

- [32] L. T. Scott, P.-C. Cheng, M. M. Hashemi, M. S. Bracher, D. T. Meyer, H. B. Warren, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 10963–10968, zit. Lit.
- [33] A. Ayalon, M. Rabinovitz, P.-C. Cheng, L. T. Scott, *Angew. Chem.* **1992**, *104*, 1691–1692; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1992**, *31*, 1636–1637.
- [34] A. Pasquarello, M. Schlüter, R. C. Haddon, *Phys. Rev. A* **1993**, *47*, 1783–1789.
- [35] P. Lazzeretti, R. Zanasi, SYSMO-Programmpaket (Universität Modena), **1980**. Einige zusätzliche Routinen zur Ermittlung und Visualisierung der Stromdichten wurden in Exeter geschrieben (E. Steiner, P. W. Fowler, unveröffentlicht).
- [36] R. D. Amos, J. E. Rice, *The Cambridge Analytical Derivatives Package, Issue 4.0*, **1987**.
- [37] J. C. Hanson, C. E. Nordman, *Acta Crystallogr. Sect. B* **1976**, *32*, 1147–1153.

Zur Entwicklung von Antitumor-Impfstoffen: ein synthetisches Konjugat aus tumorassoziertem MUC1-Glycopeptidantigen und dem Tetanustoxin-Epitop**

Stefanie Keil, Christine Claus, Wolfgang Dippold und Horst Kunz*

Seit entdeckt wurde, dass sich Tumorzellen von gesunden Zellen im Glycoproteinprofil ihrer äußeren Zellmembran stark unterscheiden,^[1] sind immer wieder Versuche unternommen worden, tumorselektive Antigene für Immunisierungen gegen Tumoren zu entwickeln.^[2] Zunächst standen Glycolipide^[3] im Vordergrund des Interesses. Von Springer et al.^[1b] waren seit 1977 Glycoproteine mit dem Thomsen-Friedenreich-Antigen (T- oder TF-Antigen: Gal β (1-3)-GalNAc-O-Ser/Thr) als tumorassozierte Oberflächenstrukturen auf Epithelzellen beschrieben worden. Wegen der Kreuzreaktivität gegen sie induzierter Antikörper wurde den T-Antigen-Glycoproteinen eine enge strukturelle Beziehung zu den Asialoglycophorinen zugeschrieben.^[1b] Basierend auf diesen Befunden haben wir vor 15 Jahren T_N- und T-Antigen-Glycopeptide synthetisiert, um Antigene zur Immunisierung gegen Tumoren zu entwickeln.^[4] Dazu wurden die Glycopeptide mit der N-terminalen Sequenz des M-Blutgruppen-Glycophorins an Rinderserumalbumin (BSA) gekuppelt und als Impfstoffe zur Immunisierung von Mäusen eingesetzt. Der durch Hybridoma-Technik gewonnene, selektiv gegen das T-Antigen-Glycopeptid gerichtete Antikörper (82-A6)^[5] zeig-

te in Enzyme-linked-Immunosorbent-Assays (ELISA) Affinität gegenüber Epitheltumoren, aber auch gegenüber gesunden Zellen dieser Gewebe und somit keine genügende Tumorselektivität. Seine weitere Charakterisierung ergab, dass er keine Affinität zu Glycophorin, wohl aber zu den Asialoglycophorinen^[5, 6] zeigte, was seine Spezifität gegen das T-Antigen belegte. Interessant war, dass der Antikörper mit Asialoglycophorin der M-Blutgruppe, dessen N-terminale Sequenz der des synthetisierten T-Antigen-Glycopeptids entspricht, deutlich stärker reagierte als mit N-Blutgruppen-Asialoglycophorin. Der Antikörper differenziert also zwischen zwei Glycoproteinen mit zahlreichen identischen T-Antigen-Sacchariden, die sich nur geringfügig in der Peptidsequenz unterscheiden. Dies war ein Hinweis darauf, dass die Spezifität eines gegen ein Kohlenhydrat-Epitop (T-Antigen) gerichteten Antikörpers entscheidend von der Peptidsequenz in der Verknüpfungsregion moduliert wird.^[4–6] Für ein tumorselektives Antigen wird danach nicht nur ein tumorassoziertes Saccharidepitop, sondern auch eine tumorselektive Peptidstruktur benötigt.

