

Einbettung von Lösungsmittelmolekülen sind in dem STM-Bild in Abbildung 2C durch Pfeile gekennzeichnet. Abbildung 2D zeigt den in Abbildung 2C markierten Bereich vergrößert. Die obere, polymerisierte Monoschicht, die von der unteren durch eine Domänengrenze getrennt ist, zeigt einen hellen Kontrast aufgrund der Polydiacetylenketten (wie in Abb. 2A), während in der unteren, unpolymersierten Domäne die Diacetylengruppen der individuellen Moleküle von 1 unterschieden werden können. Der mittlere Tunnelstrom verändert sich an der Stelle der Diacetylengruppen von der polymerisierten zur unpolymersierten Domäne nicht; er ist um den Faktor 1.5 größer als der mittlere Tunnelstrom an der Stelle der Alkylketten. Die Diacetylengruppen können grundsätzlich zwei Orientierungen bezüglich der Lamellenrichtung einnehmen: Diese beiden spezifischen Orientierungen sind Spiegelbilder hinsichtlich der Lamellenrichtung. In der Lamelle in der unteren linken Ecke des STM-Bildes in Abbildung 2D sind die Diacetylengruppen nahezu horizontal orientiert, in der nächsten Lamelle sind sie fast vertikal orientiert. In der Lamelle in der unteren rechten Ecke des Bildes sind sie wieder fast horizontal orientiert.

### Experimentelles

Zur Beobachtung der physisorbierten Monoschichten wurde ein kommerzieller STM-Aufbau benutzt (Discoverer, Topometrix Inc., Santa Barbara, CA, USA) der unter Umgebungsbedingungen betrieben wird. Die STM-Spitzen wurden durch elektrochemisches Ätzen von Pt/Ir-Draht (80%/20%, Durchmesser 0.2 mm) gefertigt, wobei eine Ätzlösung von 6 N NaCN/2 N KOH in Wasser verwendet wurde. Die Proben wurden folgendermaßen präpariert: Zuerst wurde die Diacetylenverbindung 1 in 1-Undecanol (Aldrich, 99%) mit einer Konzentration von näherungsweise  $1 \text{ mg mL}^{-1}$  aufgelöst. Dann wurde ein Tropfen dieser Lösung auf die Basalfäche eines hochorientierten pyrolytischen Graphits (HOPG, Güte ZYB, Advanced Ceramics Inc., Cleveland, OH, USA) gegeben. Die STM-Spitze wurde in diese Lösung eingetaucht und der Grenzfläche Flüssigkeit/Graphit genähert. Während der Abtastung der Probe mit der Spitze wurde die Variation des Tunnelstroms detektiert, wobei der mittlere Tunnelstrom ca. 1 nA betrug. Für ein Bild, bestehend aus 200 Linien und 200 Punkten pro Linie waren mindestens 7 s notwendig (die Grenzen sind durch die Leitungsfähigkeit des Discoverer-Instruments gegeben). Die Tunnelspannungen betrugen zwischen 0.5 und 1.5 V (Probe negativ). Ein Bild der Graphitoberfläche konnte bei kleinen Tunnelspannungen erhalten werden. Nach der Aufnahme jedes in diesem Beitrag vorgestellten Bildes wurde sofort ein Kalibrierungsbild der Graphitoberfläche an exakt der gleichen Stelle aufgenommen. Dies minimiert mögliche Fehler bei der Bildanalyse aufgrund von Drift-Scanner-Auslenkungseffekten, denn diese Effekte treten in gleichem Ausmaß sowohl im STM-Bild der Monoschicht als auch in dem HOPG-Referenzbild auf. Der Abstand zwischen ISA-Kopfgruppen wurde an mehreren Reihen durch die Mittelung über eine große Zahl von Wiederholungseinheiten pro Reihe bestimmt. Die angegebenen experimentellen Werte sind Mittelwerte aus der Auswertung vieler Bilder aus verschiedenen Experimenten mit verschiedenen Spitzen. Wenn ein HOPG-Referenzbild zur Kalibrierung erhalten worden war, konnte die Tunnelspannung wieder erhöht werden, um erneut die physisorbierten Monoschichten zu beobachten. Wir fanden keinen Hinweis darauf, daß die Monoschicht bei der Kalibrierungsmessung gestört wurde. Die STM-Daten wurden keiner Bildverarbeitung unterworfen. Die Bestrahlung wurde folgendermaßen durchgeführt: Zuerst wurde die Spitze zurückgezogen und der STM-Kopf entfernt. Dann wurde die Graphitoberfläche samt Lösung mit einer CAMAG-Universallampe ( $\lambda = 254 \text{ nm}$ ) bestrahlt (Abstand zwischen Lampe und Oberfläche 5 cm). Die Bestrahlungsdauer betrug 20–30 min. Nach der Bestrahlung wurde der STM-Kopf wieder installiert und das Abbilden fortgesetzt.

Eingegangen am 7. April,  
veränderte Fassung am 24. Juli 1997 [Z 10323]

**Stichwörter:** Alkine • Diacetylene • Monoschichten • Polymerisation • Rastertunnelmikroskopie

[1] T. Ogawa, *Prog. Polym. Sci.* **1995**, 20, 943–985.

[2] G. Wegner, *Z. Naturforsch. B* **1969**, 24, 824–832.

[3] a) A. Lio, A. Reichert, J. O. Nagy, M. Salmeron, D. H. Charych, *J. Vac. Sci. Technol.* **1996**, B14, 1481–1485; b) S. Nezu, J. B. Lando, *J. Polym. Sci.* **1995**, A33, 2455–2461.

- [4] D. W. Batchelder, S. D. Evans, T. L. Freeman, L. Häussling, H. Ringsdorf, H. Wolf, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, 116, 1050–1053.  
 [5] H. Ozaki, T. Funaki, Y. Mazaki, S. Masuda, Y. Harada, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, 117, 5596–5597.  
 [6] J. P. Rabe, S. Buchholz, L. Askadskaya, *Synth. Met.* **1993**, 54, 339–349.  
 [7] a) G. C. McConical, R. H. Bernhardt, D. J. Thomson, *Appl. Phys. Lett.* **1990**, 57, 28–30; b) J. P. Rabe, S. Buchholz, *Science* **1991**, 253, 424–427.  
 [8] D. M. Cyr, B. Venkataraman, G. W. Flynn, *Chem. Mater.* **1996**, 8, 1600–1615.  
 [9] R. Heinz, A. Stabel, J. P. Rabe, G. Wegner, F. C. De Schryver, D. Corens, W. Dehaen, C. Siling, *Angew. Chem.* **1994**, 106, 2154–2157; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1994**, 33, 2080–2083.  
 [10] P. C. M. Grim, P. Vanoppen, M. Rücker, S. De Feyter, G. Moessner, S. Valiyaveetil, K. Müllen, F. C. De Schryver, *J. Vac. Sci. Technol. B* **1997**, 15, 1419–1424.  
 [11] P. Vanoppen, P. C. M. Grim, M. Rücker, S. De Feyter, G. Moessner, S. Valiyaveetil, K. Müllen, F. C. De Schryver, *J. Phys. Chem.* **1996**, 100, 19636–19641.  
 [12] V. Enkelmann, *Adv. Polym. Sci.* **1984**, 63, 91–136.

