

2. Immunogensynthese und -analytik

2.1 Der Syntheseweg

Der günstigste Weg für die Synthese eines 6-APA-Immunogens scheint über die Acylierung der 6-APA zu führen. Die Kopplung an das Protein kann auf schonendem Wege bei neutralem pH über eine Nitrenreaktion erfolgen. Allerdings beschreibt Fischer [151] die Spaltung von β -Lactamen durch UV-Licht. Diese Spaltung ist substituenten- und lösungsmittelabhängig. Versuche mit der elektrochemischen Detektion nach UV-Bestrahlung zeigten, daß bei allen Penicillinen eine photochemisch induzierte Veränderung auftritt [45, 46]. Später zeigte sich, daß unter den gewählten Bedingungen offenbar keine Veränderungen an der Penicillinstruktur auftraten (s. Kap. 4.2.1.1.2 und 4.3.1.1.2). Als Spacer ist somit ein Molekül erforderlich, das sowohl eine Azidfunktion als auch eine Carboxylfunktion trägt. Hier bietet sich Azidbenzoesäure an.

Die Immunogensynthese erfolgte nach dem folgenden Schema (Abb. 2-1).

2.2 Synthese von p-Azidbenzoesäure

p-Azidbenzoesäure ist nicht im Handel erhältlich. Sie ist jedoch leicht über p-Aminobenzoessäure zugänglich. Die Synthese wurde nach Galardy et al. [152] mit geringen Modifikationen durchgeführt: Das Ende der Diazotierungsreaktion wurde mit Kaliumiodid-Stärke-Papier überprüft und die Trocknung des Endproduktes erfolgte über di-Phosphorpentoxid im Vakuum.

Der Schmelzpunkt des Produktes von 182 - 183 °C stimmte mit dem von Galardy et al. angegebenen überein (183 °C).

Die Umsetzung des Edukts wurde mittels DC/UV-Detektion überprüft. Sie war vollständig, das Produkt war einheitlich. Als R_f -Werte wurden auf Kieselgel mit Petrolether/Diethylether/Eisessig (8 + 5 + 10, v/v/v) ermittelt: p-Aminobenzoessäure: 0,75 und p-Azidbenzoesäure 0,90.

Die Aufnahme eines IR-Spektrums zeigte, daß die Einführung der Azidfunktion gelungen war (Abb.

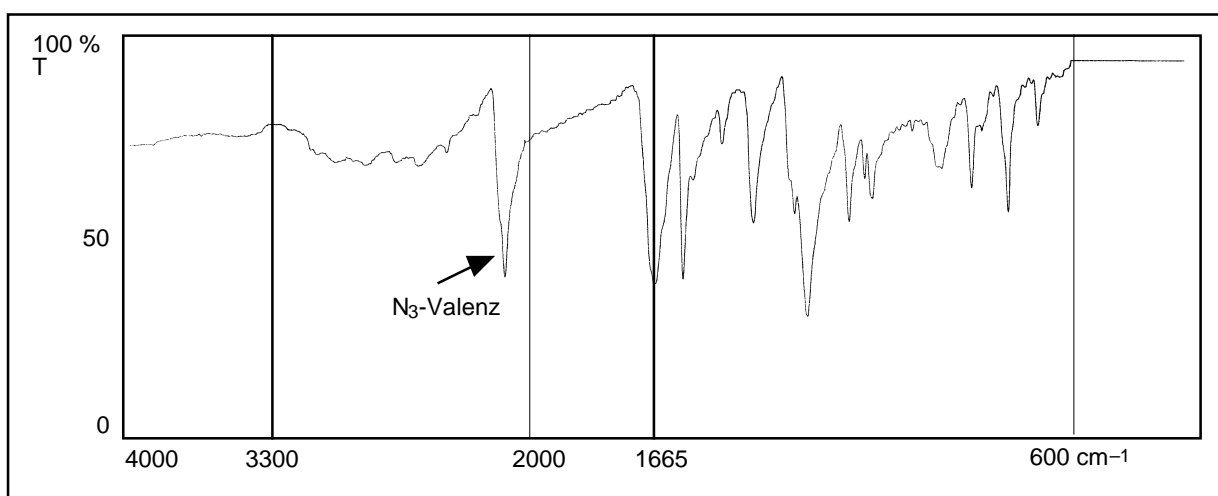


Abb. 2-2: Infrarotspektrum von p-Azidbenzoesäure (KBr-Preßling)

