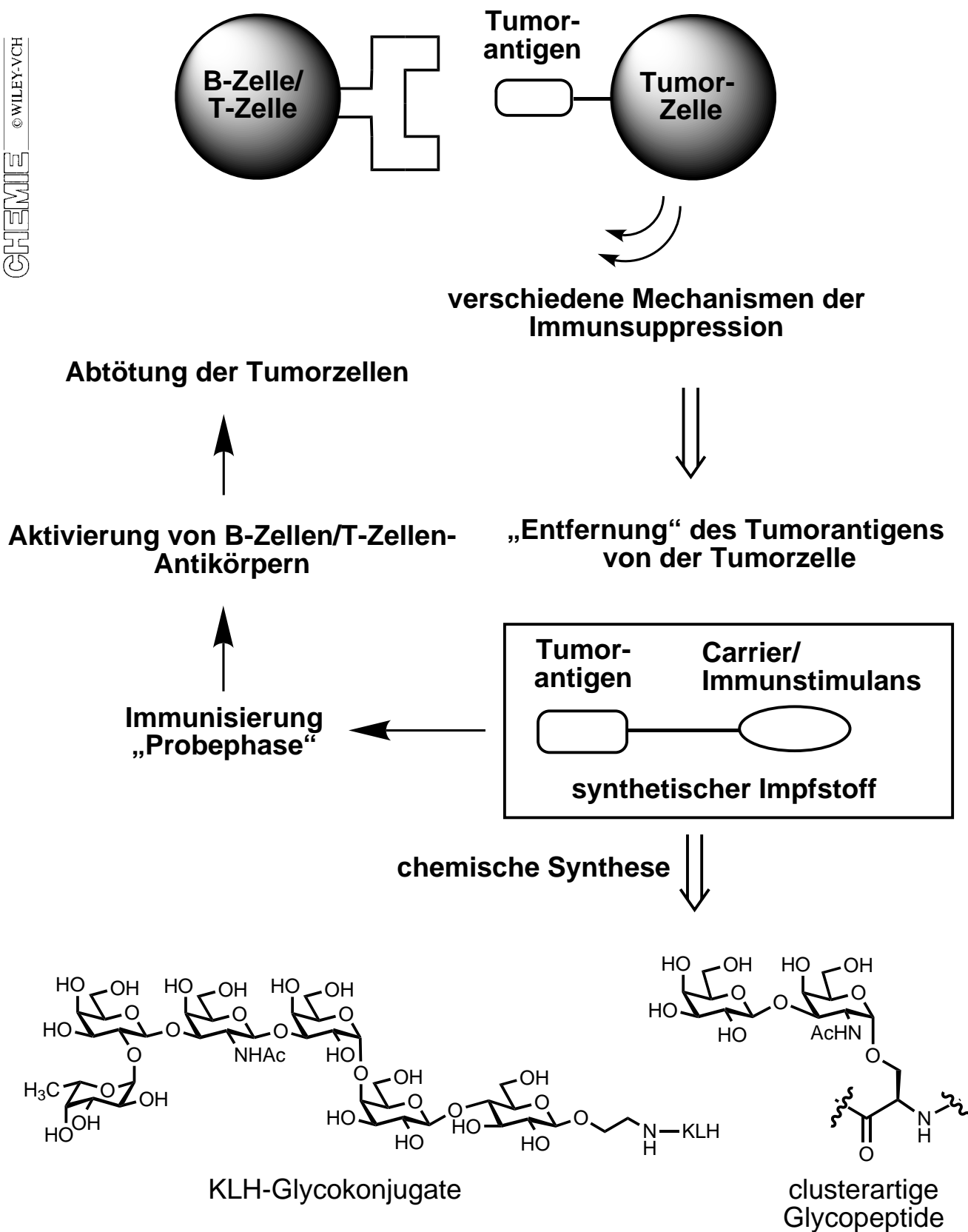


# Entwicklung von Antitumor-Impfstoffen auf Kohlenhydratbasis



# Vom Labor zur Klinik: vollsynthetische Antitumor-Impfstoffe auf Kohlenhydratbasis\*\*

Samuel J. Danishefsky\* und Jennifer R. Allen

*Dr. Paul Marks gewidmet*

Dieser Aufsatz gibt einen Überblick über die Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe zur Synthese von Oligosacchariden und Glykokonjugaten mit dem Ziel der Herstellung und Erprobung von Impfstoffen auf der Basis kohlenhydrathaltiger Tumorantigene. Unser Ausgangspunkt war die bekannte Tendenz transformierter Zellen, auf der Zelloberfläche vergleichsweise selektiv Kohlenhydratmotive in Form von Glycoproteinen oder Glycolipiden zu exprimieren. Angeregt wurden diese Untersuchungen dadurch, dass derartige Antitumor-Impfstoffe effektive Targets für Immunerkennung und -angriff sein könnten; es ist jedoch schwierig, ausreichende Substanzmengen aus natürlichen Quellen zu gewinnen. Nachdem die Totalsynthese tumorassoziierter Kohlenhydratantigene gelungen war, war im klinischen Umfeld zu klären, ob das menschliche

Immunsystem auf solche vollsynthetischen Antigene zielgerichtet und sinnvoll antworten kann. Dafür wurden die Ressourcen von Chemie und Immunologie zu einem gemeinsamen Angriff zusammengeführt. Die Synthese von tumorassozierten Kohlenhydratantigenen sowie die Immunkonjugation und die Ergebnisse der Impfung von Mäusen mit solchen Konstrukten werden beschrieben. Hierfür war die Konjugation an einen immunogenen Träger notwendig, wofür sich KLH-Konjugate als geeignet erwiesen. In präklinischen und klinischen Studien mit synthetischen Kohlenhydratkonjugaten als Impfstoffen ließ sich die Induktion einer IgM- und IgG-Antikörper-Reaktion zeigen. Eine andere Strategie bestand in der Verwendung von Glycopeptidclustern als Targets für den Immunangriff. Anfänglich richtete sich unsere Aufmerksamkeit auf

mucinähnliche, O-glycosidisch gebundene Glycopeptide. Synthetische trimere Cluster von Glycoepitopen, die sich von den Tn-, TF- und Le<sup>x</sup>-Antigenen ableiteten, erwiesen sich nach geeigneter Biokonjugation als immunogen. Die Hoffnung ist, dass Patienten, die mit den synthetischen Kohlenhydrat-Impfstoffen in Kombination mit einem Adjuvans immunisiert werden, Antikörper gegen Tumorzellen produzieren und dass die Produktion solcher Antikörper der Ausbreitung des Tumors entgegenwirkt, wodurch die Überlebenschancen und die Prognose für die „Lebensqualität“ verbessert werden.

**Stichwörter:** Glykokonjugate • Impfstoffe • Kohlenhydrate • Tumorthherapie • Wirkstoff-Forschung

## 1. Einleitung

Das erste erfolgreiche Immunisierungsverfahren zum Schutz gegen Infektionskrankheiten wird Edward Jenner für die von ihm durchgeführte Kuhpocken-Impfung (1798) zuge-

schrieben (der auch verwendete Begriff „Vaccination“ leitet sich vom Lateinischen „vacca“ (Kuh) ab). Es dauerte allerdings noch fast 80 Jahre, bis die Mechanismen, die beim Phänomen der Immunität eine Rolle spielen, besser verstanden wurden. Dies ebnete dann den Weg für die Entwicklung moderner Impfstoffe durch Eulerich, Koch, Metchnikoff, Pasteur und von Behring, um nur einige zu nennen.<sup>[1]</sup> Ein Impfstoff zur Induktion einer Antitumor-Immunantwort ist eine lang gehegte Vision in der Medizin.<sup>[2]</sup> Im Unterschied zu klassischen Virus- oder Bakterien-Impfstoffen, die im Allgemeinen zum Schutz gegen künftige Infektionen eingesetzt werden, und konventionellen Tumorthapien, die auf das (chirurgische) Entfernen oder Abtöten bösartiger Zellen abzielen, werden Antitumor-Impfstoffe bislang als Behandlungsmethode gleich nach Entdeckung der Krankheit ange-

[\*] Prof. S. J. Danishefsky,<sup>[+]</sup> Dr. J. R. Allen  
Laboratory of Bioorganic Chemistry  
Sloan-Kettering Institute for Cancer Research  
1275 York Avenue, New York, NY 10021 (USA)  
Fax: (+1) 212-772-8691  
E-mail: s-danishefsky@ski.mskcc.org

[+] Weitere Adresse:  
Department of Chemistry, Columbia University  
Havemeyer Hall, New York, NY 10027 (USA)

[\*\*] Eine Liste häufig verwendeter Abkürzungen findet sich im Anhang.

sehen. Unser Schwerpunkt liegt auf der Entwicklung von Impfstrategien, die besser gegen Rezidive und Metastasierung schützen, wenn die Tumorbelastrung durch Operation, Bestrahlung oder Chemotherapie minimiert wurde.

Die Tumor-Immuntherapie gründet auf der Theorie, dass Tumore spezifische Antigene aufweisen, die erkannt werden können, wenn sie in geeigneter Weise durch ein intaktes Immunsystem präsentiert oder prozessiert werden. In unserem Labor entstand die Verbindung zu diesem Themenkomplex, weil sich bösartig entartete Zellen meist durch das Auftreten großer und ungewöhnlicher Oligosaccharidmotive auf der Zelloberfläche von den entsprechenden normalen Zellen unterscheiden.<sup>[3]</sup> Die entwicklungsbedingten Gründe für die Bildung dieser Oligosaccharidmuster werden noch nicht vollständig verstanden, das Endergebnis ist jedenfalls die Expression diskreter, an die Zelloberfläche gebundener Glycolipid- oder Glycoproteinkonjugate.<sup>[4]</sup> Methodische Fortschritte mit monoklonalen Antikörpern, in der Immunhistologie sowie in Synthese- und Strukturchemie ermöglichten die Charakterisierung von tumorassoziierten Antigenen auf Kohlenhydratbasis, woraus sich eine Reihe interessanter Strukturen ableiten ließ.<sup>[5]</sup> Das Auslösen einer aktiven Immunantwort mit Hilfe tumorassoziiierter Kohlenhydratkongjugate gegen Tumorzellen, die komplementäre Strukturen auf ihrer Oberfläche exprimieren, ist seitdem zentrales Anliegen vieler Untersuchungen gewesen, unsere eigenen Arbeiten eingeschlossen. Tatsächlich haben sich Kohlenhydratantigene,

wenn sie als kohärenter Impfstoff verabreicht wurden, als herausragende Zielstrukturen für Immunerkennung und Immunangriffe erwiesen.<sup>[6, 7]</sup>

## 2. Immunologische Aspekte

Tumorbelastrte Wirtsorganismen sind nicht in der Lage, bösartige Zellen abzustößen, nicht einmal in experimentell induzierten Tumormodellen im Tier, in denen die Tumorzellen ein nachweisbares Maß an Immunogenität aufweisen.<sup>[8]</sup> Gegen die Versuche einer Immuntherapie beim Menschen mit tumorassoziierten Antigenen kann ein grundsätzlicherer Einwand erhoben werden: Wie können Antigene eine effiziente Immunantwort induzieren, wenn die gleichen Antigene, exprimiert von der Krebszelle, eine solche nicht auslösen? Offensichtlich gibt es Strategien, durch die von Tumorzellen präsentierte Antigene vom Immunsystem als nicht fremd angesehen werden. Diese Mechanismen, die das Tumorstadium erleichtern, waren Gegenstand vieler Diskussionen und Untersuchungen.<sup>[9]</sup> In zahlreichen Veröffentlichungen wurde über Suppressionsmechanismen beim Wachstum immunogener Tumore berichtet, die zur Erklärung des Paradoxons des Tumorstadiums in immunkompetenten Wirtsorganismen dienen.<sup>[10]</sup> Außerdem wurde beschrieben, dass manche Tumore entscheidende Erkennungsmoleküle entweder nicht aufweisen oder sie in löslicher Form frei-

*Durch seine Talmudstudien wurde Samuel J. Danishefsky bereits in jungen Jahren mit den Prinzipien des logischen Denkens und der kritischen Analyse vertraut. Im College nahm er sich ein Beispiel an seinem älteren Bruder Isadore und begann, sich für Chemie zu interessieren. Nachdem er Einführungskurse für Organische Chemie von Raymond Brewster sowie von Louis und Mary Fieser besucht hatte, war er der Faszination dieses Fachgebiets erlegen. 1956 erhielt Danishefsky seinen B.Sc. an der Yeshiva University, New York, und promovierte bei Peter Yates an der Harvard University. Als NIH-Stipendiat war er 1961–1963 Postdoktorand bei Gilbert Stork an der Columbia University in New York. 1964 bis 1979 war er an der University of Pittsburgh tätig und war von 1980 bis 1993 Professor für Chemie an der Yale University, wo er von 1981 bis 1987 auch Chairman of the Department war. 1984 wurde er zum Eugene Higgins Professor ernannt, 1990 zum Sterling Professor. Danishefsky ist gegenwärtig Director of the Laboratory of Bioorganic Chemistry am Sloan-Kettering Institute for Cancer Research. Seit 1993 hat er auch eine Professur an der Columbia University inne. Zu seinen Forschungsinteressen gehören das Entwickeln von Synthesemethoden, die Totalsynthese cytotoxischer Naturstoffe und seit Neuestem vollsynthetische Tumorantigene auf Kohlenhydratbasis. Danishefsky ist Mitglied der National Academy of Science und teilte sich mit Gilbert Stork 1996 den Wolf Prize in Chemistry.*



S. J. Danishefsky



J. R. Allen

*Jennifer Allen, geb. Lowe, stammt aus Cleveland, Ohio. Sie erhielt ihren A.B. in Chemie 1992 an der Miami University in Oxford, Ohio, und ihren Ph.D. 1998 an der Duke University. Dort arbeitete sie unter Anleitung von Ned A. Porter über Synthese und Anwendungen von unsymmetrisch markierten Alkylhydroperoxiden, wobei der Schwerpunkt auf Untersuchungen zum Mechanismus der [2,3]-Allylperoxylumlagerung lag. Als Postdoktorandin bei Professor Danishefsky beschäftigt sie sich zurzeit mit der Entwicklung neuer Antitumor-Impfstoffe auf Kohlenhydratbasis. Zu ihren Forschungsinteressen gehören Glycosidumlagerungen für die Herstellung von Glycosiden, Glykokongjugaten und Glycomimetika sowie Untersuchungen biologischer Vorgänge, an denen Kohlenhydrate beteiligt sind.*

setzen, was in jedem Fall einen Selektionsvorteil für die Tumorzellen bedeutet.<sup>[11]</sup> Ziel bei der Entwicklung von Antitumor-Impfstoffen ist, die Toleranz des Immunsystems gegenüber Antigenen, die hauptsächlich oder ausschließlich vom Tumor exprimiert werden, zu brechen. Daher verdient der Vorschlag, synthetisch hergestellte, zellfreie Glycokonjugate als immunstimulierende Antigene bei der Entwicklung von Antitumor-Impfstoffen zu verwenden, intensive Untersuchung.

Die Entwicklung immer wirksamerer Impfstoffe erfordert anschließende Testmethoden zur Bestimmung der Immunogenität. Dies dient dazu, den Prozess der Impfstoffsynthese und -prüfung zu steuern. Mit der Entwicklung serologischer Typisierungssysteme zur Definition von Zelloberflächenantigenen verfügen die Immunologen nun über Tests mit der erforderlichen Empfindlichkeit und Spezifität, ähnlich denen zur Überprüfung von Impfstoffen gegen Infektionskrankheiten.<sup>[12]</sup> Wenn effektive Testsysteme auf T-Lymphocyten-Reaktionen gegenwärtig auch noch einen Rückstand aufweisen, kann durch sie doch vielleicht bald die Weiterentwicklung T-Zell-responsiver Antigene bewertet werden. So kann mit gut definierten Tumorantigenen, deren Struktur und deren quantifizierbare Expressionshöhe auf Tumoren und auf normalen Zellen *in vivo* bekannt ist, Immunogenität für Antitumor-Impfstoffe erreicht werden.

Es gibt Gründe für Optimismus, aber auch für Vorsicht beim Gebrauch von Antitumor-Impfstoffen, die Kohlenhydratantigene als Hauptstimulantien enthalten. Mit Impfstoffen auf Kohlenhydratbasis konnte bislang keine nachweisbare T-Zell-Immunität induziert werden. Will man sich in der Immuntherapie von Krebs also ganz auf Kohlenhydratantigene verlassen, kann sich dies als Hindernis erweisen.

Im Allgemeinen ist die Immunantwort gegen Kohlenhydratantigene weitgehend auf die Induktion von Antikörpern beschränkt. Diese können einen Weg zur Abtötung von zirkulierenden Tumorzellen (im Blut) und von Mikrometastasen eröffnen und so Schutz vor Rezidiven bieten. Der Schutzmechanismus verläuft möglicherweise über komplementvermittelten Angriff und Lyse der Zellen, wobei die Kohlenhydratantigene an der Zelloberfläche als Zielstrukturen dienen. Es sind aber auch andere Mechanismen denkbar. Versuche mit monoklonalen Antikörpern gegen Kohlenhydratantigene sprechen für diesen Mechanismus, und Behandlungen im Mausmodell sind bei dem Punkt angelangt, an dem Mikrometastasen offensichtlich eliminiert werden können.<sup>[13]</sup> Auch Tumorpatienten haben in klinischen Studien positiv auf natürliche oder passiv verabreichte Antikörper reagiert, was sich in einer verlängerten rezidivfreien Zeit und einer verbesserten Prognose niederschlug.<sup>[14]</sup> Wenn das wiederholte Auftreten von Metastasen, bedingt durch einen hohen Titer an zirkulierenden Antikörpern, in einem günstigen Umfeld kontrollierbar minimiert wird, könnten aggressive lokale Therapien und eine anschließende Impfung eine lang anhaltende Kontrolle auch metastasierender Tumore ermöglichen. Es gibt ganz offensichtlich ein Anwendungspotential für die Immuntherapie von Tumoren mit monoklonalen Antikörpern.<sup>[15]</sup>

Es gibt einen anderen Umstand beim Einsatz von Tumorantigenen auf Kohlenhydratbasis als Antitumor-Impfstoffe,

der potentiell Komplikationen auslösen kann. Tumor- und normale Zellen exprimieren in Zellkulturen im Allgemeinen nur minimale Mengen solcher Antigene. Die gewaltigen Probleme, die bei ihrer Reinigung aus ganzen Zellen bestehen, machen sie als homogenes Ausgangsmaterial für eine klinische Studie im Grunde unzugänglich. Folglich fällt den organischen Chemikern eine Schlüsselrolle bei der Entwicklung solcher Antitumor-Impfstoffe zu. Zunächst muss der Synthesechemiker Probleme bezüglich Reinheit und Verfügbarkeit einer Substanz lösen, damit die Untersuchung überhaupt eine Chance hat, in klinische Phasen vorzudringen. Außerdem muss die Chemie die Hauptrolle bei der Konjugation übernehmen, die für die Weiterentwicklung eines Antigens zum Impfstoff entscheidend ist. Obwohl die meisten Tumorantigene, darunter auch die Kohlenhydratantigene, eine minimale Aktivität zeigen, sind sie im Allgemeinen schlechte Immunogene. Für die optimale Immunantwort benötigen sie einen geeigneten immunogenen Träger.<sup>[16]</sup> Es ist also eine zusätzliche Herausforderung an die Strategie, synthetische Tumorantigene erfolgreich in einem günstigen molekularen Umfeld zu verabreichen, um eine therapeutisch nutzbare Immunantwort zu induzieren. Insgesamt schien es eine breite Basis für die Untersuchung von Impfstoffen auf Kohlenhydratantigenbasis zu geben, um die Produktion von Antikörpern in einer klinischen Anwendung zu fördern.

Unsere Arbeitsgruppe befasst sich seit einiger Zeit mit der Synthese komplexer Oligosaccharide und Glycokonjugate. Neben der zuvor erwähnten Rolle als Tumorantigene können Kohlenhydrate viele biologische Abläufe beeinflussen. Sie vermitteln zahlreiche Funktionen, darunter Entzündungen, die Kontrolle von Wachstum und Differenzierung sowie Zell-Zell-Adhäsion,<sup>[17]</sup> und sind außerdem Determinanten für die Blutgruppentypisierung.<sup>[18]</sup> Aus diesen Gründen und mit unseren Kenntnissen der Synthese komplexer Kohlenhydrate war der nächste logische Schritt für uns, die Totalsynthese von Antigenen auf Kohlenhydratbasis als Teil eines größeren Impfstoff-Forschungsprojekts zu untersuchen. Dabei legten wir den Schwerpunkt auf die Synthese solcher Impfstoffe, die aus natürlichen Quellen oder mit anderen Methoden nicht verfügbar waren.

Am Sloan-Kettering Institute arbeitet unsere Gruppe intensiv mit dem Laboratory for Tumor Vaccinology und dem Laboratory for Tumor Antigen Immunochimie zusammen und ist eng an verschiedene klinische Einrichtungen im Hospital of the Memorial Sloan-Kettering Cancer Center (MSKCC) angeschlossen. In diesem Aufsatz berichten wir über unsere laufenden chemischen Untersuchungen zur Entwicklung allgemein einsetzbarer Synthesemethoden zur Herstellung von Kohlenhydraten als Teil von Glycolipiden und Glycopeptiden, die Bestandteile der Zelloberfläche von Tumorzellen nachahmen. Bei diesen Arbeiten konnten wir zahlreiche Impfstoffkonstrukte mit tumorassoziierten Antigenen herstellen, die klinisch validiert wurden und zurzeit am Menschen getestet werden (Abbildung 1). Wir möchten betonen, dass dieser Aufsatz nicht als vollständige Abhandlung über dieses große Gebiet gedacht ist. Er soll vielmehr als Rückblick auf unsere eigenen Arbeiten verstanden werden, wobei der Akzent nicht nur auf der Chemie liegt, die im Zentrum unserer Arbeiten stand, sondern auch auf der Art,

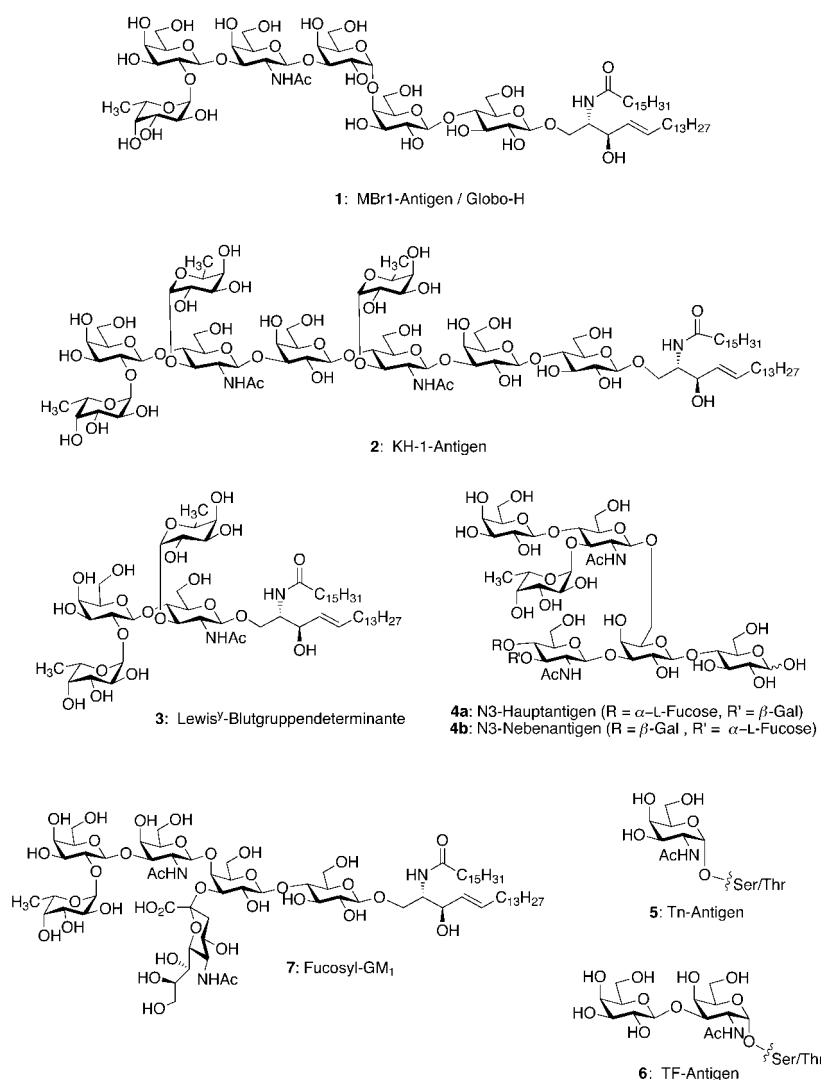


Abbildung 1. Strukturen tumorassoziierter Antigene, die in diesem Aufsatz beschrieben werden.

wie die Chemie mit Nachbardisziplinen verknüpft wurde, um das ganze Projekt voranzutreiben. Auch andere Gruppen arbeiten gegenwärtig in der gleichen Richtung mit synthetischen Konjugaten, und wir verweisen den Leser auf Zusammenfassungen ihrer wichtigen Untersuchungen.<sup>[19, 96, 97]</sup>

Wir beschreiben hier die Synthese und immunologische Evaluierung von Neoglykokonjugaten, die folgende Antigene enthalten: das MBr1-Antigen Globo-H **1**, das Adenocarcinom-KH-1-Antigen **2**, die Blutgruppenderminante Lewis<sup>x</sup> **3** (gleichzeitig Ovarialtumor-Antigen), die N3-Haupt- und Nebenantigene **4a** bzw. **4b**, die mit Magen- und Darmtumoren assoziiert sind, und das Antigen Fucosyl-GM<sub>1</sub> **7** des kleinzelligen Lungencarcinoms. Außerdem haben wir in Gruppen („Clustern“) auftretende, mit Mucin verwandte Strukturen der O-glycosidisch gebundenen Antigene Lewis<sup>x</sup>, Tn **5** und TF **6** untersucht. Alle Impfstoffkonstrukte, über die wir hier berichten, wurden in geeigneter biokonjugierbarer Form synthetisiert und in sorgfältigen Immunisierungsexperimenten an Mäusen getestet. Dies mündete in eine klinische Bewertung von drei unserer vollsynthetischen Impfstoffe (Globo-H in Prostata- und Brustkrebs-Studien, Le<sup>x</sup>-KLH-

Konjugate in Ovarialkrebs-Studien und clusterartige O-glycosidisch gebundene Tn/TF-Mucinmodelle in Prostatakrebs-Studien). Für das Globo-H-KLH-Konjugat steht die Entscheidung für die klinischen Phasen II und III (klinische Erprobung am Menschen) an. Die Entwicklungsgeschichte dieser Konstrukte wird beschrieben beginnend mit dem Entwurf am Reißbrett über die Laborentwicklung, die Charakterisierung der immunologischen Eigenschaften bis zur Impfung von Mäusen; sie endet im günstigsten Fall bei ersten klinischen Versuchen. Die Strukturen, bei denen man dann angelangt ist, sind die komplexesten vollsynthetischen Konstrukte, die je klinisch erprobt worden sind.

### 3. Präparative Aspekte

Die chemische Synthese ist eine sehr praxisnahe Disziplin, bei der es vor allem auf Geradlinigkeit und Effizienz ankommt. Die besten Synthesen sind daher diejenigen, die diese Zielvorstellungen am erfolgreichsten umsetzen. Während wir an unserem Projekt arbeiteten, suchten wir jedoch gleichzeitig nach einem einheitlichen Rahmen, in dem wir unsere Vorstellungen organisieren konnten. Wir wandten uns daher der Konjugatbildung mit Glycalen zu, die wir über viele Jahre in unserem Labor entwickelt hatten. Details der Methode sind ausführlich beschrieben worden,<sup>[20]</sup> daher werden wir den Gegenstand in diesem Aufsatz außer in den Reaktionsschemata nicht weiter verfolgen.

