

# Synthetische Antitumor-Vakzine aus MUC1-Glycopeptiden mit zwei immundominanten Domänen – Induktion einer starken Immunreaktion gegen Brusttumorgewebe\*\*

Nikola Gaidzik, Anton Kaiser, Danuta Kowalczyk, Ulrika Westerlind, Bastian Gerlitzki, Hans Peter Sinn, Edgar Schmitt\* und Horst Kunz\*

Professor Dieter Hoppe zum 70. Geburtstag gewidmet

Eine Aktivimmunisierung gegen menschliches Tumorgewebe ist nur mit Vakzinen zu erreichen, die selektiv gegen Membranstrukturen der Tumorzellen gerichtete Immunreaktionen auslösen. Als Zielstruktur für solche Antitumor-Vakzine hat sich das tumorassoziierte Mucin MUC1 herauskristallisiert.<sup>[1–3]</sup> MUC1 kommt auf nahezu allen Epithelgeweben vor. Es ist auf epithelialen Tumorzellen stark überexprimiert und enthält im extrazellulären Teil einen hoch glycosylierten Abschnitt, der aus zahlreichen Wiederholungssequenzen (tandem repeats) aufgebaut ist.<sup>[4]</sup> Im Glycosylierungsprofil unterscheidet sich tumorassoziiertes MUC1 stark vom MUC1 auf normalen Epithelzellen.<sup>[1–3,5]</sup> Als Folge veränderter Glycosyltransferaseaktivitäten sind die Glycane auf tumorassoziiertem MUC1 kurz und vorzeitig sialyliert, wie das Thomson-Friedenreich(T)-Antigen, das T<sub>N</sub>-Antigen und deren sialylierte Formen 2,6-Sialyl-T<sub>N</sub>, 2,6-Sialyl-T und 2,3-Sialyl-T-Antigen.<sup>[1,5,6]</sup> Wegen der kurzen Glycane sind im tumorassoziierten MUC1 Peptid epitope<sup>[1]</sup> für das Immunsystem zugänglich, welche im MUC1 auf Normalzellen durch die Kohlenhydrate abgedeckt sind. Vakzine, die aus nicht-glycosylierten MUC1-Tandem-Repeat-Peptiden oder aus tumorassoziierten Saccharidantigenen und Trägerproteinen, z. B. KLH (keyhole limpet hemocyanin), entwickelt wurden,

bewirkten jedoch keine befriedigende Immunreaktion.<sup>[1c,7]</sup> Es konnte aber gezeigt werden, dass mit synthetischen Vakzinen aus MUC1-Glycopeptiden und einem T-Zell-Epitop-Peptid hochselektive Immunantworten induziert werden. Die induzierten Antikörper erkennen selektiv das MUC1-Glycopeptid, aber weder das nichtglycosylierte MUC1-Peptid gleicher Sequenz noch das an ein anderes Peptid gebundene Saccharid-Antigen.<sup>[8]</sup> Die bisher entwickelten MUC1-Antitumor-Vakzine waren zu schwach, um die natürliche Toleranz gegen tumorassoziierte Glycoproteinstrukturen zu durchbrechen. Dieses Problem konnten wir mit Vakzinen aus MUC1-Glycopeptidantigenen überwinden, die an Tetanus-Toxoid (TTTox) gekuppelt sind.<sup>[9]</sup> In Wildtyp-Mäusen wurden sehr hohe Titer von 1/50 000 bis 1/500 000 an Antikörpern induziert, die an MCF-7-Brusttumorzellen binden und deren Bindung mit synthetischen tumorassoziierten Glycopeptidantigenen aus MUC1 neutralisiert werden kann.

In Bindungstests an auf Mikrochips gebundenen MUC1-Glycopeptiden<sup>[10]</sup> zeigte sich, dass das Erkennungsprofil der mit den vorgenannten Vakzinen induzierten Antikörper verschieden ist von jenem, welches mit dem biologisch optimierten tumorselektiven Antikörper SM3<sup>[11]</sup> gefunden wurde. Es unterscheidet sich auch von dem von Autoantikörpern, die aus Seren von Tumorpatienten isoliert worden waren.<sup>[12]</sup> Diese abweichenden Erkennungsselektivitäten könnten auf unterschiedliche Glycosylierungspositionen in der MUC1-Tandem-Repeat-Sequenz **1** zurückzuführen sein:

Pro-Ala-His-Gly-Val-Thr<sup>6</sup>-Ser-Ala-Pro-Asp-Thr-Arg-Pro-Ala-Pro-Gly-Ser<sup>17</sup>-Thr<sup>18</sup>-Ala-Pro-Pro-Ala **1**