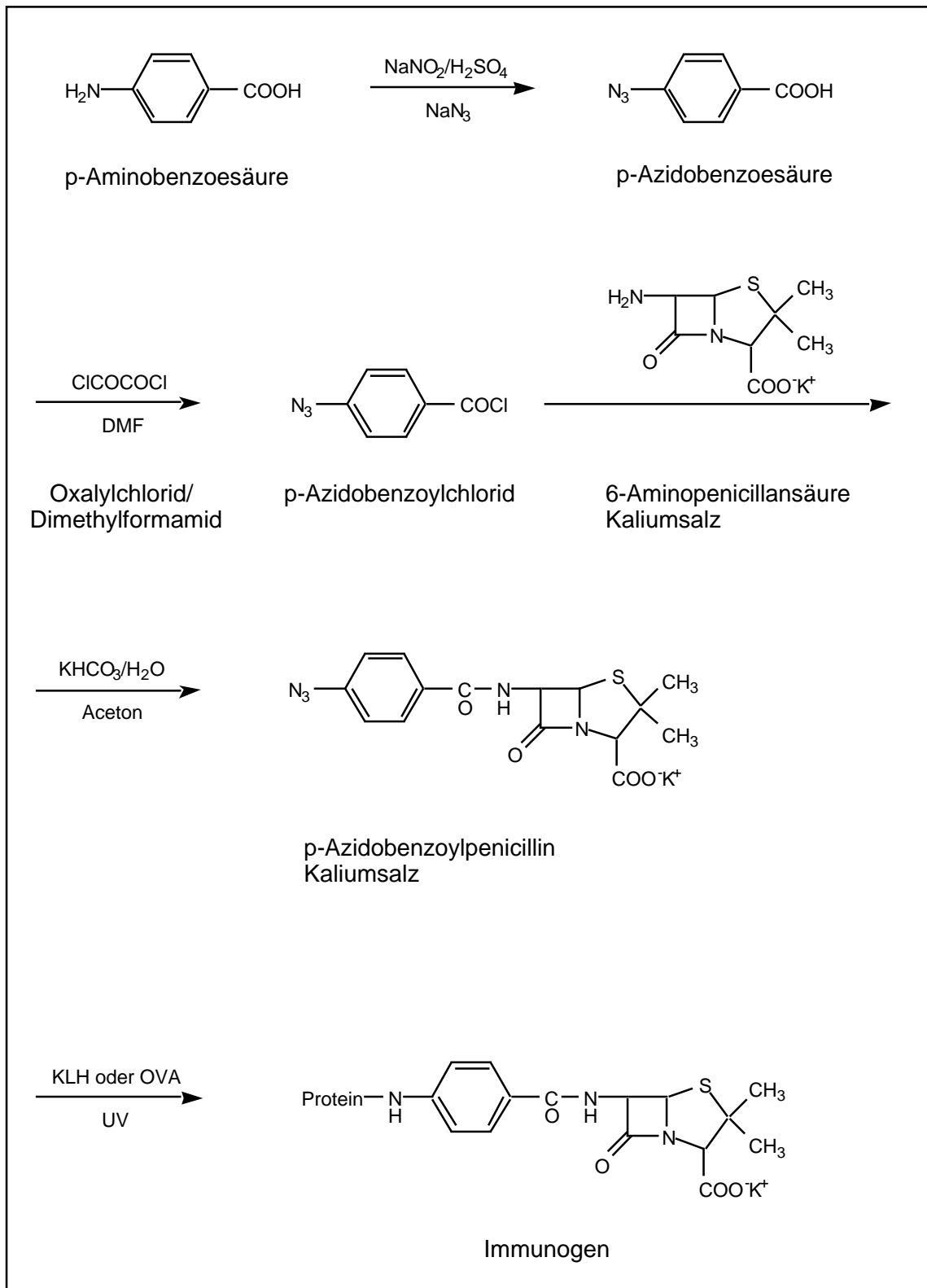


Abb. 2-1: Syntheseweg des Immunogens

2-2). Das Auftreten einer Bande bei 2100 cm^{-1} wird durch die Azid-Valenzschwingung bedingt [104], außerdem verschwanden die Amino-Valenzen bei 3340 und 3440 cm^{-1} [104, 153].

2.3 Synthese von p-Azidobenzoylchlorid

Da die direkte Kopplung von p-Azidobenzoesäure an 6-APA nicht erfolgreich war (s. Kap. 2.6), sollte der Weg über das Säurechlorid eingeschlagen werden.

