

# Synthetische Vakzine aus tumorassoziierten Glycopeptidantigenen durch immunkompatible Verankerung über Thioether an Rinderserumalbumin\*\*

Sven Wittrock, Torsten Becker und Horst Kunz\*

Professor Peter Welzel zum 70. Geburtstag gewidmet

Das Mucin MUC1 ist in gesunden Epithelzellen nur auf der apicalen Seite, in epithelialen Tumorzellen aber auf der gesamten Oberfläche und in stark erhöhtem Maße exprimiert. In den Carcinoma-Zellen sind charakteristisch veränderte Saccharidseitenketten an diesem Glycoprotein zu beobachten, die auf fehlerhafte Aktivität von Glycosyltransferasen zurückzuführen sind.<sup>[1]</sup> Stark verminderte Expression<sup>[2]</sup> der  $\beta$ -1,6-N-Acetylglucosamintransferase C2GnT-1 reduziert die Bildung der Core-2-Saccharidstruktur, aus der die langen Polylactosamin-Saccharidseitenketten entstehen, die MUC1 auf den normalen Epithelzellen auszeichnen. Die bis zu zehnfach höhere Aktivität von Sialyltransferasen<sup>[3]</sup> bewirkt in Tumorzellen die vorzeitige Sialylierung der unreifen  $T_N^-$  und T-Antigenstrukturen<sup>[4]</sup> zu den bedeutenden tumorassoziierten Sialyl- $T_N^-$ , 2,3- und 2,6-Sialyl-T-Antigenstrukturen.<sup>[5-8]</sup> Sie werden so weiterem Glycanaufbau entzogen.

Die tumorassoziierten Saccharidantigene wurden an Trägerproteine gebunden, um sie zur Induktion von Antikörpern nutzen zu können.<sup>[9]</sup> Hierfür sind zahlreiche Methoden entwickelt worden.<sup>[10]</sup> In neueren Verfahren werden für die Konjugation, die für die schwach immunogenen Kohlenhydrat-Antigene nötig ist, die Oxim-Bildung über Carbonylgruppen,<sup>[11]</sup> Reaktionen von Thiolgruppen mit Iodacetamid,<sup>[12]</sup> Disulfidbildung,<sup>[13]</sup> die Addition von Thiolgruppen an Maleinimidgruppen,<sup>[14]</sup> Staudinger-Reaktionen von Aziden kombiniert mit Esteraminolyse,<sup>[15]</sup> die 1,3-dipolare Cycloaddition von Aziden<sup>[16]</sup> an Alkine<sup>[17]</sup> oder die Aminolyse von Quadratsäureestern<sup>[18]</sup> angewendet.

Die Konjugation von Glycopeptidantigenen an Proteine kann sich schwieriger als die von Sacchariden gestalten, weil Glycopeptide zusätzliche funktionelle Gruppen aufweisen. Enthält das Glycopeptid außer der C-terminalen keine weitere Carboxygruppe, gelingt die Konjugation z. B. mit Rinderserumalbumin (BSA) über Aktivesterbildung in Wasser.<sup>[19]</sup> Sind im Glycopeptidantigen Sialinsäure und weitere Carboxygruppen vorhanden, dürfen sie keine Schutz-

gruppen tragen, da diese nach der Bindung an das Protein nicht mehr zu entfernen wären. Über aminofunktionalisierte Spacer und unter Nutzung der abgestuften Reaktivität der Quadratsäureester<sup>[18]</sup> ließen sich Glycopeptide mit BSA zu synthetischen Vakzinen verknüpfen.<sup>[20]</sup> Auch heterodifunktionelle Linker, z. B. *N*-Succinimidyl-4-(maleimidomethyl)-cyclohexan-carboxylat (SMCC),<sup>[21]</sup> wurden – über Michael-Additionen von SH-Gruppen – zur Konjugation eingesetzt.

Die von solchen Vakzinen induzierte Immunantwort ist von Wert für diagnostische Zwecke, wenn durch Auslese und Klonierung monoklonale Antikörper gewonnen werden, die selektiv an Tumorzellen binden. Will man aber eine selektive Immunantwort gegen tumorassoziierte Glycopeptidantigene<sup>[22]</sup> zur Immuntherapie fortentwickeln, dann ist die Tatsache hinderlich, dass z. B. die aus Maleimidomido- gebildeten Thiosuccinimid-, aber auch Quadratsäure- und (hetero)-aromatische Linker-Strukturen selbst hoch immunogen sind, sodass die Immunantwort gegen das eigentliche Glycopeptid-Hapten unterdrückt sein kann.<sup>[23]</sup> Die Entwicklung von Antitumorvakzinen erfordert daher nichtimmunogene Linker. Da für die Selektivität der Glycopeptidantigene deren Konformation<sup>[24]</sup> bedeutsam ist, sollte ein solcher Linker möglichst wenige Wasserstoffbrücken-Donor/Akzeptor-Strukturen enthalten, aber Wasserlöslichkeit vermitteln. Alkylthioether würden diese Anforderungen erfüllen.