Mehrere Aspekte bedürfen einer besonderen Erwähnung, wenn man die Synthese komplexer Glykokonjugate mit Substrukturen wie den in Abbildung 1 gezeigten betrachtet. Im Hinblick auf eine ökonomische Synthese sollte man sich um den sparsamen Einsatz von Schutzgruppen bemühen, die die traditionellen Synthesen komplexer verzweigter Oligosaccharide dominieren. Dazu konnten wir die Glycalbausteine zu unserem großen Vorteil einsetzen, um schnell die Oligosaccharide der Tumorantigene auf Kohlenhydratbasis aufzubauen.

Ein anderes wichtiges Element für das Impfstoff-Projekt war, eine Linkerdomäne mit einem Spacer herzustellen, um ein funktionelles Immunogen zu erhalten. Als Nächstes müsste die Anbindung eines geeigneten Immunstimulans an das Kohlenhydrat folgen. Es ist zwar bis heute keine optimale Kombination zwischen Spacer und Verbindungsdomäne erarbeitet worden; die Zielvorstellung ist jedoch, dass die molekulare Erkennung des synthetischen Tumorantigens durch das Immunsystem nicht durch die Konjugation der Kohlenhydratdomäne mit einem effektiven biologischen Trägermolekül verwässert wird.<sup>[21]</sup> Vor diesem Hintergrund

begannen wir mit Untersuchungen, das Kohlenhydratantigen an ein geeignetes Trägerprotein, z. B. an das Hämocyanin der Schlüssellock-Napfschnecke (keyhole limpet hemocyanin, KLH), zu binden. Bei unserer Konjugationsstrategie richteten wir uns nach der Vorschrift von Bernstein und Hall;<sup>[22]</sup> diese beruht auf der reduktiven Kupplung eines Glycosids, das eine endständige Glycoaldehydeinheit enthält, mit dem gewünschten Trägerprotein, bevorzugt über die  $\epsilon$ -Aminogruppen exponierter Lysinreste. Für einen fortgeschrittenen Synthesepfad fassten wir die Möglichkeit ins Auge, die Antigene über entsprechende Peptidkupplungen zu „Clustern“ zusammenzufügen, um so mucinähnliche Strukturen zu erzeugen.<sup>[23]</sup> Eine allgemeine Methode zur Lösung der stereochemischen Probleme, die beim Aufbau von  $\alpha$ -Serin/Threonin-O-glycosidisch gebundenen Oligosacchariden entstehen, wurde praxistauglich mit Hilfe eines „Kassetten-Ansatzes“ entwickelt (siehe Abschnitt 9). Mit den Glycopeptiden untersuchten wir auch verschiedene immunstimulatorische Reste, um die Konjugation des komplexen Konstrukts an ein Trägerprotein zu umgehen.

Die präklinischen Ziele zu Beginn des Impfstoffprojekts bei den verschiedenen untersuchten Tumorantigenen waren somit die folgenden:

- Totalsynthese des gewünschten Tumorantigens, chemischer Nachweis von Struktur und Einheitlichkeit und, wenn nötig, Synthese von relevanten verkürzten Varianten als Sonden für die Epitop-Spezifität.
- Einbau einer geeigneten Spacergruppe, sodass die immunologische Integrität des Antigens erhalten bleibt.
- Kovalente Bindung an ein Immunstimulans oder ein Trägerprotein, um einen voll funktionsfähigen Impfstoff zu erhalten.
- Immunisierung von Mäusen und nachfolgende Bewertung der Immunantwort.

Ein Antrag auf klinische Studien am Menschen ist erst nach Erreichen dieser Ziele möglich. Wie die Synthesestrategie mit Glycalbausteinen mit diesen Strategien und Zielen zusammengeführt wurde, ist exemplarisch in Abbildung 2 dargestellt.

## 4. Das Lewis<sup>x</sup>-KLH-Glycokonjugat

### 4.1. Synthese des Lewis<sup>x</sup>-KLH-Glycokonjugats

1995 veröffentlichten wir unsere Synthese der Neoglycokonjugate der Lewis<sup>x</sup>- (Le<sup>x</sup>-) und Le<sup>b</sup>-Blutgruppenderterminanten und der Oligosaccharide der H-Typen I und II.<sup>[24]</sup> Die Le<sup>x</sup>-Determinante war für uns von besonderer Bedeutung, weil sie bereits zuvor als wichtiges Epitop identifiziert worden war, um die Antikörperbildung gegen Dickdarm- und Lebercarcinome zu verstärken.<sup>[25]</sup> Sie wurde auch kürzlich als

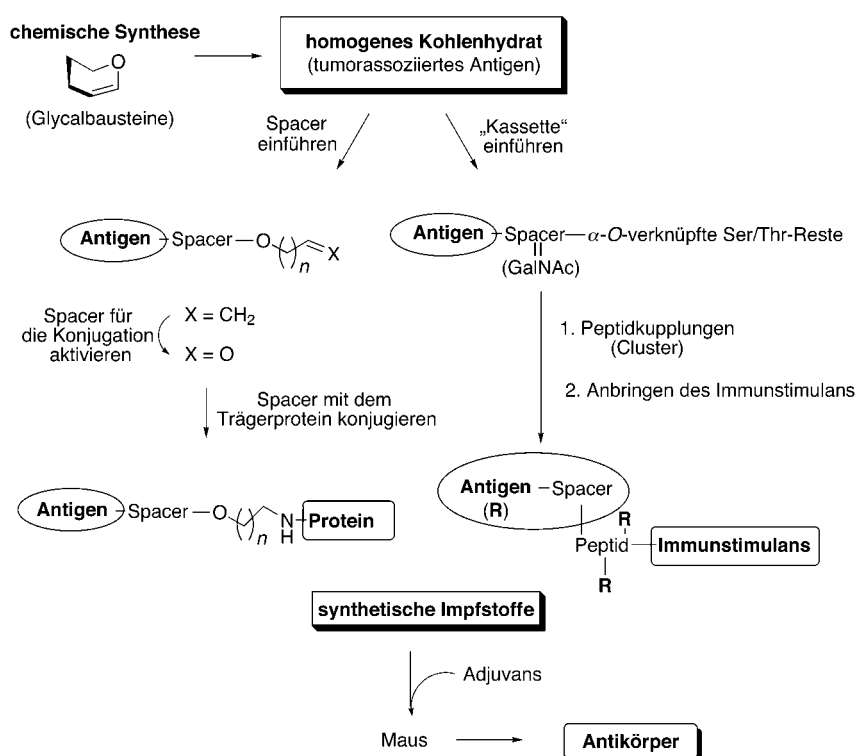
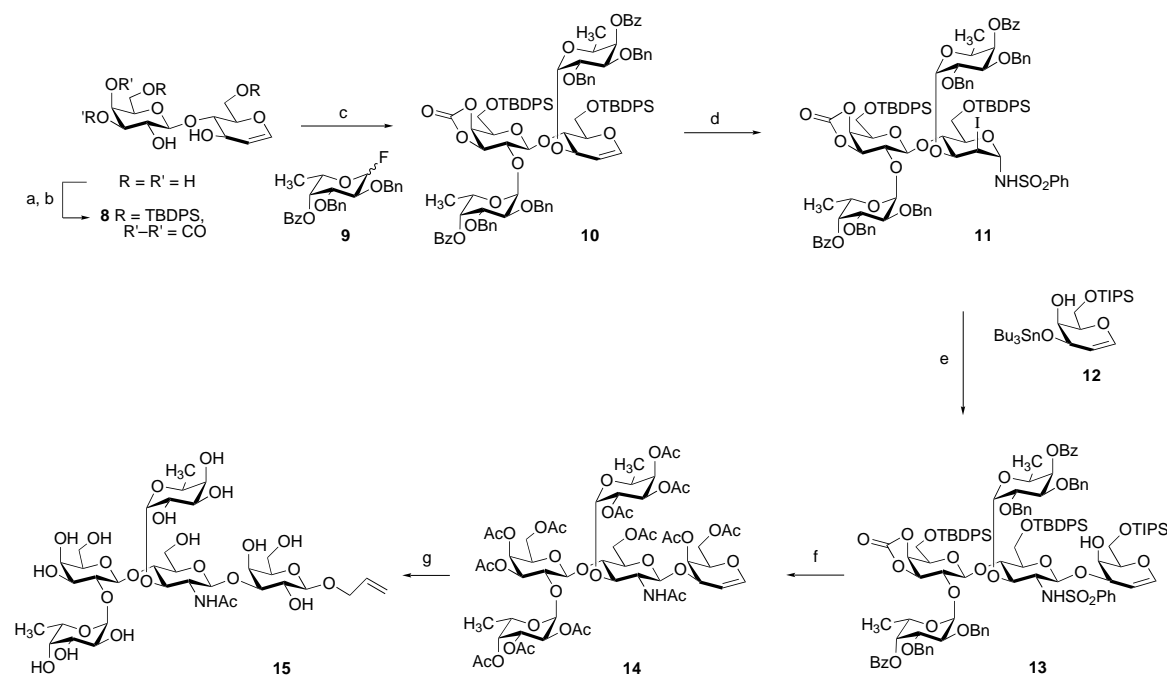


Abbildung 2. Allgemeines Verfahren zur Gewinnung synthetischer Kohlenhydratimpfstoffe.

Marker für metastasierenden Prostatakrebs in die Diskussion gebracht und wurde überexprimiert in Ovarialcarcinomen gefunden.<sup>[26]</sup>

Nach dem oben beschriebenen Vorgehen war das erste Ziel, eine biokonjugierbare Vorstufe des Le<sup>x</sup>-Epitops **3** (Abbildung 1) zum Einbau in einen einheitlichen Impfstoff zu synthetisieren. Die erfolgreiche Ausarbeitung der Synthese von Le<sup>x</sup> und ihre Vereinfachung, um sie praktikabel zu machen, waren entscheidend auf dem Weg zu künftigen Impfstoffkonstrukten. Außerdem dient sie als Leitmotiv für die Anwendung der Glycalmethode bei der Konjugation.

Das Pentasaccharid mit der Le<sup>x</sup>-Spezifität wurde gemäß Schema 1 hergestellt. Bei der Synthese wurde das *N*-Acetyl-lactosamin-Rückgrat der Zielstruktur genutzt. Das leicht zugängliche Lactal<sup>[27]</sup> wurde an den beiden primären Hydroxygruppen silyliert. Nach diesem selektiven Schutz wurde an den Positionen *cis*-C3',C4' ein cyclisches Carbonat gebildet ( $\rightarrow 7$ ). Dadurch wurden die Hydroxygruppen an C3 und C2' exponiert, was für den Verlauf dieser Synthese von besonderer Bedeutung war. So waren nun nämlich die Grundlagen für die Bisfucosylierung von **7** geschaffen, wodurch der Zugang zur Tetrasaccharid-Einheit von Le<sup>x</sup> eröffnet wurde. In diesem Fall wurde der Acceptor **7** mit dem Fluoronor **9**<sup>[28]</sup> bisfucosyliert,<sup>[29]</sup> wodurch das Le<sup>x</sup>-Tetrasaccharid als Glycal **10** anfiel. Durch das Zusammenspiel der unbeteiligten Benzylethergruppe an C2 und eines potentiell beteiligten Benzoatrests an C4 des Donors **9** kam die notwendige  $\alpha$ -Selektivität zustande. Als Nächstes wurde die Glycal-Funktionalität nach unserem zuvor entwickelten Iodsulfonamidierungs-Verfahren (siehe Verbindung **11**) für eine Reaktion als Azaglycosylierungsdonor<sup>[30]</sup> vorbereitet. Mit Iodsulfonamid und Silbertetrafluoroborat konnte das Galactal **12** an der Zinnethergruppe

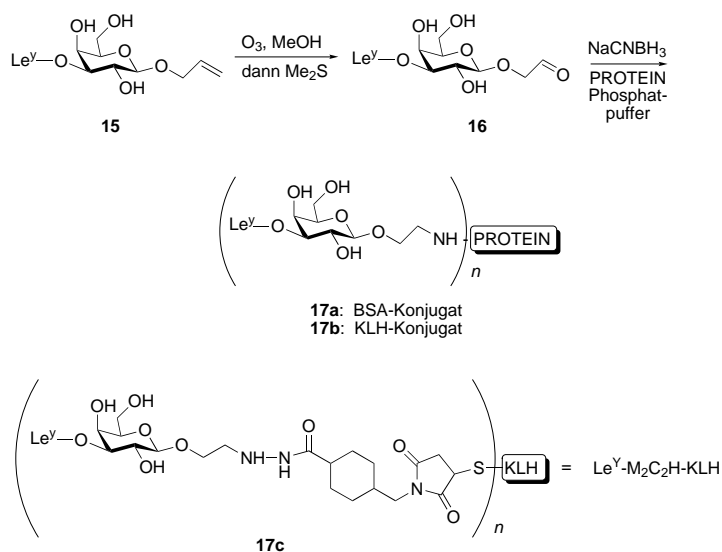


Schema 1. Synthese des Lewis<sup>x</sup>-Allylglycosids. a) TBDPSCl, Imidazol, DMF, 84 %; b) Carbonyldiimidazol, THF, 58 %; c) AgClO<sub>4</sub>, SnCl<sub>2</sub>, DTBP, Et<sub>2</sub>O, 51 %; d) PhSO<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>, I(coll)<sub>2</sub>ClO<sub>4</sub>, 99 %; e) AgBF<sub>4</sub>, THF, 75 %; f) 1. TBAF, THF; 2. Na/NH<sub>3</sub>, MeOH; 3. Ac<sub>2</sub>O, Pyridin, 37 %; g) 1. DMDO, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>; 2. Allylalkohol, ZnCl<sub>2</sub>, THF; 3. NaOMe, MeOH, 72 %; 3 Stufen.

glycosyliert werden, wodurch das Pentasaccharid-Glycal **13** entstand; dadurch wurde gleichzeitig die gewünschte Amino-Gruppe und  $\beta$ -Selektivität durch die Reaktion mit dem Galactalacceptor bereitgestellt. Durch Abspaltung aller Schutzgruppen und anschließende Peracetylierung entstand das Peracetylderivat **14**. Diese Verbindung stellte sich als äußerst wertvolles Zwischenprodukt heraus, ganz abgesehen von seiner Rolle als Vorstufe von **15**.

Nachdem das Glycal **14** verfügbar war, wurden die notwendigen Reaktionen für die Konjugation an Trägerproteine durchgeführt. Die Reaktion von **14** mit Dimethyldioxiran<sup>[31]</sup> und anschließende Öffnung des entstandenen Epoxidrings mit Allylalkohol lieferte selektiv das gewünschte Allylglycosid. Nach Entfernung der Esterschutzgruppen mit katalytischen Mengen an Natriummethoxid gelangte man zum vollständig ungeschützten Le<sup>y</sup>-Pentasaccharid **15**, das nunmehr bereit für die Konjugationsphase war. Hierfür wurde **15** bei  $-78^{\circ}\text{C}$  in Methanol ozonolysiert und mit Dimethylsulfid zu dem uncharakterisierten Aldehyd-Zwischenprodukt **16** umgesetzt (Schema 2).

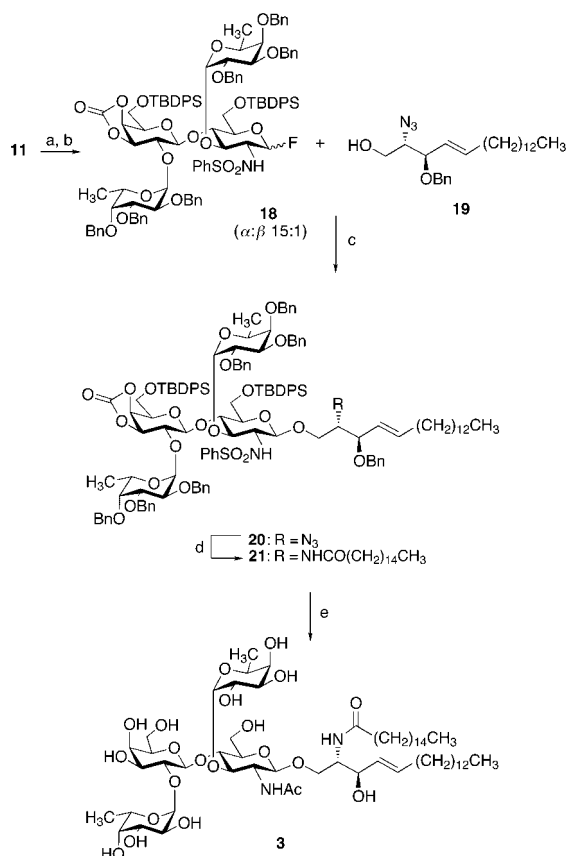
Wie bereits zuvor erwähnt, wurde die Methode der reduktiven Aminierung nach Bernstein und Hall<sup>[22]</sup> hier zuerst auf die Kupplung mit Rinderserumalbumin (BSA) in Phosphatpuffer (pH 8.0) angewandt. Dabei entstand das Proteinkonjugat **17a**, das durch erschöpfende Dialyse gereinigt wurde. Die auf eine Spaltung der Glycosidbindungen mit TFA folgende Analyse<sup>[32]</sup> ergab die erwartete Zuckerzusammensetzung: Zwei Anteile Galactose, zwei Anteile Fucose und ein Anteil Glucosamin. Die Bestimmung des Kohlenhydrat:Protein-Verhältnisses ergab, dass auf ein Trägermolekül im Durchschnitt 15 Le<sup>y</sup>-Reste entfallen. Nachfolgende Untersuchungen mit KLH als Trägerprotein (siehe **17b**) und einer analogen reduktiven Aminierung führten zu Glycokon-



Schema 2. Konjugation des Allylglycosids **15** an KLH.

jugaten mit durchschnittlich 287 Le<sup>y</sup>-Molekülen pro KLH-Molekül.

Um die Totalsynthese des Glycolipids zu vervollständigen, wurde auch das ceramidgebundene Glycokonjugat des Le<sup>y</sup>-Epitops hergestellt. Dazu wurde das Iodulfonamid **11** in zwei Stufen in den Fluordonor **18** überführt ( $\alpha:\beta = 15:1$ ; Schema 3).<sup>[33]</sup> Dieser Donor wurde mit **19**, der wohlbekannten Azidosphingosin-Vorstufe,<sup>[34]</sup> unter Verwendung eines gemischten Metallkatalysatorsystems aus Zirconocendichlorid und Silbertriflat zum Le<sup>y</sup>-Sphingosin **20** gekuppelt. Anschließend wurde die Azidogruppe reduziert und die Ceramid-Einheit mit Palmitinsäureanhydrid eingeführt; es entstand,



Schema 3. Synthese des Sphingoglycolipids Lewis<sup>x</sup> **3**. a) THF/H<sub>2</sub>O, TEA, Ag<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>; b) DAST, THF; c) [Cp<sub>2</sub>ZrCl<sub>2</sub>], AgOTf, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 57%; d) H<sub>2</sub>/Lindlar-Katalysator, Palmitoylanhydrid, 22%; e) 1. TBAF, THF; 2. Na/NH<sub>3</sub>; MeOH; 3. Ac<sub>2</sub>O, Pyridin; 4. NaOMe, MeOH.

wenn auch in niedriger Ausbeute, das Amin **21**. Andere Bedingungen zur Reduktion der Azidogruppe dieser Verbindung können noch getestet werden, doch wird man mit ähnlichen Bedingungen bei anderen Oligosacchariden wahrscheinlich ebenfalls Erfolg haben. Die Abspaltung aller Schutzgruppen aus **21** wie oben beschrieben führte zum bekannten Le<sup>y</sup>-Glycolipid-Konjugat **3**.

Nach der erfolgreichen Synthese der Le<sup>y</sup>-Konstrukte **17a**, **17b** und **3** begann unsere Zusammenarbeit mit den Immunologen, und der Weg war frei für weitere Synthesen antigener Glykokonjugate. Außerdem wurde in Verbindung mit den beschriebenen Untersuchungen die Synthese und Biokonjugation eines Lewis<sup>b</sup>-Hexasaccharids mit einer analogen Methode vollendet.<sup>[24]</sup> Mit diesen Synthesen war nun gezeigt worden, dass wir mit den Glycal-Kupplungsmethoden ausreichende Verfahren für die Konjugation von Proteinen mit Kohlenhydraten zur Verfügung hatten (siehe Schema 2).

## 4.2. Immunisierung von Mäusen mit vollsynthetischem Le<sup>y</sup>-KLH

Mit Blick auf die Entwicklung von Impfstoffen auf Le<sup>y</sup>-Basis untersuchten wir die Immunogenität der Le<sup>y</sup>-Konjugate in Mäusen. Damit wollten wir verschiedene Fragen angehen. Von Interesse war zunächst die Produktion von Antikörpern

als direkte Folge der Immunisierung. Entscheidend war, ob die so induzierten Antikörper auch an Tumorzelllinien binden würden, die das Le<sup>y</sup>-Epitop exprimieren. Die Auslösung der Lyse solcher Tumorzellen wäre ebenfalls von großer Bedeutung, denn sie würde einen wichtigen Ausgangspunkt für Versuche am Menschen darstellen. Die entscheidende Kontrolle ist natürlich der Nachweis, dass die induzierten Antikörper nicht mit Le<sup>y</sup>-negativen Zelllinien und anderen Kontrollen reagieren. Die Ergebnisse der Immunisierung von Mäusen sind weiter unten zusammengefasst.<sup>[35]</sup> Wie in all unseren Untersuchungen wurden die Impfstoffe zusammen mit dem immunologischen Adjuvans QS-21 verabreicht.<sup>[36]</sup>

Zusätzlich zu den synthetischen Konjugaten **17a** und **17b** wurde in einer ähnlichen Synthese<sup>[37]</sup> das Maleinimidyl-derivatisierte KLH-Konjugat **17c** hergestellt (siehe Schema 2). Die Immunisierung von Gruppen von Mäusen mit den drei Konjugaten zusammen mit dem Adjuvans QS-21 ergab, dass das direkt an KLH gebundene Le<sup>y</sup>-Oligosaccharid **17b** am effizientesten IgG- und IgM-Antikörper-Reaktionen gegen die natürlichen Formen der Le<sup>y</sup>-Epitope auf Mucinen und Glycolipiden induzierte.<sup>[38]</sup> Mit einem Immunassay (ELISA) wurde nachgewiesen, dass die IgM-Titer typischerweise viel höher waren als die IgG-Titer. Die Antiseren, die nach der Immunisierung mit **17b** gewonnen wurden, wurden auch mit einem Immun-Adhärenztest auf ihre Reaktivität mit Le<sup>y</sup>-exprimierenden Tumorzellen untersucht. Dabei ergab sich, dass die Antiseren der mit Le<sup>y</sup>-KLH immunisierten Mäuse stark an Le<sup>y</sup>-positive Zelllinien (MCF-7) binden, nicht aber an Le<sup>y</sup>-negative Zellen (SK-MEL-28).

Cytotoxizitätstests auf antikörperabhängige, komplement-vermittelte Lyse wurden ebenfalls durchgeführt; die Ergebnisse sind in Tabelle 1 zusammengestellt. Auch hier wurden komplementbindende Antikörper (hauptsächlich IgM) mit Immunadhärenztests nachgewiesen, die sich im Folgenden in Gegenwart von humanem Komplement als cytotoxisch gegen Le<sup>y</sup>-positive MCF-7-Zelllinien erwiesen. Demgegenüber waren sie nicht cytotoxisch gegen SK-MEL-28-Zelllinien.

Tabelle 1. Cytotoxizitätstest von Antiseren an Zellkulturen.

Antikörper oder Antiserum	MCF-7 <sup>[a]</sup> (Le <sup>y</sup> +)	SK-MEL-28 <sup>[a]</sup> (Le <sup>y</sup> -)
Maus 1 (Le <sup>y</sup> -KLH)	1:80	< 1:10
Maus 2 (Le <sup>y</sup> -KLH)	1:40	< 1:10
Maus 3 (Le <sup>y</sup> -M <sub>2</sub> C <sub>2</sub> H-KLH)	1:40	< 1:10
Maus 4 (Le <sup>y</sup> -M <sub>2</sub> C <sub>2</sub> H-KLH)	1:40	< 1:10
3S193 (anti-Le <sup>y</sup> )	0.5 µg mL <sup>-1</sup>	> 10 µg mL <sup>-1</sup>
R24 (anti-GD3)	> 10 µg mL <sup>-1</sup>	0.62 µg mL <sup>-1</sup>

[a] Größte Verdünnung, bei der nachweisbare Lyse auftritt; mit Seren vor der Immunisierung war keine Lyse (< 1:10) zu beobachten.

Diese Untersuchungen lassen sich wie folgt zusammenfassen: Mäuse, die mit **17b** zusammen mit QS-21 immunisiert wurden, produzierten hohe Titer an IgG- und IgM-Antikörpern, die mit Epitopen auf Le<sup>y</sup>-exprimierenden Tumorzellen reagieren können. Auf der Grundlage dieser Untersuchungen wurden Vorgehensweisen für klinische Phase-I-Studien entworfen. Nach der Genehmigung durch verschiedene Aufsichtsbehörden musste der Impfstoff unter Bedin-



gungen und Spezifikationen resynthetisiert werden, die bei Versuchen an Menschen eingehalten werden müssen. Wir begannen dann mit Phase-I-Studien an Patientinnen mit Ovarialcarcinomen. Ziel dieser Studien war, die Sicherheit des Impfstoffes und aller Antikörper, die als mögliche Antwort auf den Impfstoff gebildet werden könnten, zu testen. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind erst kürzlich ausgewertet worden und zeigen positive serologische Befunde. Diese klinischen Resultate werden an anderer Stelle vorgestellt werden.

## 5. Das MBr1-Antigen Globo-H

### 5.1. Synthese von Glycokonjugaten mit dem MBr1-Antigen Globo-H

Globo-H **1** (Abbildung 1) ist ein Hexasaccharid, das in Submilligramm-Mengen als ceramidgebundenes Glycolipid von Hakomori et al.<sup>[39]</sup> aus der menschlichen Brustkrebs-Zelllinie MCF-7 isoliert wurde. Es wird auf der Tumorzelloberfläche als Glycolipid, möglicherweise auch als Glycoprotein, exprimiert. Eine weitere Entwicklung, die Interesse an diesem Antigen weckte, war seine immunologische Charakterisierung mit dem monoklonalen Antikörper MBr1 durch Colnaghi et al.<sup>[40]</sup> Diese Autoren erhielten den Antikörper aus Mäusen, die mit intakten Zellen der MCF-7-Linie immunisiert worden waren. Die Isolierung von **1** aus Zellen dieser Linie und die Bindung an MBr1 wurden als Hinweise dafür gewertet, dass dieses Glycolipid ein Brusttumorantigen ist. Außerdem wurde Globo-H wenig später durch Lloyd et al.<sup>[41]</sup> immunologisch charakterisiert (mAb VK-9; mAb = monoklonaler Antikörper). Die anschließende immunhistologische Analyse mit MBr1 ergab, dass das Antigen auch auf anderen Carcinomtypen exprimiert wird, z.B. Dickdarm-, Lungen-, Ovarial- und kleinzelligem Lungencarcinom.<sup>[42]</sup> Globo-H wurde auch in der Mehrzahl der Tumore von Bauchspeicheldrüse, Magen und Uterusschleimhaut entdeckt; insbesondere ergab sich, dass das Antigen in primären und metastatischen Prostatakrebs-Proben exprimiert wird.

