

linearer Ketten vor, die sich zu einer helicalen Anordnung zusammenlagern: M. A. Withersby, A. J. Blake, N. R. Champness, P. Hubberstey, W.-S. Li, M. Schröder, *Angew. Chem.* **1997**, *109*, 2421–2423; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1997**, *36*, 2327–2329. Die Helizität dieser Verbindungen ist nicht inhärent im Polymer vorhanden.

[9] O. M. Yaghi, G. Li, H. Li, *Nature* **1995**, *378*, 703–706.

[10] D. Venkataraman, G. B. Gardner, S. Lee, J. S. Moore, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 11600–11601.

[11] P. Brunet, M. Simard, J. D. Wuest, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 2737–2738.

[12] K. Endo, T. Sawaki, M. Koyanagi, K. Kobayashi, H. Masuda, Y. Aoyama, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 8341–8352.

[13] A. W. Coleman, S. G. Bott, S. D. Morley, C. M. Means, K. D. Robinson, H. Zhang, J. L. Atwood, *Angew. Chem.* **1988**, *100*, 1412–1413; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1988**, *27*, 1361–1362.

[14] W. L. Jorgensen, D. L. Severance, *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 4768–4774.

[15] Neuere Beiträge zu C–H $\cdots$  $\pi$ -Wechselwirkungen: a) T. Steiner, M. Tamm, B. Lutz, J. van der Mass, *Chem. Commun.* **1996**, 1127–1128; b) M. Asakawa, P. R. Ashton, S. E. Boyd, C. L. Brown, S. Menzer, D. Pasini, J. F. Stoddart, M. S. Tolley, A. J. P. White, D. J. Williams, P. G. Wyatt, *Chem. Eur. J.* **1997**, *3*, 463–481; c) N. N. L. Madhavi, A. K. Katz, H. L. Carrell, A. Nangia, G. R. Desiraju, *Chem. Commun.* **1997**, 1953–1954; d) H.-C. Weiss, D. Bläser, R. Boese, B. M. Doughan, M. M. Haley, *Chem. Commun.* **1997**, 1703–1704.

[16] Kristallstrukturanalyse von **1a** (**1**·Nitrobenzol): tetragonal, Raumgruppe  $P4_32_12$  oder  $P4_12_12$  (die vollständige strukturelle Charakterisierung verschiedener Kristalle ergab, daß sie statistisch verteilt links- oder rechtsgängig sind),  $a = 14.9890(8)$ ,  $c = 27.913(2)$  Å,  $V = 6271.1(6)$  Å $^3$ ,  $Z = 8$ ,  $\rho_{\text{ber.}} = 1.365$  Mg m $^{-3}$ ,  $R_1 = 0.0522$ ,  $wR_2 = 0.1178$  für 5488 von 5533 Reflexen mit  $I > 2\sigma(I)$ . In einem typischen Beispiel wurde der Enantiomorph durch Verfeinerung des Flack-Parameters auf 0.07(2) und den Vergleich mit dem anderen Enantiomorph ( $R_1 = 0.0626$ , Flack-Parameter = 0.93(2)) bestätigt. Die Daten wurden auf einem Siemens-SMART-CCD-Diffraktometer bei 178 K aufgenommen und die Struktur mit SHEXL/TL gelöst und verfeinert. Die Verbindungen **1b**–**f** sind isostrukturell zu **1a**; ihre Kristalle weisen die folgenden Zellparameter [Å] auf: **1b**:  $a = 15.0406(9)$ ,  $c = 27.442(2)$ ; **1c**:  $a = 15.0789(6)$ ,  $c = 27.167(2)$ ; **1d**:  $a = 15.0211(8)$ ,  $c = 27.0920(14)$ ; **1e**:  $a = 14.9608(9)$ ,  $c = 27.180(2)$ ; **1f**:  $a = 15.0643(6)$ ,  $c = 27.0204(14)$ . Lösungsmittel- oder Gastmoleküle erschienen in den chiralen Hohlräumen aller Verbindungen fehlgeordnet, mit Ausnahme von **1a** und **1e**, für die Nitrobenzol- bzw. Chloroform-Dimere aufgelöst wurden. Das Vorliegen von Gastmolekülen in **1b**–**d** und **1f** wurde IR-spektroskopisch bestätigt. Die kristallographischen Daten (ohne Strukturfaktoren) der in dieser Veröffentlichung beschriebenen Strukturen wurden als „supplementary publication no.“ CCDC-102586 und CCDC-102587 (**1a** bzw. **1e**) beim Cambridge Crystallographic Data Centre hinterlegt. Kopien der Daten können kostenlos bei folgender Adresse in Großbritannien angefordert werden: CCDC, 12 Union Road, Cambridge CB21EZ (Fax: (+44) 1223-336-033; E-mail: deposit@ccdc.cam.ac.uk).

