

## Synthetische Vakzine aus tumorassoziierten MUC1-Glycopeptid-Antigenen und Rinderserumalbumin\*\*

Sebastian Dziadek, Danuta Kowalczyk und Horst Kunz\*

Voraussetzung für einen selektiven immunologischen Angriff auf Tumorgewebe ist die Identifizierung von Zelloberflächenstrukturen, die auf Tumorzellen vorkommen, nicht aber auf gesunden Zellen. Bereits vor 30 Jahren sind Membranglycoproteine mit Thomsen-Friedenreich-(T)-Antigen- und monosaccharidischen Tn-Antigen-Saccharidseitenketten von Springer und Mitarbeitern<sup>[1]</sup> als tumorassoziierte Antigene auf Epitheltumoren beschrieben worden, die strukturell dem N-terminalen Bereich von Asialoglycophorin verwandt sein sollten. Nach diesen Strukturinformationen hatten wir eine Vakzine aus N-terminalen Glycopeptiden von Asialoglycophorin der Blutgruppe M und Rinderserumalbumin (BSA) als Träger synthetisiert<sup>[2]</sup> und zur Immunisierung von Mäusen eingesetzt. Der erhaltene monoklonale Antikörper (82-A6) zeigte Affinität zu epithelialen Tumorzellen, aber keine ausreichende Tumorselektivität.<sup>[3]</sup> Der Antikörper 82-A6 vermochte deutlich zwischen Asialoglycophorin der M- und N-Blutgruppe zu differenzieren,<sup>[3]</sup> was zeigte, dass nicht nur das Saccharid, sondern auch die Peptidsequenz zum erkannten Epitop beitrug. Daraus schlossen wir, dass für ein tumorselektives Antigen nicht nur eine tumorassoziierte Saccharid-, sondern auch eine tumorselektive Peptidstruktur nötig ist.

Strukturvorgaben für tumorselektive Glycopeptid-Antigene liefern die Analysen des tumorassoziierten epithelialen Mucins MUC1.<sup>[4]</sup> MUC1 ist auf Tumorzellen stark überexprimiert. Im extrazellulären Teil enthält es eine Domäne aus vielen Wiederholungseinheiten der Aminosäuresequenz HGVTSAPDTRPAPGSTAPPA.<sup>[5]</sup> In diesen Tandem-Repeats befinden sich die meisten O-Glycosylierungsstellen, wobei MUC1 auf den Tumorzellen wegen der Herunterregulierung einer Glucosaminyltransferase (C-2GnT-1) und der Überexprimierung von Sialyltransferasen<sup>[6]</sup> kurze, vorzeitig sialylierte Saccharidseitenketten trägt. Mit aus Tumorgewebe isoliertem MUC1 wurden Antikörper induziert,<sup>[4,5]</sup> mit deren Hilfe das Peptidmotiv PDTRPAP als immundominantes Epitop erkannt wurde.<sup>[7]</sup> Die Spezifität dieser Anti-MUC1-

Antikörper wurde mit synthetischen Tn- und T-Antigen-Glycopeptiden geprüft.<sup>[8,9]</sup> Durch STD-NMR-Analyse konnte die gebundene Konformation eines Tn-Antigen-Pentapeptids aus MUC1 an einen solchen monoklonalen Antikörper ermittelt werden.<sup>[10]</sup>

Im Unterschied zu solchen, für analytische Zielsetzungen wertvollen Studien sind Immunisierungen mit aus Tumorgewebe isoliertem MUC1 als Vakzine wenig aussichtsreich, weil MUC1 aus biologischen Isolaten stets mikroheterogen ist und Strukturen enthält, die auch auf gesunden Zellen vorkommen.

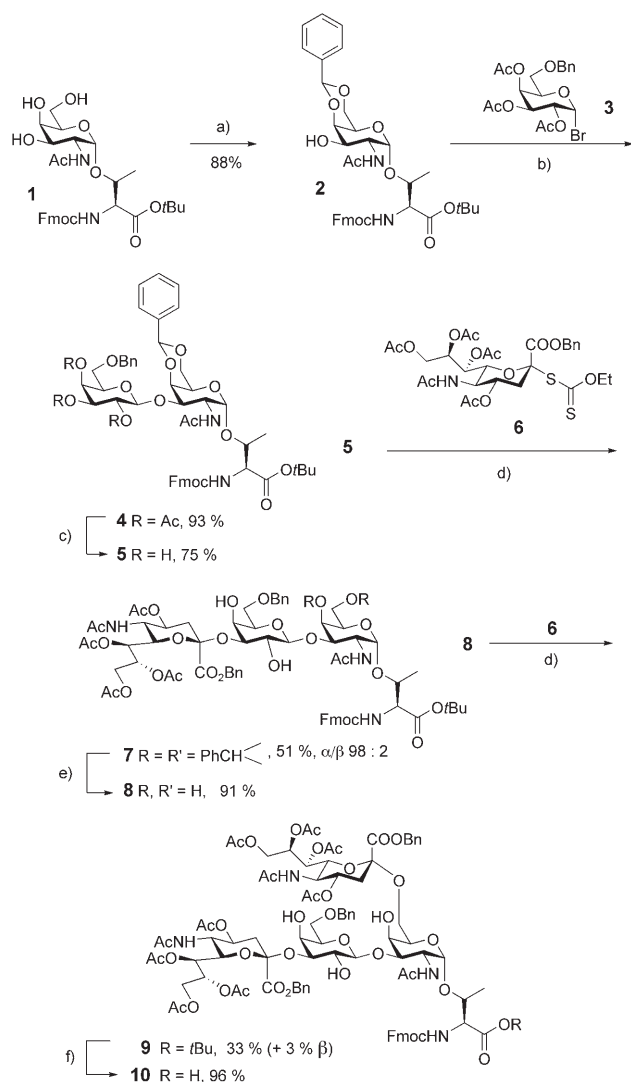
Wir haben uns deshalb für die Entwicklung von Antitumor-Vakzinen von definierten, synthetischen Tn-, T- und Sialyl-Tn-Glycopeptiden<sup>[11,12]</sup> aus MUC1 zugewandt.<sup>[13]</sup> Mit einem Konstrukt, in dem eine Glycopeptidsequenz aus dem MUC1-Tandem-Repeat mit einer Sialyl-Tn-Seitenkette über eine polare Spacer-Aminosäure mit einem Teil eines T-Zell-Epitops aus dem Tetanustoxin verknüpft wurde, konnte in Kulturen peripherer Blutlymphozyten (PBLs) die Proliferation cytotoxischer T-Zellen induziert werden.<sup>[14]</sup> Dieser Effekt trat nur in Gegenwart Antigen-präsentierender Zellen ein. Für die Entwicklung einer Antitumor-Vakzine ist aber neben einer cytotoxischen T-Zell-Antwort eine selektive, von T-Helferzellen vermittelte Antikörperbildung von entscheidender Bedeutung, wozu man Konjugate des Glycopeptid-Antigens mit Trägerproteinen wie BSA oder KLH (keyhole limpet hemocyanine) benötigt.

