

Eine vollsynthetische Vier-Komponenten-Antitumor-Vakzine mit einem MUC1-Glycopeptid und drei verschiedenen T-Helferzell-Epitopen**

Björn Palitzsch, Sebastian Hartmann, Natascha Stergiou, Markus Glaffig, Edgar Schmitt und Horst Kunz*

Abstract: In einem neuen Konzept für vollsynthetische Vakzine wird die Rolle von T-Helferzellen hervorgehoben. In einer solchen synthetischen Antitumor-Vakzine wurde ein zweifach glycosyliertes tumorassoziiertes MUC1-Glycopeptid als B-Zellepitop mit drei verschiedenen T-Helferzell-Epitopen durch Quadratsäurekonjugation zweier linearer (Glyco)Peptide kovalent verknüpft. In Mäusen löste die Impfung mit dieser Vier-Komponenten-Vakzine ohne zusätzliche Immunstimulatoren etwa achtmal höhere MUC1-spezifische Antikörpertiter aus als eine Vakzine, die nur ein T-Helferzell-Epitop enthielt. Diese ermutigenden Ergebnisse zeigen, dass die gleichzeitige Aktivierung von T-Helferzellen verschiedener Spezifität nützlich für Anwendungen ist, die eine gesteigerte Immunogenität von Epitopen erfordern. Besonders in der personalisierten Medizin kann der flexible Aufbau der Vakzine als Vorbild dienen, wenn z.B. T-Helferzell-Epitope benötigt werden, die zum humanen Leukozytenantigen-Typ (HLA) verschiedener Patienten passen.

Die Entdeckung im späten 19. Jahrhundert, dass die Impfung mit inaktivierten viralen oder bakteriellen Pathogenen zum Schutz gegen Infektionen führt, markiert einen der wichtigsten Fortschritte in der modernen Medizin.^[1,2] Diese wirksame Schutzimpfung ist auch heute noch auf die Behandlung von Infektionskrankheiten beschränkt, die durch virale, bakterielle oder protozoische Krankheitserreger verursacht werden. Die Impfung gegen Krebserkrankungen, eine der häufigsten Todesursachen in der entwickelten Welt, ist dagegen ein ungelöstes Problem, da das Immunsystem darauf ausgerichtet ist, pathogene körperfremde Strukturen von körpereigenen Strukturen zu unterscheiden. Im Falle von Krebserkrankungen müsste es aber zwischen körpereigenen

und veränderten körpereigenen Strukturen (auf neoplastischen Krebszellen) differenzieren. Eine vielversprechende Zielstruktur, die diese Differenzierung ermöglicht, ist das Mucin MUC1,^[3] ein hoch glycosyliertes Protein, das in vielen Geweben (z.B. Brust, Pankreas, Ovar und Darm) auf den Epithelzellen exprimiert wird. Den extrazellulären Hauptteil des MUC1 bildet eine Domäne, die aus 20 bis 120 Wiederholungssequenzen („Tandem Repeats“) aufgebaut ist. Die aus 20 Aminosäuren (PAHGVTSAPDTRPAPGSTAP) gebildeten Tandem Repeats enthalten fünf potentielle O-Glycosylierungsstellen an Serin und Threonin. Während das MUC1 auf normalen Zellen lange Glycane trägt, sind die Kohlenhydratseitenketten des MUC1 auf Tumorzellen wegen reduzierter Aktivität von Glycosyltransferasen deutlich kürzer.^[5] Wegen dieser verkürzten tumorassoziierten Kohlenhydratantigene (TACAs) ist nun das Peptidrückgrat des MUC1 für das Immunsystem zugänglich.^[3,6] Da in jeder Tumorzelle normale MUC1- neben tumorassoziierten MUC1-Strukturen vorkommen, ist die Isolierung von tumorassoziiertem MUC1 nicht möglich. Durch Glycopeptidsynthese an der Festphase gelingt es jedoch, solche Strukturen chemisch rein und in ausreichenden Mengen herzustellen.

Während bei klassischen Impfstoffen, z.B. gegen Tollwut,^[7] die Aktivität des pathogenen Materials reduziert werden muss, ist zur Aktivierung des körpereigenen Immunsystems gegen epitheliale Tumore durch Vakzine auf der Basis des tumorassoziierten MUC1 das Gegenteil der Fall. Das tumorassoziierte MUC1 ist als endogene Struktur zu wenig immunogen für die Induktion einer ausreichenden Immunantwort. Um eine starke Immunantwort auszulösen, muss es als B-Zellepitop mit immunstimulierenden Komponenten verknüpft werden. Dabei werden besonders T-Zell-Epitope zur Aktivierung von T-Helferzellen benötigt, die durch kostimulatorische Rezeptoren und Cytokine die zielgerichtete Aktivierung von B-Zellen und deren Reifung zu Antikörper produzierenden Plasmazellen garantieren.

