

MUC1-Glycopeptidkonjugate mit T-Zellepitopen von Tetanus-Toxoid als vollsynthetische Antitumor-Vakzine mit Eigenverstärkungseffekt**

Hui Cai, Mei-Sha Chen, Zhan-Yi Sun, Yu-Fen Zhao, Horst Kunz* und Yan-Mei Li*

Professor Gunter Fischer zum 70. Geburtstag gewidmet

Das tumorassoziierte Mucin MUC1 ist ein vielversprechendes Zielmolekül für die Entwicklung einer Immuntherapie. Als endogenes, auf vielen Epitheltumoren exprimiertes Glycoprotein ist es jedoch nur schwach immunogen.^[1] Für die Induktion einer starken Immunreaktion müssen daher MUC1-Glycopeptidantigene mit T-Zellepitop-Peptiden^[2] oder Toll-like-Rezeptor-2-Lipoepitid-Liganden^[3] oder mit beiden dieser Immunstimulantien verknüpft werden.^[4] Mit solchen synthetischen Vakzinen wurden große Fortschritte bei der Induktion von selektiv gegen tumorassoziiertes MUC1 gerichteten Immunantworten erreicht,^[2c,e] auch von solchen, die kultivierte Tumorzellen erkennen^[2d,4] und Schutz gegen Tumorstadium in transgenen Mäusen bewirken.^[4c] In der Regel blieben die induzierten Immunreaktionen aber moderat (Endpunkttiter < 30000) und die Bindung an Tumorzellen unvollständig. Da eine starke Immunantwort, die die natürliche Toleranz des Immunsystems durchbricht, unerlässlich für eine therapeutische Vakzine ist, haben wir Glycopeptidvakzine entwickelt, die die MUC1-Tandem-Repeat-Sequenz HGVTSAPDTRPAPGSTAPPA kovalent an Rinderserumalbumin (BSA) oder Tetanus-Toxoid (TTox) gebunden enthalten.^[5] Diese Vakzine, mit Freund's Adjuvans appliziert, lösen in Balb/c-Mäusen starke Immunantworten gegen auf epithelialen Tumorzellen exprimiertes MUC1 aus. Überwiegend IgG-Antikörper wurden gebildet, wobei TTox-konjugierte Vakzine besonders hohe Titer an MUC1 bindenden IgG-Antikörpern induzierten (Endpunkttiter 1000000).^[5e] Die Antikörper zeigten nahezu vollständige Erkennung von Brusttumorzellen der Zelllinien MCF-7 und T-47D und Bindung an Tumorzellen in Brusttumorgewebe.^[5f]

Wichtig ist außerdem, dass auf Tetanus-Toxoid basierende Vakzine sich als sicher bei der Impfung von Menschen erwiesen haben. Das Protein enthält aber für die Immunaktivierung unnötige Peptidepitope, die bei der Impfung störend wirken könnten.^[6] Zudem soll Freund's Adjuvans beim Menschen nicht angewendet werden. Deshalb sind wir an der Vereinfachung der Vakzinstruktur interessiert, wobei aber die stimulierenden Effekte des Tetanus-Toxoids und des Adjuvans, die für starke Immunreaktionen nötig sind, erhalten bleiben sollen.