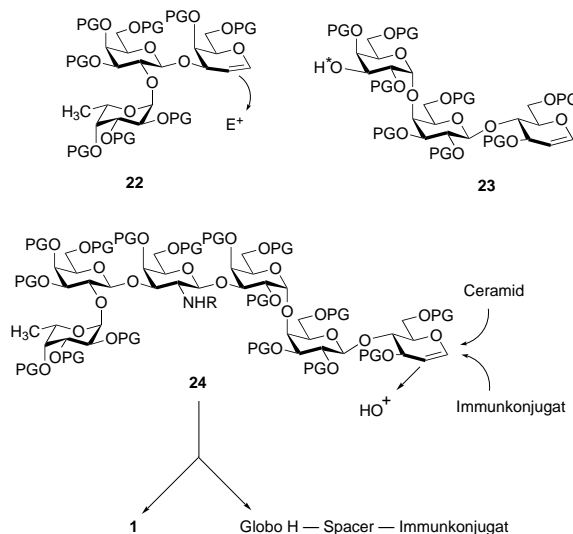
Es gibt auch Hinweise auf Zelloberflächenkohlenhydrate, die man für Globo-H hält, die mit dem MBr1-Antikörper auf normalen Geweben wie Brust, Pankreas, Dünndarm und Prostata reagieren. Das Antigen in diesen Geweben ist allerdings vorwiegend dort lokalisiert, wo der Zugang zum Immunsystem eingeschränkt ist.<sup>[43]</sup> Daher sollten immunhistologische Ergebnisse, die auf der Bindung von MBr1 zum Nachweis von Globo-H als vollständiger struktureller Einheit in einem speziellen Gewebe beruhen, mit Vorsicht bewertet werden.

Daraus ergibt sich, dass nur experimentell überprüft werden kann, ob Globo-H **1** ein brauchbares Antigen bei der Immunisierung von Mäusen ist und ob es für eine Tumorbehandlung, gemeinsam mit einem Adjuvans appliziert, tauglich ist. Gegenwärtig kann nur eine Synthese von Globo-H **1** es als das aktuelle Antigen bestätigen, das von MBr1 erkannt wird, und nur durch Synthese können ausreichende Substanzmengen für die Immunisierungsuntersuchungen zur Verfügung gestellt werden. Schon bevor wir größere

Fortschritte bei der Totalsynthese erzielt hatten, wurde klar, dass auch Studien mit „verkürzten“ Versionen von **1**<sup>[44]</sup> zur Untersuchung, welche Teilstrukturen von **1** für die Bindung notwendig sind, von Interesse wären, um diese tiefgehenden Fragen im Detail bearbeiten zu können.<sup>[45]</sup> Die genannten Befunde waren der Anlass, Globo-H als mögliches Zielantigen zu evaluieren und machten es zu einem wichtigen Synthesziel. Zu Beginn des Globo-H-Projekts gab es noch keine Totalsynthesen des Antigens.<sup>[46]</sup>

Wir berichten nun über die Schlüsselschritte unserer Totalsynthese von Konstrukten, die dem Kohlenhydratanteil von **1** entsprechen. Danach werden wir die Synthese des vorgeschlagenen Impfstoffs, der das MBr1-Antigen enthält, beschreiben. Die serologischen Daten, beginnend mit der Immunisierung von Mäusen und fortgesetzt mit einer vollständigen Phase-I-Studie, werden ebenfalls beschrieben.

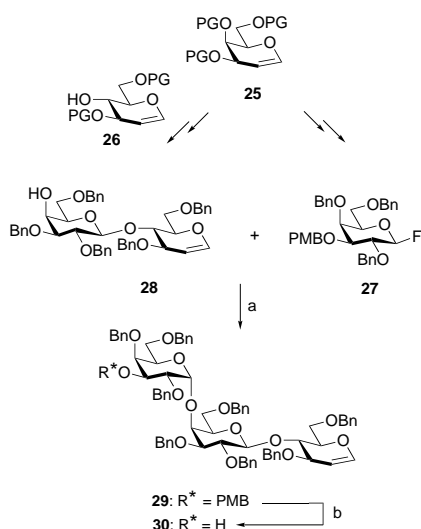
Als wir die Struktur von Globo-H **1** unter dem Aspekt von Risiken bei der chemischen Synthese untersuchten, behielten wir ein wichtiges Erfordernis im Auge. Unser erstes Teilziel sollte wie gewöhnlich eine „akademische“ Lösung sein, mit der ausreichende Mengen (5–10 mg) für Strukturbeweis, Immuncharakterisierung, Konjugation und Impfung von Mäusen erhältlich sind. Die Methode müsste allerdings gegebenenfalls auch zur Produktion viel größerer Mengen tauglich sein, wenn die serologischen Befunde positiv sein sollten und eine klinische Erprobung beabsichtigt wäre. Wir entschieden uns für eine Aufteilung in zwei Trisaccharide (siehe Retrosynthese in Schema 4).



Schema 4. Retrosynthese des MBr1-Antigens Globo-H **1**. E<sup>+</sup> = Elektrophil (Äquivalent für eine Acetamidogruppe), PG = Schutzgruppe.

Bei der Vorbereitung einer [3+3]-Kupplung, um die beiden Trisaccharide zusammenzubringen, wurde das Glycal **22** als möglicher Donor erhalten. Das Glycal **23** mit dem geeigneten C3-Sauerstoffatom des Galactalrests am nichtreduzierenden Ende des anderen Trisaccharides sollte als Acceptor fungieren. Wie bei der Synthese von Le<sup>x</sup> würde das System **22** durch Aktivierung der Glycalbindung in einen Azaglycosylierungsdonor umgewandelt werden. Die gewünschte Amino-Gruppe würde bei der Glycosylierung mit **23** erhalten werden.

In Vorwärtsrichtung wird durch die Bildung des Hexasaccharids **24** nun die Einführung des Ceramids an diesen Rest über die Glycalbindung möglich. Das Ergebnis ist eine Totalsynthese der nativen Form von Globo-H und die Bildung eines brauchbaren Immunkonjugats durch einen Verbindungsabschnitt zur Erzeugung des Impfstoffkonstrukts. Die Planung, die in Schema 4 skizziert ist, wurde so auch in die Praxis umgesetzt,<sup>[47]</sup> und die erste Totalsynthese von **1** wurde veröffentlicht.<sup>[48]</sup> Wir beginnen mit der Synthese des **23** entsprechenden Acceptor-Trisaccharids (Schema 5).

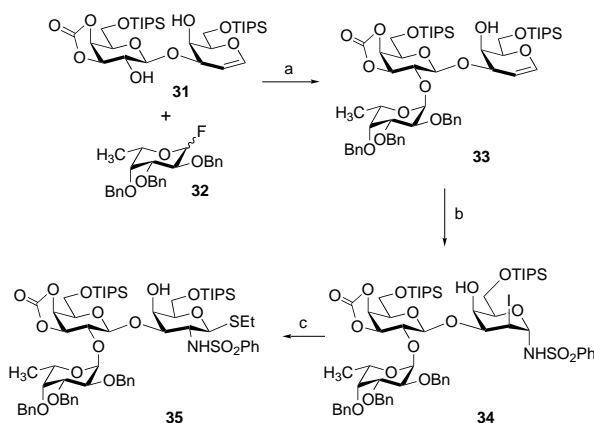


Schema 5. Synthese des Trisaccharidacceptors. a)  $\text{AgClO}_4$ ,  $\text{SnCl}_2$ , DTBP,  $\text{Et}_2\text{O}$ , 54 %; b) DDQ,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ,  $\text{H}_2\text{O}$ , 86 %.

Der Fluoridonor **27** und der Lactalceptor **28** wurden mit Bausteinen vom Typ des Galactals **25** und des Glucals **26** hergestellt; **27** enthält eine PMB-Schutzgruppe an der C3-Hydroxygruppe. In der anschließenden [2+1]-Kupplung wurde der Acceptor **27** mit dem Donor **28** unter einer modifizierten Version der Bedingungen nach Mukaiyama<sup>[28]</sup> und Nicolaou<sup>[49]</sup> zum Trisaccharid-Glycal **29** umgesetzt. Die oxidative Abspaltung der PMB-Schutzgruppe führte zu **30**, das für die Kupplung mit einem geeigneten Trisacchariddonor eingesetzt werden sollte.

Die Synthese des Donors begann, wie in Schema 6 gezeigt, mit dem Disaccharid **31** (das wiederum aus zwei Galactal-Bausteinen vom Typ **25** synthetisiert werden kann). Die regioselektive Fucosylierung der äquatorialen Hydroxygruppe an C2 mit dem Donor **32** lieferte das Trisaccharid-Glycal **33**. Dieses wurde mit Standardmethoden ins Iodsulfonamid **34** überführt. Selbst nach sorgfältiger und wiederholter Untersuchung gelang es nicht, den Acceptor **30** mit Trisaccharid-Substraten wie **34** in vernünftigen Ausbeuten durch direkte Azaglycosylierung zu koppeln. Obwohl eine derartige Verknüpfung mit einfacheren Substraten einen sehr erfolgreichen Zugang zu weniger komplizierten Konstrukten (etwa  $\text{Le}^y$ ) eröffnet, erwies sich die Azaglycosylierung für sterisch stark gehinderte Acceptoren als ungeeignet.

Zum Glück bot sich eine Lösung von selbst an. Wir hatten bereits früher die Umwandlung von Iodsulfonamiden in



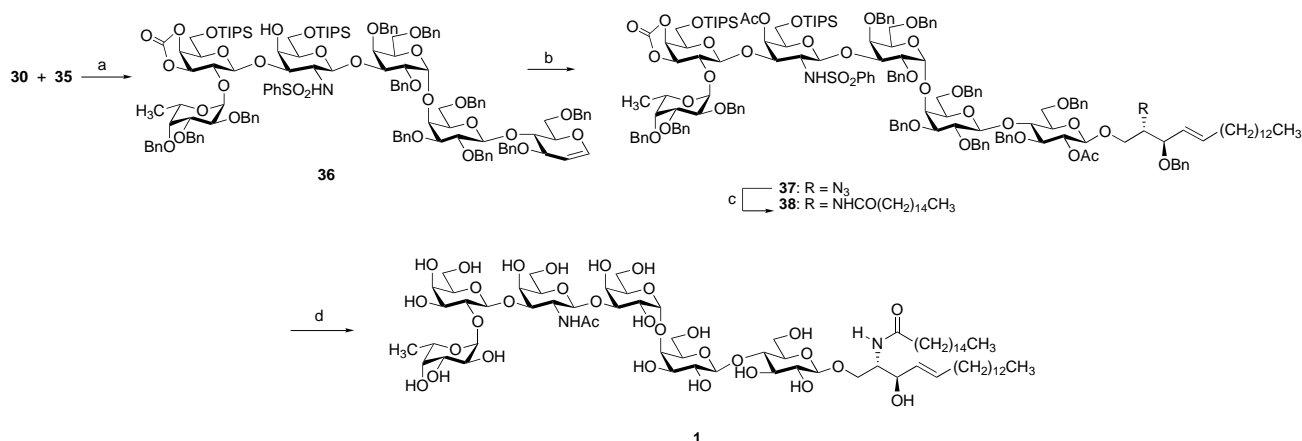
Schema 6. Synthese des Trisacchariddonors. a)  $\text{AgClO}_4$ ,  $\text{SnCl}_2$ , DTBP,  $\text{Et}_2\text{O}$ , 47 %; b)  $\text{I}(\text{coll})_2\text{ClO}_4$ ,  $\text{PhSO}_2\text{NH}_2$ , 4-Å-Molekularsieb, THF; c)  $\text{EtSH}$ , LHMDS, DMF,  $-40 \rightarrow 0^\circ\text{C}$ , 40 % über 2 Stufen.

breiter einsetzbare Donoren untersucht, die in ansonsten schwierigen Fällen effiziente Umsätze ermöglichen sollten.<sup>[30]</sup> Diese Ergebnisse wurden auf die aktuelle Situation übertragen, in der Hoffnung, dass eine erfolgreiche Kupplung zum  $\beta$ -konfigurierten Produkt über die Beteiligung des Sulfonamids möglich wäre. Wir verfolgten diesen Gedanken und behandelten das Iodsulfonamid **34** mit Lithiumethanthiolat, um den notwendigen Thioethyldonor **35** herzustellen.

Die wesentlichen Punkte dieser Synthese sind in Schema 7 gezeigt. Die kritische Kupplung von **30** mit **35** wurde durch stöchiometrische Mengen an  $\text{MeOTf}$  zur Aktivierung des Thioethyldonors bewirkt, wodurch das Hexasaccharidglycal **36** erhalten wurde. Diese Synthese ist ein hervorragendes Beispiel dafür, dass die Bildung von *trans*-2-Sulfonamido- $\beta$ -thioglycosiden aus Glycalen in zwei Stufen dann für die Kupplung komplexer Fragmente sehr nützlich sein kann, wenn die direkte Glycosylierung über die entsprechenden Iodsulfonamide fehlschlägt.

Um das natürlich vorkommende Globosid zu erhalten, wurde das korrekt konfigurierte Hexasaccharid epoxidiert. Die Umsetzung des Produkts mit der Sphingosin-Vorstufe **19**<sup>[34]</sup> (Schema 7) führte zu **37**. **37** ließ sich – in diesem Fall in exzellenten Ausbeuten – durch Reduktion der Azidogruppe mit  $\text{H}_2$  am Lindlar-Katalysator in Gegenwart von Palmitinsäureanhydrid ins Ceramid **38** umwandeln. Die Abspaltung aller Schutzgruppen erfolgte nach Standardmethoden. Anschließend wurde das Rohprodukt acetyliert und zum Glycosphingolipid **1** verseift. Dessen spektroskopische Daten hinsichtlich der anomeren Zentren stimmten vollständig mit denen überein, die für die native Verbindung publiziert waren. Ein detailliertes  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum des gereinigten MBr1-Antigens aus gesammelten Geweben konnte wegen zu geringer Substanzmengen nicht aufgenommen werden. Unsere  $^1\text{H}$ - und  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektren sowie Massenspektren in Verbindung mit den Spektren, mit denen der Fortschritt der Synthese verfolgt wurde, lieferten allerdings überzeugende Hinweise auf die Struktur des Endprodukts.

Bei der immunologischen Charakterisierung wurde nachgewiesen, dass die synthetische Verbindung **1** im ELISA und in Immun-Dünnschichtchromatographie-Tests an den monoklonalen Antikörper MBr1 bindet. Inhibierungsversuche



Schema 7. Kupplung von **30** mit **35** und letzte Schritte der Synthese des MBr1-Antigens Globo-H **1**. a) MeOTf, Et<sub>2</sub>O/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (2:1), 70 %; b) 1. DMDO, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>; 2. **19**, ZnCl<sub>2</sub>, THF, 53 %; 3. Ac<sub>2</sub>O, Pyridin, 95 %; c) H<sub>2</sub>, Lindlar-Katalysator, Palmitoylanhydrid, EtOAc, 90 %; d) 1. TBAF, THF; 2. NaOMe, MeOH; 3. Na/NH<sub>3</sub>; 4. Ac<sub>2</sub>O, Pyridin, DMAP; 5. NaOMe, MeOH.

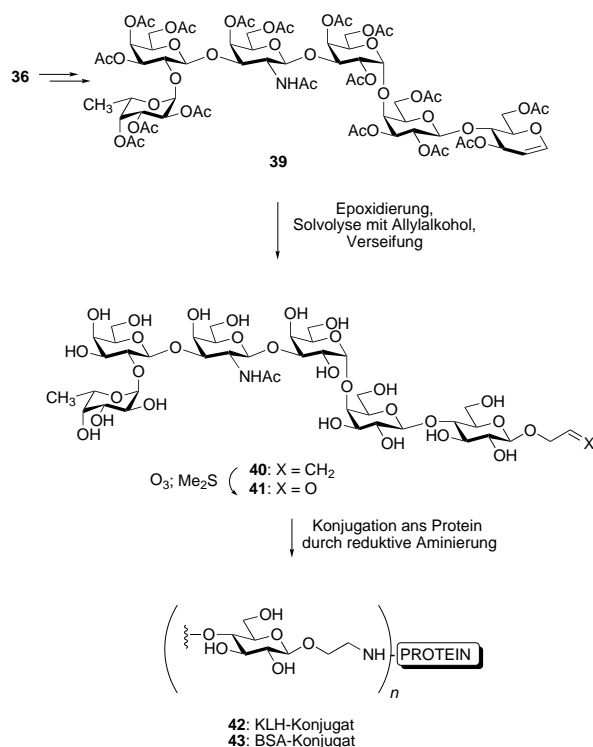
ergaben, dass eine Vorinkubation von MBr1 mit **1** die Reaktivität von MBr1 gegenüber der humanen Brustkrebs-Zelllinie MCF-7 vollständig blockiert. Das synthetische Glycosphingolipid **1** enthält also das gleiche antigene Epitop, mit dem MBr1 auch auf Brustkrebszellen reagiert.

Als Nächstes richteten wir unser Augenmerk darauf, einen funktionellen Impfstoff herzustellen, der das synthetische Antigen enthält. Entsprechend unseren vorangegangenen Untersuchungen stellten wir das entsprechende Allylglycosid her, um die Konjugation mit dem Trägerprotein vorzubereiten (Schema 8). Dazu kehrten wir zum Hexasaccharid-Glycal **36** zurück. Nach Abspaltung der Schutzgruppen und erneuter Acetylierung von **36** fiel das Peracetat **39** an. Es folgten die Epoxidierung von **39** mit Dimethyldioxiran,

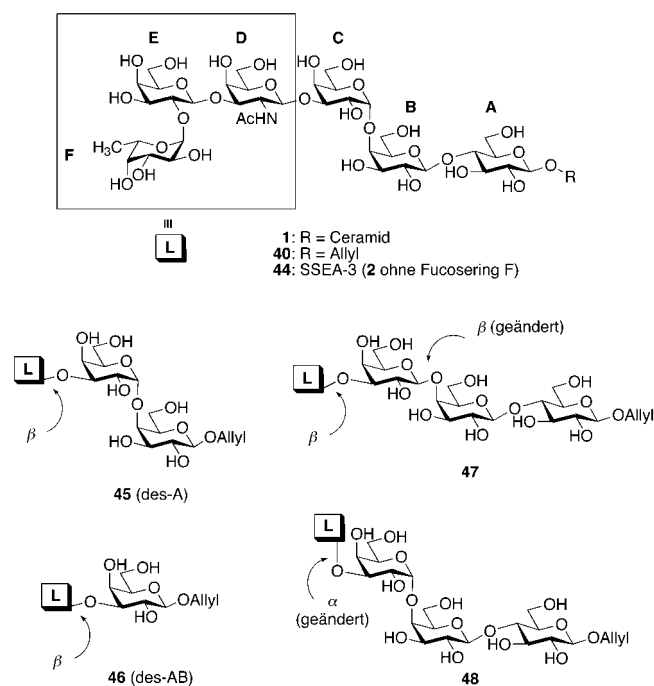
Solvolyse mit Allylalkohol und erschöpfende Verseifung zum Allylglycosid **40**, das nun eine Zugangsmöglichkeit zum vollständig funktionalisierten Impfstoff bietet. Wie zuvor wurde durch die Ozonolyse der Allylgruppe ( $\rightarrow$ **41**) die Voraussetzung für die reduktive Kupplung an KLH geschaffen,<sup>[22]</sup> wodurch das Oligosaccharid-Protein-Konjugat **42** mit voller immunogener Funktion entstand. Die Bestimmung des Kohlenhydrat:Protein-Verhältnisses<sup>[32]</sup> ergab stets etwa 350 Globo-H-Epitope pro Molekül KLH. Auf ähnliche Weise untersuchten wir Konjugate mit BSA, die 17 Kohlenhydrat-Einheiten pro Protein enthielten (**43**).

## 5.2. Die Synthese „verkürzter“ von Globo-H abgeleiteter Verbindungen

Nachdem wir eine brauchbare Synthese entwickelt hatten, konnten wir die Methode auf „verkürzte“ Varianten von **1** ausweiten. Vielleicht könnten solche Verbindungen einfacher synthetisiert werden und würden dennoch von Antikörpern gegen Globo-H erkannt werden.<sup>[45]</sup> Wir wurden bei den Synthesestudien stark dadurch beeinflusst, dass SSEA-3 **44** (Schema 9), dem der terminale Fucoserest fehlt, den MBr1-Antikörper nicht mehr bindet.<sup>[50, 51]</sup> Obwohl der Fucoserest für die Bindung wesentlich zu sein scheint, war es interessant zu untersuchen, welche verkürzten oder isomeren Formen von **1**, die den Fucoserest enthalten, denen aber Reste vom reduzierenden Ende der Kohlenhydratdomäne fehlen, vom MBr1-Antikörper erkannt würden. Also stellten wir durch chemische Totalsynthese die Allylglycoside **45–48** nach der Glycalmethode her (Schema 9).<sup>[44]</sup> Der Hexasaccharidkern, der in **1** enthalten ist, blieb in den Verbindungen **47** und **48** erhalten, doch ist in beiden Fällen gegenüber dem nativen Antigen eine glycosidische Bindung verändert. Dabei ist anzumerken, dass die gezielte Untersuchung der molekularen Erkennung des Globo-H-Antigens bis zu solchen Einzelheiten (d. h.  $\alpha$ - oder  $\beta$ -glycosidische Bindungen) mit Hilfe verkürzter Teststrukturen nur durch die Kraft der chemischen Synthese und die Ausdauer hoch motivierter Kollegen möglich war.



Schema 8. Synthese des Globo-H-KLH-Impfstoffkonstrukts.



Schema 9. „Verkürzte“ Varianten von 40.

Mit den vier in ausreichenden Mengen verfügbaren und strukturell einheitlichen Allylglycosiden führten wir Untersuchungen zur Bindung an das MBr1-Antigen durch, wofür wir MCF-7-Zelllinien verwendeten. Wir setzten steigende Mengen der Glycoside ein (0,05–500 µg); die Ergebnisse eines einzelnen Inhibierungsversuches sind in Tabelle 2 zusammengestellt. Die Verbindungen 45–47 binden deutlich an MBr1, was vermuten lässt, dass die Bindedomäne in dem CDEF-Ringsystem lokalisiert ist, und in der Tat ist der endständige Fucoserest entscheidend für diesen speziellen Antikörper. Außerdem scheint auch die Konfiguration der glycosidischen Bindung zwischen den Ringen C und D entscheidend für die Bindung an den MBr1-Antikörper zu sein (keine Bindung an 48). Wenn die korrekt konfigurierte CDEF-Domäne erst einmal präsentiert wurde, hat die Art der Glycosidbindung zwischen den Ringen B und C anschließend offenbar nur noch geringe Bedeutung (siehe Verbindung 47). Es sieht also so aus, als ob Analoga von 2 durch den MBr1-Antikörper erkannt werden können. Von größerer Bedeutung wäre allerdings ein Immuntest mit polyklonalen Antikörpern.

Tabelle 2. Inhibierung der Bindung des monoklonalen Antikörpers MBr1 an die MCF-7-Zelllinie durch die synthetischen Antigene 45–48 sowie 40 und 44.

	40	44	45	46	47	48
IC <sub>50</sub> [µM] <sup>[a]</sup>	16	> 500 <sup>[b]</sup>	10	26	27	200

[a] Konzentration für 50-proz. Inhibierung. [b] IC<sub>50</sub> wurde nicht erreicht.

### 5.3. Immunologische Untersuchungen mit Impfstoffen auf Globo-H-Basis

Als Nächstes richteten wir unsere Aufmerksamkeit auf eine detaillierte immunologische Charakterisierung des wichtigen Globo-H-Antigens und der erforderlichen Analoga. Die

Verbindungen 42 und 43 waren die Ausgangspunkte für diese Untersuchungen. Wie zuvor waren die einleitenden Schritte zur Entwicklung eines Impfstoffes auf der Basis von Globo-H Impfstudien an Mäusen,<sup>[52]</sup> um die Immunogenität des synthetischen Glycokongjugats zu bestätigen. Ziel war der Nachweis, dass die synthetische Impfstoffkongjugatkombination das Mäuseimmunsystem aktiviert, sodass dieses Antikörper bildet, die an humane Tumorzellen binden; diese exprimieren dann das Epitop, um das die Kohlenhydratregion angeordnet war.

Die serologischen Reaktionen wurden durch ELISA analysiert, um die Antikörpertiter zu bestimmen; die Zelloberflächenreaktivität der entstandenen Antikörper wurde mit Durchflusszytometrie und Immunadhärenztests gemessen. Die Fähigkeit der Seren, Komplementlyse zu vermitteln, wurde ebenfalls getestet. Zunächst wurden die KLH- und die BSA-Kongjugate untersucht. Wie im Falle des Impfstoffes auf Le<sup>y</sup>-Basis und anderen war das KLH-Kongjugat 42 das beste in Bezug auf die Immunogenität, wenn es mit dem Adjuvans QS-21 appliziert wurde.<sup>[53]</sup>

In den Tierversuchen mit dem Impfstoff 42 erreichten alle Mäuseseren hohe IgM- und IgG-Titer gegen das Globo-H-Antigen (Medianwerte 1:128000 bzw. 1:2560; Abbildung 3). Entscheidend war dabei der Befund, dass die Antiseren mit Globo-H-positiven Tumorzellen (MCF-7) reagierten, im

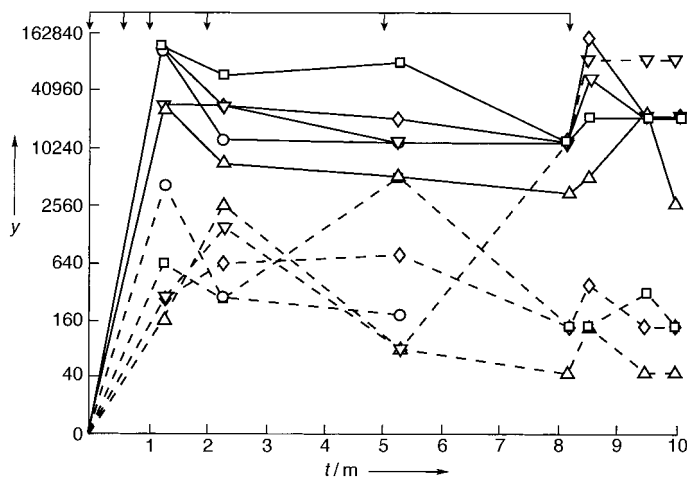


Abbildung 3. Zeitlicher Verlauf des Antikörpertiters in 5 Mäusen (◇, □, △, ○ und ▽). Auf der Ordinate ist der Kehrwert des Titers gegen Globo-H (durch ELISA bestimmt) aufgetragen (y), auf der Abszisse die Zeit t in Monaten. —: IgM-Titer, ---: IgG-Titer. Die Antikörperbildung wurde mit dem Globo-H-KLH-Kongjugat 42 plus QS-21 als Impfstoff induziert, die Zeitpunkte der Impfungen sind durch die senkrechten Pfeile gekennzeichnet.

Kontrollversuch mit den Globo-H-negativen B78.2-Melanomzellen jedoch nicht. Serologische Untersuchungen ergaben auch, dass die Antikörper hoch effizient eine komplementvermittelte Cytotoxizität induzierten. Die prozentuale Lyse, die durch Antikörper gegen das Globo-H-KLH-Kongjugat induziert wurde, betrug 48 %. In Vergleichsexperimenten wurde mit dem monoklonalen Antikörper MBr1 72 % komplement-induzierte Cytotoxizität erzielt. Aufgrund dieser Immunogenität wurde das Impfstoffkonstrukt 42 in Kombination mit QS-21 weiter untersucht. Bis jetzt ist der Kohlen-

hydratrest des betreffenden Impfstoffes das komplexeste synthetische Antigen, das bis zum Stadium der klinischen Prüfung entwickelt wurde.

Nachdem diese günstigen serologischen und Zelloberflächenreaktivitäten bei der Impfung von Mäusen entdeckt worden waren, wurden verschiedene Versuchsplanungen für den Einsatz vollsynthetischer Globo-H-Impfstoffe in der Klinik entworfen. Nach Resynthese und Rekonjugation unter geeigneten Bedingungen wurde eine solche Untersuchung begonnen, und zwar an Prostatakrebs-Patienten, die nach Entfernung der Prostata oder Bestrahlungstherapie einen Rückfall erlitten hatten.

