

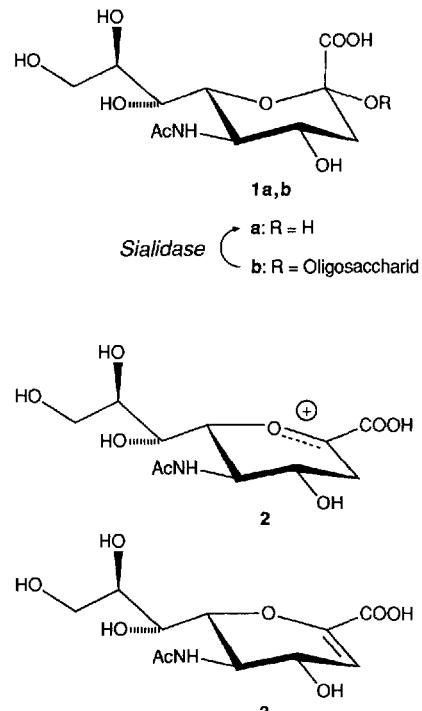
Bei Grippe? ... ein Designerwirkstoff auf Zuckerbasis

Von Carlo Unverzagt*

Wenn wir eine Grippeinfektion haben, bleibt uns neben dem dauernden Griff zum Taschentuch oft nur die Hoffnung, daß die Krankheit innerhalb der nächsten Wochen vorbei sein wird. Danach sind wir meist eine geraume Zeit gegen Neuerkrankung geschützt, dennoch ist die Chance groß, öfter im Jahr angesteckt zu werden. Auch mit Grippe-schutzimpfung können wir jederzeit wieder erkranken. Die echte Grippe, die durch Influenzaviren hervorgerufen wird, ist besonders gefährlich für ältere Menschen und Menschen mit Atemwegserkrankungen. Eine Gruppe australischer Forseher hat diese Problematik aufgegriffen und einen synthetischen Anti-Influenzawirkstoff auf der Basis von *N*-Acetylneuraminsäure **1a** entwickelt^[1], der von Glaxo als Nasenspray gegen Influenza geprüft wird. Besonders hilfreich beim Design der Verbindung waren Daten aus der Röntgenstrukturanalyse eines Komplexes aus Influenza-Sialidase und einem Inhibitor.

Warum bietet unser Immunsystem keinen dauerhaften Schutz gegen eine Influenza-Infektion? Das Virus ist in der Lage, seine Oberflächenantigene rasch zu verändern, so daß es die körpereigene Abwehr, die z.B. noch keine Antikörper gegen die neuen Virusformen besitzt, überlisten kann. Influenza befällt auch Tiere und wahrscheinlich führt die Infektion eines Organismus mit zwei verschiedenen Influenzaviren zum Auftreten neuer hoch pathogener Stämme, die dann große Pandemien auslösen können^[2]. Trotz dieses Variationsreichtums der beiden Influenza-Oberflächenantigene Hämagglutinin und Sialidase (Neuraminidase) bleiben ihre Funktionen erhalten. Beide Proteine binden an den Zucker *N*-Acetylneuraminsäure (Neu5Ac) **1a** (Schema 1) aus der Familie der Sialinsäuren. Die Sialinsäuren sind ein wichtiger Bestandteil der Zelloberfläche und befinden sich dort meist an den besonders exponierten Enden der Kohlenhydratketten von Glycoproteinen und Glycolipiden. Über die Erkennung von **1a** durch das Hämagglutinin wird das Influenzavirus zunächst an der Oberfläche der Epithelzellen im Atemwegsbereich festgehalten und kann nachfolgend die Infektion einleiten. Eine dem Hämagglutinin entgegengesetzte Wirkung hat die Sialidase, ein Enzym, das die glycosidische Bindung der *N*-Acetylneuraminsäure spaltet und damit wahrscheinlich für die gute Ablösung der neu gebildeten Viruspartikel von den Wirtszellen sorgt. Der auf der Erkennung von terminaler *N*-Acetylneuraminsäure beruhende Infektions- und Vermehrungscyclus des Influenzavirus ist somit ein guter Ansatzpunkt für die Entwicklung eines Medikamentes.

