

Synthetische Antitumorvakzine aus Tetanus-Toxoid-Konjugaten von MUC1-Glycopeptiden mit Thomsen-Friedenreich-Antigen und dessen fluorsubstituiertem Analogon**

Anja Hoffmann-Röder,* Anton Kaiser, Sarah Wagner, Nikola Gaidzik, Danuta Kowalczyk, Ulrika Westerlind, Bastian Gerlitzki, Edgar Schmitt und Horst Kunz*

Professor Albert Eschenmoser zum 85. Geburtstag gewidmet

Eine Aktivimmunisierung gegen menschliche Tumorzellen würde völlig neue Möglichkeiten der Tumortherapie eröffnen. Für sie wären Vakzine erforderlich, durch die eine starke, gegen die Tumorzellen gerichtete Immunantwort induziert wird. Das auf epithelialen Tumorzellen stark überexprimierte tumorassoziierte Mucin MUC1^[1–3] ist ein Kandidat für die Entwicklung einer solchen Vakzine. Es trägt im Vergleich zu MUC1 auf normalen Epithelzellen in der extrazellulären Tandem-Repeat-Region verkürzte, vorzeitig sialylierte Saccharidantigene, wie das T_N-, das Thomsen-Friedenreich-(T-) und das Sialyl-T_N-Antigen.^[1–4] Isoliert aus biologischem Material, d.h. aus Tumorzellmembranen, ist es wegen der biologischen Mikroheterogenität seiner Glycane, in denen Antigene aus sowohl gesunden als auch malignen Zellen vorliegen, für Vakzinierungen nicht geeignet. Mit synthetischen Glycopeptiden, die definierte tumorassoziierte Saccharide gebunden an Tandem-Repeat-Peptidsequenzen aus dem MUC1 enthalten, sollte dagegen eine gezielte Immunreaktion gegen epitheliale Tumorzellen ausgelöst werden können.

Die naturidentischen Glycopeptide und Peptide sind jedoch zu schwach immunogen, um eine starke Immunantwort hervorzurufen. Selbst ihre Konjugate mit Rinderserumalbumin^[6,7] induzieren nur mäßige Immunreaktionen und Antikörper vom IgM-Typ. Dagegen wurden in transgenen Mäusen mit vollsynthetischen Konjugaten aus tumorassoziierten MUC1-Glycopeptiden und T-Zellepitop-Peptiden aus Ovalbumin starke, selektive Immunantworten vom IgG-Typ beobachtet,^[8,9] bisher allerdings nur bei einem Drittel der

behandelten Mäuse. Besonders starke Immunreaktionen wurden jedoch mit einer synthetischen Vakzine erreicht, in der das MUC1-Glycopeptid mit einer Sialyl-T_N-Saccharid-Seitenkette an Tetanus-Toxoid als Trägerprotein gebunden ist.^[10] Tetanus-Toxoid enthält offenbar auch bei der Immunisierung von Mäusen wirksame T-Zellepitope. Auf Tetanus-Toxoid beruhende MUC1-Glycopeptid-Vakzine^[10] haben den großen Vorteil, dass sie für Anwendungen beim Menschen^[11] geeignet sind. Eine selektive Immunantwort bei allen behandelten Mäusen konnte ebenfalls mit einer vollsynthetischen Vakzine ausgelöst werden,^[12] die aus MUC1-Glycopeptid mit T-Antigen-Saccharid und einem Toll-like-Rezeptor-2-Lipopeptid^[13] besteht.