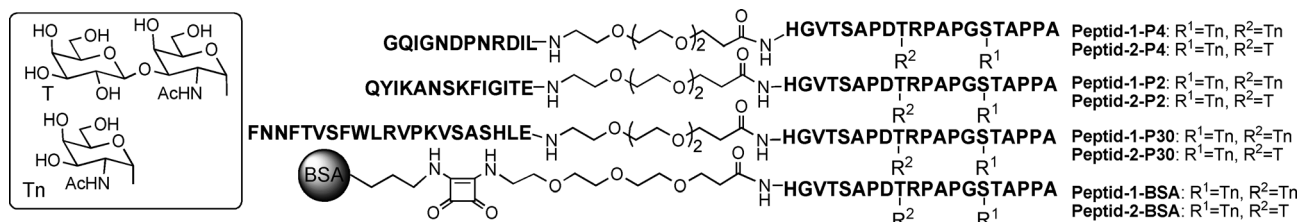
Entsprechend diesem Ziel wurden MUC1-Tandem-Repeat-Glycopeptidsequenzen HGVTSAPDTRPAPGSTAPPA mit drei bekannten universellen T-Helferzellepitop-Peptiden **P4** (TT_{1273–1284}: GQIGNDPNRDIL), **P2** (TT_{830–843}: QYIKANSKFIGITE) und **P30** (TT_{947–967}: FNNFTVSFWLRVPKVSASHLE) aus Tetanus-Toxoid^[7] verknüpft. Nach den grundlegenden Immunmechanismen sollten diese T-Helferzellpeptide das Tetanus-Toxoid bei der Stimulierung des murinen und humanen Immunsystems ersetzen können. Im Zuge der Immunreaktion wird das MUC1-Glycopeptid vom Rezeptor einer B-Zelle oder einer anderen Antigen präsentierenden Zelle (APC) erkannt. Die gesamte Vakzine wird daraufhin in die APC aufgenommen und proteolytisch prozessiert. Die T-Helferzellpeptide werden dann vom Haupthistokompatibilitäts-Komplex II (MHC II) auf diesen Zellen dem CD4⁺-Rezeptor der T-Zelle präsentiert. Die so aktivierte CD4⁺-T-Zelle stimuliert, unterstützt durch weitere Zell-Zell-Signale und freigesetzte Cytokine, die B-Zelle, sich in eine Plasmazelle zu verwandeln, zu proliferieren und Antikörper gegen das MUC1-Glycopeptidantigen zu bilden.^[8]

Innerhalb des MUC1-Tandem-Repeats bilden die PDTRP- und GSTAP-Regionen immundominante Motive.^[9,10] Sowohl MCF-7-Tumorzellen erkennende Antikörper als auch Autoantikörper aus Patientenserum binden an diese Peptidsegmente.^[1,10] Da die Konformation von Glycopeptiden offenbar durch die O-Glycosylierung beeinflusst wird,^[11] war die Immunogenität von MUC1-Glycopeptiden mit Tn- und T-Antigen (Schema 1) an Aminosäure T9 der PDTRP- und an Aminosäure S15 der GSTAP-Region von besonderem Interesse. Diese Glycopeptide wurden an der Festphase synthetisiert (SPPS).^[12] Sie trugen Tn/Tn (**Peptid-1**) oder T/Tn (**Peptid-2**) an den Positionen T9/S15. Nach der Festphasensynthese der MUC1-Glycopeptide wurde N-terminal eine Triethylenglycol-Spacer-Aminosäure angeknüpft, an der nachfolgend die **P4**-, **P2**- oder **P30**-T-Zellepitid-Sequenzen schrittweise an der Festphase angefügt wurden.^[4e] Die (Glyco)peptide wurden unter gleichzeitiger Entfernung

[*] Dr. H. Cai, M.-S. Chen, Z.-Y. Sun, Prof. Dr. Y.-F. Zhao, Prof. Dr. Y.-M. Li
Key Lab of Bioorganic Phosphorus Chemistry & Chemical Biology (Ministry of Education), Department of Chemistry
Tsinghua University
Beijing 100084 (P.R. China)
E-Mail: liym@mail.tsinghua.edu.cn
Prof. Dr. H. Kunz
Institut für Organische Chemie
Johannes Gutenberg-Universität Mainz
Duesbergweg 10-14, D55128 Mainz (Deutschland)
E-Mail: hokunz@uni-mainz.de

[**] Diese Arbeit wurde gefördert vom Major State Basic Research Development Program of China (2013CB910700 und 2012CB821601), der National Natural Science Foundation of China (208252206 und 21028004) und vom Sino-German Center for Research (GZ561).

Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.201300390> zu finden.



Schema 1. Strukturen der Konjugate aus MUC1-Glycopeptiden (**Peptid-1** und **Peptid-2**) und T-Helferzellepitopen (**P4**, **P2** und **P30**) bzw. BSA.

aller säurelabilen Seitenkettenschutzgruppen mit Trifluoressigsäure (TFA)/Triisopropylsilan(TIS)/H₂O vom Harz abgelöst. Nach Reinigung durch HPLC wurden die *O*-Acetylgruppen von den Kohlenhydraten mit MeONa/MeOH bei pH 9 ohne Beeinträchtigung der Strukturen abgespalten. Die Glycopeptid-Konjugate von **Peptid-1** bzw. **Peptid-2** gebunden an **P4**, **P2** oder **P30** wurden durch Umkehrphasen-HPLC isoliert (Schema 1). Zusätzlich wurden die BSA-Konjugate **Peptid-1-BSA** und **Peptid-2-BSA** nach bereits beschriebenen Verfahren hergestellt.^[5b]

