

Glycolipide als Immunmodulatoren – Synthesen und Eigenschaften

Von Oswald Lockhoff*

Professor Karl Heinz Büchel zum 60. Geburtstag gewidmet

Die erfolgreichsten Impfstoffe bestehen heute noch aus abgeschwächten oder abgetöteten Pathogenen, doch ist erkennbar, daß in Zukunft durch Anwendung der Gentechnologie reine Antigene in ausreichenden Mengen zur Verfügung stehen werden. Zur Erreichung einer Schutzwirkung ist es jedoch essentiell, die Immunantwort gegen diese nur schwach immunogenen Strukturen durch Adjuvantien zu verstärken. Die Suche nach chemisch definierten, synthetischen und gut verträglichen Adjuvantien ist deshalb für eine effektive Immunprophylaxe von außerordentlicher Bedeutung. Als eine in dieser Hinsicht sehr vielversprechende Verbindungsklasse erwiesen sich synthetische Glycosylamide mit zwei langen Alkylketten aus Alkylamin und Fettsäuren. Im Gegensatz zu den natürlich vorkommenden Glycolipiden, die immunsuppressiv wirken, sind die hier beschriebenen, neuen Glycolipidanaloga ausgeprägt immunstimulierend. Sie bewirken in Vaccinierungsexperimenten zusammen mit verschiedenen Antigenen einen effizienten Schutz. Der Wirkungsmechanismus, der sich von dem bekannter Adjuvantien unterscheidet, läßt die Glycolipidanaloga für Immunisierungen von Patienten mit defekten T-Lymphozytenfunktionen, z. B. AIDS-Patienten, als besonders aussichtsreich erscheinen.

1. Einleitung

Eine der lebensnotwendigen Aufgaben des Immunsystems von Säugetieren ist der Schutz vor Infektionskrankheiten. Dies gelingt durch ein Netzwerk von Interaktionen verschiedener lymphoider (B- und T-Lymphozyten) und phagozytischer Zellen (Monozyten, Makrophagen, Granulozyten) über Bildung und Freisetzung mehrerer Aktivierungs-, Wachstums- und Differenzierungsfaktoren (Interleukin I, Interleukin II, Tumor-Nekrose-Faktor). Infektiöse Keime werden dadurch selektiv neutralisiert und eliminiert, die körperliche Unversehrtheit bleibt erhalten^[1]. Diese Aufgabe wird vom Immunsystem im Normalfall hervorragend bewältigt. In einigen Fällen ist es jedoch angezeigt, das Abwehrsystem pharmakologisch zu beeinflussen, entweder im Sinne einer Immunstimulation oder einer Immunsuppression. Die Verstärkung der Immunantwort auf bestimmte körperfremde Strukturelemente (Antigene), die spezifische Immunstimulation, wird bei Impfungen (Vaccinierungen) angestrebt. Daneben gewinnt die unspezifische Immunstimulation zunehmend an Bedeutung, die einen breiten, nicht antigenabhängigen Reiz setzt, um so eine eher grundsätzliche Abwehrbereitschaft hervorzurufen. Im folgenden werden Problemstellungen im Zusammenhang mit Vaccinierungen näher betrachtet.

Viele der heute in der Human- und Veterinärmedizin gebräuchlichen Impfstoffe (Vaccine) bestehen aus abgetöteten oder abgeschwächten Bakterien, Viren oder Parasiten. Damit sind immense Erfolge in der Medizin erreicht worden, jedoch sind die Möglichkeiten von Vaccinierungen dadurch noch nicht ausgeschöpft. In der Entwicklung befinden sich Vaccine auf der Basis gereinigter Oberflächenteile von Pathogenen (Subunit-Vaccine) oder peptidischer, immundominanter Epitope, die mit Proteinen hybridisiert sind. Verstärkt wird dieser Trend durch die Einbeziehung rekombinanter

DNA-Technologien^[2], die es beispielsweise ermöglichen, virale Oberflächenproteine in Bakterien oder Kulturen tierischer Zellen zu exprimieren. Dieser Ansatz bietet unter anderem den prinzipiellen Vorteil einer höheren Sicherheit aufgrund nicht vorhandener Virulenz des Erregers. Ein Hauptproblem dabei ist jedoch, daß diese Antigene in ihrer reinen Form sehr viel weniger immunogen sind. Um eine ausreichende Schutzwirkung hervorzurufen, müssen sie zusammen mit Adjuvantien, die die spezifische Immunantwort auf Antigene verstärken, verabreicht werden^[3, 4].

In der Adjuvansforschung ist die Trennung der Immunstimulation von entzündlichen Nebenreaktionen von zentraler Bedeutung. Viele Adjuvantien wie das klassische komplette Freundschs Adjuvans (CFA, eine Wasser-in-Öl-Emulsion mit kompletten Extrakten von Mycobakterien) sind so unverträglich, daß sie nicht einmal für Veterinär-Vaccinen verwendet werden können. Die einzigen für humane Anwendungen zugelassenen Adjuvantien sind mineralische Gele wie Aluminiumhydroxid. Es ist auch Bestandteil des ersten peptidischen Hybridvaccins, das als Impfstoff gegen Malariaerkrankungen am Menschen untersucht worden war^[5-7]. Verglichen mit CFA ist Aluminiumhydroxid jedoch nur schwach wirksam, so daß es nur begrenzt verwendbar ist. Die Suche nach verträglichen und wirksamen Adjuvantien hat deshalb in jüngster Zeit enorm an Bedeutung gewonnen^[8].

Eine Reihe von Alternativen zeichnet sich ab (Übersichten siehe Lit.^[9-14]): Stoffwechselprodukte wie Interleukine, Interferone oder Peptidhormone, hochmolekulare Verbindungen mikrobiellen Ursprungs oder synthetische Derivate aus mehreren Verbindungsklassen. Von besonderem Interesse sind die niedermolekularen Adjuvantien aus dem Bereich der bakteriellen Zellwandkomponenten. Dies sind z. B. Verbindungen, die sich von der aktiven Komponente von Mycobakterien (die im CFA enthalten sind), dem Muramyl-dipeptid (MDP) 1^[15, 16], ableiten, z. B. Murabutid, Muroctasin und Muramyltripeptid-phosphatidylethanolamin (MTP-PE). Andere wirksame Adjuvantien sind Verbindungen aus der Familie der Endotoxine^[17]. Deren aktive Komponente

[*] Dr. O. Lockhoff
Bayer AG
Zentrale Forschung
W-5090 Leverkusen 1

ist Lipid A 2 (Abb. 1)^[18, 19]. Abkömmlinge dieser Leitstruktur sind beispielsweise Lipid X oder Lipid Y. Einige dieser Verbindungen befinden sich als Bestandteile von Vaccinen in der klinischen Prüfung.

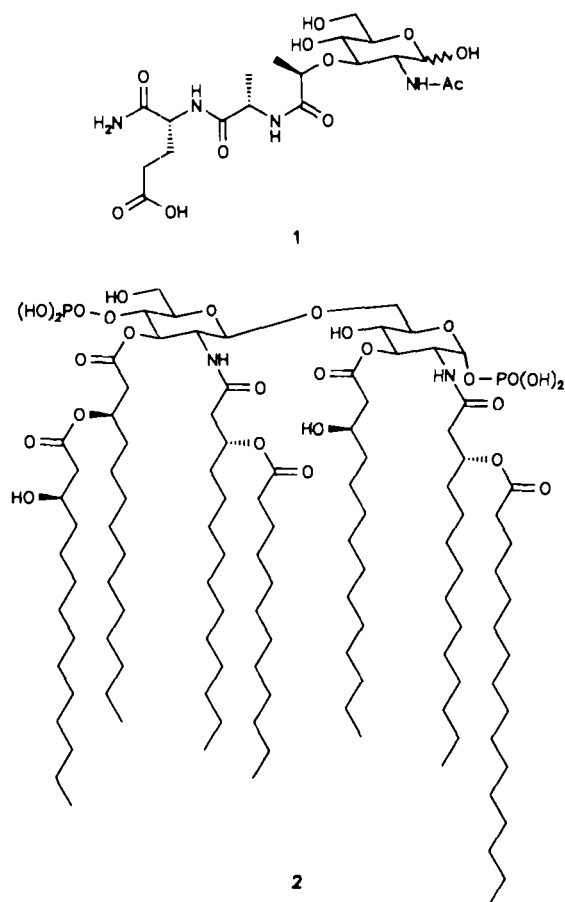


Abb. 1. Strukturformeln der Immunmodulatoren Muramyl dipeptid 1 und Lipid A 2.

Strukturvariationen an den aktiven Verbindungen ergaben, daß selbst geringe Abwandlungen der Grundstruktur häufig zu komplettem Verlust der biologischen Wirkungen führen. In vielen Fällen war es jedoch möglich, hochwirksame Derivate durch kovalente Konjugation der aktiven Leitstruktur mit Lipidresten herzustellen, wie die obengenannten Beispiele zeigen.

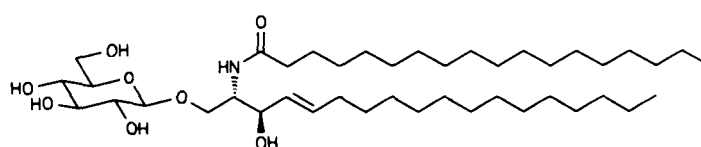
Wir fanden in den letzten Jahren eine neue Klasse von Konjugaten aus Kohlenhydraten und Lipiden, die Adjuvaneigenschaften haben, aber keine Abkömmlinge aus der

Klasse der Muramylpeptide oder der Endotoxine sind. Es sind vielmehr Glycolipidanaloga (GLA), die eine interessante Alternative zu den bisher bekannten Strukturen bieten.