Sehr hohe Titer an MUC1-spezifischen Antikörpern können durch Vakzine induziert werden, bei denen die MUC1-B-Zellepitope an Tetanus-Toxoid (TTox) gebunden sind, einem detoxifiziertem Protein aus *Clostridium tetani*, das eine Vielzahl an potennten T-Helferzell-Epitopen enthält.^[8,9] Ein Nachteil dieser Konjugate ist, dass sie nur unzureichend charakterisiert werden können, nachdem die Glycopeptide an das Protein gebunden sind. Zudem wurden diese Vakzine mit komplettem Freund'schen Adjuvans (CFA) verabreicht, das stark immunstimulierende Komponenten beinhaltet, die mehrere Mechanismen des angebo-

[*] Dipl.-Chem. B. Palitzsch, Dipl.-Chem. S. Hartmann, Dipl.-Chem. M. Glaffig, Prof. Dr. H. Kunz
Institut für Organische Chemie
Johannes-Gutenberg-Universität Mainz
Duesbergweg 10–14, 55128 Mainz (Deutschland)
E-Mail: hokunz@uni-mainz.de
Dipl.-Chem. N. Stergiou, Prof. Dr. E. Schmitt
Institut für Immunologie, Universitätsmedizin
Johannes-Gutenberg-Universität Mainz
Langenbeckstraße 1, Geb. 708, 55101 Mainz (Deutschland)

[**] Diese Arbeit wurde durch den Fonds der Chemischen Industrie und durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft, SFB 1066, Teilprojekt B1 unterstützt.

 Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.201406843> zu finden.

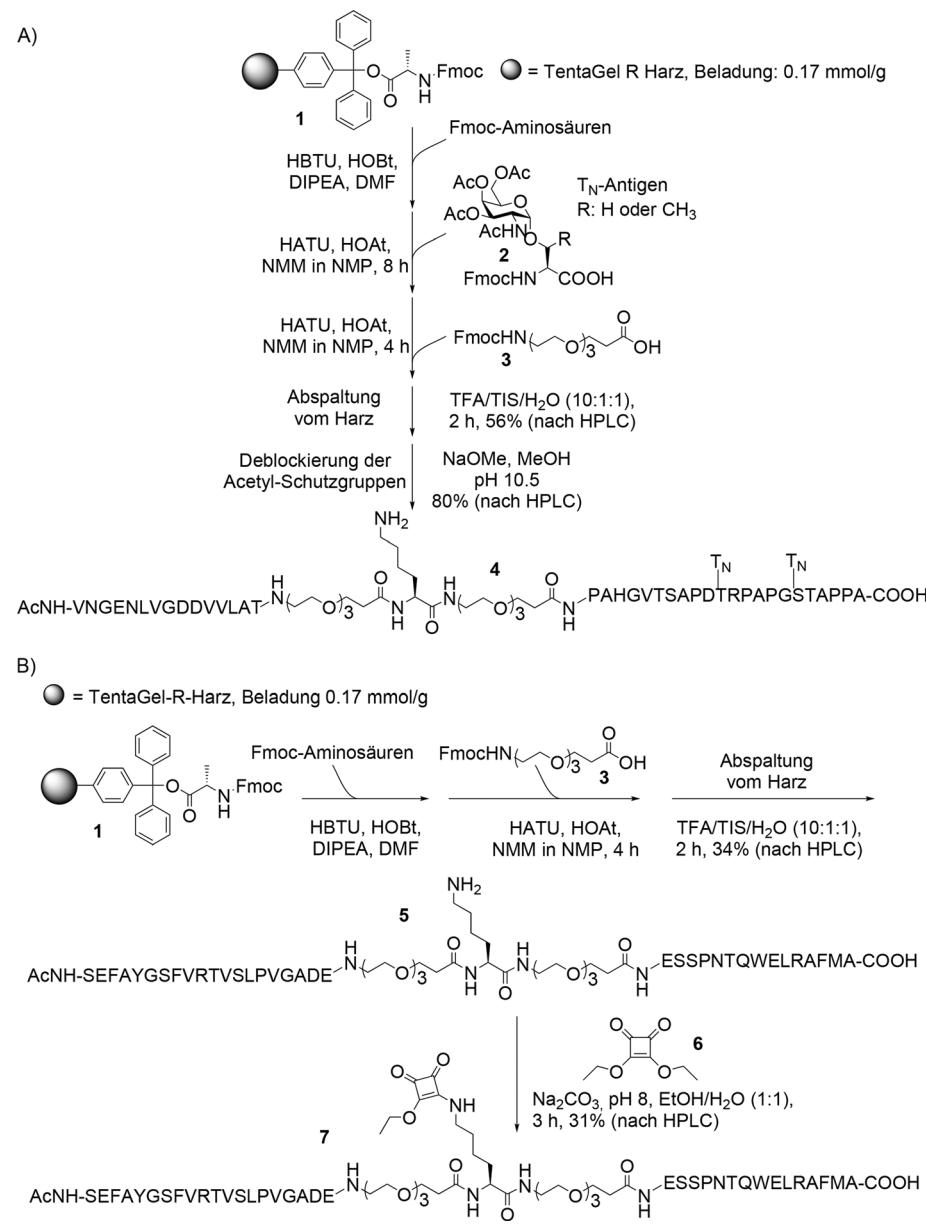
nen Immunsystems aktivieren. Wegen der Nebenwirkungen ist die Verwendung von CFA in Menschen heute verboten. Auch ist der kommerzielle Einsatz von TTox bzw. proteino- genen Vakzinen kostspielig, wobei die Kosten für die Aufrechterhaltung der Kühlkette bei der Lagerung der Vakzine überwiegen.^[10] Aus diesen Gründen wird in jüngster Zeit die Entwicklung vollsynthetischer Mehrkomponenten-Vakzinen intensiv verfolgt.^[11,12] So konnten durch Vakzine, in denen der immunstimulierende Toll-like-Rezeptor-2-Agonist Pam₃CysSK₄ an B- und T-Zellepitope gebunden wurde, in Mäusen beachtliche Immunantworten induziert werden.^[13–16] In anderen Studien wurden sowohl MUC1-B-Zell- als auch T-Helferzell-Epitope an polymere Träger konjugiert, um die Immunogenität der Vakzine durch multivalente Antigenpräsentation zu steigern.^[17,18]

