 - 4.34}), 4.20 - 4.13 (m, 6H,  $\text{V}_\alpha$  {4.18},  $4\text{xT}_\beta$  {4.17, 4.16},  $2\text{A}_\alpha$  {4.20}), 4.13 - 4.08 (m, 2H,  $\text{T}_\beta$ ), 4.05 - 4.01 (m, 2H,  $2\text{xH}2$ ), 4.00 - 3.86 (m, 9H,  $3\text{xG}_{\alpha 1}$  {3.96},  $3\text{xG}_{\alpha 2}$  {3.89},  $\text{H}7''$ ,  $2\text{xH}5$  {3.91}), 3.83 - 3.72 (m, 26H,  $2\text{xH}4$  {3.89},  $\text{H}9_2''$  {3.80},  $4\text{xS}_{\beta 1}$  {3.78},  $9\text{xP}_{\delta 1}$  {3.76},  $\text{H}5''$  {3.75},  $\text{H}4''$  {3.72},  $2\text{xH}6$  {3.71},  $2\text{xH}2$  {3.69},  $4\text{xS}_{\beta 2}$  {3.68}), 3.71 - 3.53 (m, 25H,  $6\text{xCH}_2\text{-O-Spacer}$  {3.64, 3.58},  $10\text{xP}_{\delta 2}$  {3.62},  $\text{H}6''$  {3.60},  $\text{H}9_1''$  {3.59},  $\text{H}8''$  {3.51}), 3.45 - 3.43 (m, 2H,  $\text{H}_2\text{N-CH}_2\text{-Spacer}$ ), 3.25 (m, 2H,  $\text{H}_{\beta 1}$  {3.18},  $\text{H}_{\beta 2}$  {3.15}), 3.19 - 3.13 (m, 4H,  $2\text{xR}_\delta$ ), 2.96 - 2.80 (m, 4H,  $2\text{D}_{\beta 1}$  {2.93},  $2\text{D}_{\beta 2}$  {2.85}), 2.65 (dd, 1H,  $J_{\text{H}3\text{äq}'', \text{H}3\text{ax}''} = 12.67$  Hz,  $J_{\text{H}3\text{äq}'', \text{H}4''} = 4.52$  Hz,  $\text{H-3äq}''$ ), 2.59 - 2.56 (m, 2H,  $\text{CH}_2\text{-C=O-Spacer}$ ), 2.35 - 2.18 (m, 50H,  $10\text{xP}_{\beta 1}$  {2.29 - 2.19},  $\text{V}_\beta$  {2.08 - 1.76},  $10\text{xP}_{\beta 2}$  {2.00 - 1.97},  $3\text{xAc-NH}$  {1.99, 1.98},  $10\text{xP}_\gamma$  {1.95 - 1.76}), 1.74 - 1.59 (m, 5H,  $2\text{xR}_\gamma$ , {1.63},  $2\text{xR}_\beta$  {1.72},  $\text{H}3''_{\text{ax}}$  {1.73}), 1.38 - 1.27 (m, 21H,  $8\text{xA}_\beta$ ), 1.22, 1.19, 1.17 - 1.13 (m, 15H,  $5\text{xT}_\gamma$ ), 0.90 - 0.88 (m, 6H,  $\text{V}_\gamma$ ).

$^{13}\text{C-NMR}$  (150.92 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , HSQC),  $\delta$  (ppm) = 176.32, 174.84, 174.82, 174.79, 174.56, 174.18, 174.11, 173.94, 173.86, 173.76, 173.64, 173.57, 173.42, 173.07, 173.04, 172.94, 172.86, 172.75, 172.65, 172.62, 172.44, 172.15, 172.14, 171.90, 171.85, 171.49, 171.46, 171.30, 171.24, 171.20, 171.19, 171.15, 171.05, 170.98, 170.94, 170.89, 170.85, 170.78, 170.74 ( $39\text{xC=O}$ ), 156.61 ( $\text{R}_\zeta$ ), 133.39 ( $\text{R}_\zeta$ ), 119.11 ( $\text{H}_\gamma$ ), 117.26 ( $\text{H}_\delta$ ), 117.18, 113.31 ( $\text{C}_{\text{Bn}}$ ), 98.87, 98.48 ( $2\text{xC}1$ ), 97.73 ( $\text{C}2''$ ), 71.34 ( $\text{C}6''$ ), 70.86, 69.65 ( $2\text{xC}5$ ), 69.54, 69.44, 69.37 ( $6\text{xCH}_2\text{-O-Spacer}$ ), 69.34 ( $\text{C}7''$ ), 68.44, 68.41 ( $2\text{xC}4$ ), 68.37 ( $\text{C}8''$ ), 67.54 ( $\text{C}4''$ ), 67.43 ( $2\text{xC}3$ ), 67.17, 66.98, 66.95 ( $5\text{xT}_\beta$ ), 66.59, 66.43 ( $2\text{xC}6$ ),

63.57 (C9''), 63.06, 62.86, 61.29, 61.25, 61.14, 61.08, 61.01, 60.71, 60.56 (10xP<sub>α</sub>), 60.53, 60.47, 60.41, 60.33, 60.29 (5xT<sub>α</sub>), 60.24 (V<sub>α</sub>), 58.87 (H<sub>α</sub>), 58.81, 55.53, 55.13, 55.10 (4xS<sub>α</sub>), 51.95 (C5''), 51.66, 51.06 (2xR<sub>α</sub>), 50.99, 50.90 (2xC<sub>2</sub>), 50.04 (2XD<sub>α</sub>), 50.03, 49.99, 49.74, 49.54, 49.47 (8xA<sub>α</sub>), 42.33, 42.19, 42.16 (3xG<sub>α</sub>), 39.28 (C3''), 35.45 (H<sub>β</sub>), 35.05 (H<sub>2</sub>N-CH<sub>2</sub>-Spacer), 34.88 (2xD<sub>β</sub>, C2-Spacer), 30.05, 29.33, 29.28, 29.24, 29.16, 29.11 (10xP<sub>β</sub>), 24.67, 24.64, 24.61, 24.56, 24.53, 24.46, 24.06, 23.92 (10xP<sub>γ</sub>), 22.21, 21.98, 21.97 (3xAcNH), 18.79, 18.75, 18.69, 18.62, 18.32 (5xT<sub>γ</sub>), 17.56 (V<sub>γ</sub>), 16.31, 15.95, 15.41, 15.37, 15.32, 15.25, 15.15 (8xA<sub>β</sub>).

**5.4.3.7 12-Amino-4,7,10-trioxa-dodecanoyl-L-glycyl-L-seryl-L-threonyl-L-alanyl-L-prolyl-L-prolyl-L-alanyl-L-histidyl-glycyl-L-valyl-L-threonyl-L-seryl-L-alanyl-L-prolyl-L-aspartyl-O-(2-acetamido-3,4,6-tri-O-acetyl-2-desoxy-α-D-galactopyranosyl)-L-threonyl-L-arginyl-L-prolyl-L-alanyl-L-prolyl-glycyl-O-(2-acetamido-3,4,6-tri-O-acetyl-2-desoxy-α-D-galactopyranosyl)-L-seryl-L-threonyl-L-alanyl-L-prolyl-L-prolyl-L-alanin 44**

(H<sub>2</sub>N-Spacer-GSTAPPAHGVT SAPDT(T<sub>N</sub>)RPAPGS(T<sub>N</sub>)TAPPA-COOH)



Die Peptidsynthese erfolgt nach dem Standardprotokoll ausgehend von 588 mg (0.1 mmol) eines mit Fmoc-Ala-O-Trt beladenen Tentagel-Harzes der Fa. *Rapp Polymere GmbH*, Tübingen, mit einer Beladung von 0.17 mmol/g. Die Kupplung der glycosylierten Aminosäure erfolgt manuell im Reaktor des Synthesizers. Dazu werden 65.6 mg (0.1 mmol) des T<sub>N</sub>-Serin-Bausteins bzw. 68.5 mg (0.1 mmol) des T<sub>N</sub>-Threonin-Bausteins zusammen mit 2.4 Äquivalenten HATU (91.2 mg, 0.24 mmol), 2.4 Äquivalenten HOAt (16.4 mg, 0.5 mmol) und 5.0 Äquivalenten NMM (28 µl, 0.25 mmol) in einer Kartusche eingewogen und in 2 ml NMP vollständig gelöst. Zur Beschleunigung des Lösungsvorgangs wird die Kartusche kurz in einem Ultraschallbad geschwenkt. Die Reaktionslösung wird anschließend in den Reaktor des Synthesizers gepumpt

und 8h bei Raumtemperatur geschüttelt. Die Kupplung der nachfolgenden beiden Aminosäuren erfolgt als Doppelkupplung. Der N-Terminus wird nicht acetyliert. Der nach dem Abspalten vom Harz unter Standardbedingungen erhaltene Rückstand wird durch semipräparative 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,  $R_t = 23.6$  min) gereinigt und anschließend lyophilisiert.

*Ausbeute:* 98.0 mg (46.80  $\mu$ mol, 87%) farbloses Lyophilisat.

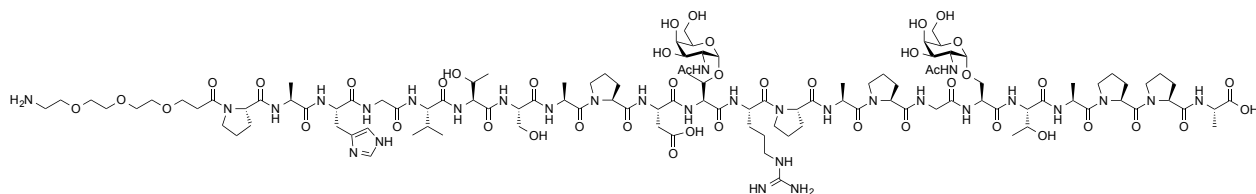
$R_t = 23.6$  (Phenomenex Luna, Gradient A).

$C_{125}H_{195}N_{30}O_{50}$  (M = 2917.09 g/mol) [2915.6].

*ESI-MS* (positiv), m/z: 1501.21 ( $[M+2H]^+$ , ber. 1501.23), 1001.13 ( $[M+3H]^+$ , ber. 1001.15), 751.21 ( $[M+4H]^+$ , ber. 751.12).

**5.4.3.8 12-Amino-4,7,10-trioxa-dodecanoyl-L-glycyl-L-seryl-L-threonyl-L-alanyl-L-prolyl-L-prolyl-L-alanyl-L-histidyl-glycyl-L-valyl-L-threonyl-L-seryl-L-alanyl-L-prolyl-L-aspartyl-O-(2-acetamido-2-desoxy- $\alpha$ -D-galactopyranosyl)-L-threonyl-L-arginyl-L-prolyl-L-alanyl-L-prolyl-glycyl-O-(2-acetamido-2-desoxy- $\alpha$ -D-galactopyranosyl)-L-seryl-L-threonyl-L-alanyl-L-prolyl-L-prolyl-L-alanin **47****

(H<sub>2</sub>N-Spacer-GSTAPPAHGVTSPAPDT(T<sub>N</sub>)RPAPGS(T<sub>N</sub>)TAPPA-COOH)



Zur Deblockierung der acetylierten Hydroxygruppen des Kohlenhydratantigens werden 98.0 mg (46.80  $\mu$ mol) des Glycopeptids **44** in 20 ml absolutem Methanol gelöst. Zu dieser Lösung wird so lange eine 2.5%ige frisch hergestellte Natriummethanolatlösung (0.5 g Natrium in 25 ml Methanol) getropft, bis ein pH-Wert von 10 - 10.5 erreicht ist. Der pH-Wert wird alle 30 min überprüft und gegebenenfalls durch erneute Zugabe der Natriummethanolatlösung nachreguliert.

Anschließend wird 3 d bei Raumtemperatur gerührt. Nach Beendigung der Reaktion wird durch Zugabe von konzentrierter Essigsäure neutralisiert und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wird durch semipräparative 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,  $R_t = 22.1$  min) gereinigt und anschließend lyophilisiert.

*Ausbeute:* 18 mg (71.30  $\mu$ mol, 20%) farbloses Lyophilisat.

$R_t = 22.1$  min (Phenomenex Luna, Gradient A).

$C_{113}H_{182}N_{30}O_{44}$  ( $M = 2664.87$  g/mol) [2663.29].

*Drehwert:*  $[\alpha]_D^{27} = -94.7$  ( $c = 0.20$ ,  $H_2O$ ).

*ESI-MS* (positiv),  $m/z$ : 1333.28 ( $[M+2H]^{+2}$ , ber. 1333.16, 889.19 ( $[M+3H]^{+3}$ , ber. 889.11).

*HR-ESI-MS* (positiv),  $m/z$ : 1332.7872, ( $[M+2H]^{2+}$ , ber. 1332.7863) 0.7 ppm.

$^1H$ -NMR (600 MHz,  $D_2O$ , COSY, HSQC),  $\delta$  (ppm) = 8.58 (d, 1H,  $J_{H\epsilon, H\delta} = 0.90$  Hz,  $H_\epsilon$ ), 7.28 (d, 1H,  $J_{H\delta, H\epsilon} = 1.46$  Hz,  $H_\delta$ ), 4.82 (d, 2H,  $J_{H1, H2} = 3.50$  Hz, 2xH1), 4.71 - 4.61 (m, 3H,  $H_\alpha$  {4.66},  $D_\alpha$  {4.69},  $R_\alpha$  {4.61}), 4.58 - 4.50 (m, 4H, 4x $A_\alpha$ ), 4.42 - 4.24 (11H, m, 3x $T_\alpha$  {4.35, 4.37}, 2x $S_\alpha$  {4.41, 4.26}, 6x $P_\alpha$  {4.37 - 4.34}), 4.21 - 4.15 (m, 4H,  $V_\alpha$  {4.18}, 2x $T_\beta$  {4.17, 4.16},  $A_\alpha$  {4.20}), 4.13 - 4.08 (m, 2H,  $T_\beta$ ), 4.04-4.02 (m, 2H, 2xH2), 4.00-3.98 (m, 1H,  $G_{\alpha1}$ ), 3.96 - 3.88 (m, 6H, 2x $G_{\alpha1}$  {3.96}, 2x $G_{\alpha2}$  {3.89}, 2xH5 {3.91}), 3.84 - 3.67 (m, 19H, 2xH4 {3.89}, 2x $S_{\beta1}$  {3.78}, 6x $P_{\delta1}$  {3.76}, 2xH6 {3.71}, 2xH2 {3.69}, 2x $S_{\beta2}$  {3.68}), 3.67 - 3.51 (m, 18H, 6x $CH_2$ -O-Spacer {3.64, 3.58}, 6x $P_{\delta2}$  {3.62}), 3.33 - 3.25 (m, 2H,  $H_2N$ - $CH_2$ -Spacer), 3.19 - 3.13 (m, 4H,  $H_{\beta1}$  {3.18}, 2x $R_\delta$  {3.16},  $H_{\beta2}$  {3.15}), 2.95 - 2.83 (m, 2H,  $D_{\beta1}$  {2.93},  $D_{\beta2}$  {2.85}), 2.72 - 2.59 (m, 3H,  $CH_2$ -C=O-Spacer,  $H3''_{aq}$ ), 2.34 - 2.18 (m, 6H, 6x $P_{\beta1}$  {2.29 - 2.19}), 2.08 - 2.05 (m, 1H,  $V_\beta$ ), 2.00 - 1.97 (m, 12H, 6x $P_{\beta2}$ , 2x $AC$ -NH {1.99, 1.98}), 1.95 - 1.76 (m, 12H, 12x $P_\gamma$ ), 1.74 - 1.57 (m, 5H, 2x $R_\gamma$ , {1.63}, 2x $R_\beta$  {1.72},  $H3''_{ax}$  {1.73}), 1.32 - 1.28 (m, 15H, 5x $A_\beta$ ), 1.17 - 1.13 (m, 9H, 3x $T_\gamma$ ), 0.91 (d, 3H,  $J_{V_{ya}, V_\beta} = 6.35$  Hz,  $V_{ya}$ ), 0.90 (d, 3H,  $J_{V_{yb}, V_\beta} = 6.26$  Hz,  $V_{yb}$ ).

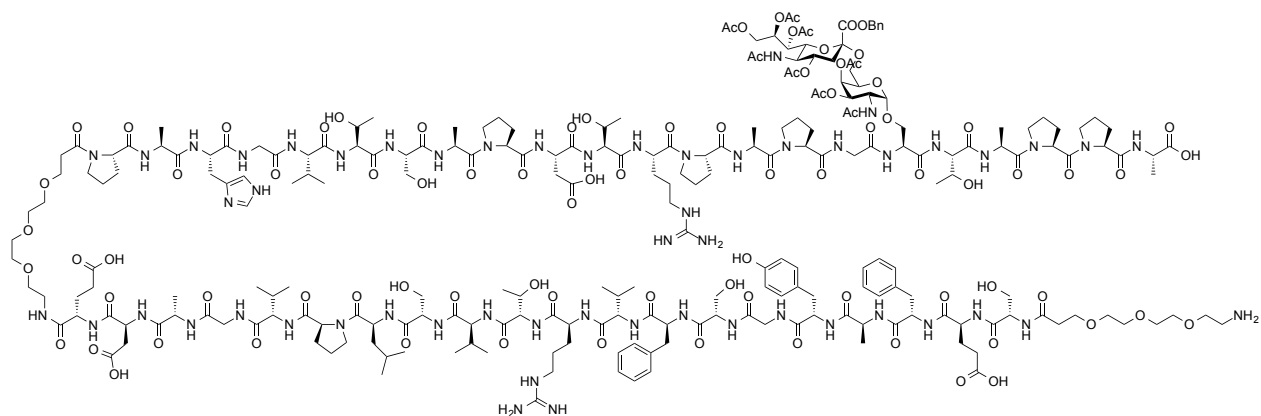
$^{13}C$ -NMR (150.92 MHz,  $CDCl_3$ , HSQC),  $\delta$  (ppm) = 177.28, 177.06, 176.44, 174.98, 174.91, 174.66, 174.46, 174.19, 174.04, 173.97, 173.85, 173.78, 173.75, 173.48, 172.90, 172.54, 172.44, 172.23, 172.02, 171.94, 171.73, 171.56, 171.38, 171.24, 170.84 (26xC=O), 133.47 ( $H_\epsilon$ ), 129.37 ( $H_\delta$ ), 97.82

(C1), 69.75 (C5), 69.63, 69.62, 69.61 (6xCH<sub>2</sub>-O-Spacer), 68.28 (C4), 67.63 (C3), 67.52, 67.03, 66.96 (T<sub>β</sub>), 66.16 (C6), 60.56, 60.52, 60.49, 60.47, 60.43, 60.40, (6xP<sub>α</sub>), 60.09 (2xT<sub>α</sub>), 59.53 (V<sub>α</sub>), 58.89 (T<sub>α</sub>), 58.68 (H<sub>α</sub>), 55.18, 54.32 (2xS<sub>α</sub>), 51.76 (C5''), 51.13 (R<sub>α</sub>), 50.89 (C2), 50.07 (D<sub>α</sub>), 49.70, 47.75, 47.70, 47.65, 47.61 (5xA<sub>α</sub>), 42.29, 42.23 (2xG<sub>α</sub>), 39.53 (C3''), 35.66 (H<sub>β</sub>), 35.61 (H<sub>2</sub>N-CH<sub>2</sub>-Spacer), 34.96 (D<sub>β</sub>), 34.07 (C2-Spacer), 29.67, 29.43, 29.39, 29.32, 29.28, 29.20 (6xP<sub>β</sub>), 24.65, 24.62 (P<sub>γ</sub>), 22.05, 22.03 (2xAc-NH), 18.87, 18.84, 18.70 (3xT<sub>γ</sub>), 18.40 (V<sub>va</sub>), 17.64 (V<sub>vb</sub>), 16.25, 15.37, 15.30 (3xA<sub>β</sub>).

## 5.4.4 Synthese der Zweikomponenten-Vakzine

### 5.4.4.1 12-Amino-4,7,10-trioxa-dodecanoyl-L-seryl-L-glutamyl-L-phenylalanyl-L-alanyl-L-tyrosyl-glycyl-L-seryl-L-phenylalanyl-L-valyl-L-arginyl-threonyl-L-valyl-L-seryl-L-leucyl-L-prolyl-L-valyl-glycyl-L-alanyl-L-aspartyl-L-glutamyl-12-amino-4,7,10-trioxa-dodecanoyl-L-prolyl-L-alanyl-L-histidyl-glycyl-L-valyl-L-threonyl-L-seryl-L-alanyl-L-prolyl-L-aspartyl-L-threonyl-L-arginyl-L-prolyl-L-alanyl-L-prolyl-glycyl-O-{2-acetamido-3,4-di-O-acetyl-2-desoxy-6-O-[benzyl-(5-acetamido-4,7,8,9-tetra-O-acetyl-3,5-didesoxy-α-glycero-D-galacto-2-nonulo-pyranosyl)onat]-α-D-galactopyranosyl}-L-seryl-L-threonyl-L-alanyl-L-prolyl-L-prolyl-L-alanin 68

(H<sub>2</sub>N-Spacer-SEFAYGSFVRTVSLPVGAE-Spacer-PAHGVTSAPDT(T<sub>N</sub>)RPAPGS(T<sub>N</sub>)TAPPA-COOH)



Die Peptidsynthese erfolgt nach dem Standardprotokoll ausgehend von 588 mg (0.1 mmol) eines mit Fmoc-Ala-O-Trt beladenen Tentagel-Harzes der Fa. *Rapp Polymere GmbH* (Tübingen) mit einer Beladung von 0.17 mmol/g. Die Kupplung der glycosylierten Aminosäure erfolgt



manuell im Reaktor des Synthesizers. Dazu werden 233.4 mg (0.2 mmol) des Sialyl-T<sub>N</sub>-Bausteins zusammen mit 2.4 Äquivalenten HATU (91.2 mg, 0.24 mmol), 2.4 Äquivalenten HOAt (32.7 mg, 0.24 mmol) und 5.0 Äquivalenten NMM (50 µl, 0.50 mmol) in einer Kartusche eingewogen und in 2 ml NMP vollständig gelöst. Zur Beschleunigung des Lösungsvorgangs wird die Kartusche kurz in einem Ultraschallbad geschwenkt. Die Reaktionslösung wird anschließend in den Reaktor des Synthesizers gepumpt und 8h bei Raumtemperatur geschüttelt. Die Kupplung der nachfolgenden beiden Aminosäuren erfolgt als Doppelkupplung. Der N-Terminus wird nicht acetyliert. Der nach dem Abspalten vom Harz unter Standardbedingungen erhaltene Rückstand wird durch semipräparative 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<sub>t</sub> = 27.3 min) gereinigt und anschließend lyophilisiert.

*Ausbeute:* 294 mg (56.1 µmol, 55%) farbloses Lyophilisat.

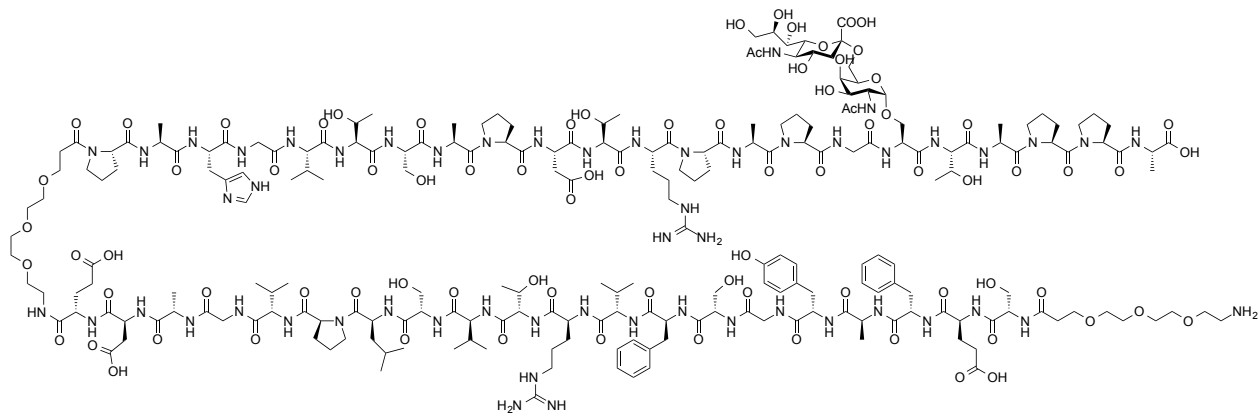
R<sub>t</sub> = 27.3 min (Phenomenex Luna, Gradient A).

C<sub>238</sub>H<sub>360</sub>N<sub>54</sub>O<sub>86</sub> (M = 5350.55 g/mol) [5353.79].

*ESI-MS* (positiv), m/z: 1083.25 ([M+5H]<sup>5+</sup>, ber. 1083.12), 1353.81 ([M+4H]<sup>4+</sup>, ber. 1353.65), 1804.90 ([M+3H]<sup>3+</sup>, ber. 1804.53).

**5.4.4.2 12-Amino-4,7,10-trioxa-dodecanoyl-L-seryl-L-glutamyl-L-phenylalanyl-L-alanyl-L-tyrosyl-glycyl-L-seryl-L-phenylalanyl-L-valyl-L-arginyl-threonyl-L-valyl-L-seryl-L-leucyl-L-prolyl-L-valyl-glycyl-L-alanyl-L-aspartyl-L-glutamyl-12-amino-4,7,10-trioxa-dodecanoyl-L-prolyl-L-alanyl-L-histidyl-glycyl-L-valyl-L-threonyl-L-seryl-L-alanyl-L-prolyl-L-aspartyl-L-threonyl-L-arginyl-L-prolyl-L-alanyl-L-prolyl-glycyl-O-{2-acetamido-2-desoxy-6-O-[5-acetamido-3,5-didesoxy-α-glycero-D-galacto-2-nonulopyrano-syl]onat}-α-D-galactopyranosyl}-L-seryl-L-threonyl-L-alanyl-L-prolyl-L-prolyl-L-alanin 69**

(H<sub>2</sub>N-Spacer-SEFAYGSFVRTVSLPVGAD-ESpacer-PAHGVTSAPDT(T<sub>N</sub>)RPAPGS(T<sub>N</sub>)TAPPA-COOH)



Zur Deblockierung der acetylierten Hydroxygruppen des Kohlenhydratantigens werden 96 mg (18.4  $\mu\text{mol}$ ) des Glycopeptids **68** in 50 ml einer wässrigen Natriumhydroxidlösung bei pH 11.0 - 11.5 (ein Natriumhydroxidplättchen in 500 ml Wasser) gelöst und 24 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Nach Beendigung der Reaktion wird durch tropfenweise Zugabe von konzentrierter Essigsäure neutralisiert und das Lösungsmittel anschließend im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wird durch semipräparative 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,  $\lambda$  = 214 nm,  $R_t$  = 25.5 min) gereinigt und anschließend lyophilisiert.

*Ausbeute:* 38 mg (7.52  $\mu\text{mol}$ , 41%) farbloses Lyophilisat.

$R_t$  = 25.5 (Phenomenex Luna, Gradient A).

$\text{C}_{221}\text{H}_{344}\text{N}_{54}\text{O}_{81}$  (M = 5053.48 g/mol) [5050.45].

*Drehwert:*  $[\alpha]_D^{25} = -104.7$  (c = 0.04,  $\text{H}_2\text{O}$ ).

*ESI-MS* (positiv), m/z: 1286.38 ( $[\text{M}+\text{H}]^+$ , ber. 1268.12), 1690.98 ( $[\text{M}+\text{H}]^+$ , ber. 1690.49).

*HR-ESI-MS* (positiv), m/z: 1689.8241 ( $[\text{M}+\text{H}]^+$ , ber. 1689.8214) 1.5 ppm.

$^1\text{H-NMR}$  (600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , COSY, HSQC),  $\delta$  (ppm) = 8.58 (d, 1H,  $J_{\text{H}_\epsilon, \text{H}_\delta} = 1.28$  Hz,  $\text{H}_\epsilon$ ), 7.28 - 7.09 (m, 15H,  $2 \times \text{F}_{\text{ar}}$  {7.28 - 7.16},  $\text{Y}_{\text{ar}}$  {7.12 - 7.09},  $\text{H}_\delta$ ), 4.86 - 4.76 (m, 2H,  $\text{H}_1$  {4.86},  $\text{H}_4''$  {4.82}), 4.71 - 4.61 (m, 7H,  $\text{H}_\alpha$  {4.66},  $2 \times \text{D}_\alpha$  {4.69},  $2 \times \text{R}_\alpha$  {4.61}.  $2 \times \text{F}_\alpha$ ), 4.58 - 4.50 (m, 8H,  $7 \times \text{A}_\alpha$ , 4.57  $\text{Y}_\alpha$ ), 4.42 - 4.24 (18H, m,  $4 \times \text{T}_\alpha$  {4.35, 4.37},  $5 \times \text{S}_\alpha$  {4.41, 4.26},  $\text{L}_\alpha$ ,  $7 \times \text{P}_\alpha$ ,  $2 \times \text{E}_\alpha$  {4.37 - 4.34}), 4.21 - 4.15 (m, 9H,  $4 \times \text{V}_\alpha$  {4.18},  $4 \times \text{T}_\beta$  {4.17, 4.16},  $\text{A}_\alpha$  {4.20}), 4.13 - 4.08 (m, 2H,  $\text{T}_\beta$ ), 4.04-4.02 (m, 1H,  $\text{H}_2$ ), 4.00-3.98

(m, 4H, 4xG<sub>α1</sub>), 3.96 - 3.88 (m, 8H, 4xG<sub>α1</sub> {3.96}, 2xG<sub>α2</sub> {3.89}, H7'', H5 {3.91}), 3.84 - 3.67 (m, 22H, H4 {3.89}, H92'' {3.80}, 5xS<sub>β1</sub> {3.78}, 7xP<sub>δ1</sub> {3.76}, H5'' {3.75}, H6 {3.71}, H2 {3.69}, 5xS<sub>β2</sub> {3.68}), 3.67 - 3.51 (m, 33H, 12xCH<sub>2</sub>-O-Spacer {3.64, 3.58}, 7xP<sub>δ2</sub> {3.62}, H6'' {3.60}, H91'' {3.59}, H8'' {3.51}), 3.33 - 3.25 (m, 4H, 2xH<sub>2</sub>N-CH<sub>2</sub>-Spacer), 3.19 - 3.13 (m, 8H, H<sub>β1</sub> {3.18}, 2xR<sub>δ</sub> {3.16}, H<sub>β2</sub> {3.15}, Y<sub>β</sub>), 2.95 - 2.83 (m, 6H, 2xD<sub>β1</sub> {2.93}, 2xD<sub>β2</sub> {2.85}, 2xF<sub>β</sub>), 2.72 - 2.59 (m, 5H, 2xCH<sub>2</sub>-C=O-Spacer, H3''<sub>aq</sub>), 2.34 - 2.18 (m, 10H, 7xP<sub>β1</sub>, 2xE<sub>γ</sub> {2.29 - 2.19}), 2.08 - 2.05 (m, 4H, 4xV<sub>β</sub>), 2.00 - 1.97 (m, 14H, 7xP<sub>β2</sub>, 2xAc-NH {1.99, 1.98}), 1.95 - 1.76 (m, 20H, 14xP<sub>γ</sub>, L<sub>β</sub>, 2xE<sub>β</sub>), 1.74 - 1.57 (m, 7H, 2xR<sub>γ</sub>, {1.63}, 2xR<sub>β</sub> {1.72}, H3''<sub>ax</sub> {1.73}, L<sub>γ</sub>), 1.35 - 1.28 (m, 21H, 7xA<sub>β</sub>), 1.18 - 1.13 (m, 12H, 4xT<sub>γ</sub>), 0.91 - 0.81 (m, 30H, 4xV<sub>γ</sub>, L<sub>δ</sub>).

<sup>13</sup>C-NMR (150.92 MHz, CDCl<sub>3</sub>, HSQC), δ (ppm) = 176.85, 176.84, 176.44, 174.96, 174.92, 174.89, 174.66, 174.46, 174.40, 174.32, 174.22, 174.19, 174.14, 174.10, 174.07, 174.03, 173.98, 173.97, 173.85, 173.83, 173.74, 173.47, 173.43, 173.03, 172.96, 172.95, 172.90, 172.78, 172.75, 172.66, 172.61, 172.59, 172.53, 172.45, 172.28, 172.23, 172.10, 172.08, 172.01, 171.98, 171.94, 171.73, 171.55, 171.38, 171.31, 171.26, 171.23, 171.14, 171.08, 170.90, 170.84 (51xC=O), 155.60 (R<sub>γ</sub>), 133.48 (H<sub>ε</sub>), 129.17 (H<sub>δ</sub>), 128.69, 128.67, 128.36 (3xF<sub>ar</sub>), Y<sub>ar</sub> (119.21), 99.22, (C2''), 97.83 (C1), 71.10 (C6''), 69.63 (C5), 69.60, 69.56, 69.53, 69.45, 68.67, 68.44, 68.30, 67.67, 67.65 (12xCH<sub>2</sub>-O-Spacer), 69.41 (C7''), 68.28 (C4), 68.19 (C8''), 67.65 (C4''), 67.63 (C3), 67.53, 67.05, 66.52, 66.34 (4xT<sub>β</sub>), 66.16 (C6), 62.87 (C9''), 60.56, 60.52, 60.49, 60.47, 60.43, 60.40, (6xP<sub>α</sub>), 60.09 (2xT<sub>α</sub>), 59.53 (V<sub>α</sub>), 58.94, 58.89, 58.68, 58.64 (T<sub>α</sub>), 58.68 (H<sub>α</sub>), 55.18, 54.32 (2xS<sub>α</sub>), 54.94, 54.60, 53.30 (3xF<sub>α</sub>), 53.17 (Y<sub>α</sub>), 52.33 (L<sub>α</sub>), 51.76 (C5''), 51.13 (R<sub>α</sub>), 50.89 (C2), 50.07 (D<sub>α</sub>), 49.70, 47.75, 47.70, 47.65, 47.61 (5xA<sub>α</sub>), 47.92, 47.89, 47.86, 47.75, 47.70, 47.62 (P<sub>δ</sub>), 42.29, 42.23 (2xG<sub>α</sub>), 40.53, 40.50, 39.14 (F<sub>β</sub>), 39.53 (C3''), 35.66 (H<sub>β</sub>), 35.61 (H<sub>2</sub>N-CH<sub>2</sub>-Spacer), 34.96 (D<sub>β</sub>), 34.07 (C2-Spacer), 29.67, 29.43, 29.39, 29.32, 29.28, 29.20 (6xP<sub>β</sub>), 27.50 (L<sub>β</sub>), 24.65, 24.62 (P<sub>γ</sub>), 22.47 (4xL<sub>δ</sub>), 22.05, 22.03 (2xAc-NH), 18.88, 18.85, 18.71, 18.42 (4xT<sub>γ</sub>), 18.71, 18.42, 18.34, 18.29 (4xV<sub>γ</sub>), 16.25, 15.37, 15.30 (3xA<sub>β</sub>).



acetyliert. Es wird nur ein Drittel des Harzes entnommen, der Rest wird weiter für die weiter für die Festphasensynthese verwendet. Der nach dem Abspalten vom Harz unter Standardbedingungen erhaltene Rückstand wird durch semipräparative 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,  $R_t = 30.7$  min) gereinigt und anschließend lyophilisiert.

*Ausbeute:* 65.6 mg (9.67  $\mu$ mol, 29%) farbloses Lyophilisat.

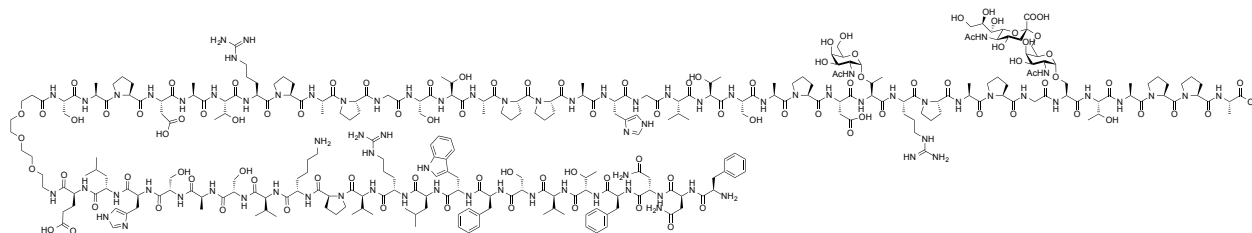
$R_t = 30.7$  min (Phenomenex Luna, Gradient A).

$C_{317}H_{475}N_{77}O_{109}$  ( $M = 7108.7170$  g/mol) [7104.3993].

*ESI-MS* (positiv),  $m/z$ : 1427.58 ( $[M+4xH+Na]^{5+}$ , ber. 1426.88), 1784.22 ( $[M+3H+Na]^{4+}$ , ber. 1783.36), 1189.74 ( $[M+5H+Na]^{6+}$ , ber. 1189.24).

**5.4.4.4 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-amino-4,7,10-trioxa-dodecanoyl-L-seryl-L-alanyl-L-prolyl-L-aspartyl-L-threonyl-L-argyl-L-prolyl-L-alanyl-L-prolyl-glycyl-L-seryl-L-threonyl-L-alanyl-L-prolyl-L-prolyl-L-alanyl-L-histidyl-glycyl-L-valyl-L-threonyl-L-seryl-L-alanyl-L-prolyl-L-aspartyl-L-O-(2-acetamido-2-desoxy- $\alpha$ -D-galactopyranosyl)-threonyl-L-arginyl-L-prolyl-L-alanyl-L-prolyl-glycyl-{2-acetamido-2-desoxy-6-O-[5-acetamido-3,5-dideoxy- $\alpha$ -glycero-D-galacto-2-nonulopyrano-syl)onat]- $\alpha$ -D-galactopyranosyl}-L-seryl-L-threonyl-L-alanyl-L-prolyl-L-prolyl-L-alanin 80**

( $NH_2$ -FNNFTVSFWLRVPKVSASHLE-Spacer-SAPDTRPAPGSTAPPAHGVTSAPDTRPAPGS-( $ST_N$ )TAPPA-COOH)



Zur Deblockierung der acetylierten Hydroxygruppen des Kohlenhydratantigens werden 65.6 mg (9.67  $\mu\text{mol}$ ) des Glycopeptids **78** in 50 ml einer wässrigen Natriumhydroxidlösung bei pH 11.0 - 11.5 (ein Natriumhydroxidplättchen in 500 ml Wasser) gelöst und 24 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Nach Beendigung der Reaktion wird durch tropfenweise Zugabe von konzentrierter Essigsäure neutralisiert und das Lösungsmittel anschließend im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wird durch semipräparative 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,  $\lambda = 214$  nm,  $R_t = 29.9$  min) gereinigt und anschließend lyophilisiert.

*Ausbeute:* 21 mg (3.10  $\mu\text{mol}$ , 32%) farbloses Lyophilisat.

$R_t = 29.9$  min (Phenomenex Luna, Gradient A).

$\text{C}_{299}\text{H}_{461}\text{N}_{79}\text{O}_{101}$  (M = 6774.34 g/mol) [6778.43].

*Drehwert:*  $[\alpha]_D^{26} = -41.3$  (c = 0.08,  $\text{H}_2\text{O}$ ).

*ESI-MS* (positiv), m/z: 1345.87 ( $[\text{M}+5\text{H}]^{5+}$ , ber. 1345.47), 1159.37 ( $[\text{M}+6\text{K}]^{6+}$ , ber. 1159.35).

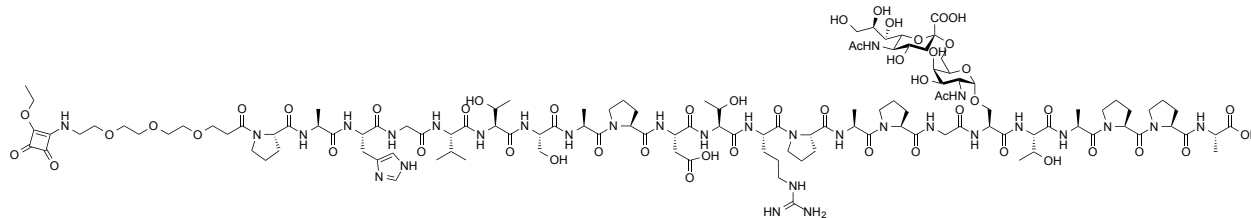
$^1\text{H-NMR}$  (600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , COSY, HSQC),  $\delta$  (ppm) = 8.58 (d, 2H,  $J_{\text{He,H}\delta} = 1.17$  Hz,  $2x\text{H}_\epsilon$ ), 7.42 - 7.40 (m, 15H,  $3xF_{\text{ar}}$ ), 7.34 - 6.87 (m, 7H,  $2x\text{H}_\delta$  {7.28},  $W_{\text{ar}}$ ), 4.99 - 4.82 (m, 3H,  $2x\text{H}_1$ ,  $\text{H}_4''$ ), 4.76 - 4.65 (m, 8H,  $2x\text{H}_\alpha$  {4.66},  $2x\text{N}_\alpha$ ,  $2x\text{D}_\alpha$  {4.69},  $2x\text{R}_\alpha$  {4.62}), 4.62 - 4.46 (m, 10H,  $6x\text{A}_\alpha$ ,  $3xF_\alpha$ ,  $\text{Y}_\alpha$ ), 4.43 - 4.25 (28H, m,  $6x\text{T}_\alpha$  {4.35, 4.37},  $2x\text{L}_\alpha$ ,  $\text{Q}_\alpha$ ,  $\text{K}_\alpha$ ,  $7x\text{S}_\alpha$  {4.41, 4.26},  $11x\text{P}_\alpha$  {4.37 - 4.34}), 4.21 - 4.09 (m, 9H,  $4x\text{V}_\alpha$  {4.18},  $6x\text{T}_\beta$  {4.17, 4.16},  $4x\text{A}_\alpha$  {4.20}), 4.05 - 3.86 (m, 10H,  $2x\text{H}_2$ ,  $3x\text{G}_{\alpha 1}$  {3.96},  $3x\text{G}_{\alpha 2}$  {3.89},  $\text{H}_7''$ ,  $2x\text{H}_5$  {3.91}), 3.83 - 3.68 (m, 34H,  $2x\text{H}_4$  {3.89},  $\text{H}_9 2''$  {3.80},  $7x\text{S}_{\beta 1}$  {3.78},  $11x\text{P}_{\delta 1}$  {3.76},  $\text{H}_5''$  {3.75},  $\text{H}_4''$  {3.72},  $2x\text{H}_6$  {3.71},  $2x\text{H}_2$  {3.69},  $7x\text{S}_{\beta 2}$  {3.68}), 3.66 - 3.51 (m, 26H,  $6x\text{CH}_2\text{-O-Spacer}$  {3.64, 3.58},  $11x\text{P}_{\delta 2}$  {3.62},  $\text{H}_6''$  {3.60},  $\text{H}_9 1''$  {3.59},  $\text{H}_8''$  {3.51}), 3.46 - 3.39 (m, 2H,  $\text{H}_2\text{N-CH}_2\text{-Spacer}$ ), 3.27 - 3.25 (m, 4H,  $2x\text{H}_{\beta 1}$  {3.18},  $2x\text{H}_{\beta 2}$  {3.15}), 3.19 - 3.06 (m, 14H,  $3x\text{R}_\delta$ ,  $3xF_\beta$ ,  $\text{Y}_\beta$ ), 3.02 - 2.80 (m, 8H,  $2x\text{N}_{\beta 1}$ ,  $2x\text{D}_{\beta 1}$  {2.93},  $2x\text{N}_{\beta 2}$ ,  $2x\text{D}_{\beta 2}$  {2.85}), 2.80 - 2.53 (m, 3H,  $\text{H-3}\ddot{\text{a}}\text{q}''$ ,  $\text{CH}_2\text{-C=O-Spacer}$ ,  $\text{K}_\epsilon$ ), 2.34 - 1.74 (m, 52H,  $\text{Q}_\gamma$ ,  $11x\text{P}_{\beta 1}$  {2.29 - 2.19},  $4x\text{V}_\beta$ ,  $\text{K}_\gamma$  {2.08 - 1.76},  $11x\text{P}_{\beta 2}$  {2.00 - 1.97},  $3x\text{Ac-NH}$  {1.99, 1.98},  $\text{Q}_\beta$ ,  $\text{K}_\beta$ ,  $11x\text{P}_\gamma$  {1.95 - 1.76}), 1.72 - 1.51 (m, 13H,  $3x\text{R}_\gamma$ , {1.63},  $\text{L}_\beta$ ,  $3x\text{R}_\beta$  {1.72},  $\text{L}_\gamma$ ,  $\text{H}_3''_{\text{ax}}$  {1.73}), 1.39 - 1.28 (m, 30H,  $10x\text{A}_\beta$ ), 1.19 - 1.11 (m, 18H,  $6x\text{T}_\gamma$ ), 0.91 - 0.78 (m, 36H,  $4x\text{V}_\gamma$ ,  $2x\text{L}_\gamma$ ).

<sup>13</sup>C-NMR (150.92 MHz, CDCl<sub>3</sub>, HSQC), δ (ppm) = 176.87, 176.71, 176.68, 176.52, 176.51, 176.48, 176.45, 176.43, 176.41, 175.18, 175.11, 175.09, 175.05, 175.03, 175.02, 174.99, 174.98, 174.94, 174.92, 174.89, 174.72, 174.67, 174.63, 174.59, 174.45, 174.43, 174.41, 174.40, 174.37, 174.36, 174.34, 174.31, 174.30, 174.18, 174.14, 174.11, 174.10, 174.05, 174.02, 173.99, 173.97, 173.95, 173.89, 173.86, 173.57, 173.56, 173.53, 173.45, 173.20, 173.18, 173.13, 173.07, 173.05, 173.04, 173.02, 172.95, 172.38, 172.37, 172.26, 172.08, 172.01, 172.00, 171.15 (63xC=O), 156.72 (2xR<sub>ζ</sub>), 133.49 (2xR<sub>ζ</sub>), 129.36, 129.35, 129.30, 129.28, 129.25, 129.23, 129.16, 129.12, 129.08, 129.02, 129.01, 128.98, 128.94, 128.92, 128.90, 128.40, 128.38, 128.37, 128.34, 128.31 (3xF<sub>ar</sub>, W<sub>ar</sub>, H<sub>γ</sub>), 119.24 (2xH<sub>γ</sub>), 117.26 (H<sub>δ</sub>), 98.73, 98.70 (2xC<sub>1</sub>), 98.13 (C<sub>2</sub>''), 71.34 (C<sub>6</sub>''), 70.86, 69.65 (2xC<sub>5</sub>), 71.81, 71.59, 69.64, 69.61, 69.59, 69.54 (6xCH<sub>2</sub>-O-Spacer), 69.34 (C<sub>7</sub>''), 68.44, 68.41 (2xC<sub>4</sub>), 68.37 (C<sub>8</sub>''), 67.54 (C<sub>4</sub>''), 67.43 (2xC<sub>3</sub>), 67.17, 66.98, 66.95 (6xT<sub>β</sub>), 66.59, 66.43 (2xC<sub>6</sub>), 63.57 (C<sub>9</sub>''), 63.06, 62.86, 61.29, 61.25, 61.14, 61.08, 61.01, 60.71, 60.56 (11xP<sub>α</sub>), 60.53, 60.47, 60.41, 60.33, 60.29 (6xT<sub>α</sub>), 60.24 (4xV<sub>α</sub>), 59.50 (K<sub>α</sub>), 58.87 (2xH<sub>α</sub>), 58.81, 55.53, 55.13, 55.10 (7xS<sub>α</sub>), 55.22 (E<sub>α</sub>), 54.39 (3xF<sub>α</sub>), 53.68 (W<sub>α</sub>), 52.45, 52.39 (2xL<sub>α</sub>), 51.95 (C<sub>5</sub>''), 51.66, 51.06 (2xR<sub>α</sub>), 50.99, 50.90 (2xC<sub>2</sub>), 51.15, 50.14, 50.09 (2xD<sub>α</sub>, 2xN<sub>α</sub>), 51.16, 51.15, 50.14, 50.09, 49.91, 49.83, 49.63 (10xA<sub>α</sub>), 42.33, 42.19, 42.16 (2xG<sub>α</sub>), 40.54 (F<sub>β</sub>), 39.53 (K<sub>ε</sub>), 39.15 (C<sub>3</sub>''), 35.45 (2xH<sub>β</sub>), 35.05 (H<sub>2</sub>N-CH<sub>2</sub>-Spacer), 35.59, 35.13, 35.00 (2xD<sub>β</sub>, 2xN<sub>β</sub>, C<sub>2</sub>-Spacer), 32.89 (K<sub>β</sub>), 30.23 (E<sub>γ</sub>), 30.16, 29.82, 29.38, 29.32, 29.29, 29.26, 29.22, 28.04, 27.49 (11xP<sub>β</sub>), 28.04 (K<sub>γ</sub>), 27.50 (4xE<sub>β</sub>), 27.49 (K<sub>δ</sub>), 27.33 (2xL<sub>β</sub>), 24.73, 24.69, 24.67, 24.65, 24.56, 24.23, 24.17, 24.13, 24.02 (11xP<sub>γ</sub>), 22.02, 21.84, 21.77 (3xAcNH), 21.84, 21.77 (2xL<sub>δ</sub>) 18.91, 18.88, 18.85, 18.78, 18.71, 18.42 (6xT<sub>γ</sub>), 18.38, 18.15, 17.65 (4xV<sub>γ</sub>, 2xL<sub>δ</sub>), 6.45, 16.41, 16.05, 15.74, 15.57, 15.49, 15.43, 15.34, 15.32, 15.11 (10xA<sub>β</sub>).

## 5.5 Synthese der Proteinkonjugate

### 5.5.1.1 12-[N-(2-Ethoxy-3,4-dioxo-cyclobutenyl)]-amino-4,7,10-trioxa-dodecanoyl-L-prolyl-L-alanyl-L-histidyl-glycyl-L-valyl-L-threonyl-L-seryl-L-alanyl-L-prolyl-L-aspartyl-L-threonyl-L-arginyl-L-prolyl-L-alanyl-L-prolyl-glycyl-O-{2-acetamido-2-desoxy-6-O-[5-acetamido-3,5-dideoxy- $\alpha$ -glycero-D-galacto-2nonulopyranosyl)onat]- $\alpha$ -D-galactopyranosyl}-L-seryl-L-threonyl-L-alanyl-L-prolyl-L-prolyl-L-alanin **54**

(EtO-Squarat-NH-Spacer-PAHGVT SAPDTRPAPGS(ST<sub>N</sub>)TAPPA-COOH)



In einer Mischung aus 5 ml Ethanol/Wasser (1:1) werden 31 mg (11.2  $\mu$ mol) des Glycopeptids **49** gelöst. Mit einer Eppendorfpipette werden 1.74  $\mu$ l (11.8  $\mu$ mol) 3,4-Diethoxy-3-cyclobuten-1,2-dion **51** zugegeben. Über einen Zeitraum von 5 min werden so oft 5.0  $\mu$ l gesättigte Natriumcarbonat-Lösung zum Reaktionsansatz pipettiert bis ein pH-Wert von 8.0 erreicht ist. Nach einer Reaktionszeit von 3 h wird mit konzentrierter Essigsäure neutralisiert und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der erhaltene Rückstand wird in Wasser gelöst und durch semipräparative 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,  $\lambda$  = 214 nm,  $R_t$  = 21.3 min) gereinigt und anschließend lyophilisiert.

*Ausbeute:* 10.0 mg (3.50  $\mu$ mol, 31%) farbloses Lyophilisat.

$R_t$  = 21.3 min (Phenomenex Luna, Gradient A).

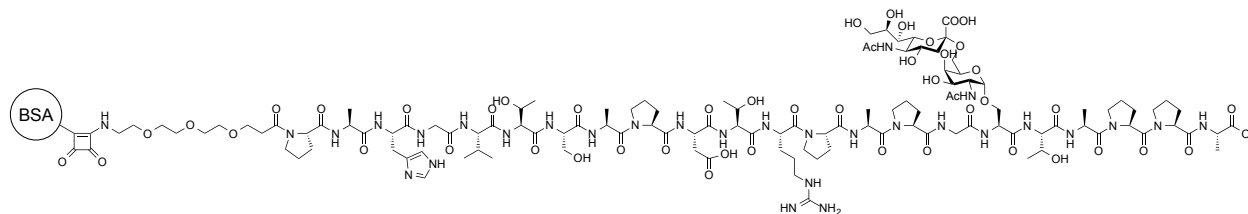
$C_{122}H_{202}N_{30}O_{49}$  (M = 2861.02 g/mol) [2859.33].

*ESI-MS* (positiv), m/z: 1439.29 ( $[M+2H]^{2+}$ , ber. 1439.17), 959.85 ( $[M+3H]^{3+}$ , ber. 959.78).



