

Serumalbumin-Konjugat erforderte mehrfache Applikation unter Zusatz von *Freunds* Adjuvans, um vergleichbare Antikörperbildung zu erzielen. Mit dem Pam₃Cys-Ser-Antigen-Konjugat 2 konnten wir bereits monoklonale Antikörper herstellen, die in Zellkultur-Überständen wie auch als Ascites nachweisbar waren.

Pam₃Cys-Konjugate sind ebenfalls in Zellkulturen stark immunogen^[9] (Abb. 1). Somit können durch in-vitro-Immunisierung auf rasche und elegante Weise konventionelle und monoklonale Antikörper auch gegen schwach immunogene Verbindungen erhalten werden. Die unterschiedlichen Antikörpertiter in Abbildung 1 spiegeln den bekannten Befund wider, daß bei einer primären in-vitro-Immunisierung regelmäßig nur eine geringe Immunantwort erzielt werden kann.

Die Vorteile unseres Konzepts in Verbindung mit Zellkulturen sind: Einfache Herstellung eines chemisch eindeutig definierten Antigen-Adjuvans-Konjugats in beliebiger Menge; im Gegensatz zu anderen Konjugaten *einmalige* Applikation ohne mehrfaches „Boostern“; hohe Effizienz in vivo und in vitro. Die erhebliche Einsparung von Versuchstieren, häufig sogar ein völliger Verzicht auf in-vivo-Immunisierungen, und ein drastischer Zeitgewinn insbesondere bei gentechnologischem Arbeiten liegen auf der Hand. Experimente mit weiteren Antigenen werden zur Zeit in Maus- und Humanzellkulturen durchgeführt, um die allgemeine Anwendbarkeit unseres Systems zu zeigen.

Synthesebeispiel

Nach üblichem schrittweisen Aufbau (Merrifield-Synthese unter N^α-Fmoc/(tBu)-Schutz mit Dicyclohexylcarbodiimid/Hydroxybenzotriazol (DCC/HOBt) und symmetrischen Anhydriden) des EGF-R-Segments 516–529 [10] wurde als letzte Aminosäure Fmoc-Ser(tBu)-OH angebaut. Nach Abspaltung der Fmoc-Gruppe mit Piperidin/Dimethylformamid (DMF) (1:1, 15 min) wurde das harzgebundene, an den Seitenketten tBu-geschützte Pentadecapeptid (1 g, Beladung 0.5 mmol/g) mit Pam₃Cys-OH [4a] (2 mmol, in DMF/CH₂Cl₂ (1:1)) und DCC/HOBt (2 mmol, bei 0°C 20 min voraktiviert) verknüpft (16 h, dann eine Nachkupplung, 4 h). Das geschützte Lipoheptadecapeptid 1 wurde mit Trifluoressigsäure (5 mL) unter Zusatz von Thioanisol (0.25 mL) innerhalb von 2 h vom Träger abgespalten und von den Schutzgruppen befreit. Ausbeute 960 mg (76%) 2 × CF₃COOH (korrekte Aminosäureanalyse, keine Racemisierung).

Eingegangen am 12. Juni,
ergänzt am 29. Juli 1985 [Z 1339]