Jede der vollsynthetischen Vakzine wurde vier Wildtyp-Balb/c-Mäusen in fünf Impfungen im Abstand von 14 Tagen intraperitoneal injiziert. Die erste Impfung wurde mit komplettem (CFA), die weiteren mit inkomplettem Freund's Adjuvans (IFA) ausgeführt. Eine Woche nach der fünften Impfung wurden die Seren von jeder Gruppe von Mäusen genommen, gemischt und die Antikörper durch ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) bestimmt. Für die ELISA-Tests wurden die Mikrotiterplatten mit Antigen-BSA-Konjugaten beschichtet.^[5c] Die **P4**- und **P2**-Epitop-MUC1-Vakzine induzierten schwache, die **Peptid-1**- und **Peptid-2-P30**-Vakzine viel stärkere Immunreaktionen (Abbildung 1). Deshalb wurden die weiteren Studien mit **P30**-Peptidepitop-Vakzinen durchgeführt.

Um die Immunogenität der verschiedenen Glycoformen der MUC1-Glycopeptide zu untersuchen, wurden an den drei Glycosylierungspositionen (T9, S15 und T16) innerhalb der immundominanten Motive Tn-, T- oder STn-Antigene angebunden. Die Glycopeptide **Peptid-3**, **-4**, **-5**, **-6** und **-7** wurden an der Festphase synthetisiert (SPPS), mit dem Spacer und der **P30**-Epitopsequenz zu den Glycopeptid-**P30**-Konjugaten **Peptid-3-P30**, **Peptid-4-P30**, **Peptid-5-P30**, **Peptid-6-P30** und **Peptid-7-P30** verlängert, vom Harz gelöst und nach präparativer HPLC rein isoliert (Schema 2). Die Benzylester der Sialinsäure in **Peptid-6-P30** und **Peptid-7-P30** wurden vor der Entfernung der *O*-Acetylgruppen mit MeONa/MeOH hydriert. **Peptid-3**, **-4**, **-5**, **-6**, **-7** wurden auch an BSA gekuppelt,

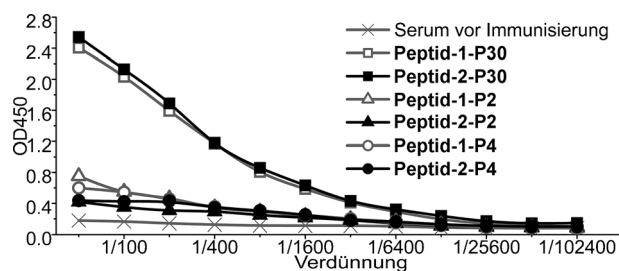
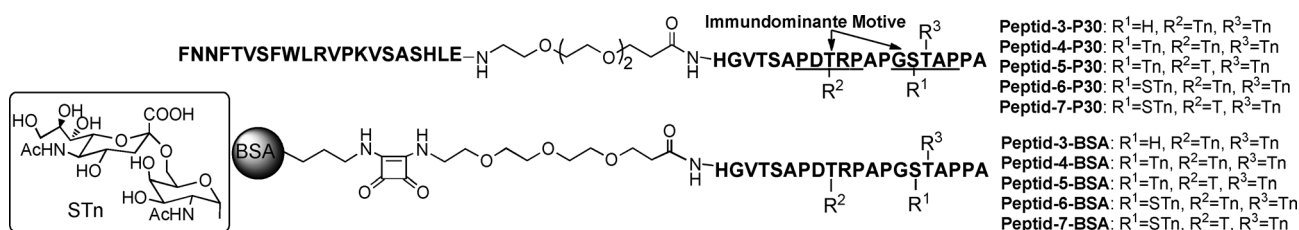


Abbildung 1. ELISA der durch an **P4**, **P2**- und **P30**-T-Helferzellepitop-Peptide gebundene MUC1-Glycopeptide induzierten gemischten Antisera. Ein Kaninchen-anti-Maus-Antikörper, verknüpft mit Meerrettich-Peroxidase, diente als Sekundärantikörper. Die optische Dichte wurde bei $\lambda = 450$ nm gemessen, wobei *O*-Phenylendiamin (OPD) und H₂O₂ als Substrate eingesetzt wurden.

