

# Ein synthetischer Impfstoff aus einem tumorassoziierten Sialyl-T<sub>N</sub>-MUC1-Tandem-Repeat-Glycopeptid und Tetanustoxoid zur Induktion einer starken, hochselektiven Immunantwort\*\*

Anton Kaiser, Nikola Gaidzik, Ulrika Westerlind, Danuta Kowalczyk, Alexandra Hobel, Edgar Schmitt und Horst Kunz\*

Professor Herbert Meier zum 70. Geburtstag gewidmet

Ein Impfstoff gegen Krebs muss vorrangig drei Kriterien erfüllen: Die induzierte Immunantwort muss so stark sein, dass die Toleranz gegen auf körpereigenen Zellen vorkommende Strukturen, wie tumorassoziierte Glycolipide und Glycoproteine, durchbrochen wird;<sup>[1]</sup> das präsentierte Antigen muss typisch für die Tumorzelle, auf dieser stark exprimiert und verschieden von verwandten Strukturen auf gesunden Zellen sein;<sup>[2]</sup> und die Immunantwort muss hochselektive Antiseren ergeben,<sup>[3]</sup> sodass keine Autoimmunreaktion gegen gesundes Gewebe ausgelöst wird. Das membrangebundene tumorassoziierte Glycoprotein MUC1<sup>[4]</sup> könnte die beiden letzteren Kriterien erfüllen. Es wird auf nahezu allen Epithelgeweben exprimiert, und auf Tumorgeweben ist es stark überexprimiert.<sup>[5]</sup> Das Glycanmuster von MUC1 auf Tumorzellen ist charakteristisch verschieden von dem auf Normalzellen.<sup>[2,5]</sup> Das ist auf veränderte Glycosyltransferaseaktivitäten in den Epitheltumorzellen bei der Mucinbiosynthese zurückzuführen: Die Glucosamintransferase GnT2 ist stark herunter-, Sialyltransferasen sind dagegen hochreguliert.<sup>[5,6]</sup> Wegen dieser veränderten Enzymaktivitäten sind das T<sub>N</sub>-Antigen und das Sialyl-T<sub>N</sub>-Antigen besonders typische Saccharidantigene für Epitheltumorzellen und bereits auf Epitheltumorgeweben nachgewiesen worden.<sup>[4-7]</sup> Die veränderten Enzymaktivitäten haben zur Folge, dass MUC1 auf Epitheltumorzellen im Durchschnitt kürzere Saccharide trägt als MUC1 auf gesunden Epithelzellen. Daher sind nicht nur die Saccharide,<sup>[8]</sup> sondern auch Peptidsequenzen aus der extrazellulären Tandem-Repeat-Region an den tumortypischen Glycopeptidpitopen beteiligt.<sup>[9]</sup>

Mit vollsynthetischen Impfstoffen, die aus Glycopeptiden von MUC1 und einem über einen Oligoethylenglycol-Spacer verknüpften T-Zellepitop aus dem Ovalbumin (OVA) beste-

hen, konnten in transgenen Mäusen hochselektive Antiseren induziert werden.<sup>[10,11]</sup> Die Seren sind nahezu monoklonal. Die Antikörper erkennen selektiv das tumorassoziierte MUC1-Glycopeptid, nicht aber die nichtglycosylierte identische Peptidsequenz oder das tumorassoziierte Saccharidantigen in Verbindung mit einer anderen Peptidsequenz, z. B. aus MUC4.<sup>[12]</sup> Die Immunantwort ist nach der dritten Immunisierung spezifisch und vom IgG-Typ, fällt aber nur bei jeder dritten Maus genügend stark aus. Daher und um die Barriere zur Anwendung beim Menschen zu überwinden, haben wir das Sialyl-T<sub>N</sub>-MUC1-Glycopeptidantigen an Tetanustoxoid als Trägerprotein angebunden. Tetanustoxoid-Konjugate mit natürlichen viralen oder bakteriellen Strukturen wurden in mehreren Impfstoffen beim Menschen angewendet.<sup>[13]</sup>

Das tumorassoziierte MUC1-Tandem-Repeat-Glycopeptidantigen wurde an **1**, einem Tentagel-Harz<sup>[14]</sup>, an das über einen Tritylanker<sup>[15]</sup> Fmoc-Prolin gebunden ist, aufgebaut (Schema 1). Die Kupplung der Fmoc-Aminosäuren (10 Äquiv.) erfolgte mit HBTU/HOBt,<sup>[16]</sup> die des glycosylierten Fmoc-Threonin-Bausteins **2** (2 Äquiv.) mit HATU/HOAt<sup>[17]</sup> in bereits beschriebener Weise.<sup>[10,11]</sup> Nach Aufbau der vollen MUC1-Tandem-Repeat-Sequenz **3** am Harz, in Schema 1 gezeigt für das Glycopeptid **3** mit Sialyl-T<sub>N</sub>-Antigen-Seitenkette, wurde ein Teil nach Ersatz der Fmoc- durch die *N*-Acetylgruppe mit Trifluoressigsäure (TFA)/Triisopropylsilan (TIS)/H<sub>2</sub>O vom Harz abgelöst. Nach chromatographischer Reinigung wurden durch Hydrogenolyse der NeuNAc-Benzylester und durch Behandlung mit katalytischen Mengen an NaOMe in Methanol bei pH 9.5 die *O*-Acetylgruppen entfernt. Das Sialyl-T<sub>N</sub>-MUC1-Glycopeptid **4a** fiel nach präparativer HPLC in 65 % Ausbeute an. Analog wurden die MUC1-Glycopeptide mit einer T<sub>N</sub>-Antigen- (**4b**), einer Sialyl-T<sub>N</sub>- und einer T<sub>N</sub>-Antigen- (**4c**), einer Sialyl-T<sub>N</sub>- und zwei T<sub>N</sub>-Antigen- (**4d**), einer 2,6-Sialyl-T<sub>N</sub><sup>[18]</sup> (**4e**), einer 2,3-Sialyl-T<sub>N</sub><sup>[19]</sup> (**4f**) und einer T-Antigen-Seitenkette (**4g**) sowie das unglycosylierte MUC1-Eicosapeptid **4h** hergestellt (Schema 2).

