

Die charakteristische AT-III-Bindungsregion in Heparin: eine Leitstruktur für neue synthetische Antithrombotica

Von Constant A. A. van Boeckel* und Maurice Petitou*

Heparin, ein sulfatiertes Glycosaminoglycan, ist ein bekanntes Anticoagulans, dessen Wirkung über den Serin-Protease-Inhibitor Antithrombin III (AT III) vermittelt wird. Heparin ist seit mehr als einem halben Jahrhundert zur Prophylaxe und Behandlung venöser Thrombosen und Thromboembolien in klinischer Anwendung. Noch bis in die 80er Jahre hinein nahm man an, daß die biologische Aktivität von Heparin hauptsächlich auf seinen polyanionischen Charakter zurückzuführen sei. Als man jedoch entdeckte, daß ein Teil der Heparin-Polysaccharide eine wohldefinierte Pentasaccharidomäne enthält, die spezifisch AT III bindet und aktiviert, geriet dieses Paradigma ins Wanken. Biologische Untersuchungen an mehreren synthetischen Heparin-Analoga erhellten die Spezifität der Wechselwirkung zwischen diesem charakteristischen Pentasaccharid und AT III. Dieser Aufsatz gibt eine Übersicht über die Synthese des Heparin-Pentasaccharids, einiger nahe verwandter Strukturen und einiger stark modifizierter Analoga. Mit Molecular Modeling und „maßgeschneiderten“ strukturellen Modifizierungen an diesem Pentasaccharid konnten zahlreiche Erkenntnisse über Struktur-Aktivitäts-Beziehungen gewonnen werden. Dies gab nicht nur den Anstoß für die Entwicklung wirksamerer und einfacherer Derivate, sondern ermöglichte auch ein detailliertes Verständnis der Erkennung von Heparin und AT III auf molekularer Ebene.

1. Einleitung^[**]

Die chemisch eng verwandten Polysaccharide Heparin und Heparansulfat sind in vielen lebenden Organismen zu finden^[1–3]. Während Heparansulfat in verschiedensten Zelltypen und Geweben verbreitet ist, kommt Heparin nur in einem Zelltyp vor: den Mastocyten, in denen es an Histamin komplexiert ist. Aufgrund seiner anticoagulanten Eigenschaften im Blut, die sich auch die klinische Anwendung

zur Verhinderung venöser Thrombosen (die Bildung von Blutgerinnseln in Venen) zunutze macht, wurde Heparin viel Aufmerksamkeit geschenkt.

Chemisch gesehen ist Heparin ein Glycosaminoglycan. Zu dieser Familie komplexer anionischer Polysaccharide zählen Glucosaminoglycane (Heparin, Heparansulfat), Galactosaminoglycane (Chondroitin-4-sulfat, Chondroitin-6-sulfat, Dermatansulfat) sowie Hyaluronsäure und Keratansulfat. In Abbildung 1 ist die Struktur von Heparin^[4] schematisch dargestellt. Sie besteht aus einem Kohlenhydratrückgrat, das alternierend aus 1,4-verknüpften Uronsäure- (D-Glucuron- oder L-Iduronsäure) und Glucosamineinheiten aufgebaut ist. Ein Standard-Heparinpräparat setzt sich aus einer Mischung linearer Polysaccharide zusammen, die aus ungefähr 20 bis 100 Monosacchariden aufgebaut sind. Viele der Monosaccharide sind, wie in Abbildung 1 gezeigt, in verschiedenen Positionen ein- oder mehrfach substituiert.

Heparin inhibiert die Blutgerinnung^[5] über die Aktivierung von Antithrombin III (AT III), einem physiologischen

[*] Dr. C. A. A. van Boeckel
Organon International B. V.
Kloosterstraat 6,
NL-5340 BH Oss (Niederlande)
Telefax: Int. + 4120/62546

Dr. M. Petitou
Sanofi Recherche
9, Rue du President Allende, F-94256 Gentilly Cedex (Frankreich)

[**] Abkürzungen: All = Allyl, Ac = Acetyl, Bn = Benzyl, Bz = Benzoyl,
Z = Benzoxy-carbonyl, MCA = Monochloracetyl, Lev = Lävulinoyl,
OTf = Trifluoromethylsulfonyl, TBDMS = *tert*-Butyldimethylsilyl.

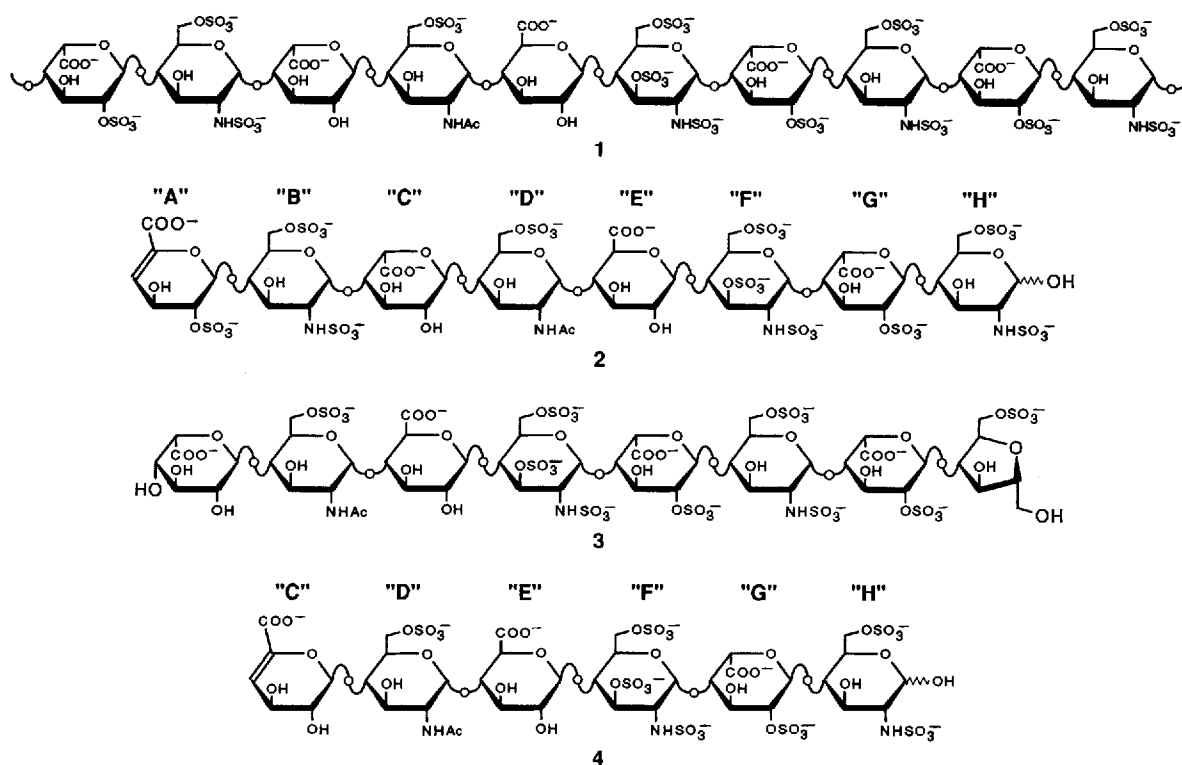


Abb. 1. In der ersten Zeile ist das Oligosaccharid 1 stellvertretend für ein hypothetisches Fragment aus einem Heparinmolekül gezeigt. Heparinketten setzen sich aus alternierenden 1 → 4-verknüpften Uronsäure- und Glucosamineinheiten zusammen. Erstere können β -D-Glucuronsäure (z.B. Einheit E), α -L-Iduronsäure (z.B. Einheit C) oder α -L-Iduronsäure-2-sulfat (z.B. Einheit G) sein, letztere können dagegen N-Acetyl- α -D-glucosamin-6-sulfat (z. B. Einheit D), N-sulfatiertes α -D-Glucosamin-6-sulfat (z. B. Einheit H; zur Bezeichnung N-Sulfat siehe Fußnote auf S. 1744) oder N-sulfatiertes α -D-Glucosamin-3,6-disulfat (z. B. Einheit F) sein. Glucosamineinheiten können auch als nicht in 6-Position sulfatierte Analoga vorliegen. Den größten Teil der Struktur eines Heparinpräparates macht die repetitive Sequenz (repeating unit) aus, die aus dem Disaccharid α -L-Iduronsäure-2-sulfat(1 → 4)- α -D-N-sulfatiertes Glucosamin-6-sulfat (z. B. der Disaccharidbaustein GH) besteht, und die „regular regions“ ausbildet [4]. Der Rest der Struktur besteht aus verschiedenen Anteilen der anderen Monosaccharidreste, die die „irregular regions“ aufbauen und möglicherweise für die biologische Funktion dieser komplexen Moleküle von größter Bedeutung sind. Die Octasaccharide 2 und 3 entstehen durch kontrollierten Abbau von Heparin durch Heparinase bzw. salpetrige Säure [12]. Nach längerem enzymatischem Abbau erhielt man auf gleiche Weise das Hexasaccharid 4 [12]. Als erstes Zielmolekül für eine Totalsynthese wurde die Pentasaccharidsequenz DEFGH (die Variante, in der Einheit D N-sulfatiert vorliegt) ausgewählt, die allen biologisch aktiven Oligosacchariden gemeinsam ist.

Inhibitor der Blutgerinnung. AT III zählt zu der Superfamilie der Serin-Protease-Inhibitoren (Serpine). Das aus 432 Aminosäuren aufgebaute (menschliche) Glycoprotein bildet mit einigen Blutgerinnungsfaktoren stabile Komplexe – wir

konzentrieren uns hier auf die Blutgerinnungsfaktoren Xa und IIa, letzterer auch als Thrombin bezeichnet, wodurch diese deaktiviert werden (Abb. 2a und 2b). Ist AT III an ein Heparinmolekül gebunden, wird die Geschwindigkeit der



Constant A. A. van Boeckel, 1956 in Brunei (früheres British Borneo) geboren, studierte an der Universität von Leiden Chemie. Er erhielt 1979 ein „Doctorat“ im Fach Chemie und promovierte 1982 unter J. van Boom. Danach wechselte er in die pharmazeutische Industrie (Organon Int. B. V., Oss). 1988 wurde er zum Teilzeitprofessor ernannt (heute an der Universität von Leiden tätig). Er wurde mit dem Unilever-Chemistry-Preis (1978), dem Professor-Oosterhoff-Preis (1981), dem Akzo-Chemie-Preis (1988) und der Golden Medal of the Royal Dutch Chemical Society (1988) ausgezeichnet. Zur Zeit ist er Abteilungsleiter einer Abteilung für Medizinische Chemie bei Organon Int. Seine Interessensgebiete sind die Chemie der Kohlenhydrate und der Nucleotide, Protease-Inhibitoren und das Wirkstoffdesign.



Maurice Petitou, geboren 1949 in Paris, studierte in Clermont-Ferrand und Orléans Chemie, wo er 1971 einen Masters Degree und 1974 ein „Doctorat“ im Fach Chemie erhielt. Danach arbeitete er drei Jahre als Mitarbeiter der Ligue Nationale Française Contre le Cancer (LNFC), wo er Membranglycoproteine von Leukämiezellen untersuchte. 1978 ging er ans Institut Choay, der Forschungseinrichtung der Laboratoires Choay, um sich der Chemie des Heparins zu widmen. 1984 promovierte er; 1985 erhielt er den Preis der Groupe Française des Glucides und 1986 den Galien Prize for Pharmaceutical Research. 1988 wurde er zum Research Associate Director des Centre National de la Recherche (CNRS) ernannt und ist seit 1989 Leiter des Carbohydrate Chemistry Department bei Sanofi Recherche, wo er für die Forschung auf dem Gebiet der Chemie von Glycosaminoglycanen verantwortlich ist.

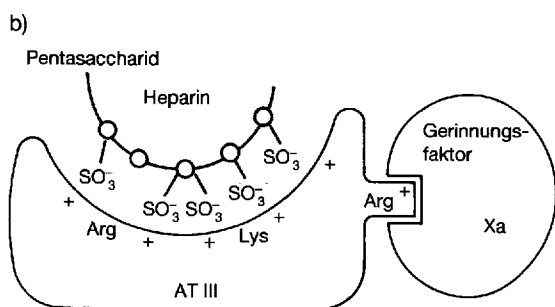
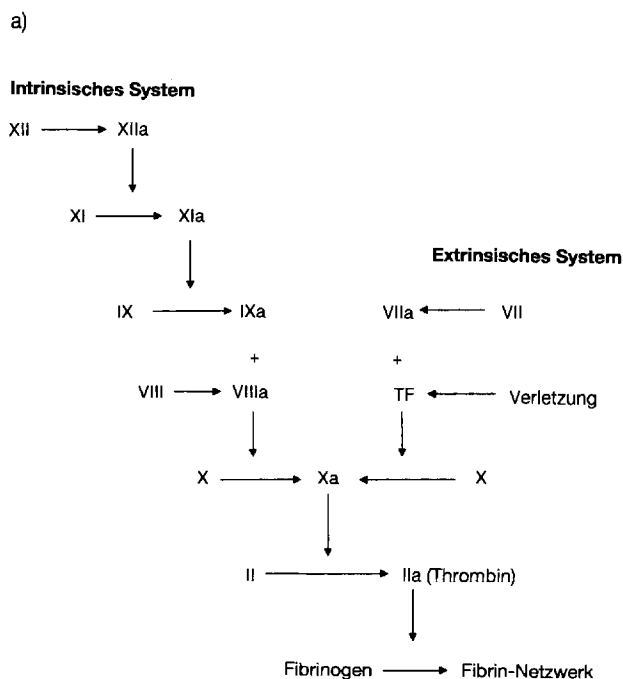


Abb. 2. a) Überblick über die Blutgerinnungskaskade. Die Blutgerinnung ist ein komplexer Prozeß, an dem sich mehrere Enzyme (aktivierte Gerinnungsfaktoren) beteiligen, die im Plasma als Vorläufermoleküle (Zymogene) vorhanden sind. Aktiviert werden diese Proenzyme in einer Kaskade, die durch den Kontakt von Blut mit fremden Oberflächen eingeleitet werden kann, möglicherweise aber auch durch subendotheliale Strukturen, die bei einer Verletzung der Blutgefäße freigelegt werden (intrinsischer Reaktionsweg). Diese Kaskade kann auch durch Thromboplastin und Gewebefaktoren (tissue factor, TF) aktiviert werden, die von verletzten Zellen ausgeschüttet oder freigesetzt werden (extrinsischer Reaktionsweg). Die beiden Reaktionswege treffen auf der Stufe der Faktor-X-Aktivierung zusammen. Eine Störung des Gleichgewichtes in diesem System führt zu einem prothrombotischen oder zu einem prothrombotischen Zustand. Wahrscheinlich verhindern natürliche Inhibitoren wie AT III prothrombotische Zustände. Im Komplex mit Heparin kann AT III verschiedene aktivierte Blutgerinnungsfaktoren inhibieren, während es gebunden an ein Pentasaccharid selektiv Faktor Xa desaktiviert. b) Eine charakteristische Heparin-Pentasacchariddomäne bindet selektiv an AT III. Während dieser Wechselwirkung ändert AT III seine Konformation, wobei eine weiter entfernte Schleifenregion freigelegt wird, was die Desaktivierung des Blutgerinnungsfaktors Xa erleichtert.

Protease-Inhibierung um einige Größenordnungen^[6] gesteigert.

Aufgrund seiner anticoagulanten Eigenschaften ist Heparin schon seit 1937 in klinischer Anwendung. Sein tatsächlicher Wirkmechanismus hängt jedoch nicht zwangsläufig mit seiner gesamten anticoagulanten Aktivität zusammen, sondern möglicherweise mit seiner Fähigkeit, die Desaktivierung einer speziellen Serin-Protease während der Blutgerinnung zu katalysieren. Dies erkannte man, als Mediziner begannen, geringe Heparindosen zu verabreichen, die zwar kaum die Gerinnungsparameter, z. B. die Dauer der Blutgerinnung, beeinflussten, jedoch trotzdem Thrombosen effektiv verhinderten. Pharmakologen schlugen danach vor, daß

die Inhibierung des Blutgerinnungsfaktors Xa für einen optimalen klinischen Effekt, also das beste Nutzen/Risiko-Verhältnis, wichtiger sein könnte als die Inhibierung von Thrombin (Faktor IIa). Von da an hat man sich darauf konzentriert, Heparinpräparate mit erhöhter Faktor-Xa-Aktivität und/oder verminderter anti-Faktor-IIa-Aktivität zu entwickeln. Mit anderen Worten: Es sollte mit diesen Präparaten möglich sein, einen größeren anti-Xa/anti-IIa-Quotienten^[7] zu erzielen.

2. Hintergrund

2.1. Fraktionierung und Abbau von Heparin

Entsprechend der zuvor genannten Hypothese, wonach Heparinpräparate mit einem verbesserten anti-Faktor-Xa/anti-Faktor-IIa-Verhältnis bessere antithrombotische Medikamente sind als Standardheparin selbst, wurden Projekte gestartet, die auf die Herstellung solcher Medikamente abzielten. 1976 wurden zwei entscheidende Beobachtungen gemacht: Erstens bindet nur ein Teil der Heparinmoleküle an AT III, wenn Heparin affinitätschromatographisch an immobilisiertem AT III aufgetrennt wird^[8-10]. Zweitens zeigten Heparinmoleküle mit Affinität gegenüber AT III die gleiche Faktor-Xa-Inhibierung und dies unabhängig von ihrer Größe, die Thrombin-Inhibierung dagegen war von der Molekülgröße abhängig^[8] (eine rationale Erklärung hierfür, basierend auf der chemischen Struktur von Heparin, wird in Abschnitt 7 diskutiert). Zusammenfassend läßt sich feststellen, daß jedes Heparinpräparat mindestens drei Arten von Molekülen enthält: Solche, die die Inhibierung von Faktor Xa und von Thrombin durch AT III fördern (Typ 1), solche, die nur die Inhibierung von Faktor Xa fördern können (Typ 2), und solche, die nicht in der Lage sind, überhaupt eine signifikante Inhibierung auszulösen (Typ 3). Standard-Heparinpräparate setzen sich zu ungefähr einem Drittel aus Molekülen des Typs 1 und zu zwei Dritteln aus Molekülen des Typs 3 zusammen. Der einfachste Weg, die Inhibierung von Faktor Xa gegenüber der von Faktor IIa zu begünstigen, besteht in der Reduzierung des Molekulargewichtes der Probe. Man hat dies sowohl durch chemische als auch enzymatische Spaltung der Heparinketten verwirklicht^[7, 11], was zur weitverbreiteten Klasse der niedermolekularen Heparinmedikamente führte^[12].

2.2. Entdeckung einer charakteristischen und definierten Antithrombin-Pentasaccharid-Bindungsdomäne

Nachdem sich gezeigt hatte, daß die Fähigkeit der Heparinfragmente zur Verstärkung der AT-III-vermittelten Inhibierung von Faktor Xa von deren Größe unabhängig ist, erschien es nur logisch, nach den kleinsten Fragmenten zu suchen, die noch in der Lage sind, die Inhibierung von Faktor Xa zu katalysieren. Dazu wurde eine kontrollierte Heparinspaltung auf chemischem (salpetrige Säure) oder enzymatischem Wege (Heparinase aus *flavobacterium heparinum*) durchgeführt, daran schloß sich eine affinitätschromatographische Trennung der Fraktionen mit AT-III-Affinität und eine Gelfiltration dieser Fraktionen an. Mit dieser Vorge-

hensweise war es möglich, biologisch aktive Octasaccharide zu identifizieren und strukturell aufzuklären (Abb. 1)^[*].