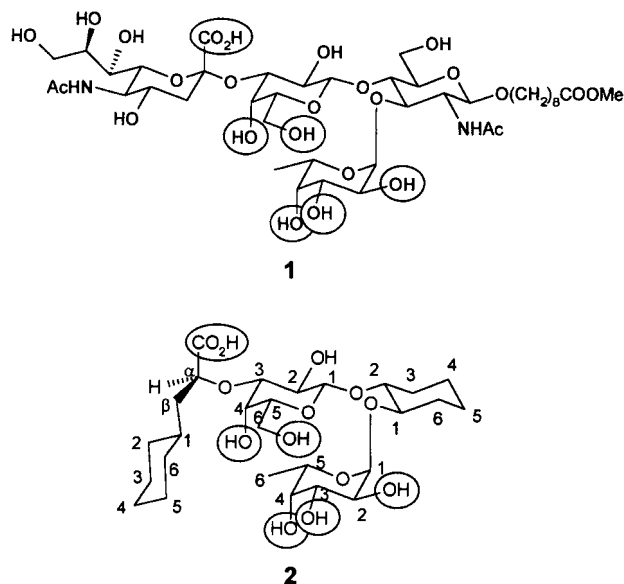
### Vergleich der bioaktiven Konformationen von Sialyl-Lewis<sup>x</sup> und einem potenten Sialyl-Lewis<sup>x</sup>-Mimetikum\*\*

Wolfgang Jahnke,\* Hartmuth C. Kolb,  
Marcel J. J. Blommers, John L. Magnani und  
Beat Ernst

Wechselwirkungen von Sialyl-Lewis<sup>x</sup>-verknüpften Glycopeptiden und Glycolipiden mit einigen Lectinen vom C-Typ, den sogenannten Selectinen, sind für das „rolling“ von Leukozyten verantwortlich, den ersten Schritt beim Leukozytenstrom zu Wunden und Entzündungen.<sup>[1]</sup> Dieser Schritt spielt bei einer Vielzahl von Krankheiten und pathologischen Situationen eine entscheidende Rolle, z. B. bei Entzündungen, Reperfusionsschäden, rheumatoider Arthritis, Metastasenbildung und Angiogenese. Mit großem Aufwand wird derzeit versucht, kohlenhydratähnliche Wirkstoffe zu erforschen, die die Rolling-Phase der Immunantwort durch Blockierung der Selectinbindungsstelle stören.<sup>[2]</sup> Für das Design von Sialyl-Lewis<sup>x</sup>-Mimetika ist das Verständnis der Struktur-Wirkungs-Beziehung erforderlich sowie die Kenntnis der bioaktiven Konformation, also der Konformation des ans Selectin gebundenen Mimetikums. Die Transfer-NOE-NMR-Technik ist eine leistungsfähige Methode, um bioaktive Konformationen von Selectinantagonisten aufzuklären. Sie ist sehr gut geeignet, um Wechselwirkungen zwischen Proteinen und Liganden mit den für Selectinantagonisten typischen Bindungsaffinitäten im millimolaren bis mikromolaren Bereich zu studieren.<sup>[3]</sup> So wurde kürzlich die bioaktive Konformation von Sialyl-Lewis<sup>x</sup> **1** durch Transfer-NOE-NMR-Studien am Sialyl-Lewis<sup>x</sup>/E-Selectin-Komplex bestimmt.<sup>[4]</sup> Hier beschreiben wir erstmals die mit der gleichen Technik ermittelte bioaktive Konformation eines potenten Sialyl-Lewis<sup>x</sup>-Mimetikums (**2**, Schema 1).<sup>[5]</sup> In unseren Testsystemen bindet das

[\*] Dr. W. Jahnke, Dr. H. C. Kolb, Dr. M. J. J. Blommers, Dr. B. Ernst  
Novartis Pharma AG, CH-4002 Basel (Schweiz)  
Telefax: Int. + 69/73704  
E-mail: wolfgang.jahnke@pharma.novartis.com  
Dr. J. L. Magnani  
GlycoTech Corp., Rockville, MD 20850 (USA)

[\*\*] Wir danken Prof. T. Peters (Medizinische Universität zu Lübeck) für wertvolle Diskussionen und für die Koordinaten von gebundenem Sialyl-Lewis<sup>x</sup> sowie Dr. T. Winkler (Novartis Crop Protection AG) für anregende Diskussionen und sachkundige Ratschläge.



Schema 1. Strukturen von Sialyl-Lewis<sup>X</sup> **1** und dem Sialyl-Lewis<sup>X</sup>-Mimetikum **2** (mit Numerierung). Pharmakophore sind durch Kreise hervorgehoben.

Mimetikum zehnmal stärker an E-Selectin als Sialyl-Lewis<sup>X</sup> ( $IC_{50}$  von **1**: 1.0–1.2 mM, von **2**: 0.10–0.11 mM).

Die NMR-Signale des Sialyl-Lewis<sup>X</sup>-Mimetikums **2** wurden durch die 2D-NMR-Experimente ROESY, TOCSY, P.E.COSY, HSQC und HSQC-TOCSY zugeordnet. Die beiden letzten Experimente, bei denen der Heterokern  $^{13}C$  verwendet wird, wurden für die eindeutige Zuordnung benötigt, weil die  $^1H$ -NMR-Signale der beiden Cyclohexyl-

Tabelle 1. Chemische Verschiebungen ( $^1H$ - und  $^{13}C$ -NMR) des Sialyl-Lewis<sup>X</sup>-Mimetikums **2** [a].