Die oben genannten MUC1-TTTox-Vakzine<sup>[9]</sup> trugen die T-Antigen- bzw. Sialyl-T<sub>N</sub>-Antigen-Seitenketten am Threonin-6 von **1**, während sowohl der SM3-Antikörper<sup>[10,11]</sup> als auch die Autoantikörper aus Patientenserum<sup>[12]</sup> mit in der GSTA-Region (Ser<sup>17</sup>, Thr<sup>18</sup>) glycosylierten MUC1-Glycopeptiden eine intensive Bindung eingingen. Da NMR-spektroskopische Analysen zeigten, dass Glycanseitenketten an STAPPA-Peptidsequenzen von MUC1 die Konformation dieses Peptidabschnitts beeinflussen<sup>[13]</sup> und die Konformation entscheidend für die Tumorselektivität der MUC1-Glycopeptide zu sein scheint,<sup>[14]</sup> bestand Interesse daran, die MUC1-TTTox-Vakzine in an Serin-17 bzw. Threonin-18 glycosylierten Formen zu untersuchen. Um den Einfluss auf die Konformation der STAPPA-Sequenz einzuschließen, wurde die

[\*] N. Gaidzik, A. Kaiser, D. Kowalczyk, Prof. Dr. H. Kunz  
Johannes Gutenberg-Universität Mainz  
Duesbergweg 10–14, 55128 Mainz (Deutschland)  
E-Mail: hokunz@uni-mainz.de

B. Gerlitzki, Prof. Dr. E. Schmitt  
Johannes Gutenberg-Universität Mainz  
Universitätsmedizin, Institut für Immunologie  
Langenbeckstraße 1, Geb. 708, 55101 Mainz (Deutschland)  
E-Mail: eschmitt@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)

Prof. Dr. H. P. Sinn  
Universität Heidelberg  
Pathologisches Institut, Sektion Gynäkopathologie  
Im Neuenheimer Feld 220, 69120 Heidelberg (Deutschland)

[\*\*] Diese Arbeit wurde von der Deutschen Forschungsgemeinschaft, der Jürgen Knop-Stiftung und dem Fonds der Chemischen Industrie unterstützt.

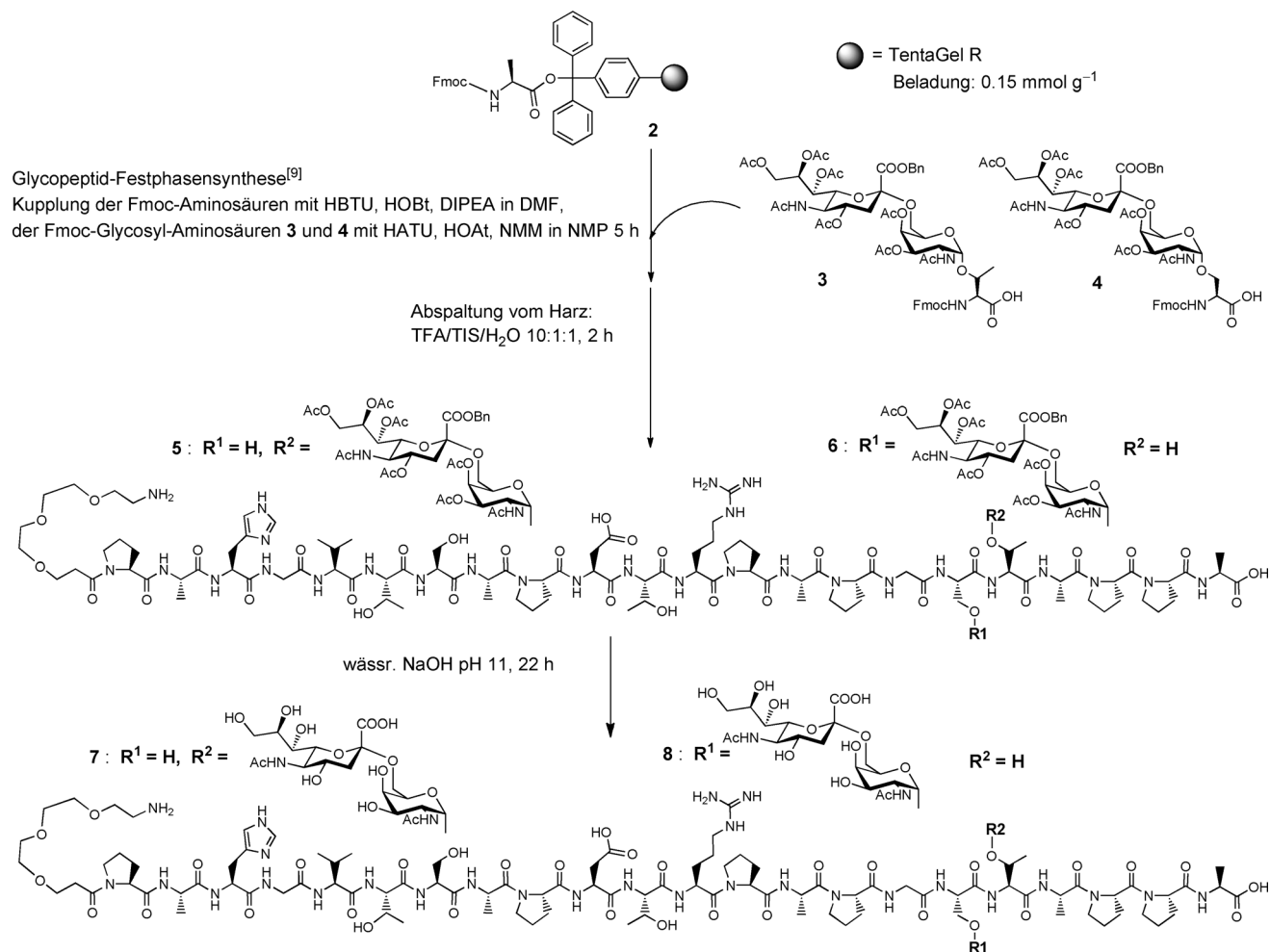
Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.201104529> zu finden.