Ein Vergleich von 2 und 3 läßt vermuten, daß das gemeinsame Hexasaccharid CDEFGH 4 die aktive Sequenz enthält. Dies wurde nach der Isolierung des entsprechenden Hexasaccharids nach Behandlung von 2 mit Heparinase bewiesen. Im Hexasaccharid 4 ist zwar die Struktur der Einheit C verändert, Folgen für die biologische Aktivität hatte dies jedoch nicht. Dies war ein klarer Hinweis darauf, daß die Pentasaccharidsequenz DEFGH die aktive Sequenz ist. Daß in der aktiven Struktur die Trisaccharidsequenz DEF vorkommt, die ein *N*-Acetyl-6-sulfatiertes Glucosamin (D), – auch ein *N*-sulfatiertes Glucosamin^[**] wurde in dieser Position gefunden – eine Glucuronsäure (E) und ein *N*-sulfatiertes 3,6-disulfatiertes Glucosamin (F) enthält, ist besonders erwähnenswert, da alle drei Monosaccharide nur Nebenbestandteile von Heparin sind. Äußerst bemerkenswert ist die Sulfatgruppe in Position 3 der zentralen Glucosamineinheit^[13, 14]. Das gleichzeitige Vorkommen dieser Strukturelemente in einer kurzen aktiven Oligosaccharidsequenz weist DEFGH als die charakteristischste Domäne innerhalb von Heparin aus. Wechselwirkungsstudien wohldefinierter synthetischer Analoga des Pentasaccharids DEFGH mit AT III (Abschnitt 7) erhärten diese Hypothese (vgl. dazu auch Abb. 25). Zusätzlich belegen in-vivo-Studien an Tieren, daß Heparansulfat in

[*] Unabhängig davon wurden dieselben Sequenzen als die für die AT-III-Bindung relevanten Bindungsregionen des Heparins identifiziert.

[**] In diesem Aufsatz wird der NHSO_3^- -Substituent durchgehend mit *N*-Sulfat bezeichnet.

Glycosaminoglycan (GAG)-Domänen

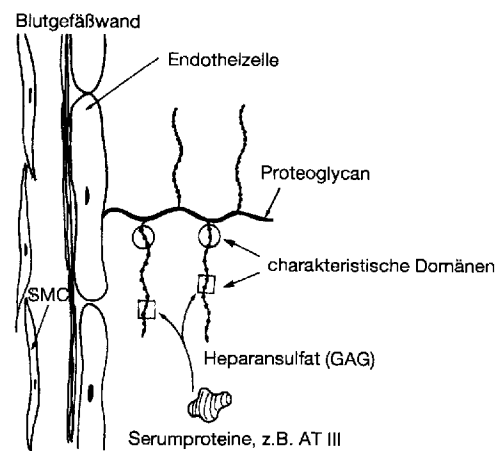


Abb. 3. Vieles spricht dafür, daß Heparansulfat-Proteoglycane auf der ins Lumen exponierten Oberfläche der Endothelzellen von Blutgefäßen zu finden sind. Heparansulfat verleiht Blutgefäßen nicht-thrombogene Eigenschaften^[15]. Außerdem enthält dieses Heparansulfat charakteristische Domänen, die der aktiven Pentasaccharidsequenz aus Heparin sehr ähnlich sind. Es gilt als erwiesen, daß ein Teil vom Plasma-AT-III durch nahe an der Blutgefäßoberfläche gebundene Heparansulfat-Glycosaminoglycane aktiviert wird. Dies bedeutet, daß das charakteristische Pentasaccharidfragment aus Heparin ebenfalls als endogenes antithrombotisches Agens wirkt. SMC = smooth muscle cell = Zelle der glatten Muskulatur.

Endothelzellen ähnliche Pentasacchariddomänen enthält, die wahrscheinlich zu den nicht-thrombogenen Eigenschaften der Gefäßwände beitragen^[15] (Abb. 3).

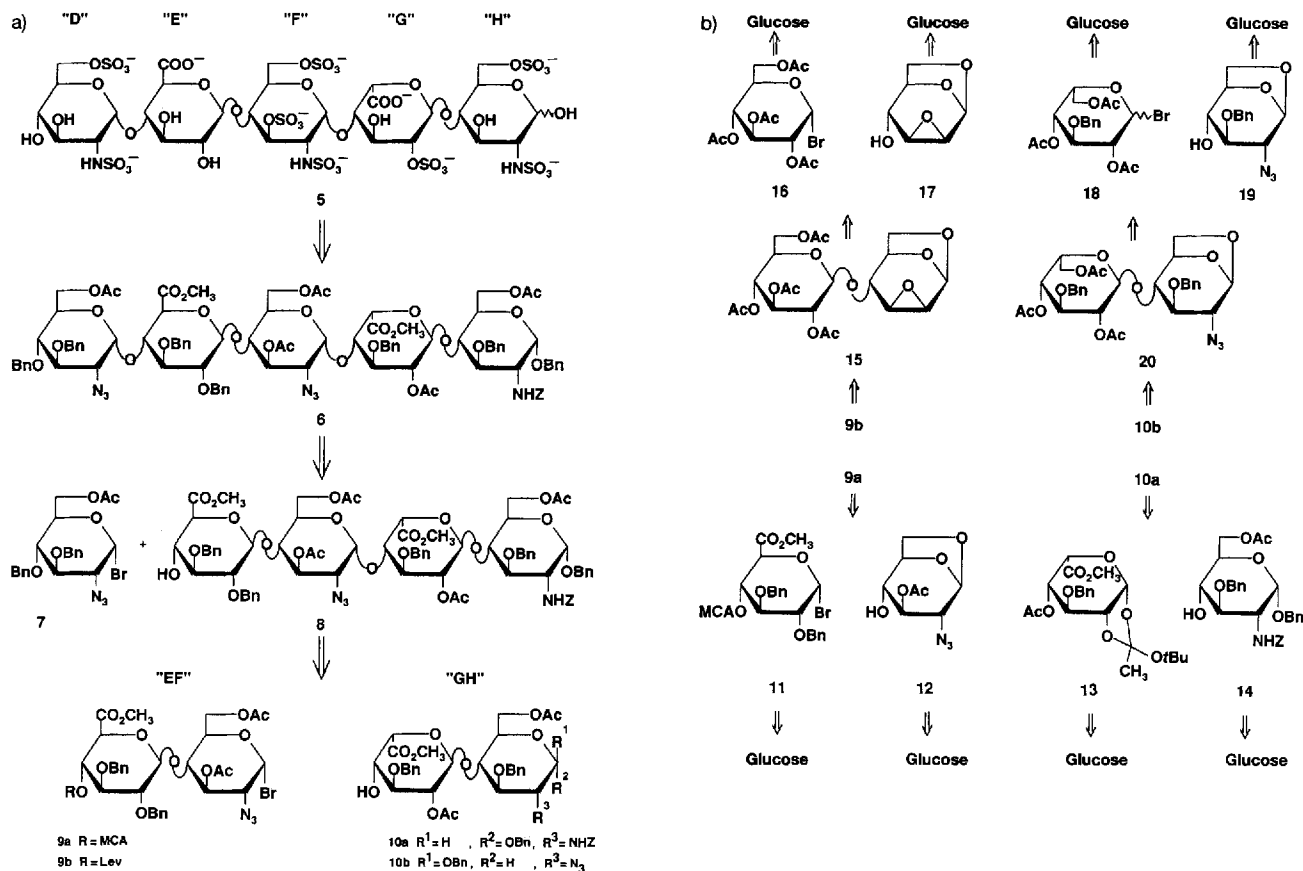


Abb. 4. a) Retrosyntheschema für das Pentasaccharid 5. Zur Darstellung der Disaccharidbausteine 9 (EF) und 10 (GH) wurden jeweils, wie in Abbildung 5a gezeigt, zwei Strategien ausgearbeitet. b) Glucose- und Idosederivate, jeweils aus Glucose dargestellt, werden auf der Stufe des Monosaccharids oxidiert (Reaktionsweg unten), so daß die korrespondierenden Uronsäurederivate 11 bzw. 13 entstehen, die dann an die Glucosaminderivate 12 bzw. 14 gekuppelt werden. Beim oberen Reaktionsweg werden zunächst Glucose-(16) und Idosederivate (18) mit Glucosaminderivaten oder Vorläufermolekülen zu den Disacchariden 15 bzw. 20 umgesetzt. Zum Schluß wird der Uronsäure-haltige Baustein auf der Stufe des Disaccharids nach entsprechender Funktionalisierung und Oxidation hergestellt (Details siehe Abb. 5a und b).

Da keine biochemischen Methoden für einen weiteren kontrollierten Abbau zur Herstellung des Pentasaccharids DEFGH zu Verfügung standen, war ein chemisch-synthetisches Vorgehen erforderlich. Die organische Synthese bietet darüber hinaus den einzigen Zugang zu wohldefinierten Mimetica und vereinfachten Analoga.

3. Synthese Antithrombin-bindender Pentasaccharide

3.1. Erste Synthesen von Pentasacchariden mit natürlicher Sequenz

In den frühen 80er Jahren gelang die Synthese des biologisch aktiven Pentasaccharids **5** nach der in Abbildung 4a dargestellten Strategie; dabei wurde zunächst ein vollständig geschütztes Pentasaccharid **6** dargestellt, und schließlich in **5**

umgewandelt^[17, 18]. Bei der Wahl der Schutzgruppen von **6** mußten folgende Aspekte berücksichtigt werden: 1) Die Notwendigkeit der Einführung von Sulfat- und N-Sulfatsubstituenten, die Anwesenheit von Carboxylat- und Hydroxygruppen in den richtigen Positionen des Zielmoleküls **5** und 2) der damalige Stand der Oligosaccharid-Synthesetechnik, z.B. der Einsatz von 2-Azido-Glucosederivaten^[16], um 1,2-*cis*-verknüpfte Glucosamineinheiten einzuführen (solch eine Glycosylierung erfordert in Position 2 des Glycosyldonors eine nicht-unterstützende Nachbargruppe) und die Verwendung von Glycosyldonoren mit einer unterstützenden Nachbargruppe in Position 2, um die Bildung von 1,2-*trans*-glycosidischen Bindungen zu kontrollieren (wie es für die beiden Uronsäuren nötig ist).

In der zuerst publizierten Synthese^[17] wurden die Disaccharidbausteine **9a** und **10a**, die jeweiligen Vorläufermoleküle für den EF- bzw. GH-Teil des Moleküls, dadurch er-

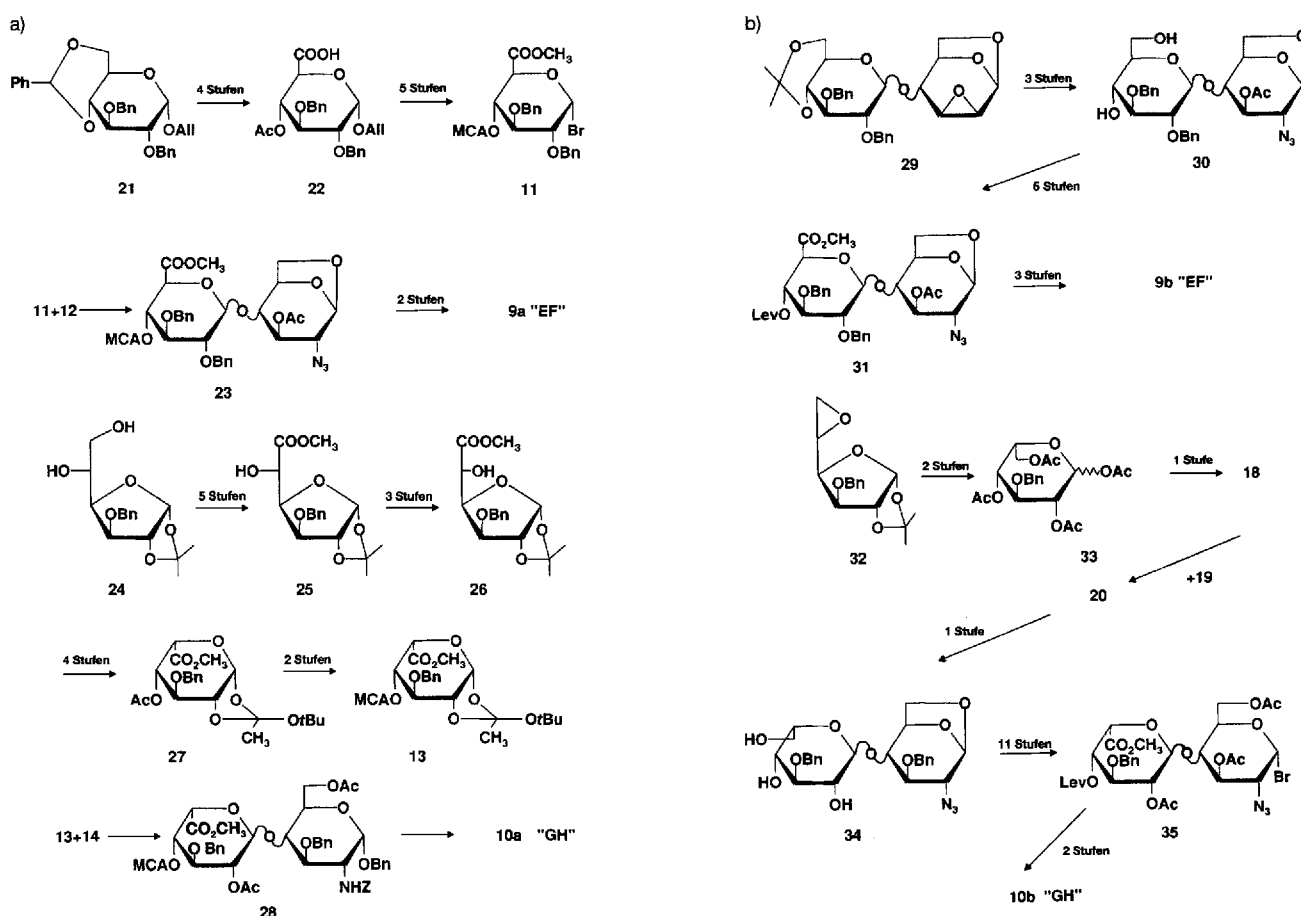


Abb. 5. a) Darstellung des EF- und GH-Disaccharidbausteins durch Kupplung von Uronsäure- und Glucosamin-Monosaccharidbausteinen^[17]. Benzilylierung von 1-O-Allyl-4,6-O-benzyliden- α -D-glucopyranosid [34] führte zu Verbindung **21** (71 %, kristallin), die in das Glucuronsäurederivat **22** überführt wurde (Säurehydrolyse, Tritylierung, Acetylierung, Jones-Oxidation; 50 % Gesamtausbeute). Das Kaliumsalz von Verbindung **22** wurde zum Prop-1'-enylglycosid (*t*BuOK, Dimethylsulfoxid (DMSO)) isomerisiert, dann methyliert und monochloracetyliert. Nach der Spaltung des Glycosids und Bromierung mit Vilsmeier-Reagens erhielt man **11** (57 % ausgehend von **22**). Kondensation mit **12** (leicht zugänglich aus 1,6-Anhydroglucose) ergab **23** (70 % bezogen auf **11**), welches in **9a** überführt wurde (Säurehydrolyse, Bromierung; 52 %). Zur Herstellung von **10a** wurde 3-O-Benzyl-1,2-O-isopropyliden-D-glucofuranose [33] zu **24** [33] überführt (Tritylierung, Acetylierung, Jones-Oxidation, Verseifung, Methylierung; 35 % Gesamtausbeute). Verbindung **25** wurde zu Verbindung **26** epimerisiert (TiCl_4 , CF_3COONa oder HCOONa , MeOH oder KHCO_3 ; 90 % Gesamtausbeute), die weiter zu **27** umgesetzt wurde (Säurehydrolyse, Acetylierung, Bromierung, Orthoesterbildung; 41 % Gesamtausbeute). Nach dem Austausch der Acetylgruppe in Position 4 gegen eine Monochloracetylgruppe erhielt man **13** ($\text{K}_2\text{CO}_3/\text{MeOH}$ dann $\text{MCACl}/\text{Pyridin}$; 79 %). Kupplung von **13** und **14** (45 % ausgehend von **13**) und Abspaltung der Monochloracetylgruppe ergab den GH-Baustein **10a**. b) Darstellung der EF- und GH-Disaccharidbausteine **9b** bzw. **10b** durch Oxidation auf der Stufe des Disaccharids^[18]. Acetobromglucose **16** wurde mit Cerny-Epoxid **17** (vgl. Abb. 4b) zum Disaccharid **15** (62 % vgl. Abb. 4b) kondensiert, das dann in drei Stufen (Entacetylierung, Umsetzung zum Isopropylidenderivat, Benzilylierung; 70 % Gesamtausbeute) in **29** umgewandelt wurde. Verbindung **29** wurde in **30** überführt (Lithiumazid/*N,N*-Dimethylformamid (DMF), Acetylierung, Säurehydrolyse; 95 % Gesamtausbeute). Danach wurde Verbindung **31** erhalten (Dimethoxytritylierung der primären Hydroxygruppe, Umsetzung zum Lävulinoylderivat, Säurehydrolyse, Jones-Oxidation, Methylierung; 43 % Gesamtausbeute) und in **9b** überführt (Spaltung mit Acetanhydrid, Abspaltung der Acetatgruppe am anomeren Zentrum, Bromierung; 92 % ausgehend von **31**). Zur Darstellung von **10b** wurde 3-O-Benzyl-1,2-O-isopropyliden- α -D-glucofuranose **24** [33] zu **32** umgesetzt (Dimethylierung, selektive Glucosylierung, Bildung des Epoxids; 71 % ausgehend von **30**). Verbindung **32** wurde in **33** überführt (Säurehydrolyse, Acetylierung; 54 %), das dann durch Bromierung an C1 zu Verbindung **18** umgesetzt wurde (vgl. Abb. 4b) und nach Kondensation mit dem Glucosamininderivat **19** nach Entacetylierung von **20** in Verbindung **34** überführt wurde (41 % ausgehend von **33**). **34** wurde zum Bromid **35** (im wesentlichen wie für die Darstellung von **9b** aus **30** beschrieben; 38 % über 11 Stufen) umgesetzt, das dann in **10b** überführt wurde (zwei Stufen; 54 %).

zeugt, daß die geeignet geschützten Glucuronsäure- bzw. Iduronsäure-Monosaccharidderivate mit Glucosamin-Vorläufermolekülen kondensiert wurden. Alle Monosaccharid-Synthons wurden, wie in Abbildung 4 b gezeigt, aus Glucose oder aus Glucosamin gewonnen.

In einer weiteren Synthese^[18], der ein alternatives Konzept zugrunde liegt, wurden unter Anwendung derselben Schutzgruppenstrategie die ähnlichen Bausteine **9b** und **10b** durch Kondensation der Glucose- bzw. Idosederivate **16** bzw. **18** mit Cerny-Epoxid **17** bzw. dem Glucosaminvorläufer **19** hergestellt (Abb. 4b). Die nachfolgende Jones-Oxidation in 6'-Position liefert dann Disaccharide, die die korrespondierenden Uronsäuren enthalten (Abb. 5b).

Das geschützte Pentasaccharid **6** wurde nach folgender Reaktionssequenz in Verbindung **5** überführt (Abb. 4a)^[17]: 1) Verseifung der Estergruppen des Moleküls, 2) Sulfatierung der so erhaltenen freien Hydroxygruppen, 3) Hydrierung, um die Aminogruppen der Glucosamineinheiten zu erzeugen und um Hydroxygruppen freizusetzen, und 4) selektive N-Sulfatierung von Aminogruppen.

Andere Synthesen von **5** oder ähnlichen Verbindungen gehen entweder von Cellobiose^[19] oder Maltose^[20] aus; allerdings liegt auch diesen Synthesen dieselbe Schutzgruppenstrategie zugrunde.

3.2. Synthetische Analoga natürlicher Pentasaccharide

Die Umwandlung der zuvor genannten vollständig geschützten Pentasaccharide, z.B. die Umwandlung von Verbindung **6** in **5**, erfordert eine Hydrierung (Schritt 3). Unter diesen Bedingungen erzeugt man jedoch sehr schnell Aminogruppen, die mit dem reduzierenden Terminus des Pentasaccharids (Aldehydfunktion) reagieren können, der nach Abspaltung der Benzylgruppe am anomeren Zentrum entsteht. Diese Nebenreaktion führt zu stabilen Produkten (besonders nach der Reduktion der intermediär entstehenden Schiff'schen Base), die sich aus einer Mischung verschiedener Dimere und Trimere des ursprünglichen Pentasaccharids zusammensetzen^[21]. Um diese unerwünschte Nebenreaktion zu vermeiden, stellt man zum permanenten Schutz des reduzierenden Endes das entsprechende Methylglycosid her, womit die α -Verknüpfung im Heparin simuliert wird, was zum Analogon **39** führt^[21] (Abb. 6). **39** zeigt dieselben biologischen Eigenschaften wie **5**. Ursprünglich wurde das Pentasaccharid **39** in der für **5** beschriebenen Weise dargestellt; erst kürzlich konnte die Synthese dadurch verbessert werden, daß man das Trisaccharid-Imidat **36**^[22] als Vorläufer für den DEF-Teil des Moleküls verwendete (Abb. 6). Damit konnte die benötigte Menge an der Zwischenverbindung **37**, des teuren Iduronsäure-haltigen Bausteins, verringert werden. **39** wird jetzt in größerem Maßstab hergestellt, und dieses synthetische Heparinfragment dient nun als Referenzverbindung für eine ganze Reihe antithrombotischer Oligosaccharide, die selektiv über die Aktivierung von AT III den Blutgerinnungsfaktor Xa inhibieren. Verbindung **39** weist im Sanofi/Organon-Referenz-Assay^[44] eine Aktivität von 700 anti-Xa-Einheiten (U) mg^{-1} auf.

