

Detektion des Pesterregers durch Anti-Kohlenhydrat-Antikörper**

Chakkumkal Anish, Xiaoqiang Guo, Annette Wahlbrink und Peter H. Seeberger*

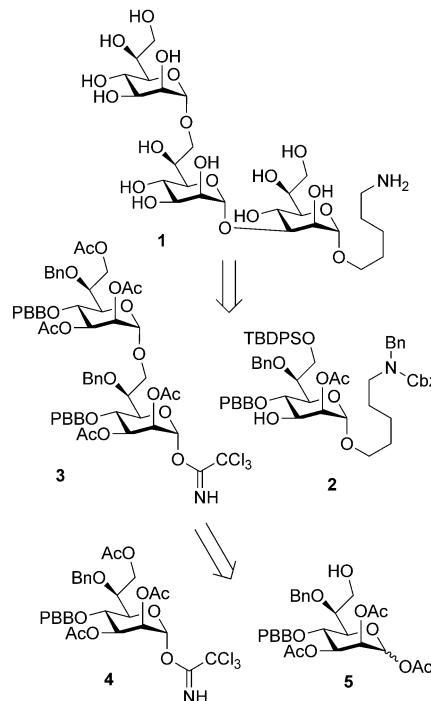
Der Firma Bayer zum 150. Jubiläum gewidmet

„Der schwarze Tod“ vermochte es, die Weltbevölkerung im Mittelalter drastisch zu dezimieren. Die Pest kostete in drei Pandemien in den letzten 1500 Jahren über 200 Millionen Menschen das Leben. Die Beulenpest wird von dem nicht-sporulierenden Bakterium *Yersinia pestis* ausgelöst.^[1] Neuere Fälle wurden in Afrika und Asien beobachtet.^[2] Wegen der hohen Ansteckungsgefahr und der Schwere der Infektion ist *Y. pestis* als biologischer Kampfstoff der Kategorie A eingestuft.^[3] In der Tat würde eine absichtliche Verteilung von Pestbakterien als Aerosol in der Luft schwere Lungenentzündungen nach Einatmen hervorrufen.^[4] Da diese Lungenpest typischerweise tödlich endet, wenn sie nicht behandelt wird, muss der Nachweis des Erregers so schnell wie möglich erfolgen, um rechtzeitige Hilfe zu gewährleisten.^[5] Der Nachweis von *Y. pestis* erfolgt momentan entweder auf Basis der Polymerasekettenreaktion oder mithilfe konventioneller Phänotypisierung.^[6] Diese Nachweismethoden sind zwar verlässlich, dafür jedoch oft komplex, teuer und langsam.^[7] Die Erkennung von Oberflächenproteinen durch Antikörper ist eine vielversprechende und weniger komplizierte Alternative zum Nachweis der Pest.^[8] Die Nachteile proteinbasierter Testmethoden sind jedoch die hohe Fehlerquote und die geringe Selektivität gegenüber verwandten Bakterienstämmen, was die Entwicklung effektiver, verlässlicher Antikörpertests erschwert.^[9] Die innere Kernregion der Lipopolysaccharide (LPS) von *Yersinia* hat eine einzigartige Struktur und enthält keine O-Seitenketten, im Unterschied zu den LPS der meisten anderen Gram-negativen Bakterien.^[10] Das LPS von *Y. pestis* ist immundominant, und LPSspezifische Antikörper in Seren von Patienten sind von hohem Stellenwert für den Nachweis der Pest.^[10a]

Wir beschreiben hier die Synthese eines Pest-spezifischen Oligosaccharidantigens und die darauf basierende Anfertigung von Glycan-Mikroarrays zur Analyse von Patientense-

ren und anderen biologischen Proben. Mithilfe LPS-spezifischer monoklonaler Antikörper (mAbs) lässt sich *Y. pestis* detektieren. Antikörper gegen LPS-Oberflächenstrukturen von *Y. pestis* sollten sich zum spezifischen Nachweis dieses Erregers in der Vor-Ort-Diagnose eignen.

Da die Isolierung der LPS von *Y. pestis* wegen Schwankungen des Expressionsgrades umständlich ist,^[11] sind synthetische Antigene hier das Mittel der Wahl. Als Zielantigen zur Antikörperherstellung wurde das Triheptosemotiv der inneren Kernregion (-L- α -D-Hepp-(1 \rightarrow 7)-L- α -D-Hepp-(1 \rightarrow 3)-L- α -D-Hepp) gewählt (Schema 1). Trisaccharidhapten



Schema 1. Retrosynthese des Heptosaccharids der inneren Kernregion von *Y.-pestis*-LPS.