Peptidsequenz auf die in **1** angeführten 22meren Glycopeptide ausgedehnt, wodurch sie neben dem APDTRP-Motiv<sup>[11]</sup> das zweite Bindungsepitop<sup>[10,11]</sup> des tumorselektiven Anti-MUC1-Antikörpers umfasst.

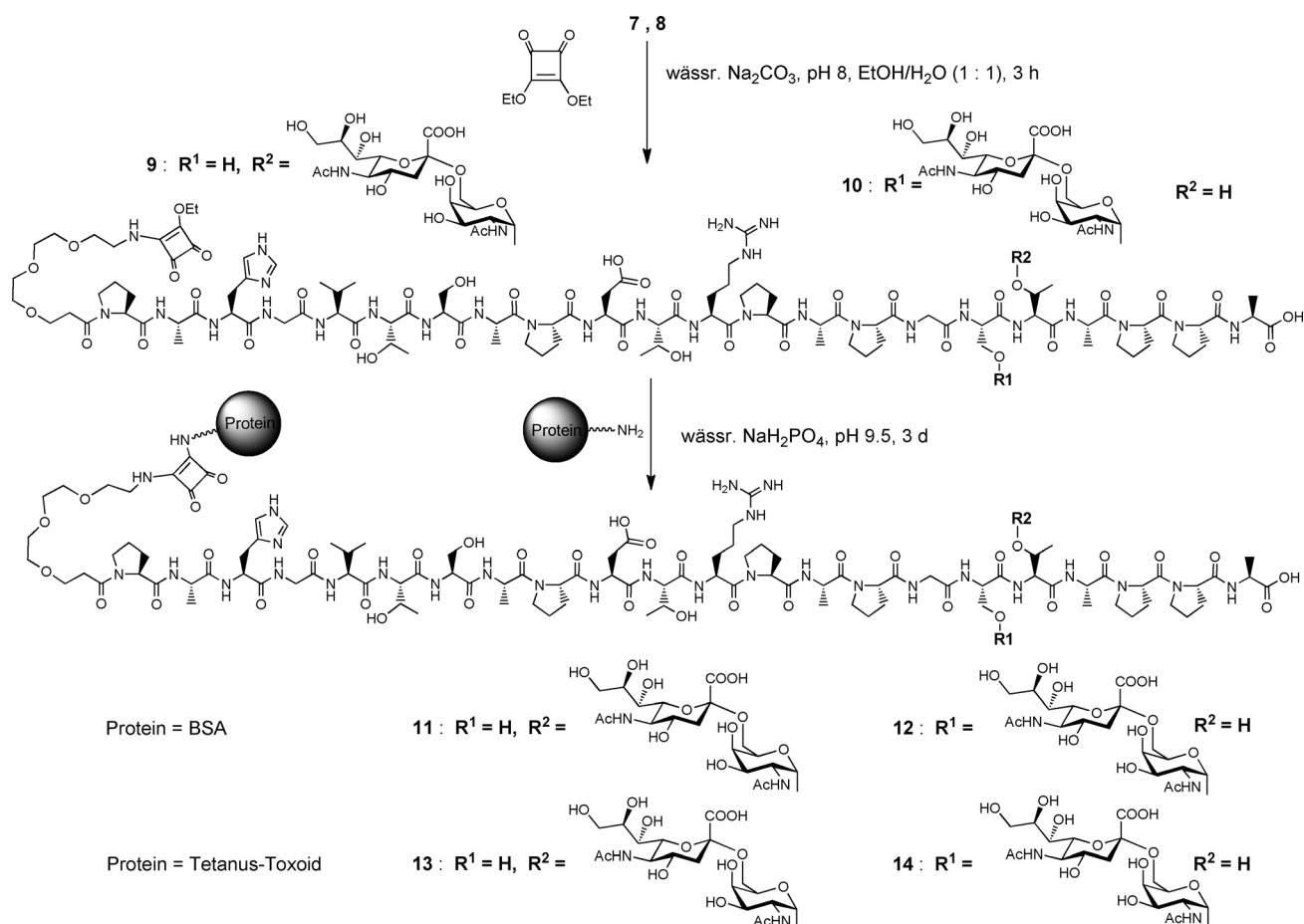
Die Festphasensynthese der MUC1-Glycopeptide erfolgte an mit Fmoc-Alanin über den Tritylanker beladenem Tentagel R-Harz **2**<sup>[16]</sup> im Synthesizer nach dem bereits beschriebenen Verfahren<sup>[9]</sup> (Schema 1). Die Kupplungen der Fmoc-Aminosäuren (10 Äquiv.) wurden mit HBTU/HOBt<sup>[17]</sup> vorgenommen. Die aufeinander folgenden Proline im C-Terminus und der frühe Einbau der *O*-Glycosyl-Aminosäuren stellen besondere Anforderungen an die Kupplungsreaktionen. Sowohl der Fmoc-geschützte Sialyl-T<sub>N</sub>-Threonin- (**3**)<sup>[18]</sup> als auch der Fmoc-Sialyl-T<sub>N</sub>-Serin-Baustein<sup>[19]</sup> (**4**) wurden mit HATU/HOAt<sup>[20]</sup> aktiviert und 5 h unter starkem Vortex-Schütteln gekuppelt. Die Kupplungen der beiden nachfolgenden Fmoc-Aminosäuren erfolgten nach dem Standardprotokoll, mussten aber wiederholt werden, um genügend Umsatz zu erreichen. Die restlichen Fmoc-Aminosäuren und die Fmoc-Spacer-Aminosäure wurden nach dem Standardverfahren<sup>[9,18]</sup> gekuppelt, wobei bei der Anbindung von Fmoc-Alanin-8 an Prolin-9 nochmals ein Einbruch in der Ausbeute