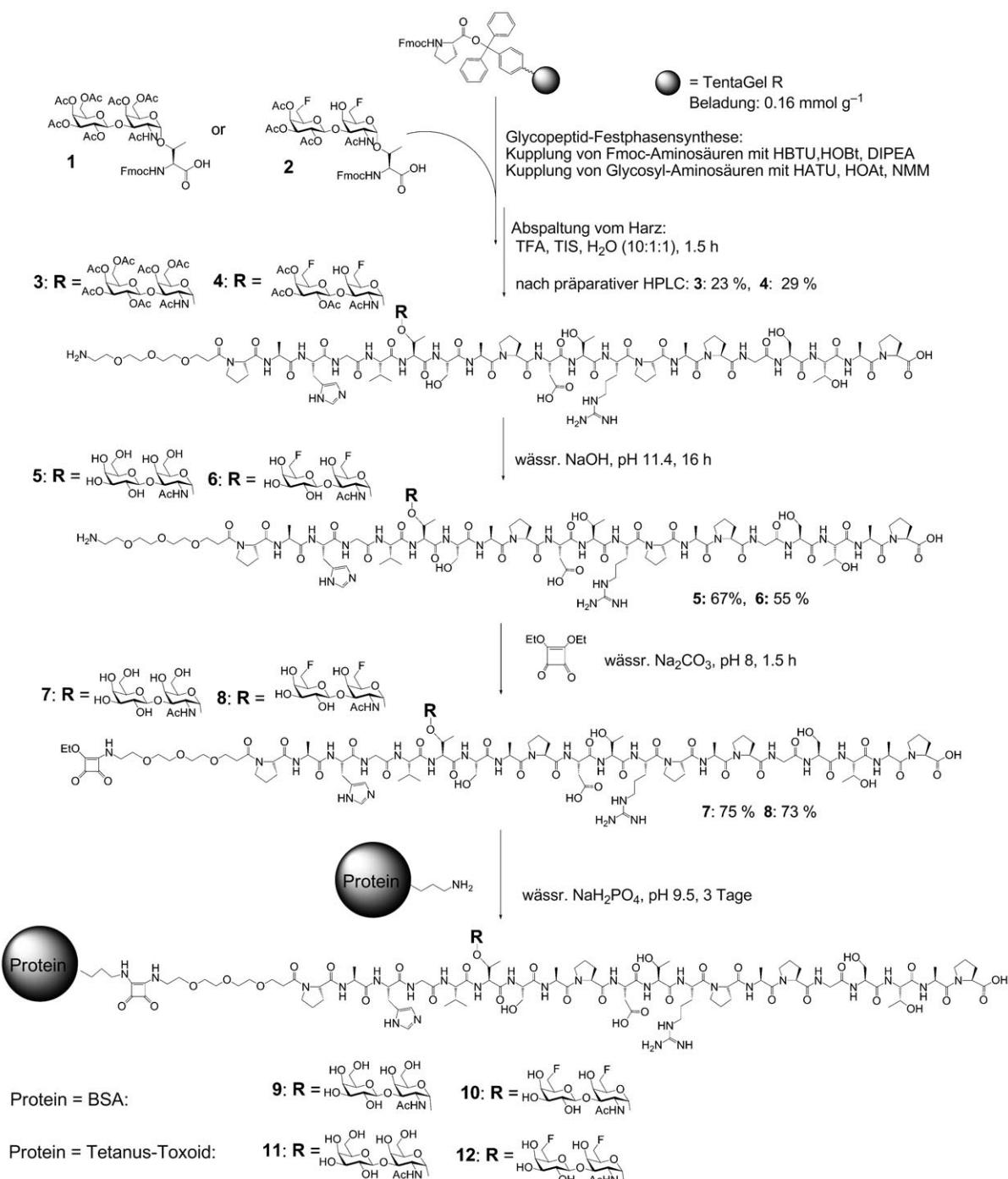
Diese Erfahrungen haben uns nun zur Synthese einer Vakzine aus dem Tetanus-Toxoid und MUC1-Glycopeptiden mit T-Antigen-Seitenkette geführt, da inzwischen auch ein dem T-Antigen analoger Glycosylaminosäure-Baustein zur Verfügung steht, der in den 6- und 6'-Positionen des Saccharids Fluorsubstituenten trägt.^[14] Der Vergleich der Eigenschaften der Vakzine mit der natürlichen und der mimetischen T-Antigen-Struktur soll klären, ob man die gegen enzymatischen Abbau empfindlichen Saccharidstrukturen ohne Verlust der immunologischen Wirkung durch verwandte Analoga ersetzen kann, die möglicherweise stabiler gegen enzymatischen Abbau und damit vorteilhaft bei Langzeitbehandlungen sein könnten.

Die Festphasensynthesen der N-terminal um einen Triethylenglycol-Spacer verlängerten MUC1-Tandem-Repeat-Glycopeptide mit T-Antigen- oder Difluor-T-Antigen-Saccharid-Seitenkette wurden an einem über einen Trityl-Anker^[15] mit Fmoc-Prolin beladenen Tentagel-Harz^[16] nach einem beschriebenen Verfahren^[17] durchgeführt (Schema 1). Die Fmoc-Aminosäuren wurden in 10 Äquivalenten eingesetzt und mit HBTU/HOBt^[18] in N-Methylpyrrolidon (NMP) gekuppelt. Zur Kupplung des Fmoc-geschützten T-Antigen-Threonin-Bausteins^[17] **1** oder des Fmoc-geschützten difluorierten T-Antigen-Bausteins^[14] **2** (2.5 Äquiv.) wurde das reaktivere HATU/HOAt-Reagens^[19] ebenfalls in NMP verwendet.

Nach Abschluss der Synthesen wurden die im Kohlenhydrat noch geschützten Glycopeptid-Antigene **3** (23 %) und **4** (29 %) mit Trifluoressigsäure/Triisopropylsilan/Wasser (10:1:1) bei gleichzeitiger Abspaltung der säurelabilen Schutzgruppen an den Aminosäureseitenketten vom Harz abgelöst und zur Entfernung der *O*-Acetyl-Gruppen mit

[*] Prof. Dr. A. Hoffmann-Röder, A. Kaiser, S. Wagner, N. Gaidzik, 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
Dr. U. Westerlind
Gesellschaft zur Förderung der Analytischen Wissenschaften e.V.
ISAS – Institute for Analytical Sciences
Otto-Hahn-Straße 6b, 44227 Dortmund (Deutschland)
B. Gerlitzki, Prof. Dr. E. Schmitt
Johannes Gutenberg-Universität Mainz
Universitätsmedizin Mainz, Institut für Immunologie
Langenbeckstraße 1, Geb. 708, 55101 Mainz (Deutschland)

[**] Diese Arbeit wurde von der Deutschen Forschungsgemeinschaft und der Jürgen-Knop-Stiftung gefördert.