Da die Qualität der humoralen Immunantwort entscheidend von der Effizienz der T-Helferzell-Aktivierung abhängt, wird hier erstmals eine vollsynthetische Vier-Komponenten-Vakzine vorgestellt, die neben einem MUC1-B-Zell- epitop drei T-Helferzell-Epitope enthält. Diese Vakzine verstärkt die B-Zellaktivierung durch drei T-Helferzelllinien und führt im Vergleich zu einer Vakzine mit nur einem T-Helferzell-Epitop zu deutlich erhöhten Titern an tumor- selektiven IgG-Antikörpern.

Die Spezifität der Antikörper, die durch diese Vakzine induziert werden, hängt ausschließlich von der Struktur des B-Zellepitops ab. Es soll die tumorassoziierte Struktur des MUC1 akkurat nachahmen und keine Antikörper induzieren, die an normales MUC1 binden, da sonst Autoimmunreaktionen ausgelöst würden. Als B-Zellepitop wurde die um zwei Aminosäuren verlängerte Tandem-Repeat-Sequenz gewählt (PA-HGVTSAPDTRPAPGSTAP-PA). Sie enthält die immundominanten Domänen PDTRP und GSTA, die bevorzugte Epitope für Anti-MUC1-Antikörper sind.^[19] Die Konformation solcher MUC1-Tandem-Repeat-Peptide wird entscheidend durch die O-Glycosylierungen beeinflusst.^[20] Daher wurden T_N-Antigene an Threonin in Position 11 und an Serin in Position 17 eingeführt, womit beide immundominanten Domänen glycosyliert sind (Schema 1 A).

Das Immunsystem kann auf verschiedene Arten so aktiviert

werden, dass Antikörper produzierende B-Zellen gebildet werden. Am wirksamsten ist die Aktivierung über T-Helferzellen, da nur so die Affinitätsreifung der Antikörper und der Wechsel der Immunglobulin-Klasse vollzogen wird. Beide Prozesse sind ausschlaggebend für die Erzeugung von tumorspezifischen Antikörpern, die cytotoxische Mechanismen, z.B. Antikörper-abhängige zelluläre Cytotoxizität (ADCC), einleiten können. Auch sind T-Helferzellen an der Bildung von Gedächtnis-B-Zellen beteiligt, die langandauernde Immunität gegen Antigene gewähren. Zum Aufbau der Vakzine wurden drei MHC-Klasse-II-T-Helferzell-Epitope gewählt, die sowohl im Menschen als auch in der Maus wirken und ein Cytokinprofil induzieren, das vorwiegend aus Interleukin 4 (IL-4), Interleukin 2 (IL-2) und Interferon-γ (IFN-γ) besteht und eine T-Zell-vermittelte Immunantwort begüns-



Schema 1. Festphasensynthese und nachfolgende Entfernung der O-Acetyl-Schutzgruppen von Glycopeptid **4** (A). Festphasensynthese von Peptid **5** und anschließende Reaktion mit Quadratsäuremonoamidethylsäureester **6** zum Quadratsäuremonoamidethylsäureester **7** (B).