1 wurde mit einem primären Amin über einen Linker am reduzierenden Ende ausgestattet, um die Konjugation an ein Trägerprotein zu ermöglichen. Eine Retrosynthese ergab Disaccharid-Trichloracetimidat **3** und Heptosid **2**^[12] als wichtige Zwischenstufen (Schema 1). Disaccharid **3** lässt sich wiederum aus den Heptosebaustein **4** und **5** herstellen.

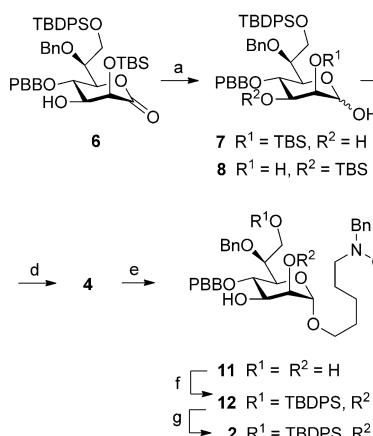
Die Synthese der Heptosebausteine **2** und **4** begann mit der Reduktion von Lacton **6**^[12] mit Lithiumtri-*tert*-butoxy-aluminiumhydrid, um die Halbacetale **7** und **8** zu erhalten (Schema 2). Die basischen Reaktionsbedingungen bewirkten

[*] Dr. C. Anish, Dr. X. Guo, A. Wahlbrink, Prof. Dr. P. H. Seeberger
Abteilung Biomolekulare Systeme, Max-Planck-Institut für Kolloid- und Grenzflächenforschung
Am Mühlenberg 1, 14424 Potsdam (Deutschland)

Prof. Dr. P. H. Seeberger
Institut für Chemie und Biochemie,
Freie Universität Berlin
Arnimallee 22, 14195 Berlin (Deutschland)
E-Mail: peter.seeberger@mpikg.mpg.de
Homepage: <http://www.mpikg.mpg.de>

[**] Wir danken der Max-Planck-Gesellschaft, dem Bundesministerium für Bildung und Forschung und der Körber-Stiftung für großzügige finanzielle Unterstützung. Wir danken Benjamin Schumann für die Übersetzung dieses Manuskripts.

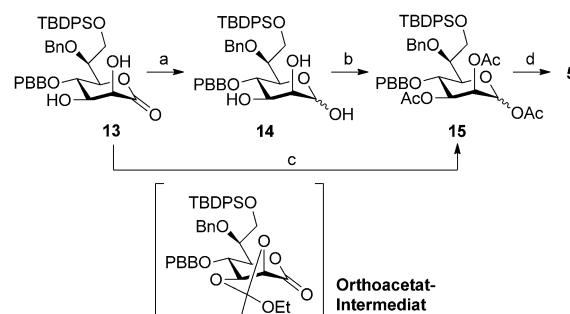
Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.201301633> zu finden.



Schema 2. Synthese der Bausteine **2** und **4**. Reagentien und Bedingungen: a) $\text{LiAlH}(\text{OtBu})_3$, THF, -20 bis -15 $^\circ\text{C}$, **7** 30%, **8** 38%; b) TBAF, THF; c) Ac_2O , Pyridin, quant.; d) Cl_3CCN , DBU, CH_2Cl_2 , 70% bis quant.; e) 1. *N*-Benzyl-*N*-benzylxycarbonyl-5-aminopentan-1-ol, TMSOTf, CH_2Cl_2 , -30 $^\circ\text{C}$; 2. NaOMe , MeOH , 35%; f) TBDPSCl, Imidazol, DMAP, CH_2Cl_2 , 76%; g) 1. Triethylorthoacetat, PTSA, Toluol; 2. 80% wässr. AcOH , THF, 70–78%. Br: Benzyl; DBU: 1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-en; DMAP: 4-Dimethylaminopyridin; PBB: *p*-Brombenzyl; PTSA: *p*-Toluolsulfonsäure; TBAF: Tetra-*n*-butylammoniumfluorid; TBDPS: *tert*-Butyl(chlorodiphenyl)silan; TMSOTf: Trimethylsilyltrifluormethansulfonat.