Die geometrischen Parameter von Hämagglutinin und Sialidase sind seit gut einem Jahrzehnt aus einer Röntgenstrukturanalyse bekannt, allerdings waren diese Daten nur sehr unzureichend. Erst in jüngerer Zeit sind Röntgenstrukturanalysen mit guter Auflösung von Komplexen dieser Substanzen mit dem Liganden *N*-Acetylneuraminsäure publi-



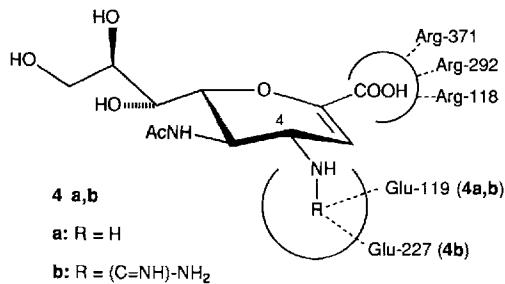
Schema 1.

ziert worden^[3]. Ein seit langem bekannter Inhibitor für Influenza-Sialidase ist 2-Desoxy-2,3-dehydro-*N*-acetylneuraminsäure (Neu5Ac2en) **3**^[4], die als Analogon des Neu5Ac-Kations **2** angesehen werden kann. Ein solches Kation wird für die Sialidasereaktion beim Übergang von der glycosidisch gebundenen (**1b**) zur freien *N*-Acetylneuraminsäure **1a** postuliert^[5]. Die Sialidase bindet den Inhibitor **3** besser ($K_i \approx 1 \times 10^{-6}$ M) als das natürliche Substrat *N*-Acetylneuraminsäure **1a** ($K_i = 6.9 \times 10^{-4}$ M). Die Inhibition durch **3** ist kompetitiv, und **3** wird durch die Sialidase sehr langsam zu **1a** hydratisiert^[6], was eine Bindung des Inhibitors als Übergangszustandsanalogon untermauert. Ausgehend von **3** als Leitstruktur konnten von Itzstein et al. nun einen wesentlich verbesserten Inhibitor entwerfen^[1]. Sie stützten sich dabei auf eine Kristallstrukturanalyse der Influenza-Sialidase mit **3** in der Bindungstasche^[3a]. Mit Hilfe eines Computerprogrammes suchten sie innerhalb der Bindungstasche die Oberfläche des Enzyms nach solchen Stellen ab, an denen der Inhibitor **3** nach dem Austausch funktionaler Gruppen zusätzliche Wechselwirkungen mit dem Protein eingehen kann. Dabei fanden sie eine Nische in der Nähe von OH-4, die von sauren Aminosäuren flankiert ist. Danach sollte eine besonders günstige Wechselwirkung der 4-Aminogruppe in 4-Amino-Neu5Ac2en **4a** mit dem Carboxylatrest von Glu-119 möglich sein. Eine noch stärkere Salzbrücke sollte 4-Guanidino-Neu5Ac2en **4b** aufbauen (Schema 2).

Die Kristallstrukturanalyse von Influenza-Sialidase im Komplex mit den nach der vorhergehenden Analyse synthetisierten Inhibitoren **4a, b** zeigte, daß sich die vorhergesagten ionischen Wechselwirkungen tatsächlich ausbilden kön-

[*] Dr. C. Unverzagt

Organisch-chemisches Institut der Technischen Universität München
Lichtenbergstraße 4, D-85748 Garching
Telefax: Int. + 89/3209-3210



Schema 2.

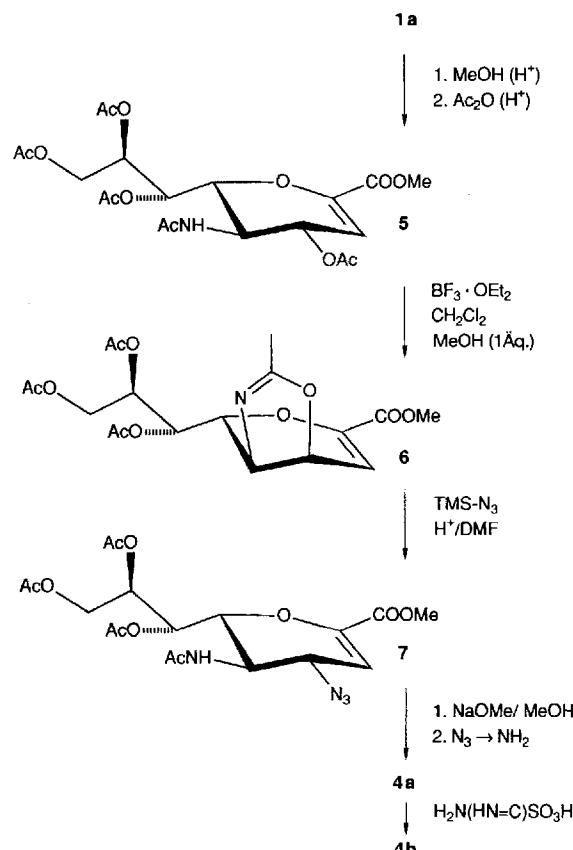
nen. So wird das Molekül am 1-Carboxylatrest durch die basischen Argininreste 118, 292 und 371 fixiert, die 4-Aminogruppe in **4a** baut eine Salzbrücke mit Glu-119 auf, während der 4-Guanidinorest in **4b** von zwei Glutaminsäureeinheiten (119 und 227) gebunden wird. Diese zusätzliche ionische Fixierung der Verbindungen **4a, b** über den Substituenten an C-4 erklärt auch ihre besondere Wirksamkeit als Sialidase-Inhibitoren. So wurde für die Aminoverbindung **4a** eine Inhibition von $K_i = 5 \times 10^{-8}$ M gefunden; bei **4b** mit dem Guanidinosubstituenten sogar $K_i = 2 \times 10^{-10}$ M. Mit **4a** und **4b**, die in vitro in nano- bzw. subnanomolaren Konzentrationen aktiv sind, liegen die bisher wirksamsten Inhibitoren der Influenza-Sialidase vor.