Wir beschreiben hier die Synthese einer Serie von Glycopeptid-Antigenen, die Sialyl-Tn-, (2,6)-Sialyl-T-, (2,3)-Sialyl-T- oder das Glycophorin-Antigen [(2,3-2,6-Bissialyl)-T] tragen und Teile oder die gesamte Tandem-Repeat-Sequenz von MUC1 enthalten, sowie Verfahren, nach denen man diese tumorselektiven Zelloberflächenstrukturen an Trägerproteine binden oder auf Mikrotiterplatten fixieren kann. Die Synthese beginnt mit der Herstellung der O-Glycosylaminosäuren. Es folgt die Festphasen-Glycopeptidsynthese und schließlich die Verknüpfung mit dem Protein oder die Immobilisierung.

Die Synthese der O-Glycosylaminosäuren nach einer einheitlichen biomimetischen Strategie<sup>[15]</sup> aus gemeinsamen Zwischenstufen ist in Schema 1 für das komplexeste Beispiel der tumorassoziierten MUC1-Antigene, das [(2,3-2,6-Bissialyl)-T]-Threonin-Konjugat, gezeigt. Gemeinsames Ausgangsprodukt bei der Synthese aller dieser tumorassoziierten Mucin-Kohlenhydrat-Antigene ist der im Kohlenhydrat deblockierte, N-Fmoc-geschützte Tn-Antigen-Threonin-tert-Butylester **1**.<sup>[16]</sup> Bei allen folgenden Schutzgruppenmanipulationen und Glycosylierungsreaktionen muss die Basenlabilität der Fmoc-Gruppe und die Säureempfindlichkeit des tert-Butylesters berücksichtigt werden. Die Überführung in das 4,6-Benzylidenacetal **2** gelang mit  $\alpha,\alpha$ -Dimethoxytoluol in Acetonitril in Gegenwart katalytischer *p*-Toluolsulfonsäure bei pH 4. In der nachfolgenden 3- $\beta$ -Galactosylierung traten bei der sonst effektiven Aktivierung des Trichloracetimidats<sup>[17]</sup> mit Trimethylsilyltrifluormethansulfonat entweder die Spaltung des Benzylidenacetals und des tert-Butylesters oder, bei Zugabe genügender Mengen von Molekularsieb, vorwiegend die Bildung des Orthoesters ein.<sup>[18]</sup> Als am günstigsten erwies sich die Aktivierung des 6-O-Benzyl-geschützten Ga-

[\*] Dr. S. Dziadek, D. Kowalczyk, Prof. Dr. H. Kunz  
Institut für Organische Chemie  
Johannes Gutenberg-Universität Mainz  
Duesbergweg 10–14, 55128 Mainz (Deutschland)  
Fax: (+49) 6131-3924786  
E-mail: hokunz@uni-mainz.de

[\*\*] Diese Arbeit wurde von der Deutschen Forschungsgemeinschaft und von der Stiftung Rheinland-Pfalz für Innovation unterstützt. S.D. dankt dem Fonds der Chemischen Industrie und dem Bundesministerium für Bildung und Forschung für ein Promotionsstipendium.



**Scheme 1.** a)  $\alpha,\alpha$ -Dimethoxytoluol, kat. *p*-TsOH, CH<sub>3</sub>CN, 3 h; b) Hg(CN)<sub>2</sub>, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/CH<sub>3</sub>NO<sub>2</sub> (2:3), Molekularsieb 4 Å; c) 1. NaOMe, MeOH, pH 8.5–9, 8 h; 2. Fmoc-OSu, Dioxan/H<sub>2</sub>O (1:1), *N*-Methylmorpholin; d) MeSBr, AgOTf, CH<sub>3</sub>CN/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (2:1), –68 °C, Molekularsieb 3 Å; e) 80 %, AcOH<sub>aq</sub>, 80 °C; f) CF<sub>3</sub>COOH, Anisol (10:1), 2 h.

lactosylbromids **3**<sup>[19]</sup> mit Quecksilbercyanid nach Helferich<sup>[20]</sup> in Nitromethan/Dichlormethan, wobei das T-Antigen-Threonin-Konjugat **4** stereoselektiv in hoher Ausbeute entstand.