dabei die Wanderung der TBS-Gruppe von C-2 nach C-3. Spaltung aller Silylether in **7** und **8** mit TBAF und darauf folgende Acetylierung ergaben Intermediat **9**. Das anomere Zentrum in **9** wurde anschließend selektiv desacytyliert und durch Reaktion mit Trichloracetonitril und 1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-en (DBU) in guten bis exzellenten Ausbeuten in das Trichloracetimidat **4** überführt. Einführung eines geschützten Linkers mit anschließender Desacetylierung ergab Glycosid **11**. Die primäre Hydroxygruppe wurde nachfolgend als TBDPS-Ether geschützt, um **12** zu erhalten. Durch Reaktion des 2,3-Diols mit Triethylorthoacetat wurde der entsprechende cyclische Orthoester gebildet, der im Anschluss mit wässriger Essigsäure selektiv und in guter Ausbeute unter Bildung von Baustein **2** geöffnet wurde. Die Reduktion von Lacton **13**^[12] zu Halbacetal **14** erfolgte unter denselben Bedingungen wie die Reduktion von **6**, war jedoch deutlich langsamer und auch nach zwei Tagen noch nicht abgeschlossen (Schema 3, Bedingung a). Acetylierung von Triol **14** und Spaltung der TBDPS-Gruppe ergaben schließlich Baustein **5**. Die Reduktion des Lactons in **13** konnte erheblich beschleunigt werden (<30 min), indem das Diol zuvor als Orthoacetat geschützt wurde (Schema 3, Bedingung c). Nach Öffnen des Orthoesters mit wässriger Essigsäure und Acetylierung wurde Triester **15** in 70% Ausbeute über vier Stufen erhalten.

Der Aufbau des Trisaccharids begann durch Kopplung der Bausteine **4** und **5** zum Disaccharid **16**. Nach Spaltung der anomeren Acetylgruppe und Umwandlung zum Trichloracetimidat konnte Glycosylierungsreagens **3** erhalten werden. Umsetzung mit Alkohol **2** und anschließende sequenzielle Entschützung aller Ester, Silylether und Benzylether ergab Trisaccharid **1**.

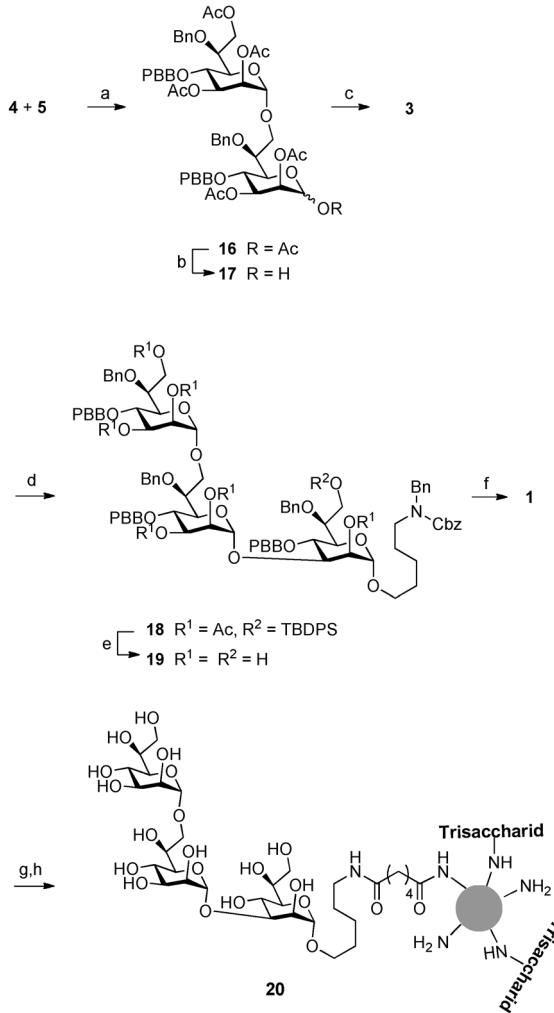


Schema 3. Synthese von Baustein **5**. Reagentien und Bedingungen:
a) $\text{LiAlH}(\text{OtBu})_3$, THF, RT, 40%; b) Ac_2O , Pyridin, quant.; c) 1. Triethylorthoacetat, PTSA, Toluol; 2. $\text{LiAlH}(\text{OtBu})_3$, THF, -20 bis -15 $^\circ\text{C}$; 3. 80% wässr. AcOH , THF; 4. Ac_2O , Pyridin, 70% (4 Stufen); d) HF-Pyridin, THF, quant.

