

Neue Verbindungs-Bibliotheken: Pseudobiopolymere und Diversomere

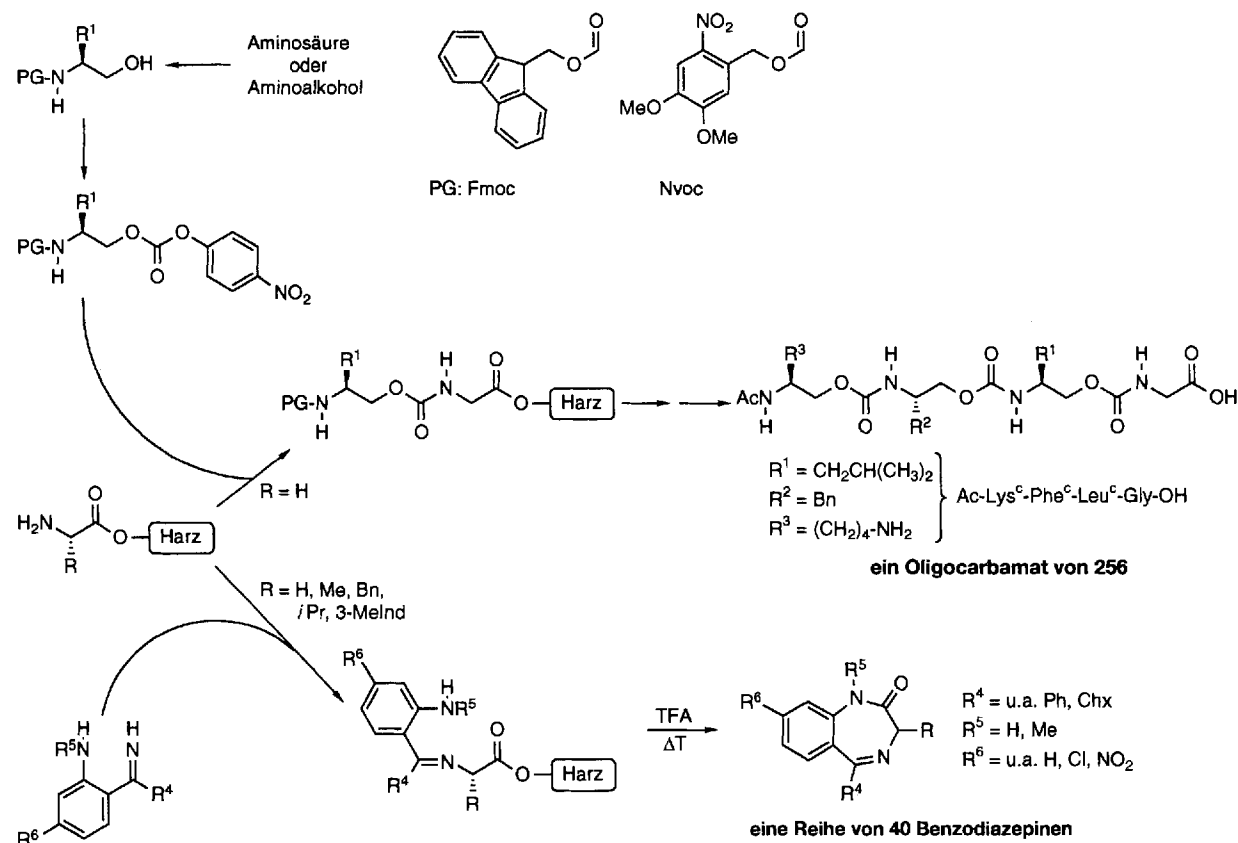
Rob M. J. Liskamp*

Die Festphasensynthese von Biopolymeren ist heutzutage unverzichtbar in der Chemie, Pharmakologie, Immunologie, Physiologie, Biologie und Biophysik. Mit diesem hervorragenden Werkzeug^[1] können nicht nur (langkettige) Peptide (halb)automatisch hergestellt werden, indem Aminosäuren und andere Reagentien zugegeben und überschüssiges Reagens sowie Nebenprodukte ausgewaschen werden, wobei auf die zeitraubende Isolierung von Zwischenprodukten verzichtet werden kann; die Methode ließ sich auch erfolgreich bei der Synthese von Nucleinsäuren und vor kurzem von Kohlenhydraten anwenden^[2, 3]. Der logische Folgeschritt war die Weiterentwicklung der Festphasenmethode hin zur *gleichzeitigen* Synthese *unterschiedlicher* Peptide. Dies führte zur Entwicklung mehrerer Strategien für multiple Peptidsynthesen mit einem weiten Anwendungsfeld^[4]. Ein wichtiger weiterer Fortschritt sind Peptidbibliotheken, die z.B. die systematische Synthese vieler – wenn möglich aller – Peptide einer bestimmten Länge als Ziel haben. Wenn jeder Aminosäurerest eine der 20 proteinogenen L-Aminosäuren ist, gibt es in einer Bibliothek 400 mögliche Dipeptide, 8000 mögliche Tripeptide usw.; mit jeder weiteren Aminosäure verzweigt sich die Zahl der möglichen Peptide. Es gibt jedoch intrinsische Schwierigkeiten bei der Herstellung