



Multivalente synthetische Glycopeptid-Lipopeptid-Antitumorstoffe: Auswirkung des Cluster-Effekts auf das Abtöten von Tumorzellen**

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

Abstract: Multivalente synthetische Vakzine wurden durch Festphasensynthese von tumorassoziierten MUC1-Glycopeptidantigenen und deren Kupplung an ein Pam₃Cys-Lipopeptid durch Klick-Reaktion gewonnen. Diese Vakzine lösen in Mäusen Immunreaktionen aus, ohne dass externe Adjuvantien angewendet werden. Die vier MUC1-Sialyl-T_N-Antigene enthaltende Vakzine zeigte einen signifikanten Cluster-Effekt. Sie induzierte in Mäusen vorwiegend IgG_{2a}-Antikörper, die an MCF-7-Brusttumorzellen binden und diese Tumorzellen durch Aktivierung des Complement-abhängigen Cytotoxizitätskomplexes (CDC) abtöten.

Die Wahl genügend tumorspezifischer Antigene ist eine Voraussetzung für die Entwicklung wirksamer Antitumorstoffe.^[1] Dabei gelten tumorassoziierte Membranglycoproteine als besonders wichtige Antigene für solche Vakzinentwicklungen.^[2] Ein Hauptproblem, das diesen Entwicklungen entgegensteht, liegt in der ungenügenden Immunogenität der endogenen Antigene. Die chemische Synthese ist heute in der Lage, komplexe Glycopeptidantigene mit spezifischen Glycosylierungsmustern herzustellen,^[3] und kann diese auch mit Immunstimulanzien verknüpfen, was für eine starke und gegen die Antigene gerichtete Immunantwort nötig ist.^[4] In der Regel werden Antigene wie Glycopeptide kovalent mit Trägerproteinen verknüpft, um die Immunreaktionen zu verstärken.^[5] Alternativ kann das bakterielle Lipopeptid Pam₃-Cys-Ser-Lys₄ (Pam₃CSK₄), ein Ligand des Toll-like-Rezeptors 2 (TLR2),^[6] mit den Glycopeptiden verknüpft werden, um die Immunreaktion zu erhöhen.^[7] Kürzlich wurden ein Glycopeptidantigen, ein T-Zellepitop und das Lipopeptid Pam₃CSK₄ kovalent zu einer vollsynthetischen Drei-Komponenten-Vakzine verbunden.^[8] In früheren Stu-

dien haben wir wirksame Antitumorstoffe durch Konjugation von MUC1-Glycopeptiden mit den Trägerproteinen Rinderserumalbumin (BSA)^[9] und insbesondere mit Tetanus-Toxoid gewonnen.^[10] Um starke Immunreaktionen gegen Antigene des Trägerproteins zu vermeiden, wurden die MUC1-Glycopeptide auch mit T-Zellepitop-Peptiden^[11] sowie mit dem Lipopeptid Pam₃CSK₄ zu vollsynthetischen Zwei- und Drei-Komponenten-Vakzinen kombiniert.^[12] Inzwischen wurden auch multivalente MUC1-Glycopeptid-Vakzine durch selbstorganisierende Strukturen oder durch Präsentation auf Polymeren hergestellt.^[13]

Um Glycopeptidantigene und Immunadjuvantien in einer unimolekularen Struktur zu kombinieren, haben wir nun multivalente Antitumor-Glycopeptidvakzine synthetisiert, in denen der TLR2-Lipopeptidligand Pam₃CSK₄ mit bis zu vier MUC1-Tandem-Repeat-Glycopeptideantigenen kombiniert ist, die Tn oder Sialyl-Tn (STn) als tumorassoziierte Kohlenhydrateantigene (TACAs) tragen. Nach der „Multiple Antigen Peptide“ (MAP)-Strategie^[14] gelang deren Synthese durch Kupplung der MUC1-Glycopeptide an ein verzweigtes Oligolysin durch Cu^I-unterstützte Klick-Reaktionen.^[15] Der mehrfach verzweigte Lysinkern wurde seinerseits am intakten TLR2-Ligand-Lipopeptid Pam₃CSK₄ verankert (Abbildung 1).^[16]