auftrat. Nach Abspaltung der N-terminalen Fmoc-Gruppe wurde nicht acetyliert, sondern das MUC1(22)-Glycopeptid **5** bzw. **6** mit Trifluoressigsäure (TFA)/Triisopropylsilan (TIS) und Wasser unter gleichzeitiger Entfernung der säurelabilen Schutzgruppen vom Harz abgelöst. Nach Reinigung durch semipräparative HPLC wurde **5** in 30 % bzw. **6** in 29 % Gesamtausbeute isoliert. Die vergleichsweise<sup>[9]</sup> mäßigen Ausbeuten spiegeln die vorgenannten Schwierigkeiten in diesen Synthesen wider. Sie sind vermutlich auf den Einfluss des Saccharids auf die Konformation<sup>[13,19,21]</sup> des harzgebundenen Peptids im Sinne einer Rückfaltung zurückzuführen. Schließlich wurden die Kohlenhydrat-Schutzgruppen aus **5** und **6** mit wässriger NaOH-Lösung bei pH 11 entfernt und die Sialyl-T<sub>N</sub>-MUC1(22)-Peptide **7** und **8** durch semipräparative HPLC rein gewonnen.

Durch Umsetzung der Glycopeptidantigene **7** und **8** mit Quadratsäurediethylester<sup>[22]</sup> bei pH 8 wurden nach Reinigung durch semipräparative HPLC die entsprechenden Quadratsäuremonoamide **9**<sup>[23]</sup> und **10**<sup>[24]</sup> erhalten (Schema 2), die in Phosphatpuffer bei pH 9.5 mit Rinderserumalbumin (BSA) zu den Neoglycoproteinen **10** und **11** zum Belegen der Titerplatten (ELISA) oder mit TTox zur Gewinnung der Vak-



**Schema 1.** Festphasensynthese der Sialyl-T<sub>N</sub>-MUC1-Glycopeptide **7** und **8**: Fmoc = Fluorenyl-9-methoxycarbonyl; HBTU = *O*-Benzotriazol-1-yl-*N,N,N',N'*-tetramethyluronium-hexafluorophosphat; HOBt = 1-Hydroxy-benzotriazol; DIPEA = Diisopropylethylamin (Hünig-Base); NMM = *N*-Methylmorpholin; NMP = *N*-Methylpyrrolidon; TFA = Trifluoressigsäure; TIS = Triisopropylsilan.



**Schema 2.** Verknüpfung der synthetischen Sialyl-T<sub>N</sub>-MUC1-Glycopeptidantigene mit den Trägerproteinen BSA und TTox zu Vakzinen; BSA = Rinderserumalbumin.

zine **13** und **14** verknüpft wurden. Alle Proteinkonjugate **11–14** wurden nach Ultrafiltration (30-kDa-Membran) als farblose Lyophilisate isoliert.

MALDI-TOF-Massenspektrometrie zeigt, dass im BSA-Konjugat **11** im Mittel mindestens vier, in **12** mindestens drei Moleküle Glycopeptid an ein Molekül Protein gebunden sind. Zu beachten ist, dass bei Sialinsäure enthaltenden Glycoproteinkonjugaten wie **11** und **12** nur die leichteren nachzuweisen sind, die höheren sich aber der Messung entziehen. Die Beladung der TTox-Vakzine **13** und **14** kann, wie schon gezeigt,<sup>[9a]</sup> nur durch Vergleich von ELISA-Bindungstests zu etwa 20 Molekülen Glycopeptid pro Molekül Protein abgeschätzt werden.

