

Lichtgesteuerte Parallelsynthese von bis zu 250 000 verschiedenen Oligopeptiden und Oligonucleotiden

Von Günter von Kiedrowski*

Die Entwicklung von Enzyminhibitoren auf der Basis von Oligopeptiden macht es erforderlich, zur Auffindung eines optimal bindenden Liganden eine beachtliche Zahl von sequenzalternativen Oligopeptiden herzustellen und auf ihre Bindungseigenschaften zu prüfen. Selbst wenn man sich dabei auf die zwanzig natürlichen Aminosäuren beschränkt, sind bereits $20^2 = 400$ Dipeptide, $20^3 = 8000$ Tripeptide und allgemein 20^N Oligopeptide der Länge N möglich. Ein systematisches „Austesten“ aller möglichen Sequenzalternativen ist bei konventioneller Arbeitsweise bereits bei Tetrapeptiden (160 000 Verbindungen) praktisch nicht mehr möglich. Durch „Molecular Modeling“ und quantitative Struktur-Wirkungs-Beziehungen lassen sich zwar ausgehend von einer bekannten Leitsequenz viele Sequenzalternativen ausschließen, für eine rationale Wirkstoffentwicklung (rational drug design)^[1] im eigentlichen Sinne muß jedoch die dreidimensionale Struktur des Rezeptors bekannt sein. Ein „irrational drug design“^[2], d. h. ein Herausfiltern der bindenden Sequenzen aus einem Pool mit statistischen Sequenzen, setzt voraus, daß der „beste“ Ligand anschließend in reiner Form

sind kürzlich in dieser Zeitschrift bereits in einem „Highlight“ gewürdigt worden^[3].

Einen chemischen Ansatz für ein irrational drug design beschrieben nun *Fodor* et al. in einer kürzlich erschienenen Arbeit^[4]. Durch die Kombination dreier Verfahren – der Festphasensynthese, der Photolithographie und der Affinitätsmarkierung – wird es möglich, auf einem Glasplättchen pro Quadratzentimeter bis zu 250 000 verschiedene Oligopeptide oder Oligonucleotide nebeneinander herzustellen und anschließend ihre Bindung an ein vorgegebenes Rezeptormolekül zu prüfen. Das Prinzip der photolithographischen Festphasensynthese ist in Abbildung 1 am Beispiel des parallelen Aufbaus von zwei Dipeptiden aus zwei Aminosäuren gezeigt.

Die Glasoberfläche wird zunächst mit 3-Aminopropyl(triethoxy)silan behandelt, dann werden die nun über einen C₃-Spacer an die Glasoberfläche gebundenen Aminogruppen mit der Nitroveratryloxycarbonyl(NVOC)-Gruppe, einer photochemisch abspaltbaren Schutzgruppe, geschützt (Schritt I). Bei der Belichtung (Schritt II) werden die NVOC-