Schema 1. Festphasensynthese der T-Antigen-MUC1-Glycopeptide **3** und **4** und ihre Kupplung an Proteine unter Bildung der Vakzinen **9–12**: Fmoc = Fluorenyl-9-methoxycarbonyl; HBTU = O-Benzotriazol-1-yl-N,N,N',N'-tetramethyluronium-hexafluorophosphat; HOBr = 1-Hydroxybenzotriazol; DIPEA = Diisopropylethylamin (Hünig-Base); NMM = N-Methylmorpholin; NMP = N-Methylpyrrolidon; TFA = Trifluoressigsäure; TIS = Triisopropylsilan; BSA = Rinderserumalbumin.

wässriger NaOH bei pH < 11.4 behandelt. Die so gewonnenen freien Glycopeptide **5** und **6** wurden nach präparativer HPLC in 67 % bzw. 55 % Ausbeute isoliert. Durch Reaktion der terminalen Aminogruppen am Triethylenglycol-Spacer mit Quadratsäurediethylester^[20] in wässriger Lösung bei pH 8 wurden daraus die Quadratsäuremonoamide der Glycopeptid-Antigene **7** (75 %) bzw. **8** (73 %) gebildet,^[21] die beim

Röhren mit Rinderserumalbumin (BSA) in wässrigem Phosphatpuffer bei pH 9.5 die BSA-Konjugate des T-Antigen-MUC1-Glycopeptids (**9**) bzw. des difluorierten T-Antigen-MUC1-Glycopeptids (**10**) ergaben. In gleicher Weise wurden die Quadratsäuremonoamide der Glycopeptide **7** und **8** mit Tetanus-Toxoid in wässriger Lösung verknüpft. Durch Ultrafiltration (30-kDa-Membran) wurden die T-Antigen-

MUC1-TTox-Vakzine **11** bzw. die F₂T-Antigen-MUC1-TTox-Vakzine **12** gewonnen.

Während die Beladung der BSA-Konjugate sich durch MALDI-TOF-Massenspektrometrie zu im Durchschnitt 7 Molekülen Glycopeptid-Antigen pro Molekül Protein ermittelten ließ (Abbildung 1), mussten die Beladungen der

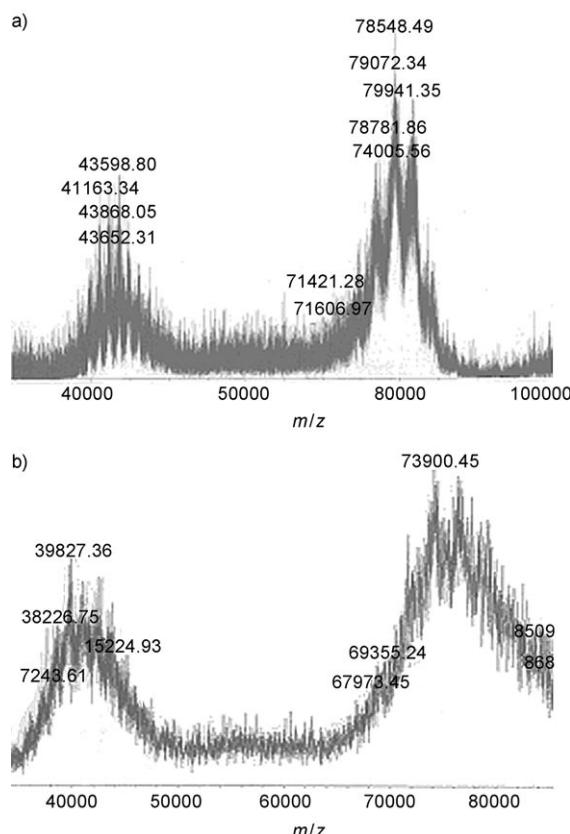


Abbildung 1. MALDI-TOF-Spektren des T-Antigen-MUC1-BSA-Konjugats **9** (a) und des Difluor-T-Antigen-MUC1-BSA-Konjugats **10** (b).

MUC1-TTOX-Vakzine **11** und **12** aus ELISA-Bindungsdaten^[10] abgeschätzt werden. Es ergaben sich Werte von > 20 Moleküle Glycopeptid-Antigen **7** bzw. **8** pro Molekül Protein.

Zur Ermittlung der immunologischen Eigenschaften wurden je drei Balb/c-Mäuse mit der T-Antigen-MUC1-Tetanus-Toxoid-Vakzine **11** (Maus 1–3) und der difluorierten T-Antigen-MUC1-Tetanus-Toxoid-Vakzine **12** (Maus 4–6) unter Zusatz von komplettem Freund-Adjuvans (CFA) immunisiert.

Nach je 21 Tagen wurden Auffrischungsimpfungen mit den Vakzinen **11** bzw. **12** und inkomplettem Freund-Adjuvans (IFA) durchgeführt. Am fünften Tag nach der dritten Immunisierung wurde Blut aus der Schwanzvene der Mäuse entnommen und das Serum auf die induzierten Antikörper geprüft. Bei allen sechs behandelten Mäusen war eine sehr starke Immunantwort festzustellen, die für das Durchbrechen der natürlichen Toleranz mehr als ausreichend war. Die Titer lagen im ELISA-Test bei den mit der natürlichen T-Antigen-MUC1-TTox-Vakzine **11** geimpften Mäusen 1–3 bei etwa 80000, wobei zur Beschichtung der Mikrotiterplatten das T-