Das Lipopeptid Pam₃CysSer(Lys)₄-OH wurde wie beschrieben synthetisiert.^[7c,16] Um die Pam₃CSK₄-Struktur^[17] während der Konjugation mit den Glycopeptiden intakt zu erhalten, wurde ein zusätzliches Lysin am C-Terminus des Lipopeptids eingeführt, das über die ε-Aminogruppe mit dem verzweigten Oligolysin gekuppelt wurde. An die terminalen Aminogruppen des Lysinkerns wurden alkylterminierte Oligoethylenglycol-Spacer gebunden. Parallel dazu wurden die Glycopeptidantigene **1**, mit zwei Tn-Antigenen an T9 und S15, und **2**, mit STn an S15 der MUC1-Tandem-Repeat-Sequenz HGVTSAPDTRPAPGSTAPPA, an der Festphase wie beschrieben synthetisiert^[7c,9a,10a] und mit azidofunktionalisierter Spacer-Carbonsäure^[16,18] acyliert. Die Glycopeptide wurden mit Trifluoressigsäure/Triisopropylsilan/Wasser vom

[*] Dr. H. Cai, Z.-Y. Sun, M.-S. Chen, 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 (Volksrepublik China)
E-Mail: liym@mail.tsinghua.edu.cn
Prof. Dr. H. Kunz
Institut für Organische Chemie
Johannes Gutenberg-Universität Mainz
Duesbergweg 10-14, 55128 Mainz (Deutschland)
E-Mail: hokunz@uni-mainz.de

[**] Diese Arbeit wurde unterstützt durch das Major State Basic Research Development Program of China (2013CB910700 und 2012CB821601), die National Natural Science Foundation of China (21332006, 91313301 und 21028004) und das Sino-German Center for Research (GZ561).

Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.201308875> zu finden.

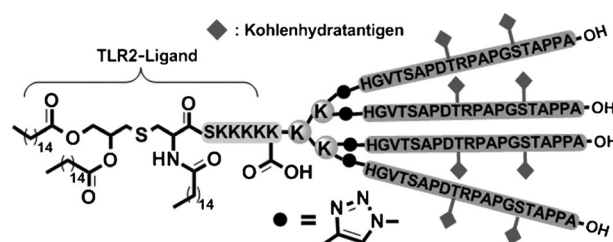
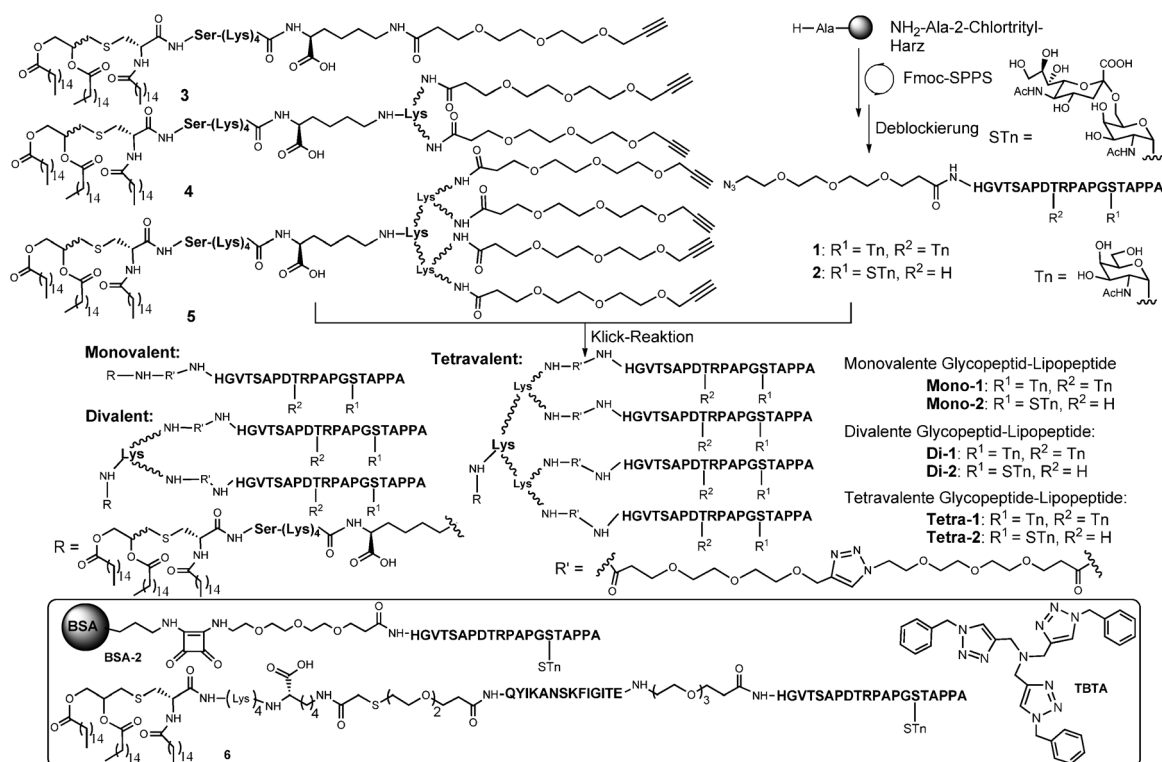


