

Der Einsatz kombinatorischer Chemie zur Synthese von Kohlenhydratbibliotheken

Prabhat Arya* und Robert N. Ben*

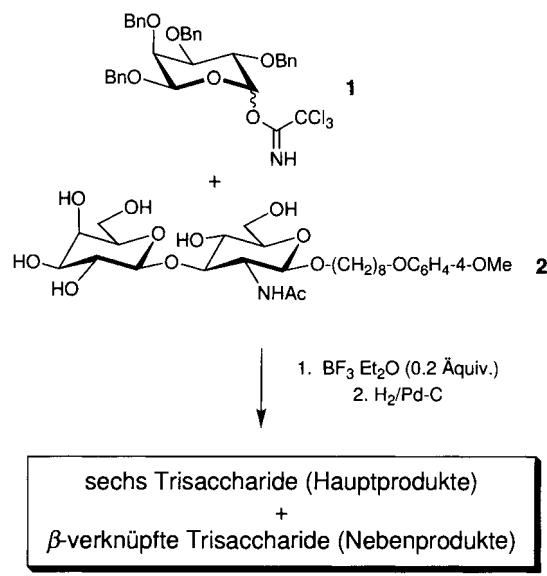
Die Identifizierung und Untersuchung von Struktur-Wirkungs-Beziehungen mit Hilfe von Verbindungsbibliotheken, die durch kombinatorische Synthese erhalten wurden, hat sich in der pharmazeutischen Forschung als sehr effektiv erwiesen.^[1] Traditionell werden neue Leitstrukturen in Form von Naturstoffen erhalten, die aus vielen Quellen stammen, unter anderem aus Pflanzen-, Tier-, Insekten- oder Mikroorganismen-Extrakten. Zeigt ein Extrakt die gewünschte biologische Wirkung, wird die aktive Verbindung identifiziert, isoliert und in weiteren biologischen Tests untersucht. Die anschließende Optimierung der chemischen Struktur, um die biologische Wirkung zu erhöhen, ist ein arbeitsintensives, zeitaufwendiges Verfahren, bei dem jede modifizierte Verbindung unabhängig synthetisiert werden muß. Diese Vorgehensweise hat die Entwicklung neuer Wirkstoffe sehr langwierig und teuer gemacht.

Daher ist die kombinatorische Chemie eine interessante Alternative zu den traditionellen Syntheseverfahren, denn sie ermöglicht die Synthese vieler, strukturell unterschiedlicher Verbindungen in kurzer Zeit. Dabei setzt man viele Bauelemente systematisch unter Bildung aller möglichen Kombinationen zusammen. Typischerweise führt man dazu Flüssig- oder Festphasensynthesen entweder nach dem „Split-Verfahren“ („Portioning-Mixing-Methode“, auch „Divide-Couple-and-Recombine-Methode“ genannt^[2d]) oder nach dem „Parallel-Verfahren“ durch. Obwohl die zur Herstellung einer Bibliothek aus kleinen Molekülen nötige Technik nicht neu ist, konnte die kombinatorische Chemie hierfür bis vor kurzem nicht optimal genutzt werden, da effiziente Methoden für die Charakterisierung (das Screening) solcher Bibliotheken nicht existierten. Viele der Screening-Strategien und einige technische Aspekte der kombinatorischen Chemie sind in gut geschriebenen Übersichtsartikeln zusammengefaßt worden.^[2]

Während der Fortschritt beim Verständnis von Protein-Protein- und Nucleotid-Protein-Wechselwirkungen erheblich ist, weiß man immer noch relativ wenig über die Rolle, die an Zelloberflächen gebundene Kohlenhydrate bei biologischen und pathologischen Abläufen spielen,^[3] und das, obwohl es die schwachen, nichtkovalenten Wechselwirkungen zwischen ihnen und einer Reihe von Proteinrezeptoren sind, die für die Erkennungsprozesse bei sehr vielen biologischen und pathologischen Prozessen von fundamentaler Bedeutung sind. So sollen Wechselwirkungen dieser Art an der Kommunikation zwischen Zellen sowie an bakteriellen und Virusinfektionen, chronischen Entzündungen, Krebs/Metastasenbildung und rheumatischer Arthritis beteiligt sein.^[3]

Oligosaccharide sind sehr komplex und verschiedenartig, was ihre Synthese arbeitsintensiv und teuer macht. Als Folge davon ist die Entdeckung neuer biologisch aktiver Oligosaccharidliganden ein komplexes Problem. Und selbst wenn eine vielversprechende Verbindung identifiziert ist, bleibt die zur Wirkungssteigerung erforderliche Optimierung ein schwieriges und zeitaufwendiges Unterfangen. Die Synthese von Oligosaccharatbibliotheken mit kombinatorischen Methoden bietet eine geeignete Lösung für diese Probleme.