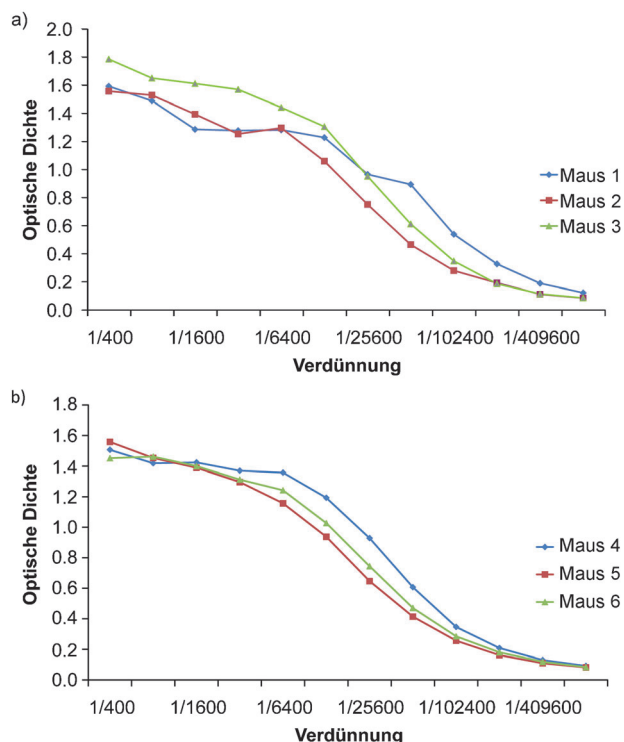
Zur biologischen Auswertung wurden je drei Wildtyp-(BALB/cJ)-Mäuse mit den Vakzinen **13** (Maus 1–3) bzw. **14** (Maus 4–6) unter Zusatz von komplettem Freund's Adjuvans immunisiert. Zwei Auffrischungsimpfungen wurden nach je 21 Tagen mit den gleichen Vakzinen vorgenommen. Fünf Tage nach der dritten Impfung wurde Blut entnommen und die Seren in ELISA-Bindungstests (Abbildung 1) auf Bindung der induzierten Antikörper an die BSA-Konjugate **11** bzw. **12** geprüft. Bei allen sechs Mäusen waren sehr starke, die natürliche Toleranz durchbrechende Immunreaktionen (Titer etwa 1/30000) festzustellen.

Laut Isotyp-Analyse wurden sowohl mit **13** als auch mit **14** überwiegend IgG<sub>1</sub>-Antikörper gebildet. Die Bindung der

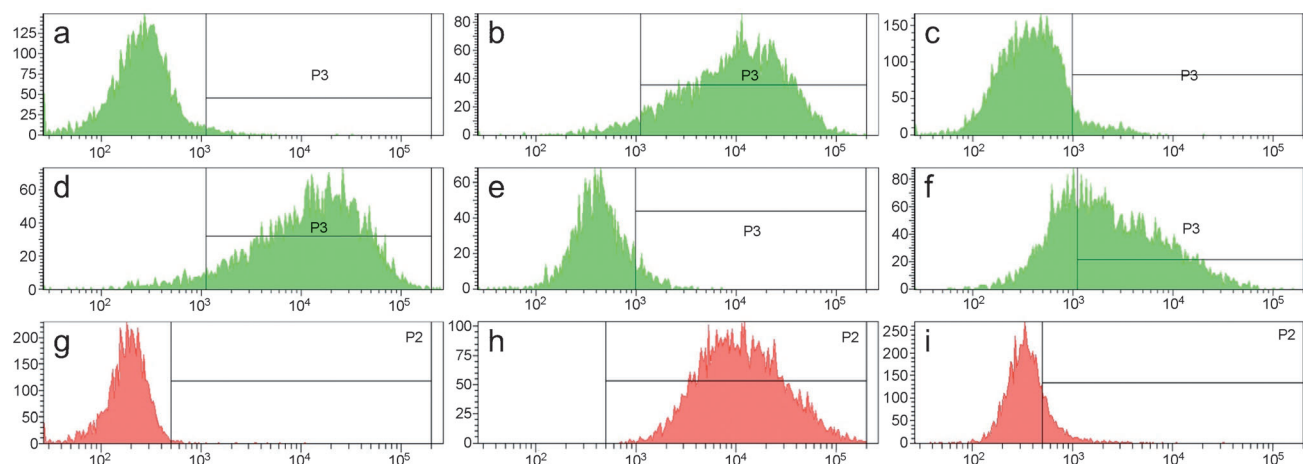
durch **13** und **14** induzierten Antikörper an Brusttumorzellen der Linie MCF-7<sup>[25]</sup> wurde durch FACS-(fluorescent-activated cell sorter)-Analyse ermittelt (Abbildung 2).<sup>[9b]</sup> Die mit Pufferlösung behandelten Tumorzellen (Abbildung 2a) werden durch Laserlichtstreuung gezählt, zeigen aber keine Bindung des fluoreszenzmarkierten (Alexafluor 488) Ziege-Antimäus-Antikörpers an und erscheinen im linken Feld. Die mit Serum der mit **13** geimpften Maus 2 inkubierten MCF-7-Zellen (Abbildung 2b) zeigen dagegen alle Fluoreszenz (rechtes Feld) und damit, dass sie von den induzierten Antikörpern erkannt wurden. Das Serum der Maus, die nur mit TTox geimpft wurde (Abbildung 2c), enthält kaum Antikörper, die an MCF-7-Zellen binden. Im Gegensatz dazu erkannten die durch die MUC1-TTox-Vakzine **14** induzierten Antikörper im Serum von Maus 5 (Abbildung 2d) die Membranglycoproteine auf den MCF-7-Zellen. Diese Bindung der Antikörper ist selektiv, denn sie kann durch Inkubation der Antikörper mit Sialyl-T<sub>N</sub>-MUC1-Glycopeptid **8** (25 µg mL<sup>-1</sup>) aufgehoben werden (Abbildung 2e). Abbildung 2f zeigt, dass der durch Klonierung optimierte Antikörper SM3<sup>[11]</sup> deutlich weniger selektiv an MCF-7-Tumorzellen bindet als die durch **13** (Abbildung 2b) und **14** (Abbildung 2d) induzierten Antikörper.