Welche Bedeutung hat die hohe Wirksamkeit der neuen Inhibitoren? Ist es möglich, damit eine Influenza im Organismus zu stoppen? Dazu muß zunächst die Frage der Selektivität geklärt werden. Schließlich sind Sialidasen ubiquitär^[7], und eine Störung z.B. der menschlichen Sialidasen im Rahmen einer Influenzabehandlung könnte zu Komplikationen führen. Die Tests mit menschlicher sowie mit mehreren bakteriellen Sialidasen zeigten jedoch, daß die an C-4 modifizierten Analoga diese Enzyme nur sehr gering hemmen^[8]. Diese hohe Selektivität liegt wahrscheinlich an der besonderen Ausbuchtung innerhalb der Bindungstasche der Influenza-Sialidase, die einen großen Substituenten an C-4 toleriert; bei den anderen untersuchten Sialidasen dagegen gibt es diese Nische offenbar nicht.

Erste Versuche mit Zellkulturen und am Tiermodell (Frettchen) ergaben für **4b** eine weitaus bessere Wirkung als für die bisher einzigen Anti-Influenza-Wirkstoffe Amantadin und Rimantidin, die allerdings einen anderen Wirkmechanismus haben. Die Stammverbindung **3** ist interessanterweise im Tiermodell fast inaktiv, während **4b** die Virusreplikation im Organismus ausgezeichnet hemmt^[11]. Damit konnte erstmals gezeigt werden, daß die effektive und selektive Hemmung der Influenza-Sialidase durch den sehr gut bindenden Inhibitor **4b** den Ausbruch einer Grippe unterdrücken kann.

Bei der hohen Mutationsrate von Influenzaviren könnte es sein, daß der Selektionsdruck durch den Inhibitor **4b** das Auftreten von Varianten fördert, die einen sperrigen Rest an C-4 nicht mehr in der Bindungstasche tolerieren. Dies widerspricht zwar der Beobachtung, daß die Aminosäuren des katalytischen Zentrums und der benachbarten Stützregion der Influenza-Sialidase hochkonserviert sind, prinzipiell ist es jedoch nicht auszuschließen. Unter Bedingungen, bei denen eine rasche Resistenzbildung gegen Amantadin auftritt, konnten mit **4b** jedenfalls keine resistenten Influenzastämme gefunden werden^[11]. Sollten sich die ersten Ergebnisse bestä-

tigen und die Wirksamkeit von **4b** beim Menschen ebenso gut sein wie am Tiermodell, so stellt sich vor dem Bestehen der pharmakologischen und toxikologischen Tests die Frage nach der Verfügbarkeit der Substanz. Die chemische Synthese (Schema 3) geht aus von *N*-Acetylneuraminsäure **1a**^[9], einem teuren Rohprodukt, das aber mittlerweile zum erheblich gesunkenen Preis von ca. 35 000 US \$ kg⁻¹ angeboten wird.



Schema 3. DMF = *N,N*-Dimethylformamid, TMS = Trimethylsilyl.