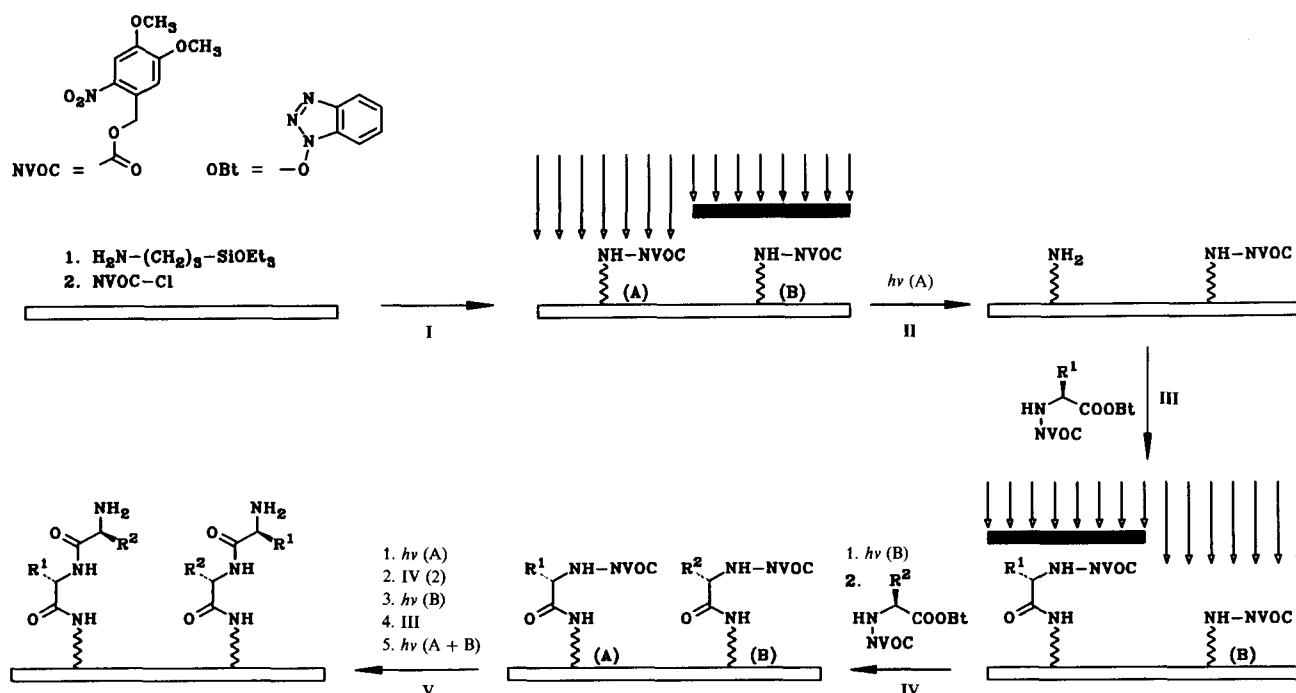


Abb. 1. Lichtgesteuerte Parallelsynthese von zwei Dipeptiden aus zwei Aminosäuren in zwei Belichtungsfeldern.

vorliegt und in einer für die Strukturaufklärung ausreichenden Konzentration zur Verfügung steht – oder auf ein entsprechendes Konzentrationsniveau angehoben werden kann. Letzteres beschränkt das irrational drug design weitgehend auf Biopolymere, die klonierbar (z. B. Antikörper) oder in vitro replizierbar sind (Nucleinsäuren). Derartige Ansätze

Gruppen an den Stellen entfernt, die nicht durch eine lichtundurchlässige Maske abgedeckt sind. Die Aminogruppen auf der Oberfläche des belichteten Feldes A werden nun mit der ersten NVOC-geschützten, C-terminal als 1-Hydroxybenzotriazol(HOBt)-ester aktivierten Aminosäure acyliert (Schritt III). Nach Belichtung des Feldes B (unter Maskierung von A) sowie Acylierung mit der zweiten Aminosäure ist die Synthese auf der ersten Ebene abgeschlossen (Schritt IV). Analoge Belichtungs- und Kupplungsschritte finden

[*] Dr. G. von Kiedrowski

Institut für Organische Chemie der Universität
Tammannstraße 2, D-3400 Göttingen

beim Aufbau der Dipeptide auf der zweiten Ebene statt (Schritt V).

Zweckmäßigerweise belichtet man bei der Synthese auf den einzelnen Ebenen in Streifen, die von einer Ebene zur nächsten jeweils um 90° versetzt sind. Dies entspricht einer Belichtung in den Reihen und Spalten einer quadratischen Matrix und ermöglicht in der Praxis wesentlich kürzere Synthesezeiten als sie mit der Einzelbelichtung diskreter Felder möglich wären. Die kürzesten Synthesezeiten werden mit der „binären Maskierungstechnik“ erzielt, bei der die Streifenrichtung mit jedem Synthesecyclus alterniert und die Streifenbreite mit jedem zweiten Synthesecyclus auf die Hälfte verringert wird, während sich die Zahl der Streifen in der Maske verdoppelt. Auf diese Weise können mit n Synthesecyclen 2ⁿ verschiedene Oligomere aufgebaut werden, deren Längen durch eine Binomialverteilung beschrieben sind (kombinatorische Synthese). 10 Synthesecyclen z. B. liefern 1024 (weniger eins) verschiedene Peptide, darunter „1 der Länge 0“, 10 der Länge 1, 45 (2), 120 (3), 210 (4), 252 (5), 210 (6), 120 (7), 45 (8), 10 (9) und 1 (10). Jede Peptidsequenz ist einem der 1024 Felder einer (32 \times 32)-Matrix zugeordnet.