Antigen-MUC1-BSA-Konjugat **9** verwendet wurde (Abbildung 2a). Die Immunantworten fallen also mehr als 25mal stärker aus, als dies in den besten Fällen der mit den synthetischen MUC1-OVA-T-Zellepitop-Vakzinen immunisierten Mäuse^[8,9] der Fall war, und gar 100mal stärker als gegen die Pam₃Cys-Lipopeptid-MUC1-Vakzine.^[12] Bei den mit dem Difluor-Analogon **12** immunisierten Mäusen 4–6 lagen die Titer bei etwa 40000 (Abbildung 2b). Hierzu wurden die Mikrotiterplatten mit den F₂T-Antigen-MUC1-BSA-Konjugat **10** beschichtet. Die durch die Vakzine **11** induzierten Antikörper erkennen das Glycopeptidantigen besonders stark im BSA-Konjugat **9**, das die gleiche Glycopeptidstruktur wie die Vakzine **11** aufweist (Abbildung 2a und Linie 1 in Abbildung 2c). Das Glycopeptid-BSA-Konjugat, das bei gleicher MUC1-Sequenz die T-Antigen-Stuktur innerhalb des 2,6-Sialyl-T-Antigens enthält,^[22] wird ähnlich stark gebunden (Linie 5, Abbildung 2c). Etwas schwächer fällt die Erkennung bei den ebenfalls tumorassoziierten Antigenen repräsentierenden BSA-Konjugaten mit Sialyl-T_N^[19] (Linie 2), mit einem Sialyl-T_N- und einem T_N-Antigen^[19] (letzteres gebunden an Threonin 18, Linie 3) und an das Konjugat mit dem nichtglycosylierten MUC1-Peptid aus (Linie 4). Die auf 12 Aminosäuren verkürzte Glycopeptidsequenz aus MUC1^[23] wird nur schwach erkannt (Linie 6). Ganz ähnlich verhalten sich die durch die Vakzine **12** induzierten Antikörper (Abbildung 2d), wobei hervorzuheben ist, dass deren Bindung an das natürliche T-Antigen-MUC1-BSA-Konjugat **9** (Linie 1, Abbildung 2d) gleich stark ausfällt wie die an das fluorsubstituierte Konjugat **10** (Abbildung 2b).

Die mit Isotyp-selektiven Antikörpern vorgenommene Ermittlung der Isotypen der entwickelten Antikörper ergab, dass durch beide Vakzine **11** und **12** überwiegend IgG₁-Antikörper, praktisch aber keine IgM-Antikörper induziert wurden. Die Immunantworten sind also selektiv und zeigen die Ausbildung eines immunologischen Gedächtnisses an (Abbildung 3a,b). Sie sind MHCII-restringiert. Im Fall der natürlichen T-Antigen-MUC1-Vakzine **11** wurden neben IgG₁ auch Anteile von IgG_{2a,b}-Antikörpern induziert, die in den durch die F₂T-Antigen-MUC1-Vakzine **12** induzierten Seren ein merkliches Ausmaß annahmen.

Für die Zielstellung des gesamten Vorhabens ist besonders wichtig, dass die durch die synthetischen Vakzine **11** und **12** induzierten Antikörper stark an Zellen der epithelialen Tumorzelllinie MCF-7^[24] binden. Um diese Bindung darzustellen, wurden die Tumorzellen mit den induzierten Antikörpern inkubiert. Nach Waschen wurden als Sekundärantikörper Anti-Maus-IgG aus der Ziege, die einen Fluoreszenzmarker (AlexaFluor 488) tragen, zu den Zellen zugegeben. Die so präparierten Zellen wurden im FACS-Analysegerät (fluorescent-activated cell sorter) durch Lichtstreuung gezählt (linkes Feld), wobei die Zellen, die durch die Antikörper aus den Maus-Antiseren erkannt wurden und deshalb fluoreszieren, gesondert ausgezählt werden (rechtes Feld). Man erkennt nun in Abbildung 4a, dass in der Kontrolle die mit Puffer-Lösung behandelten Zellen keine fluoreszenzmarkierten Anti-Maus-Antikörper binden, daher nicht fluoreszieren und im linken Feld erscheinen. Die mit tausendfach verdünntem Serum der mit Vakzine **11** immunisierten Maus 2 inkubierten MCF-7-Zellen wurden alle markiert und finden