Kohlenhydratantigene können zwar eine Immunantwort hervorrufen, allerdings ist diese T-Zell-unabhängig und nicht mit einem Immunglobulin(Ig)-Klassenwechsel verbunden. Konjugation von Kohlenhydratantigenen an immunogene Trägerproteine ermöglicht es hingegen, eine T-Zell-abhängige Immunantwort zu erzeugen.^[13] Das Diphtherietoxoid CRM197 wurde als Trägerprotein für das synthetische Hapten **1** gewählt.^[14] CRM197 ist als immunogener Bestandteil in lizenzierten Impfstoffformulierungen enthalten.^[15] Oligosaccharid **1** wurde zuerst aktiviert, indem die freie Linker-Aminogruppe mit einem der *N*-Hydroxysuccinimid(NHS)-Aktivester des Spacers Disuccinimidoadipat (DSAP) in DMSO in Gegenwart katalytischer Mengen Triethylamin zur Reaktion gebracht wurde (Schema 4).^[16]

Überschüssiges DSAP wurde durch Extraktion mit Chloroform entfernt. Das aktivierte Saccharid wurde anschließend an die Lysin-Seitenketten von CRM197 in 50 mM Phosphatpuffer, pH 7.4, gekuppelt, um das Neoglykonjugat **20** zu erhalten. Die Konjugation wurde durch SDS-PAGE bestätigt und das Verhältnis von Oligosaccharid zu CRM197 durch Matrix-unterstützte Laser-Desorptions-/Ionisations-Massenspektrometrie mit Flugzeitdetektor (MALDI-TOF-MS) untersucht. Das Massenspektrum enthielt Signale zwischen 59.9 und 68.8 kDa, was auf eine mittlere Beladung von sieben Oligosaccharidmolekülen pro Proteinmolekül schließen lässt. Um die Immunogenität des Trisaccharidhaptons zu bewerten, wurden C57BL/6-Mäuse mit Glykonjugat **20** immunisiert. Eine Grunddosis und zwei Auffrischdosen des Kohlenhydrat-Protein-Konjugats, formuliert mit Freunds Adjuvans, wurden verabreicht. Die Spiegel der gegen Hapten **1** gerichteten Antikörper wurden per Glycan-Mikroarray analysiert. Alle immunisierten Mäuse bildeten spezifische IgG-Antikörper gegen Hapten **1** (Abbildung 1).

Die mit Konjugat **20** immunisierten Mäuse zeigten eine starke IgG-Immunantwort gegen das Trisaccharidhapton, die signifikant höher war als vor der Immunisierung. Selbst in Gegenwart von 150 mM Thiocyanat war eine verstärkte Interaktion der Serumantikörper immunisierter Mäuse mit dem Trisaccharidhapton erkennbar, was auf eine hohe Affinität zwischen Antikörper und Antigen hinweist. Darüber hinaus enthielten die Seren nach Immunisierung Antikörper gegen sowohl das Trägerprotein als auch ein Spacer-Kontrollkon-



Schema 4. Synthese von Trisaccharidhapten **1** und Konjugation an das Trägerprotein CRM197, um Neoglykogenjutat **20** zu erhalten. Reagenzien und Bedingungen: a) TMSOTf, CH_2Cl_2 , -35 bis -10°C , 65–86%; b) Hydrazinacetat, DMF, 74%, oder NH_3 , MeOH, 87%; c) Cl_3CCN , DBU, CH_2Cl_2 , 80%; d) **2**, TMSOTf, CH_2Cl_2 , -40 bis -30°C , 68%; e) 1. NaOMe , MeOH; 2. TBAF, THF, quant.; f) 10% Pd/C, H_2 , MeOH/ $\text{H}_2\text{O}/\text{AcOH}$ 10:10:1, 60–95%. g) Et_3N , Disuccinimidoadipat, DMSO, 37°C , 1.5; h) CRM197-Trägerprotein, PBS (pH 7.4), 37°C , 6 h. Cbz: Carboxybenzyl; PBS: Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung.

strukt (Abbildung 1). Die Immunantwort gegen **1** war jedoch relativ gesehen stärker, sodass davon ausgegangen werden kann, dass die Anti-Trisaccharid-Antwort nicht vom Trägerprotein unterdrückt wurde. Glycan-Mikroarray-Analyse ergab außerdem einen höheren Anteil der Unterklassen IgG1 und IgG2 als IgG3, was zusätzlich auf einen Antikörper-Klassenwechsel hinweist. Nach der Auffrischimmunisierung stieg die Immunantwort der Mäuse auf das Doppelte (Abbildung 1). Sowohl Ig-Klassenwechsel als auch Stärke der Antwort auf die Auffrischdosis können auf die Umwandlung eines T-Zell-unabhängigen Oligosaccharidantigens in ein T-Zell-abhängiges Glykogenjutant zurückgeführt werden.^[17] Die Rekrutierung von T-Zellen durch Triheptose-spezifische B-Zellen führt dabei zu Ig-Klassenwechsel und Generierung von B-Gedächtniszellen.