Anders als Peptid- und Nucleotidbibliotheken sind Oligosaccharatbibliotheken nicht einfach zugänglich. Die Synthese einer solchen Bibliothek wird durch das Problem der Konfiguration am anomeren Zentrum und durch die vielen Hydroxygruppen erschwert. Traditionell würde man sich dieser Gruppen in einer alles andere als eleganten orthogonalen Schutzgruppenstrategie aus Schützen und Entschützen annehmen. Alternativ dazu haben Hindsgaul et al.^[4a] gezeigt, daß nach dem Zufallsprinzip verlaufende Glycosylierungen zur Herstellung kleiner Bibliotheken aus Di- und Trisacchariden genutzt werden können. Bei diesem Ansatz wird ein Glycosyldonor verwendet, der nur eine Art Schutzgruppe trägt, und ein Glycosylacceptor, dessen Hydroxygruppen alle ungeschützt sind (Schema 1). Auf diese Art



Schema 1. Zufalls-Glycosylierung nach Hindsgaul et al.

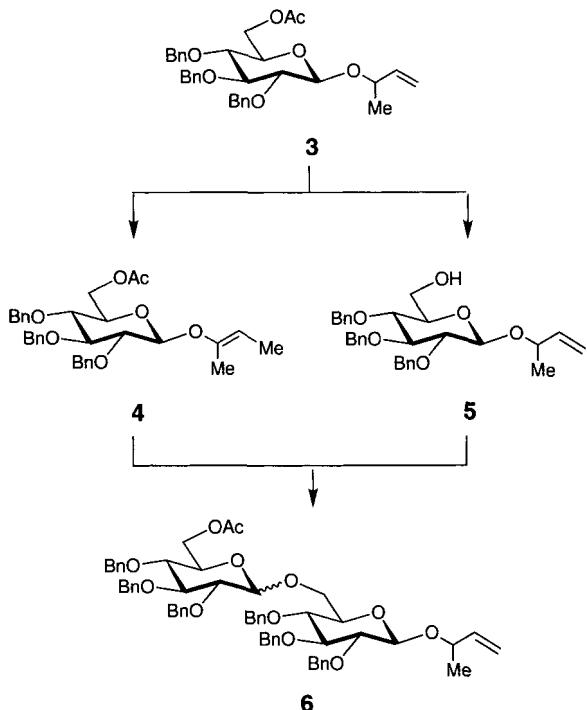
kuppelten Hindsgaul et al. den benzylierten Glycosyldonor **1** an das Disaccharid **2** mit sechs freien Hydroxygruppen als Acceptor. Nach drei Stunden bei Raumtemperatur konnte eine komplexe Mischung erhalten werden, in der etwa 30 % der Ausgangs-Disaccharide fucosiert waren (darunter ein kleiner Teil β-verknüpft). Die Trennung durch Umkehrphasenchromatographie lieferte die einzelnen Trisaccharide, die NMR-spektro-

* Dr. P. Arya, Dr. R. N. Ben
Steacie Institute for Molecular Sciences
National Research Council of Canada
100 Sussex Drive, Ottawa, K1A 0R6 (Kanada)
Telefax: Int. + 613/952-0068
E-mail: prabhat.arya@nrc.ca und rben@ned1.sims.nrc.ca