Abbildung 1. Struktur einer Vakzine, in der das TLR2-Ligand-Lipopeptid mit tetravalenten MUC1-Glycopeptiden konjugiert ist.



Schema 1. Struktur der vollsynthetischen mono-, di- und tetravalenten Glycopeptid-Lipopeptid-Vakzine. BSA = Rinderserumalbumin, Fmoc = Fluorenylmethoxycarbonyl, SPPS = Festphasen-Peptidsynthese.

Harz abgelöst. Schließlich wurden die Kohlenhydrat-Schutzgruppen entfernt (Schema 1). Es ist nötig, den Sialinsäurebenzylester vom Glycopeptid **2** im Zuge der O-Desacetylierung mit wässrigem NaOH bei pH 11.4 zu hydrolysieren.^[10a] Nach Reinigung durch HPLC wurden diese Glycopeptide mit den mono-, di- und tetraalkinfunktionalisierten Lipopeptiden (**3**, **4** bzw. **5**) durch Klick-Chemie^[15] zu den mono-, di- und tetravalenten Glycopeptid-Lipopeptid-Vakzinen Mono-**1**, Mono-**2**, Di-**1**, Di-**2**, Tetra-**1**^[16] und Tetra-**2** konjugiert. Die immunologische Untersuchung der das Glycopeptid **2** enthaltenden Vakzine (Mono-**2**, Di-**2** und Tetra-**2**) schien uns besonders interessant, weil das entsprechende BSA-Konjugat BSA-**2** in früheren Studien^[9a] Antikörper mit nur geringer Affinität zu Tumorzellen induziert hatte. Zusätzlich wurde die Drei-Komponenten-Vakzine **6**, die Pam₃CSK₄, das T-Zellepitop-Peptid P2 QYKANSKFIGITE aus Tetanus-Toxoid und das MUC1-STn-Glycopeptid **2** enthält, durch Thioetherligation^[12b] hergestellt, um deren immunologische Effekte mit denen der Vakzine Mono-**2**, Di-**2** und Tetra-**2** vergleichen zu können.

Zur Auswertung der von den synthetischen Vakzinen induzierten Immunantworten wurden je vier Balb/c-Mäuse mit jeweils 10 µg der Vakzine Mono-**2**, Di-**2**, Tetra-**2** und **6** in Phosphatpufferlösung (PBS) durch intraperitoneale Injektion ohne Einsatz eines externen Adjuvans immunisiert. Nachimpfungen erfolgten nach 2, 4, 6 und 8 Wochen. Eine Woche nach der fünften Impfung wurde Blut aus der Schwanzvene der Mäuse entnommen. Die Seren jeder Gruppe von Mäusen wurden gemischt und durch Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) auf die induzierten Antikörper hin analysiert.

Die durch Vakzine Di-**2** induzierten Antiseren zeigten die höchsten Titer gegen das BSA-Konjugat von Glycopeptid **2** (Schema 1), während niedrigere Titer für die Antiseren gegen Tetra-**2** und die Drei-Komponenten-Vakzine **6** (siehe Hintergrundinformationen) gemessen wurden. Allerdings waren alle Titer niedriger als jene, die durch die entsprechende BSA-konjugierte Vakzine ausgelöst worden waren.^[9a] Um auszuschließen, dass die gegen die tumorassoziierten Antigene gerichtete Immunantwort durch eine gegen die Triazol-Linkerstrukturen gerichtete überschrieben wird,^[19] wurde die Immunreaktion gegen die Linker durch ELISA auf Platten ermittelt, die mit Tris[(1-benzyl-1*H*-1,2,3-triazol-4-yl)methyl]amin (TBTA; Schema 1) beschichtet waren, das drei Triazolreste enthält und genügend unlöslich in Wasser ist.^[20] Es konnte keinerlei Bindung der Antiseren an die Triazolreste beobachtet werden (siehe Hintergrundinformationen).