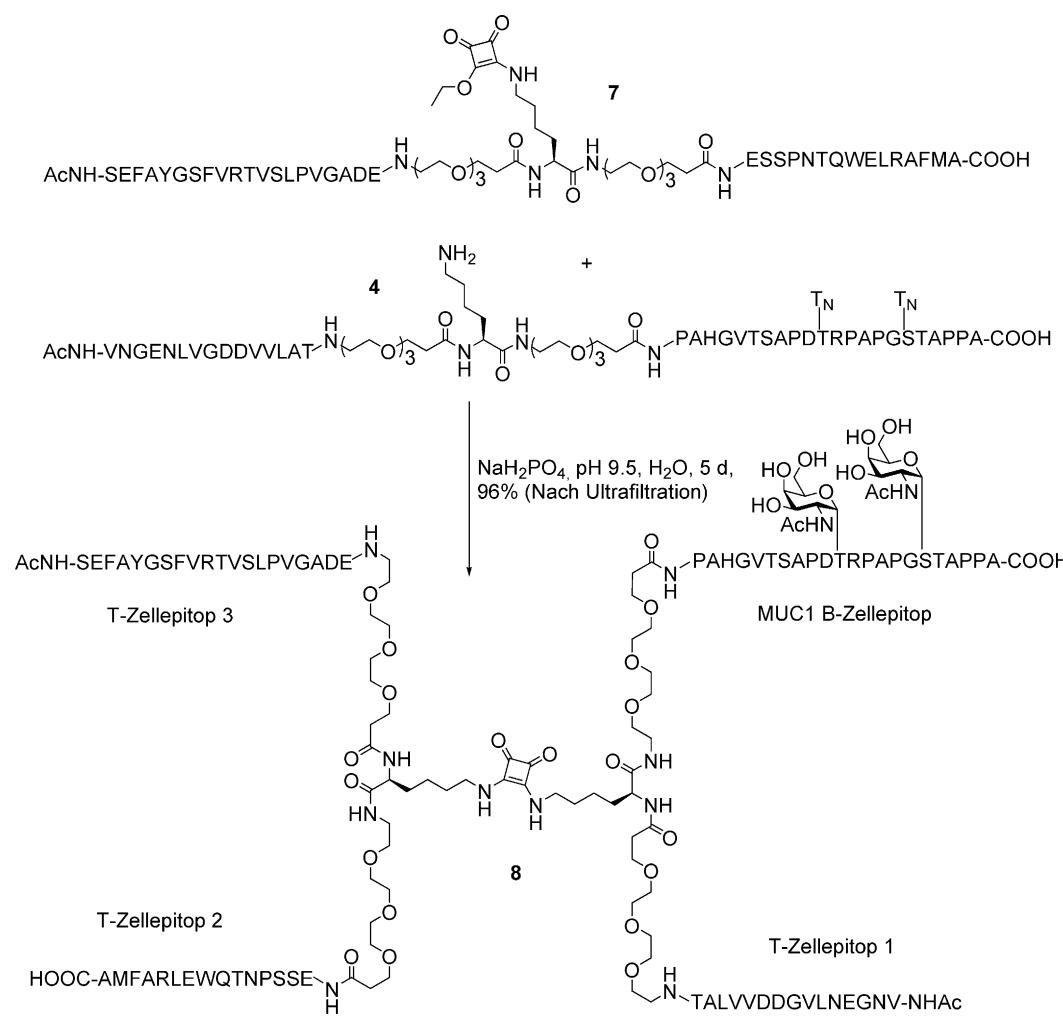
tigt. Zwei dieser Epitope stammen aus *Yersinia pestis* (Epitope 1: 14-meres Peptid (VNGENLVGDDVVLAT, Cytokinprofil: IFN- γ > IL-2 > IL-4, T-Zellproliferation: +++)^[21]; Epitope 2: 15-meres Peptid (ESSPN-TQWELRAFMA, Cytokinprofil: IFN- γ > IL-2 > IL-10 > IL-4, T-Zellproliferation: ++).^[22] Das dritte Epitop ist ein 20-meres Peptid (SEF-AYGSFVRTVSLPVGAD, Cytokinprofil: IL-4 > IFN- γ , T-Zellproliferation: +) aus *Mycobacterium tuberculosis*.

Um optimale Wirkung zu gewährleisten, sind die Komponenten kovalent verknüpft. Dennoch muss sichergestellt sein, dass die Epitope in möglichst natürlicher Konformation vorliegen. Daher wurden die Komponenten durch flexible, wasserlösliche und nichtimmunogene Triethylenglycolspacer **3** getrennt.^[24] Diese stellen sicher, dass sich die einzelnen Komponenten nicht gegenseitig konformativ beeinflussen. Die Festphasensynthese der linearen (Glyco)Peptidkonjugate **4** und **5** wurde nach der 9-Fluorenylmethoxycarbonyl-(Fmoc)-Strategie vorgenommen. Dabei wurde mit Fmoc-Alanin vorbeladenes TentaGel-Tritylharz **1** verwendet (Schema 1).^[8] Die Fmoc-Aminosäuren wurden mit HBTU/HOBt gekuppelt, während die O-glycosylierten Fmoc-Aminosäuren **2** und die Spaceraminosäure **3** mit dem reaktiveren Kupplungsreagentien HATU/HOAt angebunden wurden. Zwischen beide Spaceraminosäuren