und im Umgang mit umfangreichen Bibliotheken^[4] zusätzlich zu den Problemen bei der Identifizierung, Selektierung und Anreicherung vielversprechender Komponenten aus einer solchen Bibliothek. Um diese Arbeiten zu erleichtern, können Bibliotheken aus codierten Verbindungen sehr interessant sein. Bei einem besonders vielversprechenden Typ dieser Bibliotheken ist eine chemisch synthetisierte Komponente, z.B. ein Peptid, an eine spezielle Oligonucleotidsequenz gebunden. Dieses codierende genetische „Label“ soll dazu dienen, die erfolgversprechenden Komponenten der Bibliothek zu identifizieren und anzureichern^[5, 6]. Peptidbibliotheken sind zweifellos nützlich bei der Suche nach chemischen Leitstrukturen. Doch die mit ihnen ermittelten Leitstrukturen müssen aufwendig modifiziert werden, um brauchbare Wirkstoffkandidaten zu erhalten. Dies liegt an den Nachteilen von Peptiden wie ihrer Wasserlöslichkeit und in vielen Fällen ihrer Proteaseempfindlichkeit im Hinblick auf ihren Einsatz in biologischen Systemen. Daher sind die Ergebnisse von Cho et al.^[7] und Hobbs DeWitt et al.^[8] entscheidende Fort-

schritte auf dem Weg zu neuen Verbindungs-Bibliotheken, die erstens bis zu einem gewissen Grad die genannten Nachteile vermeiden, zweitens Leitstrukturen liefern, die möglicherweise weniger aufwendiger Modifikationen bedürfen, und drittens einen neuen Weg zur Herstellung von Makromolekülen mit neuartigen Eigenschaften weisen.