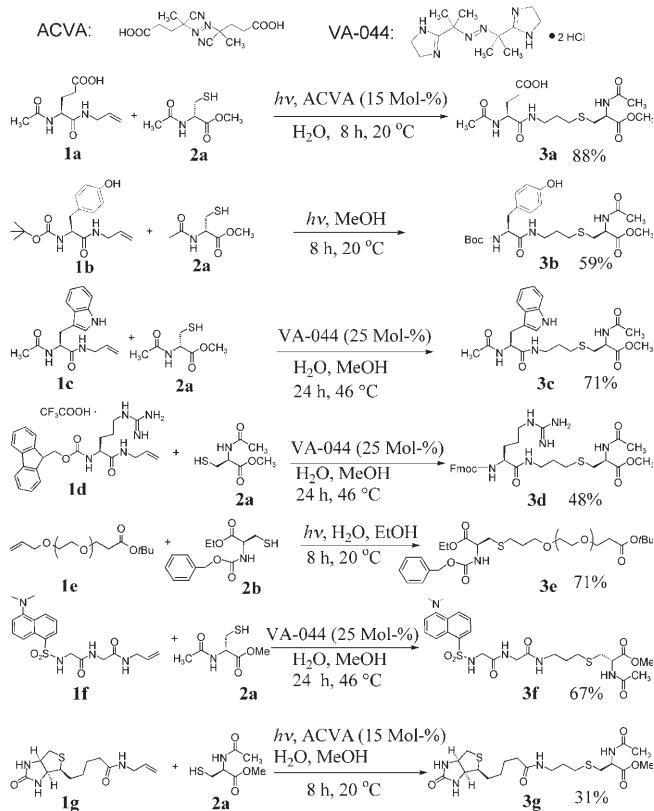
Die Bildung von Thioethern durch photochemische, d. h. radikalisch induzierte Addition von Thiolen an Alkene<sup>[25]</sup> ist schon für die Anbindung von Kohlenhydraten an Alkene eingesetzt worden.<sup>[26]</sup> Um zu prüfen, ob sich diese Reaktion auch für die Anknüpfung von Aminosäuren und Peptiden eignet, wurden Umsetzungen an Modellverbindungen durchgeführt.

Wie die Beispiele in Schema 1 zeigen, verläuft die photochemisch induzierte Thioetherbildung mit äquimolaren Mengen der Reaktionspartner in Wasser (**3a**), Wasser/Methanol- (**3c,d,f,g**) und Wasser/Ethanol-Gemischen (**3e**) sowie in Methanol (**3b**) bei Raumtemperatur. Mit dem Radikalstarter VA-044 wurde die Reaktion thermisch ausgelöst (**3c,d,f**). Nicht umgesetzte Alkenkomponenten wurden wiedergewonnen. Setzt man das Thiol im Überschuss ein, kann die Allylkomponente vollständig umgesetzt werden. Das einzige Nebenprodukt ist in der Regel das Disulfid des Cysteinderivats (ca. 10%). Die  $\alpha$ -Position der Aminosäuren wird anders als bei Literaturbeispielen<sup>[27]</sup> nicht angegriffen. Auch oxidationsempfindliche Tyrosin- (**3b**) und Tryptophanderivate (**3c**) sowie polare Aminosäurereste (**3a,d**), wie

[\*] Dr. S. Wittrock, Dr. T. Becker, Prof. Dr. H. Kunz

Institut für Organische Chemie  
Universität Mainz  
Duesbergweg 10–14, 55128 Mainz (Deutschland)  
Fax: (+49) 6131-392-4786  
E-Mail: hokunz@uni-mainz.de

[\*\*] Diese Arbeit wurde durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft und den Fonds der Chemischen Industrie gefördert. S.W. dankt der Studienstiftung des Deutschen Volkes für ein Promotionsstipendium.