Die selektive *O*-Desacetylierung von **4** bildete ein besonderes Problem. Mit katalytischem NaOMe in Methanol und strenger Kontrolle bei pH 8.5 ergab sie in kleinen Ansätzen (1 g) binnen 12 h 62 % Ausbeute. Bei größeren Ansätzen (5 g) und pH 8.6–9 wurde neben **5** (39 %) auch das *N*-deblockierte Konjugat (46 %) gebildet, dessen nachträgliche *N*-Acylierung mit 9-Fluorenylmethoxycarbonyl-*N*-hydroxysuccinimid weitere 36 % Produkt ergab, sodass die Gesamtausbeute an **5** bei 75 % lag. Die Sialylierung von **5** mit dem Xanthogenat **6** des peracetylierten Sialinsäurebenzylesters<sup>[14]</sup> zu **7** verlief unter Aktivierung mit Methylsulfonyltriflat<sup>[21]</sup> mit nahezu vollständiger Regio- und Stereoselektivität. Nach selektiver Spaltung des Benzylidenacetals mit wässriger Essig-

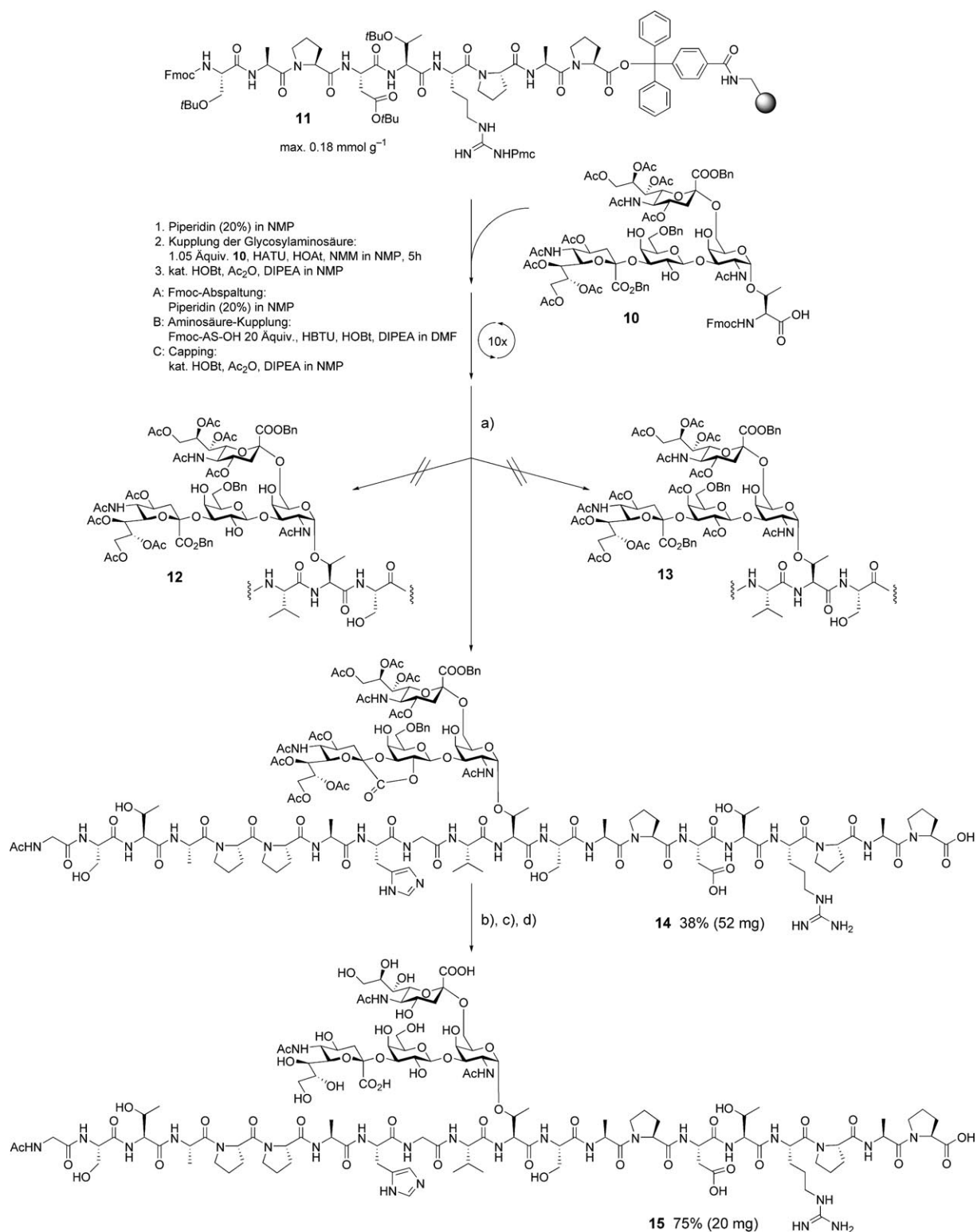
säure (80 %) bei 80 °C<sup>[22]</sup> zu **8** ergab eine weitere Sialylierung unter gleichen Bedingungen das Bissialyl-T-Antigen-Threonin-Konjugat **9**, wobei der Umsatz nach 3.5 h unvollständig blieb und neben **9** (33 %) durch präparative HPLC auch das entsprechende  $\beta$ -Anomere (3 %) isoliert werden konnte.<sup>[23]</sup> Acidolyse des *tert*-Butylesters mit Trifluoressigsäure/Anisol (10:1) lieferte den Fmoc-geschützten Bissialyl-T-Threonin-Baustein **10**,<sup>[24]</sup> der ohne weitere *O*-Acetylierung<sup>[25]</sup> in die Festphasensynthese eingeführt wurde. Von den anderen tumorassoziierten Saccharid-Aminosäure-Antigenen liegen Tn-Antigen **1**, T-Antigen **4** und 2,3-Sialyl-T-Antigen **7** direkt auf dem in Schema 1 ausgeführten Syntheseweg. Zu Sialyl-Tn-Antigen kommt man durch regioselektive Sialylierung von **1**<sup>[14,16]</sup> und zu 2,6-Sialyl-T nach Abspaltung des Benzylidenacetals aus **4** ebenfalls durch regioselektive Sialylierung.<sup>[15,26]</sup>