In den vergangenen Jahren sind die Aminosäuresequenzen von tumorassozierten Mucinen aufgeklärt worden.^[7] Ziel unserer Synthesen sind Glycopeptide aus dem tumorassozierten Mucin MUC1.^[8] MUC1 ist in Epitheltumoren bis zu zehnfach überexprimiert und wegen vorzeitig einsetzender Sialylierung unvollständig glycosyliert. Der niedrige Glycosylierungsgrad des polymorphen epithelialen Mucins (PEM) MUC1 beeinflusst dessen Konformation. Peptidepitope aus der Tandem-Repeat-Region des MUC1 werden dem Immunsystem zugänglich. Sie sollten eine tumorselektive Peptidstrukturinformation haben. Wir haben deshalb T_N-,^[9] T_N^[10] und Sialyl-T_N-Antigen-Glycopeptide^[11] aus der Tandem-Repeat-Region von MUC1^[12] synthetisiert. Da nur eines der Glycopeptide auf periphere Blutlymphozyten einen proliferierenden Effekt ausübte, haben wir ein neues Konzept zur Konstruktion von tumorselektiven Antigenen für Antitumor-Impfstoffe entwickelt, nach dem das tumorassozierte MUC1-Glycopeptid-Antigen über einen flexiblen Spacer mit einem T-Zell-Epitop aus Tetanustoxin zum Konjugat **1** (Abbildung 1) kombiniert wird.

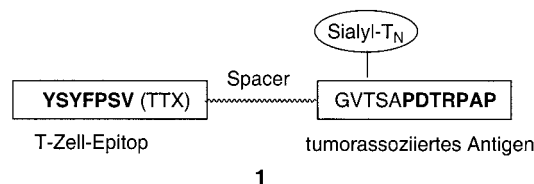


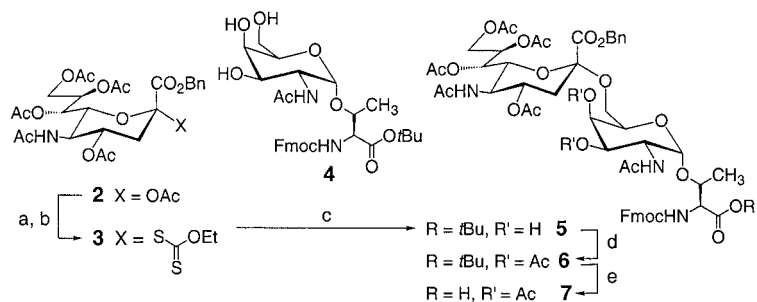
Abbildung 1.

In die Zielstruktur wurde das Peptidmotiv PDTRPAP als immundominante Domäne^[13] eingebaut. Die Neuraminsäure wird als Benzylester^[14] geschützt und **1** aus zwei großen Teilen in einer Fragmentkondensation an fester Phase aufgebaut. Der Sialyl-T_N-Baustein wird aus einem T_N-Threonin-Konjugat und einem Neuraminsäure-Donor konvergent synthetisiert.^[11] Der O-Acetyl-geschützte Sialinsäurebenzylester **2**^[14] wird mit Acetylchlorid in das Glycosylchlorid und dieses mit Kalium-O-ethylxanthogenat in das Sialylxanthogenat **3**^[15]

[*] Prof. Dr. H. Kunz, Dipl.-Chem. S. Keil
Institut für Organische Chemie der Universität Mainz
Duesbergweg 10-14, 55099 Mainz (Deutschland)
Fax: (+49) 6131-39-24786
E-mail: hokunz@mail.uni-mainz.de
Dr. C. Claus, Prof. Dr. W. Dippold^[+]
Naturwissenschaftlich-Medizinisches Forschungszentrum der Universität Mainz

[+] Weitere Adresse: St. Vincenz-Hospital Mainz

[**] Diese Arbeit wurde von der Deutschen Forschungsgemeinschaft und von der Stiftung Rheinland-Pfalz für Innovation gefördert. S.K. dankt für ein Kekulé-Stipendium des Fonds der Chemischen Industrie.



Schema 1. a) AcCl , 20°C , 3 d, quant.; b) KCS_2OEt , EtOH , 20°C , 4 h, 73 %; c) $\text{CH}_3\text{SBr}/\text{AgOTf}$, $\text{CH}_3\text{CN}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$ (2:1), -62°C , 3 h, 60 %; d) Ac_2O , Pyridin, 0°C , 4 h, 84 %; e) $\text{TFA}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$ (1:1), Anisol, 20°C , 6 h, quant.

überführt, welches sich schon beim Sialinsäuremethylester als günstiger Glycosyldonor erwiesen hatte.^[11] Reaktion von **3** mit der partiell geschützten T_N -Threonin-Vorstufe **4**^[11] liefert regioselektiv das gewünschte S(Sialyl) T_N -Threonin-Konjugat **5**. Tiefe Temperatur und Bildung von Acetonitril-Konjugaten begünstigen die Bildung des α -Sialosids (Schema 1).

Nach O-Acetylierung von **5** wird der *tert*-Butylester aus **6** durch vorsichtige Acidolyse entfernt und der so erhaltene ST_N -Threonin-Baustein **7**^[16] in die Festphasensynthese der Glycododecapeptid-Sequenz aus der Tandem-Repeat-Region von MUC1 eingeführt.