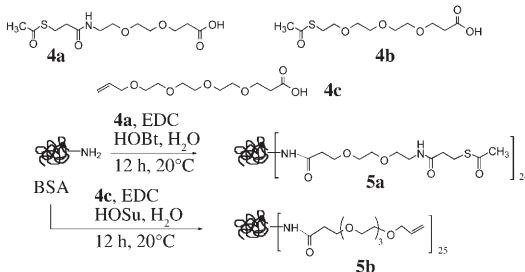


**Schema 1.** Boc = *tert*-Butoxycarbonyl, Fmoc = 9-Fluorenylmethoxycarbonyl. Die Ausbeuten beziehen sich auf gereinigte Verbindungen.

sie in den Wiederholungseinheiten von MUC1 vorkommen, werden nicht angegriffen. Die Kupplung eignet sich darüber hinaus für die Anbindung von Spacer-Molekülen (**3e**) sowie Fluoreszenz- (**3f**) und Biotinmarkern (**3g**). Die Thioether-verknüpfung kann unter Bestrahlung (**3b,e**) allein oder unterstützt durch einen wasserlöslichen Radikalstarter – ACVA oder VA-044 (siehe Schema 1) – in Gang gesetzt werden. Mit Radikalstarter (5–25 Mol-%) liegt die Ausbeute bei gleicher Reaktionszeit um ca. 10 % höher.

Da Antigenität und Spezifität von Glycopeptiden offenbar von deren Konformation abhängen,<sup>[24,28]</sup> ist es für die Konjugation solcher Haptene mit Proteinen ratsam, hydrophile Spacer zwischenzuschalten. Daher wurden in Anlehnung an bekannte Verfahren<sup>[29]</sup> aus Di- und Triethylenglycol die heterodifunktionellen Spacer **4** (Schema 2) hergestellt. Sie werden nach zwei Strategien zur immunkompatiblen Verankerung der Glycopeptidantigene eingesetzt, indem man entweder die Thiol- oder die Alkenkomponente mit dem Trägerprotein BSA verknüpft.

Die Kupplung des S-geschützten Thiol-Spacers **4a** (200 Äquiv.) an BSA erfolgte in Wasser bei Raumtemperatur und schwach saurem pH-Wert unter Aktivierung mit EDC und HOBr oder HOSu.<sup>[19]</sup> Das so erhaltene Konjugat **5a** wurde durch Dialyse gegen Wasser gereinigt. BSA enthält außer der N-terminalen noch 59 weitere Lysin-Aminogruppen, von denen nur ca. 30 leicht zugänglich sind. Dem MALDI-TOF-Massenspektrum zufolge trägt **5a** im Mittel 24 Ankermoleküle pro Molekül BSA. Bei der analogen Anbin-

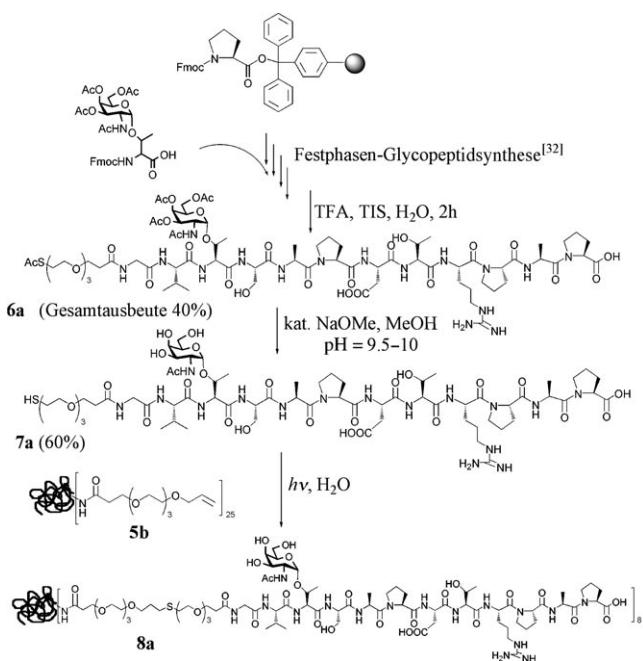


**Schema 2.** EDC = N-(Dimethylaminopropyl)-N'-ethylcarbodiimid-Hydrochlorid, HOt = 1-Hydroxybenzotriazol, HOSu = N-Hydroxysuccinimid.

dung des Olefinankers **4c** an BSA (Schema 2) ergab die MALDI-TOF-Massenspektrometrie für das entstehende Konjugat **5b** eine mittlere Beladung von 25 Ankermolekülen pro Molekül BSA.

Die mit den Ankermolekülen dekorierten BSA-Formen **5** konnten nun zur Gewinnung der über Thioetherbrücken verknüpften BSA-Glycopeptid-Immunogene nach beiden Vorgehensweisen (Verknüpfung der Thiol- oder der Alkenkomponente mit BSA) genutzt werden. Glycopeptidantigene aus MUC1 wurden zur Kupplung an das den Olefinanker enthaltende **5b**, wie für das  $T_N$ -Antigen-Glycopeptid in Schema 3 gezeigt, an mit dem Tritylanker<sup>[30]</sup> ausgestattetem Tentagel-Harz<sup>[31]</sup> nach bekannten Verfahren<sup>[32]</sup> aufgebaut. Zum Schluss wurden sie am N-terminalen Glycin mit dem heterodifunktionellen Linker **4b** acyliert und unter simultaner Spaltung von Tritylanker und säurelabilen Schutzgruppen vom Harz abgelöst.