Alle diese Bausteine wurden nun in die Festphasenglycopeptidsynthesen von MUC1-Tandem-Repeat-Glycopeptiden eingesetzt, was in Schema 2 wiederum am Beispiel des Bissialyl-T-Antigen-MUC1-Glycopeptids illustriert ist. Am über einen Trityl-Anker<sup>[27]</sup> mit Fmoc-Prolin funktionalisierten Rapp-Tentagel-Polymer<sup>[28]</sup> wurde das geschützte Nonapeptid **11** aus MUC1 nach Fmoc-Strategie<sup>[29]</sup> aufgebaut. Nach Abspaltung der Fmoc-Gruppe mit Piperidin/*N*-Methylpyrrolidon (NMP) (1:4) wurde die *O*-Glycosylaminosäure **10** (1.05 Äquiv.) unter Aktivierung mit *O*-(7-Aza-benzotriazol-1-yl)-*N,N,N',N'*-tetramethyluroniumhexafluorophosphat (HATU), 1-Hydroxy-7-aza-benzotriazol (HOAt)<sup>[30]</sup> und *N*-Methylmorpholin (NMM) in NMP gekuppelt. Alle nicht-glycosylierten Fmoc-Aminosäuren wurden mit *O*-(1H-Benzotriazol-*N,N,N',N'*-tetramethyluroniumhexafluorophosphat (HBTU)/1-Hydroxybenzotriazol (HOBt)<sup>[31]</sup> und Hünigs Base (*i*Pr<sub>2</sub>NEt) in DMF verknüpft. Zum Capping nichtumgesetzter Aminokomponenten diente Acetanhydrid/HOBt/*i*Pr<sub>2</sub>NEt.<sup>[31c]</sup>

Die simultane Spaltung des Trityl-Ankers und der säurelabilen Seitenketten-Schutzgruppen gelang mit Trifluoressigsäure (TFA), Triisopropylsilan (TIS) und wenig Wasser.<sup>[32]</sup> Sie ergab allerdings weder das erwartete Glycoicosapeptid **12** mit unveränderter Kohlenhydratseitenkette noch das durch die Capping-Reaktionen durchweg *O*-acetylierte Analogon **13**, sondern das Glycopeptid **14**<sup>[33]</sup> mit Lactonstruktur der 2,3-verknüpften Sialinsäure zur 2-OH-Gruppe des Galactose-restes in einer Gesamtausbeute nach ca. 40 Schritten von 38 %. Nachfolgende Hydrogenolyse von Benzylester und -ether, Umesterung mit NaOMe/Methanol (pH 9.5), Lactonöffnung mit NaOH in Wasser (pH 11.5), Neutralisieren mit Essigsäure, Lyophilisieren und Reinigung durch semipräparative HPLC ergaben das MUC1-Tandem-Repeat-Glycopeptid **15**<sup>[34]</sup> in 75 % Ausbeute bezogen auf **14**.

In gleicher Weise wurden mit zum Teil erheblich höheren Gesamtausbeuten das MUC1-Eicosapeptid **16** und die vollen Tandem-Repeat-Glycopeptide aus MUC1 mit den anderen wichtigen tumorassoziierten Sialysaccharid-Antigenen Sialyl-Tn (**17**), 2,6-Sialyl-T (**18**) und 2,3-Sialyl-T (**19**) aufgebaut (Schema 3), wobei keine Lactonbildung bei der Acidolyse des Trityl-Linkers beobachtet wurde.

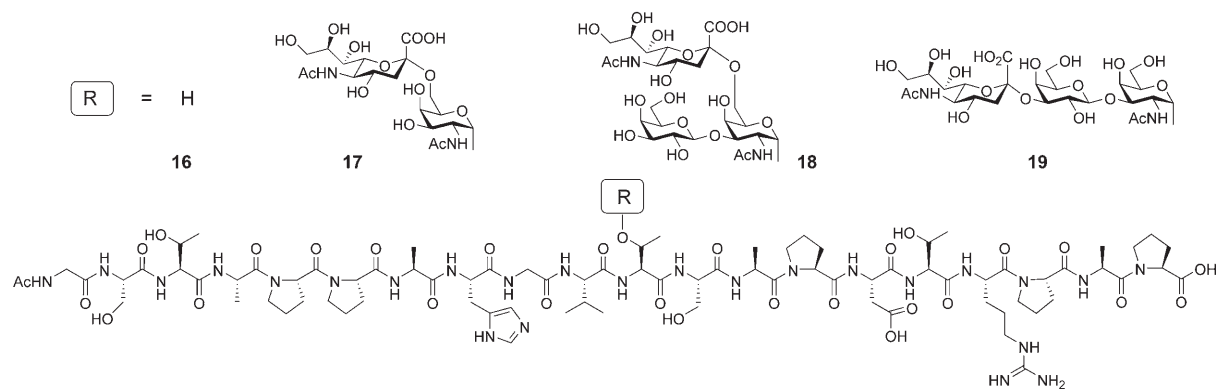
Ebenfalls nach dem in Schema 2 illustrierten Verfahren wurden das mit der Triethylenglycol-Spacer-Amino-



