

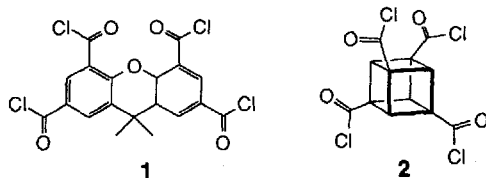
- [7] D. King, C. Fields, G. Fields, *Int. J. Pept. Protein Res.* **1990**, *36*, 255–266.
- [8] Analytische HPLC: Waters 600I, UV-Detektor Waters 490I, Ultrasphere-SI-Säule (4.6 mm × 25 cm, 80 Å, 5 µm); Fließgeschwindigkeit: 1.5 mL min⁻¹; Gradientenelution: 100% Hexan → 100% Ethylacetat in 30 min, → 100% Ethylacetat/Methanol (94/6) in 15 min. Präparative HPLC: Novapak-HR-Kieselgelsäule (19 mm × 30 cm, 68 Å, 5 µm); Fließgeschwindigkeit 3.0 mL min⁻¹.
- [9] Zur Untersuchung einer Oligopeptidbibliothek mit Ionenspray-MS und HPLC-MS-Kopplung siehe J. W. Metzger, K.-H. Wiesmüller, V. Gnau, J. Brüniges, C. Jung, *Angew. Chem.* **1993**, *105*, 901–930; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1993**, *32*, 894–896.
- [10] Zur Isolierung eines Trypsininhibitors durch Screening einer synthetischen, kombinatorischen Peptidbibliothek siehe J. Eichler, R. A. Houghton, *Biochemistry*, **1993**, *32*, 11035–11041.
- [11] T. Carell, E. A. Wintner, J. Rebek, Jr., *Angew. Chem.* **1994**, *106*, 2162–2164; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1994**, *33*, Nr. 20.

Screeningverfahren in Lösung zur Isolierung biologisch aktiver Verbindungen aus einer Molekülbibliothek**

Thomas Carell, Edward A. Wintner
und Julius Rebek, Jr.*

In der vorhergehenden Zuschrift haben wir über einen Zugang zu komplexen Substanzmischungen berichtet^[1], bei dem Bibliotheken kleiner, strukturell rigider Moleküle in Lösung entstehen. Mit seinen als komplexe Mischungen synthetisierten Bibliotheken steht dieses Konzept der gängigen Lehrmeinung in der Organischen Chemie entgegen, wonach Einzelverbindungen mit hoher Reinheit das Ziel einer Synthese sind. Da bei diesem neuen Ansatz weder Kodierungen^[2] noch räumlich isolierte Moleküle^[3] verwendet werden, können die gängigen Screening- und Amplifizierungsmethoden nicht angewendet werden^[4]. Daher haben wir für diese Mischungen ein in Lösung anwendbares Selektionsverfahren entwickelt, über dessen erste Resultate wir nun berichten.

Alle Bibliotheken wurden nach dem folgenden zweistufigen Verfahren aufgebaut^[1]: Im ersten Schritt wurde ein Zentralmolekül, wie das Xanthentetracarbonsäurechlorid **1** oder das Cubantetracarbonsäurechlorid **2**, mit einer Mischung aus 19 als



Bausteine vorgesehenen geschützten L-Aminosäuren kondensiert^[5]. Die Komplexität der entstehenden Mischungen wird durch die Zahl der eingesetzten Bausteine und die Symmetrie des Zentralmoleküls bestimmt. Mit 19 Bausteinen und dem Xanthen **1** sind theoretisch 65 341 Kombinationen möglich. Bei

Verwendung des Cubans **2** mit höherer Symmetrie können lediglich 11 191 Verbindungen mit dem gleichen Bausteinsatz gebildet werden. In der zweiten Stufe wurden die so gewonnenen Bibliotheken mit einem Trifluoressigsäure-Reagens behandelt, um die säurelabilen Schutzgruppen der gebildeten Verbindungen abzuspalten. Nach Fällung aus Diethylether/*n*-Hexan wurden die Mischungen als weiße Pulver erhalten, die in Wasser/Dimethylsulfoxid (DMSO) (9/1) für enzymatische Untersuchungen hinreichend löslich sind^[1].

