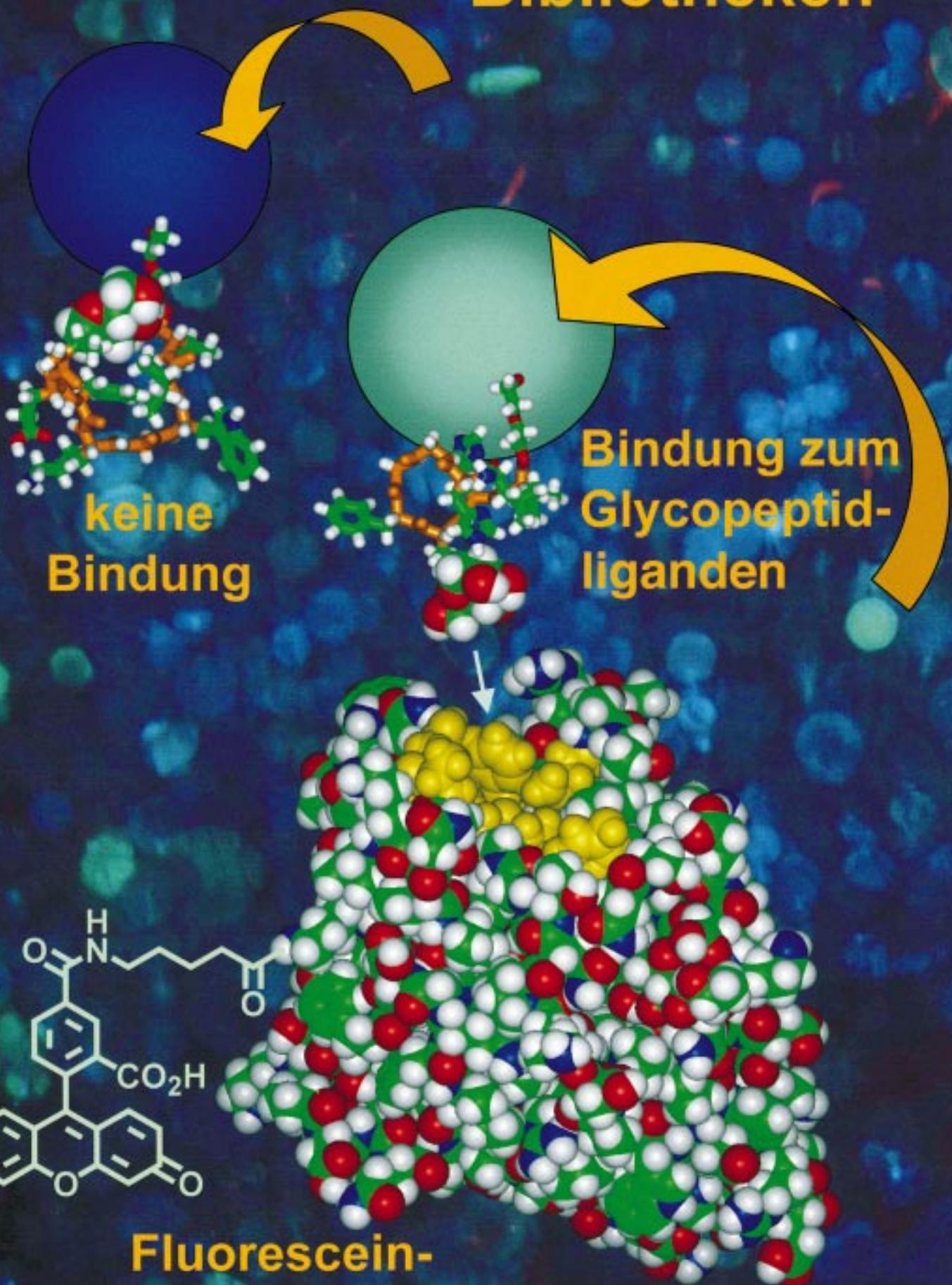


Oligosaccharidmimetika-Bibliotheken

ANGEWANDTE
CHEMIE © WILEY-VCH



Glycopeptid- und Oligosaccharidbibliotheken

Phaedria M. St. Hilaire und Morten Meldal*

Trotz zunehmenden Interesses an den vielfältigen biologischen Wirkungen und dem daraus resultierenden therapeutischen Potential der zahlreichen an Glycoproteinen und Zelloberflächen natürlich vorkommenden Oligosaccharide hat die Entwicklung der kombinatorischen Kohlenhydratchemie nicht so rasche Fortschritte gemacht, wie man anfangs erwartet hatte. Die Ursache dafür liegt in der Schwierigkeit, Oligosaccharide aufzubauen und zu analysieren, was ihre kombinatorische Synthese zu einer ziemlich mühsamen Aufgabe macht. Daher verwendete man häufig Parallelansätze, mit denen eher Anordnungen analoger Verbindungen als wirkliche Bibliotheken hergestellt werden. Da die Affini-

tät zwischen Kohlenhydratrezeptoren und modifizierten Oligosacchariden, die als Mimetika für natürliche Kohlenhydratliganden entwickelt wurden, im Allgemeinen niedrig ist, wurden Glycopeptide als alternative Mimetika untersucht. Diese erwiesen sich in vielen Fällen als bessere Liganden mit höherer Affinität zum Rezeptor als der natürliche Kohlenhydratligand. Für mehrere Rezeptortypen, darunter E-, P- und L-Selectin, Toxine, Glycohydrolasen, bakterielle Adhäsinen und der Mannose-6-phosphat-Rezeptor, wurden hochaffine Glycopeptidliganden hergestellt. Zudem ist der Aufbau von Glycopeptiden erheblich einfacher als der von Oligosacchariden, und das Verfahren kann durch Verwendung

glycosylierter Aminosäurebausteine oder durch direkte Glycosylierung von Peptidtemplaten zur kombinatorischen Synthese erweitert werden. Die „Split-and-mix“-Methode ermöglichte es, durch Stufensynthese eine sehr große Zahl von Verbindungen an fester Phase herzustellen, zu analysieren und ihre Bindung an Rezeptoren zu untersuchen. Dieses wirkungsvolle Verfahren lässt sich allgemein zum Nachweis und zur Analyse der komplizierten Wechselwirkung zwischen Kohlenhydraten und ihren Rezeptoren einsetzen.

Stichwörter: Glycopeptide • Kohlenhydrate • Kombinatorische Chemie • Oligosaccharide • Rezeptoren

1. Vergleich zwischen parallelen Verbindungsreihen und Substanzbibliotheken

Kombinatorische Methoden haben vielen Forschungsbereichen Schwung verliehen und seit ihrer Einführung vor etwa zehn Jahren beträchtlich an Boden gewonnen. Dieser Fortschritt spiegelte sich allerdings nicht auf dem Gebiet der Oligosaccharide wider – hauptsächlich wegen ihrer schwierigen Synthese und Analyse. Dagegen wurden die leicht zugänglichen Glycopeptidbibliotheken als potentielle funktionale Oligosaccharid-Mimetika genutzt. Diese Bibliotheken können wichtige Hilfsmittel bei der Entwicklung von Therapeutika auf Kohlenhydratbasis sein, z.B. von Antitumor-Impfstoffen,^[1] Hilfsmitteln für xenogene Transplantationen und Antiinfektiva. In einigen neueren Übersichten sind kombinatorisch hergestellte Bibliotheken und Parallelsyn-

thesen auf der Basis von Kohlenhydraten kurz beschrieben worden.^[2–9]

Wir geben hier einen umfassenden Überblick über die zahlreichen Aspekte bezüglich Design, Synthese, Analyse und Screening von Kohlenhydratbibliotheken in Lösung und an der Festphase. In diesem Aufsatz sind kombinatorisch hergestellte Substanzbibliotheken definiert als Zusammenstellungen von Verbindungen, die über einen realen kombinatorischen Reaktionsschritt erhalten wurden, der zu exponentiellem Wachstum der Produkte verglichen mit der Zahl der Reagentien führt (Abbildung 1a). Diese gewaltige Zunahme an Produkten lässt sich erreichen, indem entweder Reagentienmischungen umgesetzt werden, wobei Produktgemische entstehen, oder aber Zwischenstufen, die in Lösung oder als Kompartimente an fester Phase vorliegen, zunächst gemischt werden, beispielsweise mit der „Teilen-und-Mischen“-Methode (split and mix). Da dieses Verfahren an der Festphase sehr leicht durchzuführen ist, haben Festphasenbibliotheken bei weitem ein höheres Potential als Bibliotheken in Lösung und bilden daher den Schwerpunkt dieses Aufsatzes. Berücksichtigt werden auch kombinatorische Methoden, die nur beispielhaft auf die Synthese von Bibliotheken mit

[*] Prof. Dr. M. Meldal, Dr. P. M. St. Hilaire
Carlsberg Laboratory, Department of Chemistry
Gamle Carlsberg Vej 10, DK-2500 Valby (Dänemark)
Fax: (+45) 33-27-47-08
E-mail: mpm@crc.dk
pms@crc.dk

wenigen Verbindungen angewendet wurden, aber das Potential zur Herstellung sehr vieler Substanzen haben. Die Tatsache, dass es nur wenige Beispiele für echte kombinatorisch hergestellte Oligosaccharidbibliotheken gibt, unterstreicht die große Herausforderung, der Wissenschaftler auf diesem Gebiet gegenüberstehen.