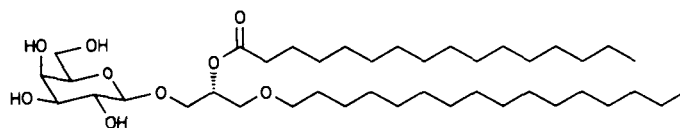
2. Glycosylamide als Glycolipidanaloga

Glycolipide sind auf der Oberfläche jeder Zelle anzutreffen. In Säugerzellen dienen sie aufgrund ihrer exponierten Stellung in der Zellmembran als Bindungsstellen von Lectinen, Antikörpern, Toxinen, Bakterien oder Viren und haben damit wichtige Funktionen für die Kommunikation der Zelle mit ihrer äußeren Umgebung^[20 - 22].

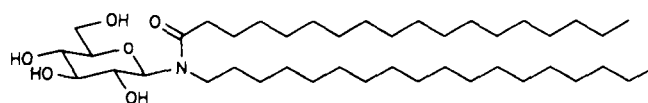
Man kennt heute mehrere hundert Glycolipidstrukturen auf der Oberfläche einer Säugerzelle. Gemäß ihrem hydrophoben Teil werden sie in zwei Klassen eingeteilt, die Glycosphingolipide 3 und die Glycoglycerolipide 4 (Abb. 2). Glycosphingolipide sind aus Sphingosin, Fettsäure und



3 Glycosphingolipide – Glycosylceramide
– Ganglioside
– Sulfatoglycosphingolipide



4 Glycoglycerolipide – Galactoglycerolipide
– Sulfatogalactoglycerolipide



5 Glycosylamide (Glycolipidanaloga, GLA)

Abb. 2. Prototypen natürlich vorkommender Glycolipide 3 und 4 – die Monosaccharidreste stehen stellvertretend für Mono- und Oligosaccharidreste, die zum Teil O-sulfatiert vorliegen – und der Glycolipidanaloga 5.



Oswald Lockhoff, geboren 1949 in Cuxhaven, studierte Chemie an der Universität Hamburg und promovierte dort 1980 bei Hans Paulsen auf dem Gebiet der Oligosaccharidsynthese. Im selben Jahr trat er als Laborleiter in die Bayer AG, Leverkusen, ein und übernahm 1986 die Leitung einer Abteilung. 1988 wechselte er in die Pharma-Forschung der Bayer AG nach Wuppertal und kehrte 1990 in die Zentrale Forschung zurück. Die Schwerpunkte seiner wissenschaftlichen Arbeit liegen auf dem Gebiet der Antiinfektiva.

Kohlenhydratresten aufgebaut, Glycoglycerolipide aus Glycerin, Fettsäuren oder Fettethern und Kohlenhydraten. Die Zuckerreste sind jeweils *O*-glycosidisch verknüpft^[23].

Die grundlegenden Eigenschaften dieser interessanten Klasse von Zellwandkomponenten, ihr amphiphiler Charakter, der durch die Kombination von lipophilen Ketten mit hydrophilen Kohlenhydrat-Kopfgruppen entsteht, und ihre immense biologische Bedeutung, veranlaßte uns Anfang der achtziger Jahre, die Chemie der Glycolipide und ihrer einfacheren Analoga näher zu untersuchen. Unser ursprüngliches Ziel war es, einfache Glycosylamide wie **5** mit langen Alkylresten und Variationen in der polaren Region zu synthetisieren und zu untersuchen, welche Effekte diese Strukturen in biologischen Systemen hervorrufen können. Die über das anomere Kohlenstoffatom direkt mit den Zucker verbundenen lipophilen Amidreste aus langkettigen Alkylaminen und Fettsäuren sollten dabei die Wirkungsweise der natürlich vorkommenden Lipidreste nachahmen.

2.1. Synthese von Glycosylamiden

Wegen der zu geringen Basizität von Amiden gelingt die direkte Kondensation mit freien Zuckern zu Glycosylamiden nicht^[24]. Auch die Hilbert-Johnson-Reaktion^[25] ist nicht auf *N*-Alkyl-carbonsäureamide übertragbar, da hierbei nur *N*-silylierte Derivate entstehen, die die *N*-Glycosid-Synthese unmöglich machen^[26]. Die Synthese von Glycosylamiden gelingt aber in einem zweistufigen Prozeß^[27]. Der erste Schritt ist die Reaktion der freien Hydroxygruppe am anomeren C-Atom eines Zuckers mit einem Amin. Diese Reaktion führt zum Glucopyranosylamin, das wegen des geringen anomeren Effekts des Stickstoffatoms mit äquatorialer Konfiguration erhalten wird^[28]. Der zweite Schritt ist die selektive Acylierung des basischen Stickstoffatoms mit einem aktivierten Carbonsäurederivat unter Bildung der Glycosylamids.

Die Glycosylamin-Synthese aus einem freien Zucker und Ammoniak oder kurzkettigen aliphatischen Aminen läßt sich in polaren Lösungsmitteln problemlos bei Raumtemperatur unter Bildung kristalliner Produkte durchführen^[24]. Wegen der unterschiedlichen Löslichkeitseigenschaften von freiem Zucker und Fettamin war diese Variante nicht anwendbar. Erst bei höherer Temperatur reagieren beide Komponenten zu Glycosylaminen. Es entstehen allerdings auch vermehrt Nebenprodukte, die mit dem irreversiblen Abbau der Kohlenhydrate verknüpft sind (Bräunungsreaktion)^[24, 29].

Die Synthese langkettiger *N*-Glucopyranosylamine gelingt am besten, wenn der freie Zucker wie D-Glucose **6a** mit Stearylamin **7** (zwei- bis dreifacher molarer Überschuß) in Alkohol-Wasser-Gemischen oder Dimethylformamid (DMF) etwa 15 min auf 80 °C erwärmt wird. Durch den Überschuß an Amin läßt sich die Bildung von *N,N*-Diglycosylaminen zurückdrängen^[30]. Das β -Glycosylamin **8a** ist unter diesen Bedingungen das Hauptprodukt der Reaktion, es fällt beim Abkühlen der Reaktionsmischung zusammen mit dem Alkylamin **7** aus (Abb. 3). Bräunungsreaktionen treten nur in untergeordnetem Maße auf.

Die folgende *N*-Acylierung des Amingemisches konnte in alkoholischen Lösungsmitteln mit einem Überschuß von aktivierten Fettsäure-Derivaten wie Laurinsäurechlorid **9** oder

dem gemischten Anhydrid aus Laurinsäure und Chlorameisensäureethylester durchgeführt werden. Diese Reaktion ergab ein Gemisch aus *N*-(β -D-Glucopyranosyl)-*N*-stearyl-laurinsäureamid **10a** und *N*-Stearyl-laurinsäureamid, aus dem das Glycosylamid **10a** chromatographisch isoliert werden konnte. **10a** kristallisiert aus methanolischer Lösung.

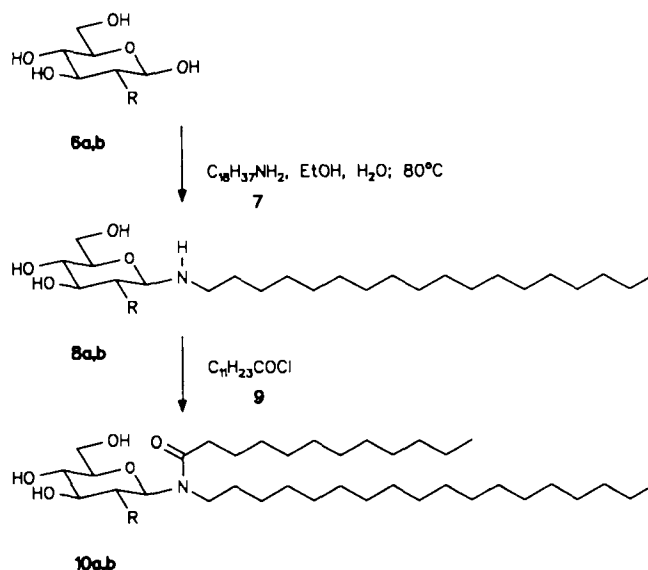


Abb. 3. Synthese eines einfachen Glycosylamids. a: R = OH, b: R = NHAc.

Andere Hexosen und Pentosen ließen sich unter ähnlichen Bedingungen zu den entsprechenden Glycosylamiden umsetzen. 2-Desoxy-D-glucose reagiert mit Stearylamin **7** bei 60 °C innerhalb weniger Minuten zum entsprechenden Glycosylamin, während die analoge Umsetzung von *N*-Acetylglucosamin **6b** mit Stearylamin **7** zu **8b** bei 80 °C ca. 3 h erfordert. Höhere Temperaturen führen auch hier zu mehr Bräunungsprodukten. Durch die folgende selektive *N*-Acylierung von **8b** wurde das *N*-(2-Acetamino-2-desoxy- β -D-glucopyranosyl)-*N*-octadecyl-carbonsäureamid **10b** erhalten. Die ent-

Tabelle 1. Vergleich der spezifischen Drehung von *N*-Glucopyranosyl-*N*-octadecyl-dodecansäureamiden **A**.

<div style="text-align: center;"> $\begin{array}{c} \text{O}=\text{C}-\text{C}_{11}\text{H}_{23} \\ \\ \text{Zucker}-\text{N}-\text{C}_{18}\text{H}_{37} \end{array} \quad \mathbf{A}$ </div>			
Verb.	Zuckerrest in A	$[\alpha]_D$	Solvens
10a	β -D-Glucopyranosyl	8.6	CH ₂ Cl ₂
10b	2-Acetamino-2-desoxy- β -D-glucopyranosyl	13.9	THF
11	β -D-Galactopyranosyl	11.4	CH ₂ Cl ₂
12	β -D-Mannopyranosyl	11.3	CH ₂ Cl ₂
13	2-Desoxy- β -D-glucopyranosyl	3.8	THF
14	α -D-Arabinopyranosyl	-20.1	THF
15	α -L-Arabinopyranosyl	20.0	THF
16	β -D-Ribopyranosyl	4.2	THF

sprechenden Umsetzungen anderer Hexosen und Pentosen mit Stearylamin und Laurinsäurechlorid führten in Gesamtausbeuten von 50–70 % zu den in Tabelle 1 angeführten Glycosylamiden^[31].