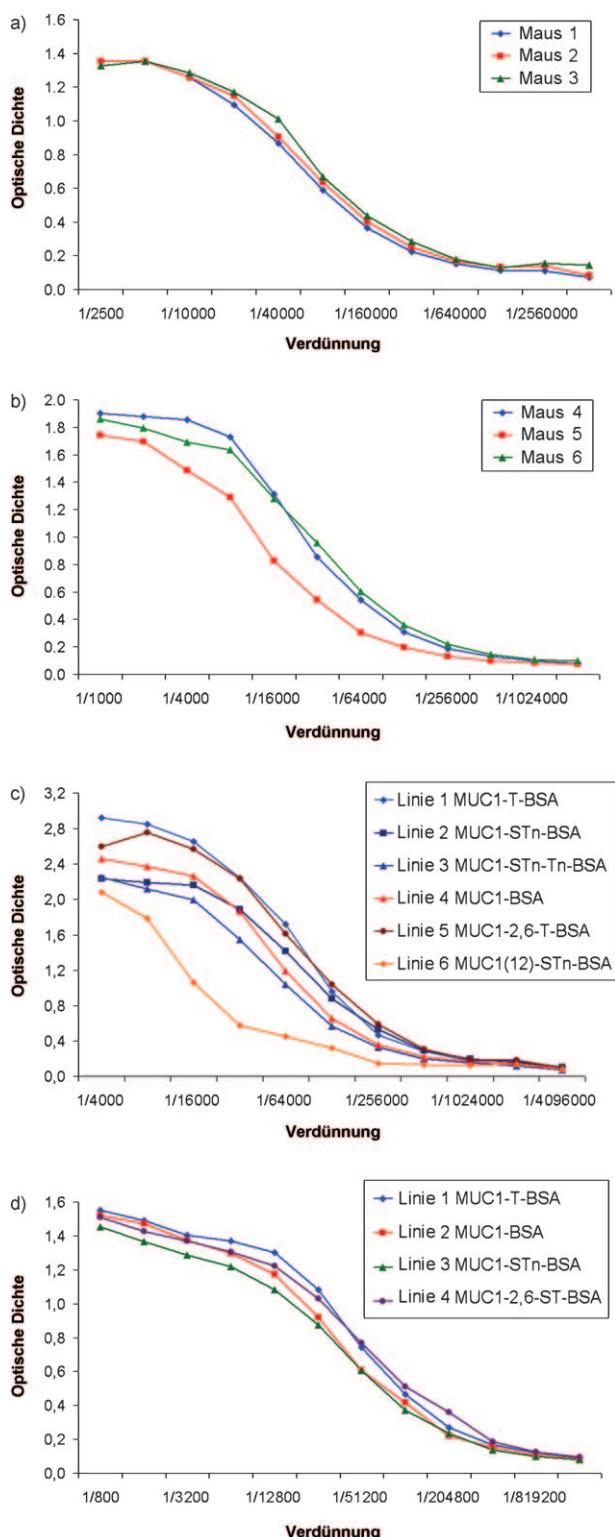


Abbildung 2. ELISA der durch die T-Antigen-MUC1-Vakzine induzierten Antiseren: a) Antiserum aus mit Vakzine **11** immunisierten Mäusen, Bindung an das BSA-Konjugat **9**; b) Antiserum aus mit Vakzine **12** immunisierten Mäusen, Bindung an das BSA-Konjugat **10**; c) Bindung der durch **11** induzierten Antikörper (Serum Maus 2) an verwandte tumorassoziierte Saccharidantigen-BSA-Konjugate; d) Bindung der durch **12** induzierten Antikörper (Serum Maus 6) an verwandte tumorassoziierte Saccharidantigen-BSA-Konjugate.

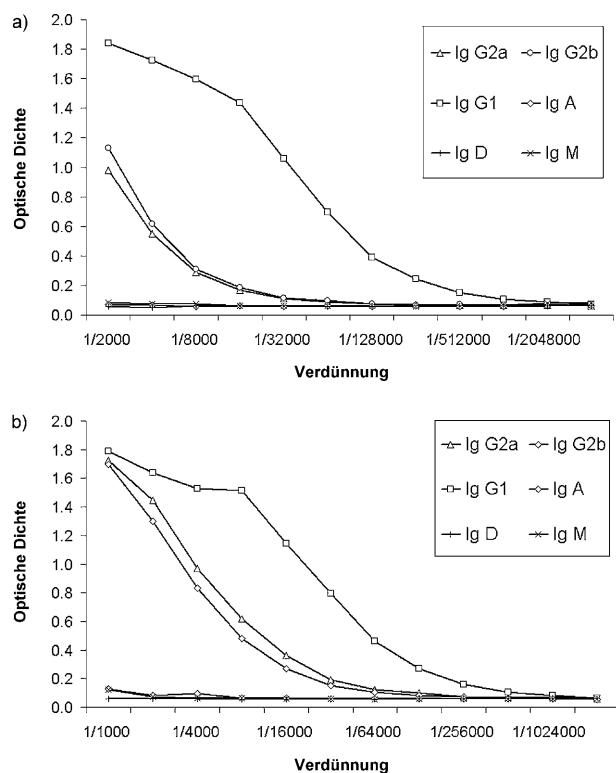


Abbildung 3. Bestimmung der Isotypen der durch die Vakzine **11** und **12** induzierten Antikörper: a) Antiserum von Maus 1, behandelt mit **11**; b) Antiserum von Maus 5, behandelt mit **12**.

sich im rechten Feld (Abbildung 4b). Nahezu gleich stark wurden die MCF-7-Zellen durch das ebenfalls tausendfach verdünnte Serum von Maus 5 erkannt, die mit Vakzine **12** mit dem fluorierten T-Antigen-MUC1 geimpft worden war (Abbildung 4c). Die Bindung der durch die synthetischen Vakzine induzierten Antikörper an die MCF-7-Tumorzellen ließ sich durch die MUC1-Glycopeptide wieder aufheben. Fügt man zu den mit dem Antiserum von Maus 2 (vakziniert mit **11**) inkubierten MCF-7-Zellen $3 \mu\text{g mL}^{-1}$ des T-Antigen-MUC1-Glycopeptids **5** hinzu, so wird die Affinität der Antikörper weitgehend neutralisiert (Abbildung 4e). In gleicher Weise neutralisiert das Glycopeptid **6** mit dem Difluor-T-Antigen ($3 \mu\text{g mL}^{-1}$) die Bindung von Antiserum aus Maus 5 an die Tumorzellen (Abbildung 4f).

Das Serum von Maus 5 wird auch durch das natürliche Glycopeptid-Antigen **5** neutralisiert, ebenso wie das Serum von Maus 2 durch das fluorierte Glycopeptid-Antigen **6** neutralisiert wird. Dagegen kann durch ein Glycopeptid aus einem anderen Mucin (MUC4),^[17] das eine andere Peptidsequenz hat, diese Erkennung der Tumorzellen nicht aufgehoben werden (Abbildung 4d). Die Erkennung der Tumorzellen durch die mit den T-Antigen-MUC1-TTox-Vakzinen induzierten Antiseren ist also selektiv gegen tumorassoziierte Glycopeptidantigene wie **5** und **6** gerichtet.