um die durch **P30**- und BSA-Konjugat-Vakzine induzierten Immunreaktionen vergleichen zu können. **Peptid-3**, **-4**, **-5**, **-6**, und **-7-P30** und **Peptid-3**, **-4**, **-5**, **-6**, und **-7-BSA**-Vakzine wurden mit CFA oder IFA appliziert, wie oben beschrieben. Mit BSA-Konjugaten wurde nur dreimal geimpft. Um den Einfluss von Freund's Adjuvans zu prüfen, wurden die Glycopeptid-**P30**-Vakzine auch ohne Adjuvans nur in Phosphatpuffer-Lösung (PBS) appliziert. Zur Auswertung der Immunreaktionen dienten ELISA-Tests. Überraschenderweise induzierten alle **P30**-Epitop-Glycopeptid-Vakzine viel stärkere Immunantworten, wenn sie in wässrigem PBS und nicht mit CFA injiziert wurden (Abbildung 2a-e). Die Immunreaktionen fielen auch stärker aus als jene, die ähnliche Drei-Komponenten-Vakzine, die Lipopeptid und **P2**- oder **P4**-Peptid enthielten, ausgelöst hatten.^[4e] Diese Ergebnisse belegen zwei bedeutende Effekte: Freund's Adjuvans kann die Immunogenität von Glycopeptid-Vakzinen unterdrücken, und das Tetanus Toxoid-**P30**-Peptid wirkt sowohl als T-Helferzellepitop als auch als Adjuvans, offenbar wegen seiner amphiphilen Natur. Die Titer der durch **Peptid-4-P30**



Schema 2. Vakzine aus MUC1-Glycopeptiden (**Peptid-3**, **-4**, **-5**, **-6**, **-7**), die an **P30**-T-Helferzellepitop-Peptide bzw. an BSA gebunden sind.