Die Synthese von Säurechloriden kann u.a. mit Hilfe von Thionylchlorid, Phosphortrichlorid und Phosphorpentachlorid erfolgen [154]. Ein bequemer Weg führt über Oxalylchlorid. Die Nebenprodukte Kohlenmonoxid, Kohlendioxid und Chlorwasserstoff lassen sich leicht durch Anlegen eines Vakuums entfernen. Die Verwendung anderer Methoden erfordern häufig den Einsatz von aufwendigeren Vakuumdestillationen. Katalysiert man die Reaktion mit Dimethylformamid (DMF), benötigt man nur einen geringen Überschuß an Oxalylchlorid [155, 156].

Der letztgenannte Weg wurde zur Synthese von p-Azidobenzoylchlorid eingeschlagen.

Der Zersetzungspunkt des Produktes lag bei $39\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Bei der DC-Untersuchung (Kieselgel F, Toluol/Essigester (6 + 4, v/v)) zeigte sich ein einheitliches Produkt mit einem R_f -Wert von 0,95, während p-Azidobenzoesäure einen R_f -Wert von 0,60 aufwies. Im IR konnte die C=O-Valenz bei 1720 und 1755 cm^{-1} von Säurehalogeniden identifiziert werden. Diese sind bei Wellenlängen von $1700 - 1785\text{ cm}^{-1}$ zu finden [104]. Es war keine C=O-Valenz von organischen Säuren bei 1665 cm^{-1} sichtbar. Außerdem war die N_3 -Valenz bei 2100 cm^{-1} vorhanden (Abb. 2-3).

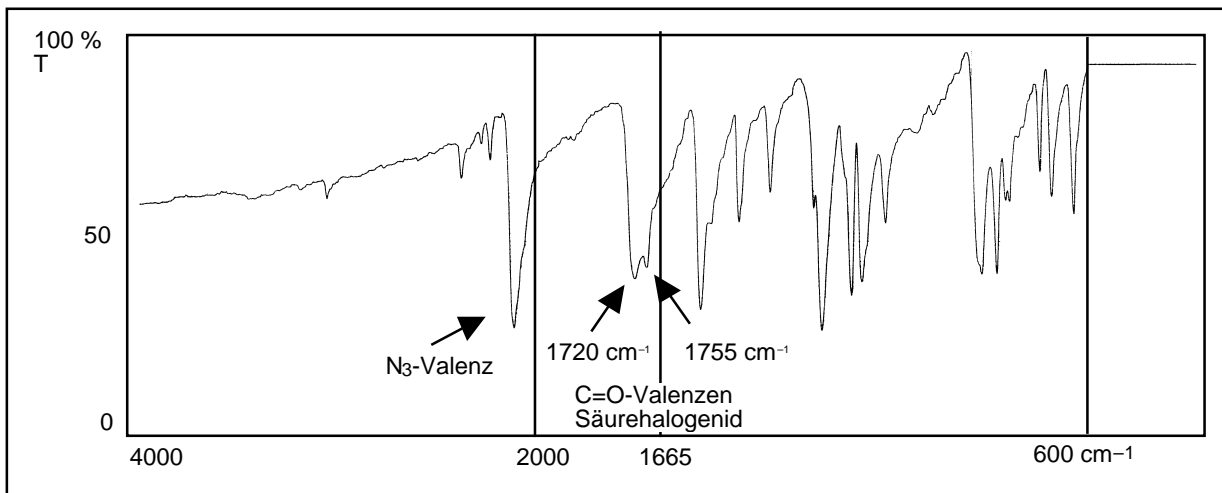


Abb. 2-3: Infrarotspektrum von p-Azidobenzoylchlorid (KBr-Preßling)

2.4 Synthese von p-Azidobenzoylpenicillin

Die Reaktion von 6-APA mit Säurechloriden wird in der Literatur unterschiedlich beschrieben: Sjöberg und Ekstrom [157] setzen 6-APA als Trimethylsilylderivat ein und verwenden als Lösungsmittel Tetrahydrofuran (THF).

Calam et al. [158] beschreiben die Reaktionsführung in wäßrig-acetonischer Lösung bei pH 7,9. Oft wird in wäßrig-acetonischer Lösung unter Zugabe von Natriumhydrogencarbonat gearbeitet [101, 159, 160, 161].