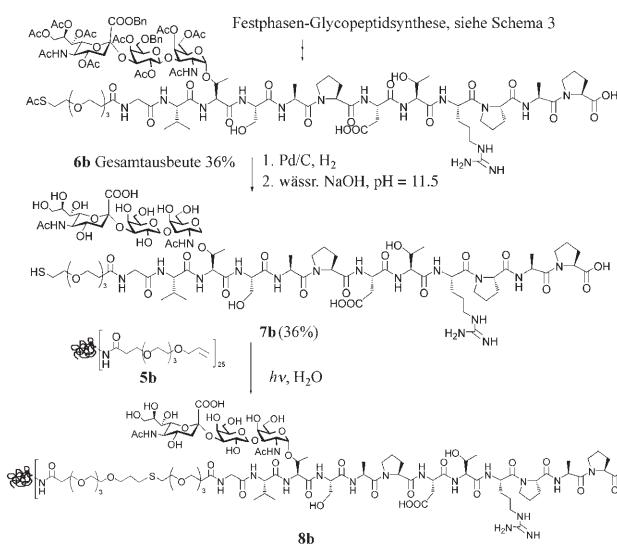
Vom Produkt **6a**<sup>[33]</sup> (Gesamtausbeute bezogen auf beladenes Harz 40 %) wurden mit kat. NaOMe/MeOH die S- und O-Acetylgruppen abgelöst. Das thiolterminierte Glycopep-



**Schema 3.** TFA = Trifluoressigsäure, TIS = Triisopropylsilan.

tidantigen **7a** wurde durch semipräparative HPLC gereinigt und mit olefinmodifiziertem **5b** in Wasser unter Bestrahlung verknüpft.<sup>[34]</sup> Nach Dialyse und Lyophilisierung zeigte die MALDI-TOF-Analyse, dass das gebildete Antigen-BSA-Konjugat **8a** im Mittel acht Glycopeptidmoleküle pro Molekül BSA trägt (Schema 3).

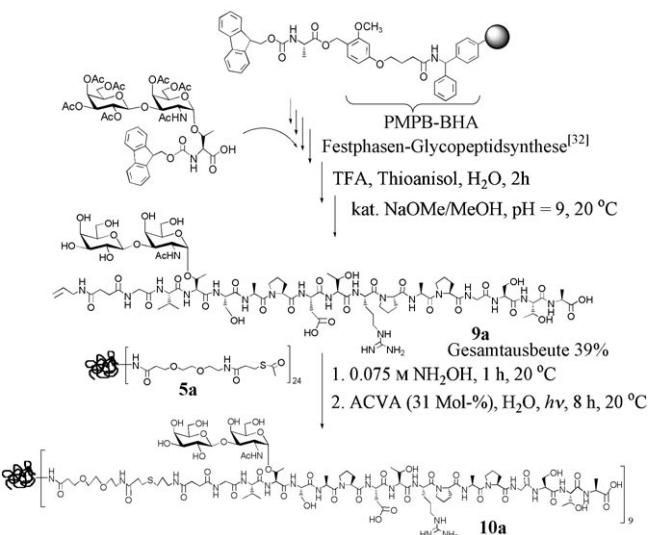
Die analoge Herstellung des mit dem 2,3-Sialyl-T-Antigen und dem geschützten Thiolterminus ausgestatteten MUC1-Glycopeptids **6b**<sup>[35]</sup> gelang unter Einsatz des Fmoc-2,3-Sialyl-T-Threonin-Bausteins.<sup>[32b]</sup> Bemerkenswert ist, dass nach Abspaltung vom Tritylharz an **6b** die Hydrogenolyse von Benzylester und -ether im Kohlenhydratteil ohne Störung durch den Thioester ablief. Nach Umesterung in Methanol wurde das mit dem Thiol-Spacer ausgestattete Glycopeptidantigen **7b** der photochemisch induzierten Thioetherverknüpfung mit **5b** zur synthetischen Vakzine **8b** unterzogen (Schema 4).



Schema 4.