Parallelsynthesen werden besonders für die Fälle beschrieben, bei denen die verwendete Strategie so erweitert werden kann, dass eine wirkliche Bibliothek entsteht, oder bei denen biologisch interessante Ergebnisse erhalten wurden. Diese Beispiele sind aber durchdachte Erweiterungen der konventionellen Herstellung von Analoga und keine Bibliotheken, da sie nicht einfach zu einer sehr großen Zahl von Verbindungen führen, d.h. das kombinatorische exponentielle Wachstum von Produkten nutzen (Abbildung 1 b).

2. Kohlenhydrat-bindende Proteine

Kohlenhydrat-bindende Proteine (carbohydrate binding proteins, CBPs), die in Zellmembranen lokalisiert sind oder sich im Cytosol oder Serum befinden, sind an zahlreichen wichtigen biologischen Funktionen wie der Zell-Zell-Kommunikation und -Adhäsion, der Adhäsion von Bakterien und Viren, der Aktivierung des angeborenen Immunsystems, dem „Rollen“ von Leukocyten sowie dem Klären gealterter Serumproteine und dem Sortieren neu synthetisierter Glycoproteine in der Leber beteiligt.^[10, 11] Die CBPs von Säuge-

tieren werden nach der Art ihrer Bindung in drei Hauptgruppen unterteilt: die C-, S- und P-Lectine.^[12]

Zu den Calcium-abhängigen C-Lectinen gehören die E-, L- und P-Selectine, während die Galectine Calcium-unabhängige S-Lectine sind. Diese haben eine für enge Wechselwirkungen mit Di- oder Trisacchariden passende Bindungsstelle. Selectine binden ihre Liganden hauptsächlich durch Koordinierung von zwei vicinalen Hydroxygruppen einer einzelnen Zuckereinheit an ein in der Kohlenhydraterkennungsregion (carbohydrate recognition domain, CRD) gebundenes Caclciumion, während die umgebenden Zucker des Oligosaccharids durch relativ schwache zusätzliche Wechselwirkungen zur Bindungsspezifität beitragen. Diese recht einfache Art der Wechselwirkung ist der Grund dafür, dass die Spezifität der Selectinbindung ziemlich breit ist und durch einfache Monosaccharid-haltige Verbindungen nachgeahmt werden kann.^[13, 14] Allerdings ist die biologische Wirkung von Liganden strukturabhängig und wird durch eine Reihe von Faktoren wie Polyvalenz und Clustering kompliziert.^[15, 16]

Zu den Calcium-unabhängigen Rezeptoren des P-Typs, die am Klären und Sortieren von Glycoproteinen beteiligt sind, gehören die Mannose-6-phosphat-Rezeptoren,^[17] die hepatischen Gal/GalNAc-Rezeptoren^[18] und die aus Leberextrakten isolierten Man/GlcNAc-Rezeptoren.^[19] Diese Rezeptoren sind wirklich polyvalent und binden an die Enden N-verknüpfter Oligosaccharide mit zwei, drei oder vier Armen. Die meisten bekannten Rezeptoren erkennen zwar Gal/GalNAc oder Man/GlcNAc, es gibt aber auch Rezeptoren wie den

Phaedria M. St. Hilaire wurde auf Dominica in der Ostkaribik geboren und erhielt ihren B.Sc. in Chemie von der University of South Carolina, an der sie Presidential Scholar war. Als Mitglied des Integrated Toxicology Program promovierte sie 1995 in Organischer Chemie an der Duke University unter Anleitung von Dr. Eric Toone über die Wechselwirkung des Shiga-ähnlichen Toxins mit seinem Kohlenhydratrezeptor. Das Interesse an Kohlenhydrat-vermittelten Wechselwirkungen führte sie zu einem Postdoc-Aufenthalt am Carlsberg Laboratory, wo sie Methoden zur Synthese und Analyse von Glycopeptidbibliotheken entwickelte. 1997 wurde sie Forschungsbeauftragte. Zu ihren Forschungsinteressen gehört die Anwendung kombinatorisch hergestellter Substanzbibliotheken auf die Untersuchung von Protein-Kohlenhydrat-Wechselwirkungen und die Entwicklung neuer spezifischer Protease-Inhibitoren. Sie untersucht außerdem grundlegende Vorgänge bei Screening-Methoden an der Festphase.

Morten Meldal, 1954 in Dänemark geboren, leitet als Senior Scientist die Synthesegruppe am Carlsberg Laboratory und ist Außerordentlicher Professor an der Danish Technical University. Er leitet die Forschung über kombinatorische Chemie am SPOCC-Center im Carlsberg Laboratory. 1990 erhielt er den Danish Chemistry Award, 1996 den NKT Research Award für Chemie, 1996 den Leonidas Zervas Award und 1997 die Ellen-und-Niels-Bjerrum-Goldmedaille für Chemie. Er ist Autor von mehr als 190 Publikationen und Inhaber von zehn Patenten. Seine Forschungsinteressen konzentrieren sich auf die kombinatorische organische Chemie an der Festphase, die Polymerchemie, die Synthese von Peptiden und Glycopeptiden, die Glycobiologie und die molekulare Immunologie, Methodik und Automation sowie Enzymologie und Enzyminhibition. Meldal ist bekannt für die Entwicklung neuer PEG-Träger, die sich für Synthese und Screening an der Festphase eignen, und für neue Festphasen-Assays auf FRET-Basis zum Nachweis von Enzymaktivität und -inhibition.



P. M. St. Hilaire



M. Meldal

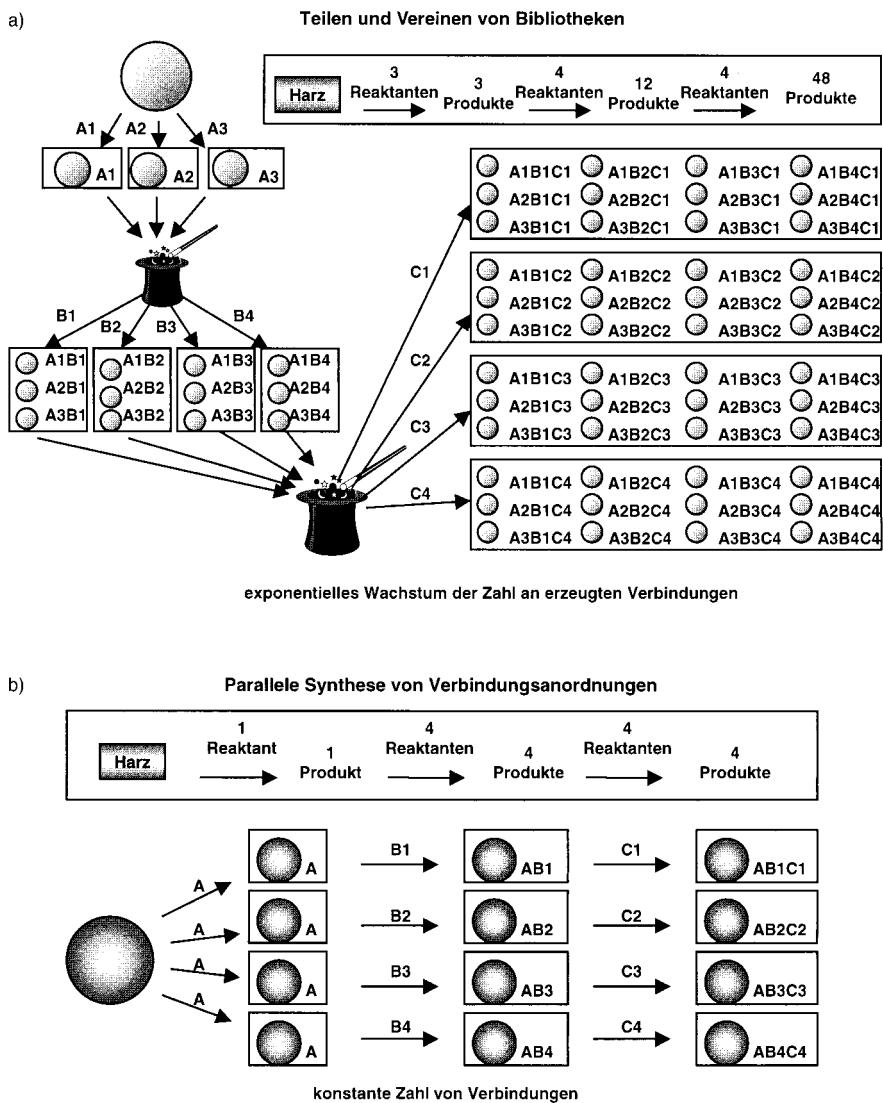


Abbildung 1. Konzeptionen für die Synthese einer kombinatorisch hergestellten Bibliothek mit exponentiellem Wachstum der Verbindungszahl (a) und für Synthesen von parallelen Anordnungen getrennter Verbindungen (b).

Sialinsäurerezeptor von Makrophagen, die komplexe Sialylglycane erkennen.^[20]

Die hauptsächlich am angeborenen Immunsystem beteiligten Collectine^[21] sind Proteine mit großer Oberfläche oder Serumproteine aus Bündeln von Strukturkollagenfasern, deren trimere Kopfenden Calcium-abhängige CRDs enthalten und die wegen ihrer strukturellen Ähnlichkeit dem C-Typ zugeordnet werden können. Die Bindung an einfache Mannose-Oligosaccharide ist verhältnismäßig schwach, und die Aktivierung der komplementären Kaskade wird nur durch polyvalente Wechselwirkungen des Proteins mit großen Polymannanen an fremden Zelloberflächen erreicht, was zur Bildung eines Aktivierungstemplats für die komplementären Processing-Enzyme führt.^[22] Da diese polyvalente Wechselwirkung unspezifisch ist und zwischen den Wechselwirkungsstellen ein großer Abstand liegt (53 Å),^[23] sind synthetische polyvalente Liganden für diese Proteine schwer zu entwickeln und herzustellen. Dagegen lässt sich jede CRD mit hochaffinen monovalenten Liganden erreichen.

