

Strategien zur dynamischen Verknüpfung von kombinatorischer Synthese und Screening^{**}

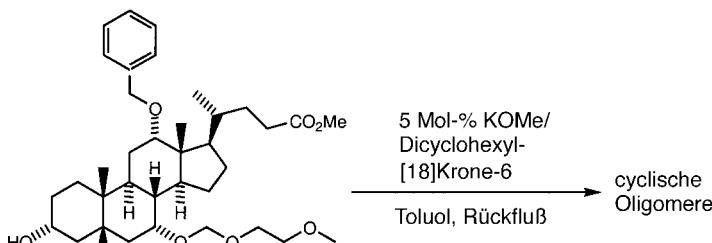
Arasu Ganesan*

In der Biologie ist die Herstellung und das Screening großer Populationen eine gängige Methode, die im Zentrum der Rekombinationstechnik steht und in der Natur während der Evolution genutzt wird. Von Chemikern werden diese Ansätze erst jetzt geschätzt: Die kombinatorische organische Synthese mit anschließendem Screening bei hohem Durchsatz ist zu einem wichtigen Teil der Wirkstoffentwicklung geworden.^[1]

Auch Bereiche wie die Materialwissenschaften, die Katalyse und die automatisierte Biosynthese werden zunehmend von Denkansätzen aus der kombinatorischen Chemie beeinflußt.^[2] Traditionell werden die Synthese von Bibliotheken und das Screening nacheinander durchgeführt. Bei den hier vorgestellten, aktuellen Beispielen ist die Bibliothekszusammensetzung „fließend“, d. h., sie ändert sich dynamisch während der Selektion der Komponente mit der gewünschten Eigenschaft.^[3]

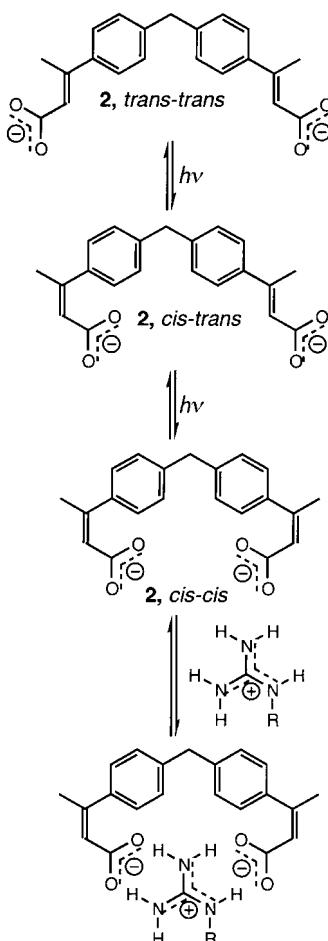
Die Idee zu diesem Konzept stammt ursprünglich aus dem Bereich der molekularen Erkennung. Ein Metallkation kann in Gegenwart mehrerer Liganden viele unterschiedliche Komplexe bilden. Unter Gleichgewichtsbedingungen ist die aktuelle Zusammensetzung allerdings von der thermodynamischen Stabilität der Komplexe abhängig.^[4] Der am stärksten bindende Ligand kann leicht durch Identifizierung der im Gleichgewicht vorherrschenden Verbindung ermittelt werden, ohne daß jeder Ligand einzeln untersucht werden muß. Lehn et al.^[5] haben diesen Ansatz als „die Auswahl aus einer virtuellen kombinatorischen Bibliothek“ beschrieben.^[6]

Die Gruppe von Sanders hat die Umesterung zur Herstellung kombinatorischer Bibliotheken genutzt. So wurde der Steroid-Hydroxyester **1** (Schema 1) durch Erhitzen vorwiegend zum makrocyclischen Trimer, Tetramer und Pentamer umgesetzt (83:12:5 in Massenprozenten).^[7] Wurde das Experiment mit einer äquimolaren Menge an NaI wiederholt, verschob sich das Gleichgewicht zugunsten der höhere Oligomere (61:24:14); dies ist wahrscheinlich auf einen Templateffekt des Polyethersubstituenten zurückzuführen. Durch Mischen zweier Hydroxyester-Monomere wurden auch gemischte Makrocyclen erhalten.^[8]



Schema 1. Thermodynamisch kontrollierte Umesterung.