2.2. Physikalische Eigenschaften von Glycosylamiden

Die synthetisierten Glycosylamide sind chromatographisch einheitlich und weisen kleine positive optische Drehwerte auf (Tabelle 1), die die β -Konfiguration bestätigen^[32]. Bei Arabinosederivaten war die α -Konfiguration mit äquatorialem Amidrest an C-1 das bevorzugte Derivat. In FAB-Massenspektren sind die Molekülpeaks eindeutig nachweisbar.

Sowohl in den ^1H - als auch in den ^{13}C -NMR-Spektren sind Signalverdopplungen zu beobachten, die zwei Konformere in Lösung anzeigen. Im ^1H -NMR-Spektrum sind die Signale der Protonen der anomeren C-Atome der Epimere von **10a** bei $\delta = 5.45$ und 4.84 mit Kopplungskonstanten von über 8 Hz nachzuweisen (Lösungsmittel CD_3OD). Im ^{13}C -NMR-Spektrum erscheinen die Signale der anomeren Kohlenstoffatome bei $\delta = 88.17$ und 84.28 (Lösungsmittel CD_3OD) im Intensitätsverhältnis $2:1$. ^{13}C -NMR-Spektren von **10a** in $[\text{D}_6]$ Dimethylsulfoxid bei unterschiedlichen Temperaturen zeigten, daß die Signale der anomeren C-Atome dieser Verbindung bei 300 K gut separiert sind ($\delta = 86.25$ und 81.90 , Intensitätsverhältnis $2:1$), während sie sich bei 353 K noch in Koaleszenz befinden. Andere *N*-Alkyl-*N*-glycosylfettsäureamide dieser Klasse zeigen ein ähnliches Verhalten. Das Phänomen der Linienverdopplung in den NMR-Spektren von Glycosylamiden ist von analogen Glycosylamiden aus der Klasse der *N*-Acetyl-*N*-(β -D-glucopyranosyl)-naphthylethylamine bekannt, bei denen ebenfalls eine gehinderte Rotation um die amidische C-N-Bindung untersucht worden war^[33].

Eine ausgeprägte Eigenschaft von amphiphilen Molekülen ist es, sich in wäßrigen Medien ab einer kritischen Konzentration zu hochmolekularen Aggregaten anzuordnen. Die treibende Kraft dazu sind hydrophobe Wechselwirkungen zwischen den Alkylketten, die durch diese Anordnung vor der Wechselwirkung mit Wassermolekülen geschützt sind^[34]. Die Aggregate können sphärische, globuläre, abgeflachte oder zylindrische Micellen, ein- oder mehrwändige Vesikel (Liposomen), Doppelschichten, lamellare Phasen oder invertierte Strukturen bilden. Dabei ordnen sich die Alkylketten parallel zueinander an. Diese parallele Orientierung findet man auch in Zellmembranen, wo die polare Kopfgruppe der Phospholipide an der Membrangrenze angeordnet ist und die Alkylketten ins Innere der Membran weisen^[35, 36].

Auch die *N*-Alkyl-*N*-glycosyl-fettsäureamide bilden Aggregate, bei denen sich die Alkylketten parallel zueinander anordnen. Die Auswertung von Schub-Flächen-Diagrammen (Langmuir-Isothermen) monomolekularer Filme dieser Verbindungen an der Wasser-Luft-Grenzfläche ergaben für die Verbindungen **10a** und **12** einen Flächenbedarf von jeweils 40 Å^2 pro Molekül^[37]. Dies ist mit der Annahme zweier parallel orientierter Alkylketten in Einklang. Mit Kleinwinkel-Röntgenstreuung wurde nachgewiesen, daß diese Verbindungen abhängig von der Temperatur lamellare oder hexagonale Phasen bilden können^[38].

2.3. Adjuvanswirkung von Glycosylamiden

Die Untersuchung der *N*-Alkyl-*N*-glycosyl-fettsäureamide in immunologischen Testsystemen ergab überraschender-

weise, daß mehrere dieser relativ einfachen Verbindungen die Antikörperproduktion gegen verschiedene Antigene steigern. Anhand von *N*-(β -D-Glucopyranosyl)-*N*-stearyl-laurinsäureamid **10a** wurde in vitro eine dosisabhängige Steigerung der Antikörperbildung gegen Schafserthrozyten im Konzentrationsbereich von 3 bis 100 µg mL^{-1} festgestellt. Von besonderem Interesse war der Befund, daß **10a** alleine keine mitogene Aktivität (Induzierung von Zellteilungen) aufweist, sondern die Bildung von Antikörpern nur in Verbindung mit einem antigenen Stimulus erkennbar war^[39]. Demnach wirkte **10a** im gleichen Dosisebereich wie die bekannten Immunmodulatoren, jedoch offenbar über einen anderen, bisher nicht beschriebenen Mechanismus. Die genauere immunologische Charakterisierung dieser Verbindungsklasse wird in Abschnitt 3 beschrieben. Diese Befunde motivierten uns jedoch, Glycosylamide unter Struktur-Wirkungs-Aspekten näher zu betrachten.

2.4. Chemische Optimierungen der Leitstruktur

Variationen des Zuckerrestes, der lipophilen Reste und der Verzweigungsregion sollten die Einflüsse dieser Substrukturen klären. Nach dem in Abbildung 3 gezeigten Schema wurden geradkettige Alkylamine und aliphatische Fettsäuren mit Hexopyranosyl- und Pentopyranosylresten kombiniert. Die Wirkung auf die Antikörpersynthese in vitro hängt sowohl von der Kombination der Alkylketten als auch von der Natur der Kohlenhydratkomponente ab, wobei der Einfluß der polaren Gruppe stärker ist. Ein β -D-Glucopyranosylrest hat einen ähnlich starken Effekt wie der 2-Acetyl-amino-2-desoxy- β -D-glucopyranosylrest und der β -D-Mannopyranosylrest, geringere Aktivität wurde bei dem β -D-Galactopyranosylrest festgestellt. Keinen oder nur geringen Effekt haben Pentopyranosyl- und 2-Desoxy- β -D-glucopyranosylreste (Schema 1).

Glycolipid	10a	10b	11	12	13	14	15	16
Antikörpersynthese	3	3	2	3	0	0	0	1

Schema 1. Einfluß der Kohlenhydratkomponente auf die primäre Antikörpersynthese in vitro (Maus-Milzzellen, Antigen: Schafserthrozyten). Die Zahlen bedeuten: 3 starker Effekt, 2 mittlerer Effekt, 1 schwacher Effekt, 0 kein Effekt.

Die biologische Wirkung ist in diesen in-vitro-Modellen von den *n*-Alkylketten weniger stark abhängig. Beide Alkylketten müssen allerdings jeweils mindestens 12 Kohlenstoffatome lang sein. Kürzere Ketten führen zu cytotoxischen Effekten. Das gleiche gilt auch für Amphiphile aus einem Pyranoseres und nur einer Alkylkette.

Die Amidgruppierung als Verzweigungsregion ist ebenfalls von großer biologischer Bedeutung. Die Untersuchung von Glycolipiden mit Urethan-, Harnstoff-, *S*-Alkylthiocarbamat- oder Allophanatgruppierungen **17–20**, die aus *N*-Alkyl-*N*- β -D-glucopyranosylaminen wie **8a** durch Umsetzung mit Chlorameisensäurealkylestern, Alkylisocyanaten, Alkylthiocarbonylchloriden bzw. Alkoxy-carbonylisocyanaten zugänglich sind (Abb. 4), ergab, daß diese Verbin-

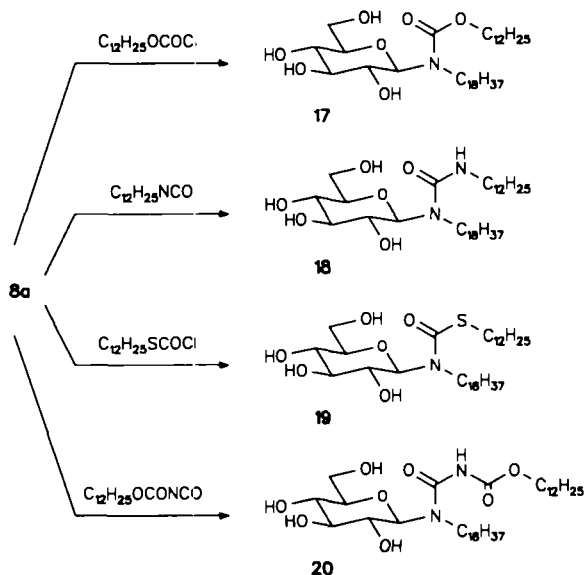


Abb. 4. Synthese des Glycosylurethans 17, -harnstoffs 18, -thiocarbamats 19 und -allophanats 20.

dungen im Gegensatz zu den Glycosylamiden nur geringe Wirkungen auf die Antikörperproduktion *in vitro* haben.