3. Die Kohlenhydratliganden

Glycoproteine von Säugetieren bestehen zu 5–90 % aus Glycanen, die sich in mehrere Hauptgruppen gliedern. Zu den N-Glycosiden gehören Mannose-reiche, komplexe Oligosaccharide und Hybriddervate, während Mucine, Blutgruppendifferenzanten und Proteoglycane O-Glycoside sind (Abbildung 2).

Glycolipide enthalten eine andere Gruppe von Oligosaccharid-Signalmolekülen. Die Mannose-reichen Oligosaccharide beruhen auf der 1→2- α -Mannosylierung des Mannosepentasaccharid-Kerns α -D-Man-(1→3)-{ α -D-Man-(1→3)-[α -D-Man-(1→6)]- β -D-Man-(1→6)- β -D-Man-(1→4)- β -D-GlcNAc-(1→N), und diese Oligosaccharide liegen als Konformergemische um die 1→6-Bindungen vor (Abbildung 3). Jedes dieser Konformere kann das aktive beim Kontakt mit einem Rezeptor sein.

Komplexe Glycane mit Antennstrukturen entstehen durch Anknüpfen von β -(1→4)-Lactosamin an die 2-, 4- und 6-Positionen der terminalen Mannosen eines α -D-Man-(1→3)-{ α -D-Man-(1→6)- β -D-Man-(1→4)- β -D-GlcNAc-(1→4)- β -D-GlcNAc-(1→N)-Kernstücks. Die terminalen Galactosen tragen in 3- oder 6-Stellung oft Sialylgruppen.

Das in Abbildung 2 gezeigte vierarmige Oligosaccharid hat in einer der Hauptkonformationen eine schirmähnliche Struktur.^[24, 25] Der Abstand zwischen den mit den Rezeptoren wechselwirkenden terminalen Zuckerresten kann ungefähr 8–30 Å betragen. Bei

den phosphorylierten Mannose-reichen Liganden für den Mannose-6-phosphat-Rezeptor (MPR) beträgt der Abstand zwischen den Phosphatresten ca. 15 Å.^[26]

Für Mucin-Oligosaccharide scheint es in Säugetieren nicht viele Rezeptoren zu geben. Dagegen verfügen im Gastrointestinaltrakt vorkommende Bakterien oft über Rezeptoren, die an den mit Mucin ausgekleideten Epithelien haften.^[27] Die Erkennung von anomally glycosylierten Formen, wie sie in bösartigem Gewebe vorkommen, ist Voraussetzung für die Bekämpfung von Tumoren durch das Immunsystem.^[28–30] Die am besten untersuchten Liganden sind Analoga des Sialyl-Lewis^x(SLe^x)-Antigens^[13, 31], das am „Rollen“ von Leukozyten, der Adhäsion und der Abstoßung durch Wechselwirkung mit den E-, P- oder L-Selectinen beteiligt ist, für die noch nach optimalen Liganden und der Art der Erkennung für die biologische Wirkung gesucht wird. Entscheidend für die Wechselwirkung sind der Fucoserest, eine Hydroxygruppe der zentralen Galactose-Einheit und die Carboxygruppe der Sialinsäure (Abbildung 4).

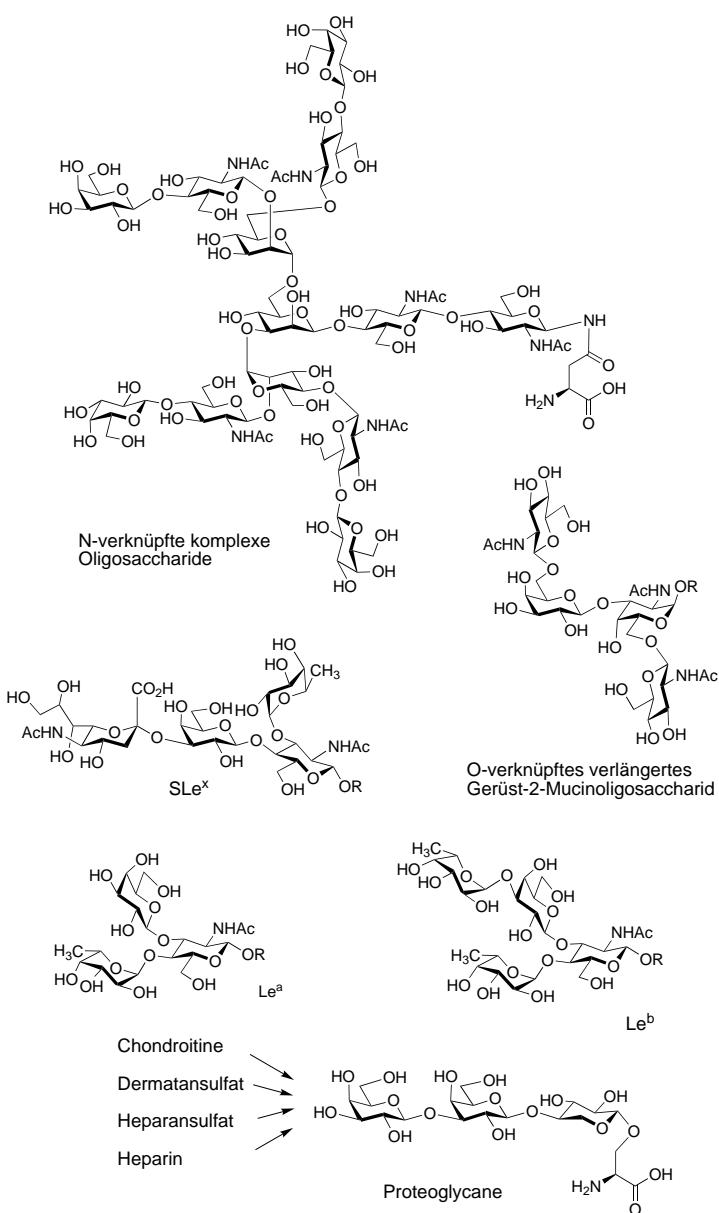


Abbildung 2. Ausgewählte Oligosaccharide der Glycoproteine und Glycolipide von Säugetieren. Die komplexen Oligosaccharide können zwei, drei oder vier Verzweigungen haben, die durch $1 \rightarrow 4$ -verknüpfte Lactosamin-Einheiten mehr oder weniger verlängert und an Sialinsäuren gebunden sein können. Die Saccharide SLe^x, Le^a und Le^b repräsentieren die häufig an Lipiden vorkommenden Blutgruppendifferenzanten, und die verlängerte Kernstruktur 2 ist ein Mucin-ähnliches Saccharid. Proteoglycane haben ein gemeinsames Kernstück, das mit verschiedenen linearen sauren Polysacchariden verknüpft ist.

Strukturuntersuchungen an Rezeptoren und ihren Kohlenhydratliganden deuten darauf hin, dass die Bindung des Liganden an den Rezeptor häufig nur über wenige terminale Reste erfolgt. Es ist daher zu erwarten, dass diese Rezeptoren auch an Kohlenhydrat-Mimetika binden, die die erforderlichen funktionellen Gruppen in optimaler Anordnung enthalten. Kombinatorisch hergestellte Kohlenhydratbibliotheken, die entweder zufällig erhalten oder aufgrund des Wissens über Rezeptor und/oder Ligand sorgfältig geplant wurden, werden die Entdeckung von Mimetika komplexer Oligosaccharidliganden beträchtlich erleichtern.

4. Träger für Festphasenbibliotheken

Sowohl parallele Anordnungen als auch Bibliotheken von Glycopeptiden und Oligosacchariden können in Lösung oder an fester Phase synthetisiert werden. Die Vorteile von Festphasenmethoden sind gut dokumentiert,^[32] und detaillierte Beschreibungen wurden veröffentlicht.^[5, 33] Die Wahl des festen Trägers ist entscheidend; sie hängt sowohl von den daran durchzuführenden Reaktionen als auch von den verwendeten Screening-Methoden ab. Am gebräuchlichsten sind feste Träger auf der Basis von Polystyrol (PS; z.B. das Merrifield-Harz^[32], das häufig verwendete Wang-Harz,^[34] TentaGel^[35]) oder Polyethylenglycol (PEG; z.B. PEGA,^[36] POEPOP,^[37] POEPS-3,^[38] SPOCC^[39]); Beispiele sind in Abbildung 5 zu sehen.

Polystyrolharze bestehen hauptsächlich aus mit 1–2% Divinylbenzol vernetzten Gerüsten mit kurzen Linkern (Abbildung 5a). Wegen der Abnahme der Enzymaktivität im Polymer oder wegen ihrer geringen Quellfähigkeit in polaren Lösungsmitteln, die den Ausschluss der Biomoleküle vom hydrophoben Kern des Polymers zur Folge hat, eignen sich Polystyrolgele im Allgemeinen nicht für ein direktes Screening am Träger. Dies gilt auch für die mit langen PEG-Ketten polymerisierten PS-Harze, beispielsweise ArgoGel und TentaGel (Abbildung 5b),^[40] obwohl ihr Quellvermögen in Wasser verbessert und so ein gewisser Zugang zu ihrem Inneren erreicht wurde.^[41, 42] Außerdem absorbiert das Polystyrolmaterial Licht, so dass manche Fluoreszenz-Assays gestört werden und der hydrophobe Kern zu unspezifischer Proteinbindung führen kann.