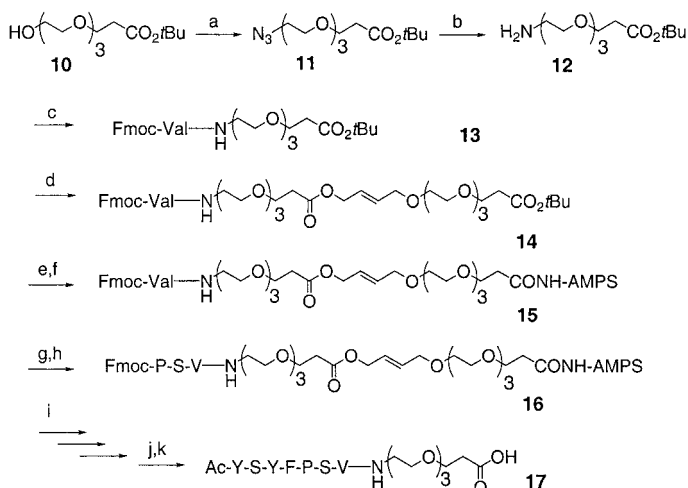
Die Synthese des ST_N -Glycododecapeptids wird an mit Fmoc-Prolin über den allylischen HYCRON-Anker^[9] und β -Alanin beladenem Aminomethylpolystyrol (AMPS)-Harz **8** durchgeführt. Zur Unterdrückung der Diketopiperazinbildung wechselt man bei der zweiten Aminosäure (Ala) zur Boc-Strategie, was wegen der Stabilität des Allyllankers gegen Basen und Säuren möglich ist.^[9] Für den weiteren Aufbau des harzgebundenen ST_N -Glycododecapeptids **9** wird wieder die Fmoc-Strategie verwendet (Schema 2).

Parallel dazu wird 12-Hydroxy-4,7,10-trioxadodecansäure-*tert*-butylester^[17] **10** über das 12-Azidoderivat **11** in das 12-Aminoderivat **12** überführt, mit Fmoc-Valin zu **13** kondensiert und nach Spaltung des *tert*-Butylesters an den HYCRON-Linker^[9] gebunden. Das Fmoc-Val-Spacer-HYCRON-Konjugat **14** wird an das Polymer gekuppelt (\rightarrow **15**), woraus nach der Fmoc-Strategie das Tetanustoxin-Peptid-

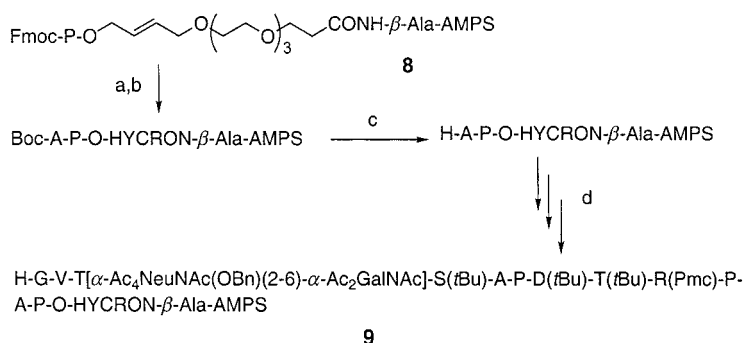
Spacerkonjugat aufgebaut wird. Im ersten Verlängerungsschritt wird zur Vermeidung der Diketopiperazinbildung ein Dipeptid angekuppelt, und es entsteht **16**;^[18] im letzten Schritt wird die Fmoc-Gruppe die Acetylgruppe ausgetauscht (Schema 3).

Durch Pd^0 -katalysierte Spaltung des Allyllankers^[9] erhält man das TTX-T-Zellepitop-Spacer-Konjugat **17**. Dieses Fragment wird an das festphasengebundene MUC1-Glycododecapeptid nach Carboxyaktivierung mit HATU/HOAT^[19] zum T-Zellepitop-Spacer-MUC1-Antigen-Konjugat **18** gekuppelt (Schema 4).

Nach Pd^0 -katalysierter Abspaltung des HYCRON-Ankers und Reinigung mit präparativer



Schema 3. a) 1. MesCl , NEt_3 , CH_2Cl_2 , 20°C , 3 h, 2. NaN_3 , DMF , 60°C , 18 h; b) Raney-Ni , H_2 , 2-Propanol, 20°C , 12 h, 73 %; c) Fmoc-Val-OH , EEDQ , CH_2Cl_2 , 20°C , 12 h, 70 %; d) 1. TFA , 20°C , 2 h, 2. Br-HYCRON-OrBu (Lit. [9]), NBu_4Br , $\text{NaHCO}_3/\text{CH}_2\text{Cl}_2$, 20°C , 12 h, 75 %; e) TFA , 20°C , 2 h, 95 %; f) H-AMPS , TBTU , HOBT , NMM , DMF , 20°C , 18 h, 74 %; g) $\text{Morpholin}/\text{DMF}$ (1:1); h) $\text{Fmoc-Pro-Ser(tBu)-OH}$, TBTU , HOBT , NMM , DMF ; i) 4-mal [1. Kupplung: Fmoc-AS-OH , TBTU , HOBT , NMM , DMF , 2. Capping: $\text{Ac}_2\text{O}/\text{Pyridin}$ (1:3), 3. Fmoc-Abspaltung: $\text{Morpholin}/\text{DMF}$ (1:1)]; j) $\text{Ac}_2\text{O}/\text{Pyridin}$ (1:3); k) $[\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4]$, Morpholin , DMF/DMSO (1:1) 44 % bezogen auf **15**. $\text{MesCl} = \beta$ -Morpholinylethansulfonsäurechlorid, $\text{EEDQ} = 2$ -Ethoxy-*N*-ethoxycarbonyl-1,2-dihydrochinolin.