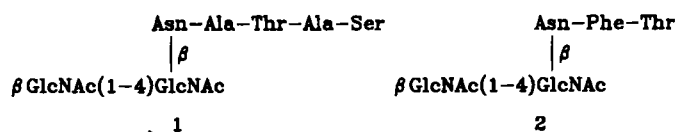
- [1] G. Jung: „Synthesis and Perspectives of New Adjuvant and Carrier Systems for Potential Application for Synthetic Vaccines“, in *Proc. Int. Symp. Synth. Antigens*, Siena, 29.–30. Okt. 1984; *Ann. Sclavo* 1984, Nr. 2, S. 191–208.
- [2] a) M. Sela, *Biopolymers* 22 (1983) 419; b) R. Arnon, M. Sela, M. Parant, L. Chedid, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 11 (1980) 6769; c) L. Chedid in *Proc. Forum Peptides*, Cap d'Adge, Sept. 1984, im Druck.
- [3] E. Lederer, *J. Med. Chem.* 23 (1980) 819.
- [4] a) K.-H. Wiesmüller, W. G. Bessler, G. Jung, *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* 364 (1983) 593, zit. Lit.; b) G. Jung, C. Carrera, H. Brückner, W. G. Bessler, *Liebigs Ann. Chem.* 1983, 1608; c) W. G. Bessler, R. B. Johnson, K.-H. Wiesmüller, G. Jung, *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* 363 (1982) 767; d) A. Lex, H.-M. Vordermeier, R. Sprenger, B. Suhr, W. G. Bessler, *Immunobiology* 168 (1984) 71.
- [5] V. Braun, *Biochim. Biophys. Acta* 415 (1975) 335, zit. Lit.
- [6] a) F. Melchers, V. Braun, G. Galanos, *J. Exp. Med.* 142 (1975) 473; b) W. G. Bessler, V. Braun, *Z. Immunitätsforsch. Exp. Klin. Immunol.* 150 (1975) 193; c) K. Resch, W. G. Bessler, *Eur. J. Biochem.* 115 (1981) 247.
- [7] C. D. Chang, M. Waki, M. Ahmad, J. Meienhofer, E. D. Lomdel, J. D. Haug, *Int. J. Pept. Protein Res.* 15 (1980) 59.
- [8] A. Ullrich, L. Courreau, J. S. Haylick, T. J. Hull, A. Grey, A. W. Tam, J. Lee, Y. Yarden, T. A. Libermann, J. Schlessinger, J. Downward, E. L. V. Mayse, N. Whittle, M. D. Waterfield, P. H. Seeburg, *Nature (London)* 309 (1984) 418.
- [9] W. G. Bessler, B. Suhr, H.-J. Bühring, C. P. Müller, K.-H. Wiesmüller, G. Becker, G. Jung, *Immunobiology*, im Druck.
- [10] H. J. Bühring, C. P. Müller, G. Becker, G. Jung, noch unveröffentlicht.

Aufbau disaccharidischer N-Glycopeptide – Synthese der Verknüpfungsregion der Transmembran-Neuraminidase eines Influenza-Virus**

Von Horst Kunz* und Herbert Waldmann

Professor Günter Viktor Schulz
zum 80. Geburtstag gewidmet

Glycoproteine spielen eine wichtige Rolle in biologischen Erkennungsvorgängen an Zellmembranen, wie sie bei Immunreaktionen und bei Infektionsprozessen ablaufen^[1]. Für die genauere Erforschung und die gezielte Beeinflussung dieser Vorgänge sind definierte Modellverbindungen wichtig, welche charakteristischen Strukturelementen von Glycoproteinen entsprechen, die an diesen Erkennungsphänomenen beteiligt sind. Wir beschreiben nun die Synthese zweier solcher Partialstrukturen aus N-Glycoproteinen, eines Glycopentapeptids aus der Verknüpfungsregion 1 der Transmembran-Neuraminidase des Influenza-Virus-Stamm A/Tokyo/3/67^[2] und eines Glycotripeptids aus dem Verknüpfungsbereich 2 des Faktors B des menschlichen Komplementsystems^[3]. Beide Strukturen enthalten das für N-Glycoproteine charakteristische disaccharidische Kernelement der Di-N-acetyl-chitobiose, welches N-glycosidisch an die Amidfunktion des Asparagins der Peptidkette gebunden ist.



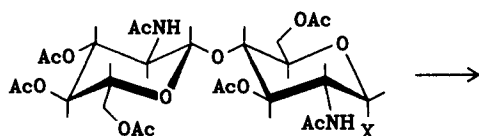
Für den Aufbau der Zielstrukturen 1 und 2 wird zunächst das Octaacetat der Chitobiose 3 durch acetylierende saure Hydrolyse aus Chitin gewonnen und durch Umsetzung mit HCl in Acetylchlorid in das peracetylierte Chitobiosylchlorid 4 überführt^[4]. Die bisher^[4] mit Hilfe des heiklen Silberazids ausgeführte Umwandlung von 4 in das β-Azid 5 gelingt glatt als phasentransferkatalysierte S_N2-Reaktion mit Natriumazid in Anwesenheit von Tri-n-capryl-methyl-ammoniumchlorid in Chloroform/Wasser. Die Hydrogenolyse des Azids ergibt das Chitobiosylamin 6, das durch Ethyl-2-ethoxy-1,2-dihydrochinolin-1-carboxylat (EEDQ)^[5] mit N-tert-Butyloxycarbonyl-asparaginsäureallylester 7^[6] in hoher Ausbeute zum vollgeschützten Chitobiosyl-asparagin-Element 8 verknüpft wird.