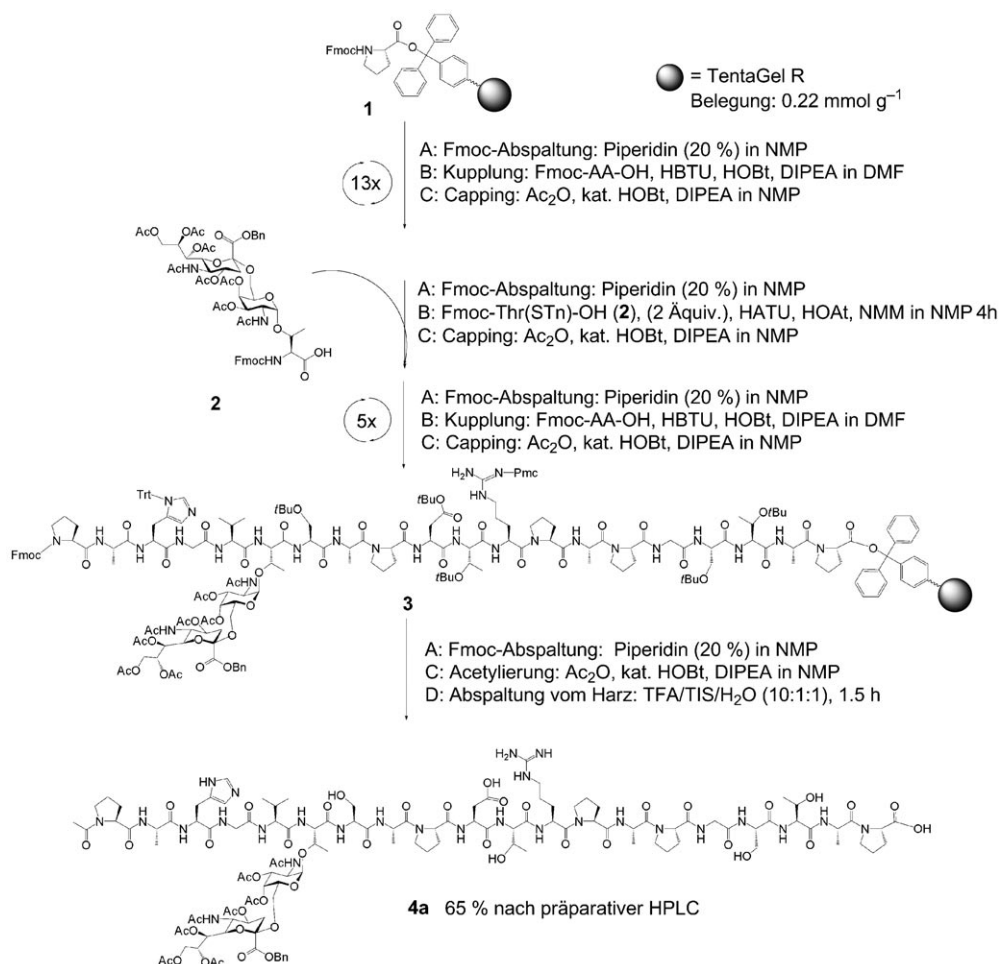
Zur Gewinnung des Impfstoffs, der das tumorassoziierte Sialyl-T<sub>N</sub>-MUC1-Glycopeptid **4a** als prägendes Antigen enthält, wurde die harzgebundene Form **3** mit der Fmoc-geschützten Triethylenglycol-Spaceraminosäure **5**<sup>[20]</sup> zu **6** verlängert (Schema 3). Entfernung der Fmoc-Gruppe, acidolytische Abspaltung vom Harz und Spaltung aller säurelabilen Gruppen ergaben nach präparativer HPLC das Spacer-Gly-