Cho et al. beschrieben die Prinzipien der Festphasensynthese eines Oligocarbamats und die Herstellung einer Oligocarbamat-Bibliothek^[7]. Dieses Oligocarbamat wurde als „nichtnatürliches Biopolymer“ bezeichnet^[9], „nichtnatürlich“, weil es offensichtlich nicht in der Natur vorkommt, und „Biopolymer“, um auf den Ursprung der Monomere hinzuweisen, die von proteinogenen Aminosäuren abgeleitet sind. Der Ausdruck Pseudobiopolymer („biopolymer mimetic“) wäre besser, da „nichtnatürliches Biopolymer“ ein Widerspruch in sich ist. Die Monomere, N-geschützte Aminoalkylcarbonate, waren aus den entsprechenden N-geschützten Aminosäuren oder Aminoalkoholen, die aus den Aminosäuren erhältlich sind, leicht zugänglich (Schema 1). Das Oligocarbamat wurde unter Verwendung der basenlabilen Fmoc-Schutzgruppe nach Standard-Festphasenmethoden synthetisiert; dabei betrug die Ausbeute pro Schritt mehr als 99%. Noch interessanter war der Einsatz der photolabilen Nitroveratryloxycarbonyl(Nvoc)-Aminoschutzgruppe (Schema 1). Sie ermöglichte den Autoren, eine Bibliothek aus 256 Oligocarbamaten herzustellen; dazu verwendeten sie eine zweistufige Maskierungsstrategie, wie sie von Oligopeptid- und Oligonucleotid-Bibliotheken beschrieben wurde^[10]. Die Bibliothek enthält alle Verbindungen, die durch Entfernen einer oder mehrerer Carbamateinheiten aus der Ursprungssequenz Ac-Tyr^c-Phe^c-Ala^c-Ser^c-Lys^c-Ile^c-Phe^c-Leu^c abgeleitet werden konnten (das hochgestellte c kennzeichnet das Vorliegen einer Carbamatverknüpfung). Die Bibliothek wurde auf eine 1.3 × 1.3 cm große Glasoberfläche aufgebracht und auf die Fähigkeit durchmustert, einen monoklonalen Antikörper gegen Ac-Tyr^c-Lys^c-Phe^c-Leu^c zu binden. Dabei zeigte sich, daß die Oligocarbamate Ac-Lys^c-Phe^c-Leu^c-Gly-OH (wobei Gly das Bindeglied im Napfschnecken-Hämocyanin-Konjugat dieses Oligocarbamats ist), Ac-Phe^c-Lys^c-Phe^c-Leu^c-Gly-OH, Ac-Tyr^c-Lys^c-Phe^c-Leu^c-Gly-OH, Ac-Ala^c-Lys^c-Phe^c-Leu^c-Gly-OH und Ac-Ile^c-Phe^c-Leu^c-Gly-OH nach den Fluoreszenzintensitäten zu den zehn Liganden mit den höchsten Affinitäten gehörten. Kompetitive ELISA-Tests (ELISA = enzyme-linked immunosorbent assay) in Lösung mit den freien Oligocarbamaten ergaben IC₅₀-Werte zwischen 60 und 180 nM. Daraus ließ sich als vermutlich dominierendes Epitop des Antikörpers Phe^c-Leu^c ableiten. Obwohl Ac-Tyr^c-Phe^c-Leu^c-Gly-OH dieses Epitop ent-

[*] Dr. R. M. J. Liskamp
Utrecht Institute for Pharmaceutical Sciences
Department of Pharmaceutics
Section Organic and Medicinal Chemistry
P.O. Box 80082, NL-3508 TB Utrecht (Niederlande)
Telefax: Int. +30/537307



Schema 1. Festphasensynthese von Oligocarbaten und Benzodiazepinen ausgehend von einer an Harz gebundenen Aminosäure. Die Fmoc-geschützten 4-Nitrophenylcarbonat-Monomere wurden in der normalen Festphasensynthese eines Oligocarbatens eingesetzt; dagegen wurde aus den entsprechenden Nvoc-geschützten Monomeren eine Bibliothek aus 256 Oligocarbat erhalten, von denen eines (Ac-Lys^c-Phe^c-Leu^c-Gly-OH) gezeigt ist. 40 Diazepine wurden synthetisiert, indem an Harz gebundene Aminosäuren mit acht 2-Aminobenzophenonimininen zur Reaktion gebracht und anschließend cyclisiert wurden. Ind = Indolyl, Chx = Cyclohexyl.

hält und in Lösung mit einem IC₅₀-Wert von ca. 160 nM band, rangiert das Fluoreszenzsignal, das dem Oligocarbat auf festem Träger (der Glasoberfläche der Bibliothek) entsprach, unter den unteren 30 %. Dies legt nahe, daß das Oligocarbat auf festem Träger eine andere Konformation einnimmt als in Lösung. Diesem Problem wird in Zukunft weitere Beachtung geschenkt werden müssen, bevor die Verwendung von Verbindungs-Bibliotheken für Affinitätsstudien allgemein empfohlen werden kann^[11].

Das Oligocarbat unterscheidet sich wesentlich vom entsprechenden Oligopeptid, z.B. weil es eine größere Ausdehnung hat, da zwischen den Seitenketten vier Atome anstelle von zweien wie in einem Peptid liegen, doch zugleich sind einige inhärente Nachteile von Peptiden in Oligocarbat weniger ausgeprägt: a) Sie sind deutlich hydrophober (bestimmt über den Wasser/Octanol-Verteilungskoeffizienten) und können somit möglicherweise die Blut-Hirn-Schranke leichter überwinden; b) sie sind resistent gegen den Abbau durch Trypsin und Pepsin.