Dieser Weg wurde auch hier gegangen. Es wurde ein Produkt mit einem Zersetzungspunkt von 38 °C erhalten.

Die DC wurde mit tert. Butanol/Wasser (1 + 19, v/v) als Fließmittel (modifiziert nach [162]) und mit UV- und Iodazid-Detektion [163, 164] durchgeführt. Das Produkt war einheitlich. Als R_f -Werte wurden ermittelt: p-Azidobenzoylchlorid: 0,84; 6-APA: 0,07; p-Azidobenzoylpenicillin: 0,28.

Im IR zeigten sich zwei charakteristische Banden: die N_3 -Valenz bei 2100 cm^{-1} und die Carbonylschwingung des β -Lactamringes bei 1760 cm^{-1} (Abb. 2-4).

In der Literatur wird für einen β -Lactamring, der an einen Thiazolidinring kondensiert ist, der Bereich von 1760 bis 1780 cm^{-1} angegeben [6, 7, 160, 165, 166].

Im 1H -NMR-Spektrum konnten die Protonen am Aromaten und die Protonen der 6-APA zugeordnet werden [4, 167 - 169] (Abb. 2-5).

2.5 Direkte Kopplung von Azidobenzoesäure an 6-APA

Die Kopplung von Carbonsäuren an die Aminofunktion von 6-APA kann auf verschiedenen Wegen durchgeführt werden. Eine Methode führt über die Katalyse mit Penicillin-G-Acylase [170].

Die Methode über das gemischte Anhydrid wird mit Chlorameisensäureethylester ohne [171] oder mit Zusatz von Triethylamin (TEA) [159] oder mit Chlorameisensäurebutylester mit TEA-Zusatz [160] beschrieben.

Ein anderer Weg zur Knüpfung von Amidbindungen führt über Katalyse mit N-Hydroxysuccinimid (NHS). Dabei muß in neutraler oder leicht saurer Lösung gearbeitet werden, da NHS im Alkalischen sehr schnell hydrolysiert. Da 6-APA nur im schwach Alkalischen durch Salzbildung löslich ist, konnte diese Reaktion nicht verwendet werden.

Die Kopplung von Azidobenzoesäure an 6-APA sollte aufgrund der einfachen Reaktionsführung nach Rehse und Ritter [171] erfolgen. Eine IR-Analyse des Produktes zeigte jedoch, daß die Azidfunktion nach der Umsetzung nicht mehr vorhanden war. Die direkte Reaktion von 6-APA mit p-Azidobenzoesäure wurde daher nicht weiter verfolgt.

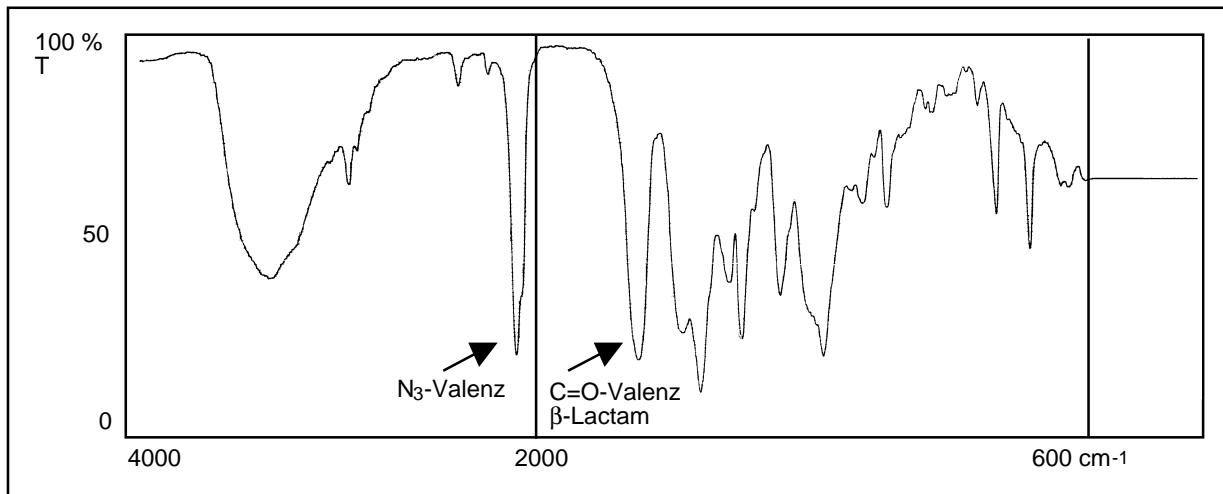


Abb.2-4: Infrarotspektrum von p-Azidobenzoylpenicillin (KBr-Preßling)

