

Ein Lysogangliosid/Poly-L-glutaminsäure-Konjugat als picomolarer Inhibitor von Influenza-Hämagglyutinin**

Hiroshi Kamitakahara, Takashi Suzuki,
Noriko Nishigori, Yasuo Suzuki, Osamu Kanie* und
Chi-Huey Wong*

Zelloberflächen sind häufig mit Oligosacchariden bedeckt, die wichtige Rollen bei vielen zellulären Erkennungsprozessen spielen, z.B. bei einer Infektion, bei der Bildung von Krebsmetastasen und bei anderen interzellulären Adhäsionsprozessen.^[1] Hämagglyutinine (HAs) des Influenzavirus sind typische Beispiele für Rezeptormoleküle; diese trimeren Proteine können an sialylierte Oligosaccharide auf der Oberfläche von Epithelzellen binden.^[2] Die für die Erkennung erforderliche Minimalstruktur ist je nach Virusstamm α -Neu5Ac-(2→3)- β -Gal oder α -Neu5Ac-(2→6)- β -Gal als nichtreduzierendes, terminales Saccharid.^[3] Darüber hinaus sind HAs an der Auslösung der Fusion der Virusmembran mit der lysosomalen Lipiddoppelschicht beteiligt, indem sie ihre Konformation ändern.^[4] Daher kann durch Inhibition beider oder eines dieser Prozesse die Virusinfektion aufgehalten werden. Wir berichten hier über die Synthese polyvalenter Inhibitoren mit einer hydrophoben Gruppe, die den durch den Protein-Kohlenhydrat-Erkennungsprozeß initiierten Fusionsmechanismus behindern.

Ein Problem bei Kohlenhydrat-Rezeptor-Wechselwirkungen ist die relativ geringe Bindungsaffinität. Eine Möglichkeit zur Erhöhung dieser Affinität besteht darin, polyvalente Liganden mit spezifischen monomeren Kohlenhydratliganden zu verwenden.^[5] Aus diesem Grund haben funktionalisierte Polymere,^[5d, 6, 7] Peptide,^[8] Dendrimere^[9] oder zuckerhaltige Liposomen^[10] Beachtung gefunden, die eine höhere Affinität gegenüber dem Rezeptor aufweisen.^[5] Verschiedene Typen von Polymeren mit Sialinsäureresten wurden ebenfalls zur Inhibition des Influenzavirus synthetisiert.^[5d, 7] Da das Virus HA und Neuramidase (NA) auf der Oberfläche aufweist, erwiesen sich Polymere mit Sialinsäureresten, die über

nichtspaltbare Bindungen mit dem Polymer verknüpft waren, als stabile und potente Inhibitoren von HA. Alternativ könnte durch Einführung einer zweiten Gruppe, die ebenfalls eine Affinität zum Zielmolekül oder zu benachbarten Molekülen aufweist, die Bindungsaffinität weiter erhöht werden. Beispielsweise könnten hydrophobe Gruppen die Bindungsaffinität erhöhen, indem sie mit hydrophoben Aminosäureseitenketten und/oder mit der Membran wechselwirken. Letzteres könnte die Konformationsänderung der Membranfusionsdomäne von HA selbst nach dem ersten Inhibierungsprozeß stören. Die Infektion mit Influenzavirus kann so auf zwei unterschiedlichen Stufen inhibiert werden: während des anfänglichen Bindungsprozesses und während der durch HAs hervorgerufenen Membranfusion.

Um die Hypothese zu überprüfen, daß hydrophobe Gruppen im Polymer zur verstärkten Bindung und zur Zerstörung des Virus beitragen, haben wir das Lysogangliosid GM₃ (Lyso-GM₃), α -Neu5Ac-(2→3)- β -Gal-(1→4)- β -Glc-(1→)-Sphingosin,^[11] dem im Vergleich zum Gangliosid GM3 der Stearinsäurerest fehlt, mit Poly-L-glutaminsäure (PGA) verknüpft. Für die Wahl von Lyso-GM₃ sprach, daß es das einfachste von HA erkannte Gangliosid ist.^[2] Die Aminofunktion von Sphingosin ist zur Bindung an das Polymer geeignet. Der amphiphile Charakter von Sphingosin, das direkt mit der Oligosaccharideinheit verknüpft ist, könnte dazu beitragen, die Epitopeinheit auf der Oberfläche des synthetischen Polymers zu präsentieren, indem entweder intra- (gefaltete) oder intermolekulare Aggregate gebildet werden (Abb. 1). PGA (Polymerisationsgrad DP 540) wurde ausgewählt wegen ihrer geringen Toxizität, ihrer geringen Immunogenität, ihrer biologischen Abbaubarkeit^[12] und ihrer