[\*] A. Kaiser, N. Gaidzik, Dr. U. Westerlind, D. Kowalczyk, Prof. Dr. H. Kunz

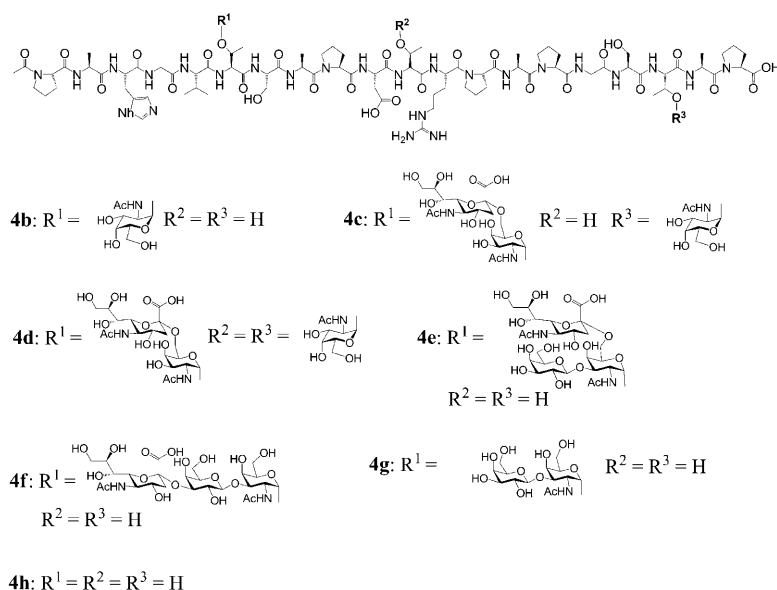
Johannes Gutenberg-Universität Mainz  
Institut für Organische Chemie  
Duesbergweg 10–14, 55128 Mainz (Deutschland)  
Fax: (+49) 6131-392-4786  
E-Mail: hokunz@uni-mainz.de

A. Hobel, Prof. Dr. E. Schmitt  
Johannes Gutenberg-Universität Mainz, Institut für Immunologie  
Obere Zahlbacher Straße 67, 55101 Mainz (Deutschland)

[\*\*] Diese Arbeit wurde durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft gefördert. U.W. dankt für ein Postdoktorandenstipendium der Alexander-von-Humboldt-Stiftung.



**Scheme 1.** Festphasensynthese der tumorassoziierten MUC1-Tandem-Repeat-Glycopeptide: NMP: *N*-Methylpyrrolidon; HBTU: *O*-(Benzotriazol-1-yl)-*N,N,N',N'*-tetramethyluronium-hexafluorophosphat, HOBT: 1-Hydroxybenzotriazol, DIPEA: Diisopropylethylamin, HATU: *O*-(7-Azabenzotriazol-1-yl)-*N,N,N',N'*-tetramethyluronium-hexafluorophosphat, HOAt: 7-Aza-1-hydroxybenzotriazol.