Die Bindung der Antiseren an Antigene auf Zellen der menschlichen Brusttumorzell-Linie MCF-7 wurde durch Durchflusszytometrie ermittelt. Die MCF-7-Zellen wurden mit den verdünnten Antiseren (1:50) inkubiert. Die an die Zellen gebundenen Maus-Antikörper wurden mit einem mit Fluoresceinisothiocyanat (FITC) konjugierten Kaninchen-anti-Maus-IgG-Antikörper nachgewiesen. Das Experiment erbrachte überraschend, dass die durch die Vakzine Tetra-**2** induzierten Antiseren die stärkste Bindung an die MCF-7-Zellen eingingen (Abbildung 2), während die Antiseren, die durch Mono-**2** ebenso wie durch die Drei-Komponenten-Vakzine **6** (siehe Hintergrundinformationen) und durch die BSA-konjugierte Vakzine^[9a] induziert wurden, nur schwach an diese Zellen banden.

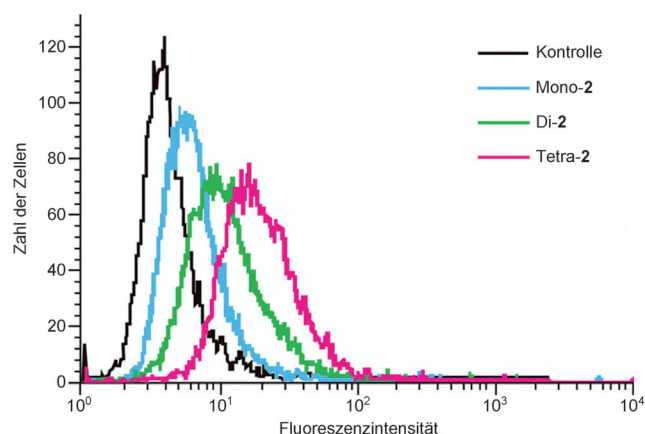


Abbildung 2. FACS-Analyse der Bindung von Antiseren, die durch die Vakzine Mono-/Di-/Tetra-2 induziert wurden, an MCF-7-Tumorzellen.

Die Antikörper, die an die MCF-7-Tumorzellen gebunden sind, sollten das Abtöten der markierten Tumorzellen durch Aktivierung des „Complement Dependent Cytotoxicity“- (CDC)-Komplexes einleiten. Es gibt drei Wege der CDC-Aktivierung: den klassischen, den Lectin-artigen und den alternativen Weg.^[21] Da der Lectin-artige Mechanismus Kohlenhydrat erkennende Rezeptoren (Mannose-bindendes Lectin oder Ficoline^[22]) erfordert, dürfte die Initiierung im Falle der durch MUC1-Glycopeptidvakzine induzierten Antiseren über den klassischen oder den alternativen Mechanismus ablaufen. Auf beiden Wegen wird schließlich der Membrane Attacking Complex (MAC) gebildet, der Poren in die Membran schlägt, was zur Lyse der Zellen führt.^[23] Zur Klärung des Mechanismus wurden MCF-7-Tumorzellen mit den Antiseren inkubiert und auf die Titerplatten gebracht. Nach Waschen mit PBS-Lösung wird Kaninchenserum als Complement-Quelle zugegeben. Die Überlebensrate der Zellen wird durch den 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT)-Assay ermittelt. Parallel dazu wird die Mortalitätsrate durch den Lactatdehydrogenase (LDH)-Test gemessen. Wie in Abbildung 3 gezeigt, bewirken die durch Tetra-2 ausgelösten Antiseren zu mehr als 90 % Abtötung der Zellen; sie initiieren eine viel stärkere Aktivierung des CDC als die durch die Drei-Komponenten-Vakzine 6 induzierten Antiseren. Auch im Vergleich zu den analogen Vakzinen Mono-2 und Di-2 induzierte Tetra-2 Antiseren, die stärkere Cytotoxizität gegen MCF-7-Tumorzellen auslösen, was zudem durch die Resultate des LDH-Assays (Abbildung 3b) bestätigt wird.

Die CDC-Aktivierungswege wurden durch Hemmtests mit Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) und Ethylenglycolbis(2-aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure (EGTA) differenziert. EDTA komplexiert Mg^{2+} - und Ca^{2+} -Kationen und inhibiert folglich sowohl den klassischen als auch alternativen Weg,^[24] während EGTA selektiv Ca^{2+} komplexiert und nur den klassischen Pfad blockiert. Wie Abbildung 3b zeigt, verursacht das Versetzen des Kulturmediums mit 10 mM EDTA eine fast völlige Inhibierung der CDC. Dagegen hemmen 10 mM EGTA die CDC nicht. Dies lässt darauf schließen, dass der alternative Weg der CDC-Aktivierung dominiert.