Das Screeningverfahren beruht auf einem von Houghten et al. bei Peptidmischungen angewendeten Trypsinassay^[6]. Unser Ziel war die Identifizierung einer Verbindung innerhalb der Bibliothek, die die Trypsin-katalysierte Hydrolyse der Amidbindung von *N*²-Benzoyl-D, L-arginin-*para*-nitroanilid (BAPA) inhibieren kann. In den Assays wurde die Aktivität des Inhibitors mit der Geschwindigkeit der Freisetzung von *para*-Nitroanilin durch das Enzym reziprok korreliert. Die bei Zugabe der unterschiedlichen Bibliotheken zu dem Trypsinassay gewonnenen Resultate sind in Abbildung 1 zusammengestellt.

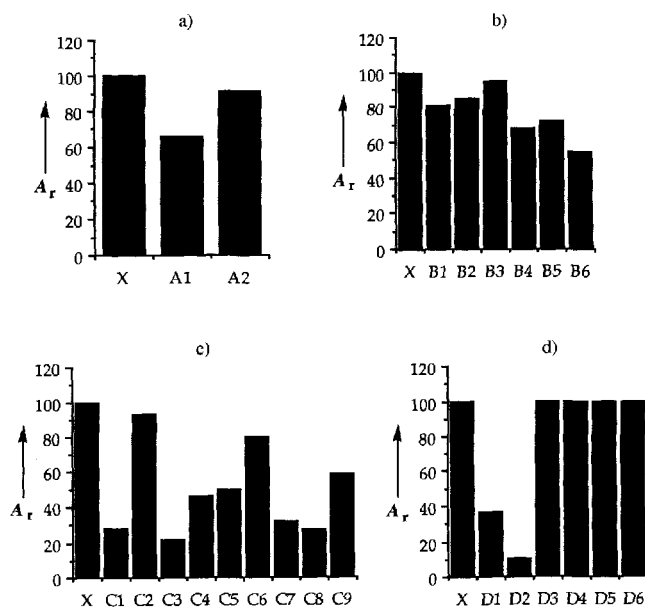


Abb. 1. Trypsinaktivität A_T [%] in Gegenwart der Bibliotheken relativ zu einem in Abwesenheit von Bibliotheksmaterial ermittelten Blindwert (X, A_T = 100%). Jeder Balken gibt die mittlere Trypsinaktivität von vier Messungen wieder. a) Trypsinaktivität [%] der Ausgangsbibliotheken A1 und A2 (je 2.5 mg in 50 µL DMSO), die aus den Zentralmolekülen **1** bzw. **2** und 19 Aminosäure-Bausteinen aufgebaut wurden (**1**, **5**). b) Trypsinaktivität [%] der sechs Teilbibliotheken B1–B6 (je 2.5 mg in 50 µL DMSO), die aus dem Zentralmolekül **1** und 15 der 19 Aminosäure-Bausteine (ohne S-Trt-Cys) aufgebaut wurden. B1: ohne Gruppe G1; B2: ohne Gruppe G2; B3: ohne Gruppe G3; B4: ohne Gruppe G4; B5: ohne Gruppe G5; B6: ohne Gruppe G6. Die Gruppen G1–G6 sind in Tabelle 1 zusammengestellt. c) Trypsinaktivität [%] der neun Teilbibliotheken C1–C9 (je 1.5 mg in 50 µL DMSO), die aus dem Zentralmolekül **1** und acht der neun Bausteine aus den Aminosäuren der Gruppen G1–G3 (Tabelle 1) aufgebaut wurden. C1: ohne Arg; C2: ohne Lys; C3: ohne His; C4: ohne Leu; C5: ohne Ile; C6: ohne Pro; C7: ohne Gly; C8: ohne Ala; C9: ohne Val. d) Trypsinaktivität [%] der sechs Teilbibliotheken D1–D6 (je 0.5 mg in 50 µL DMSO); Zusammensetzung siehe Text und Tabelle 2.