Schema 2. a) $\text{Morpholin}/\text{DMF}$ (1:1); b) Boc-Ala-OH , TBTU , HOBT , NMM , DMF ; c) 1. $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{TFA}$ (1:1), 2. DIPEA , CH_2Cl_2 ; d) 10-mal [1. 2.–8., 10. und 11. Kupplung: Fmoc-AS-OH , TBTU , HOBT , NMM , DMF ; 9. Kupplung: **7**, 2. Capping: $\text{Ac}_2\text{O}/\text{Pyridin}$ (1:3) 3. Fmoc-Abspaltung: $\text{Morpholin}/\text{DMF}$ (1:1)]. $\text{HOBT} = \text{Hydroxybenzotriazol}$, $\text{TBTU} = O$ -(1*H*-Benzotriazol-1-yl)-*N,N,N',N'*-tetramethyluroniumtetrafluoroborat, $\text{NMM} = N$ -Methylmorpholin, $\text{DIPEA} = \text{Diisopropylethylamin}$, $\text{Pmc} = 2,2,5,7,8$ -Pentamethylchroman-6-sulfonyl.

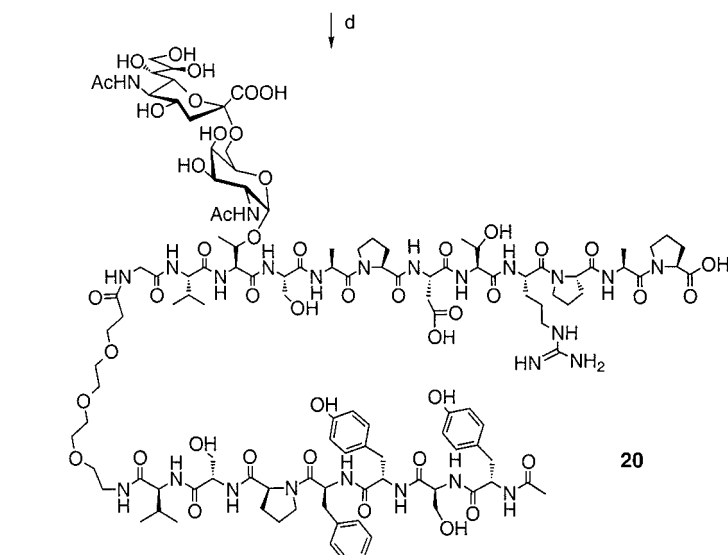
Umkehrphasen-HPLC isoliert man das geschützte T-Zellepitop-Spacer- ST_N -MUC-1-Antigen-Konjugat **19** in NMR-spektroskopisch^[20] reiner Form. Hydrogenolyse des Sialinsäurebenzylesters, Acidolyse der Seitenketten-Schutzgruppen und milde Methanolyse der O-Acetylgruppen ergeben das HPLC-analytisch und NMR-spektroskopisch^[21] reine Konjugat **20** in 47 % Ausbeute. **20** entspricht der konzipierten Verbindung **1** aus Tetanustoxin-Epitop, Spacer und tumorassoziertem MUC1-Glycopeptid-Antigen.

Zur immunologischen Prüfung wurden ca. 10^5 periphere Blutlymphozyten (PBL) von vier gesunden Spendern mit **20** und zum Vergleich mit dem MUC-1-Dodecapeptid, dem MUC-1- ST_N -Glycododecapeptid gleicher Sequenz, dem ST_N -Threonin-Konjugat und dem Tetanustoxin-Spacerkonjugat (alle in de-blockierter Form) jeweils in Konzentrationen von

H-G-V-T[α -Ac₄NeuNAc(OBn)(2-6)- α -Ac₂GalNAc]-S(fBu)-A-P-D(fBu)-T(fBu)-R(Pmc)-P-A-P-O-HYCRON- β -Ala-AMPS

↓ a
Ac-Y(fBu)-S(fBu)-Y(fBu)-F-P-S(fBu)-V-Spacer-G-V-T[α -Ac₄NeuNAc(OBn)(2-6)- α -Ac₂GalNAc]-S(fBu)-A-P-D(fBu)-T(fBu)-R(Pmc)-P-A-P-O-HYCRON- β -Ala-AMPS