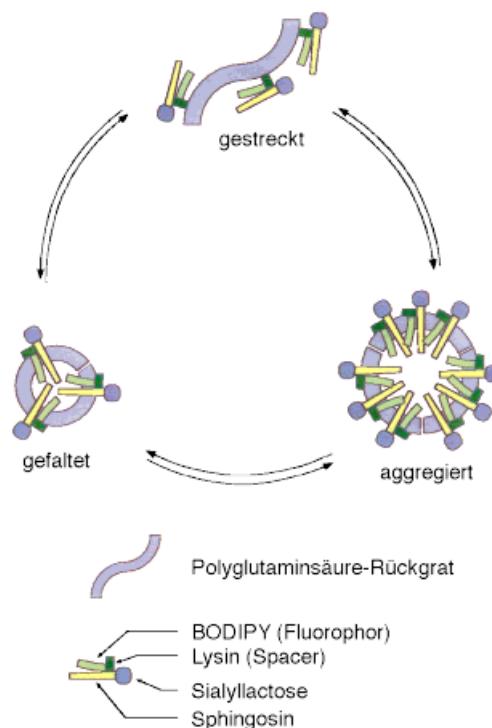


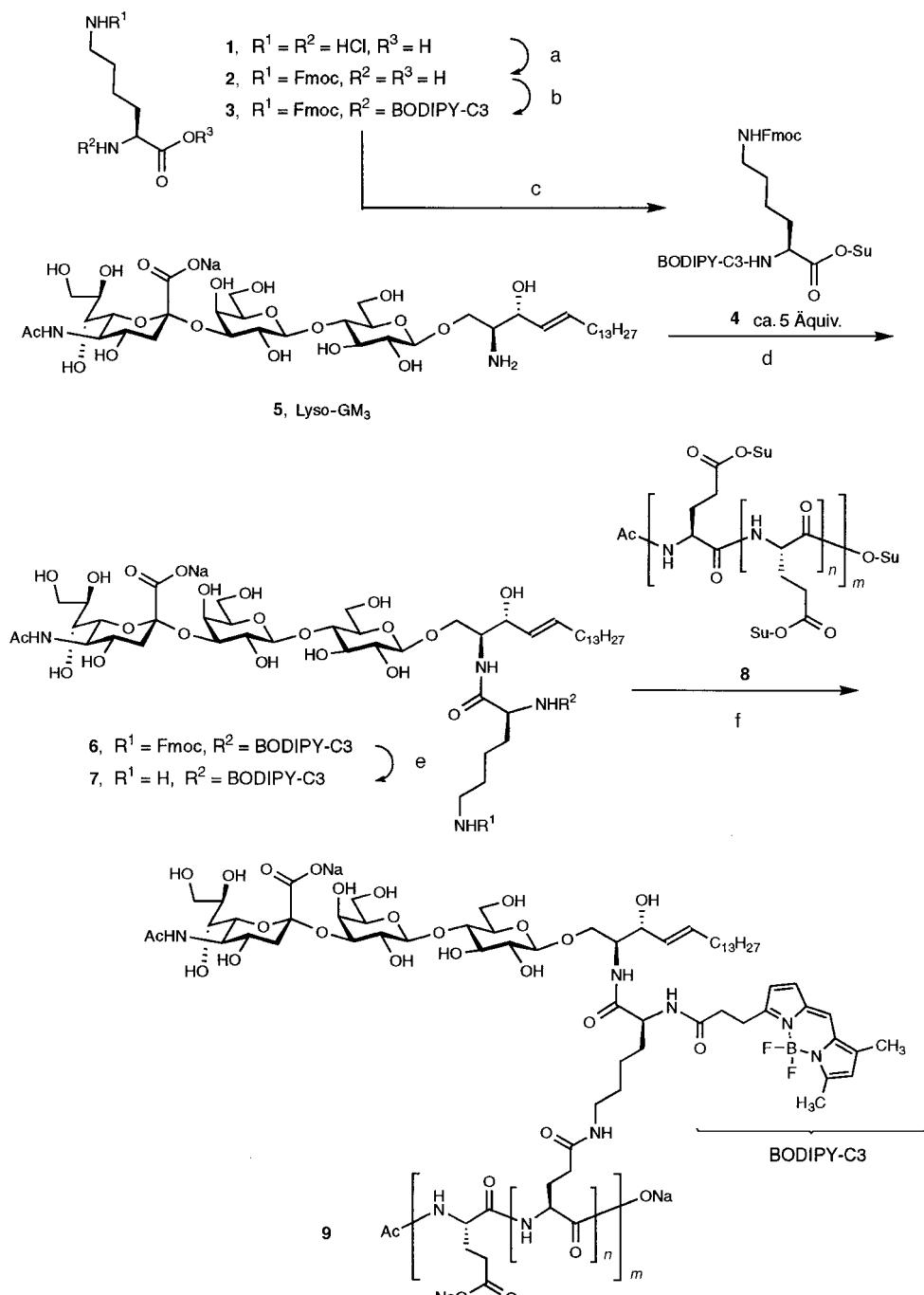
Abb. 1. Schematische Darstellung von Lyso-GM₃-PGA, das in Methanol in gestreckter Form und in wässriger Lösung entweder gefaltet oder aggregiert vorliegt.

[*] Dr. O. Kanie, Prof. Dr. C.-H. Wong,^[+] Dr. H. Kamitakahara
Frontier Research Program, The Institute of Physical and
Chemical Research (RIKEN)
2-1 Hirosawa, Wako-shi, Saitama 351-01 (Japan)
Fax: (+81) 48-467-3620
E-mail: kokanee@postman.riken.go.jp
Dr. T. Suzuki, N. Nishigori, Prof. Dr. Y. Suzuki
Department of Biochemistry
University of Shizuoka, School of Pharmaceutical Science
52-1 Yada, Shizuoka-shi 422 (Japan)

[+] Ständige Adresse:
Department of Chemistry
The Scripps Research Institute
10550 N. Torrey Pines Road, La Jolla, CA 92037 (USA)
Fax: (+1) 619-784-2409
E-mail: wong@scripps.edu

[**] Wir danken den Mitarbeitern des NMR-Labors und Dr. Sadamu Kurono, RIKEN, für die ¹H-NMR-spektroskopischen und massenspektrometrischen Analysen sowie Dr. Yoshitaka Nagai und Dr. Tomoya Ogawa, RIKEN, für Unterstützung. Dieses Forschungsprojekt wurde von der Wissenschafts- und Technologieagentur der japanischen Regierung gefördert.