Position	Cyc-1	Gal	Cyc-2	Fuc
1	1.53 35.9	4.48 102.7	3.50 79.9	4.97 98.3
2	0.88(a) 1.77(e) 34.5	3.52 72.9	3.72 81.1	3.74 70.6
3	1.18(a) 1.66(e) 28.4	3.38 85.6	1.27(a) 2.09(e) 32.4	3.89 72.2
4	1.13(a) 1.58(e) 28.8	3.88 68.9	1.21(a) 1.68(e) 25.8	3.78 74.7
5	1.20(a) 1.63(e) 28.6	3.58 77.0	1.21(a) 1.67 25.8	4.60 69.2
6	0.93(a) 1.63(e) 31.8	3.71 64.2	1.24(a) 2.05(e) 31.8	1.18 18.0
COOH	– 185.5			
$\alpha$	3.94 81.9			
$\beta$	1.51 (pro- <i>S</i> ) 1.58 (pro- <i>R</i> ) 43.9			

Bei 25 °C in  $D_2O$ , 100 mM Imidazol, pH 7.4 (unkorrigiert). Die oberen Zahlen beziehen sich auf  $^1H$ , die unteren auf  $^{13}C$ . Alle chemischen Verschiebungen sind bezogen auf 3-(Trimethylsilyl)-1-Propansulfonat (DSS). a kennzeichnet die axialen Protonen und e die äquatorialen Cyclohexylprotonen von (*S*)-Cyclohexylmilchsäure (Cyc-1) und (1*R*,2*R*)-1,2-Cyclohexandiol (Cyc-2).

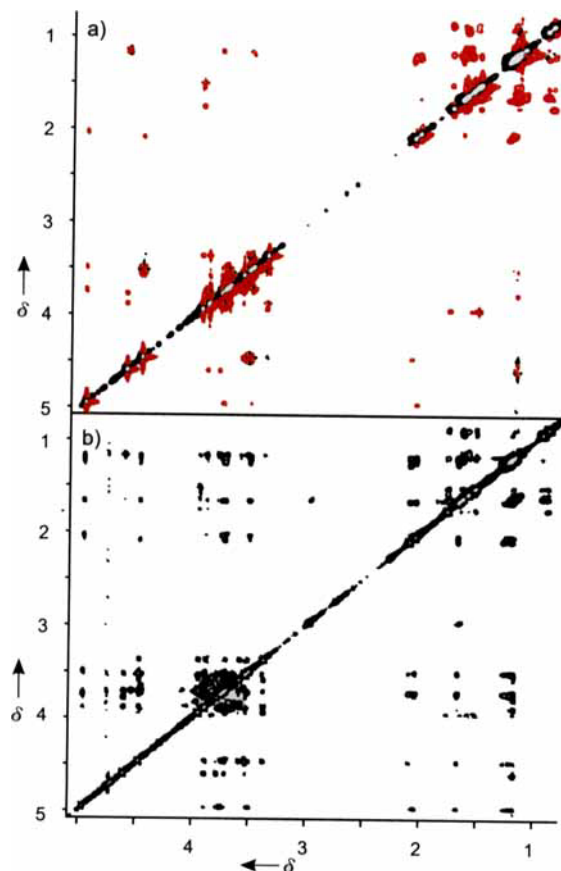


Abb. 1. 2D-NOESY-Spektren des Sialyl-Lewis<sup>X</sup>-Mimetikums **2**. a) Freies **2** (17 mM), b) an E-Selectin gebundenes **2** (1.75 mM). Beide Spektren wurden im gleichen Puffer bei 25 °C aufgenommen. Die Mischzeit betrug 200 ms; ein  $T_{1\rho}$ -Relaxationsfilter wurde verwendet [6]. Für das Experiment b) wurden 35  $\mu$ M E-Selectin/IgG-Konstrukt zugesetzt, um eine Mischung von **2** und E-Selectin im Netto-Verhältnis 25:1 zu erhalten.

ringe stark überlappen. Die Signale der beiden diastereotopen exocyclischen  $H_{\beta}$ -Protonen und der (*S*)-Cyclohexylmilchsäureprotonen (Cyc-1) wurden individuell zugeordnet durch Analyse von homonuclearen  $^3J$ -Kopplungskonstanten aus dem P.E.COSY-, von heteronuclearen  $^3J$ -Kopplungskonstanten aus dem HMBC-, sowie von ROE-Intensitäten aus dem ROESY-Experiment. Die Zuordnungen der  $^1H$ - und  $^{13}C$ -NMR-Signale von **2** sind in Tabelle 1 aufgeführt. Das NOESY-Spektrum des ungebundenen Sialyl-Lewis<sup>X</sup>-Mimetikums **2** weist schwache, positive NOEs auf (also negative Kreuzsignale, Abb. 1 a). Nach Zugabe von E-Selectin läßt das mit einem  $T_{1\rho}$ -Relaxationsfilter [6] aufgenommene NOESY-Spektrum starke negative NOEs erkennen. Die bei **2** auftretenden negativen NOEs können deshalb eindeutig als Transfer-NOEs interpretiert werden, anders als bei den Untersuchungen mit Sialyl-Lewis<sup>X</sup> **1**, [4c] bei denen negative NOEs auch im ungebundenen Zustand festgestellt wurden. Die umgekehrten Vorzeichen der NOEs für ungebundenes **1** und **2** sind auf die unterschiedliche Molekülbewegung in Lösung, bedingt durch die unterschiedlichen Molekülmassen, zurückzuführen (**1**:  $M_r$  991.0, **2**:  $M_r$  578.6).

Transfer-NOE-Spektren des Sialyl-Lewis<sup>X</sup>-Mimetikums **2** wurden mit Mischzeiten von 25, 50, 80, 100, 150, 200 und 300 ms aufgenommen. Zusätzlich wurde ein Transfer-ROE-Experiment mit einer Mischzeit von 80 ms durchgeführt. Die Transfer-NOE-Intensitäten wurden durch Integration der Kreuzsignale erhalten und als Aufbaukurven dargestellt,

diese wurden von 38 intramolekularen Abständen analysiert. Anhand dieser Aufbaukurven und des Vorzeichens sowie der Stärke der ROEs wurden 22 Transfer-NOEs als direkte NOEs identifiziert, bei denen Spindiffusion keine dominante Rolle spielt. Diese 22 NOEs wurden als stark, mittel oder schwach klassifiziert und in Abstände bis 3.5 Å, 4.5 Å bzw. 5.5 Å übersetzt. Transfer-NOEs, die in Transfer-NOE-Spektren mit Mischzeiten unter 100 ms eindeutig fehlten und für die keine NOEs beim freien Liganden detektiert wurden, wurden in Abstände größer als 4 Å übersetzt. In Tabelle 2 sind die direkten NOEs zusammen mit den entsprechenden Abstandsgrenzen aufgeführt. Diese Grenzen sind weniger eng als die

Tabelle 2. Aus Transfer-NOE-Untersuchungen erhaltene Abstandsgrenzen für die Strukturrechnungen der bioaktiven Konformation des Sialyl-Lewis<sup>x</sup>-Mimetikums **2** [a].