**5.5.1.2 Konjugation von 12-[N-(2-Ethoxy-3,4-dioxo-cyclobutenyl)]-amino-4,7,10-trioxadodecanoyl-L-prolyl-L-alanyl-L-histidyl-glycyl-L-valyl-L-threonyl-L-seryl-L-alanyl-L-prolyl-L-aspartyl-L-threonyl-L-arginyl-L-prolyl-L-alanyl-L-prolyl-glycyl-O-{2-acetamido-2-desoxy-6-O-[5-acetamido-3,5-dideoxy- $\alpha$ -glycero-D-galacto-2nonulopyranosyl)onat]- $\alpha$ -D-galactopyranosyl]-L-seryl-L-threonyl-L-alanyl-L-prolyl-L-prolyl-L-alanin an Rinderserumalbumin (BSA) 58**

BSA(-NH-Squarat-NH-Spacer-PAHGVTSPDTRPAPGS(ST<sub>N</sub>)TAPPA-COOH)

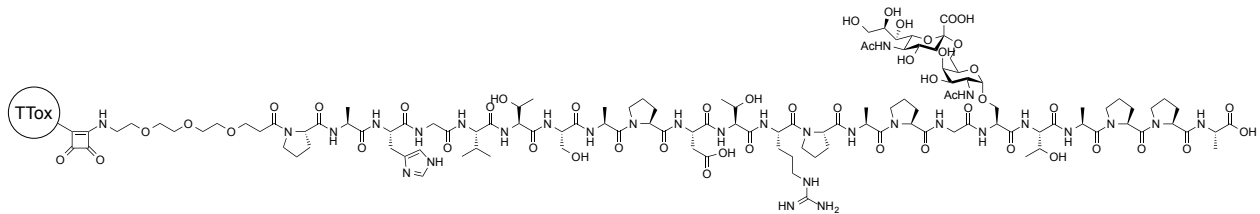


In einer Pufferlösung aus 130 mg Dinatriumhydrogenphosphat in 2 ml Wasser (pH 9.5) werden 2.00 mg (0.70  $\mu$ mol) des Glycopeptids **54** zusammen mit 2.15 mg (0.031  $\mu$ mol) Rinderserumalbumin (BSA) gelöst. Die Lösung wird 3 d bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend werden die Salze der Pufferlösung und die nicht-gebundenen Glycopeptide durch Filtration mit einer *Millipore* Ultrafiltrationsanlage entfernt. Dabei wird eine Membran verwendet, die Moleküle bis 30 kDa passieren lässt. Der Fortschritt der Filtration wird über den pH-Wert des Filtrats überprüft. Es werden insgesamt viermal 50 ml entionisiertes Wasser durch die Membran gefiltert bis das Filtrat neutral ist. Der verbliebene Überstand wird vorsichtig mit einer Pasteurpipette abgenommen und lyophilisiert.

*Ausbeute:* 3.9 mg farbloses Lyophilisat.

**5.5.1.3 Konjugation von 12-[N-(2-Ethoxy-3,4-dioxo-cyclobutenyl)]-amino-4,7,10-trioxa-dodecanoyl-L-glycyl-L-seryl-L-threonyl-L-alanyl-L-prolyl-L-prolyl-L-alanyl-L-histidyl-glycyl-L-valyl-L-threonyl-L-seryl-L-alanyl-L-prolyl-L-aspartyl-L-threonyl-L-arginyl-L-prolyl-L-alanyl-L-prolyl-glycyl-O-(2-acetamido-2-desoxy- $\alpha$ -D-galactopyranosyl)-L-seryl-L-threonyl-L-alanyl-L-prolyl-L-prolyl-L-alanin an Tetanus Toxoid 61**

TTox(-NH-Squarat-NH-Spacer-STAPPAHGVT SAPDTRPAPGS(ST<sub>N</sub>)TAPPA-COOH)

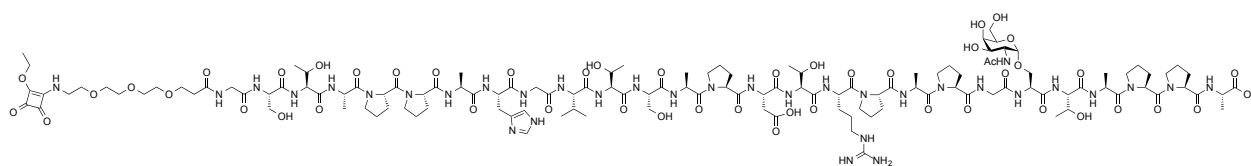


In einer Pufferlösung aus 130 mg Dinatriumhydrogenphosphat in 2 ml Wasser (pH 9.5) werden 2.24 mg (0.78  $\mu$ mol) des Glycopeptids **54** zusammen mit 2.00 mg (0.013  $\mu$ mol) Tetanus Toxoid (TTox) gelöst. Die Lösung wird 3 d bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend werden die Salze der Pufferlösung und die nicht-gebundenen Glycopeptide durch Filtration mit einer *Millipore* Ultrafiltrationsanlage entfernt. Dabei wird eine Membran verwendet, die Moleküle bis 30 kDa passieren lässt. Der Fortschritt der Filtration wird über den pH-Wert des Filtrats überprüft. Es werden insgesamt viermal 50 ml entionisiertes Wasser durch die Membran gefiltert bis das Filtrat neutral ist. Der verbliebene Überstand wird vorsichtig mit einer Pasteurpipette abgenommen und lyophilisiert.

*Ausbeute:* 4.0 mg farbloses Lyophilisat.

**5.5.1.4 12-[N-(2-Ethoxy-3,4-dioxo-cyclobutenyl)]-amino-4,7,10-trioxa-dodecanoyl-L-glycyl-L-seryl-L-threonyl-L-alanyl-L-prolyl-L-prolyl-L-alanyl-L-histidyl-glycyl-L-valyl-L-threonyl-L-seryl-L-alanyl-L-prolyl-L-aspartyl-L-threonyl-L-arginyl-L-prolyl-L-alanyl-L-prolyl-glycyl-O-(2-acetamido-3,4,6-tri-O-acetyl-2-desoxy- $\alpha$ -D-galactopyranosyl)-L-seryl-L-threonyl-L-alanyl-L-prolyl-L-prolyl-L-alanin **53****

EtO-Squarat-NH-Spacer-GSTAPPAHGVTSAPDTRPAPGS(T<sub>N</sub>)TAPPA-COOH)



In einer Mischung aus 5 ml Ethanol/Wasser (1:1) werden 27 mg (9.4  $\mu$ mol) des Glycopeptids **48** gelöst. Mit einer Eppendorfpipette werden 1.46  $\mu$ l (9.9  $\mu$ mol) 3,4-Diethoxy-3-cyclobuten-1,2-dion **51** zugegeben. Über einen Zeitraum von 5 min werden so oft 5.0  $\mu$ l gesättigte Natriumcarbonat-Lösung zum Reaktionsansatz pipettiert bis ein pH-Wert von 8.0 erreicht ist. Nach einer Reaktionszeit von 3 h wird mit konzentrierter Essigsäure neutralisiert und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der erhaltene Rückstand wird in Wasser gelöst und durch semipräparative 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,  $\lambda$  = 214 nm,  $R_t$  = 19.9 min) gereinigt und anschließend lyophilisiert.

*Ausbeute:* 9 mg (3.13  $\mu$ mol, 33%) farbloses Lyophilisat.

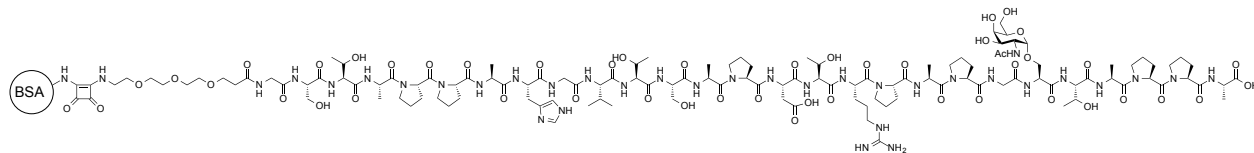
$R_t$  = 19.9 min (Phenomenex Luna, Gradient A).

$C_{128}H_{200}N_{34}O_{49}$  (M = 2999.20 g/mol) [2997.42].

*ESI-MS* (positiv), m/z: 1500.35 ( $[M+2H]^{2+}$ , ber. 1500.22), 1000.56 ( $[M+3H]^{3+}$ , ber. 1000.48), 750.61 ( $[M+4H]^{2+}$ , ber. 750.78).

**5.5.1.5 Konjugation von 12-[N-(2-Ethoxy-3,4-dioxo-cyclobutenyl)]-amino-4,7,10-trioxa-dodecanoyl-L-glycyl-L-seryl-L-threonyl-L-alanyl-L-prolyl-L-prolyl-L-alanyl-L-histidyl-glycyl-L-valyl-L-threonyl-L-seryl-L-alanyl-L-prolyl-L-aspartyl-L-threonyl-L-arginyl-L-prolyl-L-alanyl-L-prolyl-glycyl-O-(2-acetamido-2-desoxy- $\alpha$ -D-galactopyranosyl)-L-seryl-L-threonyl-L-alanyl-L-prolyl-L-prolyl-L-alanin an Rinderserumalbumin (BSA) 57**

BSA(-NH-Squarat-NH-Spacer-GSTAPPAHGVTSAPDTRPAPGS(T<sub>N</sub>)TAPPA-COOH)

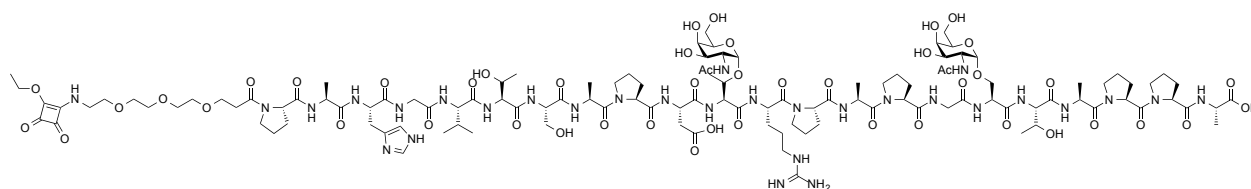


In einer Pufferlösung aus 65 mg Dinatriumhydrogenphosphat in 1 ml Wasser (pH 9.5) werden 2.5 mg (0.83  $\mu$ mol) des Glycopeptids **53** zusammen mit 0.95 mg (0.014  $\mu$ mol) Rinderserumalbumin (BSA) gelöst. Die Lösung wird 3 d bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend werden die Salze der Pufferlösung und die nicht-gebundenen Glycopeptide durch Filtration mit einer *Millipore* Ultrafiltrationsanlage entfernt. Dabei wird eine Membran verwendet, die Moleküle bis 30 kDa passieren lässt. Der Fortschritt der Filtration wird über den pH-Wert des Filtrats überprüft. Es werden insgesamt viermal 50 ml entionisiertes Wasser durch die Membran gefiltert bis das Filtrat neutral ist. Der verbliebene Überstand wird vorsichtig mit einer Pasteurpipette abgenommen und lyophilisiert.

*Ausbeute:* 3.0 mg farbloses Lyophilisat.

**5.5.1.6 12-[N-(2-Ethoxy-3,4-dioxo-cyclobutenyl)]-amino-4,7,10-trioxa-dodecanoyl-L-prolyl-L-alanyl-L-histidyl-glycyl-L-valyl-L-threonyl-L-seryl-L-alanyl-L-prolyl-L-aspartyl-O-(2-acetamido-3,4,6-tri-O-acetyl-2-desoxy- $\alpha$ -D-galactopyranosyl)-L-threonyl-L-arginyl-L-prolyl-L-alanyl-L-prolyl-glycyl-O-(2-acetamido-3,4,6-tri-O-acetyl-2-desoxy- $\alpha$ -D-galactopyranosyl)-L-seryl-L-threonyl-L-alanyl-L-prolyl-L-prolyl-L-alanin **52****

EtO-Squarat-NH-Spacer-PAHGVT SAPDT(T<sub>N</sub>)RPAPGS(T<sub>N</sub>)TAPPA-COOH)



In einer Mischung aus 5 ml Ethanol/Wasser (1:1) werden 17 mg (6.5  $\mu$ mol) des Glycopeptids **47** gelöst. Mit einer Eppendorfpipette werden 1.05  $\mu$ l (7.1  $\mu$ mol) 3,4-Diethoxy-3-cyclobuten-1,2-dion **51** zugegeben. Über einen Zeitraum von 5 min werden so oft 5.0  $\mu$ l gesättigte Natriumcarbonat-Lösung zum Reaktionsansatz pipettiert bis ein pH-Wert von 8.0 erreicht ist. Nach einer Reaktionszeit von 3 h wird mit konzentrierter Essigsäure neutralisiert und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der erhaltene Rückstand wird in Wasser gelöst und durch semipräparative 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,  $\lambda$  = 214 nm,  $R_t$  = 24.8 min) gereinigt und anschließend lyophilisiert.

*Ausbeute:* 11.8 mg (4.2  $\mu$ mol, 66%) farbloses Lyophilisat.

$R_t$  = 24.8 min (Phenomenex Luna, Gradient A).

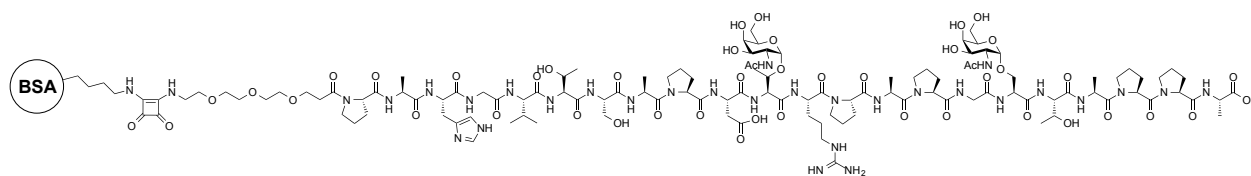
$C_{118}H_{185}N_{30}O_{47}$  (M = 2775.94 g/mol) [2774.30].

*ESI-MS* (positiv), m/z: 1417.57 ( $[M+2Na]^{2+}$ , ber. 1417.15).

*HR-ESI-MS* (positiv), m/z: 1416.6433 ( $[M+2Na]^{2+}$ , ber. 1416.6442).

**5.5.1.7 Konjugation von 12-[N-(2-Ethoxy-3,4-dioxo-cyclobutenyl)]-amino-4,7,10-trioxa-dodecanoyl-L-glycyl-L-seryl-L-threonyl-L-alanyl-L-prolyl-L-prolyl-L-alanyl-L-histidyl-glycyl-L-valyl-L-threonyl-L-seryl-L-alanyl-L-prolyl-L-aspartyl-O-(2-acetamido-2-desoxy- $\alpha$ -D-galactopyranosyl)-L-threonyl-L-arginyl-L-prolyl-L-alanyl-L-prolyl-glycyl-O-(2-acetamido-2-desoxy- $\alpha$ -D-galactopyranosyl)-L-seryl-L-threonyl-L-alanyl-L-prolyl-L-prolyl-L-alanin an Rinderserumalbumin (BSA) 56**

BSA(-NH-Squarat-NH-Spacer-GSTAPPAHGVTSAPDT(T<sub>N</sub>)RPAPGS(T<sub>N</sub>)TAPPA-COOH)<sub>n</sub>



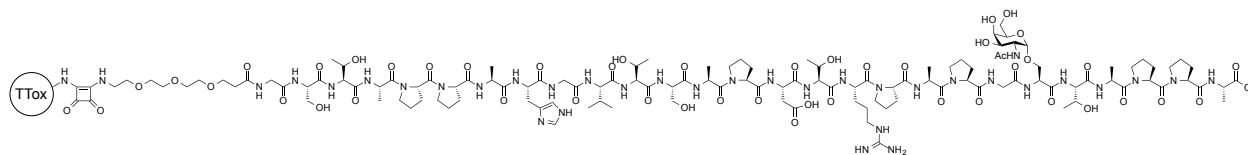
In einer Pufferlösung aus 65 mg Dinatriumhydrogenphosphat in 1 ml Wasser (pH 9.5) werden 2.5 mg (0.9  $\mu$ mol) des Glycopeptids **52** zusammen mit 2.0 mg (0.03  $\mu$ mol) Rinderserumalbumin (BSA) gelöst. Die Lösung wird 3 d bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend werden die Salze der Pufferlösung und die nicht-gebundenen Glycopeptide durch Filtration mit einer *Millipore* Ultrafiltrationsanlage entfernt. Dabei wird eine Membran verwendet, die Moleküle bis 30 kDa passieren lässt. Der Fortschritt der Filtration wird über den pH-Wert des Filtrats überprüft. Es werden insgesamt viermal 50 ml entionisiertes Wasser durch die Membran gefiltert bis das Filtrat neutral ist. Der verbliebene Überstand wird vorsichtig mit einer Pasteurpipette abgenommen und lyophilisiert.

*Ausbeute:* 4.3 mg farbloses Lyophilisat.

*MALDI-TOF-MS* (Sinapinsäure, positiv),  $m/z$ : 78000 - 177000 ( $[M]^+$ ). Dies entspricht eine Beladung von 3 bis 22 Glycopeptiden **52** pro BSA-Molekül.

**5.5.1.8 Konjugation von 12-[N-(2-Ethoxy-3,4-dioxo-cyclobutenyl)]-amino-4,7,10-trioxa-dodecanoyl-L-glycyl-L-seryl-L-threonyl-L-alanyl-L-prolyl-L-prolyl-L-alanyl-L-histidyl-glycyl-L-valyl-L-threonyl-L-seryl-L-alanyl-L-prolyl-L-aspartyl-L-threonyl-L-arginyl-L-prolyl-L-alanyl-L-prolyl-glycyl-O-(2-acetamido-2-desoxy- $\alpha$ -D-galactopyranosyl)-L-seryl-L-threonyl-L-alanyl-L-prolyl-L-prolyl-L-alanin an Tetanus Toxoid 60**

TTox(-NH-Squarat-NH-Spacer-STAPPAHGVTSAPDTRPAPGS(ST<sub>N</sub>)TAPPA-COOH)

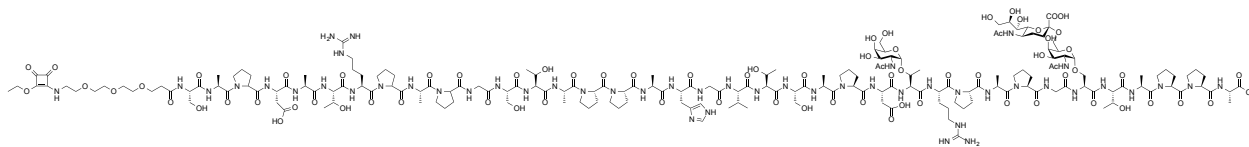


In einer Pufferlösung aus 130 mg Dinatriumhydrogenphosphat in 2 ml Wasser (pH 9.5) werden 2.3 mg (0.78  $\mu$ mol) des Glycopeptids **57** zusammen mit 2.00 mg (0.013  $\mu$ mol) Tetanus Toxoid (TTox) gelöst. Die Lösung wird 3 d bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend werden die Salze der Pufferlösung und die nicht-gebundenen Glycopeptide durch Filtration mit einer *Millipore* Ultrafiltrationsanlage entfernt. Dabei wird eine Membran verwendet, die Moleküle bis 30 kDa passieren lässt. Der Fortschritt der Filtration wird über den pH-Wert des Filtrats überprüft. Es werden insgesamt viermal 50 ml entionisiertes Wasser durch die Membran gefiltert bis das Filtrat neutral ist. Der verbliebene Überstand wird vorsichtig mit einer Pasteurpipette abgenommen und lyophilisiert.

*Ausbeute:* 4.0 mg farbloses Lyophilisat.

**5.5.1.9 12-[N-(2-Ethoxy-3,4-dioxo-cyclobutenyl)]-amino-4,7,10-trioxa-dodecanoyl-L-seryl-L-alanyl-L-prolyl-L-aspartyl-L-threonyl-L-argyl-L-prolyl-L-alanyl-L-prolyl-glycyl-L-seryl-L-threonyl-L-alanyl-L-prolyl-L-prolyl-L-alanyl-L-histidyl-glycyl-L-valyl-L-threonyl-L-seryl-L-alanyl-L-prolyl-L-aspartyl-L-O-(2-acetamido-2-desoxy- $\alpha$ -D-galactopyranosyl)-threonyl-L-arginyl-L-prolyl-L-alanyl-L-prolyl-glycyl-{2-acetamido-2-desoxy-6-O-[5-acetamido-3,5-dideoxy- $\alpha$ -glycero-D-galacto-2nonulopyranosyl)onat]- $\alpha$ -D-galactopyranosyl}-L-seryl-L-threonyl-L-alanyl-L-prolyl-L-prolyl-L-alanin 59**

(EtO-Squarat-NH-Spacer-SAPDTRPAPGSTAPPAHGVTSAPDT(T<sub>N</sub>)RPAPGS(ST<sub>N</sub>)TAPPA-COOH)



In einer Mischung aus 4 ml Ethanol/Wasser (1:1) werden 20 mg (4.69  $\mu$ mol) des Glycopeptids **50** gelöst. Mit einer Eppendorfpipette werden 0.76  $\mu$ l (5.16  $\mu$ mol) 3,4-Diethoxy-3-cyclobuten-1,2-dion **51** zugegeben. Über einen Zeitraum von 5 min werden so oft 5.0  $\mu$ l gesättigte Natriumcarbonat-Lösung zum Reaktionsansatz pipettiert bis ein pH-Wert von 8.0 erreicht ist. Nach einer Reaktionszeit von 3 h wird mit konzentrierter Essigsäure neutralisiert und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der erhaltene Rückstand wird in Wasser gelöst und durch semipräparative 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,  $\lambda$  = 214 nm,  $R_t$  = 24.2 min) gereinigt und anschließend lyophilisiert.

*Ausbeute:* 14.6 mg (3.29  $\mu$ mol, 70%) farbloses Lyophilisat.

$R_t$  = 24.2 min (Phenomenex Luna, Gradient A).

$C_{188}H_{295}N_{49}O_{75}$  (M = 4441.70 g/mol) [4439.08].

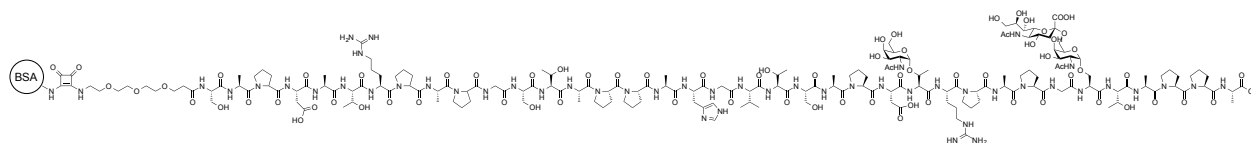
*ESI-MS* (positiv), m/z: 1463.05 ([M+3H]<sup>3+</sup>, ber. 1462.68), 1097.66 ([M+3H]<sup>3+</sup>, ber. 1097.27).

*HR-ESI-MS* (positiv), m/z: 1462.3519 ([M+3H]<sup>3+</sup>, ber. 1462.3536) 0.7 ppm.



**5.5.1.10 Konjugation von 12-[N-(2-Ethoxy-3,4-dioxo-cyclobutenyl)]-amino-4,7,10-trioxa-dodecanoyl-L-seryl-L-alanyl-L-prolyl-L-aspartyl-L-threonyl-L-argyl-L-prolyl-L-alanyl-L-prolyl-glycyl-L-seryl-L-threonyl-L-alanyl-L-prolyl-L-prolyl-L-alanyl-L-histidyl-glycyl-L-valyl-L-threonyl-L-seryl-L-alanyl-L-prolyl-L-aspartyl-L-O-(2-acetamido-2-desoxy- $\alpha$ -D-galactopyranosyl)-threonyl-L-arginyl-L-prolyl-L-alanyl-L-prolyl-glycyl-{2-acetamido-2-desoxy-6-O-[5-acetamido-3,5-didesoxy- $\alpha$ -glycero-D-galacto-2nonulopyranosyl)onat]- $\alpha$ -D-galactopyranosyl}-L-seryl-L-threonyl-L-alanyl-L-prolyl-L-prolyl-L-alanin an Rinderserumalbumin (BSA) 59**

BSA-(NH-Spacer-SAPDTRPAPGSTAPPAHGVTSAPDT(T<sub>N</sub>)RPAPGS(ST<sub>N</sub>)TAPPA-COOH)



In einer Pufferlösung aus 130 mg Dinatriumhydrogenphosphat in 2 ml Wasser (pH 9.5) werden 3.95 mg (0.89  $\mu$ mol) des Glycopeptids **55** zusammen mit 2.00 mg (0.030  $\mu$ mol) Rinderserumalbumin (BSA) gelöst. Die Lösung wird 4 d bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend werden die Salze der Pufferlösung und die nicht-gebundenen Glycopeptide durch Filtration mit einer *Millipore* Ultrafiltrationsanlage entfernt. Dabei wird eine Membran verwendet, die Moleküle bis 30 kDa passieren lässt. Der Fortschritt der Filtration wird über den pH-Wert des Filtrats überprüft. Es werden insgesamt viermal 50 ml entionisiertes Wasser durch die Membran gefiltert bis das Filtrat neutral ist. Der verbliebene Überstand wird vorsichtig mit einer Pasteurpipette abgenommen und lyophilisiert.

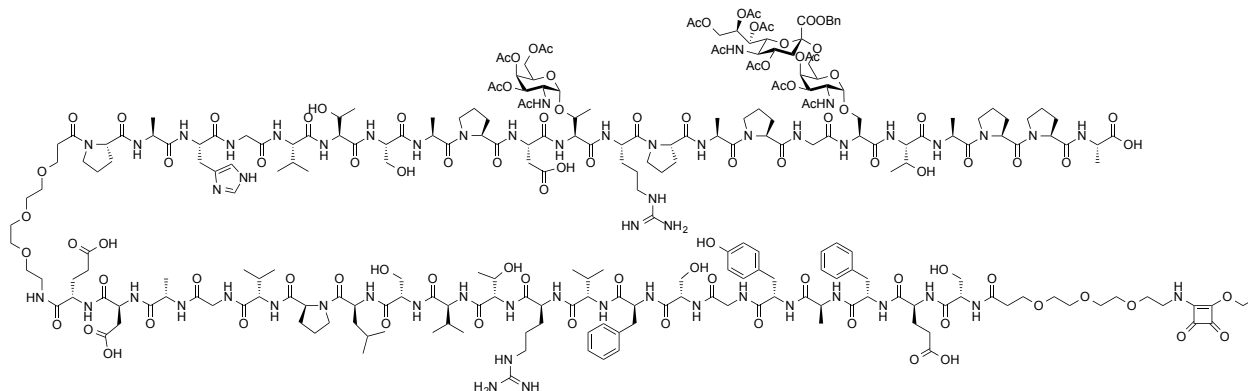
*Ausbeute:* 2.8 mg farbloses Lyophilisat.



## 5.6 Synthese der Dreikomponenten-Vakzine mit einem CpG-Motiv als TLR9-Ligand

### 5.6.1.1 12-[N-(2-Ethoxy-3,4-dioxo-cyclobutenyl)]-amino-4,7,10-trioxa-dodecanoyl-L-seryl-L-glutamyl-L-phenylalanyl-L-alanyl-L-tyrosyl-glycyl-L-seryl-L-phenylalanyl-L-valyl-L-arginyl-threonyl-L-valyl-L-seryl-L-leucyl-L-prolyl-L-valyl-glycyl-L-alanyl-L-aspartyl-L-glutamyl-12-amino-4,7,10-trioxa-dodecanoyl-L-prolyl-L-alanyl-L-histidyl-glycyl-L-valyl-L-threonyl-L-seryl-L-alanyl-L-prolyl-L-aspartyl-L-threonyl-L-arginyl-L-prolyl-L-alanyl-L-prolyl-glycyl-O-{2-acetamido-2-desoxy-6-O-[5-acetamido-3,5-dideoxy- $\alpha$ -glycero-D-galacto-2-nonulopyrano-syl)onat]- $\alpha$ -D-galactopyranosyl}-L-seryl-L-threonyl-L-alanyl-L-prolyl-L-prolyl-L-alanin 70

(Squarat-HN-Spacer-SEFAYGSFVRTVSLPVGAD-Spacer-PAHGVTSAPDT(T<sub>N</sub>)-RPAPGS(T<sub>N</sub>)TAPPA-COOH)



In einer Mischung aus 3 ml Ethanol/Wasser (1:1) werden 18 mg (3.55  $\mu$ mol) des Glycopeptids **69** gelöst. Mit einer Eppendorfpipette werden 0.57  $\mu$ l (3.91  $\mu$ mol) 3,4-Diethoxy-3-cyclobuten-1,2-dion **51** zugegeben. Über einen Zeitraum von 5 min werden so oft 5.0  $\mu$ l gesättigte Natriumcarbonat-Lösung zum Reaktionsansatz pipettiert bis ein pH-Wert von 8.0 erreicht ist. Nach einer Reaktionszeit von 2.5 h wird mit konzentrierter Essigsäure neutralisiert und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der erhaltene Rückstand wird in Wasser gelöst und durch semipräparative 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,  $\lambda$  = 214 nm,  $R_t$  = 29.4 min) gereinigt und anschließend lyophilisiert.

*Ausbeute:* 13.7 mg (2.65  $\mu\text{mol}$ , 75%) farbloses Lyophilisat.

$R_t = 29.4$  min (Phenomenex Luna, Gradient A).

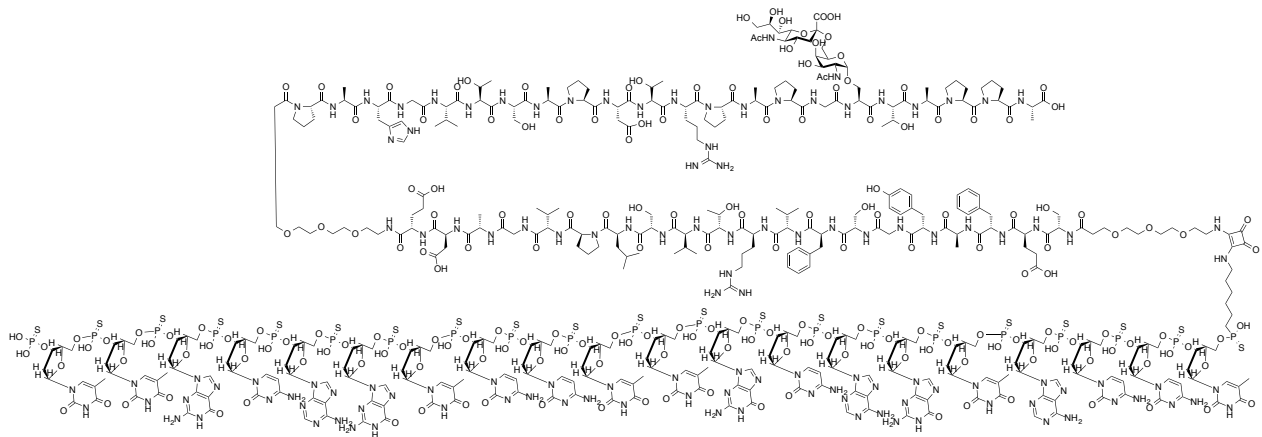
$\text{C}_{227}\text{H}_{348}\text{N}_{54}\text{O}_{83}$  ( $M = 5161.58$  g/mol) [5158.47].

*ESI-MS* (positiv),  $m/z$ : 1731.88 ( $[\text{M}+3\text{H}]^{3+}$ , ber. 1731,83), 1305,04 ( $[\text{M}+3\text{H}+\text{Na}]^{4+}$ , ber. 1304.62), 2597,96 ( $[\text{M}+2\text{H}]^{2+}$ , ber. 2597.24).

*HR-ESI-MS* (positiv),  $m/z$ : 1731.1609 ( $[\text{M}+3\text{H}]^{3+}$ , ber. 1731.1601) 0.4 ppm.

**5.6.1.2 Konjugation von 12-[*N*-(2-Ethoxy-3,4-dioxo-cyclobutenyl)]-amino-4,7,10-trioxa-dodecanoyl-L-seryl-L-glutamyl-L-phenylalanyl-L-alanyl-L-tyrosyl-glycyl-L-seryl-L-phenylalanyl-L-valyl-L-arginyl-threonyl-L-valyl-L-seryl-L-leucyl-L-prolyl-L-valyl-glycyl-L-alanyl-L-aspartyl-L-glutamyl-12-amino-4,7,10-trioxa-dodecanoyl-L-prolyl-L-alanyl-L-histidyl-glycyl-L-valyl-L-threonyl-L-seryl-L-alanyl-L-prolyl-L-aspartyl-L-threonyl-L-arginyl-L-prolyl-L-alanyl-L-prolyl-glycyl-*O*-{2-acetamido-2-desoxy-6-*O*-[5-acetamido-3,5-dideoxy- $\alpha$ -glycero-*D*-galacto-2-nonulopyrano-syl)onat]- $\alpha$ -*D*-galactopyranosyl]-L-seryl-L-threonyl-L-alanyl-L-prolyl-L-prolyl-L-alanin an ein CpG-Motiv 71**

(CpG-Motiv-Squarat-HN-Spacer-SEFAYGSFVRTVSLPVGAD-ESpacer-PAHGVTSA-PDT( $T_N$ )-RPAPGS( $T_N$ )TAPPA-COOH)



In einer Pufferlösung aus 130 mg Dinatriumhydrogenphosphat in 2 ml Wasser (pH 9.5) werden 3.00 mg (0.58  $\mu\text{mol}$ ) des Glycopeptids **70** zusammen mit 4.00 mg (0.58  $\mu\text{mol}$ ) des CpG-Motif-Oligonukleotid **67** gelöst. Die Lösung wird 6 d bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend werden die Salze der Pufferlösung und die nicht-gebundenen Glycopeptide durch Filtration mit einer *Millipore*-Ultrafiltrationsanlage entfernt. Dabei wird eine Membran verwendet, die Moleküle bis 3 kDa passieren lässt. Der Fortschritt der Filtration wird über den pH-Wert des Filtrats überprüft. Es werden insgesamt viermal 50 ml entionisiertes Wasser durch die Membran gefiltert bis das Filtrat neutral ist. Der verbliebene Überstand wird vorsichtig mit einer Pasteurpipette abgenommen und lyophilisiert.

*Ausbeute:* 6.6 mg (0.56  $\mu\text{mol}$ , 97%) farbloses Lyophilisat.

$\text{C}_{425}\text{H}_{605}\text{N}_{122}\text{O}_{189}\text{P}_{21}\text{S}_{21}$  ( $M = 11770.89 \text{ g/mol}$ ) [11763.01].

*Drehwert:*  $[\alpha]_D^{27} = +20.3$  ( $c = 20.3, \text{H}_2\text{O}$ ).

*MALDI-TOF-MS* ( $\alpha$ -Cyano-4-hydroxymizsäure, positiv),  $m/z$ : 11782.24 ( $[\text{M}+\text{Na}]^+$ , ber. 11782.00).

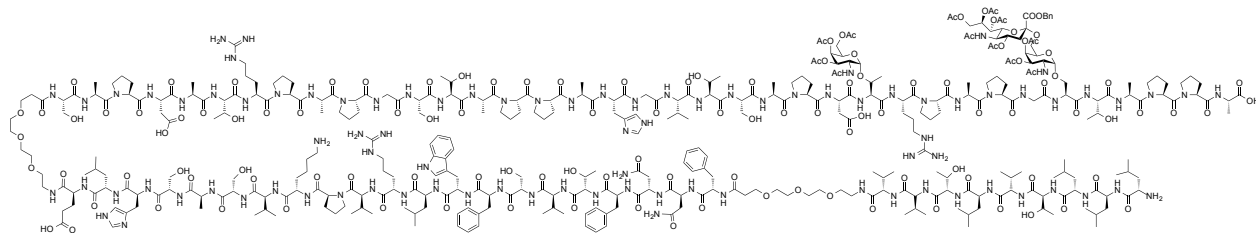
$^1\text{H-NMR}$  (600 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ , COSY, HSQC),  $\delta$  (ppm) ausgewählte Signale = 8.40 (d, 1H,  $J_{\text{H}\epsilon, \text{H}\delta} = 1.30$  Hz,  $\text{H}\epsilon$ ), 8.30 ( $s_{\text{br}}$ , 3H, 3xAdenin-H2), 7.69 ( $s_{\text{br}}$ , 7H, 3xAdenin-H8, 4xGuanin-H8), 7.44 - 7.32 (m, 13H, 7xThymidin-H6, 6xUracil-H6), 5.61 - 5.52 (m, 6H, 6xUracil-H5), 4.76 - 4.71 (m, 2H, H1 {4.74}, H4'' {4.72}), 2.46 ( $s_{\text{br}}$ , 21H, 7xThymidin- $\text{CH}_3$ ), 1.20 - 1.12 (m, 21H,  $\text{A}\beta$ ), 0.94 - 0.79 (m, 30H, 4x $\text{V}_\gamma$ , 1x $\text{L}_\delta$ )

$^{13}\text{C-NMR}$  (150.92 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ , HSQC),  $\delta$  (ppm) ausgewählte Signale = 141.11 (Adenin-C8, Guanin C-8), 139.53 (Adenin-C2), 136.25 (Thymidin-C6, Uracil-C6), 133.10 ( $\text{H}\epsilon$ ), 97.82, (C2''), 97.73 (C1), 37.70 (Thymidin- $\text{CH}_3$ ), 18.85 ( $\text{A}\beta$ ), 18.25, 17.80, 17.34 ( $\text{V}_\gamma$ ),  $\text{L}_\delta$  (22.39).

## 5.7 Synthese der Fünfkomponenten-Vakzine mit drei MHC I T-Zell-Epitopen

**5.7.1.1 L-Leucyl-L-leucyl-L-leucyl-L-threonyl-L-valyl-L-leucyl-L-threonyl-L-valyl-L-valyl-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-12-amino-4,7,10-trioxa-dodecanoyl-L-seryl-L-alanyl-L-prolyl-L-aspartyl-L-threonyl-L-argyl-L-prolyl-L-alanyl-L-prolyl-glycyl-L-seryl-L-threonyl-L-alanyl-L-prolyl-L-prolyl-L-alanyl-L-histidyl-glycyl-L-valyl-L-threonyl-L-seryl-L-alanyl-L-prolyl-L-aspartyl-L-O-(2-acetamido-3,4,6-tri-O-acetyl-2-desoxy- $\alpha$ -D-galactopyranosyl)-threonyl-L-arginyl-L-prolyl-L-alanyl-L-prolyl-glycyl-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- $\alpha$ -glycero-D-galacto-2-nonulo-pyranosyl)onat]- $\alpha$ -D-galactopyranosyl}-L-seryl-L-threonyl-L-alanyl-L-prolyl-L-prolyl-L-alanin 79**

(NH<sub>2</sub>-LLLTVLTVV-Spacer-FNNFTVSFWLRVPKVSASHLE-Spacer-SAPDTRPAPGSTAPPA-HGVT SAPDTRPAPGS-(ST<sub>N</sub>)TAPPA-COOH)



Die Peptidsynthese erfolgt nach dem Standardprotokoll ausgehend von 588 mg (0.1 mmol) eines mit Fmoc-Ala-O-Trt beladenen Tentagel-Harzes der Fa. *Rapp Polymere GmbH*, Tübingen, mit einer Beladung von 0.17 mmol/g. Die Kupplung der glycosylierten Aminosäure erfolgt manuell im Reaktor des Synthesizers. Dazu werden 233.4 mg (0.2 mmol) des Sialyl-T<sub>N</sub>-Serin-Bausteins zusammen mit 2.4 Äquivalenten HATU (91.2 mg, 0.24 mmol), 2.4 Äquivalenten HOAt (32.7 mg, 0.24 mmol) und 5.0 Äquivalenten NMM (50  $\mu$ l, 0.50 mmol) in einer Kartusche eingewogen und in 2 ml NMP vollständig gelöst. Zur Beschleunigung des Lösungsvorgangs wird die Kartusche kurz in einem Ultraschallbad geschwenkt. Die Reaktionslösung wird anschließend

in den Reaktor des Synthesizers gepumpt und 8h bei Raumtemperatur geschüttelt. Die Kupplung der nachfolgenden beiden Aminosäuren erfolgt als Doppelkupplung. Die Kupplung des T<sub>N</sub>-Bausteins erfolgte analog zu der des Sialyl-T<sub>N</sub>-Threonin-Bausteins. Die Kupplung des nachfolgenden Aspartats wird als Doppelkupplung durchgeführt. Der N-Terminus wird nicht acetyliert. Es wird nur ein Drittel des Harzes entnommen, der Rest wird weiter für die weiter für die Festphasensynthese verwendet. Der nach dem Abspalten vom Harz unter Standardbedingungen erhaltene Rückstand wird durch semipräparative 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<sub>t</sub> = 31.2 min) gereinigt und anschließend lyophilisiert.

*Ausbeute:* 63.2 mg (7.56 μmol, 23%) farbloses Lyophilisat.

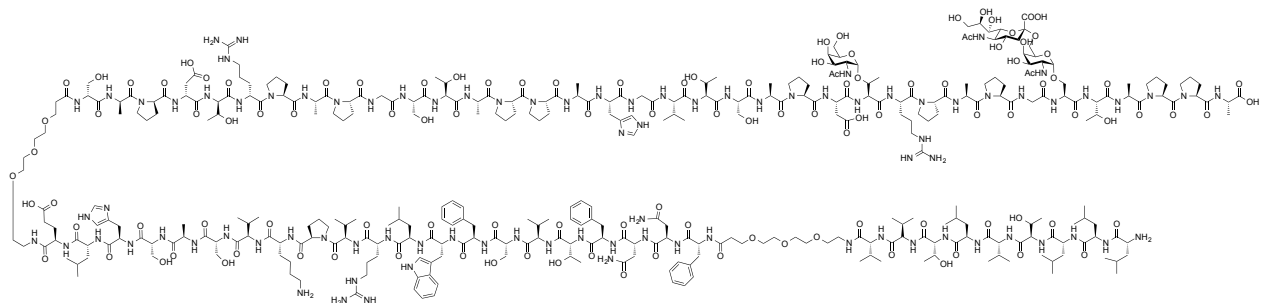
R<sub>t</sub> = 31.2 min (Phenomenex Luna, Gradient A).

C<sub>378</sub>H<sub>858</sub>N<sub>89</sub>O<sub>124</sub> (M = 8360.34 g/mol) [8355.22].

*ESI-MS* (positiv), m/z: 1671.77 ([M+H]<sup>5+</sup>, ber. 1670.05), 1193.64 ([M+6H]<sup>6+</sup>, ber. 1193.18).

**5.7.1.2 L-Leucyl-L-leucyl-L-leucyl-L-threonyl-L-valyl-L-leucyl-L-threonyl-L-valyl-L-valyl-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-amino-4,7,10-trioxa-dodecanoyl-L-seryl-L-alanyl-L-prolyl-L-aspartyl-L-threonyl-L-argyl-L-prolyl-L-alanyl-L-prolyl-glycyl-L-seryl-L-threonyl-L-alanyl-L-prolyl-L-prolyl-L-alanyl-L-histidyl-glycyl-L-valyl-L-threonyl-L-seryl-L-alanyl-L-prolyl-L-aspartyl-L-O-(2-acetamido-2-desoxy-α-D-galactopyranosyl)-threonyl-L-arginyl-L-prolyl-L-alanyl-L-prolyl-glycyl-{2-acetamido-2-desoxy-6-O-[5-acetamido-3,5-didesoxy-α-glycero-D-galacto-2-nonulopyranosyl]onat}-α-D-galactopyranosyl-L-seryl-L-threonyl-L-alanyl-L-prolyl-L-prolyl-L-alanin 81**

(NH<sub>2</sub>-LLLTVLTVV-Spacer-FNNFTVSFWLRVPKVSASHLE-Spacer-SAPDTRPAPGSTAPPA-HGVTSAPDTRPAPGS-(ST<sub>N</sub>)TAPPA-COOH)



Zur Deblockierung der acetylierten Hydroxygruppen des Kohlenhydratantigens werden 63.2 mg (7.56  $\mu\text{mol}$ ) des Glycopeptids **79** in 50 ml einer wässrigen Natriumhydroxidlösung bei pH 11.0 - 11.5 (ein Natriumhydroxidplättchen in 500 ml Wasser) gelöst und 24 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Nach Beendigung der Reaktion wird durch tropfenweise Zugabe von konzentrierter Essigsäure neutralisiert und das Lösungsmittel anschließend im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wird durch semipräparative 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,  $\lambda = 214$  nm,  $R_t = 29.6$  min) gereinigt und anschließend lyophilisiert.

*Ausbeute:* 11.9 mg (1.50  $\mu\text{mol}$ , 20%) farbloses Lyophilisat.

$R_t = 29.6$  (Phenomenex Luna, Gradient A).

$\text{C}_{355}\text{H}_{563}\text{N}_{89}\text{O}_{116}$  ( $M = 7933.92$  g/mol) [7929.09].

*Drehwert:*  $[\alpha]_D^{25} = -114.1$  ( $c = 0.18$ ,  $\text{H}_2\text{O}$ ).

*ESI-MS* (positiv),  $m/z$ : 1154.55 ( $[\text{M}+7\text{Na}]^{7+}$ , ber. 1154.29).

$^1\text{H-NMR}$  (600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , COSY, HSQC),  $\delta$  (ppm) = 8.58 (d, 2H,  $J_{\text{He,H}\delta} = 1.17$  Hz,  $2x\text{H}_\epsilon$ ), 7.42 - 7.40 (m, 15H,  $3x\text{F}_{\text{ar}}$ ), 7.34 - 6.87 (m, 7H,  $2x\text{H}_\delta$  {7.28},  $\text{W}_{\text{ar}}$ ), 4.99 - 4.82 (m, 3H,  $2x\text{H}_1$ ,  $\text{H}_4''$ ), 4.76 - 4.65 (m, 8H,  $2x\text{H}_\alpha$  {4.66},  $2x\text{N}_\alpha$ ,  $2xD_\alpha$  {4.69},  $2xR_\alpha$  {4.62}), 4.62 - 4.46 (m, 10H,  $6x\text{A}_\alpha$ ,  $3x\text{F}_\alpha$ ,  $\text{Y}_\alpha$ ), 4.43 - 4.25 (32H, m,  $6x\text{T}_\alpha$  {4.35, 4.37},  $6x\text{L}_\alpha$ ,  $\text{Q}_\alpha$ ,  $\text{K}_\alpha$ ,  $7x\text{S}_\alpha$  {4.41, 4.26},  $11x\text{P}_\alpha$  {4.37 - 4.34}), 4.21 - 4.09 (m, 14H,  $7x\text{V}_\alpha$  {4.18},  $8x\text{T}_\beta$  {4.17, 4.16},  $4x\text{A}_\alpha$  {4.20}), 4.05 - 3.86 (m, 10H,  $2x\text{H}_2$ ,  $3x\text{G}_{\alpha 1}$  {3.96},  $3x\text{G}_{\alpha 2}$  {3.89},  $\text{H}_7''$ ,  $2x\text{H}_5$  {3.91}), 3.83 - 3.68 (m, 34H,  $2x\text{H}_4$  {3.89},  $\text{H}_{9_2}''$  {3.80},  $7x\text{S}_{\beta 1}$  {3.78},  $11x\text{P}_{\delta 1}$  {3.76},  $\text{H}_5''$  {3.75},  $\text{H}_4''$  {3.72},  $2x\text{H}_6$  {3.71},  $2x\text{H}_2$  {3.69},  $7x\text{S}_{\beta 2}$  {3.68}), 3.66 - 3.51 (m, 38H,  $12x\text{CH}_2\text{-O-Spacer}$  {3.64, 3.58},  $11x\text{P}_{\delta 2}$  {3.62},  $\text{H}_6''$  {3.60},  $\text{H}_{9_1}''$  {3.59},  $\text{H}_8''$  {3.51}), 3.46 - 3.39 (m, 4H,  $2x\text{H}_2\text{-CH}_2\text{-Spacer}$ ), 3.27 - 3.25 (m, 4H,  $2x\text{H}_{\beta 1}$  {3.18},  $2x\text{H}_{\beta 2}$  {3.15}), 3.19 - 3.06 (m, 14H,  $3x\text{R}_\delta$ ,



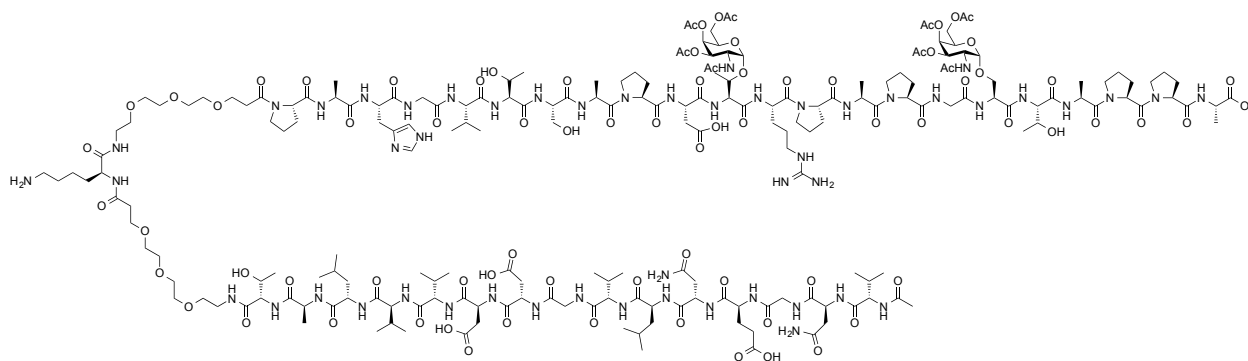
3x $F_{\beta}$ ,  $Y_{\beta}$ ), 3.02 - 2.80 (m, 8H, 2x $N_{\beta 1}$ , 2xD $_{\beta 1}$  {2.93}, 2x $N_{\beta 2}$ , 2xD $_{\beta 2}$  {2.85}), 2.80 - 2.53 (m, 5H, H- $_{3\text{äq}}$ ), 2x $CH_2-C=O$ -Spacer,  $K_{\epsilon}$ ), 2.34 - 1.74 (m, 52H,  $Q_{\gamma}$ , 11xP $_{\beta 1}$  {2.29 - 2.19}, 7xV $_{\beta}$ ,  $K_{\gamma}$  {2.08 - 1.76}, 11xP $_{\beta 2}$  {2.00 - 1.97}, 3xAc-NH {1.99, 1.98},  $Q_{\beta}$ ,  $K_{\beta}$ , 11xP $_{\gamma}$  {1.95 - 1.76}), 1.72 - 1.51 (m, 27H, 4xL $_{\gamma}$  {1.67}, 3xR $_{\gamma}$  {1.63}, 6xL $_{\beta}$  {1.56 - 1.51}, 3xR $_{\beta}$  {1.72}, H $_{3''ax}$  {1.73}), 1.39 - 1.28 (m, 30H, 10xA $_{\beta}$ ), 1.19 - 1.11 (m, 18H, 8xT $_{\gamma}$ ), 0.91 - 0.78 (m, 78H, 7xV $_{\gamma}$ , 6xL $_{\delta}$ ).