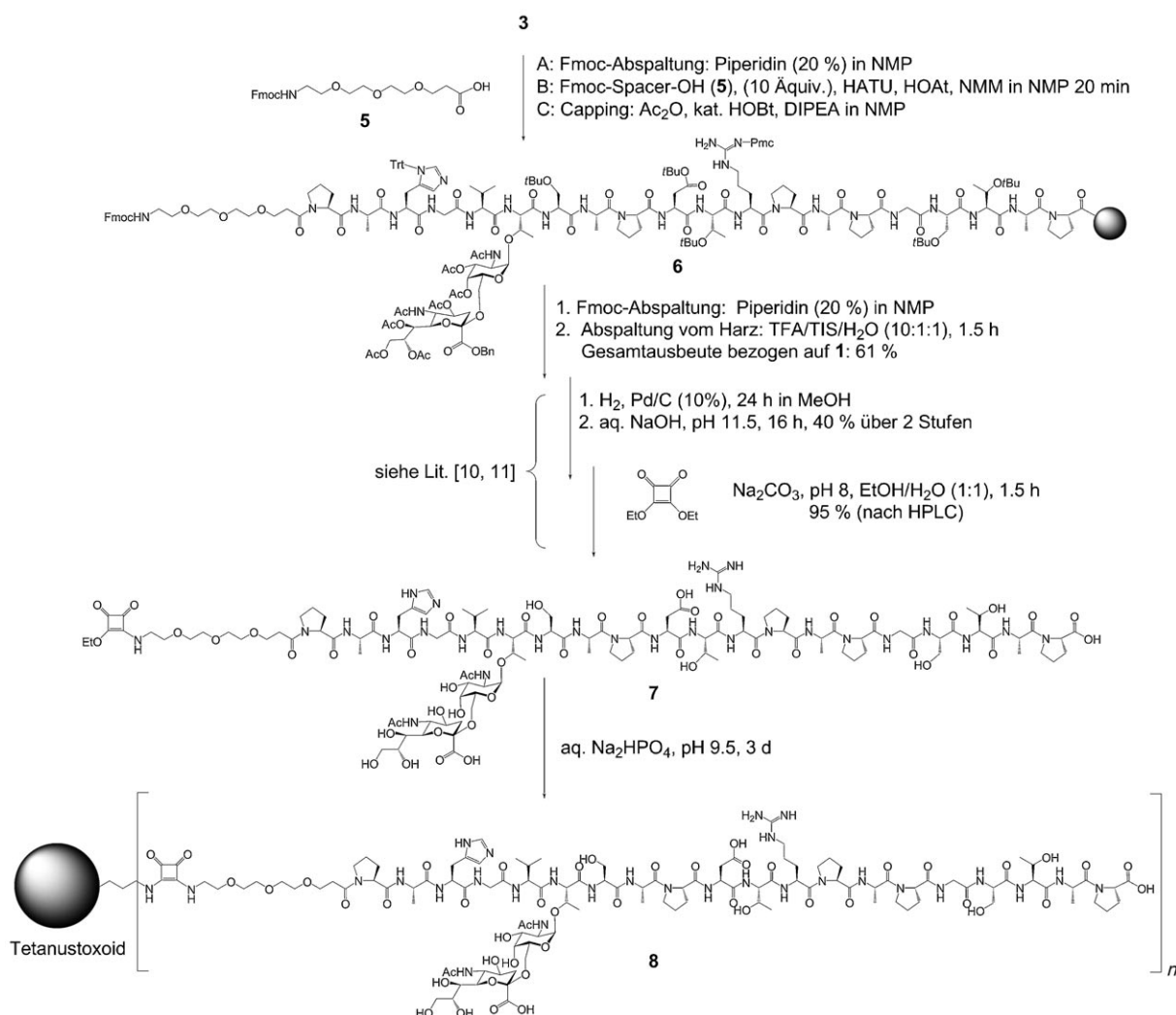


**Scheme 2.** Analog Schema 1 synthetisierte MUC1-Glycopeptidantigene.

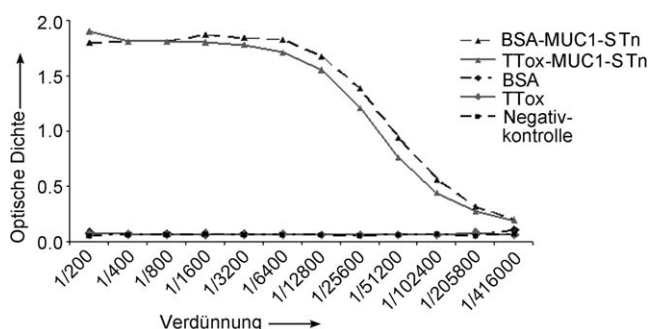
copeptidantigen in 61 % Gesamtausbeute bezogen auf **1**. Hydrogenolyse des Benzylesters und basenkatalysierte Umesterung lieferten das deblockierte Glycopeptid, das in Ethanol/H<sub>2</sub>O mit Quadratsäurediethylester<sup>[21]</sup> zum Monoamidester **7**<sup>[22]</sup> umgesetzt wurde. Dieser wurde in wässrigem Natriumphosphatpuffer mit dem Tetanustoxoid als Trägerprotein zum synthetischen Sialyl-T<sub>N</sub>-MUC1-TTox-Impfstoff **8** verknüpft. Durch Ultrafiltration (Membran 30 kDa) wurden niedermolekulare Verbindungen und nicht umgesetztes Glycopeptid **7** abgetrennt. Nach Waschen mit entionisiertem Wasser wurde der Impfstoff **8** durch Lyophilisierung gewonnen (7.5 mg). Die Massenzunahme spricht für die Anbindung von ca. 40 Molekülen Glycopeptidantigen **7** (Molekulargewicht ca. 2700) pro Molekül Tetanustoxoid (Molekulargewicht ca. 150000). Anders als bei den MUC1-Glycopeptid-BSA-(Rinderserumalbumin)-Konjugaten<sup>[11]</sup> war die Beladung von **8** durch Maldi-

TOF-Massenspektrometrie wegen des hohen Molekulargewichts nicht zu bestimmen.

Vergleichende ELISA-Tests<sup>[10,11]</sup> an gleichen Mengen (0.5 µg pro Vertiefung) von einerseits Impfstoff **8** und andererseits dem entsprechenden Glycopeptid-BSA-Konjugat **9**<sup>[11]</sup> (siehe Abbildung 2a) mit dem Serum einer Maus, die mit dem in Lit. [11] beschriebenen synthetischen Impfstoff aus Sialyl-T<sub>N</sub>-MUC1-Glycopeptid und T-Zellepitop aus Ovalbumin immunisiert worden war, zeigten die Bindung nahezu gleicher Antikörpermengen an (Abbildung 1). Die Antikörperbindung wurde photometrisch mithilfe eines biotinylierten Anti-Maus-Antikörpers und durch anschließende Behandlung mit Streptavidin-Meerrettichperoxidase (HPO)<sup>[23]</sup> ermittelt. Da das Konjugat **9** im Mittel 7 Moleküle MUC1-Glycopeptid trägt,<sup>[11]</sup> aber nur etwa ein Drittel des Molekulargewichts von **8** hat, müssen mindestens 20 Moleküle synthetisches Glycopeptid pro Molekül **8** gebunden sein. Dies ist nur eine