Zwei potentielle Risiken müssen beachtet werden beim Übergang von der Mäuseimpfung zur Impfung von Menschen: Menschliche Seren und Zelloberflächen-Glycoproteine präsentieren verwandte Strukturen (in Form von Lewis-Blutgruppenderminanten und – allerdings in sehr niedrigen Konzentrationen – von Globosiden). Daher kann es unter klinischen Bedingungen beim Menschen zu potentiellen Erscheinungen von Immuntoleranz oder Autoimmunschädigungen bei den Betroffenen kommen. Solchen Betrachtungen brauchten bei der Immunisierung von Mäusen nicht angestellt zu werden. Sicherlich wäre eine eng begrenzte humorale Antitumorantwort auf den vollsynthetischen Kohlenhydratimpfstoff eine zufriedenstellende Bestätigung für das zugrundeliegende Prinzip.<sup>[54]</sup> Solche Phase-I-Studien wurden durchgeführt, um die Sicherheit des Impfstoffes zu testen und die angemessene Dosis des Impfstoffkonjugats zusammen mit QS-21 zu bestimmen.

Im ersten Versuch erhielten fünf Patienten mit progressivem und rezidivierendem Prostatakrebs den KLH-Konjugatimpfstoff **42** mit 30 µg Globo-H plus 100 µg QS-21, entsprechend der vorher festgelegten klinischen Vorgehensweise.<sup>[55]</sup> Ihre Seren wurden genau analysiert und bewertet. Die IgG- und IgM-Titer gegen Globo-H-Ceramid, die nach der Impfung mit ELISA bestimmt wurden, sind in Abbildung 4 gezeigt. Nach der Impfung entwickelten alle fünf Patienten eine starke IgM-Antwort, und zwei Patienten zeigten zusätzlich eine hohe IgG-Antwort. Die Spezifität dieser Antikörper für Globo-H in Extrakten oder Biopsieproben von Prostata-tumorzellen ebenso wie in Brustkrebs-Biopsieproben wurde durch Immun-Dünnschichtchromatographie analysiert; sie ergab, dass nach der Impfung die Seren sowohl synthetisches als auch aus Tumoren isoliertes Globo-H-Ceramid erkannten. Andererseits reagierten die Seren nicht auf Melanom-Biopsieproben-Extrakte, die verschiedene Glycolipide enthalten, aber Globo-H-negativ sind.

Als die Patientenserum nach der Impfung verfügbar waren, wurden damit Inhibierungsversuche durchgeführt, um die Spezifität der gegen Globo-H gerichteten Antikörper in den immunisierten Patienten zu bestimmen. Das synthetische Globo-H-Ceramid **1** und die strukturverwandten Antigene **45–48** (Schema 9), die zuvor durch Totalsynthese hergestellt worden waren, wurden im ELISA-Test untersucht; die Ergebnisse sind in Abbildung 5 dargestellt. Auch wenn die verkürzten Oligosaccharide in gewissem Ausmaß erkannt wurden, hemmt Verbindung **1** die Anti-Globo-H-Reaktivität am effizientesten. Als Kontrolle dienten nicht verwandte Glycolipide und synthetisches Le<sup>y</sup>-Allylglycosid **15**, die nicht

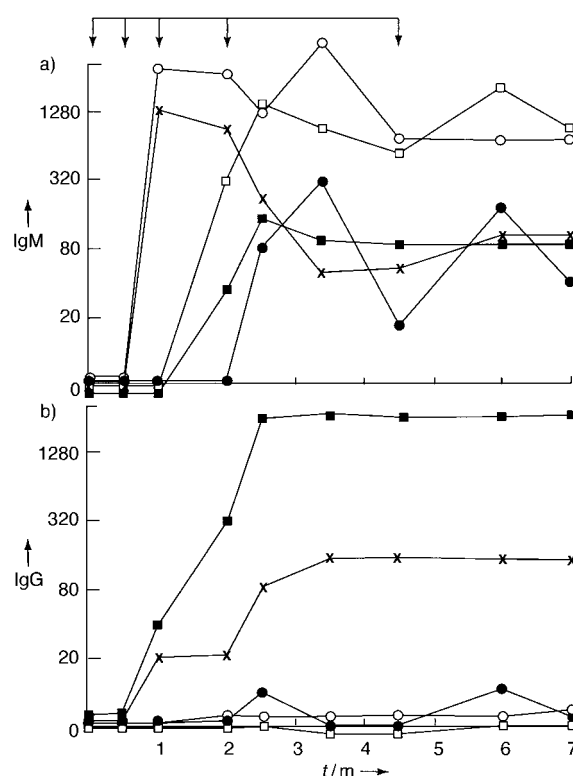


Abbildung 4. Zeitlicher Verlauf der Antikörperbildung bei fünf Patienten (●, ×, ○, □ und ■), die mit dem Globo-H/KLH-Konjugat **42** (30 µg) und QS-21 geimpft wurden. a) IgM-Titer; b) IgG-Titer. Auf der Ordinate ist der Kehrwert des Titers gegen Globo-H (durch ELISA bestimmt) aufgetragen, auf der Abszisse die Zeit *t* in Monaten. Die Zeitpunkte der Impfungen sind durch die senkrechten Pfeile gekennzeichnet.

reagierten (Abbildung 5a). Die beiden Antiseren mit IgG-Aktivität im ELISA wiesen zusätzliche Reaktivität auf (Abbildung 5b). Die beiden synthetischen Hexasaccharide **1** und **40** und das Pentasaccharid **45** inhibierten in diesem Test effektiv die Bindung. Offensichtlich erkennen die polyklonalen IgG-Antikörper aus diesen beiden Seren hauptsächlich ein Epitop einer Größe von etwa fünf terminalen Kohlenhydrat-Einheiten vom reduzierenden Ende her.

Die mangelnde Erkennung des Le<sup>y</sup>-Antigens **15** und verschiedener Teststrukturen sogar unter polyklonalen Bedingungen spiegelt auch eine sehr kontrollierte Antwort gegen Teile des Globo-H-Antigens wider. Die Spezifität für **1** rührt eindeutig von dem Unterschied in der strukturellen und stereochemischen Beziehung der antigenen Substrukturen her. Die Ergebnisse zeigen, dass eine fucosylierte Struktur für eine optimale Anti-Globo-H-Reaktion notwendig ist (siehe Verbindung **44**).

Ermutigt durch diese Befunde verfolgten wir die entscheidende Frage, ob Antikörper, deren Bildung durch das KLH-Impfstoffkonstrukt **42** verstärkt worden war, das Antigen vor seinem natürlichen Hintergrund, also auf der Zelloberfläche, erkennen können. Diese Art der Erkennung ist sicherlich ein wesentlicher Meilenstein beim Fortschritt und der Entwicklung von Antitumor-Impfstoffen. Eine Vorinkubation der Seren mit Globo-H-positiven (MCF-7) Zelllinien führte zu einem mehr als 50-prozentigen Abfall der Bindung an Globo-H-Ceramid, was bedeutet, dass ein großer Teil der Antikörper

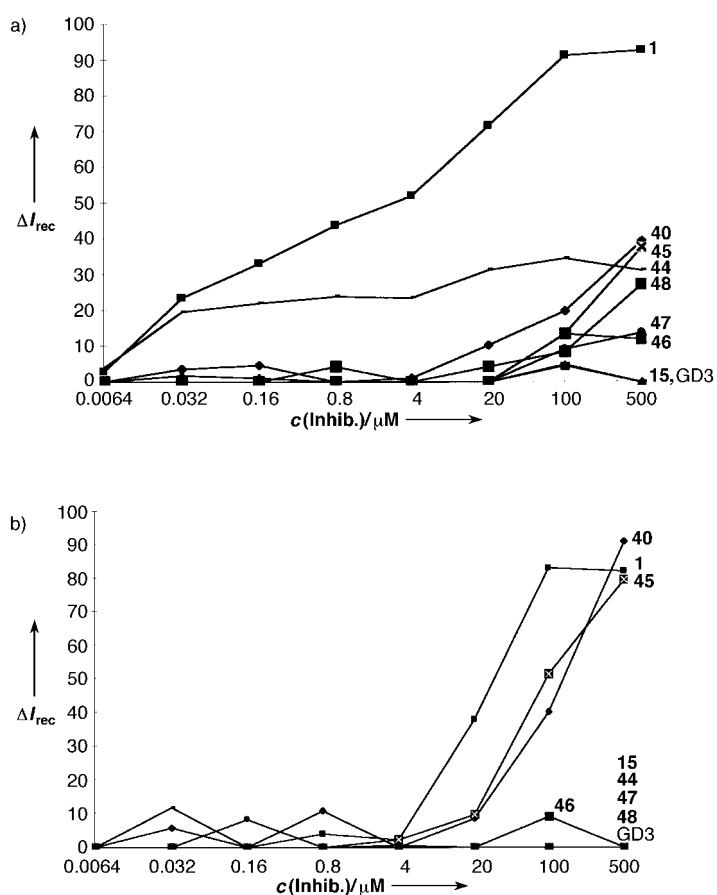


Abbildung 5. Analyse der Spezifität des Anti-Globo-H-Antiserums durch Inhibierungs-Assays. Aufgetragen ist die ELISA-Reaktivität des Serums gegen Globo-H-Ceramid bei Zusatz der Verbindungen **1**, **15**, **40**, **44**–**49** und GD3 (GD3 = NeuAca2 → 8NeuAc2 → 3Galβ1 → 4Glcβ1 – 1'-Cer). a) IgM-Antikörper-Antwort; b) IgG-Antikörper-Antwort. ( $\Delta I_{\text{rec}}$  = % Hemmung;  $c(\text{Inhib.})$  = Konzentration des Inhibitors.)

erkannt und an die Tumorzelloberfläche gebunden wurde. Keine Abnahme der Bindungsaktivität wurde nach Inkubation mit Globo-H-negativen (SK-MEL-28) Melanomzellen beobachtet. Die Zelloberflächenreaktivität von Anti-Globo-H-Antikörpern, mit Durchflusszytometrie bestimmt, nahm bei IgM- und (in geringerem Umfang) bei IgG-Antikörpern zu.

Ein letzter Punkt der einleitenden präklinischen serologischen Evaluierung, die nach der Impfung mit **42** vorgenommen wurde, war, die erhaltenen Seren auf Anti-Globo-H-Antikörper zu testen, die komplementabhängige Cytotoxizität (CDC - complement-dependent cytotoxicity) vermitteln. Nach entsprechenden Kontrollexperimenten ergab sich, dass drei der fünf Seren nach der Impfung eine starke komplementabhängige Cytotoxizität gegen MCF-7-Zellen vermittelten. Diese Ergebnisse sind auch deshalb ermutigend, weil die komplementinduzierte Lyse von Tumorzellen eine verringerte Ausbreitung des Tumors bedeuten sollte und damit eine längere Überlebenszeit begünstigt würde.<sup>[7a]</sup>

Nach dem erfolgreichen Nachweis, dass das Impfstoffkonstrukt **42** zusammen mit dem Adjuvans QS-21 im Menschen sicher ist und spezifische Antikörper gegen Tumorzellen induziert, die die gleiche antigene Struktur auf der Zellober-

fläche tragen, die auch in dem Impfstoff enthalten ist, führten wir eine größere Untersuchung an Patienten durch. Die vollständige Phase-I-Studie wurde mit 18 Patienten mit fortgeschrittenem und rezidivierendem Prostatacarcinom abgeschlossen. Für klinische Details der Studie wird auf Lit. [56] verwiesen. Alle immunisierten Patienten entwickelten gute IgM-Antworten gegen Globo-H, wodurch die Immunogenität bei Prostatacarcinom-Patienten mit einem weiten Spektrum von Krankheitsstadien und Tumoralasten bestätigt wurde. Seren vor und nach der Immunisierung von 18 Patienten wurden auf die Fähigkeit zur Vermittlung von Komplementlyse untersucht. Die IgM-Antikörper, die in dieser Studie induziert worden waren, reagierten mit Tumorzellen, was sich mit Durchflusszytometrie nachweisen ließ, und induzierten in neun Fällen komplementvermittelte Lyse von Globo-H-exprimierenden Zelllinien (Abbildung 6).

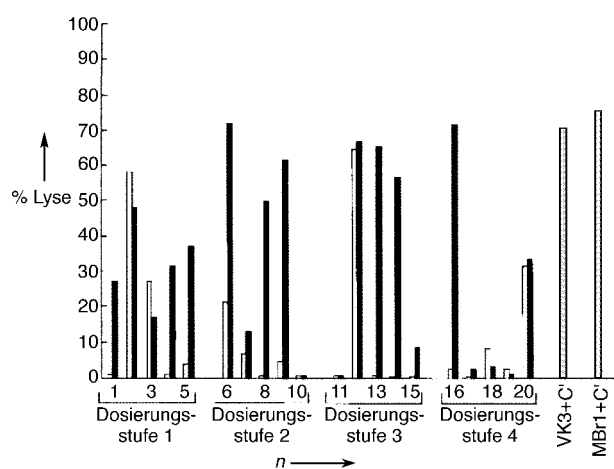


Abbildung 6. Komplementlyse von MCF-7-Tumorzellen durch Seren, die vor und nach der Immunisierung von 18 Patienten im Rahmen einer Studie gewonnen wurden. Die positiven Kontrollen wurden mit MCF-7-Zellen und den monoklonalen Antikörpern VK9 (IgG) oder MBr1 (IgM) und Komplement durchgeführt. Weiß: vor der Immunisierung, schwarz: nach der Immunisierung, grau: Kontrolle.  $n$  = Nummer der Patienten.

Neben der Induktion einer echten Immunogenität wurde ein weiterer wichtiger Befund weiter verfolgt und bei allen beteiligten Patienten erhoben: Prostatakrebs ist im Prinzip für die Untersuchung eine einzigartige Erkrankung, da es anhand des Prostata-spezifischen Antigens (PSA) als hoch spezifischem Biomarker möglich ist, die Krankheit bei niedrigen Tumoralasten zu verfolgen, bei denen die Impftherapie, die uns interessiert, mit höherer Wahrscheinlichkeit wirksam ist. Die Messung des PSA-Titers in verschiedenen Patienten in unserer Studie könnte anzeigen, ob ein Behandlungseffekt nach Vollendung der Impftherapie eintritt. Gegenwärtig scheint mit der Impfung eine Abnahme des Anstiegs der Kurve des Logarithmus der PSA-Konzentration in Abhängigkeit von der Zeit nach der Behandlung im Vergleich mit den Werten vor der Behandlung erreicht zu werden.

Bei allen Patienten nahm die PSA-Konzentration während der ersten 26 Behandlungswochen zu, wenngleich sich in einigen Fällen die Geschwindigkeit des Anstiegs im Verlauf der Immunisierung zu verlangsamen schien. Der möglicherweise wichtige, wenn auch als vorläufig zu bezeichnende

Befund allerdings war, dass sich während der nächsten sechs bis neun Monate nach der Behandlung, während der die Patienten weiter beobachtet wurden, günstige Veränderungen im Anstieg der PSA-Konzentration bei den meisten Patienten eingestellt hatten, die sich in einem frühen nicht metastasierenden Stadium befanden. Nimmt man die Verlangsamung dieses Anstiegs als Kriterium, kann man behaupten, dass ein gewisser aktueller Behandlungseffekt bereits nach drei Monaten sichtbar wird. Berücksichtigt man allerdings die vorliegende kleine Stichprobe, ist dieser Befund sicherlich noch nicht als endgültig anzusehen. Ein Beispiel zum PSA-Kriterium ist in Abbildung 7 gezeigt.

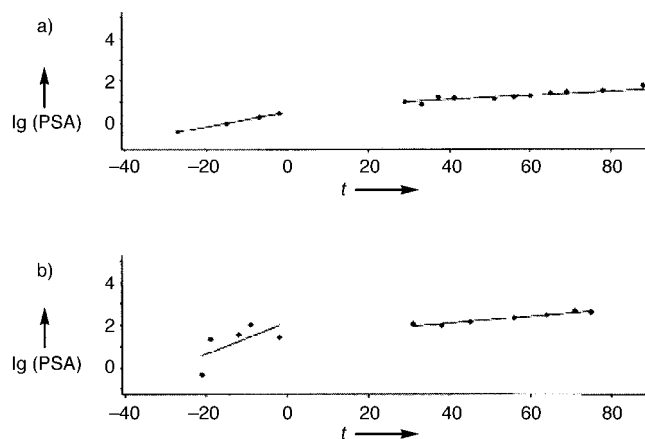


Abbildung 7. Rückgang der Kurvensteigung des Logarithmus der PSA-Konzentration in Abhängigkeit von der Zeit  $t$  (in Wochen) nach Behandlung der Patienten im Vergleich zu den Werten vor der Behandlung. Nach radiologischem Befund sind die Patienten auch mehr als 80 Wochen nach der Behandlung krankheitsfrei und zeigen stabile PSA-Steigungen. a) Steigung vorher = 0.034, nachher = 0.009; b) vorher = 0.075, nachher = 0.016.

Fünf Patienten aus dieser Studie, die weiterhin Auffrischungsimpfungen erhalten, haben stabile PSA-Profile, und es gibt nach zwei Jahren keine radiologischen Hinweise auf eine Erkrankung. Bei zwei der fünf Patienten geht der PSA-Anstieg zurück. Wir möchten betonen, dass das Konzept, die PSA-Profile für den Nachweis früher Behandlungseffekte biologischer Therapien wie der Impfung zu nutzen, noch weiter in Phase-II- und Phase-III-Studien überprüft werden muss und gegenwärtig noch kein verlässlicher diagnostischer Parameter ist.

Wie eingangs erwähnt, wurde die Globo-H-Expression auf verschiedenen Tumoren nachgewiesen. Daher hoffen wir, einen Impfstoff auf Globo-H-Basis auch gegen andere Krebsarten einsetzen zu können. Ein Impfstoff, der das Globo-H-Antigen **42** enthält, ist auch schon in einer klinischen Phase-I-Studie bei Brustkrebs-Patientinnen nach den vordefinierten klinischen Anleitungen erprobt worden. Inzwischen wurde mit der Auswertung der Daten begonnen. Zunächst scheinen die serologischen Ergebnisse ermutigend zu sein. Eine vollständige Darstellung wird zu gegebener Zeit veröffentlicht werden.

Zum Zweck der Weiterentwicklung der Impfstoffe auf Globo-H-Basis haben wir klinische Daten gesammelt und

ihre Erhebung bis zu dem Punkt organisiert, an dem wir eine Studie mit 200 Prostatacarcinom-Patienten planen. In einer solchen Studie würde das vollsynthetische Konstrukt **42** mit dem Globo-H-Antigen eingesetzt werden, möglicherweise in einer polyvalenten Applikationsform, die eine ganze Palette von Tumorantigenen enthalten würde. Wenn die Synthesversuche erfolgreich sind,<sup>[57]</sup> werden auch die Vorbereitungen für eine große Studie mit 1000 Patienten mit Globo-H noch in diesem Jahr beginnen.

## 6. Synthese des KH-1-Antigens

Das Glycolipid KH-1 **2** (Abbildung 1) ist vielleicht das größte bislang charakterisierte Antigen auf Kohlenhydratbasis.<sup>[58]</sup> Es wurde aus menschlichen Dickdarm-Adenocarcinomzellen mit Antikörpern gegen die klassische Le<sup>y</sup>-Determinante (**3** in Abbildung 1) isoliert. **2** wurde auf der Zelloberfläche aller bisher untersuchten Adenocarcinomzellen gefunden. Außerdem wurde es nie in Extrakten normaler Dickdarmzellen nachgewiesen. Die Erfolgchancen einer Impftherapie werden offensichtlich besser sein, weil man die größere Spezifität der Kohlenhydratdomäne des Antigens nutzen kann.

Monoklonale Antikörper wurden gegen dieses Antigen erzeugt und ihre spezifische Bindung an **2** gezeigt. Aufgrund dieser Untersuchungen postulierten Hakomori et al., dass das KH-1-Antigen ein hoch spezifischer Marker für Malignität und Prä malignität speziell bei Dickdarm-Adenocarcinom sei.<sup>[59]</sup> Vor kurzem wurde die röntgenkristallographisch bestimmte Struktur des Antitumor-Antikörpers BR96 im Komplex mit dem Nonansäureesterderivat des Le<sup>y</sup>-Tetrasaccharids von Jeffrey et al.<sup>[60]</sup> veröffentlicht. Die in dieser Untersuchung ermittelte Gestalt des Antikörper-Le<sup>y</sup>-Komplexes lässt vermuten, dass BR96 ungenutzte Bindungsbereiche aufweist, die auch Verbindungen erkennen könnten, die größer sind als das Le<sup>y</sup>-Tetrasaccharid (z. B. das KH-1-Antigen).

Vom Standpunkt der chemischen Synthese aus war das KH-1-Antigen für uns aus verschiedenen Gründen attraktiv. Zunächst würde die Totalsynthese von **2** und von biokonjugierbaren Vorstufen die Konstruktion eines weiteren extrem komplexen Tumorantigens bedeuten.<sup>[61]</sup> Wenn wir uns dieser Aufgabe widmeten, hätten wir auch die Möglichkeit und die Rahmenbedingungen, um wichtige strategische Vorteile der Syntheseökonomie bei der Oligosaccharidsynthese zu nutzen. Außerdem war unser Interesse nicht auf **2** beschränkt, sondern schloss auch verwandte Verbindungen ein, die ebenfalls mit dem geeigneten Trägersystem konjugiert werden könnten.<sup>[62]</sup>

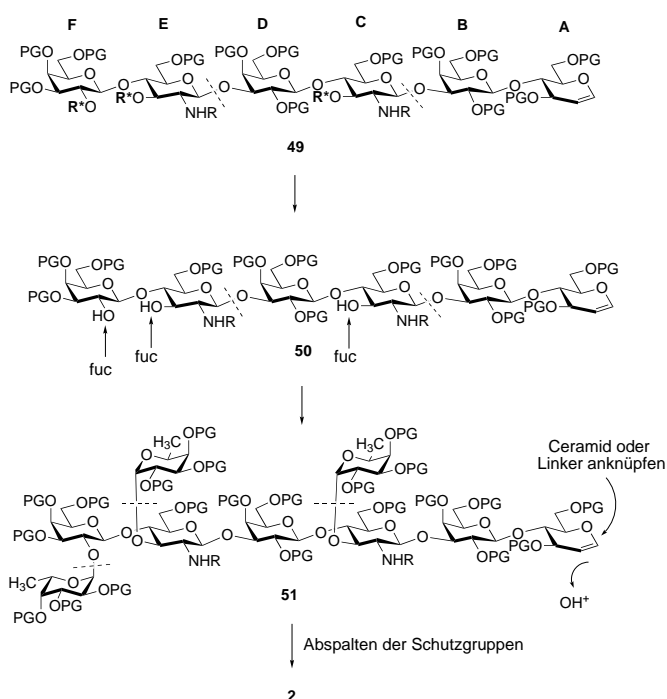
Die Schwierigkeiten bei der Isolierung und Reinigung komplexer Kohlenhydrate aus menschlichem Dickdarmtumorgewebe waren so groß, dass **2** nicht in ausreichender Menge für eine Evaluierung zur Verfügung stand. Nur durch Totalsynthese könnten handhabbare Mengen solcher chemisch komplexer Systeme erhalten werden, die für weitergehende Beurteilungen ausreichen.

Unsere Synthese des KH-1-Antigens **2** wurde zu Beginn des Jahres 1998 veröffentlicht.<sup>[63]</sup> Dabei gelang uns nicht nur die Totalsynthese, sondern wir konnten auch die stets wichtige

Frage der Synthesestrategie bei der Oligosaccharidsynthese in befriedigender Weise angehen. Der Synthesepfad, den wir verfolgten, wird im Folgenden erläutert.

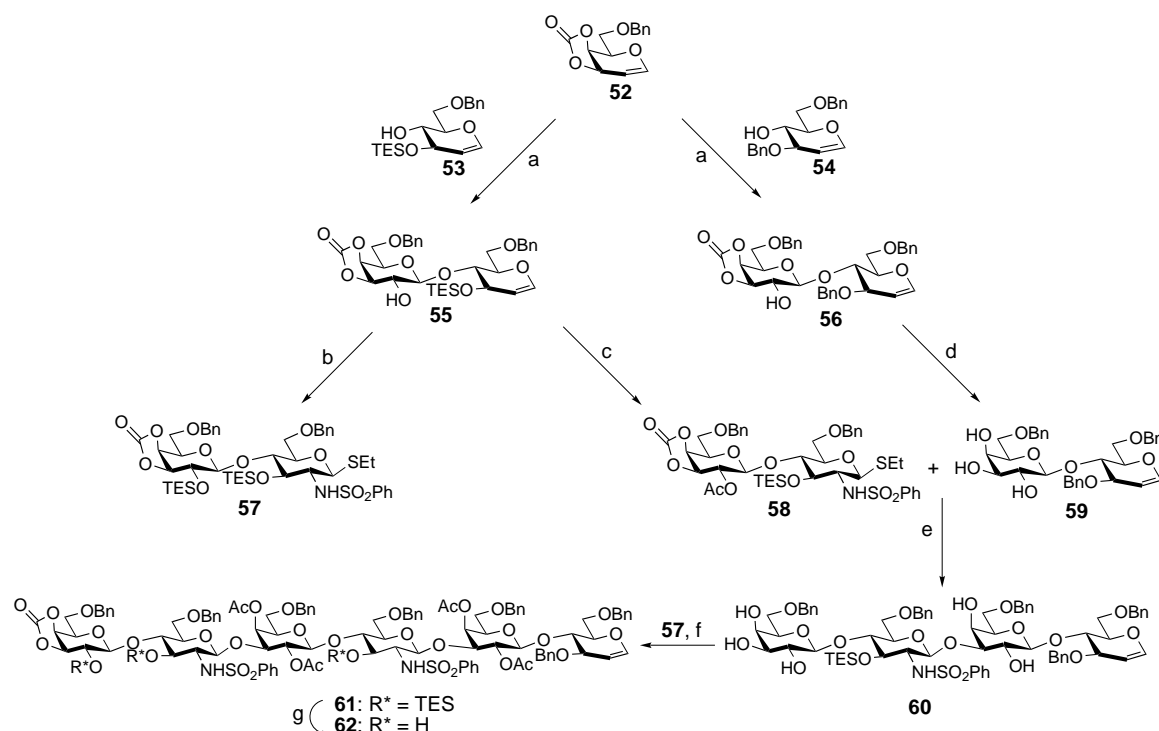
Reifliche Überlegung galt dem Ziel, Schutzgruppen so weit wie möglich zu vermeiden und eine optimale, geradlinige Synthese zu finden, eine Forderung, die zunehmend schwieriger zu erfüllen ist, wenn Verzweigungen und Komplexität der Oligosaccharid-Zielstruktur zunehmen. Unter diesem Aspekt planten wir, ein Hexasaccharid (**49**, Schema 10) zu synthetisieren, dessen differenziertes Schutzgruppenmuster die gleichzeitige Freisetzung der drei Hydroxygruppen ermöglichte, die an einem strategischen Punkt unserer Wahl fucosyliert werden sollten. Als beabsichtigter Vorteil unserer Synthese sollten die drei Fucosylierungen dann gleichzeitig durchgeführt werden (**50**→**51**). Daher waren für **49** drei Arten von Schutzgruppen nötig: eine für die Stickstoffzentren, eine andere für die drei vorgeschlagenen Fucosylierungsstellen ( $R^*$ ) und eine für die verbleibenden Hydroxygruppen. Wir hatten uns darauf verlassen (und dies bereits zuvor erfolgreich demonstriert), dass uns auf unserem Weg zu evaluierbaren Antiadenocarcinom-Impfstoffen die endständige Glycal-Funktionalität in **51** einen Zugang zu dem nativen KH-1-Antigen **2** oder zu Biokonjugaten verschaffen würde. Die Retrosynthese, die auf einem solchen Plan beruht, ist in Schema 10 gezeigt.

Es ist leicht einzusehen, dass die Synthese eines Hexasaccharid-Glycals des Typs **49** selbst ein aufwendiges Unterfangen war. Die Synthese des unterschiedlich geschützten Glycals **61** ist in Schema 11 ohne detaillierte Diskussion dargestellt. Man kann für die Kürze des Syntheseweges



Schema 10. Geplante Synthese von KH-1 **2**. PG = allgemeine Hydroxy-schutzgruppe, R = Stickstoffschutzgruppe, spezifische Sauerstoffschutzgruppe.