Zusätzlich wurde die Bindung der durch Vakzine **14** in Maus 5 ausgelösten Antikörper an humane Brusttumorzellen der Linie T-47D<sup>[26]</sup> untersucht. Während in der FACS-Ana-

lyse der mit Puffer behandelten T-47D-Zellen nach Zugabe von Alexafluor-488-Ziege-Antimaus-Antikörper keine Fluoreszenzmarkierung auftrat (Abbildung 2g), waren alle der mit Serum von Maus 5 behandelten Zellen in der FACS-Analyse fluoreszenzmarkiert (Abbildung 2h). Diese Bindung wurde durch Inkubation der Antikörper mit dem Glycopeptid **8** ( $6 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) vollständig aufgehoben (Abbildung 2i), was die Strukturelektivität der durch **14** ausgelösten Immunreaktion belegt.

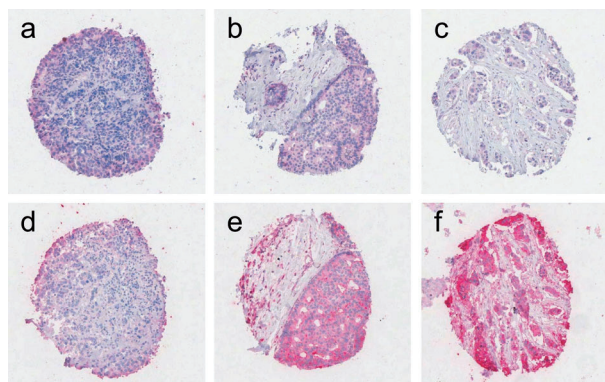


**Abbildung 1.** ELISA der durch die Vakzine **13** (a) und **14** (b) induzierten Antisera; Bindung an die BSA-Konjugate **11** (a) bzw. **12** (b).



**Abbildung 2.** FACS-Analyse der Bindung der durch Vakzine **13** bzw. **14** induzierten Antisera: a) Mit PBS-Puffer behandelte MCF-7-Tumorzellen; b) mit Antiserum (1:1000) von Maus 2, immunisiert mit **13**, behandelte MCF-7-Zellen; c) mit Serum von einer Kontroll-Maus, die nur mit TTox geimpft worden war, behandelte MCF-7-Zellen; d) mit Antiserum (1:1000) von Maus 5, immunisiert mit **14**, behandelte MCF-7-Zellen; e) die in (d) gezeigte Bindung wird durch Zugabe von MUC1-Glycopeptid **8** ( $25 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) aufgehoben; f) Bindung von SM3-Antikörper an MCF-7-Tumorzellen; g) mit PBS-Puffer behandelte T-47D-Brusttumorzellen; h) mit Antiserum (1:1000) von Maus 5, immunisiert mit **14**, behandelte T-47D-Zellen; i) die in (h) gezeigte Bindung wird durch Zugabe von MUC1-Glycopeptid **8** ( $6 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) aufgehoben.

Diese Bindung ist nicht nur an langzeitkultivierte Tumorzellen, sondern auch in Gewebeschnitten von nativem Tumormaterial zu beobachten. Abbildung 3 zeigt drei Mammakarzinom-Gewebeschnitte, die mit Formalin fixiert und in Paraffin eingebettet wurden, in lichtmikroskopischer Aufnahme (Vergrößerung 1/100). Zur Negativkontrolle (3a-c) wurde ein Isotyp-Kontrollantikörper ( $\text{IgG}_1$ ) eingesetzt. Die Gewebeschnitte Abbildung 3d-f wurden dagegen mit dem Serum der mit Vakzine **14** immunisierten Maus 5 inkubiert. Gebundene tumorselektive Antikörper wurden mit einem biotinylierten Ziege-Antimaus/Antikaninchen-Antikörper detektiert, dessen Bindung mit Streptavidin-Meerrettich-Peroxidase nachgewiesen wurde, das die Oxidation von 3-Amino-9-ethylcarbazol zu einem rosaroten Farbstoff katalysiert.



**Abbildung 3.** Brusttumor-Gewebeschnitte von drei Patientinnen: a–c) mit Formalin fixiert und in Paraffin eingebettet in lichtmikroskopischer Aufnahme (1:100); d–f) inkubiert mit dem Serum von Maus 5, die mit der synthetischen Vakzine **14** immunisiert worden war. Der Nachweis erfolgte mit biotinyliertem Ziege-Antimaus/Antikaninchen-Antikörper (ChemMate Detection Kit, Dakocytomation, Glostrup, Dänemark) an Avidin gebundener Meerrettich-Peroxidase durch katalysierte Oxidation von 3-Amino-9-ethylcarbazol.