PEG-Harze sind hingegen mit langketigen PEG-Makromonomeren vernetzt, die zusätzlich funktionelle Amino- oder Hydroxygruppen aufweisen. Daher werden die mechanischen und chemischen Eigenschaften der Harze stark von der Art der PEG-Ketten beeinflusst.^[33] Zudem sind PEG-Ketten mit den meisten Solventien unter Bildung eines quasi-homogenen Reaktionsmediums sehr gut mischbar. PEG-Harze quellen in wässrigen Medien enorm und ermöglichen so den Biomolekülen Zugang zum gesamten Harzkügelchen.^[43, 44] Diese Harze eignen sich daher für die Proteinbindung,^[45] für enzymatische Reaktionen und für das Screening auf Enzymaktivität und -inhibition.^[42, 46–51]

Da PEG-Polymeren als Träger den Vorteil haben, sowohl für die Synthese als auch für das Screening der Enzymaktivität und Proteinbindung geeignet zu sein, bemühte man sich, solche Polymere mit besseren Eigenschaften auf beiden Gebieten herzustellen. Sie können durch radikalische Polymerisation von langketigen PEG-Makromonomeren zum PEG-Polyacrylamid-Copolymer^[36, 43] (PEGA, Abbildung 5c) oder zum PEG-vernetzten Oligostyrol^[38] (POEPS-3, Abbildung 5d) erhalten werden. Zwei neuartige Gelträger wurden gebildet durch anionisch katalysierte Blockpolymerisation von PEG, derivatisiert mit Epichlorhydrin^[37] (POEPOP, Abbildung 5e), und durch kationisch katalysierte Blockpolymerisation von PEG, derivatisiert mit Oxetan^[39] (SPOCC, Abbildung 5f). Das inerte Verhalten der Polymere ermöglicht organische Reaktionen auch unter drastischen Bedingungen. Wegen ihres ausgezeichneten Quellvermögens in wässrigen Pufferlösungen wurden alle genannten Harze in

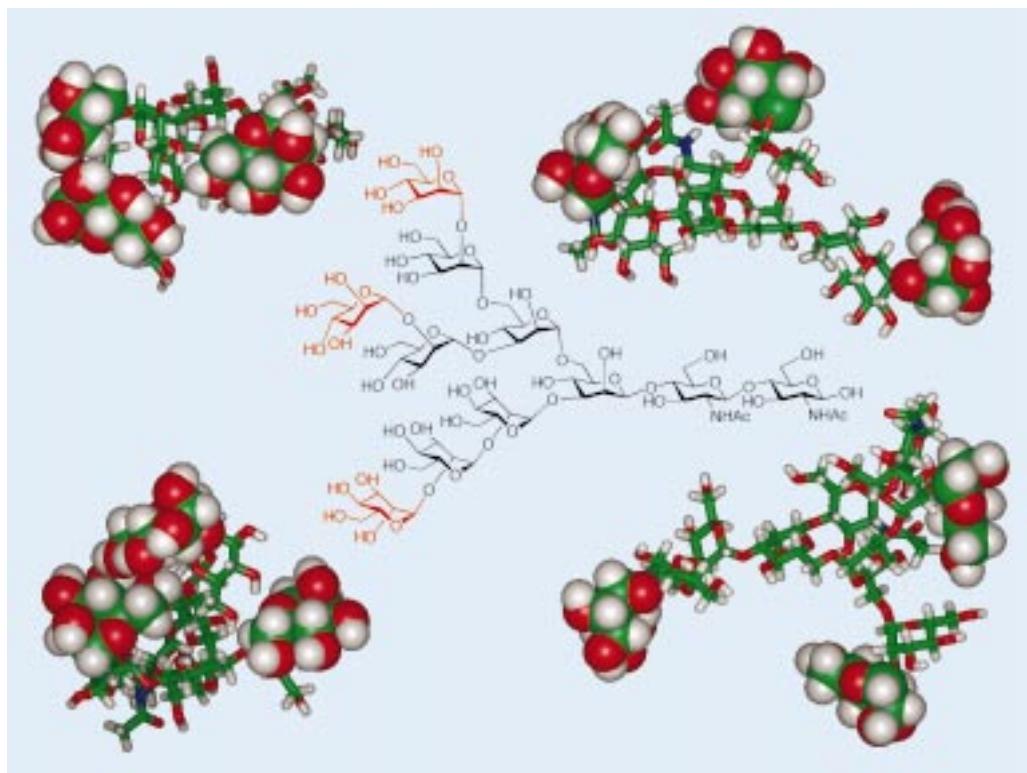


Abbildung 3. Strukturmodelle von vier Konformeren (zwei für jede 1→6-Verknüpfung) des dreiarmigen Mannose-reichen Undecasaccharids M9. Terminale Mannosereste sind als Kalottenmodelle hervorgehoben.^[22]

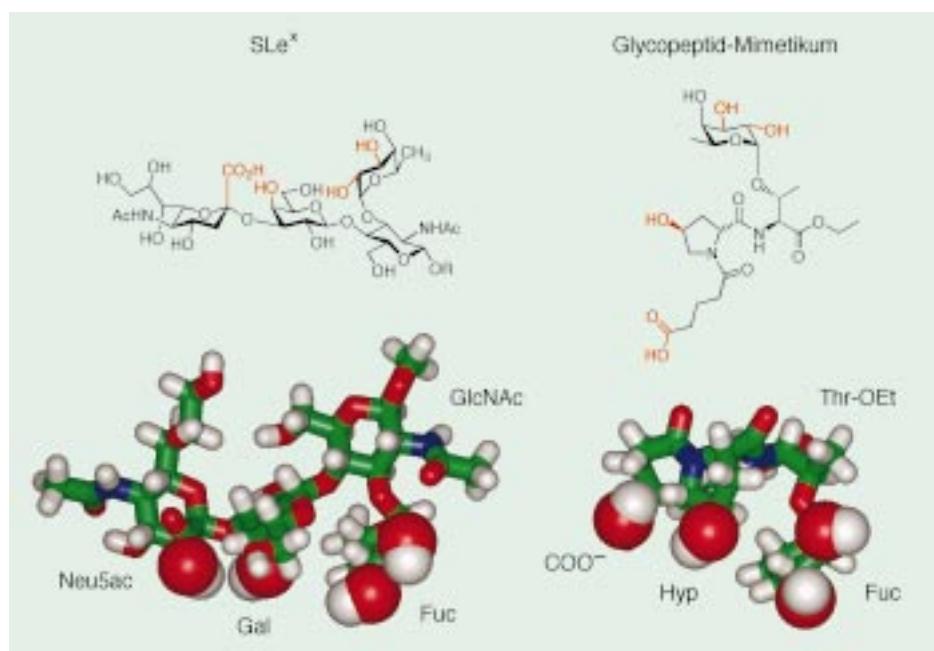


Abbildung 4. Bindungskonformationen des SLe^x-Tetrasaccharids und eines wirksamen Fucosylglycopeptid-Mimetikums.^[118] Fest gebundene Hydroxygruppen sind als Kugeln dargestellt.

Bioassays für Enzyme eingesetzt; weitergehende Untersuchungen ergaben für das PEGA-Harz keine unspezifische Proteinbindung.^[52]

Bei der Festphasensynthese von Glycopeptiden und Oligosacchariden wurden sowohl Polystyrol- als auch PEG-Harze erfolgreich eingesetzt. Untersuchungen der Reaktionsgeschwindigkeit an mehreren Harzen haben ergeben, dass sie

nur von der Art der Reaktion selbst abhängt.^[53] Manche Reaktionen lassen sich besser an hydrophoben, andere besser an hydrophilen Harzen durchführen. Ein anderes Problem, das besonders für die Synthese von Oligosacchariden an fester Phase Bedeutung hat, ist der Einfluss des festen Trägers auf das stereochemische Ergebnis der Glycosylierung. Hierzu gibt es nur wenige eingehende Untersuchungen, und die ersten Ergebnisse sind widersprüchlich; einige lassen den Schluss zu, dass das Anomerieverhältnis stark von der Art des Trägerharzes sowie vom Lösungsmittel, der C2-Gruppe am Donor und der Temperatur abhängt.^[54–56] Bei manchen Umsetzungen scheint sich die Anomerenselektivität an der festen Phase zu erhöhen.^[55] Gegenwärtig sind vier erfolgreiche Synthesen von Oligosaccharid- und Glycopeptidbibliotheken bekannt, die an TentaGel oder einem PEG-Harz (PEGA und POEPOP) hergestellt wurden und so das rasche Festphasen-Screening der Bibliothek ermöglichen (siehe Abschnitte 6.3 und 8.2).