[17] a) M. Fujita, O. Sasaki, T. Mitsuhashi, T. Fujita, J. Yazaki, K. Yamaguchi, K. Ogura, *Chem. Commun.* **1996**, 1535–1536; b) P. J. Stang, D. H. Cao, S. Saito, A. M. Arif, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 6273–6283; c) R. V. Slone, D. I. Yoon, R. M. Calhoun, J. T. Hupp, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 11813–11814.

[18] L. R. MacGillivray, J. L. Atwood, *Nature* **1997**, *389*, 469–472.

[19] R. Hoss, O. König, V. Kramer-Hoss, U. Berger, P. Rogin, J. Hulliger, *Angew. Chem.* **1996**, *108*, 1774–1776; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1996**, *35*, 1664–1666.

[20] M. E. Brown, M. D. Hollingsworth, *Nature* **1995**, *376*, 323–326.

[21] M. Sakamoto, *Chem. Eur. J.* **1997**, *3*, 684–689.

## Selektive RGD-vermittelte Adhäsion von Osteoblasten an Implantat-Oberflächen\*\*

Martin Kantlehner, Dirk Finsinger, Jörg Meyer, Patricia Schaffner, Alfred Jonczyk, Beate Diefenbach, Berthold Nies und Horst Kessler\*

Der unphysiologische Charakter synthetischer Werkstoffe äußert sich oft in einer schlechten Integration dieser Materialien nach Implantation in humanes oder tierisches Gewebe. Abstoßungsreaktionen, mangelnde mechanische Stabilität der Biomaterial-Gewebe-Grenzschicht, Infektionen und Entzündungen sind unerwünschte Folgen der unzureichenden aktiven Wechselwirkung zwischen Implantat und angrenzendem Gewebe und erfordern häufig eine Revision des Implantats. Durch Beschichtung von Knochenimplantaten mit integrinspezifischen zellselektiven Molekülen (Integrine sind Glycoproteinrezeptoren der Zellmembran) soll die Grenzschicht durch eine integrinvermittelte Bindung derjenigen körpereigenen Zellen an das Implantat induziert werden, die durch Knochenumbauprozesse („tissue remodeling“) dessen Integration in das Gewebe bewirken. Diese Prozesse erfordern das abgestimmte Zusammenspiel von knochenbildenden Osteoblasten und knochenresorbierenden Osteoklasten, deren Aktivitäten sich in einem natürlichen Gleichgewicht befinden.<sup>[1]</sup> Das Implantat kann einerseits mit den vollständigen natürlichen Adhäsionsproteinen der extrazellulären Matrix beschichtet werden (Fibronektin, Vitronektin, Kollagen),<sup>[2]</sup> andererseits können auch diejenigen kurzkettigen Peptidsequenzen verwendet werden, die die entsprechende adhäsionsvermittelnde Aktivität (z.B. die Sequenz Arg-Gly-Asp (RGD)) enthalten.<sup>[3–9]</sup> Hier berichten wir über eine neue, optimierte Methode der Beschichtung, bei der integrinspezifische Peptidliganden verwendet und kovalent an Polymethylmethacrylat (PMMA), ein übliches Implantatmaterial, gebunden werden. Wir zeigen, daß diese Oberflächen integrintragende Osteoblasten binden, diese zur Proliferation anregen und so die natürliche Geweberegeneration induzieren (Abbildung 1).

Als Integrinliganden verwendeten wir das für den  $\alpha_5\beta_3$ - und den  $\alpha_5\beta_5$ -Rezeptor hochselektive Cyclopeptid c-(RGDFX)-, das als Gruppe X ein Lysin (K) hat (f = D-Phenylalanin)<sup>[10–15]</sup> und an das ein bezüglich der Länge optimierter Spacer und Acrylsäure als Ankergruppe für die Beschichtung von PMMA-Formkörpern geknüpft sind. Wesentlich und für die

[\*] Prof. Dr. H. Kessler, M. Kantlehner, Dr. D. Finsinger  
Institut für Organische Chemie und Biochemie der Technischen Universität München  
Lichtenbergstraße 4, D-85747 Garching  
Fax: (+49) 89-2891-3210  
E-mail: kessler@ch.tum.de

Dr. J. Meyer, P. Schaffner, Dr. B. Nies  
Merck Biomaterial GmbH, Forschung  
Frankfurter Straße 250, D-64271 Darmstadt  
Dr. A. Jonczyk, Dr. B. Diefenbach  
Merck KGaA, Praktische Forschung  
Frankfurter Str. 250, D-64271 Darmstadt

[\*\*] Diese Arbeit wurde vom Fonds der Chemischen Industrie gefördert. Wir danken B. Blessing, G. Fleißner, H.-G. Kreysch und Mona Wolff für die technische Unterstützung.