Abbildung 3a zeigt ein kaum entdifferenziertes Tumorgewebe (Frühphase, Grad G1, weniger als 1 % reagierende Tumorzellen), Abbildung 3b ein Gewebe, bei dem 1–9 % der Zellen reagieren (Grad G2), und Abbildung 3c ein fortgeschrittenes Tumorgewebe mit 10–50 % reagierenden Zellen (G3). Nach Inkubation mit Serum von Maus 5, die mit der synthetischen Vakzine **14** immunisiert worden war, erkennt man an der Rosarotfärbung, dass die durch **14** induzierten IgG<sub>1</sub>-Antikörper wenig an das Tumorgewebe in der Frühphase (Abbildung 3d, G1), aber deutlich an den Tumor in der G2-Phase (Abbildung 3e) binden. Das im Bild zu sehende Bindegewebe wird nicht markiert. Das Tumorgewebe in der fortgeschrittenen G3-Phase (Abbildung 3f) wird sehr stark von den Antikörpern markiert, die durch die synthetische Vakzine **14** induziert worden waren.

Diese Ergebnisse unterstreichen erstmals den diagnostischen Wert der durch die synthetischen MUC1-Glycopeptid-TTox-Vakzine induzierten Antikörper. Bedenkt man zudem, dass nach den immunologischen Mechanismen die von den IgG-Antikörpern erkannten Tumorzellen durch das Immunsystem zerstört werden sollten, dann belegen die in Abbildung 2 und 3 gezeigten Ergebnisse, dass mit synthetischen MUC1-Glycopeptid-Vakzinen, wie **13** und **14**, eine Aktivimmunisierung von Patienten gegen ihr eigenes Tumorgewebe möglich werden sollte.

Eingegangen am 30. Juni 2011

Online veröffentlicht am 9. September 2011

**Stichwörter:** Antitumor-Vakzine · Gewebeschnittmarkierung · Glycopeptidantigene · Sialyl-T<sub>N</sub>-Antigen · Tetanus-Toxoid