Im Gegensatz zum Bericht aus Berkeley und Affymax legt der Artikel von Hobbs DeWitt^[8] keinen besonderen Wert auf die Herstellung einer Oligomeren-Bibliothek, sondern konzentriert sich ausschließlich auf die Erzeugung einer Bibliothek aus unterschiedlichen, wenn auch miteinander verwandten, als Diversomere bezeichneten organischen Verbindungen. Ein wichtiger Grund für die Erzeugung solcher Bibliotheken ist die Suche nach Leitstrukturen, die von vornherein dem endgültigen

Wirkstoff strukturell ähnlicher sind, denn Leitstrukturen aus Peptid- oder Nucleotid-Bibliotheken bedürfen noch – wie bereits erwähnt – umfangreicher Modifikationen. Ein anderer, ebenso wichtiger Grund ist, daß man schnell eine umfangreiche Bibliothek organischer Verbindungen (vergleichbar den haus-eigenen Substanzsammlungen pharmazeutischer Unternehmen) erhalten kann, die in die oft automatisierten und mit hohem Durchsatz arbeitenden biologischen Screeningsysteme eingespeist werden können.

Im Gegensatz zu der bekannten PEPSCAN-Methode, bei der Polyethylenstäbchen oder -nadeln als feste Träger für die gleichzeitige Synthese unterschiedlicher Peptide eingesetzt wurden^[4, 12], wurden hier hohle, in einer Glasfritte endende Nadeln verwendet; jede von ihnen enthielt etwa 100 mg Harz, an das über eine Ankergruppe eine Fmoc-Aminosäure gebunden war. Die Entfernung der Fmoc-Gruppe von den acht Aminosäureharzen und die Behandlung eines jeden Harzes mit fünf verschiedenen Isocyanaten ergab nach anschließender Cyclisierung 39 von 40 der möglichen Hydantoine in Ausbeuten von 4–81 %. In ähnlicher Weise wurden ausgehend von fünf Boc-geschützten, aminosäurebeladenen Merrifield-Harzen durch Reaktion mit acht 2-Aminobenzophenonimininen und anschließende Cyclisierung vierzig verschiedene Benzodiazepine synthetisiert (Schema 1). Die vierzig Produkte wurden in Ausbeuten von 9–63 % bei >90 % Reinheit (¹H-NMR-spektroskopisch bestimmt) erhalten und in einem Test zur Hemmung von Fluoronitrazepam eingesetzt. Bunin und Ellman hatten bereits früher eine andere

Festphasensynthese von zehn Benzodiazepin-Derivaten beschrieben^[1,3].

Eine wichtige Botschaft der beiden Berichte ist, daß die Verfasser durch Festphasensynthese eine Palette nichtnatürlicher Verbindungen bereitstellen können, die zum Screening auf neue Leitstrukturen dienen können. Diese Leitstrukturen sind den letztendlich einsetzbaren Wirkstoffen möglicherweise ähnlicher, da sie aus einer Verbindungsgruppe gewonnen wurden, die sich von natürlichen Systemen wie Peptiden und Nucleotiden stärker unterscheidet.

Mit der Festphasenstrategie sollten auch Bibliotheken anderer Pseudobiopolymere zugänglich werden, z.B. Oligoharnstoffe, Oligosulfone, Peptidosulfonamide^[14], Peptidophosphoramidate und Peptoide (Schema 2)^[15]. Aus diesen Verbindungen werden ohne Zweifel neue biologisch aktive Strukturen ebenso erwachsen wie die Möglichkeit, Biopolymere mit neuen Eigenschaften zu konstruieren.

Die Diversomeren-Bibliothek zeigt, daß die Synthese einer Palette organischer Verbindungen auf diese Art möglich ist und, obwohl deren Zahl viel kleiner ist als jene, die mit den meisten gängigen Methoden zur Synthese von Peptid-Bibliotheken erreichbar ist, kann eine erhebliche Zahl von Strukturanaloga schneller hergestellt werden, als wenn jede Substanz getrennt synthetisiert wird. Darüber hinaus sollte es möglich sein, die Methode an viele andere organisch-chemische Reaktionen anzupassen, so daß in naher Zukunft wahrscheinlich eine ganze Anzahl von Diversomeren-Bibliotheken hergestellt werden wird.