In Abschnitt 2.2 haben wir erwähnt, daß in der Pentasaccharidsequenz, die für die Bindung von Heparin an AT III verantwortlich ist, als D-Einheit entweder ein N-sulfatierter oder ein N-acetylierter Glucosaminrest vorliegen kann. We-

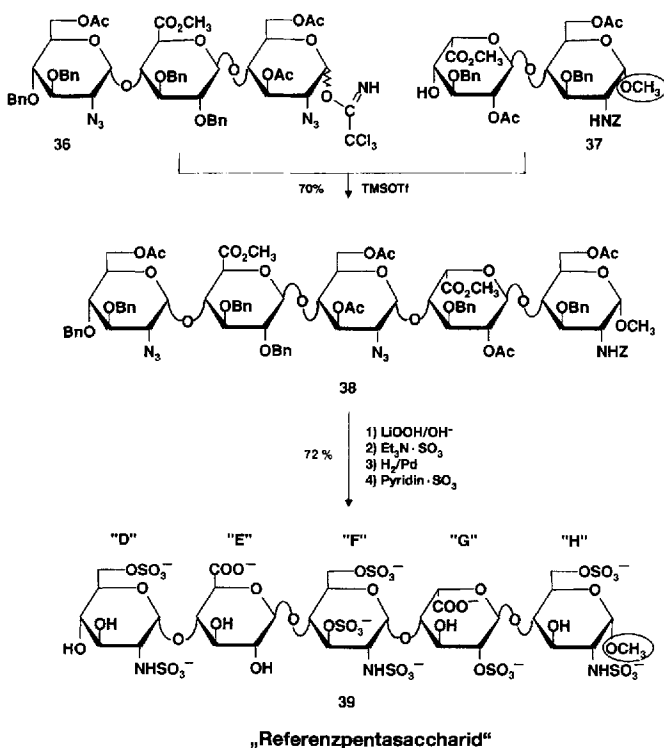


Abb. 6. Die Synthese von **39**, dem α -Methylglycosid von **5**, folgt einer 3 + 2-Kupplung. In unseren Arbeiten wird Verbindung **39** als „Referenzpentasaccharid“ oder „natürliches Produkt“ bezeichnet.

gen der einfacheren Chemie wurde in der ersten Synthese die N-sulfatierte Variante gewählt. Beginnend mit dem Trisaccharid **40** (Abb. 7) war es mit dieser Vorgehensweise jedoch schon auf der Stufe des Trisaccharids möglich, bezüglich der D-Untereinheit zu differenzieren. Die selektive Reduktion der Azidgruppe in Position 2 der nicht-reduzierenden terminalen Monosaccharideinheit in **40** ist dabei der Schlüssel-

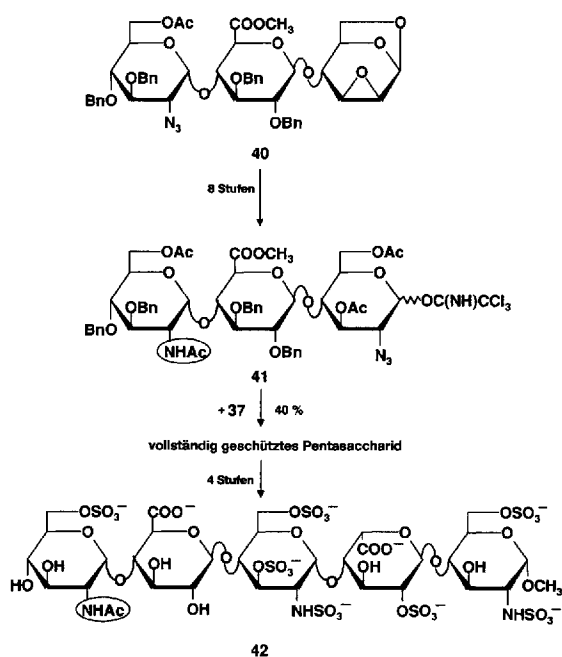


Abb. 7. Synthese des N-acetylierten Pentasaccharids, das die AT-III-Bindungsregion aus Schweine-Heparin ist. Reduktion der Azidgruppe in **40** liefert ein Amin, das selektiv acetyliert werden konnte. Nach weiterer Umsetzung erhielt man den Trisacchariddonor **41**, der nach Kupplung mit **37** und nach Standardaufarbeitung Verbindung **42** ergab.

schritt. Sie kann entweder mit dem Lindlar-Katalysator oder durch katalytische Hydrierung via Wasserstofftransfer durchgeführt werden^[23]. Danach konnte das Methylglycosidanalogon **42** der natürlichen *N*-acetylierten Pentasaccharidsequenz nach der Vorschrift zur Herstellung von **39** gewonnen werden. Überraschenderweise war das Pentasaccharid **42** ein weniger wirksamer AT-III-Stimulator als das korrespondierende *N*-sulfatierte Pentasaccharid **39** (350 anti-Xa U mg⁻¹ gegenüber 700 anti-Xa U mg⁻¹).

4. Konformationsanalyse des Pentasaccharids

Für die Wechselwirkung von Heparin-Oligosacchariden mit Antithrombin ist seitens des Oligosaccharids eine präzise dreidimensionale Ausrichtung der involvierten Sulfat- und Carboxylatgruppen notwendig (vgl. Abschnitt 7). Die Orientierung dieser Gruppen wird hauptsächlich durch die Konformation des Kohlenhydratrückgrates bestimmt, die ihrerseits wiederum von der Konformation der einzelnen Zuckerreste und den konformativen Beziehungen zwischen aufeinanderfolgenden Resten abhängt. Wir wollen zunächst das konformative Verhalten der individuellen Monosaccharide diskutieren.

In allen bisher untersuchten Heparin-Oligosacchariden^[17] nahmen die Glucosamin- und Glucuronsäureeinheiten ausschließlich die ⁴C₁-Konformation^[*] (Abb. 8) ein, was durch die Analyse der ¹H-NMR-Kopplungskonstanten gestützt wird.

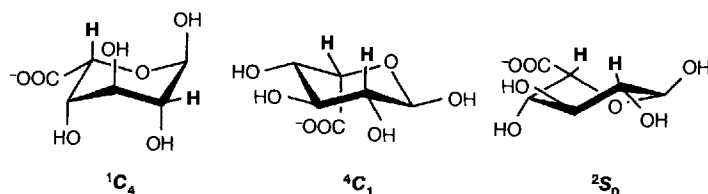


Abb. 8. Drei in Heparin-ähnlichen Pentasacchariden möglicherweise vorliegende *L*-Iduronsäure-Konformere (¹C₄, ⁴C₁, ²S₀). Die Protonen H2 und H5 sind im ²S₀-Konformer in räumlicher Nachbarschaft, wie die NOE-Effekte in den ¹H-NMR-Spektren zeigen.

Im Gegensatz dazu hängt die Konformation der Iduronsäurereste ganz extrem von Substitutionsmuster (z.B. Sulfat-substituent in Position 2) und von der genauen Art der flankierenden Reste ab. Rechnungen zum konformativen Verhalten der Iduronsäure zeigen, daß die drei Konformationen ¹C₄, ⁴C₁ und ²S₀ (Skew-boat-Konformation, windschiefe Wannenkongformation) eingenommen werden können, und nicht, wie vorher behauptet, nur ¹C₄ und ⁴C₁ (Abb. 8). Die dritte, von der Energie her ähnliche ²S₀-Konformation wird auch durch das Auftreten eines NOE-Effektes (NOE = Nuclear Overhauser Enhancement) zwischen den Protonen H2 und H5 bestätigt, die nur in dieser speziellen Konformation in enger räumlicher Nachbarschaft (2.3 Å) zu finden sind. Ein Vergleich der ¹H-NMR-Daten, speziell der vicinalen Kopplungskonstanten (Abb. 9A) zeigt, daß im

Falle des Pentasaccharids **39** und seines Analogons **45**^[25] (das die *N*-sulfatierte, 6-sulfatierte Glucosamineinheit F enthält) Konformationsunterschiede bezüglich der 2-sulfatierten α -*L*-Iduronsäurereste bestehen^[26, 27]. Ersetzt man die terminale reduzierende Einheit in **39** (d. h. das *N*-sulfatierte, 6-sulfatierte Glucosamin) durch ein *N*-sulfatiertes, 3,6-disulfatiertes Glucosamin (**57**), so wird die ²S₀-Konformation bevorzugt^[28]. Abhängig von der Position innerhalb der Oligosaccharidkette nahmen die Iduronsäurereste in isolierten Heparinfragmenten unterschiedliche Konformationen ein. In Modelltrisacchariden machte man ähnliche Beobachtungen (Abb. 9B). Bei diesen Untersuchungen^[29] wurde ge-

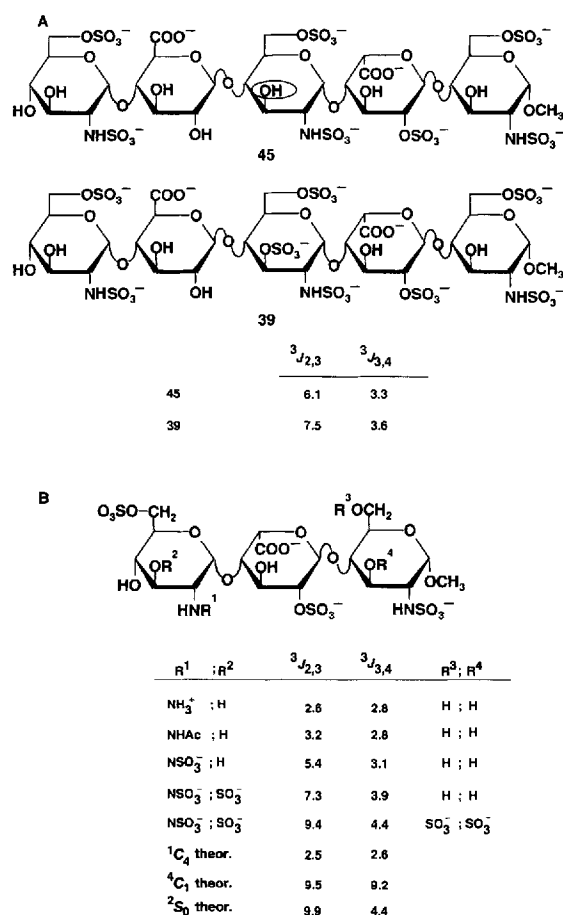


Abb. 9. Die Konformationsanalyse einer Reihe synthetischer Pentasaccharide (A) und Trisaccharide (B) mit ¹H-NMR Spektroskopie zeigte, daß das konformative Verhalten von α -*L*-Iduronsäure-2-sulfat durch Substituenten an den benachbarten D-Glucosamineinheiten bestimmt wird. Mit den 2,3- und 3,4-vicinalen Kopplungskonstanten (³J) in α -*L*-Iduronsäure ist es am besten möglich, zwischen den Konformationen zu differenzieren, wie man an den berechneten Kopplungskonstanten (im unteren Teil) erkennt. Eine Ammonium- oder *N*-Acetylgruppe (R¹) am linken Glucosamin-Nachbar (B) stabilisiert die ¹C₄-Konformation der α -*L*-Iduronsäure. Sulfatgruppen in der gleichen Einheit (R²) destabilisieren dagegen die ⁴C₁-Konformation, so daß das ²S₀-Konformer (skew boat) zu einem nicht geringen Teil zum Gleichgewicht beiträgt. Durch diesen Konformationswechsel vergrößern sich die Abstände zwischen den verschiedenen Sulfatgruppen, wodurch sich ihre gegenseitige elektrostatische Abstoßung minimiert. Trägt der linke wie der rechte Glucosamin-Nachbar Sulfat-substituenten, wird fast ausschließlich die ²S₀-Konformation eingenommen.

[*] Bei Pyranosen in der Sesselkonformation bezeichnet man mit ⁴C₁ die Konformation, in der sich C1 unterhalb und C4 oberhalb der Ebene C2, C3, C5, O5 befinden; in der inversen ¹C₄-Konformation befinden sich C1 oberhalb und C4 unterhalb dieser Ebene. Vgl. R. E. Reeves, *Adv. Carbohydr. Chem.* **1951**, 6, 107.

Die Konformationen der synthetischen Pentasaccharide **39** und **45** wurden durch Kombination von Computersimulationen (unter Verwendung von Kraftfeldrechnungen) und NMR-Experimenten untersucht^[30–32, 66].

Wie schon zuvor erwähnt, nehmen die Glucosamin- und Glucuronsäurereste die 4C_1 -Konformation ein, während die Iduronsäureeinheiten in einem Gleichgewicht zwischen den 1C_4 - und den 2S_0 -Konformeren vorliegen. Sulfat- oder N-Sulfatsubstituenten, die über ein O- bzw. N-Atom an tertiäre Kohlenstoffatome gebunden sind, nehmen eine Konformation ein, in der das Schwefelatom auf Deckung (ekliptisch) zum Ringproton steht. Ist das Schwefelatom an ein sekundäres Kohlenstoffatom gebunden (Position 6 der Glucosamine), so bevorzugt es eine *trans*-konfigurierte C6-O6-Bindung; Kraftfeldrechnungen favorisieren hier *gt*- und *gg*-Konformationen (*g*: *gauche*, *t*: *trans*), wobei allerdings gemäß den 1H -NMR-Daten vorwiegend die *gg*-Konformation populiert ist. Freie Hydroxygruppen können drei Konformationen einnehmen, während die Carboxylatgruppe der Uronsäuren einen großen Torsionsfreiraum hat. Die stabilsten Konformationen der Pentasaccharide **39**, **45** und **57** (Abb. 17) zeigen die Iduronsäureeinheiten entweder in 1C_4 - oder in 2S_0 -Konformation (Abb. 10).

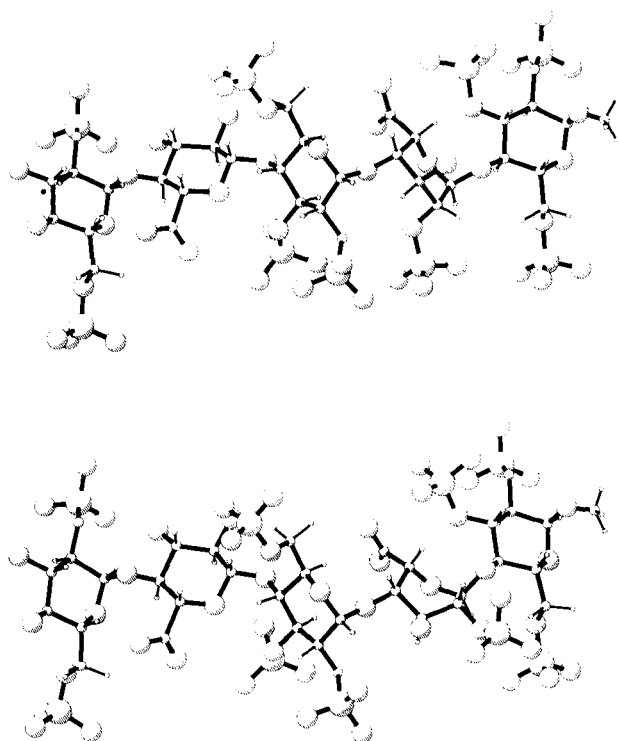


Abb. 10. Dreidimensionale Darstellung von Verbindung **57** mit dem Iduronsäurerest in 1C_4 - (oben) und 2S_0 -Konformation (unten).

Eine genaue Analyse der in Abbildung 10 dargestellten Modelle zeigt eine asymmetrische Verteilung der Ladungen, die für die Wechselwirkung mit AT III relevant sind (siehe Abb. 16 und Abschnitt 7). Welche Rolle ein Konformationswechsel der Iduronsäure während der Bindung und Aktivierung von AT III spielt, ist noch nicht geklärt.

5. Weitere synthetische Analoga

5.1. Synthetische Analoga, denen geladene Gruppen in definierten Positionen fehlen

5.1.1. Analoga, denen manche Sulfatgruppen fehlen

Nach der Darstellung synthetischer Analoga des natürlich vorkommenden Pentasaccharids, also der Verbindungen **5** und **39**, war eine der zentralen Fragen, ob alle geladenen Gruppen im Pentasaccharid zur Aktivierung von AT III benötigt werden. Zwar lagen aus Untersuchungen^[35b] an (bio)chemisch modifizierten Heparinfragmenten wichtige Information über die Rolle von Sulfatgruppen vor, doch konnte eine Antwort auf diese Frage erst mit der Synthese von Analoga gegeben werden, denen in definierten Positionen eben diese geladenen Gruppen fehlten (vgl. Abb. 11). So

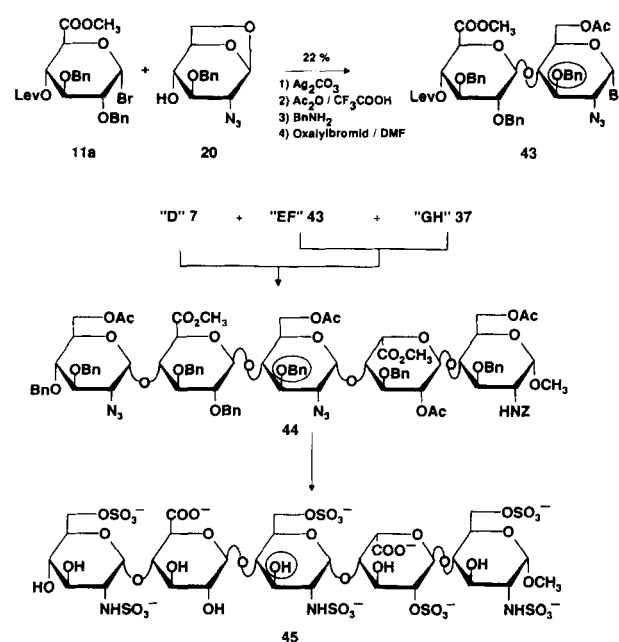


Abb. 11. Darstellung des Analogons **45**, dem die charakteristische 3-Sulfatgruppe (mit Kreis markiert) in der Glucosamineinheit F fehlt. Verbindung **45** ist inaktiv, was die Bedeutung dieser speziellen Sulfatgruppe bei der AT-III-Aktivierung belegt.

war beispielsweise der endgültige Beweis dafür, daß die charakteristische 3-Sulfatgruppe in Einheit F für die AT-III-Aktivierung essentiell ist, erst nach der Synthese^[36] des biologisch inaktiven Analogons **45** erbracht, dem genau diese Sulfatgruppe fehlte. Wie man leicht erkennt, ähnelt die Synthese des Analogons **45** der unserer Leitverbindung **39**. Der Hauptunterschied liegt in der Darstellung des EF-Disaccharidbausteins **43**, der nach unserer Strategie eine 3-O-Benzylgruppe anstelle der 3-O-Acetylgruppe (wie im EF-Baustein **9b**) in der Einheit F enthalten sollte. Abgesehen von der 3-Sulfatgruppe in Einheit F stellte sich heraus^[37], daß die 6-Sulfatgruppe der „nicht-reduzierenden“ terminalen Einheit D für die biologische Aktivität unbedingt notwendig ist. Eine ähnliche Strategie lag der Synthese zweier nicht-natürlicher Pentasaccharide^[38] zugrunde, wobei einem die 6-Sulfatgruppe in Einheit H, dem anderen die 2-Sulfatgruppe

pe in Einheit G fehlten. Beide Analoga zeigten ungefähr ein Viertel der Aktivität des Referenzpentasaccharids **39**, was auf die essentielle Bedeutung dieser Sulfatgruppen in den Einheiten G und H hinweist.