$^{13}C$ -NMR (150.92 MHz,  $CDCl_3$ , HSQC),  $\delta$  (ppm) = 176.87, 176.71, 176.68, 176.52, 176.51, 176.48, 176.45, 176.43, 176.41, 175.18, 175.11, 175.09, 175.05, 175.03, 175.02, 174.99, 174.98, 174.94, 174.92, 174.89, 174.72, 174.67, 174.63, 174.59, 174.45, 174.43, 174.41, 174.40, 174.37, 174.36, 174.34, 174.31, 174.30, 174.18, 174.14, 174.11, 174.10, 174.05, 174.02, 173.99, 173.97, 173.95, 173.89, 173.86, 173.57, 173.56, 173.53, 173.45, 173.20, 173.18, 173.13, 173.07, 173.05, 173.04, 173.02, 172.95, 172.38, 172.37, 172.26, 172.08, 172.01, 172.00, 171.15 (72xC=O), 156.72 (2xR $_{\gamma}$ ), 133.49 (2xR $_{\zeta}$ ), 129.36, 129.35, 129.30, 129.28, 129.25, 129.23, 129.16, 129.12, 129.08, 129.02, 129.01, 128.98, 128.94, 128.92, 128.90, 128.40, 128.38, 128.37, 128.34, 128.31 (3xF $_{ar}$ , W $_{ar}$ , H $_{\gamma}$ ), 119.24 (2xH $_{\gamma}$ ), 117.26 (H $_{\delta}$ ), 98.73, 98.70 (2xC1), 98.13 (C2''), 71.34 (C6''), 70.86, 69.65 (2xC5), 71.81, 71.59, 69.64, 69.61, 69.59, 69.54 (12x $CH_2-O$ -Spacer), 69.34 (C7''), 68.44, 68.41 (2xC4), 68.37 (C8''), 67.54 (C4''), 67.43 (2xC3), 67.17, 66.98, 66.95 (6xT $_{\beta}$ ), 66.59, 66.43 (2xC6), 63.57 (C9''), 63.06, 62.86, 61.29, 61.25, 61.14, 61.08, 61.01, 60.71, 60.56 (11xP $_{\alpha}$ ), 60.53, 60.47, 60.41, 60.33, 60.29 (6xT $_{\alpha}$ ), 60.24 (7xV $_{\alpha}$ ), 59.50 (K $_{\alpha}$ ), 58.87 (2xH $_{\alpha}$ ), 58.81, 55.53, 55.13, 55.10 (7xS $_{\alpha}$ ), 55.22 (E $_{\alpha}$ ), 54.39 (3xF $_{\alpha}$ ), 53.68 (W $_{\alpha}$ ), 52.45, 52.39 (6xL $_{\alpha}$ ), 51.95 (C5''), 51.66, 51.06 (2xR $_{\alpha}$ ), 50.99, 50.90 (2xC2), 51.15, 50.14, 50.09 (2xD $_{\alpha}$ , 2xN $_{\alpha}$ ), 51.16, 51.15, 50.14, 50.09, 49.91, 49.83, 49.63 (10xA $_{\alpha}$ ), 42.33, 42.19, 42.16 (2xG $_{\alpha}$ ), 40.54 (F $_{\beta}$ ), 39.53 (K $_{\epsilon}$ ), 39.15 (C3''), 35.45 (2xH $_{\beta}$ ), 35.05 (2xH $_2N-CH_2$ -Spacer), 35.59, 35.13, 35.00 (2xD $_{\beta}$ , 2xN $_{\beta}$ , 2xC2-Spacer), 32.89 (K $_{\beta}$ ), 30.23 (E $_{\gamma}$ ), 30.16, 29.82, 29.38, 29.32, 29.29, 29.26, 29.22, 28.04, 27.49 (11xP $_{\beta}$ ), 28.04 (K $_{\gamma}$ ), 27.50 (4xE $_{\beta}$ ), 27.49 (K $_{\delta}$ ), 27.33 (6xL $_{\beta}$ ), 24.73, 24.69, 24.67, 24.65, 24.56, 24.23, 24.17, 24.13, 24.02 (11xP $_{\gamma}$ ), 22.02, 21.84, 21.77 (3xAcNH), 21.84, 21.77 (6xL $_{\delta}$ ) 18.91, 18.88, 18.85, 18.78, 18.71, 18.42 (6xT $_{\gamma}$ ), 18.38, 18.15, 17.65 (7xV $_{\gamma}$ , 6xL $_{\delta}$ ), 6.45, 16.41, 16.05, 15.74, 15.57, 15.49, 15.43, 15.34, 15.32, 15.11 (10xA $_{\beta}$ ).

## 5.8 Synthese der Vierkomponenten-Vakzine mit drei MHC II-T-Zell-Epitopen

### 5.8.1.1 *N*-Acetyl-L-valyl-L-aspartyl-L-glycyl-L-glutamyl-L-aspartyl-L-leucyl-L-valyl-glycyl-L-aspartyl-L-aspartyl-L-valyl-L-valyl-L-leucyl-L-alanyl-L-threonyl-12-amino-4,7,10-trioxa-dodecanoyl-L-lysyl-12-amino-4,7,10-trioxa-dodecanoyl-L-prolyl-L-alanyl-L-histidyl-glycyl-L-valyl-L-threonyl-L-seryl-L-alanyl-L-prolyl-L-aspartyl-*O*-(2-acetamido-3,4,6-tri-*O*-acetyl-2-desoxy- $\alpha$ -D-galactopyranosyl)-L-threonyl-L-arginyl-L-prolyl-L-alanyl-L-prolyl-glycyl-*O*-(2-acetamido-3,4,6-tri-*O*-acetyl-2-desoxy- $\alpha$ -D-galactopyranosyl)-L-seryl-L-threonyl-L-alanyl-L-prolyl-L-prolyl-L-alanin 73

(Ac-NH-VNGENLVGDDVVLAT-Spacer-K-Spacer-PAHGVTSAPDT(T<sub>N</sub>)RPAPGS(T<sub>N</sub>)TAPPA-COOH)



Die Peptidsynthese erfolgt nach dem Standardprotokoll ausgehend von 588 mg (0.1 mmol) eines mit Fmoc-Ala-*O*-Trt beladenen Tentagel-Harzes der Fa. *Rapp Polymere GmbH*, Tübingen, mit einer Beladung von 0.17 mmol/g. Die Kupplung der glycosylierten Aminosäure erfolgt manuell im Reaktor des Synthesizers. Dazu werden 233.4 mg (0.2 mmol) des T<sub>N</sub>-Serin-Bausteins zusammen mit 2.4 Äquivalenten HATU (91.2 mg, 0.24 mmol), 2.4 Äquivalenten HOAt (32.7 mg, 0.24 mmol) und 5.0 Äquivalenten NMM (50  $\mu$ l, 0.50 mmol) in einer Kartusche eingewogen und in 2 ml NMP vollständig gelöst. Zur Beschleunigung des Lösungsvorgangs wird die Kartusche kurz in einem Ultraschallbad geschwenkt. Die Reaktionslösung wird anschließend in den Reaktor des Synthesizers gepumpt und 8h bei Raumtemperatur geschüttelt. Die Kupplung der nachfolgenden beiden Aminosäuren erfolgt als Doppelkupplung. Die Kupplung des T<sub>N</sub>-Threonin-Bausteins erfolgte analog zu der des T<sub>N</sub>-Serin-Bausteins. Die Kupplung des nachfolgenden Aspartats wird als Doppelkupplung durchgeführt. Der N-Terminus wird nicht acetyliert. Der nach

dem Abspalten vom Harz unter Standardbedingungen erhaltene Rückstand wird durch semipräparative 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,  $R_t = 28.3$  min) gereinigt und anschließend lyophilisiert.

*Ausbeute:* 112.0 mg (23.40  $\mu\text{mol}$ , 23%) farbloses Lyophilisat.

$R_t = 28.3$  min (Phenomenex Luna, Gradient A).

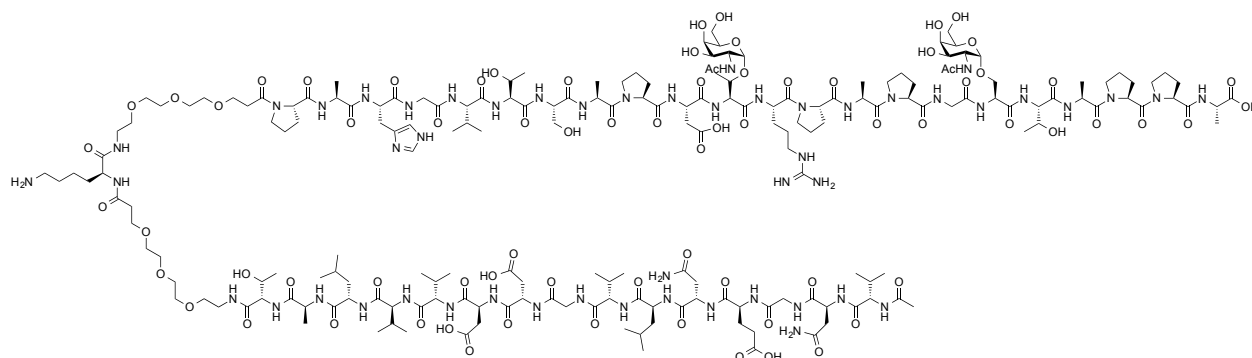
$\text{C}_{207}\text{H}_{332}\text{N}_{50}\text{O}_{79}$  ( $M = 4787.18$  g/mol) [4784.33].

*ESI-MS* (positiv),  $m/z$ : 1596.43 ( $[\text{M}+3\text{H}]^{3+}$ , ber. 1596.45), 2394.14 ( $[\text{M}+2\text{H}]^{2+}$ , ber. 2394.18), 1197.47 ( $[\text{M}+4\text{H}]^{4+}$ , ber. 1197.59).

*HR-ESI-MS* (positiv),  $m/z$ : 1595.7811 ( $[\text{M}+3\text{H}]^{3+}$ , ber. 1595.7842) 1.9 ppm.

**5.8.1.2 N-Acetyl-L-valyl-L-aspargyl-L-glycyl-L-glutamyl-L-aspargyl-L-leucyl-L-valyl-glycyl-L-aspartyl-L-aspartyl-L-valyl-L-valyl-L-leucyl-L-alanyl-L-threonyl-12-amino-4,7,10-trioxadodecanoyl-L-lysyl-12-amino-4,7,10-trioxadodecanoyl-L-prolyl-L-alanyl-L-histidyl-glycyl-L-valyl-L-threonyl-L-seryl-L-alanyl-L-prolyl-L-aspartyl-O-(2-acetamido-2-desoxy- $\alpha$ -D-galactopyranosyl)-L-threonyl-L-arginyl-L-prolyl-L-alanyl-L-prolyl-glycyl-O-(2-acetamido-2-desoxy- $\alpha$ -D-galactopyranosyl)-L-seryl-L-threonyl-L-alanyl-L-prolyl-L-prolyl-L-alanin **74****

(Ac-NH-VNGENLVGDDVVLAT-Spacer-K-Spacer-PAHGVTSPAPDT( $T_N$ )RPAPGS( $T_N$ )TAPPA-COOH)



Zur Deblockierung der acetylierten Hydroxygruppen des Kohlenhydratantigens werden 112.0 mg (23.40  $\mu\text{mol}$ , 51%) des Glycopeptids **73** in 20 ml absolutem Methanol gelöst. Zu dieser Lösung

wird so lange eine 2.5%ige frisch hergestellte Natriummethanolatlösung (0.5 g Natrium in 25 ml Methanol) getropft, bis ein pH-Wert von 10 - 10.5 erreicht ist. Der pH-Wert wird alle 30 min überprüft und gegebenenfalls durch erneute Zugabe der Natriummethanolatlösung nachreguliert. Anschließend wird 3 d bei Raumtemperatur gerührt. Nach Beendigung der Reaktion wird durch Zugabe von konzentrierter Essigsäure neutralisiert und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wird durch semipräparative 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,  $R_t = 26.1$  min) gereinigt und anschließend lyophilisiert.

*Ausbeute:* 53.7 mg (11.84  $\mu$ mol, 36%) farbloses Lyophilisat.

$R_t = 26.1$  (Phenomenex Luna, Gradient A).

$C_{194}H_{318}N_{50}O_{74}$  ( $M = 4534.27$  g/mol) [4532.27].

*Drehwert:*  $[\alpha]_D^{27} = -83.5$  ( $c = 0.11$ ,  $H_2O$ ).

*ESI-MS* (positiv),  $m/z$ : 1512.58 ( $[M+3H]^{3+}$ , ber. 1512.43), 2268.38 ( $[M+2H]^{2+}$ , ber. 2268.14), 1134.81 ( $[M+4H]^{4+}$ , ber. 1134.81).

*HR-ESI-MS* (positiv),  $m/z$ : 2267.1396 ( $[M+2H]^{2+}$ , ber. 2267.1407) 0.4 ppm.

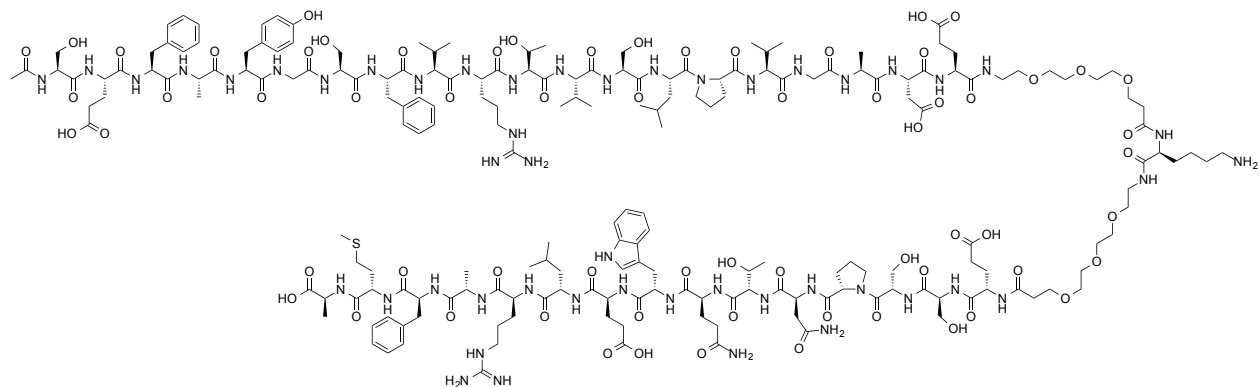
$^1H$ -NMR (400 MHz,  $D_2O$ , COSY, HSQC),  $\delta$  (ppm) = 8.61 (d, 1H,  $J_{H_e, H_\delta} = 1.15$  Hz,  $H_e$ ), 7.31 ( $s_{br}$ , 1H,  $H_\delta$ ), 4.87 (d, 1H,  $J_{H1, H2} = 3.42$  Hz,  $H1$ ), 4.85 (d, 1H,  $J_{H1, H2} = 3.48$  Hz,  $H1$ ), 4.74 - 4.65 (m, 5H,  $3xD_\alpha$ ,  $2xN_\alpha$ ), 4.61-4.53 (m, 4H,  $3A_\alpha$  {4.57, 4.58},  $H_\alpha$  {4.57}), 4.46 - 4.30 (m, 18H,  $2xL_\alpha$  {4.35},  $4xT_\alpha$  {4.40, 4.37},  $2xA_\alpha$  {4.34},  $6xP_\alpha$  {4.39},  $2xS_\alpha$  {4.44},  $E_\alpha$  {4.40},  $R_\alpha$  {4.36}), 4.27 - 4.11 (m, 4H,  $2xV_\alpha$  {4.22},  $K_\alpha$  {4.26},  $H2$  {4.13}), 4.27 - 4.17 (m, 9H,  $4XT_\beta$ ,  $A_\alpha$  {4.24}), 4.08 - 4.05 (m, 4H,  $3xV_\alpha$  {4.06},  $H2$  {4.07}), 3.99 - 3.90 (m, 10H,  $4xG_\alpha$ ,  $2xH5$  {3.97}), 3.87-3.57 (44H,  $2xH2$  {3.84},  $2xS_{\beta1}$  {3.82},  $2xH6$  {3.80},  $6xP_{\delta1}$  {3.78},  $2xC8$ -Spacer {3.76},  $2xH4$  {3.72},  $2xS_{\beta2}$  {3.71},  $10xCH_2$ -O-Spacer {3.65},  $6xP_{\delta2}$  {3.62}), 3.50 - 3.14 (m, 8H,  $R_\delta$  {3.38},  $H_{\beta1}$  {3.20},  $H_{\beta2}$  {3.28}),  $2xCH_2$ -NH<sub>2</sub>-Spacer {3.20}, 2.98 - 2.65 (m, 16H,  $K_\epsilon$  {2.97},  $2xC2$ -Spacer {2.87},  $3xD_\beta$ ,  $2xN_\beta$  {2.96, 2.92, 2.88, 2.85}), 2.37 - 2.22 (m, 8H,  $6xP_{\beta1}$  {2.30},  $E_{\beta1}$  {2.29},  $E_{\beta2}$  {2.24}), 2.12 - 1.77 (m, 29H,  $5xV_\beta$ ,  $3xAcetyl$ -NH {2.04, 2.02, 2.01},  $6xP_{\beta2}$  {1.88},  $6xP_\gamma$  {1.90},  $E_\gamma$  {1.93}), 1.76 - 1.52 (m, 13H,  $2xL_\gamma$  {1.56},  $2xL_\beta$  {1.65},  $K_\delta$  {1.66},  $K_\beta$  {1.70},  $R_{\beta1}$  {1.70},  $R_{\beta2}$  {1.79},  $R_\gamma$  {1.67}), 1.42 - 1.31 (m, 20 H,  $6xA_\beta$  {1.41, 1.39, 1.35, 1.34, 1.32},  $K_\gamma$  {1.40}), 1.24 - 1.17 (m, 12H,  $4xT_\gamma$ ), 0.94 - 0.83 (m, 42 H,  $2xL_\delta$  {0.90, 0.83},  $5xV_\delta$  {0.94, 0.92, 0.91,

0.89}).

<sup>13</sup>C-NMR (100.70 MHz, CDCl<sub>3</sub>, HSQC), δ (ppm) = 176.44, 174.97, 174.91, 174.79, 174.69, 174.69, 174.47, 174.39, 174.28, 174.23, 174.09, 174.02, 173.99, 173.88, 173.83, 173.80, 173.70, 173.61, 173.54, 173.23, 173.14, 173.06, 173.02, 172.78, 172.73, 172.68, 172.43, 172.25, 172.23, 172.21, 172.18, 172.14, 172.03, 171.97, 171.94, 171.77, 171.59, 171.42, 171.27, 171.21, 171.17, 171.14, 171.06, 170.98, 170.94, 170.90, 170.86, 170.82, 170.77, 170.73 (49xC=O), 156.76 (R<sub>ζ</sub>), 133.52 (H<sub>ε</sub>), 128.40 (H<sub>γ</sub>), 117.81 (H<sub>δ</sub>), 98.60, 97.94 (2xC1), 69.66, 69.60, 69.58, 69.53, 69.44, (10xCH<sub>2</sub>-O-Spacer), 68.80, 68.74 (2xC3), 68.57, 68.54 (2xC4), 68.42, 68.64 (2xC5), 66.48, 66.67, 66.60, 66.18 (4xT<sub>β</sub>) 66.20, 66.16 (2xC8-Spacer), 61.36, 61.33 (2xS<sub>β</sub>), 61.20, 61.16, 61.08, (6xP<sub>α</sub>), 60.58 (R<sub>α</sub>), 60.06, 59.97 (2xC6), 60.15, 60.10, 59.90, 59.86, 59.80 (5xV<sub>α</sub>), 60.53, 60.47, 60.37, 60.33, (4xT<sub>α</sub>), 59.55 (2xL<sub>α</sub>), 59.17 (E<sub>α</sub>), 58.93 (K<sub>α</sub>), 55.21, 55.07, (2xS<sub>α</sub>), 51.10 (H<sub>α</sub>), 50.55, 50.52, 50.48, (3xD<sub>α</sub>), 50.23, 50.17 (2xN<sub>α</sub>), 50.06, 50.00 (2xC2), 48.14, 47.95, 48.89, 48.61, 48.57, 49.71 (6xA<sub>α</sub>), 47.78, 47.73, 47.65, 47.63, 47.59, 47.56 (6xP<sub>δ</sub>), 42.58, 42.54, 42.33, 42.29 (4xG<sub>α</sub>), 40.50, 40.46 (2xCH<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub>-Spacer), 39.19, (K<sub>ε</sub>), 39.06 (R<sub>δ</sub>), 35.67 (2xC2-Spacer), 35.26, 35.23, 35.18, 35.07, 35.06 (3xD<sub>β</sub>, 2N<sub>β</sub>), 30.63 (V<sub>β</sub>), 30.59 (K<sub>β</sub>), 30.52 (R<sub>β</sub>), 30.19 (E<sub>β</sub>), 30.02, 29.97, 29.94, 29.90, 29.85, 29.80 (6xP<sub>β</sub>), 26.31 (2xL<sub>β</sub>), 26.02 (H<sub>β</sub>), 24.68 (E<sub>γ</sub>), 24.64 (K<sub>ε</sub>), 24.61 (2xL<sub>γ</sub>), 24.52 (R<sub>γ</sub>), 24.46, 24.42, 24.28, 24.19, 24.12, 24.09 (6xP<sub>γ</sub>), 22.34, 22.19, 22.09 (3xAcetyl-CH<sub>3</sub>), 22.13 (K<sub>γ</sub>), 18.88, 18.86, 18.83, 18.80 (4xT<sub>γ</sub>), 18.52, 18.48, 18.46, 18.44, 18.41 (5xV<sub>γ</sub>).

**5.8.1.3 N-Acetyl-L-seryl-L-glutamyl-L-phenylalanyl-L-alanyl-L-tyrosyl-glycyl-L-seryl-L-phenylalanyl-L-valyl-L-arginyl-threonyl-L-valyl-L-seryl-L-leucyl-L-prolyl-L-valyl-glycyl-L-alanyl-L-aspartyl-L-glutamyl-12-amino-4,7,10-trioxa-dodecanoyl-L-lysyl-12-amino-4,7,10-trioxa-dodecanoyl-L-glutamyl-L-seryl-L-seryl-L-prolyl-L-asparagyl-L-threonyl-L-tryptophyl-L-glutamyl-L-leucyl-L-arginyl-L-alanyl-L-phenylalanyl-L-methionyl-L-alanine**  
75

(Ac-NH-SEFAYGSFVRTVSLPVGAD-ESpacer-K-Spacer-ESSPNTQWELRAFMA-COOH)



Die Peptidsynthese erfolgt nach dem Standardprotokoll ausgehend von 588 mg (0.1 mmol) eines mit Fmoc-Ala-O-Trt beladenen Tentagel-Harzes der Fa. *Rapp Polymere GmbH*, Tübingen, mit einer Beladung von 0.17 mmol/g. Die Kupplung der Spaceramino­säure erfolgt manuell im Reaktor des Synthesizers. Dazu werden 88.7 mg (0.2 mmol) des Fmoc-Spaceramino­säure zusammen mit 2.4 Äquivalenten HATU (91.2 mg, 0.24 mmol), 2.4 Äquivalenten HOAt (32.7 mg, 0.24 mmol) und 5.0 Äquivalenten NMM (50 µl, 0.50 mmol) in einer Kartusche eingewogen und in 2 ml NMP vollständig gelöst. Zur Beschleunigung des Lösungsvorgangs wird die Kartusche kurz in einem Ultraschallbad geschwenkt. Die Reaktionslösung wird anschließend in den Reaktor des Synthesizers gepumpt und 8h bei Raumtemperatur geschüttelt. Der N-Terminus wird nicht acetyliert. Der nach dem Abspalten vom Harz unter Standardbedingungen erhaltene Rückstand wird durch semipräparative 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,  $R_t = 30.8$  min) gereinigt und anschließend lyophilisiert.

*Ausbeute:* 91.7 mg (20.57 µmol, 21%) farbloses Lyophilisat.

$R_t = 30.8$  min (Phenomenex Luna, Gradient A).

$C_{199}H_{303}N_{47}O_{67}S$  ( $M = 4457.94$  g/mol) [4455.15].

*Drehwert:*  $[\alpha]_D^{27} = -78.2$  ( $c = 0.09$ ,  $H_2O$ ).

*ESI-MS* (positiv),  $m/z$ : 1486.70 ( $[M+3H]^{3+}$ , ber. 1486.65), 2230.10 ( $[M+2H]^{2+}$ , ber. 2229.48), 1115.40 ( $[M+3H]^{3+}$ , ber. 1115.34).

HR-ESI-MS (positiv), m/z: 1486.0574 ( $[M+3H]^{3+}$ , ber. 1486.0568) 0.4 ppm.

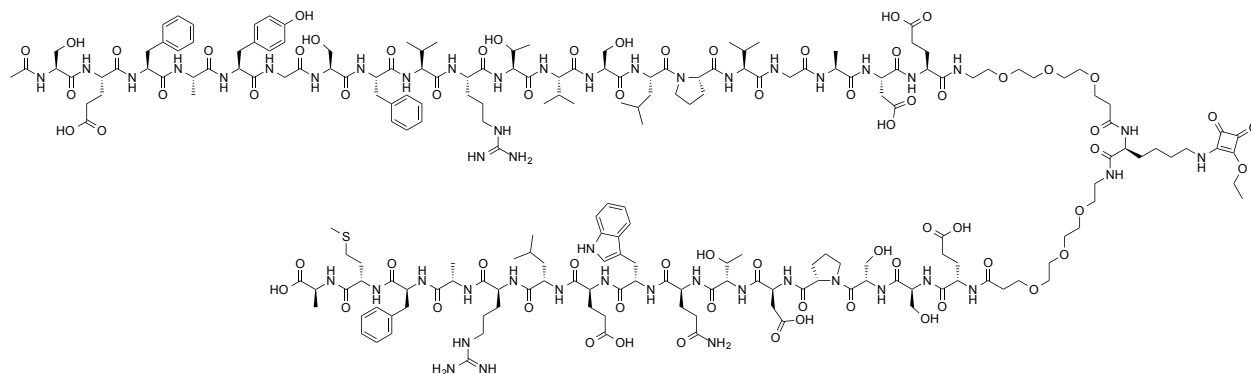
$^1H$ -NMR (400 MHz, DMSO, COSY, HSQC),  $\delta$  (ppm) 7.24 - 7.15 (m, 20H,  $3xF_{ar}$ ), 7.06 - 7.01 (m, 4H,  $Y_{ar}$ ), 4.96 - 4.93 (m, 2H,  $2xT_{OH}$ ), 4.87 ( $S_{br}$ , 5H,  $5xS_{OH}$ ), 4.62 - 4.39 (m, 9H,  $3xF_{\alpha}$ ,  $W_{\alpha}$ ,  $Y_{\alpha}$ ,  $D_{\alpha}$ ,  $N_{\alpha}$  {4.56},  $CH_3-CH_2$ -Squarat {4.64}), 4.38 - 4.14 (m, 26H,  $Q_{\alpha}$  {4.37},  $3xV_{\alpha}$  {4.35},  $K_{\alpha}$  {4.34},  $2xL_{\alpha}$ ,  $3xE_{\alpha}$  {4.33},  $2xP_{\alpha}$  {4.32},  $E_{\alpha}$ ,  $5xS_{\alpha}$  {4.30},  $4xA_{\alpha}$  {4.22, 4.19, 4.18, 4.17},  $2xR_{\alpha}$  {4.21},  $2xT_{\alpha}$  {4.17, 4.14}), 4.01 - 3.96 (m, 2H,  $2xT_{\beta}$ ), 3.78 - 3.52 (m, 17H,  $2xG_{\alpha 1}$  {3.78},  $2xG_{\alpha 2}$  {3.72},  $2xP_{\delta 1}$  {3.66},  $2xP_{\delta 2}$  {3.63},  $2xC_3$ -Spacer {3.59},  $5xS_{\beta 1}$  {3.54}), 3.50 - 3.48 (m, 25H,  $10xCH_2$ -O-Spacer,  $5xS_{\beta 2}$  {3.49}), 3.40 - 3.39 (m, 4H,  $2xCH_2$ -NH<sub>2</sub>-Spacer), 3.13 - 2.98 (m, 12H,  $3xF_{\beta}$ ,  $Y_{\beta}$ ,  $W_{\beta}$ ,  $2xR_{\delta}$  {3.08}), 2.84 - 2.71 (m, 6H,  $D_{\beta 1}$  {2.74},  $K_{\epsilon}$  {2.73},  $N_{\beta 1}$  {2.66},  $D_{\beta 2}$  {2.53},  $N_{\beta 2}$  {2.50}), 2.46 - 2.32 (m, 8H,  $2xP_{\gamma}$  {2.42},  $2xC_2$ -Spacer {2.37}), 2.26 - 2.13 (m, 10H, },  $Q_{\gamma}$  {2.26},  $4xE_{\gamma}$  {2.20}), 2.10 - 2.05 (m, 2H,  $M_{\beta 2}$ ), 2.03 (s, 3H, Ac-NH), 1.99 - 1.57 (m, 37H,  $3xV_{\beta}$  {1.94, 1.91, 1.89},  $K_{\beta 1}$ ,  $Q_{\beta 2}$  {1.91},  $K_{\delta}$  {1.90},  $M_{\delta}$ ,  $M_{\beta 1}$  {1.86},  $Q_{\beta 1}$ ,  $2xP_{\beta 1}$  {1.85},  $4xE_{\beta 1}$  {1.83},  $K_{\beta 2}$  {1.81},  $4xE_{\beta 2}$  {1.77},  $2xL_{\beta}$  {1.78},  $K_{\gamma}$  {1.69},  $2xL_{\gamma}$  {1.63, 1.60},  $2xR_{\beta 2}$  {1.62}), 1.56 - 1.37 (m, 9H,  $2xR_{\beta 1}$  {1.50},  $2xR_{\gamma}$  {1.44},  $CH_3-CH_2$ -SQ {1.39}), 1.29 - 1.13 (m, 12H,  $4xA_{\beta}$  {1.28, 1.20, 1.14}), 1.01 (d, 6H,  $J_{TV/T\beta} = 5.85$  Hz,  $2xT_{\gamma}$ ), 0.87 - 0.81 (m, 30H,  $3xV_{\gamma}$ ,  $2xL_{\delta}$ ).

$^{13}C$ -NMR (100.70 MHz, DMSO, HSQC),  $\delta$  (ppm) = 174.54, 174.51, 174.43, 174.41, 174.38, 172.80, 172.70, 172.49, 172.34, 172.29, 172.21, 172.14, 172.08, 171.95, 171.84, 171.80, 171.74, 171.71, 171.59, 171.36, 171.33, 171.28, 171.26, 171.22, 171.13, 171.10, 171.05, 171.03, 170.97, 170.89, 170.87, 170.81, 170.74, 170.72, 170.63, 170.51, 170.37, 170.28, 170.11, 170.09, 170.05, 169.74, 169.06, 169.03, 168.98 ( $45xC=O$ ), 157.08 ( $R_{\zeta}$ ), 129.63, 129.57, 128.48, 128.43, 128.36, 127.64 ( $3xF_{ar}$ ), 126.69 ( $W_{ar}$ ), 121.30 ( $Y_{ar}$ ), 70.23, 70.15, 70.12, 70.00, 69.92, 69.70 ( $12xCH_2$ -O-Spacer), 66.92, 66.89 ( $2xT_{\beta}$ ), 62.20, 62.12, 62.10, 62.07, 62.01 ( $5xS_{\beta}$ ), 60.77 ( $Q_{\alpha}$ ), 60.22, 60.18, 60.12 ( $3xV_{\alpha}$ ), 59.50, 59.48 ( $2xP_{\alpha}$ ), 59.41 ( $K_{\alpha}$ ), 58.76, 58.73 ( $2xT_{\alpha}$ ), 58.30 ( $2xR_{\alpha}$ ), 55.47, 55.42, 55.36 ( $4xE_{\alpha}$ ), 55.32, 55.28, 55.25, 55.15, 55.10 ( $5xS_{\beta}$ ), 54.30 ( $D_{\alpha}$ ), 54.29, 54.26, 54.22, 54.10 ( $3xF_{\alpha}$ ), 53.54 ( $Y_{\alpha}$ ), 53.50 ( $W_{\alpha}$ ), 52.70, 52.61 ( $2xL_{\alpha}$ ), 48.65, 48.61, 47.96 ( $4xA_{\alpha}$ ), 47.16, 47.12 ( $2xP_{\delta}$ ), 42.36, 42.28 ( $2xG_{\alpha}$ ), 40.94, 40.88 ( $2xF_{\beta}$ ), 40.81 ( $2xR_{\delta}$ ), 40.74 ( $F_{\beta}$ ), 39.22 ( $K_{\epsilon}$ ), 39.11, 39.08 ( $2xCH_2$ -NH-Spacer), 38.97 ( $W_{\beta}$ ), 36.31 ( $C_2$ -Spacer), 36.12 ( $D_{\beta}$ ), 36.03 ( $N_{\beta}$ ), 32.64 ( $K_{\beta}$ ), 31.84 ( $M_{\gamma}$ ), 31.43, 31.40, 31.32 ( $3xV_{\beta}$ ), 30.56 ( $2xP_{\gamma}$ ), 30.28 ( $Q_{\gamma}$ ), 29.64 ( $2xP_{\beta}$ ), 29.13 ( $M_{\beta}$ ), 28.03 ( $K_{\gamma}$ ), 27.98, 27.93

(2xL<sub>β</sub>), 27.85, 27.50 (4xE<sub>β</sub>), 27.46 (Q<sub>β</sub>), 27.15 (2xR<sub>β</sub>), 27.11 (K<sub>δ</sub>), 25.41, 25.35 (2xR<sub>γ</sub>), 24.42, 24.39 (2xL<sub>γ</sub>), 23.68, 23.54, 21.96, 21.84 (4xL<sub>δ</sub>), 22.99 (M<sub>δ</sub>), 19.65, 19.61 (T<sub>γ</sub>), 18.70, 18.67, 18.62, 18.48, 18.25, 18.19 (6xV<sub>γ</sub>), 18.57, 18.56, 18.51, 17.40 (4xA<sub>α</sub>), 15.09 (Ac-NH).

**5.8.1.4 N-Acetyl-L-seryl-L-glutamyl-L-phenylalanyl-L-alanyl-L-tyrosyl-glycyl-L-seryl-L-phenylalanyl-L-valyl-L-arginyl-threonyl-L-valyl-L-seryl-L-leucyl-L-prolyl-L-valyl-glycyl--L-alanyl-L-aspartyl-L-glutamyl-12-amino-4,7,10-trioxa-dodecanoyl-L-N-(2-ethoxy-3,4-dioxy-cyclobut-1-enyl)-lysyl-12-amino-4,7,10-trioxa-dodecanoyl-L-glutamyl-L-seryl-L-seryl-L-prolyl-L-asparglyl-L-threonyl-L-tryptophyl-L-glutamyl-L-leucyl-L-arginyl-L-alanyl-L-phenylalanyl-L-methionyl-L-alanin **76****

(Ac-NH-SEFAYGSFVRTVSLPVGAD-Spacer-K-(NH-Squarat-)-Spacer-ESSPNTQWELRAFMA-COOH)



In einer Mischung aus 12 ml Ethanol/Wasser (1:1) werden 99.5 mg (22.3 μmol) des Glycopeptids **75** gelöst. Mit einer Eppendorfpipette werden 3.63 μl (24.6 μmol) 3,4-Diethoxy-3-cyclobuten-1,2-dion **51** zugegeben. Über einen Zeitraum von 5 min werden so oft 5.0 μl gesättigte Natriumcarbonat-Lösung zum Reaktionsansatz pipettiert bis ein pH-Wert von 8.0 erreicht ist. Nach einer Reaktionszeit von 2.5 h wird mit konzentrierter Essigsäure neutralisiert und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der erhaltene Rückstand wird in Wasser gelöst und durch semipräparative 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<sub>t</sub> = 31.9 min) gereinigt und



anschließend lyophilisiert.

*Ausbeute:* 31.3 mg (6.83  $\mu\text{mol}$ , 31%) farbloses Lyophilisat.

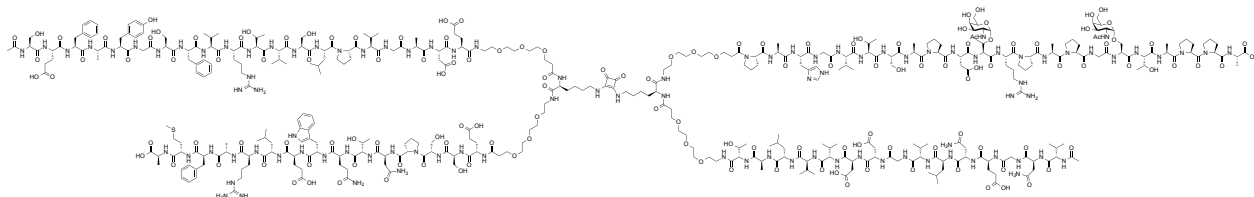
$R_t = 31.9$  min (Phenomenex Luna, Gradient A).

$\text{C}_{205}\text{H}_{308}\text{N}_{48}\text{O}_{69}\text{S}$  ( $M = 4578.18$  g/mol) [4581.05].

*ESI-MS* (positiv),  $m/z$ : 1155.99 ( $[\text{M}+3\text{H}+\text{K}]^{4+}$ , ber. 1155.54), 1540.83 ( $[\text{M}+\text{K}+2\text{H}]^{3+}$ , ber. 1540.39), 1527.85 ( $[\text{M}+3\text{H}]^{3+}$ , ber. 1527.74), 2291.78 ( $[\text{M}+2\text{H}]^{2+}$ , ber. 2291.10).

*HR-ESI-MS* (positiv),  $m/z$ : 1534.3964 ( $[\text{M}+2\text{H}+\text{Na}]^{3+}$ , ber. 1534.3947).

### 5.8.1.5 Konjugation von (Ac-NH-SEFAYGSFVRTVSLPVGAE-Spacer-K-(NH-Squarat-)-Spacer-ESSPNTQWELRAFMA-COOH) mit [(Ac-NH-VNGENLVGDDVVLAT-Spacer-K-Spacer-PAHGV TSA-PDT( $T_N$ )RPAPGS( $T_N$ )TAPPA-COOH] **77**



In einer Pufferlösung aus 390 mg Dinatriumhydrogenphosphat in 6 ml Wasser (pH 9.5) werden 9.70 mg (2.18  $\mu\text{mol}$ ) des Glycopeptids **74** zusammen mit 10.00 mg (2.18  $\mu\text{mol}$ ) des Peptids **76** gelöst. Die Lösung wird 5 d bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend werden die Salze der Pufferlösung und die nicht-gebundenen Glycopeptide durch Filtration mit einer *Millipore* Ultrafiltrationsanlage entfernt. Dabei wird eine Membran verwendet, die Moleküle bis 3 kDa passieren lässt. Der Fortschritt der Filtration wird über den pH-Wert des Filtrats überprüft. Es werden insgesamt viermal 50 ml entionisiertes Wasser durch die Membran gefiltert bis das Filtrat neutral ist. Der verbliebene Überstand wird vorsichtig mit einer Pasteurpipette abgenommen und lyophilisiert.

*Ausbeute:* 18.9 mg (2.08  $\mu\text{mol}$ , 96%) farbloses Lyophilisat.

$\text{C}_{397}\text{H}_{619}\text{N}_{97}\text{O}_{1435}$  ( $M = 9070.92 \text{ g/mol}$ ) [9065.39].

*Drehwert:*  $[\alpha]_D^{27} = -62.3$  ( $c = 0.05$ ,  $\text{H}_2\text{O}$ ).

*ESI-MS* (positiv),  $m/z$ : 1520.10 ( $[\text{M}+4\text{H}+2\text{Na}]^{6+}$ , ber. 1519.74), 1145.94 ( $[\text{M}+4\text{H}+4\text{Na}]^{8+}$ , ber. 1145.55), 1151.20 ( $[\text{M}+6\text{K}+2\text{H}]^{8+}$ , ber. 1151.05).

*HR-ESI-MS* (positiv),  $m/z$ : 1535.7206 ( $[\text{M}+3\text{Na}+2\text{K}+\text{H}]^{8+}$ , ber. 1535.7190).

$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz, DMSO, COSY, HSQC),  $\delta$  (ppm) ausgewählte Signale = 8.40 (1H, d,  $J_{\text{H}_\epsilon, \text{H}_\delta} = 0.84$  Hz,  $\text{H}_\epsilon$ ), 7.31 - 7.23 (m, 15H,  $F_{\text{aromat.}}$ ), 7.19 - 7.18 (m, 4H,  $W_{\text{aromat.}}$ ), 7.34 (s<sub>br</sub>, 1H,  $\text{H}_\delta$ ), 7.12 - 7.08 (m, 4H,  $Y_{\text{aromat.}}$ ), 4.86 (d, 1H,  $J_{\text{H}_1, \text{H}_2} = 3.41$  Hz,  $\text{H}_1$ ), 4.84 (d, 1H,  $J_{\text{H}_1, \text{H}_2} = 3.72$  Hz,  $\text{H}_1$ ), 3.62 - 3.60 (m, 40H, 20x $\text{CH}_2\text{-O-Spacer}$ ), 2.03 - 1.98 (4xs, 12H, 4xAcNH{2.03, 2.02, 1.99, 1.98}), 1.21 - 1.16 (m, 27H, 9x $\text{A}_\beta$ ), 0.91-0.80 (m, 100H, 8x $\text{V}_\gamma$ {0.90}, 4x $\text{L}_\delta$ {0.88}, 6x $\text{T}_\gamma$ {0.86}).

$^{13}\text{C-NMR}$  (100.70 MHz, DMSO, HSQC),  $\delta$  (ppm) ausgewählte Signale = 132.27 ( $\text{H}_\epsilon$ ), 129.22, 129.17 ( $W_{\text{aromat.}}$ ), 128.77, 128.75 ( $F_{\text{aromat.}}$ ), 122.14, 115.59, 115.56 ( $Y_{\text{aromat.}}$ ), 69.67, 69.64, 69.59, 69.50, 69.45 ( $\text{CH}_2\text{-O-Spacer}$ ), 22.30, 22.19, 22.16, 22.14 (4x $\text{L}_\delta$ ), 22.06, 21.88 (4xAcNH), 18.88, 18.86, 18.83 18.80 (9x $\text{A}_\beta$ ), 20.77, 20.74, 20.71, 20.57, 20.54, 20.48 (6x $\text{T}_\gamma$ ), 18.52, 18.48, 18.46, 18.44, 18.41, 18.39, 18.36, 18.32 (8x $\text{V}_\gamma$ ).

## 5.9 Immunologische Evaluierung

Die Arbeiten zur immunologischen Evaluierung wurden in der Arbeitsgruppe von *Herrn Prof. Dr. Xxxxx Xxxxxxx* in Kooperation mit *Herrn Dr. Xxxxxxx Xxxxxxxx* (bis 2012) und *Frau Dipl.-Chem. Xxxxxxx Xxxxxxx* am *Institut für Immunologie der Universitätsmedizin Mainz* durchgeführt.

### 5.9.1 Verwendete Materialien

#### 5.9.1.1 Medien, Puffer und Reagenzien

- CFA (Complete Freund's Adjuvant): Bacto Adjuvant Complete Freund, Control. 645230 (0638-60), *Difco Laboratories*, Detroit

- IFA (Incomplete Freund's Adjuvant): F5506-10x10ML 051M8728, *Sigma Aldrich*, St. Louis, USA
- PBS (Phosphate Buffered Saline): 1.4 M NaCl, 0.1 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH = 7.2
- Tween 20 (Poly(oxy-1,2-ethandiyl)-mono-dekansäuresorbitylester): *Roth*, Karlsruhe
- Zitronensäure: *Roth*, Karlsruhe
- Beschichtungs-Puffer: 0.1 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH = 9.2
- BSA (Rinderserumalbumin): 10%ige Lösung (0.2 µM) in PBS
- Blockpuffer: 0.05% Tween 20, 1% BSA in PBS
- Waschpuffer: 0.1% Tween 20 in PBS
- Citratpuffer: 40 mM Zitronensäure, 60 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>
- ACK-Lysepuffer: 150 mM NH<sub>4</sub>Cl, 1 mM KHCO<sub>3</sub>, 0.1 mM EDTA
- FACS-Puffer: 30 mM EDTA, 0.1% NaN<sub>3</sub>, in PBS
- ABTS (2,2-Azino-bis-3-ethylbenzthiazolin-6-sulfonsäure): 1 mg/ml in Citratpuffer
- Wasserstoffperoxid: 30%ig, wird 1 : 4000 eingesetzt.
- SA-HPO (Streptavidin-Meerrettichperoxidase): 1 : 10 vorverdünnt, Einsatzkonzentration: 1 : 10000
- MEGM BulletKit (Medium für HMEC-Zellen), *Lonza*, Basel (Schweiz)

### 5.9.1.2 Verwendete Antikörper

- **Schaf-anti-Maus IgG, biotinyliert:** Hergestellt von Prof. Dr. Xxxxx Xxxxxxx, Institut für Immunologie, Johannes Gutenberg-Universität Mainz. Dieser Antikörper wird bei ELISA-Experimenten als Sekundärantikörper eingesetzt (Einsatzkonzentration: 0.48 µg/ml).
- **Ratte-anti-Maus IgG<sub>1</sub>, biotinyliert:** *BD Pharmingen* (0.5 mg/ml, Klon: R19-15). Verwendung als Sekundärantikörper in ELISA-Experimenten (Einsatzkonzentration: 1.0 µg/ml).
- **Ratte-anti-Maus IgG<sub>2a</sub>, biotinyliert:** *BD Pharmingen* (0.5 mg/ml, Klon: A85-1). Verwendung als Sekundärantikörper in ELISA-Experimenten (Einsatzkonzentration: 1.0 µg/ml).
- **Ratte-anti-Maus IgG<sub>2b</sub>, biotinyliert:** *BD Pharmingen* (0.25 mg/ml, Klon: G15-337). Verwendung als Sekundärantikörper in ELISA-Experimenten (Einsatzkonzentration: 0.5 µg/ml).
- **Ratte-anti-Maus IgA, biotinyliert:** *eBioscience* (0.5 mg/ml, Klon: 11-44-2). Verwendung als Sekundärantikörper in ELISA-Experimenten (Einsatzkonzentration: 1.0 µg/ml).

- **Ratte-anti-Maus IgD, biotinyliert:** *eBioscience* (0.5 mg/ml, Klon: 11-26). Verwendung als Sekundärantikörper in ELISA-Experimenten (Einsatzkonzentration: 1.0 µg/ml).
- **Ratte-anti-Maus IgM, biotinyliert:** *eBioscience* (0.5 mg/ml, Klon: eB121-15F9). Verwendung als Sekundärantikörper in ELISA-Experimenten (Einsatzkonzentration: 1.0 µg/ml).
- **Ziege-anti-Maus IgG, AlexaFluor488:** *invitrogen*, (2 mg/ml, Klon: A11029). Verwendung als Sekundärantikörper in der durchflusszytometrischen Analyse (Einsatzkonzentration: 2 µg/ml).
- **Maus-anti-taMUC1 IgG<sub>1</sub> (I/30):** Monoklonaler Antikörper gegen tumorassoziertes MUC1, hergestellt von *Dr. Nicola Gaizik, Dr. Xxxxxxx Xxxxxxxx*, Johannes Gutenberg-Universität Mainz. Verwendung in der durchflusszytometrischen Analyse sowie in immunhistochemischen Färbungen von Gewebsschnitten (Einsatzkonzentration 1 µg/ml).

### 5.9.1.3 Zelllinien

**MCF-7 (Mamma Carcinoma Female):**<sup>[198][24]</sup> Humane Brustkrebszelllinie, die tumor-assoziiertes MUC1 exprimiert, erworben von der Fa. *CLS - Cell Lines Service*, Eppelheim.

**T47D:**<sup>[24][199]</sup> Humane Brustkrebszelllinie, die tumorassoziertes MUC1 exprimiert, erworben von der Fa. *CLS - Cell Lines Service*, Eppelheim.

**Panc-1:**<sup>[200]</sup> Humane Pankreaskrebszelllinie, die tumorassoziertes MUC1 exprimiert erworben von der Fa. *CLS - Cell Lines Service*, Eppelheim.

**HMEC (Human Mammary Epithelial Cells):**<sup>[201]</sup> Humane Brustepithelzelllinie, die normales MUC1 exprimiert, erworben von der Fa. *Lonza*, Basel (Schweiz).

### 5.9.1.4 Verbrauchsmaterialien

- 24 Well-Platten, *Greiner Bio-One*, Frickenhausen
- 96 Well-Platten (Spitzboden), *Greiner Bio-One*, Frickenhausen
- 96 Well-Platten (Flachboden, Maxisorb), *Nunc*, Roskilde Dänemark
- 14 ml Röhrchen, *Greiner, Greiner Bio-One*, Frickenhausen
- 50 ml Röhrchen, *Greiner, Greiner Bio-One*, Frickenhausen

- Reaktionsgefäße (1.5 ml, 2.0 ml), *Eppendorf*, Hamburg
- Pasteurpipetten, *VWR International*
- Spritzen (1 ml, 2 ml), *B. Braun*, Melsungen

#### 5.9.1.5 Geräte

- UV-Spektrometer für 96-Well-Platten, *Tecan Reader GENios*, Männedorf, Schweiz
- Durchflusszytometer LSRII Multi-color Flow Cytometer, *BD Biosciences*, San Jose, USA
- Ultraschall Dispergierer, *IKA Ultra-Turrax*, Staufen

### 5.9.2 Durchführung der Immunisierungen

#### 5.9.2.1 Herstellung der Vakzin-Formulierung

Für die im Institut für Immunologie, Universität Mainz, durchgeführten Immunisierungsversuche wurden folgende Formulierungen verwendet:

- Applikation in komplettem Freund'schem Adjuvans: In ein 2 ml-Eppendorfgefäß werden 0.5 ml Komplettes Freund'sches Adjuvans (CFA) und 0.5 ml einer Lösung der Vakzine (0.5 mg/ml) in PBS pipettiert und auf Eis gekühlt. Die beiden Phasen werden durch mehrfaches auf- und abpipettieren zu einer Emulsion verarbeitet und anschließend in eine 2 ml Spritze überführt, deren Öffnung mit Parafilm verschlossen wurde. Mit einem *IKA Ultra-Turrax* Dispergierer wurde das voremulgierte Gemisch unter Eiskühlung zu einer stabilen Emulsion verarbeitet (30 s, 80%). Die gekühlte Emulsion wird anschließend in eine 1 ml Spritze überführt und bis zur Applikation auf Eis gelagert.
- Applikation in inkomplettem Freund'schen Adjuvans: In ein 2 ml-Eppendorfgefäß werden 0.25 ml Inkomplettes Freund'sches Adjuvans (IFA) und 0.5 ml einer Lösung der Vakzine (0.25 mg/ml) in PBS pipettiert und auf Eis gekühlt. Die beiden Phasen werden durch mehrfaches auf- und abpipettieren zu einer Emulsion verarbeitet und anschließend in eine 2 ml-Spritze überführt, deren Öffnung mit Parafilm verschlossen wird. Mit einem *IKA Ultra-Turrax* Dispergierer wurde das voremulgierte Gemisch unter Eiskühlung zu ei-

ner stabilen Emulsion verarbeitet (30 s, 80%). Die gekühlte Emulsion wird anschließend in eine 1 ml Spritze überführt und bis zur Applikation auf Eis gelagert.

- Applikation in PBS: Es werden 250 µl einer Lösung der Vakzine mit einer Konzentration von 0.25 mg/ml bzw. 1.25 mg/ml hergestellt.

### **5.9.2.2 Immunisierungsplan**

Das Injektionsvolumen beträgt bei allen Vakzinformulierungen 40 µl. Aufgrund der hohen Immunogenität können CFA-Formulierungen nur subkutan appliziert werden. Zudem kommen CFA-Formulierungen nur bei der ersten Immunisierung zum Einsatz. Die Auffrischungsimpfungen erfolgen in der Regel mit IFA-Formulierungen und werden intraperitoneal appliziert. Abweichungen vom Standardimmunisierungsplan werden bei den einzelnen Immunisierungsstudien beschrieben. Die Immunisierungen werden immer nach folgendem Schema durchgeführt:

- Die erste Impfung erfolgt subkutan mit CFA
- Drei Auffrischungsimpfungen im Abstand von jeweils 21 Tagen werden intraperitoneal in IFA appliziert.

### **5.9.2.3 Blutprobengewinnung**

Den Mäusen wird 5 Tage nach jeder Auffrischungsimpfung durch Punktierung der Schwanzvene mit einem spitzen Skalpell (Klingen-Nr. 11) etwa 50 bis 100 µl Blut entnommen. Das gewonnene Blut wurde bei 13000 U/min 10 min zentrifugiert, das klare Serum mit einer Pipette abgenommen und erneut bei 1300 U/min 10 min zentrifugiert. Der Überstand wird erneut entnommen und der Rest verworfen.

## 5.10 Nachweis von spezifischen Antikörpern durch ELISA-Experimente

Der Nachweis von Vakzin-spezifischen Serumantikörpern erfolgt nach folgendem Schema:

1. Beschichtung der Platten mit dem Glycopeptid-BSA-Konjugat:

Pro Well einer 96-Well-Platte werden 50 µl BSA-Konjugat (20 µg/ml) in Beschichtungspuffer eine Stunde bei 37 °C inkubiert.

2. Der Überstand wird verworfen und alle Wells der 96-Well-Platte werden dreimal mit Waschpuffer gewaschen.

3. Blocken:

In jedes Well werden 50 µl Blockpuffer vorgelegt, und es wird 30 min bei 37 °C inkubiert.

4. Titration der Seren:

In die erste Reihe (A1 bis A8) der 96-Well-Platte werden 50 µl verdünntes Serum (bei TTOX-Vakzinen 1 : 100 bis 1 : 400, bei vollsynthetischen Vakzinen 1 : 10 bis 1 : 50) vorgelegt. Mit einer Mehrkanalpipette werden nun 50 µl aus der ersten Reihe (A1 bis A8) entnommen und in die nächste Reihe pipetiert (B1 bis B8). Die Proben durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren gemischt und es werden die restlichen Reihen 1 : 1 seriell verdünnt, wobei die letzten 50 µl verworfen werden. Anschließend wird für eine Stunde bei 37 °C inkubiert.

5. Der Überstand wird verworfen und alle Wells der 96-Well-Platte werden dreimal mit Waschpuffer gewaschen.

6. Zugabe des Sekundärantikörpers:

Es werden 50 µl Sekundärantikörper (Konzentration 0.5 µg/ml) in Blockpuffer in jedes Well pipetiert. Anschließend wird eine Stunde bei 37 °C inkubiert.