Für den Erfolg der weiteren Synthesen entscheidend ist es, daß die komplexe N- und O-glycosidische Bindungen enthaltende Verbindung 8 praktisch spezifisch und quantitativ durch Palladium(0)-katalysierte Allylesterspaltung^[5] C-terminal deblockiert werden kann. Dadurch werden C-terminale Kettenverlängerungen mit Dipeptidallylestern^[6] möglich.

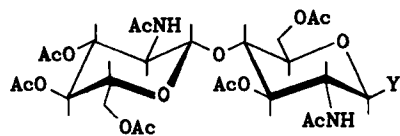
Mit EEDQ als Kondensationsmittel in Dichlormethan entstehen die geschützten Chitobiosyl-asparagin-tripeptide 11, wobei die Ausbeute an 11a unter der während der Reaktion ablaufenden Cyclisierung des wenig gehinderten Dipeptidesters zum Diketopiperazin leidet. Auch das disaccharidische Glycopeptid 11a läßt sich durch Pd⁰-katalysierte Allylübertragung auf Morpholin in Dioxan bei

[*] Prof. Dr. H. Kunz, Dr. H. Waldmann
Institut für Organische Chemie der Universität
Johann-Joachim-Becher-Weg 18–20, D-6500 Mainz

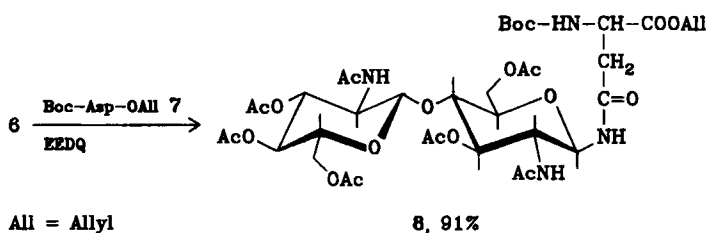
[**] Diese Arbeit wurde von der Deutschen Forschungsgemeinschaft und vom Fonds der Chemischen Industrie unterstützt.



3: X = OAc 4: X = Cl, 88%

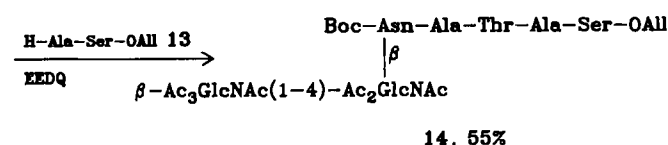
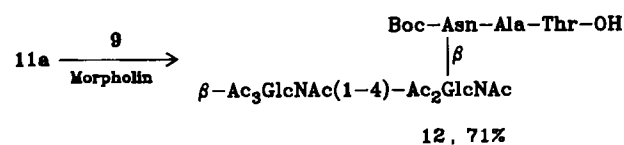
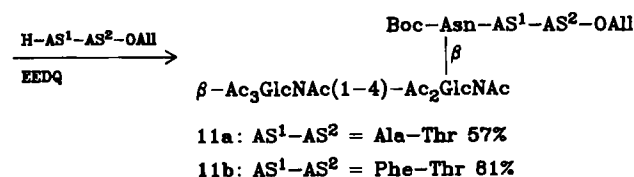
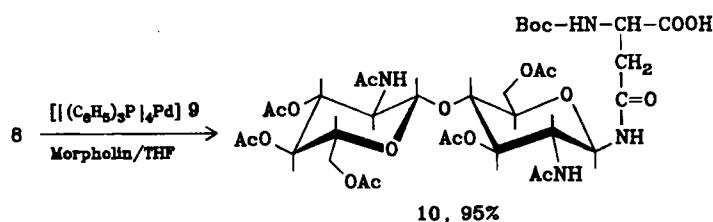