↓ b,c
Ac-Y(fBu)-S(fBu)-Y(fBu)-F-P-S(fBu)-V-Spacer-G-V-T[α -Ac₄NeuNAc(OBn)(2-6)- α -Ac₂GalNAc]-S(fBu)-A-P-D(fBu)-T(fBu)-R(Pmc)-P-A-P-OH



Schema 4. a) **17**, HOAT/HATU/NMM, DMF, 20 °C, 2 d, 42 %; b) Ac₂O/Pyridin (1:3); c) [Pd(PPh₃)₄], Morpholin, DMF/DMSO (1:1) 20 % bezogen auf **8**; d) 1. Pd/C (10 %), H₂, MeOH, 20 °C, 1 h, 2. CH₂Cl₂/TFA/Thioanisol/Ethandithiol (10:10:1:1), 20 °C, 2 h, 3. NaOMe, MeOH, pH 8.5, 20 °C, 18 h, 47 % über 3 Stufen. HOAT = 7-Aza-1-hydroxy-1H-benzotriazol, HATU = N-[(Dimethylamino)-1H-1,2,3-triazol[4,5-b]-pyridin-1-ylmethyl]-N-methylmethanaminiumhexafluorophosphat.

1 μ g und 0.1 μ g pro 200 μ L behandelt. Da eine primäre Stimulation der Zellen nicht eintrat, wurde nach jeweils sieben Tagen mit dem gleichen Antigen restimuliert, bis sich Proliferationszentren zeigten. Bei den Zellen von drei der vier Spender setzte laut ELISA mit Maus-anti-Human-IFN γ -Antikörpern bei allen diesen Substanzen nach der zweiten Restimulierung und vor der Zugabe des T-Zellwachstumsfaktors Interleukin-2 Produktion von Interferon- γ ein. Nach der vierten Restimulierung wurde über den [³H]Thymidin-Einbau die Proliferation der PBL gemessen. Die Proliferation wird bei den einzelnen Spendern in unterschiedlichem Ausmaß bei allen fünf Substanzen auch in einem von fötalem Kälberserum freien Medium gefunden, tritt aber nur in Gegenwart Antigen präsentierender Zellen (APCs) und nicht bei gereinigten T-Zellen ein. Dies ist ein deutlicher Hinweis auf eine antigenspezifische Reaktivität. Die Charakterisierung der proliferierenden Lymphozyten wurde mit monoklonalen Antikörpern gegen Oberflächenantigene in einem Fluorescence-Activated-Cell-Sorter (FACS-Analyse) durchgeführt. Sie ergab, dass mit **20** bis zu 100 % CD3-positive und davon 53 % CD8-positive T-Zellen gefunden werden können. Auch mit den anderen Substanzen werden CD3-positive T-Zellen angereichert, jedoch weit weniger die erwünschten cytotoxischen CD8-positiven T-Zellen. Diese ersten Ergeb-

nisse berechtigen zu der Hoffnung, dass mit Konstrukten aus T-Zellepitopen und tumorassoziierten MUC-Glycopeptid-Antigenen wie **20** cytotoxische T-Zellantworten^[22] und auf dieser Basis wirksame synthetische Antitumor-Impfstoffe entwickelt werden können.

Eingegangen am 9. August 2000 [Z15608]