Eliseev und Nelen haben eine photochemisch induzierte *cis-trans*-Isomerisierung des Dicarboxylats **2** genutzt, um eine Gleichgewichtsreaktion zu steuern (Schema 2).^[9] Von den drei geometrischen Isomeren hat die *cis,cis*-Form die optimale Struktur, um Guanidin über Salzbrücken zu binden. Nach ungefähr 30 Cyclen (bestehend aus Bestrahlung und Chromatographie an einer mit immobilisiertem Arginin modifizierten Säule) war die *cis,cis*-Form die dominante Form.



Schema 2. Amplifikation eines Guanidin-Rezeptors durch *cis-trans*-Isomerisierung.

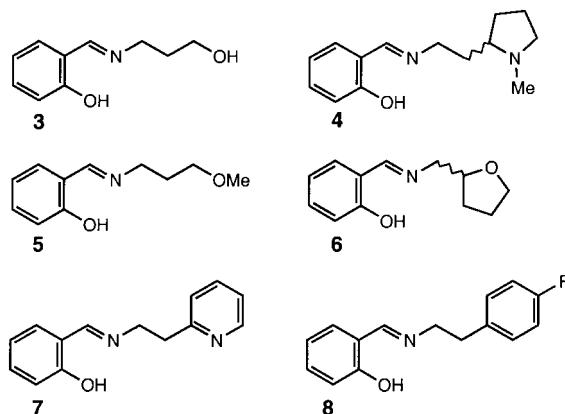
[*] Dr. A. Ganesan

Institute of Molecular and Cell Biology
National University of Singapore
30 Medical Drive, Singapore 117609 (Singapur)
Fax: (+65) 779-1117
E-mail: mcbgane@imcb.nus.edu.sg

[**] Ich danke Dr. Chris Larson (Salk Institute, San Diego), Dr. David Oare (Advanced Medicine Inc., South San Francisco) und Dr. Paramjeet Singh (Institute of Molecular and Cell Biology, Singapore) für hilfreiche Anmerkungen.

zierten Säule) änderte sich das Verhältnis der *cis,cis*-, *cis,trans*- und *trans,trans*-Isomere in Lösung von 3:28:69 zu 48:29:23, während das auf der Säule verbliebene **2** ein Isomerenverhältnis von 85:13:2 aufwies.

Die Zahl der Moleküle, die bei den angeführten Beispielen selektiert werden, ist sehr klein. Ein Beispiel, das von größerer praktischer Bedeutung ist, wurde von Klekota et al. vorgestellt.^[10] Die Aldimine **3–8** (Schema 3) können mit

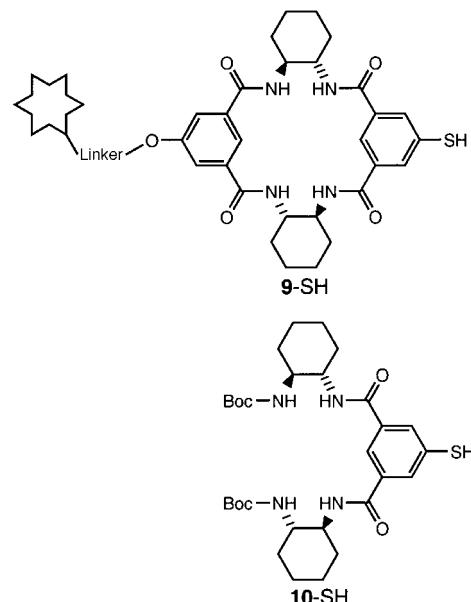


Schema 3. Salicylaldimine, die auf ihre DNA-Bindungsfähigkeit in Gegenwart von Zinkkationen untersucht wurden.

zweiwertigen Kationen insgesamt 36 Bis(salicylaldiminato)-Komplexe bilden. In Gegenwart von Zink im Überschuss nahm die Menge an **4**, das bei der Affinitätschromatographie an doppelsträngiger Poly-d(AT)-DNA von der Säule eluierte, beträchtlich ab. Unabhängig davon wurde festgestellt, daß der Komplex $Zn^{2+}(4)_2$ mit einer scheinbaren Gleichgewichtskonstante K_d von $1.1 \mu\text{M}$ an DNA bindet.