Zur Synthese der Glycopeptidantigene für die umgekehrte Thioetherverknüpfung wurde Polystyrolharz verwendet, das über Benzhydrylamid (BHA) und den supersäurelabilen<sup>[36]</sup> 4-Hydroxymethyl-3-methoxyphenoxybuttersäure-(HMPB)-Anker mit der C-terminalen Aminosäure beladen ist. Das Glycohexadecapeptid aus der MUC1-Tandem-Wiederholungseinheit mit T-Antigen-Seitenkette wurde unter Einsatz des T-Antigen-Threonin-Bausteins<sup>[32a]</sup> synthetisiert. Nach Abschluss der Synthese wurde N-terminal mit Bernsteinsäuremono-N-allylamid acyliert. Nach acidolytischer Ablösung vom Harz und Zemplén-Umesterung (pH = 9) fiel das mit der Olefingruppe ausgestattete MUC1-Glycopeptid **9a** an (Schema 5).

Vor der Anbindung von **9a** an das Protein wurde das mit dem S-Acetylthio-Spacer modifizierte BSA **5a** zuerst mit 0.075 M wässrigem Hydroxylamin unter Argon desacetyliert. Nach Dialyse wurden unter Argon die Thiolgruppen des dotierten BSA unter Bestrahlung und in Gegenwart des Radicalstarters ACVA mit den Allylamid-Enden des Glycopeptids **9a** umgesetzt. Die so erhaltene, über Thioether verknüpfte Vakzine **10a** zeigte im MALDI-TOF-Massenspek-



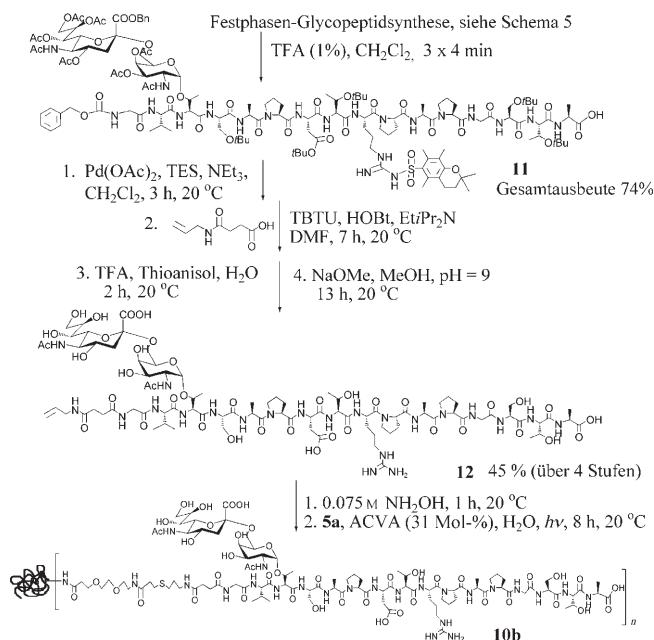
Schema 5.

trum nur schwache Signale, weswegen ihre Beladung photometrisch mit Phenol/Schwefelsäure<sup>[19]</sup> ermittelt wurde; im Mittel wurden neun Moleküle tumorassoziiertes MUC1-Glycopeptid pro Molekül Protein gefunden.

Die Herstellung einer Sialinsäure enthaltenden Glycopeptidvakzine erforderte ein modifiziertes Vorgehen, da das Allylamid bei der Hydrogenolyse des Sialinsäurebenzylesters hydriert werden würde. Daher wurde durch Festphasensynthese und nach selektiver Abspaltung vom Sasrin-Harz (1% TFA in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) zunächst Benzylcarbonyl(Z)-geschütztes Sialyl-T<sub>N</sub>-Glycopeptid **11** hergestellt (Schema 6). Nach Hydrogenolyse von Benzylester und Z-Gruppe wurde mit Bernsteinsäuremonoallylamid in Lösung gekuppelt. Nun erst wurden durch Acidolyse und anschließende Umesterung die verbliebenen Schutzgruppen abgelöst, was zum Sialyl-T<sub>N</sub>-MUC1-Glycohexadecapeptid **12**<sup>[37]</sup> führte. **5a** wurde mit verdünntem wässrigem Hydroxylamin desacetyliert und photochemisch mit dem Glycopeptid zur synthetischen Vakzine **10b** verknüpft.

Die Ergebnisse zeigen, dass synthetische Glycopeptidantigene, die tumortypische Strukturelemente sowohl im Saccharid- als auch im Peptidteil tragen, strukturell definiert über photochemisch initiierte Thioladdition an Alkene mit Trägerproteinen geknüpft werden können. Dabei werden keine Nebenreaktionen an den α-CH-Gruppen von Aminosäureresten beobachtet. Die immunkompatible Thioetherverknüpfung wird gebildet, indem man das Protein zunächst mit in Allylgruppen endenden Spacer/Anker-Molekülen und das synthetische Glycopeptid mit Thiolgruppen exponierten Strukturteilen versieht und beide in Wasser der photochemisch angeregten Thioetherbildung unterwirft (Schema 4). Alternativ wird das Protein mit Thiolseitenketten dekoriert und photochemisch mit dem synthetischen Glycopeptid-Antigen, das olefinische Endgruppen trägt, in Wasser zum Thioether verknüpft.