Diagramm a in Abbildung 1 zeigt die Screeningergebnisse der mit **1** und **2** sowie den 19 geschützten Aminosäuren^[5] gebildeten Ausgangsbibliotheken (A1 bzw. A2). Obwohl beide Bibliotheken mit dem gleichen Satz von Bausteinen aufgebaut wurden, verminderte lediglich die Bibliothek A1 die Trypsinaktivität signifikant (etwa 30%). Die Tatsache, daß die Bibliothek A2 die Enzymreaktion nicht wesentlich beeinflußt (91% Aktivität), legt die Vermutung nahe, daß allein die Gegenwart bestimmter

[*] Prof. J. Rebek, Jr., Dr. T. Carell, E. A. Wintner
Department of Chemistry, Massachusetts Institute of Technology
Cambridge, MA 02139 (USA)
Telefax: Int. + 617/253-7929

[**] Diese Arbeit wurde von den National Institutes of Health gefördert. T. C. dankt der Alexander-von-Humboldt-Stiftung für ein Feodor-Lynen-Stipendium, E. A. W. der National Science Foundation für ein Promotionsstipendium. Prof. J. Stubbe gilt unser Dank für Hinweise zum Enzymassay.

funktioneller Gruppen zur Bildung eines Trypsininhibitors nicht ausreicht. Vielmehr sind die Orientierung und die relative Anordnung der funktionellen Gruppen zueinander sowie das (relativ starre) Zentralkernmolekül wichtig.

Um zu bestimmen, welche der 19 Bausteine für die Bildung einer aktiven Xanthenbibliothek notwendig sind, wurden drei weitere Screeningschritte durchgeführt.

Mit dem ersten Experiment sollte die Zahl möglicher aktiver Bausteine von 19 auf 9 reduziert werden. Dazu haben wir die Bausteine (ohne *S*-Trt-Cys) in sechs Gruppen (G1–6) eingeteilt (Tabelle 1). Jede Gruppe enthielt drei Bausteine mit ähnlichen

Tabelle 1. Die entschützten Bausteine der Gruppen G1–G6 [5].

G1	G2	G3	G4	G5	G6
Gly	Leu	Arg	Ser	Phe	Glu
Ala	Ile	Lys	Thr	Tyr	Asp
Val	Pro	His	Met	Trp	Asn

Seitenketten. Mit jeweils fünf dieser Bausteingruppen und dem Xanthen **1** wurden daraufhin sechs Teilbibliotheken (B1–6) hergestellt. Die in Diagramm b, Abbildung 1 zusammengestellten Screeningergebnisse jeder Teilbibliothek zeigen, daß ohne bestimmte Aminosäuren die Fähigkeit der Bibliothek zur Inhibierung der Trypsinreaktion abnahm. Mit den Teilbibliotheken B1, B2 und B3, bei denen die Aminosäuren der Gruppen G1–3 fehlen, wurden die höchsten Trypsinaktivitäten festgestellt. Daher sollten die neun Aminosäuren der Gruppen G1–3, gebunden an **1**, die höchste inhibierende Aktivität aufweisen. Nur diese neun Bausteine wurden in der zweiten Screeningstufe weiter untersucht.

Durch das nächste Experiment wurde die Zahl der möglichen aktiven Bausteine von neun auf fünf herabgesetzt. Neun Teilbibliotheken (C1–9) mit jeweils acht Bausteinen wurden unter sequentielltem Auslassen einer der neun geschützten Aminosäuren synthetisiert. Die mit diesen neun Teilbibliotheken erhaltenen Screeningbefunde (Diagramm c, Abb. 1) zeigen, daß die ohne die Bausteine *N*^t-Boc-Lys-OMe, Leu-*O*-*t*-Bu, Ile-*O*-*t*-Bu, Pro-*O*-*t*-Bu oder Val-*O*-*t*-Bu hergestellten Bibliotheken (C2, C4, C5, C6 bzw. C9) zu sehr hohen Trypsinaktivitäten führten und somit keine wirksamen Trypsininhibitoren enthielten. Daher sind diese fünf Bausteine für die Bildung von Inhibitoren wesentlich.

Für die dritte Screeningphase wurden Teilbibliotheken aus dem Xanthen-Zentralkernmolekül und Mischungen von drei oder vier der fünf Bausteine *N*^t-Boc-Lys-OMe, Leu-*O*-*t*-Bu, Ile-*O*-*t*-Bu, Pro-*O*-*t*-Bu und Val-*O*-*t*-Bu gebildet. Trypsinassays mit diesen Teilbibliotheken bestätigten die Ergebnisse aus Diagramm c. Dabei wies eine aus **1** und *N*^t-Boc-Lys-OMe, Ile-*O*-*t*-Bu, Pro-*O*-*t*-Bu sowie Val-*O*-*t*-Bu aufgebaute Bibliothek die höchste Inhibitorwirkung auf. Wurde nur einer dieser vier Bausteine ausgelassen, erhielt man Bibliotheken mit deutlich verminderter Inhibitoraktivität^[7].