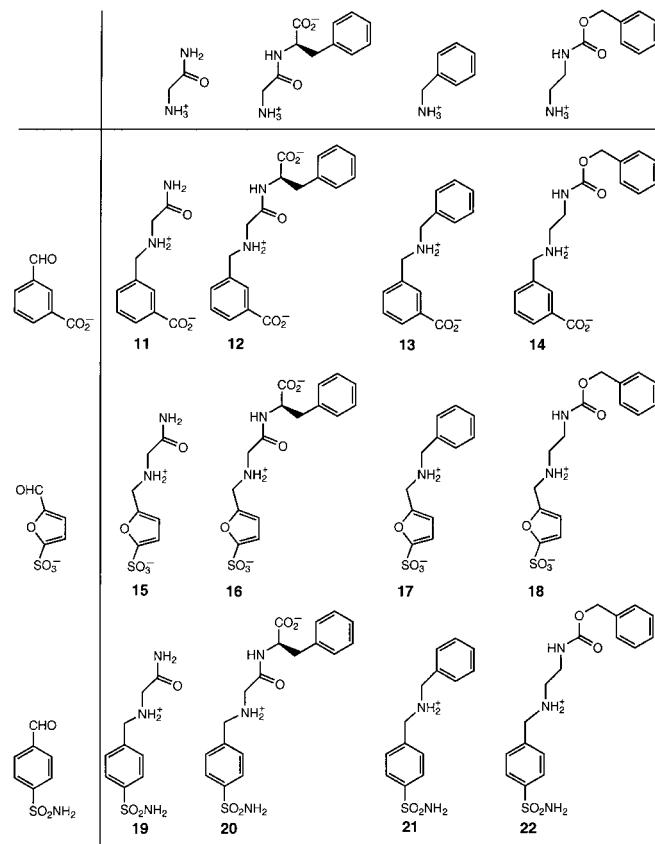
Die Gleichgewichtsverschiebung durch reversible Disulfidbindungsbildung wurde von Hioki und Still untersucht.^[11] Durch Screening einer an Harzkügelchen immobilisierten Tripeptidbibliothek wurden für das fluoreszierende Disulfid **9-S-S-9** Liganden identifiziert, wie Ac-D-Pro-L-Val-D-Val-Polystyrol (Schema 4). Die Inkubation des Disulfids mit Thiophenol lieferte eine Gleichgewichtsmischung aus 65 % **9-SS-9** und PhSSPh sowie 35 % **9-SSPh**. Fand die Gleichgewichtseinstellung dagegen in Gegenwart des immobilisierten Tripeptidliganden (3.7 Äquiv.) statt, erhielt man zu 95 % das Gemisch aus **9-SS-9** und PhSSPh. PhSSPh befand sich nahezu vollständig in Lösung, während die Harzkügelchen, an die **9-SS-9** gebunden vorlag, leicht durch den Fluoreszenzmarker identifiziert werden konnten. Das Disulfid wurde so in hoher Reinheit freigesetzt. In einem weiteren Experiment wurde die Gleichgewichtsreaktion des gemischten Disulfids **9-SS-10** mit **10-SH** untersucht. Auch hier verschob der Tripeptidligand das Gleichgewicht zugunsten der symmetrischen Disulfide **9-SS-9** und **10-SS-10**, wobei sich die Gleichgewichtskonstante von 1.8 zu 32 änderte.

Huc und Lehn nutzten die dynamische Gleichgewichtseinstellung zum Nachweis von Enzyminhibitoren.^[12] Durch Mischen von vier Aminen und drei Aldehyden wurden reversibel zwölf Imine gebildet (Tabelle 1), die durch Reduktion zu **11–22** abgefangen wurden. Darüber hinaus wurde die Reaktion in Gegenwart der Carboanhydrase durchgeführt



Schema 4. Tripeptidrezeptoren, die zur Gleichgewichtssteuerung der reversiblen Disulfidbindungsbildung genutzt wurden (der Stern stellt einen Farbstoff dar; Boc = Butoxycarbonyl).