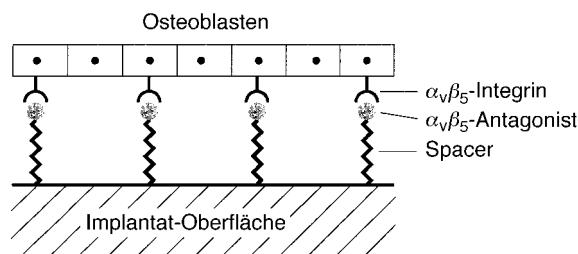


Abbildung 1. Durch  $\alpha_v\beta_5$ -Integrin-Antagonisten vermittelte Adhäsion von Osteoblasten an PMMA-Oberflächen.

die praktische Anwendung wichtig ist, daß das Pentapeptid mit D-Phenylalanin in Nachbarschaft zur Bindungssequenz RGD eine hohe Aktivität und die erforderliche Selektivität für  $\alpha_v$  im Vergleich zum Blutplättchenrezeptor  $\alpha_{IIb}\beta_3$  aufweist, so daß bevorzugt Osteoblasten und nicht Blutplättchen gebunden werden. Wir haben gezeigt, daß RGD-Peptide, die diese Kriterien nicht erfüllen (z.B. lineare Peptide oder auch cyclische Peptide mit der D-Aminosäure in einer anderen Position des Cyclus), keine  $\alpha_v$ -Selektivität und teilweise auch nur eine geringe Aktivität aufweisen.<sup>[11, 14]</sup>

In orientierenden Untersuchungen haben wir c(-RGDfK-) über einen N-Succinylcysteamid-Linker (→ Thiolpeptid **A**)<sup>[16]</sup> und einen 3-Sulfanylpropionsäure(3-Mercaptopropionsäure)-Linker (→ Thiolpeptid **B**)<sup>[16]</sup> und Maleimid an mit Rinderserumalbumin (bovine serum albumin, BSA) modifizierte Oberflächen gebunden und die Adhäsion verschiedener Osteoblastenkulturen untersucht (primäre Human-Osteoblasten, primäre Human-Osteoprogenitorzellen, primäre Ratten-Osteoblasten und MC3T3H1-Maus-Osteoblasten).<sup>[17]</sup> Durch Immunfluoreszenzfärbung mit integrinspezifischen Antikörpern haben wir nachgewiesen, daß alle untersuchten Osteoblastenkulturen  $\alpha_v\beta_5$ - sowie  $\alpha_v\beta_3$ -Integrin exprimieren. Alle untersuchten Osteoblastenkulturen binden an die mit c(-RGDfK-) beschichteten Oberflächen, nicht jedoch die Kontroll-Zelllinie M21L, die weder  $\alpha_v\beta_3$ - noch  $\alpha_v\beta_5$ -Integrin exprimiert (Abbildung 2).

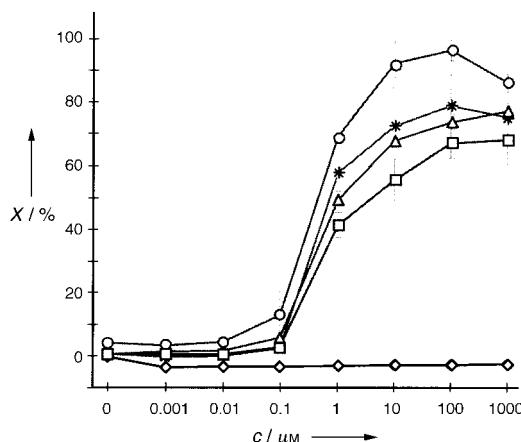


Abbildung 2. Abhängigkeit der Zelladhäsionsrate  $X$  verschiedener Osteoblastenkulturen von der Konzentration des Thiolpeptids **A** ( $c$ ) in der Beschichtungslösung. M21L-Zellen, die weder  $\alpha_v\beta_3$ - noch  $\alpha_v\beta_5$ -Integrin exprimieren (Negativkontrolle), können nicht an die Oberfläche binden. △: primäre Human-Osteoblasten, \*: primäre Human-Osteoprogenitorzellen, □: primäre Ratten-Osteoblasten, ○: MC3T3H1-Maus-Osteoblasten, ◇: humane Melanomzellen (M21L).