Mit diesen Ergebnissen sind wir einer synthetischen Antitumorvakzine, die zur gezielten Aktivimmunisierung praktisch eingesetzt werden könnte, entscheidend näher gekommen. Durch die T-Antigen-MUC1-Tetanus-Toxoid-Vakzine **11** und **12** werden außerordentlich starke Immunreaktionen

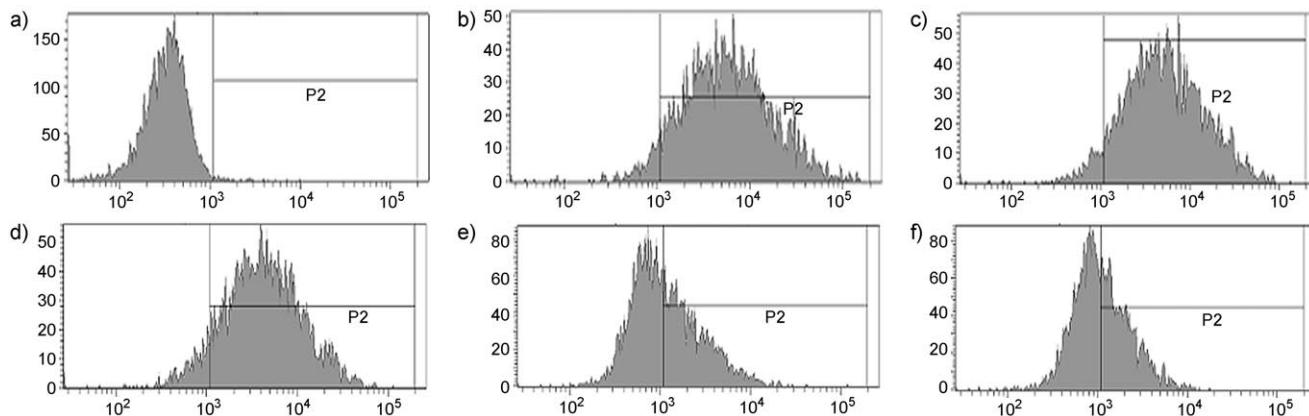


Abbildung 4. FACS-Analyse der Bindung der Antiseren an MCF-7-Zellen: a) Mit Pufferlösung behandelte Tumorzellen der Linie MCF-7; b) MCF-7-Zellen, die mit Serum der mit **11** geimpften Maus 2 behandelt wurden; c) MCF-7-Zellen, die mit Serum der mit **12** geimpften Maus 5 behandelt wurden; d) die in (c) dargestellte Bindung wird durch Zugabe eines Glycopeptids aus einem anderen Mucin (MUC4)^[17] nicht neutralisiert. e) Neutralisierung der Bindung der Antikörper aus Maus 2 durch das T-Antigen-MUC1-Glycopeptid **5**. f) Neutralisierung der Bindung der Antikörper aus Maus 5 durch das F₂T-Antigen-MUC1-Glycopeptid **6**. Waagrechte Achsen: Fluoreszenzintensität (logarithmischer Maßstab); senkrechte Achsen: Zellzahlen.

ausgelöst, die die natürliche Toleranz gegen auf körpereigenen Zellen vorkommende Strukturen durchbrechen. Im Unterschied zu den mit MUC1-T-Zellepitopeptid-Vakzinen erreichten Immunreaktionen in transgenen Mäusen^[8,9] reagiert nicht nur ein Drittel, sondern es reagieren alle mit **11** und **12** geimpften Wildtyp-Mäuse sehr stark. Die Immunantworten sind selektiv und bringen Antikörper vom IgG-Typ hervor. Die induzierten Antikörper binden sehr stark an epitheliale Tumorzellen der Zelllinie MCF-7. Im T-Antigen-Kohlenhydrat des Glycopeptidantigens können die primären OH-Gruppen durch Fluor substituiert werden, ohne dass die Immunogenität und Strukturselektivität der Vakzine gemindert wird. Von besonderem Wert ist, dass die Vakzine aus synthetischem MUC1-Glycopeptid und Tetanus-Toxoid auch beim Menschen eingesetzt werden können, was schon in einer Reihe von praktisch eingesetzten Impfstoffen^[11] gezeigt wurde.

Eingegangen am 22. Juni 2010,
veränderte Fassung am 21. Juli 2010
Online veröffentlicht am 28. September 2010

Stichwörter: Antitumorvakzine · Glycopeptide · MUC1 · Tetanus-Toxoid · Thomsen-Friedenreich-Antigen