N-Acetylneuraminsäure **1a** wird durch saure Veresterung mit Methanol und nachfolgende Acetylierung unter sauren Bedingungen in das geschützte Glycal **5** überführt. Anschließend wird der allylständige Acetatrest an C-4 durch den nachbarständigen Acetamidosubstituenten intramolekular substituiert. Als Produkt der mit Bor trifluorid-Ether katalysierten Umsetzung erhält man das reaktive Intermediat **6**^[10] mit einer invertierten Konfiguration an C-4. Der Oxazolinring kann durch die Aktivierung des Allylsystems direkt von Nucleophilen wie Azid geöffnet werden^[10b] und liefert die 4-Azidooverbindung **7**, die wieder die Konfiguration der 2,3-Dehydro-*N*-acetylneuraminsäure aufweist. Sämtliche Reaktionsschritte ausgehend von *N*-Acetylneuraminsäure **1a** laufen in sehr hohen Ausbeuten ab. Anschließend werden die Acetatgruppen sowie der Methylester abgespalten, die Azidogruppe reduziert und das Amin **4a** mit Aminoimino-methansulfonsäure in „annehmbarer“ Ausbeute zur Guanidinoverbindung **4b** umgesetzt^[1, 10c]. Die auf den ersten Blick aufwendige Synthese führt zu einer Verbindung, deren Preis durch das teure Ausgangsmaterial und die Zahl der Reaktionsschritte sicherlich hoch liegen wird, allerdings

ist die Wirtschaftlichkeit in der Hauptsache eine Frage der Einstandskosten für *N*-Acetylneuraminsäure **1a** (siehe oben).

Für die klinischen Versuche und die spätere Zulassung dieses Inhibitors ist es entscheidend, diesen auch „eimerweise“ herstellen zu können^[11]. Da es eine pharmazeutische „Glyco“industrie erst seit kurzem gibt, steht man bei der Bewältigung solcher Probleme noch am Anfang. Andere Projekte für Pharmazeutika auf Kohlenhydratbasis sind ebenfalls vielversprechend und haben Signalwirkung für die chemische Industrie^[11]. Nicht zuletzt wegen der rapide zunehmenden Kenntnisse über die vielfältigen biologischen Funktionen der Kohlenhydrate^[12] scheint der Kohlenhydratchemie, die lange als zu schwierig in der Anwendung galt, endlich die Aufmerksamkeit zuteil zu werden, die sie verdient.

Die Influenza-Sialidase-Inhibitoren **4a, b** sind die Früchte einer über mehr als ein Jahrzehnt andauernden Arbeit. Molecular-Modeling-Studien unter konsequenter Verwendung von Proteinstrukturdaten machten das rationelle Design dieses maßgeschneiderten Inhibitors mit bislang unerreichter Wirksamkeit erst möglich.

- [1] M. von Itzstein, W.-Y. Wu, G. B. Kok, M. S. Pegg, J. C. Dyason, B. Jin, T. V. Phan, M. L. Smythe, H. F. White, S. W. Oliver, P. M. Colman, J. N. Varghese, D. M. Ryan, J. M. Woods, R. C. Bethell, V. J. Hotham, J. M. Cameron, C. R. Penn, *Nature* **1993**, *363*, 418–423.
- [2] C. Scholtissek, *Angew. Chem.* **1986**, *98*, 47–56; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1986**, *25*, 47–56.
- [3] a) J. N. Varghese, J. L. McKimm-Breschkin, J. B. Caldwell, A. A. Kortt, P. M. Colman, *Proteins* **1992**, *14*, 327–332; b) W. P. Burmester, R. W. H. Ruigrok, S. Cusack, *EMBO J.* **1992**, *11*, 49–56; c) W. Weiss, J. H. Brown, S. Cusack, J. C. Paulson, J. J. Skehel, D. C. Wiley, *Nature* **1988**, *333*, 426–431.
- [4] P. Meindl, G. Bodo, P. Palese, J. Schulman, H. Tuppy, *Virology* **1974**, *58*, 457–463.
- [5] A. K. J. Chong, M. S. Pegg, N. R. Taylor, M. von Itzstein, *Eur. J. Biochem.* **1992**, *207*, 335–343.
- [6] M. Flashner, J. Kessler, S. W. Tanenbaum, *Arch. Biochem. Biophys.* **1983**, *221*, 188–196.
- [7] Y. Pilatte, J. Bignon, C. R. Lambré, *Glycobiology* **1993**, *3*, 201–217.
- [8] C. T. Holzer, M. von Itzstein, B. Jin, M. S. Pegg, W. P. Stewart, W.-Y. Wu, *Glycoconjugate J.* **1993**, *10*, 40–44.
- [9] U. Kragl, D. Gygax, O. Ghisalba, C. Wandrey, *Angew. Chem.* **1991**, *103*, 854–855; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1991**, *30*, 827.
- [10] a) E. Schreiner, E. Zbiral, R. G. Kleineidam, R. Schauer, *Liebigs Ann. Chem.* **1991**, *129*–134; b) M. von Itzstein, B. Jin, W.-Y. Wu, M. Chandler, *Carbohydr. Res.* **1993**, *244*, 181–185; c) M. von Itzstein, W.-Y. Wu, T. V. Phan, B. Danylec, B. Jin (Biota Scientific Management Pty. Ltd.), WO-P 91 16 320; *Chem. Abstr.* **1992**, *117*, 49151y.
- [11] S. Borman, *Chem. Eng. News* **1993**, *71*(26), 27–34.
- [12] A. Varki, *Glycobiology* **1993**, *3*, 97–130.