Die Osteoblastenbindung erfolgt also über  $\alpha_v\beta_5$ - und über  $\alpha_v\beta_3$ -Integrin, wobei c(-RGDfK-) an beide Rezeptoren bindet.<sup>[11, 12]</sup> Adhäsive Zellen können durch Zugabe von gelöstem c(-RGDfK-) wieder abgelöst werden. Das Negativkontrollpeptid c(-R $\beta$ ADfK-) (Kontroll-Thiolpeptid), bei dem aufgrund einer einzigen eingeschobenen Methylenegruppe am Glycinrest ( $\beta$ -Alanin) die Bindung an Integrine vollständig unterbleibt, bewirkt keine Zelladhäsion der Osteoblasten (Abbildung 3). Dies sind zusätzliche Beweise dafür, daß die

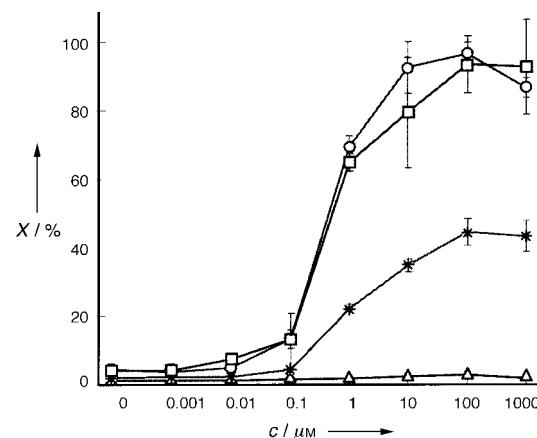


Abbildung 3. Zelladhäsionsrate  $X$  von MC3T3H1-Maus-Osteoblasten in Abhängigkeit von der Peptidkonzentration  $c$  in der Beschichtungslösung. Getestet wurden folgende Thiolpeptide: Thiolpeptid **A** (○), Thiolpeptid **B** (□), Thiolpeptid **C** (\*), Kontroll-Thiolpeptid (△). **A** und **B** weisen c(-RGDfK-) als hochaktiven und selektiven Integrin-Antagonisten auf, **C** dagegen c(-RGDEv-) als inaktiv.

hier auftretende Zelladhäsion auf Integrin-RGD-Peptidwechselwirkungen beruht. Ein Vergleich zweier unterschiedlicher Spacervarianten des Liganden c(-RGDfK-) (Thiolpeptide **A** und **B**) mit dem von Delforge et al. synthetisierten Peptid c(-RGDEv-)<sup>[7]</sup> (Thiolpeptid **C**) zeigt eine deutlich gesteigerte Zelladhäsion für den c(-RGDfK)-Liganden (Abbildung 3).

Zur Beschichtung von PMMA-Oberflächen mit c(-RGDfK-) wird das Peptid über einen Spacer an Acrylsäure als Ankergruppe gebunden und durch radikalische Polymerisation mit dem PMMA-Formkörper verknüpft.<sup>[18]</sup> Offenbar sind freie Doppelbindungen des Polymers für diese Anknüpfung ausreichend.

Zunächst wurde das RGD-Peptid mit dem Linker **1**<sup>[19]</sup> für die Beschichtung eingesetzt. Da an derartig beschichtete Oberflächen keine Osteoblasten binden (Abbildung 4), wurden RGD-Peptide mit den längeren Linkern **2**, **3** und **4**,<sup>[20]</sup> die sich in ihren hydrophilen/hydrophoben Eigenschaften unterscheiden, synthetisiert und zur Beschichtung eingesetzt. Alle drei Acrylpeptide<sup>[21]</sup> stimulieren die Osteoblasten-Adhäsion an die beschichteten Oberflächen, ohne daß dabei signifikante Unterschiede im Adhäsionsverhalten feststellbar sind (Abbildung 4). Dies ist ein Hinweis darauf, daß für eine effektive integrinvermittelte Zelladhäsion an Oberflächen ein Mindestabstand von ca. 3.5 nm zwischen Ligand und Oberfläche vorliegen muß. Wie erwartet, steigt die prozentuale Zelladhäsionsrate (Verhältnis der Zahl der adhärierten Zel-