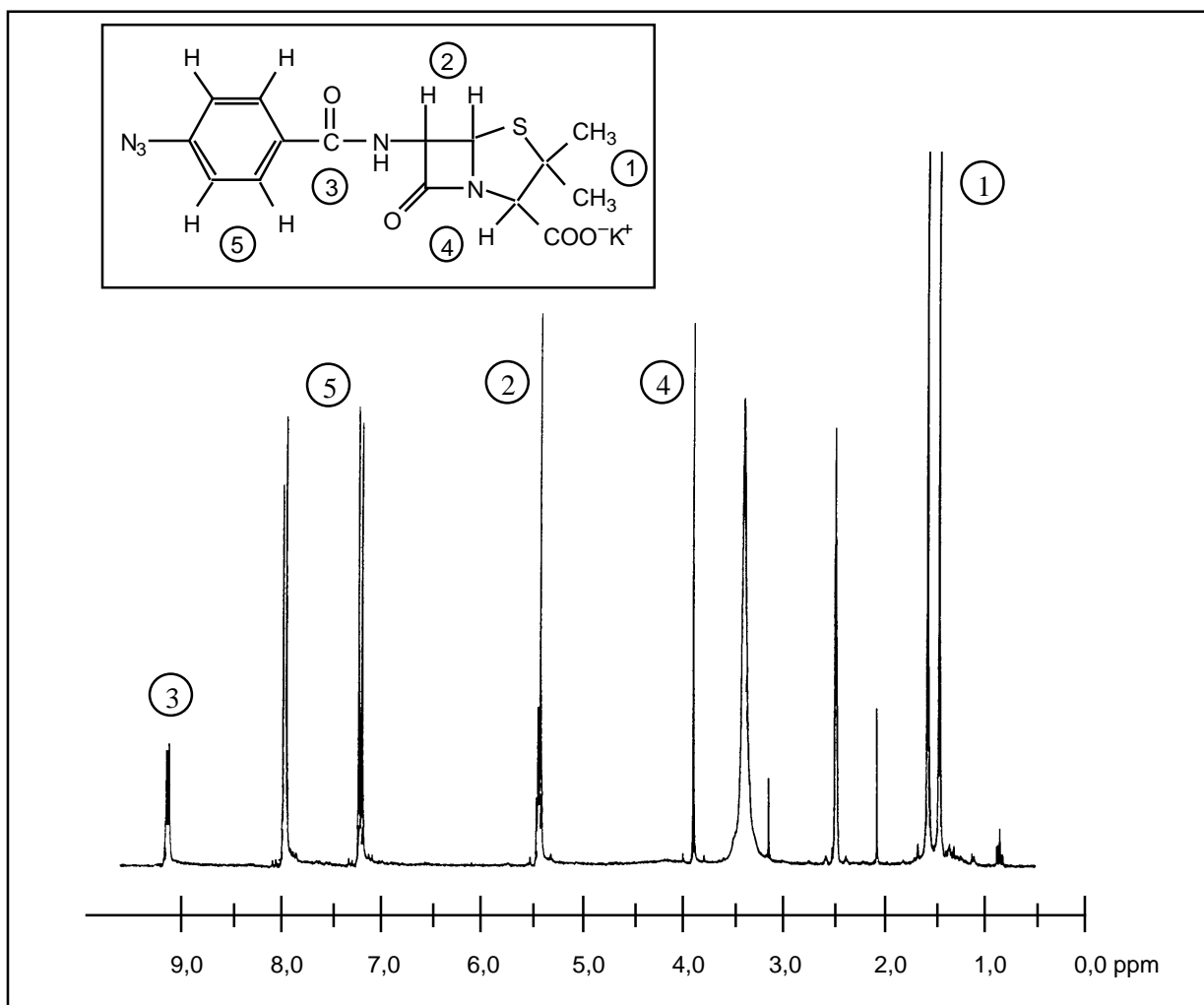


Abb. 2-5: ^1H -NMR-Spektrum von p-Azidobenzoylpenicillin (in DMSO-d_6)

2.6 Photochemische Kopplung

p-Azidobenzoylpenicillin hat bei 200 und 267 nm je ein Extinktionsmaximum. Das Maximum bei 267 nm nimmt bei UV-Bestrahlung ab, während sich das Maximum bei 200 nm nicht verändert. Diese Beobachtung stimmt mit der Beschreibung von Bayley und Knowles [105] überein.