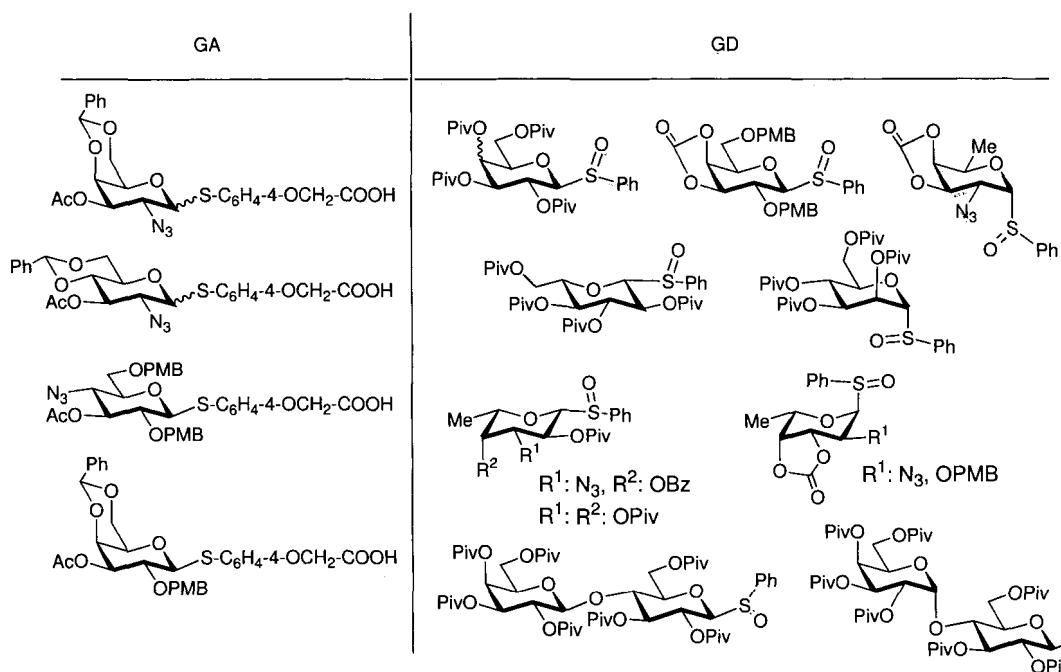
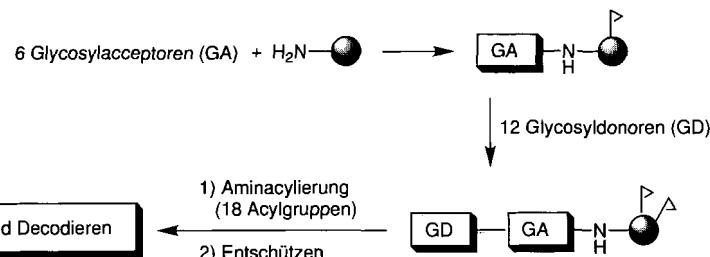
skopisch charakterisiert wurden. Den Analysen zufolge lagen alle sechs erwarteten α -verknüpften Produkte in Anteilen von 8 bis 23 % vor. Bei einer Mischung mit idealer statistischer Verteilung wäre der Anteil eines jeden Produkts 17 %.

Als alternatives Flüssigphasenverfahren kann die latent-aktive Glycosylierung von Boons und Mitarbeitern gelten (Schema 2).^[4b] Bei dieser Strategie sind Glycosyldonor (4) und Glycosylacceptor (5) vom gleichen Bauelement (3) abgeleitet. Beim Kuppeln des Donors mit dem Acceptor entstünde ein Disaccharid (6), das desacetyliert und mit anderen Glycosyldonoren kombinatorisch umgesetzt werden könnte. Boons et al. zeigten die prinzipielle Durchführbarkeit dieses Ansatzes mit der Synthese einer kleinen Trisaccharidbibliothek, die Mischungen aus Anomeren enthielt und durch Gelfiltration/Säulenchromatographie gereinigt wurde.

Eine andere wichtige Entdeckung auf dem Gebiet der kombinatorischen Synthese von Di- und Trisacchariden machten Kahne und Mitarbeiter in Princeton,^[4c] die eine Saccharidbibliothek (Schema 3) mit einem Festphasenverfahren herstellten. Dies war eine besondere Herausforderung, da sich für ein erfolgreiches Verfahren die Bindungen zwischen den Monomeren in hohen Ausbeuten bilden müssten. Dies ist nicht trivial, da in hohen Ausbeuten verlaufende Kupplungen in der Kohlenhydratchemie häufig nicht allgemein einsetzbar sind.^[5]



Schema 2. Latent-aktive Glycosylierung nach Boons et al.