Nutzen daraus ziehen, dass man auf die Glycal-Bausteine **52**–**54** für den schnellen Aufbau von großen Oligosacchariden wie den in Schema 11 gezeigten zurückgreift. Durch Ab-



Schema 11. Synthese des Hexasaccharids **62**. a) 1. DMDO,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ; 2. **53** oder **54**,  $\text{ZnCl}_2$ , THF, 65 bzw. 55%; b) 1. TESOTf,  $\text{Et}_3\text{N}$ ,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , 92%; 2.  $\text{I}(\text{coll})_2\text{ClO}_4$ ,  $\text{PhSO}_2\text{NH}_2$ , 4-Å-Molekularsieb,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , 90%; 3. LHMDs, EtSH, DMF, 90%; c) 1.  $\text{Ac}_2\text{O}$ ,  $\text{Et}_3\text{N}$ , DMAP,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , 95%; 2.  $\text{I}(\text{coll})_2\text{ClO}_4$ ,  $\text{PhSO}_2\text{NH}_2$ , 4-Å-Molekularsieb,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , 90%; 3. LHMDs, EtSH, DMF, 90%; 4.  $\text{Ac}_2\text{O}$ ,  $\text{Et}_3\text{N}$ , DMAP,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , 85%; d)  $\text{K}_2\text{CO}_3$ , MeOH, 80%; e) 1. MeOTf, DTBP,  $\text{Et}_2\text{O}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (2:1), 4-Å-Molekularsieb, 55%; 2.  $\text{K}_2\text{CO}_3$ , MeOH, 85%; f) 1. MeOTf, DTBP,  $\text{Et}_2\text{O}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (2:1), 4-Å-Molekularsieb, 60%; 2.  $\text{Ac}_2\text{O}$ , Pyridin, DMAP,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , 95%; g) TBAF/AcOH, 93%.



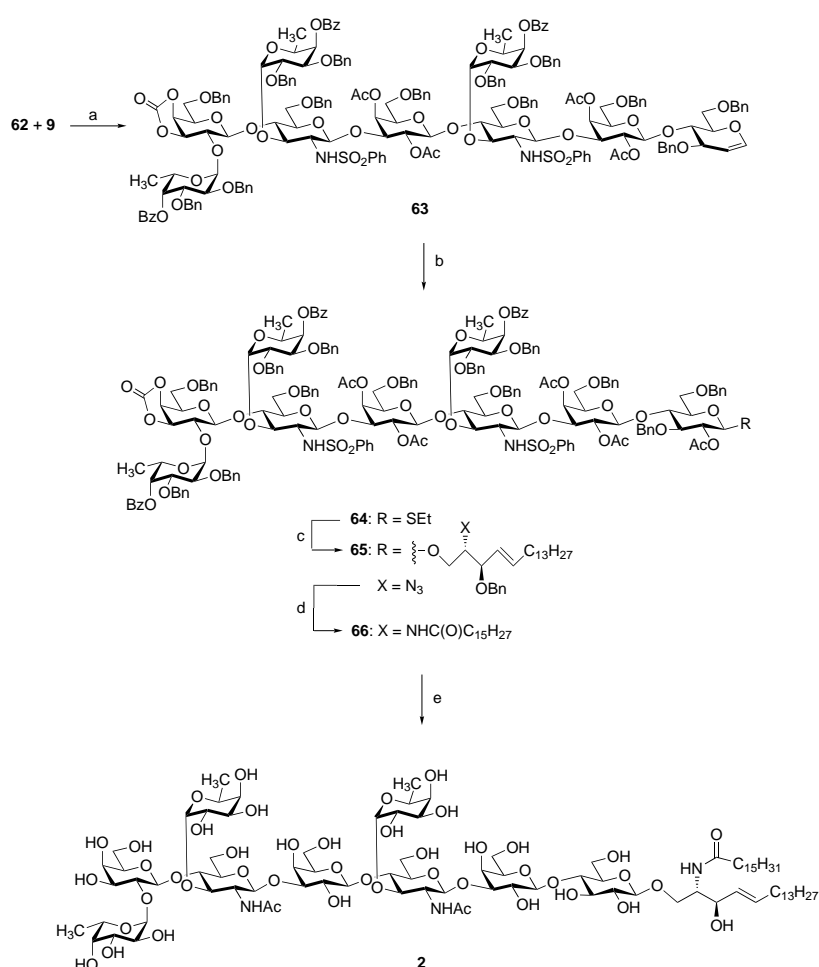
spaltung der Schutzgruppen von **61** entstand **62**, woraufhin der krönende Abschluss des Synthesplans umgesetzt werden konnte.

Wie erhofft gelang es, die drei  $\alpha$ -L-Fucose-reste in einem einzigen Syntheseschritt über den Fluoronor **9** einzuführen und so das Nonasaccharid-Glycal **63** in ausgezeichneter Ausbeute zu erhalten (Schema 12). Von hier aus sind die Synthesewege, die wir zum Erreichen von **2** und verwandten Verbindungen beschritten, stark von unseren früheren Arbeiten über Globo-H und Le<sup>y</sup> beeinflusst. Der erste Schritt auf dem Weg zum nativen KH-1-Antigen **2**, die Einführung der Ceramid-Seitenkette, war die Epoxidierung des Glycals **63**. Während diese Reaktion anscheinend glatt verlief, ergaben Versuche, das Epoxid direkt als Glycosyldonor mit dem Acceptor **19** umzusetzen, nur niedrige Ausbeuten des Kupplungsprodukts. Daher wandten wir eine neu entwickelte Variante der Glycalepoxydonormethode an.<sup>[64]</sup> Diese wurde durch die Epoxidierung von **63** mit Dime-thyldioxiran eingeleitet; der Epoxidring wurde mit Ethan-thiol geöffnet. Anschließend wurde acetyliert, wobei das Acetat **64** entstand. In der Erwartung einer effektiven Beteiligung der benachbarten C2-Acetoxygruppe an der Lenkung einer  $\beta$ -Glycosylierung wurde **64** in Gegenwart von Methyltriflat mit **19** umgesetzt. Dies führte tatsächlich zur Bildung des Glycosids **65** unter deutlicher Verbesserung der Ausbeute. Von dieser Stufe ab war uns die notwendige Methodik weitgehend vertraut, und die Totalsynthese des KH-1-Antigens **2** wurde wie in Schema 12 gezeigt vollendet.

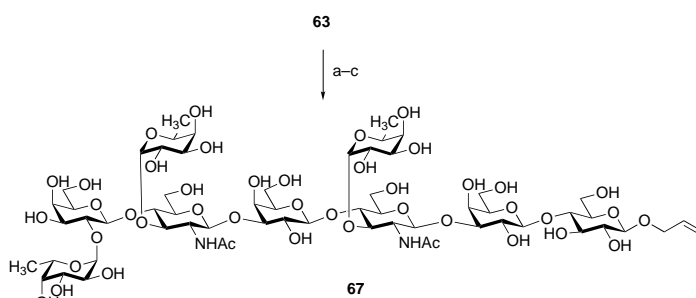
Für die immunologischen Untersuchungen war das Allylglycosid wieder das Ziel. Zu diesem Zweck gingen wir wieder vom Glycal **63** aus (Schema 13). Durch Entfernung der Schutzgruppen und anschließende Veresterung gelangten wir zum peracetylierten Glycal, und durch Epoxidierung unter Standardbedingungen und Solvolyse mit Allylalkohol entstand der benötigte Spacerbereich. Nach erschöpfender Desacetylierung fiel das vollständig ungeschützte Nonasaccharid **67** an (Schema 13), das wiederum wie in den vorangegangenen Impfstoffpräparationen mit KLH konjugiert wurde.

Die Strukturen der Endprodukte **2** und **67** wurden vollständig durch Massenspektrometrie, durch NMR-Analyse sowie im Falle von **2** durch Vergleich mit den wenigen verfügbaren Daten erhärtet. Ein direkter Substanzvergleich war nicht möglich, weil die Gewinnung des KH-1-Antigens aus natürlichen Quellen nicht praktikabel ist. Dank dieser Synthese ist der Zugang zum KH-1-System kein unüberwindliches Hindernis mehr.

Bei der Vorbereitung der immunologischen Untersuchungen wäre es hilfreich, die Spezifitäten der verschiedenen Antikörper für die Strukturelemente des KH-1-Antigens zu bestimmen. Zu diesem Zweck wollten wir verkürzte Struktu-

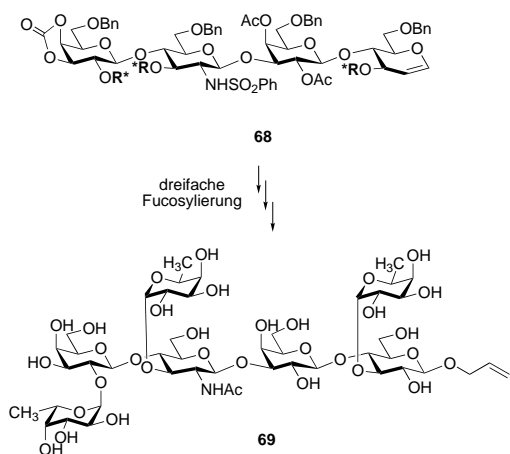


Schema 12. Totalsynthese des KH-1-Antigens **2**. a)  $\text{Sn}(\text{OTf})_2$ , Toluol/THF (10:1), 4-Å-Molekularsieb, 60 %; b) 1. DMDO,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ; 2. EtSH,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ,  $\text{H}^+$  (kat.); 3.  $\text{Ac}_2\text{O}$ , Pyridin,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , 60 % über 3 Stufen; c) **19**,  $\text{MeOTf}$ ,  $\text{Et}_2\text{O}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (2:1), 4-Å-Molekularsieb, 55 %; d)  $\text{H}_2$ , Lindlar-Katalysator, Palmitoylanhydrid,  $\text{EtOAc}$ , 85 %; e) 1.  $\text{Na}/\text{NH}_3$ , THF, dann  $\text{MeOH}$ ; 2.  $\text{Ac}_2\text{O}$ ,  $\text{Et}_3\text{N}$ , DMAP,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ; 3.  $\text{MeONa}$ ,  $\text{MeOH}$ , 70 % über 3 Stufen.



Schema 13. Synthese des Allylglycosids **67**. a) 1.  $\text{Na}/\text{NH}_3$ , dann  $\text{MeOH}$ ; 2.  $\text{Ac}_2\text{O}$ , Pyridin, DMAP; b) 1. DMDO,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ; 2. Allylalkohol; c)  $\text{NaOMe}$ ,  $\text{MeOH}$ , 60 % über 3 Stufen.

ren erzeugen, in denen Abschnitte des Moleküls entfernt werden sollten. Im ersten Anlauf richteten wir unsere Aufmerksamkeit auf ein Konstrukt, in dem die drei Fucose-reste und eine *N*-Acetylfunktion erhalten bleiben sollten (Verbindung **69** in Schema 14). Die *N*-Acetyl-lactosamin-Substruktur am reduzierenden Ende dagegen sollte entfernt werden. Wir griffen wiederum auf eine dreifache Fucosylierungsprozedur zurück, um die gewünschten Bindungen zu knüpfen; die

Schema 14. Synthese „verkürzter“ Varianten von **2**.

übrigen Schritte bei der Umwandlung des fucosylierten **68** zu **69** verliefen parallel zur Synthese von **67** – und tatsächlich war die Strategie der dreifachen Fucosylierung zur Erreichung einer möglichst kurzen Synthesesequenz erfolgreich.

Nachdem alle chemischen Ziele erreicht waren, verlagerte sich unser Arbeitsschwerpunkt beim KH-1-Antigen auf die Aspekte Immunologie und Impfung. Mäuse, die mit dem vollsynthetischen KH-1-Impfstoff, der **67** zusammen mit QS-21 als Immunadjuvans enthielt, immunisiert wurden, entwickelten einen hohen Antikörpertiter gegen den Impfstoff. Untersuchungen der immunologischen Eigenschaften der Mäuseantikörper, die so induziert wurden, sind im Hinblick auf mögliche klinische Studien im Gange; die Ergebnisse werden in Kürze veröffentlicht werden.<sup>[65]</sup>

## 7. Zukünftige Impfprojekte

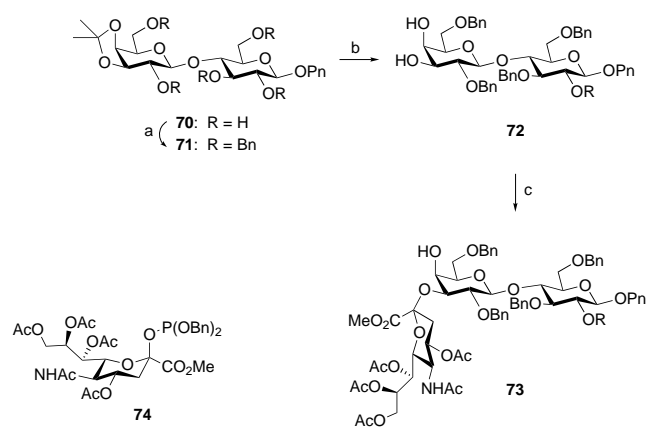
### 7.1. Synthese des Antigens Fucosyl-GM<sub>1</sub> des kleinzelligen Lungenkarzinoms

An dieser Stelle möchten wir den Leser auch über unsere erst vor kurzem vollendeten, aber noch unveröffentlichten Totalsynthesen der Fucosyl-GM<sub>1</sub>- und N3-Antigene informieren. Natürlich wurden wir bei der Lösung der hiermit verbundenen Probleme von unseren vorangegangenen Erfolgen stark beeinflusst. Die biologische und die chemische Basis für die Bearbeitung dieses Ziels werden nur kurz beschrieben; sie integrieren die Synthesen in unser laufendes Impfstoff-Projekt.

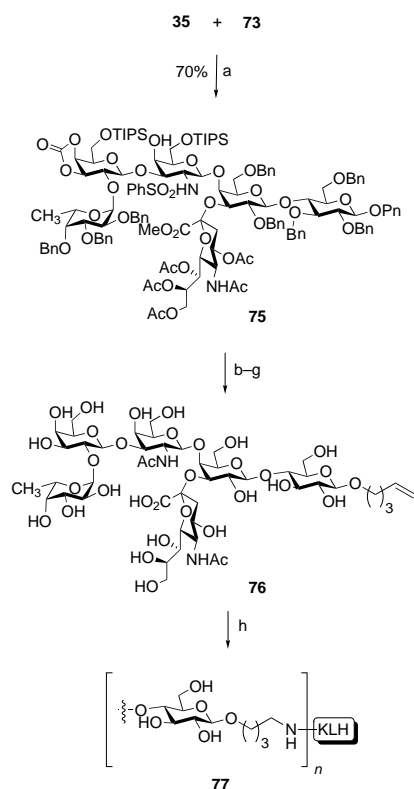
Das Glycolipid Fucosyl-GM<sub>1</sub> **7** (Abbildung 1) ist als hoch spezifischer Marker mit Zellen des kleinzelligen Lungenkarzinoms (SCLC - small cell lung cancer) assoziiert.<sup>[66, 67]</sup> Zu Beginn unserer Untersuchungen war noch keine Totalsynthese von **7** erarbeitet worden. Durch die Tumorspezifität des Antigens **7**<sup>[68]</sup> sahen wir uns ermutigt, nicht nur eine Totalsynthese des enthaltenen Hexasaccharidkerns zu entwickeln, sondern auch eine Synthese, durch die genügend Material für eine klinische Prüfung hergestellt werden kann. Unsere derzeitigen Bemühungen zur Synthese des Pentenylglycosids von **7** werden in diesem Abschnitt beschrieben.<sup>[69]</sup>

Die Erkenntnis, dass die drei Zuckerreste am nichtreduzierenden Ende von **7** identisch mit dem DEF-Teil in Globo-H (**22** in Schema 4) sind, ließ uns an eine weitere [3+3]-Kupplung denken. Diese Aufteilung würde allerdings eine möglicherweise schwierige Reaktion mit einem Trisaccharid bedeuten, das einen geschützten Sialinsäurerest als Acceptor trägt. Wir hielten dieses Risiko nach unseren vorangegangenen Erfahrungen mit den Globo-H-Derivaten für ernst zu nehmend, aber tragbar. Auch ließen wir uns durch andere Vorkenntnisse aus unserem Labor und durch die Erfahrungen, die wir beim Aufbau von GM<sub>1</sub> mit einer verwandten Sulfonamidoglycosylierung gesammelt hatten, inspirieren.<sup>[70]</sup> Für eine Impfstoffentwicklung mit GM<sub>1</sub> fassten wir ein funktionalisiertes Glucopyranosid ins Auge, das zu einem frühen Stadium der Synthese eingeführt werden sollte, anstatt uns auf Manipulationen am vollständig aufgebauten Oligosaccharid einzulassen.

Die Synthese des erforderlichen Trisaccharid-Rezeptors ist in Schema 15 gezeigt. Pentenylactosid<sup>[71]</sup> wurde in das thermodynamisch stabilere C3', C4'-Acetonid **70** umgewandelt und anschließend zur unterschiedlich geschützten Verbindung **71** perbenzyliert. Durch Entfernen der Acetonid-Schutzgruppe wurden zwei Hydroxygruppen freigesetzt. Das entstandene Diol **72** sollte nacheinander als Acceptor einer Sialylierung mit **74** und dann der geplanten [3+3]-Kupplung fungieren. Die Reaktion des Phosphitdonors **74**<sup>[72]</sup> mit TMSOTf in Gegenwart von **72** führte zum Trisaccharid **73** als einzigem nachweisbaren Trisaccharid-Produkt.

Schema 15. Synthese von **73**. a) BnBr, NaH, DMF, 84 %; b) AcOH/H<sub>2</sub>O (4:1), 90 %; c) **74**, TMSOTf, EtCN, 4-Å-Molekularsieb, –40 °C, 75 %.

Der Trisacchariddonor **35** war bereits aus der Synthese von Globo-H zugänglich (Schema 6); seine Verknüpfung mit **73** in Gegenwart von MeOTf zum Hexasaccharid **75** verlief mit guter Ausbeute, was die Leistungsfähigkeit der Azaglycosylierungssequenz bestätigte (Schema 16). Die Schutzgruppen wurden vom Hexasaccharid **75** wie bei den vorherigen Synthesen nach Standardmethoden abgespalten, wodurch das Pentenylglycosid von Fucosyl-GM<sub>1</sub>, **76**, entstand. Unsere Zuordnung der Struktur von **76** beruhte auf der NMR-Analyse von Zwischenprodukten auf dem Weg zur endgültigen Struktur und wurde durch hochauflösende Massen-



Schema 16. Synthese von **77**. a) MeOTf, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/Et<sub>2</sub>O, 0 °C, 70%; b) TBAF, AcOH, THF; c) NaOMe, MeOH; d) NaOH, THF; e) Na/NH<sub>3</sub>, THF, –78 °C, dann MeOH; f) Ac<sub>2</sub>O, Pyridin, DMAP, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 46% über 5 Stufen; g) Stufen (c) und (d), 96%; h) 1. O<sub>3</sub>, MeOH; Me<sub>2</sub>S; 2. KLH, NaCNBH<sub>3</sub>, Phosphatpuffer.

spektrometrie untermauert. Damit war die erste Totalsynthese des Fucosyl-GM<sub>1</sub>-Hexasaccharidkerns erarbeitet.

Bemerkenswert an dieser Synthese ist, dass die Pentenylglycosid-Modifikation eine viel effektivere Synthese potentieller Vorstufenmoleküle für eine Konjugation ermöglicht, weil (in manchen Fällen ziemlich teure) Anpassungen im letzten Stadium nachhaltig vermieden werden. Wir verfolgen diese Strategie auch für die Immunkonjugation in anderen Fällen.<sup>[73]</sup>

Das Fucosyl-GM<sub>1</sub>-pentenylglycosid **76** wurde mit dem Trägerprotein KLH zum Glykokonjugat **77** konjugiert. Wichtig ist – wie mit diesem Ergebnis nachgewiesen wurde –, dass der verbindende Pentenylrest ebenso wie der Allyllinker für Konjugationszwecke geeignet ist. Erste Kontrolluntersuchungen mit **76** und Impfuntersuchungen an Mäusen mit dem KLH-Konjugat **77** werden gegenwärtig durchgeführt.

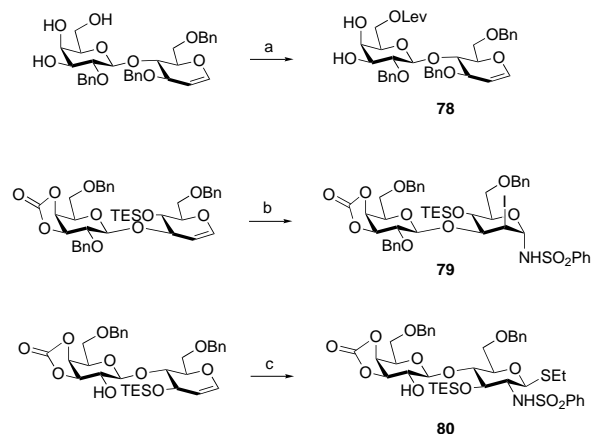
## 7.2. Synthese des N3-Antigens

Das Vorkommen von Anti-N3-Antikörpern im Serum von Patienten, die an Magen- oder Darmkrebs in einem frühen Stadium leiden, korreliert mit der Entwicklung des Tumors. Wir hoffen ebenso wie andere,<sup>[74]</sup> dass eine passend konjugierte Version dieses Antigens dazu dienen könnte, bereits die ersten winzigen Mengen des N3-Antikörpers zu entdecken. Ein Team in unserem Labor hat kürzlich eine Total-

synthese des Haupt- und des Neben-Antigens von N3 (**4a** und **4b** in Abbildung 1) und von biomedizinisch vielseitig verwendbaren Allylglycosiden vervollständigt.<sup>[75]</sup>

Wie bereits anhand von Schema 12 beschrieben, war der zentrale Punkt in unserer KH-1-Synthese die Polyfucosylierung eines geeignet geschützten Acceptors. Die strukturellen Eigenschaften von N3 (insbesondere ein hohes Ausmaß verzweigter Fucosereste) ließen erwarten, dass ein ähnlicher Ansatz hier auf einen Hexasaccharidkern angewendet werden könnte. Außerdem erkannten wir bald, dass der benötigte Hexasaccharidkern aus drei Disaccharid-Bausteinen nach der Glycal-Kupplungsmethode aufgebaut werden konnte.

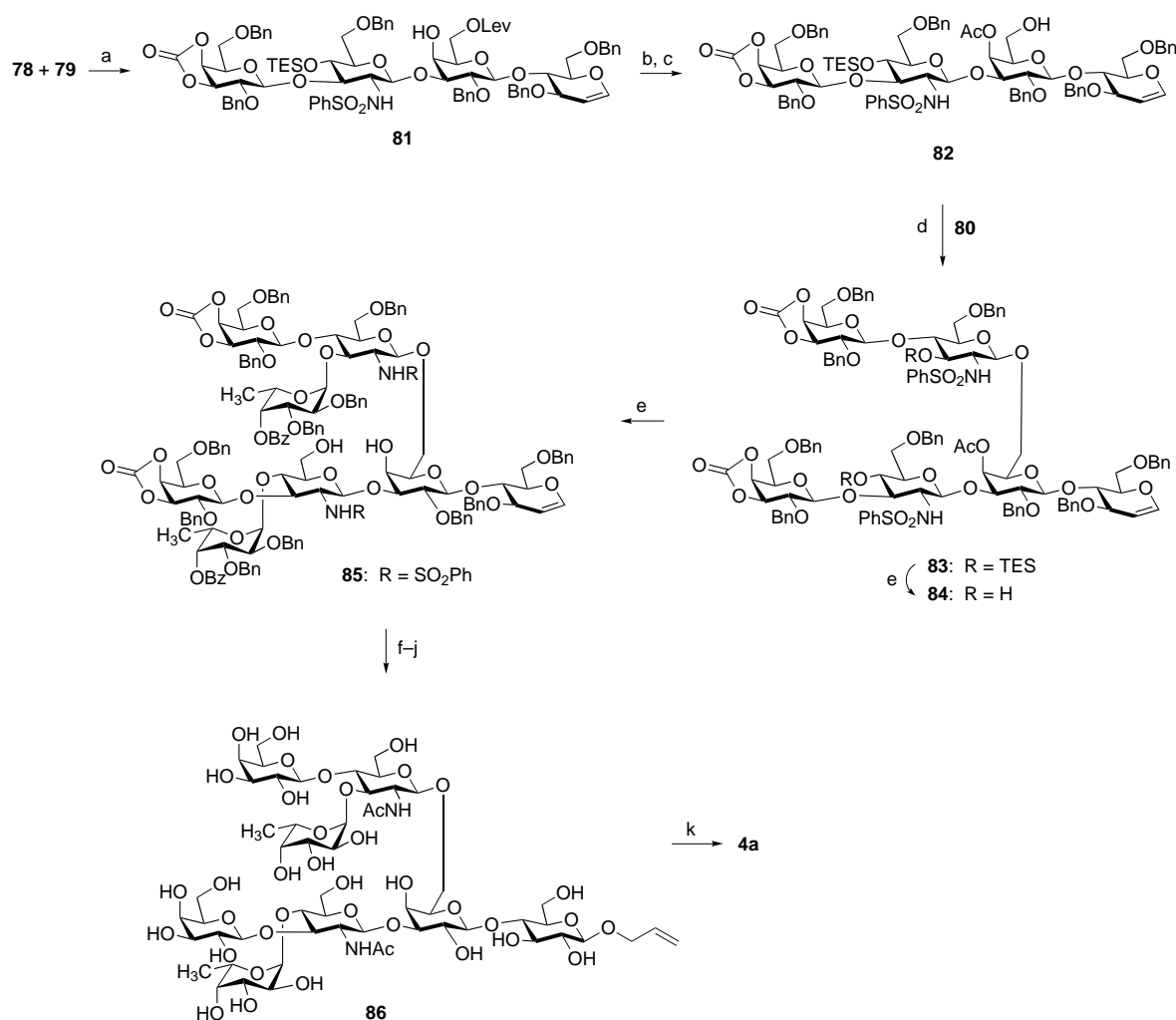
Die Herausforderung, eine geeignete Reaktionssequenz zum Anbringen und Entfernen der Schutzgruppen zu finden, spielte die entscheidende Rolle beim Erreichen dieses Ziels. Die Disaccharid-Bausteine für das Haupt- und das Nebenantigen von N3 sind in Schema 17 gezeigt. Das Disaccharid **78** enthält eine differenzierende Lävulinoylschutzgruppe an C6', die durch selektive Acylierung angebracht wurde. Die Synthese des Iodsulfonamids **79** gelang aus dem entsprechenden Glycal, das selbst aus Glycalbausteinen hergestellt wurde. Die erforderliche differenzierende Schutzgruppe in **79** ist die Silylgruppe an C4. Der Donor **80** schließlich leitet sich von dem entsprechenden Lactalderivat ab und enthält eine Silylgruppe an C3 zur selektiven Abspaltung.



Schema 17. Synthese der Disaccharid-Bausteine **78–80**: a) Lävulinsäure, CMPI, Et<sub>3</sub>N, Dioxan, 91%; b) I(coll)<sub>2</sub>ClO<sub>4</sub>, PhSO<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 90%; c) 1. Stufe (b), 94%; 2. LHMS, EtSH, DMF, 85%.

Kommen wir nun zur Synthese des N3-Hauptantigens (Schema 18): Der Iodsulfonamiddonor **79** wurde direkt mit dem aus **78** erhaltenen Stannan zum Tetrasaccharid **81** gekuppelt. Zum Einbau der zweiten Disaccharid-Einheit wurde die resultierende freie Hydroxygruppe acetyliert und die Lävulinoylschutzgruppe an C6' selektiv entfernt. Die so erhaltene Verbindung **82** wurde mit dem Donor **80** zum Hexasaccharidkern **83** in Form des Glycals umgesetzt.