**Schema 3.** Synthese des Sialyl-T<sub>N</sub>-MUC1-Tetanustoxoid-Impfstoffs **8**.



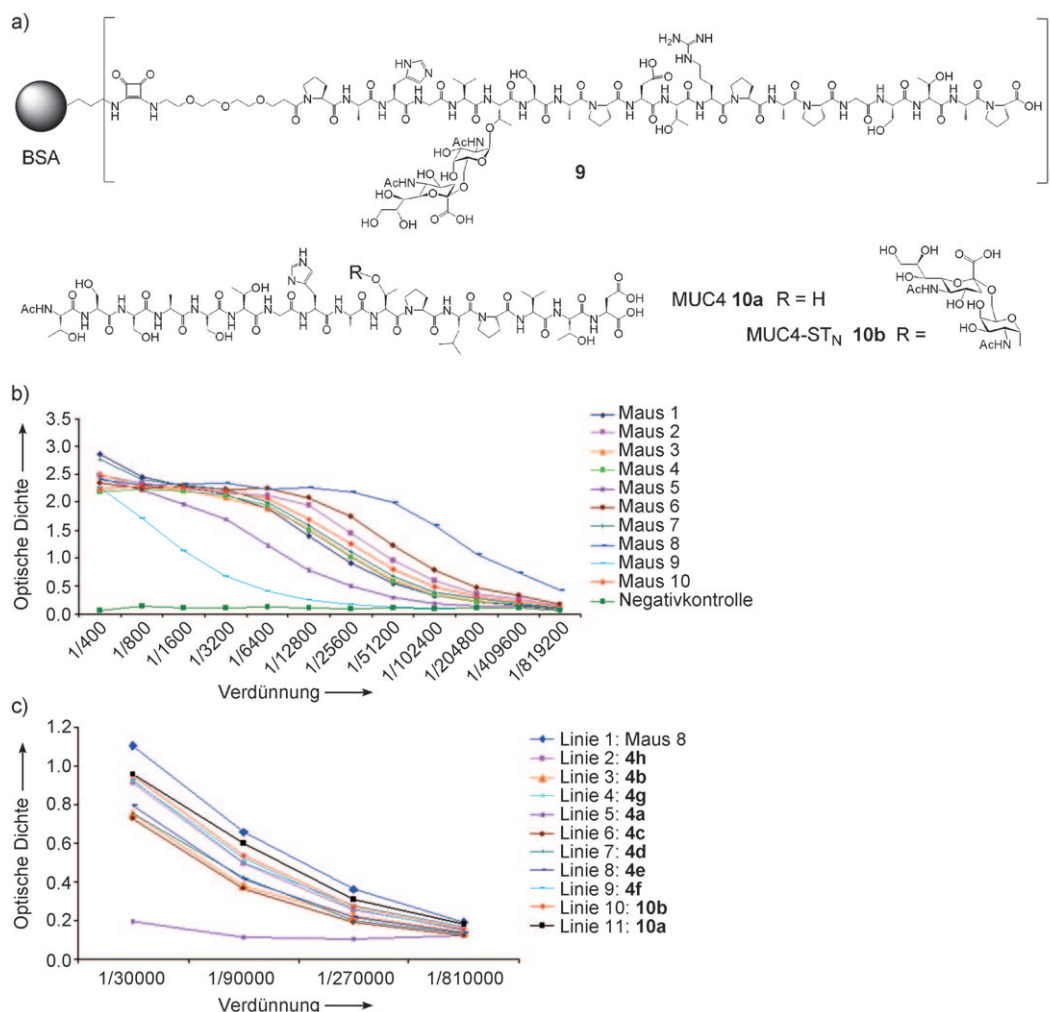
**Abbildung 1.** Ermittlung der Beladung von **8** durch vergleichende ELISA-Tests.

Abschätzung, denn die relative Zahl der für Antikörper zugänglichen Glycopeptidantigene ist beim voluminösen TTTox-Impfstoff geringer als beim BSA-Konjugat. Der ELISA-Test (Abbildung 1) zeigt zudem, dass die mit **8** induzierten Antikörper weder an BSA noch an Tetanustoxoid selbst binden.

Zehn acht Wochen alte Balb/c-Mäuse wurden mit 20 µg **8** (in 40 µL PBS-Puffer) und komplettem Freund-Adjuvans (CFA) immunisiert. Nach 21 Tagen wurde mit 20 µg **8** und inkomplettem Freund-Adjuvans eine Auffrischungsimpfung vorgenommen. Fünf Tage nach der zweiten Immunisierung wurde Blut von den Mäusen genommen und zentrifugiert. In Verdünnungsreihen wurde das Serum hinsichtlich seiner Bindung an das Konjugat **9**<sup>[11]</sup> ausgemessen (Abbildung 2b).

Die Ergebnisse zeigen, dass durch den Sialyl-T<sub>N</sub>-Tetanustoxoid-Impfstoff **8** in allen behandelten Mäusen eine starke Immunantwort ausgelöst wird. In den Mäusen **8** und **6** werden Antikörpertiter von 1/100 000–1/200 000 gefunden. Damit ist die eingangs geschilderte Anforderung erfüllt, dass ein Krebsimpfstoff eine starke, toleranzdurchbrechende Immunreaktion auslösen muss. Auch ist mit der Bindung an das Tetanustoxoid erstmals ein Weg eröffnet, diese Immunisierung von der Maus in den Menschen zu übertragen.

Die Selektivität der Immunantwort wurde durch Neutralisierungsexperimente mit dem Serum von Maus **8** ermittelt. Dazu wurde das Konjugat **9** in einer 96er-Platte aufgebracht und mit PBS-Puffer, der 1 % BSA enthält, gewaschen



**Abbildung 2.** a) Chemische Formeln der Verbindungen **9** und **10**. b) ELISA der Seren der mit dem Impfstoff **8** immunisierten Mäuse, Beschichtung der Mikrotiterplatten mit dem Konjugat **9**. c) Neutralisierung des von Maus 8 durch Impfung mit **8** erhaltenen Serums durch die (Glyco)peptidantigene **4** und **10**.

und geblockt. Das Serum wurde in drei Verdünnungen mit jeweils 100 µg der Glycopeptidantigene **4a–4h** bei 37°C 1 h inkubiert und danach auf die ELISA-Platte übertragen. Nach Waschen mit Puffer wurde mit biotinyliertem Anti-Maus-Antikörper und durch Ausmessen von dessen Bindung des Streptavidin-HPO-Konjugats<sup>[10,11]</sup> die verbleibende Affinität des Serums für **9** durch die farbstoffbildende Peroxidase-Reaktion<sup>[23]</sup> bei  $\lambda = 410$  nm bestimmt (Abbildung 2c).