Die Auswirkung der Erhöhung der Lipophilie der Glycolipide wurde anhand der Einführung einer dritten Alkylkette an 2-Amino-2-desoxy-D-glucose-Derivaten untersucht. D-Glucosamin-hydrochlorid 21 wurde dazu in Isopropylalkohol bei 65 °C mit Octadecylamin zu *N*-(2-Amino-2-desoxy-β-

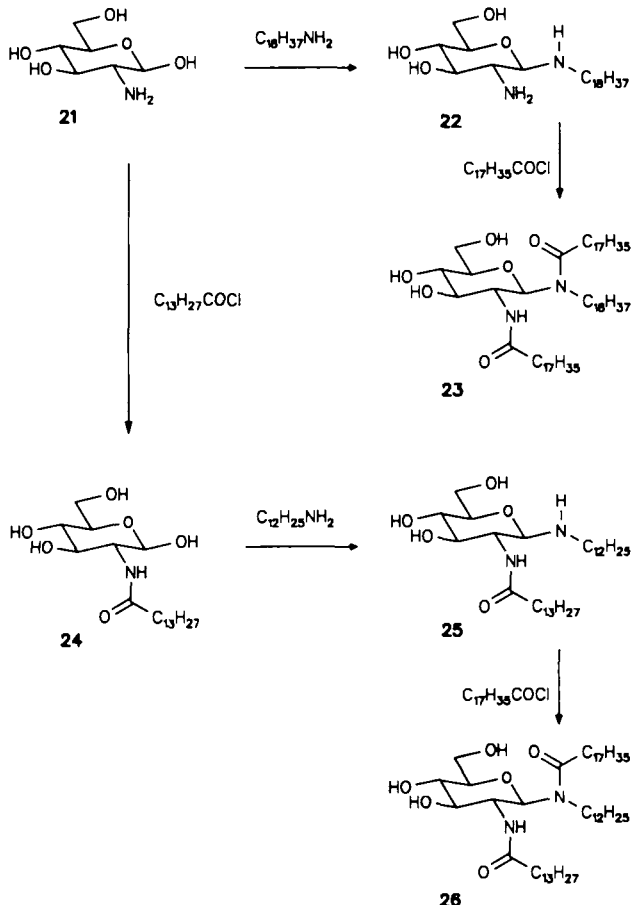
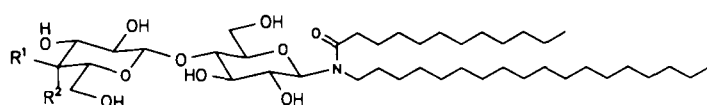


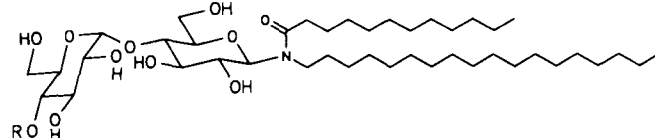
Abb. 5. Synthesen von Glycolipiden mit drei Alkylketten.

D-glucopyranosyl)-*N*-octadecylamin-hydrochlorid 22 umgesetzt. Durch Umsetzung mit zwei Äquivalenten Stearinsäurechlorid war daraus *N*-(2-Octadecanoylamino-2-desoxy-β-D-glucopyranosyl)-*N*-octadecyl-octadecansäureamid 23 erhältlich, das drei Ketten mit je 18 C-Atomen enthält. Drei unterschiedlich lange Alkylreste am Glucosamin konnten auf folgendem Weg erhalten werden: Acylierung der 2-Aminogruppe von Glucosamin mit Dodecansäurechlorid ergibt 2-Desoxy-2-dodecanoylamino-D-glucopyranose 24, dessen *N*-Glycosylierung mit Dodecylamin *N*-(2-Desoxy-2-dodecanoylamino-β-D-glucopyranosyl)-*N*-dodecylamin 25; *N*-1-Acylierung mit Octadecansäurechlorid führt dann zum *N*-(2-Desoxy-2-dodecanoylamino-β-D-glucopyranosyl)-*N*-dodecyl-octadecansäureamid 26. Mit verschiedenen Alkylaminen und Säurechloriden ließ sich eine breite Palette von Glucosaminderivaten mit unterschiedlichen Lipidresten herstellen (Abb. 5). Die Untersuchung der Verbindungen 23 und 26 und ihrer Homologen auf biologische Wirkung erwiesen sich jedoch aufgrund ihrer nur sehr geringen Löslichkeit in wässrigen Systemen als sehr schwierig. Die Struktur-Wirkungs-Beziehungen waren in sich nicht konsistent, so daß die biologischen Effekte dieser Subklasse letztendlich nicht zu beurteilen waren.



27 $R^1 = OH, R^2 = H$: β-Cellobiosylamid

28 $R^1 = H, R^2 = OH$: β-Lactosylamid



29 $R = H$: β-Maltosylamid

30 $R = \alpha$ -D-Glucopyranosyl: β-Maltotriosylamid

Abb. 6. Glycosylamide von Di- und Trisacchariden.

Auf der anderen Seite sollten Glycolipide mit mehreren Hydroxygruppen oder mit geladenen funktionellen Gruppen deutlich besser wasserlöslich sein. Zu diesem Zweck wurden die Disaccharide Cellobiose, Lactose oder Maltose oder das Trisaccharid Maltotriose nacheinander mit langkettigen Alkylaminen und anschließend mit Fettsäurechloriden zu Di- bzw. Trisaccharidlipiden 27–30 umgesetzt (Abb. 6). Diese Glycolipide sind in Wasser deutlich besser dispergierbar.

Von besonderem Interesse waren auch Glycosylamide mit Phosphatestergruppierungen. Da in Immunmodulatoren, die sich vom Lipid A ableiten, eine Phosphatestergruppe am Zucker für die biologische Aktivität essentiell ist, wurde die selektive *O*-Phosphorylierung von Lipiden der Monosaccharidamide näher untersucht.

Für eine selektive Phosphorylierung sollte die erhöhte Nucleophilie der primären Hydroxygruppe an der C-6-Position ausgenutzt werden. Die Umsetzung von 31 – das in zweistufiger Reaktion aus D-Galactose, Dodecylamin und Stearinsäurechlorid zugänglich ist – mit Dibenzylphosphorsäure-

chlorid in Gegenwart von Pyridin führt zu einem Phosphorsäuretriester, der sich in Gegenwart von Palladium-Aktivkohle zum 6-*O*-phosphorylierten Glycosylamid **32** hydrieren läßt (Abb. 7). Durch diese Phosphorylierung wurde auch

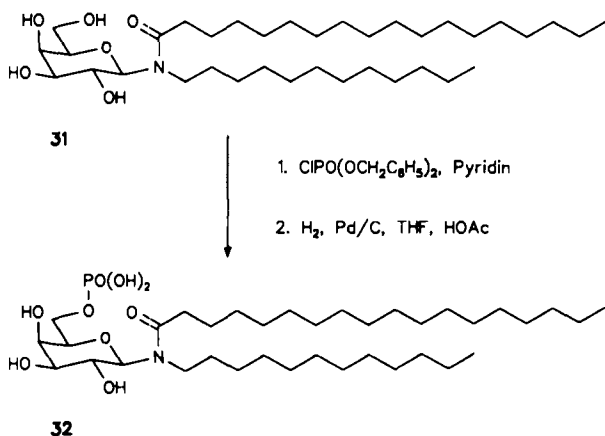


Abb. 7. Synthese eines *O*-phosphorylierten Glycosylamids mit antiviraler Wirkung.

eine Veränderung der Wirkqualität hervorgerufen. Während **31** die Antikörpersynthese *in vitro* stark stimuliert, ist dieser Effekt bei **32** etwas geringer ausgeprägt. Zusätzlich zeigt **32** jedoch eine signifikante antivirale Wirkung gegen Herpes-simplex-Virus Typ I (HSV I). Dieser Effekt beruht auf einer Steigerung des Interferontiters, der durch eine Virusinfektion hervorgerufen wird^[40].

2.5. Glycosylamide des Glucosamins

Um andere geladene funktionelle Gruppen in diese Glycolipide zu bringen, wurden 2-Aminozucker untersucht. Da Glucosamin-hydrochlorid mit Alkylaminen zu *N*-Alkyl-*N*-(2-Amino-2-desoxy- β -D-glucopyranosyl)amin reagiert, mußte zur Differenzierung der beiden Aminofunktionen die Aminogruppe am Zucker vor der *N*-Glycosid-Synthese blockiert werden. Eine Benzyloxycarbonyl-Schutzgruppe sollte sich selektiv in Gegenwart einer C-1-Amidfunktion abspalten lassen. Deshalb wurde D-Glucosamin zum *N*-Benzyloxycarbonylderivat **33** umgesetzt. Mit Alkylaminen reagierte **33** analog, aber deutlich langsamer zu Glycosylaminen als Zucker mit einer 2-Hydroxygruppe. In DMF bildet sich mit Tetradecylamin als Aminkomponente nach 4 h bei 80 °C das Glycosylamin **34** in 50 bis 60% Ausbeute (Abb. 8). Wegen der längeren Reaktionszeit findet verstärkt eine temperatur- und zeitabhängige Bildung von Nebenprodukten statt. Die langsame und unvollständige Reaktion ist offenbar auf den deaktivierenden Effekt des Carbamatrestes am C-2 des Zuckers zurückzuführen, der aber auch eine erhöhte Hydrolysestabilität des Glycosylamins **34** bewirkt.

Die Acylierung der C-1-Aminogruppe von **34** mit dem gemischten Anhydrid aus Stearinsäure und Chlorameisensäureethylester ergibt das Glycosylamid **35a**, das nach chromatographischer Reinigung problemlos zum *N*-(2-Amino-2-desoxy- β -D-glucopyranosyl)-*N*-tetradecyl-octadecansäureamid **36a** hydriert werden kann. Mit anderen aliphatischen Aminen und Fettsäuren lassen sich homologe Verbindungen synthetisieren.

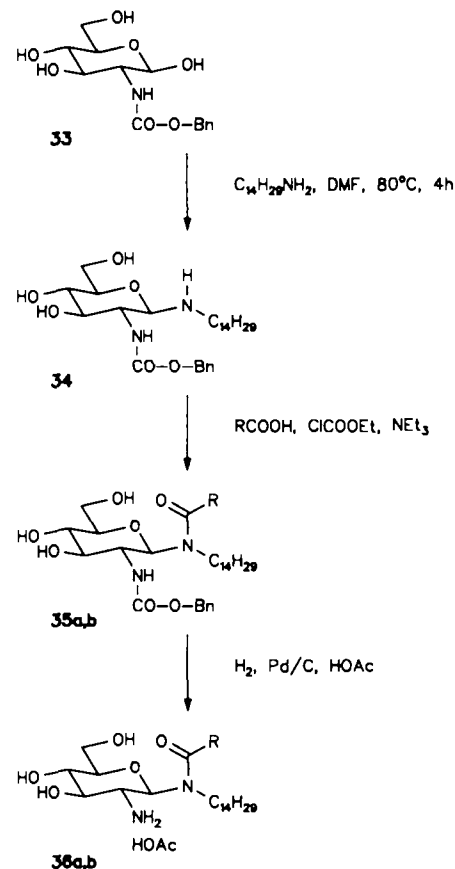


Abb. 8. Synthese von 2-Amino-2-desoxy-glycosylamiden. Bn = Benzyl, a: R = C₁₈H₃₇, b: R = C₁₂H₂₅.