Erstaunlicherweise zeigte ein Pentasaccharid ohne die 2-Sulfatgruppe in Einheit G und ohne die 6-Sulfatgruppe in Einheit H fast die gleiche Aktivität wie die beiden Analoga, denen jeweils nur einer dieser Substituenten fehlte.

Das Analogon ohne die 6-Sulfatgruppe in Einheit F wurde bis jetzt noch nicht synthetisiert. Untersuchungen an natürlichen Heparinfragmenten, denen diese Gruppe fehlte, ergaben jedoch, daß dieser Substituent nicht erwähnenswert zur Aktivierung von AT III beiträgt.

5.1.2. Analoga, denen manche N-Sulfatgruppen fehlen

Riesenfeld et al.^[39] zeigten im Hinblick auf die Bedeutung der N-Sulfatgruppen in den Einheiten D, F und H, daß das Fehlen dieser Substituenten in einer der beiden Einheiten F oder H zu inaktiven Heparinfragmenten führt.

Dagegen sind in Einheit D N-acetylierte Heparinfragmente noch aktiv. Genauere Informationen darüber konnten mit synthetischen Derivaten erhalten werden. Das in Einheit D N-acetylierte synthetische Analogon **42** (vgl. Abschnitt 3.2) repräsentiert die am weitesten verbreitete AT-III-Bindungsdomäne aus Schweine-Heparin und ist in einem anti-Faktor-Xa-Assay nur halb so aktiv wie das korrespondierende N-sulfatierte Derivat **39**. Ein anderes Analogon mit einer 2-Hydroxygruppe in Einheit D war nahezu genauso aktiv wie das Pentasaccharid mit der N-Acetylgruppe (**42**)^[43].

Die äußerst geringe Aktivität (ca. 5 %) des synthetischen Analogons **46**^[43], das eine 2-Hydroxygruppe in Einheit H enthält, stimmt mit den Untersuchungsergebnissen von Riesenfeld et al.^[39] überein, wonach die N-Sulfatgruppe in dieser Einheit von entscheidender Bedeutung ist.

Für die Synthese des Hydroxy-Analogons **46** (Abb. 12) mußte das geeignet geschützte H-Fragment **47**, das eine 2-O-Benzylschutzgruppe enthält, eingebaut werden^[40].

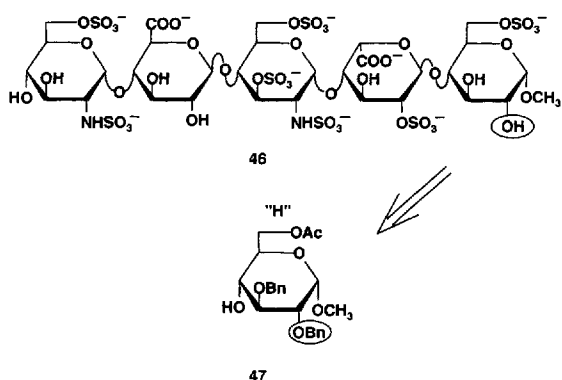


Abb. 12. In Analogon **46** ist die N-Sulfatgruppe am reduzierenden Ende (H) durch eine Hydroxygruppe ersetzt. Gemäß der allgemeinen Strategie benötigt man dazu die 2,3-Di-O-benzyl-geschützte Glucoseeinheit **47** als Baustein für die reduzierende terminale Einheit.

5.1.3. Analoga, denen manche Carboxylatgruppen fehlen

Mit synthetischen Modellverbindungen wurde auch untersucht, welche Funktion die beiden Carboxylatgruppen im

aktiven Heparinfragment haben. **51**, dem ersten für diesen Zweck hergestellten synthetischen Analogon, fehlte die Iduonsäure-Carboxylatgruppe; anstelle einer 2-Sulfat- α -L-idopyranuronat-Einheit war eine 2-Sulfat- β -D-xylopyranose-Einheit eingebaut. Folglich mußte das GH-Disaccharid **49** aus dem Xylopyranosyldonor **48** und dem bekannten Acceptor **14** synthetisiert werden (Abb. 13). Zum Aufbau des voll-

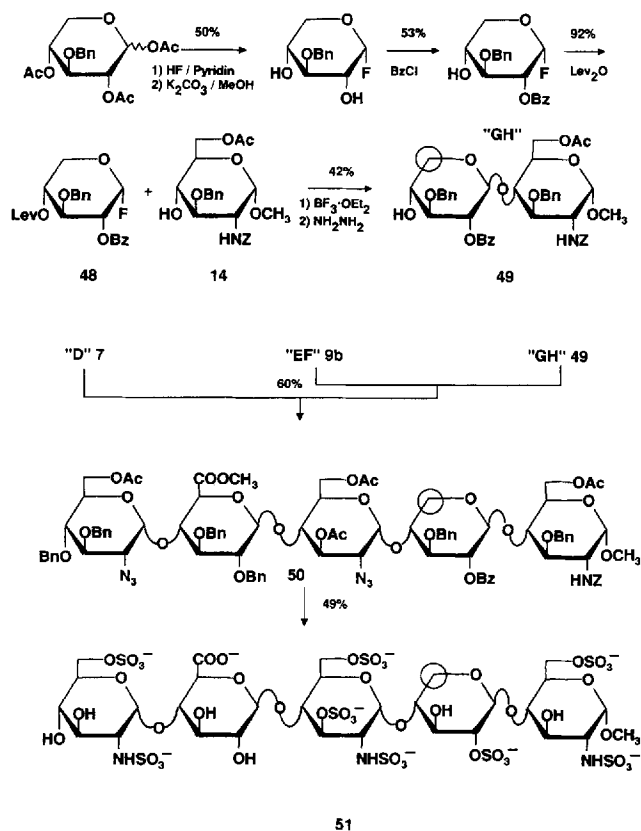


Abb. 13. Synthese des Analogons **51**, dem die essentielle Carboxylatgruppe (mit Kreis markiert) der α -L-Iduronsäure fehlt. Zur Darstellung von **51** mußte ein geeignet geschütztes D-Xylopyranosylderivat (Verbindung **48**) als Einheit G dargestellt werden. Die Carboxylatgruppe der α -L-Iduronsäure ist nicht nur für die Wechselwirkung mit AT III notwendig, sondern bestimmt auch die Konformation der Einheit G.

ständig geschützten Pentasaccharids **50** wurde **49** mit dem bekannten Disaccharid **9b** und dem Monosaccharid **7** gekuppelt. Die nachfolgende Entschützung und Sulfatierung führte schließlich zum inaktiven Analogon **51**. Mit größter Wahrscheinlichkeit kann man diesen drastischen Rückgang der biologischen Aktivität dem Fehlen einer essentiellen Carboxylatgruppe zuschreiben, die mit dem Protein wechselwirkt. Wir haben aber auch noch gefunden^[41], daß die Xylopyranosyleinheit in diesem Analogon sich in ihrer Konformation von der des entsprechenden Iduonsäurebausteins unterscheidet (die 4C_1 -Konformation ist gegenüber dem $^2S_0/{}^1C_4$ -Gleichgewicht von Iduonsäure favorisiert).

Weiterhin hat sich gezeigt^[42], daß der Carboxylatgruppe der Glucuronsäure (Einheit E) im Aktivierungsprozeß eine Schlüsselfunktion zukommt, da das Pentasaccharid **52** (Abb. 14), das eine Methoxycarbonylgruppe in Einheit E aufweist, nur 5 % der Aktivität des natürlichen Produktes entfaltet.

Das Pentasaccharid **52** war nicht das Ziel einer geplanten Totalsynthese, sondern es fiel lediglich als Nebenprodukt

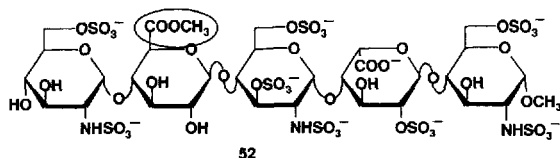


Abb. 14. Verbindung **52** trägt einen Mylester im D-Glucuronsäurerest und ist kaum aktiv. Dies zeigt, daß die Carboxylatgruppe in dieser Position bei der Aktivierung von AT III eine wichtige Rolle spielt.

während der Herstellung der Referenzverbindung **39** an. Die äußerst geringen Aktivitäten der Pentasaccharide **51** und **52** zeigen, daß die beiden Carboxylatgruppen der Uronsäuren (Einheiten E und G) für die AT-III-Aktivierung unentbehrlich sind. In Abschnitt 5.5 werden wir zeigen, daß sich der Austausch der geladenen Gruppe an C5 der Uronsäure gegen eine andere geladene Gruppe ($\text{CH}_2\text{OSO}_3^-$ anstelle von COO^-) ebenfalls nachteilig auf die Aktivität auswirkt.

Als Schlußfolgerung läßt sich festhalten, daß man nun nach Studien an rational entworfenen synthetischen Analoga die Bedeutung aller Sulfat- und Carboxylatgruppen des aktiven Heparin-Pentasaccharids für die AT-III-Aktivierung kennt. In Abbildung 15 ist der Einfluß der einzelnen geladenen Gruppen auf die biologische Aktivität schematisch wiedergegeben.

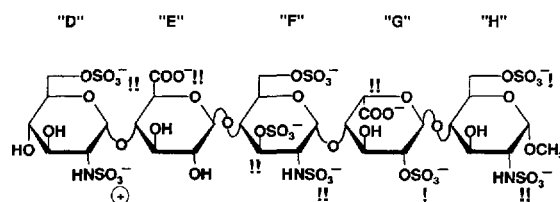


Abb. 15. Funktion der einzelnen geladenen Gruppen bei der Aktivierung von AT III. Die mit Ausrufezeichen versehenen Gruppen wurden als wichtige Funktionalitäten identifiziert, da bei ihrer Entfernung die anti-Xa-Aktivität um mehr als 95 % (!!) und um ca. 75 % (!) abnimmt; die mit (+) gekennzeichnete N-Sulfatgruppe trägt auch zur Aktivität bei (Abnahme der anti-Xa-Aktivität nach Entfernung um ca. 50%).

5.2. Die Entdeckung wirksamerer Derivate

1987 waren wir an dem Punkt angelangt, wo sowohl die Rolle der einzelnen geladenen Gruppen des Heparin-Pentasaccharids bereits fest umrissen war (vgl. Abschnitt 5.1) als auch ein verlässliches, auf ^1H -NMR-spektroskopischen Untersuchungen und Molecular Modeling basierendes Strukturmodell zur Verfügung stand (vgl. Abschnitt 4). Besonders bemerkenswert ist hierbei, daß zwei unterschiedliche AT-III-Bindungsregionen um das Molekülmodell des Pentasaccharids erstellt werden konnten^[43] (Abb. 16). Man erkennt die potentiellen Kontaktpunkte an der Oberseite („Nordseite“) und Unterseite („Südseite“) des Pentasaccharides. Die essentiellen geladenen Gruppen des DEF-Fragments sind zur südlichen Bindungsregion hin ausgerichtet, die wichtigen Carboxylat- und N-Sulfatgruppen des GH-Fragments zur nördlichen Bindungsregion. Dieses AT-III-Heparin-Wechselwirkungsmodell inspirierte uns zur Synthese des Analogons **57** (Abb. 17), das eine zusätzliche 3-Sulfatgruppe in Einheit H enthält (vgl. Sternchen in Abb. 16), die, in Einklang mit dem Modell, die Bindungsaffinität zur Nordseite

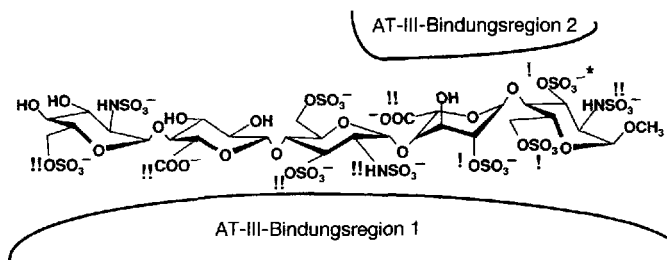


Abb. 16. Als die Funktion der essentiellen geladenen Gruppen (!! und !) bekannt wurde, postulierte man das hier dargestellte Wechselwirkungsmodell mit zwei AT-III-Pentasaccharid-Bindungsregionen. Auf der Grundlage dieses Modells entschied man, in 3-Position am reduzierenden Terminus der Glucosamin-einheit H (*) eine zusätzliche Sulfatgruppe einzuführen. Tatsächlich war dieses „super-sulfatierte“ Analogon **57** aktiver und trat stärker mit dem AT-III-Protein in Wechselwirkung als die natürliche Verbindung. Andere super-sulfatierte Analoga waren weniger aktiv.

hin verstärken sollte. Tatsächlich zeigt das zusätzlich sulfatierte Derivat **57** eine höhere AT-III-vermittelte anti-Faktor-Xa-Aktivität als die Referenzverbindung **39** (1250 U mg^{-1} gegenüber 700 U mg^{-1}) und bindet an AT III um eine Größenordnung stärker (siehe Abschnitt 7.1). Darüber hinaus wurde in pharmakokinetischen Untersuchungen^[44] festgestellt, daß **57** eine längere biologische Halbwertszeit aufweist, wahrscheinlich aufgrund einer stärkeren Wechselwirkung mit AT III im Blutkreislauf.

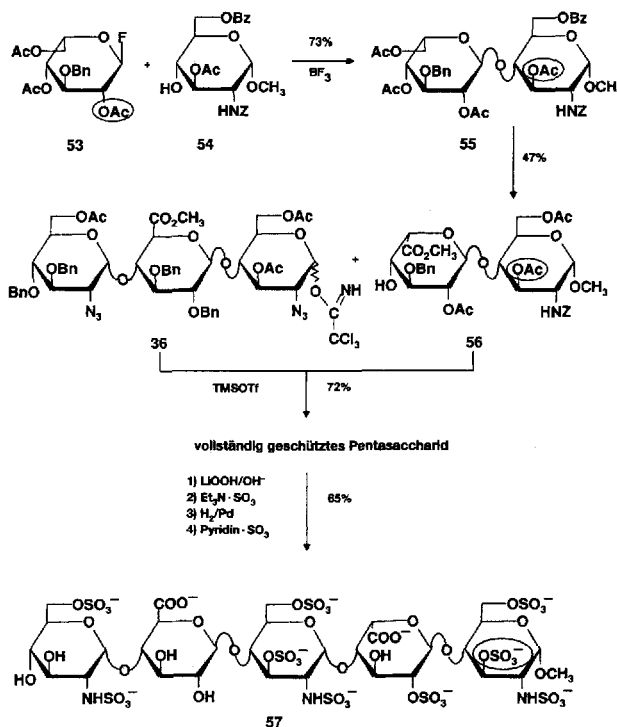


Abb. 17. Synthese des aktiveren Analogons **57**, welches eine zusätzliche 3-Sulfatgruppe am reduzierenden Terminus enthält. Folgt man der allgemeinen Strategie, so benötigt man einen geeignet geschützten GH-Baustein (**56**), der anstelle einer 3-O-Benzylschutzgruppe eine 3-O-Acetylgruppe (siehe Kreis) enthält.

Der Synthese des zusätzlich sulfatierten Pentasaccharids **57** lag im wesentlichen die zuvor diskutierte allgemeine Strategie zugrunde. Die zusätzliche 3-Sulfatgruppe in Einheit H erforderte einen Glucosaminbaustein H, der eine 3-O-

Acetylgruppe anstelle einer 3-*O*-Benzylgruppe enthält. Zu diesem Zweck wurde der Monosaccharidacceptor **54** synthetisiert (Abb. 17). Die Kupplung von **54** mit dem Idopyranosylfluorid-Donor **53** führte zum vollständig geschützten Disaccharid **55**, das, analog zur Darstellung von **35** aus **20** (Abb. 5b), weiter umgesetzt wurde, so daß schließlich der geschützte GH-Baustein **56** erhalten werden konnte.

Das vollständig geschützte Pentasaccharid ließ sich äußerst einfach durch Kupplung des GH-Acceptors **56** mit einer äquimolaren Menge des als Imidat aktivierten DEF-Donors **36** herstellen. Trotzdem verliefen die ersten Versuche, das voll geschützte Pentasaccharid in das gewünschte Produkt **57** zu überführen, eher enttäuschend: Im ersten Entschützungs-schritt, der Verseifung mit Natriumhydroxid, trat zu annähernd 40% Fragmentierung infolge einer 4,5-Eliminierung der Iduronsäure auf. Glücklicherweise konnte diese unerwünschte Nebenreaktion durch Verseifung mit Lithiumhydropoxid unterdrückt werden. Bei den anschließenden Sulfatierungs- und Entschützungs-schritten wurden gute Ausbeuten erzielt.

Aufgrund der beachtlichen Wirkung des zusätzlich sulfatierten Analogons **57** wurde das Interesse auf einige seiner Analoga gelenkt. Man ging nun der Frage nach, ob die Einführung zusätzlicher Sulfatgruppen die Aktivität des Pentasaccharids steigert. Im Prinzip sollte sich die Wechselwirkung mit dem positiv geladenen AT III durch Erhöhung der negativen Ladung des Kohlenhydrates verstärken lassen. Man fand jedoch genau das Gegenteil. Zum Beispiel sind die Analoga **58** und **59** (Abb. 18), die jeweils eine zusätzliche 3-Sulfatgruppe in der Glucuron-^[45] bzw. Iduronsäureeinheit^[46] enthalten, weniger aktiv als Verbindung **57** (30% bzw. 60% Aktivitätsverlust). Die Aktivität von Analoga mit

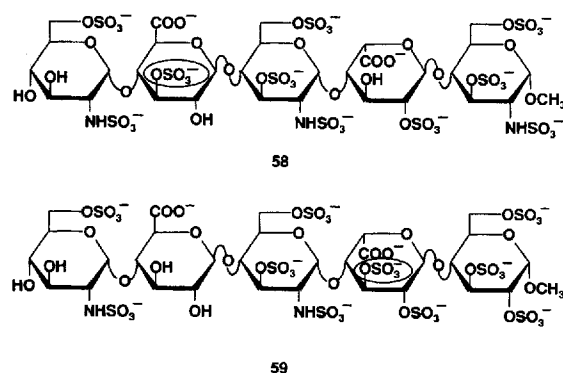


Abb. 18. Andere super-sulfatierte Analoga, wie die Verbindungen **58** und **59**, die Uronsäure-3-sulfat-Einheiten enthalten, sind weit weniger aktiv als die Leitverbindung **57**, in der diese zusätzliche Sulfatgruppe fehlt. Dieser Befund zeigt, daß die Wechselwirkung zwischen dem Pentasaccharid und AT III nicht einfach durch elektrostatische Anziehung zweier gegensätzlich geladener Moleküle erklärt werden kann.

zusätzlichen Sulfatgruppen in der D-Einheit sinkt um ungefähr 10%^[46]. Das äußerste Extrem ist das vollständig sulfatierte, inaktive Pentasaccharid^[47]. Offensichtlich ist die Art der Wechselwirkung zwischen dem charakteristischen Heparinfragment und dem Protein viel komplexer, als es ein einfaches elektrostatisches Modell beschreiben kann, das von der Anziehung zweier gegensätzlich geladener Biomakromoleküle ausgeht.