Die Werte zeigen, dass die Bindung des unbehandelten Serums von Maus 8 (Linie 1) nach Inkubation mit dem Sialyl-T<sub>N</sub>-MUC1-Antigen **4a**, das ist das im Impfstoff **8** enthaltene Antigen, völlig unterbunden ist (Linie 5). Die MUC1-Glycopeptidantigene **4b** (Linie 3), **4c** (Linie 6), **4d** (Linie 7) und **4e** (Linie 8) blockieren die durch **8** induzierten Antikörper noch in erheblichem Maße. Sie enthalten die gleiche Peptidsequenz und wesentliche Teile des Sialyl-T<sub>N</sub>-Disaccharids und verkörpern allesamt tumorassoziierte MUC1-Strukturen. Dagegen binden das unglycosylierte MUC1-Peptid gleicher Sequenz (**4h**, Linie 2), das MUC1-Glycopeptid mit T-Antigen (**4g**, Linie 4) sowie das mit 2,3-Sialyl-T-Seitenkette (**4f**,

Linie 9) nur schwach, obwohl sie ebenfalls die identische Peptidsequenz enthalten. Die MUC4-Tandem-Repeat-Sequenz (**10a**, Linie 11) und deren Glycopeptid mit Sialyl-T<sub>N</sub>-Antigenseitenkette<sup>[12,24]</sup>

**10b** (Linie 10) neutralisieren die von **8** induzierten Antikörper nicht, was die hohe Selektivität der induzierten Immunantwort gegenüber der MUC1-Peptidsequenz unterstreicht.

Vergleicht man die sehr schwach neutralisierende Wirkung von **10b**, welches das Sialyl-T<sub>N</sub>-Saccharid an eine andere Peptidsequenz gebunden enthält, und der nicht-glycosylierten MUC1-Tandem-Repeat-Sequenz **4h** mit der fast vollständigen Neutralisierung der durch **8** induzierten Antikörper durch **4a**, so wird die hohe Selektivität der durch **8** ausgelösten Immunantwort deutlich.

Weder das Saccharid noch das Peptid allein werden von den Antikörpern erkannt. Allerdings werden die **4a** nahe verwandten Glycopeptidstrukturen **4b–e**, die ebenfalls tumorassoziierte MUC1-Glycopeptidstrukturen sind, durch die induzierten Antikörper in abgeschwächtem, aber deutlichen Ausmaß gebunden. Für eine praktische Anwendung in einem Krebsimpfstoff ist diese Erkennungsbreite bei der gegebenen hohen Strukturselektivität von Vorteil. Von besonderem Wert ist jedoch, dass mit dem synthetischen Impfstoff **8** aus Sialyl-T<sub>N</sub>-MUC1-Glycopeptidantigen (**4a**) und Tetanustoxoid eine sehr starke und hochselektive Immunreaktion induziert wird und dass auf der Basis von Tetanustoxoid als Trägerprotein eine Anwendung dieser Immunisierung beim Menschen möglich wird.