	$r_{\min}$ [Å]	$r_{\max}$ [Å]
H1 <sup>Fuc</sup> -H6 <sup>eCyc-2</sup>		3.5
H1 <sup>Fuc</sup> -H6 <sup>aCyc-2</sup>		4.5
H3 <sup>Fuc</sup> -H2 <sup>Gal</sup>		4.5
H4 <sup>Fuc</sup> -H2 <sup>Gal</sup>		4.5
H5 <sup>Fuc</sup> -H2 <sup>Gal</sup>		3.5
H5 <sup>Fuc</sup> -H6 <sup>Gal</sup>		4.5
H6 <sup>Fuc</sup> -H2 <sup>Gal</sup>		4.5
H2 <sup>Cyc-2</sup> -H1 <sup>Gal</sup>		3.5
H3 <sup>eCyc-2</sup> -H1 <sup>Gal</sup>		3.5
H3 <sup>aCyc-2</sup> -H1 <sup>Gal</sup>		4.5
H1 <sup>Gal</sup> -H $\alpha$ <sup>Cyc-1</sup>		5.5
H2 <sup>Gal</sup> -H $\alpha$ <sup>Cyc-1</sup>		5.5
H2 <sup>Gal</sup> -H1 <sup>Cyc-1</sup>	4.0	
H2 <sup>Gal</sup> -H $\beta$ <sup>Cyc-1</sup>	4.0	
H3 <sup>Gal</sup> -H $\beta$ <sup>Cyc-1</sup>	4.0	
H3 <sup>Gal</sup> -H $\alpha$ <sup>Cyc-1</sup>		3.5
H5 <sup>Gal</sup> -H $\alpha$ <sup>Cyc-1</sup>		5.5
H2 <sup>eCyc-1</sup> -H $\alpha$ <sup>Cyc-1</sup>		4.5
H2 <sup>aCyc-1</sup> -H4 <sup>Gal</sup>	4.0	
H6 <sup>aCyc-1</sup> -H $\alpha$ <sup>Cyc-1</sup>	4.0	

Fuc = Fucose, Gal = Galactose;  $r_{\min}$  = Mindestabstand,  $r_{\max}$  = Maximalabstand. Die beiden Abstandsgrenzen, die aus dem Fehlen von NOEs abgeleitet werden und sich auf H $\beta$ <sup>Cyc-1</sup> beziehen, werden auf beide H $\beta$ -Protonen individuell angewendet. Wo kein Mindestabstand angegeben ist, entspricht die Grenze der Summe der van-der-Waals-Radien.

Grenzen, die bei Verwendung der Isolated Spin Pair Approximation (ISPA)<sup>[7]</sup> erhalten wurden. Da das Mimetikum **2** mehr als zehnmal stärker bindet als das natürliche Epitop Sialyl-Lewis<sup>x</sup> **1**, würden engere Abstände auf der Basis von ISPA keine akkurateren Daten liefern. Die große Zahl von Abstandsgrenzen kompensiert das Fehlen der Präzision individueller Abstände und definiert die Strukturen sehr gut. Die Strukturberechnungen wurden mit dem Distanzgeometrie-Programm DGII durchgeführt.

Eine Überlagerung von 19 berechneten Strukturen des an E-Selectin gebundenen Sialyl-Lewis<sup>x</sup>-Mimetikums **2** ist in Abbildung 2b gezeigt. Während die Position des endständigen Cyclohexylrings nicht gut definiert ist, ist die Carboxygruppe eindeutig aus der Papierebene heraus zum Betrachter gerichtet. Die Fucose- und Galactoseringe, die durch den (1R,2R)-1,2-Cyclohexandiol-Spacer getrennt sind, liegen übereinander. Abbildung 2c zeigt die gleichen Strukturen aus einem anderen Blickwinkel. Man sieht hier, daß der C $\alpha$ -C(O)-Bindungsvektor der (S)-Cyclohexylmilchsäure durch die NMR-Daten gut definiert ist. Die Lage der Sauerstoffatome ist jedoch wegen des Fehlens gebundener Protonen unbestimmt, so daß die Carboxygruppe frei drehbar erscheint. Ein Vergleich der bioaktiven Konformationen von **1** und **2** (Abb. 2a, b) zeigt, daß die Konformationen des Moleküllerns