Tabelle 1. Potentielle Inhibitoren der Carboanhydrase aus drei Aldehyden und vier Aminen.



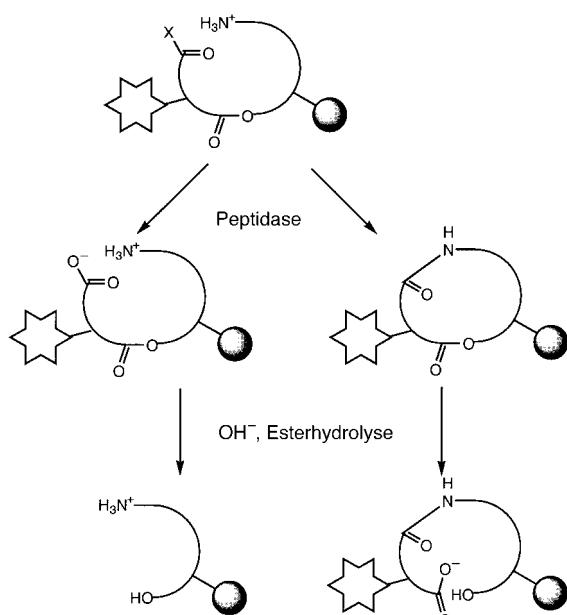
(ein Äquivalent bezogen auf die Aldehydkomponente), wobei die Amine in 15fachem Überschuß eingesetzt wurden, um Reaktionen mit den Lysinresten der Enzymseitenketten

weitestgehend zu verhindern: Gemäß HPLC-Analyse wurde der relative Anteil an **21** durch den Enzymzusatz fast verdoppelt. *para*-Substituierte Sulfonamide sind bekanntlich Inhibitoren der Carboanhydrase, und die Selektion von **21** anstelle von **19**, **20** oder **22** steht im Einklang mit den sterischen Anforderungen des Enzyms.

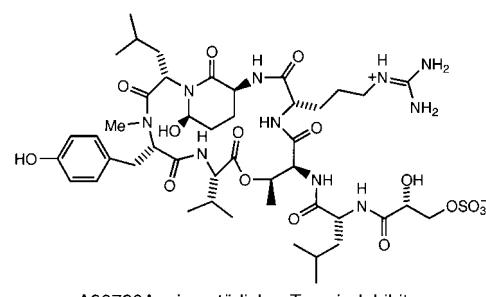
Swann et al.^[13] haben eine unspezifische Protease zur Katalyse der Peptidbindungsbildung und der Hydrolyse verwendet. Gemäß HPLC-Analyse lieferte die Inkubation der Peptide Tyr-Gly-Gly und Phe-Leu mit Thermolysin mindestens 15 Produkte. Die Reaktion wurde wiederholt, wobei man in die eine Hälfte eines Dialysators Thermolysin und die Peptide, in die andere Hälfte dagegen einen monoklonalen Antikörper gab ($c=1 \mu\text{g mL}^{-1}$), der den N-Terminus von β -Endorphin (Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu, $K_d = 7.1 \text{ nm}$) erkennt. Die Amplifikation dieses Pentapeptids konnte nicht direkt nachgewiesen werden; allerdings inhibierte die Mischung in geringem Maße die Bindung von radioaktiv markiertem β -Endorphin an den Antikörper. Auf ähnliche Weise wurden Trypsinhydrolysate von Rinderserumalbumin und das Peptid Gly-Pro-Arg (das bekanntlich Fibrinogen bindet) mit Thermolysin in Gegenwart von Fibrinogen inkubiert. Zwei Tetrapeptide, Gly-Pro-Arg-Leu und Gly-Pro-Arg-Phe, wurden identifiziert, die schwach an Fibrinogen binden ($K_d = 100 \mu\text{M}$). Wenn die beträchtlichen praktischen Probleme einer effizienten Peptid-Peptid-Gleichgewichtssteuerung überwunden werden, könnte diese Methode eine Alternative zum Phagen-Peptid-Display werden.