5.3. Einige flexible Analoga

Bereits in Abschnitt 5.1 wurde gezeigt, daß die Carboxylatgruppen der Uronsäurereste E und G für die AT-III-Aktivierung unbedingt erforderlich sind. Es stellte sich nun die Frage, ob dies auch für die Pyranringe der Uronsäureeinheiten gilt. Zur Lösung dieses Problems synthetisierten wir^[48] die „ringgeöffneten“ Strukturen **63** und **64** (Abb. 19–21). Die α -L-Iduronsäureeinheit ist im Analogon **63** durch ein (*R*)-Glycerinsäure-2-*O*-CH₂-Fragment ersetzt, die β -D-Glucuronsäure im Analogon **64** durch ein (*S*)-Glycerinsäure-2-*O*-CH₂-Fragment (Abb. 19). Diese Analoga enthalten

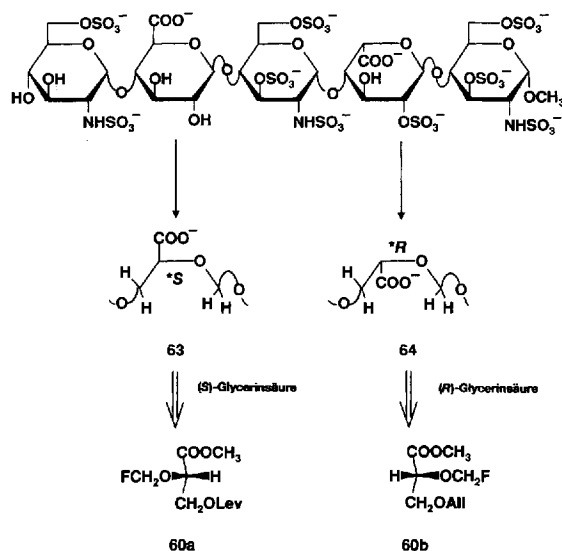


Abb. 19. Wir fragten uns, ob die Uronsäurereste des Pentasaccharids durch flexible „geöffnete“ Pyranoseeinheiten ersetzt werden können, die die essentiellen Carboxylatgruppen in passender Konfiguration enthalten. Zu diesem Zweck mußten die geeignet geschützten (*S*)- und (*R*)-Glycerinsäure-Bausteine **60a** bzw. **60b** synthetisiert werden.

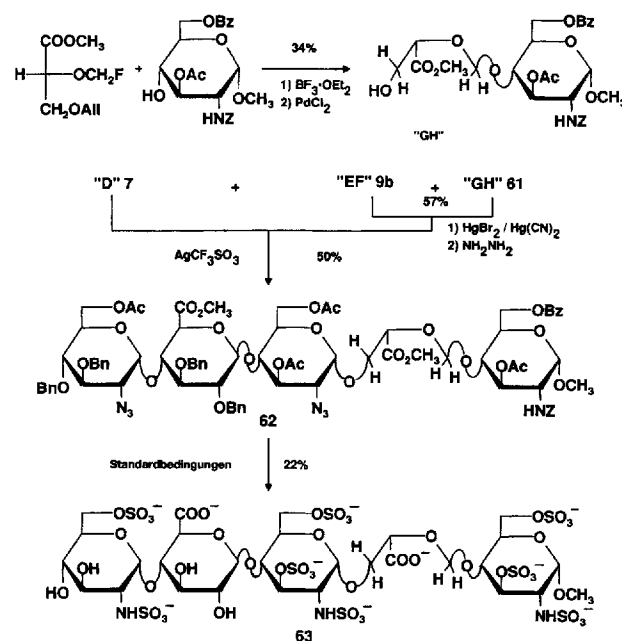


Abb. 20. Synthese des Analogons **63**, das einen „ringgeöffneten“ α -L-Iduronsäurerest enthält. Analogon **63** zeigt noch ca. 25% der biologischen Aktivität der Referenzverbindung **39**. Anscheinend kann der flexible α -L-Iduronsäurerest G durch eine lineare Kette ersetzt werden, in der die Carboxylatgruppe in passender Konfiguration freiliegt.

immer noch die essentiellen Carboxylatsubstituenten in der geforderten Konfiguration, gleichzeitig aber ist ihre konformative Flexibilität erhöht. Die Herstellung und Einführung der Glycerinsäure-O-CH₂-Bausteine sind Schlüsselschritte in der Synthese dieser Analoga.

Zu diesem Zweck wurden die beiden geeignet geschützten und aktivierten Bausteine **60a** und **60b** aus (*S*)- bzw. (*R*)-Glycerinsäure hergestellt. In Abbildung 20 ist die Synthese von **63** skizziert; Analogon **64** (Abb. 21) wurde auf ähnliche Weise hergestellt. Analogon **63** mit „ringoffener“ α -L-Idu-

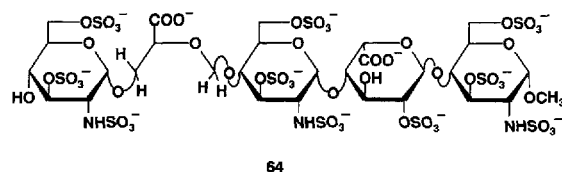


Abb. 21. Analogon **64** enthält einen ringoffenen Glucuronsäurerest und ist nicht aktiv, obwohl alle essentiellen geladenen Gruppen vorhanden sind. Daraus läßt sich schließen, daß die starre Glucuronsäureinheit D (in ⁴C₁-Konformation) für die Aktivierung von AT III erforderlich ist.

ronsäure zeigte noch ungefähr ein Viertel der Aktivität der Referenzverbindung. Dies beweist, daß die cyclische Struktur der α -L-Iduronsäure nicht unbedingt intakt bleiben muß. Dieses Phänomen ist nicht so überraschend, wenn man bedenkt, daß dieser Bereich des Moleküls konformativ nur wenig eingeschränkt ist^[49] (vgl. Abschnitt 4).

Dagegen ist Analogon **64** mit dem ringoffenen β -D-Glucuronsäurerest nahezu inaktiv, obwohl alle geladene Gruppen im Molekül vorhanden sind. Wahrscheinlich wird der starre D-Glucuronsäurerest (Einheit E) dafür benötigt, die essentiellen, Ladungen tragenden Gruppen in der geforderten Weise auszurichten. Stark vereinfachte Analoga mit zwei ringoffenen Iduonsäurefragmenten in den Positionen E und G sind biologisch inaktiv^[50].

5.4. Einige epimere Analoga

Um detaillierte Einblicke in die Heparin/AT-III-Wechselwirkung zu erhalten, untersuchten wir einige synthetische Analoga, die alle essentiellen geladenen Gruppen enthielten und in denen jeweils nur eines der 25 chiralen Zentren invertiert war, also epimere Analoga.

Verbindung **65** (Abb. 22) enthält ein β -verknüpftes Glucosamin (Einheit D) und zeigt kaum Aktivität^[47], während Verbindung **66** mit einem β -D-Glucuronsäure- anstelle eines α -L-Iduronsäurerests (Einheit G) völlig inaktiv ist^[47]. Im letztgenannten Analogon führt die Epimerisierung an C5 der α -L-Iduronsäure, wobei β -D-Glucuronsäure entsteht, zu einer drastischen Änderung des konformativen Verhaltens der Einheit G, da die flexible Iduonsäure (¹C₄- und ²S₀-Konformationen sind möglich) in eine starre Glucuronsäure überführt wird, die ausschließlich die ⁴C₁-Konformation einnehmen kann.

Analogon **67**, in dem D-Glucuronsäure an C5 epimerisiert wurde und das somit zwei Iduonsäureuntereinheiten enthält, weist immer noch um die 10 % der anti-Faktor-Xa-Aktivität des wirksamen Derivats **57** auf. Aus präparativer

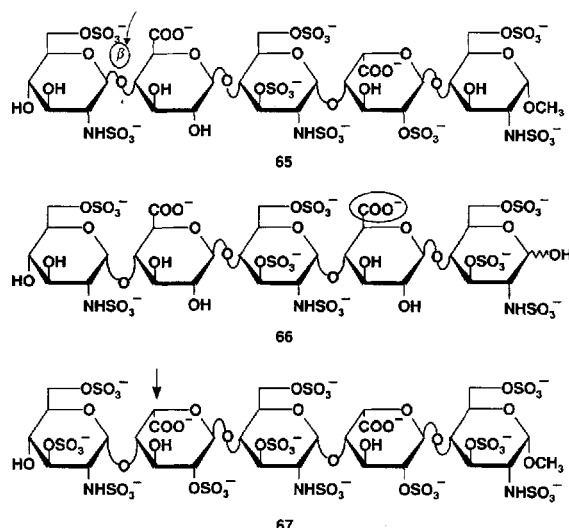


Abb. 22. Die epimeren Analoga **65** und **66** sind kaum aktiv, während Analogon **67** ca. 10 % der Aktivität des korrespondierenden Epimers aufweist. Offensichtlich sinkt die biologische Aktivität drastisch, sobald die Orientierung der essentiellen geladenen Gruppen im Raum verändert wird.

Sicht ist Verbindung **67** ein attraktives Zielmolekül, da es aus alternierenden Saccharideinheiten aufgebaut ist, wobei sich sowohl die D-, F- und H-Einheiten als auch die E- und G-Einheiten gleichen. Dies bedeutet, daß zur Aufrechterhaltung der biologischen Aktivität prinzipiell nur zwei Zuckerbausteine benötigt werden. Interessanterweise wurden ähnliche alternierende Sequenzen des Typs [IdoA(2-SO₄) α 1 \rightarrow 4 GlcNSO₃(3-SO₄) α 1 \rightarrow 4] im Heparansulfat der glomerulären Basalmembran identifiziert^[52].

In einer verwandten Reihe (vgl. Abschnitt 6) wurden zwei weitere epimere Analoga synthetisiert. Eines davon enthielt eine nicht-reduzierende terminale D-Mannopyranosyleinheit (Einheit D) und war halb so aktiv wie das korrespondierende Pentasaccharid mit der D-Glucopyranosyleinheit^[42]. Dagegen hatte das andere Analogon mit D-konfiguriertem Galactopyranosylrest^[42] am nichtreduzierenden Ende (Einheit D) die gleiche Aktivität wie die Stammverbindung.

Eine andere Gruppe^[19] zeigte, daß die biologische Aktivität eines Analogons mit einer β -O-Methylgruppe am anomeren Zentrum (Einheit H) mit der der Referenzverbindung identisch war. Da nur wenige der prinzipiell möglichen epimeren Analoga bis heute untersucht worden sind, ist es gefährlich, daraus Schlüsse zu ziehen; allerdings deuten die Ergebnisse darauf hin, daß die Aktivität immer dann sinkt, sobald die Ausrichtung essentieller, geladener Substituenten verändert wird.

5.5. Analoga mit anderen geladenen Substituenten

Ein anderer Aspekt der Struktur-Aktivitäts-Studien des charakteristischen Heparinfragments ist die Bedeutung des Typs der geladenen Gruppen im Molekül, mit anderen Worten: Benötigt das Molekül bei der AT-III-Aktivierung Sulfat- und Carboxylatgruppen? Wir ersetzen z.B. die essentielle 6-Sulfatgruppe in Einheit D durch eine höher geladene Phosphatgruppe^[53] (Verbindung **69**, Abb. 23). Zur Synthese dieses Analogons wurde ein Lävulinsäureester als temporärer Schutz für die 6-Position in Einheit D verwendet. Nach

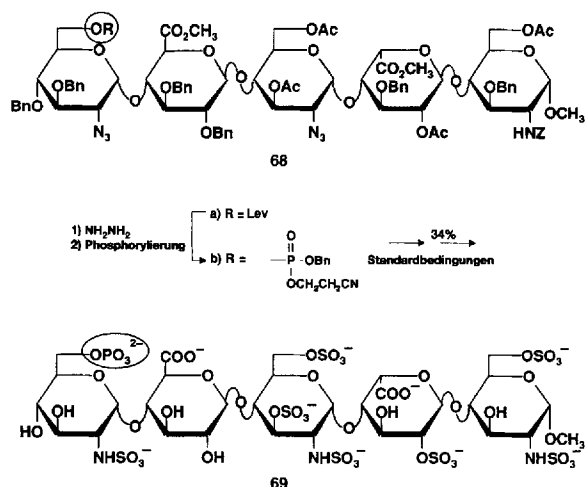


Abb. 23. Synthesestrategie für das 6-O-phosphorylierte Analogon **69**. Zu unserer Überraschung war Verbindung **69** biologisch inaktiv. Offensichtlich kann eine essentielle Sulfatgruppe nicht durch eine Phosphatgruppe ersetzt werden. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, daß selbst die Art der negativ geladenen Gruppen im Heparin (Sulfat und Carboxylat) im spezifischen Erkennungsprozeß zwischen Heparin und AT III von Bedeutung ist.

kontrollierter Hydrazinolyse von **68a** wurde **68b**, das entsprechende Derivat mit der freien Hydroxygruppe, mit Standardmethoden der Phosphoramidit-Chemie phosphoryliert. Dazu mußten mit den nachfolgenden Entschützungs- und Sulfatierungsschritten kompatible Phosphatschutzgruppen eingesetzt werden. Nach unserer Erfahrung hat sich dazu die 2-Cyanethyl-Schutzgruppe in Kombination mit einer Benzylschutzgruppe am besten bewährt. Die 2-Cyanethylgruppe wird im ersten Entschützungs-schritt (Verseifung) abgespalten, und die Benzylgruppe wird durch Hydrierung entfernt. Zu unserer Überraschung zeigte das monophosphorylierte Derivat **69** keine signifikante Aktivität. Es fällt schwer, eine Erklärung dafür zu liefern, daß AT III die Phosphatgruppe nicht erkennt. Möglicherweise ist die Wechselwirkung zwischen dem phosphorylierten Derivat und AT III aufgrund der hohen Freien Dehydratisierungsenergie der Phosphatgruppe so schwach.

Andere Arbeitsgruppen^[54] haben Hinweise dafür gefunden, daß Proteine über verschiedene Wasserstoffbrücken-Netzwerke zwischen Phosphat- und Sulfatgruppen unterscheiden können (Abb. 24).

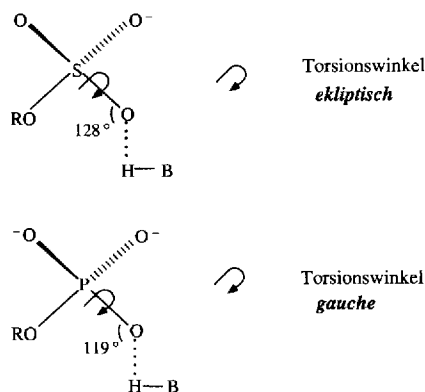


Abb. 24. Kristallstrukturanalysen und ab-initio-Rechnungen zeigen, daß bei der Bindung eines Wasserstoffatoms an Sulfat oder Phosphat signifikante Unterschiede in der Orientierung auftreten. Die gezeigten Daten beziehen sich auf die Ergebnisse von Kristallstrukturuntersuchungen^[20a].

Da die zwei Carboxylatgruppen des Pentasaccharids an der AT-III-Aktivierung beteiligt sind, versuchten wir, andere geladene funktionelle Gruppen in diesen Positionen zu plazieren. Dazu wurden die Analoga **70** und **71**^[55] (Abb. 25) synthetisiert, in denen die COO^- -Gruppen durch $\text{CH}_2\text{OSO}_3^-$ -Gruppen ersetzt sind. Da **70** und **71** nahezu inak-

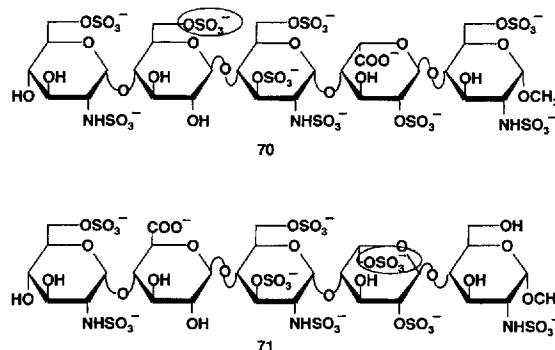


Abb. 25. Die Analoga **70** und **71** mit Methylsulfat- anstelle von Carboxylatgruppen weisen nur geringe anti-Xa-Aktivität auf. Dieser Befund zeigt, daß die Carboxylatgruppen der Uronsäureeinheiten E und G spezifische Bindungen mit den positiv geladenen, komplementären Bindungsregionen in AT III eingehen.

tiv waren, obwohl sie ähnliche konformative Eigenschaften wie die natürliche Verbindung aufwiesen, ist die Schlußfolgerung zulässig, daß offensichtlich auch die Art des Ladungsträgers (d. h. Carboxylat) in Position 5 der Uronsäurereste entscheidend ist. Wahrscheinlich wurden die Sulfat- und Carboxylatgruppen in Heparin von der Natur aufgrund ihrer speziellen Eigenschaften für die molekulare Erkennung gewählt. Vermutlich sind hochgeordnete Netzwerke von Wasserstoffbrückenbindungen (Salzbrücken), insbesondere zwischen definierten, positiv geladenen Aminosäureresten aus AT III und den essentiellen geladenen Gruppen der charakteristischen Heparindomäne an der Protein-Kohlenhydrat-Wechselwirkung beteiligt^[56] (vgl. auch Abschnitt 7).

6. Entwicklung biologisch aktiver „Nicht-Glycosamino“glycan-Analoga

6.1. Austausch von N-Sulfat gegen Sulfat

Verbindung **75** (Abb. 26) ist ein Analogon des hochwirksamen Pentasaccharids **57** (siehe Abschnitt 5.2) und enthält anstelle eines Glucosamins einen Glucoserest (Einheit H)^[56]. Diese Modifizierung hatte keinen Einfluß auf die biologische Aktivität, was uns dazu veranlaßte, Derivate zu synthetisieren, in denen alle N-Sulfat- gegen Sulfatgruppen ersetzt waren. Dies vereinfachte die Synthese erheblich. Wir erreichten dieses Ziel mit einer ganz neuen Reihe methylierter Heparinfragmente (siehe Abschnitt 6.3), die wir als „Nicht-Glycosamino“glycan-Fragmente bezeichnen. Zur Darstellung von Analogon **75** wurde zunächst der neue GH-Acceptor **74** synthetisiert. Dazu wurde das Idopyranosylderivat **72** mit dem Acceptor **73** gekuppelt, daran schlossen sich weitere Umsetzungen an.

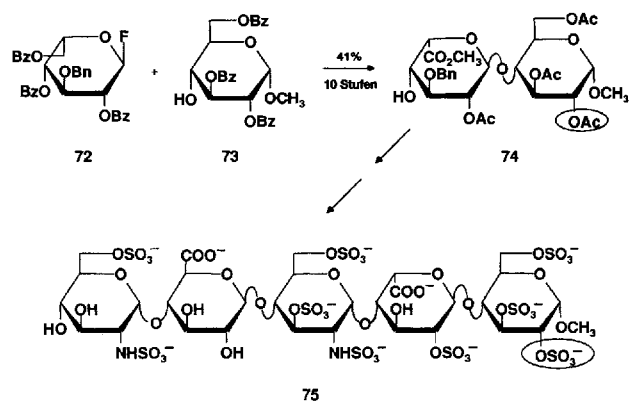


Abb. 26. Strategie zur Darstellung eines super-sulfatierten Analogons, das anstelle einer 2-N-Sulfatgruppe am reduzierenden Terminus eine 2-Sulfatgruppe trägt. Diese Modifizierung beeinflusste die anti-Xa-Aktivität (im Vergleich zu **57**) in keiner Weise; deshalb ist Analogon **75** eine wichtige Leitverbindung in der Entwicklung von Nicht-Glycosaminoglycan-Analoga.

6.2. O-Methylierte Pentasaccharide

Um unsere Kenntnisse der Struktur-Aktivitäts-Beziehungen zu erweitern, wurden einige partiell O-methylierte Derivate sowie ein vollständig methyliertes Derivat der aktiven Pentasaccharide **75** und **57** synthetisiert (Abb. 27)^[56]. Diese

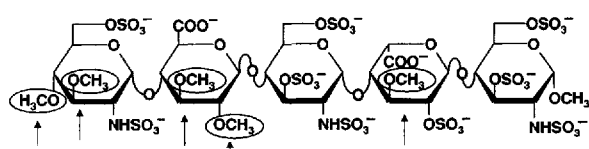


Abb. 27. Einige O-methylierte Analoga wurden synthetisiert, die zeigten, daß in der charakteristischen Pentasaccharidomäne von Heparin keine essentiellen Hydroxygruppen vorhanden sind. Demzufolge wurden Nicht-Glycosaminoglycan-Pentasaccharide hergestellt, die nur Sulfat- und O-Alkylgruppen enthielten; einige dieser Analoga waren sogar aktiver als ihre natürlichen Homologen.

Analoga sind bemerkenswerterweise fast genauso aktiv wie die korrespondierenden nicht-methylierten Pentasaccharide, was darauf hindeutet, daß die Hydroxygruppen nicht an der Kohlenhydrat-Protein-Wechselwirkung beteiligt sind. Im Gegensatz dazu fand man bei allen bisher untersuchten Protein-Kohlenhydrat-Wechselwirkungen zumindest einige wenige polare „Schlüssel“-Hydroxygruppen des Kohlenhydrats, die mit dem Protein sehr stark in Wechselwirkung treten.