7. Der Überstand wird verworfen und alle Wells der 96-Well-Platte werden dreimal mit Waschpuffer gewaschen.

8. Zugabe der Streptavidin-Meerrettichperoxidase:

In jedes Well werden 50 µl Streptavidin-Meerrettichperoxidase (Verdünnung 1 : 10000) gegeben. Anschließend wird die 96-Well-Plate 30 min bei 37 °C inkubiert.

9. Der Überstand wird verworfen und alle Wells der 96-Well-Platte werden dreimal mit Waschpuffer gewaschen.

10. Zugabe des ABTS/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Substrats:

In jedes Well werden 50 µl einer Lösung aus ABTS (1 mg/ml) und Wasserstoffperoxid (30%ig, 1 : 4000 verdünnt) in Citratpuffer gegeben. Nach 5 bis 10 Minuten wird die Absorption bei 410 nm gemessen.

### **5.11 Durchflusszytometrische Analyse zum Nachweis von tumorspezifischen Serum-Antikörpern**

Tumorspezifische Serum-Antikörper werden per Durchflusszytometrie nachgewiesen. Dabei wird deren Bindungspotential an humane Tumorzelllinien untersucht. Die Färbung der Zellen wird wie folgt durchgeführt. Für jedes zu überprüfende Serum werden etwa  $5 \times 10^4$  Zellen pro Well einer Spitzbodenplatte vorgelegt. Die Zellen werden bei 2000 U/min 3 min zentrifugiert und der Überstand zweimal mit FACS-Puffer gewaschen. Anschließend werden 50 µl des verdünnten Antiserums (TTOX-Vakzine: 1 : 200 bis 1 : 1000, vollsynthetische Vakzine: 1 : 20 bis 1 : 100) zugegeben und 20 min bei 4 °C inkubiert. Anschließend wird bei 2000 U/min 3 min zentrifugiert und der Überstand verworfen. Die Zellen werden zweimal mit FACS-Puffer gewaschen. Der Sekundärantikörper wird in der entsprechenden Konzentration (siehe verwendete Antikörper) gelöst in 50 µl FACS-Puffer, zugegeben und 20 min bei 4 °C inkubiert. Anschließend wird bei 2000 U/min 3 min zentrifugiert und der Überstand verworfen. Die Zellen werden zweimal mit FACS-Puffer gewaschen, anschließend in FACS-Röhrchen überführt und bis zu Messung bei 4 °C gelagert. Als Positivkontrolle wird der monoklonale I/30 Antikörper verwendet. Als Negativkontrolle dienen Zellen, die lediglich mit dem Sekundärantikörper inkubiert werden.



## 5.12 Färbungen von Zellen für die Fluoreszenzmikroskopie

Die Fluoreszenzmikroskopie wurde in der Arbeitsgruppe von *Frau Prof. Dr. N. Teusch* an der *FH Köln* in Kooperation mit *Frau Xxxxx Xxxxx* durchgeführt. Für jedes zu überprüfende Serum werden etwa  $5 \times 10^3$  Zellen pro Well einer Spitzbodenplatte vorgelegt. Die Zellen werden bei 2000 U/min 3 min zentrifugiert und der Überstand zweimal mit Wasch-Puffer gewaschen. Anschließend werden 50 µl des verdünnten Antiserums (TTOX-Vakzine: 1 : 200 bis 1 : 1000, vollsynthetische Vakzine: 1 : 20 bis 1 : 100) zugegeben und 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wird bei 2000 U/min 3 min zentrifugiert und der Überstand verworfen. Die Zellen werden zweimal mit Wasch-Puffer gewaschen. Der Sekundärantikörper wird in der entsprechenden Konzentration (siehe verwendete Antikörper) gelöst in 50 µl Wasch-Puffer, zugegeben und 20 min bei 4 °C inkubiert. Anschließend wird bei 2000 U/min 3 min zentrifugiert und der Überstand verworfen. Die Zellen werden zweimal mit Wasch-Puffer gewaschen, anschließend auf die Objektträger überführt.

## 5.13 Immunhistochemische Färbung von Pankreaskarzinomzellschnitten

Die Färbung der Zellschnitte erfolgte vollautomatisch an einem *BenchMark XT IHC* Färbeautomaten der Fa. *Ventana* am *Pathologischen Institut Celle* und Aufsicht von *Dr. Xxxx Xxxxxxxx* unter Anwendung des folgenden Protokolls. Dabei wird ein *ultraView Universal DAB Detection Kit* der Fa. *Ventana* zur Färbung der IgG<sub>1</sub>-Serumantikörper verwendet. Die Antiseren werden dabei in einer Verdünnung von 1 : 250 eingesetzt. Der monoklonale Antikörper wird in einer Konzentration von 2 µg/ml eingesetzt.

1 \*\*\*\*\* EZ Prep Auswählen \*\*\*\*\*

2 \*\*\*\*\* Getimete Schritte Starten \*\*\*\*\*

3 \*\*\*\*\* Mischer Aus \*\*\*\*\*

4 Aufheizen des Objektträgers bis 75 °C und für 4 Minuten inkubieren

5 EZPrep Vol. ausgleichen

- 6 Objektträger waschen
- 7 EZPrep Vol. ausgleichen
- 8 Objektträger waschen
- 9 EZPrep Vol. ausgleichen
- 10 Coverslip auftragen
- 11 Aufheizen des Objektträgers bis 76 °C und für 4 Minuten inkubieren
- 12 Objektträger waschen
- 13 Deparaffinierung Vol. ausgleichen
- 14 Coverslip auftragen
- 15 Objektträger-Heizung ausschalten
- 16 \*\*\*\*\* Mischer An \*\*\*\*\*
- 17 [ Kurz- 8 Minuten Conditioning ]
- 18 Objektträger waschen
- 19 Cell Conditioner Nr.1 lang auftragen
- 20 Abgabe von Cell Cond. u. Coverslip lang
- 21 \*\*\*\*\* SSC Wash Auswählen \*\*\*\*\*
- 22 Aufheizen des Objektträgers bis 95 °C und für 8 Minuten inkubieren
- 23 [ Mild - 30 Minuten Conditioning ]
- 24 Cell Conditioner Nr.1 auftragen
- 25 Cell Cond. u. Coverslip auftragen (ohne Barcode Blowoff)
- 26 Aufheizen des Objektträgers bis 100 °C und für 4 Minuten inkubieren
- 27 Cell Cond. u. Coverslip auftragen (ohne Barcode Blowoff)
- 28 Cell Conditioner Nr.1 auftragen
- 29 Cell Cond. u. Coverslip auftragen (ohne Barcode Blowoff)
- 30 Cell Conditioner Nr.1 auftragen
- 31 Cell Cond. u. Coverslip auftragen (ohne Barcode Blowoff)
- 32 Cell Conditioner Nr.1 auftragen
- 33 Cell Cond. u. Coverslip auftragen (ohne Barcode Blowoff)
- 34 Cell Conditioner Nr.1 auftragen
- 35 Cell Cond. u. Coverslip auftragen (ohne Barcode Blowoff)

- 36 Cell Conditioner Nr.1 auftragen
- 37 Cell Cond. u. Coverslip auftragen (ohne Barcode Blowoff)
- 38 Objektträger-Heizung ausschalten
- 39 Inkubieren für 8 Minuten
- 40 Spülen mit Reaktionspuffer
- 41 Feineinstellung des Reaktionspuffervolumens
- 42 Coverslip auftragen
- 43 Spülen mit Reaktionspuffer
- 44 Feineinstellung des Reaktionspuffervolumens
- 45 Coverslip auftragen
- 46 \*\*\*\*\* Synchronisieren der Prozeduren
- 47 Aufheizen des Objektträgers bis 37 °C, und für 4 Minuten inkubieren
- 48 Spülen mit Reaktionspuffer
- 49 Feineinstellung des Reaktionspuffervolumens
- 50 1 Tropfen UV INHIBITOR auftragen, Coverslip auftragen und für 4 Minuten inkubieren.
- 51 Spülen mit Reaktionspuffer
- 52 Feineinstellung des Reaktionspuffervolumens
- 53 Coverslip auftragen
- 54 Aufheizen des Objektträgers bis 37 °C, und für 4 Minuten inkubieren
- 55 Spülen mit Reaktionspuffer
- 56 Feineinstellung des Reaktionspuffervolumens
- 57 Coverslip auftragen
- 58 \*\*\*\*\* Handauftrag (Primär Antikörper) und für [0 Stunden 32 Min] inkubieren \*\*\*\*\*
- 59 Spülen mit Reaktionspuffer
- 60 Feineinstellung des Reaktionspuffervolumens
- 61 Coverslip auftragen
- 62 Aufheizen des Objektträgers bis 37 °C, und für 4 Minuten inkubieren
- 63 Spülen mit Reaktionspuffer
- 64 Zugabe von 200 ul + Volumenausgleich Reaktionspuffer
- 65 1 Tropfen UV HRP UNIV MULT auftragen Coverslip auftragen, und für 8 Minuten inkubieren.

66 Spülen mit Reaktionspuffer

67 Feineinstellung des Reaktionspuffervolumens

68 Coverslip auftragen

69 Spülen mit Reaktionspuffer

70 Feineinstellung des Reaktionspuffervolumens

71 Coverslip auftragen

72 Spülen mit Reaktionspuffer

73 Feineinstellung des Reaktionspuffervolumens

74 1 Tropfen UV DAB und einen Tropfen UV DAB H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> auftragen, LCS auftragen und für 8 Minuten inkubieren.

75 Spülen mit Reaktionspuffer

76 Feineinstellung des Reaktionspuffervolumens

77 1 Tropfen UV COPPER auftragen, Coverslip auftragen und für 4 Minuten inkubieren.

78 Spülen mit Reaktionspuffer

79 Feineinstellung des Reaktionspuffervolumens

80 1 Tropfen von [COUNTERSTAIN 2] ( Gegenfärbung ) auftragen, LCS auftragen u. für [8 Minuten] inkubieren.

81 Spülen mit Reaktionspuffer

82 Feineinstellung des Reaktionspuffervolumens

83 Coverslip auftragen

84 Spülen mit Reaktionspuffer

85 Feineinstellung des Reaktionspuffervolumens

86 1 Tropfen von [BLUING REAGENT] ( Nach-Gegenfärbung ) auftragen, LCS auftragen u. für [4 Minuten] inkubieren.

87 Spülen mit Reaktionspuffer

88 Coverslip auftragen

89 Objektträger-Heizung ausschalten

90 \*\*\*\*\* Optionalen Waschvorgang Auswählen \*\*\*\*\*

91 \*\*\*\*\* SSC Wash Auswählen \*\*\*\*\*

92 \*\*\*\*\* Getimete Schritte Starten \*\*\*\*\*

93 Spülen mit Reaktionspuffer

Nach der Färbung wurden die Zellschnitte mit einem Durchlichtmikroskop mit Kamerafunktion bei 100-facher und 200-facher Vergrößerung fotografiert.

## 6 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.1: Unterschiede der Glycosylierung von normalen Epithelzellen und epithelialen Tumorzellen (oben) und die Auswirkung auf die Morphologie der Zellen und auf den Zellverband (unten).	5
Abb. 2.1: Die geschützten Aminosäurebausteine T <sub>N</sub> und Sialyl-T <sub>N</sub> (oben) und die bisher etablierte Peptidsequenz (unten).	8
Abb. 3.1: T <sub>N</sub> -Threonin-Antigen 12b, T <sub>N</sub> -Serin-Antigen 12 und Sialyl-T <sub>N</sub> -Serin-Antigen 22 als Glycosylaminosäurebausteine für die Festphasenglycopeptidsynthese.	12
Abb. 3.2: Darstellung des N- und C-terminal blockierten L-Serins 3.	13
Abb. 3.3: Darstellung des acetylierten α-Galactosylbromids 6.	13
Abb. 3.4: Partielle Aufhebung der Dipolmomente bei axialer Stellung (links) und Addition der Dipolmomente bei äquatorialer Anordnung (rechts) der anomeren Gruppe.	14
Abb. 3.5: Hyperkonjugation bei axialer Anordnung des Bromids.	14
Abb. 3.6: Reduktive Eliminierung zum 3,4,6-Tri-O-acetylgalactal 7.	15
Abb. 3.7: Azidonitratisierung nach Lemieux.	15
Abb. 3.8: Vorgeschlagener Mechanismus der Azidonitratisierung nach <i>Lemieux</i> .	16
Abb. 3.9: Synthese des Azidobromids 9.	16
Abb. 3.10: Herstellung der Glycosylaminosäure 10 nach <i>Königs-Knorr</i> in einer Variante nach <i>Paulsen</i> .	17
Abb. 3.11: Mechanismus der Glycosylierungsreaktion.	17
Abb. 3.12: Reduktion und N-Acetylierung zum vollständig blockiertem T <sub>N</sub> -Serin-Antigen.	18
Abb. 3.13 Acidolyse der C-terminalen <i>tert</i> -Butylschutzgruppe.	18
Abb. 3.14: Synthese des Sialylakzeptors 13.	19
Abb. 3.15: Mechanismus der Deacetylierung.	20
Abb. 3.16: Blockierung der N-Acetylneuraminsäure.	20
Abb. 3.17: Darstellung des Sialinsäuredonors 18.	21
Abb. 3.18: Aktivierung des Glycosyldonors 18 mit Methylsulfonylbromid.	21
Abb. 3.19: Nebenreaktion des aktivierten Glycosyldonors 18b zum Glycal 18c.	22
Abb. 3.20: Kontrolle der Stereoselektivität bei der Sialylierung über den Nitrileffekt.	22
Abb. 3.21: Sialylierungsreaktion Sialyl-T <sub>N</sub> -Serin-Antigen Derivat 20.	23
Abb. 3.22: Acetylierung der C3- und C4-Position und Deblockierung des C-Terminus zum Sialyl-T <sub>N</sub> -Festphasenbaustein 22.	24
Abb. 3.23: Verwendung eines Abstandhalters zum Aufbau von Vakzinen.	25
Abb. 3.24: Synthese des Fmoc-Spaceraminosäurebausteins 29.	26
Abb. 3.25: Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe durch Piperidin.	28
Abb. 3.26: Fmoc-Abspaltprotokoll einer Festphasenpeptidsynthese.	29

<b>Abb. 3.27: Säurelabile Seitenkettenschutzgruppen.</b>	<b>30</b>
<b>Abb. 3.28: Struktur des TentaGel-Harzes 38.</b>	<b>30</b>
<b>Abb. 3.29: Mechanismus der Diketopiperazinbildung.</b>	<b>31</b>
<b>Abb. 3.30: Verwendete Kupplungsreagenzien und Zusätze.</b>	<b>32</b>
<b>Abb. 3.31: Mechanismus der Reaktivesterbildung und Ausbildung der Amidbindung bei der Festphasenpeptidsynthese.</b>	<b>33</b>
<b>Abb. 3.32: Synthese der Glycopeptide mit N-terminalem Spacer an der festen Phase.</b>	<b>36</b>
<b>Abb. 3.33: Entfernung der Acetylschutzgruppen des T<sub>N</sub>-Serin-Antigens am Glycopeptid.</b>	<b>37</b>
<b>Abb. 3.34: Entfernung der Acetyl- und Benzylschutzgruppen des Sialyl-T<sub>N</sub>-Serin-Antigens am Glycopeptid.</b>	<b>38</b>
<b>Abb. 3.35: A) HPLC-Elugramm, B) ESI-Massenspektrum und C) HR-ESI-Massenspektrum von Glycopeptid 50.</b>	<b>39</b>
<b>Abb. 3.36: A) <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum und B) HSQC-Spektrum von Glycopeptid 50.</b>	<b>40</b>
<b>Abb. 3.37: Wichtige Rezeptoren zur Erkennung von PAMPs.</b> <sup>[85,94,95]</sup>	<b>41</b>
<b>Abb. 3.38: Murine T<sub>H1</sub>-T<sub>H2</sub> T-Zell-Differenzierung durch Cytokine.</b>	<b>44</b>
<b>Abb. 3.39: Modell der T- und B-Zell Kooperation.</b>	<b>46</b>
<b>Abb. 3.40: Aufbau eines IgG-Antikörpers.</b>	<b>47</b>
<b>Abb. 3.41: Eigenschaften humaner und muriner IgM- und IgG- Antikörper.</b>	<b>48</b>
<b>Abb. 3.42: Synthese der Quadratsäuremonoamidethylester 52, 53, 54 und 55.</b>	<b>52</b>
<b>Abb. 3.43 Darstellung eines BSA-Konjugates.</b>	<b>53</b>
<b>Abb. 3.44: In dieser Arbeit hergestellte BSA-Konjugate 56 - 59 (oben) und MALDI-TOF-Spektrum von BSA (unten links) und von Struktur 59 (unten rechts).</b>	<b>54</b>
<b>Abb. 3.45: Schematische Darstellung des ELISA.</b>	<b>56</b>
<b>Abb. 3.46: Beispielhafte Darstellung einer entwickelten ELISA 96-Mikrotiterplatte.</b>	<b>57</b>
<b>Abb. 3.47: Synthese der TTox-Konjugate 60, 61 und 62.</b>	<b>59</b>
<b>Abb. 3.48: Entwicklung der Antikörpertiter nach einer Erstinfektion mit Dengueviren.</b> <sup>[153]</sup>	<b>61</b>
<b>Abb. 3.49: Zeitplan zur Immunisierungsstudie.</b>	<b>62</b>
<b>Abb. 3.50: Erhöhung der Titer von Serumantikörpern durch Auffrischungsimpfungen, Vakzine 60, Maus 1, BSA-Coat 57. Erstimpfung mit komplettem Freund's Adjuvans (CFA), Auffrischungsimpfungen mit inkomplettem Freund's Adjuvans (IFA).</b>	<b>63</b>
<b>Abb. 3.51: IgG-Antikörpertiter induziert durch Vakzine 60 nach dem 3. Bluten, BSA-Coat 57. Erstimpfung mit komplettem Freund's Adjuvans (CFA), Auffrischungsimpfungen mit inkomplettem Freund's Adjuvans (IFA).</b>	<b>64</b>
<b>Abb. 3.52: IgG-Antikörpertiter induziert durch Vakzine 61 nach dem 3. Bluten, BSA-Coat 58. Erst- und Auffrischungsimpfungen nur mit inkompletten Freund's Adjuvans (IFA).</b>	<b>65</b>
<b>Abb. 3.53: IgG-Antikörpertiter induziert durch Vakzine 62 nach dem 3. Bluten, BSA-Coat 59. Erst- und Auffrischungsimpfungen nur mit inkompletten Freund's Adjuvans (IFA).</b>	<b>65</b>

- Abb. 3.54:** Bestimmung der durch Vakzine 60 (oben), 61 (mittig) und 62 (unten) induzierten Antikörperisotypen fünf Tage nach der letzten Immunisierung durch ELISA-Experimente. 67
- Abb. 3.55:** Durchflusszytometrische Bestimmung der Bindung von Serumantikörpern induziert durch Vakzine 60 (linke Spalte), 61 (mittlere Spalte) und 62 (rechte Spalte) an humanen Brustkrebszellen (T47D). Gezeigt sind die 1 : 250 verdünnten Seren nach dem zweiten Bluten. Negativkontrolle: Färbung der Zellen allein mit Sekundärantikörper. 69
- Abb. 3.56:** Nachweis der MUC1-Expression in T47D-, Panc-1- und HMEC-Zellen durch PCR. 72
- Abb. 3.57:** Auflistung der Vakzine, deren Bindungsselektivität durch Analyse der Vakzin-induzierten Antikörper bestimmt wurde. 73
- Abb. 3.58:** Ergebnisse der durchflusszytometrischen Analyse zur Untersuchung der Selektivität von Vakzin-induzierten Antikörpern an HMEC- und T47D-Zellen. Getestet wurden Serumantikörper, die durch Vakzine 60 und 62 - 66 induziert wurden. Bei dem mAK I/30 handelt es sich um einen monoklonalen Antikörper, der durch die Hybridomtechnik nach Immunisierung mit Vakzine 61 erzeugt wurde. Die Strukturen der B-Zell-Epitope zu den Vakzinen 60 - 66 finden sich in Abb. 3.57. 75
- Abb. 3.59:** Durchlichtmikroskopische Aufnahme von humanen Brustkrebszellen (MCF-7, links) und normalen MUC1-exprimierenden Brustepithelzellen (HMEC, rechts). 76
- Abb. 3.60:** Struktur von 4'6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI, oben) und Negativkontrolle durch Inkubation des Sekundärantikörpers mit MCF-7 Zellen (unten links) und HMEC-Zellen (unten rechts). Die Zellkerne wurden mit DAPI angefärbt. 77
- Abb. 3.61:** Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme von MCF-7-Brustumorzellen (links) und normalen HMEC-Brustepithelzellen (rechts), die mit Serumantikörpern (induziert durch Vakzine 60, Maus 3) und dem fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörper inkubiert wurden. Die Zellkerne der HMEC-Zellen wurden mit DAPI blau angefärbt. 78
- Abb. 3.62:** Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme von MCF-7-Brustumorzellen (links) und normalen HMEC-Brustepithelzellen (rechts), die mit dem monoklonalen Antikörper I/30 (induziert durch Vakzine 61) und dem fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörper inkubiert wurden. Die Zellkerne der HMEC-Zellen wurden mit DAPI blau angefärbt. 78
- Abb. 3.63:** Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme von MCF-7-Brustumorzellen (links) und normalen HMEC-Brustepithelzellen (rechts), die mit Serumantikörpern (induziert durch Vakzine 63, Maus 1) und dem fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörper inkubiert wurden. Die Zellkerne der HMEC-Zellen wurden mit DAPI blau angefärbt. 79
- Abb. 3.64:** Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme von MCF-7-Brustumorzellen (links) und normalen HMEC-Brustepithelzellen (rechts), die mit Serumantikörpern (induziert durch Vakzine 64, Maus 1) und dem fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörper inkubiert wurden. Die Zellkerne der HMEC-Zellen wurden mit DAPI blau angefärbt. 79



- Abb. 3.65:** Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme von MCF-7-Brustumorzellen (links) und normalen HMEC-Brustepithelzellen (rechts), die mit Serumantikörpern (induziert durch Vakzine 65, Maus 1) und dem fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörper inkubiert wurden. Die Zellkerne der HMEC-Zellen wurden mit DAPI blau angefärbt. 80
- Abb. 3.66:** Durchflusszytometrische Analyse zur Bindungaffinität des monoklonalen Antikörpers I/30 an Panc1-Zellen (links) und T47D-Zellen (rechts). 82
- Abb. 3.67:** Farbreaktion des 3,3'-Diaminobenzidin (DAB) katalysiert durch die Meerrettichperoxidase (HRP). 83
- Abb. 3.68:** Bindung der durch Vakzine 60 induzierten Serumantikörper (Maus 1, Verdünnung 1:250) an Panc1-Pankreastumorzellen (A). Färbung von duktalem Adenokarzinom in 100-facher Vergrößerung (B, D), 200-facher Vergrößerung (C) und 400-facher Vergrößerung (E) sowie die Färbung eines fortgeschrittenen Adenokarzinoms in 100-facher Vergrößerung (F). 84
- Abb. 3.69:** Bindung des monoklonalen Antikörpers I/30 (induziert durch Vakzine 61, Konzentration 1 µg/ml) an Panc1-Pankreastumorzellen (A). Färbung eines duktalem Adenokarzinoms in 100- und 200-facher Vergrößerung (B, C). Färbung eines muzinösen Cystadenokarzinoms in 100- und 200-facher Vergrößerung (D, E). Färbung eines solid-zystischen Pankreastumors in 100-facher Vergrößerung (F). 85
- Abb. 3.70:** Bindung der durch Vakzine 63 induzierten Serumantikörper (Maus 3, Verdünnung 1:250) an Panc1-Pankreastumorzellen (A). Färbung eines duktalem Adenokarzinoms in 100- und 200-facher Vergrößerung (B, C). 86
- Abb. 3.71:** Bindung der durch Vakzine 64 induzierten Serumantikörper (Maus 1, Verdünnung 1:250) an Panc1-Pankreastumorzellen (A). Färbung eines duktalem Adenokarzinoms in 100- und 200-facher Vergrößerung (B, C). 86
- Abb. 3.72:** CpG-Motiv ODN 1826 mit Aminolinker am 5'-Ende. 90
- Abb. 3.73:** Synthese des Glycopeptids 68 an der festen Phase. 91
- Abb. 3.74:** Deblockierung des Glycopeptids 68 und Synthese des Quadratsäuremonoamidethylesters 70. 92
- Abb. 3.75:** Reaktion des CpG-Motivs 67 mit dem Monosquarat des Glycopeptids 70 zur fertigen Dreikomponentenvakzine 71. 93
- Abb. 3.76:** Bestimmung der durch Vakzine 70 und 71 induzierten IgG-Serumantikörper nach der ersten Auffrischungsimpfung durch ELISA-Analysen (verwendeter BSA-Coat: 58). 94
- Abb. 3.77:** Bestimmung der durch Vakzine 70 und 71 induzierten IgG-Serumantikörper nach der dritten Auffrischungsimpfung durch ELISA-Analysen (verwendeter BSA-Coat: 58). 95
- Abb. 3.78:** Durchflusszytometrische Bestimmung der Bindungaffinität der durch Vakzine 70 und 71 induzierten Serumantikörper zu T47D Tumorzellen (eFluor670 färbt ausschließlich tote Zellen an, Negativkontrolle: nur Sekundärantikörper, Positivkontrolle: monoklonaler Antikörper I/30 (Konzentration 1 µg/ml)). 96
- Abb. 3.79:** Konzept der Vierkomponenten-Vakzine mit drei verschiedenen T-Helferzell-Epitopen. 97
- Abb. 3.80:** Schematische Darstellung der automatisierten Festphasenglycopeptidsynthese von Glycopeptid 73. 99
- Abb. 3.81:** Synthese des deblockierten der Glycopeptids 74. 100

Abb. 3.82: Schematische Darstellung der automatisierten Festphasenpeptidsynthese von Peptid 75.	101
Abb. 3.83: Synthese des Quadratsäuremonoamidethylesters 76.	102
Abb. 3.84: Konjugation von Glycopeptid 74 mit Peptid 76 zur Vakzine 77.	103
Abb. 3.85: ELISA-Analyse der IgG-Antikörpertiter, die durch Vakzine 74 und 77 induziert worden sind nach der ersten (oben) und nach der dritten (unten) Auffrischungsimpfung (BSA-Coat 56).	104
Abb. 3.86: Bestimmung der durch Vakzine 74 (oben) und 77 (unten) induzierten Antikörper-Isotypen fünf Tage nach der letzten Immunisierung durch ELISA-Experimente.	105
Abb. 3.87: Ergebnisse der durchflusszytometrischen Analyse zur Bestimmung der Bindungsaffinität der durch Vakzine 74 und 77 induzierten Serumantikörper an humanen T47D-Tumorzellen. Negativkontrolle: Färbung mit dem Fluoreszenzfarbstoff-markiertem Sekundärantikörper.	106
Abb. 3.88: Aufbau der Fünfkomponenten-Vakzine mit drei cytotoxischen T-Zell-Epitopen aus der Sequenz des MUC1.	109
Abb. 3.89: Festphasensynthese der Glycopeptidkonjugate 78 und 79.	110
Abb. 3.90: Entfernung der Glycanschutzgruppen von Glycopeptid 78.	110
Abb. 3.91: Entfernung der Schutzgruppen von Glycopeptid 79.	111
Abb. 3.92: ELISA-Analyse der IgG-Antikörpertiter, die durch Vakzine 80 und 81 induziert wurden nach der vierten Auffrischungsimpfung (BSA-Coat 59).	112
Abb. 3.93: Bestimmung der durch Vakzine 80 (oben) und 81 (unten) induzierten Antikörperisotypen fünf Tage nach der letzten Immunisierung durch ELISA-Experimente (BSA-Coat 59).	112
Abb. 3.94: Ergebnisse der durchflusszytometrischen Analyse zur Bestimmung der Bindungsaffinität der durch Vakzine 80 und 81 induzierten Serumantikörper an humanen T47D-Tumorzellen. (Negativkontrolle: Färbung mit dem Fluoreszenzfarbstoff-markiertem Sekundärantikörper, Positivkontrolle: mAκ I/30 c = 1 µg/ml).	113
Abb. 3.95: Synthese der zur <i>ex vivo</i> Restimulation benötigten T-Zell-Epitope 82, 83 und 84.	114
Abb. 3.96: Verwendete Antikörper zur Charakterisierung der T-Zellen nach der Restimulation <i>ex vivo</i> .	115
Abb. 3.97: Darstellung der Gating-Strategie zur durchflusszytometrischen Analyse anhand der Negativkontrolle (Kontrollmaus immunisiert mit PBS, keine <i>ex vivo</i> -Restimulation) der inguinalen Lymphknoten (A). Darstellung der durchflusszytometrischen Analyse von Maus 1, immunisiert mit Vakzine 81 (inguinale Lymphknoten, <i>ex vivo</i> restimuliert mit Peptid 82, 83 und 84).	116
Abb. 3.98: Prozentualer Anteil der cytotoxischen CD8 <sup>+</sup> T-Zellen (A) und der CD4 <sup>+</sup> T-Helferzellen (B) in der Milz, den mesenterialen und den inguinalen Lymphknoten fünf Tage nach der vierten Auffrischungsimpfung. Gezeigt ist der prozentuale Anteil bezogen auf alle lebenden Zellen (Negativkontrolle: Kontrollmaus immunisiert mit PBS).	117
Abb. 3.99: Nachweis von CD8 <sup>+</sup> Gedächtnis- (A), CD8 <sup>+</sup> Effektor- (B) und IFN-γ produzierenden T-Zellen aus der Milz nach der <i>ex vivo</i> Restimulation mit den Peptiden 82, 83 oder 84. Gemessen wurde der prozentuale Anteil von der CD8 <sup>+</sup> T-Zellpopulation (vgl. Abb. 97 A).	119

<b>Abb. 4.1: Bausteine für die Festphasenpeptidsynthese: T<sub>N</sub><sup>-</sup>, Sialyl-T<sub>N</sub><sup>-</sup> und Spaceraminosäurebaustein.</b>	<b>123</b>
<b>Abb. 4.2: Im Rahmen dieser Arbeit hergestellte TTox-Vakzine 60, 61 und 62.</b>	<b>123</b>
<b>Abb. 4.3: A) Färbung von humanen MCF-7-Brusttumorzellen (links) und normalen Brustepithelzellen (HMEC, rechts) mit dem mAK I/30 (grün), induziert durch Vakzine 61. Zur Erkennung der HMEC-Zellen wurde der Zellkern mit DAPI blau angefärbt Kooperation mit Frau Prof. N. Teusch und Frau Xxxxx Xxxxx, Fachhochschule Köln. B) 100-fache Vergrößerung der Färbung eines humanen mucinösen Cystadenokarzinoms mit dem mAK I/30 (Kooperation mit Herrn PD Dr. X. Xxxxxxxx von Pathologischen Institut, Celle).</b>	<b>125</b>
<b>Abb. 4.4: Vollsynthetische Zweikomponenten-Vakzine (bakterielles T-Zell-Epitop-MUC1-B-Zell-Epitop).</b>	<b>126</b>
<b>Abb. 4.5: Dreikomponenten-Vakzine mit einem CpG-DNA-Motiv als internem Adjuvans.</b>	<b>126</b>
<b>Abb. 4.6: Konjugation zur Vierkomponenten-Vakzine mit einem MUC1-B-Zell-Epitop und drei verschiedenen T-Helferzell-Epitopen.</b>	<b>127</b>
<b>Abb. 4.7: Vakzin-induzierte Antikörpertiter nach der zweiten (links) und nach der vierten Immunisierung (rechts).</b>	<b>128</b>
<b>Abb. 4.8: Fünfkomponentenvakzine 81 mit MUC1-B-Zell-Epitop, T-Helferzell-Epitop und drei cytotoxischen T-Zell-Epitopen.</b>	<b>129</b>
<b>Abb. 4.9: Aktivierung von cytotoxischen T-Zellen (mLN: mesenteriale Lymphknoten, iLN: inguinale Lymphknoten).</b>	<b>129</b>

## 7 Literaturverzeichnis

- [1] E. Caffarelli, P. Filetici, *Front. Biosci. (Landmark Ed.)* **2011**, *16*, 2682–94.
- [2] T. Bogenrieder, M. Herlyn, *Oncogene* **2003**, *22*, 6524–36.
- [3] C. J. Stein, G. A. Colditz, *Br. J. Cancer* **2004**, *90*, 299–303.
- [4] A. Jemal, R. Siegel, J. Xu, E. Ward, *CA. Cancer J. Clin.* **2010**, *60*, 277–300.
- [5] A. Ki Che Leung, in *Hist. Vaccine Dev.* (Ed.: S.A. Plotkin), **2011**, pp. 5–12.
- [6] D. Baxby, *Vaccine* **1999**, *17*, 301–307.
- [7] S. H. E. Kaufmann, U. E. Schaible, *Trends Microbiol.* **2005**, *13*, 469–75.
- [8] S. A. Plotkin, *Nat. Med.* **2005**, *11*, S5–11.
- [9] E. A. von Behring, S. Kitasato, *DMW - Dtsch. Medizinische Wochenschrift* **1890**, *16*, 1113–1114.
- [10] L. V. Parijs, *Science (80-. )*. **1998**, *280*, 243–248.
- [11] A. N. Houghton, *J. Exp. Med.* **1994**, *180*, 1–4.
- [12] S. Nath, P. Mukherjee, *Trends Mol. Med.* **2014**, *20*, 332–42.
- [13] M. A. Hollingsworth, B. J. Swanson, *Nat. Rev. Cancer* **2004**, *4*, 45–60.
- [14] A. P. Corfield, *Biochim. Biophys. Acta* **2014**, DOI 10.1016/j.bbagen.2014.05.003.
- [15] F. Levitin, O. Stern, M. Weiss, C. Gil-Henn, R. Ziv, Z. Prokocimer, N. I. Smorodinsky, D. B. Rubinstein, D. H. Wreschner, *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 33374–86.

- [16] S. J. Gendler, J. Burchell, C. A. Lancaster, D. Wilson, *J. Biol. Chem.* **1990**, *265*, 15286–15293.
- [17] S. Röttger, J. White, H. H. Wandall, J. C. Olivo, A. Stark, E. P. Bennett, C. Whitehouse, E. G. Berger, H. Clausen, T. Nilsson, *J. Cell Sci.* **1998**, *111* ( Pt 1, 45–60.
- [18] K. Ohtsubo, J. D. Marth, *Cell* **2006**, *126*, 855–67.
- [19] I. Brockhausen, *EMBO Rep.* **2006**, *7*, 599–604.
- [20] N. Jonckheere, N. Skrypek, F. Frénois, I. Van Seuningen, *Biochimie* **2013**, *95*, 1077–86.
- [21] I. Brockhausen, J. M. Yang, J. Burchell, C. Whitehouse, J. Taylor-Papadimitriou, *Eur. J. Biochem.* **1995**, *233*, 607–17.
- [22] G. Picco, S. Julien, I. Brockhausen, R. Beatson, A. Antonopoulos, S. Haslam, U. Mandel, A. Dell, S. Pinder, J. Taylor-Papadimitriou, et al., *Glycobiology* **2010**, *20*, 1241–50.
- [23] J. Arklie, J. Taylor-Papadimitriou, W. Bodmer, M. Egan, R. Millis, *Int. J. Cancer* **1981**, *28*, 23–9.
- [24] I. Brockhausen, J.-M. Yang, J. Burchell, C. Whitehouse, J. Taylor-Papadimitriou, *Eur. J. Biochem.* **1995**, *233*, 607–617.
- [25] F.-G. Hanisch, J. Peter-Katalinic, H. Egge, U. Dabrowski, G. Uhlenbruck, *Glycoconj. J.* **1990**, *7*, 525–543.
- [26] F.-G. Hanisch, S. Muller, *Glycobiology* **2000**, *10*, 439–449.
- [27] A. Kaiser, N. Gaidzik, U. Westerlind, D. Kowalczyk, A. Hobel, E. Schmitt, H. Kunz, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2009**, *48*, 7551–5.
- [28] 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.

- [29] B. L. Wilkinson, S. Day, L. R. Malins, V. Apostolopoulos, R. J. Payne, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2011**, *50*, 1635–9.
- [30] 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.
- [31] A. Aderem, R. J. Ulevitch, *Nature* **2000**, *406*, 782–7.
- [32] M. Glaffig, B. Palitzsch, S. Hartmann, C. Schüll, L. Nuhn, B. Gerlitzki, E. Schmitt, H. Frey, H. Kunz, *Chemistry* **2014**, *20*, 4232–6.
- [33] L. Nuhn, S. Hartmann, B. Palitzsch, B. Gerlitzki, E. Schmitt, R. Zentel, H. Kunz, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2013**, *52*, 10652–6.
- [34] J. L. Czapinski, C. R. Bertozzi, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2006**, *10*, 645–51.
- [35] Y. S. Kim, J. Gum, I. Brockhausen, *Glycoconj. J.* **1996**, *13*, 693–707.
- [36] C. D. Chang, J. Meienhofer, *Int. J. Pept. Protein Res.* **1978**, *11*, 246–9.
- [37] A. Paquet, *Can. J. Chem.* **1982**, *60*, 976–980.
- [38] B. Neises, W. Steglich, *Angew. Chem.* **1978**, *17*, 522–524.
- [39] P. Braun, *Diss. Univ. Mainz* **1993**.
- [40] A. P. Kozikowski, J. Lee, *J. Org. Chem.* **1990**, *55*, 863–870.
- [41] T. K. Lindhorst, *Essentials of Carbohydrate Chemistry and Biochemistry.*, Wiley-VCH, Weinheim, **2003**.
- [42] S. Koto, K. Asami, M. Hirooka, K. Nagura, M. Takizawa, S. Yamamoto, N. Okamoto, M. Sato, H. Tajima, T. Yoshida, et al., *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1999**, *72*, 765–777.

- [43] R. M. Ratcliffe, R. U. Lemieux, *Can. J. Chem.* **1979**, *57*, 1244–1251.
- [44] R. M. Lemieux, R. M. Ratcliffe, *Dtsch. Patentanmeldung* **1978**, AZ: P 2816340.8.
- [45] H. Paulsen, J.-P. Hölck, *Carbohydr. Res.* **1982**, *109*, 89–107.
- [46] H. Paulsen, S. Peters, T. Bielfeldt, M. Meldal, K. Bock, *Carbohydr. Res.* **1995**, *268*, 17–34.
- [47] E. Meinjohanns, M. Meldal, A. Schleyer, H. Paulsen, K. Bock, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* **1996**, 985–993.
- [48] C. Brocke, *Diss. Univ. Mainz* **1996**.
- [49] C. Brocke, H. Kunz, *Synthesis (Stuttg.)* **2004**, 525–542.
- [50] S. Dziadek, C. Brocke, H. Kunz, *Chemistry* **2004**, *10*, 4150–62.
- [51] A. Marra, P. Sinaÿ, *Carbohydr. Res.* **1989**, *187*, 35–42.
- [52] B. Liebe, H. Kunz, *Angew. Chemie Int. Ed. English* **1997**, *36*, 618–621.
- [53] B. Liebe, H. Kunz, *Helv. Chim. Acta* **1997**, *80*, 1473–1482.
- [54] J. C. Lee, Y. S. Oh, S. H. Cho, J. D. Lee, *Org. Prep. Proced. Int.* **1996**, *28*, 480–483.
- [55] F. Dasgupta, P. J. Garegg, *Carbohydr. Res.* **1988**, *177*, c13–c17.
- [56] P. J. Garegg, *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* **1997**, *52*, 179–205.
- [57] H. Lönn, K. Stenvall, *Tetrahedron Lett.* **1992**, *33*, 115–116.
- [58] R. R. Schmidt, M. Behrendt, A. Toepfer, *Synlett* **1990**, *1990*, 694–696.
- [59] O. Kanie, M. Kiso, A. Hasegawa, *J. Carbohydr. Chem.* **1988**, *7*, 501–506.
- [60] S. Dziadek, *Diss. Univ. Mainz* **2004**.

- [61] O. Seitz, H. Kunz, *J. Org. Chem.* **1997**, *62*, 813–826.
- [62] O. Seitz, H. Kunz, *Angew. Chemie* **1995**, *107*, 901–904.
- [63] M. a Tarp, A. L. Sørensen, U. Mandel, H. Paulsen, J. Burchell, J. Taylor-Papadimitriou, H. Clausen, *Glycobiology* **2007**, *17*, 197–209.
- [64] J. M. Cruse, R. E. Lewis, *Contrib. Microbiol. Immunol.* **1989**, *10*, 1–10.
- [65] C. V Garner, G. B. Pier, *Contrib. Microbiol. Immunol.* **1989**, *10*, 11–7.
- [66] L. Moens, S. G. Tangye, *Front. Immunol.* **2014**, *5*, 65.
- [67] R. B. Merrifield, *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, *85*, 2149–2154.
- [68] S. B. Kent, *Annu. Rev. Biochem.* **1988**, *57*, 957–89.
- [69] C.-D. Chang, J. Meienhofer, *Int. J. Pept. Protein Res.* **2009**, *11*, 246–249.
- [70] J. Vágner, G. Barany, K. S. Lam, V. Krchnák, N. F. Sepetov, J. a Ostrem, P. Strop, M. Lebl, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1996**, *93*, 8194–9.
- [71] St Hilaire PM, M. Meldal, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2000**, *39*, 1162–1179.
- [72] T. M. Fyles, C. C. Leznoff, *Can. J. Chem.* **1976**, *54*, 935–942.
- [73] P. M. Fischer, *J. Pept. Sci.* **2003**, *9*, 9–35.
- [74] V. Dourtoglou, J.-C. Ziegler, B. Gross, *Tetrahedron Lett.* **1978**, *19*, 1269–1272.
- [75] M. Amblard, J.-A. Fehrentz, J. Martinez, G. Subra, *Mol. Biotechnol.* **2006**, *33*, 239–54.
- [76] L. A. Carpino, A. El-Faham, C. A. Minor, F. Albericio, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1994**, 201.
- [77] W. König, R. Geiger, *Chem. Ber.* **1970**, *103*, 788–98.



- [78] L. A. Carpino, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 4397–4398.
- [79] P. Braun, G. M. Davies, M. R. Price, P. M. Williams, S. J. Tendler, H. Kunz, *Bioorg. Med. Chem.* **1998**, *6*, 1531–45.
- [80] M. R. Price, P. D. Rye, E. Petrakou, A. Murray, K. Brady, S. Imai, S. Haga, Y. Kiyozuka, D. Schol, M. F. a. Meulenbroek, et al., *Tumor Biol.* **1998**, *19*, 1–20.
- [81] N. Gaidzik, A. Kaiser, D. Kowalczyk, U. Westerlind, B. Gerlitzki, H. P. Sinn, E. Schmitt, H. Kunz, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2011**, *50*, 9977–81.
- [82] F. Corzana, J. H. Busto, G. Jiménez-Osés, M. García de Luis, J. L. Asensio, J. Jiménez-Barbero, J. M. Peregrina, A. Avenoza, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 9458–67.
- [83] S. Hartmann, *Diss. Univ. Mainz* **2014**.
- [84] C. A. Janeway, *Immunol. Today* **1992**, *13*, 11–6.
- [85] R. Medzhitov, C. a Janeway, *Science* **2002**, *296*, 298–300.
- [86] D. T. Fearon, R. M. Locksley, *Science* **1996**, *272*, 50–3.
- [87] R. Medzhitov, C. A. Janeway, *Curr. Opin. Immunol.* **1997**, *9*, 4–9.
- [88] S. P. Hogan, H. F. Rosenberg, R. Moqbel, S. Phipps, P. S. Foster, P. Lacy, a B. Kay, M. E. Rothenberg, *Eosinophils: Biological Properties and Role in Health and Disease.*, **2008**.
- [89] C. Prussin, D. D. Metcalfe, *J. Allergy Clin. Immunol.* **2003**, *111*, S486–S494.
- [90] E. Vivier, D. H. Raulet, A. Moretta, M. a Caligiuri, L. Zitvogel, L. L. Lanier, W. M. Yokoyama, S. Ugolini, *Science* **2011**, *331*, 44–9.
- [91] C. Nathan, *Nat. Rev. Immunol.* **2006**, *6*, 173–82.

- [92] N. V Serbina, T. P. Salazar-Mather, C. a Biron, W. a Kuziel, E. G. Pamer, *Immunity* **2003**, *19*, 59–70.
- [93] M. E. Bianchi, *J. Leukoc. Biol.* **2007**, *81*, 1–5.
- [94] S. Akira, K. Takeda, T. Kaisho, *Nat. Immunol.* **2001**, *2*, 675–80.
- [95] K. Takeda, S. Akira, *Int. Immunol.* **2005**, *17*, 1–14.
- [96] C. a Janeway, R. Medzhitov, *Annu. Rev. Immunol.* **2002**, *20*, 197–216.
- [97] H. J. Müller-Eberhard, *Annu. Rev. Biochem.* **1988**, *57*, 321–47.
- [98] B. P. Morgan, *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **1992**, *178*, 115–40.
- [99] M. S. Duthie, H. P. Windish, C. B. Fox, S. G. Reed, *Immunol. Rev.* **2011**, *239*, 178–96.
- [100] R. M. Steinman, H. Hemmi, *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **2006**, *311*, 17–58.
- [101] G. J. V. Nossal, *Cell* **1992**, *68*, 1–2.
- [102] J. S. Murray, *Immunol. Today* **1998**, *19*, 157–162.
- [103] R. Ahmed, D. Gray, *Science (80- )*. **1996**, *272*, 54–60.
- [104] J. Banchereau, R. M. Steinman, *Nature* **1998**, *392*, 245–52.
- [105] R. N. Germain, *Cell* **1994**, *76*, 287–299.
- [106] K. Falk, O. Rötzschke, H. G. Rammensee, *Nature* **1990**, *348*, 248–51.
- [107] R. M. ZINKERNAGEL, P. C. DOHERTY, *Nature* **1974**, *248*, 701–702.
- [108] H. Schild, O. Rotzschke, H. Kalbacher, H. Rammensee, *Science (80- )*. **1990**, *247*, 1587–1589.

- [109] J. MILLER, *Lancet* **1961**, 278, 748–749.
- [110] J. F. Miller, *Immunol. Today* **1991**, 12, 42–5.
- [111] Y. Takahama, *Nat. Rev. Immunol.* **2006**, 6, 127–35.
- [112] R. M. Zinkernagel, P. C. Doherty, *Immunol. Today* **1997**, 18, 14–17.
- [113] L. K. Denzin, P. Cresswell, *Cell* **1995**, 82, 155–165.
- [114] D. F. Fiorentino, *J. Exp. Med.* **1989**, 170, 2081–2095.
- [115] U. Boehm, T. Klamp, M. Groot, J. C. Howard, *Annu. Rev. Immunol.* **1997**, 15, 749–95.
- [116] D. C. Parker, *Annu. Rev. Immunol.* **1993**, 11, 331–60.
- [117] T. R. Mosmann, R. L. Coffman, *Annu. Rev. Immunol.* **1989**, 7, 145–73.
- [118] D. H. Katz, T. Hamaoka, M. E. Dorf, B. Benacerraf, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1973**, 70, 2624–8.
- [119] I. S. Grewal, R. a Flavell, *Annu. Rev. Immunol.* **1998**, 16, 111–35.
- [120] N. A. Mitchison, *Nat. Rev. Immunol.* **2004**, 4, 308–12.
- [121] C. Esser, A. Radbruch, *Annu. Rev. Immunol.* **1990**, 8, 717–35.
- [122] A. J. Matthews, S. Zheng, L. J. DiMenna, J. Chaudhuri, *Adv. Immunol.* **2014**, 122, 1–57.
- [123] F. D. Finkelman, J. Holmes, I. M. Katona, J. F. Urban, M. P. Beckmann, L. S. Park, K. A. Schooley, R. L. Coffman, T. R. Mosmann, W. E. Paul, *Annu. Rev. Immunol.* **1990**, 8, 303–33.
- [124] J. Mestas, C. C. W. Hughes, *J. Immunol.* **2004**, 172, 2731–8.
- [125] S.-Y. Wang, G. Weiner, *Expert Opin. Biol. Ther.* **2008**, 8, 759–68.

- [126] F. Nimmerjahn, J. V Ravetch, *Curr. Opin. Immunol.* **2007**, *19*, 239–45.
- [127] D. R. Mould, K. R. D. Sweeney, *Curr. Opin. Drug Discov. Devel.* **2007**, *10*, 84–96.
- [128] R. Jefferis, *Expert Opin. Biol. Ther.* **2007**, *7*, 1401–13.
- [129] P. Bruhns, **2012**, *119*, 5640–5649.
- [130] C. M. Snapper, W. E. Paul, *Science* **1987**, *236*, 944–7.
- [131] S. G. Tangye, A. Ferguson, D. T. Avery, C. S. Ma, P. D. Hodgkin, *J. Immunol.* **2002**, *169*, 4298–4306.
- [132] J. P. Coutelier, J. T. van der Logt, F. W. Heessen, G. Warnier, J. Van Snick, *J. Exp. Med.* **1987**, *165*, 64–9.
- [133] F. Nimmerjahn, J. V Ravetch, *Science* **2005**, *310*, 1510–2.
- [134] P. Vieira, **1988**, 313–316.
- [135] S. M. Sivakumar, M. M. Safhi, M. Kannadasan, N. Sukumaran, *Saudi Pharm. J. SPJ Off. Publ. Saudi Pharm. Soc.* **2011**, *19*, 197–206.
- [136] R. K. Gupta, E. H. Relyveldt, E. B. Lindblad, B. Bizzini, **1993**, *11*, 293–306.
- [137] S. M. Loosmore, G. R. Zealy, R. E. F. Fahim, in *New Vaccine Technol.*, **2001**, pp. 186–214.
- [138] S. F. Slovin, G. Ragupathi, C. Musselli, K. Olkiewicz, D. Verbel, S. D. Kuduk, J. B. Schwarz, D. Sames, S. Danishefsky, P. O. Livingston, et al., *J. Clin. Oncol.* **2003**, *21*, 4292–8.
- [139] S. Dziadek, D. Kowalczyk, H. Kunz, *Angew. Chem.* **2005**, *117*, 7798–7803.
- [140] H. Cai, Z.-H. Huang, L. Shi, Z.-Y. Sun, Y.-F. Zhao, H. Kunz, Y.-M. Li, *Angew. Chem.* **2012**, *51*, 1719–23.

- [141] L. F. Tietze, M. Arlt, M. Beller, K.-H. Glüsenkamp, E. Jähde, M. F. Rajewsky, *Chem. Ber.* **1991**, *124*, 1215–1221.
- [142] L. F. Tietze, C. Schröter, S. Gabius, U. Brinck, A. Goerlach-Graw, H. J. Gabius, *Bioconjug. Chem. n.d.*, *2*, 148–53.
- [143] B. K. Van Weemen, A. H. W. M. Schuurs, *FEBS Lett.* **1971**, *15*, 232–236.
- [144] E. Engvall, P. Perlmann, *Immunochemistry* **1971**, *8*, 871–874.
- [145] A. Kaiser, *Diss. Univ. Mainz* **2009**.
- [146] J. W. Smith, *Bol. Oficina Sanit. Panam.* **1973**, *74*, 152–65.
- [147] B. A. Claesson, B. Trollfors, T. Lagergard, J. Taranger, D. Bryla, G. Otterman, T. Cramton, Y. Yang, C. B. Reimer, J. B. Robbins, *J. Pediatr.* **1988**, *112*, 695–702.
- [148] M. Knuf, D. Kieninger-Baum, P. Habermehl, P. Muttonen, H. Maurer, P. Vink, J. Poolman, D. Boutriau, *Vaccine* **2010**, *28*, 744–53.
- [149] H. Ahman, H. Käyhty, A. Vuorela, O. Leroy, J. Eskola, *Vaccine* **1999**, *17*, 2726–32.
- [150] F. P. Heinzl, *J. Exp. Med.* **1989**, *169*, 59–72.
- [151] A. Friedman, H. L. Weiner, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1994**, *91*, 6688–92.
- [152] N. Gaidzik, *Diss. Univ. Mainz* **2011**, 143.
- [153] M. G. Guzman, S. B. Halstead, H. Artsob, P. Buchy, J. Farrar, D. J. Gubler, E. Hunsperger, A. Kroeger, H. S. Margolis, E. Martínez, et al., *Nat. Rev. Microbiol.* **2010**, *8*, S7–16.
- [154] a K. Abbas, K. M. Murphy, a Sher, *Nature* **1996**, *383*, 787–93.
- [155] J. M. Critchfield, M. K. Racke, J. C. Zúñiga-Pflücker, B. Cannella, C. S. Raine, J. Goverman, M. J. Lenardo, *Science* **1994**, *263*, 1139–43.