Länge, die den Kriterien der Kettenschloß-Strategie („chain lock“ strategy) genügt, um auf die oben geschilderte Weise effektiv zu wirken. Ein weiterer Vorteil dieser Strategie ist, daß die Galactosylreste, die nach der Abspaltung der Sialinsäuren durch NA auf der Virusoberfläche exponiert sind, zu Galactose-vermittelter Endocytose führen können, da die natürliche Form des Oligosaccharids als Ligand genutzt wird. Wir beschreiben hier die Synthese eines Lyso-GM₃/Poly-L-glutaminsäure-Konjugats und seine inhibitorische Wirkung auf HAs, die an den α -Sialyl-(2→3)-galactosyl-Rest binden.



Schema 1. a) 1. CuCO₃·Cu(OH)₂·H₂O, H₂O; 2. Fmoc-O-Su, 10% Na₂CO₃, 1,2-Dimethoxyethan, 58.2%; b) BODIPYFLC3-O-Su, 10% Na₂CO₃, MeOH, 87%; c) HO-Su, 1,3-Diisopropylcarbodiimid, CH₂Cl₂; d) Et₃N, MeOH/DMF, quantitativ; e) Piperidin, DMF, 34%; f) DMF/MeOH. Su = Succinimidyl; m = 270, n : m ≈ 1.5 : 100.

Zu Beginn der Synthese (Schema 1) wurde L-Lysin derivatisiert, das als Spacer zwischen Lyso-GM₃ und dem Polymerückgrat sowie als trifunktioneller Linker zur Einführung eines fluoreszierenden Farbstoffs diente; so konnte der Zerstörungsprozeß quantifiziert und später sichtbar gemacht werden, wenn die Polymer-Virus-Komplexe von Makrophagen aufgenommen wurden. Zum Schutz der ε-Aminofunktion mit der 9-Fluorenylmethoxycarbonyl(Fmoc)-Gruppe unter basischen Bedingungen wurde der Kupfer-Chelatkomplex von L-Lysin verwendet (58.2%). Der fluoreszierende Marker, die 4,4-Difluor-5,7-dimethyl-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacen-3-

propionyl(BODIPYFL C3)-Gruppe,^[13] wurde dann mit der α-Aminofunktion verknüpft (87%). Die Verbindung 3 wurde anschließend zum aktivierten Ester 4 umgesetzt, der ohne weitere Reinigung mit Lyso-GM₃ 5 zum Kondensationsprodukt 6 gekuppelt wurde^[14] (quantitativer Umsatz laut Dünnschichtchromatographie mit Fluoreszenzdetektion). Die Fmoc-Gruppe wurde unter den üblichen Bedingungen abgespalten; durch eine zu lange Reaktionsdauer wurde allerdings wegen der Zersetzung des fluoreszierenden Markers nur eine niedrige Ausbeute erzielt. Die Kupplungsreaktion der Verbindung 7 mit als Succinimidylester aktivierter Poly-L-glutaminsäure (→8) verlief glatt und lieferte nach Behandeln mit Natriumhydrogencarbonat und Reinigung durch Gelpermeationschromatographie (GPC) an einer Superose-12-pg-Säule (Pharmacia Biotech) ein Lyso-GM₃-haltiges^[15] Polymer (→9). Der Gehalt an Lyso-GM₃ (oder Sialinsäure) wurde über die Absorption bei 508 nm (BODIPY; in MeOH) errechnet und zu durchschnittlich 44.6 nmol pro mg Polymer bestimmt (0.72 Mol-%).

Das synthetische Polymer 9 war insofern einzigartig, als die grüne Lumineszenz, die in MeOH auftrat, in Wasser verschwand und stattdessen die Lösung schwach orange wurde, obwohl BODIPYFLC3 in beiden Lösungsmitteln sowie in einer NaOAc-Lösung ($c \approx 10 \text{ nmol mL}^{-1}$) grün lumineszierte (Abb. 2). Die Fluores-

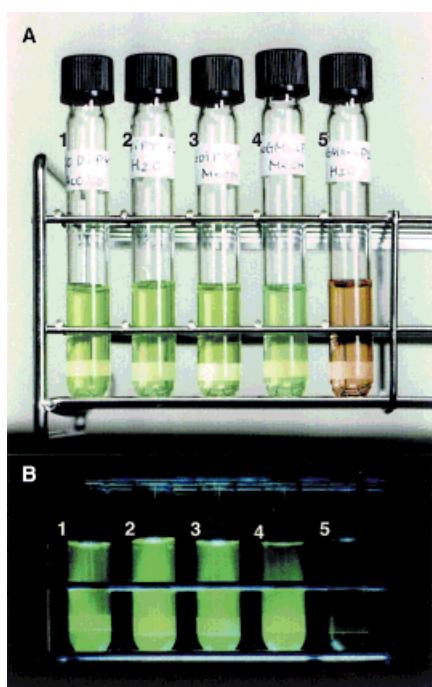


Abb. 2. Lösungen von Lyso-GM₃-PGA **9** und BODIPY-Fluorophor in unterschiedlichen Lösungsmitteln: BODIPY FL C3 in NaOAc-Lösung (1), Wasser (2) und MeOH (3) sowie Lyso-GM₃-PGA in MeOH (4) und Wasser (5), jeweils bei 26°C. Das obere Photo (A) wurde bei Umgebungslicht aufgenommen, für das untere Photo (B) wurden die Lösungen mit UV-Licht (365 nm) bestrahlt.