Die zweite Vorgehensweise erfordert einen vollständigen Ausschluss von Sauerstoff. Die Sialinsäure enthaltenden Glycopeptid-Antigen-Konjugate bereiten bei der MALDI-



**Schema 6.** TES = Triethylsilyl, TBTU = Benzotriazolyltetramethyluroniumtetrafluoroborat.

TOF-Massenspektrometrie Schwierigkeiten. Die hier beschriebenen Konjugate aus synthetischen Glycopeptidantigenen und Trägerproteinen verkörpern die vielseitigste Vakzinform. Sie liefern bei der Prozessierung des Proteins die für die T-Zellaktivierung nötigen T-Zellepitope,<sup>[38]</sup> und sie können wegen ihrer Haftung an Mikrotiterplatten direkt zur Prüfung der induzierten Seren eingesetzt werden.<sup>[20,22]</sup> Die kaum immunogenen, über Oligoethylenglycol-Spacer gebildeten Thioether-Linker sollten es ermöglichen, diese Vorteile für die Entwicklung von Vakzinen zur Aktivimmunisierung gegen Tumorzellen zu nutzen.

Eingegangen am 5. März 2007

Online veröffentlicht am 4. Juni 2007

**Stichwörter:** Antigene · Glycopeptide · Proteine · Synthetische Vakzine · Thioladditionen

- [1] a) I. Brockhausen, *Biochim. Biophys. Acta Gen. Subj.* **1999**, 1473, 67; b) J. M. Burchell, A. Munguia, J. Taylor-Papadimitriou, *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia* **2001**, 6, 355.
- [2] I. Brockhausen, J. N. Yang, J. M. Burchell, C. Whitehouse, J. Taylor-Papadimitriou, *Eur. J. Biochem.* **1995**, 233, 607.
- [3] a) K. O. Lloyd, J. Burchell, V. Kudryashov, B. W. Yin, J. Taylor-Papadimitriou, *J. Biol. Chem.* **1996**, 271, 33325; b) I. Brockhausen, *Biochem. Soc. Trans.* **2003**, 31, 318.
- [4] G. F. Springer, *Science* **1984**, 224, 1198.
- [5] S. H. Itzkowitz, M. Yuan, C. K. Montgomery, T. Kjeldsen, H. K. Takahashi, W. L. Bigbee, Y. S. Kim, *Cancer Res.* **1989**, 49, 197.
- [6] S. Müller, F.-G. Hanisch, *J. Biol. Chem.* **2002**, 277, 26103.
- [7] N. Marcos, T. A. Cruz, F. Silva, R. Almeida, L. David, U. Mandel, H. Clausen, S. von Mensdorff-Pouilly, C. Reis, *J. Histochem. Cytochem.* **2003**, 51, 761.
- [8] F. J. Irazoqui, P. H. Lopez, M. A. Vides, G. A. Nores, *Glycobiology* **2000**, 10, 781.