Deshalb sollte man daraus folgern können, daß die Fähigkeit zur Ausrichtung polarer Schlüssel-Carboxylat- und -Sulfatgruppen gegenüber AT III zu den wichtigsten Eigenschaften von Heparin zählt. Diese Hypothese wird durch biologisch aktive Analoga erhärtet, die im folgenden Abschnitt beschrieben werden.

6.3. O-Alkylierte, sulfatierte Pentasaccharide („Nicht-Glycosamino“glycan-Analoga)

Da weder eine Methylierung der freien Hydroxygruppen noch ein Austausch der N-Sulfatgruppe in Einheit H gegen

eine Sulfatgruppe die biologische Aktivität beeinflussen, stellten wir das Nicht-Glycosaminoglycan-Analogon **83** her, das nur Schwefelsäureester und O-Methylether enthält^[58]. Die Synthese solcher Analoga ist wesentlich einfacher – wodurch eine ökonomisch vertretbare Wirkstoffentwicklung ermöglicht wird – als die der Heparin-ähnlichen Fragmente (Abschnitte 1–5), und zwar aus folgenden Gründen: 1) Die Synthesestrategie ist viel flexibler, da sowohl Acylester als auch Benzylether zum Schutz der zu sulfatierenden Hydroxygruppen gewählt werden können; 2) es müssen keine α -verknüpften Glycosamine eingeführt werden, wozu man Synthesewege für Azid-haltige Bausteine entwickeln müßte; 3) selektive N-Sulfatierungen entfallen; 4) der Rahmen für mögliche chemische Modifizierungen ist größer (als neue Optionen ergeben sich: Carboxylatgruppen können als Benzylester geschützt werden; die Epimerisierung der Iduronsäureeinheiten wird möglich, siehe nachstehend).

Verbindung **83** war das erste von uns synthetisierte Nicht-Glycosaminoglycan-Analogon^[58], das ein ähnliches Sulfatierungsmuster aufwies wie das wirksame Derivat **57**. In den Abbildungen 28 a und 28 b ist die Darstellung des methylierten GH-Acceptors **78** bzw. des methylierten DEF-Donors **81** gezeigt. Durch Trimethylsilyltriflat-katalysierte Kondensation des Donors **81** mit der äquimolaren Menge des Acceptors **78** erhielt man das gewünschte vollständig geschützte Pentasaccharid in 70% Ausbeute (Abb. 29). Die Umwandlung von **82** in das Endprodukt **83** gelang in einer dreistufigen Sequenz (Verseifung, Hydrierung und Sulfatierung) in 60% Ausbeute.

Um Nebenreaktionen (α,β -Eliminierung, Epimerisierung) der Uronsäurereste während der Verseifung des geschützten Pentasaccharids zu vermeiden, wurden die Carboxylatgruppen als Benzylester geschützt (Abb. 29)^[42, 51], z.B. wurde anstelle von **82** das vollständig Benzylester-geschützte Pentasaccharid **84** hergestellt. Der erste Entschüttungsschritt ist dann eine Hydrogenolyse, wobei neben den Hydroxygruppen die Carboxylatgruppen freigesetzt werden, deren Anwesenheit eine α,β -Eliminierung und Epimerisierung während der nachfolgenden Verseifung verhindert. Dementsprechend sind auch die Ausbeuten höher (bis zu 96%), und die chemische Reinheit der Endprodukte ist hervorragend, weshalb man auch keine Ionenaustauschchromatographie zur weiteren Reinigung benötigt. Wir weisen ausdrücklich darauf hin, daß diese alternative Schutzgruppenstrategie für die Synthese von Heparinfragmenten, die mit dem Naturstoff nahe verwandt sind, nicht eingesetzt werden kann.

Das sulfatierte, O-methylierte Analogon **83** zeigte sogar eine etwas höhere AT-III-vermittelte anti-Faktor-Xa-Aktivität ($1323 \alpha\text{Xa U mg}^{-1}$) und eine etwas stärkere Bindung an AT III als das wirksame Heparin-Analogon **57** (siehe Abb. 35).

Darüber hinaus synthetisierten wir auch Pentasaccharide, die längere aliphatische Ketten^[58] enthalten. Einige interessante Beispiele sind in Abbildung 30 dargestellt. Verbindung **85** ist in den Positionen 3 und 4 der D-Einheit mit zwei Tetradecylgruppen substituiert, die Verbindung **86** mit zwei Hexyl- und die Verbindung **87** mit zwei Butylgruppen in den gleichen Positionen. Überraschenderweise hatte die Einführung der Tetradecylgruppen den vollständigen Verlust der anti-Faktor-Xa-Aktivität zur Folge, während das korrespondierende butylierte Derivat **87** sogar aktiver ($1529 \alpha\text{Xa U mg}^{-1}$) als das zuvor erwähnte methylierte Pentasaccha-

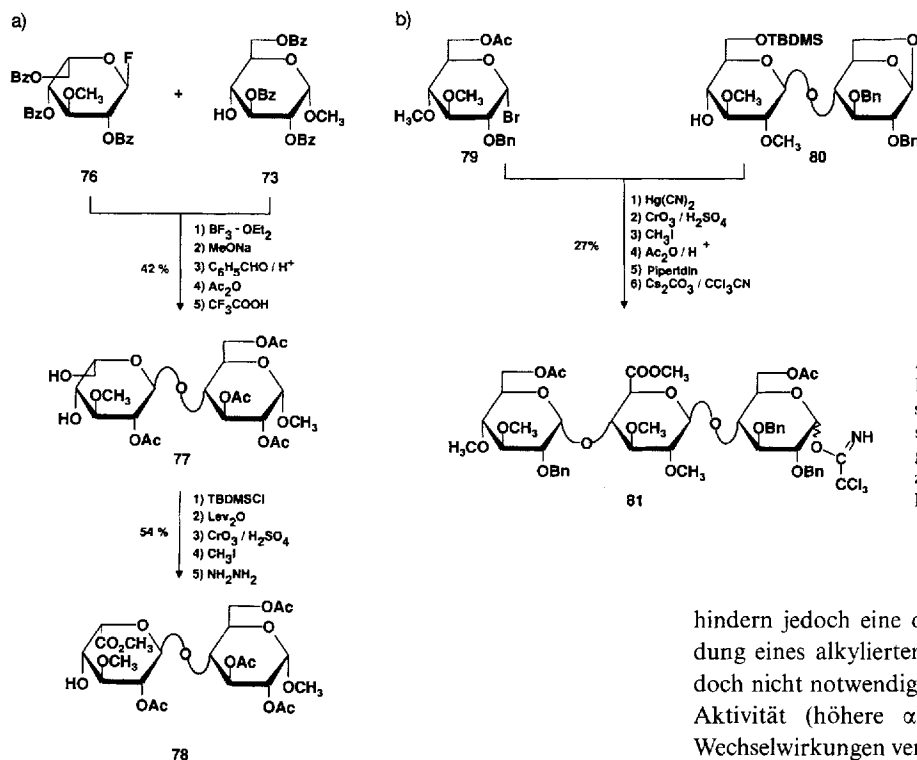


Abb. 28. a) Synthese eines geeignet geschützten Disaccharidbausteins GH 78 zur Darstellung vollständig sulfatierter, *O*-methylierter Nicht-Glycosaminoglycan-Analoga. b) Synthese von 81, einem geeignet geschützten Trisaccharidbaustein DEF zur Darstellung vollständig sulfatierter, *O*-methylierter Nicht-Glycosaminoglycan-Analoga.

rid **83** ($1323 \alpha\text{Xa U mg}^{-1}$) ist. Analogon **86** mit zwei Hexylgruppen zeigt eine mittlere Aktivität ($910 \alpha\text{Xa U mg}^{-1}$).

Somit erhöhen lipophile Gruppen mittlerer Größe – von Methyl bis Butyl – in Einheit D die Affinität gegenüber AT III (vgl. Abb. 35), wahrscheinlich wegen ausgeprägter hydrophober Wechselwirkungen. Längere Alkylketten ver-

hindern jedoch eine optimale Bindung. Eine stärkere Bindung eines alkylierten Pentasaccharids an AT III führt jedoch nicht notwendigerweise zu einer erhöhten spezifischen Aktivität (höhere αXa -Aktivität); manche hydrophobe Wechselwirkungen verstärken nur die Bindung, während andere auch zur AT-III-Aktivierung beitragen (vgl. Beispiel in Abschnitt 6.4). Analoga mit größeren lipophilen Gruppen binden darüber hinaus auch in beachtlichem Maße an andere Serumproteine, was einen beträchtlichen Selektivitätsverlust verursacht^[59].

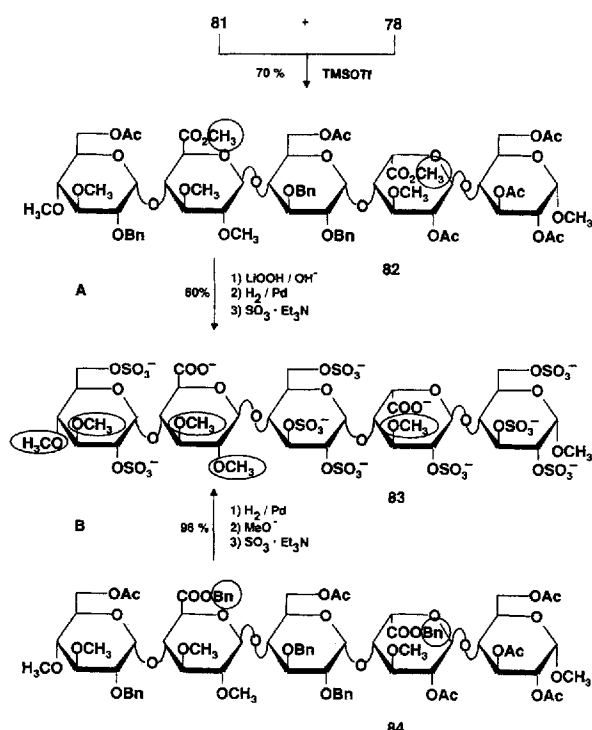
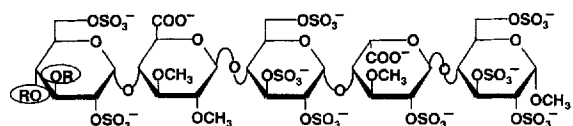


Abb. 29. Zwei Strategien (A und B) zur Darstellung des Nicht-Glycosaminoglycan-Analogons **83**. Bei der Synthese solcher Analoga können die Carboxylatgruppen auch durch Benzilylierung geschützt werden (B). Die Hydrierung zur Abspaltung der Benzylester (B) ist der Verseifung von Methylestern (A) vorzuziehen, da unter den zuletzt genannten Abspaltungsbedingungen Eliminierung und Epimerisierung auftreten können.



83 : R = CH ₃	(1323 $\alpha\text{Xa U mg}^{-1}$)
85 : R = (CH ₂) ₁₃ CH ₃	(<1 $\alpha\text{Xa U mg}^{-1}$)
86 : R = (CH ₂) ₅ CH ₃	(910 $\alpha\text{Xa U mg}^{-1}$)
87 : R = (CH ₂) ₃ CH ₃	(1529 $\alpha\text{Xa U mg}^{-1}$)

Abb. 30. Einige *O*-alkylierte, sulfatierte Analoga mit längeren Alkylketten in Einheit D. Sind zwei Hexyl- oder längere Alkylketten vorhanden, beobachtet man einen Abfall der biologischen Aktivität. Offensichtlich behindern längere aliphatische Ketten eine optimale Wechselwirkung mit AT III.

6.4. Pentasaccharide mit „pseudo-alternierender“ Sequenz: ein verkürzter Weg zu vereinfachten Analoga

Unter den sulfatierten/*O*-alkylierten Analoga befinden sich aussichtsreiche Kandidaten für eine Wirkstoffentwicklung, da sulfatierte/*O*-alkylierte Pentasaccharide sowohl leicht zugänglich sind als auch eine hohe AT-III-vermittelte αXa -Aktivität zeigen.

Wir fragten uns, ob man Analoga entwickeln könnte, für die man sogar noch kürzere Synthesewege ausarbeiten kann. Besonders vielversprechend sind Derivate mit einer semi-alternierenden Sequenz wie Verbindung **88** in Abbildung 31. Die EF- und GH-Fragmente dieses Analogons haben ein identisches Substitutionsmuster und unterscheiden sich nur in der Konfiguration an C5 der Uronsäurereste.

Unter Berücksichtigung der Ähnlichkeit von EF und GH könnte ein Reaktionsweg ausgearbeitet werden, auf dem man ein EF-Disaccharid durch Epimerisierung eines geeignet geschützten GH-Disaccharids erhält (Abb. 31). So ergab beispielsweise die Epimerisierung des GH-Derivates **89** mit Natriummethanolat die korrespondierende EF-Einheit **90** in guter Ausbeute. Das so erhaltene EF-Disaccharid **90** enthält jedoch eine schwer zu entfernende Methylschutzgruppe am anomeren Zentrum. Die Umwandlung von **90** in einen geeigneten EF-Glycosyldonor (**91**) erfordert – nach Schutz der 4'-Hydroxygruppe – eine Acetolyse des blockierten anomeren Zentrums; dabei entsteht in hoher Ausbeute **91**.

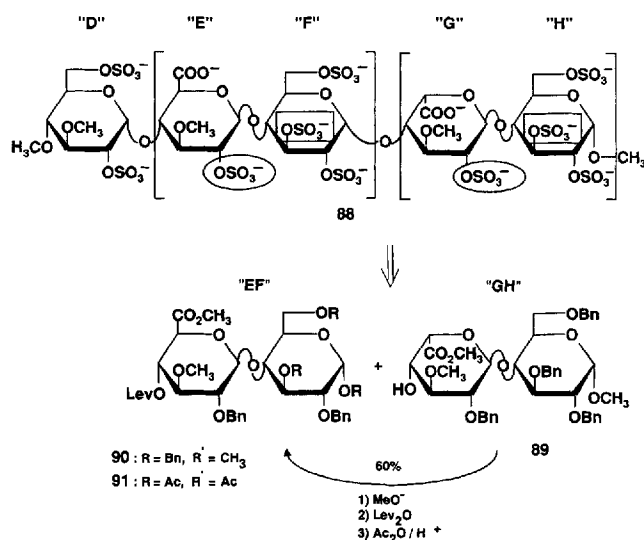


Abb. 31. Durch die Einführung einer zusätzlichen 3-Sulfatgruppe in Einheit H und einer zusätzlichen 2-Sulfatgruppe in Einheit E wurden Derivate mit einer pseudo-alternierenden Sequenz hergestellt. Abgesehen von der Konfiguration an C5 der Uronsäurereste sind die Einheiten EF und GH in **88** fast identisch. Folglich läßt sich über die Epimerisierung des korrespondierenden Bausteins GH **89** der geeignet geschützte EF-Disaccharidbaustein **90** darstellen. Diese Strategie kann nur in der hochmodifizierten Reihe vollständig O-alkylierter/sulfatierter Analoga angewandt werden.

Es sollte betont werden, daß die 3-O- und 6-O-Benzylgruppen im letzten Aufarbeitungsschritt mit Essigsäureanhydrid unter sauren Bedingungen quantitativ abgespalten wurden. Man beachte dabei, daß die zuvor erwähnte Reaktionsfolge nur in der Nicht-Glycosaminoglycan-Serie verwendet werden kann, nicht hingegen in der Reihe der Heparinfragmente. Somit benötigt man also bei der Methanolat-katalysierten Epimerisierung von GH ausschließlich Ethergruppierungen, während für die Synthese von Heparin-ähnlichen Fragmenten Acetylenschutzgruppen nötig sind. Man sollte bedenken, daß nach der Acetolyse von **90** zu **91** sowohl Acetyl- als auch Benzylschutzgruppen die zu sulfatierenden Hydroxygruppen blockieren, und daß eine solche Kombination verschiedener Schutzgruppentypen in der „Heparin-ähnlichen“ Serie nicht anwendbar ist (Abschnitte 1 bis 5).

Analogon **92** zeigt eine anti-Faktor-Xa-Aktivität von 1150 U mg⁻¹, was bedeutet, daß die 2-Sulfat- anstelle der 2-O-Methylglucuronsäure (Einheit E) die Aktivität leicht verringert. Eine andere Möglichkeit, aus der Leitverbindung **83** ein Pentasaccharid mit pseudoalternierender Sequenz aufzubauen, besteht darin, die 2-Sulfatgruppe der Iduronsäure

durch eine 2-O-Methylgruppe zu ersetzen, was z.B. in Verbindung **92** (Abb. 32) realisiert wurde.

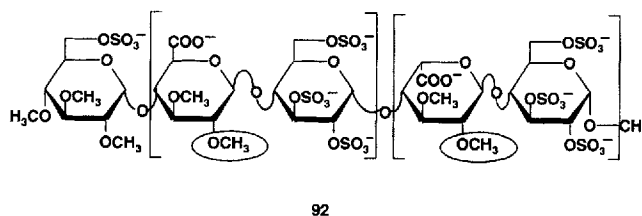


Abb. 32. Analog zu Pentasaccharid **88** kann Verbindung **92**, ein Derivat mit pseudo-alternierender Sequenz, durch Austausch der 2-Sulfatgruppe in α-L-Iduronsäure gegen eine 2-O-Methylgruppe aufgebaut werden. Überraschenderweise ist Verbindung **92** das bisher aktivste Pentasaccharid. Da die Entfernung der 2-Sulfatgruppe in Einheit G der natürlichen Verbindung die Anti-Xa-Aktivität um das Fünffache reduziert, kann man davon ausgehen, daß die Methylierung zu anderen günstigeren Wechselwirkungen, z.B. hydrophoben Wechselwirkungen, beiträgt.

Wir stellten^[61] einige an den 2-O- und 3-O-Positionen beider Uronsäureeinheiten (Einheiten E und G) methylierte Analoga her, indem wir einen ähnlichen Syntheseweg wie für das Pentasaccharid **88** einschlugen. Wir vermuteten, daß solche Analoga zumindest die Hälfte ihrer biologischen Aktivität einbüßen sollten, wie das für Verbindungen aus der Reihe der Heparin-ähnlichen Fragmente beobachtet wurde, die keine 2-Sulfatgruppe im Iduronsäurerest tragen. Allerdings zeigten die methylierten Analoga ganz unerwartet eine hohe biologische Aktivität.

Analogon **92** mit einer 2,3,4-tri-O-methylierten D-Einheit ist mit einer anti-Faktor-Xa-Aktivität von 1611 U mg⁻¹ das aktivste bekannte Pentasaccharid, und dies ungeachtet der Tatsache, daß im Vergleich zum natürlichen Produkt zwei Sulfatgruppen (in den 2-Positionen der Einheiten D und G) fehlen.

Möglicherweise wechselwirken die Methylgruppen in diesen Positionen sogar besser mit AT III als die korrespondierenden Sulfatgruppen. Dies würde bedeuten, daß der Verlust elektrostatischer Wechselwirkungen durch energetisch günstige hydrophobe oder van-der-Waals-Wechselwirkungen kompensiert werden kann. Eine niedrigere Freie Dehydratisierungsenergie der permethylierten Analoga im Vergleich zu nicht-alkylierten Derivaten oder die Annahme einer Erniedrigung der Dielektrizitätskonstante in der Pentasaccharid-Bindungsregion von AT III können als alternative Erklärungen für dieses Phänomen herangezogen werden.

7. Die Rolle des Pentasaccharids bei der Antithrombin-Aktivierung

7.1. Kinetische Daten und Bindungskonstanten

Wie bereits in Abschnitt 1 erwähnt, beschleunigen das charakteristische Heparin-Pentasaccharid sowie größere Heparinfragmente, die diese Sequenz enthalten, Reaktionen von AT III mit einigen Serin-Proteasen, z.B. mit dem Blutgerinnungsfaktor Xa. Zur Desaktivierung anderer Serin-Proteasen wie Thrombin ist die Anwesenheit des Pentasaccharids zwar erforderlich, zusätzlich sollte jedoch die Heparinkette eine Länge von mindestens 18 Zuckerbausteinen haben^[62]. Dieses Phänomen wurde durch eine Reak-

tion erklärt, die sich aus zwei unterschiedlichen Einzelmechanismen zusammensetzt: Ein Konformationswechsel von AT III (der durch das charakteristische Pentasaccharid hervorgerufen wird; siehe Abb. 2 b und 34) sowie eine Verbrückung, bei der AT III und Thrombin an dieselbe Heparinkette binden müssen (Abb. 33; es wird eine längere Heparinkette als Brücke benötigt)^[62, 63].