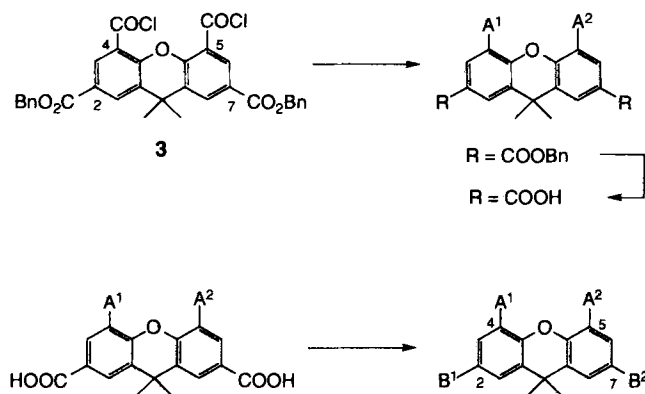
Nach jeder Screeningstufe wurden die Teilbibliotheken weniger komplex, da weniger Bausteine verwendet wurden. Die relative Konzentration der Verbindungen stieg damit in den kleiner werdenden Teilbibliotheken an. Da zudem lediglich aktive Teilbibliotheken ausgewählt wurden, wurde so die Konzentration aktiver gegenüber der inaktiver Verbindungen „amplifiziert“. Wegen der mit zunehmender Zahl der Screeningstufen steigenden Aktivitäten wurde ein Assay der Teilbibliotheken immer einfacher.

Nach nur drei Screeningstufen blieben somit die zwölf Strukturisomere des Lys-Ile-Pro-Val-Xanthens. Zur Bestimmung des wirksamsten Isomers wurden weitere sechs Teilbibliotheken (D1–6, Tabelle 2) in zwei Stufen gebildet (Schema 1). Für jede der Teilbibliotheken wurde das Dibenzylester-geschützte Dicar-

bonsäurechlorid **3**^[1] zunächst mit nur zwei der vier Bausteine, *N*^t-Boc-Lys-OMe, Ile-*O*-*t*-Bu, Pro-*O*-*t*-Bu, Val-*O*-*t*-Bu) umgesetzt. Die hydrogenolytische Debenzylierung (H₂, 10% Pd/C, Ethylacetat/Ethanol 9/1) der Mischung aus drei Verbindungen und die anschließende Umsetzung mit den beiden jeweils fehlenden Bausteinen (1*H*-Benzotriazol-1-olato-*O*)tris(*N*-methylmethanaminato)phosphor-hexafluorophosphat (BOP), Dimethylformamid (DMF), Et₃N) lieferte jeweils pro Teilbibliothek eine Mischung von zwölf Verbindungen. Nach Abspalten der säurelabilen Schutzgruppen wurden sechs Teilbibliotheken D1–6 erhalten, die jeweils Verbindungen mit einer einzigartigen Baustein-Verteilung am Xanthen-Zentralkernmolekül enthalten. In Tabelle 2 sind die in jedem Schritt verwendeten Aminosäuren und damit ihre Positionen am Zentralkernmolekül in den Teilbibliotheken angegeben.

Tabelle 2. Aminosäuren, die bei der Bildung der Teilbibliotheken D1–D6 an die Xanthenpositionen 4 und 5 (A¹, A²) bzw. 2 und 7 (B¹, B²) geknüpft wurden.

Teilbibliothek	A ¹ , A ²	B ¹ , B ²
D1	Lys, Val	Ile, Pro
D2	Lys, Ile	Val, Pro
D3	Lys, Pro	Ile, Val
D4	Val, Ile	Lys, Pro
D5	Val, Pro	Lys, Ile
D6	Ile, Pro	Lys, Val



Schema 1. Synthese der Teilbibliotheken D1–D6 (A¹, A², B¹, B² siehe Tabelle 2).