Eine andere Herausforderung ist die Entwicklung von Bibliotheken mit „eingeschränkter Konformation“, in denen die Konformation eines Oligomers genauer definiert ist, z.B. durch die Einführung starrer Monomere an verschiedenen Stellen des Oligomers. Dies ist insofern von Bedeutung, als es in der Literatur zahlreiche Belege dafür gibt, daß oft die Anwesenheit funktio-

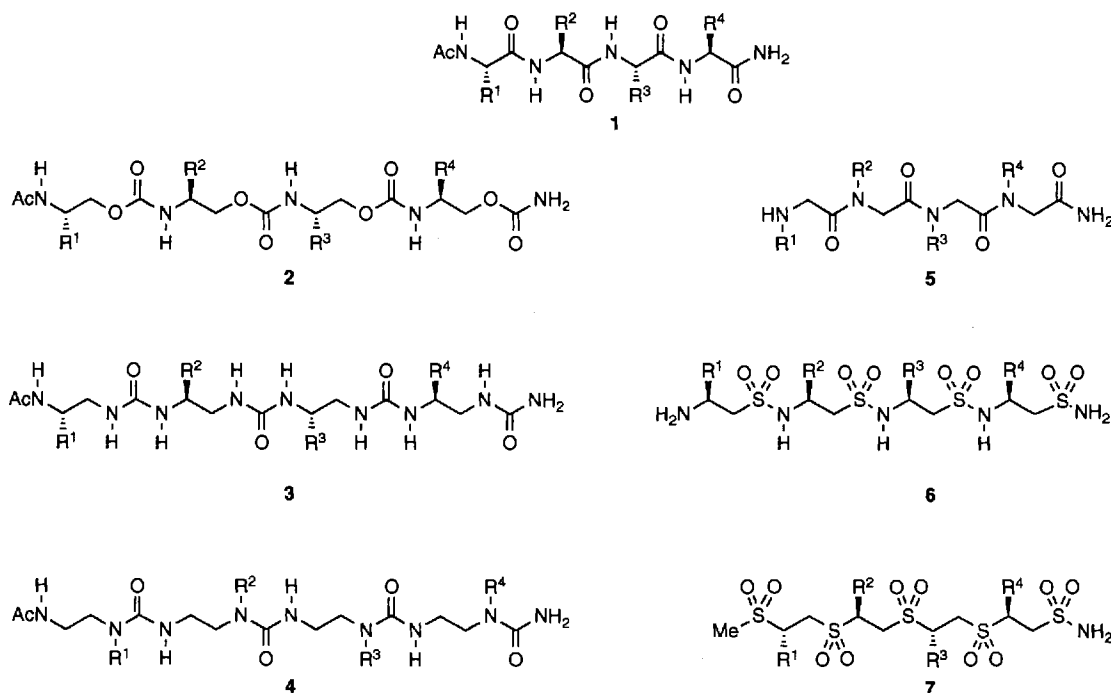
neller Gruppen allein, wie sie z.B. durch eine Aminosäuresequenz bereitgestellt werden, für eine optimale biologische Aktivität nicht ausreicht, sondern daß die richtige Orientierung der funktionellen Gruppen ebenfalls unverzichtbar ist^[16]. Darüber hinaus kann sich – wie bereits erwähnt – die Konformation auf dem festen Träger der Bibliothek von der in Lösung unterscheiden, was den Nutzen der Bibliothek für das Selektieren von Leitstrukturen einschränkt. Das unterstreicht die Wichtigkeit, Bibliotheken aus Verbindungen mit definierter Konformation zu entwickeln, die in unterschiedlicher Umgebung ähnlich, wenn nicht identisch ist.

Wissenschaftler haben das angeborene Bedürfnis, *rational* eine Verbindung mit vorhersagbarer (biologischer) Aktivität zu entwerfen. Computer-gestützte Molecular-Modeling-Techniken, Röntgenstrukturanalyse und NMR-Methoden haben dieses Bedürfnis verstärkt, und auch die Überzeugung, daß dieser Ansatz letztlich für alle Wirkstoffe möglich sein sollte. Dennoch wurden viele der gegenwärtig verfügbaren Wirkstoffe oder zumindest der Leitsubstanzen, von denen ihre Entwicklung ausging, in Screenings gefunden, also in „irrationalen“ Ansätzen. Obwohl man davon ausgehen kann, daß die rationale Entwicklung von Wirkstoffen immer wichtiger werden wird, werden auch Screening-Ansätze weiter an Bedeutung zunehmen, da sie einen Beitrag zum schnelleren und direkten Informationsgewinn liefern. Daher ist der rationale Entwurf irrationaler Screening-Verfahren für die Zukunft vielversprechend, und als Ergebnis werden sich viele Möglichkeiten ergeben, neue Verbindungs-Bibliotheken anzulegen und zu nutzen^[17].