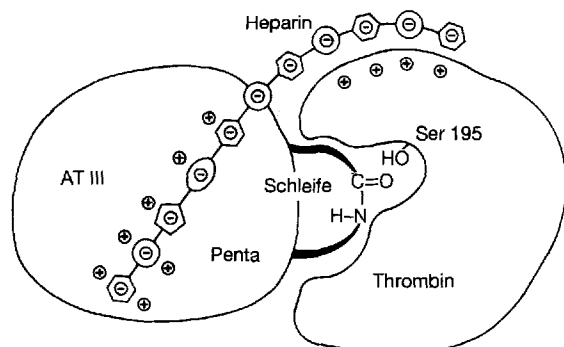


Abb. 33. Um die AT-III-vermittelte Desaktivierung von Thrombin zu beschleunigen, muß nicht nur die charakteristische Pentasacchariddomäne mit AT III wechselwirken, sondern es muß auch die Heparinkette lang genug sein (ca. 18 Zuckerbausteine), um eine Brücke zwischen AT III und Thrombin bilden zu können.

Mehrere kinetische Studien enthüllten den Wirkungsmechanismus von Heparin^[62–64]. Die Rolle des Pentasaccharids bei der AT-III-vermittelten Desaktivierung des Faktors Xa ist in Abbildung 34 im Detail gezeigt. Demnach reagiert das Pentasaccharid in zwei Stufen: Zuerst bindet es unter rascher Gleichgewichtseinstellung an AT III (Bildung des schwachen Komplexes B), daran schließt sich ein Konformationswechsel des Proteins an, der die aktive Form von AT III induziert (C)^[64]. Während dieses Konformationswechsels verstärkt sich die Wechselwirkung des Pentasaccharids mit AT III. Die aktivierte Form von AT III reagiert mit Faktor Xa zum stabilen AT-III/Xa-Komplex (D), während das Pentasaccharid – der Katalysator dieser Reaktion – wieder freigesetzt wird.

Als Dissoziationskonstante K_D des AT-III/Pentasaccharid-Komplexes (C) wurden Werte von 36 nM bis 300 nM bestimmt. Offensichtlich hängen die ermittelten Daten von den Bedingungen, beispielsweise dem pH-Wert, und dem verwendeten AT-III-Typ ab. Ähnliche Untersuchungen wurden auch mit verschiedenen Pentasaccharid-Analoga durchgeführt, und deren Resultate tragen wesentlich zum Verständnis der AT-III-Aktivierung bei. Atha et al. berichteten^[35b] beispielsweise, daß Tetrasaccharide bestehend aus dem DEFG- oder dem EFGH-Teil des Pentasaccharids eine im Vergleich zum Pentasaccharid 100fach bzw. 1000fach geringere Aktivität gegenüber AT III aufweisen. Das Ergebnis für das zuletzt erwähnte Tetrasaccharid stimmt mit dem Befund überein, daß die 6-Sulfatgruppe in Einheit D absolut notwendig ist. Das in 3-Position nicht-sulfatierte Pentasaccharid **45** bindet AT III ebenfalls sehr schwach ($K_D = 5 \times 10^5$ nM) und ist nicht dazu in der Lage, einen Konformationswechsel im AT III auszulösen.

Visser et al. untersuchten^[65] den Einfluß der Sulfatgruppen in Einheit H (Abb. 35a). Die Einführung einer zusätzlichen 3-Sulfatgruppe (aktives Analogon **57**) führt zu einer

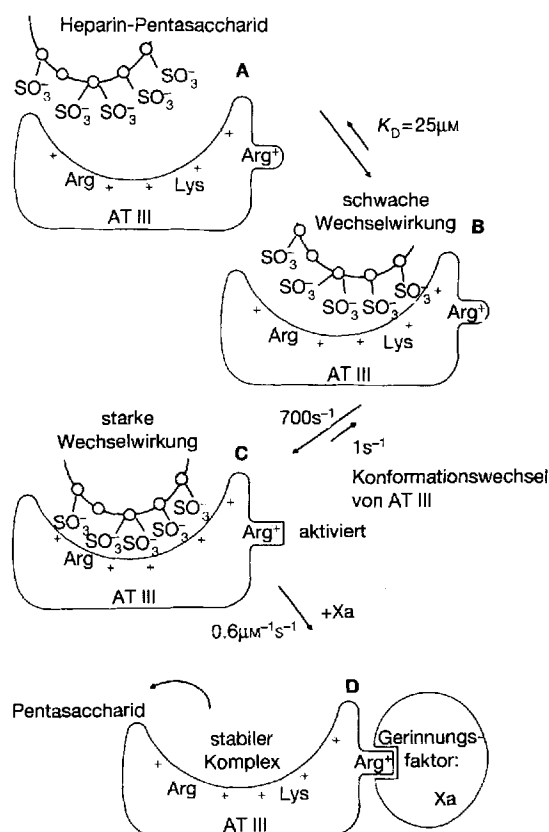


Abb. 34. Aus kinetischen Studien abgeleiteter Wirkmechanismus des Pentasaccharids. Zuerst bindet das Pentasaccharid (Umwandlung von A in B), wobei sich ein schnelles Gleichgewicht einstellt. Ein Konformationswechsel des schwachen Komplexes B führt zur Bildung des aktivierten Pentasaccharid/AT-III-Komplexes C. Der aktive Komplex C kann nun mit Faktor Xa in Wechselwirkung treten und den stabilen Komplex D bilden; während der Bildung von D findet ein weiterer Konformationswechsel statt, der unter anderem auch die Freisetzung des Pentasaccharids bewirkt. Wenn wir Bindungs(Dissoziations)konstanten der verschiedenen AT-III/Pentasaccharid-Komplexe diskutieren, so beziehen diese sich auf die Bildung von Komplex C. Die anti-Faktor-Xa-Aktivitäten werden über kompetitive Bindungen des Komplexes C und eines chromogenen Substrates (S2222) an Xa bestimmt.

ungefähr 15fachen Erhöhung der Bindungsaffinität gegenüber AT III, während die Entfernung der 6-Sulfatgruppe aus Einheit H (Verbindung **93**) eine vier- bis fünffache Erniedrigung der Affinität zur Folge hat.

Es konnte zudem gezeigt werden, daß die Verringerung der anti-Faktor-Xa-Aktivität des zusätzlich in E sulfatierten Derivates **58** mit einer höheren Dissoziationskonstante des Pentasaccharid-AT-III-Komplexes korrespondiert.

In Abbildung 35 b und 35 c sind die hochwirksamen alkylierten Analoga **83**, **87**, **92**, **94** gezeigt, bei denen nicht nur die anti-Faktor-Xa-Aktivität erhöht ist, sondern auch die Affinität für AT III. Auch mehrere Nicht-Glycosaminoglycane mit lipophilen, aliphatischen und aromatischen Gruppen (Abb. 35 d) wurden synthetisiert. Die meisten dieser Derivate zeigen eine starke Bindung an AT III (K_D bis zu 1,6 nM, Verbindung **95**), jedoch nur eine relativ geringe anti-Faktor-Xa-Aktivität ($< 1000 \alpha Xa \text{ U mg}^{-1}$, Verbindung **95**). Zudem binden die zuletzt genannten alkylierten Analoga auch an andere Plasmaproteine. Diese Ergebnisse lassen sich damit erklären, daß die Derivate amphiphil sind und sich deshalb unspezifisch an positiv geladene Domänen anderer Proteine anlagern^[59].

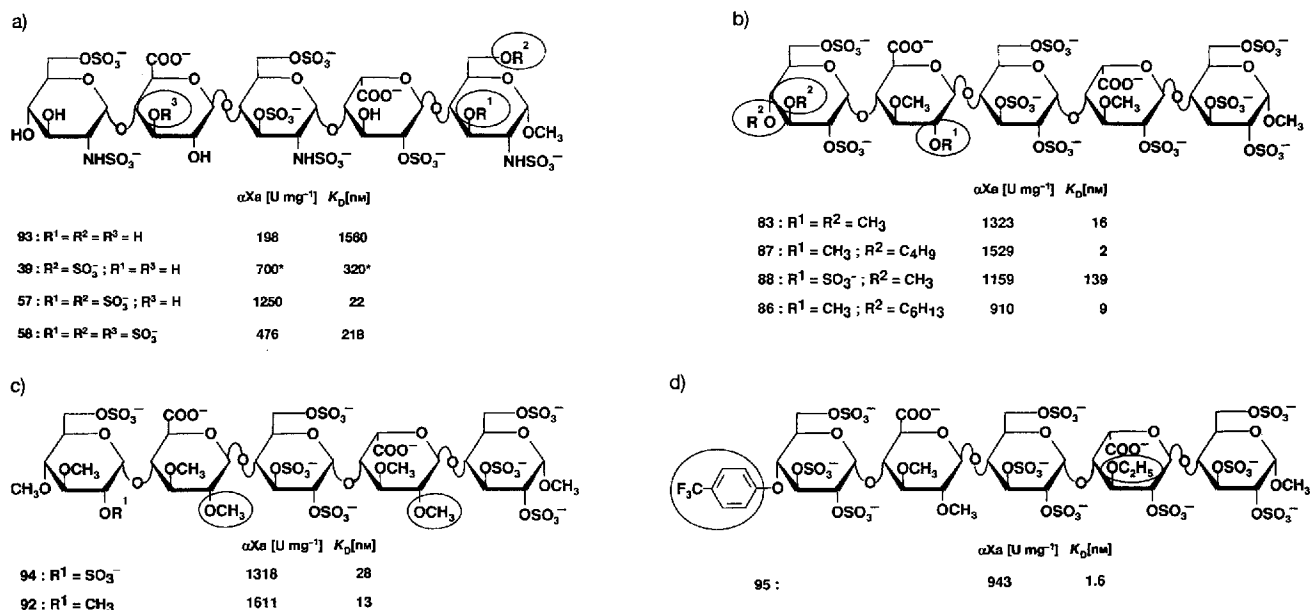


Abb. 35. Synthetische Pentasaccharide und ihre anti-Faktor-Xa-Aktivitäten sowie Dissoziationskonstanten des AT-III/Pentasaccharid-Komplexes. Diskussion siehe Text.

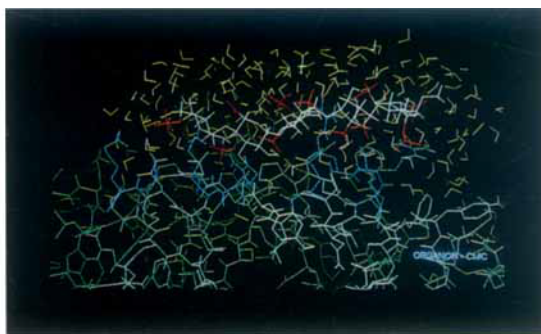
7.2. Ein Modell des Antithrombin-Pentasaccharid-Komplexes

Mit dem Bau eines dreidimensionalen molekularen Modells des Komplexes konnten detailliertere Informationen

über die Wechselwirkung des Pentasaccharids mit AT III^[66] erhalten werden. Zuerst wurde ein molekulares Modell von AT III auf der Grundlage der Kristallstruktur von gespaltenem α_1 -Antitrypsin (einem Mitglied der Serpin-Superfamilie, der auch AT III angehört) mit Standard-Homologie-



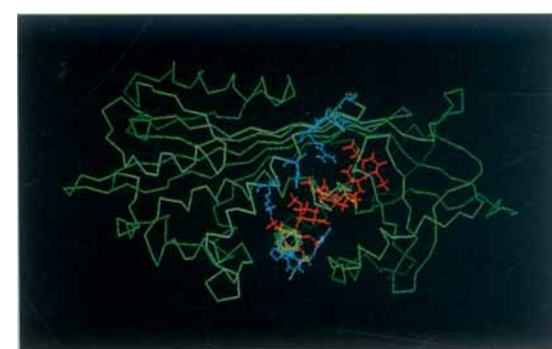
a



c



b



d

tasaccharid als auch Protein ein unsymmetrisches Netzwerk von Kontaktpunkten bilden, konnte deren Orientierung zueinander zweifelsfrei bestimmt werden. c) Ausschnitt aus dem AT-III/Pentasaccharid-57-Komplex nach Hydratisierung und Optimierung mit Moleküldynamik-Simulation. d) Modell des AT-III/Pentasaccharid-57-Komplexes nach einer Moleküldynamik-Simulation von 30 ps Dauer. Der Übersichtlichkeit halber sind die Wassermoleküle nicht gezeigt (Pentasaccharid rot; essentielle Aminosäureseitenketten blau). In Abbildung 37 ist dieser Komplex schematisch dargestellt.

Abb. 36. a) Kalottenmodell des aktiven, super-sulfatierten Pentasaccharids 57. Die essentiellen Sulfat- und Carboxylatgruppen sind rot dargestellt. Man beachte die unsymmetrische Verteilung negativ geladener Gruppen. b) Ein Ausschnitt aus dem AT-III-Modell (α -Kohlenstoff-Rückgrat grün), der die Heparin-Bindungsregion (Heparin-bindende Aminosäuren blau) mit gebundenem Pentasaccharid (weiß; essentielle geladene Gruppen rot) zeigt. Da sowohl Pentasaccharid (weiß; essentielle geladene Gruppen rot) zeigt. Da sowohl Pentasaccharid (weiß; essentielle geladene Gruppen rot) zeigt. Da sowohl Pentasaccharid (weiß; essentielle geladene Gruppen rot) zeigt.

Modeling-Techniken unter Zugrundelegung bekannter Strukturdaten konstruiert. Dabei wurde den positiv geladenen Aminosäureresten von AT III, die für die Wechselwirkung als wesentlich erkannt worden waren (Lys125, Arg129, Arg132, Lys133, Lys136, Arg46, Arg47), besonderes Augenmerk gewidmet. Da diese Aminosäuren ein asymmetrisches Ensemble von komplementären Ankerpunkten für die Wechselwirkung mit den essentiellen geladenen Gruppen des Pentasaccharids aufspannen (Abb. 36a und 36b), konnte die relative Orientierung von AT III und Pentasaccharid zueinander in Docking-Experimenten zweifelsfrei festgelegt werden. Mit Moleküldynamik-Rechnungen unter Berücksichtigung von Wassermolekülen als Lösungsumgebung konnte das Modell optimiert werden (Abb. 36c und 36d). Die entscheidenden AT-III-Pentasaccharid-Wechselwirkungen sind schematisch in Abbildung 37 dargestellt. In anderen

zugänglich, je nachdem, ob sie sich teilweise zwischen die Stränge S3 und S5 des Faltblattes „A“ im Protein schiebt^[71]. Die Kristallstrukturanalyse des AT-III/Pentasaccharid-Komplexes sollte nicht nur diese Frage klären, sondern darüber hinaus auch neue Erkenntnisse über die Art der AT-III-Aktivierung durch Heparin liefern.

8. Zusammenfassung

Mittlerweile gilt als sicher, daß das Anticoagulans Heparin mit verschiedenen Proteinen entweder kooperative oder spezifische Bindungen oder beide Arten von Wechselwirkungen eingehen kann. Es wurden zahlreiche Beispiele^[2, 71a] für Heparin/Protein-Wechselwirkungen beschrieben, in denen kooperative Wechselwirkungen zu dominieren scheinen; je länger das Polysaccharid und je höher die Ladungsdichte, desto höher ist die Affinität, da sich mehr positiv geladene Bereiche entlang der Heparinkette anpassen können. Daß auch hochspezifische Wechselwirkungen auftreten können, wurde zu dem Zeitpunkt klar, als die heterogene Pentasacchariddomäne im Heparin entdeckt wurde, die die Wechselwirkung von AT III mit dem Blutgerinnungsfaktor Xa (siehe vorhergehende Abschnitte) beschleunigt. In der Tat können andere Polyanionen dieses Pentasaccharid bei der Bindung und Aktivierung von AT III nicht ersetzen. Unserer Meinung nach ist der Befund, daß eine einzige charakteristische Domäne eines Glycosaminoglycans (das Heparin-Pentasaccharid) im direkten Zusammenhang mit einer spezifischen biologischen Aktivität steht, ein echter Durchbruch in einem noch kaum erforschten Gebiet der Molekularbiologie. Leider sind bis heute nur einige wenige Beispiele für spezifische Struktureinheiten in Glycosaminoglycanen bekannt^[72]. Das charakteristische Pentasaccharid ist die Minimalsequenz für die AT-III-vermittelte Desaktivierung des Faktors Xa, bei der Desaktivierung von Thrombin (IIa) durch dasselbe Serpin sollte die Heparinkette allerdings viel länger sein (mindestens 18 Kohlenhydrateinheiten). Für diesen Fall gibt es recht gute Hinweise darauf, daß die Heparinkette mit AT III spezifisch und stark, mit Thrombin jedoch nur schwach und weniger spezifisch wechselwirkt^[63b].

Basierend auf einem Ensemble von ca. 50 synthetischen Analoga des charakteristischen Pentasaccharids konnten viele neue Erkenntnisse über die Heparin-vermittelte AT-III-Aktivierung gewonnen werden. Die verschiedenen Aspekte dieser Wechselwirkung und der Aktivierung lassen sich wie folgt zusammenfassen:

- 1) Die heterogene Pentasacchariddomäne von Heparin ist bis heute das einzige bekannte Polyanion, das in der Lage ist, den Konformationswechsel von AT III auszulösen.
- 2) Das Pentasaccharid hat zwei essentielle Sulfat-, zwei essentielle N-Sulfat- und zwei essentielle Carboxylatgruppen. Die Entfernung einer dieser essentiellen Sulfat- oder Carboxylatgruppen führt zu einer nahezu vollständigen Aktivitätseinbuße, während zwei bis drei weitere Sulfatgruppen im Molekül die Aktivität zu erhöhen scheinen.
- 3) Die biologische Aktivität wird durch Sulfatierung der 3-Hydroxygruppe der reduzierenden terminalen Einheit (H) verbessert, während die Sulfatierung anderer Hydroxygruppen zu Aktivitätseinbußen führt. Das „persulfatierte“ Pentasaccharid zeigt keine signifikante Aktivität.

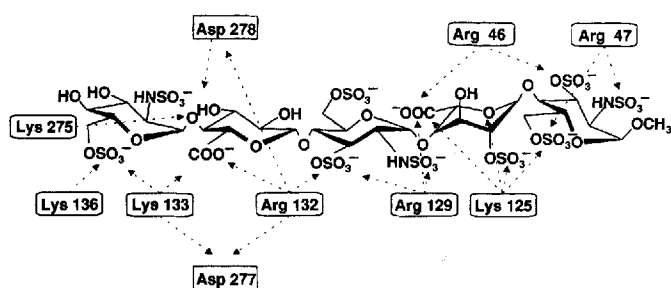


Abb. 37. Schematische Darstellung des Netzwerkes von Wasserstoffbrückenbindungen in einem energieminierten Modell des AT-III/Pentasaccharid-57-Komplexes.

Arbeiten, die sich auf Kristallstrukturen von gespaltenem α -Antithrombin^[67], gespaltenem AT III^[68] oder Ovalbumin^[69] stützen, wird ebenfalls die Heparin-Bindungsregion angegeben, jedoch werden weder die Orientierung des Pentasaccharids in der Bindungsregion noch mögliche Wechselwirkungen zwischen komplementären Gruppen diskutiert. Wir haben kürzlich eine ähnliche Studie^[70], basierend auf der Kristallstruktur von intaktem AT III durchgeführt. Zwar sind sich die beiden Wechselwirkungsschemata sehr ähnlich, doch unterscheiden sich einige Bindungscharakteristika signifikant. Es ist bemerkenswert, daß in der Kristallstruktur von AT III Lys125 und Arg129 auf einer Seite einer α -Helix lokalisiert sind, die als Helix D bezeichnet wird, während die Region Arg132, Lys133, Lys136 eine ungeordnete (coil-like) Konformation einnimmt. Während der Moleküldynamik-Simulation mit Pentasaccharid zeigt Helix D die Tendenz, sich zu strecken. Dieser Konformationswechsel verbessert die Zugänglichkeit der basischen Seitenketten, wodurch diese attraktive Wechselwirkungen mit den essentiellen geladenen Gruppen des Heparins eingehen können.