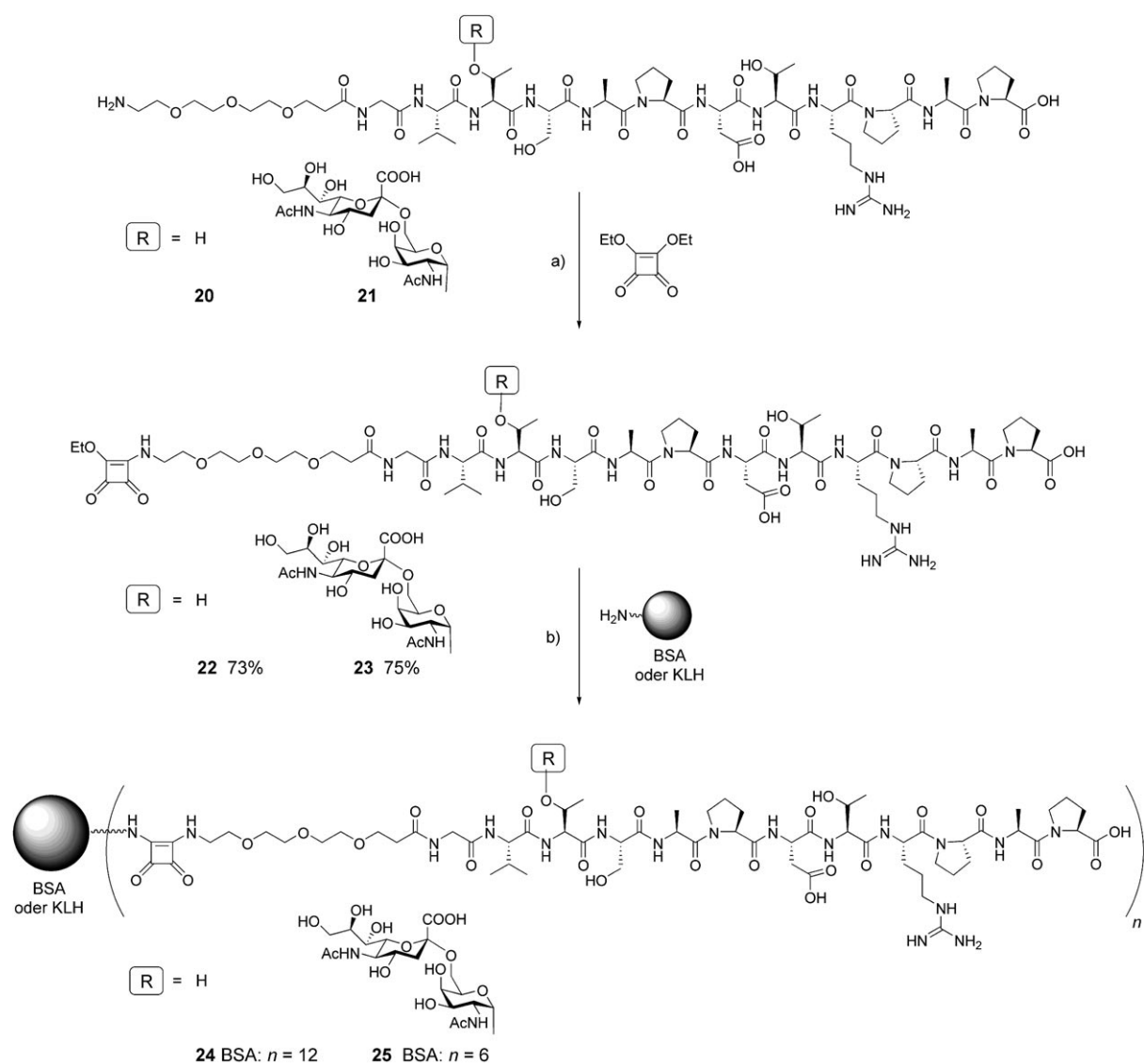
**Schema 2.** a) TFA, TIS, H<sub>2</sub>O (15:0.9:0.9); b) H<sub>2</sub>/Pd-C (10%), MeOH; c) NaOMe/MeOH, pH 9.5; d) NaOH<sub>aq</sub>, pH 11.5, 1 h, dann AcOH. DIPEA = Diisopropylethylamin.

Gruppe<sup>[14]</sup> ausgestattete Dodecapeptid **20** und das analoge Sialyl-Tn-Dodecapeptid **21** aus MUC1 als Modellverbindungen für die Konjugierung mit Rinderserumalbumin bzw. für die Immobilisierung hergestellt (Schema 4).<sup>[35]</sup> Dabei wurden

noch auf dem Harz die *N*-terminale Fmoc-Gruppe und während der Acidolyse des Trityl-Ankers alle säurelabilen Seitenketten-Schutzgruppen abgespalten. Bei der Synthese des Sialyl-Tn-Glycopeptids **21** mussten nach der Abspaltung vom