- a) T. Feizi, *Nature* **1985**, 314, 53; b) G. F. Springer, *Science* **1984**, 224, 1198.
- Übersichten: a) S. J. Danishefsky, J. R. Allen, *Angew. Chem.* **2000**, 112, 882; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000**, 39, 836; b) R. R. Koganty, M.-A. Reddish, B. M. Longenecker in *Glycopeptides and Related Compounds* (Hrsg.: D. G. Large, C. D. Warren), Marcel Dekker, New York, **1997**, S. 707; c) H. Kunz, P. Wernig, M. Schilling, J. März, C. Unverzagt, S. Birnbach, U. Lang, H. Waldmann, *Environ. Health Perspect.* **1990**, 88, 247.
- Übersicht: S.-I. Hakomori, Y. Zhang, *Chem. Biol.* **1997**, 4, 97.
- H. Kunz, S. Birnbach, *Angew. Chem.* **1986**, 98, 354; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1986**, 25, 360. T_N-Antigen = Ser/Thr(α GalNAc).
- W. Dippold, A. Steinborn, K.-H. Meyer zum Büschenfelde, *Environ. Health Perspect.* **1990**, 88, 255.
- W. Dippold, A. Steinborn, S. Birnbach, H. Kunz, unveröffentlichte Ergebnisse; A. Steinborn, Dissertation, Universität Mainz, **1990**.
- Übersicht: P. L. Nguyen, G. A. Niehans, D. L. Cherwitz, Y. S. Kim, S. B. Ho, *Tumor Biol.* **1996**, 17, 176.
- S. J. Gendler, C. A. Lancaster, J. Taylor-Papadimitriou, T. Duhig, N. Peat, J. Burchell, L. Pemberton, E. N. Lalani, D. Wilson, *J. Biol. Chem.* **1990**, 265, 15286.
- O. Seitz, H. Kunz, *Angew. Chem.* **1995**, 107, 901; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1995**, 34, 803.
- a) M. Leuck, H. Kunz, *J. Prakt. Chem.* **1997**, 339, 332; b) P. Braun, G. M. Davies, M. R. Price, P. M. Williams, S. B. J. Tendler, H. Kunz, *Bioorg. Med. Chem.* **1998**, 6, 1531.
- B. Liebe, H. Kunz, *Angew. Chem.* **1997**, 109, 629; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1997**, 36, 618.
- Auch von anderen Arbeitsgruppen wurden Mucin-Glycopeptide mit T_N-, T- und ST_N-Antigen-Saccharidteilen synthetisiert: a) E. Meinjohanns, M. Meldal, A. Schleyer, H. Paulsen, K. Bock, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* **1996**, 985; b) S. D. Kuduk, J. B. Schwarz, X.-T. Chen, P. W. Glunz, D. Sames, G. Ragupanti, P. O. Livingston, S. J. Danishefsky, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, 120, 12474; c) J. B. Schwarz, S. D. Kuduk, X.-T. Chen, D. Sames, P. W. Glunz, S. J. Danishefsky, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, 121, 2662.
- a) J. Burchell, J. Taylor-Papadimitriou, M. Boshell, S. Gendler, T. Duhig, *Int. J. Cancer* **1989**, 44, 691; b) M. R. Price, F. Hudecz, C. O'Sullivan, R. W. Baldwin, P. M. Edwards, S. B. J. Tendler, *Mol. Immunol.* **1990**, 62, 795.
- K. Furuhashi, K. Kimio, H. Ogura, T. Hata, *Chem. Pharm. Bull.* **1991**, 39, 255.
- A. Marra, P. Sinaÿ, *Carbohydr. Res.* **1989**, 187, 36.
- Trihydrat von **7**: [α]_D²⁵ = 29.1 (c = 1.0, MeOH); MALDI-MS (MeOH, DHB): m/z: 1239.1 [M - H⁺ + K⁺ + Na⁺], 1223.3 [M - H⁺ + 2Na⁺], 1217.0 [M + K⁺], 1201.5 [M + Na⁺]; ¹H-NMR (¹H-¹H-COSY) (400 MHz, CD₃OD, TMS): δ = 4.99 (dd, 1H, J_{2,3} = 11.7 Hz, J_{3,4} = 3.2 Hz, H-3), 4.90–4.84 (m, 2H, H-1, H-4'), 4.69 (dd, 1H, J = 6.2, 10.9 Hz, OCH₂Fmoc), 4.51 (dd, 1H, J = 5.9, 10.9 Hz, OCH₂Fmoc), 4.10 (dd, 1H, J = 5.3, 12.3 Hz, H-9'b), 3.84 (dd, 1H, J_{5,6a} = 7.5 Hz, J_{6a,6b'} = 10.3 Hz, H-6a), 3.15 (dd, 1H, J_{5,6b} = 4.4 Hz, J_{6a,6b} = 10.3 Hz, H-6b), 2.69 (dd, 1H, J_{3'e,3'a} = 12.6, J_{3'e,4'} = 4.4 Hz, H-3'e), 1.22 (d, 3H, J = 6.5 Hz, T⁺); ¹³C-NMR (DEPT) (100.6 MHz, CD₃OD): δ = 100.77 (C-1), 99.93 (C-2'), 38.83 (C-3'), 19.32 (T⁺).