Elektrochemische Herstellung von Zintl-Anionen: Renaissance eines Syntheseweges

Von *Brigitte Eisenmann*

Unter den drei großen Klassen von Verbindungen, den salzartigen, den kovalenten und den metallischen, sind die intermetallischen Verbindungen der Denkweise des Chemikers am wenigsten zugänglich und verschlossen. Dies gilt sowohl für die stöchiometrischen Gesetzmäßigkeiten, die bisher nur für einige Verbindungsgruppen abgeleitet werden konnten, als auch für die Kristallstrukturen, deren Packungen großer, einander durchdringender Koordinationspolyeder die Verteilung der Valenzelektronen und damit der bindenden Kräfte nicht ohne weiteres erkennen lassen. Vergleichende Analysen dominierender Strukturelemente, geometrischer Faktoren und Valenzelektronenkonzentrationen sowie Modell- und Bandstrukturrechnungen haben zu Annäherungen an diese Verbindungsklasse geführt, wie vor kurzem von Nesper zusammenfassend diskutiert^[1].

Reaktive intermetallische Bausteine zu generieren, aus denen sich auf chemischem Wege metallisch leitende oder halbleitende Filme und Feststoffe für unterschiedliche Anwendungen aufbauen lassen, ist das Ziel der Untersuchungen, über die Haushalter et al. in der November-Ausgabe der *Angewandten Chemie* berichtet^[2].

Erste Versuche, von bekanntem Terrain aus einen experimentellen Zugang zu intermetallischen Phasen zu finden, gehen auf Eduard Zintl zurück. Bereits die erste Mitteilung

über Metalle und Legierungen aus dem Jahr 1931 hat als Schwerpunkt den „Übergang Salz-Metall“ und befaßt sich mit salzartigen und intermetallischen Verbindungen von Natrium in flüssigem Ammoniak^[3]. Zintl greift dabei auf Beobachtungen von Joannis zurück, wonach Lösungen von Natrium in flüssigem Ammoniak mit einer Reihe von Metallen und Halbmetallen wie Blei oder Antimon unter Bildung intensiv farbiger Lösungen reagieren^[4]. Nach Untersuchungen von Kraus sind die tiefgrünen Na-Pb-Lösungen Elektrolyte, aus denen sich anodisch Blei abscheiden und durch Zusatz von Pb²⁺-Salzen anionisch gelöstes Blei ausfällen läßt, und in denen Blei kathodisch gelöst werden kann^[5].

Zintl stellte nun diese Einzelbeobachtungen auf eine breitere Basis, indem er diese Reaktionen systematisch mit den Elementen der Haupt- und Nebengruppen, beginnend bei den Chalkogenen und nach links fortschreitend, durchführte und mit potentiometrischen Titrationen verfolgte. Die Elemente werden dabei in flüssigem NH₃ vorgelegt – entweder suspendiert oder in Form ihrer Sulfide oder Iodide, gelöst – und mit Lösungen von Na in flüssigem NH₃ unter strengem Luftausschluß titriert. Umgekehrt können letztere auch mit Lösungen der Elementhalogenide umgesetzt werden. Diese Versuchsführung ergibt die Zusammensetzung der in Lösung entstehenden Verbindungen, erkennbar an den Wendepunkten der Titrationskurven, und führt zur Formulierung von „polyanionigen“ Verbindungen wie Na₄Pb₉, Na₄Pb₇, Na₃Sb₃, Na₃Sb₇ oder Na₃Bi₅. Der Befund, daß sich noch die Elemente der vierten, nicht aber der dritten Hauptgruppe anionisch lösen lassen, bildete die Basis für die Grenzziehung

[*] Priv.-Doz. Dr. B. Eisenmann

Eduard-Zintl-Institut

Abteilung II für Anorganische Chemie der Technischen Hochschule
Hochschulstraße 10, D-64289 Darmstadt
Telefax: Int. + 6151/16-4073