Wie erwartet, bewirkt die Ammoniumgruppe in **36a** und Homologen eine erhöhte Löslichkeit in Wasser. Die Löslichkeit in Wasser-Ethanol (99:1, v/v) wurde durch HPLC bestimmt (Abb. 9).

R	Löslichkeit in Wasser-Ethanol 99:1 (v/v) [mg mL ⁻¹]
OH	2.1
NH-Ac	2.0
NH ₂ · HOAc	13.2

Abb. 9. Vergleich der Löslichkeiten von Glycosylamiden mit verschiedenen C-2-Substituenten an der Glucoseinheit.

2-Amino-2-desoxy-glycosylamide haben eine ausgeprägte Wirkung auf die Antikörpersynthese *in vitro* und *in vivo*. Mehrere Verbindungen, besonders **36a** und **36b**, übertreffen deutlich die Aktivität von **10a** und **10b**.

Die Verbindungen **36** und andere Homologe aus dieser Klasse ermöglichen über die freie Aminofunktion weitere selektive Derivatisierungen. Da Glycolipide mit Ammoniumgruppen in der Kopfregion nach bisherigen Befunden am interessantesten zu sein schienen, wurden Verknüpfun-

gen mit Aminosäuren angestrebt. Dies gelang durch die klassische, racemisierungsfrei verlaufende Kondensation mit geschützten Aminosäure-*N*-hydroxysuccinimidestern zu *N*-(2-Aminoacylamino-2-desoxy- β -D-glucopyranosyl)-*N*-alkylfettsäureamiden **38**, die hydrogenolytisch zu den freien Aminen **39** entblockiert werden konnten (Abb. 10). Durch Kombination aliphatischer Amine, Fettsäuren und Aminosäuren konnte so eine Vielzahl von Glycolipiden **39** mit polarem Charakter hergestellt werden^[41].

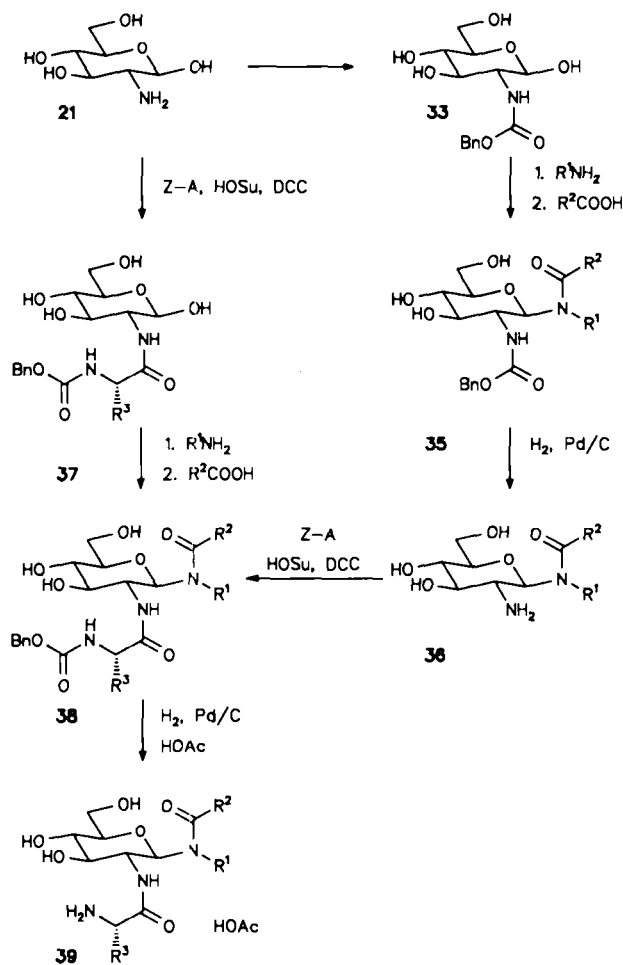


Abb. 10. Zwei Wege zu Peptidoglycolipiden. Z-A = Benzyloxycarbonyl-geschützte Aminosäure, HOSu = *N*-Hydroxysuccinimid, DCC = Dicyclohexylcarbodiimid, $R^1, R^2 = C_{11}H_{23}$ bis $C_{18}H_{37}$.

Die Peptidoglycolipide **39** konnten mit gleich guten Ergebnissen auch auf einem kürzeren Syntheseweg hergestellt werden (Abb. 10). Danach wurde in der ersten Stufe zunächst ein Konjugat **37** aus Glucosamin und einer *N*-Benzyloxycarbonyl-geschützten Aminosäure hergestellt. **37** reagierte ähnlich wie *N*-Acetylglucosamin in zwei Stufen mit

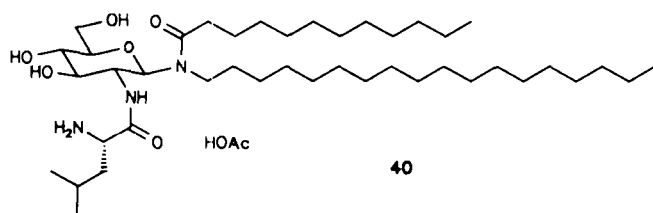


Abb. 11. Strukturformel von BAY R 1005 40.

Alkylaminen und aktivierten Fettsäuren zu den blockierten Peptidoglycolipiden **38**, die zu **39** entblockiert wurden.

Aus einer Vielzahl von Verbindungen des Typs **39** wurde *N*-(2-Desoxy-2-L-leucylamino- β -D-glucopyranosyl)-*N*-octadecyl-dodecansäureamid-Essigsäure **40** (BAY R 1005) (Abb. 11) für eine vertiefte biologische Entwicklung ausgewählt (siehe Abschnitt 3).

2.6. Lipophile Glycosylamide des Muramyl-dipeptids

Von besonderem Interesse war die Frage, ob der Glycosylamidrest, wie er in den GLAs auftritt, auch mit dem Strukturelement Muramyl-dipeptid (MDP) **1** kombinierbar ist und welche Effekte eine solche Modifikation auf die biologischen Wirkungen hat. In der Vergangenheit ist MDP schon öfters mit anderen lipophilen Strukturen verknüpft worden. So wurden 6-*O*-Mycolyl-, 6-*O*-Corynomycyl-^[42] und 6-*O*-Ubichinylfettsäureester von MDP^[43] synthetisiert und eine Antitumorwirkung nachgewiesen. Antiinfektive Wirkung oder Antitumorwirkung wurde auch bei solchen MDP-Derivaten gefunden, deren Peptidteil über eine kovalente Bindung mit einem Lipidrest verknüpft ist. Beispiele aus dieser Gruppe sind die Konjugate aus Muramyltripeptid und Dipalmitoylphosphatidyl-ethanolamin (CGP-19835A, MTP-PE)^[44] oder Muramyl-dipeptid und Stearoyl-L-lysin (MDP-Lys(L18), Muroctasin)^[45], die sich beide in fortgeschrittener klinischer Entwicklung befinden^[13].

Der Zuckerbaustein von MDP ist D-Glucosamin. Dieselbe Struktur liegt auch in den Glycolipiden vom Typ *N*-(2-Acetyl-amino-2-desoxy- β -D-glucopyranosyl)-*N*-alkylcarbonsäureamid **41** vor. Angestrebt war deshalb eine Kombination beider Strukturelemente in einem Molekül, wobei der gemeinsame Baustein der Aminosucker sein sollte.

Die Synthese der MDP-Lipide sollte sich prinzipiell aus Muramyl-dipeptid in zwei Stufen durch *N*-Glycosylierung und folgende *N*-Acylierung durchführen lassen. Wegen der erwarteten, verlustreichen *N*-Glycosidierung eines 2-Acetylaminosuckers schien es ökonomischer, von *N*-(2-Acetyl-amino-2-desoxy- β -D-glucopyranosyl)-*N*-alkylcarbonsäureamiden **41** auszugehen, den 3-*O*-Lactylether einzuführen und mit einem Dipeptidbaustein umzusetzen. Für die Einführung des Lactyletherrestes an C-3 der Zuckereinheit **41** wurden zunächst die C4- und C6-Hydroxygruppen als Benzylidenacetal blockiert. Die Verbindungen **42** konnten kristallin isoliert werden (Abb. 12).

Die 1H -NMR-Spektren der Derivate von **42** waren vollständig zu interpretieren. Die bei den 4,6-unsubstituierten Glycolipiden **41** beobachtbare Amid-Rotamerie liegt bei **42** vollständig aufgehoben. Die Verbindungen **42** liegen auch in Lösung nur in einer einzigen Konformation vor.

Die Alkoholfunktion in **42** wurde anschließend stereoselektiv mit L-Chlorpropionsäure **43** und Natriumhydrid zu den Lactyletherderivaten **44** umgesetzt^[46]. Die Ethersynthese verlief unter Walden-Umkehr unter vergleichbaren Bedingungen, wie sie bei α -konfigurierten *O*-Methylglycosiden beschrieben worden waren^[47]. Diastereomere konnten NMR-spektroskopisch nicht nachgewiesen werden. Nach Aktivierung der Carboxyfunktion als Hydroxysuccinimid-ester ergab die Kupplung mit dem Dipeptidbaustein^[48] L-Alanyl-D-isoglutamin-benzylester **45** die geschützten MDP-

Lipidderivate **46**, die durch Hydrogenolyse in die freien Peptidoglycolipide **47** überführt werden konnten.