Natürlich war viel Planungsarbeit zum Erreichen dieses Syntheseziels nötig. Beispielhaft für das Konzept ist die nachfolgende Entfernung der beiden Silylschutzgruppen aus **83**, um die beiden neuen Acceptorpositionen für die nachfolgende bevorstehende Fucosylierung freizulegen (**→84**). Daher waren wir sehr erfreut, dass die zweifache Fucosylier-



Schema 18. Synthese von **4a**) (Bu<sub>3</sub>Sn)<sub>2</sub>O, Benzol, **78**; dann **79**, AgBF<sub>4</sub>, THF, 4-Å-Molekularsieb, 67 %; b) Ac<sub>2</sub>O, DMAP (kat.), Pyridin, 88 %; c) H<sub>2</sub>NNH<sub>2</sub>, Pyridin, AcOH, 83 %; d) TBAF, AcOH, 93 %; e) **9**, Sn(OTf)<sub>2</sub>, DTBP, 4-Å-Molekularsieb, Toluol/THF (10:1), 76 %; f) Na/NH<sub>3</sub>, dann MeOH; g) Ac<sub>2</sub>O, Pyridin, DMAP, 58 % über 2 Stufen; h) DMDO, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>; i) Allylalkohol, 41 % über 2 Stufen; j) NaOMe, MeOH, 88 %; k) PdCl<sub>2</sub>, wässr. MeOH, quantitativ.

rung des Diols **84** mit dem Fluordonor **9** zum vollständig geschützten Octasaccharid, das dem im N3-Hauptantigen **85** entspricht, führte. Nach der Reaktionssequenz Schutzgruppenabspaltung, Epoxidation, Solvolyse mit Allylalkohol und Desacetylierung lag das biokonjugierbare Allylglycosid **86** des N3-Hauptantigens vor. Die Synthese von **4a** wurde durch die Entfernung der Allylgruppe abgeschlossen und führte zu einer Mischung des  $\alpha$ - und  $\beta$ -Isomers. Nach einer ähnlichen Strategie wurde auch die Synthese des N3-Nebenantigens **4b** und seines Allylglycosids mit den Disaccharid-Bausteinen **78** und **80** begonnen. Die weiteren Tests mit den vollsynthetischen N3-Antigenen sind im Gange, und die Untersuchungsergebnisse dazu werden zu gegebener Zeit veröffentlicht werden.

## 8. Antigen-Cluster als Impfstoffe auf Kohlenhydratbasis

Die Syntheseforschungen der nächsten Stufe in unserem Projekt bestanden in der Entwicklung einer allgemein einsetzbaren Synthesemethode zur Herstellung von Impfstoff-

konstrukten auf Glycopeptidbasis, die die Zelloberfläche von Tumorzellen nachahmen. Zuerst konzentrierten wir uns auf mucinähnliche, Sauerstoff-verknüpfte Glycopeptide. Im verbleibenden Teil dieses Aufsatzes werden folgende Themen behandelt: unsere Bemühungen, trimere Cluster von passend biokonjugierten Glycoepitopen herzustellen, anhand der Antikörperproduktion nachzuweisen, dass sie immunogen sind und dass sich weitere Untersuchungen an diesen Clustern als Antitumor-Impfstoffe lohnen. Mit einem Konstrukt beginnen gerade klinische Phase-II-Studien am Menschen.

Mucine, eine Familie großer, auf der Oberfläche von Epithelzellen exprimierter Glycoproteine, tragen große clusterartige Glycodomänen.<sup>[76]</sup> Ihre Aminosäuresequenzen enthalten einen sehr hohen Anteil an Serin- und Threoninresten, oftmals zwei bis fünf aneinander grenzende. Wie die Besetzung dieser Blöcke von Serin- und Threonin-Untereinheiten im Detail aussieht, ist in den meisten Fällen nicht bekannt.<sup>[77]</sup> Trotz der großen Variabilität der Mucin-Glycostrukturen scheint die Art, wie der erste Rest, ein *N*-Acetylgalactosaminrest, mit einem Serin- oder Threoninrest über eine  $\alpha$ -glycosidische Bindung verknüpft ist, weithin konserviert zu sein (Abbildung 8). Die Glycophorin-Familie  $\alpha$ -O-glycosi-

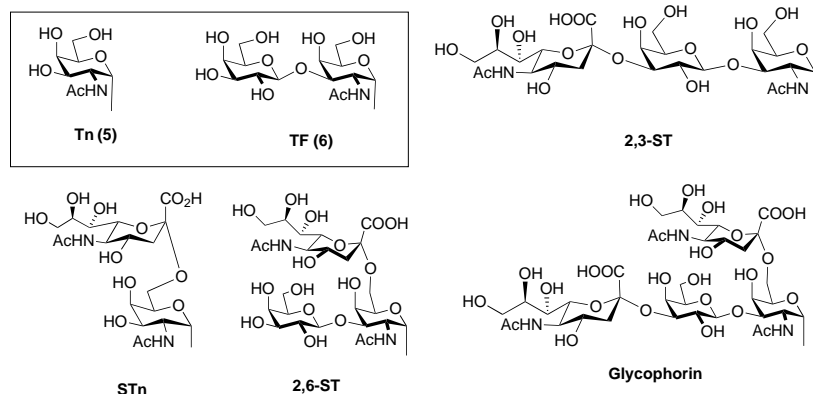


Abbildung 8. Die Glycophorin-Familie  $\alpha$ -O-glycosidisch gebundener Antigene.

disch verknüpfter Kohlenhydrate ist eine gut bekannte und untersuchte Klasse von Tumorantigenen.

Das Tn-Antigen (siehe auch 5, Abbildung 1) ist das einfachste Mitglied der Glycophorin-Familie (Abbildung 8). Dieses Antigen, ebenso wie das verwandte Thomsen-Friedreich-Disaccharid-(TF)-Antigen (siehe auch 6, Abbildung 1) kommt gewöhnlich in bösartigen Tumoren besonders des Dickdarms und der Prostata vor.<sup>[78]</sup> Diese einfachen Kohlenhydratantigene wurden synthetisiert und ihre Immunogenität in Konjugat-Impfstoffen bestätigt.<sup>[79]</sup> Beispielsweise wurde berichtet, dass Antikörpertiter gegen STn mit einer verbesserten Prognose bei Brustkrebs-Patientinnen korrelieren.<sup>[80]</sup> Vergleichbare Untersuchungen mit komplexeren Kohlenhydraten wurden kaum beschrieben; dadurch wurde bei uns großes Interesse an der Synthese großer clusterartiger Formen dieser Antigene geweckt.

## 9. Das Kassetten-Konzept

Die Antigene Tn und TF sind bereits früher durch verschiedene Methoden hergestellt worden,<sup>[81]</sup> zum Zeitpunkt unserer Untersuchungen bestand jedoch noch ein altbekanntes Problem in der Glycopeptidsynthese.<sup>[82]</sup> Der Kern des Problems war die Synthese von Kohlenhydratdomänen, die über Sauerstoffatome an die entscheidenden Aminosäuren Serin und Threonin gebunden sind, wobei eine starke stereochemische Kontrolle bei der Bildung der  $\alpha$ -glycosidischen Bindung gewährleistet sein muss. Nach vielen Untersuchungen mit komplexeren Molekülen konnten wir keine allgemein anwendbare Synthesemethode entwickeln, durch die die gewünschte Aminosäure auf ein vollständig synthetisiertes Substrat unserer Wahl mit hoher  $\alpha$ -Selektivität übertragen wird.

Die Methode zum Aufbau von Glycopeptiden, die wir konsequenterweise entwickelt haben und auf die wir uns stützen, verfolgt einen „Kassetten-Ansatz“ anstelle einer maximal konvergenten Synthese.<sup>[83]</sup> Gemäß dieser Strategie synthetisieren wir ein *N*-Acetylgalactosamin-Synthons, das stereospezifisch O-glycosidisch an eine Serin- (oder Threonin-)Seitenkette gebunden ist und eine differenzierbare Acceptorposition am GalNAc-Rest aufweist. Dieses Konstrukt dient als allgemein brauchbarer Einschub („Kassette“),

der mit einem Zielsaccharid verknüpft werden kann, das wiederum eine Glycosyldonorfunktion am reduzierenden Ende trägt. So vermeiden wir die direkte Kupplung einer Serin-Seitenketten-Hydroxygruppe an einen voll entwickelten, bereits recht komplexen Saccharid-donor. Der eindeutige Vorteil dieser Methode besteht darin, dass das sehr schwierige Problem der Verknüpfung über Sauerstoff nur einmal für alle reduzierenden Enden gelöst werden muss und die eingesparte Arbeitskapazität für den Aufbau des gewünschten Clustersystems genutzt werden kann.

In Abbildung 9 ist das Prinzip der Kassettenstrategie gezeigt. Mit dieser Strategie machten wir uns daran, gehäuft (als Cluster) auftretende immunogene Tn-Antigenstrukturen zu synthetisieren und daneben das Kassetten-Modell am einfachsten Fall clusterartiger TF-Antigenstrukturen zu testen. Wenn wir dieses Risiko meistern würden, wären Cluster mit anderen Mitgliedern der Glycophorin-Antigenfamilie letztlich in Reichweite.

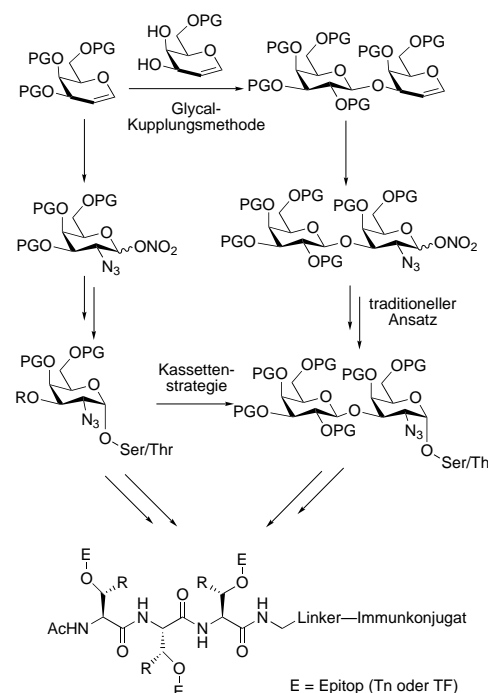
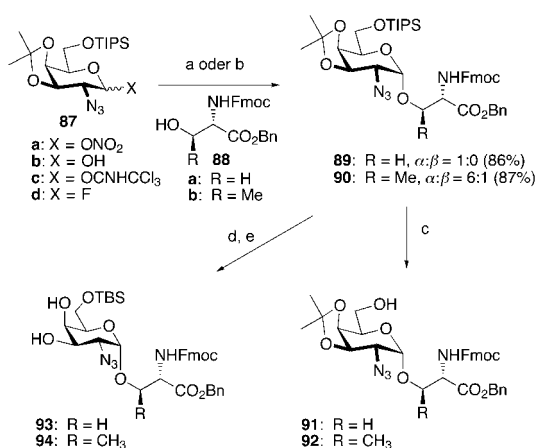


Abbildung 9. Kassettenmethode für die Glycopeptid-Synthese.

Der attraktivste Ansatz, den wir für die gewünschten  $\alpha$ -O-glycosidisch verknüpften Kassetten gefunden haben, ist in Schema 19 gezeigt.<sup>[84]</sup> Die Donoren **87c** und **87d** wurden aus dem anomeren Alkohol **87b** hergestellt, der seinerseits aus dem entsprechenden Glycal über eine Azidonitrierung<sup>[85]</sup> zu **87a** erhalten wurde. Im Falle des von Serin abgeleiteten Acceptors entstand bei der Glycosylierung fast ausschließlich das  $\alpha$ -glycosidische Produkt **89**; bei der Synthese des Threonin-Produkts **90** wurde nur wenig  $\beta$ -Glycosid gefunden. Beide Synthesen verliefen mit ausgezeichneter Ausbeute. So kamen wir darauf, **89** und **90** allgemein als Kassetten zu verwenden,



Schema 19. Synthese der Kassetten **91–94**. a) R=H: **87c**, TMSOTf, THF, –78 °C; b) R=Me: **87d**, [Cp<sub>2</sub>ZrCl<sub>2</sub>], AgOTf, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>; c) TBAF, AcOH, THF, 94–100%; d) I<sub>2</sub>/MeOH, 63–81%; e) TBSCl, Imidazol, DMF, 64–85%.

die am Ende einer komplexen Synthese eingeführt werden können. Um diese Strategie allerdings umsetzen zu können, sind eine Reihe orthogonal geschützter Module zur weiteren Verwendung als Glycosylacceptoren vonnöten. Entsprechend wurde mit den in Schema 19 gezeigten Reaktionen ein einfacher Zugang zur Position 6 der Acceptoren **91** und **92** erreicht und zur Position 3 der Acceptoren **93** und **94**.

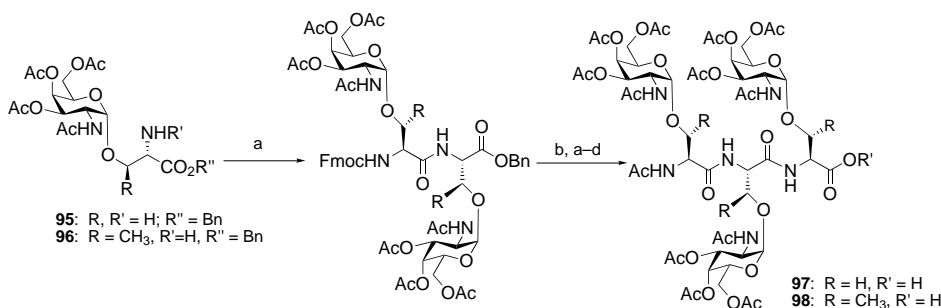
## 10. Clusterartige Tn-Immunkonjugate

### 10.1. Die Synthese clusterartiger Tn-Immunkonjugate

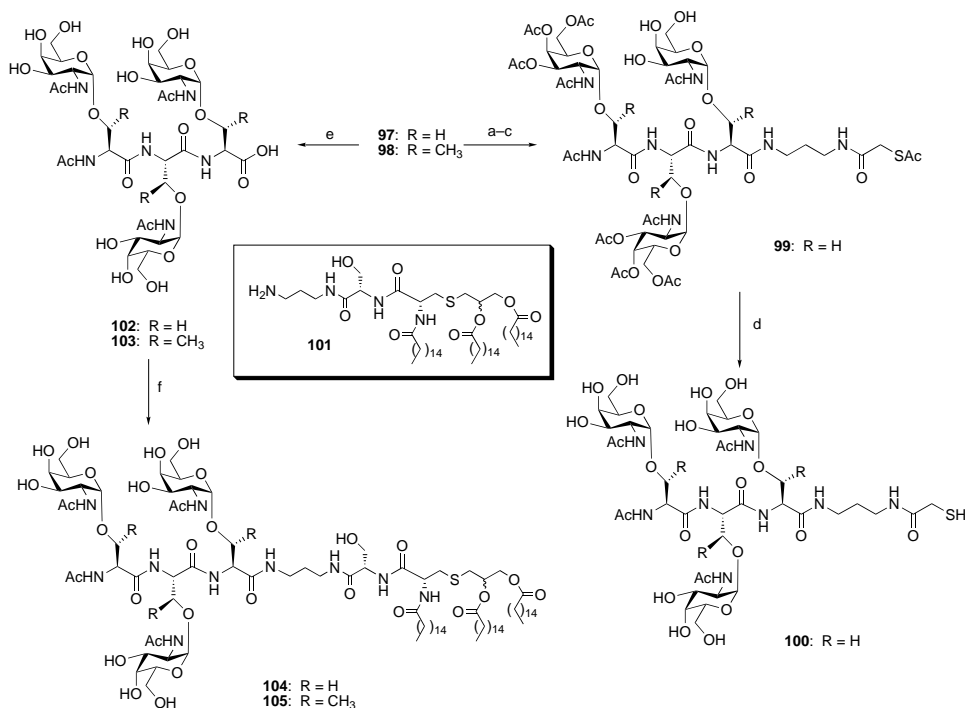
Mit der Absicht, einen Tn-Cluster zu synthetisieren, wandten wir uns den Verbindungen **95** und **96** zu.<sup>[86]</sup> Aus Mangel an verlässlichen Informationen darüber, welche Serin- oder Threoninreste innerhalb eines zusammenhängenden Bereichs ein optimales Epitop darstellen, wurde eine Sequenz von drei aufeinander folgenden Ser/Thr-Einheiten für eine erste Evaluierung ausgewählt.<sup>[87]</sup> Mit Standardverfahren zur Verknüpfung von Peptiden wurde die Synthese der trimeren Cluster **97** und **98**

vollendet (Schema 20). Abgeschlossen wurde die Synthese mit dem Schützen des Aminoterminus und der Freisetzung des verbleibenden Carboxyterminus für weitere Modifizierungen. Um einen brauchbaren Impfstoff zu erzeugen, gehören zu diesen Modifizierungen die Konjugation an ein synthetisches Lipopeptid als immunologischer Aktivator oder an ein immunogenes Trägerprotein wie in früheren Untersuchungen.

Zwei Reaktionswege, die für eine mögliche Konjugation verfolgt wurden, sind in Schema 21 aufgeführt. Der erste Weg verlief über die Anknüpfung eines geeigneten Linkers für die Konjugation mit einem Trägerprotein. Mit einer gegenüber unseren früheren Plänen leicht veränderten Strategie untersuchten wir die Sulfanylacetamid-Einheit für diesen Zweck.<sup>[88]</sup> Die Säure **97** wurde mit *tert*-Butyl-*N*-(3-aminopropyl)-carbammat in Gegenwart von IIDQ umgesetzt. Anschließend wurde die hierbei eingebaute Boc-Schutzgruppe abgespalten und dann die Kupplung mit *S*-Acetylthioglycolsäurepenta-



Schema 20. Synthese der trimeren Tn-Cluster. a) **95/96** (R' = Fmoc, R'' = H), IIDQ, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 85–97%; b) 20% Morpholin in DMF, 90–100%; c) Ac<sub>2</sub>O, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 70–76%; d) H<sub>2</sub>, Pd/C, MeOH, H<sub>2</sub>O, 85–95%.



Schema 21. Herstellung der clusterartigen Immunkonjugate **100**, **104** und **105**. a) H<sub>2</sub>N(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>NHBoc, IIDQ, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>; b) TFA, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>; c) SAMA-(OPfp), DIEA, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 81%; d) NaOMe, MeOH (entgast), 85%; e) NaOH, MeOH, 95%; f) **101**, NHS, EDC, DMF, DIEA oder HOAt, HATU, DMF, Collidin, 35–40%.

fluorphenylester durchgeführt. Das so erhaltene vollständig geschützte Glycopeptid **99** wurde dann einer unter sorgfältig kontrollierten Bedingungen (pH  $\approx$  9, entgastes MeOH) methanolysiert, wobei die clusterartig auftretende Verbindung **100** entstand, die nun mit dem ausgewählten Träger (KLH oder BSA) konjugiert werden kann.

Bei der Synthese eines vollsynthetischen Lipopeptids führten wir Tripalmitoyl-S-glycerylcysteinylserin (Pam<sub>3</sub>Cys **101**) nach der Methode von Tokoyuni et al. ein.<sup>[89]</sup> Pam<sub>3</sub>Cys hat sich als potenter Aktivator von Makrophagen und B-Lymphocyten herausgestellt und wurde erstmals von Tokoyuni et al. in ähnlicher Absicht mit ein bis drei Epitopen Serin-Tn eingeführt.<sup>[90]</sup> Zunächst wurden **97** und **98** durch vorsichtige Verseifung mit NaOMe/MeOH in die ungeschützten Glycopeptide **102** bzw. **103** überführt. Die Kupplung mit dem Amin **101** nach der NHS- oder der HOAt/HATU-Methode<sup>[91]</sup> lieferte dann die Glycolipide **104** bzw. **105**.

## 10.2. Diskussion der ersten immunologischen Ergebnisse

Die ersten Experimente dienten dazu, die Antikörper-Antwort auf die Impfung von Mäusen mit dem Tn(-cluster)-Lipopeptid **104** oder konventionellen Tn(c)-KLH oder -BSA-Konjugaten zu bewerten. Die Herstellung dieser Konjugate ging von der vorher beschriebenen Verbindung **100** aus, die kovalent an das Trägerprotein gebunden wurde.<sup>[92]</sup> An ein Molekül KLH wurden etwa 317 Cluster gebunden, an ein Molekül BSA dagegen nur etwa 7.

Diese Konjugate wurden zusammen mit dem Adjuvans QS-21 oder Tn(c)-pam **104** in Emulsion sowie **104** in Emulsion mit QS-21 zur Impfung von Gruppen von je fünf Mäusen verwendet. Alle Konstrukte erwiesen sich als immunogen. Die Mediane der IgM- und IgG-Titer (bestimmt mit ELISA) gegen Tn(c)-pam in den Seren sind in Tabelle 3 zusammengestellt. Obwohl Seren von Mäusen, die mit **104**/QS-21 immunisiert worden waren, keine starke Reaktion zeigten, induzierte das Konstrukt **100** konjugiert mit KLH hohe IgM- und mäßige IgG-Titer.

Auch die Zelloberflächenreaktivität der Anti-Tn(c)-Antikörper wurde mit Tn(c)-positiven LS-C-Dickdarmkrebszellen und Tn(c)-negativen LB-B-Dickdarmzellen bestimmt. Wieder wurden die Messungen mit Durchfluscytometrie und CDC-Assays durchgeführt. Seren von Mäusen, die mit **100**-KLH oder **100**-BSA in Kombination mit QS-21 geimpft wurden, zeigten deutliche IgM-Reaktivität mit LS-C-Dickdarm-Tumorzellen (durchfluscytometrisch bestimmt). Mit

Tabelle 3. Antikörper-Titer gegen Tn(c), mit ELISA bestimmt.<sup>[a]</sup>

Mäuse Impfstoff	Impfung		nach 3. Immunisierung	
	vorher			
	IgM	IgG	IgM	IgG
<b>104</b>	0	0	1350	150
<b>104</b> + QS-21	0	0	1350	50
<b>100</b> -KLH	0	0	12 150	450
<b>100</b> -BSA	0	0	1350	150

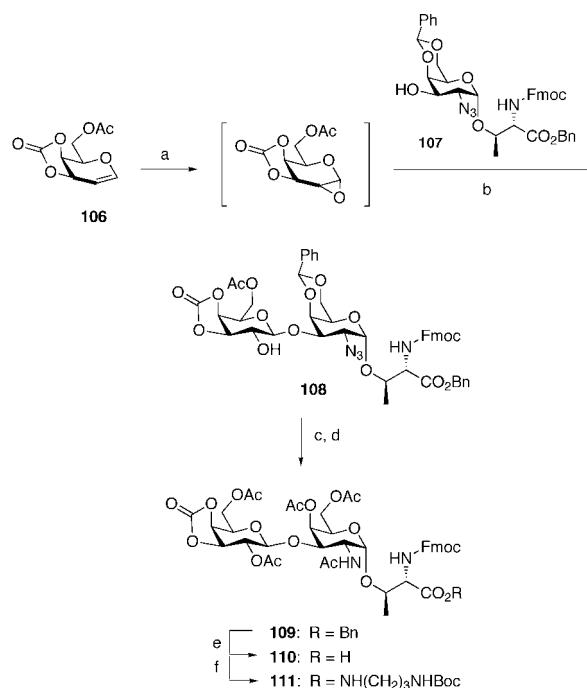
[a] Alle Titer sind als Medianwerte für Gruppen von fünf Mäusen angegeben.

dem gleichen Verfahren ließ sich auch eine signifikante IgG-Reaktivität nachweisen.

Auch hier wurden für einen Fortschritt in Richtung klinischer Versuche am Menschen durch diese Untersuchungen weitere Argumente geliefert. Eine Phase-I-Studie mit **100**-KLH bei Prostatakrebs-Patienten ist gerade abgeschlossen worden und führte zu extrem positiven serologischen Befunden. Daher planen wir nun, mit dem synthetischen Konstrukt **100**-KLH eine klinische Phase-II-Studie mit der Substanz selbst und mit einem multivalenten Cluster durchführen zu lassen.

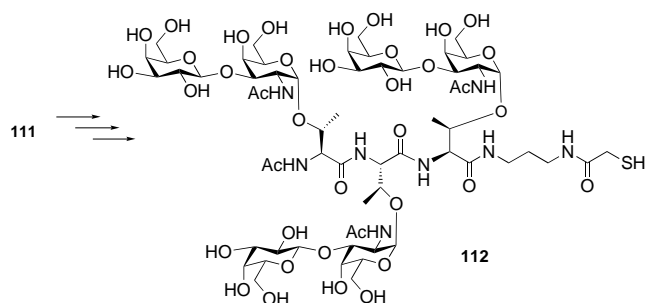
## 11. Synthese des clusterartigen TF-Antigens

Nachdem eine erfolgreiche Immunisierung mit clusterartigen Antigenen so eindrucksvoll demonstriert worden war, begannen wir als Nächstes mit der Synthese des clusterartigen TF-Disaccharids. Dabei stellt sich zunächst heraus, dass die Knüpfung der  $\alpha$ -O-glycosidischen Bindung am fertig synthetisierten Disaccharid durch die schlechte Selektivität sehr beeinträchtigt wurde. So ergab sich wie von selbst eine ideale Situation für die Anwendung der Kassettenmethode. Dafür wandten wir uns unserer Glycal-Kupplungsstrategie zu, um die Konstruktion zu erleichtern. Der Hintergedanke war dabei, die glycosylierte Aminosäure mit der notwendigen  $\alpha$ -O-glycosidischen Bindung an der richtigen Stelle als Glycosylacceptor einzusetzen. Wie in Schema 22 gezeigt, war das vom Glycal **106** abgeleitete Epoxid ein effizienter Donor, der bei der Reaktion mit der Kassette **107** zum  $\beta$ -glycosidisch gebundenen Disaccharid **108** führte.



Schema 22. Kassetten-Kupplung zur Synthese des TF-Disaccharids **108**. a) DMDO, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 0 °C; b) **107**, ZnCl<sub>2</sub>, THF, –78 °C  $\rightarrow$  RT, 97%; c) 1. 80% AcOH, 70 °C, 3 h; 2. Ac<sub>2</sub>O, DMAP, TEA, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 93%; d) CH<sub>3</sub>C(O)SH, 19 h, 87%; e) H<sub>2</sub>, Pd/C, 2 h, quantitativ; f) HOAt, HATU, DMF, Collidin, 84%.

An dieser Stelle entschieden wir uns, zunächst den geschützten Diamin-Linker einzuführen (siehe **111**) und dann die Reaktion zur Clusterbildung weiterzuführen.<sup>[93]</sup> Eine ähnliche Weiterbearbeitung der Zwischenprodukte wie bei der Synthese der Tn-Cluster lieferte trimere TF-Cluster des Typs **112** (Schema 23).



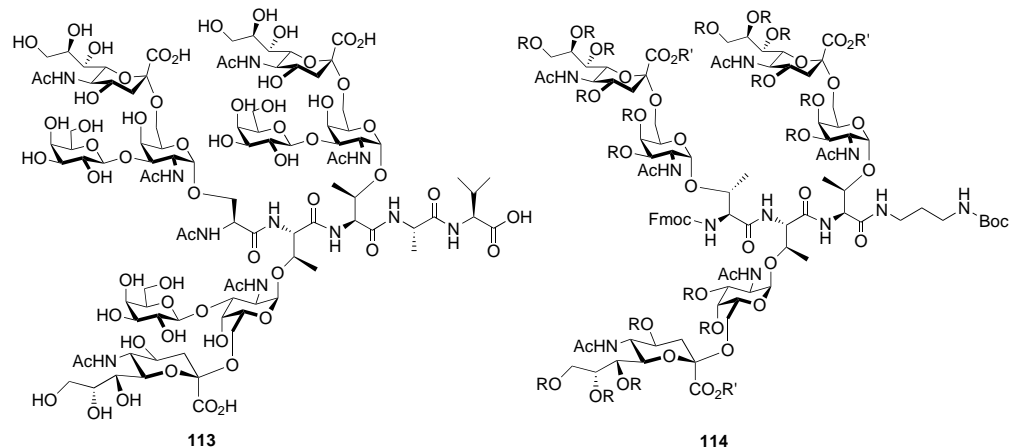
Schema 23. Synthese trimerer TF-Cluster.