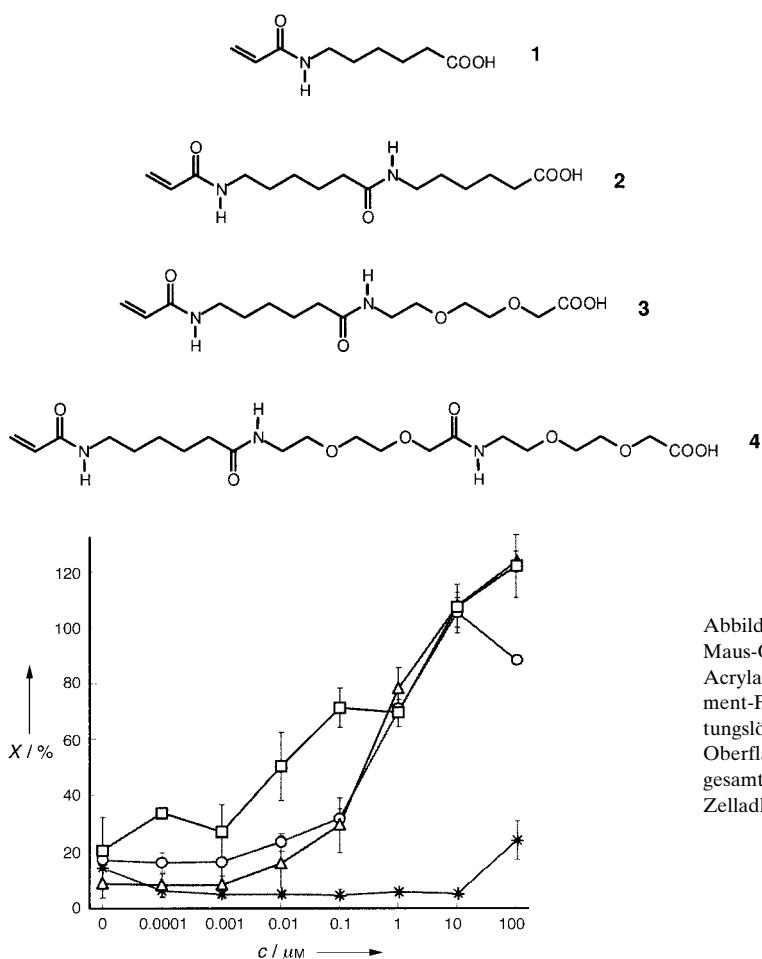


Abbildung 4. Zelladhäsionsrate  $X$  von MC3T3H1-Maus-Osteoblasten in Abhängigkeit von der Peptidkonzentration  $c$  in der Beschichtungslösung. Getestet wurden vier verschiedene Acrylatpeptide, die  $c$ -RGDFK- als Integrin-Antagonisten aufweisen und sich nur bezüglich der Spacer **1–4** unterscheiden. \*: Acrylatpeptid 1, ○: Acrylatpeptid 2, □: Acrylatpeptid 3, △: Acrylatpeptid 4. Der Spacer **1** ist zu kurz für eine effektive Osteoblasten-Adhäsion.

len zur Gesamtzahl der Zellen  $\times 100$ ) mit zunehmender Ligandendichte an der Oberfläche an. Selbst bei einer in diesen Experimenten verwendeten relativ großen Zahl suspendierter Zellen (50 000 pro  $\text{cm}^2$  Oberfläche) binden alle Zellen an die Oberfläche: Es werden also Zelladhäsionsraten bis zu 100 % erreicht (Abbildung 5). Die adhäsierten Zellen waren so fest gebunden, daß sie weder durch Waschen noch durch mechanisches Schütteln von der Oberfläche entfernt werden konnten.

In einer 22 Tage dauernden Untersuchung wurden die Osteoblasten, die an mit RGD-Peptid beschichtete PMMA-Oberflächen anhafteten, bei unterschiedlicher Ligandendichte an der Oberfläche zur Zellproliferation stimuliert: Die Zahl der an der Oberfläche proliferierenden Zellen erhöhte sich innerhalb dieses Zeitraums ungefähr um den Faktor 10. Als Vergleich diente die unbeschichtete PMMA-Oberfläche (Abbildung 6).<sup>[22]</sup> Damit scheint es möglich, eine vollständige Oberflächenbelegung zu erreichen und einen natürlichen Übergang vom Material zum Gewebe herzustellen.

Anhand der vorliegenden Ergebnisse könnten zellfreie und bioaktive Implantate entwickelt werden, die die biologische

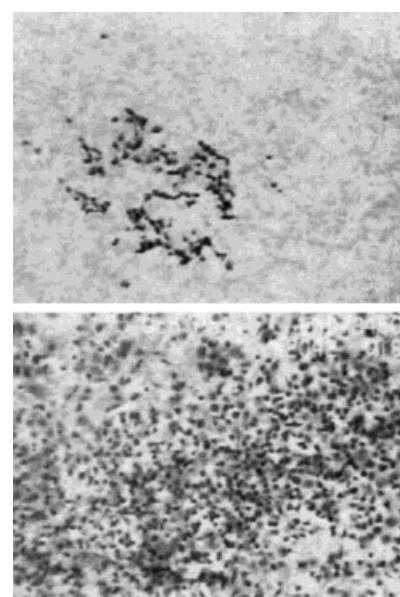


Abbildung 5. Lichtmikroskopische Aufnahme adhäsierter MC3T3H1-Maus-Osteoblasten (dunkel) an unbeschichtete (oben) und mit dem Acrylatpeptid 3 (enthält den Spacer **3**) beschichtete PMMA-Knochenement-Formkörper (unten). Die Peptidkonzentration  $c$  in der Beschichtungslösung betrug 100  $\mu\text{M}$ . Das untere Foto ist für die gesamte beschichtete Oberfläche repräsentativ; auf dem oberen Foto ist die einzige Stelle auf der gesamten unbeschichteten Oberfläche erkennbar, an der in geringem Maß Zelladhäsion auftrat.