Wie so häufig in der Wirkstoffsynthese führt die Kombination von zwei aktiven Strukturen in einem Molekül zu einem Wirkungsverlust. So auch im Falle der MDP-Glycoli-

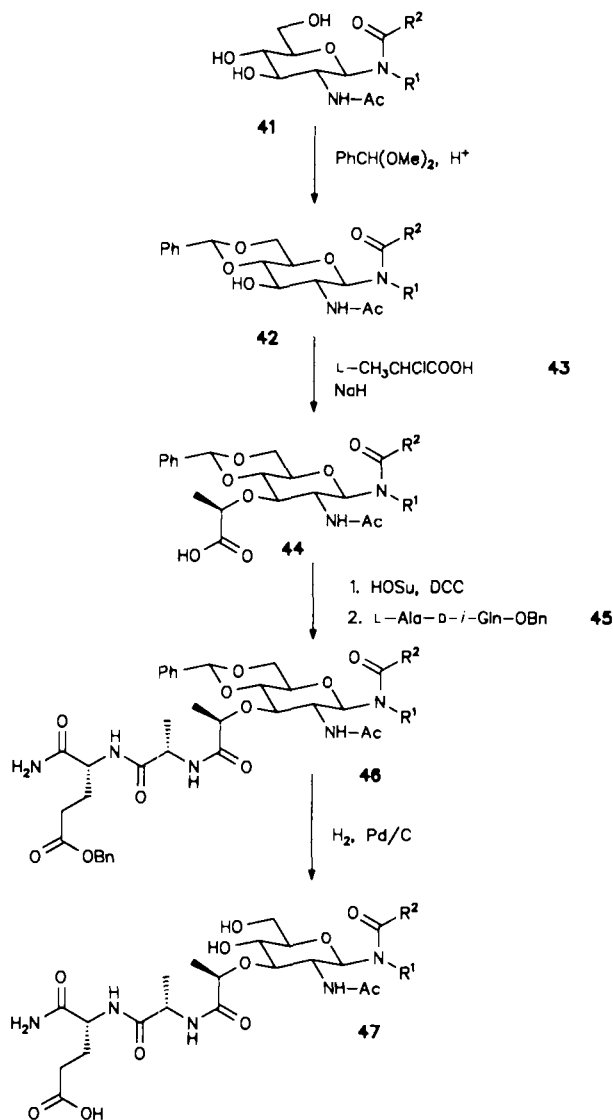


Abb. 12. Syntheschema von N-Glycosiden des Muramyldipeptids (MDP). $\text{R}^1, \text{R}^2 = \text{C}_{11}\text{H}_{23}$ bis $\text{C}_{18}\text{H}_{37}$, i-Gln = Isoglutamin.

pide **47**, die keine oder nur eine sehr schwache Steigerung der Antikörpersynthese bewirkten.

2.7. Röntgenkristallographische Untersuchungen

Die Kenntnis der Konformation von Lipiden ist für das Verständnis ihrer Anordnung untereinander und für ihre Organisation in einer Zellmembran von entscheidender Bedeutung. Röntgenkristallographische Untersuchungen an Phospholipiden^[49-52] ergaben, daß die beiden Alkylketten parallel zueinander mit einem Abstand von 4,8 Å in all-trans-Konformation angeordnet sind. Der Diederwinkel zwischen den beiden Ebenen beträgt nur wenige Grad. Die Struktur^[53] von 1,2-Dilauroyl-*sn*-glycero-3-phosphocholin **48** ist in Abbildung 13 wiedergegeben.

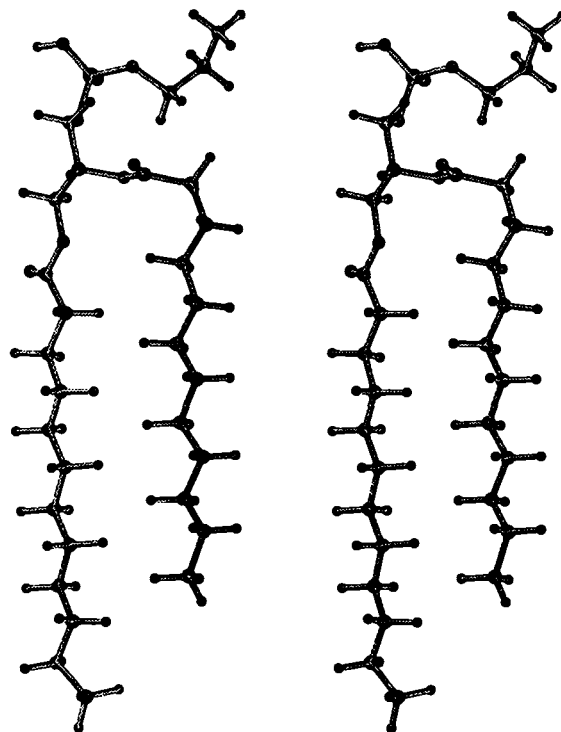


Abb. 13. Stereobild der Struktur von 1,2-Dilauroyl-*sn*-glycero-3-phosphorylcholin **48** im Kristall [53].

Von BAY R 1005 **40** selbst konnten keine Kristalle erhalten werden, die eine Röntgenstrukturanalyse ermöglichten. Dies gelang jedoch bei einer blockierten Vorstufe, dem Tri-*O*-acetat **49**, das aus methanolischer Lösung in langen Nadeln kristallisierte. Abbildung 14 zeigt das Ergebnis der Röntgenstrukturanalyse^[54].

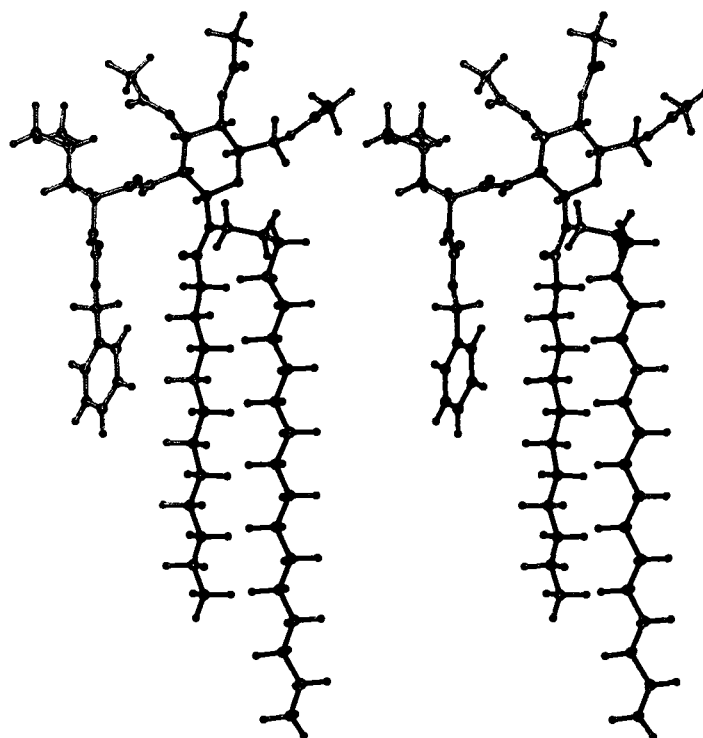


Abb. 14. Stereobild der Struktur des Glycosylamids **49** im Kristall.

Der Zuckerring in **49** liegt erwartungsgemäß in der 4C_1 -Konformation mit äquatorialer Anordnung aller Substituenten vor. Der Laurinsäurerest erstreckt sich linear in der Ebene des Zuckerringes, während die Alkylkette des Alkylamins oberhalb der Ringebene lokalisiert ist. Beide Alkylketten sind auch in diesem Lipidderivat parallel zueinander angeordnet mit einem mittleren Abstand von ca. 5 Å. Auffällig ist jedoch der Diederwinkel zwischen den Zickzack-Ebenen beider Alkylketten, der sich mit ca. 90° deutlich von dem von Phospholipiden unterscheidet. Diese Anordnung wird ermöglicht durch zwei *gauche*-Konformationen zwischen C2-C3 und C3-C4 des Alkylaminteils. Der Diederwinkel zwischen C1-H1 im Zuckerring und der Carbonylgruppe aus der Amidgruppierung am anomeren C-Atom des Zuckers beträgt nahezu 0°.

Ob diese Konformation der Lipidreste untereinander und relativ zum Zuckerring auch in Lösung vorliegt, läßt sich nicht zweifelsfrei beantworten, da wahrscheinlich auch durch die parallele Anordnung der Benzyloxycarbonyl-Schutzgruppe im Kristall eine Begünstigung dieser Struktur hervorgerufen wird. **49** liegt jedoch nach 1H -NMR-Messungen auch in Lösung als ein Konformer (ohne Amid-Rotamerie) vor, so daß diese Konformation auch als wahrscheinlich für den gelösten Zustand anzusehen ist.

Sowohl im 1H - als auch im ${}^{13}C$ -NMR-Spektrum ist nach Entblockierung von **49** zu BAY R 1005 **40** wieder die Amid-Rotamerie sichtbar, die auf zwei unterschiedliche Konformationen in Lösung hindeutet. Möglicherweise ist nun die in der Röntgenstrukturanalyse gefundene Konformation auch eine derjenigen, in der BAY R 1005 vorliegt.

3. Adjuvanswirkung

Das biologische Wirkprofil dieser neuen Klasse von Glycolipiden ist für Vaccinierungen außerordentlich interessant. Sowohl in vitro als auch in vivo steigern sie die spezifische Immunantwort (Adjuvanseffekt), wie im folgenden anhand von BAY R 1005 **40** näher beschrieben wird.