Aus den mit diesen Teilbibliotheken erhaltenen Screeningergebnissen (Diagramm d, Abb. 1) folgt, daß sich nur in den Mischungen hemmende Verbindungen befanden, die an den Positionen 4 und 5 mit Lys/Val- oder Lys/Ile-Kombinationen substituiert waren (Teilbibliotheken D1 bzw. D2)^[8]. Während D2 am aktivsten und D1 nur etwas weniger aktiv war, wies D3, die nur Verbindungen mit Lys/Pro-Substituenten an den Positionen 4 und 5 enthielt, keine inhibierende Wirkung auf. Die drei Teilbibliotheken D4–6 mit dem Lys-Baustein an den Positionen 2 oder 7 waren ebenfalls inaktiv. Also sind die Verbindungen **4** und **5** die wirksamsten Inhibitoren.

4 und **5** wurden synthetisiert und ihre Aktivitäten bestimmt^[9]. Trotz der Ähnlichkeit ihrer Strukturen war **4** signifikant aktiver als das Isomer **5**. Verbindung **4** ist ein kompetitiver Inhibitor für Trypsin ($K_i = (9 \pm 2) \times 10^{-6}$ M). Weitere Untersuchungen zur Aufklärung der Wechselwirkung von **4** mit Trypsin werden durchgeführt.

4 ist sicher nicht die einzige inhibierende Verbindung aus der Ausgangsbibliothek A1. Das vorgestellte Screeningverfahren

Durch unser einfaches iteratives Screeningverfahren konnten wir die Einzelverbindung **4**, einen nichtlinearen Peptidinhibitor, der Trypsin mikromolar inhibiert, innerhalb weniger Wochen aus einer komplexen Bibliothek kleiner organischer Moleküle in Lösung isolieren. Synthese und Screening von Molekülbibliotheken, die aus Zentralmolekülen und einer Vielzahl von Bausteinen hergestellt wurden^[1], sind also nützliche Methoden zur Erforschung der Strukturvielfalt kleiner Moleküle. Sie können bestehende Methoden zur Auffindung geeigneter Leistrukturen für Arzneistoffe ergänzen. Während in dieser Untersuchung nur einfach zugängliche geschützte L-Aminosäuren und lediglich zwei Sorten von Zentralmolekülen eingesetzt wurden, kann darüber hinaus jedes mit diesen oder anderen Zentralmolekülen zu hydrolysestabilen Produkten führende Nucleophil eingesetzt werden^[7]. Die mögliche Breite der durch diese neue Methode zugänglichen Bibliotheken ist unbegrenzt.

- [1] T. Carell, E. A. Wintner, A. Bashir-Hashemi, J. Rebek, Jr., *Angew. Chem.* **1994**, *106*, 2159–2162; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1994**, *33*, Nr. 20.
- [2] S. Brenner, R. A. Lerner, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1992**, *89*, 5381–5383; A. Borchardt, W. C. Still, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 373–374; J. Nielsen, S. Brenner, K. D. Janda, *ibid.* **1993**, *115*, 9812–9813; J. M. Kerr, S. C. Banville, R. N. Zuckermann, *ibid.* **1993**, *115*, 2529–2530; M. H. J. Ohlmeyer, R. N. Swanson, L. W. Dillard, J. C. Reader, G. Asouline, R. Kobayashi, M. Wigler, C. Still, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1993**, *90*, 10922.
- [3] H. M. Geysen, R. H. Meloen, S. J. Barteling, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1984**, *81*, 3998–4002; R. A. Houghten, *ibid.* **1985**, *82*, 5131–5135; S. P. A. Fodor, J. L. Read, M. C. Pirrung, L. Stryer, A. T. Lu, D. Solas, *Science* **1991**, *251*, 767–773; A. Furka, F. Sebastyen, M. Asgedom, G. Dibo, *Int. J. Pept. Protein Res.* **1991**, *37*, 487–493. Übersichten: G. Jung, A. Beck-Sickinger, *Angew. Chem.* **1992**, *104*, 375–391; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1992**, *31*, 367–383; M. R. Pavia, T. K. Sawyer, W. H. Moos, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1993**, *3*, 387–396.

- [**] Diese Arbeit wurde von der Deutschen Forschungsgemeinschaft gefördert.