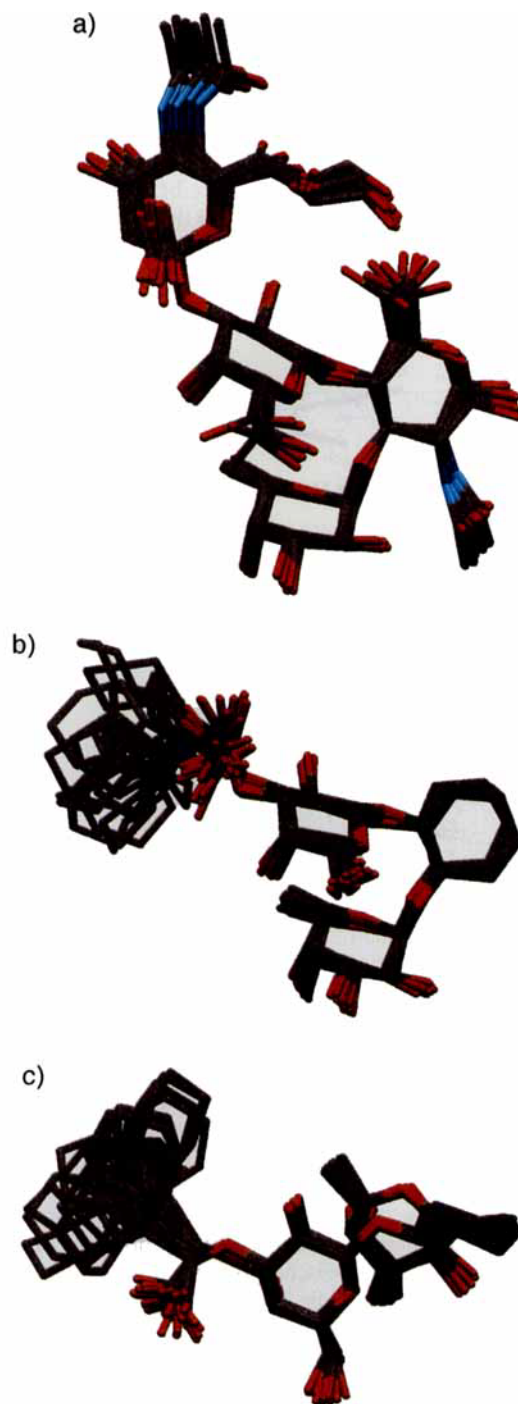


Abb. 2. Bioaktive Konformationen von E-Selectin-Liganden: a) Überlagerung von 10 berechneten Strukturen von **1**, gebunden an E-Selectin[4c]. b) Überlagerung von 19 Strukturen von an E-Selectin gebundenem **2**, berechnet mit dem Distanzgeometrie-Programm DGII. c) Bildteil b) aus einem anderen Blickwinkel.

von gebundenem Sialyl-Lewis<sup>x</sup> **1**<sup>[4c]</sup> und gebundenem **2** sehr ähnlich sind. Charakteristisch für beide Moleküle ist die gestaffelte Anordnung des Moleküllerns. Auch die Carboxygruppen der N-Acetylneuraminsäure und der (S)-Cyclohexylmilchsäure sind gleich ausgerichtet, während der restliche Teil der N-Acetylneuraminsäure in **1** und der Cyclohexylring in **2** eindeutig in eine andere Richtung orientiert sind. Der Vergleich der bioaktiven Konformationen von **1** und **2** kann in einem internen Koordinatenplot quantifiziert werden. In Abbildung 3 ist die Konformation des Moleküllerns, definiert

durch den Diederwinkel  $C2^{NeuNAc}-O^{GlcNAc}/Fuc-C1^{Fuc}-C4^{Fuc}$ , gegen die Orientierung der Säure, definiert durch den Diederwinkel  $C1^{NeuNAc}-C2^{NeuNAc}-O^{GlcNAc}/Fuc-C1^{Fuc}$ , aufgetragen. In diesem internen Koordinatensystem beträgt der Diederwinkel, der die Konformation des Moleküllerns bestimmt, in **2**  $-36.4(5.8)^\circ$  und in **1**  $-40.2(4.7)^\circ$ . Der Diederwinkel, der die Orientierung der Säure beschreibt, beträgt  $120.5(16.1)^\circ$  in **2** und  $110.7(9.0)^\circ$  in **1**. Die bioaktiven Konformationen von **1** und **2** überlappen also im internen Koordinatenplot und stimmen deshalb im Rahmen der Meßgenauigkeit überein.

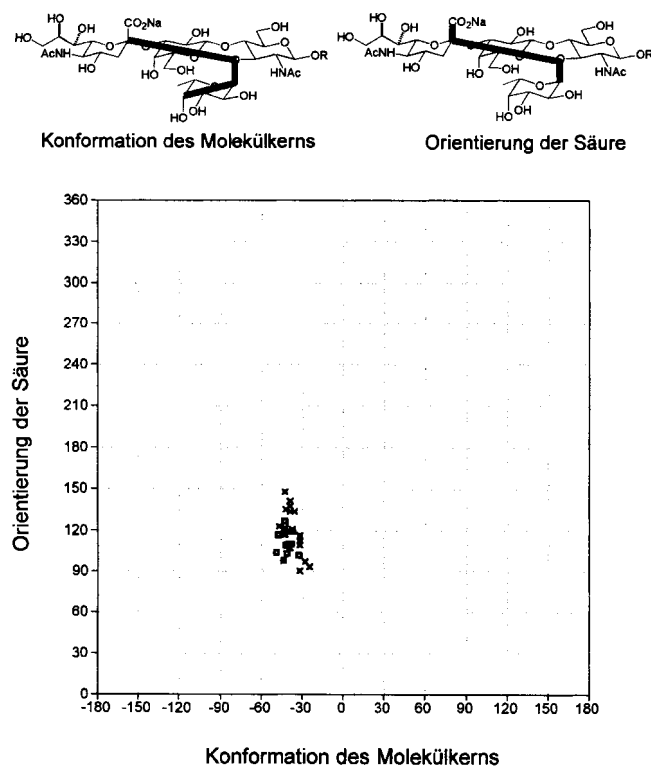


Abb. 3. Interner Koordinatenplot [5] der bioaktiven Konformationen von **1** ( $\square$ ) **2** ( $\times$ ). Näheres siehe Text.

Die Anwesenheit der Carboxygruppe ist eine Voraussetzung für die biologische Aktivität.<sup>[8]</sup> Neuere Untersuchungen zufolge hängt die Bioaktivität eines potentiellen Mimetikums mit seiner Fähigkeit zusammen, die benötigte Orientierung der Carboxygruppe zu präsentieren.<sup>[5,8b]</sup> Die Resultate der vorliegenden Untersuchungen erhärten diese Hypothese, indem sie zeigen, daß die Carboxygruppe in den bioaktiven Konformationen von Sialyl-Lewis<sup>X</sup> **1** und im Mimetikum **2** tatsächlich gleich orientiert ist. Zusammenfassend stellen wir fest, daß alle funktionellen Gruppen in **1**, die für die Bindung benötigt werden (siehe Schema 1), in **2** sehr ähnlich orientiert sind. Dies spricht dafür, daß beide Liganden in gleicher Art und Weise binden.

Schlecht definierte Teile in Strukturen, die aus NMR-Daten berechnet wurden, hier z.B. die Orientierung des endständigen Cyclohexylrings, können zwei völlig unterschiedliche Ursachen haben: Zum einen kann echte Flexibilität und die damit verbundene Abnahme der Korrelationszeit von Interprotonvektoren zum Fehlen von NOEs führen, auch wenn zwei Protonen zumindest zeitweise benachbart sind. Zum anderen kann ein Mangel an NOEs auch in starren Molekülen einfach durch einen Mangel benachbarter Protonen verur-

sacht werden und Flexibilität vortäuschen, wenn Strukturen nur auf der Basis von NOEs berechnet werden. Im Falle des Mimetikums **2** könnte der beobachtete Mangel an NOEs für den endständigen Cyclohexylring dann nur auf eine gestreckte Konformation des Rings zurückzuführen sein, unabhängig von dessen Flexibilität. Die beiden möglichen Ursachen können für das Mimetikum **2** also nicht eindeutig unterschieden werden. Dies wäre im Prinzip möglich durch Messung von  $^{13}C$ -Relaxationsparametern und deren Interpretation im Rahmen geeigneter Modelle,<sup>[9]</sup> doch wurde eine solche Untersuchung bisher nicht durchgeführt und erscheint für gebundenes Sialyl-Lewis<sup>X</sup> sehr schwierig. Es sollte festgehalten werden, daß der ungeordnete Cyclohexylring nicht notwendigerweise Mobilität im gebundenen Zustand widerspiegelt.