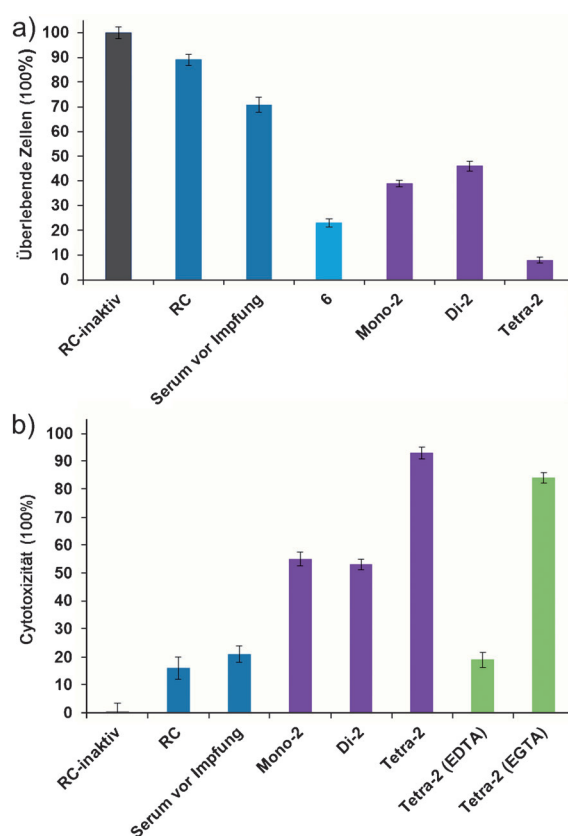


Abbildung 3. Zellüberlebensraten- und Cytotoxizitätsassays. a) MTT-Assay der Zellüberlebensrate nach Complement-Einwirkung. b) LDH-Assay der von Complement bewirkten Cytotoxizität. RC: Rabbit-Complement. RC-inaktiv: Rabbit-Complement, inaktiviert durch 30 min Behandlung bei 65 °C. EDTA und EGTA fungierten als Inhibitoren der Complement-abhängigen Cytotoxizität. Die Daten sind der Mittelwert von fünf Experimenten. Students t-Test, $P < 0.01$.

Die durch Tetra-2 induzierten Antiseren erkennen die Tumorzellen am besten (Abbildung 2) und initiieren das stärkste Abtöten dieser Zellen durch CDC (Abbildung 3). Dies war überraschend, weil die Titer der durch Tetra-2 induzierten Antiseren relativ moderat waren. Um diesen unerwarteten Befund zu verstehen, wurden die durch die Vakzine induzierten Isotypen der Antikörper durch ELISA-Tests analysiert. Wie Abbildung 4 zeigt, überwogen in den durch Tetra-2 induzierten Antiseren die IgG2a-Antikörper. Das Verhältnis IgG2a/IgG1 lag über 2.0 (Verdünnung 1:800). In den von Mono-2 und Di-2 induzierten Antiseren waren die Anteile von IgG1 und IgG2a fast gleich. Die tetravalente Glycopeptid-Lipopeptid-Vakzine induziert also überwiegend IgG2a-Antikörper, die offenbar die ausgeprägte zellabtötende Wirkung verursachen. Dies kann auf den verstärkten Cluster-Effekt zurückzuführen sein. Zur Überprüfung dieser Annahme wurden auch die Antikörperisotypen der durch Mono-/Di-/Tetra-1 induzierten Antigene ermittelt. Wiederum zeigte sich, dass IgG2a-Antikörper in jenen Antiseren überwogen, die durch die Cluster-artigen Vakzine Di-1 und Tetra-1 induziert wurden (Hintergrundinformationen und Abbildung 4e).