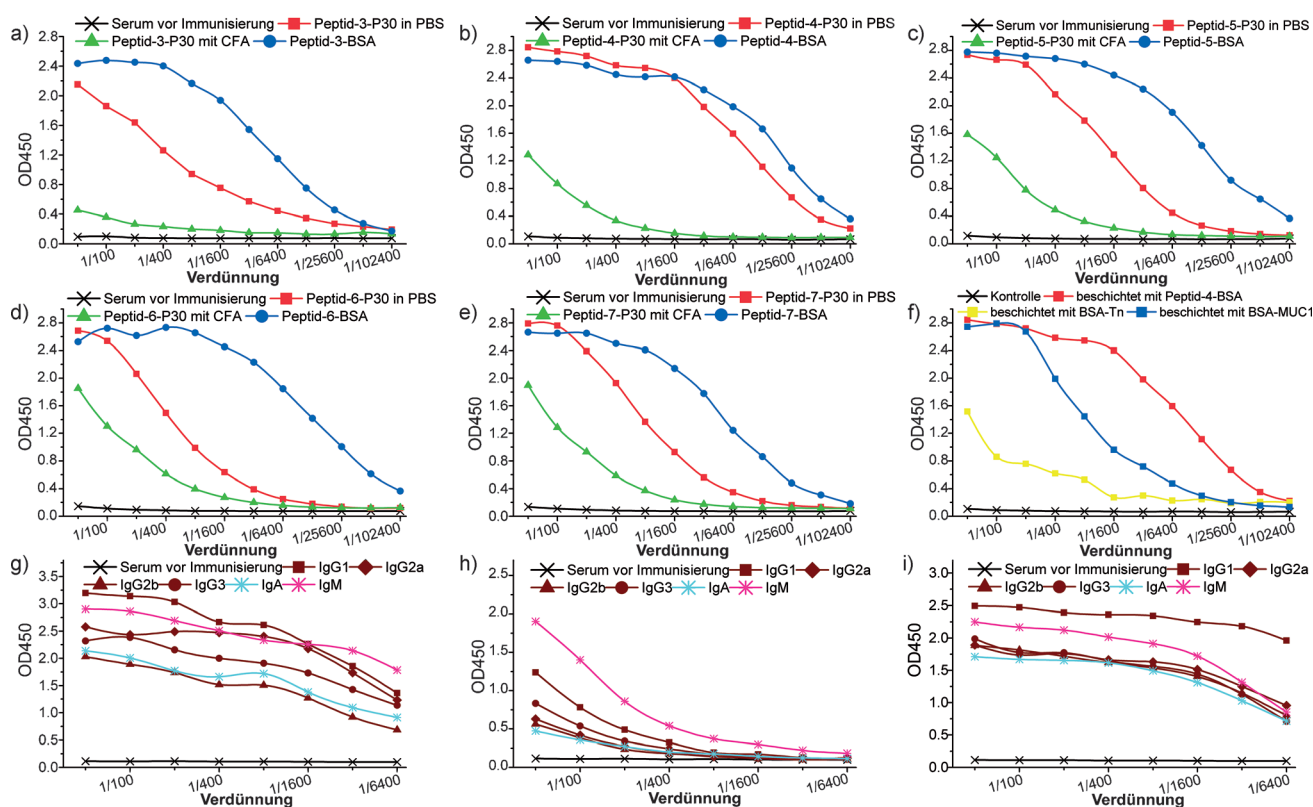


Abbildung 2. a–e) ELISA der durch an **P30**-T-Zellepitop oder BSA gebundene **Peptid-3**-, **-4**-, **-5**-, **-6**-, **-7**-Vakzine induzierten Antiseren. Die Mikrotiterplatten für die Analyse der durch BSA-gebundene Vakzine induzierten Seren wurden mit dem entsprechenden nichtkonjugierten Glycopeptid beschichtet, während für die ELISA-Tests der anderen Seren BSA-konjugierte Glycopeptide als Beschichtung dienten. f) Bindung von durch Vakzine **Peptid-4-P30** induzierten Antikörpern an verschiedene, auf Mikrotiterplatten immobilisierte Antigene. BSA-Tn ist das Konjugat von Tn-Thr mit BSA; BSA-MUC1 ist das Konjugat des unglycosylierten MUC1-Tandem-Repeat-Peptides mit BSA. g–i) Antikörperisotypanalyse von Antiseren, die durch **Peptid-4-P30** (g und h) und **Peptid-4-BSA** (i) induziert wurden, g: appliziert in PBS, h: appliziert mit CFA.

und **Peptid-5-P30** induzierten Antiseren waren viel höher als die von **Peptid-3-P30** ausgelöst (Abbildung 2a–c), was darauf hinweist, dass die zweite Glycosylierung innerhalb der GSTAP-Region die Immunogenität erhöhen kann. Im Vergleich zu den durch BSA-gekuppelte Vakzine erhaltenen Antiseren waren die Titer der durch **P30**-T-Zellepitop-Konjugate induzierten niedriger, allerdings mit Ausnahme der durch **Peptid-4-P30** induzierten Seren (Abbildung 2b). Es ist bemerkenswert, dass die Immunisierung mit der vollsynthetischen Vakzine **Peptid-4-P30** ohne Unterstützung durch ein kovalent gebundenes immunstimulierendes Lipopeptid oder ein externes Adjuvans eine fast genauso starke Immunreaktion auslöste wie das analoge Glycopeptidkonjugat mit einem immunogenen Protein. Die Affinität der durch **Peptid-4-P30** induzierten Antikörper zu weiteren Antigenen wurde ebenfalls durch ELISA ermittelt (Abbildung 2f). Im Vergleich zur Bindung an **Peptid-4-BSA** (Abbildung 2f, rot) war die an das nicht glycosylierte BSA-MUC1 (blau) deutlich geringer. Die Antikörper binden auch nur schwach an ein Tn-Thr-BSA-Konjugat (gelb), obwohl in der **Peptid-4-P30**-Vakzine drei Kopien vom Tn-Antigen enthalten sind. Diese Ergebnisse unterstreichen, dass beide, der Peptid- und der Kohlenhydratanteil, zum wirksamen Epitop von MUC1 beitragen.

Die Isotypen der durch die Vakzine **Peptid-4-P30** induzierten Antikörper wurden ebenfalls durch ELISA mit Ziege-

anti-Maus-Sekundärantikörpern gegen IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3, IgM und IgA bestimmt, die mit an Meerrettich-Peroxidase gebundenem Kaninchen-anti-Ziege-IgG als drittem Antikörper nachgewiesen wurden. Abbildung 2g zeigt, dass die Vakzine **Peptid-4-P30**, in PBS-Lösung appliziert, überwiegend IgG₁ und IgM induziert, aber auch erhebliche Anteile an IgG₃, typisch für eine Anti-Kohlenhydrat-Reaktion, und IgG_{2a/b}-Antikörper, die eine zelluläre (MHC1) Immunantwort anzeigen.