Das rationale Design von Sialyl-Lewis<sup>X</sup>-Mimetika hängt entscheidend von der Kenntnis der Struktur ihrer Komplexe mit E-Selectin ab. Zwar wurde noch keine Struktur eines Komplexes von E-Selectin mit einem Liganden publiziert, aber die Struktur von E-Selectin im Kristall<sup>[10]</sup> und die aus NMR-Daten berechneten Strukturen von Sialyl-Lewis<sup>X</sup> **1**<sup>[4]</sup> und dem Mimetikum **2**, beide gebunden an E-Selectin, sind nun verfügbar. Durch Bindungsstudien mit Sialyl-Lewis<sup>X</sup>-Analoga lassen sich die funktionellen Gruppen bestimmen, die an der Wechselwirkung mit dem Rezeptor beteiligt sind,<sup>[11]</sup> und durch Punktmutationsstudien an E-Selectin wurden die Aminosäuren identifiziert, die für die Bindung von Sialyl-Lewis<sup>X</sup> **1** verantwortlich sind.<sup>[12]</sup> Auf der Grundlage dieser Daten ist es möglich, ein Modell des E-Selectin/Sialyl-Lewis<sup>X</sup>-Komplexes zu erstellen, das das rationale Design weiterer potenter Sialyl-Lewis<sup>X</sup>-Analoga erleichtert.

### Experimentelles

Die Ektodomänen von humanem E-Selectin wurden durch Polymerase-Kettenreaktion (PCR) mit der Fc-Region von humanem IgG1 kombiniert und in den Expressionsvektor pcDNA1/neo (Invitrogen) kloniert. Durch Transfektion von CHO-K1-Zellen (ATCC CCL-61) und Selektion mit G418 (Gibco) wurde eine stabile Zelllinie erhalten, die ca.  $25 \mu\text{g mL}^{-1}$  rekombinantes E-Selectin/hlgG sekretierte. Zur Produktion größerer Mengen wurde diese Zelllinie in einem Hohlfasereaktor ( $1.1 \text{ m}^2$ , 50 mL, Cellco) in Opti-MEM-KulturmEDIUM (Gibco) kultiviert, das mit 2% fötalem Kälberserum und  $200 \text{ mg mL}^{-1}$  Gentamycin ergänzt wurde. Konditionierte Zellüberstände wurden zuerst durch Affinitätschromatographie an Protein-A-Agarose (Sigma) gereinigt. Die durch Elution mit 20 mM Glycin-HCl, pH 3.0, erhaltene Proteinfraction wurde nach Neutralisierung direkt an einer Anti-Human-E-Selectin-Affinitätsäule (2 mg monoklonaler Antikörper 7A9 pro mL Affigel) chromatographisch gereinigt. Spezifisch gebundenes E-Selectin/IgG wurde mit 5 M Harnstoff in gepufferter Salzlösung eluiert und anschließend gegen Dubeccos PBS-Lösung (PBS = phosphate buffered saline) dialysiert. Das erhaltene Protein wies in einer Natriumdodecylsulfat (SDS)-Polyamidgelelektrophorese unter reduzierenden Bedingungen eine einzige Bande bei ca. 140 kDa auf. Für die NMR-Analyse wurden ca. 6 mg E-Selectin/hlgG gegen 50 mM perdeuteriertes Imidazol (Sigma), 1 mM  $\text{CaCl}_2$ , pH 7.4, in  $\text{D}_2\text{O}$  dialysiert und mit Centricon YM-50 (Amicon) auf ein Endvolumen von 0.5 mL konzentriert.

$\text{IC}_{50}$ -Werte wurden mit einem Standard-ELISA-Assay bestimmt. Dazu wurde E-Selectin/hlgG und sLe<sup>x</sup>-enthaltendes, biotinyliertes Polymer verwendet. Die Näpfchen einer Mikrotiterplatte (Platte 1, Falcon probind) wurden mit E-Selectin/hlgG beschichtet, indem  $100 \mu\text{L}$  des gereinigten E-Selectin/hlgG mit einer Konzentration von 200 ng pro Näpfchen in 50 mM Tris-Puffer, 0.15 M NaCl, 2 mM  $\text{CaCl}_2$ , pH 7.4 (Tris- $\text{Ca}^{2+}$ ) inkubiert wurden. Nach 2 h wurden  $100 \mu\text{L}$  einer 1:1-Mischung aus 1% BSA in Tris- $\text{Ca}^{2+}$  und Stabilcoat zu jedem Näpfchen zugegeben und bei  $22^\circ\text{C}$  inkubiert, um unspezifische Bindung zu blockieren. Währenddessen wurden die zu testenden, in Tris- $\text{Ca}^{2+}$  und 1% BSA gelösten Inhibitoren durch aufeinanderfolgende zweifache Verdünnung in eine zweite U-förmige Mikrotiterplatte (Platte 2, Costar) titriert. In jedes Näpfchen wurde ein gleiches Volumen eines vorgebildeten Komplexes von biotinyliertem sLe<sup>x</sup>-Polymer und Meerrettich-Peroxidase-markiertem Streptavidin (KPL, Gathersburg, MD, USA;  $1 \text{ mg mL}^{-1}$  in Tris- $\text{Ca}^{2+}$ , 1% BSA) gegeben. Nach 2 h bei  $22^\circ\text{C}$  wurde Platte 1 mit Tris- $\text{Ca}^{2+}$  gewaschen, und  $100 \mu\text{L}$  pro Näpfchen wurden von Platte 2 nach Platte 1 transferiert. Die Bindungsreaktion wurde 2 h unter Schütteln bei  $22^\circ\text{C}$  fortgesetzt. Platte 1 wurde dann mit Tris- $\text{Ca}^{2+}$  gewaschen,

und jedes Nöpfchen wurde mit 100  $\mu\text{L}$  3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin-Substrat (KPL, Gathersburg, MD, USA) versetzt. Nach drei Minuten wurde die colorimetrische Reaktion durch Zugabe von 100  $\mu\text{L}$  1M  $\text{H}_2\text{PO}_4$  pro Nöpfchen beendet, und die optische Dichte wurde bei 450 nm bestimmt.