Bei einem kürzlich von Burger und Bartlett^[14] vorgestellten Beispiel findet zwar keine Gleichgewichtssteuerung statt, doch wird die Vorauswahl von geeigneten Bibliothekskomponenten bemerkenswerterweise von einem Zielmolekül getroffen. Da sowohl die Peptidbindungsbildung als auch die Hydrolyse über den gleichen Übergangszustand verlaufen, wären lineare Peptide, die in Gegenwart einer Peptidase cyclisieren, zugleich gute Template für Inhibitoren. Gemäß der Strategie in Schema 5 werden an Harzkügelchen gebundene, cyclisierfähige Substrate aus der Bibliothek ausgewählt. Das synthetische Peptid **23** (Schema 6) wurde aus dem Trypsininhibitor A90720A hergestellt, der aus einer Blaugrünlalge stammt (Gleichgewichtskonstante für die Bindung des Inhibitors $K_i = 10 \text{ nM}$ mit Rindertrypsin als Substrat). Das Peptid wurde durch Trypsin in einem Gemisch aus Wasser und einem organischen Lösungsmittel zum Makrocyclus **24** cyclisiert. Wie erwartet, ist **24** ein Substrat für Trypsin in wässriger Lösung; da aber bei niedrigen Enzymkonzentrationen ein langsamer Umsatz stattfindet, betrug die scheinbare Gleichgewichtskonstante $K_i = 230 \text{ nM}$ (berechnet). Vermutlich erhielt man einen effizienten Inhibitor, wenn die spaltbare Bindung durch ein Übergangszustandsanalogon ersetzt würde. Wie in dem Beispiel von Still et al. sollte eine Selektion unter Immobilisierung an Harzkügelchen das schnelle Screening großer Bibliotheken ermöglichen.

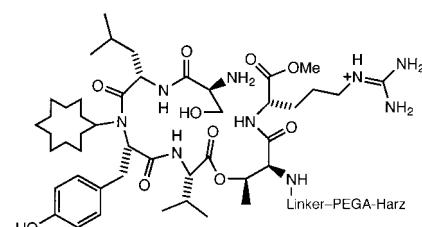
Das Konzept des dynamischen Maßschneiderns einer Bibliothekszusammensetzung steckt noch in den Kinderschuhen. Es ist prinzipiell durchführbar, wie anhand von Beispielen belegt wurde, bei denen die selektierte Komponente vorhergesagt werden konnte (abgesehen vom DNA-bindenden Zn^{2+} (**4**)₂). Bevor das Verfahren in vollem Maße



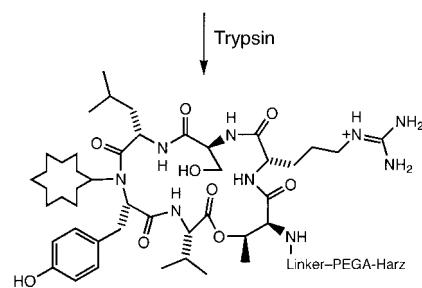
Schema 5. Eine Strategie zur Identifizierung makrocyclischer Substrate und Inhibitoren von Proteasen: Anders als das ungünstige Substrat (links) cyclisiert das günstige Substrat (rechts) in Gegenwart der Peptidase. Das nach Esterhydrolyse entstandene Produkt (rechts) fluoresziert im Gegensatz zum farbstofffreien Produkt links (der Farbstoff ist als Stern, die Harzkügelchen sind als Kugeln dargestellt).



A90720A, ein natürlicher Trypsin-Inhibitor



23, ein harzgebundenes synthetisches Analogon



24

Schema 6. Design eines Trypsin-Inhibitors. PEGA = Polyethylenglycolamid.

genutzt werden kann, müssen folgende Probleme gelöst werden:

1. Die Zahl der chemischen Reaktionstypen, die für eine Gleichgewichtssteuerung geeignet sind, ist wegen der notwendigen Reversibilität der Reaktion begrenzt. Bei komplexen Zusammensetzungen können auch im Falle vollkommen reversibler Reaktionen kinetische Barrieren auftreten, so daß nicht alle möglichen Komponenten innerhalb eines vernünftigen Zeitraums vollständig untersucht werden können.
2. Die Selektion eines biologischen Zielmoleküls, z.B. eines Proteins, hätte weitere Einschränkungen zur Folge (z.B. wässriges Medium, physiologische Temperaturen und pH-Werte). Darüber hinaus müßte das Zielmolekül in äquimolaren Mengen oder im Überschuß vorliegen. Daher sind Anwendungen dieses Konzepts möglicherweise leichter in den Materialwissenschaften zu verwirklichen als in der Wirkstoffentwicklung.
3. Wenn die Amplifikation nicht sehr hoch ist, so muß die Bibliothekszusammensetzung sorgfältig mit und ohne Selektion untersucht werden, so daß der Bibliotheksgröße in der Praxis Grenzen gesetzt sind.