Die Impfung mit **Peptid-4-P30** zusammen mit CFA löst eine viel schwächere Immunreaktion aus und induziert überwiegend weniger spezifische IgM-Antikörper (Abbildung 2h). Impfung mit der Vakzine **Peptid-4-BSA** (Abbildung 2i) ergab ein ähnliches Antikörperisotyp-Spektrum wie das durch **Peptid-4-P30** hervorgerufene. Die durch die Vakzine **Peptid-3**-, **-5**-, **-6**-, und **-7-P30**, appliziert in PBS, induzierten Antiseren zeigten ähnliche Isotypmuster mit vorherrschenden IgG₁/IgG₃-Subtypen, die eine vorwiegende Th2-Immunreaktion anzeigen.^[13]

Ähnlich der Immunogenität und Subtypzusammensetzung war die Bindung der induzierten Antikörper an MCF-7 Brusttumorzellen abhängig von der Art der Applikation der MUC1-Glycopeptid-**P30**-Vakzine. Die Durchflusszytometrie (FACS) mit durch Fluoresceinisothiocyanat (FITC)-markiertem Kaninchen-anti-Maus-IgG offenbarte, dass durch **Peptid**-

3-, -4-, -5-, -6-, und -7-P30 ohne CFA induzierte Antiseren stärker an MCF-7-Zellen banden als jene, die durch die gleichen Vakzine zusammen mit CFA als Adjuvans ausgelöst wurden (Hintergrundinformationen). Dieser Unterschied ist für **Peptid-6-P30** besonders auffällig.

Im Allgemeinen binden durch mit BSA konjugierte Vakzine gewonnene Antiseren stärker an MCF-7-Zellen. Der Unterschied in diesen Bindungen scheint umso größer zu sein, je hydrophiler das MUC1-Glycopeptidantigen ist. Obwohl diese Effekte noch nicht zu erklären sind, könnten sie auf unterschiedliche Aggregation und Konformation der Glycopeptidantigene in den verschiedenen Präparationen zurückzuführen sein. Die induzierten Antikörper binden nicht nur an Tumorzellen, sie leiten auch das Abtöten der erkannten MCF-7-Tumorzellen durch Aktivierung der „complement dependent cytotoxicity“ (CDC) ein. In den Tetrazoliumbromid-(MTT)-Assays zur Bestimmung der Überlebensraten der Zellen zeigt sich (Abbildung 3), dass die durch Aktivierung von Kaninchen-Komplement (RC) bewirkte Cytotoxizität der Antiseren höher ist, wenn die **P-30**-konjugierten Vakzine in PBS-Lösung ohne CFA injiziert werden.

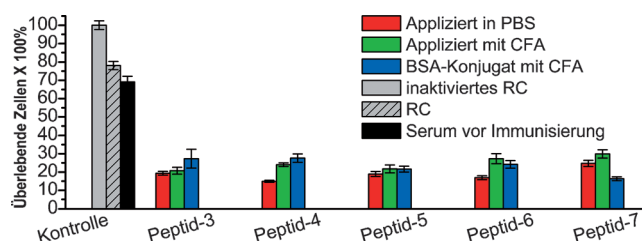


Abbildung 3. Von CDC (complement dependent cytotoxicity) bewirkte Abtötung von MCF-7-Tumorzellen. Peptid-3–7 steht für die entsprechenden Vakzine mit konjugiertem **P30** (rote und grüne Balken) oder mit BSA (blaue Balken). RC-inaktiv: Die Zellüberlebensrate nach Einwirkung von inaktiviertem Kaninchen-Komplement (RC) wurde als 100% gesetzt; die Überlebensrate wurde nach 2 h Inkubation gemessen. Die Daten sind Mittelwerte aus 5 Experimenten.