wurde ein zentrales Lysin eingefügt, das als Anker für die nachfolgende Konjugation der beiden Peptidkonjugate dient. Um unerwünschte Reaktionen am N-Terminus zu verhindern, wurden die (Glyco)Peptidkonjugate mit Acetanhydrid acetyliert. Nach beendeter Synthese wurden die (Glyco)Peptidkonjugate mit Trifluoressigsäure/Triisopropylsilan/Wasser (10:1:1) vom Harz gelöst, wobei alle säurelabilen Schutzgruppen der Aminosäureseitenketten entfernt wurden. Nach Reinigung durch préparative HPLC wurde das Peptidkonjugat **5** in 34 % Ausbeute erhalten. Das Glycopeptidkonjugat wurde ebenso durch préparative HPLC gereinigt. Nach Entfernung

der O-Acetylgruppen der Glycane mit methanolischer Natriummethanolatlösung (pH 10.5) und Reinigung durch präparative HPLC wurde das Glycopeptidkonjugat **4** in 45 % Gesamtausbeute erhalten (Schema 1A, siehe die Hintergrundinformationen). Zur Kupplung der beiden Konjugate wurde die ϵ -Aminogruppe des Lysins von Konjugat **5** mit Quadratsäurediethylester (**6**) in Natriumcarbonatlösung (pH 8)^[25] in Wasser/Ethanol zum Quadratsäuremonoamidester **7** umgesetzt und anschließend durch präparative HPLC gereinigt (Schema 1B, siehe die Hintergrundinformationen). Das lineare Glycopeptid **4** wurde mit **7** in wässriger Dinatriumhydrogenphosphatlösung (pH 9.5)^[26] zur Vakzine **8** umgesetzt, die nach Reinigung durch Ultrafiltration in 96 % Ausbeute anfiel (Schema 2).

Es sei angemerkt, dass die Peptidepitope der Vakzine **8** in einem bestimmten Muster angeordnet sind: Während T-Zellepitop 1 (*Y. pestis*) und T-Zellepitop 3 (*M. tuberculosis*) mit dem MUC1-Glycopeptid in linearer C→N-Terminus-Richtung verbunden sind, ist das MUC1-Glycopeptid mit T-Zellepitop 2 verzweigt in N→N-Terminus-Richtung verknüpft. Die Anordnung gilt als stabiler, da sie langsamer metabolisiert wird.^[27] Sie kann zur Optimierung nach Belieben variiert werden. Zudem ermöglicht der beschriebene



Schema 2. Konjugation des Glycopeptids **4** und des Peptids **7** zu Vakzine **8**.

Aufbau der Vakzine die multiple Präsentation eines der Epitope.

Um das Potenzial der Vakzine **8** mit drei T-Helferzell-Epitopen zu evaluieren, wurde sie mit Vakzine **4** verglichen, die lediglich das Epitop aus *M. tuberculosis* enthält. Dazu wurden je drei weibliche Balb/c-Mäuse im Alter von 12 Wochen viermal in Intervallen von 21 Tagen mit einer der Vakzine geimpft.^[32] Zur Impfung wurden jeweils 50 µg Vakzine in 40 µL einer Wasser-in-Öl-Emulsion ohne weitere immunstimulierende Adjuvantien intraperitoneal appliziert. Fünf Tage nach jeder Auffrischungsimpfung wurde Blut aus der Schwanzvene der Mäuse entnommen. Die Seren wurden durch Enzym-gebundene Immunadsorbent-Untersuchungen (ELISA) auf Vakzin-induzierte Serumantikörper des IgG-Typs geprüft. Dazu wurde die Mikrotiterplatte mit dem Konjugat aus MUC1-B-Zellepitop und Rinderserumalbumin (BSA) beschichtet (siehe die Hintergrundinformationen).^[28,29] Schon nach der ersten Auffrischungsimpfung konnten in allen Seren antigenspezifische IgG-Antikörper nachgewiesen werden. Dabei waren die Titer in den Mäusen signifikant höher, die mit der Vier-Komponenten-Vakzine **8** immunisiert wurden (Abbildung 1 A). Die erhöhte Immunogenität von Vakzine **8** war nach der dritten Auffrischungsimpfung noch ausgeprägter. Die Endpunkttitre, die durch Vakzine **8** (Maus 2 und 3) induziert wurden, lagen bei etwa 30 000 und damit etwa achtmal höher, als die Endpunkttitre, welche Vakzine **4** auslöste (Abbildung 1 B). Im Vergleich zu MUC1-TTox-Vakzinen sind die induzierten Titer zwar um eine Größenordnung niedriger,^[8,9] aber im Vergleich zu anderen vollsynthetischen Vakzinen, die mit vergleichbarer ELISA-Technik evaluiert wurden, sind die durch Vakzine **8** induzierten Titer höher.^[16–18] Durch ELISA-Experimente wurden die Isotypen der induzierten Antikörper bestimmt. Sie zeigten, dass in zwei von drei Mäusen überwiegend Antikörper des Isotyps IgG₁ induziert wurden und in deutlich geringerem Ausmaß IgM-Antikörper (Abbildung 2 A). Das Überwiegen der IgG₁-Antikörper belegt, dass Vakzine **8** eine adaptive T-Zell-vermittelte Immunantwort ausgelöst hat, bei der vorwiegend IL-4 induziert wurde.^[30,31] Dies beweist zudem, dass ein immunologisches Gedächtnis ausgebildet wurde, das Langzeitschutz gegen das Antigen bietet. Um zu überprüfen, ob die induzierten Antikörper tumorassoziiertes MUC1 auf der Oberfläche von Tumorzellen