Stichwörter: Kombinatorische Chemie • Molekulare Erkennung • Selektionsprozesse

[1] Für aktuelle Übersichtsartikel über die kombinatorische Chemie siehe: a) *Chem. Rev.* **1997**, 97(2); b) *Curr. Opin. Chem. Biol.* **1997**, 1(1); *Curr. Opin. Chem. Biol.* **1998**, 2 (3); N. K. Terrett, *Combinatorial Chemistry*, Oxford University Press, Oxford, **1998**. Für eine umfas-

sende und regelmäßig aktualisierte Internet-Datenbank siehe: <http://www.5z.com/divinfo/>.

- [2] Die Grenzen der kombinatorischen Chemie werden erörtert in: K. Burgess, *Chem. Eng. News* **1997**, 75(6), 4; D. P. Curran, P. Wipf, *Chem. Eng. News* **1997**, 75(11), 6; A. W. Czarnik, *Chem. Eng. News* **1997**, 75(11), 7.
- [3] Übersicht über Selektionstechniken: P. A. Brady, J. K. M. Sanders, *Chem. Soc. Rev.* **1997**, 26, 327–336.
- [4] Neuere Beispiele der Selbtaggregation: a) S. J. Rowan, D. G. Hamilton, P. A. Brady, J. K. M. Sanders, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, 119, 2578–2579; b) B. Hasenkopf, J.-M. Lehn, N. Boumediene, A. Dupont-Gervais, A. Van Dorsselaer, B. Kneisel, D. Fenske, *ibid.* **1997**, 119, 10956–10962; c) D. L. Caulder, K. N. Raymond, *Angew. Chem. Int. Engl.* **1997**, 109, 1508–1510; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1997**, 36, 1440–1442; d) S. Sakai, Y. Shigemasa, T. Sasaki, *Tetrahedron Lett.* **1997**, 38, 8145–8148; e) für einen selbtaggregierenden Katalysator siehe: C. L. Hill, X. Zhang, *Nature* **1995**, 373, 324–326.
- [5] B. Hasenkopf, J.-M. Lehn, B. O. Kneisel, G. Baum, D. Fenske, *Angew. Chem.* **1996**, 108, 1987–1990; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1996**, 35, 1838–1840.
- [6] Diese Terminologie kann verwirrend sein, da sie früher zur Beschreibung von Bibliotheken genutzt wurde, die vor der Synthese rechnerisch modelliert wurden. Übersicht: J. H. Van Drie, M. S. Lajiness, *Drug Discovery Today* **1998**, 3, 274–283.
- [7] P. A. Brady, J. K. M. Sanders, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1*, **1997**, 3237–3253.
- [8] S. J. Rowan, J. K. M. Sanders, *J. Org. Chem.* **1998**, 63, 1536–1546.
- [9] a) A. V. Eliseev, M. I. Nelen, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, 119, 1147–1148; b) *Chem. Eur. J.* **1998**, 4, 825–834.
- [10] B. Klekota, M. H. Hammond, B. L. Miller, *Tetrahedron Lett.* **1997**, 38, 8639–8642.
- [11] H. Hioki, W. C. Still, *J. Org. Chem.* **1998**, 63, 904–905.
- [12] I. Huc, J.-M. Lehn, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1997**, 94, 2106–2110.
- [13] P. G. Swann, R. A. Casanova, A. Desai, M. M. Frauenhoff, M. Urbancic, U. Slomczynska, A. J. Hopfinger, G. C. Le Breton, D. L. Venton, *Biopolymers* **1996**, 40, 617–625.
- [14] M. T. Burger, P. A. Bartlett, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, 119, 12697–12698.