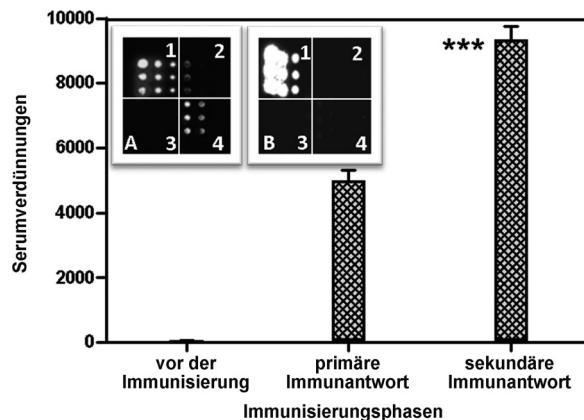


Abbildung 1. Quantifizierung der Anti-Triheptose-IgG-Antwort (Endpunkt-Titer) immunisierter Mäuse mithilfe des Glycan-Mikroarrays. Einschub: Repräsentatives Bild eines Mikroarray-Experiments. Fluoreszenzsignale geben Antikörper-Antigen-Bindung wieder. A) Bindungssignale von Serumantikörpern. B) Bindungssignale von aufgereinigten mAbs. Immobilisiert sind das Triheptoseheptapeptid **1** (Quadrant 1), CRM197 (Quadrant 2), ein nicht verwandtes Oligosaccharid als Negativkontrolle (Quadrant 3) und ein Spacer-Kontrollkonstrukt (Quadrant 4). Balken: Mittelwert \pm Standardabweichung von sechs Mikroarray-Signalen. ***: $P \leq 0.001$ (zweiseitige Student'sche t-Verteilung).

Maus-Splenocyten wurden zur B-Zell-Hybridom-Herstellung isoliert. Nach Subklonierung und wiederholter Selektion wurden fünf Hybridoma erhalten. In jedem Selektionsschritt wurden per Glycan-Mikroarray-Analyse die Klone identifiziert, die Antikörper gegen **1** mit hoher Spezifität und Affinität sezernierten. Ausgewählte Hybridoma wurden in Bioreaktoren kultiviert, und sezernierte Antikörper aus dem Überstand wurden mittels Protein G-Affinitätschromatographie bis zur Homogenität aufgereinigt. Um herauszufinden, ob monoklonale Anti-**1**-Antikörper LPS von *Y. pestis* erkennen, wurde Immunfluoreszenz an fixierten Bakterien durchgeführt und durch konfokale Lasermikroskopie (CLSM) analysiert. Eine spezifische Anfärbung der Bakterien konnte durch einen grün fluoreszierenden Sekundärantikörper (Anti-Maus-FITC) nachgewiesen werden. Die grüne Fluoreszenz war dabei mit der blauen Fluoreszenz des DNA-Farbstoffs 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) kolokalisiert. Sowohl aufgereinigte mAbs als auch Serumantikörper erkannten selektiv die bakterielle Oberfläche, was im Durchlichtbild deutlich wird (Abbildung 2). Somit ist eine wichtige Voraussetzung für die Detektion von *Y. pestis* in biologischen Proben gewährleistet.

Mithilfe von Glycan-Mikroarrays, die synthetische Oligosaccharidstrukturen verwandter, Gram-negativer Bakterien enthielten, wurden die Spezifität der mAbs sowie die Fähigkeit, zwischen verschiedenen Oberflächenglykanen zu unterscheiden, überprüft (Abbildung 3). Anti-**1**-mAbs erkannten ausschließlich Antigen **1** (Abbildung 3, Spot 5), aber keine der übrigen synthetischen Kohlenhydratstrukturen, mit Ausnahme eines Antikörpers, der zusätzlich eine schwache Bindung an Monoheptose aufwies. Darüber hinaus wurde die Fähigkeit zur Bindung der mAbs an natives LPS verwandter Bakterien getestet. Zu diesem Zweck wurden mAbs auf Anti-IgG-Chips immobilisiert, und die Affinität für isoliertes LPS