Eingegangen am 14. Mai 2009

Online veröffentlicht am 15. August 2009



**Stichwörter:** Glycopeptide · Proteinkonjugate · Synthetische Impfstoffe · Tetanustoxoid · Tumorassoziierte Antigene

- [1] a) C. Leclerc, G. Przewlocki, M.-P. Schutze, L. Chedid, *Eur. J. Immunol.* **1987**, 17, 269; b) B. Agrawal, M. J. Krautz, M. J. Reddish, B. M. Longenecker, *Nat. Med.* **1998**, 4, 43; c) A. K. Chan, D. C. Lockhart, W. von Bernstorff, R. A. Spanjaard, H.-G. Joo, T. J. Eberlein, P. S. Goedegebuure, *Int. J. Cancer* **1999**, 82, 721; d) Z.-H. Jiang, R. R. Kogenty, *Curr. Med. Chem.* **2003**, 10, 1423; e) T. Buskas, S. Ingale, G.-J. Boons, *Angew. Chem.* **2005**, 117, 6139; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, 44, 5985.
- [2] a) T. F. Ørntoft, H. N. Harving, N. C. Langkilde, *Int. J. Cancer* **1990**, 45, 666; b) L. David, J. M. Nesland, H. Clausen, F. Carneiro, M. Sobrinho-Simoes APMIS **1992**, Suppl. 27, 100, 162; c) T. Kjeldsen, H. Clausen, S. Hirohashi, T. Ogawa, H. Iijima, S.-I. Hakomori, *Cancer Res.* **1988**, 48, 2214.
- [3] a) F. G. Snijdwint, S. von Mensdorff-Pouilly, A. H. Karuntu-Wanamarta, A. A. Verstraeten, I. van Zanten-Przybysz, P. Hummel, H. W. Nijman, P. Kenemans, J. Hilgers, *Cancer Immunol. Immunother.* **1999**, 48, 47; b) S. M. Barratt-Boyes, A. Vlach, O. J. Finn, *Clin. Cancer Res.* **1999**, 5, 1918; B. M. Sandmeyer, D. V. Oparin, L. A. Hohnberg, M. A. Reddish, G. D. McLean, B. M. Longenecker, *J. Immunol.* **1999**, 22, 54; c) A. L. Sørensen, C. S. Reis, M. A. Tarp, U. Mandel, K. Ramchandran, V. Sankaranarayanan, T. Schwientek, R. Graham, J. Taylor-Papadimitriou, M. A. Hollingworth, J. Burchell, H. Clausen, *Glycobiology* **2006**, 16, 96.
- [4] a) J. Taylor-Papadimitriou, J. M. Burchell, D. W. Miles, M. Dalziel, *Biochim. Biophys. Acta Mol. Basis Dis.* **1999**, 1455, 301; b) F. G. Hanisch, *Biol. Chem.* **2001**, 382, 143.
- [5] I. Brockhausen, J.-M. Yang, J. Burchell, C. Whitehouse, J. Taylor-Papadimitriou, *Eur. J. Biochem.* **1995**, 233, 607.
- [6] a) T. G. Hanisch, T. R. E. Stadie, F. Deutermann, J. Peter-Katalinic, *Eur. J. Biochem.* **1996**, 236, 318; b) V. Whitehouse, J. Burchell, S. Gschmeissner, I. Brockhausen, K. O. Lloyd, J. Taylor-Papadimitriou, *J. Cell Biol.* **1997**, 137, 1229.
- [7] a) G. F. Springer, *Science* **1984**, 224, 1198; b) S. H. Itzkowitz, M. Yuan, C. K. Montgomery, T. Kjeldsen, H. K. Takahashi, W. L. Bigbee, Y. S. Kim, *Cancer Res.* **1990**, 75, 1031; c) H. Inone, *Obstet. Gynecol.* **1990**, 75, 1031; d) I. Takahashi, I. Maehara, T. Kusumoto, M. Yoshida, Y. Katcej, H. Kusumoto, M. Furusawa, K. Suglimacti, *Cancer* **1993**, 72, 18836; e) R. Soares, A. Marinho, F. Schmitt, *Pathol. Res. Pract.* **1996**, 192, 1182.
- [8] a) H. Kunz, S. Birnbach, *Angew. Chem.* **1986**, 98, 354; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1986**, 25, 360; b) W. Dippold, A. Steinborn, K. H. Meyer zum Büschenfelde, *Environ. Health Perspect.* **1990**, 88, 255; c) H. Kunz, *J. Pept. Sci.* **2003**, 9, 563.
- [9] Übersichten: a) S. Dziadek, H. Kunz, *Chem. Rec.* **2004**, 3, 308; b) T. Becker, S. Dziadek, S. Wittrock, H. Kunz, *Curr. Cancer Drug Targets* **2006**, 6, 491; c) A. Liakatos, H. Kunz, *Curr. Opin. Mol. Ther.* **2007**, 9, 35, zit. Lit.
- [10] S. Dziadek, A. Hobel, E. Schmitt, H. Kunz, *Angew. Chem.* **2005**, 117, 7803; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, 44, 7630.
- [11] U. Westerlind, A. Hobel, N. Gaidzik, E. Schmitt, H. Kunz, *Angew. Chem.* **2008**, 120, 7662; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, 47, 7551.
- [12] C. Brocke, H. Kunz, *Synthesis* **2004**, 525.
- [13] a) A. Barra, C. Cordonnier, M. P. Preziosi, L. Intrator, L. Hessel, B. Fritzell, J. L. Preud'homme, *J. Infect. Dis.* **1992**, 166, 1021; b) D. W. Scheifele, W. Meekison, R. Guasparini, A. Roberts, L. Barreto, J. Thippawong, S. Wiltsey, *Vaccine* **1995**, 13, 104; c) S. Kuritska, H. Kayhty, L. Saarinen, P.-R. Rounberg, J. Eskola, H. P. Makela, *J. Pediatr.* **1996**, 128, 525; d) R. E. Huebner, M. Nicol, R. Mothupi, H. Kaeyhty, N. Mbelle, E. Khomo, K.-P. Klugman, *Vaccine* **2005**, 23, 802; e) T. Nolan, S. Lambert, D. Robertson, H. Marshall, P. Richmond, C. Streton, J. Poolman, D. Boutriau, *Vaccine* **2007**, 25, 8487.