- [17] M. Gewehr, H. Kunz, *Synthesis* **1997**, 1499.
- [18] J. Habermann, H. Kunz, *Tetrahedron Lett.* **1998**, 39, 265.
- [19] L. A. Carpino, A. S. El-Faham, C. Minor, F. Albericio, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1994**, 210.
- [20] **19**: $[\alpha]_D^{25} = -20.8$ ($c = 1.0$, CH_3CN). FAB-MS (nba, pos.): m/z (%): 3754.4 (62.3) $[M(2 \times ^{13}\text{C}) - 4 \times (\text{tert-Butyl}) + 2 \times \text{Na}^+]$, ber.: 3753.74, 3755.1 (100) $[M(3 \times ^{13}\text{C}) - 3 \times (\text{tert-Butyl}) + 2 \times \text{Na}^+]$, 3755.8 (82.7) $[M(4 \times ^{13}\text{C}) - 4 \times (\text{tert-Butyl}) + 2 \times \text{Na}^+]$, 3757.2 (49.1) $[M(5 \times ^{13}\text{C}) - 4 \times (\text{tert-Butyl}) + 2 \times \text{Na}^+]$; $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, $[\text{D}_6]\text{DMSO}$, TMS): $\delta = 8.48\text{--}7.41$ (m, 18H, NH), 7.38 (m, 5H, $\text{H}_{\text{Ar-Bn}}$), 7.28–7.16 (m, 5H, $\text{H}_{\text{Ar-F}}$), 7.11 (d, 2H, $J = 7.9$ Hz), 7.03 (d, 2H, $J = 7.6$ Hz, 2 \times (H2-Y, H6-Y)), 6.82–6.76 (m, 4H, 2 \times (H3-Y, H5-Y)), 6.70, 6.55 (S_{br} , $\text{R}^{\text{NH}(e,\xi,\eta)}$), 5.22–5.14 (m, 5H, H-4, H-7', H-8', CH_2Bn), 4.92–4.85 (m, 2H, H-1, H-3); 4.78–4.69 (m, H-4'), 4.65–3.24 (m, 58H, F^{α} , 2 \times Y^{α} , 2 \times V^{α} , 3 \times S^{α} , 3 \times S^{β} , $-\text{CH}_2\text{CH}_2(\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2)_2=\text{CH}_2\text{CH}_2$, R^{α} , D^{α} , 2 \times A^{α} , 4 \times P^{α} , 2 \times T^{α} , G^{α} , V^{α} , H-2, H-5, H-6', H-9', 2 \times T^{β} , 4 \times P^{β} , H-6a, H-5'), 3.22–2.60 (m, 10H, F^{β} , 2 \times Y^{β} , H-6b, R^{β} , H-3'e), 2.57–2.38 (m, 4H, D^{β} , $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Pmc}$), 2.38–2.35 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{CONH-G-V}$), 2.49, 2.46 (s, 6H, o,o' - CH_3Pmc), 2.18–1.58 (m, 18H, 4 \times P^{β} , 4 \times P^{γ} , $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Pmc}$), 2.03, 2.00, 1.99, 1.93, 1.91, 1.85, 1.82, 1.75, 1.71, 1.66 (10 \times s, 30H, m- CH_3Pmc , 6 \times OAc, 3 \times NHAc), 1.53–1.02 (m, 9H, 2 \times V^{β} , R^{γ} , R^{β} , $\text{H}_3'\text{a}$, 2 \times A^{β}), 1.35, 1.23, 1.20, 1.15, 1.11, 1.08, 1.06, 1.05, (s, 69H, 7 \times $\text{C}(\text{CH}_3)_3$, $\text{C}(\text{CH}_3)_3\text{Pmc}$), 0.98–0.90 (m, 3H, T_1^{γ}), 0.89–0.83 (m, 3H, T_2^{γ}), 0.82–0.78 (m, 12H, V^{γ}); $^{13}\text{C-NMR}$ (DEPT) (100.6 MHz, $[\text{D}_6]\text{DMSO}$): $\delta = 98.40$ (C-1), 98.01 (C-2'), 41.18, 40.97, 38.40, 36.95, 35.87 (2 \times Y^{β} , F^{β} , C-3', D^{β} , R^{β} , CH_2CONH); 32.12 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Pmc}$), 19.05, 16.92, 18.75, 18.75, 18.16, 18.07, 17.95 (2 \times V^{γ} , T_1^{γ} , o,o' - CH_3Pmc), 16.77, 16.72, 10.00 (T_2^{γ} , 2 \times A^{β}), 11.82 (m- CH_3Pmc).
- [21] **20**: $[\alpha]_D^{25} = -76.9$ ($c = 1.0$, H_2O); FAB-MS (nba + LiBr, pos.): m/z (%): 2770.7 (0.62) $[M+\text{Li}^+]$, ber.: 2770.30; $^1\text{H-NMR}$ (^1H - ^1H -COSY) (400 MHz, D_2O): $\delta = 7.37\text{--}7.24$ (m, 3H), 7.23, 7.16 (m, 2H, $\text{H}_{\text{Ar-F}}$), 7.08–6.97 (m, 4H, 2 \times (H2-Y, H6-Y)), 6.81–6.72 (m, 4H, 2 \times (H3-Y, H5-Y)), 4.90 (m, 1H, H-1), 4.72–4.66 (m, 1H, D^{α}), 4.64–4.59 (m, 2H, F^{α} , R^{α}), 4.57–4.50 (m, 1H, A_1^{α}), 4.49–4.42 (m, 6H, A_2^{α} , 2 \times S^{α} , 2 \times Y^{α}), 4.41–4.33 (m, 6H, 4 \times P^{α} , S_3^{α} , T_1^{α}), 4.32–4.29 (m, 2H, V_1^{α} , T_2^{α}), 4.28–4.23 (m, 1H, T_1^{β}), 4.22–4.17 (m, 1H, T_2^{β}), 4.12–4.03 (m, 3H, H-2, V_2^{α} , S_1^{β}), 4.01–3.27 (m, 40H, H-3, H-4, H-5, H-6, H-4', H-5', H-6', H-7', H-8', H-9', $\text{NH}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CONH}$, 2 \times S^{β} , G^{α} , 4 \times P^{β}), 3.17 (m, 2H, R^{β}), 3.10–2.99 (m, 1H, $\text{F}^{\beta a}$), 2.90–2.77 (m, 7H, 2 \times Y^{β} , D^{β} , $\text{F}^{\beta b}$), 2.67 (dd, 1H, H-3'e), 2.60–2.54 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{CONH-G-V}$), 2.33–2.18 (m, 4H 4 \times $\text{P}^{\beta a}$), 2.11–1.77 (m, 15H, 2 \times V^{β} , 4 \times $\text{P}^{\beta b}$, 4 \times P^{γ} , $\text{R}^{\beta a}$), 2.03, 2.01, 1.93 (s, 9H, 3 \times NHAc), 1.76–1.59 (m, 4H, H-3'a, $\text{R}^{\beta b}$, R^{γ}), 1.34 (m, 6H, $J = 6.5$ Hz, 2 \times A^{β}), 1.30–1.21 (m, 3H, T_1^{γ}), 1.15 (d, 3H, $J = 6.2$ Hz, T_2^{γ}), 0.97–0.85 (m, 12H, 2 \times V^{γ}); $^{13}\text{C-NMR}$ (DEPT) (100.6 MHz, D_2O): $\delta = 99.62$ (C-1), 99.20 (C-2'), 22.14, 21.94, 21.49, (3 \times NHAc), 18.73, 18.39, 18.22, 17.54 (2 \times T^{γ} , 2 \times V^{γ}), 15.11, 14.92 (2 \times A^{β}).
- [22] Zur Bedeutung dieser Zieleigenschaft siehe Abschnitt 2 in Lit. [2a], S. 885, links.