[1] R. B. Merrifield, *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, *85*, 2149; *Angew. Chem.* **1985**, *97*, 801; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1985**, *24*, 799.

[2] Aktuelle Übersicht: S. L. Beaucage, R. P. Iyer, *Tetrahedron* **1993**, *48*, 2223.

[3] R. Verduyn, P. A. M. van der Klein, M. Douwes, G. A. van der Marel, J. H. van Boom, *Recl. Trav. Chim. Pays-Bas* **1993**, *112*, 464; S. J. Danishefsky, K. F.



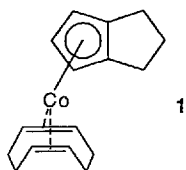
Schema 2. Ein Peptid 1, das entsprechende Oligocarbamat 2, die entsprechenden Oligoharnstoffe 3 und 4, das entsprechende Peptoid 5, Peptidosulfonamid 6 und Oligosulfon 7.

- McClure, J. T. Randolph, R. B. Ruggeri, *Science* **1993**, 260, 1307; S. P. Douglas, D. M. Whitfield, J. I. Krepinsky, *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, 113, 5095; G. H. Vecneman, R. M. J. Liskamp, G. A. van der Marel, J. H. van Boom, *Tetrahedron Lett.* **1987**, 28, 6695.
- [4] Aktuelle Übersicht über die parallele Synthese mehrerer Peptide: G. Jung, A. G. Beck-Sickinger, *Angew. Chem.* **1992**, 104, 375; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1992**, 31, 367.
- [5] S. Brenner, R. A. Lerner, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1992**, 89, 5381; I. Amato, *Science* **1992**, 257, 330; J. Nielsen, S. Brenner, K. D. Janda, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, 115, 9812.
- [6] Grundsätzlich sollte es auch möglich sein, codierende Elemente zur Identifizierung einer Verbindung an andere Bausteine als Peptide, z. B. an Kohlenhydrate, anzuhängen. Dies würde die Möglichkeiten zur Erzeugung neuer Bibliotheken erweitern.
- [7] C. Y. Cho, E. J. Moran, S. R. Cherry, J. C. Stephans, S. P. A. Fodor, C. L. Adams, A. Sundaram, J. W. Jacobs, P. G. Schultz, *Science* **1993**, 261, 1303.
- [8] S. Hobbs DeWitt, J. S. Kiely, C. J. Stankovic, M. C. Schroeder, D. M. Reynolds Cody, M. R. Pavia, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1993**, 90, 6909.
- [9] Die Antisense-Oligonucleotide sind eine frühe Klasse nichtnatürlicher Biopolymere: A. Peyman, *Chem. Rev.* **1990**, 90, 543.
- [10] S. P. A. Fodor, J. L. Leighton Read, M. C. Pirrung, L. Stryer, A. T. Lu, D. Solas, *Science* **1991**, 251, 767; ein Highlight war diesem Thema bereits gewidmet: G. von Kiederowski, *Angew. Chem.* **1991**, 103, 839; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1991**, 30, 822.
- [11] Dies ist eine der kritischen Fragen, die von Kiederowski in seinem Highlight [10] gestellt hat.
- [12] H. M. Geysen, R. H. Meloen, S. J. Barteling, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1984**, 81, 3998.
- [13] B. A. Bunin, J. A. Ellman, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, 114, 10997.
- [14] R. M. J. Liskamp, W. J. Moree, unveröffentlichte Ergebnisse.
- [15] Peptide wurden kürzlich von H. Kessler in einem Highlight vorgestellt: *Angew. Chem.* **1993**, 105, 572; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1993**, 32, 543.
- [16] Siehe beispielsweise den aktuellen Übersichtsartikel über Peptidmimetica: A. Giannis, T. Kolter, *Angew. Chem.* **1993**, 105, 1303; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1993**, 32, 1244.
- [17] Ein Highlight wurde der „Rationalität des Zufalls-Screenings“ gewidmet: A. Plückthun, L. Ge, *Angew. Chem.* **1991**, 103, 301; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1991**, 30, 296.