- [14] Rapp Polymere, Tübingen, Deutschland.
- [15] J. M. J. Fréchet, K. E. Haque, *Tetrahedron Lett.* **1975**, 16, 3055.
- [16] V. Dourtoglou, B. Gross, V. Lambropoulou, C. Ziodrou, *Synthesis* **1984**, 572.
- [17] L. A. Carpino, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, 115, 4397.
- [18] S. Dziadek, C. Griesinger, H. Kunz, U. M. Reinscheid, *Chem. Eur. J.* **2006**, 12, 4981.
- [19] S. Dziadek, C. Brocke, H. Kunz, *Chem. Eur. J.* **2004**, 10, 4150.
- [20] a) S. Keil, C. Claus, W. Dippold, H. Kunz, *Angew. Chem.* **2001**, 113, 379; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, 40, 366; b) S. Keil, A. Kaiser, F. Syed, H. Kunz, *Synthesis* **2009**, 1355.
- [21] L. F. Tietze, C. Schröder, S. Gabius, U. Brinck, A. Goerlach-Graw, H.-J. Gabius, *Bioconjugate Chem.* **1991**, 2, 148.
- [22] 7: [ $\alpha_{23}^D = -47.2$  ( $c = 1.00$  g(100 mL) $^{-1}$ , H<sub>2</sub>O); MALDI-TOF-MS (dhb, positiv):  $m/z$ : 2710.29 ( $[M+H]^+$ , ber.: 2708.23);  $^1$ H-NMR (400 MHz, D<sub>2</sub>O, COSY, HSQC):  $\delta = 8.50$  (d, 1H, H<sub>e</sub>,  $J_{He,Hb} = 1.44$  Hz), 7.21 (d, 1H, H<sub>b</sub>,  $J_{Hb,Hc} = 1.11$  Hz), 4.81 (d, 1H, H<sub>i</sub>,  $J_{Hi,H2} = 3.60$  Hz), 4.62–4.04 (m, 23H, D<sub>a</sub> {4.60}, CH<sub>2</sub>O-Squarat {4.59}, H<sub>a</sub> {4.57}, R<sub>a</sub> {4.52}, A<sub>3a</sub> {4.47}, A<sub>2a</sub> {4.44}, S<sub>2a</sub> {4.38}, A<sub>4a</sub> {4.34}, S<sub>1a</sub> {4.31}, P<sub>1,5a</sub> {4.28, 4.26, 4.23, 4.19, 4.17}, V<sub>a</sub> {4.19}, T<sub>STna</sub> {4.17}, T<sub>STnb</sub> {4.14}, A<sub>1a</sub> {4.12}, T<sub>1a</sub> {4.10}, T<sub>2a</sub> {4.08}, T<sub>2b</sub> {4.06}, T<sub>1b</sub> {4.05}), 3.97–3.59 (m, 23H, H<sub>2</sub> {3.94}, G<sub>1aa</sub> {3.88}, G<sub>1ab</sub> {3.86}, H<sub>5</sub> {3.77}, 4 × CH<sub>2</sub>O-Spacer {3.76}, S<sub>2b</sub> {3.74}, G<sub>2a</sub> {3.71}, H<sub>3</sub> {3.69}, S<sub>1b</sub> {3.67}, 3-CH<sub>2</sub>-Spacer {3.66}, H<sub>6,ab</sub> {3.64}), 3.58–3.29 (m, 18H, H<sub>4</sub> {3.57}, H<sub>6''</sub> {3.56}, H<sub>9a''</sub> {3.56}, H<sub>7''</sub> {3.55}, P<sub>1,5b</sub> {3.56, 3.53, 3.48, 3.44}, H<sub>9b''</sub> {3.54}, H<sub>4''</sub> {3.53}, H<sub>8''</sub> {3.52}, H<sub>5''</sub> {3.48}), 3.18 (d, 1H, H<sub>ba</sub>,  $J_{He,Hb} = 5.88$  Hz), 3.12–3.02 (m, 7H, CH<sub>2</sub>-Spacer {3.08}, H<sub>bb</sub> {3.08}, D<sub>ba</sub> {3.07}, R<sub>b</sub> {3.04}), 2.81 (m, 1H, D<sub>bb</sub>), 2.60 (t, 2H, 12-CH<sub>2</sub>-Spacer,  $J_{CH_2CH_2} = 6.32$  Hz), 2.57–2.48 (m, 3H, H<sub>3eq</sub>'' {2.54}, CH<sub>2</sub>-Spacer {2.53}), 2.26–2.07 (m, 4H, P<sub>1,2ba</sub> {2.22, 2.19}, CH<sub>2</sub>-Spacer {2.14}), 2.01–1.67 (m, 26H, P<sub>3,5ba</sub> {1.97, 1.89, 1.84}, V<sub>b</sub> {1.96}, P<sub>1,5b</sub> {1.95–1.81}, P<sub>1,5bb</sub> {2.00, 1.96, 1.91, 1.87, 1.83}, AcNH {2 × s, 1.89, 1.89}, R<sub>ba</sub> {1.76}), 1.65–1.47 (m, 7H, R<sub>bb</sub> {1.60}, H<sub>3ax</sub>'' {1.55}, R<sub>c</sub> {1.53}, CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>-Squarat {1.49}), 1.33–1.19 (m, 12H, A<sub>2b</sub> {1.25, d, A<sub>3b</sub>  $J_{A\beta,A\alpha} = 7.0$  Hz}, {1.23 d, A<sub>4b</sub>,  $J_{A\beta,A\alpha} = 7.28$  Hz}, {1.20, d, A<sub>1b</sub>,  $J_{A\beta,A\alpha} = 7.28$  Hz}), 1.16 (d, 3H, T<sub>STnb</sub>,  $J_{T\gamma,T\beta} = 6.16$  Hz), 1.08 (d, 3H, T<sub>2\gamma</sub>,  $J_{T\gamma,T\beta} = 6.50$  Hz), 1.05 (d, 3H, T<sub>1\gamma</sub>,  $J_{T\gamma,T\beta} = 6.44$  Hz), 0.84 (d, 3H, V<sub>γ</sub>,  $J_{V\gamma a,V\beta} = 6.52$  Hz), 0.82 ppm (d, 3H, V<sub>γ</sub>,  $J_{V\gamma b,V\beta} = 6.44$  Hz).
- [23] HPO katalysiert die Oxidation der farblosen 2,2'-Azinobis(3-ethylbenzthiazolin-6-sulfonsäure) durch H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> zum metastabilen grünen Radikalkation mit einem Absorptionsmaximum bei  $\lambda = 414$  nm.
- [24] C. Brocke, H. Kunz, *Synlett* **2003**, 2052.