Ein letzter Belichtungsschritt entfernt die *N*-terminalen NVOC-Gruppen aller Peptide; gegebenenfalls sind weitere Deblockierungsreaktionen für die Freisetzung der funktionalen Gruppen in den Seitenketten erforderlich. Zur Affinitätsprüfung wird das Glasplättchen mit den chemisch gebundenen Peptiden einfach in eine Lösung des fluoreszenzmarkierten Rezeptormoleküls gehalten, gespült und anschließend unter dem Fluoreszenzmikroskop betrachtet. Aus der Fluoreszenzintensität eines Feldes kann direkt auf die Affinität des zugehörigen Peptids zum vorgegebenen Rezeptor geschlossen werden. Die Autoren demonstrieren das gesamte Verfahren an einer kombinatorischen Synthese von 1024 Peptiden, deren Bindung an den Antikörper 3E7 geprüft wird. Die 15 Peptide mit deutlich erkennbarer Affinität beginnen alle mit der Sequenz 5'-H₂N-Tyr-Gly. Dieser Befund deckt sich mit Ergebnissen von Cwirla et al., wonach ein *N*-terminaler Tyrosinrest die Schlüsseldeterminante bei der Bindung an 3E7 ist^[5].

Zur Belichtung verwendeten die Autoren eine Quecksilberbogenlampe, die bei $\lambda = 365$ nm und 12 mW cm^{-2} eine Belichtungszeit von 20 min erfordert. Kürzere Belichtungszeiten sollten mit einem Argon-Laser möglich sein. Um eine Anregung aromatischer Seitenketten und insbesondere einen photochemischen Tryptophanabbau zu verhindern, sind kürzere Wellenlängen nicht empfehlenswert. Die Gesamt-

ausbeute pro Synthesecyclus (Belichtung und Kupplung) beträgt 85–95 %, so daß das Verfahren bei Oligopeptiden mit mehr als zehn Aminosäuren nur in Ausnahmefällen sinnvoll scheint. Maskentechnisch ist eine Auflösung von $> 20 \mu\text{m}^2$ pro Synthesefeld erreichbar, bei $50 \mu\text{m}^2$ großen Elementen lassen sich auf einem Mikroskopie-Deckplättchen problemlos 250 000 Synthesen adressieren. Die Autoren zeigen, daß ihr Verfahren nicht auf Oligopeptidsynthesen beschränkt ist, sondern auch bei lichtgesteuerten Oligonucleotidsynthesen anwendbar ist, wobei sich 5'-NVOC-geschützte Nucleosid-3'-cyanethylphosphoamidite als monomere Bausteine eignen.

Drei kritische Fragen müssen allerdings noch experimentell beantwortet werden, bevor sich eine allgemeine Anwendung für Affinitätsstudien abzeichnet:

1. Hat das trägegebundene Oligopeptid dieselbe Konformation wie in Lösung?
2. Welcher Spacer ist alternativ zu einer C₃-Kette zu verwenden, damit ein Großteil biologischer Rezeptoren ungehindert anbinden kann?
3. Lassen sich die Ausbeuten der Synthesecyclen, z. B. durch Verwendung anderer Schutzgruppen, verbessern?

Man darf mit Spannung erwarten, ob die Autoren demnächst eine Lösung der genannten Probleme anbieten. Sollte dies eintreten, so ist abzusehen, daß lichtbetriebene Parallelsynthesizer ähnlich wie die heutigen Peptid- und DNA-Synthesemaschinen bald viele Pharmaforschungs- und Hochschullaboratorien erobern werden. Die Lage des Affymax Research Institute der Autoren im „Silicon Valley“ wird die Entwicklung erster Prototypen für kommerzielle Maschinen jedenfalls nicht behindern.

-
- [1] H. Fröhbeis, R. Klein, H. Wallmeier, *Angew. Chem.* 99 (1987) 413; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 26 (1987) 403.
 - [2] Der Begriff „irrational drug design“ wurde kürzlich von S. Brenner auf einem Symposium über natürliche und künstliche Selektionsvorgänge (Max-Planck-Institut für Biophysikalische Chemie, Göttingen, 17.–19. April 1991) geprägt. Im Gegensatz zum „rational drug design“, bei dem mehr oder weniger detaillierte Kenntnisse über den Rezeptor, den Liganden sowie deren Wechselwirkung vorliegen und in die Entwicklung verbesserter Liganden einfließen, sind unter „irrational drug design“ kenntnisfreie Ansätze zu verstehen, bei denen ein großes Repertoire an Liganden „blind“ getestet wird.
 - [3] A. Plückthun, L. Ge, *Angew. Chem.* 103 (1991) 301; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 30 (1991) 296.
 - [4] S. P. A. Fodor, J. L. Read, M. C. Pirrung, L. Stryer, A. T. Lu, D. Solas, *Science* 251 (1991) 767.
 - [5] S. E. Cwirla, E. A. Peters, R. W. Barrett, W. J. Dower, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87 (1990) 6378.