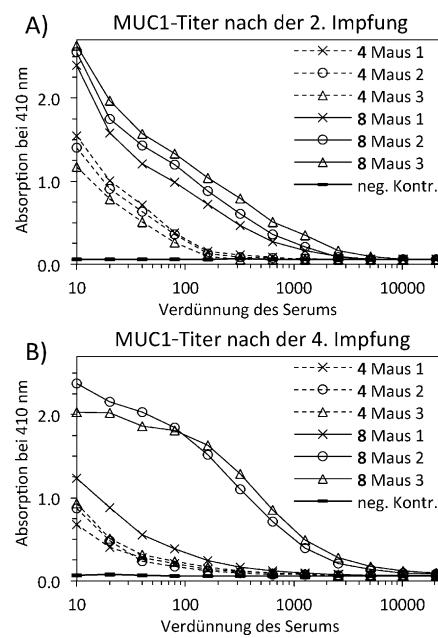


Abbildung 1. Durch Vakzine **4** und **8** induzierte IgG-Antikörpertiter nach der zweiten Impfung (A) und nach der vierten Impfung (B).

len erkennen, wurden Zellen der humanen MUC1-exprimierenden Brustkrebszelllinie T47D mit den durch Vakzine **4** bzw. **8** induzierten Antiseren inkubiert. Nach Waschen wurden die an die T47D-Zellen gebundenen Serumantikörper mit Fluoreszenz-markiertem Ziege-anti-Maus-IgG-Sekundärantikörper angefärbt. Die Fluoreszenzintensität der Zellen wurde durch Durchflusszytometrie bestimmt. Die

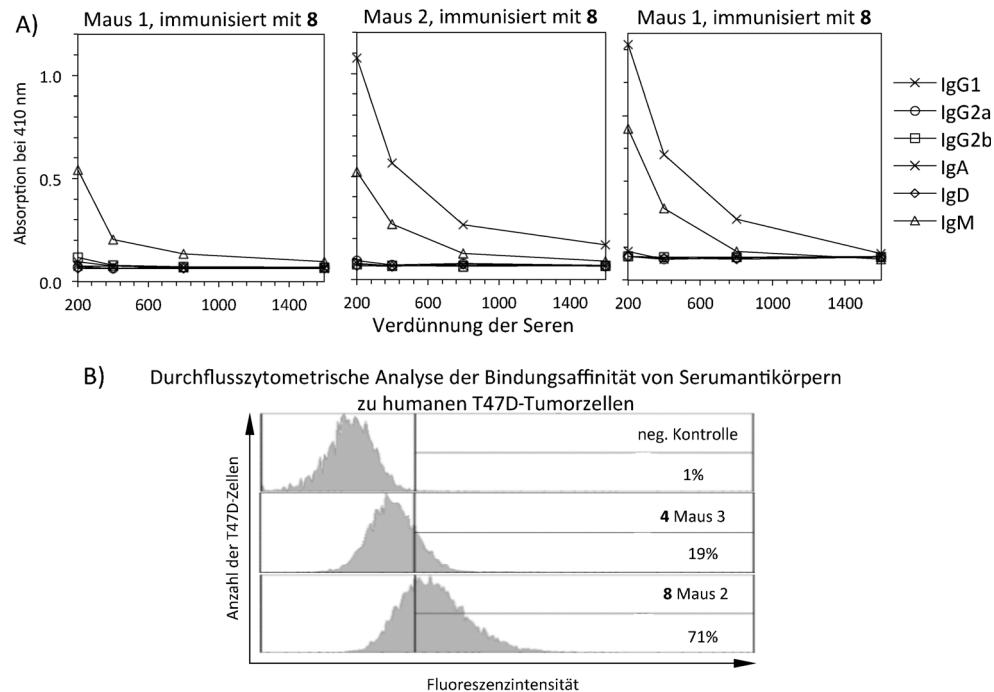


Abbildung 2. Durch Vakzine **8** induzierte Antikörperisotypen (A) und Durchflusszytometrie-Analyse der Bindungsaffinität der Antikörper an humane T47D-Brustkrebszellen (B, Negativkontrolle: Serum einer nichtimmunisierten Maus).