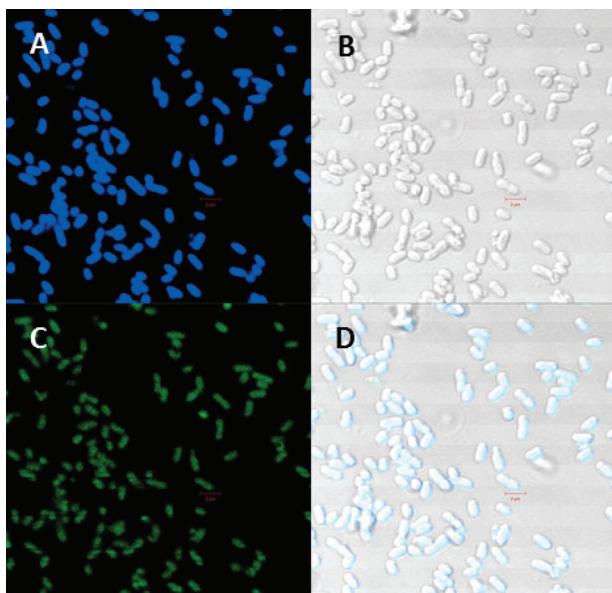


Abbildung 2. CLSM-Bilder der indirekten Immunfluoreszenzfärbung von *Y. pestis* durch mAbs gegen Hapten 1. A) Kontrollfärbung bakterieller DNA mit DAPI. B) Visualisierung der Bakterien im Durchlicht per Differentialinterferenzkontrast. C) FITC-Fluoreszenz des Sekundärantikörpers. D) Überlagerung aller drei Bilder.

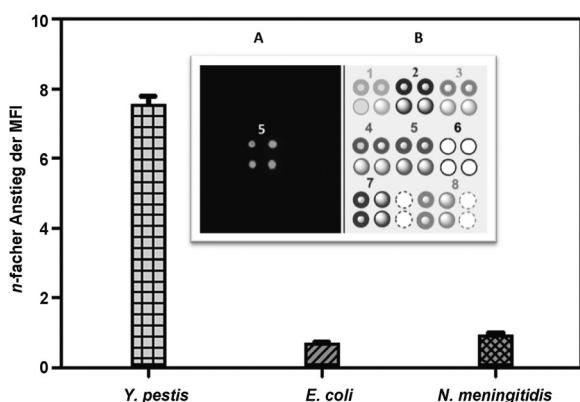


Abbildung 3. Vergleich der Bindung von Anti-*Y. pestis*-mAbs an *Y. pestis*, *E. coli* und *N. meningitidis*. Einschub: Repräsentatives Bild eines Mikroarray-Experiments mit immobilisierten LPS-basierten Oligosacchariden verschiedener Bakterien: A) Mikroarray-Bild; B) Immobilisierungsmuster; 1: Monoheptose, 2: Mono-Kdo, 3: Heptose-Kdo-Disaccharid aller Gram-negativen Bakterien, 4: Tri-Kdo von *C. trachomatis*, 5: Triheptose von *Y. pestis*, 6: Puffer-Kontrolle, 7: Tetrasaccharid der inneren Kernregion von *N. meningitidis* LPS, 8: konserviertes Trisaccharid der LPS-Strukturen aller Gram-negativen Bakterien. MFI = mittlere Fluoreszenzintensität. Balken: Mittelwert \pm Standardabweichung von drei Bindungsexperimenten.

von *E. coli*, *Salmonella typhi* und *Neisseria meningitidis* wurde mithilfe der Oberflächenplasmonenresonanz (SPR) bestimmt. Die Immobilisierung von Antikörpern anstatt LPS an stationärer Phase wurde gewählt, weil bei der Immobilisierung von strukturell heterogenem LPS Ungleichmäßigkeiten auftreten könnten, was zu experimentellen Artefakten führen könnte. Anders als im Fall des synthetischen Trisaccharidan-

tigen von *Y. pestis* war die Interaktion zwischen den mAbs und den LPS-Proben sowohl von *E. coli* O55 als auch *N. meningitidis* vernachlässigbar. Die Spezifität der mAbs wurde dadurch bestätigt, dass eine Interaktion auch mit einem delipidierten LPS-Derivat von *E. coli* O55:B5 ausblieb. Da die LPS-Expression in *E. coli* stark vom verwendeten Stamm abhängt, wurde isoliertes LPS eines anderen Stammes, *E. coli* O127:B8, in Bindungsexperimenten verwendet. Sowohl dieses als auch LPS von *S. typhi* wiesen verstärkte Kreuzreaktivität mit den Anti-*Y. pestis*-mAbs auf. Die Bindung war jedoch immer noch schwächer als die an das *Y. pestis*-LPS-Derivat (siehe Hintergrundinformationen). Die hohe Spezifität der mAbs gegen *Y. pestis*-LPS lässt sich mit den einzigartigen Struktureigenschaften dieses Polysaccharids erklären. Die innere Kernregion der LPS von *E. coli* und *N. meningitidis* ist oft mit verschiedenartigen Modifikationen versehen, z.B. anderen Zuckern oder Phosphaten, Phosphatidylethanolamin oder Phosphatidylcholin.^[18] Erste Sättigungs-Transfer-Differenz(STD)-NMR-spektroskopische Ergebnisse weisen auf eine wichtige Rolle der Hydroxygruppen in den Heptose-Seitenketten für die mAb-Zucker-Bindung hin (nicht gezeigt). Diese Seitenketten sind in LPS von *N. meningitidis* und *E. coli* oft derivatisiert, was erklärt, wie mAbs die verschiedenen LPS-Typen voneinander unterscheiden können. Um weitere Aufschlüsse auf die Bindungsspezifität zu erhalten, wurde die Interaktion der mAbs mit *E. coli* sowie *N. meningitidis* per Durchfluszcytometrie bestimmt. Durch den Einsatz eines Anti-Maus-FITC-Konjugats als Sekundärantikörper ließ sich dabei von der Fluoreszenzintensität auf die Bindungsstärke schließen.