Aufbau von Kohlenstoffgerüsten mit Hilfe von Rutheniumkomplexen: 1,5-Cyclooctadien als Reagens in Übergangsmetallkatalysierten Reaktionen

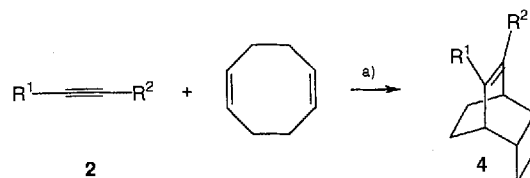
Holger Butenschön*

Eine im vergangenen Jahr erschienene Publikation von Trost et al.^[1] ist der Anlaß, auf einige wichtige Arbeiten aus der sich immer intensiver entwickelnden Ruthenium-organischen Chemie hinzuweisen. 1,5-Cyclooctadien (COD) wird häufig als zweizähliger, neutraler Ligand von Übergangsmetallkomplexen eingesetzt, der sich unter oft milden Bedingungen unter Bildung freier Koordinationsstellen wieder abgespalten läßt. Als Paradebeispiel ist in diesem Zusammenhang das Bis(1,5-cyclooctadien)nickel(0) als Vorläufer des „nackten Nickels“ zu nennen, mit dem G. Wilke et al. eine Vielzahl wichtiger Reaktionen ausführten und so den besonderen Wert der metallorganischen Chemie für die Synthese organischer Verbindungen bereits zu einem sehr frühen Zeitpunkt unterstrichen^[2]. Es ist bemerkenswert, daß von Reaktionen des CODs am Metall trotz seiner häufigen Verwendung als Ligand nur selten berichtet wurde. Einer dieser Fälle ist die von Lehmkuhl et al. sowie Otsuka et al. gefundene Bildung des Bicyclo[3.3.0]octadienylcobalt-Komplexes **1** bei der Umsetzung von Cobalt-Reagentien mit COD^[3–5].



Von B. M. Trost et al.^[1] wurde das bislang recht schmale Spektrum der Organischen Chemie des CODs nun dadurch ganz wesentlich erweitert, daß es formal als Bishomodien in metallkatalysierten [4 + 2]-Cycloadditionen fungieren kann. Eine 0.1 M Lösung des Alkins **2** reagiert mit 1.1 Äquivalenten COD in Gegenwart von

5% Chloro(η⁴-cyclooctadien)(η⁵-cyclopentadienyl)ruthenium(II) [CpRu(cod)Cl] **3**^[6] in siedendem Methanol zu Derivaten **4** des Tricyclo[4.2.2.0^{2,5}]dec-7-ens (Schema 1). In sieben von acht



Schema 1. a) 5% [CpRu(cod)Cl] **3**, MeOH; R¹ = H, Me, Et, CH₂OSi(iPr)₃, p-CH₂C₆H₄OCH₃; R² = CH₂OH, CH₂OSi(iPr)₃, CH₂CH₂OH, p-CH₂C₆H₄OCH₃, CO₂Me, CH₂CH₂CH₂CO₂Me; 78–100% (siehe Text).

Beispielen werden dabei Ausbeuten zwischen 78% und 100% erzielt, in einem Fall nur 22% (jedoch, wie die Autoren bemerken, „65% yield brsm“ – die ungewöhnliche Abkürzung steht für „based on recovered starting material“; im Deutschen könnte man von 65% „baum“ sprechen – baum = bezogen auf umgesetztes Material). Elektronenarme Alkine reagieren besonders langsam, und die Reaktion mit Dimethylbutindioat bleibt sogar aus. Sterische Hinderung bremst die Reaktion, **5** wird in nur 51% (98% baum) erhalten. Dies kann man jedoch zur Differenzierung der Dreifachbindungen in Alkinen mit mehreren Dreifachbindungen nutzen, wie die selektive Bildung von **6** in 63% (72% baum, Schema 2) zeigt.

Der von den Autoren vorgeschlagene Katalysezyklus geht von einem kationischen Cyclopentadienylruthenium-Komplex aus, der einen COD-Liganden und ein Solvensmolekül trägt. Letzteres wird durch das Alkin verdrängt, welches anschließend

[*] Prof. Dr. H. Butenschön
Institut für Organische Chemie der Universität
Schneiderberg 1B, D-30167 Hannover
Telefax: Int. + 511/762-3011