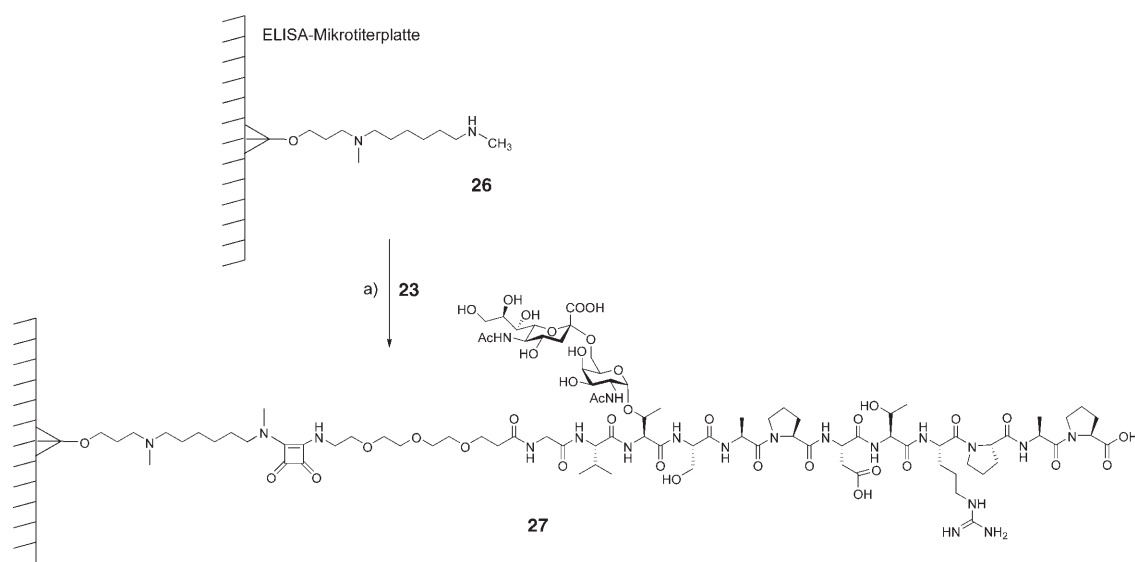
**Schema 3.**



**Schema 4.** a) Ethanol/Wasser (1:1),  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , pH 8.0, 2 h, präparative HPLC; b) 0.07 M Natriumborat, 0.035 M Natriumhydrogencarbonat, pH 9, 24 h, Gelfiltrationschromatographie an Sephadex-G25-PD10-Säule, Dialyse gegen  $\text{H}_2\text{O}$ .

Harz zusätzlich durch Hydrogenolyse und NaOMe-katalysierte Umesterung die Kohlenhydrat-Schutzgruppen entfernt werden.

Zur Verknüpfung der synthetischen MUC1-Peptide oder -Glycopeptide mit Proteinen wurden nach einem von Tietze et al.<sup>[36]</sup> zur Konjugation von Lactosaminphenylglycosid be-



Schema 5. a) 0.07 M Natriumborat, 0.035 M Natriumhydrogencarbonat, pH 9.

beschriebenen Verfahren die Spaceraminogruppen von **20** bzw. **21** mit Quadratsäurediethylester (3,4-Diethoxy-3-cyclobuten-1,2-dion) in Ethanol/Wasser bei pH 8 zu den Monoamiden **22** und **23**<sup>[37]</sup> umgesetzt, welche nach Reinigung durch präparative HPLC bei pH 9 in einem Natriumborat-Puffer zur Bindung an Rinderserumalbumin eingesetzt wurden.

Die Anknüpfung des Peptids **22** erbrachte binnen 24 h eine Kupplungsausbeute von ca. 60% und, laut MALDI-TOF-MS, eine Vakzine **24** mit durchschnittlich zwölf Molekülen Peptid pro Proteinmolekül. Beim Glycopeptid **23** verlief die Kupplung langsamer, sodass in **25** nur etwa halb so viele Antigenmoleküle an das Protein gebunden waren. Das mit dem Spacer ausgestattete Glycopeptid-Antigen wurde zusätzlich kovalent auf mit sekundären Aminogruppen funktionalisierten Mikrotiterplatten der Struktur **26**<sup>[38]</sup> immobilisiert (Schema 5). Von diesen so überzogenen Mikrotiterplatten **27**<sup>[39]</sup> kann das MUC1-Antigen in den ELISA-Tests mit Wasser nicht ausgewaschen werden, was bisher beim Arbeiten mit Glycopeptidantigenen stets zu Problemen geführt hatte.

Mit den immobilisierten und konjugierten MUC1-Glycopeptid-Antigenen stehen nicht nur Vakzine mit definierter Struktur tumorselektiver Oberflächenantigene von epithelialen Tumorzellen zur Verfügung, sondern auch Mittel, die es erlauben, die Strukturelektivität der Immunantwort zu überprüfen. Erste vielversprechende Resultate<sup>[40]</sup> ermutigen dazu, das gesamte Spektrum der durch die synthetischen Glycopeptid-Antigene wie **17**, **18**, **19**, **21**, **23** und **25** gekennzeichneten Strukturen zur Entwicklung von synthetischen Antitumorstoffen auszuloten.