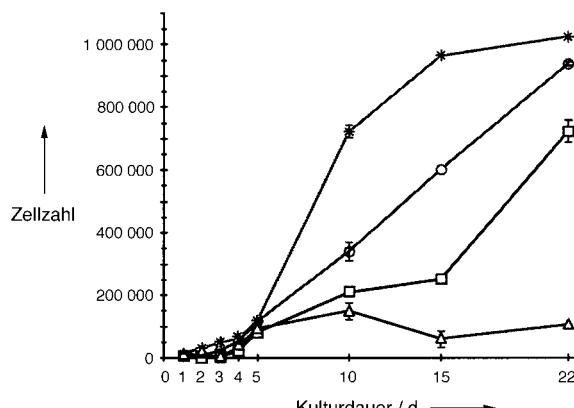


Abbildung 6. Abhängigkeit der Zellzahl PMMA-adhäsierter MC3T3H1-Maus-Osteoblasten von der Kulturdauer (stimulierte Proliferation) bei verschiedenen Peptidkonzentrationen  $c$  (Acrylatpeptid 3) in der Beschichtungslösung. \*: 100  $\mu\text{M}$ , ○: 1  $\mu\text{M}$ , □: 0.01  $\mu\text{M}$  Acrylatpeptid 3. Als Vergleich diente die unbeschichtete Kontrolloberfläche (Δ).

Information zur selektiven Aktivierung derjenigen Zielzellen tragen, die bestimmte Geweberegenerationsprozesse durchführen sollen.

Eingegangen am 3. August 1998 [Z12237]  
International Edition: *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, *38*, 560–562

**Stichwörter:** Bioorganische Chemie • Integrine • Materialwissenschaften • Oberflächenchemie • Peptide

[1] M. Amling, vorgetragen auf der VII. Jahrestagung der Chirurgischen Arbeitsgemeinschaft Biomaterialien (CAB) der Deutschen Gesellschaft für Chirurgie, Hamburg, **1998**.

[2] J. Lahann, D. Klee, H. Klint, A. Ince, H. Höcker, J. Reul, *Proceedings of the 24th Annual Meeting of the Society for Biomaterials* (San Diego), **1998**, 136.

[3] D. L. Hern, J. A. Hubbell, *J. Biomed. Mater. Res.* **1998**, 39, 266–276.

[4] A. Rezania, C. H. Thomas, A. B. Branger, C. M. Waters, K. E. Healy, *J. Biomed. Mater. Res.* **1997**, 37, 9–19.

[5] R. F. Valentini, D. Ferris, C. Di Giovanni, P. Dimond, M. Sherling, G. Moodie, T. Crisco, D. Labrador, M. Ehrlich, *Proceedings of the 23th Annual Meeting of the Society for Biomaterials* (New Orleans), **1997**, 55.

[6] J. R. Glass, W. S. Craig, K. Dickerson, M. D. Pierschbacher, *Mater. Res. Soc. Symp. Proc.* **1992**, 252, 331–337.

[7] D. Delforge, M. Art, B. Gillon, M. Dieu, E. Delaive, M. Raes, J. Remacle, *Anal. Biochem.* **1996**, 242, 180–186.

[8] D. Delforge, B. Gillon, M. Art, J. Dewelle, M. Raes, J. Remacle, *Lett. Pept. Sci.* **1998**, 5, 87–91.

[9] C. Roberts, C. S. Chen, M. Mrksich, V. Martichonok, D. E. Ingber, G. M. Whitesides, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, 120, 6548–6555.

[10] M. Aumailley, M. Gurrath, G. Müller, J. Calvete, R. Timpl, H. Kessler, *FEBS Lett.* **1991**, 291, 50–54.

[11] R. Haubner, R. Gratias, B. Diefenbach, S. L. Goodman, A. Jonczyk, H. Kessler, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, 118, 7461–7472.

[12] M. Friedlander, P. C. Brooks, R. W. Shaffer, C. M. Kincaid, J. A. Varner, D. A. Cheshire, *Science* **1995**, 270, 1500–1502.

[13] M. Pfaff, K. Tangemann, B. Müller, M. Gurrath, G. Müller, H. Kessler, R. Timpl, J. Engel, *J. Biol. Chem.* **1994**, 269, 20233–20238.

[14] R. Haubner, D. Finsinger, H. Kessler, *Angew. Chem.* **1997**, 109, 1440–1456; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1997**, 36, 1374–1389.