Zusammenfassend ist festzuhalten, dass neue, wirksame Zweikomponenten-Antitumor-Vakzine durch Kupplung von MUC1-Tandem-Repeat-Glycopeptiden mit dem **P30**-T-Helferzellepitop aus Tetanus-Toxoid gewonnen wurden. Diese Vakzine induzieren erstaunlicherweise deutlich stärkere Immunreaktionen, wenn sie nicht mit Freundes Adjuvans, sondern einfach in wässriger Pufferlösung angewendet wurden. Verglichen mit den **P2**- und **P4**-Epitopen, entfaltet das **P30**-T-Zellepitop offenbar eine überlegene Wirkung. Es enthält drei potentielle Epitope, von denen jedes mit einem MHC II-Molekül präsentiert werden kann.^[11] Zusätzlich wirkt dieses **P30**-T-Zellpeptid gleichzeitig als eingebautes Adjuvans und macht die Anwendung eines externen Adjuvans oder eines kovalent angebondenen Lipopeptid-Immunstimulans überflüssig. Das ist günstig, weil Lipopeptid-Konjugate schwer zu synthetisieren und zu reinigen sind, und Freundes Adjuvans für die Anwendung beim Menschen obsolet ist. Darüber hinaus zeigen die Ergebnisse zum ersten Mal, dass Freundes Adjuvans die Immunogenität synthetischer Glycopeptid-Vakzine und

die Erkennung von Tumorzellen durch die induzierten Antiseren unterdrücken kann. Die Resultate belegen auch, dass die Wirksamkeit der synthetischen Vakzine vom Glycosylierungsmuster abhängt. Drei Glycan-Seitenketten in den PDTRP- und GSTAP-Regionen erhöhten die Immunogenität der Vakzine. Drei Tn-Saccharidantigene an den Glycosylierungspositionen ergaben eine Vakzine, die ohne Unterstützung durch ein Adjuvans die stärkste Immunantwort mit an Tumorzellen bindenden Antikörpern hervorrief (Endpunkt-titer 100000). Sie ist daher eine vielversprechende Leitstruktur für die Entwicklung einer vollsynthetischen Antitumor-Vakzine.

Eingegangen am 16. Januar 2013,
veränderte Fassung am 15. Februar 2013
Online veröffentlicht am 25. April 2013

Stichwörter: Antitumor-Vakzine · Festphasensynthesen · Glycopeptide · Tetanus-Toxoid · Trägerprotein

- [1] a) J. Burchell, J. Taylor-Papadimitriou, M. Boshell, S. Gendler, T. Duhig, *Int. J. Cancer* **1989**, *44*, 691; b) O. J. Finn, K. R. Jerome, R. A. Henderson, G. Pecher, N. Domenech, J. Magarian-Blander, S. M. Barratt-Boyes, *Immunol. Rev.* **1995**, *145*, 61.
- [2] a) S. Keil, C. Claus, W. Dippold, H. Kunz, *Angew. Chem.* **2001**, *113*, 379; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 366; b) A. M. Vlad, J. C. Kettel, N. M. Alajez, C. A. Carlos, O. J. Finn, *Adv. Immunol.* **2004**, *82*, 249; c) S. Dziadek, A. Hobel, E. Schmitt, H. Kunz, *Angew. Chem.* **2005**, *117*, 7803; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 7630; d) G. A. Cremer, N. Bureau, V. Piller, H. Kunz, F. Piller, A. F. Delmas, *ChemMedChem* **2006**, *1*, 965; e) U. Westerlind, A. Hobel, N. Gaidzik, E. Schmitt, H. Kunz, *Angew. Chem.* **2008**, *120*, 7662; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 7551; f) O. Renaudet, L. BenMohamed, G. Dasgupta, I. Bettahi, P. Dumy, *ChemMedChem* **2008**, *3*, 737.
- [3] a) B. L. Wilkinson, L. R. Malins, C. K. Y. Chun, R. J. Payne, *Chem. Commun.* **2010**, *46*, 6249; b) 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.
- [4] a) S. Ingale, M. A Wolfert, J. Gaekwad, T. Buskas, G. J. Boons, *Nat. Chem. Biol.* **2007**, *3*, 663; b) B. L. Wilkinson, S. Day, L. R. Malins, V. Apostolopoulos, R. J. Payne, *Angew. Chem.* **2011**, *123*, 1673; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 1635–1639; c) V. Lakshminarayanan, P. Thompson, M. A. Wolfert, T. Buskas, J. M. Bradley, L. B. Pathangey, C. S. Madsen, P. A. Cohen, S. J. Gendler, G. J. Boons, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2012**, *109*, 261; d) B. L. Wilkinson, S. Day, R. Chapman, S. Perrier, V. Apostolopoulos, R. J. Payne, *Chem. Eur. J.* **2012**, *18*, 16540; e) H. Cai, Z.-Y. Sun, Z. H. Huang, L. Shi, Y. F. Zhao, H. Kunz, Y. M. Li, *Chem. Eur. J.* **2013**, *19*, 1962.
- [5] a) S. Dziadek, D. Kowalczyk, H. Kunz, *Angew. Chem.* **2005**, *117*, 7798; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 7624; b) H. Cai, Z. H. Huang, L. Shi, P. Zou, Y. F. Zhao, H. Kunz, Y. M. Li, *Eur. J. Org. Chem.* **2011**, 3685; c) H. Cai, Z. H. Huang, L. Shi, Z. Y. Sun, Y. F. Zhao, H. Kunz, Y. M. Li, *Angew. Chem.* **2012**, *124*, 1751; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 1719; d) 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*, 8498–8503; e) 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*, 7551–7555; f) N. Gaidzik, A. Kaiser, D. Kowalczyk, U. Wester-