Der Wechsel des Antikörperisotypenspektrums und sein Einfluss auf die Cytotoxizität gegenüber Tumorzellen ist hier

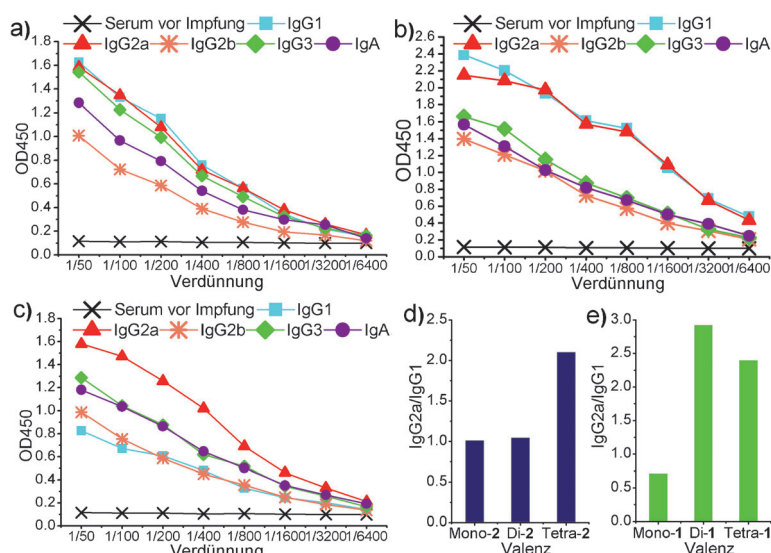


Abbildung 4. Antikörperisotypanalyse. a)–c) Antikörperisotypanalyse von den durch Mono-2 (a), Di-2 (b) und Tetra-2 (c) induzierten Antiseren; d) IgG2a/IgG1-Verhältnis für Mono-, Di- und Tetra-2 aus OD-Werten bei einer Verdünnung von 1:800; e) IgG2a/IgG1-Verhältnis von Mono-, Di- und Tetra-1 aus OD-Werten bei einer Verdünnung von 1:800. Weitere Details zu den durch Mono-, Di- und Tetra-1 induzierten Antikörperisotypen, siehe Hintergrundinformationen.

zum ersten Mal für synthetische Vakzine gefunden worden, die unterschiedliche Zahlen von identischen STn-Glycopeptid-Antigenen, gebunden an ein TLR2-Ligand-Lipopeptid Pam₃CSK₄, tragen. Mit einer Ausnahme^[25] sind dies übrigens die ersten multivalenten MUC1-Glycopeptide mit dem STn-Antigen. Ihre immunologische Auswertung gelang ohne Anwendung externer Adjuvantien während der Impfungen.

Den ELISA-Tests zufolge erkennen die induzierten Antikörper nicht die in den synthetischen Vakzinen vorhandenen Triazolstrukturen, denn sie binden nicht an TBTA, das drei Triazole enthält, d.h., die Immunogenität der Glycopeptide wurde nicht von jener der Linker-Strukturen überschrieben. Die Vakzine Mono-2, Di-2 und Tetra-2 offenbarten nach der ELISA-Analyse allerdings keinen klaren Cluster-Effekt. Die divalente Vakzine Di-2 löste die stärkste Immunantwort aus, während die tetravalente Vakzine Tetra-2 den niedrigsten Titer gegen das Antigen bewirkte, der sogar niedriger war, als der von der Drei-Komponenten-Vakzine 6 ausgelöst. Allerdings induzierte Tetra-2 das Antiserum, das am stärksten an die MCF-7-Tumorzellen band (Abbildung 2). Die Affinität zu den MCF-7-Tumorzellen nimmt mit steigender Valenz der Glycopeptidvakzine zu. Dieses Resultat steht im Gegensatz zu früheren Beobachtungen bei durch BSA-Konjugat-Vakzine induzierten Antikörpern,^[9a] die das gleiche MUC1-Glycopeptidantigen trugen. Darüber hinaus verursachten die an die Tumorzellen gebundenen Antikörper sehr starke Zellcytotoxizität, indem sie das Abtöten der erkannten Tumorzellen durch Aktivierung der CDC, hauptsächlich über den alternativen Mechanismus, initiierten (Abbildung 3). Die Analyse der Antikörperisotypen ergab, dass von Mono-2 über Di-2 zu Tetra-2 der vorherrschende Antikörperisotyp von IgG1 zu IgG2a wechselte, gezeigt im IgG2a/IgG1-Verhältnis (Abbildung 4). Obwohl die tetrava-