[15] Die cyclischen Peptide wurden mit klassischen Methoden der Peptidsynthese hergestellt.

[16] Das Thiolpeptid **A** mit dem *N*-Succinylcysteamin-Anker wurde durch Umsetzen des Cyclopeptids mit Bernsteinsäureanhydrid und Kupplung von *S*-Tritylcysteamin synthetisiert: D. Finsinger, Dissertation, Technische Universität München, **1997**. Die Synthese des Thiolpeptids **B** mit dem 3-Sulfanylpropionsäureamid-Anker ist in folgendem Patent beschrieben: A. Jonczyk, S. Goodman, B. Diefenbach, A. Sutter, H. Kessler (Merck), WO-A 97/14716, **1997** [*Chem. Abstr.* **1997**, 127(2), 17965].

[17] Die Untersuchungen zur Zelladhäsion wurden nach folgendem Literaturverfahren durchgeführt: U. Landegren, *J. Immunol. Methods* **1984**, 67, 379–388.

[18] Die PMMA-Oberflächen wurden durch Lösen der entschützten Acrylpeptide in einer geringen Menge Dimethylsulfoxid, sukzessive Verdünnung mit Isopropylalkohol und Campherchinon-vermittelte radikalische Polymerisation beschichtet. Die beschichteten Oberflächen wurden mehrfach gewaschen und mit  $\gamma$ -Strahlung sterilisiert.

[19] D. D. Pless, Y. C. Lee, S. Roseman, R. L. Schnaar, *J. Biol. Chem.* **1983**, 258, 2348–2349.

[20] Die Linker **1** und **2** wurden nach Lit. [19] synthetisiert, die Linker **3** und **4** wurden in einer Festphasensynthese aus Fmoc-[2-(2-Aminoethoxy)ethoxy]essigsäure (Fmoc = 9-Fluorenylmethoxycarbonyl) und Acrylamidohexansäure (Linker **1**) hergestellt. Die  $^1\text{H}$ -NMR-spektroskopischen Daten des Linkers **1** sind in Einklang mit den Literaturdaten.<sup>[19]</sup> –  $^1\text{H}$ -NMR-Daten der Linker **2–4**: **2** (250 MHz,  $[\text{D}_6]\text{DMSO}$ , 27 °C):  $\delta$  = 8.03 (m, 1H; NH), 7.70 (m, 1H; NH), 6.16 (dd,  $^3J(\text{H},\text{H})$  = 17 Hz, 10 Hz, 1H;  $=\text{CH}$ ), 6.03 (dd,  $^3J(\text{H},\text{H})$  = 17 Hz,  $^2J(\text{H},\text{H})$  = 2.5 Hz, 1H;  $\text{CH}_2=$ ), 5.53 (dd,  $^3J(\text{H},\text{H})$  = 10 Hz,  $^2J(\text{H},\text{H})$  = 2.5 Hz, 1H;  $\text{CH}_2=$ ), 3.15–2.95 (m, 4H; N–CH<sub>2</sub>), 2.17 (t,  $^3J(\text{H},\text{H})$  = 7 Hz, 2H;  $\text{CH}_2\text{COO}$ ), 2.02 (t,  $^3J(\text{H},\text{H})$  = 7 Hz, 2H;  $\text{CH}_2\text{CON}$ ), 1.55–1.15 (m, 12H;  $(\text{CH}_2)_3$ ). **3** (250 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , 27 °C):  $\delta$  = 6.87 (m, 1H; NH), 6.43 (m, 1H; NH), 6.25 (dd,  $^3J(\text{H},\text{H})$  = 17 Hz,  $^2J(\text{H},\text{H})$  = 2 Hz, 1H;  $\text{CH}_2=$ ), 6.11 (dd,  $^3J(\text{H},\text{H})$  = 17, 10 Hz, 1H;  $=\text{CH}$ ), 5.62 (dd,  $^3J(\text{H},\text{H})$  = 10 Hz,  $^2J(\text{H},\text{H})$  = 2 Hz, 1H;  $\text{CH}_2=$ ), 4.13 (s, 2H; O–CH<sub>2</sub>–COO), 3.99 (s, 2H; O–CH<sub>2</sub>–CON), 3.80–3.25 (m, 18H;  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}$ , N–CH<sub>2</sub>), 2.20 (t,  $^3J(\text{H},\text{H})$  = 7 Hz, 2H;  $\text{CH}_2\text{CON}$ ), 1.75–1.27 (m, 6H;  $(\text{CH}_2)_3$ ). **4** (250 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , 27 °C):  $\delta$  = 7.30 (m, 2H; NH), 6.67 (m, 1H; NH), 6.25 (dd,  $^3J(\text{H},\text{H})$  = 17 Hz,  $^2J(\text{H},\text{H})$  = 2 Hz, 1H;  $\text{CH}_2=$ ), 6.11 (dd,  $^3J(\text{H},\text{H})$  = 17, 10 Hz, 1H;  $=\text{CH}$ ), 5.62 (dd,  $^3J(\text{H},\text{H})$  = 10 Hz,  $^2J(\text{H},\text{H})$  = 2 Hz, 1H;  $\text{CH}_2=$ ), 4.13 (s, 2H; O–CH<sub>2</sub>–COO), 3.99 (s, 2H; O–CH<sub>2</sub>–CON), 3.80–3.25 (m, 18H;  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}$ , N–CH<sub>2</sub>), 2.20 (t,  $^3J(\text{H},\text{H})$  = 7 Hz, 2H;  $\text{CH}_2\text{CON}$ ), 1.75–1.27 (m, 6H;  $(\text{CH}_2)_3$ ).