5. Analysemethoden für Oligosaccharid- und Glycopeptidbibliotheken

Bei Substanzbibliotheken in Lösung, die aus Verbindungsgemischen bestehen, steigt die Schwierigkeit der Analyse mit zunehmender Zahl der Verbindungen drastisch an. Im Allgemeinen werden sehr umfangreiche Verbindungsgemische vor dem

Screening nicht analysiert, kleinere können hingegen durch Massenspektrometrie, HPLC, NMR-Spektroskopie oder Kombinationen dieser Methoden auf Vollständigkeit der Reaktion untersucht werden. Der Nachweis und die Analyse wirksamer Verbindungen aus diesen Gemischen erfordert Sorgfalt und Zeit, und die vollständige Charakterisierung ist nur nach Dekonvolutionsverfahren und Resyn-

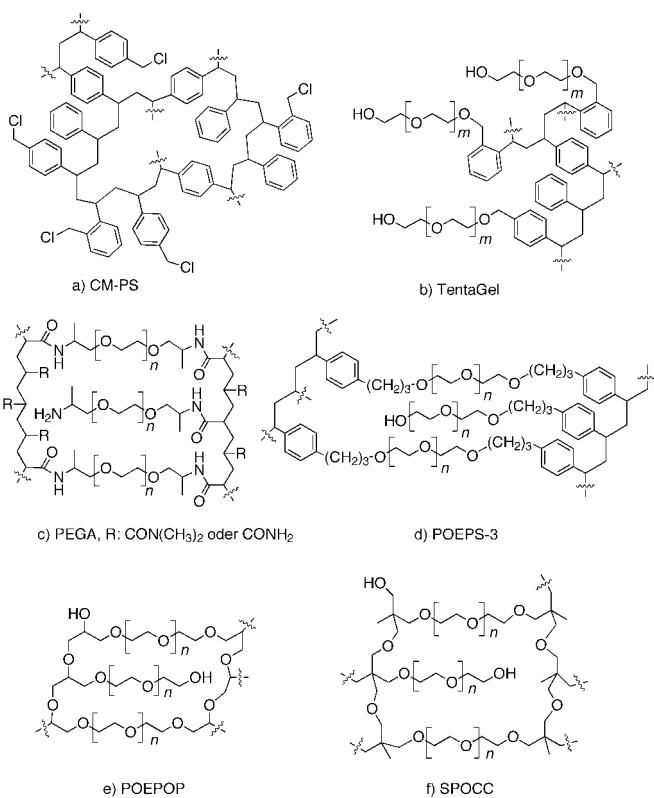


Abbildung 5. Chemische Struktur von PS- und PEG-Harzen. Die offene Struktur und das inerte Verhalten von PEG in biologischen Systemen verleihen diesen Trägerharzen ideale Eigenschaften für Bioassays.^[33]

these der aktiven Verbindung möglich.^[57] Die derzeit entwickelten Methoden für Festphasenbibliotheken werden im Folgenden besprochen.

5.1. Markierungsverfahren bei Oligosaccharidbibliotheken

Für Nichtpeptidbibliotheken gibt es immer mehr Analyseverfahren, die sich allgemein in zwei Kategorien einteilen lassen: Direkte Methoden beruhen meistens auf der Massenspektrometrie und der NMR-Spektroskopie, während bei indirekten Methoden chemische,^[58–60] chemolumineszierende^[61] oder andere Kodierungen^[62–64] verwendet werden. Viele Verfahren zur chemischen Markierung sind nur eingeschränkt anwendbar, weil zusätzliche Syntheseschritte erforderlich sind und für beide Synthesereihen orthogonale Reaktionsbedingungen entwickelt werden müssen. Allerdings ist die chemische Kodierung auch die einzige Methode, die bisher erfolgreich zur Identifizierung von Verbindungen in einer Oligosaccharidbibliothek eingesetzt worden ist.^[59] Hierbei werden über eine Carbeninsertion polyhalogenierte aromatische Markierungen angebracht, die photochemisch gespalten und anschließend durch GC-MS analysiert werden können.^[60]

5.2. Analyse durch Massenspektrometrie

Die Entwicklung von Oligosaccharid- und Glycopeptidbibliotheken mit der „Teilen-und-Mischen“-Methode wird

dadurch gehemmt, dass die gleichzeitige Entwicklung eines allgemein anwendbaren, einfachen Trenn- und Charakterisierungsverfahrens ausbleibt. Zwar brachte die chemische Kodierung der Bibliotheken einen gewissen Fortschritt, aber es gibt nur sehr wenige direkte Analysemethoden. Eine viel versprechende Methode zur direkten Untersuchung beider Substanzbibliotheken ist die Massenspektrometrie, insbesondere die matrixgestützte Laserdesorptions/Ionisations-Flugzeit(MALDI-TOF)-, die Electrospray-Tandem-(ES-MS)- und die Fourier-Transform-Ionenzyklotron-Resonanz(FT-ICR)-Massenspektrometrie. MALDI-TOF-MS und ES-MS-MS wurden zur Charakterisierung von Glycopeptiden^[65–67] und komplexen Oligosacchariden eingesetzt.^[68–72]

Besondere Schwierigkeiten bei der Analyse von Kohlenhydraten durch Massenspektrometrie bilden die Unterscheidung der Verzweigungspunkte, isobare Monosaccharide und die Konfiguration am anomeren Zentrum der Glycosidbindung. Hierfür wurden mehrere Methoden mit MALDI-TOF-MS entwickelt. Bei einem Verfahren wird das Oligosaccharid nacheinander mit Glycosidasen behandelt, die Masse der resultierenden Fragmente aufgezeichnet und das ursprüngliche Oligosaccharid durch Deduktion bestimmt.^[71, 73] Die Oligosaccharidfragmente werden durch verschiedene Arten der Ionisierung erzeugt: Zerfall hinter der Ionenquelle (PSD, post-source decay), verzögerte Ausschleusung mit durch energiereiche Kollision induziertem Zerfall (CID, collision-induced decomposition), Fragmentierung in der Ionenquelle oder Tandem-MALDI.^[68, 69] Bei allen Verfahren erfolgt die Fragmentierung über die Glycosidbindung in einer Weise, die zum Teil von der Art der Verknüpfung (d.h. 1 → 6 oder 1 → 3), der anomeren Konfiguration und der Art des Monosaccharids abhängt.^[72, 74] Die Interpretation von PSD-Spektren kann bei komplizierten Sacchariden etwas schwierig sein, dürfte sich aber wesentlich vereinfachen, wenn die Oligosaccharidbibliotheken auf 3–4 Monosaccharide begrenzt sind.

Auf ähnliche Weise wurden die Glycopeptide – hauptsächlich durch MALDI-PSD – analysiert. Dabei wurden zwei Strategien genutzt: Entweder wurde der Glycananteil zuerst enzymatisch oder durch basenkatalysierte β-Eliminierung abgespalten^[66, 75] und mit anderen Methoden (MS oder NMR-Spektroskopie) getrennt charakterisiert, während das Peptid durch PSD sequenziert wurde, oder das komplette Glycopeptid wurde mit PSD fragmentiert und die Spektren analysiert.^[65, 67] Diese Analysen sind ebenfalls alle sehr zeitraubend und eignen sich nicht für ein effektives Screening (High-Throughput-Screening, HTS). Das bisher einzige Beispiel für eine einfache direkte Methode zur Charakterisierung von Glycopeptidbibliotheken, die nach dem Bausteinverfahren erhalten wurden, ist eine Kombination aus chemischer Markierung (zur Bestimmung des Glycananteils) und Abschlusschritten, mit der Bruchstücke für die Massenanalyse hergestellt werden (Stufensynthese).^[52] Ein Beispiel für das Massenspektrum eines zweifach glycosylierten Peptids aus einer solchen Bibliothek ist in Abbildung 6 wiedergegeben. Das Prinzip dieser Methode und ihre Anwendung auf die Synthese einer Glycopeptidbibliothek werden in Abschnitt 8.2 ausführlich behandelt.

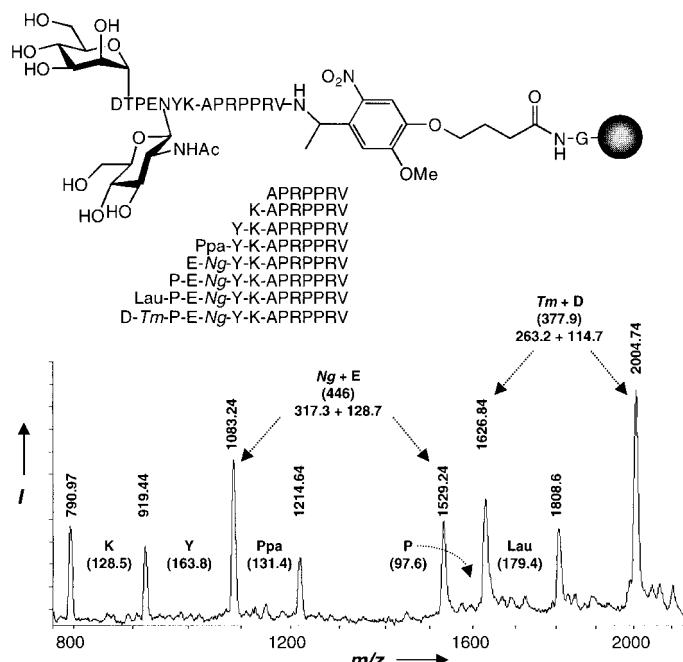


Abbildung 6. Repräsentatives Massenspektrum eines zweifach glycosylierten Glycopeptids (in der Mitte ist die „Leiter“ der Spezies gezeigt, die sich um jeweils eine Einheit unterscheiden), erhalten beim Screening einer Glycopeptidbibliothek. Phenylpropionsäure (Ppa) und Laurinsäure (Lau) markieren Asn(GlcNAc) bzw. Thr(Man).^[52]