5: Y = N₃, 75% 6: Y = NH₂, 60%



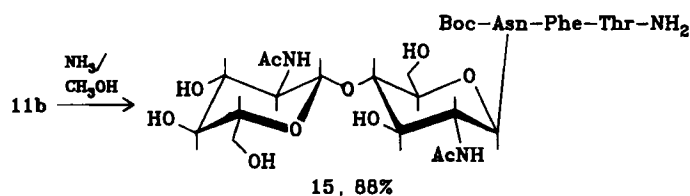
All = Allyl

Raumtemperatur selektiv an der Carboxygruppe deblockieren. Chromatographisch erhält man die analytisch reine Verbindung 12^[7]. Mit dem Dipeptidallylester 13^[6], der wiederum zur Cyclisierung neigt, entsteht das Chitobiosyl-asparagin-pentapeptid 14, das der geschützten Partialstruktur 1 aus der Influenza-Virus-Neuraminidase entspricht. 14 wird chromatographisch (Chloroform/Ethanol 9:1) rein isoliert und spektroskopisch charakterisiert^[8].

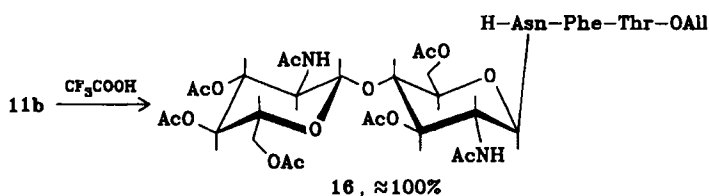


Die Kohlenhydrat-Hydroxygruppen der synthetischen Glycopeptide können sehr schonend mit Ammoniak in Methanol bei Raumtemperatur freigelegt werden, was an der Verbindung 11b, der geschützten Partialstruktur 2 aus dem menschlichen Komplement-Faktor B, gezeigt wird^[9].

Dabei wird auch der Allylester aminolysiert. Die Verbindung kann direkt aus Methanol/Chloroform kristallin und rein gewonnen und für biochemische und immunologische Modellreaktionen eingesetzt werden.



Will man auch die *tert*-Butyloxycarbonyl-Gruppe aus dem Glycopeptid ablösen, so gelingt dies nicht am größtenteils deblockierten 15. Sowohl mit wasserfreier Trifluoressigsäure als auch mit wässriger Salzsäure wird teilweise die *O*-glycosidische Bindung der Chitobiose gespalten. Dagegen verläuft die *N*-terminale Deblockierung am vollgeschützten Glycotripeptid 11b zu 16 mit wasserfreier Trifluoressigsäure erfolgreich und selektiv.



Das Hydrosalz der *N*-deblockierten Verbindung 16 eröffnet die Möglichkeit sowohl zur gezielten *N*-terminalen Verlängerung als auch zur weiteren Deblockierung im oben gezeigten Sinne.

Eingegangen am 10. Juni,
in veränderter Fassung am 23. Juli 1985 [Z 1344]