zenzlöschung und die Verschiebung des Absorptionsmaximums wurden wegen der Hydrophobie von Sphingosin und des BODIPY-Fluorophors auf eine Faltung oder Aggregation in Wasser zurückgeführt. Wegen der Lyso-GM₃-Einheit ist der Fluorophor im synthetischen Polymer wahrscheinlich in hohem Maße lokalisiert, so daß er im Grundzustand wechselwirken kann, was eine Abnahme der Fluoreszenz um 83.3% ($\lambda_{\text{em}} = 512 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{ex}} = 480 \text{ nm}$) sowie die leichte Verschiebung des Absorptionsmaximums ($\lambda_{\text{max}} = 504.6$ und 507.8 nm in MeOH bzw. H₂O) zur Folge hat (Abb. 3). Eine Verschiebung der Emissionswellenlänge oder ein zusätzliches Signal aufgrund von Excimer-Wechselwirkungen traten nicht

auf. Zwar ist der BODIPY-Fluorophor pH-unempfindlich und weitgehend unabhängig von der Umgebung, doch kann er ein Aggregat bilden, so daß in wässriger Lösung eine Selbstlöschung auftritt. Die Selbstlöschung war nicht auf eine hohe Konzentration des im Polymer eingeschlossenen Fluorophors zurückzuführen, da die Löschung beim freien Fluorophor BODIPY FL C3 unter gleichen Bedingungen nicht auftrat. Der Lyso-GM₃-Gehalt war darüber hinaus in Einklang mit den Mengen, die für die Kondensation zwischen Lyso-GM₃-Lys(BODIPY)-NH₂ **7** und aktivierter PGA **8** verwendet wurden. Wir schlossen daher, daß das synthetische Polymer **9** in Methanol in gestreckter und in wässriger Lösung in gefalteter oder aggregierter Form vorliegt.

Wir haben die Inhibierungsaktivität des Polymers **9** gegen das Influenzavirus A/PR/8/34(H1N1) mit einem ELISA (ELISA = enzyme-linked immunosorbent assay) untersucht.^[16] Der IC₅₀-Wert von **9** betrug $1.9 \times 10^{-12} \text{ M}$ bezogen auf dessen Lyso-GM₃-Gehalt (oder $7.5 \times 10^{-12} \text{ M}$ bezogen auf dessen Sialinsäuregehalt; jeweils abgeschätzt anhand der UV-Absorption des Fluorophors). Zum Vergleich wurden die IC₅₀-Werte für GM₃, Lyso-GM₃ **5** und Sialyllactose (Trisaccharidteil von GM₃) ermittelt (1×10^{-9} , 3×10^{-9} bzw. $1.5 \times 10^{-7} \text{ M}$). Sialyl-PGA war erheblich weniger aktiv als **9**. Bei PGA trat bis zu einer Konzentration von $1 \times 10^{-9} \text{ M}$, in der auch **9** im Assay eingesetzt wurde, keine Inhibition auf (Tabelle 1).

Tabelle 1. Inhibierungsaktivität des synthetischen Polymers **9** und verwandter Verbindungen gegen das Influenzavirus A/PR/8/34(H1N1).

Verbindung	IC ₅₀ [M] ^[a]	Verbindung	IC ₅₀ [M] ^[a]
9	1.9×10^{-12}	Lyso-GM ₃ 5	3×10^{-9}
9	7.5×10^{-12} ^[b]	Sialyllactose	1.5×10^{-7}
GM ₃	1.0×10^{-9}	PGA	— ^[c]

[a] Bezogen auf den Sialyllactosegehalt. [b] Bezogen auf den Sialinsäuregehalt. [c] Keine Inhibition.

Wir haben eine neue Strategie zur Inhibition des Influenzavirus entwickelt, und dieser Prozeß kann anhand des eingebrachten Fluorophors untersucht werden. Es wurden experimentelle Hinweise erhalten, die für den beschriebenen Kettenschloß-Mechanismus (Abb. 4) sprechen. Sofort nach Zugabe des Polymers **9** zur Viruslösung trat eine Verstärkung der Fluoreszenzemission von BODIPY auf ($\lambda_{\text{em}} = 510$, $\lambda_{\text{ex}} = 480 \text{ nm}$), was auf das Entfalten des Polymers nach anfänglicher Selbstlöschung im gefalteten Zustand hinweist. Die Emissionsintensität nahm dann nach weiterer Inkubation bei 10°C ab; dies kann mit dem Energietransfer auf aromatische Aminosäurereste von HA erklärt werden. Bei der Anregung von Tryptophanresten ($\lambda_{\text{ex}} = 287 \text{ nm}$) trat auch Emission von BODIPY ($\lambda_{\text{em}} = 510 \text{ nm}$) auf, ein Hinweis auf den Energietransfer zwischen BODIPY und den Trp-Resten.^[17] Die starke Bindung könnte auf die anfängliche mehrfache Wechselwirkung zwischen **9** und dem Virus zurückzuführen sein, gefolgt von einer hydrophoben Wechselwirkung zwischen Ligand und Rezeptor. Alternativ dazu kann die hydrophobe Wechselwirkung auch zuerst stattfinden. Sowohl GM₃ als auch Lyso-GM₃ können Liposomen und Micellen bilden und