Alle NMR-Experimente wurden bei 25 °C mit einem Varian-UnityPlus-600-MHz-Spektrometer ausgeführt; es wurden susceptibilitätsangepaßte NMR-Röhrchen (Shigemi) mit einem Probenvolumen von 220  $\mu\text{L}$  verwendet. Die Probe enthielt 35  $\mu\text{M}$  E-Selectin-Konstrukt und 1750  $\mu\text{M}$  des Sialyl-Lewis<sup>x</sup>-Mimetikums **2** in 100 mM deuteriertem Imidazol (pH 7.4) und 1 mM  $\text{CaCl}_2$  in  $\text{D}_2\text{O}$ . Da jedes E-Selectin/HlgG-Molekül zwei Bindungsstellen für Sialyl-Lewis<sup>x</sup> enthält, betrug das tatsächliche Verhältnis Protein:Ligand 1:25. NOESY-Spektren wurden mit einem Spinlock-Filter[6] vor  $t_1$  von 20 ms Dauer und 9 kHz Feldstärke aufgenommen. Die Repetitionszeit betrug 1.85 s. Die Spektren wurden mit 384 komplexen Punkten in  $t_1$  und 32 Scans pro  $t_1$ -Inkrement aufgenommen.

Die Strukturrechnungen wurden mit dem Distanzgeometrie-Programm DGII (INSIGHTII, MSI) auf einer SGI-Workstation durchgeführt. 22 nichttriviale, von NOE-Daten abgeleitete Abstandsgrenzen wurden verwendet. Die Konformation der vier Kohlenhydratringe wurde für das ungebundene Mimetikum **2** aus homonuclearen und heteronuclearen Kopplungskonstanten abgeleitet und durch Analyse von Transfer-NOE-Intensitäten für gebundenes **2** plausibilisiert. Die Zuckerkonformationen wurden durch 36 Abstandsgrenzen zwischen Kohlenstoffatomen, die weniger als 3 Å im selben Ring auseinander liegen, fixiert. 50 Strukturen wurden mit der Dreiecksbedingung geglättet und im vierdimensionalen Raum eingebettet. Die Strukturen wurden mit 10000 Simulated-Annealing-Schritten verfeinert. Dabei wurde die Molekülmasse mit dem Faktor 1000 multipliziert. Die Strukturen wurden dann in 250 Schritten energieminiert (conjugate gradient). Die Summe der van-der-Waals-Radien wurde zur Einschränkung verwendet. Alle anderen nichtbindenden Wechselwirkungen wurden von den Rechnungen ausgeschlossen, um mögliche von Kraftfeldparametern hervorgerufene Artefakte zu eliminieren. Dadurch spiegelt die Strukturvielfalt im Ensemble der Strukturen tatsächlich die gemessenen Daten wider und ist nicht bloß eine Folge der Energieminimierung. 19 berechnete Strukturen konvergierten zu Konformationen, die alle Abstandseinschränkungen innerhalb von 0.05 Å erfüllen. Der rmsd-Wert der Strukturen betrug 0.25 Å für die Schweratome von Fucose, Galactose, (1R,2R)-1,2-Cyclohexandiol (cyc-2) und die Ca-C(O)-Atome der (S)-Cyclohexylmilchsäure (cyc-1). Der rmsd-Wert für alle Schweratome des Moleküls betrug 1.16 Å.

Eingegangen am 20. Mai 1997 [Z10449]

**Stichwörter:** Kohlenhydrate • NMR-Spektroskopie • Sialyl-Lewis<sup>x</sup>

- [1] a) S. R. Sharar, R. K. Winn, J. M. Harlan, *Springer Semin. Immunopathol.* **1995**, 16, 359–378; b) F. Dasgupta, B. N. N. Rao, *Exp. Opin. Invest. Drugs* **1994**, 3, 709–724; c) J. K. Welply, J. L. Keene, J. J. Schmuke, S. C. Howard, *Biochim. Biophys. Acta* **1994**, 1197, 215–226; d) R. P. McEver, *Curr. Opin. Immunol.* **1994**, 6, 75–84; e) S. D. Rosen, C. R. Bertozzi, *Curr. Opin. Cell Biol.* **1994**, 6, 663–673.
- [2] a) H. Ohmoto, K. Nakamura, T. Inoue, N. Kondo, Y. Inoue, K. Yoshino, H. Kondo, H. Ishida, M. Kiso, A. Hasegawa, *J. Med. Chem.* **1996**, 39, 1339–1343; b) M. Yoshida, A. Uchimura, M. Kiso, A. Hasegawa, *Glycoconjugate J.* **1993**, 10, 3–15; c) B. K. Brandley, M. Kiso, S. Abbas, P. Nikrad, O. Srivastava, C. Foxall, Y. Oda, A. Hasegawa, *Glycobiology* **1993**, 3, 633–639; d) M. W. Cappi, W. J. Moree, L. Qiao, T. G. Marron, G. Weitz-Schmidt, C.-H. Wong, *Angew. Chem.* **1996**, 108, 2501–2503; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1996**, 35, 2346–2348; e) G. Dekany, K. Wright, P. Ward, I. Toth, *J. Carbohydr. Chem.* **1996**, 15, 383–398; f) C.-C. Lin, M. Shimazaki, M.-P. Heck, S. Aoki, R. Wang, T. Kimura, H. Ritzén, S. Takayama, S.-H. Wu, G. Weitz-Schmidt, C.-H. Wong, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, 118, 6826–6840; g) J. C. Prodder, M. J. Bamford, M. I. Bird, P. M. Gore, D. S. Holmes, R. Priest, V. Saez, *Bioorg. Med. Chem.* **1996**, 4, 793–801; h) S. Hanessian, H. Prabhakaran, *Synlett* **1994**, 868–870; i) B. Dupré, H. Bui, I. L. Scott, R. V. Market, K. M. Keller, P. J. Beck, T. P. Kogan, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1996**, 6, 569–572; k) J. Y. Ramphal, M. Hiroshige, B. Lou, J. J. Gaudino, M. Hayashi, S. M. Chen, L. C. Chiang, F. C. A. Gaeta, S. A. DeFrees, *J. Med. Chem.* **1996**, 39, 1357–1360.
- [3] a) G. M. Clore, A. M. Gronenborn, *J. Magn. Reson.* **1982**, 48, 402–417; b) A. P. Campbell, B. D. Sykes, *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **1993**, 22, 99–122; c) F. Ni, *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* **1994**, 26, 517–606.
- [4] a) R. M. Cooke, R. S. Hale, S. G. Lister, G. Shah, M. P. Weir, *Biochemistry* **1994**, 33, 10591–10596; b) P. Hensley, P. J. McDevitt, I. Brooks, J. J. Trill, J. A. Feild, D. E. McNulty, J. R. Connor, D. E. Griswold, N. V. Kumar, K. D. Kopple, S. A. Carr, B. J. Dalton, K. Johanson, *J. Biol. Chem.* **1994**, 269, 23949–23958; c) K. Scheffler, B. Ernst, A. Katopodis, J. L. Magnani, W. T. Wang, R. Weisemann, T. Peters, *Angew. Chem.* **1995**, 107, 2034–2037; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1995**, 34, 1841–1844.