durch Vakzine **4** (Maus 3) induzierten Antiseren zeigten nur moderate Bindung an die T47D-Zellen. Dagegen offenbarten die durch Vakzine **8** (Maus 2) induzierten Antiseren eine hohe Bindungsaffinität zu den T47D-Tumorzellen und markierten 71 % aller T47D-Zellen (Abbildung 2B).

Die Ergebnisse zeigen, dass die vollsynthetische Vier-Komponenten-Antitumor-Vakzine aus einem MUC1-B-Zellepitop und drei bakteriellen T-Helferzell-Epitopen adaptive T-Zell-vermittelte Immunreaktionen auslöst. Es werden überwiegend protektive IgG-Antikörper induziert, die tumorassoziiertes MUC1 auf humanen Brustkrebszellen mit hoher Affinität binden. Durch verlangsamten Abbau der verzweigten Struktur sollte eine längere Bioverfügbarkeit der Vakzine gewährleistet sein. Die Synthese dieser neuen Vakzine gelang durch Kreuzvernetzung zweier zentraler ε-Lysine in den beiden Peptidkonjugaten über die Bildung eines Quadratsäurediamids. Die beiden Peptidkonjugate enthielten ein B-Zell- und ein T-Zellepitop bzw. zwei T-Zellepitope. Damit sich die Epitope in ihrer Konformation nicht beeinflussen, wurden sie durch flexible wasserlösliche Triethyleneglycolspacer getrennt. Die durch die Vier-Komponenten-Vakzine induzierten Antikörpertiter waren um eine Größenordnung höher als jene, die durch eine Vakzine mit nur einem T-Zellepitop ausgelöst wurden. Die Resultate zeigen, dass die multiple Aktivierung von T-Helferzellen vielversprechend und auch für andere Anwendungen attraktiv ist, bei denen eine erhöhte Immunantwort den therapeutischen Effekt steigert. Die gezielte Wahl der T-Zellepitope ermöglicht die Modulierung des Cytokinmilieus und kann so zur Steuerung der Immunreaktion beitragen. Zudem ermöglicht das Konzept der Vier-Komponenten-Vakzine zahlreiche Variationen. Das B-Zellepitop kann z. B. mit zwei T-Zellepitopen und einem immunstimulierendem Lipopetid wie Pam₃Cys kombiniert werden, das als internes Adjuvans wirkt. Außerdem kann der flexible Aufbau der Vakzine als Modell für die personalisierte Medizin dienen, wenn etwa T-Helferzell-Epitope benötigt werden, die zum HLA-Typ von verschiedenen Patienten passen.

Eingegangen am 3. Juli 2014

Online veröffentlicht am 15. Oktober 2014

Stichwörter: Antigen-Präsentation · Antitumor-Vakzine · Glycopeptide · Tumorzell-Erkennung · T-Zellepitope

- [1] E. A. von Behring, *Ger. Offen.*, DE 108516 18980929, **1898**.
- [2] D. Baxby, *Vaccine* **1999**, *17*, 301–307.
- [3] F.-G. Hanisch, J. Peter-Katalinic, H. Egge, U. Dabrowski, G. Uhlenbrück, *Glycoconjugate J.* **1990**, *7*, 525–543.
- [4] F. Irazoqui, G. Nores, *Curr. Cancer Drug Targets* **2003**, *3*, 433–443.
- [5] J. Arklie, J. Taylor-Papadimitriou, W. Bodmer, M. Egan, R. Millis, *Int. J. Cancer* **1981**, *28*, 23–29.
- [6] S. J. Gendler, J. Burchell, C. A. Lancaster, D. Wilson, *J. Biol. Chem.* **1990**, *265*, 15286–15293.
- [7] J. Blancou, M. P. Kiely, R. Lathe, J. P. Lecocq, P. P. Pastoret, J. P. Soulebot, P. Desmettre, *Nature* **1986**, *322*, 373–375.