- lind, B. Gerlitzki, H. P. Sinn, E. Schmitt, H. Kunz, *Angew. Chem.* **2011**, 123, 10153; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, 50, 9977.
- [6] a) T. Buskas, Y. H. Li, G. J. Boons, *Chem. Eur. J.* **2004**, 10, 3517; b) S. J. Danishefsky, J. R. Allen, *Angew. Chem.* **2000**, 112, 882; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000**, 39, 836; c) V. Kudryashov, P. W. Glunz, L. J. Williams, S. Hintermann, S. J. Danishefsky, K. O. Lloyd, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2001**, 98, 3264.
- [7] a) T. Monji, D. Pious, *J. Immunol.* **1997**, 158, 3155; b) S. Demotz, A. Lanzavecchia, U. Eisel, H. Niemann, C. Widmann, G. Corradin, *J. Immunol.* **1989**, 142, 394; c) P. Panina-Bordignon, A. Tan, A. Termijtelen, S. Demotz, G. Corradin, A. Lanzavecchia, *Eur. J. Immunol.* **1989**, 19, 2237.
- [8] A. Aderem, D. M. Underhill, *Annu. Rev. Immunol.* **1999**, 17, 593.
- [9] U. Karsten, S. von Mensdorff-Pouilly, S. Goletz, *Tumour Biol.* **2005**, 26, 217.
- [10] a) M. A. Tarp, A. L. Sorensen, U. Mandel, H. Paulsen, J. Burchell, J. Taylor-Papadimitriou, H. Clausen, *Glycobiology* **2007**, 17, 197; b) O. Blixt, E. Clo, A. S. Nudelman, K. K. Sorensen, T. Clausen, H. H. Wandall, P. O. Livingston, H. Clausen, K. J. Jensen, *J. Proteome Res.* **2010**, 9, 5250; c) U. Karsten, C. Diotel, G. Klich, H. Paulsen, S. Goletz, S. Muller, F. G. Hanisch, *Cancer Res.* **1998**, 58, 2541; d) H. Möller, N. Serittas, H. Paulsen, J. M. Burchell, J. Taylor-Papadimitriou, B. Meyer, *Eur. J. Biochem.* **2002**, 269, 1444.
- [11] a) P. Braun, G. M. Davies, M. R. Price, P. M. Williams, S. B. J. Tendler, H. Kunz, *Bioorg. Med. Chem.* **1998**, 6, 1531; b) S. Dziadek, C. Griesinger, H. Kunz, U. M. Reinscheid, *Chem. Eur. J.* **2006**, 12, 4981 c) F. Corzana, J. H. Busto, F. Marcelo, M. G. de Luis, J. L. Asensio, S. Martin-Santamaria, Y. Saenz, C. Torres, J. Jimenez-Barbero, A. Avenoza, J. M. Peregrina, *Chem. Commun.* **2011**, 47, 5319.
- [12] C. Brocke, H. Kunz, *Synthesis* **2004**, 525–542.
- [13] S. S. Seregin, D. M. Appledorn, A. J. McBride, N. J. Schuldt, Y. A. Aldhamen, T. Voss, J. Wei, M. Bujold, W. Nance, S. Godbehere, A. Amalfitano, *Mol. Ther.* **2009**, 17, 685.