Indem wir den Weg verfolgten, der in den hier beschriebenen Synthesen erarbeitet wurde, gipfelte unsere Kassettenstrategie in der Kombination mit den Methoden der Glycal-Kupplung auch in der Synthese zweier anderer clusterartiger Motive aus Proteinen der Glycophorin-Familie. Die Verbindungen **113**<sup>[94]</sup> und **114**<sup>[95]</sup>, die das 2,6-STF<sup>[96]</sup> bzw. das STn-Motiv<sup>[97]</sup> enthalten, wurden gemäß Schema 24 hergestellt. Konjugation und immunologische Evaluierung dieser Konstrukte werden gegenwärtig durchgeführt.

## 12. Der Lewis<sup>x</sup>-Glycopeptidcluster

### 12.1. Synthese des Lewis<sup>x</sup>-Glycopeptidclusters

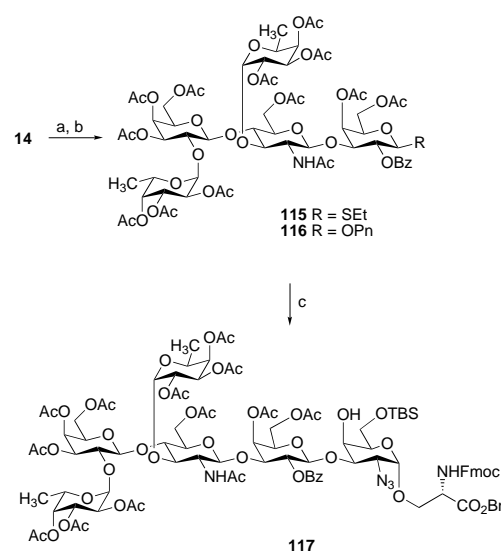
Die Komplexität vieler Anforderungen, die bei der Synthese einer vollsynthetischen homogenen Blutgruppenderminante in Clusterform überwunden werden musste, stellte eine klare Herausforderung an die Kunst der chemischen Synthese dar. Wir nahmen diese Herausforderung mit der Synthese von Lewis<sup>x</sup> in Clusterform an.<sup>[98]</sup> Wie stets bei Glycopeptid-Clustern waren wir auch hier daran interessiert,



Schema 24. 2,6-STF- und STn-Cluster **113** bzw. **114**.

Möglichkeiten für die Einführung einer flankierenden Sequenz am Carboxyterminus zu schaffen, wobei wir zum immunstimulierenden Pam<sub>3</sub>Cys-Rest gelangten. Betrachtet man das weite Spektrum an Schutzgruppen, die zur Durchführung einer solchen Synthese notwendig sind, erweist sich deren Auswahl als ein Hauptelement des ganzen Unterfangens.

Nachdem wir uns für die Kassettenstrategie entschieden hatten, wandten wir uns dem Glycal **14** zu, das bereits Le<sup>y</sup>-Spezifität zeigt (Schema 1). Nach Aktivierung des Glycals für die Glycosylierung konnte die Serin-Kassette **93** (Schema 19) als Acceptor eingesetzt werden. Das Glycal **14** wurde auf die übliche Art epoxidiert und in den Thioethyldonor **115** überführt (Schema 25).



Schema 25. Kassetten-Kupplung zur Synthese des Le<sup>y</sup>-Pentasaccharids. a) 1. DMDO, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 0 °C; 2. EtSH, TFA, 40–50 %, oder PnOH, ZnCl<sub>2</sub>, THF, –78 °C, 83 %; b) BzCl, Pyridin, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, DMAP, 40–50 % für R = SEt, 97 % für R = OPn; c) **93**, NIS, TFOH, 4-Å-Molekularsieb, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 79 % für R = SEt, 83 % für R = OPn.

Der Pentenylglycosiddonor<sup>[99]</sup> **116** wurde durch die Reaktion des Epoxids von **14** mit Pentenylalkohol hergestellt.<sup>[100]</sup> Die Benzoatschutzgruppe an C2 wurde eingeführt, um die Orthoesterbildung zu minimieren und um die gewünschte  $\beta$ -Selektivität bei der Glycosylierung zu ermöglichen. Bei der [5+1]-Kassetten-Kupplung in Gegenwart katalytischer Mengen an NIS/TFOH<sup>[101]</sup> entstand in ausgezeichneter Ausbeute das Hexasaccharid **117**, das den notwendigen Serinrest  $\alpha$ -O-glycosidisch gebunden an die komplexe Kohlenhydratdomäne enthält.

Das kassettengebundene Konstrukt **117** wurde anschließend in den Aufbau des Peptids eingebracht. Durch iterative

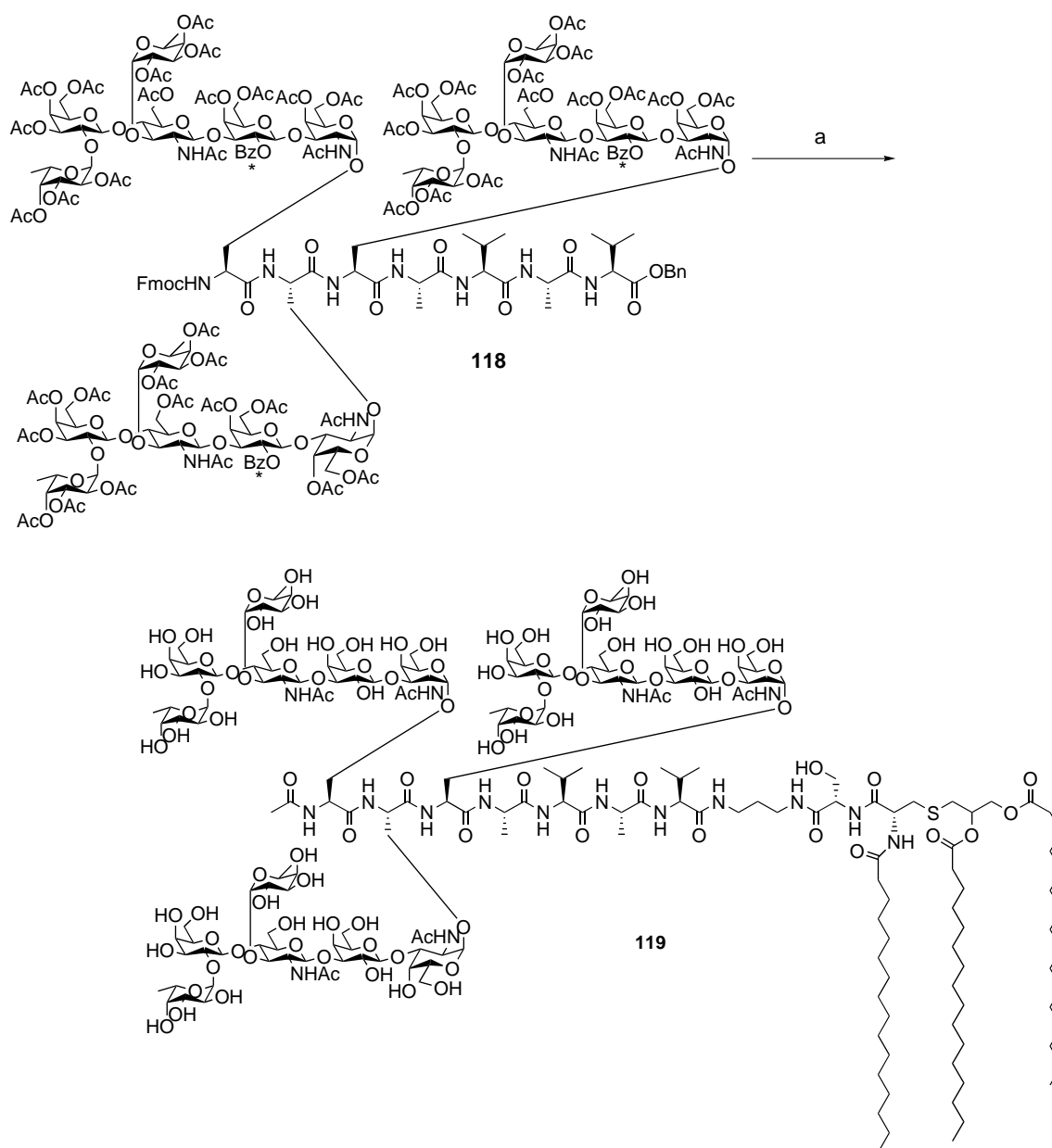


Peptidkupplungen, deren Ablauf durch unsere vorangegangenen Clustersynthesen vorgezeichnet war, gelangten wir zum trimeren Cluster **118** (Schema 26). Um **118** in ein funktionelles Immunkonjugat zu überführen, wurde die Fmoc-Schutzgruppe entfernt und die freie Aminogruppe durch Acetylierung geschützt. Durch hydrogenolytische Entfernung der Benzylgruppe wurde anschließend die C-terminale Carboxygruppe freigesetzt. Mit Hydrazinhydrat in Methanol wurden die Acetat- und Benzoatschutzgruppen in einem Schritt schonend entfernt und so das vollständig ungeschützte Glycopeptid hergestellt. Der Erfolg der Hydrazinolyse war von entscheidender Bedeutung, weil die Benzoatschutzgruppen an den drei Galactose-Spacern (durch Sternchen markiert), die die Determinanten von den Serinresten isolieren, unter den typischen Abspaltungsbedingungen stabil waren.<sup>[102]</sup> Schließlich wurde noch das Lipidamin Pam<sub>3</sub>Cys **101**

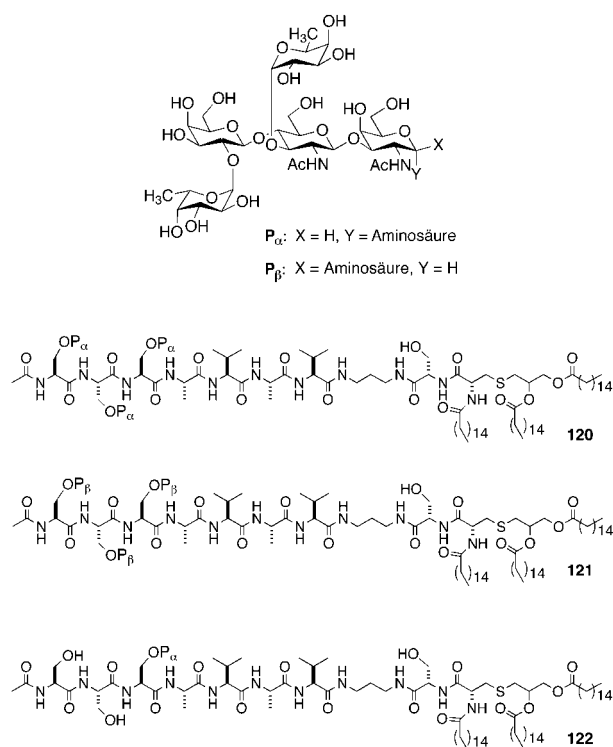
unter den gezeigten Bedingungen an den C-Terminus des Heptapeptids gekuppelt, womit diese Totalsynthese eines mucinähnlichen Clusters von totalsynthetischen Le<sup>y</sup>-Epitopen (**119**) abgeschlossen war.

## 12.2. Immunreaktionen auf Le<sup>y</sup>-Cluster

Während der Entwicklung der Totalsynthesen wurden drei zusätzliche Pentasaccharidkonstrukte, die keinen internen Galactoserest aufwiesen, nach einem ähnlichen Konzept hergestellt (Schema 27): ein trisubstituiertes Lipopeptid (**120**), in dem die  $\alpha$ -glycosidische GalNAc-Bindung von **119** erhalten ist, ein ähnliches Konstrukt mit einer  $\beta$ -glycosidisch gebundenen GalNAc-Einheit (**121**) und ein mit einem einzel-



Schema 26. Umsetzung des Heptapeptids **118** zum Antigenkonstrukt **119**. a) 1. Morpholin, Ac<sub>2</sub>O; 2. H<sub>2</sub>, Pd/C; 3. Hydrazinhydrat; 4. **101**, HOAt, HATU.



Schema 27. Synthetische clusterartige Sondenstrukturen.

nen Le<sup>y</sup>-Epitop substituiertes Lipopeptid (**122**). Bei diesem Reaktionsweg, bei dem wir nicht die Kassettenstrategie verfolgten, war die Glycopeptidsynthese nicht stereospezifisch, sodass sowohl das  $\alpha$ - als auch das  $\beta$ -Glycosyl-Serin-Stereoisomer isoliert werden konnte. So erhielten wir durch die Totalsynthese einschließlich der nicht stereospezifischen Variante die Möglichkeit, die Architektur der Zelloberfläche von Tumorzellen zu sondieren. Im Anschluss wurden immunologische Studien mit dem Hexasaccharidkonstrukt **119** und den Pentasaccharidkonstrukten **120–122** geplant, um die isomeren Strukturen zu vergleichen.

Die immunologischen Reaktivitäten der Le<sup>y</sup> enthaltenden Lipoglycopeptidkonstrukte **120–122** und des Le<sup>y</sup>-Ceramids **3** (als Kontrollprobe) gegenüber dem Anti-Le<sup>y</sup>-Antikörper 3S193<sup>[103]</sup> wurden mit ELISA bestimmt (Abbildung 10). Dieser Antikörper war mit Hilfe von Tumorzellen induziert worden, die wahrscheinlich das Mucinmotiv auf der Zelloberfläche exprimieren. Von den synthetisierten Konstrukten waren das  $\alpha$ -O-glycosidisch gebundene Hexasaccharid **120** und das  $\beta$ -O-glycosidisch gebundene Le<sup>y</sup> enthaltende Glycopeptid **122** die reaktivsten; sie waren mit der Le<sup>y</sup>-Ceramid-Kontrollverbindung **3** vergleichbar. Die  $\alpha$ -O-glycosidisch gebundenen Monomer- und Trimerkonstrukte (**122** bzw. **120**) waren etwa gleich reaktiv, wurden aber signifikant weniger stark gebunden als die Kontrollverbindung. Dies lässt vermuten, dass die Konstrukte mit einer  $\beta$ -glycosidischen Bindung zwischen dem terminalen Pentasaccharid und dem Peptid des tumorexprimierten Zelloberflächen-Le<sup>y</sup>, gegen das der Antikörper 3S193 induziert worden war, am ähnlichsten sind.

In der nächsten Phase wurden Mäuse mit den Le<sup>y</sup>-Pentasaccharidkonstrukten ohne Adjuvans immunisiert, und die Antiseren wurden gegen Le<sup>y</sup>-Ceramid, Le<sup>y</sup>-Mucin und Le<sup>y</sup> exprimierende Tumorzellen getestet, um die Auswirkung der

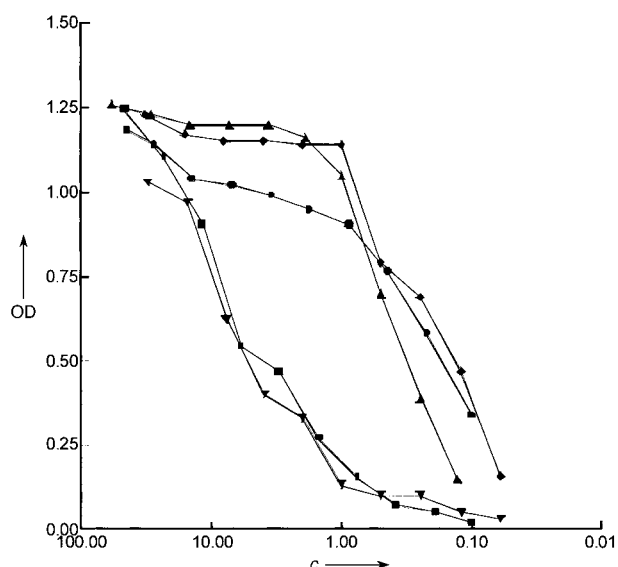


Abbildung 10. Reaktivität synthetischer Le<sup>y</sup>-Hexa- und Pentasaccharid-Lipoglycopeptide mit dem monoklonalen Maus-Anti-Le<sup>y</sup>-Antikörper 3S193, bestimmt mit ELISA. ♦: **119**, ■: **120**, ▲: **121**, ▼: **122**, ●: Le<sup>y</sup>-Ceramid **3**. Aufgetragen ist die optische Dichte OD gegen den Antigentiter in ng pro Probenvertiefung.

Antigenstruktur auf die Immunogenität und die Tumorzellreaktivität auf die Antikörperantwort zu untersuchen. Ein clusterartiges Auftreten der Glycodomäne wurde als entscheidende Eigenschaft für die Antikörperproduktion gegen natürliche Substrate erkannt. Die  $\alpha$ - und  $\beta$ -O-glycosidisch gebundenen trimeren Verbindungen (**120** und **121**) sind hoch immunogen mit einer Stärke der Antikörperantwort auf Le<sup>y</sup>-Ceramid und Le<sup>y</sup>-Mucin, die der von Le<sup>y</sup>-KLH ähnelt, während die Antwort des monomeren Konstrukts **122** auf das gleiche Target schwach war. Der gleiche Trend wurde bei der FACS-Analyse der Zelloberflächenreaktivität beobachtet. Antikörper gegen die clusterartigen Motive banden effizienter an die Le<sup>y</sup>-positiven Tumorzellen als an die monomeren Strukturen (74 gegenüber 54 %).

Interessanterweise ist die natürliche glycosidische Bindung an die Aminosäure, die in Mucin-Glycoproteinen vorkommt, nicht entscheidend für die Antikörper-Produktion gegen Le<sup>y</sup> tragende Glycolipide und Mucin, denn **120** ist ebenso immunogen wie **121**. Es fällt außerdem auf, dass gegen die Lipopeptidkonstrukte hauptsächlich IgM gebildet wird, während Le<sup>y</sup>-KLH IgG- und IgM-Antikörper induziert. Es scheint, dass die Pam<sub>3</sub>Cys-immunmodulierende Einheit in dieser Untersuchung nur B-Zellen stimulierte. Dennoch wird in dieser Untersuchung erstmals gezeigt, dass die Immunisierung mit synthetischen Antigenen, die eine clusterartige Struktur, aber kein Trägerprotein haben, die Immunisierung mit Zellen oder natürlichen Antigenen nachahmt. Weitere Ergebnisse dieser Untersuchungen werden in Kürze erscheinen.

### 13. Ausblick

Es ist seit geraumer Zeit bekannt, dass spezifische Typen von Glycolipiden oder Glycoproteinen, die in normalen

Zellen immunhistologisch nachgewiesen werden können, in Tumoren höher exprimiert werden. Die stärkere Expression auf Tumorzellen verursacht eine Antikörperreaktion, die das Zelloberflächen-Glycokonjugat als tumorassoziertes Antigen erkennbar macht. Solche Glycokonjugate als tumorassozierte Antigene zu verwenden ist die Grundlage für die Entwicklung von Antitumor-Impfstoffen auf Kohlenhydratbasis.

Tumorantigene auf Kohlenhydratbasis wie TF, TN, KH-1, Le<sup>y</sup> und Globo-H sind geeignete Zielstrukturen für aktive und passive Immuntherapien, weil sie an der Oberfläche von malignen Zellen in verschiedenen Tumoren überexprimiert vorliegen. Außerdem sind sie mit geeigneten monoklonalen Antikörpern immunologisch charakterisiert worden, sodass es für immunologische Studien relevante serologische Marker gibt. Wir haben solche Studien in der Hoffnung durchgeführt, dass Patienten, die mit synthetischen Kohlenhydrat-Impfstoffen zusammen mit einem Adjuvans immunisiert wurden, Antikörper gegen die Tumorzellen bilden würden und dass die Bildung solcher Antikörper gegen die Ausbreitung der Tumoren wirken würden, sodass die Krankheitsprognose besser werden sollte.

Mit Blick auf die mucinähnlichen Konstrukte und die Kassettenstrategie glauben wir, dass zwar komplexe Anforderungen von Fall zu Fall bearbeitet werden müssen, die hier präsentierten Ergebnisse aber deutlich zeigen, dass für die notwendigen chemischen Umsetzungen allgemeine Methoden entwickelt werden können. Die Synthese von **119** ist ein besonders gutes Beispiel für unseren Erfolg. Wir wenden derzeit die Kassettenstrategie auf die Synthese antigener Strukturen an, die das Globo-H-Epitop enthalten. Immer ausgefeiltere und hoffentlich immer realistischere molekulare Modelle der Zelloberfläche können nun zusammengefügt und spektroskopisch<sup>[104]</sup> sowie bezüglich der Immunerkennung überprüft werden.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass sich die chemische Synthese erfolgreich der Herausforderung der komplexen Kohlenhydratsynthese gestellt hat und dies auch weiterhin tun wird. Die Möglichkeiten, komplizierte strukturelle und im weiteren Verlauf auch mechanistische Fragen im Hinblick auf die Entwicklung von Antitumor-Impfstoffen zu bearbeiten, werden dementsprechend zunehmen. Obwohl die Untersuchungen, die möglicherweise für Antitumor-Impfstoffe besonders wichtig sind, noch in den Kinderschuhen stecken, werden die notwendigen komplexen Substanzen für weitere präklinische und klinische Studien zunehmend verfügbar. Es ist zu hoffen, dass die kreative Konfrontation zwischen komplexer targetorientierter Synthese und Immunologie klinische Früchte tragen wird.

## Abkürzungen

Ac	Acetyl
Bn	Benzyl
Boc	<i>tert</i> -Butoxycarbonyl
BSA	Rinderserumalbumin
Bz	Benzoyl
CDC	complement-dependent cytotoxicity
CMPI	2-Chlor-1-methylpyridiniumiodid

coll	Collidin (2,4,6-Trimethylpyridin)
Cp	Cyclopentadienyl
DAST	Diethylaminoschwefeltrifluorid
DDQ	2,3-Dichlor-5,6-dicyan-1,4-benzochinon
DIEA	Diisopropylethylamin
DMAP	4-Dimethylaminopyridin
DMDO	3,3-Dimethyldioxiran
DTBP	Di- <i>tert</i> -butylpyridin
EDC	<i>N'</i> -(3-Dimethylaminopropyl)- <i>N</i> -ethylcarbodiimid
ELISA	enzyme-linked immunosorbant assay
Fmoc	Fluoren-9-ylmethoxycarbonyl
HATU	<i>N</i> -[(Dimethylamino)-1 <i>H</i> -1,2,3-triazol[4,5- <i>b</i> ]-pyridin-1-ylmethyl]- <i>N</i> -methylmethanaminiumhexafluorophosphat
HOAt	7-Aza-1-hydroxy-1 <i>H</i> -benzotriazol
IIDQ	2-(2-Methylpropoxy)-1(2 <i>H</i> )-chinolincarbonsäure-(2-methylpropyl)ester
KLH	keyhole limpet hemocyanin
Lev	Lävulinoyl
LHMDS	Lithium-bis(trimethylsilyl)amid
NHS	<i>N</i> -Hydroxysuccinimid
NIS	<i>N</i> -Iodsuccinimid
OTf	Trifluormethansulfonat
Pam <sub>3</sub> Cys	Tripalmitoyl- <i>S</i> -glycerylcysteinylserin
PMB	<i>para</i> -Methoxybenzyl
Pn	Pentenyl
PPTS	Pyridinium- <i>p</i> -toluolsulfonat
PSA	Prostata-spezifisches Antigen
SAMA-(OPfp)	<i>S</i> -Acetylmercaptoessigsäurepentafluorphenylester
SCLC	Small cell lung cancer
TBAF	Tetrabutylammoniumfluorid
TBDPS	<i>tert</i> -Butyldiphenylsilyl
TBS	<i>tert</i> -Butyldimethylsilyl
TEA	Triethylamin
TES	Triethylsilyl
Tf	Trifluormethansulfonyl
TFA	Trifluoressigsäure
TFAA	Trifluoressigsäureanhydrid
TIPS	Triisopropyl
TMS	Trimethylsilyl

*Dieser Aufsatz ist Dr. Paul Marks, dem Präsidenten des Memorial Hospital und des Memorial Sloan-Kettering Cancer Center, für seinen Weitblick und seine Leistungen gewidmet. Die hier beschriebenen Arbeiten wurden von den National Institutes of Health gefördert (Nr. A116943, CA28824 und HL25848), außerdem durch Forschungsmittel des Sloan-Kettering Institute für S.J.D. (Förder-Nr. CA-08748) und durch ein Postdoktoranden-Stipendium der NIH (Nr. GM19578) für J.R.A. Wir danken Dr. George Sukenick für die NMR- und MS-Analysen.*

Eingegangen am 24. Juni 1999 [A 350]  
Übersetzt von Dr. Burkard Neuß, Jülich

[1] A. M. Silverstein in *A History of Immunology*, Academic Press, San Diego, **1989**, Kap. 1 und 12.