- [156] J. D. Fontenot, S. V. Mariappan, P. Catasti, N. Domenech, O. J. Finn, G. Gupta, *J. Biomol. Struct. Dyn.* **1995**, *13*, 245–60.
- [157] M. D. Sadic, F. P. Heinzl, B. J. Holaday, R. T. Pu, R. S. Dawkins, R. M. Locksley, *J. Exp. Med.* **1990**, *171*, 115–127.
- [158] C. A. R. L. W. Altenbaugh, **1998**, *95*, 115–127.
- [159] J. F. Chang, H. L. Zhao, J. Phillips, G. Greenburg, *Cell. Immunol.* **2000**, *201*, 83–8.
- [160] M. J. Ligtenberg, F. Buijs, H. L. Vos, J. Hilkens, *Cancer Res.* **1992**, *52*, 2318–24.
- [161] P. E. Oberstein, K. P. Olive, *Therap. Adv. Gastroenterol.* **2013**, *6*, 321–37.
- [162] M. a Hollingsworth, J. M. Strawhecker, T. C. Caffrey, D. R. Mack, *Int. J. Cancer* **1994**, *57*, 198–203.
- [163] M. J. Welch, S. Fong, J. Vaughan, D. Carson, *Clin. Exp. Immunol.* **1983**, *51*, 299–304.
- [164] A. W. Purcell, J. McCluskey, J. Rossjohn, *Nat. Rev. Drug Discov.* **2007**, *6*, 404–14.
- [165] H. Cai, Z.-Y. Sun, M.-S. Chen, Y.-F. Zhao, H. Kunz, Y.-M. Li, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2014**, 1699–1703.
- [166] D. M. McDonald, B. L. Wilkinson, L. Corcilus, M. Thaysen-Andersen, S. N. Byrne, R. J. Payne, *Chem. Commun. (Camb)*. **2014**, *50*, 10273–6.
- [167] E. D. Papadimitraki, G. K. Bertias, D. T. Boumpas, *J. Autoimmun.* **2007**, *29*, 310–8.
- [168] R. Rankin, R. Pontarollo, X. Ioannou, A. M. Krieg, R. Hecker, L. A. Babiuk, S. van Drunen Littel-van den Hurk, *Antisense Nucleic Acid Drug Dev.* **2001**, *11*, 333–40.
- [169] A. Iwasaki, R. Medzhitov, *Nat. Immunol.* **2004**, *5*, 987–95.

- [170] R. S. Chu, O. S. Targoni, A. M. Krieg, P. V. Lehmann, C. V. Harding, *J. Exp. Med.* **1997**, *186*, 1623–1631.
- [171] J. N. Agrewala, R. J. Wilkinson, *Eur. J. Immunol.* **1999**, *29*, 1753–61.
- [172] B. Palitzsch, S. Hartmann, N. Stergiou, M. Glaffig, E. Schmitt, H. Kunz, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2014**, im Druck.
- [173] L. Sabhnani, M. Manocha, K. Sridevi, D. Shashikiran, R. Rayanade, D. N. Rao, *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **2003**, *38*, 215–229.
- [174] A. A. Khan, J. P. Babu, G. Gupta, D. N. Rao, *Vaccine* **2008**, *26*, 316–32.
- [175] A. Stryjewska, K. Kiepusa, T. Librowski, S. Lochyński, *Pharmacol. Rep.* **2013**, *65*, 1086–101.
- [176] E. D. Lobo, R. J. Hansen, J. P. Balthasar, *J. Pharm. Sci.* **2004**, *93*, 2645–68.
- [177] D. Kagi, F. Vignaux, B. Ledermann, K. Burki, V. Depraetere, S. Nagata, H. Hengartner, P. Golstein, *Science (80- )*. **1994**, *265*, 528–530.
- [178] N. Doménech, R. A. Henderson, O. J. Finn, *J. Immunol.* **1995**, *155*, 4766–74.
- [179] P. Brossart, K. S. Heinrich, G. Stuhler, L. Behnke, V. L. Reichardt, S. Stevanovic, a Muhm, H. G. Rammensee, L. Kanz, W. Brugger, *Blood* **1999**, *93*, 4309–17.
- [180] V. Apostolopoulos, V. Karanikas, J. S. Haurum, I. F. McKenzie, *J. Immunol.* **1997**, *159*, 5211–8.
- [181] E. Lazoura, J. Lodding, W. Farrugia, P. a Ramsland, J. Stevens, I. a Wilson, G. a Pietersz, V. Apostolopoulos, *Immunology* **2006**, *119*, 306–16.
- [182] L. C. Heukamp, S. H. van der Burg, J. W. Drijfhout, C. J. Melief, J. Taylor-Papadimitriou, R. Offringa, *Int. J. Cancer* **2001**, *91*, 385–92.

- [183] P. Panina-Bordignon, a Tan, a Termijtelen, S. Demotz, G. Corradin, a Lanzavecchia, *Eur. J. Immunol.* **1989**, *19*, 2237–42.
- [184] C. Choi, M. Witzens, M. Bucur, M. Feuerer, N. Sommerfeldt, A. Trojan, A. Ho, V. Schirmmacher, H. Goldschmidt, P. Beckhove, *Blood* **2005**, *105*, 2132–4.
- [185] M. A. Egan, M. J. Kuroda, G. Voss, J. E. Schmitz, W. A. Charini, C. I. Lord, M. A. Forman, N. L. Letvin, *J. Virol.* **1999**, *73*, 5466–72.
- [186] F. Sallusto, D. Lenig, R. Förster, M. Lipp, a Lanzavecchia, *Nature* **1999**, *401*, 708–12.
- [187] a Aruffo, I. Stamenkovic, M. Melnick, C. B. Underhill, B. Seed, *Cell* **1990**, *61*, 1303–13.
- [188] D. D. Perrin, W. L. F. Armarego, *Purification of Laboratory Chemicals*, **1988**.
- [189] W. C. Still, M. Kahn, A. Mitra, *J. Org. Chem.* **1978**, *43*, 2923–2925.
- [190] J. Habermann, *Diss. Univ. Mainz* **1997**, 76.
- [191] G. B. Fields, R. L. Noble, *Int. J. Pept. Protein Res.* **1990**, *35*, 161–214.
- [192] M. Schultz, H. Kunz, *Tetrahedron: Asymmetry* **1993**, *4*, 1205–1220.
- [193] A. P. Kozikowski, J. Lee, *J. Org. Chem.* **1990**, *55*, 863–870.
- [194] J. Broddefalk, U. Nilsson, J. Kihlberg, *J. Carbohydr. Chem.* **1994**, *13*, 129–132.
- [195] H. Paulsen, K. Adermann, *Liebigs Ann. Chem.* **1989**, *1989*, 751–769.
- [196] S. Keil, *Diss. Univ. Mainz* **2000**.
- [197] S. Keil, C. Claus, W. Dippold, H. Kunz, *Angew. Chem.* **2001**, *113*, 379–382.
- [198] H. D. Soule, J. Vazquez, A. Long, S. Albert, M. Brennan, *J. Natl. Cancer Inst.* **1973**, *51*, 1409–16.

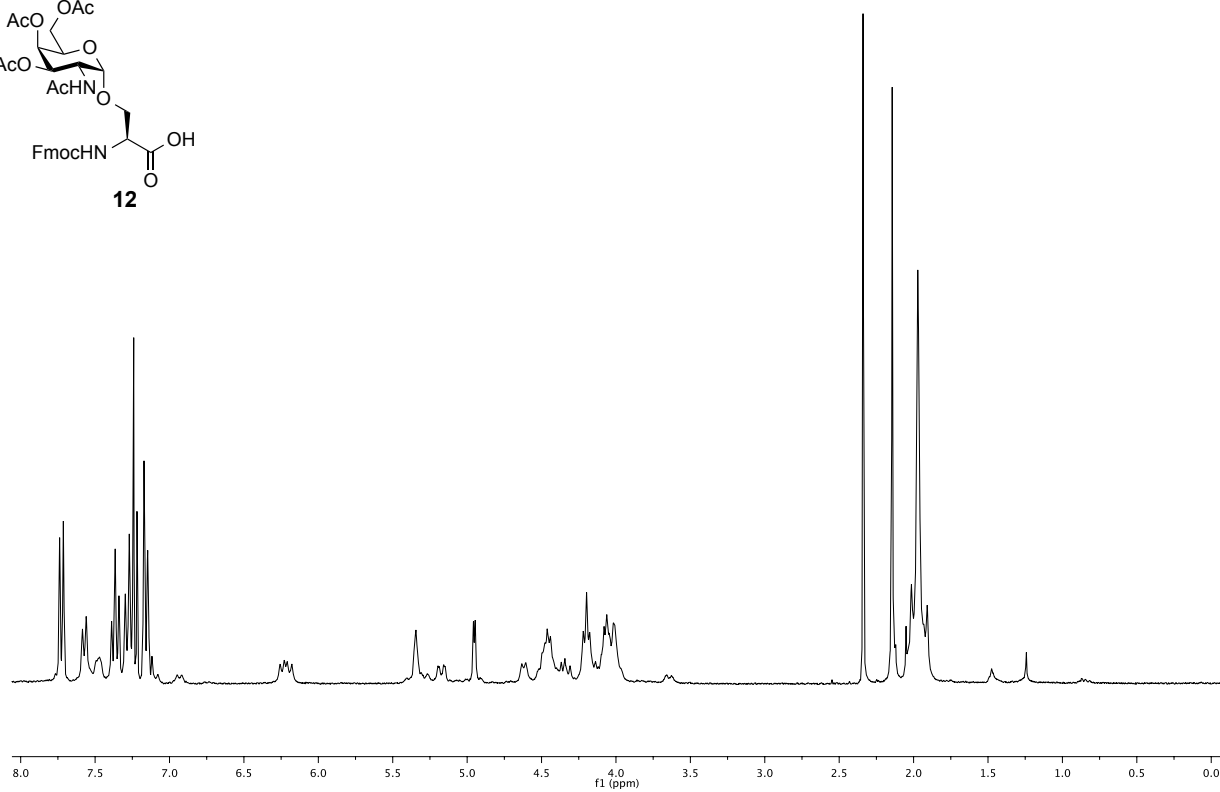
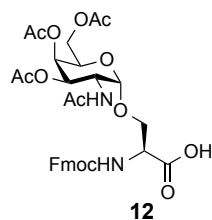
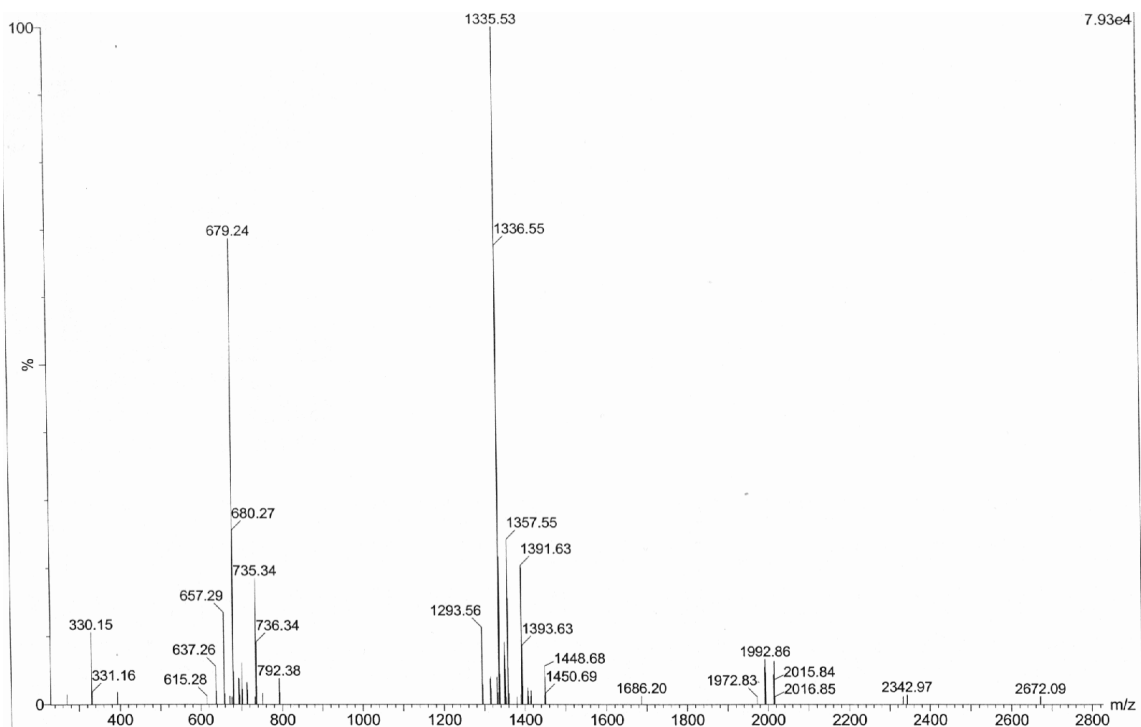


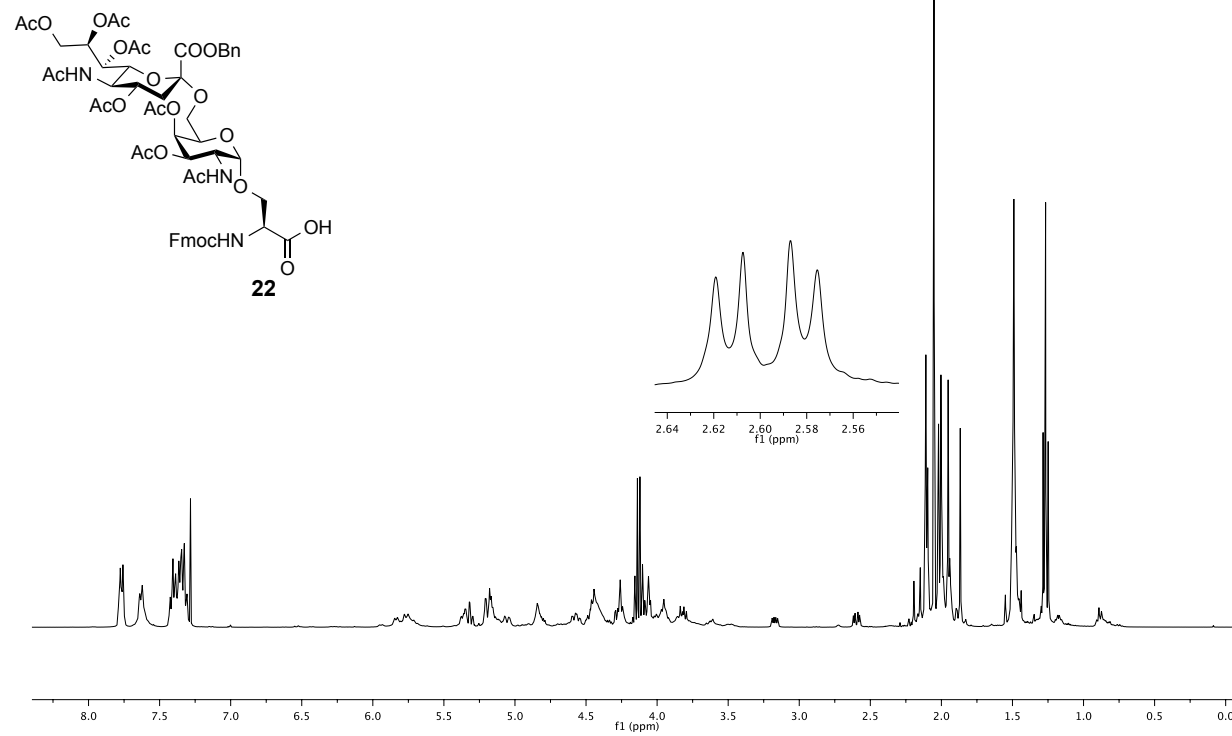
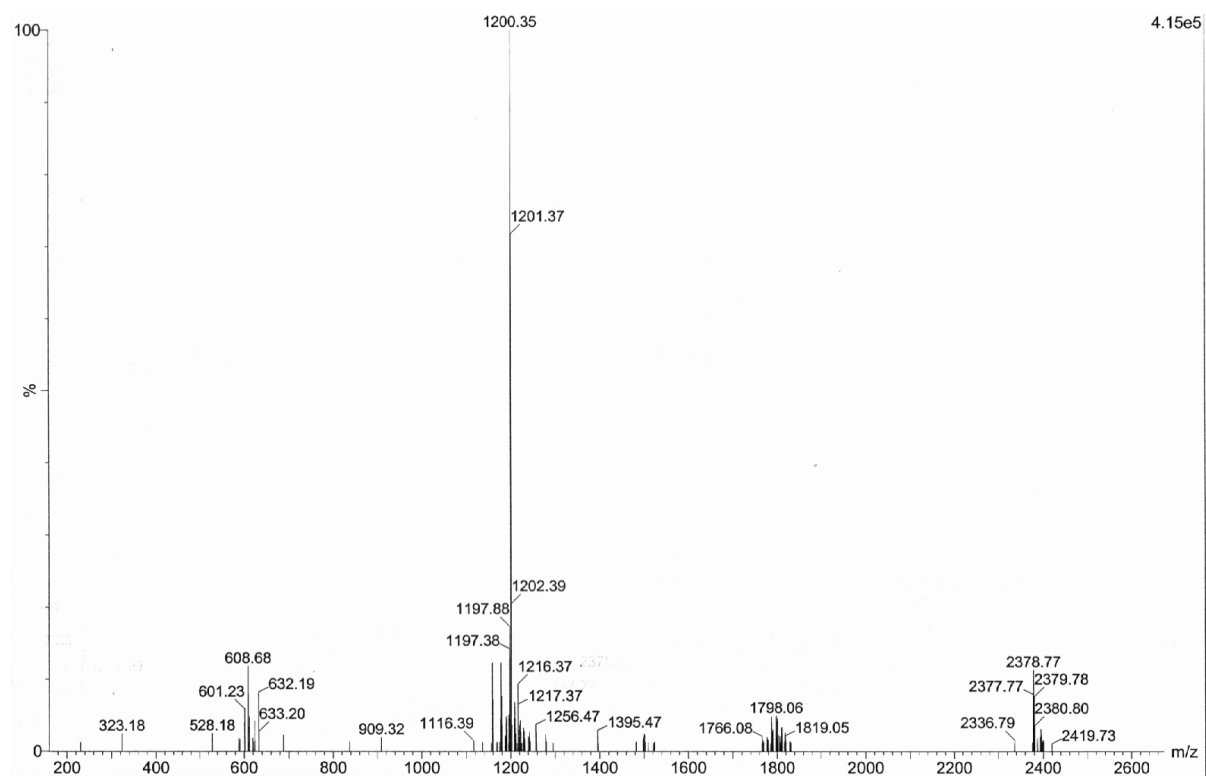
- [199] I. Keydar, L. Chen, S. Karby, F. R. Weiss, J. Delarea, M. Radu, S. Chaitcik, H. J. Brenner, *Eur. J. Cancer* **1979**, *15*, 659–70.
- [200] M. Lieber, J. Mazzetta, W. Nelson-Rees, M. Kaplan, G. Todaro, *Int. J. Cancer* **1975**, *15*, 741–7.
- [201] S. Chada, a M. Mhashilkar, Y. Liu, T. Nishikawa, D. Bocangel, M. Zheng, S. a Vorburger, a Pataer, S. G. Swisher, R. Ramesh, et al., *Cancer Gene Ther.* **2006**, *13*, 490–502.

## 8 Spektroskopischer Anhang

Im folgenden Anhang sind die analytischen Daten einiger ausgesuchter Verbindungen dieser Arbeit gezeigt.

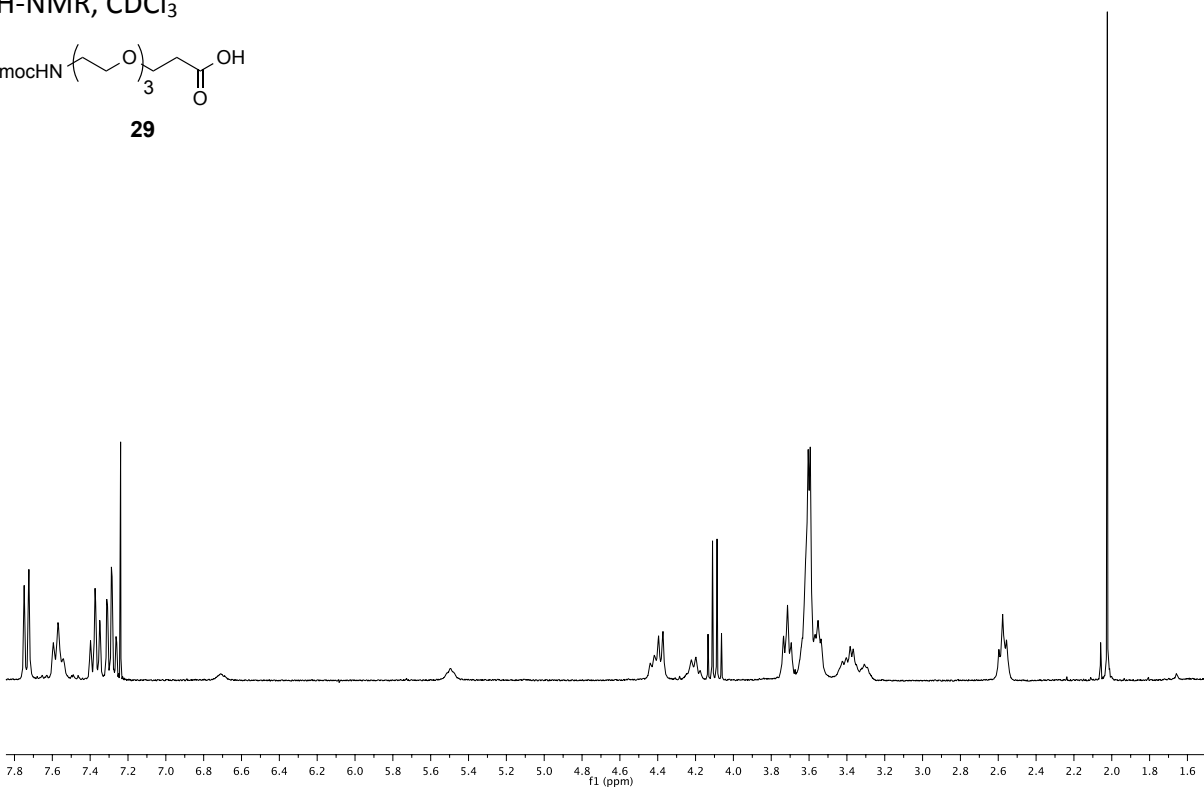
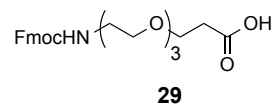
Verbindung <b>12</b>	240
Verbindung <b>22</b>	241
Verbindung <b>29</b>	242
Verbindung <b>83</b>	243
Verbindung <b>82</b>	246
Verbindung <b>84</b>	249
Verbindung <b>48</b>	252
Verbindung <b>49</b>	254
Verbindung <b>47</b>	257
Verbindung <b>50</b>	259
Verbindung <b>69</b>	262
Verbindung <b>71</b>	265
Verbindung <b>77</b>	277
Verbindung <b>81</b>	281

**(Fmoc-Ser( $\alpha$ Ac<sub>3</sub>GalNAc)-OH) 12**<sup>1</sup>H-NMR, CDCl<sub>3</sub>**ESI-MS, 12**

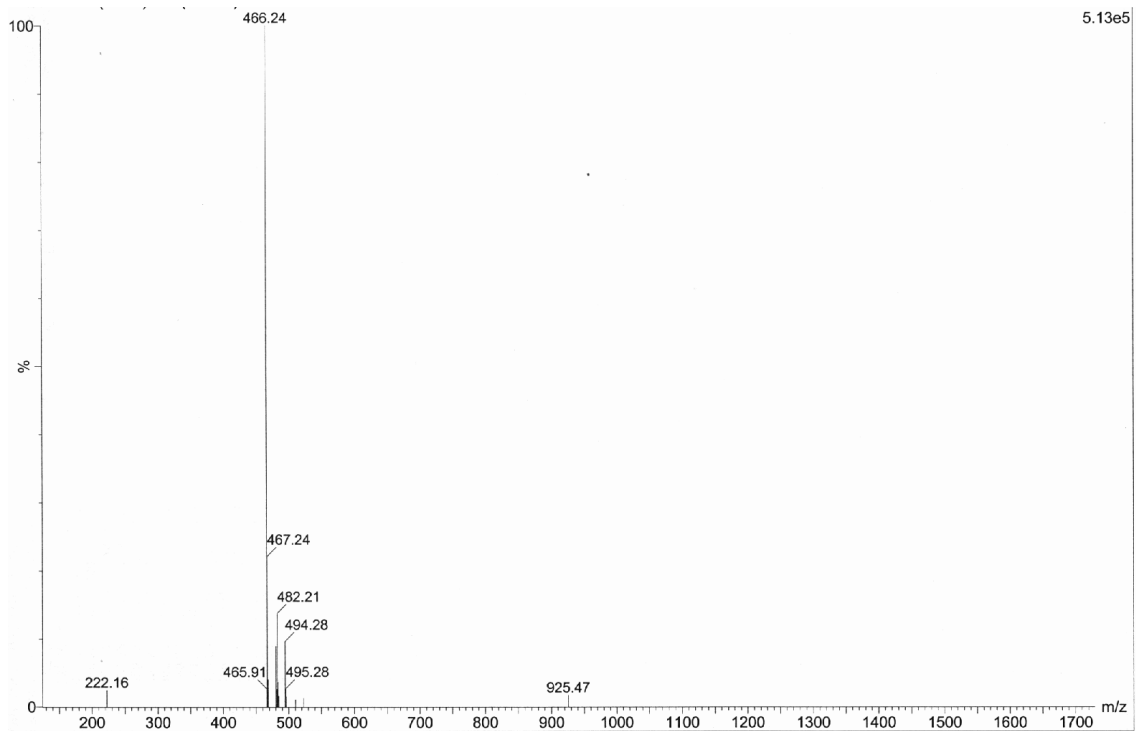
(Fmoc-Ser( $\alpha$ Ac<sub>4</sub>NeuNAcCOOBn-(2 $\rightarrow$ 6)- $\alpha$ Ac<sub>3</sub>GalNAc)-OH) **22**<sup>1</sup>H-NMR, CDCl<sub>3</sub>ESI-MS, **22**

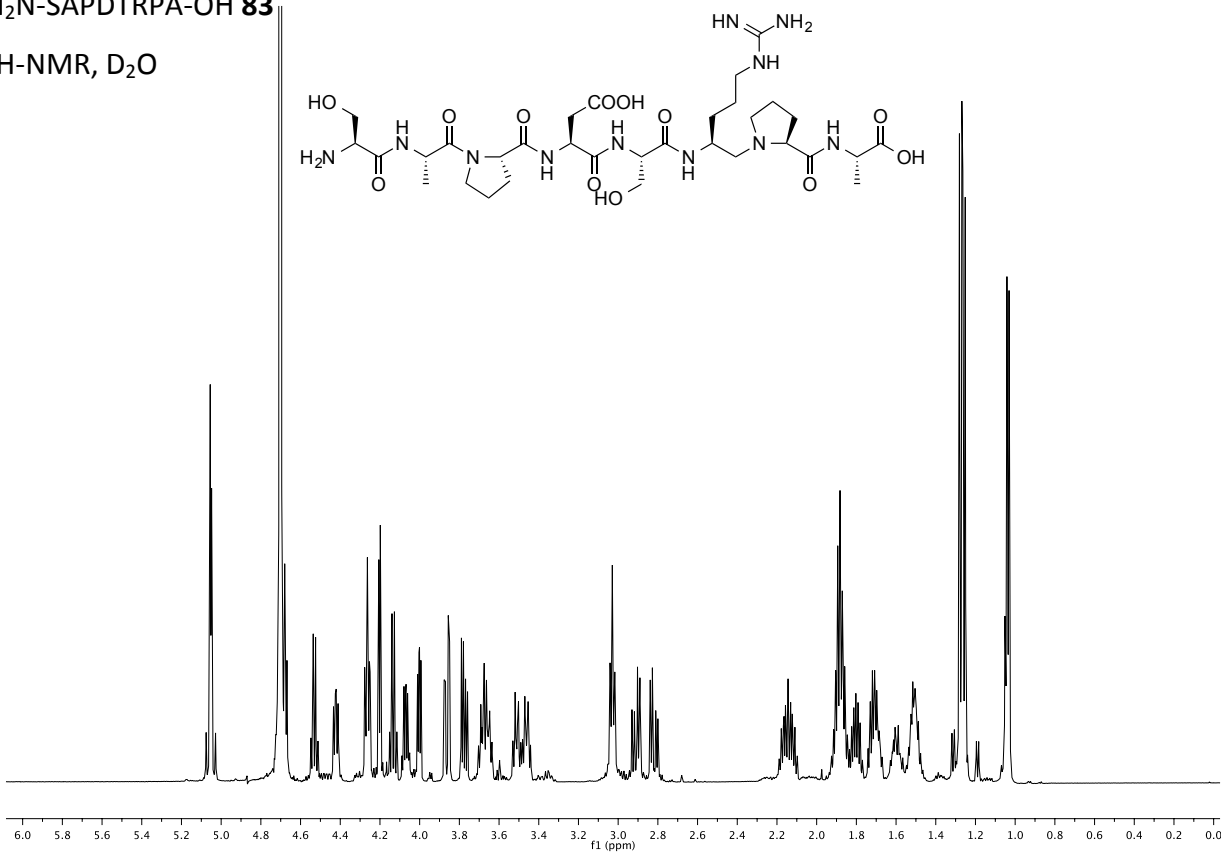
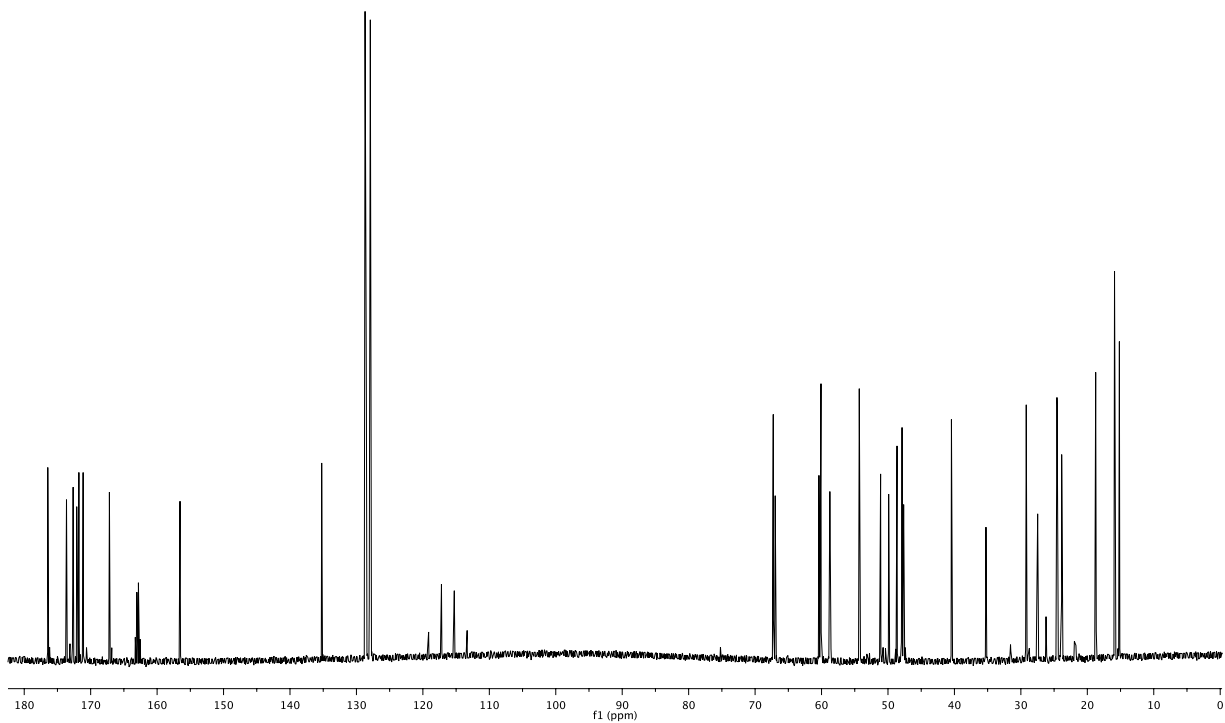
(FmocNH(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>COOH) **29**

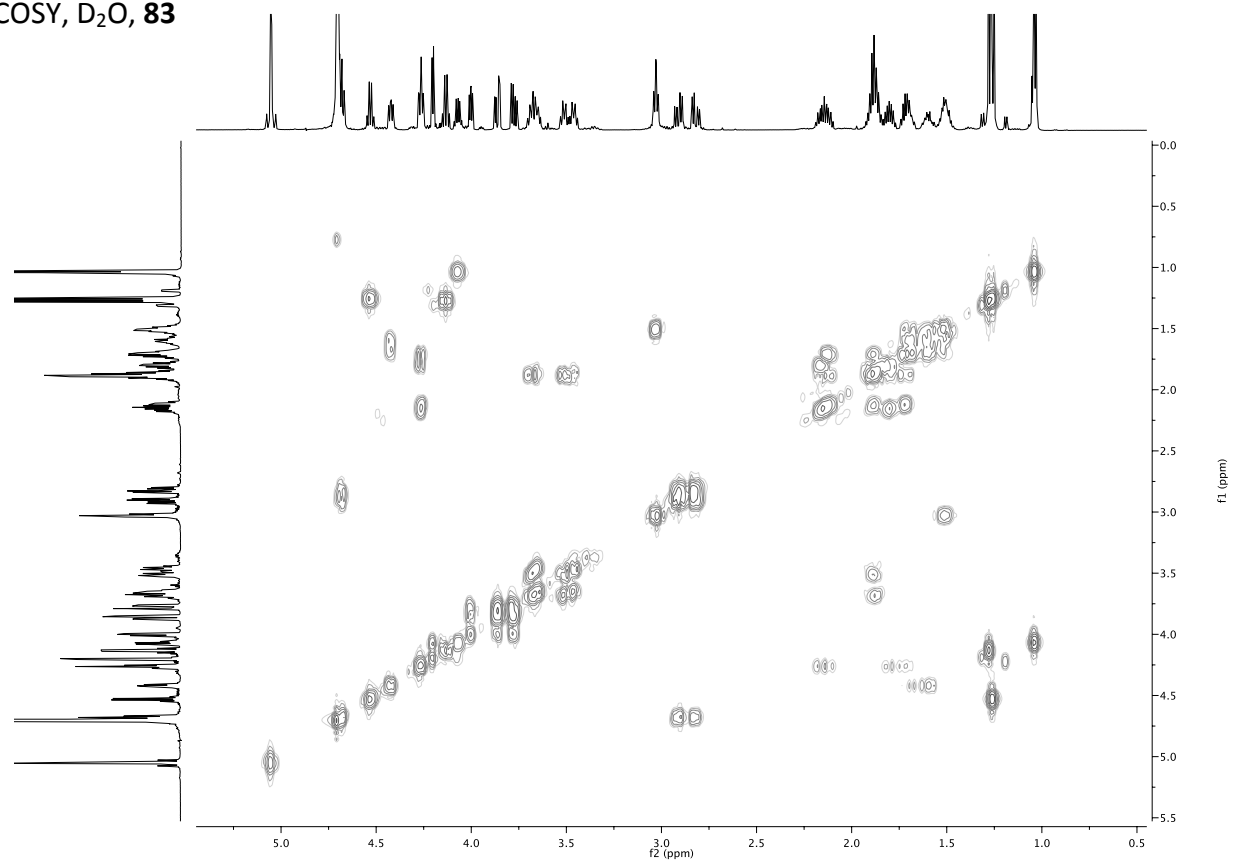
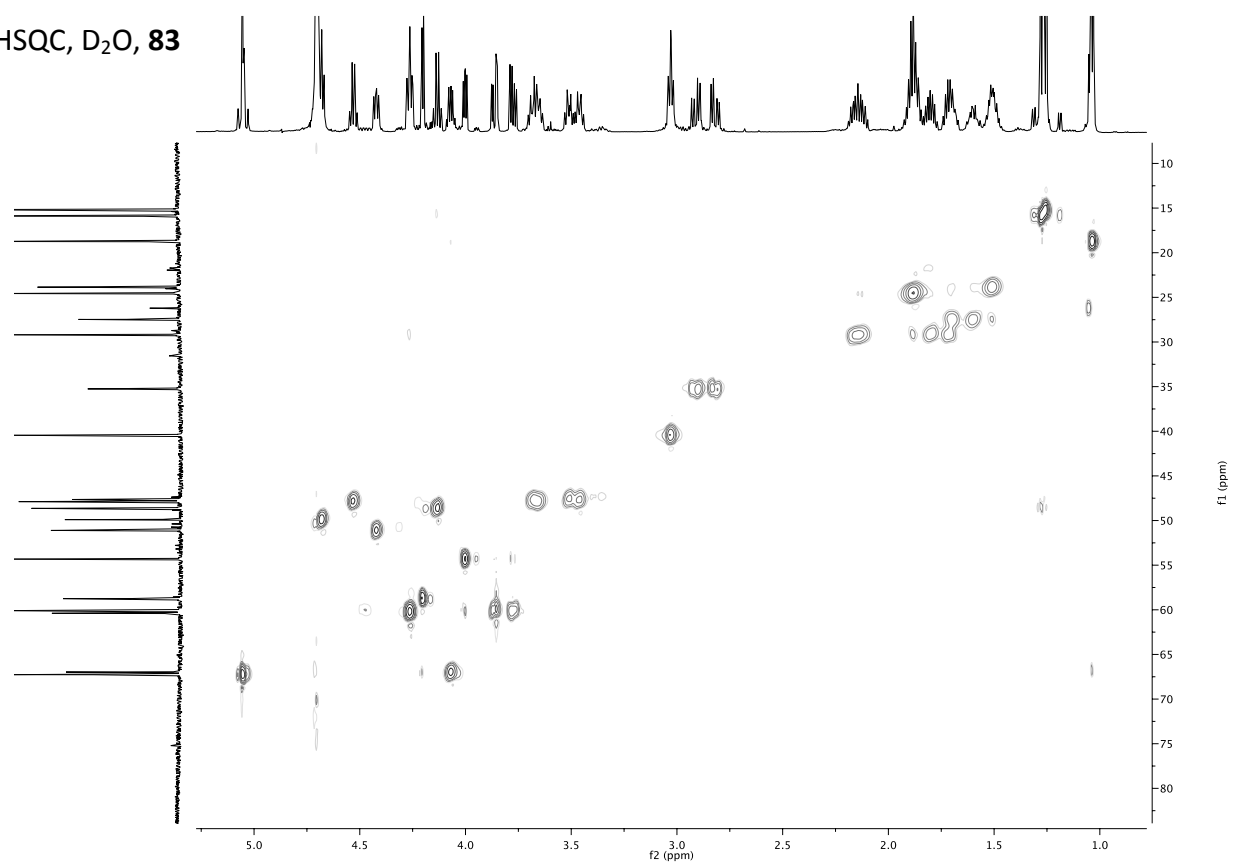
<sup>1</sup>H-NMR, CDCl<sub>3</sub>



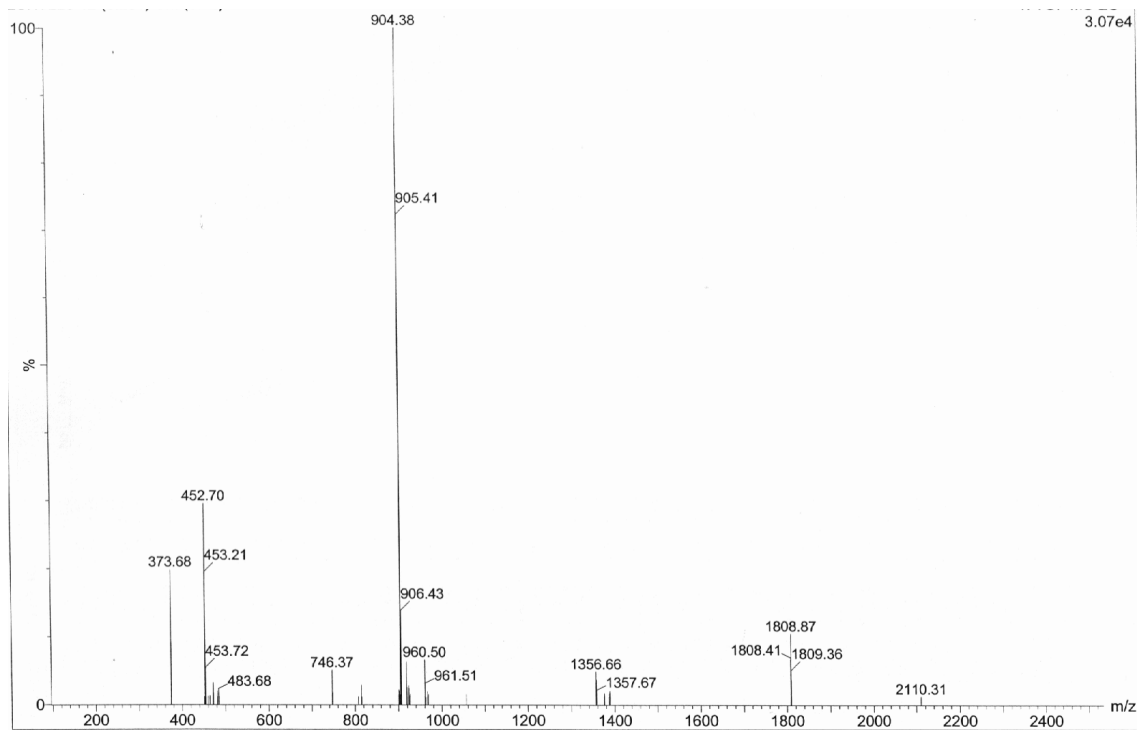
ESI-MS, **29**



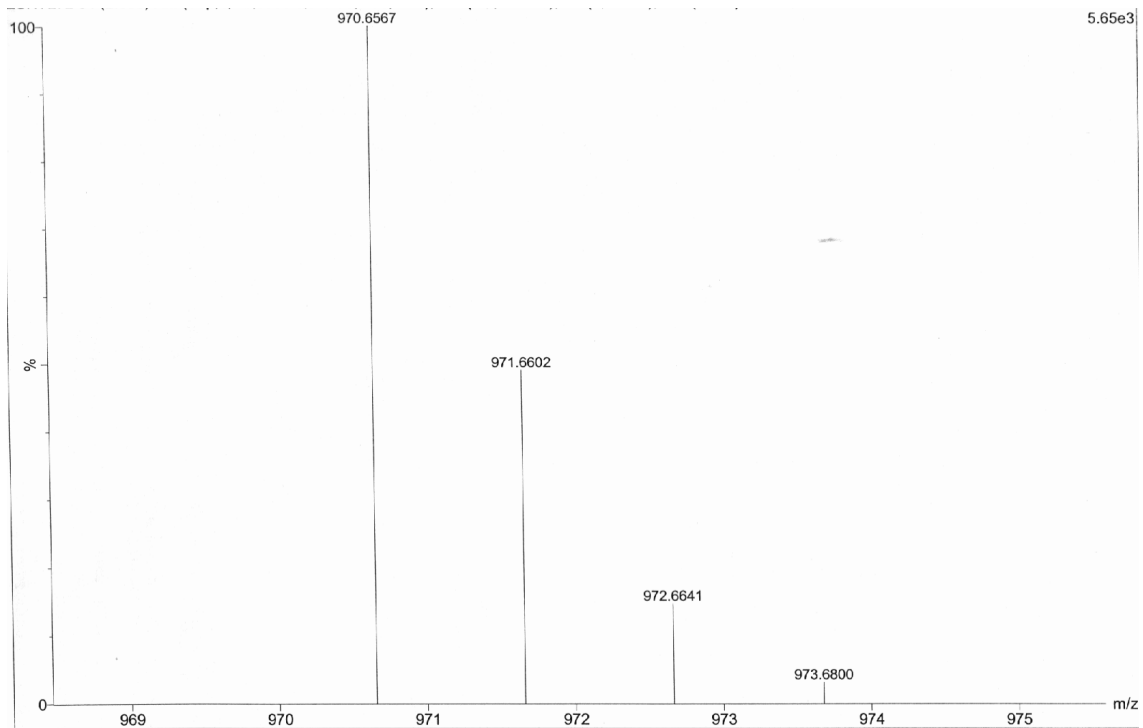
**H<sub>2</sub>N-SAPDTRPA-OH 83**<sup>1</sup>H-NMR, D<sub>2</sub>O<sup>13</sup>C, D<sub>2</sub>O, 83

COSY, D<sub>2</sub>O, 83HSQC, D<sub>2</sub>O, 83

## ESI-MS, 83

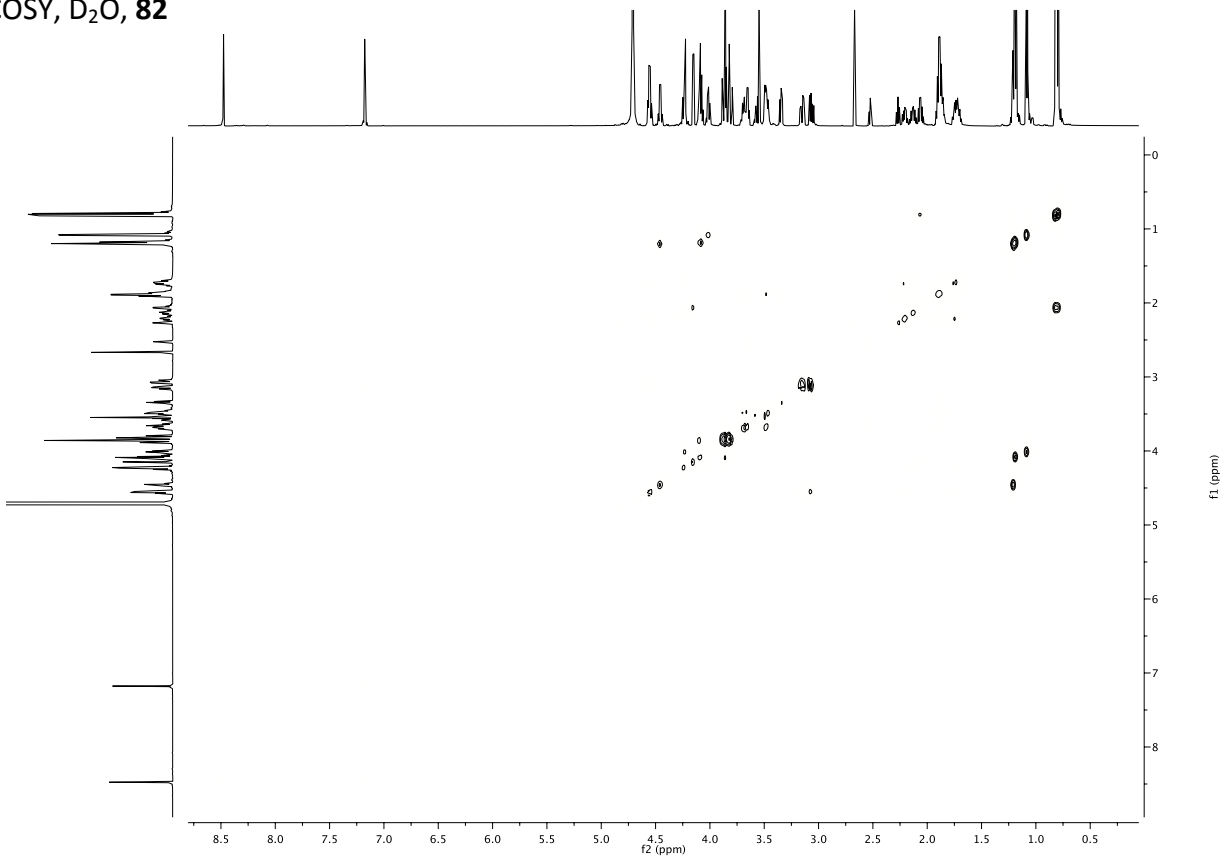
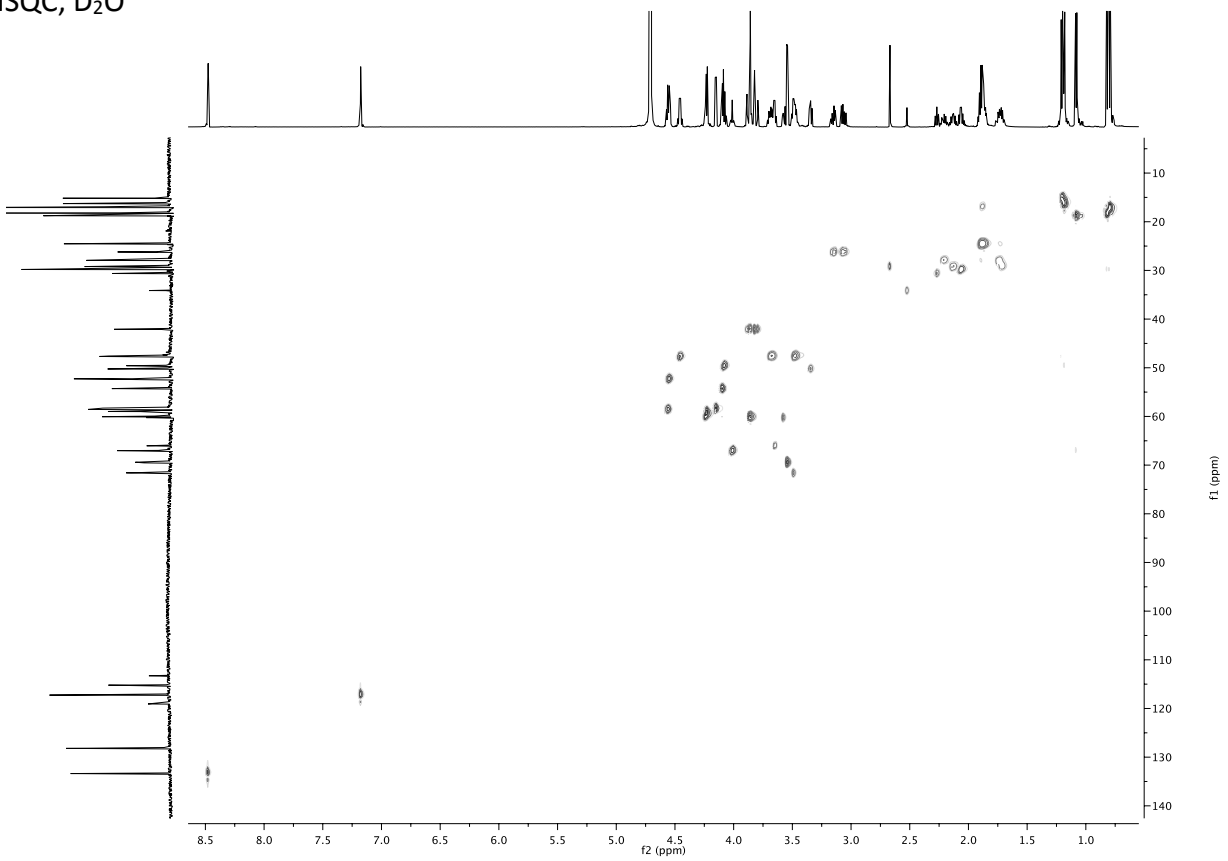