Eingegangen am 10. Mai 2005

Online veröffentlicht am 25. Oktober 2005

**Stichwörter:** Antigene · Glycopeptide · Kohlenhydrate · Synthetische Vakzine · Tumortheraeutika

- [1] G. F. Springer, *Science* **1984**, 224, 1198.
- [2] H. Kunz, S. Birnbach, *Angew. Chem.* **1986**, 98, 354; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1986**, 25, 360.
- [3] a) W. Dippold, A. Steinborn, K.-H. Meyer zum Büschenfelde, *Environ. Health Perspect.* **1990**, 88, 255; W. Dippold, A. Steinborn, S. Birnbach, H. Kunz, unveröffentlichte Ergebnisse; A. Steinborn, Dissertation, Universität Mainz, **1990**; b) S. Dziadek, H. Kunz, *Chem. Rec.* **2004**, 4, 308.
- [4] a) S. Gendler, C. A. Lancaster, J. Taylor-Papadimitriou, T. Duhig, N. Peal, J. Burchell, L. Pemberton, E. N. Lalani, P. Wilson, *J. Biol. Chem.* **1990**, 265, 15286; b) kurze Übersicht: J. Taylor-Papadimitriou, J. M. Burchell, D. W. Miles, M. Dalziel, *Biochim. Biophys. Acta* **1999**, 1455, 301.
- [5] D. M. Swallow, S. J. Gendler, B. Griffith, G. Corney, J. Taylor-Papadimitriou, *Nature* **1987**, 328, 82.
- [6] a) I. Brockhausen, *Biochim. Biophys. Acta* **1999**, 1473, 67; I. Brockhausen, *Biochem. Soc. Trans.* **2003**, 31, 318; b) K. O. Lloyd, J. Burchell, V. Kundryashov, B. W. Yin, J. Taylor-Papadimitriou, *J. Biol. Chem.* **1996**, 271, 33325; c) J. M. Burchell, A. Mungul, J. Taylor-Papadimitriou, *J. Mammary Gland. Biol. Neoplasia* **2001**, 6, 355.
- [7] a) J. Burchell, J. Taylor-Papadimitriou, M. Boshell, S. Gendler, T. Duhig, *Int. J. Cancer* **1989**, 44, 691; b) M. R. Price, F. Hudecz, C. O'Sullivan, R. W. Baldwin, P. M. Edwards, S. B. J. Tendler, *Mol. Immunol.* **1990**, 62, 795.
- [8] a) G. F. Hanisch, S. Müller, *Glycobiology* **2000**, 10, 439; b) S. Müller, F. G. Hanisch, *J. Biol. Chem.* **2002**, 277, 26103; c) U. Karsten, N. Serttas, H. Paulsen, A. Danielczyk, S. Goletz, *Glycobiology* **2004**, 14, 681.
- [9] S. von Mensdorff-Pouilly, F. G. M. Snijdwint, A. A. Verstraeten, R. H. M. Verheijen, P. Kenemans, *Int. J. Biol. Markers* **2000**, 15, 343.
- [10] H. Möller, N. Serttas, H. Paulsen, J. M. Burchell, J. Taylor-Papadimitriou, B. Meyer, *Eur. J. Biochem.* **2002**, 269, 1444.
- [11] a) O. Seitz, H. Kunz, *Angew. Chem.* **1995**, 107, 901; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1995**, 34, 803; b) M. Leuck, H. Kunz, *J. Prakt. Chem.* **1997**, 339, 332; c) P. Braun, G. M. Davies, M. R. Price, P. M. Williams, S. B. J. Tendler, H. Kunz, *Bioorg. Med. Chem.* **1998**, 6, 1531.
- [12] B. Liebe, H. Kunz, *Angew. Chem.* **1997**, 109, 629; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1997**, 36, 618.