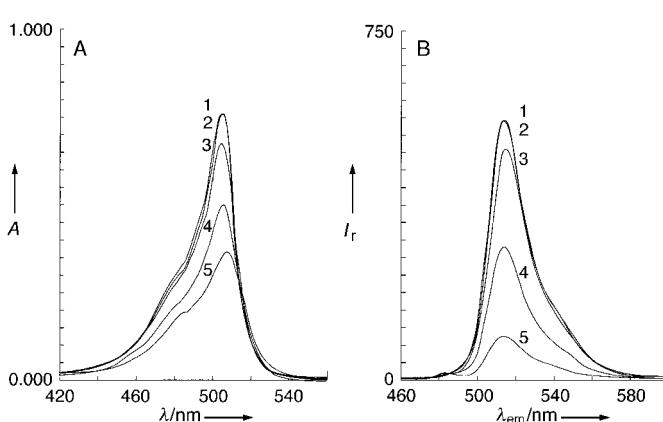


Abb. 3. (A) UV/VIS- (0.1 mg mL^{-1}) und (B) Fluoreszenzemissions-Spektren ($80 \mu\text{g mL}^{-1}$, $\lambda_{\text{ex}} = 480 \text{ nm}$) von Lyso-GM₃-PGA(**9**)-Lösungen in MeOH (1), 75% MeOH (2), 50% MeOH (3), 25% MeOH (4) und Wasser (5). I_r = relative Fluoreszenzintensität.

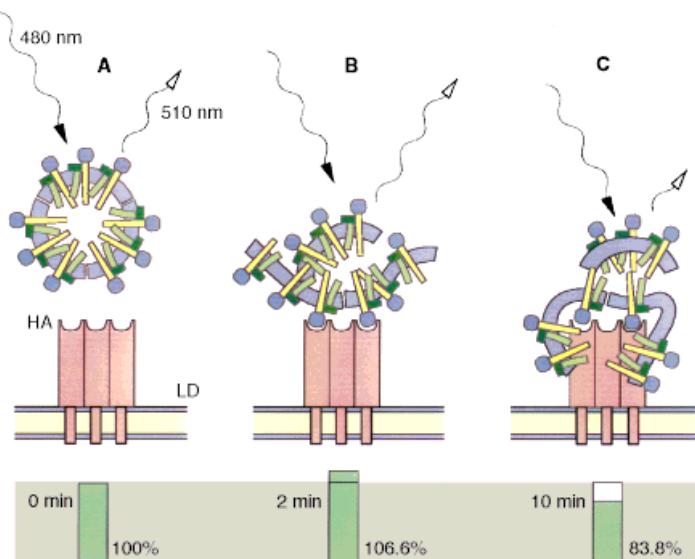


Abb. 4. Schematische Darstellung der Ketteneschloß-Inhibierungs-Strategie. A) Der aggregierte polymere Inhibitor mit dem spezifischen Liganden, hier Sialylactose, nähert sich dem Rezeptor, hier Hämaggglutinin. B) Das aggregierte Polymer wechselwirkt mit dem Rezeptor, wodurch sich die Fluoreszenzintensität erhöht. Die Emission des exponierten BODIPY-Fluorophors ist stärker als der Energieverlust durch den Energietransfer zu einem Trp-Rest in der Bindungsstelle. C) Aufgrund von hydrophoben Wechselwirkungen wird ein stabiler Komplex gebildet. Die hydrophoben Gruppen in HA, einschließlich der aromatischen Seitenketten, führen wegen des Energietransfers zu einer weiteren Abnahme der Fluoreszenzemission von BODIPY. Die Balkendiagramme (unten) verdeutlichen die relative Fluoreszenzintensität der Testlösung ($\lambda_{\text{em}} = 510$, $\lambda_{\text{ex}} = 480$ nm). Die Emissionsintensität der Lösung zum Zeitpunkt $t = 0$ min wurde mit 100% angesetzt. Für die Erklärung der graphischen Elemente siehe Abbildung 1. LD = Lipiddoppelschicht des Virus.

weisen eine mehrfache Wirkung auf, die aber nicht so effektiv ist wie die von **9**.

Eingegangen am 12. Dezember 1997 [Z11259]

Stichwörter: Amphiphile · Ganglioside · Molekulare Erkennung · Rezeptoren · Sialinsäuren