- [1] Zusammenfassung: E. F. Neufeld, G. Ashwell in W. J. Lennarz (Hrsg.): *The Biochemistry of Glycoproteins and Proteoglycans*, Plenum Press, New York 1980.
- [2] C. W. Ward, T. C. Ellman, A. A. Azad, *Biochem. J.* 207 (1982) 91.
- [3] D. L. Christie, J. Gagnon, *Biochemistry* 201 (1982) 555.
- [4] M. Spinola, R. W. Jeanloz, *J. Biol. Chem.* 245 (1970) 4158.
- [5] H. Kunz, H. Waldmann, *Angew. Chem.* 96 (1984) 49; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 23 (1984) 71; die Reaktion verläuft hier in 4 h bei Raumtemperatur in Tetrahydrofuran (THF)/Dimethylsulfoxid (DMSO) 4:1.
- [6] Herstellung nach: H. Waldmann, H. Kunz, *Liebigs Ann. Chem.* 1983, 1712.
- [7] *Arbeitsvorschrift*: Zu 0.28 g (0.26 mmol) 11a in 10 mL wasserfreiem Dioxan gibt man unter Argon und Lichtausschluss 30 mg (0.026 mmol) Tetraakis(triphenylphosphan)palladium(0), tropft dann 0.26 g (3 mmol) Morpholin zu und rührt 12 h bei Raumtemperatur. Nach Einengen zur Trockne im Vakuum wird das C-terminal deblockierte Di-N-acetyl-chitobiosaminyl-tripeptid 12 chromatographisch über Silicagel gereinigt, indem die Verunreinigungen zunächst mit Chloroform/Ethanol 9:1 abgetrennt werden und 12 dann mit Methanol eluiert wird. Ausbeute 0.19 g (71%); $F_p = 218-220^\circ\text{C}$; $[\alpha]_D^{25} 6.2$ ($c = 0.2$, DMSO). - 270 MHz-¹H-NMR ([D₆]DMSO): $\delta = 8.51$ (d, $J = 10$ Hz, 1H, γ -NH Asn), 8.05 (d, $J = 10$ Hz, 1H, NH), 7.94 (d, $J = 8.5$ Hz, 1H, NH), 7.87 (d, $J = 9$ Hz, 1H, NH), 7.53 (d, $J = 7.5$ Hz, 1H, NH), 6.86 (d, $J = 9.2$ Hz, 1H, NH Urethan), 5.11 (dd, $J(H1'/NH) = 10$, $J(H1'/H2) = 9.5$ Hz, 1H, H1), 4.68 (d, $J(H1'/H2) = 8.3$ Hz, 1H, H1'), 2.49 (dd, $J_{gem} = 11.9$, $J_{vic} = 7.5$ Hz, 1H, β -CH₂ Asn), 2.03, 2.0, 1.94, 1.93 und 1.91 (5s, 15H, 5CH₃-COO), 1.74 (s, 6H, 2CH₃-CONH), 1.38 (s, 9H, (CH₃)₃C), 1.20 (d, $J = 6$ Hz, 3H, CH(OH)-CH₃), 0.95 (d, $J = 6.2$ Hz, 3H, CH-CH₃).
- [8] $F_p = 202^\circ\text{C}$; $[\alpha]_D^{25} -3.3$ ($c = 0.1$, DMSO). - FAB-Massenspektrum: $m/z_{\text{ber.}}$ 1219, $m/z_{\text{gef.}}$ 1258 ((M+K)⁺). - 270 MHz-¹H-NMR ([D₆]DMSO): $\delta = 8.5-8.4$ (m, 2H, NH), 8.22 (d, $J = 7.6$ Hz, 1H, NH), 8.02 (d, $J = 9.1$ Hz, 1H, NH); 7.83 (d, $J = 7.5$ Hz, 1H, NH), 7.24 (d, $J = 7.8$ Hz, 1H, NH), 5.9 (ddt, 1H, CH=CH₂), 5.31 (dd, $J_{trans} = 17.3$, $J_{gem} = 1.7$ Hz, 1H, CH=CH_{2trans}), 5.19 (dd, $J_{cis} = 9.6$, $J_{gem} = 1.7$ Hz, 1H, CH=CH_{2cis}), 4.68 (d, $J(H1'/H2) = 8.2$ Hz, 1H, H1'), 4.57 (d, $J = 4.8$ Hz, 2H, CH₂-CH=CH₂), 2.04, 2.01, 1.95, 1.94 und 1.90 (5s, 15H, 5CH₃-COO), 1.74 (s, 6H, 2CH₃CONH), 1.35 (s, 9H, (CH₃)₃C).