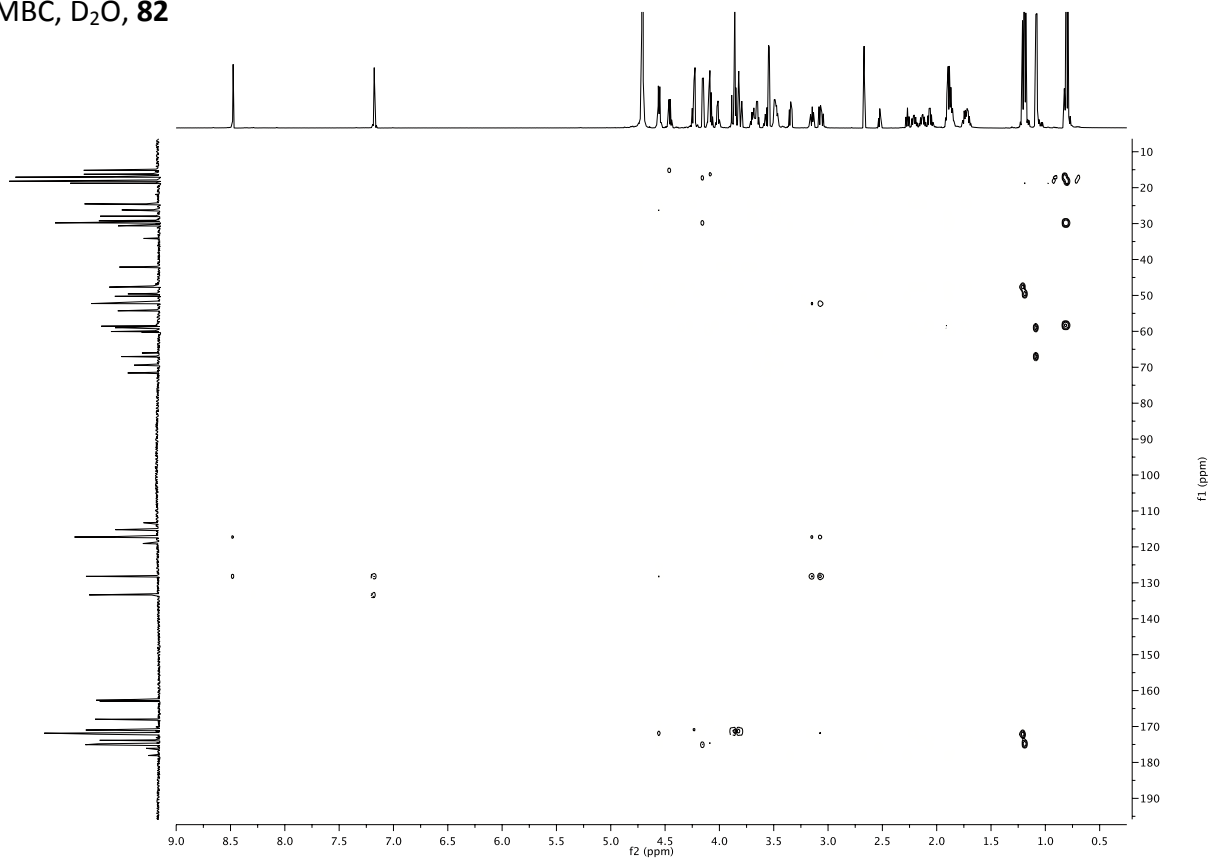
## HR-ESI-MS, 83



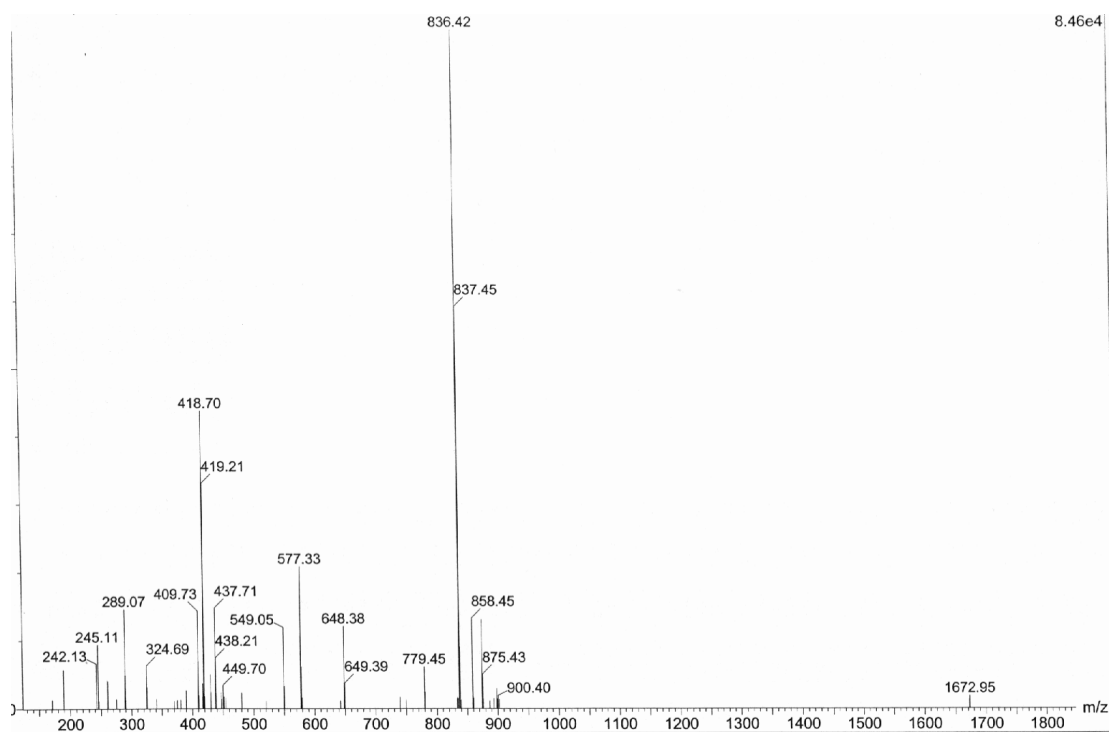




COSY, D<sub>2</sub>O, 82HSQC, D<sub>2</sub>O

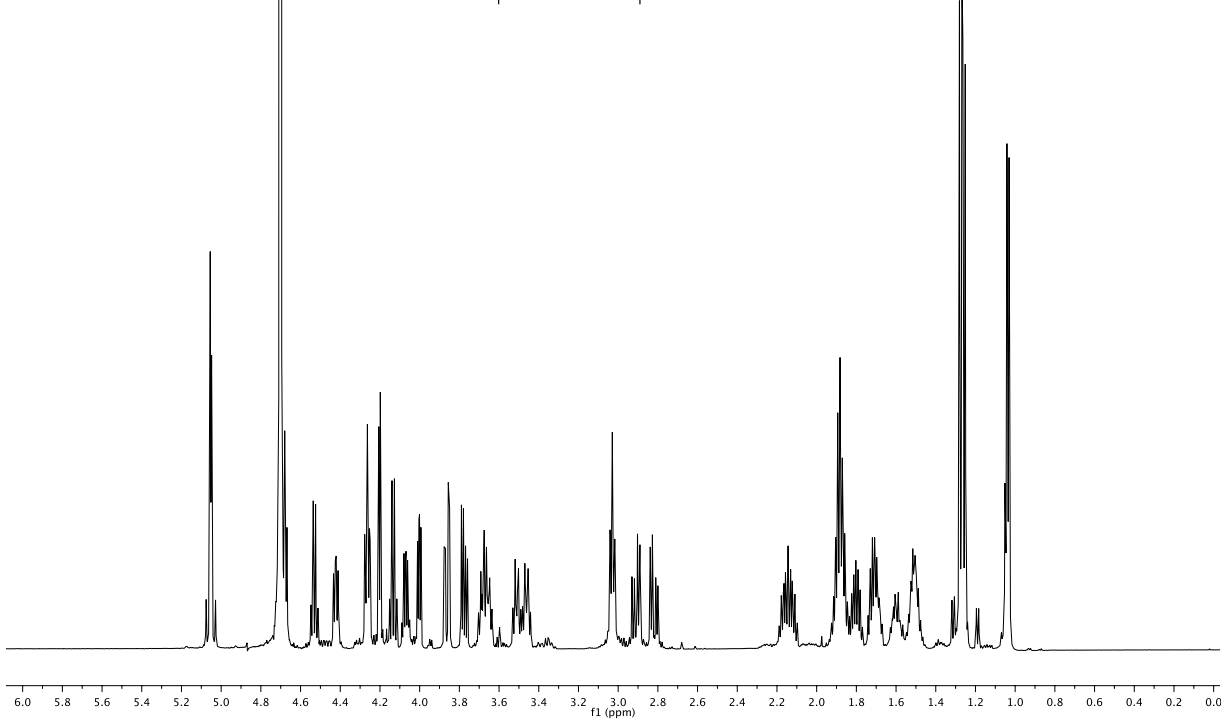
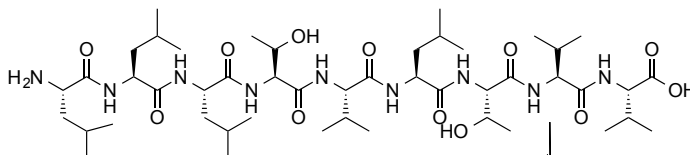
HMBC, D<sub>2</sub>O, 82

## ESI-MS, 82

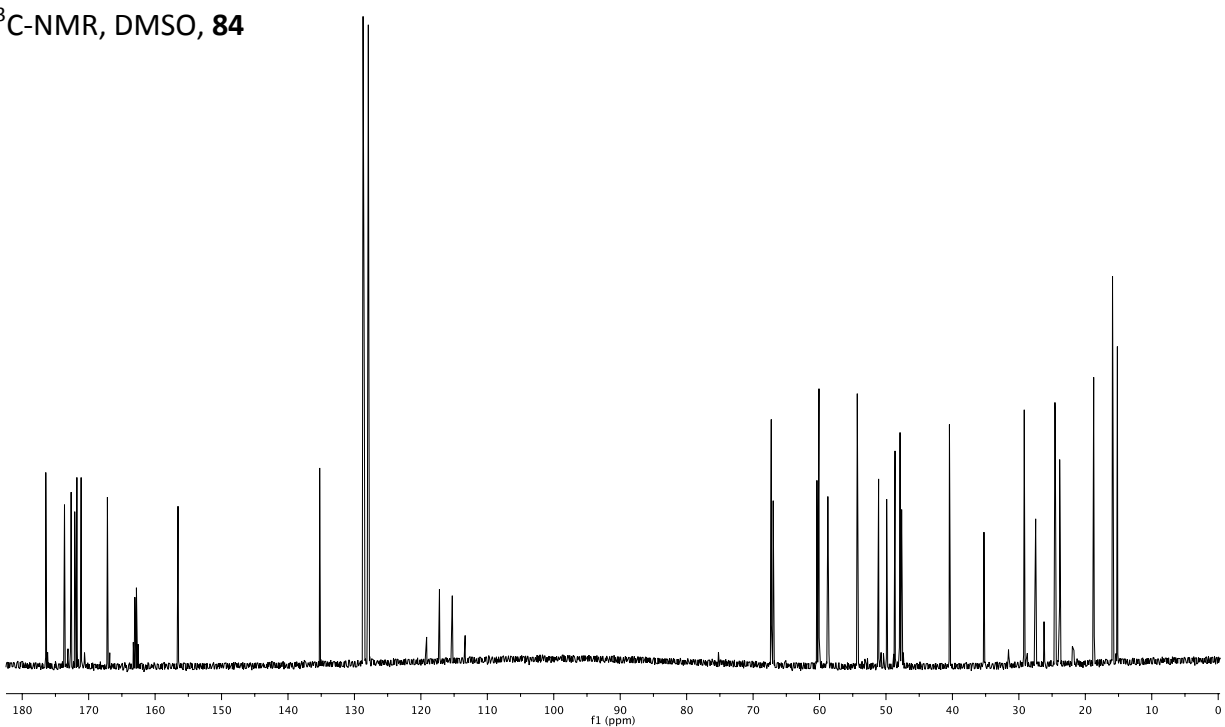


(H<sub>2</sub>N-LLLTVLTVV-OH) **84**

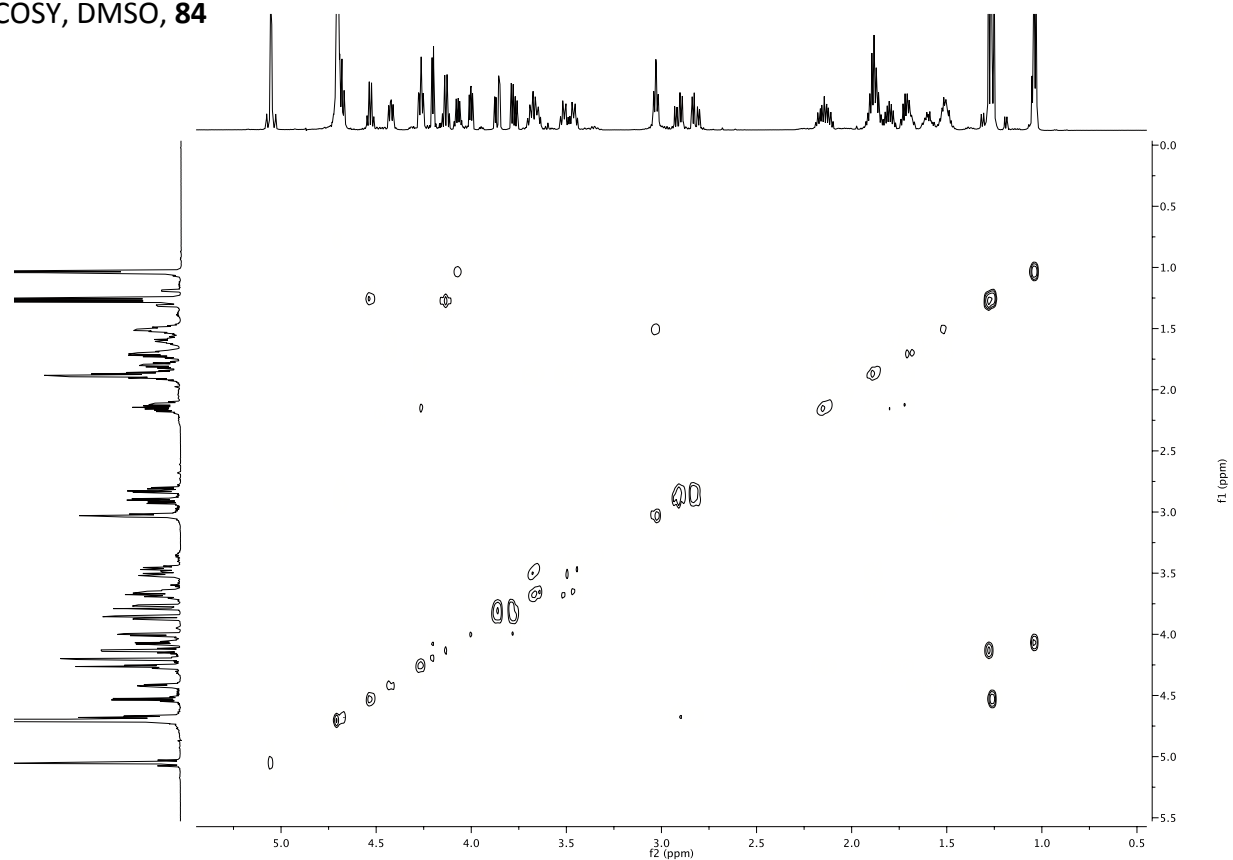
<sup>1</sup>H-NMR, DMSO



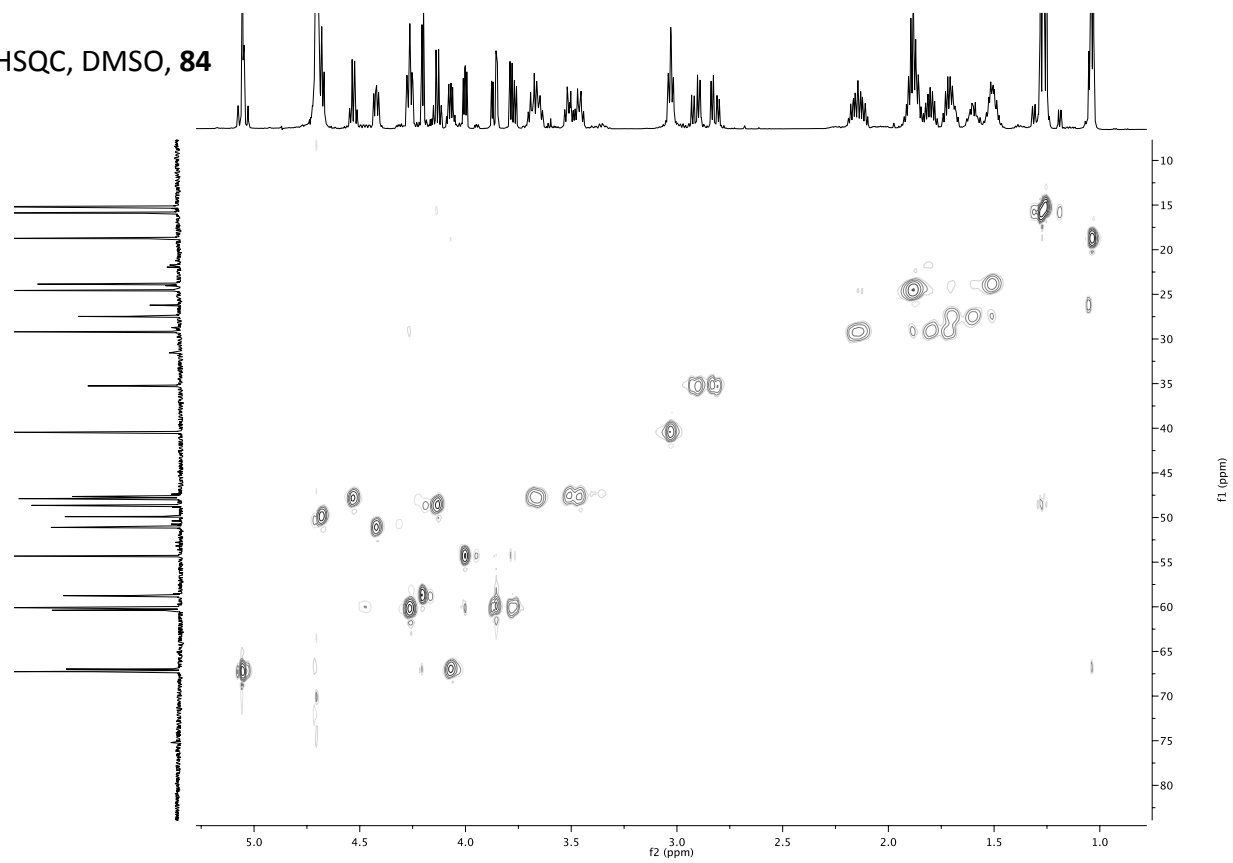
<sup>13</sup>C-NMR, DMSO, **84**



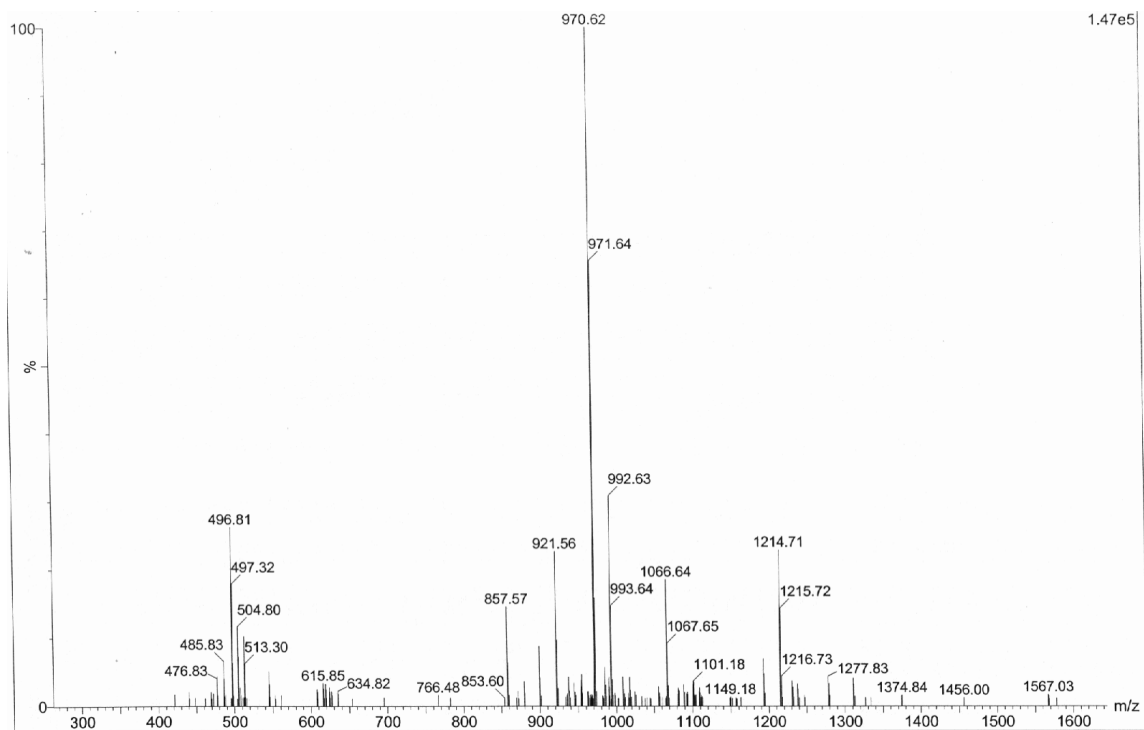
COSY, DMSO, 84



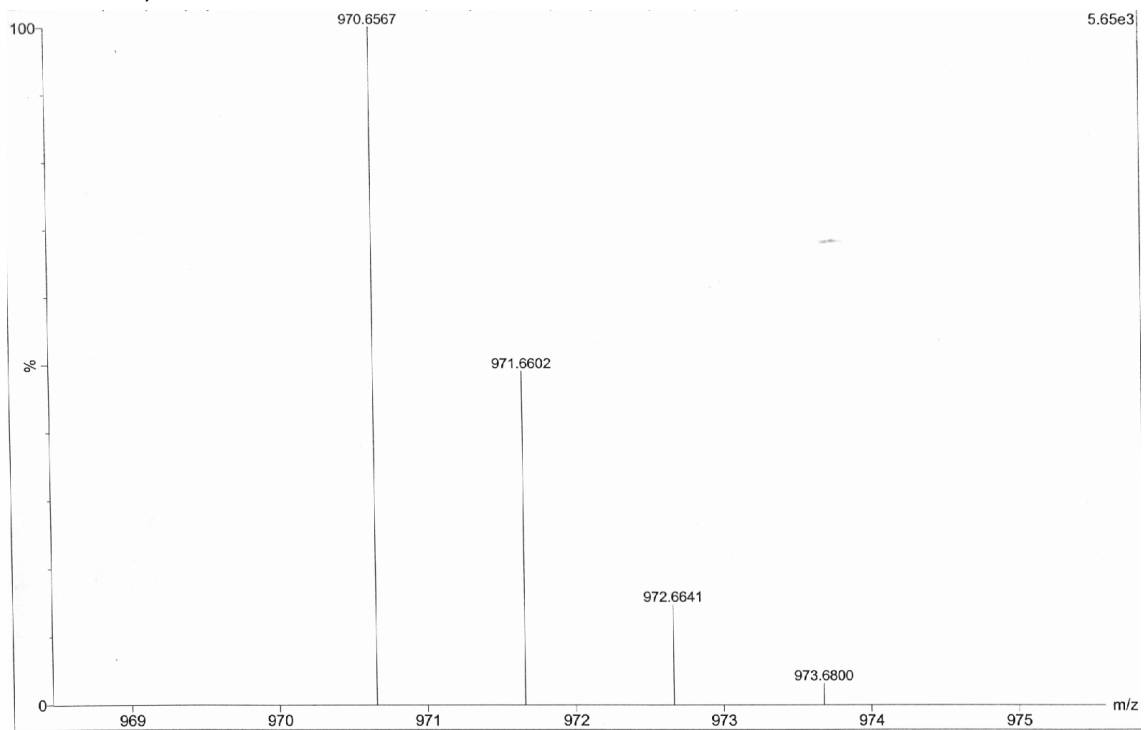
HSQC, DMSO, 84



## ESI-MS, 84

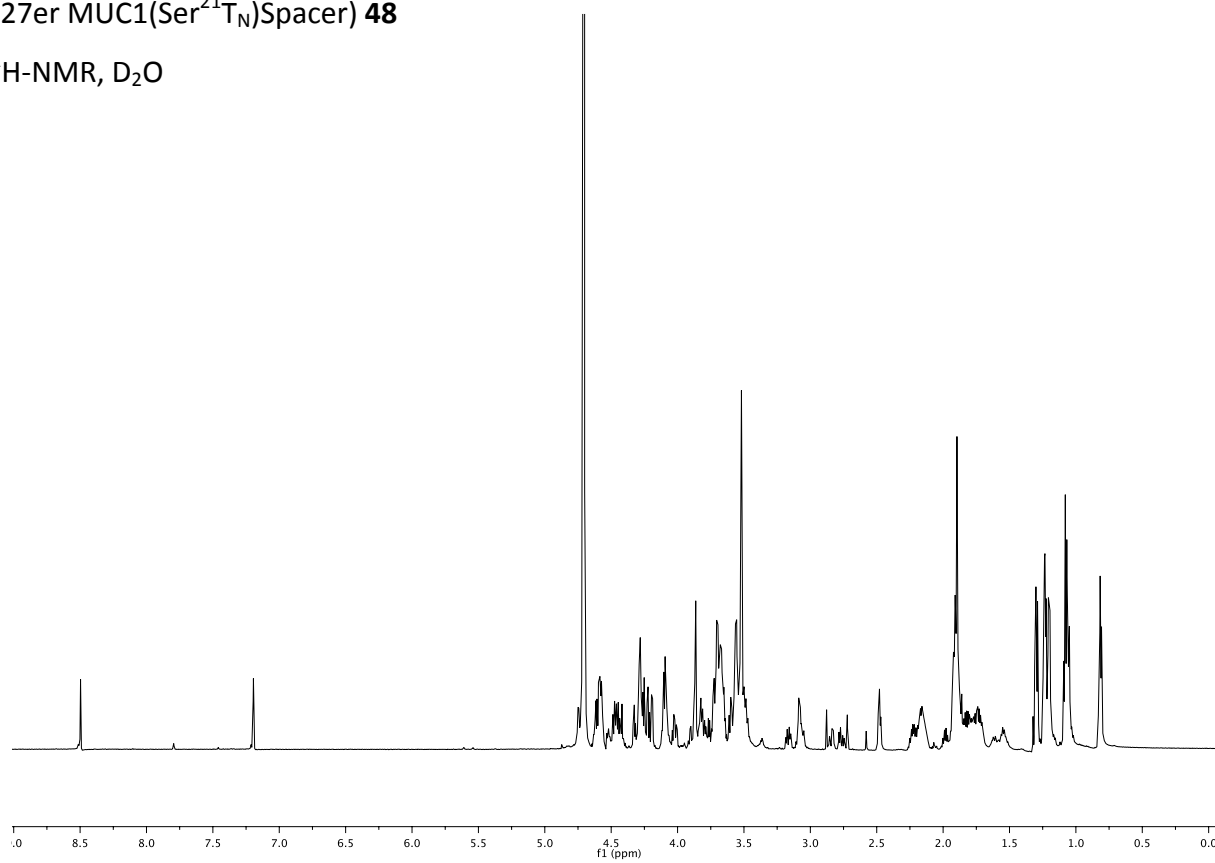


## HR-ESI-MS, 84

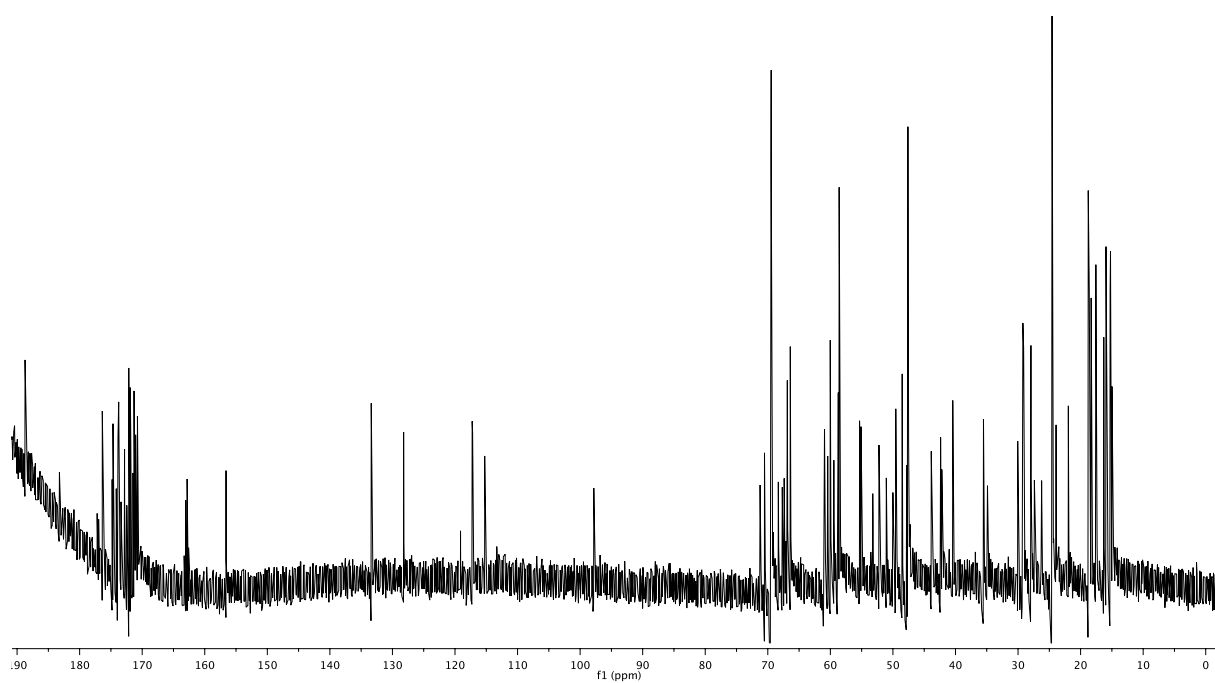


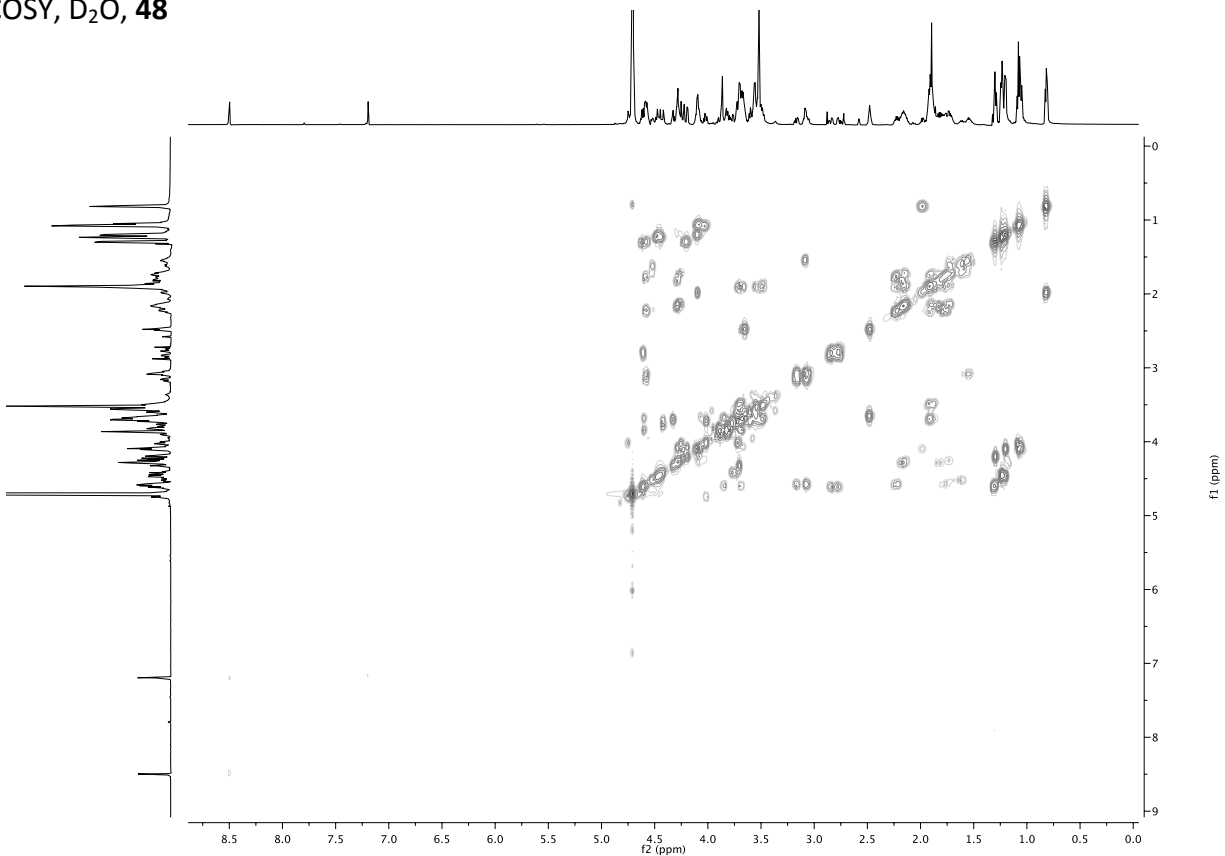
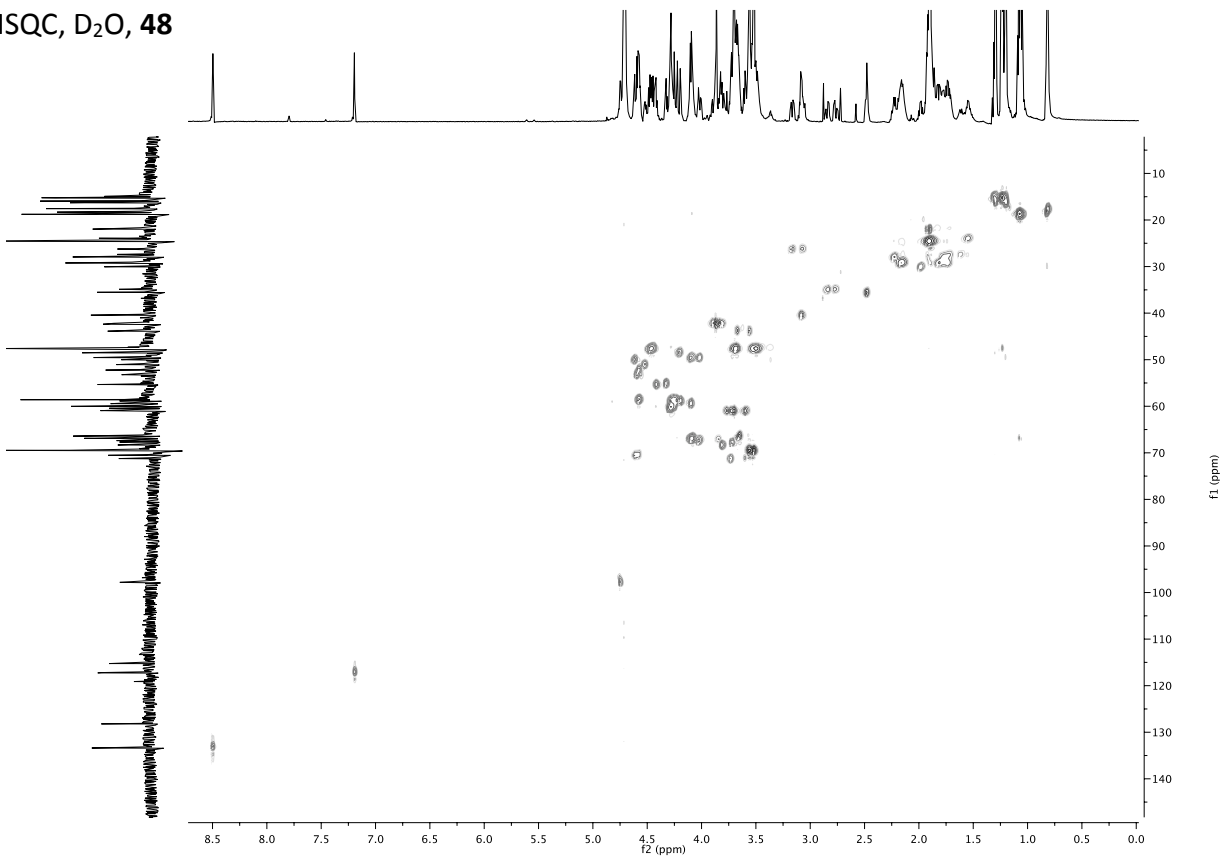
(27er MUC1(Ser<sup>21</sup>T<sub>N</sub>)Spacer) **48**

<sup>1</sup>H-NMR, D<sub>2</sub>O



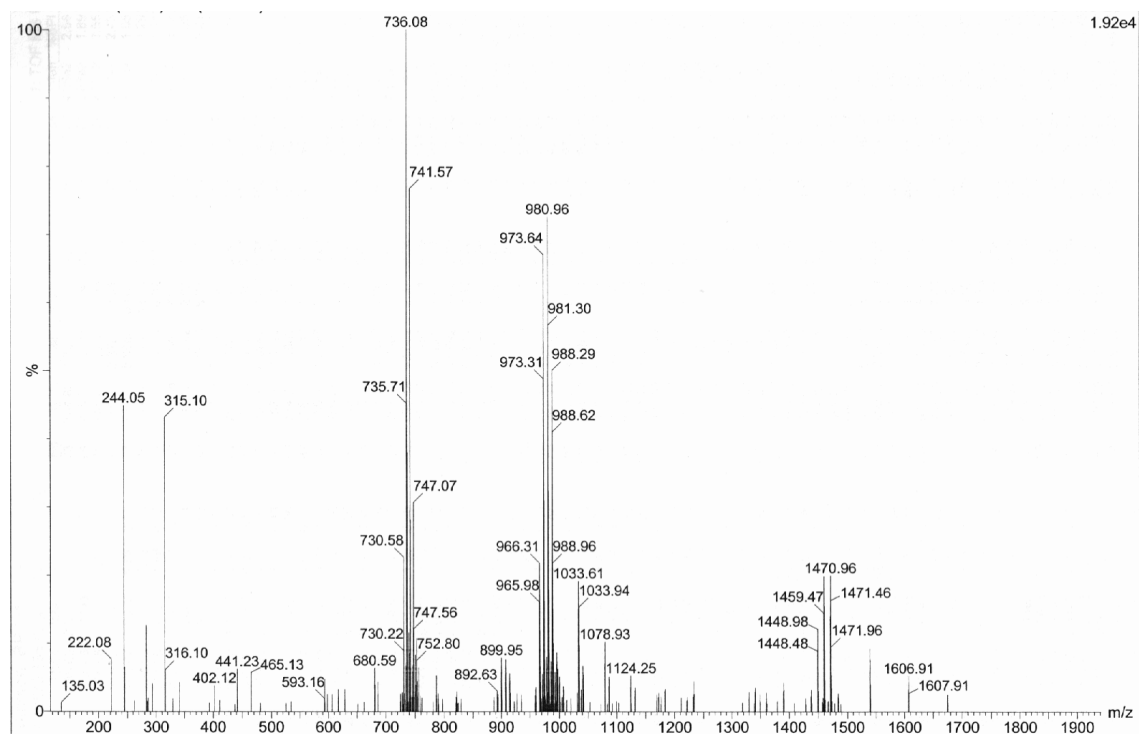
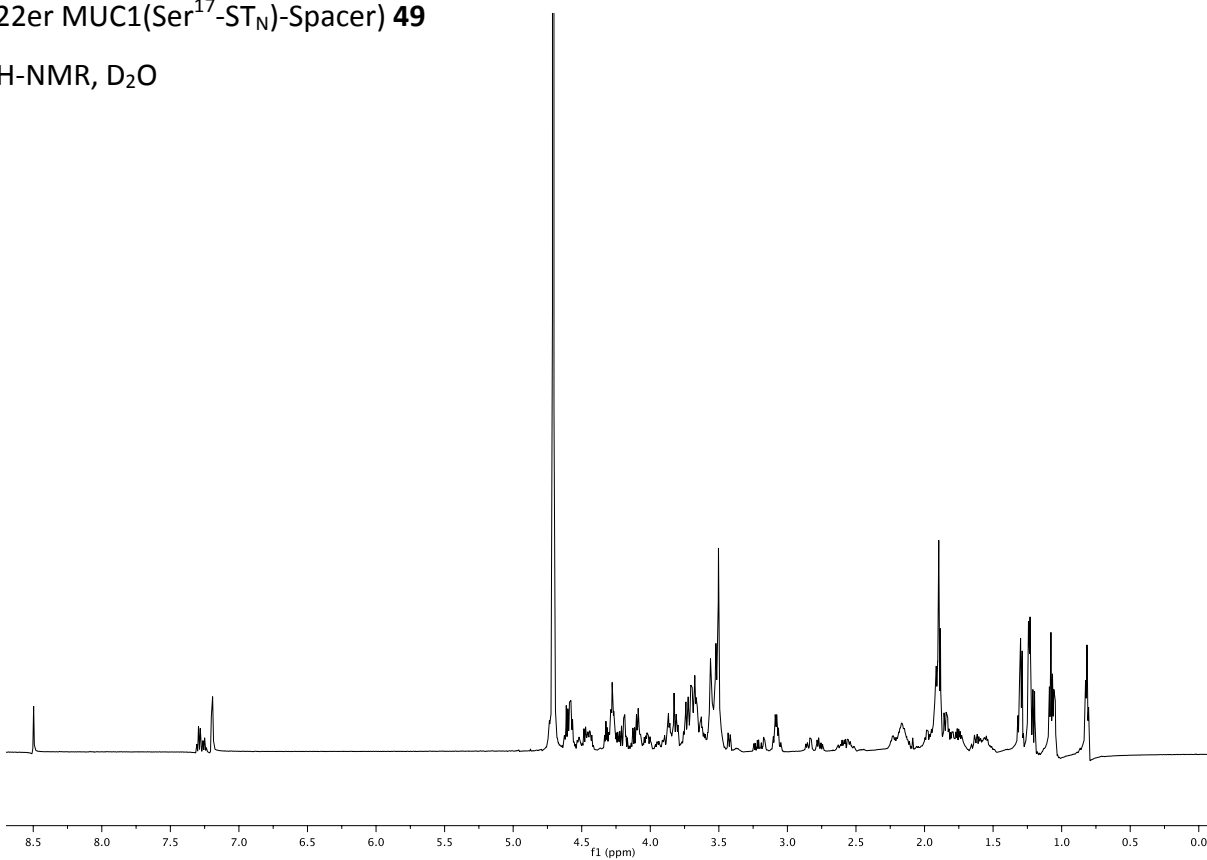
<sup>13</sup>C-NMR, D<sub>2</sub>O, **48**

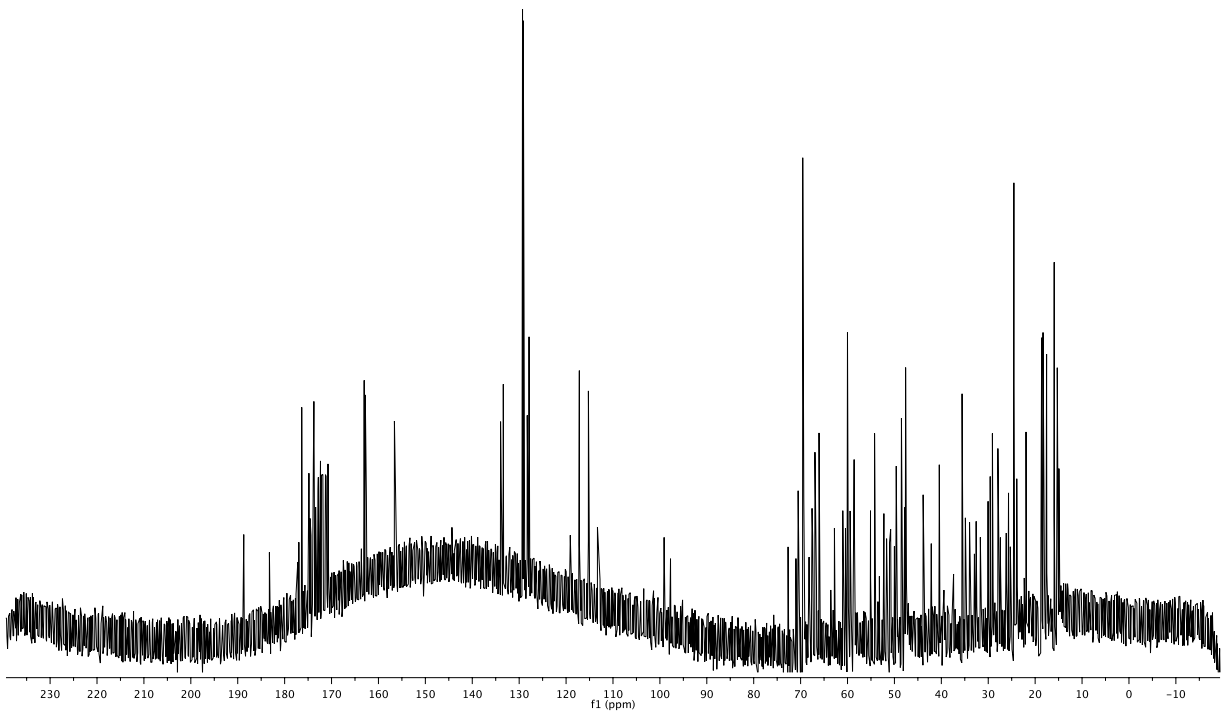
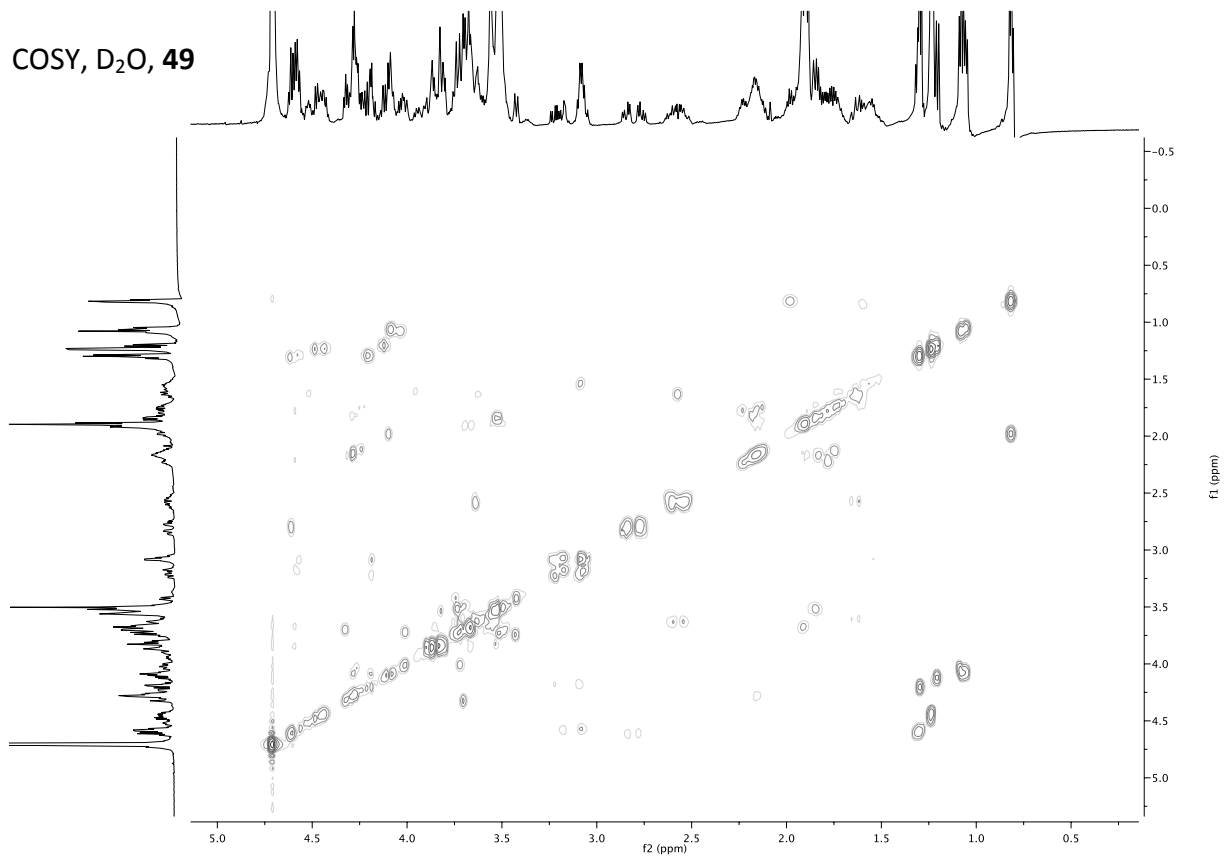


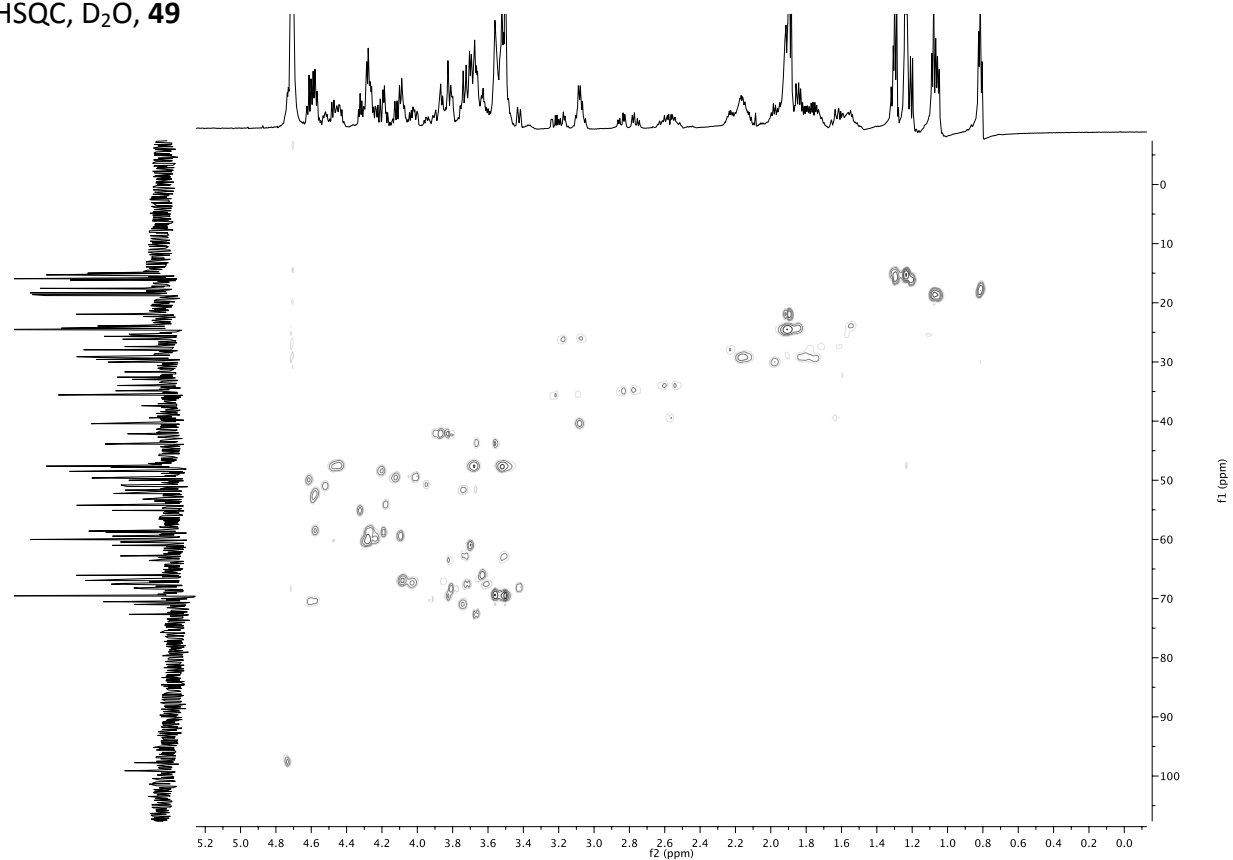
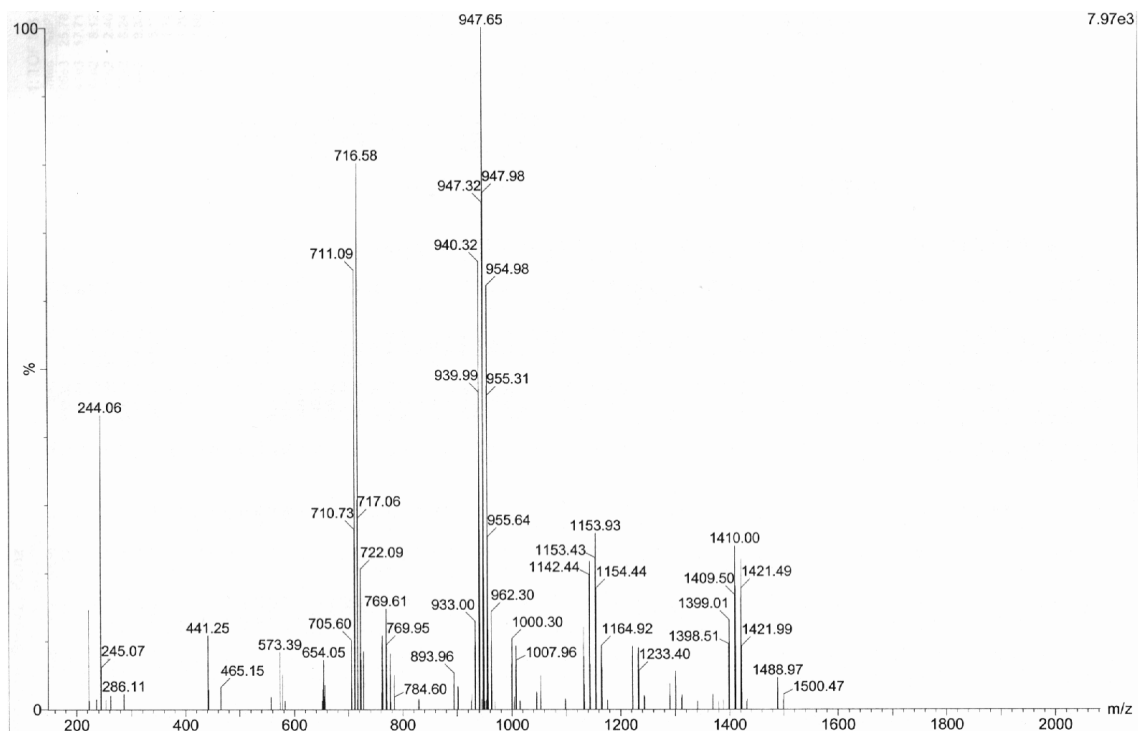
COSY, D<sub>2</sub>O, 48HSQC, D<sub>2</sub>O, 48