Die Photoreaktion wurde durch Bestrahlen mit einer Niederdruckquecksilberdampflampe gestartet. Dabei wurde die Lösung eiskalt gehalten. Die Azidkomponente wurde langsam zugegeben, um intermolekulare Reaktionen des Azids zu minimieren. Eine erneute Zugabe erfolgte erst, wenn die durch die Azidgruppe verursachte Extinktion bei 267 nm auf $\frac{1}{3}$ des Ausgangswertes abgesunken war.

Als Trägerproteine wurden KLH und OVA eingesetzt. Beide Proteine stammen nicht von Säugern und lassen so aufgrund der phylogenetischen Distanz eine hohe Immunogenität im Kaninchen erwarten.

Die Reaktionsausbeute läßt sich durch volumetrische Bestimmung des freigesetzten Stickstoffes ermitteln [109]. Hier wird vorausgesetzt, daß der nicht mehr nachweisbare Anteil des Azids auch einen Reaktionspartner gefunden hat und daß kein Anteil durch Umlagerung verloren gegangen ist.

Diese Methode setzt eine präzise Apparatur zur Bestimmung kleiner Gasmengen voraus.

Meistens wird die Reaktionsausbeute jedoch durch Bestimmung einer charakteristischen Extinktion der eingeführten Gruppe berechnet.

Da p-Azidobenzoylpenicillin keine charakteristische Extinktion besitzt, mußte ein anderer Weg gefunden werden.

2.7 Bestimmung der Belegungsdichte

Zum Abschluß der Synthese sollte bestimmt werden, wie hoch die Belegungsdichte der Proteine mit 6-APA war. Oft wird dazu die Anzahl der derivatisierten Amino- oder Carboxylfunktionen am Protein herangezogen. Diese Methode scheidet aus, da die zur Kopplung verwendete Nitrenreaktion unspezifisch ist und keine bestimmte funktionelle Gruppe im Protein angreift.

Eine weitere Möglichkeit ergibt sich, wenn das Hapten eine spezifische Absorption aufweist, aufgrund derer es sich am Protein quantifizieren läßt. Da das an das Protein gekoppelte 6-APA-Derivat keine spezifische Absorption besitzt, scheidet diese Methode aus.

Obwohl diese beiden am häufigsten eingesetzten Methoden nicht einsetzbar waren, standen eine Reihe sowohl direkter als auch indirekter Verfahren zur Verfügung. Die direkten Verfahren lieferten jedoch keine plausiblen Ergebnisse, so daß die Belegungsdichte nur indirekt bestimmt werden konnte:

- *HPLC des durch Dialyse abgetrennten, nichtgebundenen 6-APA-Anteils* nach Derivatisierung mit BrMMC [43]. Dazu wurde ein Aliquot des Dialysates lyophilisiert und unter Kronenetherkatalyse mit 4-Brommethyl-7-methoxycumarin derivatisiert. Der Gehalt des 6-Azidobenzoylpenicillins im Dialysat lag unterhalb der Nachweisgrenze. Diese lag unterhalb von 20 % des zur Immunogensynthese eingesetzten Derivates. Die Reaktionsausbeute bei der Synthese lag also bei mindestens 80 %.

- *Photometrisch*: Das 6-APA-Derivat besitzt ein Extinktionsmaximum bei 267 nm, das von der Azidfunktion stammt. Mit zunehmendem Abbau des Azids wird das Maximum geringer. Über die Differenz der Extinktionen vor und nach der Photoreaktion kann ebenfalls die Reaktionsausbeute errechnet werden.

Direkte Methoden:

- *Derivatisierung mit 1,2,4-Triazol in Gegenwart Quecksilber-II-chlorid* [35], es entsteht ein Derivat mit einem Extinktionsmaximum bei 325 nm.

- *Iodometrisch nach alkalischer Hydrolyse* zu Penicilloinsäure [101]. Penicilloinsäure reagiert mit Iod im Verhältnis von 6 - 9 Iod/Penicilloinsäure. Es handelt sich um ein empirisches Verfahren, die Reaktionsgleichung ist ungeklärt und läuft nicht stöchiometrisch ab.

- *Bestimmung als Penamaldat* durch Umsetzung mit p-Hydroxymercuribenzoessäure mit Detektion bei 260 nm [97, 172].