- [1] A. Varki, *Glycobiology* **1993**, *3*, 97–130.
- [2] a) I. A. Wilson, J. J. Skehel, D. C. Wiley, *Nature* **1981**, *289*, 366–373; b) D. C. Wiley, I. A. Wilson, J. J. Skehel, *ibid.* **1981**, *289*, 373–378.
- [3] a) Y. Suzuki, *Prog. Lipid Res.* **1994**, *33*, 429–457; b) E. Nobusawa, T. Aoyama, H. Kato, Y. Suzuki, Y. Tateno, K. Nakajima, *Virology* **1991**, *182*, 475–485; c) Y. Suzuki, T. Nakao, T. Ito, N. Watanabe, Y. Toda, X. Guiyun, T. Suzuki, T. Kobayashi, Y. Kimura, A. Yamada, K. Sugawara, H. Nishimura, F. Kitame, K. Nakamura, E. Deya, M. Kiso, A. Hasegawa, *ibid.* **1992**, *189*, 121–131.
- [4] a) C. M. Carr, P. S. Kim, *Cell* **1993**, *73*, 823–832; b) J. M. White, I. A. Wilson, *J. Cell Biol.* **1987**, *105*, 2887–2896; c) L. H. Pinto, L. J. Holsinger, R. A. Lamb, *Cell* **1992**, *69*, 517–528.
- [5] a) *Neoglycoconjugates: Preparation and Applications* (Hrsg.: Y. C. Lee, R. T. Lee), Academic Press, San Diego, CA, **1994**; b) Y. C. Lee, R. T. Lee, *J. Biomed. Sci.* **1996**, *3*, 221–237; c) R. Roy, *Trends Glycosci. Glycotechnol.* **1996**, *8*, 79–99; d) M. Mammen, G. Dahmann, G. M. Whitesides, *J. Med. Chem.* **1995**, *38*, 4179–4190.
- [6] a) K. Nagata, T. Furuike, S.-I. Nishimura, *J. Biochem.* **1995**, *118*, 278–284; b) W. Spevak, C. Foxall, D. H. Charych, F. Dasgupta, J. O. Nagy, *J. Med. Chem.* **1996**, *39*, 1018–1020; c) K. Akiyoshi, J. Sunamoto, *Supramol. Sci.* **1996**, *3*, 157–163; d) K. H. Mortell, R. V. Weatherman, L. L. Kiessling, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 2297–2298; e) K. Kobayashi, A. Tsuchida, *Macromolecules* **1997**, *30*, 2016–2020; f) P. Arya, S. Dion, G. K. H. Shimizu, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1997**, *7*, 1537–1542; g) G. Thoma, B. Ernst, F. Schwarzenbach, R. O. Duthaler, *ibid.* **1997**, *7*, 1705–1708.
- [7] a) M. N. Matrosova, L. V. Mochalova, V. P. Marinina, N. E. Byramova, N. V. Bovin, *FEBS Lett.* **1990**, *272*, 209–212; b) A. Gamian, M. Chomik, C. A. Laferrière, R. Roy, *Can. J. Microbiol.* **1991**, *37*, 233–237; c) A. Spaltenstein, G. M. Whitesides, *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 686–687; d) J. O. Nagy, P. Wang, J. H. Gilbert, M. E. Schaefer, T. G. Hill, M. R. Callstrom, M. D. Bednarski, *J. Med. Chem.* **1992**, *35*, 4501–4502; e) S. Sabesan, J. Ø. Duus, S. Neira, P. Domaille, S. Kelm, J. C. Paulson, K. Bock, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 8363–8375; f) S.-I. Nishimura, K. B. Lee, K. Matsuoka, Y. C. Lee, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1994**, *199*, 249–254; g) W. J. Lee, A. Spaltenstein, J. E. Kingery-Wood, G. M. Whitesides, *J. Med. Chem.* **1994**, *37*, 3419–3433; h) M. Itoh, P. Hetterich, R. Isenbeck, R. Brossmer, H.-D. Klenk, *Virology* **1995**, *212*, 340–347; i) S. Cao, R. Roy, *Tetrahedron Lett.* **1996**, *37*, 3421–3424; j) G. B. Sigal, M. Mammen, G. Dahmann, G. M. Whitesides, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 3789–3800; k) D. Zanini, R. Roy, *ibid.* **1997**, *119*, 2088–2095; l) A. S. Gambaryan, A. B. Tuzikov, V. E. Piskarev, S. S. Yamnikova, D. K. Lvov, J. S. Robertson, N. V. Bovin, M. N. Matrosova, *Virology* **1997**, *232*, 345–350.
- [8] a) C. Unverzagt, S. Kelm, J. C. Paulson, *Carbohydr. Res.* **1994**, *251*, 285–301, zit. Lit.; b) H. Paulsen, S. Peters, T. Biefeldt, M. Meldal, K. Bock, *ibid.* **1995**, *268*, 17–34; c) U. Sprengard, M. Schudok, W. Schmidt, G. Kretzschmar, H. Kunz, *Angew. Chem.* **1996**, *108*, 359–362; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1996**, *35*, 321–324.
- [9] a) K. Aoi, H. Itoh, M. Okada, *Macromolecules* **1995**, *28*, 5391–5393; b) T. K. Lindhorst, C. Kieburg, *Angew. Chem.* **1996**, *108*, 2083–2086; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1996**, *35*, 1953–1956; c) P. R. Ashton, S. E. Boyd, C. L. Brown, N. Jayaraman, J. F. Stoddart, *ibid.* **1997**, *109*, 756–759 bzw. **1997**, *36*, 732–735.
- [10] a) T. Toyokuni, B. Dean, S. Cai, D. Boivin, S.-I. Hakimori, A. K. Singhal, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 395–396; b) C.-C. Lin, T. Kimura, S. H. Wu, G. Weitz-Schmidt, C.-H. Wong, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1996**, *6*, 2755–2760; c) Y. Okumura, J. Sunamoto, *Supramol. Sci.* **1996**, *3*, 171–176; d) M. Koketsu, T. Nitoda, H. Sugino, L. R. Juneja, M. Kim, T. Yamamoto, C.-H. Wong, *J. Med. Chem.* **1997**, *40*, 3332–3335; e) T. Murohara, J. Margiotta, L. M. Phillips, J. C. Paulson, S. DeFrees, S. Zalipsky, L. S. S. Guo, A. M. Lefer, *Cardiovasc. Res.* **1997**, *30*, 965–974.
- [11] A. Hasegawa, N. Suzuki, F. Kozawa, H. Ishida, M. Kiso, *J. Carbohydr. Chem.* **1996**, *15*, 639–648.
- [12] H. Hirabayashi, M. Nishikawa, Y. Takakura, M. Hashida, *Pharm. Res.* **1996**, *13*, 880–884.
- [13] R. P. Haugland in *Molecular Probes* (Hrsg.: M. T. Z. Spence), Molecular Probes, Eugene, OR, USA, **1992**.
- [14] $R_f = 0.27$ ($\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}/15\text{mM CaCl}_2$ (60/35/8, v/v/v)), $^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, CD_3OD): $\delta = 7.34$ (s, 1H, BODIPY), 6.93 (d, 1H, BODIPY), 6.26 (d, 1H, BODIPY), 6.13 (s, 1H, BODIPY), 3.13 (m, 2H, BODIPY- CH_2), 2.62 (t, 2H, BODIPY- CH_2), 2.42 (s, 3H, BODIPY- CH_3), 2.19 (s, 3H, BODIPY- CH_3), 4.2–4.3 (1H, $\text{C}_\alpha\text{-H}$), 3.03 (m, 2H, $\text{C}_\beta\text{-H}$), 1.5–1.65 (m, 4H, $\text{C}_\beta\text{-H}$, $\text{C}_\gamma\text{-H}$), 1.69 (m, 2H, $\text{C}_\delta\text{-H}$), 4.21 (d, 1H, $J = 8.1$ Hz, Glc-H1), 4.32 (d, 1H, $J = 8.1$ Hz, Gal-H1), 3.93–3.95 (1H, Gal-H3), 3.80 (br. s, 1H, Gal-H4), 2.81 (dd, 1H, Neu5Ac- H_2^aq), 1.54 (1H, Neu5Ac- H_3^aq), 1.91 (3H, Neu5Ac-NHCO CH_3), 5.32–5.38 (m, 1H, Sphingosin, olefinisches H4), 5.56–5.59 (m, 1H, Sphingosin, olefinisches H5), 1.19 (16H, Sphingosin- CH_2), 0.80 (Sphingosin- CH_3); ESI-MS, Positiv-Ionen: ber. für $[M+2\text{Na} - \text{H}]^+$: 1362, gef.: 1362; ber. für $[M+\text{Na}]^+$: 1340, gef.: 1340; Negativ-Ionen: ber. für $[M - \text{H}]^-$: 1316, gef. 1316.
- [15] Die mittlere Molekulmasse (\overline{M}_v) wurde aus dem Lyso-GM₃-Gehalt (0.72%; $m = 536.1$, $n = 3.9$) und aus dem Polymerisationsgrad (DP = 540) von PGA zu 87 kDa errechnet. \overline{M}_v von **9** wurde über eine GPC zu 336 kDa abgeschätzt (Waters-Ultrahydrogel-Liner-Säule (7.8 × 300 mm), Elution mit 0.1M NaNO₃, Flufrate: 1 mL min⁻¹, UV-Detektion bei 500 nm und 40°C). Zur Analyse der Daten wurde ein Millipore Millennium 2010 mit GPC-spezifischer Software verwendet. Polyethylenoxide wurden als Eichverbindungen eingesetzt und über den Brechungsindex detektiert. Das Ergebnis der GPC ist offensichtlich bezüglich der Zahl eingeführter Lyso-GM₃-Gruppen mit Fehlern behaftet ($\overline{M}_v(\text{GPC})/\overline{M}_v(\text{UV}) = 3.86$). Dies könnte auf eine Aggregation zurückzuführen sein.
- [16] Die Inhibierungsaktivität des Polymers **9** gegen das Influenzavirus Eugene, OR, A/PR/8/34(H1N1) wurde mit einem ELISA ermittelt. Dazu wurde eine Lösung von 1 nmol GM₃ in Ethanol in jede