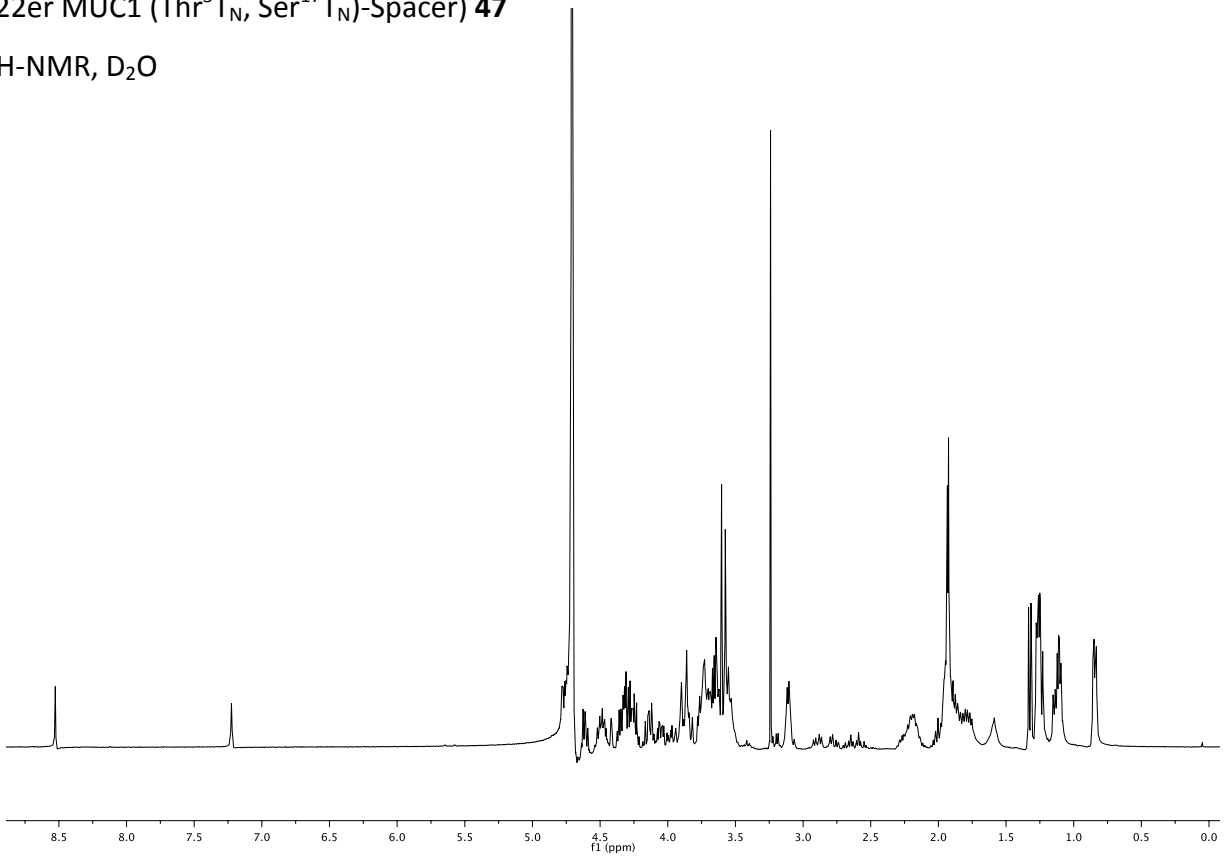
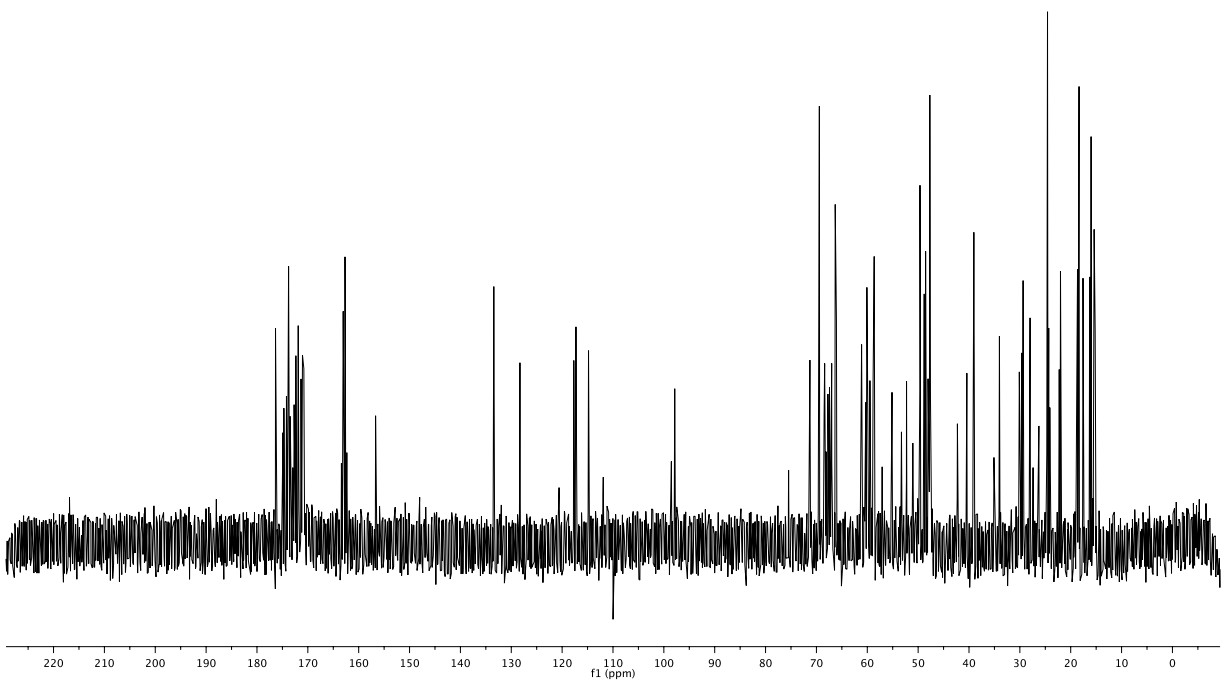


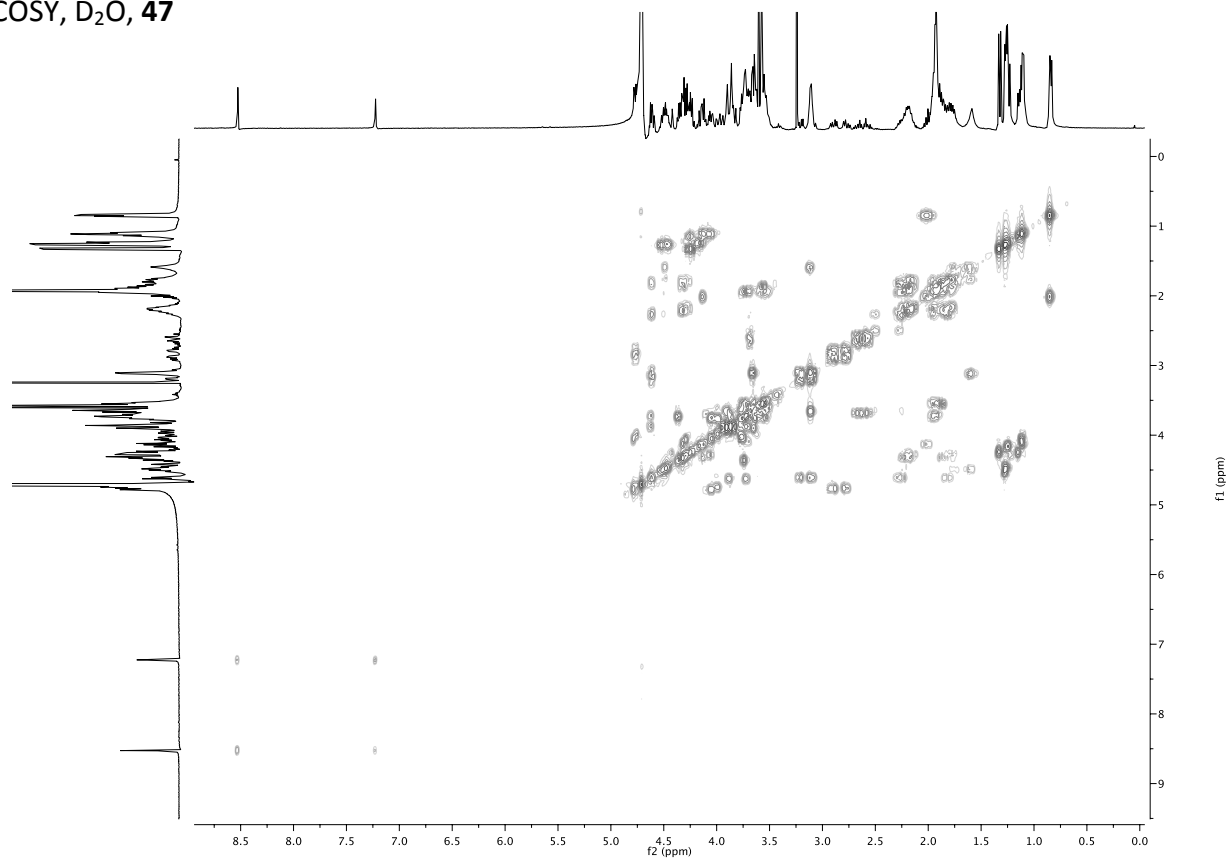
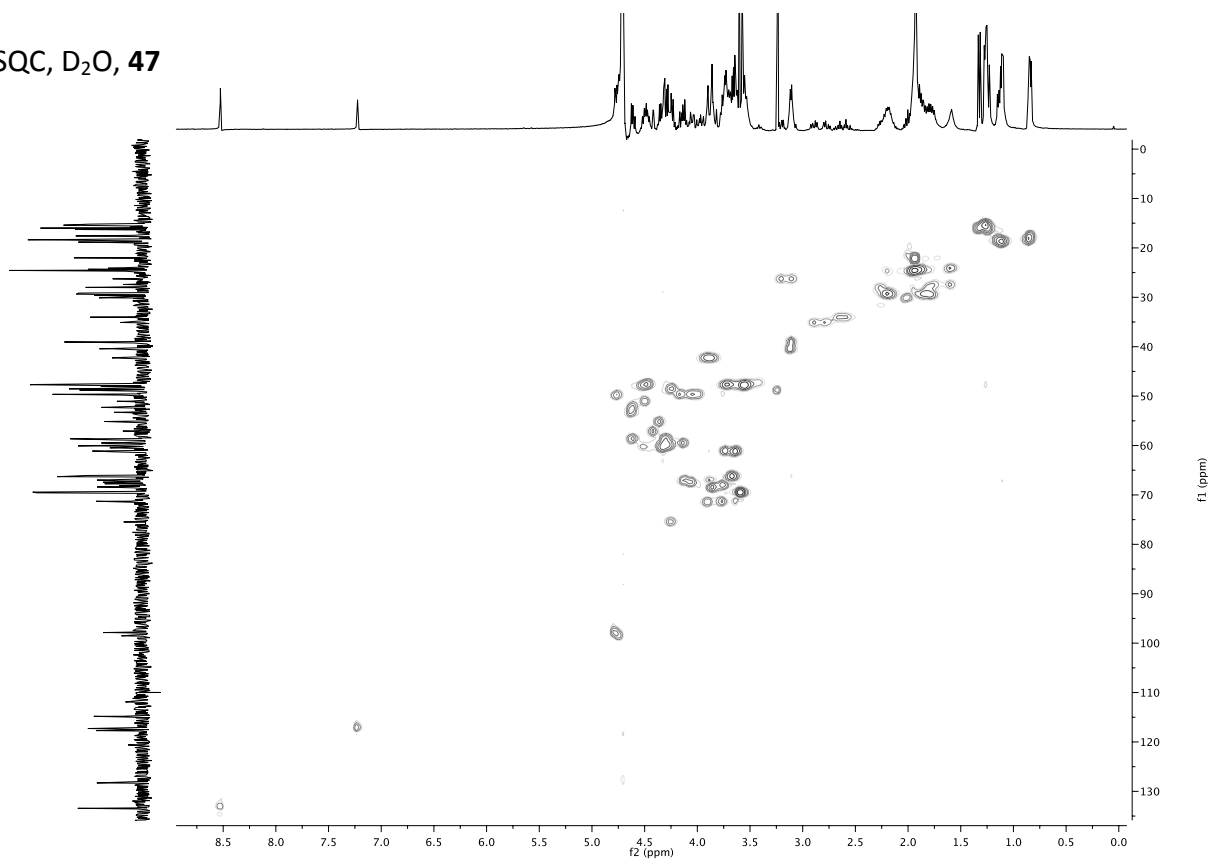
## ESI-MS, 48

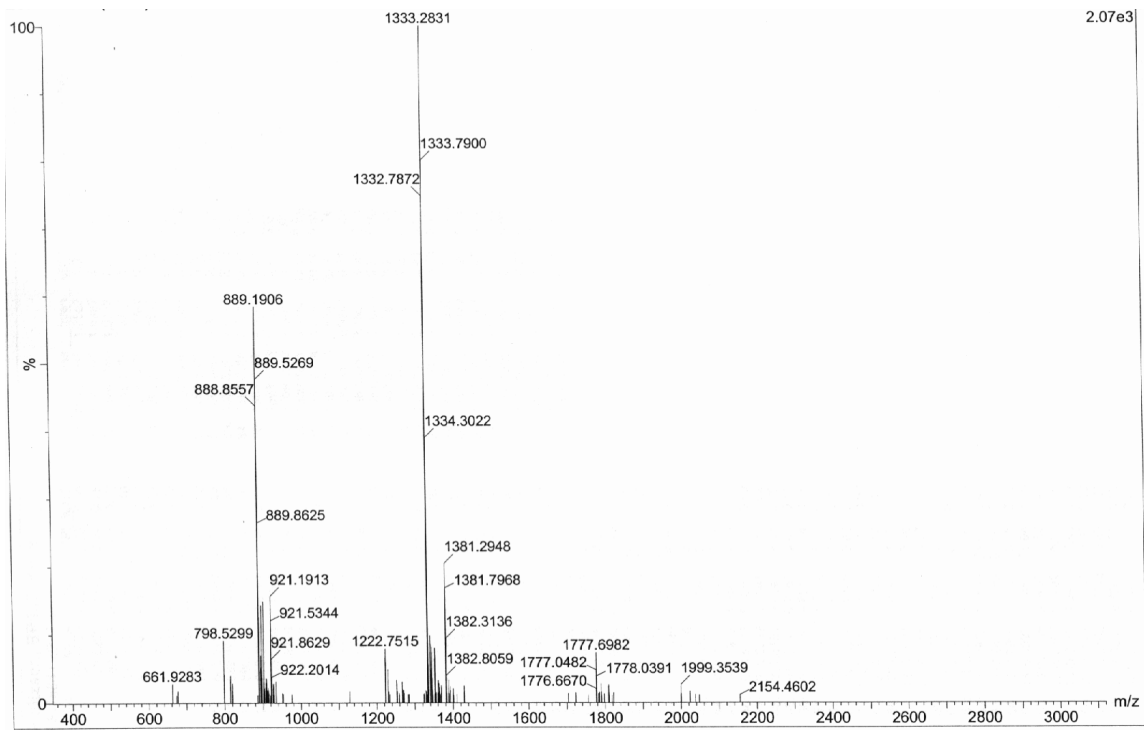
(22er MUC1(Ser<sup>17</sup>-ST<sub>N</sub>)-Spacer) 49<sup>1</sup>H-NMR, D<sub>2</sub>O

$^{13}\text{C}$ -NMR,  $\text{D}_2\text{O}$ , 49COSY,  $\text{D}_2\text{O}$ , 49

HSQC, D<sub>2</sub>O, 49ESI-MS, D<sub>2</sub>O, 49

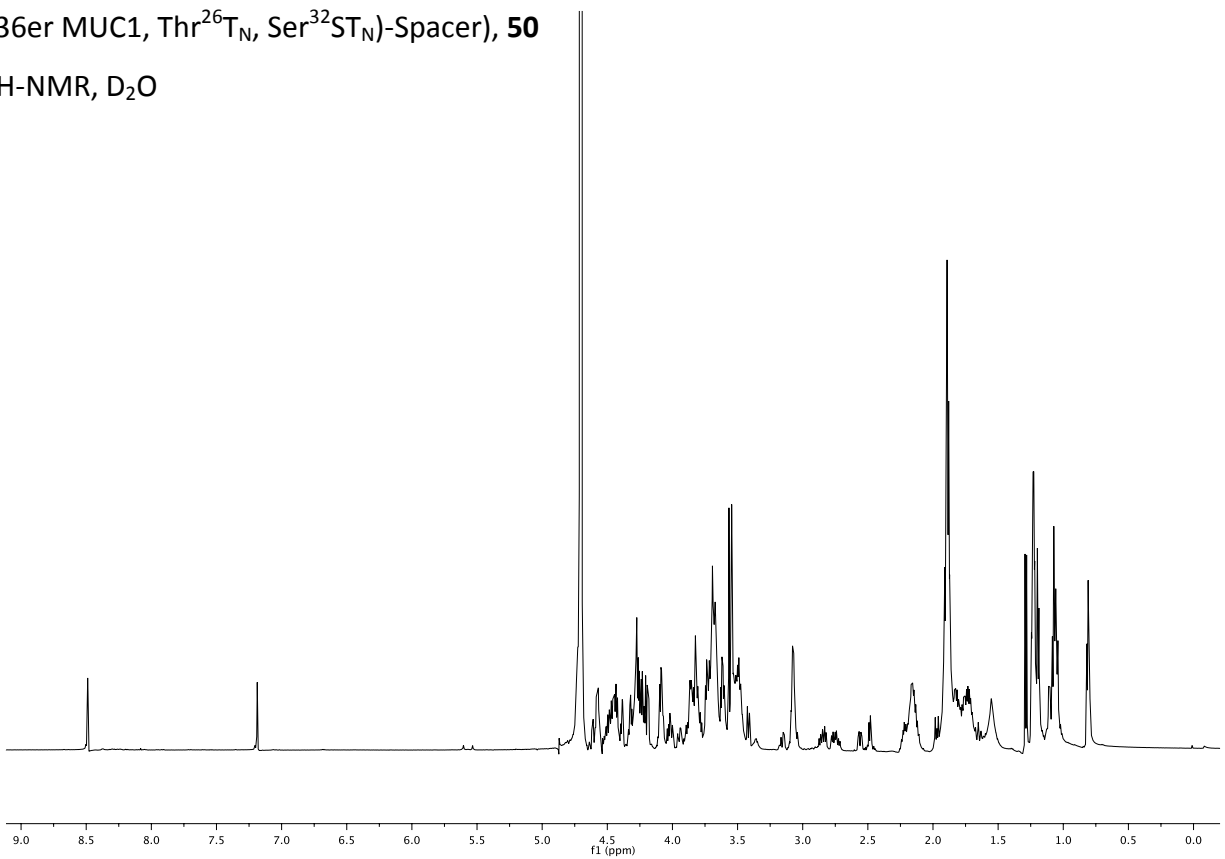
**(22er MUC1 (Thr<sup>5</sup>T<sub>N</sub>, Ser<sup>17</sup>T<sub>N</sub>)-Spacer) 47**<sup>1</sup>H-NMR, D<sub>2</sub>O<sup>13</sup>C-NMR, D<sub>2</sub>O 47

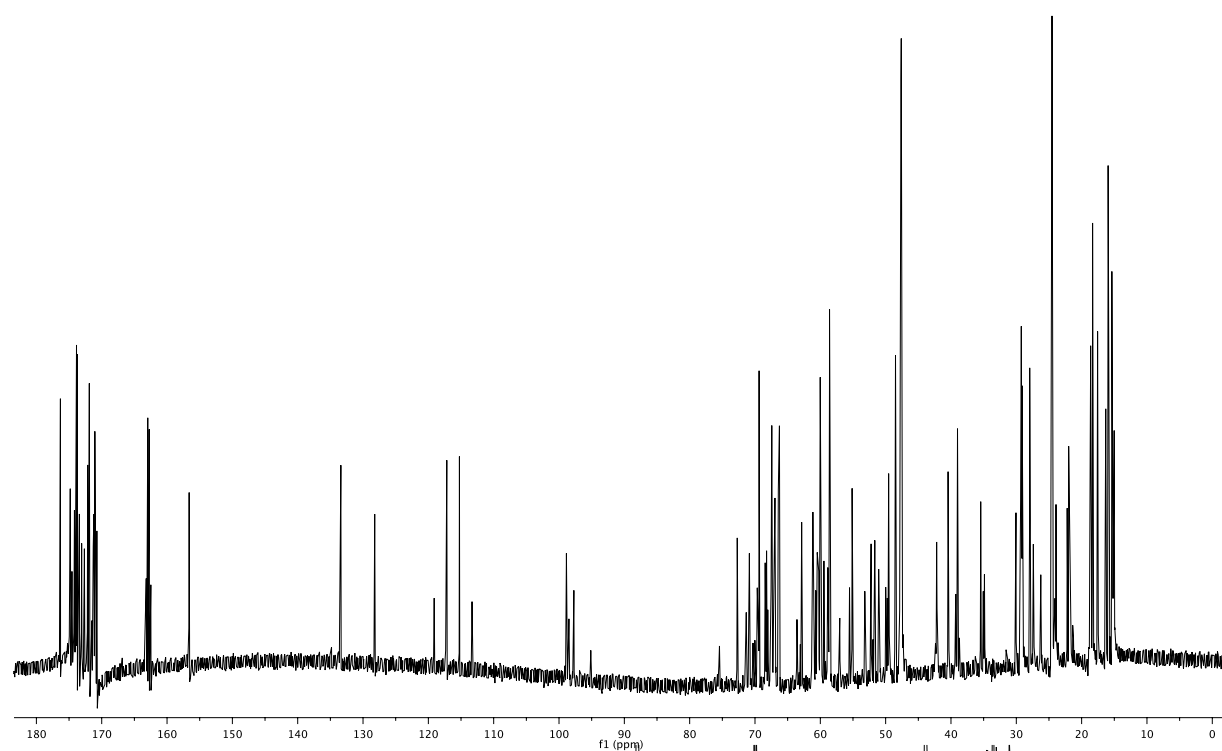
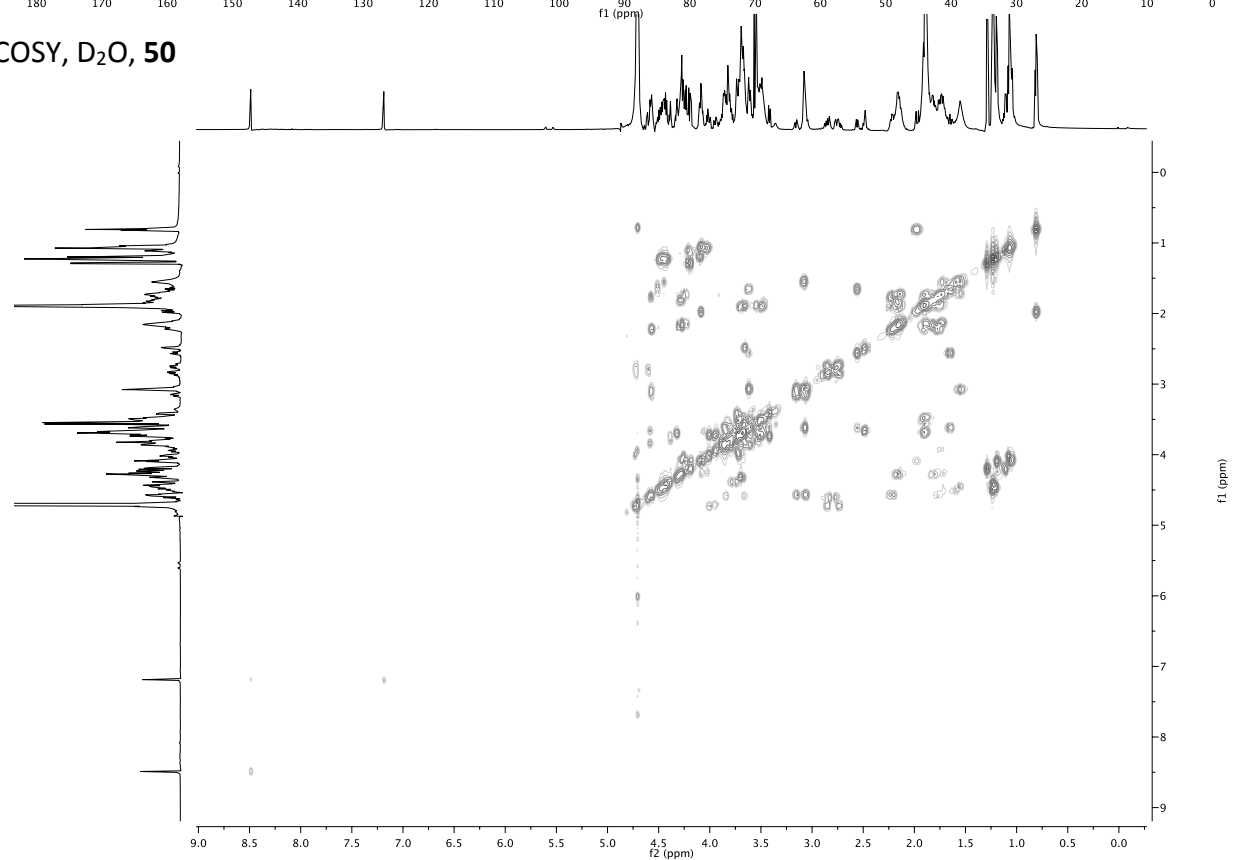
COSY, D<sub>2</sub>O, 47HSQC, D<sub>2</sub>O, 47

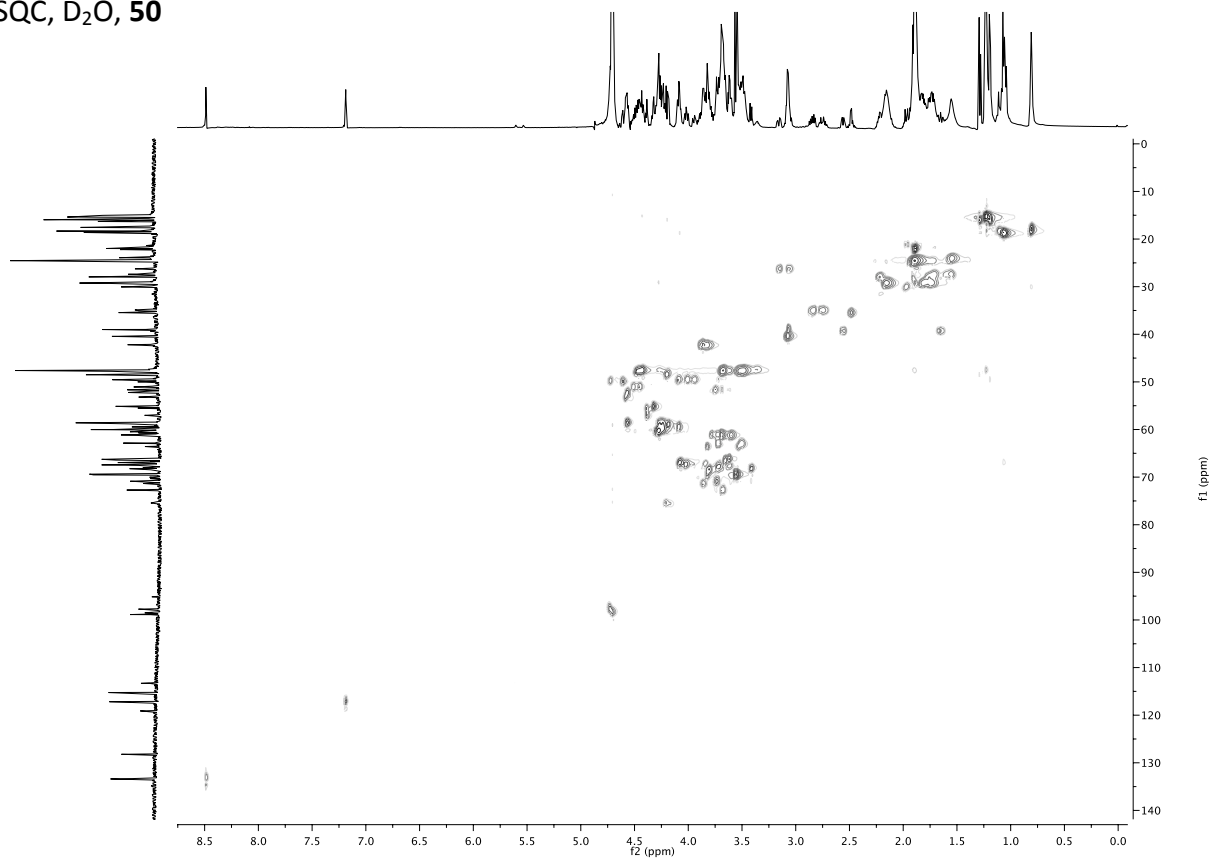


(36er MUC1, Thr<sup>26</sup>T<sub>N</sub>, Ser<sup>32</sup>ST<sub>N</sub>)-Spacer), 50

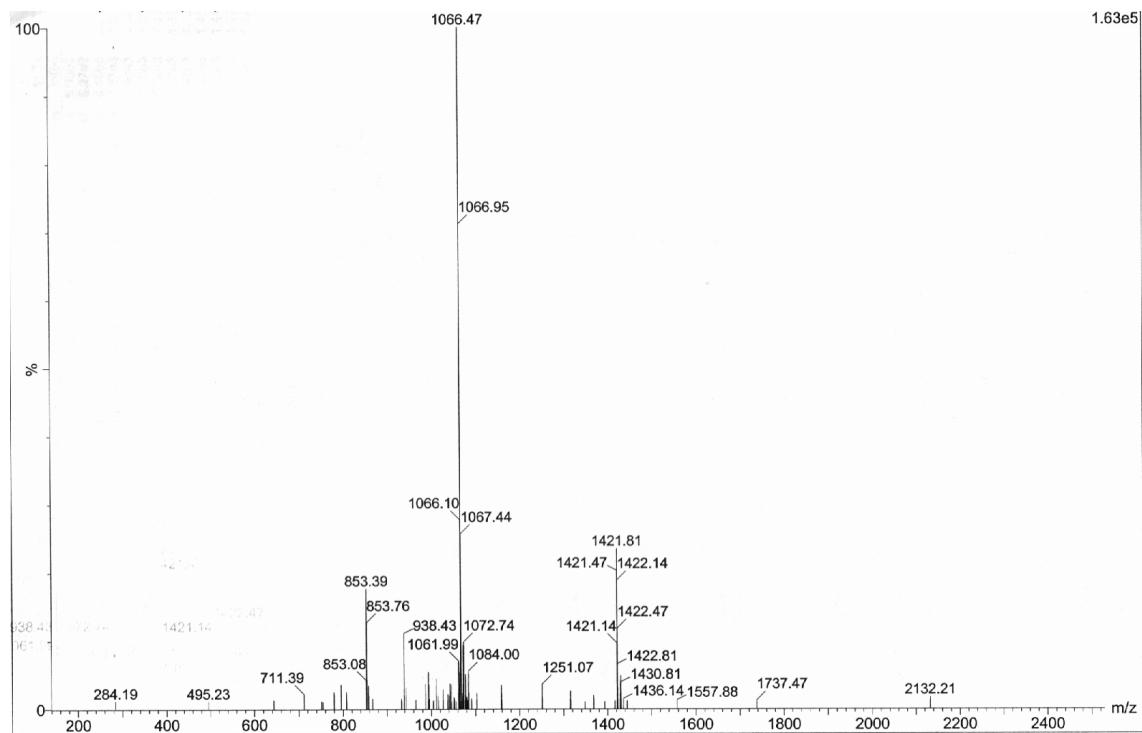
<sup>1</sup>H-NMR, D<sub>2</sub>O



$^{13}\text{C}$ -NMR,  $\text{D}_2\text{O}$ , 50COSY,  $\text{D}_2\text{O}$ , 50

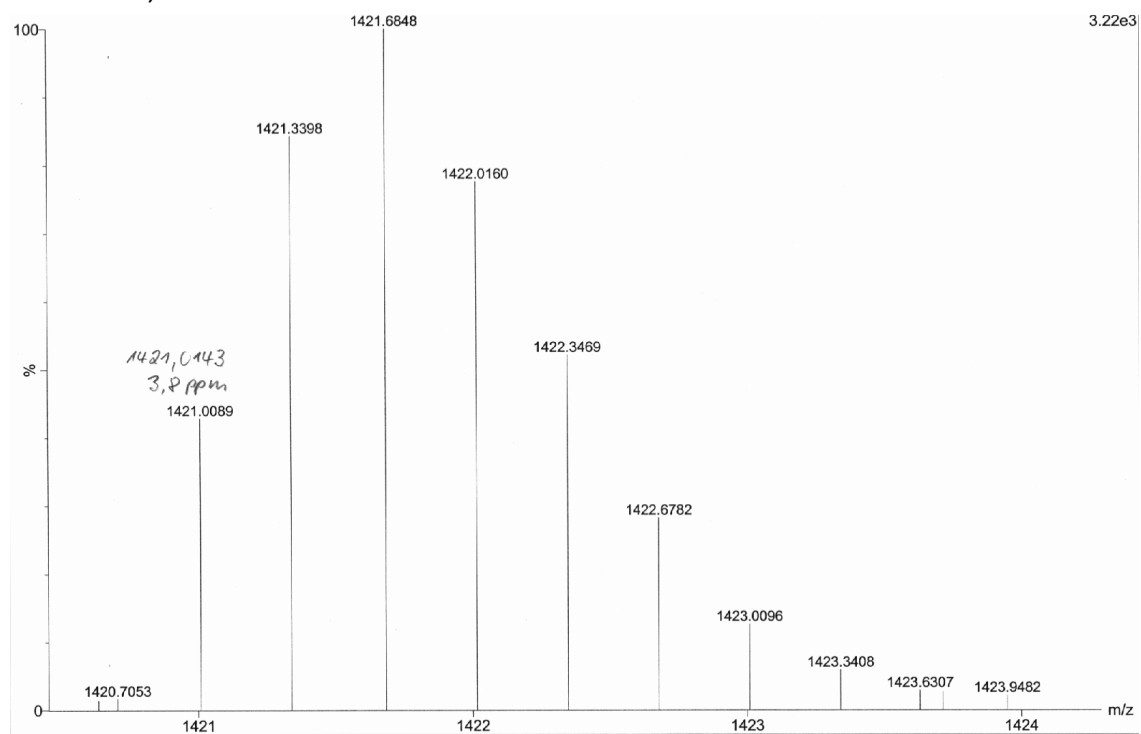
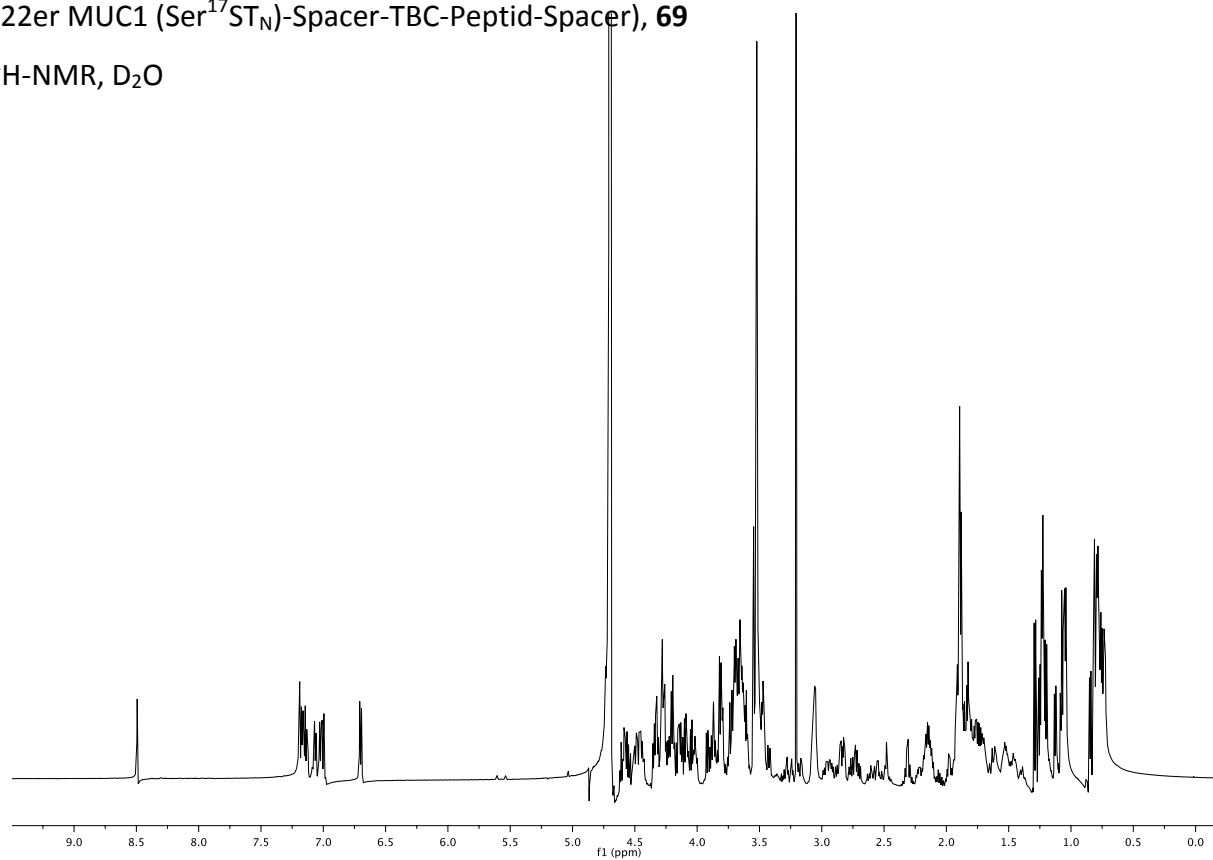
HSQC, D<sub>2</sub>O, 50

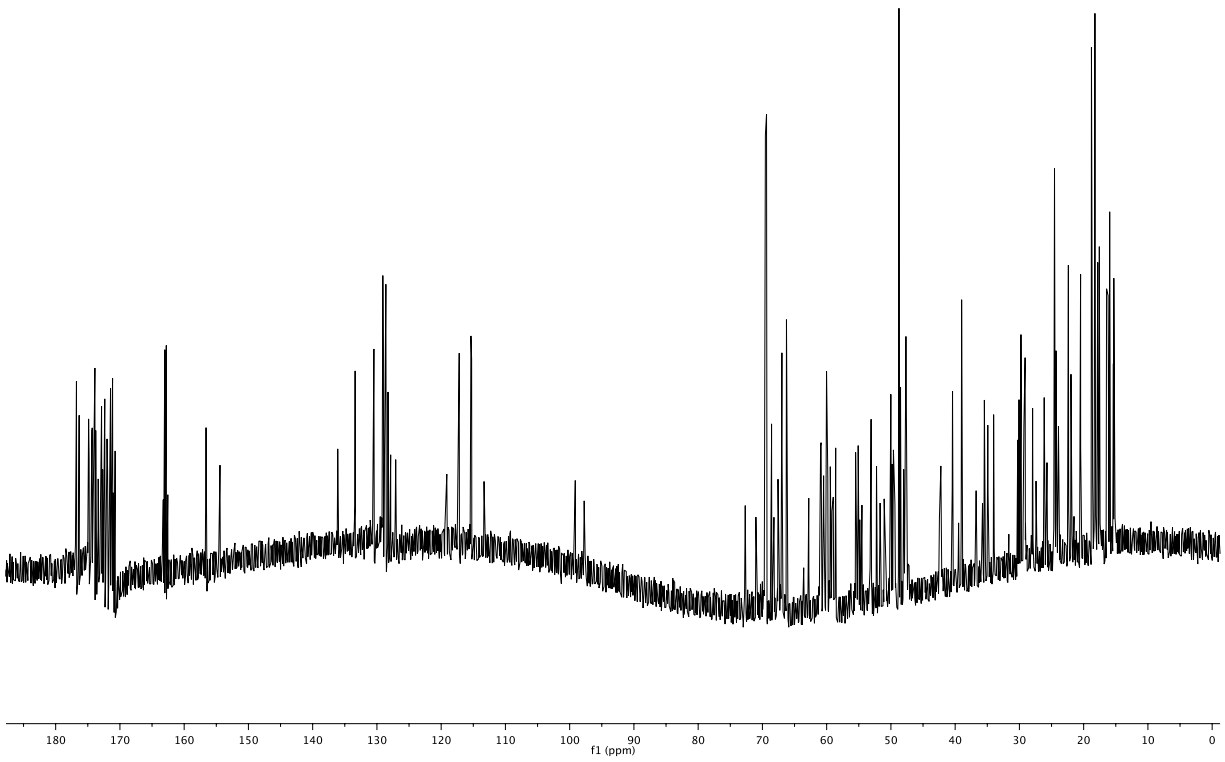
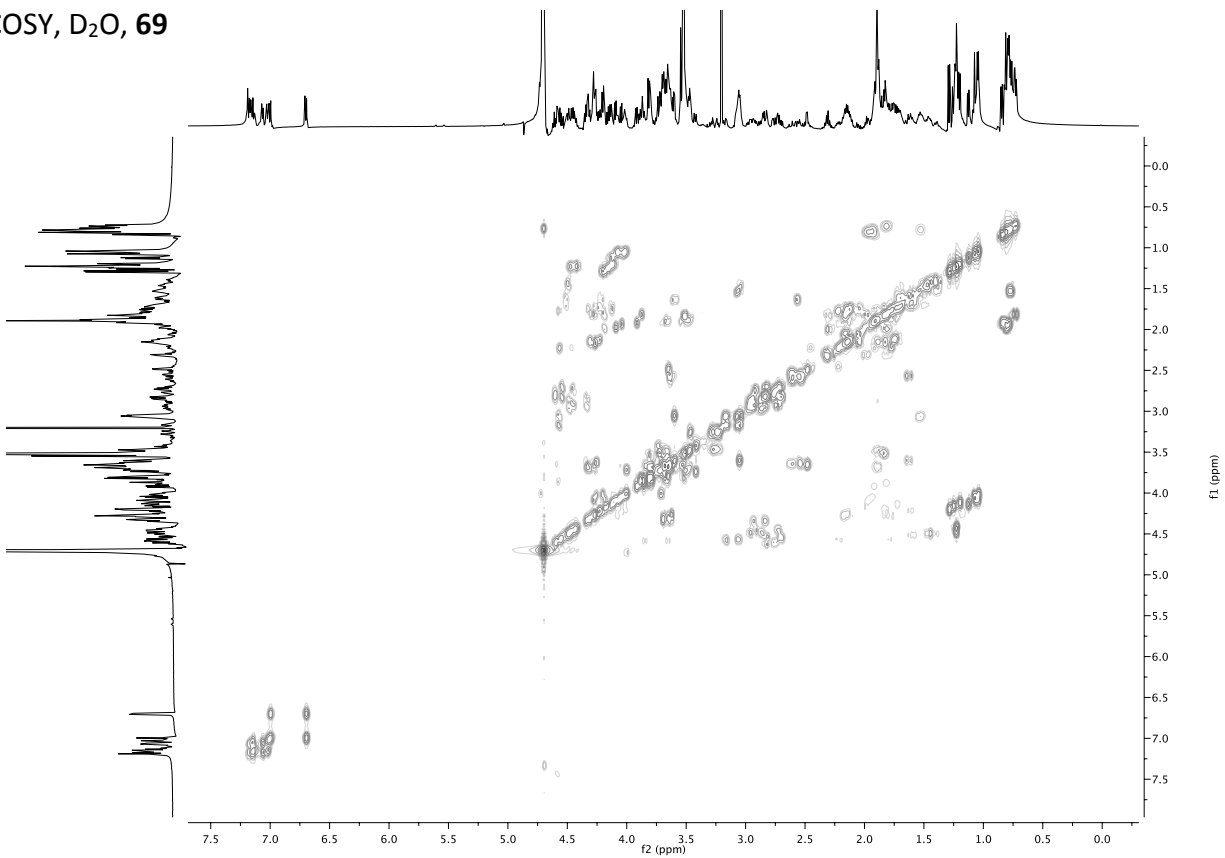
## ESI-MS, 50

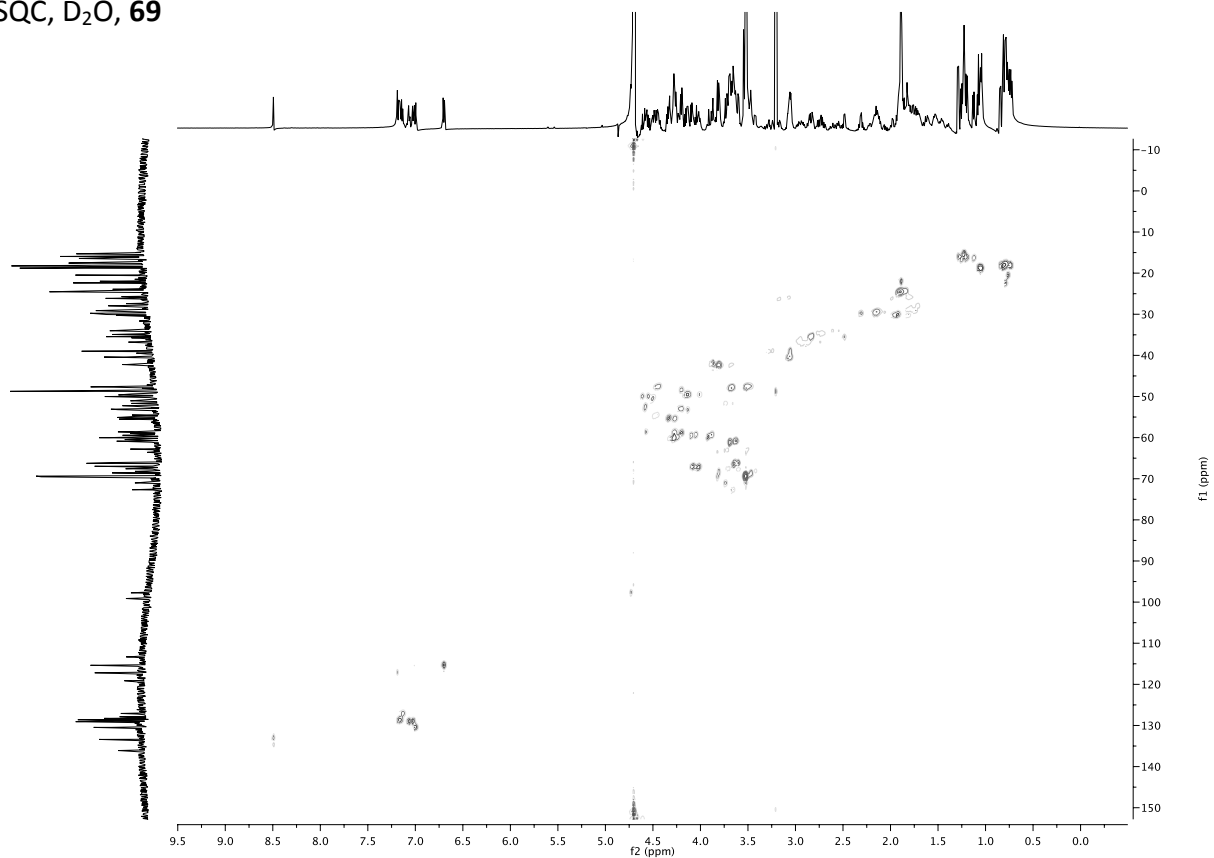




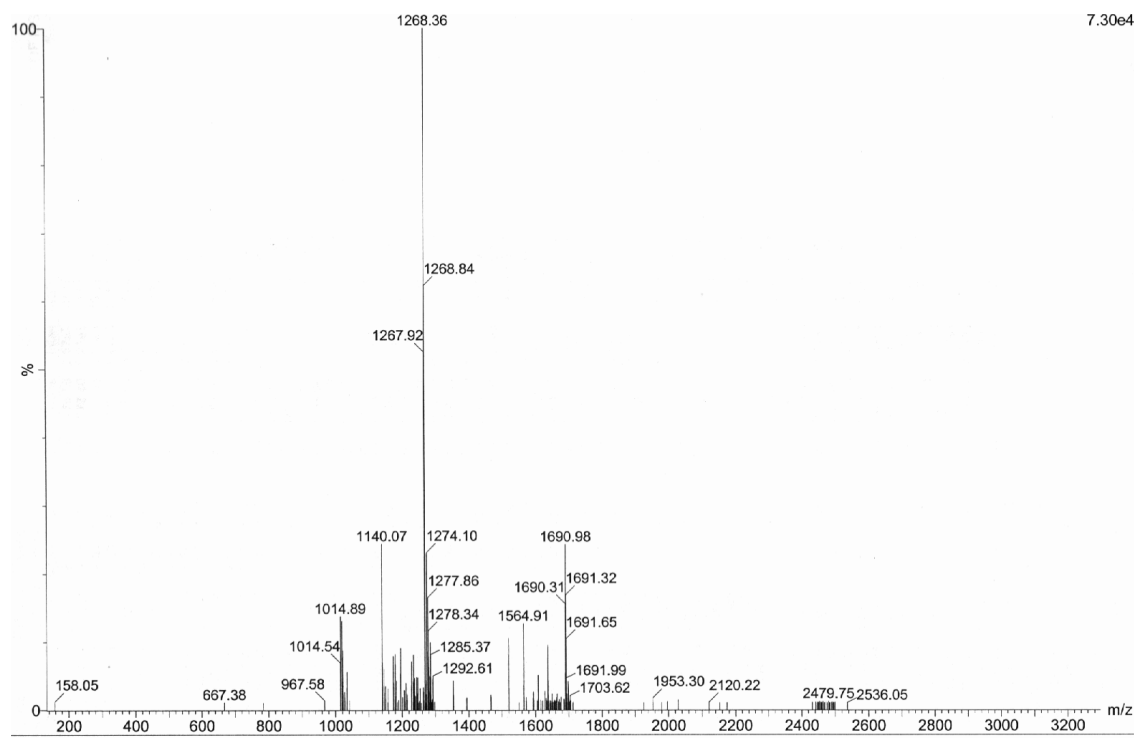
## HR-ESI-MS, 50

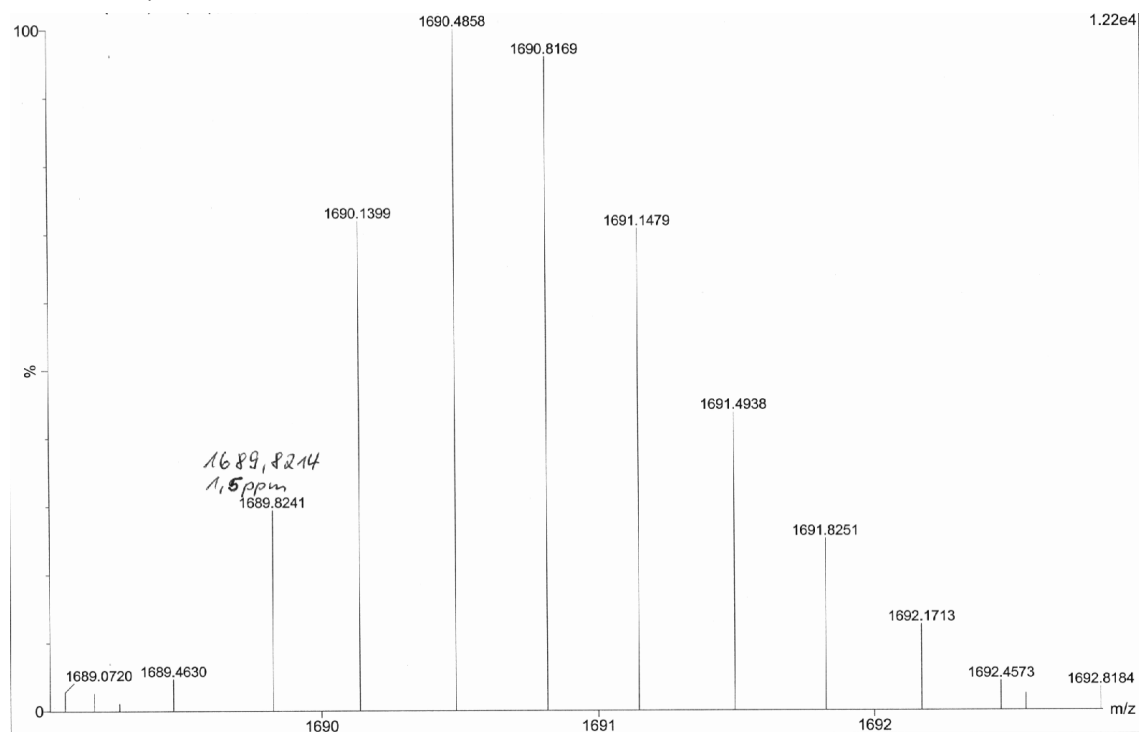
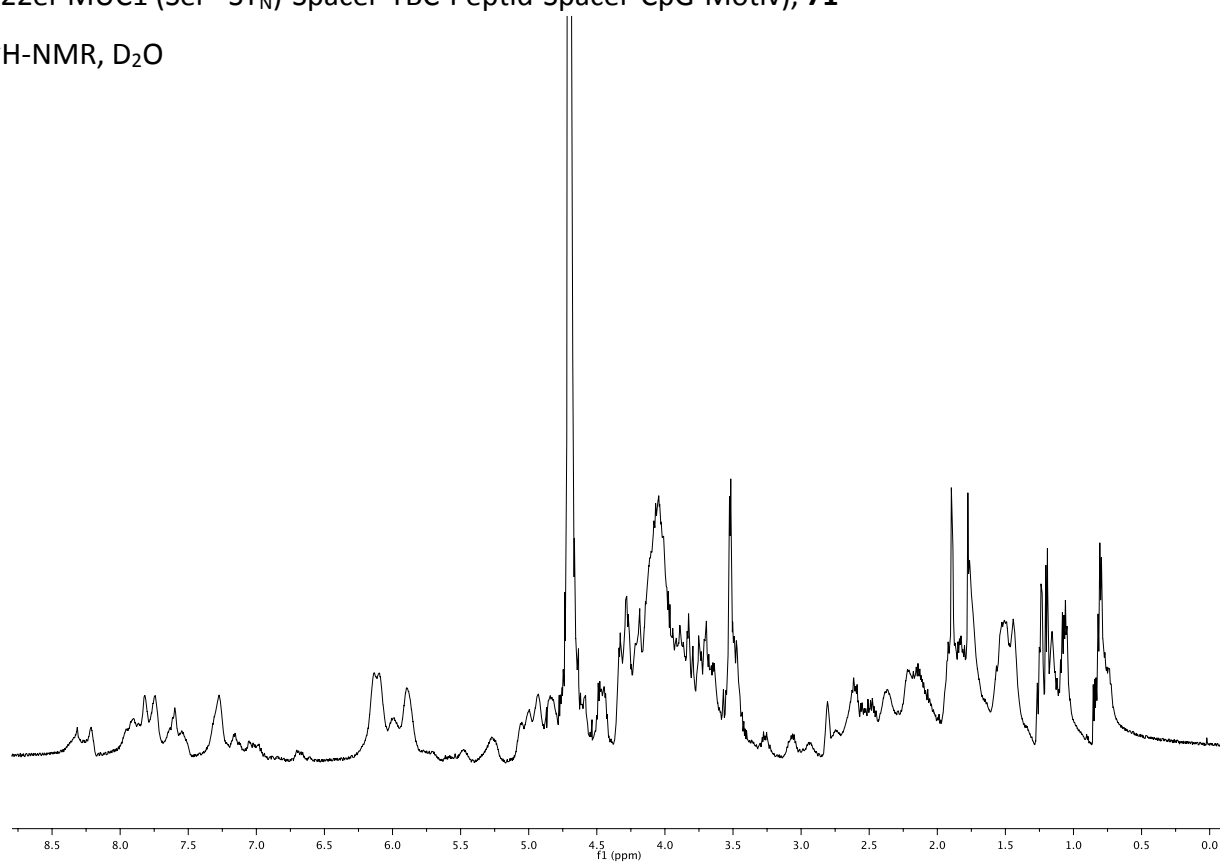
(22er MUC1 (Ser<sup>17</sup>ST<sub>N</sub>)-Spacer-TBC-Peptid-Spacer), 69<sup>1</sup>H-NMR, D<sub>2</sub>O