Diese drei Bestimmungsmethoden führten zu unreproduzierbaren und unplausiblen Ergebnissen, wenn sie zur Ermittlung der Belegungsdichte von 6-APA auf KLH oder OVA eingesetzt wurden.

- *SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)* (nur OVA-Immungene, da KLH aufgrund seiner Größe nicht in das Gel einläuft) [173].

Das verwendete Ovalbumin erzeugt in der SDS-PAGE eine diffuse Bande, die über einen Molekulargewichtsbereich von 39,8-48,6 kDa reicht. Eine Auswertung eines Laufstreckenunterschiedes, der im Bereich von 5 kDa erwartet wird (bei einer Belegungsdichte von 100 µg/mg, entsprechend einer Molekulargewichtszunahme von 10 %), war daher nicht möglich.

- *Protein-HPLC an einer RP-8 (10 µm)-Phase* [174, 175].

Es wurden mit verschiedenen Eluenten und Gradienten entweder keine Elution oder aber keine Trennung erzielt.

- *Die Veresterung der Carboxylfunktion der 6-APA mit einer radioaktiv markierten Methylgruppe* schien ein aussichtsreicher Weg zu sein. Durch die Bestimmung der eingeführten Radioaktivität sollte eine quantitative Aussage gemacht werden.

Die Veresterung kann mit Iodmethan/Natriumhydrid/Dimethylformamid [176], mit Iodmethan/Pyridin [177], Iodmethan [178], Methanol/Carbodiimid [179, 180], mit Iodmethan/Kaliumhydroxid/Dimethylsulfoxid (DMSO) [181] oder mit Iodmethan/DMSO/Calciumoxid [182] durchgeführt werden.

Auch die Umsetzung mit Methanol unter Säurekatalyse ist theoretisch möglich [154], jedoch sind hier nur geringe Ausbeuten aufgrund der Gleichgewichtsreaktion zu erwarten. Eine Verschiebung des Gleichgewichtes ist durch einen großen Überschuß Methanol zu erreichen, jedoch ist dann eine Öffnung des β -Lactamringes durch nucleophilen Angriff des Alkohols zu erwarten.

Die Methylierung mit Diazomethan ist prinzipiell möglich [161], jedoch ist Diazomethan nicht radioaktiv markiert erhältlich.

Die Methylierung mit Methanol und Carbodiimid wurde zunächst mit nichtmarkierten Reagenzien mit verschiedenen Methoden durchgeführt. In wäßriger Lösung bei pH 5,0 [180] sowohl bei Raumtemperatur als auch bei 30 °C wurden entgegen Literaturangaben nur geringe Ausbeuten erzielt (Kontrolle mit DC). Bei pH 7 waren die Ausbeuten noch geringer.

Die IR-Untersuchung des mit Diethylether und Ethylacetat extrahierten Reaktionsproduktes zeigte, daß der β -Lactamring geöffnet wurde (fehlende Bande bei 1760 cm^{-1}) und kein einheitliches Produkt erhalten wurde.

Die Durchführung in wasserfreiem Medium sollte die Konkurrenzreaktion der Hydrolyse des Carbodiimides verhindern. Daher wurde getrocknetes Methanol als Lösungsmittel verwendet [177]. Die Ringöffnung durch nucleophilen Angriff des Methanols ist jedoch wahrscheinlich. Außerdem müßte für eine Markierung des Esters das Lösungsmittel radioaktiv sein. Als Katalysator wurde zusätzlich Pyridin verwendet. Die Reaktionsausbeute war jedoch auch hier nur unbefriedigend.

Nach Extraktion der Produkte mit Cyclohexan und Ethylacetat wurden IR-Spektren aufgenommen. Es zeigte sich, daß der β -Lactamring gespalten war und daß verschiedene Produkte isoliert wurden.

Auch mit Iodmethan [181] wurden keine einheitlichen Produkte erhalten, da das Reagenz an verschiedenen Punkten angreift.

- Die *Iodierung des Aromaten* schien zunächst ebenfalls ein möglicher Weg zu sein. Dazu muß von p-Azidosalicylsäure ausgegangen werden, da Azidobenzoesäure aufgrund des durch die Azidfunktion deaktivierten Ringes nicht iodiert werden kann. Die Synthese von p-Azidosalicylsäure wurde u.a. von Arán et al. [183] beschrieben.