- [1] a) S. J. Gendler, C. A. Lancaster, J. Taylor-Papadimitriou, T. Dulugm, N. Peat, J. Burchell, L. Pemberton, E. Lalani, D. Wilson, *J. Biol. Chem.* **1990**, *265*, 15286; b) J. Taylor-Papadimitriou, J. Burchell, D. W. Miles, M. Daziel, *Biochim. Biophys. Acta Mol. Basis Dis.* **1999**, *1455*, 301.
- [2] a) F.-G. Hanisch, S. Müller, *Glycobiology* **2000**, *10*, 439; b) T. Ninkovic, L. Kinarsky, K. Engelmann, V. Pisarev, S. Sherman, O. J. Finn, F. G. Hanisch, *Mol. Immunol.* **2009**, *47*, 131.
- [3] A. L. Sørensen, C. A. Reis, M. A. Tarp, U. Mandel, K. Ramachandran, V. Sankaranarayanan, T. Schientek, R. Graham, J. Taylor-Papadimitriou, M. A. Hollingsworth, J. Burchell, H. Clausen, *Glycobiology* **2006**, *16*, 96.
- [4] T. Ju, R. P. Aryal, C. J. Stowell, R. D. Cummings, *J. Cell Biol.* **2008**, *182*, 531.
- [5] S. Muller in *Synthetic Peptides as Antigens*, Vol. 28 (Hrsg.: S. Pillai, P. C. van der Vliet) Elsevier, Amsterdam, **1999**, S. 79–131.
- [6] T. Peters, Jr., *Adv. Protein Chem.* **1985**, *37*, 161.
- [7] H. Kunz, S. Birnbach, *Angew. Chem.* **1986**, *98*, 354; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1986**, *25*, 360.
- [8] S. Dziadek, A. Hobel, E. Schmitt, H. Kunz, *Angew. Chem.* **2005**, *117*, 7803; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 7630.
- [9] U. Westerlind, A. Hobel, N. Gaidzik, E. Schmitt, H. Kunz, *Angew. Chem.* **2008**, *120*, 7662; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 7551.
- [10] A. Kaiser, N. Gaidzik, U. Westerlind, D. Kowalczyk, A. Hobel, E. Schmitt, H. Kunz, *Angew. Chem.* **2009**, *121*, 7688; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 7551.
- [11] Beispiel: T. Nolan, S. Lambert, D. Roberton, H. Marshall, P. Richmond, C. Streeton, J. Poolman, D. Boutriau, *Vaccine* **2007**, *25*, 8487, zit. Lit.
- [12] A. Kaiser, N. Gaidzik, T. Becker, C. Menge, K. Groh, H. Cai, Y.-M. Li, B. Gerlitzki, E. Schmitt, H. Kunz, *Angew. Chem.* **2010**, *122*, 3772; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 3688.
- [13] R. Spohn, U. Buwitt-Beckmann, R. Brock, G. Jung, A. J. Ulmer, K.-H. Wiesmüller, *Vaccine* **2004**, *22*, 2494.
- [14] a) C. Mersch, S. Wagner, A. Hoffmann-Röder, *Synlett* **2009**, 2167; b) S. Wagner, C. Mersch, A. Hoffmann-Röder, *Chem. Eur. J.* **2010**, DOI: 10.1002/chem.200903294.
- [15] J. M. J. Fréchet, K. E. Haque, *Tetrahedron Lett.* **1975**, *16*, 3055.
- [16] Rapp Polymere, Tübingen, Deutschland.
- [17] C. Brocke, H. Kunz, *Synthesis* **2004**, 525.
- [18] L. A. Carpiño, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 4397.
- [19] V. Dourtoglou, B. Gross, V. Lambropoulou, C. Ziodrou, *Synthesis* **1984**, 572.
- [20] L. F. Tietze, M. Arlt, M. Beller, K.-A. Glüsenkamp, E. Jäde, M. F. Rajewski, *Chem. Ber.* **1991**, *124*, 1215.
- [21] 7:15.6 mg (64%), farbloses Lyophilisat, $[\alpha]_{D}^{23} = -82.3$ ($c = 1.0$, H₂O); $t_R = 17.8$ min (Phenomenex Jupiter, Gradient: CH₃CN/H₂O + 0.1% TFA (10:90) → (25:75), 30 min, $\lambda = 218$ nm). MALDI-TOF-MS (Dihydroxybenzoësäure): m/z : 2580.88 ($[M+H]^+$, ber.: 2579.19). ESI-MS: m/z : 1290.17 ($[M+2H]^{2+}$, ber.: 1290.10), 860.77 ($[M+3H]^{3+}$, ber.: 860.40). ¹H-NMR (400 MHz, D₂O, COSY, HSQC; ausgewählte Signale): $\delta = 8.50$ (d, 1 H, $J_{He,H\delta} = 1.3$ Hz, H_e), 7.20 (d, 1 H, H_{\delta}, $J_{He} = 1.1$ Hz, H_{\delta}), 4.83 (d, 1 H, $J_{H1,H2} = 3.8$ Hz, 1-H), 4.63–4.03 (m, 24 H, D^a [4.59], CH₂O-Squarat [4.59], H^a [4.58], R^a [4.53], T^{T*}^a [4.53], A³^a [4.47],