lente Vakzine Tetra-2 Immunantworten mit relativ niedrigen Titern hervorrief, bewirkte ihr Cluster-Effekt einen deutlichen Anstieg des Isotypverhältnisses IgG2a/IgG1. Ein ähnlicher Trend wurde für Mono-1, Di-1 und Tetra-1 gefunden. Die Bildung von IgG1-Antikörpern ist normalerweise verbunden mit einer Th2-Antwort, während hohe IgG2a-Titer vermutlich eine Th1-Antwort widerspiegeln,^[26] weshalb das IgG2a/IgG1-Verhältnis die relativen Beiträge der Th1/Th2-Zweige der Immunantwort reflektieren dürfte.^[27] Der Cluster-Effekt dieser Glycopeptidvakzine wirkt sich demnach in einem erhöhten Beitrag der über den Th1-Weg gesteuerten Immunreaktion und so durch einen hohen Spiegel an IgG2a-Antikörpern aus, die die Bindung an die Tumorzellen und den erhöhten cytotoxischen Effekt bewirken.

Insgesamt induziert die tetravalente MUC1-Glycopeptid-Lipopeptid-Vakzine Tetra-2 genügend hohe Immunreaktionen und Antiseren, die an die Tumorzellen binden und darüber hinaus eine effiziente, von CDC bewirkte Abtötung der Tumorzellen initiieren. Die Bindung ebenso wie die Cytotoxizität wurden durch die zunehmende Zahl an STn tragendem Glycopeptid erhöht. Die durch Tetra-2 induzierten Antiseren zeigten stär-

kere Bindung und Cytotoxizität als die durch die entsprechenden BSA-Konjugate oder die Drei-Komponenten-Vakzine induzierten. Außerdem wurde geklärt, dass die CDC über den alternativen Mechanismus aktiviert wurde. Diese Befunde sollten besonders wichtig für therapeutische Zielsetzungen sein.

Eingegangen am 11. Oktober 2013,
veränderte Fassung am 27. November 2013
Online veröffentlicht am 21. Januar 2014

Stichwörter: Antigene · Multivalente Glycopeptide · Tumortheraeutika · Vakzine · Zelltoxizität