Vertiefung einer 96-Microwell-Platte gegeben. Das Lösungsmittel wurde bei 37 °C verdampft und die verbliebenen Bindungsstellen mit 200 µL PBS (PBS = phosphate buffered saline; 0.15 M NaCl, 8.1 mM Na₂HPO₄, 1.5 mM NaH₂PO₄), das 2 % BSA (BSA = bovine serum albumin) enthielt (→PBS-BSA), 12 h bei 4 °C blockiert. Danach wurden die Vertiefungen fünfmal mit PBS gewaschen. Von einer Lösung des Polymers (200 pmol) in 0.2 % PBS-BSA wurde eine Reihe von Verdünnungen angefertigt, die sich jeweils um den Faktor Zwei unterschieden. Diese verdünnten Lösungen wurden 2 h bei 4 °C mit 50 µL der Influenzavirus-Suspension (32 HA-Einheiten) vorinkubiert und dann in die Vertiefungen gegeben. Die Platten wurden 12 h bei 4 °C inkubiert, anschließend fünfmal mit PBS gewaschen, dann 2 h bei 4 °C mit einer mit 0.2 % PBS-BSA 1000fach verdünnten Lösung von 50 µL Antiinfluenzavirus-Antikörpern inkubiert und 2 h bei 4 °C mit Meerrettich-Peroxidase -konjugiertem Protein A (1000fach verdünnt mit Lösung A) umgesetzt. Die an GM₃ gebundenen und in den Vertiefungen immobilisierten Virionen wurden mit einer *o*-Phenyldiamin(OPD)-Lösung nachgewiesen, die 4 mg OPD und 0.01 % H₂O₂ in 100 mM Phosphatpuffer (mit Citronensäure auf pH=5.0 eingestellt) enthielt. Die Reaktionen wurden durch Zusatz von 4 N H₂SO₄ unterbrochen und die Virusbindung über die Farbentwicklung bei 492 nm bestimmt (Referenzwellenlänge 630 nm). Verdünnungsreihen (Verdünnungsfaktor Zwei) von Sialyllactose (2 µmol), PGA (800 pmol) und Lyso-GM₃ (20 nmol) wurden in der beschriebenen Weise zum Vergleich untersucht.

- [17] Im HA-Trimer des Influenzavirus vom Serotyp H1 gibt es insgesamt 15 Trp-Reste.