$A^{2\alpha}$ {4.47}, $S^{2\alpha}$ {4.40}, $A^{4\alpha}$ {4.35}, $S^{1\alpha}$ {4.32}, $1'\text{-H}$ {4.29}, $P^{1-5\alpha}$ {4.30, 4.29, 4.27, 4.25, 4.23}, V^α {4.19}, $T^{\gamma*\beta}$ {4.14}, $A^{1\alpha}$ {4.12}, $T^{1\alpha}$ {4.09}, $T^{2\alpha}$ {4.09}, $T^{2\beta}$ {4.07}, $T^{1\beta}$ {4.06}); 2.80 (m, 3H, $D^{3\beta}$, 12-CH₂-Spacer), 2.58 (m, 2H, CH₂-Spacer); 1.14 (d, 3H, $J_{T\gamma,T\beta}$ = 6.3 Hz, $T^{1\gamma}$), 1.08 (d, 3H, $J_{T\gamma,T\beta}$ = 6, 6 Hz, $T^{2\gamma}$), 1.06 (d, 3H, $J_{T\gamma,T\beta}$ = 7.2 Hz, $T^{1\gamma}$), 0.84 ppm (t, 6H, $J_{V\gamma,V\beta}$ = 8.3 Hz, V^γ). ¹³C-NMR (100.6 MHz, D₂O, HSQC): δ = 188.83 (C=O-Squarat), 176.19, 174.94, 174.89, 174.84, 174.44, 174.20, 173.99, 173.77, 173.67, 173.53, 173.51, 173.11, 172.58, 172.42, 172.02, 171.96, 171.51, 171.35, 171.22, 171.14, 170.93, 170.74 (C=O, C=O-Acetyl), 156.70 (C=NH, O-C=C-Squarat), 133.41 (H^e), 128.47 (H^v), 117.29 (H^b), 104.63 (C1'), 99.13 (C1); 18.80 ($T^{1\gamma}$), 18.72 ($T^{2\gamma}$), 18.47 ($V^{1\alpha}$), 18.35 ($T^{1\gamma*}$), 17.83 ($V^{1\beta}$), 16.20, 15.18, 15.06, 15.02 (A^{1-4β}), 14.03 ppm (CH₃-Squarat).

8: 20 mg (73 %), farbloses Lyophylisat, $[\alpha]_D^{23} = -82.9$ ($c = 1.0$, H₂O), $t_R = 25.1$ min (Phenomenex Luna, Gradient: MeCN/H₂O + 0.1 % TFA (10:90) → (25:75), 40 min, → (70:30) 60 min). ESI-MS: m/z : 874.70 ([M+K+2H]³⁺, ber.: 874.92), 1292.59 ([M+2H]²⁺, ber.: 1292.84). ¹H-NMR (400 MHz, D₂O, COSY, HMQC) δ = 8.61 (d, $J_{He,Hb}$ = 1.4 Hz, 1H, H^e), 7.31 (d, $J_{He,He}$ = 1.1 Hz, 1H, H^b), 5.01 (d, $J_{H1,H2}$ = 3.7, 1H, 1-H), 4.75–4.50 (m, 15H, D^a [4.72], CH₂O-Squarat [4.71], H^a [4.69], 6a'-H [4.68], 6a-H [4.67], T^{a*} [4.65], R^a [4.65], S₁^a [4.52], A₃^a [4.58], 6b'-H [4.58],

6b'-H [4.56] A₂^a [4.53]), 4.48–4.19 (m, 18H, A₄^a [4.45], S₂^a [4.46], 1'-H [4.45], P₁₋₅^a [4.39, 4.38, 4.37, 4.35, 4.33], T₁₋₂^a [4.34, 4.30], T^{b*} (4.31), V^a [4.29], 5-H [4.30], A₁^a [4.23], 4-H [4.21], T₁₋₂^b [4.20, 4.19], 2-H [4.18]); 2.88 (dd, $J_{D\beta b,D\beta a}$ = 6.9, $J_{D\beta b,D\beta a}$ = 17.1, 1H, D^{3b}), 2.77–2.61 (m, 2H, CH₂-Amid-Spacer); 1.24 (d, $J_{T\gamma*,T\beta*}$ = 6.3 Hz, 3H, $T^{1\gamma*}$), 1.19 (d, $J_{T\gamma,T\beta}$ = 6.5 Hz, 3H, T₁^γ), 1.17 (d, $J_{T\gamma,T\beta}$ = 6.4 Hz, 3H, T₂^γ), 0.96 (d, $J_{V\gamma,V\beta}$ = 4.4 Hz, 3H, V^γ), 0.95 ppm (d, $J_{V\gamma,V\beta}$ = 4.3 Hz, 3H, V^γ). ¹³C-NMR (100.6 MHz, D₂O, DEPT): δ = 188.8, 183.3 (C=O-Squarat), 177.1, 176.0, 174.9, 174.9, 174.0, 173.7, 173.5, 173.1, 172.5, 172.0, 171.5, 171.5, 171.4, 171.2, 171.1, 171.0, 170.8, 170.7 (C=O, C=O-Acetyl, C=C-Squarat), 156.7 (C=NH), 133.4 (H^e), 128.4 (H^v), 117.3 (H^b), 104.5 (C1'), 99.2 (C1); 18.8, 18.7 (T^γ), 18.5 (V^γ), 18.2 (T^{γ*}), 17.8 (V^γ), 16.2, 15.2, 15.1, 15.0 (A₁₋₄^b), 14.9 ppm (CH₃-Squarat). ¹⁹F-NMR (376.4 Hz, D₂O): δ = –229.1––229.4 (m, 2F, {–229.3 ppm (dt, $J_{F,HS}$ = 13.7 Hz, $J_{F,H6}$ = 47.1 Hz)}).

- [22] S. Dziadek, C. Griesinger, H. Kunz, U. M. Reinscheid, *Chem. Eur. J.* **2006**, *12*, 4981.
- [23] S. Dziadek, D. Kowalczyk, H. Kunz, *Angew. Chem.* **2005**, *117*, 7798; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 7624.
- [24] H. D. Soule, J. Vazquez, A. Long, S. Albert, M. Brennan, *J. Natl. Cancer Inst.* **1973**, *51*, 1409.