[9] *Arbeitsvorschrift:* 0.45 g (0.39 mol) vollgeschützter Chitobiosyl-tripeptid-ester **11b** werden in 20 mL einer kaltesättigten Lösung von Ammoniak in Methanol 2 d bei Raumtemperatur gerührt. Man engt im Vakuum zur Trockne ein und reinigt das zurückbleibende Produkt **15** durch zweimaliges Umkristallisieren aus Methanol/Chloroform. Ausbeute: 0.3 g (86%). $F_p = 267^\circ\text{C}$; $[\alpha]_D^{25} = -14.4$ ($c = 0.1$, H_2O). – FAB-Massenspektrum: m/z_{theor} 885.8, m/z_{expt} 887 ($(M+1)^+$), 909 ($(M+\text{Na})^+$). – 470 MHz- ^1H -NMR (D_2O): $\delta = 7.38$ (d, $J = 7.3$ Hz, 2H, 2o-H C_6H_5), 7.33 (t, $J = 6.7$ Hz, 1H, p -H C_6H_5), 7.29 (t, $J = 6.2$ Hz, 2H, 2m-H C_6H_5), 5.05 (d, $J(\text{H}1/\text{H}2) = 9.56$ Hz, 1H, H1), 4.59 (d, $J(\text{H}1'/\text{H}2') = 8.4$ Hz, 1H, H1'), 3.13 (dd, $J_{\text{vic}} = 7.9$, $J_{\text{vic}} = 8.4$ Hz, 2H, β -CH₂ Phe), 2.72 (dd, $J_{\text{vic}} = 16$, $J_{\text{gem}} = 5.6$ Hz, 1H, β -CH₃ Asn), 2.6–2.55 (m, 1H, β -CH₃ Asn), 2.06 und 2.02 (2s, 6H, 2CH₃-CONH), 1.41 (s, 9H, $(\text{CH}_3)_3\text{C}$), 1.16 (d, $J = 6.2$ Hz, 3H, $\text{CH}(\text{OH})-\text{CH}_3$).

Erstmalige chemische Partialsynthese des Nickelkomplexes eines Cobyrynsäure-Derivates**

Von Gerhard Holze* und Hans Herloff Inhoffen

Professor Albert Eschenmoser

zum 60. Geburtstag gewidmet

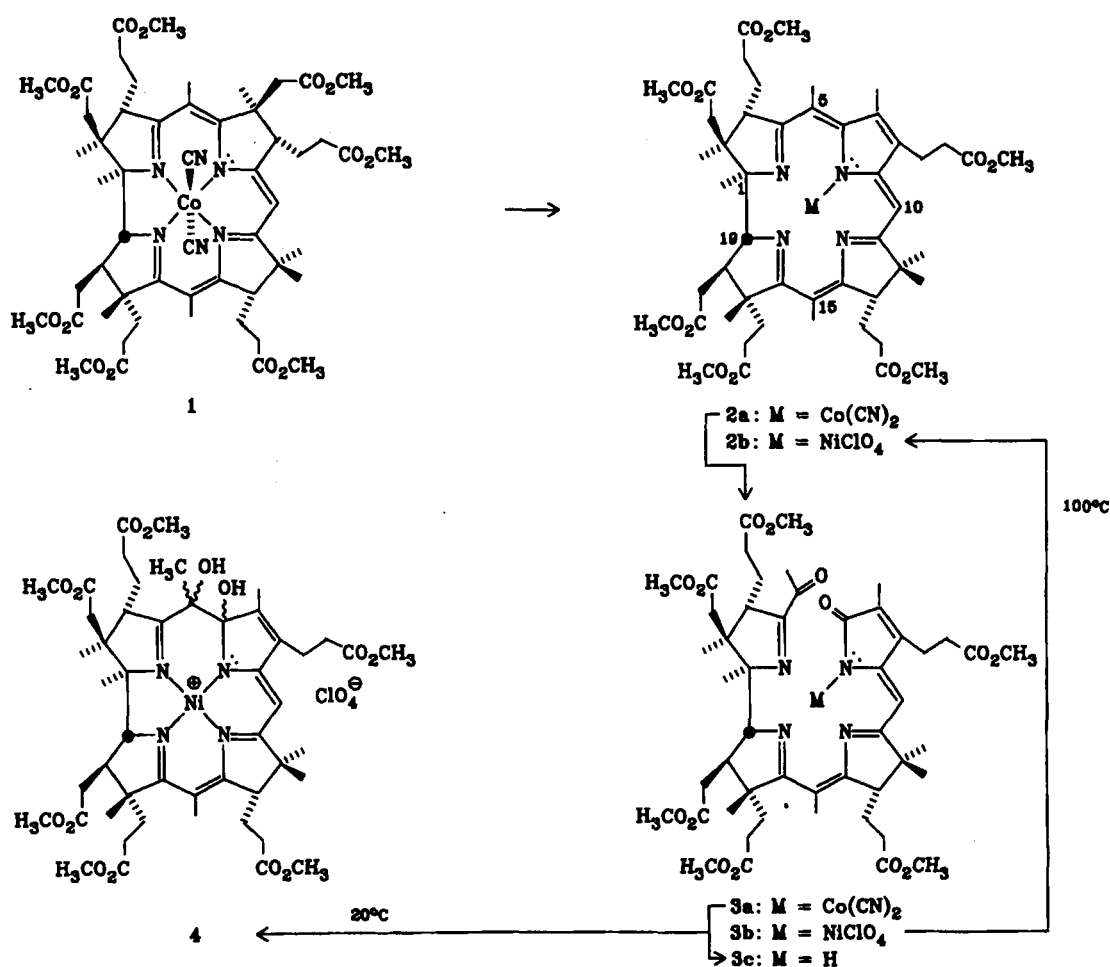
Mit Ausnahme der cobalthaltigen Derivate, die durch Umwandlung des in der Natur vorkommenden Vitamin-B₁₂-Chromophors hergestellt werden, sind Metallchelate von Corrinoiden bisher nur entweder totalsynthetisch^[1]