Monoklonale Antikörper gegen *Y. pestis* wiesen eine hohe Bindungsspezifität für diesen Keim auf, aber nicht für *N. meningitidis* und *E. coli*. Daraus lässt sich folgern, dass diese mAbs hochspezifisch sind und selektiv zwischen *Y. pestis* und anderen Gram-negativen Bakterien unterscheiden können.

Zusammengefasst zeigen wir hier, dass synthetische Oligosaccharide, die auf einzigartigen Zelloberflächenglycanen beruhen, die Basis für die Herstellung von Detektionssystemen gegen Bakterien sein können. Anti-Triheptose-mAbs binden *Y. pestis* mit hoher Selektivität und Empfindlichkeit und eignen sich daher zum Einsatz in der patientennahen Labordiagnostik. Die Entwicklung entsprechender Tests ist Gegenstand aktueller Arbeiten.

Experimentelles

Synthese von Trisaccharidantigen 1:

Trichloracetimidat **3** (64 mg, 0.050 mmol) und Alkohol **2** (38 mg, 0.036 mmol) wurden in wasserfreiem CH_2Cl_2 (0.5 mL) über 4-Å-MS (100 mg) vorgelegt. Die Lösung wurde auf -40°C gekühlt und mit TMSOTf (4 μL , 0.022 mmol) versetzt. Die Reaktion wurde 1 h zwischen -40 und -30°C gehalten und anschließend mit wässriger gesättigter NaHCO_3 -Lösung gestoppt. Die organische Phase wurde über MgSO_4 getrocknet und filtriert, und das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch aufgereinigt (Hexane/EtOAc 2:1), und **18** (52 mg, 67%) wurde als farbloses Öl erhalten. Eine Methanollösung (1.5 mL) von **18** (50 mg, 0.023 mmol) wurde mit NaOMe versetzt (0.2 mL, 0.5 M in MeOH) und 15 h bei Raumtemperatur gerührt. Nach Neutralisation mit

Amberlite IR-120 wurde die Reaktionsmischung filtriert und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde nachfolgend in THF gelöst (1 mL) und mit TBAF (0.2 mL, 1 M in THF) versetzt. Die Reaktionsmischung wurde 48 h bei Raumtemperatur gerührt, und anschließend wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der erhaltene Rückstand wurde durch Größenausschlusschromatographie (Sephadex LH-20, Laufmittel MeOH) aufgereinigt. Dabei wurde **19** als farbloses Öl erhalten. Eine Lösung von **19** (37.5 mg, 0.022 mmol) in MeOH/H₂O/AcOH (2 mL, 50:50:1) wurde mit Pd/C versetzt (10%, 100 mg). Die Reaktionsmischung wurde 48 h in einer H₂-Atmosphäre gerührt und filtriert; im Anschluss wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wurde durch Größenausschlusschromatographie (Sephadex LH-20, Laufmittel H₂O) aufgereinigt. **1** (9 mg, 60%) wurde nach Gefriertrocknung als weißes Pulver erhalten.

Konjugation von Trisaccharid **1** an CRM197:

Eine Lösung von Disuccinimidoadipat (0.43 mmol) und Triethylamin (10 µL) in DMSO (100 µL) wurde tropfenweise mit einer Lösung von Trisaccharid **1** (4.27 µmol) in DMSO (100 µL) versetzt. Nach 1.5 h wurde Phosphatpuffer (0.1 M pH 7.4, 0.5 mL) zugegeben und überschüssiges Reagens mit Chloroform extrahiert. Die Extraktion wurde dreimal wiederholt und anschließend wurde die wässrige Phase zentrifugiert (300 g, 5 min), um Spuren von Chloroform zu entfernen. Die wässrige Phase wurde zu einer Lösung von CRM197 (1 mg mL⁻¹ in 0.1 M Phosphatpuffer pH 7.4, 1 mL) gegeben und die Reaktionsmischung 5–6 h bei Raumtemperatur gerührt. Das Glykоконjugат wurde durch Größenausschlusschromatographie oder Ultrafiltration aufgereinigt.