5.3. Strukturanalyse von Verbindungen an einzelnen Harzkügelchen durch MAS-NMR-Spektroskopie

Da leistungsfähige und wirksame Markierungsmethoden fehlen, ist die Magic-Angle-Spinning(MAS)-NMR-Spektroskopie von Nanogramm-Proben das aussichtsreiche Analyseverfahren zur direkten Identifizierung einer Einzelverbindung an einem Polymerteilchen. Außerdem kann so die Vollständigkeit jedes Syntheseschritts zerstörungsfrei beurteilt werden. Die Gelphasen-NMR-Spektroskopie liefert von zahlreichen trägegebundenen Verbindungen beachtliche ¹³C-NMR-Spektren, aber eine solche Analyse einzelner Harzkügelchen ist nicht möglich, und ¹H-NMR-Spektren bieten keine brauchbare Auflösung. Die Eigenschaften des Polymers wirken sich erheblich auf die Qualität der aufgezeichneten Spektren aus; allgemein gilt, dass die Auflösung der ¹H-NMR-Spektren umso besser ist, je mobiler und einer Flüssigkeit ähnlicher das Polymergerüst ist. Das trifft auch für die MAS-NMR-Spektroskopie bei Rotationsgeschwindigkeiten von 2000–4000 Hz zu, wobei Verbindungen an PEG-Harzen wesentlich besser aufgelöst werden als an Polystyrol oder sogar TentaGel.^[76] Es ist sogar so, dass sich die Auflösung der Festphasenspektren nicht von der unterscheidet, die man mit Lösungsspektren dieser Harze erhalten kann.^[77]

Die vollständige Strukturaufklärung unbekannter Verbindungen an einzelnen Harzkügelchen bleibt eine Herausforderung, und die meisten anderen Routineanalysen benötigen beträchtliche Mengen von Harzkügelchen – mit einer Ausnahme, bei der Makroperlen aus TentaGel verwendet wurden.^[78] Die Analyse wurde normalerweise an Polystyrol-Kügelchen durchgeführt, und obwohl die 1D-¹H-MAS-NMR-

Spektren im Allgemeinen keine oder nur geringe Auflösung von Signalen für gekoppelte Spinsysteme zeigten, konnten brauchbare 2D-MAS-NMR-Spektren erhalten werden.^[79] Bisher wurden lediglich bekannte Reaktionsprodukte und bekannte Verbindungen an Polystyrol oder TentaGel analysiert.^[80–83] Vor kurzem gelang die einzige vollständige Strukturaufklärung eines unbekannten Peptids aus acht Aminosäureresten an einer einzelnen POEPOP-Perle (10 nmol).^[77] Die für eine komplette Strukturaufklärung erforderliche Menge an trägegebundenem Material beträgt je nach Komplexität der Struktur und des Trägers bei 500 MHz für PEG-Harze 2–7 nmol der Verbindung.^[77] Die zeitraubende Strukturanalyse durch NMR-Spektroskopie verlangt auch nach einem unempfindlicheren (keine falsch-positiven Ergebnisse) und quantitativen biologischen Assay, mit dem die Reihenfolge der Aktivitäten von Verbindungen direkt quantifiziert werden kann, um so die Zahl der notwendigen Strukturanalysen einzuschränken.^[84] Mit der MAS-NMR-Spektroskopie wurden Glycosylierungen von Peptidtemplaten an fester Phase mit dem Ziel kontrolliert, Glycopeptide an Einzelperlen aus aufeinander folgenden Glycosylierungen von Peptidtemplatenbibliotheken zu analysieren.^[85, 86]

6. Synthese von Oligosacchariden in Parallelanordnungen und Bibliotheken

6.1. Einleitende Betrachtungen

Während bei der Herstellung von Substanzbibliotheken kleiner Moleküle, Peptide oder Nucleotide gewaltige Fortschritte erzielt wurden, blieb die Synthese von Kohlenhydratbibliotheken schwierig. Ihr Aufbau wird durch die chemische Komplexität des Kohlenhydrats selbst und der zugehörigen Reaktionen erschwert. Um eine stereoselektive Glycosylierung mit hoher Ausbeute zu erreichen, müssen die relevanten Hydroxygruppen mit einer sorgfältig geplanten orthogonalen Schutzgruppenstrategie selektiv ge- und entschützt werden. Drei Arten von Glycosyldonoren, die Thioglycoside,^[87] die Glycosylsulfoxide^[88] und die Trichloracetimidate,^[89] erwiesen sich bei Verknüpfungsreaktionen als allgemein wirksam und lieferten hohe Ausbeuten und angemessene Stereoselektivität. Zwei Methoden bieten außerdem homogene Reaktionsbedingungen und können daher für Glycosylierungen an der Festphase eingesetzt werden. Dabei ist jedoch zu berücksichtigen, dass es sogar in Lösung noch schwierig ist, wichtige Oligosaccharidbindungen wie die β -Man-, die α -Neu5Ac- und die α -Kdo-Bindung in mehr als 50% Ausbeute zu knüpfen. Bei Festphasenbibliotheken ist die Übertragung von Glycosylierungen, die in Lösung glatt verlaufen, auf die feste Phase oft schwierig. Trotz dieser Probleme hat es bedeutende Durchbrüche bei der Herstellung von Oligosaccharidbibliotheken kleiner bis mittlerer Größe gegeben.

6.2. Parallelsynthese von Oligosaccharidanordnungen

Strukturell unterschiedliche Oligosaccharide können durch Parallelsynthese in Lösung aus einem gemeinsamen Kern-

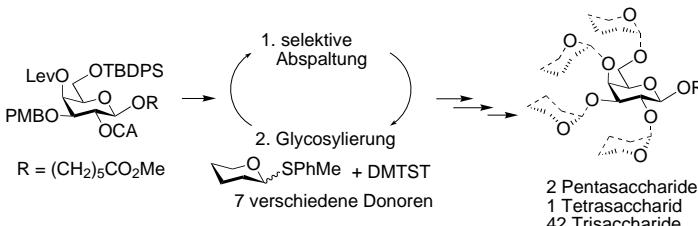
stück hergestellt werden, das im ersten Syntheseschritt umgesetzt wird. Mit einer kürzlich beschriebenen eleganten Synthese in Lösung,^[90] die vier orthogonale Schutzgruppen für die Hydroxygruppen des Monosaccharids nutzt, wurden durch parallele Glycosylierung des gemeinsamen Acceptors mit sieben verschiedenen Glycosyldonoren 45 Oligosaccharide (42 Trisaccharide, ein Tetrasaccharid und zwei Pentasaccharide) erhalten (Schema 1). Der gemeinsame Monosaccharid-Acceptor enthält je eine Chloracetyl(CA)-, Lävulinoyl(Lev)-, *p*-Methoxybenzyl(PMBO)- und *tert*-Butyldiphenylsilyl(TBDPS)-Schutzgruppe. Die Hydroxygruppen werden

Base abgespalten werden, sowie photolabile Linker. Säureempfindliche Linker sind unter den sauren Glycosylierungsbedingungen manchmal problematisch. Die Glycosylierungen müssen unter homogenen Bedingungen durchgeführt werden. Hierfür wurden das Trichloroacetimidat-Verfahren,^[55, 89] die Sulfoxid/Tf₂O-Methode,^[88] das Pentenylglycosid-Verfahren mit Iodoniumaktivierung^[56] (*N*-Iodussuccinimid/Triethylsilyltrifluormethansulfonat; NIS/TESOTf) sowie die Glycalmethoden eingesetzt, die entweder Iodoniumzwischenstufen oder ein Epoxid^[94] mit Lewis-Säure-Aktivierung verwenden. Da diese Methoden an fester Phase durchgeführt wurden, wären sie für die Synthese von Oligosaccharidbibliotheken besonders geeignet.

6.3. Synthese von Oligosaccharidbibliotheken

Die Herstellung von Oligosaccharidbibliotheken gelang sowohl in Lösung als auch an fester Phase vor allem durch chemische Synthese. Die Synthese von Kohlenhydratbibliotheken in Lösung erfolgt nach zwei Hauptstrategien: Ein geschützter Glycosyldonor wird entweder mit freien^[98–100] oder mit geschützten Aczeptoren umgesetzt.^[101] Die erste Strategie wurde entwickelt, um die erheblichen Syntheseanforderungen bezüglich der für die Regioselektivität benötigten orthogonal geschützten Saccharidbausteine zu vermeiden und dadurch Zeit und Kosten bei der Herstellung von Oligosaccharidbibliotheken zu sparen. In einer zukunftsweisenden Arbeit wurde eine Bibliothek aller sechs möglichen α -verknüpften Trisaccharide (Schema 2a) durch Kupplung von perbenzyliertem Fucosyltrichloracetimidat an den freien LacNAc-Acceptor synthetisiert.^[98] Entscheidend für den Erfolg dieser Methode ist der Einbau eines UV-aktiven Fettsäure-„Endstücks“ in den Acceptor, um die Trennung und den Nachweis der Produkte im Reaktionsgemisch zu erleichtern, sowie die Verwendung polarer Lösungsmittel (DMF) für die Glycosylierung und der Abbruch der Reaktion nach 30% Umsatz, um eine Mehrfachglycosylierung zu vermeiden. Interessanterweise entstanden die Regiosomere in nahezu äquimolaren Mengen, obwohl vorherige Untersuchungen ergaben, dass sich die Reaktivität der Hydroxygruppen bei einer Glycosylierung in unpolaren Solventien sehr stark unterscheidet. Die Gemische wurden auf Aktivität gegenüber Glycosyltransferasen untersucht.^[100] Hauptprobleme dieser Strategie sind die Trennung und Identifizierung der Produkte; trotz des hydrophoben Endstücks war die Isomerentrennung ziemlich schwierig. Die Anwendungsbreite der Methode war aufgrund der mühsamen Identifizierung der Produkte eingeschränkt, die nur durch Vergleich der NMR-Spektren der Gemische mit denen der getrennt synthetisierten Einzelverbindungen möglich war.