Nach Hendriksen und Burchardt [184] ist jedoch bei der Photolyse von Arylaziden die Eliminierung von Iod mit anschließender Reduktion zu Anilin zu beobachten. Auch Watt et al. [111] beschreiben, daß sich iodierete Arylazide anders als nicht iodierete verhalten. Die Bildung von Anilin findet auch bei Anwesenheit von Aminen statt, Iod wird teilweise eliminiert.

Dadurch sind keine quantitativen Aussagen möglich.

- Ein weiterer Weg zur Charakterisierung des Immunogens kann über die *Schwingung der β -Lactam-Carbonylgruppe im Infrarotspektrum* führen. Ovalbumin zeigt bei 1760 cm^{-1} keine Schwingung. Ein Spektrum eines Ovalbumin-6-APA-Gemisches in demselben Verhältnis wie es zur Synthese eingesetzt wurde, zeigte eine schwache Schwingung, die jedoch zu klein für eine quantitative Auswertung war. Mit UV bestrahltes Ovalbumin hatte ein gegenüber dem nativen Protein ein stark verändertes Spektrum, es schien durch die Bestrahlung verändert zu werden.

Im Spektrum des Immunogens war keine Schwingung bei 1760 cm^{-1} zu sehen, diese Wellenlänge lag allerdings auf der Flanke einer breiten Schwingung und kann so verdeckt sein.

Der 6-APA-Anteil im Immunogen konnte daher nicht durch Infrarotspektroskopie ermittelt werden.

Die *Osmometrie* als Methode zur Bestimmung der Molekulargewichtserhöhung schied aus, da die Präzision der Methode mit 5 % genau im Bereich der erwarteten Molekulargewichtserhöhung liegt.

Die Untersuchung per *matrixunterstützter Laserdesorptionsionisations-Massenspektrometrie* (matrix assisted laser desorption ionisation-mass spectrometry, MALDI-MS) wurde von Herrn Dr. G. Paulus (Fa. Shimadzu, Duisburg) vorgenommen. Es konnten jedoch keine verlässlichen Daten gewonnen werden, da das Gerät an dem zur Untersuchung zur Verfügung stehenden Tag auch für Standardsubstanzen fehlerhafte und schwankende Werte lieferte.

2.8 Zusammenstellung der Syntheseergebnisse

Es wurden verschiedene Immunogene synthetisiert, die sich durch die Anfangsbedingungen bei der photochemischen Kopplung unterschieden. Bei der Synthese von 6-APA-OVA 1 wurde das Protein in 10 ml Puffer gelöst, bei der Herstellung von 6-APA-OVA 2 dagegen in 30 ml. Die Proteinkonzentration im Reaktionsgemisch war daher zum Ende der Reaktion 4-fach geringer. Außerdem wurde die Reaktion im Ansatz 2 in einem weiteren Gefäß (4,5 cm, Ansatz 1: 4,0 cm) durchgeführt, so daß der Faktor aus Proteinkonzentration und von der UV-Lampe zu durchstrahlender Schichtdicke kleiner wurde. Dieser Faktor wäre bei Verwendung der gleichen Gefäße unverändert geblieben und bestimmt die absolute Absorption der Lösung (Lambert-Beersches Gesetz). Damit sollte der Einfluß des Volumens und der Proteinkonzentration auf den Verlauf der Reaktion getestet werden. Die Reaktion wurde jeweils abgebrochen, wenn keine oder nur noch eine geringfügige Abnahme der Extinktion bei 267 nm zu beobachten war. Die Reaktionsausbeute wurde photometrisch bei 267 nm bestimmt (Tab. 2-1).

Tab. 2-1: Übersicht über die Parameter bei der photochemischen Kopplung

	6-APA-OVA 1	6-APA-OVA 2	6-APA-KLH
mg Protein/ml Puffer	101 mg OVA/ 10 ml Puffer	101 mg OVA/ 30 ml Puffer	100 mg KLH/ 10 ml Puffer
mg Azidobenzoylpenicillin /ml Puffer	20 mg/10 ml	20 mg/10 ml	21 mg/10 ml
entsprechen mg 6-APA	12 mg	12 mg	12,4 mg
entsprechen µg 6-APA/mg Protein	119 µg/mg	119 µg/ml	124 µg/mg
Reaktionszeit	14,5 Stunden	13 Stunden	9,5 Stunden
Reaktionsausbeute	101 µg/mg = 85 %	95 µg/mg = 80 %	114 µg/mg = 92 %