Bei der primären humoralen Immunantwort^[55] (Synthese von Antikörpern der Klasse IgM) von Milz-Zellkulturen (Maus) auf Schafserythrozyten als Antigene in Gegenwart von BAY R 1005 **40** induziert dieses eine dosisabhängige Steigerung der Zahl antikörperbildender Zellen im Konzentrationsbereich von 1–100 $\mu g mL^{-1}$. Von besonderer Bedeutung ist, daß dieser Effekt prinzipiell von T-Lymphozyten unabhängig ist, und daß die Steigerung der Antikörpersynthese streng antigenabhängig und nicht das Ergebnis einer unspezifischen, polyklonalen Stimulation ist. Nicht mit Schafserythrozyten stimulierte Kulturen wiesen nur eine vernachlässigswerte Erhöhung der Zahl antikörperbildender Zellen auf^[39, 56]. Das bedeutet, daß die GLAs im Unterschied zu nahezu allen anderen Adjuvantien^[57, 58] nicht mitogen wirken, sondern auf B-Lymphozyten nur zusammen mit einem antigenen Reiz wirken. BAY R 1005 scheint demnach auf Populationen von B-Lymphozyten als zweites Signal zu wirken, das erst mit dem Primärsignal des Antigens zur Auswirkung kommt.

Dieser Adjuvanseffekt ließ sich auch in vivo bei Immunisierungen von Mäusen reproduzieren. Bei intraperitonealer Gabe von Schafserythrozyten und gleichzeitiger subcutaner Gabe von BAY R 1005 wurde eine dosisabhängige Steige-

rung der Anzahl antikörperbildender Zellen festgestellt (Abb. 15). Vergleichbare Steigerungen der Antikörpertiter wurden ebenfalls nach Immunisierung mit dem löslichen Antigen Ovalbumin gemessen.

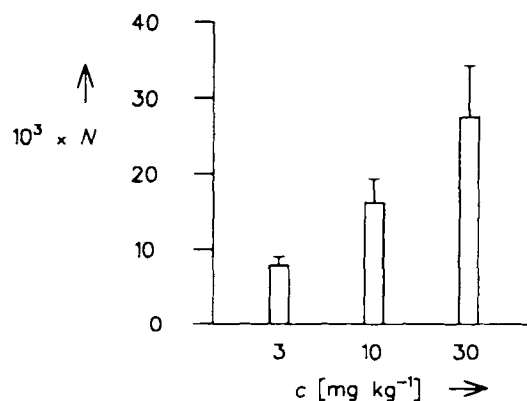


Abb. 15. Adjuvanseffekt von BAY R 1005 auf die primäre humorale Immunantwort gegen Schafserythrozyten. Mit zunehmender Dosis c steigt die Zahl N der antikörperbildenden Zellen.

BAY R 1005 **40** bewirkt auch eine Steigerung der Antikörpersynthese in vivo gegen virale Vaccine, die in suboptimalen Konzentrationen verabreicht werden^[59]. Durch gleichzeitige Gabe von BAY R 1005 konnte die Schutzwirkung einer Immunisierung mit einem inaktivierten Pseudorabies-Virusvaccin signifikant gesteigert werden. Nach Belastung mit infektiösem Virus waren die Überlebensraten und mittleren Überlebenszeiten der zusätzlich mit BAY R 1005 immunisierten Tiere deutlich höher als die in den Kontrollgruppen (Tabelle 2). Parallel zur Schutzwirkung wurden auch erhöhte Serumantikörpertiter mit neutralisierenden Eigenschaften nachgewiesen. Konventionelle Adjuvantien führten zu keiner Verbesserung des Schutzes virusinfizierter Mäuse.

Tabelle 2. Adjuvanseffekt von BAY R 1005 in CF-1-Mäusen bei Immunisierung mit β -Propiolacton-inaktiviertem Pseudorabies-Virus im Vergleich mit konventionellen Adjuvantien.

Behandlung	Überlebensrate [%] [a]
Kontrolle	
Formulierung (ohne Immunisierung)	0
Vaccin (ohne Adjuvans)	60
Konventionelle Adjuvantien	
Komplettes Freundsches Adjuvans [b]	60
Al(OH) ₃ - Saponin [b]	50
BAY R 1005 40 [$mg\ kg^{-1}$]	
3	90
6	100
12	100

[a] Ermittelt an jeweils zehn Tieren. [b] Mit Antigen 1:1 gemischt.

BAY R 1005 ist auch bei Tieren wirksam, deren Abwehr geschwächt ist. Restaurative und Adjuvanseffekte wurden in Mäusen beobachtet, die durch bakterielle Lipopolysaccharide oder Melanom-B₁₆-Tumore immunsupprimiert worden waren.

Alle bisher vorliegenden Daten zeigen, daß es sich bei BAY R 1005 aufgrund seiner Wirksamkeit und seines Wirkungsmechanismus um eine sehr bemerkenswerte Verbindung einer neuen Klasse von Adjuvantien handelt, die auch

lokal und systemisch sehr gut verträglich ist. Die Wirkungen auf das Immunsystem sind deutlich verschieden von denen von Amphiphilen anderer Strukturklassen, die schon bei relativ niedrigen Konzentrationen starke immunsuppressive Effekte zeigen^[60]. Die Wirkungen unterscheiden sich auch signifikant von den immunmodulatorischen Eigenschaften natürlicher Glycolipide aus der Klasse der Glycosphingolipide, die in vitro ebenfalls supprimierend auf die Antwort von Lymphozyten gegen Antigene wirken^[61].

4. Zusammenfassung und Ausblick

Die molekularen Mechanismen, die der immunologischen Wirkung der Glycolipidanaloga zugrunde liegen, können heute bei weitem noch nicht geklärt werden, da die Vorgänge zu komplex sind. Nach dem „Flüssig-Mosaik“-Modell von Membranen^[35] fällt den Lipiden nur die passive Rolle der Stabilisierung der Zellmembran zu. Dieses Modell erklärt jedoch nicht, weshalb die Natur mehrere Hundert verschiedene Lipide mit zum Teil erheblichem Stoffwechselaufwand synthetisiert. Neuere Untersuchungen ergaben, daß die Lipidzusammensetzung einer Membran Auswirkungen auf die Stoffwechselaktivität im Inneren der Zelle hat. Selbst kleine Strukturänderungen in den polaren Kopfgruppen von Glycolipiden und Phospholipiden haben starke Effekte auf die gegenseitige Mischbarkeit in festen und flüssigkristallinen Phasen^[62], die wiederum Auswirkungen auf die Membranfluidität hat. Dadurch kann die Konformation von Proteinen oder membranständigen Rezeptoren beeinflusst werden^[63]. Möglicherweise steht eine solche Fluiditätsänderung im Zusammenhang mit den beobachteten Konformerengleichgewichten der Glycolipide vom Glycosylamid-Typ. Interessant in diesem Zusammenhang ist auch ein neuerer Befund, nach dem Spaltprodukte von Sphingolipiden, Sphingosin und Lysosphingolipiden über eine Hemmung der Proteinkinase C als endogene Modulatoren der Zellfunktion wirken können^[64]. Die Auswirkung von BAY R 1005 40 oder von möglichen durch membranständige Lipasen gebildeten Spaltprodukten auf Second-Messenger-Systeme ist jedoch noch nicht untersucht.

Im Gegensatz zu diesen Spekulationen sind die beobachteten Effekte der hier beschriebenen Glycolipide in Vaccinierungsexperimenten eindeutig. BAY R 1005 führt in Kombination mit gereinigten Virusvaccinen und Subunit-Vaccinen zu einem erhöhten Schutz virusinfizierter Mäuse. Präklinische Versuche in vivo an anderen Tierarten (Schweine, Schafe, Pferde) und in vitro mit isolierten menschlichen Blutzellen^[65] zeigten vergleichbare Resultate, so daß eine Anwendung in der Veterinär- und Humanmedizin möglich sein sollte. Neben der allgemeinen Wirksamkeit ist jedoch dem Wirkungsmechanismus der Substanz besondere Aufmerksamkeit zu widmen: Die durch BAY R 1005 verursachte Steigerung der Antikörpersynthese ist spezifisch vom Antigen abhängig und nicht das Ergebnis einer polyklonalen Stimulation. Das Glycolipidanalogon wirkt auf die Proliferation von B-Lymphozyten als zweites Signal, das erst mit dem als erstes Signal wirkenden Antigen zur Auswirkung kommt. Da BAY R 1005 in der Lage ist, B-Lymphozyten unabhängig von der Helferfunktion von T-Lymphozyten zu aktivieren, könnte sich die Substanz als Adjuvans besonders für die

Immunisierung von Patienten mit defekten T-Lymphozytenfunktionen, z. B. AIDS-Patienten, als sehr hilfreich erweisen.

Dieser Überblick enthält zu weiten Teilen Ergebnisse mehrerer Kollegen, die sich unter chemischen, physikalischen und biologischen Fragestellungen mit diesen Glycolipiden auseinandergesetzt haben. Ich bin ihnen für ihren Einsatz und ihr Durchhaltevermögen zu Dank verpflichtet. An den präparativen Arbeiten waren hauptsächlich beteiligt: P. Stadler, Y. Hayauchi, B. W. Krüger und L. Röben. Mit den physikalischen Aspekten beschäftigten sich A. Zembrod und J. Goossens. Die biologischen Untersuchungen, Fragen des Wirkungsmechanismus und die Evaluierung der Glycolipide für Vaccinierungen wurden von H. G. Opitz, K. G. Stünkel, G. Streissle, V. Klimetzek und P. Thein durchgeführt. Die Strukturen wurden von P. Schmitt, C. Wünsche und D. Wendisch spektroskopisch aufgeklärt. L. Born bin ich für die Röntgenstrukturanalysen zu Dank verpflichtet.