Auch wenn die Glycosylierung freier Aczeptoren tatsächlich zufällig verlaufen kann, muss eine Mehrfachglycosylierung verhindert werden, da sie die Dekonvolution und Trennung der Bibliothekskomponenten noch erschweren würde. Daher wählten andere Wissenschaftler einen Zugang, bei dem Donor und Acceptor geschützt sind und der so eine vollständige Umsetzung ermöglicht, ohne dass eine Mehrfachglycosylierung befürchten ist. Beispielweise wurde mit

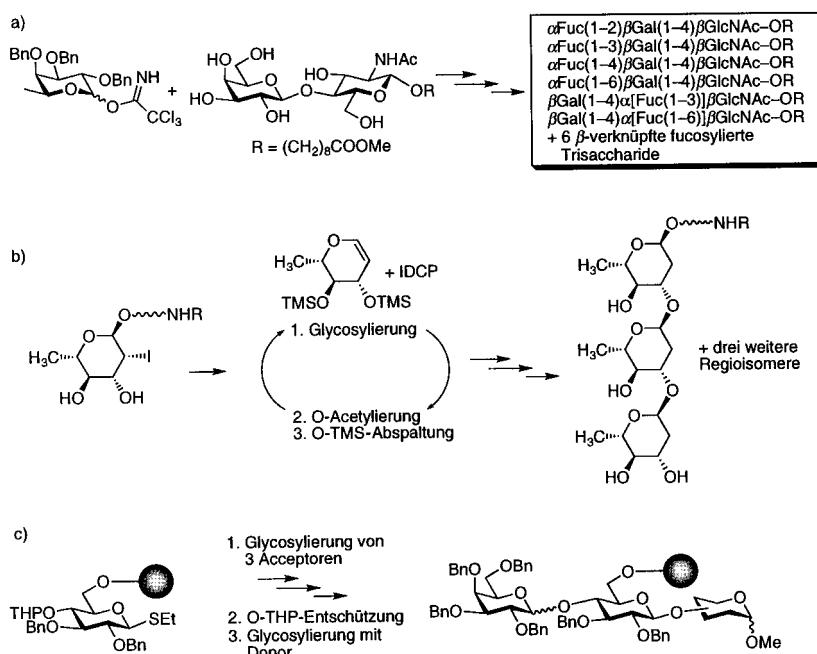


Schema 1. Parallelsynthese von Oligosaccharidanordnungen in Lösung. Die Oligosaccharidausbeuten für zwei Glycosylierungs-/Entschützungszyklen variierten zwischen 5 und 85 %.^[90] DMTST = (Dimethylthio)methylsulfoniumtrifluormethansulfonat; CA = Chloracetyl.

nacheinander entschützt und nach Aktivierung durch DMTST mit Thiokresyldonoren verknüpft, wobei die Ausbeuten und die Stereoselektivität stark variieren. Durch die zunehmende Größe des Oligosaccharids verringerten sich die Selektivität und die Ausbeute; die Gesamtausbeuten für zwei Zyklen aus Entschützen und Kuppeln lagen zwischen 5 und 85 %. Die so hergestellten Verbindungen wurden vollständig entschützt und durch Massenspektrometrie und NMR-Spektroskopie charakterisiert. Diese für die flüssige Phase beschriebene Methode ist äußerst arbeitsaufwändig und wegen der erforderlichen orthogonalen Schutzgruppenstrategie nur begrenzt anwendbar.

Das in hohem Maß orthogonale Schutzgruppenschema lässt sich umgehen, wenn man Enzyme mit der gewünschten Glycosylierungsspezifität einsetzt. Insbesondere die Umkehr von Glycohydrolase-Reaktionen erwies sich als zweckmäßig; mit dieser Methode konnten kleine Anordnungen von Oligosacchariden, darunter die Mucin-Kernstrukturen 1 und 2, in niedrigen Ausbeuten synthetisiert werden.^[91] Durch Verwendung hitzebeständiger Glycosidasen bei erhöhten Temperaturen können die Produktausbeuten verbessert werden.^[92] Auch Glycosyltransferasen lassen sich zur regio- und anomerenselektiven Synthese von Glycosidbindungen einsetzen. Durch sequentielle Inkubation von nichtnatürlichen *N*-Acyldisacchariden mit α (2-3)-Sialyltransferase und Fucose-III- oder Fucose-IV-Transferase wurden kleine Anordnungen nichtnatürlicher Analoga von SLe^x (11 Verbindungen) und SLe^a (16 Verbindungen) synthetisiert.^[93]

Für die Parallelsynthese von Oligosacchariden wurden auch Festphasenmethoden entwickelt.^[55, 56, 88, 94–97] Als orthogonale Linker dienten die mit BF₃·Et₂O abspaltbare TMSET-Schutzgruppe (TMSET = Trimethylsilylethyl),^[96] die mit Cerammoniumnitrat zu entfernende *p*-Alkoxybenzylgruppe,^[95] die Hydroxymethylbenzoësäure-Linker, die mit verdünnter



Schema 2. Beispiele für die Synthese von Oligosaccharidbibliotheken. a) Synthese in Lösung mit freien Aczeptoren.^[98] b) Synthese in Lösung mit geschützten Aczeptoren.^[102] c) Festphasensynthese.^[103] Alle Substanzbibliotheken wurden als Verbindungsgemische erhalten. Ac = Acetyl, Bn = Benzyl, IDCP = Iodoniumdicollidinperchlorat, THP = Tetrahydropyran, TMS = Trimethylsilyl.

der „Latente/aktive-Vinylgruppen-Strategie“ eine kleine Bibliothek aus 20 Trisacchariden (einschließlich α/β -Anomere) hergestellt.^[101] Als gemeinsamer Baustein diente das 3-Methylallylglycosid mit Benzylschutzgruppen und einem Acetylrest, das durch Isomerisierung zum Vinylglycosid in den Glycosyldonor oder durch Abspalten der Acetylgruppe in den Acceptor überführt wurde. Glycosylierungen in Gegenwart von TMSOTf lieferten ein 1:1-Gemisch der α/β Anomere in > 70 % Ausbeute. Dieses Verfahren ist in Wirklichkeit eine Kombination aus Parallelsynthese und der Teilen-und-Mischen-Methode. Weil ein gemeinsamer Monosaccharidbaustein mit nur zwei verschiedenen Schutzgruppen verwendet wurde, war die mit dem Teilen-und-Mischen-Schritt eingeführte Diversität sehr begrenzt. Nach Beendigung der Synthese wurden die Einzelverbindungen der Trisaccharidbibliothek nicht getrennt, sondern einfach anhand der Trisaccharidmasse und der Zusammensetzung aus Monosacchariden analysiert. Die Vollständigkeit der Glycosylierungen wurde ebenfalls massenspektrometrisch analysiert.

Eine andere Synthese nutzt nur die Teilen-und-Mischen-Methode, um eine kleine Bibliothek aus vier 2,6-Didesoxytrisacchariden aus einem gemeinsamen geschützten Glycalbaustein herzustellen (Schema 2b).^[102] Dazu wurde das Glycal zunächst mit Iodoniumdicollidinperchlorat (IDCP) zum 2-Iodglycosid aktiviert. Nach Entfernen der Schutzgruppen in 3- und 4-Stellung führte die simultane Glycosylierung bei niedriger Temperatur mit äquimolarer Donormenge stereoselektiv zu einem 1:1-Gemisch der beiden α -

verknüpften regiosomeren Disaccharide. Obwohl die Umsetzungen so lange wie möglich durchgeführt wurden, enthielt das Reaktionsgemisch überraschenderweise weder nicht umgesetztes Ausgangsmaterial noch nennenswerte Mengen von Trisacchariden, die durch Glycosidierung der 3- und der 4-Position gebildet wurden. Die übrigen Hydroxygruppen wurden anschließend acetyliert und die TMS-Gruppen entfernt. Die Glycosylierung der neu gebildeten Hydroxygruppen wie zuvor ergab ein Gemisch aus vier 2-Iodtrisacchariden, das mit Tributylzinnhydrid reduziert wurde. Auch in diesem Fall wurden die Produkte nicht getrennt, sondern als Gemisch durch Massenspektrometrie und NMR-Spektroskopie analysiert.

Die meisten Oligosaccharidbibliotheken wurden zwar in Lösung synthetisiert, es gibt aber auch zwei Beispiele für die Festphasensynthese dieser Substanzbibliotheken. So wurde an TentaGel-Harz mit Thioethylglycosid als Donor eine kleine Bibliothek aus zwölf Trisacchariden (darunter die α/β -Anomere) mit der Teilen-und-Mischen-Methode synthetisiert (Schema 2c).^[103] Da nur eine Hydroxygruppe als Acceptor verwendet wurde, war die Diversität dieser Bibliothek stark limitiert. Das Thioethylglycosid wurde über einen Bernsteinsäureester an C6 an den festen Träger gebunden und konnte so bei Glycosylierungen als Donor oder als Acceptor verwendet werden.