Schema 3. Aufbau einer Bibliothek aus Di- und Trisacchariden nach Kahne et al. Es wurde eine Split-Synthese verwendet, und das Screening wurde an fester Phase durchgeführt.

Kahne et al. verwendeten eine neuartige Kupplungsmethode, bei der anomere Sulfoxide als Glycosyldonoren fungieren. Solche Verbindungen sind nützliche Intermediate, da bereits gezeigt werden konnte, daß sie bei niedrigen Temperaturen unabhängig vom Vorhandensein etwaiger sonstiger Schutzgruppen aktiviert werden können und in Festphasensynthesen nahezu quantitativ (ca. 90%) reagieren.^[5b] Auf diesem Weg wurde in drei Stufen eine Bibliothek aus ungefähr 1300 Di- und Trisacchariden synthetisiert, deren Bauelemente auf unterschiedlichste Art verbunden sind. Bei der angewandten Split-Synthese wurden zuerst getrennt sechs verschiedene Monomere an TentaGel-Harzkügelchen angeknüpft. Danach wurden zwölf Glycosylsulfoxide separat mit Mischungen der Monomer-belegten Harzkügelchen gekuppelt. Die Kügelchen wurden anschließend vereinigt und eine Reduktion zur Umwandlung der an den Glycosylacceptoren vorhandenen Azidogruppen in Aminogruppen durchgeführt. Danach wurden die Harzkügelchen in achtzehn Portionen geteilt, mit unterschiedlichen Acylierungsreagentien umgesetzt und von allen Schutzgruppen befreit.

Zum Screening wurde ein kolorimetrisches Verfahren unter Verwendung eines Lectins genutzt. Die ungefähr 1300 Verbindungen umfassende Bibliothek wurde biotinyliertem Lectin und an Streptavidin gebundener alkalischer Phosphatase ausgesetzt und schließlich mit „nitro blue tetrazolium“ (= 2,2'-Di-*para*-nitrophenyl-5,5'-diphenyl-3,3'-(3,3'-dimethoxy-4,4'-diphenyl)ditetrazoliumchlorid) angefärbt. Die Harzkügelchen, die sich anfärbten ließen, wiesen den höchsten Bindungsgrad auf und wurden mechanisch unter dem Lichtmikroskop abgetrennt. Bemerkenswert ist, daß nur 0.3 % der Kügelchen (25 Stück) angefärbt waren und davon 13 denselben Disaccharidkern enthielten, der nur mit unterschiedlichen hydrophoben Gruppen acyliert war. Die verbleibenden 12 Kügelchen wurden verworfen, da Analysen zufolge keine der Verbindungen irgendwelche Gemeinsamkeiten aufwiesen. Überraschenderweise wurde der natürliche Lectinligand nicht als „Treffer“ identifiziert, obwohl er in der Bibliothek vorhanden war. In getrennten Experimenten konnte bewiesen werden, daß die an den 13 Kügelchen befindlichen Verbindungen alle tatsächlich bessere Liganden als das natürliche Substrat sind.

Wie Kahne et al. bereits festgestellt haben, ist es interessant, daß das Lectin beim Binden an bestimmte Di- und Trisaccharide so gut unterscheidet. Eines der Paradoxa bei bindenden Wechselwirkungen mit Kohlenhydraten ist, daß Kohlenhydrat-bindende Proteine in Lösung mehrere Substrate binden können, bei der gegenseitigen Erkennung von Zellen aber bemerkenswert spezifisch reagieren. Die Untersuchung von Kahne et al. belegt auch, daß die Präsentation der Saccharide auf der Oberfläche der Kügelchen entscheidend für das Binden des Lectins ist, denn Affinitätsuntersuchungen in Lösung zufolge binden sowohl der

natürliche Ligand als auch die 13 als „Treffer“ identifizierten Verbindungen das Lectin in Lösung. Dies ist wirklich erstaunlich, da das Screening an Harzkügelchen häufig durch die Art der Präsentation der zu untersuchenden Verbindung erschwert wird.