- [8] A. Kaiser, N. Gaidzik, U. Westerlind, D. Kowalczyk, A. Hobel, E. Schmitt, H. Kunz, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 7551–7555; *Angew. Chem.* **2009**, *121*, 7688–7692.
- [9] N. Gaidzik, A. Kaiser, D. Kowalczyk, U. Westerlind, B. Gerlitzki, H. P. Sinn, E. Schmitt, H. Kunz, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 9977–9981; *Angew. Chem.* **2011**, *123*, 10153–10157.
- [10] A. W. Purcell, J. McCluskey, J. Rossjohn, *Nat. Rev. Drug Discovery* **2007**, *6*, 404–414.
- [11] S. Dziadek, A. Hobel, E. Schmitt, H. Kunz, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 7630–7635; *Angew. Chem.* **2005**, *117*, 7803–7808.
- [12] G. A. Cremer, N. Bureaud, V. Piller, H. Kunz, F. Piller, A. Delmas, *ChemMedChem* **2006**, *1*, 965–968.
- [13] S. Ingale, M. A. Wolfert, J. Gaekwad, T. Buskas, G. J. Boons, *Nat. Chem. Biol.* **2007**, *3*, 663–667.
- [14] B. L. Wilkinson, S. Day, L. R. Malins, V. Apostolopoulos, R. J. Payne, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 1635–1639; *Angew. Chem.* **2011**, *123*, 1673–1677.
- [15] V. Lakshminarayanan, P. Thompson, M. A. Wolfert, T. Buskas, J. M. Bradley, L. B. Pathaney, C. S. Madsen, P. Cohen, S. J. Gendler, G.-J. Boons, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2012**, *109*, 261–266.
- [16] H. Cai, Z.-Y. Sun, M.-S. Chen, Y.-F. Zhao, H. Kunz, Y.-M. Li, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53*, 1699–1703; *Angew. Chem.* **2014**, *126*, 1725–1729.
- [17] L. Nuhn, S. Hartmann, B. Palitzsch, B. Gerlitzki, E. Schmitt, R. Zentel, H. Kunz, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52*, 10652–10656; *Angew. Chem.* **2013**, *125*, 10846–10850.
- [18] M. Glaffig, B. Palitzsch, S. Hartmann, C. Schüll, L. Nuhn, B. Gerlitzki, E. Schmitt, H. Frey, H. Kunz, *Chem. Eur. J.* **2014**, *20*, 4232–4236.
- [19] M. A. Tarp, A. L. Sørensen, U. Mandel, H. Paulsen, J. Burchell, J. Taylor-Papadimitriou, H. Clausen, *Glycobiology* **2007**, *17*, 197–209.
- [20] P. Braun, G. M. Davies, M. R. Price, P. M. Williams, S. J. Tendler, H. Kunz, *Bioorg. Med. Chem.* **1998**, *6*, 1531–1545.
- [21] L. Sabhnani, M. Manocha, K. Sridevi, D. Shashikiran, R. Ranade, D. N. Rao, *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **2003**, *38*, 215–229.
- [22] A. A. Khan, J. P. Babu, G. Gupta, D. N. Rao, *Vaccine* **2008**, *26*, 316–332.
- [23] J. N. Agrewala, R. J. Wilkinson, *Eur. J. Immunol.* **1999**, *29*, 1753–1761.
- [24] S. Keil, C. Claus, W. Dippold, H. Kunz, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 366–369; *Angew. Chem.* **2001**, *113*, 379–382.
- [25] L. F. Tietze, M. Arlt, M. Beller, K.-H. Glüsenkamp, E. Jähde, M. F. Rajewsky, *Chem. Ber.* **1991**, *124*, 1215–1221.
- [26] L. F. Tietze, C. Schröter, S. Gabius, U. Brinck, A. Goerlach-Graw, H. J. Gabius, *Bioconjugate Chem.* **1991**, *2*, 148–153.
- [27] L. Bracci, C. Chiara, B. Lelli, L. Lozzi, Y. Runci, A. Pini, M. G. De Montis, A. Tagliamonte, P. Neri, *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 46590–46595.
- [28] S. Dziadek, D. Kowalczyk, H. Kunz, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 7624–7630; *Angew. Chem.* **2005**, *117*, 7798–7803.
- [29] H. Cai, Z.-H. Huang, L. Shi, Z.-Y. Sun, Y.-F. Zhao, H. Kunz, Y. M. Li, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 1719–1723; *Angew. Chem.* **2012**, *124*, 1751–1755.
- [30] K. Murphy, *Janeway's Immunobiology*, 8 Garland Science London, New York, **2012**, S. 401–402.
- [31] C. M. Snapper, W. E. Paul, *Science* **1987**, *236*, 944–947.
- [32] Die in Immunisierungsstudien verwendeten Mäuse waren 8–12 Wochen alt. Alle Mäuse wurden nach institutionell genehmigten Protokollen gezüchtet und waren in einer spezifischen pathogenfreien Kolonie in einer Versuchstieranlage der Johannes Gutenberg-Universität untergebracht. (Die Erlaubnis wurde vom Landesuntersuchungsamt Koblenz erteilt, Referenznummer: 23 177 bis 07/G 08-1-019.)