[21] Die Kupplung der Linker **1–4** an das Peptid wurde mit 1-(3-Dimethylaminopropyl)-3-ethylcarbodiimidhydrochlorid (EDCI-HCl) in DMF durchgeführt, die Arg- und Asp-Schutzgruppen wurden mit 95 % Trifluoressigsäure abgespalten, die Acrylpeptide wurden

durch präparative HPLC gereinigt. Die Verbindungen wurden  $^1\text{H}$ -NMR-spektroskopisch (250 MHz) sowie durch HPLC-MS-Messungen charakterisiert, wobei die erwarteten NMR- und Massenspektren erhalten wurden.

[22] Die Proliferation der Zellen wurde mit dem WST-1-Verfahren nachgewiesen: J. A. Cook, J. B. Mitchell, *J. Immunol. Methods* **1983**, 65, 55–63.

## Ein totalsynthetischer Globo-H-Kohlenhydrat-Impfstoff verursacht eine gezielte humorale Immunantwort bei Prostatakrebs-Patienten: der Beweis des Prinzips\*\*

Govindaswami Ragupathi, Susan F. Slovin, Sucharita Adluri, Dalibor Sames, In Jong Kim, Hyunjin M. Kim, Maria Spassova, William G. Bornmann, Kenneth O. Lloyd, Howard I. Scher, Philip O. Livingston und Samuel J. Danishefsky\*

Die Mobilisierung des menschlichen Immunsystems gegen Krebskrankungen ist seit langem ein Wunschtraum der Medizin.<sup>[1, 2]</sup> Idealerweise würde ein Impfstoff, der aus einem bestimmten tumorassoziierten Antigen oder aus einer ganzen Reihe von Zelloberflächen-Antigenen besteht, durch effektive Stimulierung des Immunsystems eine aktive Immunantwort gegen die Krebszellen auslösen, die entsprechend strukturierte Verbindungen auf ihrer Oberfläche exprimieren.<sup>[3]</sup> Unsere Forschung konzentriert sich auf die Entwick-

[\*] Prof. Dr. S. J. Danishefsky,<sup>[+]</sup> Dr. D. Sames,<sup>[+]</sup> Dr. I. J. Kim, H. M. Kim<sup>[+]</sup>

Laboratory for Bioorganic Chemistry  
Sloan-Kettering Institute for Cancer Research  
1275 York Avenue, New York, NY 10021 (USA)  
Fax: (+1)212-772-8691  
E-mail: c-kandell@ski.mskcc.org

Dr. G. Ragupathi, Dr. S. Adluri, Dr. P. O. Livingston  
Laboratory for Tumor Vaccinology  
Sloan-Kettering Institute for Cancer Research

Dr. S. F. Slovin, Dr. H. I. Scher  
Laboratory for Genitourinary Oncology  
Sloan-Kettering Institute for Cancer Research

Dr. M. Spassova, Dr. W. G. Bornmann  
Preparative Synthesis Core Facility  
Sloan-Kettering Institute for Cancer Research

Dr. K. O. Lloyd  
Laboratory for Tumor Antigen Immunochimistry  
Sloan-Kettering Institute for Cancer Research

[+] Weitere Adresse:  
Department of Chemistry, Columbia University  
Havemeyer Hall, New York, NY 10027 (USA)

[\*\*] Diese Arbeit wurde von den National Institutes of Health (S.J.D., AI-16943, CA-28824; K.O.L., CA-71506; P.O.L., CA-61422), durch einen Sloan Kettering Institute Core Grant (CA-08748) sowie von Pepsico, CapCure, der Milstein Family Foundation und Swim Across America gefördert. D.S. (Irvington Institute) bedankt sich für ein Postdoktorandenstipendium, H.M.K. (US Army Breast Cancer Grant DAM D 17-97-1-7119) für ein Promotionsstipendium.