Hindsgauls Zufalls-Glycosylierung, Boons' latent-aktive Glycosylierung sowie Kahnes Festphasenmethode ermöglichen nun die Synthese von Bibliotheken, die aus Di- und Trisacchariden bestehen. Kolorimetrische Untersuchungen sollten das Screening solcher Bibliotheken leicht und effizient machen, denn daselbe Verfahren könnte auf andere Lectine angewendet werden. Es gibt kaum Zweifel daran, daß diese Fortschritte in der kombinatorischen Chemie mit Di- und Trisacchariden große Bedeutung für ein besseres Verständnis der Wechselwirkungen an Zelloberflächen haben und beim Design polyvalenter Verbindungen helfen werden, die diese Wechselwirkungen unterbinden.

Während die hier referierten Fortschritte die Synthese von Di- und Trisaccharidbibliotheken zu einem relativ leicht durchzuführenden Prozeß machen, ist die Synthese von Oligosaccharidbibliotheken (Bibliotheken aus Tetrasacchariden und höheren Derivaten) immer noch eine Herausforderung. Dies liegt hauptsächlich daran, daß die derzeitigen Glycosylierungsverfahren keine quantitativen Umsetzungen ermöglichen. Somit müssen erst effizientere, quantitativ verlaufende Glycosylierungen sowie bessere Trenntechniken entwickelt werden, bevor die kombinatorische Synthese von Oligosaccharidbibliotheken möglich wird.

Stichworte: Glycosylierungen · Kombinatorische Chemie · Kohlenhydrate

- [1] *Molecular Diversity and Combinatorial Chemistry—Libraries and Drug Discovery* (Hrsg.: I. M. Chaiken, K. D. Janda) (*ACS Conference Proceeding Series* 1996).
- [2] Neuere Übersichten zur kombinatorischen Chemie: a) M. A. Gallop, R. W. Barrett, W. J. Dower, S. P. A. Fodor, E. M. Gordon, *J. Med. Chem.* **1994**, *37*, 1233–1251; b) E. M. Gordon, R. W. Barrett, W. J. Dower, S. P. A. Fodor, M. A. Gallop, *ibid.* **1994**, *37*, 1385–1401; c) L. A. Thompson, J. A. Ellman, *Chem. Rev.* **1996**, *96*, 555–600; d) F. Balkenhol, C. von dem Bussche-Hünnefeld, A. Lansky, C. Zechel, *Angew. Chem.* **1996**, *108*, 2436–2487; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1996**, *35*, 2288–2337; e) M. J. Sofia, *Drugs Discovery Today* **1996**, *1*, 27–34.
- [3] a) N. Sharon, H. Lis, *Sci. Am.* **1993**, *268*(1), 82–89; b) P. Sears, C.-H. Wong, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1996**, *93*, 12086–12093.
- [4] a) O. Kanie, F. Barresi, Y. Ding, J. Labbe, A. Otter, L. S. Forsberg, B. Ernst, O. Hindsgaul, *Angew. Chem.* **1995**, *107*, 2912–2915; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1995**, *34*, 2720–2722; b) G.-J. Boons, B. Heskamp, F. Hout, *ibid.* **1996**, *106*, 3053–3056 bzw. **1996**, *35*, 2845–2847; c) R. Liang, L. Yan, J. Loebach, M. Ge, Y. Uozumi, K. Sekanina, N. Horan, J. Glidersleeve, C. Thompson, A. Smith, K. Biswas, W. C. Still, D. Kahne, *Science* **1996**, *274*, 1520–1522.
- [5] a) M. Schuster, P. Wang, J. C. Paulson, C.-H. Wong, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 1135–1136; b) L. Yan, C. M. Taylor, R. Goodnow, Jr., D. Kahne, *ibid.* **1994**, *116*, 6953–6954; c) S. P. Douglas, D. M. Whitfield, J. J. Krepinsky, *ibid.* **1995**, *117*, 2116–2117; d) J. Y. Roberge, X. Beebe, S. J. Danishefsky, *Science* **1995**, *269*, 202–204; e) J. A. Hunt, W. R. Roush, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 9998–9999; f) K. C. Nicolaou, N. Winssinger, J. Pastor, F. DeRoose, *ibid.* **1997**, *119*, 449–450.