- [5] a) H. C. Kolb, B. Ernst, *Chem. Eur. J.* **1997**, 3, 1571–1578; b) *Pure Appl. Chem.* **1997**, 69, 1879–1884.
- [6] T. Scherf, J. Anglister, *Biophys. J.* **1993**, 64, 754–761.
- [7] A. M. Gronenborn, G. M. Clore, *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* **1985**, 17, 1–32.
- [8] a) C.-T. Yuen, A. M. Lawson, W. Chai, M. Larkin, M. S. Stoll, A. C. Stuart, F. X. Sullivan, T. J. Ahern, T. Feizi, *Biochemistry* **1992**, 31, 9126–9131; b) G. Thoma, F. Schwarzenbach, R. O. Duthaler, *J. Org. Chem.* **1996**, 61, 514–524.
- [9] a) G. Lipari, A. Szabo, *J. Am. Chem. Soc.* **1982**, 104, 4546–4559; b) R. Brüschweiler, D. Case, *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* **1994**, 26, 27–58.
- [10] B. J. Graves, R. L. Crowther, C. Chandran, J. M. Rumberger, S. Li, K.-S. Huang, D. H. Presky, P. C. Familletti, B. A. Wolitzky, D. K. Burns, *Nature* **1994**, 367, 532–538.
- [11] a) J. Y. Ramphal, Z.-L. Zheng, C. Perez, L. E. Walker, S. A. DeFrees, F. C. A. Gaeta, *J. Med. Chem.* **1994**, 37, 3459–3463; b) W. Stahl, U. Sprengard, G. Kretschmar, H. Kunz, *Angew. Chem.* **1994**, 106, 2186–2188; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1994**, 33, 2096–2098; c) A. Hasegawa, M. Kato, T. Ando, H. Ishida, M. Kiso, *Carbohydr. Res.* **1995**, 274, 165–181.
- [12] a) D. V. Erbe, B. A. Wolitzky, L. G. Presta, C. R. Norton, R. J. Ramos, D. K. Burns, J. M. Rumberger, B. N. N. Rao, C. Foxall, B. K. Brandley, L. A. Lasky, *J. Cell Biol.* **1992**, 119, 215–227; b) B. M. Revelle, D. Scott, T. P. Kogan, J. Zheng, P. J. Beck, *J. Biol. Chem.* **1996**, 271, 4289–4297; c) B. M. Revelle, D. Scott, P. J. Beck, *ibid.* **1996**, 271, 16160–16170.

## Sterisch gehinderte stabile nucleophile Carbene\*\*

Michael K. Denk,\* Avinash Thadani, Ken Hatano und Alan J. Lough

Nach frühen Untersuchungen von Wanzlick et al.<sup>[1]</sup> wurde die Chemie stabiler Carbene<sup>[1–7]</sup> 1991 durch die strukturelle Charakterisierung eines isolierbaren Carbens des Typs **1** (R=1-Adamantyl) wiederbelebt.<sup>[2]</sup> Solche Carbene sind nun leicht zugänglich,<sup>[2,3]</sup> und ihre Chemie ist sehr vielfältig.<sup>[2–4]</sup> Theoretische Untersuchungen haben bestätigt, daß Carbene des Typs **1** aromatisch stabilisiert sind.<sup>[5]</sup> Der Vielzahl bekannter isolierbarer Carbene<sup>[2–4]</sup> stehen mit **2**<sup>[6]</sup> und **3** (R=Mesityl)<sup>[7]</sup> bislang nur zwei nichtaromatische Verbindungen gegenüber. Die Isolierung des stabilen Bis(diisopropylamino)carbens **2** durch Alder et al.<sup>[6]</sup> zeigt erstmals, daß weder aromatische Delokalisierung noch stabilisierende Beiträge der Ringgeometrie notwendig sind, um stabile Diaminocarben zu erhalten. Die Isolierbarkeit von Carbenen ist begrenzt, da sie zu Olefinen dimerisieren können,<sup>[8–11]</sup> doch ist die Dimerisierung bei Carbenen **1** nach Chen et al.<sup>[11]</sup> thermodynamisch nicht begünstigt.

Nach der Untersuchung der zu den Carbenen **1** und **3** isostrukturellen, isolierbaren Silylene,<sup>[12]</sup> Germylene<sup>[13]</sup> und Phospheniumkationen<sup>[14]</sup> zeigen wir nun, daß die Isolierbarkeit der Carbene **3** anders als bei **1** lediglich kinetisch bedingt ist und in kritischer Weise von der Größe des Substituenten R abhängt. Die neuen Carbene **3a–3d** wurden durch reduktive Entschwefelung der entsprechenden Thioharnstoffe<sup>[15]</sup> mit Kalium in siedendem THF erhalten, wie von Kuhn et al.<sup>[16]</sup> für Carbene **2** bereits beschrieben wurde. Die analogen Harn-

[\*] Prof. Dr. M. K. Denk, A. Thadani, Dr. K. Hatano, Dr. A. J. Lough  
University of Toronto, Department of Chemistry, Erindale College  
3359 Mississauga Rd. North, Mississauga, Ontario L5L 1C6 (Kanada)  
Telefax: Int. + 905/828-5335  
E-mail: mdenk@credit.erin.utoronto.ca

[\*\*] Die Autoren danken Prof. Roger Alder (Bristol) für wichtige Diskussionsbeiträge und die Mitteilung unveröffentlichter Ergebnisse<sup>[6b,19]</sup> sowie dem Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC) und dem Connaught Fund der University of Toronto für die Förderung dieser Arbeit.