Synthese und Membranbindungseigenschaften eines Lipopeptids der membranassoziierten Domäne des Influenza-A-Virus-Hämagglutinins**

Frank Eisele, Jürgen Kuhlmann und Herbert Waldmann*

Zu den Schlüsselschritten einer viralen Infektion zählen die Anbindung des Virus an die Oberfläche der Wirtszelle, seine Verschmelzung mit der Zelle und die Abknospung (budding) neuer viraler Partikel. Bei diesem komplexen, mehrstufigen Prozess spielen posttranslational modifizierte Proteine, die in die Lipiddoppelschicht der Viren eingelagert sind, eine entscheidende Rolle. So ist das Hämagglutinin des Influenza-A-Virus außerhalb der Virenmembran glycosyliert^[1, 2] und in der Nähe seiner Transmembranregion S-palmitoyliert (Abbildung 1).^[3, 4] Der Glycopeptidbereich vermittelt die selektive Bindung an die Sialinsäurerezeptoren auf der Oberfläche der Wirtszelle und ist für die Initiierung der Virusinfektion verantwortlich. Die Lipidreste werden für die Wechselwirkung der Zellmembran mit dem freien Capsid bei der Abknospung von Virus-Nachkommen benötigt^[5, 6] und vermitteln vermutlich Protein-Protein- und Protein-Lipid-Wechselwirkungen innerhalb des Virus.^[7] Darüber hinaus könnten die lipidierten Bereiche nach dem Eintritt des Viruspartikels in die Zelle bei Fusionsprozessen der viralen Membran mit dem Endosom eine wichtige Rolle spielen.^[8, 9] Dieser Vorschlag wird jedoch kontrovers diskutiert, da mehrere Untersuchungen darauf hindeuten, dass die lipidierte cytoplasmatische Domäne dieses komplexen viralen Lipoglycoproteins nicht entscheidend für seine Membranfusionsaktivität ist.^[10]

Um diese und verwandte Prozesse bis in die molekularen Details zu untersuchen, könnten sich fluoreszenzmarkierte Peptide, die die Stellen für die Anknüpfung der Lipidgruppen an das Proteinrückgrat enthalten, in biologischen Experimenten als effiziente Werkzeuge erweisen.^[11] Ihre Synthese wird jedoch durch die ausgeprägte Basenlabilität der Palmitinsäure-Thioester kompliziert, die bei $\text{pH} > 7$ spontan hydrolysieren.^[12] Für die Herstellung solcher labiler Peptidkonjugate bieten enzymatische Methoden wertvolle Alternativen zu den klassischen chemischen Verfahren.^[11] Wir berichten hier über die Entwicklung der *p*-(Phenylacetoxymethyl)- (PAOB)-Estergruppe, einer neuen enzymlabilen Schutzgrup-

[*] Prof. Dr. H. Waldmann

Max-Planck-Institut für molekulare Physiologie

Abteilung Chemische Biologie

Fax: (+49) 231-133-2499

und Universität Dortmund, Institut für Organische Chemie

Otto-Hahn-Straße 11, 44227 Dortmund (Deutschland)

E-mail: herbert.waldmann@mpi-dortmund.mpg.de

Dr. J. Kuhlmann

Max-Planck-Institut für molekulare Physiologie

Abteilung Strukturelle Biologie

Otto-Hahn-Straße 11, 44227 Dortmund (Deutschland)

Dr. F. Eisele

Universität Karlsruhe

Institut für Organische Chemie

Richard-Willstätter-Allee 2, 76128 Karlsruhe (Deutschland)

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