- [1] a) J. Arklie, J. Taylor-Papadimitriou, W. Bodmer, M. Egan, R. Millis, *Int. J. Cancer* **1981**, 28, 23; b) S. Gendler, J. Taylor-Papadimitriou, T. Duhig, J. Rothbard, J. Burchell, *J. Biol. Chem.* **1988**, 263, 12820; c) neuere Übersicht: R. E. Beatson, J. Taylor-Papadimitriou, J. M. Burchell, *Immunotherapy* **2010**, 2, 305, zit. Lit.
- [2] a) F.-G. Hanisch, J. Peter-Katalinic, H. Egge, U. Dabrowski, G. Uhlenbruck, *Glycoconjugate J.* **1990**, 7, 525; b) F.-G. Hanisch, T. Stadie, K. Boßlet, *Cancer Res.* **1995**, 55, 4036; c) 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. Schwientek, R. Graham, J. Taylor-Papadimitriou, M. A. Hollingsworth, J. Burchell, H. Clausen, *Glycobiology* **2006**, 16, 96.
- [4] a) K. O. Lloyd, J. Burchell, V. Kudryashov, B. W. Tin, J. Taylor-Papadimitriou, *J. Biol. Chem.* **1996**, 271, 33325; b) R. T. Greenlee, M. B. Hill-Harmon, T. Murray, M. Thun, *Ca-Cancer J. Clin.* **2001**, 51, 15.
- [5] a) S. Müller, F.-G. Hanisch, *J. Biol. Chem.* **2002**, 277, 26103; b) S. Wilkie, G. Picco, J. Foster, D. M. Davies, S. Julien, L. Cooper, S. Arif, S. J. Mather, J. Taylor-Papadimitriou, J. M. Burchell, J. Maher, *J. Immunol.* **2008**, 180, 4902.
- [6] G. F. Springer, *Science* **1984**, 224, 1198.
- [7] S. F. Slovin, G. Ragupathi, C. Musselli, K. Olkiewicz, D. Verbel, S. D. Kuduk, J. B. Schwarz, D. Sames, S. Danishefsky, P. O. Livingston, H. I. Scher, *J. Clin. Oncol.* **2003**, 21, 4292.
- [8] a) S. Dziadek, A. Hobel, E. Schmitt, H. Kunz, *Angew. Chem.* **2005**, 117, 7803; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, 44, 7630; b) U. Westerlind, A. Hobel, N. Gaidzik, E. Schmitt, H. Kunz, *Angew. Chem.* **2008**, 120, 7662; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, 47, 7551.
- [9] a) 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; b) A. Hoffmann-Röder, A. Kaiser, S. Wagner, N. Gaidzik, D. Kowalczyk, U. Westerlind, B. Gerlitzki, E. Schmitt, H. Kunz, *Angew. Chem.* **2010**, 122, 8676; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, 49, 8498.
- [10] U. Westerlind, H. Schröder, A. Hobel, N. Gaidzik, A. Kaiser, C. M. Niemeyer, E. Schmitt, H. Waldmann, H. Kunz, *Angew. Chem.* **2009**, 121, 8413; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, 48, 8263.
- [11] a) J. Burchell, J. Taylor-Papadimitriou, M. Boshell, S. Gendler, T. Duhig, *Int. J. Cancer* **1989**, 44, 691; b) M. A. Tarp, A. L. Sørensen, U. Mandel, H. Paulsen, J. Burchell, J. Taylor-Papadimitriou, H. Clausen, *Glycobiology* **2007**, 17, 209.
- [12] O. Blixt, E. Cló, A. S. Nudelman, K. Kildegaard Sørensen, T. Clausen, H. H. Wandall, P. O. Livingston, H. Clausen, K. J. Jensen, *J. Proteome Res.* **2010**, 9, 5250.
- [13] a) P. Braun, G. M. Davies, M. R. Price, P. M. Williams, S. J. Tendler, H. Kunz, *Bioorg. Med. Chem.* **1998**, 6, 1531; b) F. Corzana, J. Busto, M. Garcia de Luis, J. Jimenez-Barbero, A. Avenoza, J. M. Peregrina, *Chem. Eur. J.* **2009**, 15, 3863; c) F. Corzana, J. Busto, F. Marcelo, M. Garcia de Luis, J. C. Asenso, S. Martin Santamaria, J. Jimenez-Barbero, A. Avenoza, J. M. Peregrina, *Chem. Eur. J.* **2011**, 17, 3105.
- [14] a) M. J. Scanlon, S. D. Morley, D. E. Jackson, M. R. Price, S. J. B. Tendler, *Biochem. J.* **1992**, 284, 137; b) J. D. Fontenot, N. Tjandra, B. Dawen, H. Chien, R. C. Montelaro, O. J. Finn, *Cancer Res.* **1993**, 53, 5386; c) J. A. Mollick, F. S. Hodi, R. J. Soiffer, L. M. Nadler, G. Dranoff, *Cancer Immunity* **2003**, 3, 3.
- [15] J. M. J. Fréchet, K. E. Haque, *Tetrahedron Lett.* **1975**, 16, 3055.
- [16] Rapp Polymere, Tübingen, Deutschland.
- [17] V. Dourtoglou, B. Gross, V. Lambropoulou, C. Zioudrou, *Synthesis* **1984**, 572.
- [18] a) S. Keil, C. Claus, W. Dippold, H. Kunz, *Angew. Chem.* **2001**, 113, 379; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, 40, 366; b) C. Brocke, H. Kunz, *Synthesis* **2004**, 525.
- [19] A. Kuhn, H. Kunz, *Angew. Chem.* **2007**, 119, 458; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, 46, 454.
- [20] L. A. Carpino, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, 115, 4397.
- [21] S. Dziadek, C. Griesinger, H. Kunz, U. M. Reinscheid, *Chem. Eur. J.* **2006**, 12, 4981.
- [22] L. F. Tietze, M. Arlt, M. Beller, K.-H. Glüsenkamp, E. Jähde, M. F. Rajewsky, *Chem. Ber.* **1991**, 124, 1215.
- [23] **9**: 5.5 mg (48 %);  $[\alpha]_D^{25} = -131.0$  ( $c = 0.36$ ; H<sub>2</sub>O).  $R_f = 25.7$  min (Phenomenex Jupiter C18, Acetonitril/Wasser mit 0.1 % TFA, Gradient: (5:95)→(25:75), 30 min,  $\lambda = 214$  nm). MALDI-TOF-MS (dhb, positiv),  $m/z$ : 2877.3 ( $[M+H]^+$ , ber.: 2877.3), 2585.6 ( $[M+H-\text{NeuNAcCOOH}]^+$ , ber.: 2585.2).
- [24] **10**: 14.5 mg, (72 %);  $[\alpha]_D^{25} = -144.4$  ( $c = 0.72$ , H<sub>2</sub>O),  $R_f = 26.5$  min (Phenomenex Jupiter C18, Acetonitril/Wasser mit 0.1 % TFA, Gradient: (10:90)→(25:75), 30 min,  $\lambda = 214$  nm). ESI-MS (positiv),  $m/z$ : 870.13 ( $[M+3H+Na-\text{NeuNAcCOOH}]^{3+}$ , ber.: 870.08). HR-MS,  $m/z$ : 1440.6854 ( $[M+2H]^{2+}$ , ber.: 1440.6769), 1440.1788 ( $[M+2H]^{2+}$ , ber.: 1440.1752), 1439.6710 ( $[M+2H]^{2+}$ , ber.: 1439.6736), 1439.1685 ( $[M+2H]^{2+}$ , ber.: 1439.1719), 1438.6707 ( $[M+2H]^{2+}$ , ber.: 1438.6702). MALDI-TOF-MS (dhb, positiv),  $m/z$ : 2878.1 ( $[M+2H]^+$ , ber.: 2877.3), 2586.3 ( $[M+2H-\text{NeuNAcCOOH}]^+$ , ber.: 2586.2).
- [25] H. D. Soule, J. Vazquez, J. Long, S. Albert, M. Brennan, *J. Natl. Cancer Inst.* **1973**, 51, 1409.
- [26] I. Brockhausen, J.-M. Yang, J. Burchell, C. Whitehouse, J. Taylor-Papadimitriou, *Eur. J. Biochem.* **1995**, 233, 607.