Eingegangen am 14. August 1991 [A 847]

- [1] J. Klein: *Immunologie*, VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim 1991.
- [2] D. G. Kleid, *Annu. Rep. Med. Chem.* 19 (1984) 223–230.
- [3] A. C. Allison, N. E. Byars, *Bio/Technology* 5 (1987) 1041–1045.
- [4] H. S. Warren, L. A. Chedid, *Crit. Rev. Immunol.* 8 (1988) 83–101.
- [5] W. R. Ballou, S. L. Hoffman, J. A. Sherwood, M. R. Hollingdale, F. A. Neva, W. T. Hockmeyer, D. M. Gordon, I. Schneider, R. A. Wirtz, J. F. Young, G. F. Wasserman, P. Reeve, C. L. Diggs, J. D. Chulay, *Lancet* 1987, 1277–1281.
- [6] D. A. Herrington, D. F. Clyde, G. Losonsky, M. Cortesia, J. R. Murphy, J. Davis, S. Baqar, A. M. Felix, E. P. Heimer, D. Gillesen, E. Nardin, R. S. Nussenzweig, V. Nussenzweig, M. R. Hollingdale, M. M. Levine, *Nature* 328 (1987) 257–259.
- [7] M. E. Patarroyo, R. Amador, P. Clavijo, A. Moreno, F. Guzman, P. Romero, R. Tacon, A. Franco, L. A. Murillo, G. Ponton, G. Trujillo, *Nature* 332 (1988) 158–161.
- [8] D. A. Eppstein, N. E. Byars, A. C. Allison, *Adv. Drug Delivery Rev.* 4 (1990) 233–253.
- [9] A. S. Fauci, S. A. Rosenberg, S. A. Sherwin, C. A. Dinarello, D. L. Longo, H. C. Lane, *Ann. Intern. Med.* 106 (1987) 421–433.
- [10] D. E. S. Stewart-Tull, M. Parant, *Ann. Immunol. Hung.* 26 (1986) 197–223.
- [11] V. Ruzsala-Mallon, Y. I. Lin, F. E. Durr, B. S. Wang, *Int. J. Immunopharmacol.* 10 (1988) 497–510.
- [12] J. P. Devlin, K. D. Hargrave, *Tetrahedron* 45 (1989) 4327–4369.
- [13] G. Baschang, *Tetrahedron* 45 (1989) 6331–6360.
- [14] V. S. Georgiev, *Med. Res. Rev.* 10 (1990) 371–409.
- [15] A. Adam, E. Lederer, *Med. Res. Rev.* 4 (1984) 111–152.
- [16] P. Lefrancier, E. Lederer, *Pure Appl. Chem.* 59 (1987) 449–454.
- [17] J. A. Rudbach, J. L. Cantrell, J. T. Ulrich, M. S. Mitchell, *Adv. Exp. Med. Biol.* 256 (1990) 665–676.
- [18] O. Westphal, O. Lüderitz, *Angew. Chem.* 66 (1954) 407–417.
- [19] O. Lüderitz, C. Galanos, V. Lehmann, H. Mayer, E. T. Rietschel, J. Weckesser, *Naturwissenschaften* 65 (1978) 578–585.
- [20] S. Hakomori, *Annu. Rev. Biochem.* 50 (1981) 733–764.
- [21] T. Feizi, *Nature* 314 (1985) 53–57.
- [22] S. Hakomori, *Prog. Cancer Res. Ther.* 32 (1985) 139–156.
- [23] C. C. Sweeley, B. Siddiqui in M. I. Horowitz, W. Pigman (Hrsg.): *The Glycoconjugates*, Vol. 1, Academic, New York 1977, S. 459–540.
- [24] H. Paulsen, K.-W. Pflughaupt in W. Pigman, D. Horton (Hrsg.): *The Carbohydrates*, Vol. 1 B, Academic, New York 1980, S. 881–927.
- [25] U. Niedballa, H. Vorbrüggen, *Angew. Chem.* 82 (1970) 449–450; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 9 (1970) 461–462.
- [26] G. Snatzke, J. Vlahov, *Liebigs Ann. Chem.* 1985, 439–447.
- [27] J. E. Hodge, B. F. Moy, *J. Org. Chem.* 28 (1963) 2784–2789.
- [28] H. Paulsen, Z. Györgydeak, M. Friedmann, *Chem. Ber.* 107 (1974) 1590–1613.
- [29] G. P. Ellis, *Adv. Carbohydr. Chem.* 14 (1959) 63–134.
- [30] H. S. Isbell, H. L. Frush, *J. Org. Chem.* 23 (1958) 1309.
- [31] P. Stadler, O. Lockhoff, H. G. Opitz, K. Schaller, DE 3213650 (1982/1983), Bayer.
- [32] G. P. Ellis, J. Honeyman, *Adv. Carbohydr. Chem.* 10 (1955) 95–168.
- [33] M. M. Vigdorchik, N. P. Kostyuchenko, R. P. Olad'ko, G. S. Mosina, Yu. N. Sheinker, N. L. Suvorov, *J. Org. Chem. USSR (Engl. Transl.)* 9 (1973) 617–622.
- [34] J. N. Israelachvili, S. Marcelja, R. G. Horn, *Q. Rev. Biophys.* 13 (1980) 121–200.
- [35] S. J. Singer, G. L. Nicolson, *Science* 175 (1972) 720–731.
- [36] H. Eibl, *Angew. Chem.* 96 (1984) 247–262; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 23 (1984) 257–271.

- [37] B. Hagenhoff, M. Deimel, A. Benninghoven, H. O. Siegmund, D. Holtkamp, *J. Phys. D: Appl. Phys.* (1991), eingereicht.
- [38] R. Zorn, M. Grönce, O. Lockhoff, G. Nimtz, *Biophys. J.* 58 (1990) 1199-1206.
- [39] K. G. Stünkel, O. Lockhoff, H. G. Opitz, V. Klimetzek, G. Streissle, A. Paessens, P. Stadler, H. D. Schlumberger, *Adv. Biosci. (Oxford)* 68 (1988) 429-437.
- [40] O. Lockhoff, B. W. Krüger, P. Stadler, A. Paessens, G. Streissle, P. Taylor, H. J. Zeiler, K. G. Metzger, DE 3403495 (1983/1985), Bayer.
- [41] O. Lockhoff, Y. Hayauchi, P. Stadler, K. G. Stünkel, G. Streissle, A. Paessens, V. Klimetzek, H. J. Zeiler, K. G. Metzger, H. P. Kroll, H. Brunner, K. Schaller, DE 3421994 (1985/1987), Bayer.
- [42] T. Shiba, S. Okada, S. Kusumoto, I. Azuma, Y. Yamamura, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* 51 (1978) 3307-3311.
- [43] S. Kobayashi, T. Fukuda, I. Imada, M. Fujino, I. Azuma, Y. Yamamura, *Chem. Pharm. Bull.* 27 (1979) 3193-3196.
- [44] B. Lukas, K. H. Schmidt-Ruppin, DE 3326163 (1982/1984), Ciba-Geigy.
- [45] T. Shiba, Y. Yamamura, O. Nagase, S. Kotani, H. Ogawa, US 4317771 (1982), Daiichi Seiyaku.
- [46] O. Lockhoff, Y. Hayauchi, P. Stadler, H. Brunner, DE 3604681 (1986, 1987), Bayer.
- [47] Y. Matsushima, J. T. Park, *J. Org. Chem.* 27 (1962) 3581-3583.
- [48] S. Kusumoto, Y. Tarumi, K. Ikenaka, T. Shiba, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* 49 (1976) 533-539.
- [49] P. B. Hitchcock, R. Mason, K. M. Thomas, G. G. Shipley, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 71 (1974) 3036-3040.
- [50] R. H. Pearson, I. Pascher, *Nature* 281 (1979) 499-501.
- [51] H. Hauser, I. Pascher, S. Sundell, *J. Mol. Biol.* 137 (1980) 249-264.
- [52] K. Harlos, H. Eibl, I. Pascher, S. Sundell, *Chem. Phys. Lipids* 43 (1984) 115-126.
- [53] M. Elder, P. B. Hitchcock, R. Mason, G. G. Shipley, *Proc. R. Soc. London A* 354 (1977) 157-170.
- [54] L. Born, O. Lockhoff, unveröffentlicht.
- [55] R. Mishell, R. W. Dutton, *J. Exp. Med.* 126 (1967) 432.
- [56] K. G. Stünkel, O. Lockhoff, G. Streissle, V. Klimetzek, A. Paessens, H. D. Schlumberger in J. C. Mani, J. Dornand (Hrsg.): *Lymphocyte Activation and Differentiation*, de Gruyter, Berlin 1988, S. 421-425.
- [57] J. Anderson, F. Melchers, C. Galanos, O. Lüderitz, *J. Exp. Med.* 137 (1973) 943-953.
- [58] C. Damais, M. Parant, L. Chedid, *Cell. Immunol.* 34 (1977) 49-56.
- [59] K. G. Stünkel, A. Paessens, G. Streissle, G. Hewlett, O. Lockhoff, H. D. Schlumberger in J. G. Kaplan, D. R. Green, R. C. Bleackley (Hrsg.): *Prog. Leukocyte Biol. 9 (Cellular Basis Immune Modulation)*, Liss, New York 1989, S. 575-579.
- [60] R. B. Ashman, R. V. Blanden, B. W. Ninham, D. F. Evans, *Immunol. Today* 7 (1986) 278-283.
- [61] D. M. Marcus, *Mol. Immunol.* 21 (1984) 1083-1091.
- [62] R. D. Koynova, H. L. Kuttentrich, B. G. Tenchov, H.-J. Hinz, *Biochemistry* 27 (1988) 4612.
- [63] I. Ishizuka, T. Yamakawa in H. Wiegandt (Hrsg.): *Glycolipids*, Elsevier/Academic, New York 1985.
- [64] Y. A. Hannun, R. M. Bell, *Science* 243 (1989) 500-507.
- [65] J. Bauer, K. G. Stünkel, *Biotechnol. Prog.*, im Druck.

WUT ZUR LÜ KE



**Hat schon wieder ein anderer die Angewandte?
Statt vor Wut zu kochen: Lückenlos auf dem
neuesten Stand mit einem persönlichen
Abonnement!**

Anruf oder Fax genügt



Tel. (06201) 602216, Fax (06201) 602328
Postfach 101161, D-6940 Weinheim