Es sei auch daran erinnert, daß eine Vielzahl experimenteller Befunde darauf hinweist, daß Heparin α -helicale Konformationen dadurch stabilisiert, daß es ungünstige elektrostatische Wechselwirkungen zwischen Lys- und/oder Arg-Seitenketten verringert^[71]. Dies legt nahe, daß die durch das Pentasaccharid induzierte Streckung der Helix D den bekannten Konformationswechsel von AT III auslöst. Davon abgesehen ist klar, daß die gesamte Konformationsänderung von AT III viel komplexer ist, denn die Schleife von AT III, die an die Protease bindet, ist mal mehr, mal weniger frei

- 4) Die räumliche Ausrichtung der geladenen Gruppen mit Schlüsselfunktion ist entscheidend, da Epimere geringere Aktivität zeigen.
- 5) Der Ladungstyp ist wesentlich. So kann eine essentielle Sulfatgruppe nicht durch eine Phosphatgruppe ersetzt werden, ebenso wenig lassen sich die Carboxylatgruppen der Uronsäureeinheiten gegen $\text{CH}_2\text{OSO}_3^-$ -Reste austauschen. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, daß die essentiellen geladenen Gruppen von Heparin über definierte Wasserstoffbrückenbindungen mit komplementären Bereichen in AT III wechselwirken.
- 6) Einige Kohlenhydratbausteine wie Glucuronsäure (Einheit E) müssen starr sein, während andere wie Iduronsäure (Einheit G) flexibel sein dürfen, manche sogar flexibel sein müssen.
- 7) AT III richtet auch einige negativ geladene Aminosäureseitenketten in die Heparin-Bindungsregion, die möglicherweise geladene Reste anderer Polyanionen abstoßen und damit die Selektivität erhöhen.
- 8) Die Hydroxygruppen des Pentasaccharids fungieren bei der Wechselwirkung nicht als Wasserstoffbrückendonoren, da eine Methylierung dieser Hydroxygruppen die Aktivität nicht mindert. Genauso wenig sind die Wasserstoffatome der sulfatierten Aminogruppen wichtige Wasserstoffbrückendonoren, da N-Sulfat durch Sulfat ersetzt werden kann.
- 9) Hydrophobe Wechselwirkungen können die Bindung verstärken und die spezifische Aktivität erhöhen. Im bisher aktivsten Derivat (Verbindung 92 in Abb. 32) wurden zwei als bindend identifizierte Sulfatgruppen durch Methoxygruppen ersetzt. Die Anwesenheit raumerfüllender hydrophober Substituenten wirkt sich jedoch negativ auf die AT-III-Aktivierung aus, und amphiphile Derivate tendieren dazu, unspezifisch an andere Proteine zu binden.

9. Ausblick

Immer deutlicher wird die wichtige biologische Funktion von Glycosaminoglycanen bei der Kontrolle biologischer Schlüsselprozesse wie Zellwachstum, Zellwanderung, Zelldifferenzierung und Zelladhäsion. Lange Zeit verliefen Untersuchungen dieser Phänomene auf molekularem Niveau enttäuschend, da keine geeigneten physikalisch-chemischen Methoden zur Verfügung standen. Deshalb ist es bis heute nicht klar, wie viele solcher biologischer Funktionen mit relativ kurzen, wohldefinierten Domänen von komplexen hochmolekularen Glycosaminoglycanen assoziiert sind. Wir meinen, daß das Beispiel von Heparin, in dem die bekannten antithrombotischen Eigenschaften an eine charakteristische Teilstruktur geknüpft sind, die Strukturaufklärung anderer wichtiger Domänen aus Glycosaminoglycanen stimulieren sollte. Zu guter Letzt sollte die Anwendung der in diesem Aufsatz diskutierten chemischen Methoden Möglichkeiten zur Entwicklung neuer Wirkstoffe eröffnen.

Wir danken Sjoerd van Aelst, Jan Basten, T. Bärzu, Tom Beetz, Rein van de Bosch, Jean Choay, Marcel Derrien, Theo van Dinther, Philippe Duchaussoy, Peter Grootenhuis, Françoise Gourvenec, Henk van der Heijden, Guy Jaurand, Isidore Lederman, Jean-Claude Lormeau, Hans Lucas, Jan-

Remt Mellema, Dick Meuleman, Bertus Olde Hanter, Anita Rood, Pierre Sinay, Jean-Marc Strassel, Arie Visser, Jan Vos und Pieter Westerduin für ihre Mitarbeit an den in diesem Aufsatz beschriebenen Projekten. Weiterer Dank gilt Janine Spit für die Anfertigung der Abbildungen. Ein Teil der Forschungen wurde von der Europäischen Gemeinschaft im Rahmen des Eurêka Programmes (Projekt EU237) gefördert.

Eingegangen am 26. Januar 1993 [A 925]
Übersetzt von Dr. Marion Gurrath, Padua

- [1] D. A. Lane, I. Björk, U. Lindahl, *Adv. Exp. Med. Biol.* **1992**, 313, 1–364.
- [2] F. A. Ofofu, I. Danishefsky, J. Hirsch, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1989**, 556, 1–499.
- [3] *Heparin* (Hrsg.: D. A. Lane, U. Lindahl), Edward Arnold, London, **1989**.
- [4] B. Casu, *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* **1985**, 43, 51–134.
- [5] R. D. Rosenberg, P. S. Damus, *J. Biol. Chem.* **1973**, 248, 6490–6505.
- [6] I. Björk, S. T. Olson, J. D. Shore, in Lit. [3] S. 229–255.
- [7] a) J. C. Lormeau, J. Goulay, J. Choay (Inst. Choay) FR-B 7831357; b) J. Choay, J. C. Lormeau, M. Petitou, P. Sinay, B. Casu, P. Oreste, G. Torri, G. Gatti, *Thromb. Res.* **1980**, 18, 573–578.
- [8] L. O. Andersson, T. W. Barrowcliffe, E. Holmer, E. A. Johnson, G. E. C. Sims, *Thromb. Res.* **1976**, 9, 575–583.
- [9] M. Höök, I. Björk, J. Hopwood, U. Lindahl, *FEBS Lett.* **1976**, 66, 90–93.
- [10] L. H. Lam, J. E. Silbert, R. D. Rosenberg, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1976**, 69, 570–577.
- [11] V. V. Kakkar, B. Djazaeri, J. Fok, M. Fletcher, M. F. Scully, J. Westwick, *Br. Med. J.* **1982**, 284, 375–379.
- [12] M. Verstraete, *Drugs* **1990**, 40, 498–530.
- [13] a) J. Choay, J. C. Lormeau, M. Petitou, *Ann. Pharm. Fr.* **1981**, 39, 37–44; b) J. Choay, J. C. Lormeau, M. Petitou, P. Sinay, J. Fareed, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1981**, 370, 644–649; c) B. Casu, P. Oreste, G. Torri, G. Zoppetti, J. Choay, J. C. Lormeau, M. Petitou, P. Sinay, *Biochem. J.* **1981**, 197, 599–609.
- [14] a) U. Lindahl, G. Bäckström, L. Thunberg, I. G. Leder, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1980**, 77, 6551–6555; b) L. Thunberg, G. Bäckström, U. Lindahl, *Carbohydr. Res.* **1982**, 100, 393–410.
- [15] a) J. A. Marcum, R. D. Rosenberg in Lit. [3], S. 275–294; b) G. Mertens, J. J. Cassiman, H. van den Bergh, J. Vermeylen, G. David, *J. Biol. Chem.* **1992**, 267, 20435–20443.
- [16] H. Paulsen, *Angew. Chem.* **1982**, 94, 184–201; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1982**, 21, 155–173.
- [17] a) P. Sinay, J. C. Jacquinet, M. Petitou, P. Duchaussoy, I. Lederman, J. Choay, G. Torri, *Carbohydr. Res.* **1984**, 132, C5–C9; b) M. Petitou, P. Duchaussoy, I. Lederman, J. Choay, P. Sinay, J. C. Jacquinet, G. Torri, *ibid.* **1986**, 147, 221–236.
- [18] C. A. A. van Boeckel, T. Beetz, J. N. Vos, A. J. M. de Jong, S. F. van Aelst, R. H. van den Bosch, J. M. R. Mertens, F. A. van der Vlugt, *J. Carbohydr. Chem.* **1985**, 4, 293–321.
- [19] Y. Ichikawa, R. Monden, H. Kuzuhara, *Tetrahedron Lett.* **1986**, 27, 611–614.
- [20] J. N. Glushka, A. S. Perlin, *Carbohydr. Res.* **1990**, 205, 305–321.
- [21] M. Petitou, P. Duchaussoy, I. Lederman, J. Choay, J. C. Jacquinet, P. Sinay, G. Torri, *Carbohydr. Res.* **1987**, 167, 67–75.
- [22] M. Petitou, G. Jaurand, M. Derrien, J. Choay, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1991**, 1, 95–98.
- [23] a) M. K. Anwer, A. F. Spatola, *Synthesis* **1980**, 929–932; b) M. K. Anwer, A. F. Spatola, *Tetrahedron Lett.* **1981**, 22, 4369–4372.
- [24] P. Duchaussoy, P. S. Lei, M. Petitou, P. Sinay, J. C. Lormeau, J. Choay, *BioMed. Chem. Lett.* **1991**, 1, 99–102.
- [25] M. Petitou, P. Duchaussoy, I. Lederman, J. Choay, P. Sinay, *Carbohydr. Res.* **1988**, 179, 163–172.
- [26] G. Torri, B. Casu, G. Gatti, M. Petitou, J. Choay, J. C. Jacquinet, P. Sinay, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1985**, 128, 134–140.
- [27] D. R. Ferro, A. Provasoli, M. Ragazzi, B. Casu, G. Torri, V. Bossennec, B. Perly, P. Sinay, M. Petitou, J. Choay, *Carbohydr. Res.* **1990**, 195, 157–167.
- [28] C. A. A. van Boeckel, T. Beetz, S. F. van Aelst, *Tetrahedron Lett.* **1988**, 29, 803–806.
- [29] C. A. A. van Boeckel, S. F. van Aelst, G. N. Wagenaar, J.-R. Mellema, H. Paulsen, T. Peters, A. Pollex, V. Sinnwell, *Recl. Trav. Chim. Pays-Bas* **1987**, 106, 19–29.
- [30] D. R. Ferro, A. Provasoli, M. Ragazzi, G. Torri, B. Casu, G. Gatti, J. C. Jacquinet, P. Sinay, M. Petitou, J. Choay, *J. Am. Chem. Soc.* **1986**, 108, 6773–6778.
- [31] M. Ragazzi, D. R. Ferro, A. Provasoli, *J. Comput. Chem.* **1986**, 7, 105–112.
- [32] M. Ragazzi, D. R. Ferro, B. Perly, P. Sinay, M. Petitou, J. Choay, *Carbohydr. Res.* **1990**, 195, 169–185.
- [33] R. L. Whistler, W. C. Lake, *Methods Carbohydr. Chem.* **1972**, 6, 286–291.
- [34] P. M. Collins, V. R. N. Munasinghe, N. N. Oparaeche, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1*, **1977**, 1, 2433.

- [35] a) U. Lindahl, G. Bäckström, L. Thunberg, *J. Biol. Chem.* **1983**, 2826–2830; b) D. H. Atha, J. C. Lormeau, M. Petitou, R. D. Rosenberg, J. Choay, *Biochemistry* **1985**, 24, 6723–6729.
- [36] a) M. Petitou, P. Duchaussoy, L. Lederman, J. Choay, P. Sinay, *Carbohydr. Res.* **1988**, 179, 163–172; b) M. Petitou, *Nouv. Rev. Fr. Hematol.* **1984**, 26, 221–226.
- [37] a) J. Choay, *Semin. Thromb. Hemostasis* **1985**, 11, 81–85; b) D. H. Atha, J. C. Lormeau, M. Petitou, R. D. Rosenberg, J. Choay, *Biochemistry* **1987**, 26, 6454–6461.
- [38] a) T. Beetz, C. A. A. van Boeckel, *Tetrahedron Lett.* **1986**, 27, 5889–5892; b) M. Petitou, J. C. Lormeau, J. Choay, *Eur. J. Biochem.* **1988**, 88, 637–640.
- [39] J. Riesenfeld, L. Thunberg, M. Höök, U. Lindahl, *J. Biol. Chem.* **1981**, 256, 2389–2394.
- [40] C. A. A. van Boeckel, unveröffentlicht.
- [41] C. A. A. van Boeckel, H. Lucas, S. F. van Aelst, M. W. P. van den Nieuwenhof, G. N. Wagenaars, J.-R. Mellema, *Recl. Trav. Chim. Pays-Bas* **1987**, 106, 581–591.
- [42] M. Petitou, unveröffentlicht.
- [43] C. A. A. van Boeckel, S. F. van Aelst, T. Beetz, D. G. Meuleman, T. G. van Dinther, H. C. T. Moelker, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1989**, 56, 489–491.
- [44] D. G. Meuleman, P. M. J. Hobbelen, T. G. van Dinther, G. M. T. Vogel, C. A. A. van Boeckel, H. C. T. Moelker, *Semin. Thromb. Hemostasis* **1991**, 17, 112–117.
- [45] M. Petitou, G. Jaurand, M. Derrien, P. Duchaussoy, J. Choay, *Abstr. Fifth European Symp. Carbohydr. EuroCarb V*, Prag, **1989**, S. A-68.
- [46] M. W. P. Kat van den Nieuwenhof, J. E. M. Basten, H. Lucas, C. A. A. van Boeckel, *Abstr. Fifth European Symp. Carbohydr., EuroCarb V*, Prag, **1989**, S. A-39.
- [47] J. N. Vos (Organon), unveröffentlicht.
- [48] a) C. A. A. van Boeckel, J. E. M. Basten, H. Lucas, S. F. van Aelst, *Angew. Chem.* **1988**, 100, 1217–1218; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1988**, 27, 1177–1178; b) H. Lucas, J. E. M. Basten, T. G. van Dinther, D. G. Meuleman, S. F. van Aelst, C. A. A. van Boeckel, *Tetrahedron* **1990**, 46, 8207–8228.
- [49] C. A. A. van Boeckel, G. N. Wagenaars, J.-R. Mellema, *Recl. Trav. Chim. Pays-Bas* **1988**, 107, 649–651.
- [50] T. Nukada, H. Lucas, P. Konradsson, C. A. A. van Boeckel, *Synlett* **1991**, 365–367.
- [51] J. E. M. Basten, unveröffentlicht.
- [52] A. S. B. Edge, R. G. Spiro, *J. Biol. Chem.* **1990**, 265, 15784–15881.
- [53] J. N. Vos, P. Westerduin, C. A. A. van Boeckel, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1991**, 1, 143–146.
- [54] a) Z. F. Kanyo, D. W. Christianson, *J. Biol. Chem.* **1991**, 266, 4264–4268; b) H. Luecke, F. A. Quirocho, *Nature* **1990**, 347, 402–406; c) G. R. J. Thatcher, D. R. Cameron, R. Nagelkerke, J. Schmitke, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1992**, 386–388.
- [55] S. F. van Aelst, C. A. A. van Boeckel, *Recl. Trav. Chim. Pays-Bas*, **1987**, 106, 593–595.
- [56] a) P. Duchaussoy, P. S. Lei, M. Petitou, P. Sinay, J. C. Lormeau, J. Choay, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1991**, 1, 1–4; b) M. Petitou, J. C. Lormeau, J. Choay, *Semin. Thromb. Hemostasis* **1991**, 17, 143–146.
- [57] a) G. Jaurand, J. Basten, I. Lederman, C. A. A. van Boeckel, M. Petitou, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1992**, 2, 897–900; b) J. E. M. Basten, G. Jaurand, B. Olde-Hanter, M. Petitou, C. A. A. van Boeckel, *ibid.* **1992**, 2, 901–904.
- [58] J. E. M. Basten, G. Jaurand, B. Olde-Hanter, P. Duchaussoy, M. Petitou, C. A. A. van Boeckel, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1992**, 2, 905–908.
- [59] D. G. Meuleman, unveröffentlicht.
- [60] H. Lucas, J. E. M. Basten, P. Konradsson, C. A. A. van Boeckel, *Angew. Chem.* **1993**, 105, 462–464; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1993**, 32, 434–436.
- [61] P. D. J. Grootenhuys, C. A. A. van Boeckel, A. M. M. Rood, A. Visser, T. G. van Dinther, D. Meuleman in *Trends in QSAR and Molecular Modelling 92* (Hrsg.: C. G. Wermuth) Escom, Leiden, **1993**, S. 169–174.
- [62] a) P. L. Lane, J. Denton, A. Flynn, L. Thunberg, U. Lindahl, *Biochem. J.* **1984**, 218, 732–735; b) S. T. Olson, H. R. Halvorson, I. Björk, *J. Biol. Chem.* **1991**, 266, 6342–6352.
- [63] a) S. T. Olson, I. Björk, *J. Biol. Chem.* **1991**, 266, 6353–6364; b) S. T. Olson, I. Björk, R. Sheffer, P. A. Graig, J. D. Shore, J. Choay, *ibid.* **1992**, 267, 12528–12538.
- [64] P. A. Graig, S. T. Olson, J. D. Shore, *J. Biol. Chem.* **1989**, 264, 5452–5461.
- [65] A. Visser, M. T. Buiting, T. G. van Dinther, C. A. A. van Boeckel, P. D. J. Grootenhuys, D. G. Meuleman, *Thromb. Haemost.* **1991**, 17, 143; *J. Biol. Chem.*, eingereicht. Die Geschwindigkeit der Desaktivierung von Faktor Xa durch AT III wurde für eine Reihe von Pentasaccharid-Konzentrationen bei 37 °C und einem pH-Wert von 8.4 unter Verwendung des chromogenen Substrates S2765 bestimmt. Die Dissoziationskonstante K_D läßt sich aus der Geschwindigkeitskonstanten der Desaktivierung von Faktor Xa berechnen, die nach einem Geschwindigkeitsgesetz zweiter Ordnung verläuft. In einem Fluoreszenz-Assay (T. Bárzu, (Sanofi), nicht veröffentlicht) dagegen wurden bei pH 7.4 niedrigere Dissoziationskonstanten ermittelt (K_D (57) = 1.3 nM anstelle von 22 nM; K_D (39) = 50 nM anstelle von 320 nM). Die Unterschiede der K_D -Werte können mit den unterschiedlichen pH-Werten erklärt werden, bei denen die beiden Assays durchgeführt wurden.
- [66] a) P. D. J. Grootenhuys, C. A. A. van Boeckel, *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, 113, 2743–2747; b) C. A. A. van Boeckel, P. D. J. Grootenhuys, C. A. G. Haasnoot, *Trends Pharmacol. Sci.* **1991**, 12, 241–243.
- [67] R. Huber, R. W. Carrell, *Biochemistry*, **1989**, 28, 8951–8966.
- [68] L. Mourey, J. P. Samama, M. Delarue, J. Choay, J. C. Lormeau, M. Petitou, D. Moras, *Biochimie*, **1990**, 72, 599–608.
- [69] R. W. Carrell, D. L. I. Evans, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **1992**, 2, 438–446.
- [70] a) H. Schreuder, unveröffentlicht; b) P. D. J. Grootenhuys, unveröffentlicht.
- [71] a) R. L. Jackson, S. J. Busch, A. D. Cardin, *Physiol. Rev.* **1991**, 71, 481–539; b) D. S. Ferran, M. Sobel, R. B. Harris, *Biochemistry* **1992**, 31, 5010–5016.
- [72] Beispiel für eine charakteristische Heparansulfat-Domäne, die an der Bindung von Fibroblast-Wachstumsfaktoren beteiligt ist: J. T. Gallagher, J. E. Turnbull, *Glycobiology* **1992**, 2, 523–528. Zur Teilstruktur von Dermatan-sulfat, die für die Bindung an den Serpin-Heparin-Cofaktor II (HC II) verantwortlich ist, siehe M. M. Maimone, D. M. Tollefsen, *J. Biol. Chem.* **1990**, 265, 18263–18271.