- [13] Andere Arbeitsgruppen haben ebenfalls Mucin-Glycopeptide mit Tn-, T- und Sialyl-Tn-Antigen-Sacchariden synthetisiert: a) E. Meinjohanns, M. Meldal, A. Schleyer, H. Paulsen, K. Bock, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* **1996**, 985; b) S. D. Kuduk, J. B. Schwarz, X.-T. Chen, P. W. Glunz, D. Sames, G. Ragapunti, P. O. Livingston, S. J. Danishefsky, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, 120, 12474; c) J. B. Schwarz, S. D. Kuduk, X.-T. Chen, D. Sames, P. W. Glunz, S. J. Danishefsky, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, 121, 2662; d) M. A. Reddish, L. Jackson, R. R. Koganti, D. Qui, W. Hong, B. M. Longenecker, *Glycoconjugate J.* **1997**, 14, 549.
- [14] S. Keil, C. Claus, W. Dippold, H. Kunz, *Angew. Chem.* **2001**, 113, 379; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, 40, 366.
- [15] a) C. Brocke, H. Kunz, *Synlett* **2003**, 2052; b) S. Dziadek, H. Kunz, *Synlett* **2003**, 1623.
- [16] B. Liebe, H. Kunz, *Helv. Chim. Acta* **1997**, 80, 1473.
- [17] a) R. R. Schmidt, J. Michel, *Angew. Chem.* **1980**, 92, 763; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1980**, 19, 731; b) R. R. Schmidt, *Angew. Chem.* **1986**, 98, 213; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1986**, 25, 212.
- [18] T. Reipen, H. Kunz, *Synthesis* **2003**, 2487.
- [19] M. Lergenmüller, Y. Ito, T. Ogawa, *Tetrahedron* **1988**, 44, 1381.
- [20] B. Helferich, F. Wedemeyer, *Justus Liebigs Ann. Chem.* **1949**, 563, 139.
- [21] F. Dasgupta, P. Garegg, *Carbohydr. Res.* **1988**, 177, C13.
- [22] N. Mathieux, H. Paulsen, M. Meldal, K. Bock, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* **1997**, 2359.
- [23] **9**:  $[\alpha]_D^{25} = 16.6$  ( $c = 1$ ,  $\text{CHCl}_3$ ); MALDI-TOF-MS (dhb, positiv):  $m/z$  1975.2  $[M+\text{Na}]^+$ , 1991.2  $[M+\text{K}]^+$ ; HR-ESI-TOF-MS (positiv): 1973.7257 (ber.: 1973.7271).  $^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , COSY, TOSY, HMQC, HMBC):  $\delta = 4.81$  ( $J_{1,2} = 3.9$  Hz, H-1), 3.32 (d, 1H,  $J_{3',4'} = 2.7$  Hz, H-4'), 2.71 (dd, 1H,  $J_{3\text{eq}'',3\text{ax}''} = 12.9$ ,  $J_{3\text{eq}'',4''} = 4.7$  Hz, H-3eq''), 2.54 ppm (dd, 1H,  $J_{3\text{eq}''',3\text{ax}'''} = 12.7$ ,  $J_{3\text{eq}''',4'''} = 4.7$  Hz, H-3eq''').
- [24] **10**:  $[\alpha]_D^{22} = 20.3$  ( $c = 1$ ,  $\text{CHCl}_3$ ); HR-ESI-TOF-MS (positiv): 1917.6743 ( $[M+\text{Na}]^+$ , ber.: 1917.6645).
- [25] Die Abspaltung von *O*-Acetylgruppen insbesondere von den 4-OH-Gruppen von Galactoseeinheiten aus Sialyl-Lewis<sup>x</sup>-Glycopeptiden (M. Rösch, H. Herzner, W. Dippold, M. Wild, D. Vestweber, H. Kunz, *Angew. Chem.* **2001**, 113, 3954; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, 40, 3836) und aus Sialyl-T-Glycopeptiden (Lit. [15]) kann sehr erschwert sein.
- [26] C. Brocke, H. Kunz, *Synthesis* **2004**, 525.
- [27] J. M. J. Freché, K. E. Haque, *Tetrahedron Lett.* **1975**, 16, 3055.
- [28] E. Bayer, W. Rapp, *Chem. Pept. Proteins* **1986**, 3, 3.
- [29] L. A. Carpino, G. Y. Han, *J. Am. Chem. Soc.* **1970**, 92, 5748.
- [30] L. A. Carpino, D. Jonescu, A. El-Falham, *J. Org. Chem.* **1996**, 61, 2460.
- [31] a) R. Knorr, A. Trzeciak, W. Bannwarth, D. Gillessen, *Tetrahedron Lett.* **1989**, 30, 1927; b) V. Dourtoglou, B. Gross, V. Lambropoulou, C. Zioudrou, *Synthesis* **1984**, 572; c) W. König, R. Geiger, *Chem. Ber.* **1970**, 103, 788.
- [32] D. A. Pearson, M. Blanchette, M. L. Baker, C. A. Guidon, *Tetrahedron Lett.* **1989**, 30, 2739.
- [33] **14**: MALDI-TOF-MS (dhb, positiv):  $m/z$  3376.0  $[M+\text{H}]^+$ , 3398.0  $[M+\text{Na}]^+$ , 3414.3  $[M+\text{K}]^+$ .  $^1\text{H-NMR}$  (600 MHz,  $[\text{D}_6]\text{DMSO}$ , COSY, TOCSY, HMQC, HMBC):  $\delta = 4.76$  (H-2'), 4.21 (H-4'), 4.01 ppm (H-3').
- [34] **15**: 19.4 mg;  $[\alpha]_D^{22} = -117.4$  ( $c = 1$ ,  $\text{H}_2\text{O}$ ); MALDI-TOF-MS (dhb, positiv):  $m/z$  2876.6  $[M+\text{H}]^+$ .  $^1\text{H-NMR}$  (600 MHz,  $[\text{D}_6]\text{DMSO}$ , COSY, HMQC, HMBC):  $\delta = 4.79$  (d, 1H,  $J_{1,2} = 2.1$  Hz, H-1), 2.66 ppm (dd, 1H,  $J_{3\text{eq}',3\text{ax}'} = 13.7$ ,  $J_{3\text{eq}',4'} = 6.7$  Hz, H-3'eq);  $^{13}\text{C-NMR}$  (150.9 MHz,  $[\text{D}_6]\text{DMSO}$ , HMQC, HMBC):  $\delta = 104.5$  (C-1'), 98.8 (C-1), 98.4 (C-2'), 98.1 ppm (C-2''').
- [35] Nach unseren bisherigen Erfahrungen ist die Zwischenschaltung des flexiblen hydrophilen Spacers für die immunologische Auswertung der synthetischen Vakzine wichtig.<sup>[14]</sup>
- [36] L. F. Tietze, C. Schröder, S. Gabius, U. Brinck, A. Goerlach-Graw, H.-J. Gabius, *Bioconjugate Chem.* **1991**, 2, 148.
- [37] **23**:  $[\alpha]_D^{26} = -68.4$  ( $c = 1$ ,  $\text{H}_2\text{O}$ ); MALDI-TOF-MS (dhb, positiv):  $m/z$  1991.4  $[M+\text{H}]^+$ .  $^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ , COSY, HMQC):  $\delta = 4.97$  (d, 1H,  $J_{1,2} = 3.5$  Hz, H-1), 4.76–4.64 (m, 3H,  $\text{CH}_2\text{O-Squarat}$ ,  $\text{H}_\alpha\text{-Arg}$ ), 2.66 ppm (dd, 1H,  $J_{3\text{eq}',3\text{ax}'} = 12.7$ ,  $J_{3\text{eq}',4'} = 4.7$  Hz, H-3'eq).
- [38] A. Bergh, B.-G. Magnusson, J. Ohlsson, U. Wellmar, U. J. Mils-son, *Glycoconjugate J.* **2005**, 18, 615.
- [39] **27**: Kohlenhydratnachweis mit Phenol/ $\text{H}_2\text{SO}_4$ ; siehe Lit. [2].
- [40] S. Dziadek, A. Hobel, E. Schmitt, H. Kunz, *Angew. Chem.* **2005**, 117, 7803; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, 44, 7630.