- [9] a) G. Ragupathi, L. Howard, S. Capello, R. R. Koganty, D. Qui, B. M. Longenecker, M. A. Reddish, K. O. Lloyd, P. O. Livingston, *Cancer Immunol. Immunother.* **1999**, 48, 1, zit. Lit.; b) ein frühes Beispiel: A. Noujaim, C. Turner, D. M. Haines, B. M. Longenecker, *Nucl. Med.* **1987**, 26, 1.
- [10] Diskussion dieser Methoden in Übersichtsartikeln: a) S. J. Danishefsky, J. A. Allen, *Angew. Chem.* **2000**, 112, 882; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000**, 39, 836; b) B. G. Davis, *Chem. Rev.* **2002**, 102, 579.
- [11] a) S. E. Cervigni, P. Dumy, M. Mutter, *Angew. Chem.* **1996**, 108, 1325; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1996**, 35, 1230; b) S. Peluso, B. Imperiali, *Tetrahedron Lett.* **2001**, 42, 2085; c) G.-A. Cremer, N. Bureaud, V. Piller, H. Kunz, F. Piller, A. Delmas, *ChemMed-Chem* **2006**, 1, 965.
- [12] a) N. J. Davis, S. L. Flitsch, *Tetrahedron Lett.* **1991**, 32, 6793; b) L. A. Marcaurelle, E. C. Rodriguez, C. R. Bertozzi, *Tetrahedron Lett.* **1998**, 39, 8417.
- [13] a) W. M. Macindoe, A. H. van Oijen, G.-J. Boons, *Chem. Commun.* **1998**, 847; b) B. G. Davis, J. B. Jones, *Synlett* **1999**, 1495.
- [14] a) O. Keller, J. Rudinger, *Helv. Chim. Acta* **1975**, 58, 531; b) I. Shin, H.-J. Jung, M.-R. Lee, *Tetrahedron Lett.* **2001**, 42, 1325.
- [15] a) E. Saxon, C. R. Bertozzi, *Science* **2000**, 287, 2007; b) B. L. Nilsson, L. L. Kiessling, R. T. Rainers, *Org. Lett.* **2001**, 3, 9.
- [16] R. Huisgen, *Angew. Chem.* **1963**, 75, 604; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1963**, 2, 565.
- [17] a) V. V. Rostovtsev, G. L. Green, V. V. Fokin, K. P. Sharpless, *Angew. Chem.* **2002**, 114, 2708; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, 41, 2596; b) R. Breinbauer, M. Koehn, *ChemBioChem* **2003**, 4, 1147.
- [18] L. F. Tietze, M. Arlt, M. Beller, K.-H. Glüskamp, E. Jähde, M. F. Rajewski, *Chem. Ber.* **1991**, 124, 1215.
- [19] a) H. Kunz, S. Birnbach, *Angew. Chem.* **1986**, 98, 354; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1986**, 25, 360; b) H. Kunz, K. von dem Bruch, *Meth. Enzym.* **1994**, 247B, 3; c) M. Dubois, K. A. Gilles, J. K. Hamilton, P. A. Rebers, F. Smith, *Anal. Chem.* **1956**, 28, 350.
- [20] S. Dziadek, D. Kowalczyk, H. Kunz, *Angew. Chem.* **2005**, 117, 7798; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, 44, 7624.
- [21] S. Yoshitake, M. Imagawa, E. Ishikawa, Y. Niitsu, M. Urushizaki, M. Nishimura, R. Kanazawa, H. Kurosaki, S. Tachibana, N. Nakazawa, H. Ogawa, *J. Biochem.* **1982**, 92, 1413.
- [22] S. Dziadek, A. Hobel, E. Schmitt, H. Kunz, *Angew. Chem.* **2005**, 117, 7803; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, 44, 7630.
- [23] T. Buskas, Y. Li, G.-J. Boons, *Chem. Eur. J.* **2004**, 10, 3517.
- [24] S. Dziadek, C. Griesinger, H. Kunz, U. M. Reinscheid, *Chem. Eur. J.* **2006**, 12, 4981.
- [25] T. Posner, *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1905**, 38, 646.
- [26] a) C. Kieburg, M. Dubber, T. K. Lindhorst, *Synlett* **1997**, 1447; b) D. Ramos, P. Rollin, W. Klaffke, *J. Org. Chem.* **2001**, 66, 2948.
- [27] a) T. Nauser, C. Schoeneich, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, 125, 2042; b) Q. B. Broxterman, B. Kaptein, J. Kamphuis, H. E. Schoemaker, *J. Org. Chem.* **1992**, 57, 6286.
- [28] S. Dziadek, C. G. Espinola, H. Kunz, *Aust. J. Chem.* **2003**, 56, 519.
- [29] a) O. Seitz, H. Kunz, *J. Org. Chem.* **1997**, 62, 813; b) S. Keil, C. Klaus, W. Dippold, H. Kunz, *Angew. Chem.* **2001**, 113, 379; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, 40, 366; c) H. Herzner, H. Kunz, *Carbohydr. Res.* **2007**, 342, 541.
- [30] J. M. J. Frechet, K. E. Haque, *Tetrahedron Lett.* **1997**, 38, 3055.
- [31] E. Bayer, W. Rapp, *Chem. Pept. Proteins* **1986**, 3, 3.
- [32] a) C. Brocke, H. Kunz, *Synthesis* **2004**, 525; b) S. Dziadek, C. Brocke, H. Kunz, *Chem. Eur. J.* **2004**, 10, 4150.
- [33]  $[\alpha]_D^{23} = -84.6 \text{ deg cm}^3 \text{ g}^{-1} \text{ dm}^{-1}$  ( $c = 0.02 \text{ g cm}^{-3}$ ,  $\text{H}_2\text{O}$ ); HR-ESI-MS (positiv):  $m/z = 1759.7931 [\text{M}+\text{H}]^+$ , ber. 1759.7948.  $^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ , COSY):  $\delta = 5.29$  (d, 1 H,  $J_{4,3} = 2.9 \text{ Hz}$ , H-4), 5.09 (dd, 1 H,  $J_{3,2} = 11.2 \text{ Hz}$ , H-3), 4.99 (d, 1 H,  $J_{1,2} = 3.7 \text{ Hz}$ , H-1), 2.98 (t, 2 H,  $J = 6.8 \text{ Hz}$ ,  $\text{S-CH}_2$ ), 2.84 (dd, 1 H,  $J_{\text{gem}} = 17.1 \text{ Hz}$ ,  $J_{\text{vic}} =$