- [1] O. J. Finn, *Nat. Rev. Immunol.* **2003**, 3, 630–641.
- [2] P. M. Rudd, T. Elliott, P. Cresswell, I. A. Wilson, R. A. Dwek, *Science* **2001**, 291, 2370–2376.
- [3] a) C. Unverzagt, Y. Kajihara, *Chem. Soc. Rev.* **2013**, 42, 4408–4420; b) N. Gaidzik, U. Westerlind, H. Kunz, *Chem. Soc. Rev.* **2013**, 42, 4421–4442.
- [4] a) B. Pulendran, R. Ahmed, *Nat. Immunol.* **2011**, 12, 509–517; b) R. L. Coffman, A. Sher, R. A. Seder, *Immunity* **2010**, 33, 492–503.
- [5] G. Ragupathi, F. Koide, N. Sathyan, E. Kagan, M. Spassova, W. Bornmann, P. Gregor, C. A. Reis, H. Clausen, S. J. Danishefsky, P. O. Livingston, *Cancer Immunol. Immunother.* **2003**, 52, 608–616.
- [6] E. Hennessy, A. Parker, L. O'Neill, *Nat. Rev. Drug Discovery* **2010**, 9, 293–307.
- [7] a) V. Kudryashov, P. W. Glunz, L. J. Williams, S. Hintermann, S. J. Danishefsky, K. O. Lloyd, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2001**, 98, 3264–3269; b) B. L. Wilkinson, L. R. Malins, C. K. Y. Chun, R. J. Payne, *Chem. Commun.* **2010**, 46, 6249–6251; c) 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*, 3772–3776; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 3688–3692.
- [8] a) S. Ingale, M. A. Wolfert, J. Gaekwad, T. Buskas, G. J. Boons, *Nat. Chem. Biol.* **2007**, *3*, 663–667; b) V. Lakshminarayanan, P. Thompson, M. A. Wolfert, T. Buskas, J. Bradley, L. B. Pathangey, C. S. Madsen, P. A. Cohen, S. J. Gendler, G. J. Boons, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2012**, *109*, 261–266; c) B. Wilkinson, S. Day, L. Malins, V. Apostolopoulos, R. J. Payne, *Angew. Chem.* **2011**, *123*, 1673–1677; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 1635–1639.
- [9] a) H. Cai, Z. H. Huang, L. Shi, Z. Y. Sun, Y. F. Zhao, H. Kunz, Y. M. Li, *Angew. Chem.* **2012**, *124*, 1751–1755; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 1719–1723; b) S. Dziadek, D. Kowalczyk, H. Kunz, *Angew. Chem.* **2005**, *117*, 7798–7803; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 7624–7630.
- [10] a) A. Kaiser, N. Gaidzik, U. Westerlind, D. Kowalczyk, A. Hobel, E. Schmitt, H. Kunz, *Angew. Chem.* **2009**, *121*, 7688–7692; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 7551–7555; b) N. Gaidzik, A. Kaiser, D. Kowalczyk, U. Westerlind, B. Gerlitzki, H. P. Sinn, E. Schmitt, H. Kunz, *Angew. Chem.* **2011**, *123*, 10153–10157; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 9977–9981.
- [11] a) U. Westerlind, A. Hobel, N. Gaidzik, E. Schmitt, H. Kunz, *Angew. Chem.* **2008**, *120*, 7662–7667; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 7551–7556; b) H. Cai, M. S. Chen, Z. Y. Sun, Y. F. Zhao, H. Kunz, Y. M. Li, *Angew. Chem.* **2013**, *125*, 6222–6226; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52*, 6106–6110.
- [12] H. Cai, Z. Y. Sun, Z. H. Huang, L. Shi, Y. F. Zhao, H. Kunz, Y. M. Li, *Chem. Eur. J.* **2013**, *19*, 1962–1970.
- [13] a) Z. H. Huang, L. Shi, J. W. Ma, Z. Y. Sun, H. Cai, Y. X. Chen, Y. F. Zhao, Y. M. Li, *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 8730–8733; b) L. Nuhn, S. Hartmann, B. Palitzsch, B. Gerlitzki, E. Schmitt, R. Zentel, H. Kunz, *Angew. Chem.* **2013**, *125*, 10846–10850; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52*, 10652–10656.
- [14] R. Roy, T. C. Shiao, *New J. Chem.* **2012**, *36*, 324–339.
- [15] V. V. Rostovtsev, L. G. Green, V. V. Fokin, K. B. Sharpless, *Angew. Chem.* **2002**, *114*, 2708–2711; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 2596–2599.
- [16] H. Cai, Z. H. Huang, L. Shi, Y. F. Zhao, H. Kunz, Y. M. Li, *Chem. Eur. J.* **2011**, *17*, 6396–6406.
- [17] R. Spohn, U. Buwitt-Beckmann, R. Brock, G. Jung, A. J. Ulmer, K. H. Wiesmüller, *Vaccine* **2004**, *22*, 2494–2499.
- [18] S. Keil, C. Claus, W. Dippold, H. Kunz, *Angew. Chem.* **2001**, *113*, 379–382; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 366–369.
- [19] T. Buskas, Y. H. Li, G. J. Boons, *Chem. Eur. J.* **2004**, *10*, 3517–3524.
- [20] T. R. Chan, R. Hilgraf, K. B. Sharpless, V. V. Fokin, *Org. Lett.* **2004**, *6*, 2853–2855; siehe dort Lit. [14].
- [21] T. Fujita, *Nat. Rev. Immunol.* **2002**, *2*, 346–353.
- [22] T. Fujita, M. Matsushita, Y. Endo, *Immunol. Rev.* **2004**, *198*, 185–202.
- [23] a) A. R. Duncan, G. Winter, *Nature* **1988**, *332*, 738–740; b) M. K. Pangburn, H. J. Müller-Eberhard, *Springer Semin. Immunopathol.* **1984**, *7*, 163–192.
- [24] M. Dechant, W. Weisner, S. Berger, M. Peipp, T. Beyer, T. Schneider-Merck, J. Lammerts van Bueren, W. Bleeker, P. W. Parren, J. G. van de Winkel, T. Valerius, *Cancer Res.* **2008**, *68*, 4998–5003.
- [25] S. Keil, A. Kaiser, F. Syed, H. Kunz, *Synthesis* **2009**, 1355–1369.
- [26] M. Skwarczynski, M. Zaman, C. N. Urbani, I. C. Lin, Z. Jia, M. R. Batzloff, M. F. Good, M. J. Monteiro, I. Toth, *Angew. Chem.* **2010**, *122*, 5878–5881; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 5742–5745.
- [27] S. S. Seregin, D. M. Appledorn, A. J. McBride, N. J. Schuldt, Y. A. Aldhamen, T. Voss, J. Wei, M. Bujold, W. Nance, S. Godbehre, A. Amalfitano, *Mol. Ther.* **2009**, *17*, 685–696.