Eingegangen am 25. Februar 2013,
veränderte Fassung am 14. Mai 2013
Online veröffentlicht am 10. Juli 2013

Stichwörter: Antikörper · Lipopolysaccharid · Oligosaccharide · Pathogendetektion

- [1] S. Haensch, R. Bianucci, M. Signoli, M. Rajerison, M. Schultz, S. Kacki, M. Vermunt, D. A. Weston, D. Hurst, M. Achtman, E. Carniel, B. Bramanti, *PLoS Pathog.* **2010**, *6*, e1001134.
[2] R. D. Perry, J. D. Fetherston, *Clin. Microbiol. Rev.* **1997**, *10*, 35.
[3] a) T. V. Inglesby, D. T. Dennis, D. A. Henderson, J. G. Bartlett, M. S. Ascher, E. Eitzen, A. D. Fine, A. M. Friedlander, J. Hauer,

- J. F. Koerner, M. Layton, J. McDade, M. T. Osterholm, T. O'Toole, G. Parker, T. M. Perl, P. K. Russell, M. Schoch-Spana, K. Tonat, W. G. C. Biodefense, *JAMA J. Am. Med. Assoc.* **2000**, *283*, 2281; b) T. V. Inglesby, D. A. Henderson, T. O'Toole, D. T. Dennis, *JAMA J. Am. Med. Assoc.* **2000**, *284*, 1649.
[4] M. B. Prentice, L. Rahalison, *Lancet* **2007**, *369*, 1196.
[5] K. V. Sergueev, Y. X. He, R. H. Borschel, M. P. Nikolic, A. A. Filippov, *Plos One* **2010**, *5*, e11337.
[6] a) D. M. Engelthaler, K. L. Gage, J. A. Montenieri, M. Chu, L. G. Carter, *J. Clin. Microbiol.* **1999**, *37*, 1980; b) J. Guarner, W. J. Shieh, P. W. Greer, J. M. Gabastou, M. Chu, E. Hayes, K. B. Nolte, S. R. Zaki, *Am. J. Clin. Pathol.* **2002**, *117*, 205.
[7] H. Neubauer, H. Meyer, J. Prior, S. Aleksic, A. Hensel, W. Splettstosser, *J. Vet. Med. Ser. B* **2000**, *47*, 573.
[8] O. Lazcka, F. J. Del Campo, F. X. Munoz, *Biosens. Bioelectron.* **2007**, *22*, 1205.
[9] N. Gilmartin, R. O'Kennedy, *Enzyme Microb. Technol.* **2012**, *50*, 87.
[10] a) A. A. Byvalov, Y. S. Ovodov, *Russ. J. Bioorg. Chem.* **2011**, *37*, 400; b) Y. A. Knirel, A. P. Anisimov, *Acta naturae* **2012**, *4*, 46.
[11] Y. A. Knirel, B. Lindner, E. V. Vinogradov, N. A. Kocharova, S. N. Senchenkova, R. Z. Shaikhutdinova, S. V. Dentovskaya, N. K. Fursova, I. V. Bakhteeva, G. M. Titareva, S. V. Balakhnov, O. Holst, T. A. Gremyakova, G. B. Pier, A. P. Anisimov, *Biochemistry* **2005**, *44*, 1731.
[12] T. Ohara, A. Adibekian, D. Esposito, P. Stallforth, P. H. Seeberger, *Chem. Commun.* **2010**, *46*, 4106.
[13] a) F. Y. Avci, D. L. Kasper, *Annu. Rev. Immunol.* **2010**, *28*, 107; b) M. L. Hecht, P. Stallforth, D. V. Silva, A. Adibekian, P. H. Seeberger, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2009**, *13*, 354.
[14] Wir danken Pfenex Ltd. (Reagent proteins, <http://www.reagentproteins.com>) für einen Preisnachlass beim Kauf von CRM197.
[15] M. Bröker, P. Costantino, L. DeTora, E. D. McIntosh, R. Rappuoli, *Biological* **2011**, *39*, 195.
[16] A. Kabanova, I. Margarit, F. Berti, M. R. Romano, G. Grandi, G. Bensi, E. Chiarot, D. Proietti, E. Swennen, E. Cappelletti, P. Fontani, D. Casini, R. Adamo, V. Pinto, D. Skibinski, S. Capo, G. Buffi, M. Gallotta, W. J. Christ, A. S. Campbell, J. Pena, P. H. Seeberger, R. Rappuoli, P. Costantino, *Vaccine* **2010**, *29*, 104.
[17] P. Costantino, R. Rappuoli, F. Berti, *Expert Opin. Drug Discovery* **2011**, *6*, 1045.
[18] C. R. H. Raetz, C. Whitfield, *Annu. Rev. Biochem.* **2002**, *71*, 635.