- 6.5 Hz,  $D_a^\beta$ ), 2.79 (dd,  $^1H$ ,  $J_{\text{vic}} = 6.8$  Hz,  $D_b^\beta$ ), 1.18 (d, 3H,  $J = 6.3$  Hz,  $T''$ ), 1.06 (d, 3H,  $J = 6.4$  Hz,  $T''$ ).
- [34] In einem Quarzreagenzglas (NS 14.5) wird **7a** (11 mg, 6.9  $\mu\text{mol}$ ) in entgastem wässrigem Phosphatpuffer (pH = 7) gelöst. Unter Argon werden 4 mg olefinmodifiziertes **5b** zugegeben. Die Lösung wird 6 h extern mit einer Quecksilberniederdrucklampe ( $\lambda = 254$  nm, 77 W) bestrahlt, gegen destilliertes Wasser dialysiert (Spectra/Por Float A Lyzer), lyophilisiert und ergibt 7 mg **8a** als farbloses Lyophilisat. MALDI-MS (positiv):  $m/z = 83923.6$ .
- [35]  $[\alpha]_D^{25} = -63.8 \text{ deg cm}^3 \text{ g}^{-1} \text{ dm}^{-1}$  ( $c = 0.01 \text{ g cm}^{-3}$ ,  $\text{H}_2\text{O}$ ); HR-ESI-MS (positiv):  $m/z = 2604.0803$  [ $M + \text{H}$ ] $^+$ , ber. 2604.0931;  $^1\text{H}$ -NMR (400 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ , DQF-COSY):  $\delta = 5.33\text{--}5.16$  (m, 4H {5.3}, H-8'', {5.27} H-4, {5.26} H-7'', {5.23}  $\text{CH}_{2\text{a}}$ -Bn-Ester), 5.00–4.86 (m, 3H, {4.95}  $\text{CH}_{2\text{b}}$ -Bn-Ester, {4.91} H-4', {4.88} H-1), 2.93 (m, 2H, S- $\text{CH}_2$ ), 2.85 (dd, 1H,  $J_{\text{gem}} = 17.3$  Hz,  $J_{\text{vic}} = 6.6$  Hz,  $D_a^\beta$ ), 1.21–1.13 (m, 3H,  $T''$ ), 1.06 ppm (d, 3H,  $J = 6.4$  Hz,  $T''$ );  $^{13}\text{C}$ -NMR (100.6 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ , HSQC):  $\delta = 100.8$  (C-1'), 98.9 (2C, C-1, C-2''), 36.8 (C-3''), 30.0 (SAC), 28.2 ppm (S- $\text{CH}_2$ ).
- [36] M. Mergler, R. Tanner, J. Gosteli, *Tetrahedron Lett.* **1988**, 29, 4005.
- [37]  $[\alpha]_D^{25} = -49.4 \text{ deg cm}^3 \text{ g}^{-1} \text{ dm}^{-1}$  ( $c = 0.01 \text{ g cm}^{-3}$ ,  $\text{H}_2\text{O}$ ); HR-ESI-MS (positiv):  $m/z = 2118.9705$  [ $M + \text{H}$ ] $^+$ , ber. 2118.9760;  $^1\text{H}$ -NMR (400 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ , COSY):  $\delta = 5.69$  (m, 1H,  $\text{CH}_2\text{-CH=CH}_2$ ), 4.99 (m, 2H,  $\text{CH}_2\text{-CH=CH}_2$ ), 4.80 (d, 1H,  $J_{1,2} = 3.7$  Hz, H-1), 2.54 (dd, 1H,  $J_{3,4} = 4.5$  Hz,  $J_{\text{gem}} = 12.5$  Hz, H-3'eq.), 1.15 (d, 3H,  $J = 6.2$  Hz,  $T''$ ), 1.09–1.04 ppm (m, 6H,  $2 \times T''$ );  $^{13}\text{C}$ -NMR (100.6 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ , HSQC, HMBC):  $\delta = 133.6$  ( $\text{CH}_2\text{-CH=CH}_2$ ), 115.3 ( $\text{CH}_2\text{-CH=CH}_2$ ), 99.3 (C-1), 99.2 (C-2'), 39.5 ppm (C-3').
- [38] S. Muller in *Synthetic peptides as antigens*, Vol. 28 (Hrsg.: S. Pillai, P. C. van der Vliet), Elsevier, Amsterdam, **1999**, S. 79.