oder durch Komplexbildung metallfreier Corrinoiden, die aus den Kulturmedien phototropher Bakterien isoliert werden^[2], zugänglich. Die Entmetallierung und/oder Ummetallierung von cobalthaltigen Corrinoiden ist daher sowohl theoretisch als auch praktisch von Interesse.

Wegen der extrem hohen Stabilität von Corrin-Cobalt-Komplexen waren bisher sämtliche Versuche zum direkten Austausch des komplexgebundenen Cobalt-Ions gegen andere Metall-Ionen fehlgeschlagen^[3].

Ein alternativer, von Inhoffen et al. beschrittener Weg besteht in der gezielten Aufspaltung des Corrinringes, darauffolgender Entmetallierung des erhaltenen *seco*-Corrinoids, Remetallierung und schließlich Recyclisierung zum neuen Metallkomplex. In der Dicyano-cobyrynsäure-heptamethylester-Reihe gelang der Ringschluß beim Cobaltkomplex^[4], nicht jedoch bei den Rhodium- und Palladium-Analoga^[5].

Bei früheren Arbeiten über die Reaktivität des Corrin-Chromophors fanden wir, daß bei der Thermolyse von **1** der „Pyrocobyrynsäureester“ **2a**^[6] in 60proz. Ausbeute gebildet wird^[7], dessen *regioselektive* Oxidation mit photochemisch erzeugtem Singulett-Sauerstoff zur Dioxo-mono-*seco*-Verbindung **3a** in 95proz. Ausbeute führt^[8]. Die vorliegende Mitteilung berichtet über die erstmalige Umwandlung von **2a** in den Nickelkomplex **2b**.



[*] Dipl.-Chem. G. Holze
Institut de Chimie Organique de l'Université
Pérolles, CH-1700 Fribourg (Schweiz)
Prof. Dr. H. H. Inhoffen
Fakultät für Chemie der Universität
D-7750 Konstanz

[**] Wir danken Professor Dr. A. Gossauer für Unterstützung.

Versuche, **3a** zu entmetallieren, schlugen zunächst fehl. Weder mit H₂S in Pyridin/Methanol^[4] noch mit Dithiolen in Gegenwart von Säuren^[9] konnten befriedigende Resultate erzielt werden. Erst die Umsetzung von **3a** mit P₄S₁₀ in Acetonitril ergab gute Ausbeuten an instabilem **3c** (ca. 80% Ausbeute an Rohprodukt). Das *seco*-Corrinoid **3c** wurde