- [2] a) Lanzavecchia, *Science* **1993**, 260, 937–944; b) D. M. Pardoll, *Curr. Opin. Immunol.* **1993**, 5, 719–725; c) P. O. Livingston, *Curr. Opin. Immunol.* **1992**, 4, 2; d) G. Dranoff, E. Jaffee, A. Lazenby, P. Golumbek, H. Levitsky, K. Brose, V. Jackson, H. Hamada, D. Pardoll, R. C. Mulligan, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1993**, 90, 3539; e) M.-H. Tao, R. Levy, *Nature* **1993**, 362, 755; f) T. Boon, *Int. J. Cancer* **1993**, 54, 177.
- [3] a) S. Hakomori, *Cancer Res.* **1985**, 45, 2405; b) T. Feizi, *Cancer Surv.* **1985**, 4, 245; c) K. O. Lloyd, *Cancer Biol.* **1991**, 2, 421; d) P. O. Livingston *Immunol. Rev.* **1995**, 145, 147–166; e) Y. J. Kim, A. Varki, *Glycoconjugate J.* **1997**, 14, 569.
- [4] a) S. Ho, Y. S. Kim, *Semin. Cancer Biol.* **1991**, 2, 389; b) A. K. Singal, *Semin. Cancer Biol.* **1991**, 2, 379; c) S. R. Hull, A. Bright, K. L. Carraway, *Cancer Commun.* **1989**, 1, 261; d) S. Hakomori, *Cancer Cells* **1991**, 3, 461; e) S. Hakomori, *Cancer Res.* **1996**, 56, 5309.
- [5] Übersicht: S. Hakomori, Y. Zhang, *Chem. Biol.* **1997**, 4, 97.
- [6] Einige frühe Erfolge: a) G. D. MacLean, M. B. Bowen-Yacyshyn, J. Samuel, A. Meikle, G. Stuart, J. Nation, S. Poppema, M. Jerry, R. R. Koganty, T. Wong, B. M. Longnecker, *J. Immunol.* **1992**, 11, 292; b) P. Y. S. Fung, M. Made, R. R. Koganty, B. M. Longnecker, *Cancer Res.* **1990**, 50, 4308; c) P. O. Livingston, G. Ritter, P. Srivastava, M. Padavan, M. J. Calves, H. F. Oettgen, L. J. Old, *Cancer Res.* **1989**, 49, 7045; d) Y. Haraday, M. Sakatsume, G. A. Nores, S. Hakomori, M. Taniguchi, *Jpn. J. Cancer Res.* **1989**, 80, 988.
- [7] a) P. O. Livingston, S. Zhang, K. O. Lloyd, *Cancer Immunol. Immunother.* **1997**, 45, 1; b) G. Ragupathi, *Cancer Immunol. Immunother.* **1996**, 43, 152.
- [8] a) I. Hellstrom, K. E. Hellstrom, *J. Immunother.* **1998**, 21, 119; b) P. Möller, G. J. Hammerling, *Cancer Surv.* **1992**, 13, 101.
- [9] a) A. J. Treves, C. Carnaud, N. Tranin, M. Feldman, I. R. Cohen, *Eur. J. Immunol.* **1974**, 4, 722; b) S. Fujimoto, M. I. Greene, A. H. Sehon, *J. Immunol.* **1976**, 116, 791; c) D. Naor, *Adv. Cancer Res.* **1979**, 29, 45; d) E. S. Dye, R. J. North, *J. Exp. Med.* **1981**, 154, 1033; d) H. Kirchner, T. M. Chused, R. B. Herberman, H. T. Holden, D. H. Lavrin, *J. Exp. Med.* **1974**, 139, 1473.
- [10] a) T. Fujii, T. Igarashi, S. Kishimoto, *J. Natl. Cancer Inst.* **1987**, 78, 509; b) I. Kamo, H. Freidman, *Adv. Cancer Res.* **1977**, 25, 271; c) K. E. Hellstrom, I. Hellstrom, *Adv. Immunol.* **1974**, 18, 209; d) J. Tamerius, J. Nepom, I. Hellstrom, K. E. Hellstrom, *J. Immunol.* **1976**, 116, 724; e) T. Tada, S. Ohzeki, K. Utsumi, H. Takiuchi, M. Muramatsu, X.-F. Li, J. Shimizu, H. Fujiwara, T. Hamaoka, *J. Immunol.* **1991**, 146, 1077.
- [11] a) W. F. Bodmer, M. J. Browning, P. Krausa, A. Rowan, D. C. Bicknell, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1993**, 690, 42; b) H. Ikeda, B. Lethe, F. Lehmann, N. van Baren, J. F. Baurain, C. de-Smet, H. Chambost, M. Vitale, A. Moretta, T. Boon, P. G. Coulie, *Immunity* **1997**, 6, 199; c) G. Torre Amione, R. D. Beauchamp, H. Koeppen, B. H. Park, H. Schreiber, H. L. Moses, D. A. Rowley, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1990**, 87, 1486.
- [12] a) P. O. Livingston, *Immunol. Rev.* **1995**, 145, 147; b) L. J. Old, *Cancer Res.* **1981**, 41, 361.
- [13] P. O. Livingston in *Molecular Diagnosis, Prevention and Treatment of Melanoma* (Hrsg.: J. K. Kirkwood), New York, **1997**.
- [14] a) P. C. Jones, L. L. Sze, P. Y. Lui, D. L. Morton, R. F. Irie, *J. Natl. Cancer Inst.* **1981**, 66, 249; b) P. O. Livingston, G. Y. Wong, S. Adulri, Y. Tao, M. Padavan, R. Parente, C. Hanlon, M. J. Calves, F. Helling, G. Ritter, *J. Clin. Oncol.* **1994**, 12, 1036; c) S. F. Winter, Y. Sekido, J. D. Minna, D. McIntire, B. E. Johnson, A. F. Gazdar, D. P. Carbone, *J. Natl. Cancer Inst.* **1993**, 85, 2012; d) G. Reithmüller, E. Schneider-Gadicke, G. Schlimok, W. Schmiegel, R. Raab, K. Höffken, R. Gruber, H. Pichlmaier, H. Hirche, R. Pichlmayr, P. Buggisch, J. Witte, *Lancet* **1994**, 343, 1177.
- [15] a) J. Portoukalian, S. Carrel, J. F. Dore, P. Rumke, *Int. J. Cancer* **1991**, 49, 893; b) M. H. Ravindranath, D. L. Morton, R. F. Irie, *Cancer Res.* **1989**, 49, 3891.
- [16] M. J. Francis in *Vaccines: Recent Trends and Progress* (Hrsg.: G. Gregoriadis, A. C. Allison, G. Poste), Plenum Press, New York, **1991**.
- [17] a) T. Feizi, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **1993**, 3, 701; b) S. D. Rosen, C. R. Bertozzi, *Curr. Biol.* **1996**, 6, 261; c) A. Varki, *Glycobiology* **1993**, 3, 97; d) M. L. Phillips, E. Nudelman, F. C. A. Gaeta, M. Perez, A. K. Singal, S. Hakomori, J. C. Paulson, *Science* **1990**, 250, 1130; e) M. J. Polley, M. L. Phillips, E. Wagner, E. Nudelman, A. K. Singal, S. Hakomori, J. C. Paulson, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1991**, 88, 6224; f) L. A. Lasky, *Science* **1992**, 258, 964; g) D. J. Miller, M. B. Macek, B. D. Schur, *Nature* **1992**, 357, 589; h) T. Feizi, *Nature* **1985**, 314, 53.
- [18] J. B. Lowe in *The Molecular Basis of Blood Diseases* (Hrsg.: G. Stamatoyannopoulos, A. W. Nienhuis, P. W. Majerus, H. Varmus), Saunders, Philadelphia, **1987**, Kap. 8.
- [19] a) G. D. MacLean, M. A. Reddish, M. B. Bowen-Yacyshyn, S. Poppema, B. M. Longnecker, *Cancer Investigat.* **1994**, 12, 46; b) T. Toyokuni, A. K. Singhal, *Chem. Soc. Rev.* **1995**, 24, 23; c) R. Lo-Man, S. Bay, S. Vicher-Guerre, E. Deriaud, D. Cantacuzene, C. Leclerc, *Cancer Res.* **1999**, 59, 1520, zit. Lit.
- [20] a) S. J. Danishefsky, M. T. Bilodeau, *Angew. Chem.* **1996**, 108, 1482; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1996**, 35, 1380.
- [21] a) M. R. Stroud, S. B. Levery, S. Martensson, M. E. K. Salyan, H. Clausen, S. Hakomori, *Biochemistry* **1994**, 33, 10672; b) C.-T. Yuen, K. Bezouska, J. O'Brien, M. Stoll, R. Lemoine, A. Lubineau, M. Kiso, A. Hasegawa, N. J. Bockovich, K. C. Nicolaou, T. Feizi, *J. Biochem.* **1994**, 269, 1595; c) M. R. Stroud, S. B. Levery, E. Nudelman, M. E. K. Salyan, J. A. Towell, C. E. Roberts, M. Watanabe, S. Hakomori, *J. Biol. Chem.* **1991**, 266, 8439.
- [22] a) M. A. Bernstein, L. D. Hall, *Carbohydr. Res.* **1980**, 78, C1; b) R. U. Lemieux, *Chem. Soc. Rev.* **1978**, 7, 423, zit. Lit.
- [23] S. Müller, S. Goletz, N. Packer, A. Gooley, A. M. Lawson, F.-G. Hanisch, *J. Biol. Chem.* **1997**, 272, 24780.
- [24] S. J. Danishefsky, V. Behar, J. T. Randolph, K. O. Lloyd, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, 117, 5701.
- [25] a) K. O. Lloyd, *Am. J. Clin. Pathol.* **1987**, 87, 129; b) K. O. Lloyd, *Cancer Biol.* **1991**, 2, 421.
- [26] B. W. Yin, C. L. Finstad, K. Kitamura, M. G. Federici, M. Welshinger, V. Kudryashov, W. J. Hoskins, S. Welt, K. O. Lloyd, *Int. J. Cancer* **1996**, 65, 406.
- [27] W. N. Haworth, E. L. Hirst, M. M. T. Plant, R. J. W. Reynolds, *J. Chem. Soc.* **1930**, 2644.
- [28] S. J. Danishefsky, J. Gervay, J. M. Peterson, F. E. McDonald, K. Koseki, T. Oriyama, D. A. Griffith, C.-H. Wong, D. P. Dumas, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, 114, 8329.
- [29] T. Mukaiyama, Y. Murai, S. Shoda, *Chem. Lett.* **1981**, 431.
- [30] a) S. J. Danishefsky, K. Koseki, D. A. Griffith, J. Gervay, J. M. Peterson, F. E. McDonald, T. Oriyama, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, 114, 8331; b) D. A. Griffith, S. J. Danishefsky, *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, 112, 5811; c) D. A. Griffith, S. J. Danishefsky, *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, 113, 5863.
- [31] R. L. Halcomb, S. J. Danishefsky, *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, 111, 6661.
- [32] Methoden zur Zuckeranalyse: a) K. O. Lloyd, A. Savage, *Glycoconjugate J.* **1991**, 8, 493; b) M. R. Hardy, R. R. Townsend, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1988**, 85, 3289.
- [33] V. Behar, Dissertation, Columbia University, New York, **1994**.
- [34] R. R. Schmidt, P. Zimmermann, *Tetrahedron Lett.* **1986**, 27, 481.
- [35] V. Kudryashov, H. M. Kim, G. Ragupathi, S. J. Danishefsky, P. O. Livingston, K. O. Lloyd, *Cancer Immunol. Immunother.* **1998**, 45, 281.
- [36] In früheren Untersuchungen konnte nachgewiesen werden, dass QS-21 anderen Adjuvantien überlegen ist. Außerdem ist es nicht toxisch und ist sicher in der Anwendung beim Menschen: P. O. Livingston, R. R. Koganty, B. M. Longnecker, K. O. Lloyd, M. J. Calves, *Vaccine Res.* **1991**, 1, 99; b) C. R. Kensil, U. Patel, M. Lennick, D. Marciani, *J. Immunol.* **1991**, 146, 431.
- [37] Dieses Konjugat wurde nach einem kürzlich entwickelten Verfahren hergestellt, bei dem das Kohlenhydrat zuerst an 4-(N-Maleidomethyl)cyclohexan-1-carboxyhydrazid (M2C2H) gekuppelt und das Produkt dann an 2-Iminothiolan-derivatisiertes KLH gebunden wird. Die Produktausbeuten bei dieser Methode mit **15** sind erheblich verbessert (39% bezogen auf den eingesetzten Zucker), und das Verhältnis Kohlenhydrat:Protein ist am besten bei KLH-Konjugaten (540:1): G. Ragupathi, L. Howard, S. Cappello, R. R. Koganty, D. Qiu, B. M. Longnecker, M. A. Reddish, K. O. Lloyd, P. O. Livingston, *Cancer Immunol. Immunother.* **1999**, 48, 1, zit. Lit.
- [38] Nicht alle Kohlenhydrat-Immunkonjugate können die Bildung von Antikörpern verstärken. KLH-Konjugate scheinen dafür besonders gut geeignet zu sein; für einen systematischen Vergleich einer Reihe von Trägerproteinen und Adjuvantien siehe: F. Helling, Y. Shang, M. Calves, H. F. Oettgen, P. O. Livingston, *Cancer Res.* **1994**, 54, 197.

- [39] a) R. Kannagi, S. B. Levery, F. Ishijamiki, S. Hakomori, L. H. Schevinsky, B. B. Knowles, D. Solter, *J. Biol. Chem.* **1983**, 258, 8934; b) E. G. Bremer, S. B. Levery, S. Sonnino, R. Ghidoni, S. Canevari, R. Kannagi, S. Hakomori, *J. Biol. Chem.* **1984**, 259, 14773.
- [40] S. Menard, E. Tagliabue, S. Canevari, G. Fossati, M. I. Colnaghi, *Cancer Res.* **1983**, 43, 1295.
- [41] V. Kudryashov, G. Ragupathi, I. J. Kim, M. E. Breimer, S. J. Danishefsky, P. O. Livingston, K. O. Lloyd, *Glycoconjugate J.* **1998**, 15, 243.
- [42] a) P. O. Livingston, *Cancer Biol.* **1995**, 6, 357–366; b) S. Zhang, C. Cordon-Cardo, H. S. Zhang, V. E. Reuter, S. Adluri, W. B. Hamilton, K. O. Lloyd, P. O. Livingston, *Int. J. Cancer* **1997**, 3, 42–49.
- [43] S. Zhang, H. S. Zhang, V. E. Reuter, S. F. Slovin, H. I. Scher, P. O. Livingston, *Clin. Cancer Res.* **1998**, 4, 295–302.
- [44] I. J. Kim, T. K. Park, S. Hu, K. Abrampah, S. Zhang, P. O. Livingston, S. J. Danishefsky, *J. Org. Chem.* **1995**, 60, 7716.
- [45] Die Synthesen der Fragmente DEF und CDEF von **1** wurden bereits publiziert; beide Strukturen binden nachweislich an MBr1: L. Lay, F. Nicotra, L. Panza, G. Russo, *Helv. Chim. Acta* **1994**, 77, 509–514; L. Lay, L. Panza, G. Russo, D. Colombo, F. Ronchetti, E. Adobati, S. Canevari, *Helv. Chim. Acta* **1995**, 78, 533–538.
- [46] Eine weitere Synthese des Hexasaccharidrests von Globo-H findet sich bei: J. Lassaletta, R. R. Schmidt, *Liebigs Ann.* **1996**, 1417.
- [47] Eine Kurzmitteilung über die Totalsynthese: M. T. Bilodeau, T. K. Park, S. Hu, J. T. Randolph, S. J. Danishefsky, P. O. Livingston, S. Zhang, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, 117, 7840.
- [48] T. K. Park, I. J. Kim, S. Hu, M. T. Bilodeau, J. T. Randolph, O. Kwon, S. J. Danishefsky, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, 118, 11488.
- [49] a) K. C. Nicolaou, T. J. Caulfield, H. Kataoka, N. A. Stylianides, *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, 112, 3693; b) K. C. Nicolaou, C. W. Hummel, N. J. Bockovich, C.-H. Wong, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1991**, 870.
- [50] Zur Synthese von SSEA-3 siehe: a) S. Nunomura, T. Ogawa, *Tetrahedron Lett.* **1988**, 29, 5681; b) T. K. Park, I. J. Kim, S. J. Danishefsky, *Tetrahedron Lett.* **1995**, 36, 9089.
- [51] Zur Synthese von Gb3, das die ABC-Trisaccharidomäne enthält, siehe: K. C. Nicolaou, T. Caulfield, H. Kataoka, T. Kumazawa, *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, 110, 7910.
- [52] G. Ragupathi, T. K. Park, S. Zhang, I. J. Kim, L. Graber, S. Adluri, K. O. Lloyd, S. J. Danishefsky, P. O. Livingston, *Angew. Chem.* **1997**, 109, 66; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1997**, 36, 125.
- [53] Ein anderes Beispiel für die gegenüber anderen Trägerproteinen gesteigerte Immunogenität von KLH: F. Helling, S. Zhang, A. Shang, S. Adluri, M. Calves, R. Koganty, B. M. Longnecker, T.-J. Yao, H. F. Oettgen, P. O. Livingston, *Cancer Res.* **1995**, 55, 2783.
- [54] G. Ragupathi, S. F. Slovin, S. Adluri, D. Sames, I. J. Kim, H. Kim, M. Spassova, W. G. Bornmann, K. O. Lloyd, H. I. Scher, P. O. Livingston, S. J. Danishefsky, *Angew. Chem.* **1999**, 111, 590; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, 38, 563.
- [55] Das Impfstoffkonjugat wurde als ein „neuer Wirkstoff“ (IND: investigational new drug) der amerikanischen FDA (Food and Drug Administration) am Memorial Sloan-Kettering Cancer Center verabreicht.
- [56] S. F. Slovin, G. Ragupathi, S. Adluri, G. Ungers, K. Terry, S. Kim, M. Spassova, W. G. Bornmann, M. Fazzari, L. Dantis, K. Olkiewicz, K. O. Lloyd, P. O. Livingston, S. J. Danishefsky, H. I. Scher, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1999**, 96, 5710.
- [57] Gegenwärtig sind wir in der Lage, das vollständig ungeschützte Allylglycosid **40** in Mengen von einigen Gramm fast ohne Komplikationen zu synthetisieren.
- [58] E. Nudelman, S. B. Levery, T. Kaizu, S. Hakomori, *J. Biol. Chem.* **1986**, 261, 11247.
- [59] a) T. Kaizu, S. B. Levery, E. Nudelman, R. E. Stenkamp, S. Hakomori, *J. Biol. Chem.* **1986**, 261, 11254; b) S. Y. Kim, M. Yuan, S. H. Itzkowitz, Q. Sun, T. Kaizu, A. Palekar, B. F. Trump, S.-I. Hakomori, *Cancer Res.* **1986**, 46, 5985.
- [60] P. D. Jeffrey, J. Bajorath, C. Y. Chang, Y. Dale, I. Hellstrom, E. K. Hellstrom, S. Sheriff, *Nat. Struct. Biol.* **1995**, 2, 466.
- [61] Eine Kurzmitteilung von Teilen dieser Arbeit: P. P. Deshpande, S. J. Danishefsky, *Nature* **1997**, 387, 164; b) eine andere Synthese des nichtkonjugierten KH-1-Antigens wurde veröffentlicht, während unser Manuskript ([63]) begutachtet wurde: G. Hummel, R. R. Schmidt, *Tetrahedron Lett.* **1997**, 38, 1173.
- [62] a) A.-C. Helland, M. Nilsson, T. Norberg, *J. Carbohydr. Chem.* **1992**, 11, 77; b) R. Windmüller, R. R. Schmidt, *Tetrahedron Lett.* **1994**, 35, 7927.
- [63] P. P. Deshpande, H. M. Kim, A. Zatorski, T. K. Park, G. Ragupathi, P. O. Livingston, D. Live, S. J. Danishefsky, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, 120, 1600.
- [64] P. H. Seeberger, M. Eckhardt, C. E. Gutteridge, S. J. Danishefsky, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, 119, 10064.
- [65] G. Ragupathi, P. P. Deshpande, K. O. Lloyd, S. J. Danishefsky, P. O. Livingston, unveröffentlichte Ergebnisse.
- [66] a) O. Nilsson, J.-E. Mansson, T. Brezicka, J. Holmgren, L. Lindholm, S. Sorenson, F. Yngvason, L. Svennerholm, *Glycoconjugate J.* **1984**, 1, 43; b) F. T. Brezicka, S. Olling, O. Nilsson, J. Bergh, J. Holmgren, S. Sorenson, F. Yngvason, *Cancer Res.* **1989**, 49, 1300.
- [67] a) O. Nilsson, T. F. Brezicka, J. Holmgren, S. Sorenson, L. Svennerholm, F. Yngvason, L. Lindholm, *Cancer Res.* **1986**, 46, 1403; b) A. J. Vangsted, H. Clausen, T. B. Kjeldsen, T. White, B. Sweeney, S. Hakomori, L. Drivsholm, J. Zeuthen, *Cancer Res.* **1991**, 51, 2879.
- [68] S. Zhang, C. Cordon-Cardo, H. S. Zhang, V. E. Reutter, S. Adluri, W. B. Hamilton, K. O. Lloyd, P. O. Livingston, *Int. J. Cancer* **1997**, 73, 42.
- [69] J. R. Allen, G. Ragupathi, P. O. Livingston, S. J. Danishefsky, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, 121, 10875.
- [70] a) O. Kwon, S. J. Danishefsky, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, 120, 1588; b) S. Bhattacharya, S. J. Danishefsky, *J. Org. Chem.* **2000**, 65, 144.
- [71] E. B. Rodriguez, R. V. Stick, *Aust. J. Chem.* **1990**, 43, 665.
- [72] a) M. M. Sim, H. Kondo, C.-H. Wong, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, 115, 2260; b) M. D. Chappell, R. L. Halcomb, *Tetrahedron* **1997**, 53, 11109.
- [73] J. A. Allen, J. G. Allen, X.-F. Zhang, L. J. Williams, A. Zatorski, unveröffentlichte Ergebnisse.
- [74] B. E. Anderson, M. Grove, L. E. Davis, US 5376531, **1994**.
- [75] H. M. Kim, I. J. Kim, unveröffentlichte Ergebnisse.
- [76] I. Carlstedt, J. R. Davies, *Biochem. Soc. Trans.* **1997**, 25, 214.
- [77] P. A. Poland, C. L. Kinlough, M. D. Rokaw, J. Magarian-Blander, O. J. Finn, R. P. Hughey, *Glycoconjugate J.* **1997**, 14, 89.
- [78] a) G. F. Springer, *Science* **1984**, 224, 1198; b) B. J. Campbell, E. F. Finnie, E. F. Hounsell, J. M. Rhodes, *J. Clin. Invest.* **1995**, 95, 571.
- [79] a) G. F. Springer, *Clin. Rev. Oncogenesis* **1995**, 6, 57; b) G. D. MacLean, M. A. Reddish, M. B. Bowen-Yacyshyn, S. Poppema, B. M. Longenecker, *Cancer Invest.* **1994**, 12, 45; c) H. J. Jennings, F. E. Ashton, A. Gamian, F. Michon in *Towards Better Carbohydrate Vaccines* (Hrsg.: R. Roy, R. Bell, G. Torrigiani), Wiley, London, **1987**, S. 11–17.
- [80] a) G. D. MacLean, M. A. Reddish, R. R. Koganty, T. Wong, S. Gandhi, M. Smolenski, J. Samuel, J. M. Nabholz, B. M. Longnecker, *Cancer Immunol. Immunother.* **1993**, 36, 215; b) R. Schneerson, J. B. Robinson, S. C. Szu, Y. Yang in *Towards Better Carbohydrate Vaccines* (Hrsg.: R. Roy, R. Bell, G. Torrigiani), Wiley, London, **1987**, S. 307–327.
- [81] Beispiele für frühere Tn-Synthesen: T. Tokoyuni, S. Hakomori, A. K. Singhal, *Bioorg. Med. Chem.* **1994**, 11, 1119, zit. Lit. Beispiele für Tn-Glycopeptid-Cluster: S. Bay, R. Lo-Man, E. Osinaga, H. Nakada, C. Leclerc, D. Cantacuzene, *J. Pept. Res.* **1997**, 49, 620, zit. Lit.
- [82] Ausgewählte interessante Beispiele für Glycoproteinsynthesen: a) R. M. Bill, S. L. Flitsch, *Chem. Biol.* **1996**, 3, 145; b) K. Witte, P. Sears, K. Martin, C.-H. Wong, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, 119, 2114; c) T. Tsuda, S. Nithimura, *Chem. Commun.* **1996**, 2779.
- [83] Andere Ansätze, die auf Kassetten beruhen: E. Meinjohanns, M. Meldal, H. Paulsen, A. Schleyer, K. Bock, *J. Chem. Soc. Perkin. Trans. 1* **1996**, 985; N. Mathieux, H. Paulsen, M. Meldal, K. Bock, *J. Chem. Soc. Perkin. Trans. 1* **1997**, 2359; Y. Nakahara, H. Iijima, T. Ogawa, *Tetrahedron Lett.* **1994**, 35, 3321; B. Liebe, H. Kunz, *Tetrahedron Lett.* **1994**, 35, 8777.
- [84] X. T. Chen, D. Sames, S. J. Danishefsky, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, 120, 7700.
- [85] R. U. Lemieux, R. M. Ratcliffe, *Can. J. Chem.* **1979**, 57, 1244.
- [86] S. D. Kuduk, J. B. Schwarz, X. T. Chen, P. W. Glunz, D. Sames, G. Ragupathi, P. O. Livingston, S. J. Danishefsky, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, 120, 12474.

- [87] Übersicht über die Synthese  $\alpha$ -O-glycosidisch gebundener Serin- oder Threonin-Glycopeptide: a) H. Kunz, *Pure Appl. Chem.* **1993**, 65, 123; b) H. Kunz, *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* **1994**, 50, 277.
- [88] H. R. Brugghe, *Int. J. Peptide Protein Res.* **1994**, 43, 166.
- [89] T. Tokoyuni, S. Hakomori, A. K. Singhal, *Bioorg. Med. Chem.* **1994**, 11, 1119.
- [90] T. Tokoyuni, B. Dean, S. Cai, D. Boivin, S. Hakomori, A. K. Singhal, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, 116, 395.
- [91] a) L. A. Carpino, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, 115, 4397; b) L. A. Carpino, D. Ionescu, A. El-Faham, *J. Org. Chem.* **1996**, 61, 2460.
- [92] Die synthetische Verbindung **100** wurde mit *m*-Maleimidobenzoyl-*N*-hydroxysuccinamidester (MBS) an KLH konjugiert, einem heterobifunktionellen Reagens, das Thiolgruppen mit Aminogruppen quervernetzt.
- [93] Mono- und divalente Cluster des TF-Antigens: H. Kunz, S. Birnbach, P. Wering, *Carbohydr. Res.* **1990**, 202, 207.
- [94] D. Sames, X. T. Chen, S. J. Danishefsky, *Nature* **1997**, 389, 587.
- [95] J. B. Schwarz, S. D. Kuduk, X. T. Chen, D. Sames, P. W. Glunz, S. J. Danishefsky, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, 121, 2662.
- [96] Frühere Synthesen von 2,6-STF: a) H. Iijima, T. Ogawa, *Carbohydr. Res.* **1989**, 186, 95; b) D. Qiu, R. R. Koganty, *Tetrahedron Lett.* **1996**, 37, 595; c) D. Qiu, R. R. Koganty, *Tetrahedron Lett.* **1997**, 38, 961.
- [97] Frühere Synthesen von STn: a) H. Kunz, B. Liebe, *Helv. Chim. Acta.* **1997**, 80, 1473; b) H. Kunz, B. Liebe, *Angew. Chem.* **1997**, 109, 629; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1997**, 36, 618; c) H. Iijima, T. Ogawa, *Carbohydr. Res.* **1988**, 172, 183.
- [98] P. W. Glunz, S. Hintermann, J. B. Schwarz, S. D. Kuduk, X. T. Chen, L. J. Williams, D. Sames, S. J. Danishefsky, V. Kudryashov, K. O. Lloyd, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, 121, 10636.
- [99] B. O. Fraser-Reid, U. E. Udodong, W. Zufan, H. Ottosson, R. Merriitt, S. Rao, C. Roberts, R. Madsen, *Synlett* **1992**, 927.
- [100] P. W. Glunz, unveröffentlichte Ergebnisse.
- [101] a) P. Konradsson, D. R. Mootoo, R. E. McDevitt, B. Fraser-Reid, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1990**, 270; b) P. Konradsson, U. E. Udodong, B. Fraser-Reid, *Tetrahedron Lett.* **1990**, 31, 4313.
- [102] Auch Reaktionsbedingungen wie die folgenden führten nicht zur Abspaltung der drei Benzoatgruppen: pH 10, wässr. NaOH/MeOH, LiOH, LiOOH, katalytischen Mengen an NaOMe/MeOH.
- [103] K. Kitamura, E. Stockert, P. Garin-Chesa, S. Welt, K. O. Lloyd, K. L. Armour, T. P. Wallace, W. J. Harris, F. J. Carr, L. J. Old, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1994**, 91, 12957–12961.
- [104] D. Live, L. J. Williams, S. D. Kuduk, J. B. Schwarz, P. W. Glunz, X. T. Chen, D. Sames, R. A. Kumar, S. J. Danishefsky, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1999**, 96, 3489.

### Zitieren von Zeitschriften

Im Literaturverzeichnis von Beiträgen in der *Angewandten Chemie* soll der Name einer Zeitschrift nicht durch „*ibid.*“ ersetzt werden, wenn sie mehrmals hintereinander zitiert wird, da in elektronischen Datenbanken eine Suche nach „*ibid.*“ nicht sinnvoll ist und für die Zukunft geplante Hyperlinks zu zitierten Beiträgen der *Angewandten Chemie* bei der elektronischen Version der Zeitschrift nicht möglich sind, wenn die Abkürzung „*ibid.*“ verwendet wird. Deshalb sollen *immer* die nach dem Chemical Abstracts Service Source Index abgekürzten Namen einer Zeitschrift aufgeführt werden. Entsprechend sollten stets alle Autoren angegeben werden, wenn mehrere Beiträge derselben Autoren hintereinander zitiert werden. Beispiele:

- [1] a) J. Guo, K. J. Duffy, K. L. Stevens, P. I. Dalko, R. M. Roth, M. M. Hayward, Y. Kishi, *Angew. Chem.* **1998**, 110, 198–202; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, 37, 187–190; b) M. M. Hayward, R. M. Roth, K. J. Duffy, P. I. Dalko, K. L. Stevens, J. Guo, Y. Kishi, *Angew. Chem.* **1998**, 110, 202–206; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, 37, 190–196.
- [2] a) R. Mokaya, W. Jones, *Chem. Commun.* **1996**, 981–982; b) R. Mokaya, W. Jones, *Chem. Commun.* **1996**, 983–984.