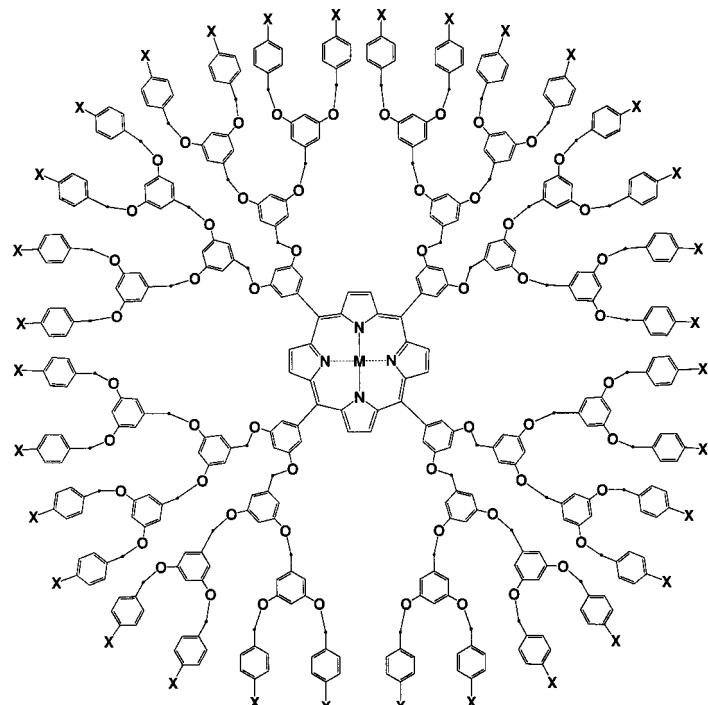
Elektrostatische Aggregation von dendritischen Elektrolyten: negativ und positiv geladene Porphyrin-Dendrimere**

Nobuyuki Tomioka, Daisuke Takasu, Toshie Takahashi und Takuzo Aida*

Als Dendrimere bezeichnet man stark verzweigte Makromoleküle mit einer wohldefinierten dreidimensionalen Gestalt, deren Größe im Nanometerbereich liegt.^[1] Sie sind als Bausteine für organisierte funktionelle Materialien mit extremer Genauigkeit interessant. Die Entwicklung von Methoden zur kontrollierten räumlichen Anordnung funktioneller Dendrimere ist daher besonders wichtig. Kürzlich wurde über die spontane Zusammenlagerung einiger keilförmiger Dendrimere (Dendrone) aufgrund von van-der-Waals-Kräf-

ten, Wasserstoffbrückenbindungen oder metallvermittelten Wechselwirkungen zu unter anderem kugel- sowie scheibenförmigen Superstrukturen berichtet.^[2,3] Wir berichten hier über die Ergebnisse einer ersten Untersuchung über elektrostatische Zusammenlagerungen von Dendrimer-Elektrolyten.^[4] Zu diesem Zweck haben wir negativ und positiv geladene Dendrimere verwendet, die eine freie Porphyrinbase oder deren Zinkkomplex als fluoreszenzaktives Zentrum enthielten.

In einer früheren Arbeit haben wir die konvergente Synthese eines negativ geladenen, wasserlöslichen dendritischen Zinkporphyrins (32[–]DPZn) beschrieben,^[5] das in seiner Molekülperipherie 32 Carboxylatfunktionalitäten aufwies.^[6] Dieses photofunktionelle Makromolekül besteht aus einem vierstufigen Arylether-Dendrimergerüst, das wahrscheinlich eine kugelförmige Konformation mit einem geschätzten Durchmesser von 4–5 nm annimmt.^[7] Ausgehend von 32[HO₂C]DPZn^[6] haben wir nun ein positiv geladenes dendritisches Zinkporphyrin (32[+]DPZn) hergestellt, das 32 Ammoniumfunktionalitäten in seiner Peripherie enthält.



[*] Prof. Dr. T. Aida, N. Tomioka, D. Takasu
Presto Research for Embryonic Science and Technology
(PRESTO), JST

and

Department of Chemistry and Biotechnology

Graduate School of Engineering, The University of Tokyo

7-3-1 Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8656 (Japan)

Fax: (+81) 3-5802-3363

E-mail: aida@macro.t.u-tokyo.ac.jp

Dr. T. Takahashi^[+]

Department of Biochemistry and Molecular Biology

Graduate School of Medicine, The University of Tokyo

7-3-1 Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo 113-0033 (Japan)

[+] Massenspektren

[**] Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://www.wiley-vch.de/home/angewandte/> zu finden oder vom Autor anzufordern.

32[MeO₂C]DPH₂: X = CO₂Me, M = H₂

32[MeO₂C]DPZn: X = CO₂Me, M = Zn

32[HO₂C]DPH₂: X = CO₂H, M = H₂

32[HO₂C]DPZn: X = CO₂H, M = Zn

32[–]DPH₂: X = CO₂K⁺, M = H₂

32[–]DPZn: X = CO₂K⁺, M = Zn

32[Me₂N]DPZn: X = CONH(CH₂)₂NMe₂, M = Zn

32[+]DPZn: X = CONH(CH₂)₂N⁺Me₃Cl[–], M = Zn

Das elektrostatische Zusammenlagern der negativ und positiv geladenen dendritischen Elektrolyte 32[–]DPH₂ (freie Porphyrinbase) und 32[+]DPZn wurde nach Mischen der phosphatgepufferten Lösungen (pH 6.9, 1.5 µM) bei 20 °C