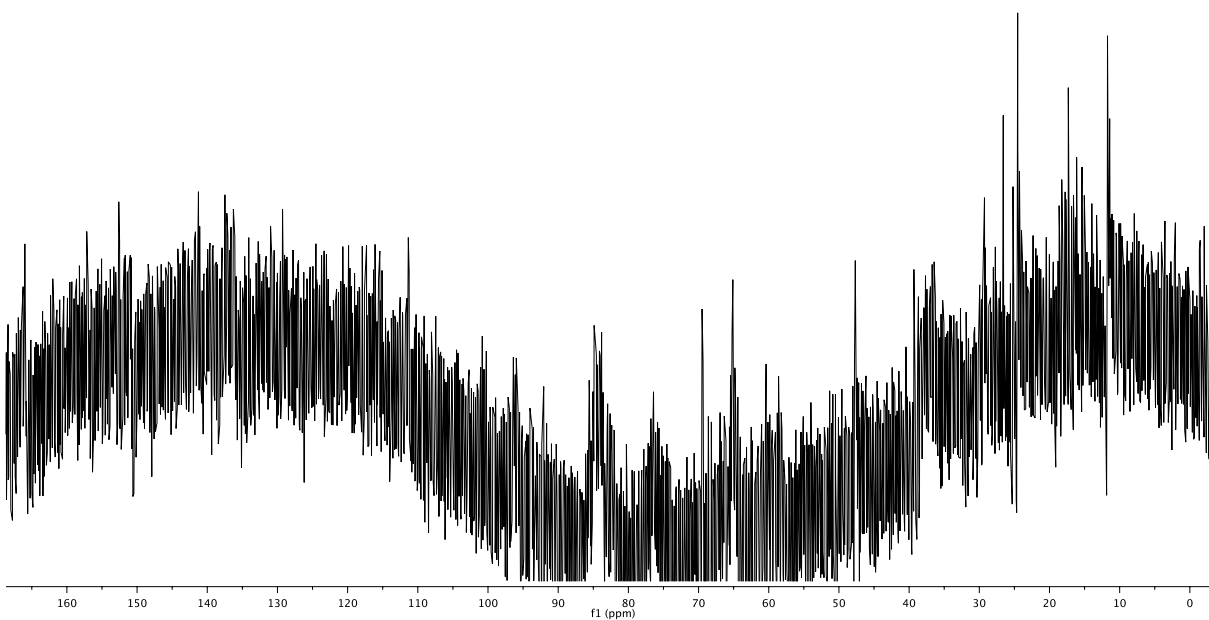
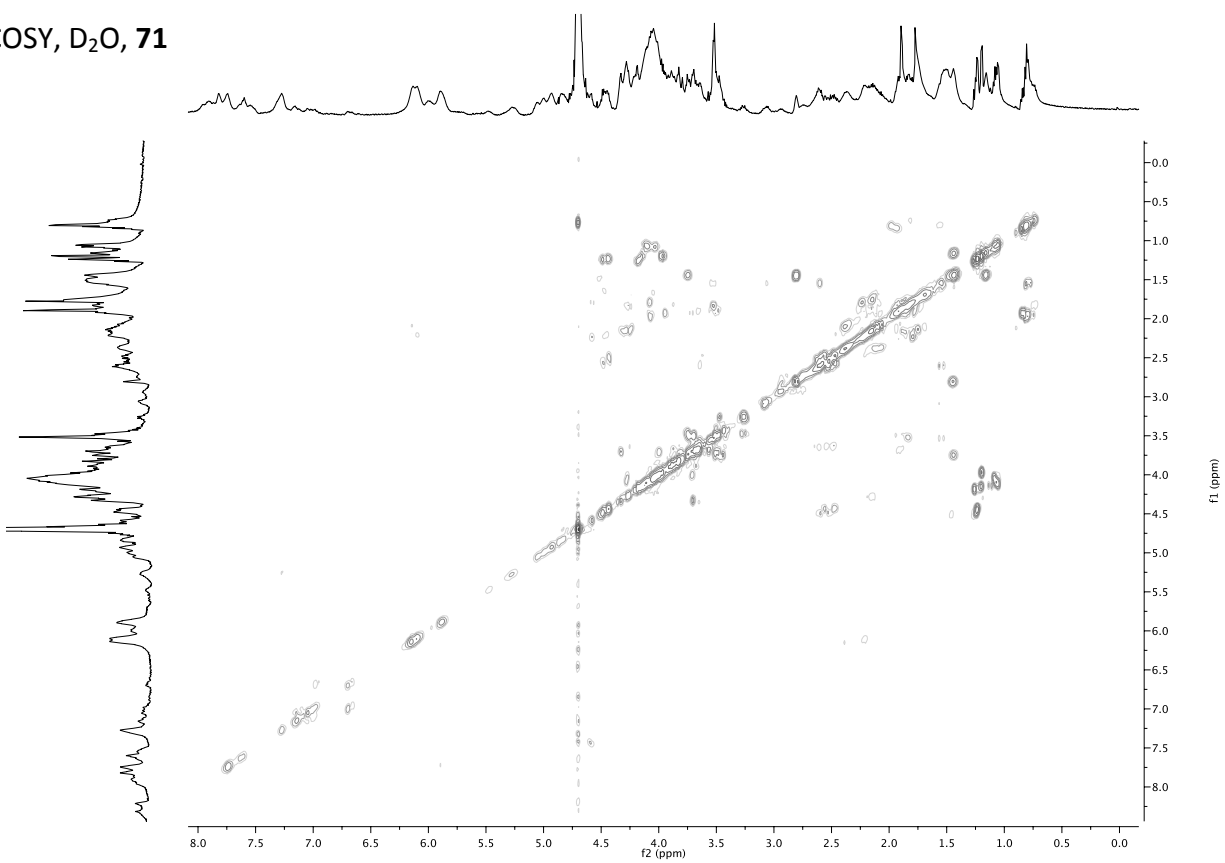
$^{13}\text{C}$ -NMR,  $\text{D}_2\text{O}$ , 69COSY,  $\text{D}_2\text{O}$ , 69

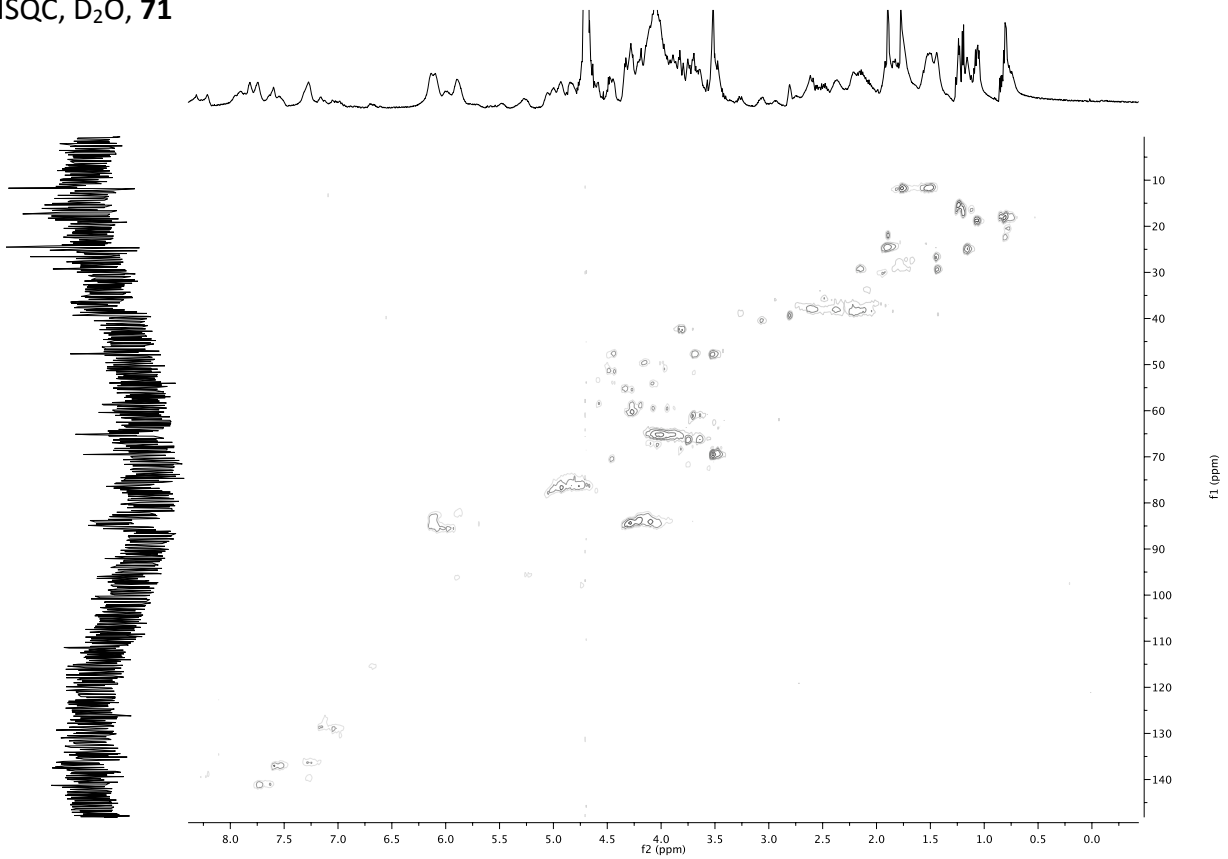
HSQC, D<sub>2</sub>O, 69

## ESI-MS, 69

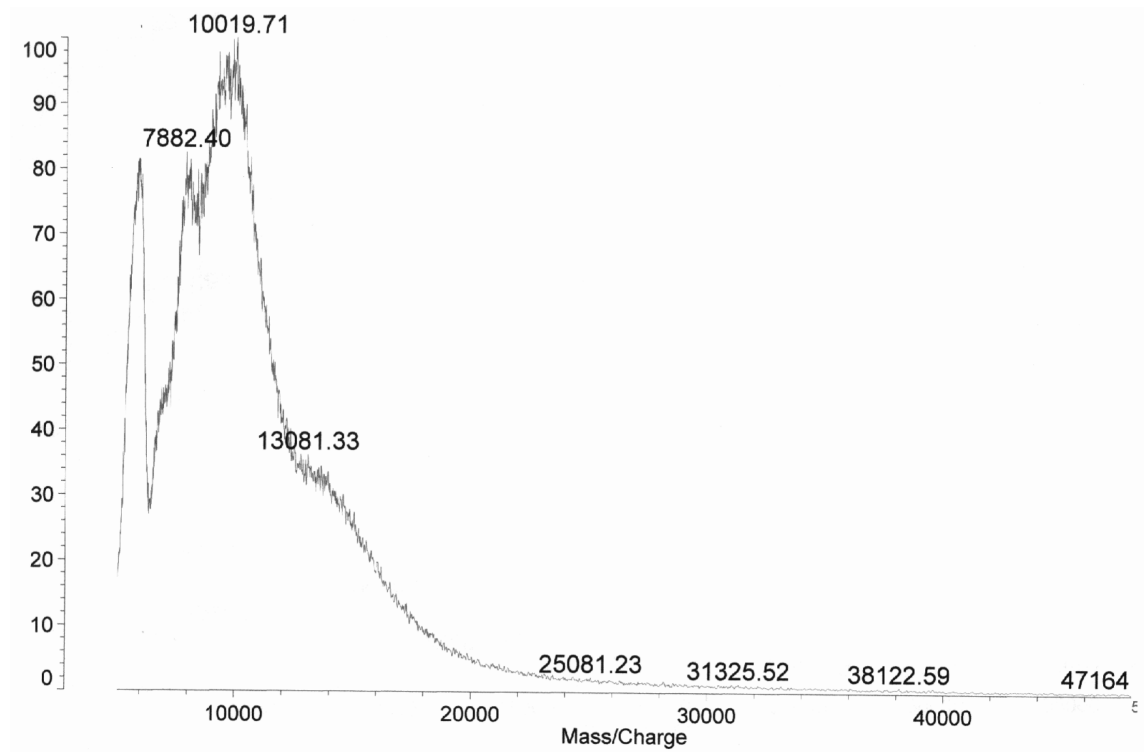


HR-ESI-MS, **69****(22er MUC1 (Ser<sup>17</sup>ST<sub>N</sub>)-Spacer-TBC-Peptid-Spacer-CpG-Motiv), 71**<sup>1</sup>H-NMR, D<sub>2</sub>O

$^{13}\text{C}$ -NMR,  $\text{D}_2\text{O}$ , 71COSY,  $\text{D}_2\text{O}$ , 71

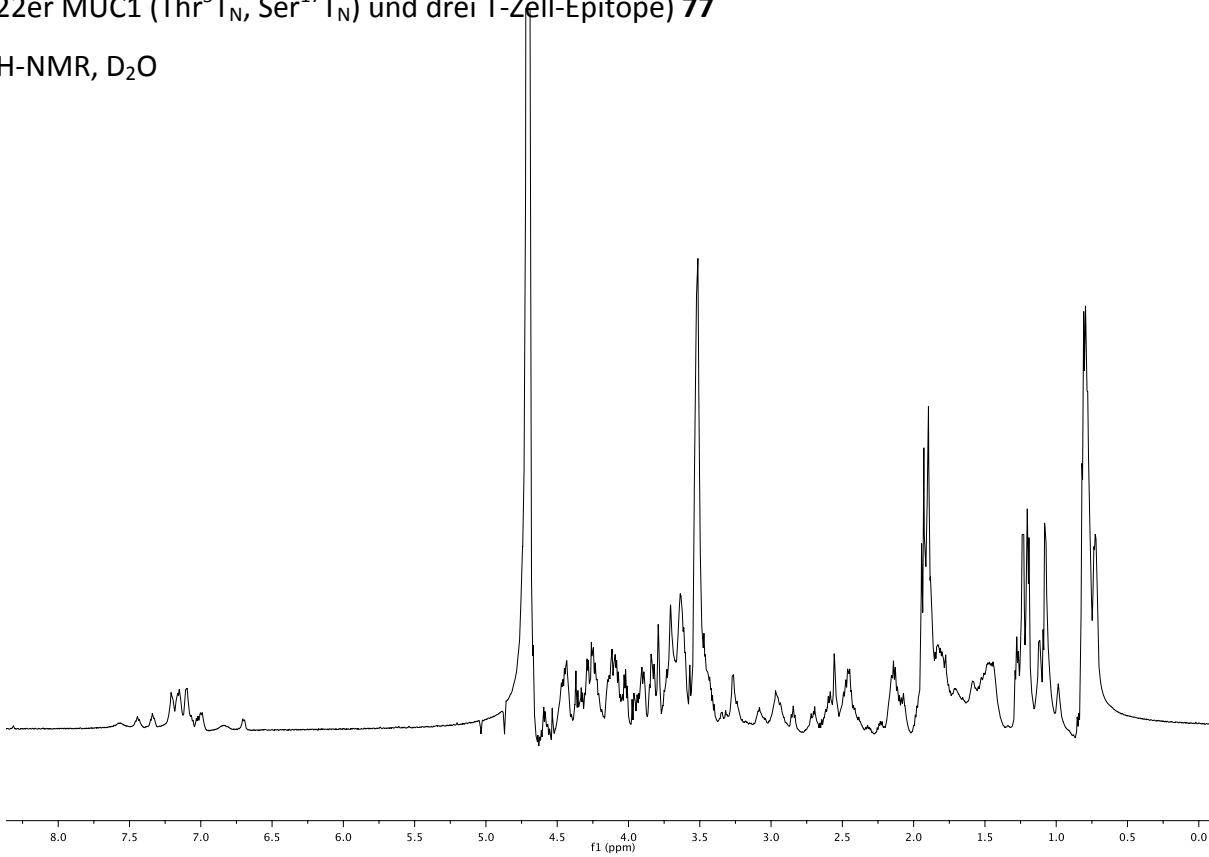
HSQC, D<sub>2</sub>O, 71

## MALDI-TOF, Sinapinsäure, 71

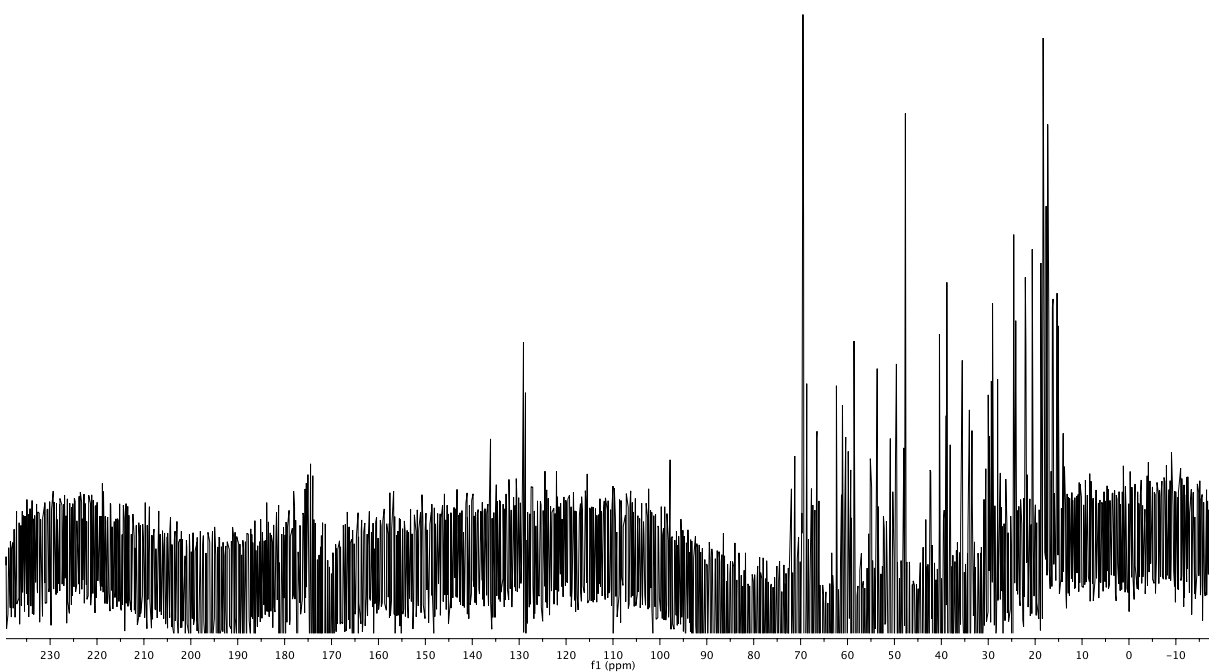


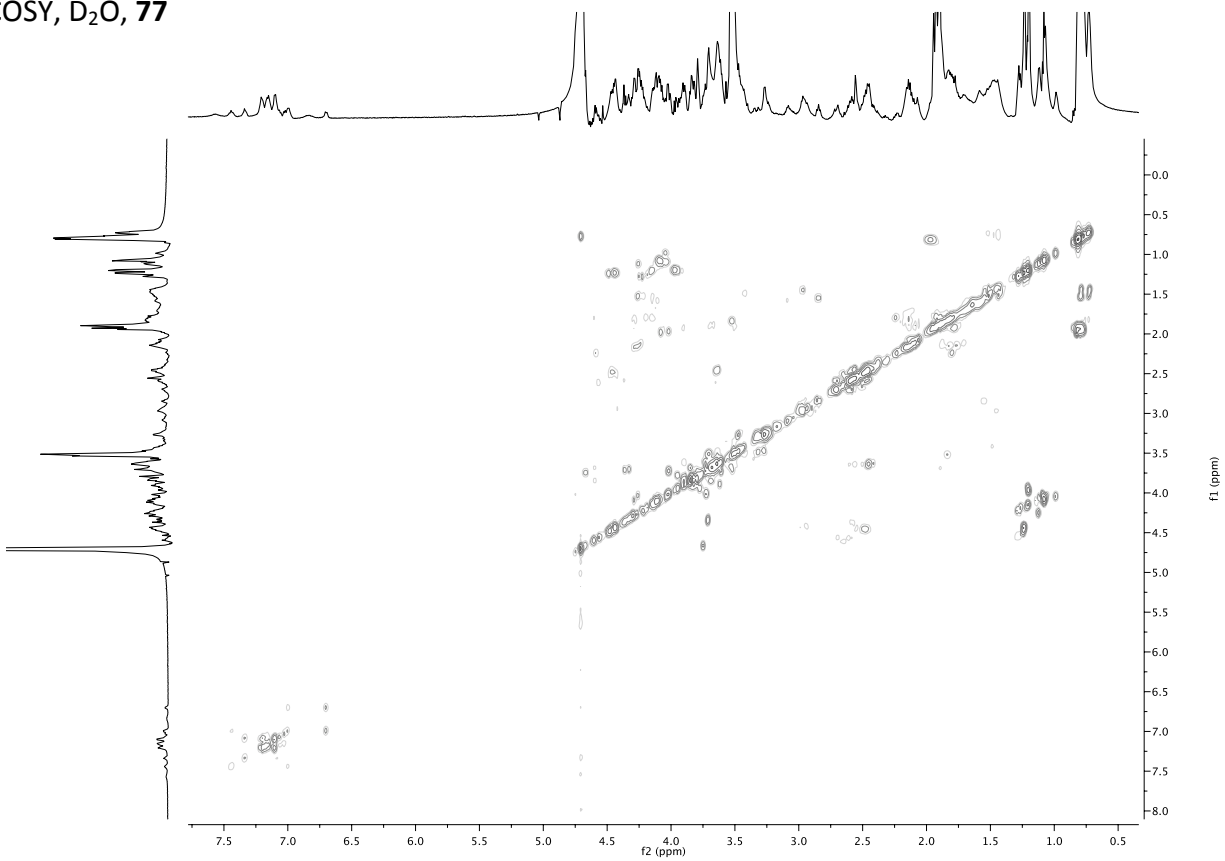
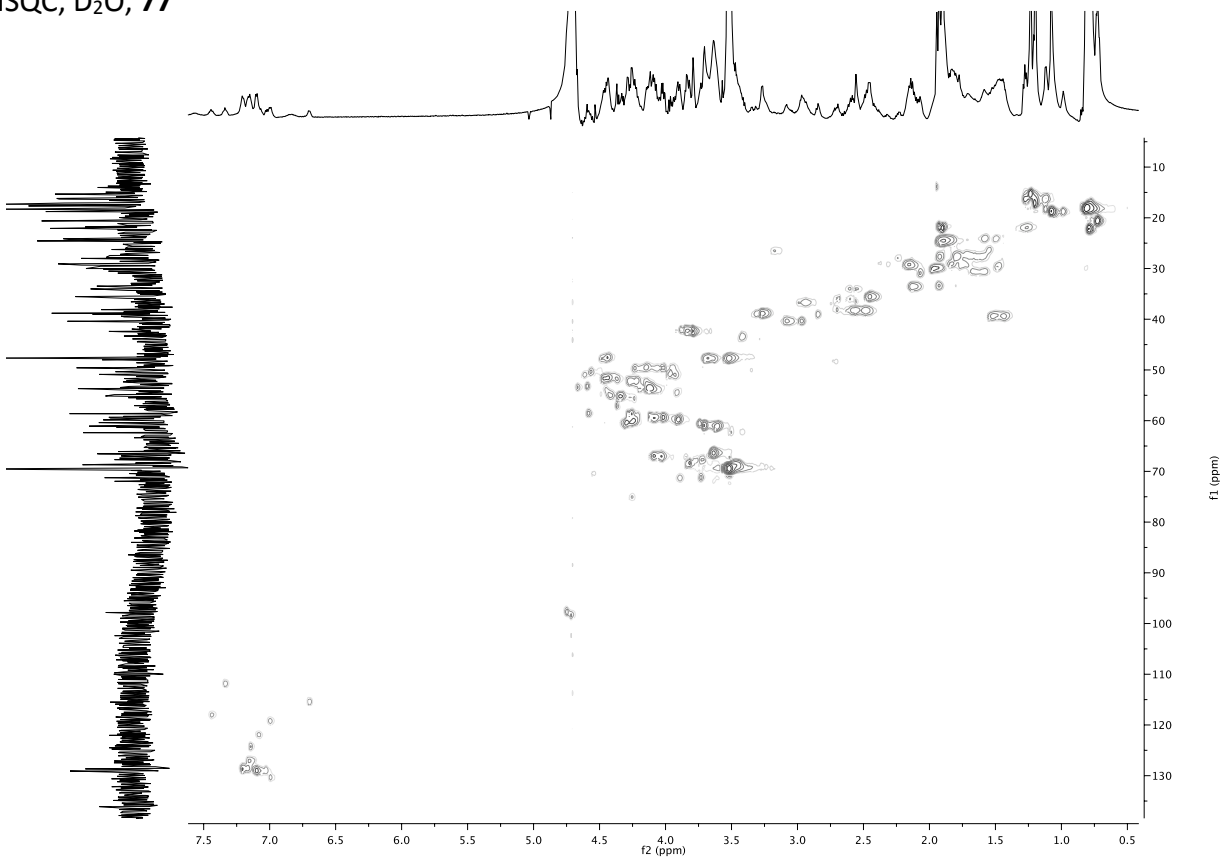
(22er MUC1 (Thr<sup>5</sup>T<sub>N</sub>, Ser<sup>17</sup>T<sub>N</sub>) und drei T-Zell-Epitope) **77**

<sup>1</sup>H-NMR, D<sub>2</sub>O

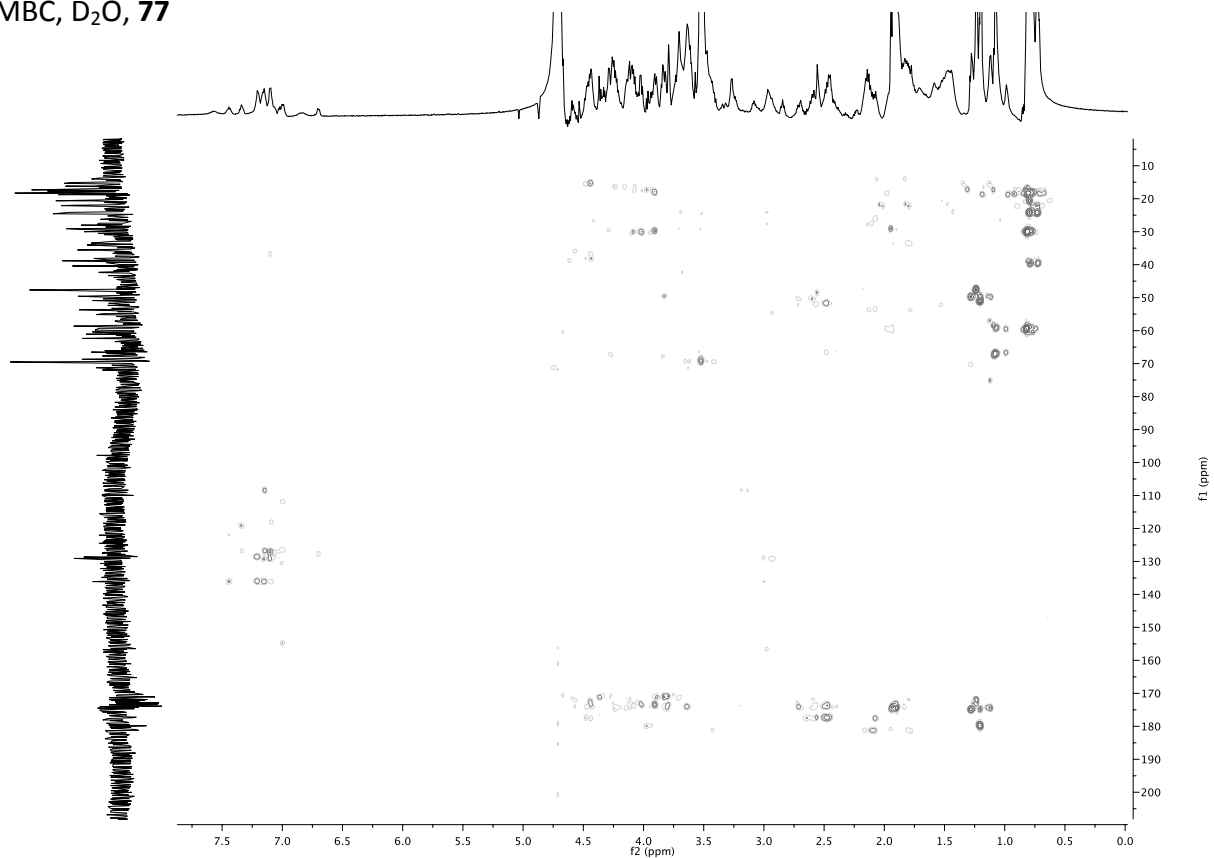


<sup>13</sup>C-NMR, D<sub>2</sub>O

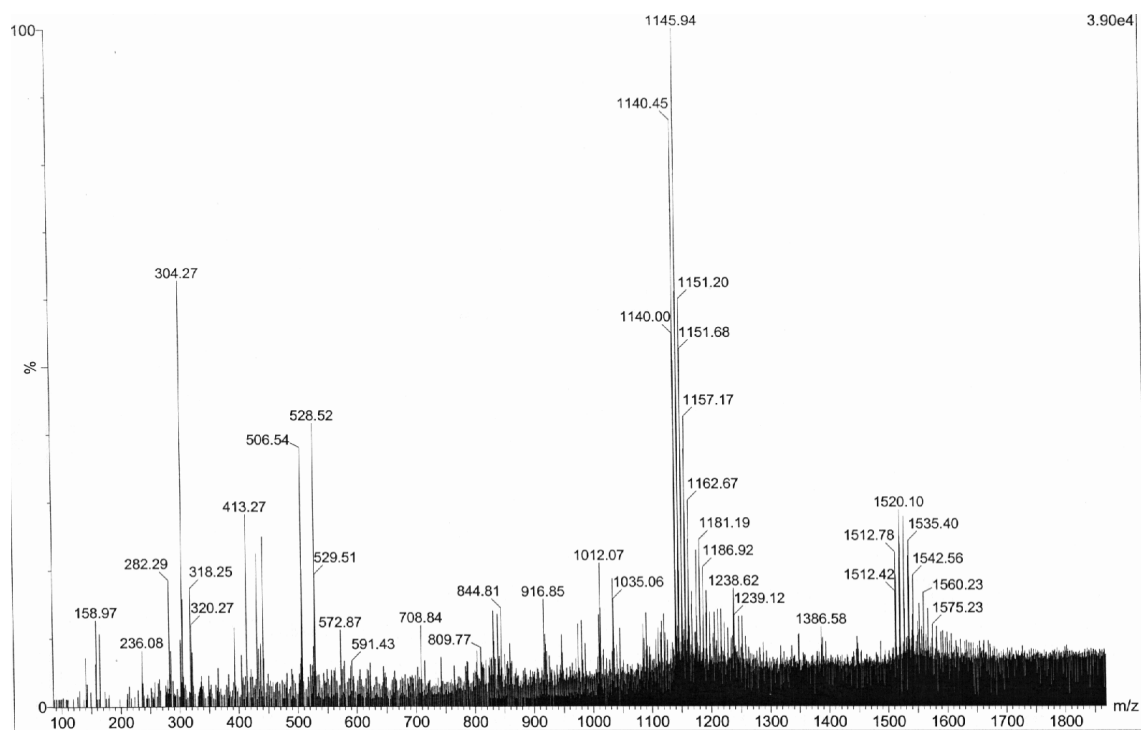


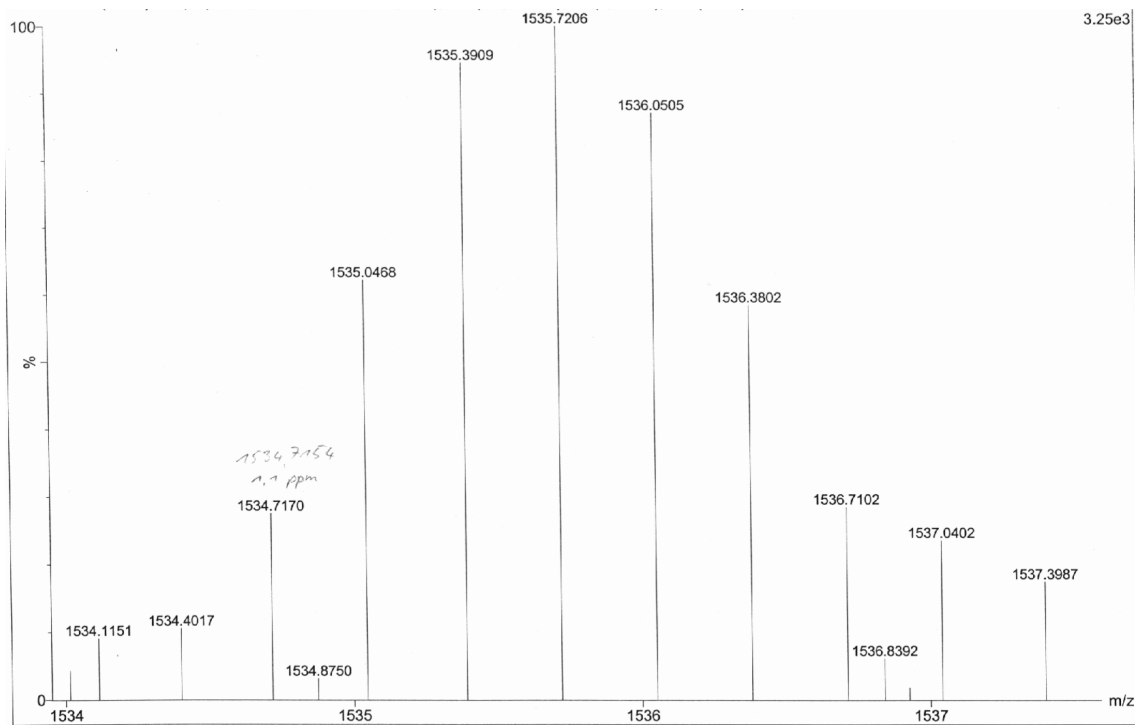
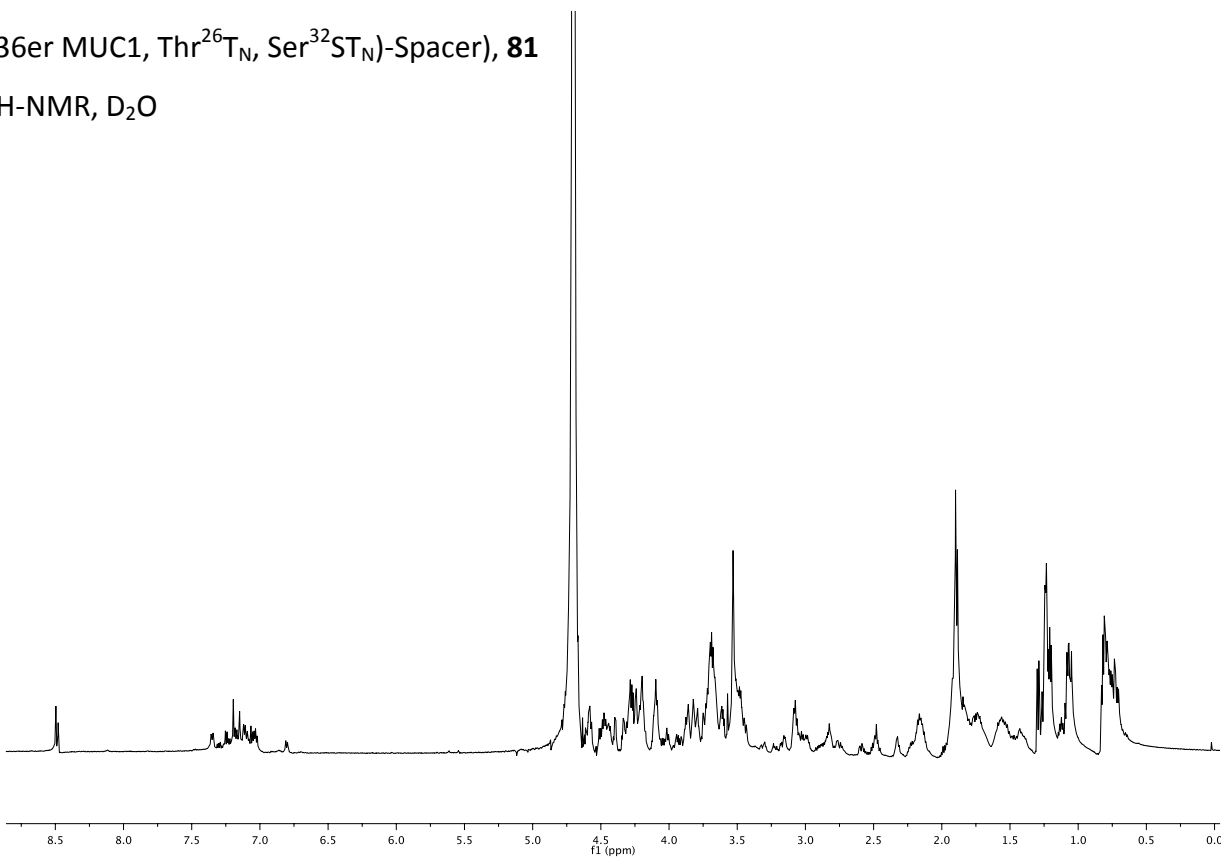
COSY, D<sub>2</sub>O, 77HSQC, D<sub>2</sub>O, 77

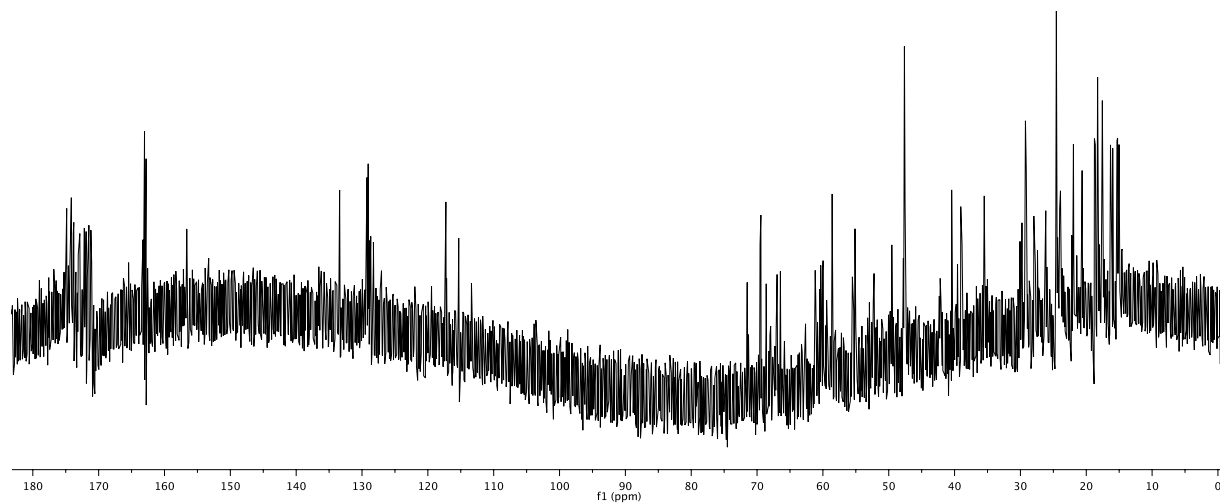
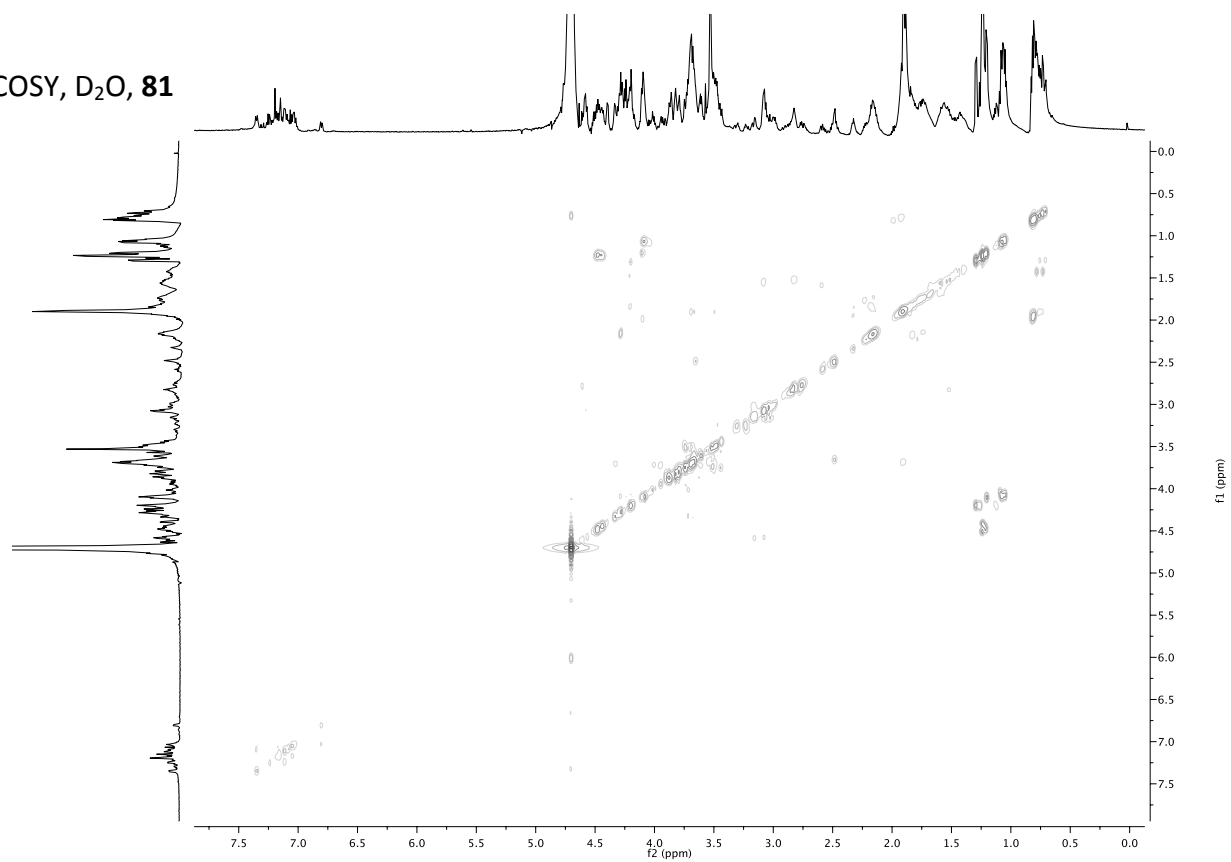


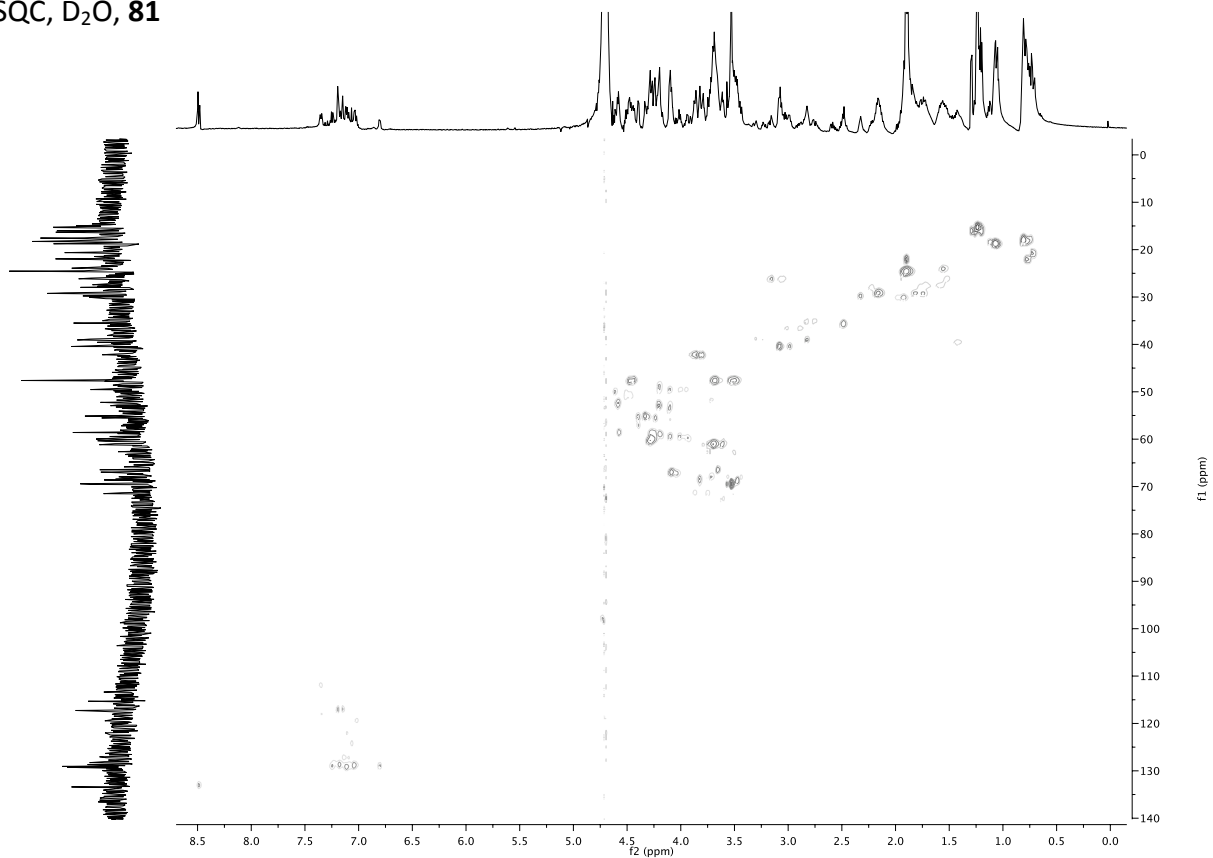
HMBC, D<sub>2</sub>O, 77

## ESI-MS, 77

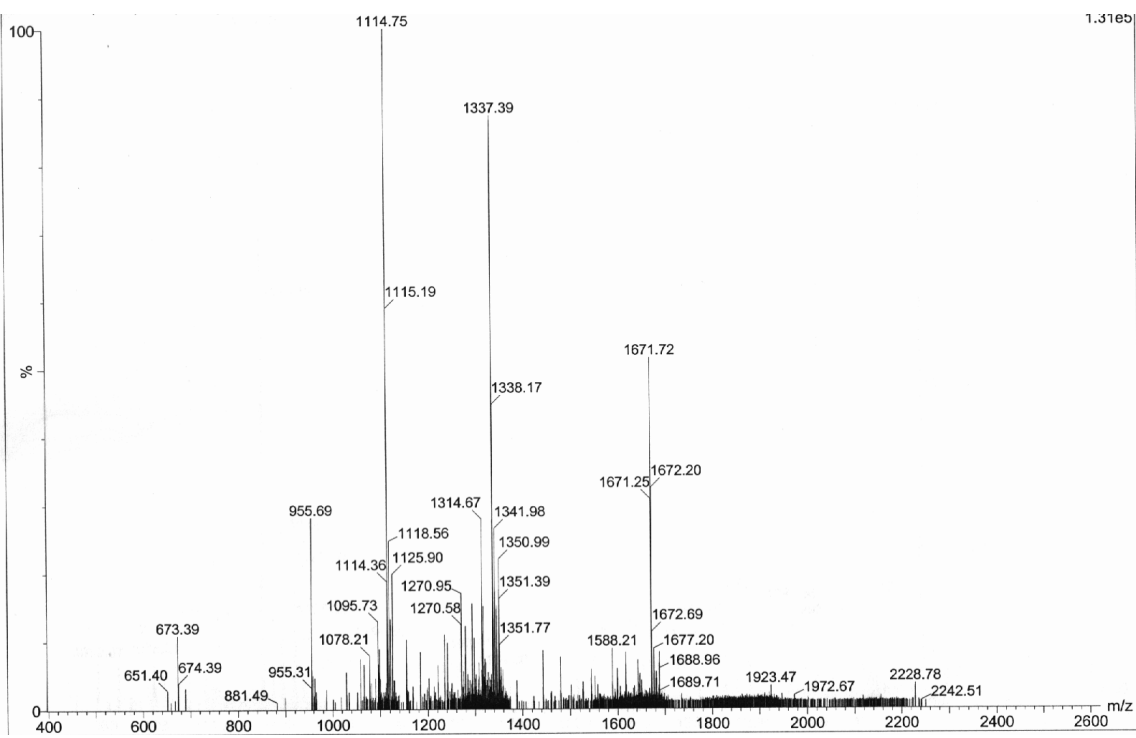


HR-ESI-MS, **77****(36er MUC1, Thr<sup>26</sup>T<sub>N</sub>, Ser<sup>32</sup>ST<sub>N</sub>)-Spacer), **81****<sup>1</sup>H-NMR, D<sub>2</sub>O

$^{13}\text{C}$ -NMR,  $\text{D}_2\text{O}$ , **81**COSY,  $\text{D}_2\text{O}$ , **81**

HSQC, D<sub>2</sub>O, 81

## ESI-MS, 81





## **Danksagung**









CURRICULUM VITAE

---