In einer umfangreicheren Arbeit wurde mit der Teilen-und-Mischen-Methode eine Substanzbibliothek aus ca. 1300 Di- und Trisacchariden synthetisiert, bei der jede Trägerperle nur eine Verbindung enthält („One-Bead-one-Compound“-Bibliothek; Abbildung 7).^[59] Sechs geschützte, an TentaGel gebundene Azidomonosaccharide wurden mit zwölf Mono- und Disaccharidsulfoxid-Donoren zu 72 verschiedenen Verbindungen glycosyliert. Die Reduktion der Azidgruppe und Acylierung des Oligosaccharidamins mit 20 Carbonsäuren

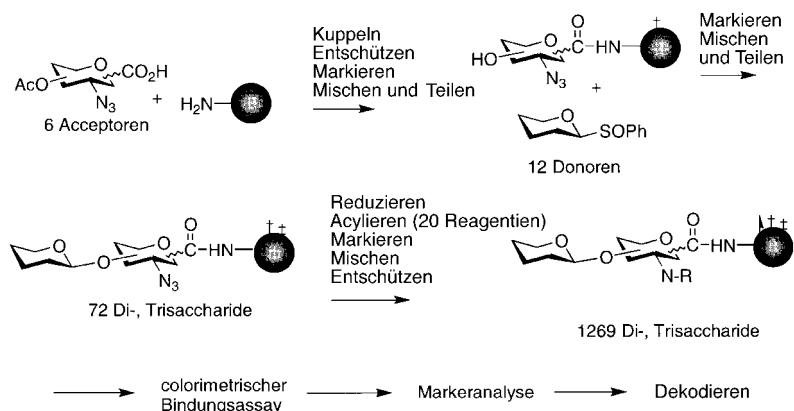


Abbildung 7. Festphasen-Oligosaccharidbibliothek mit exponentieller Zunahme der Verbindungszahl in jedem Reaktionsschritt. Die Substanzbibliothek wurde mit einem Festphasen-Enzymbindungsassay auf aktive Verbindungen untersucht, und die Komponenten wurden durch chemische Markierung identifiziert. Die neuen Liganden hatten ähnliche Aktivität wie der natürliche Ligand.^[59]

führte zu weiterer Diversität. Die Analyse der mit den Trägerperlen verknüpften Verbindungen erfolgte durch Markieren mit Halogenarylderivaten über Carbenkupplungen.^[60] Mit diesem Verfahren ließ sich zwar feststellen, welche Kohlenhydrate an einer Trägerperle miteinander verknüpft wurden, aber die genaue Art der Glycosidbindung konnte nicht endgültig bestimmt werden. Aufgrund früherer Untersuchungen ging man davon aus, dass die Glycosylierungen unter solchen Bedingungen völlig stereoselektiv verlaufen waren. Die Substanzbibliothek wurde mit einem Festphasen-enzym-Assay auf aktive Liganden für das Lectin aus *Burhinia purpurea* untersucht.

Die Synthese von Oligosaccharidbibliotheken ist keineswegs trivial – weder in Lösung noch an der Festphase. Die Haupthindernisse für Fortschritte beim Aufbau von Kohlenhydratbibliotheken waren die Ausbeuten und Selektivitäten der Glycosylierungen sowie Trenn- und Analysemethoden. Kürzlich wurde eine neue Festphasensynthese von S-verknüpften Oligosacchariden durch nucleophile Substitution von Zuckertriflaten mit Thioglycosiden beschrieben.^[104] Diese Methode wurde bisher zwar noch nicht für Substanzbibliotheken eingesetzt, sie könnte aber die selektive Bildung von Glycosidbindungen an der Festphase und damit die Herstellung von Oligosaccharidbibliotheken durch Teilen und Vereinen sowie ihre Analyse erleichtern. Mit einer Ausnahme wurden die hier beschriebenen Oligosaccharidbibliotheken weder getrennt, noch wurden die Einzelprodukte genau identifiziert und charakterisiert. Die neue Methode, die orthogonale Schutzgruppen für die Parallelsynthese in Lösung verwendet (Schema 1),^[105] hat unter der Voraussetzung, dass die notwendigen Analyseverfahren entwickelt werden können, ein großes Potential für die Festphasensynthese von Bibliotheken. Anzumerken ist auch, dass nur bei einer der beschriebenen Oligosaccharidbibliotheken^[59] die exponentielle Zunahme der Verbindungszahl durch aufeinander folgende Reaktionen in signifikantem Maß genutzt wurde.

7. Glycopeptide als Oligosaccharid-Mimetika

Bei der Suche nach Therapeutika auf der Basis von Kohlenhydraten ist die Synthese zahlreicher Oligosaccharide ein kostspieliger, präparativ anspruchsvoller und zeitraubender Prozess. Auch wenn durch die Verwendung von Oligosaccharidbibliotheken bei Synthese und Screening Zeit gespart würde, wären die Kosten, die Syntheseaufgabe und die Analyse von aktiven Verbindungen aus der Bibliothek weiterhin problematisch. Außerdem bewirken kleine Veränderungen des natürlichen Oligosaccharidliganden nur selten eine Zunahme der Bindungseffizienz.^[106–108] Dieser Effekt wurde auf die Enthalpie-Entropie-Kompensation zurückgeführt, die oft bei der Wechselwirkung analoger Verbindungen mit ihren Rezeptoren in wässrigem Milieu auftritt.^[109–111] Die Gibbs-Bindungsenergie eines Rezeptors mit Liganden ähnlicher Struktur korreliert mit der Präorganisation von Wassermolekülen im Reaktionsmedium nahe der Bindungsstelle.^[112] In diesem Fall sind signifikant andere Affinitäten als die des natürlichen Liganden nur für Verbindungen zu erwarten, die

sowohl mit dem Rezeptor als auch mit der wässrigen Umgebung deutlich andere Wechselwirkungen ermöglichen.

Als die Glycopeptide erstmals als Oligosaccharid-Mimetika vorgestellt wurden,^[113] ging man davon aus, dass die Saccharideinheit für die Bindungsspezifität sorgt, indem sie den Liganden zur Oligosaccharid-Bindungsstelle lenkt, während das Peptid als Gerüst für die optimale Orientierung des Glycanteils dient. Da Peptidliganden aber allgemein mit hoher Affinität an Peptidrezeptoren binden, ist auch zu erwarten, dass das Glycopeptid außerdem bevorzugt mit dem Kohlenhydrat-bindenden Rezeptor über das Peptidgerüst wechselwirkt und so eine Zunahme der Bindungsaffinität bewirkt.^[26] Die Ursache für die erhöhte Affinität von Peptiden kann ihre Fähigkeit zur induzierten Anpassung an die Bindungsstelle sein (induced fit), weil die relativ begrenzte Flexibilität um die Peptidbindungen hohe Geschwindigkeiten bei der Hinreaktion der Bindung bewirkt. In der Peptidstruktur wird diese Flexibilität durch Erhöhung der Mindestentropie erhalten. Umgekehrt liegen die konformativen Anordnungen von Kohlenhydraten normalerweise eng um eine (oder ein Mehrfaches von zwei für jede zugehörige 1→6-Verknüpfung, siehe Abbildung 3) kugelförmige Konformation mit Energieminimum. Im Unterschied zu Glycopeptiden haben die sehr flexiblen Neoglykonjugate^[114] wegen der großen Entropiezunahme keine hohe Affinität.^[115, 116]

Bindungsuntersuchungen mit einer Reihe phosphorylierter Glycopeptide und dem divalenten Mannose-6-phosphat-Rezeptor (MPR) bestätigten die Auffassung, dass Oligosaccharide von Glycopeptiden nachgeahmt werden können.^[26] Die strukturelle Ähnlichkeit zwischen dem Oligosaccharid und dem aktivsten Glycopeptidliganden wurde durch Moleküldynamik-Untersuchungen gestützt (Abbildung 8).

Ähnliche Ergebnisse wurden später mit Glycopeptiden erhalten, die für die Bindung an Selectine entwickelt wurden.^[14] Ein Glycopeptid-Mimetikum des SLe^x-Tetrasaccharids, das Fucose an einem Peptidgerüst enthält, hatte eine mehr als zehnmal höhere Bindungsaffinität zu E-Selectin.^[117] Wenn die Liganden in polymerer polyvalenter Anordnung in Liposomen immobilisiert waren, trat keine weitere signifikante Zunahme der Affinität auf.^[118] In einer anderen Arbeit wurde ein hochaffiner divalent Adhäsinsligand für *Streptococcus suis* hergestellt, der über Peptidbindungen mit einem aromatischen Kern verknüpftes αGal(1→4)αGal enthält. Der Assay mit strukturell ähnlichen tetravalenten Liganden ergab keine signifikante Zunahme der Bindung, was darauf schließen lässt, dass die Wechselwirkung tatsächlich divalent ist.^[27] Glycopeptid-Mimetika von Galactose- oder GlcNAc-haltigen Oligosacchariden lieferten Inhibitoren ($K_d = 1.7 \mu\text{m}$) von Galactosidase^[119] bzw. GlcNAc-Transferase.^[120] Bei einem anderen Ansatz wurden Glycopeptid-ähnliche Azazucker-Inhibitoren hergestellt; sie hatten jedoch geringere Inhibitorkraft als die Azazucker ohne Peptideinheit.^[121]

Glycopeptide sind ausgezeichnete Mimetika für komplexe Oligosaccharide und können in Form einer Bibliothek dazu dienen, Liganden mit hoher Affinität zu identifizieren.^[122] Da Glycopeptide aus präaktivierten Aminosäuren und glycosylierten Aminosäurebausteinen leicht zu synthetisieren sind, ist bei sorgfältigem Aufbau einer Bibliothek davon auszuge-

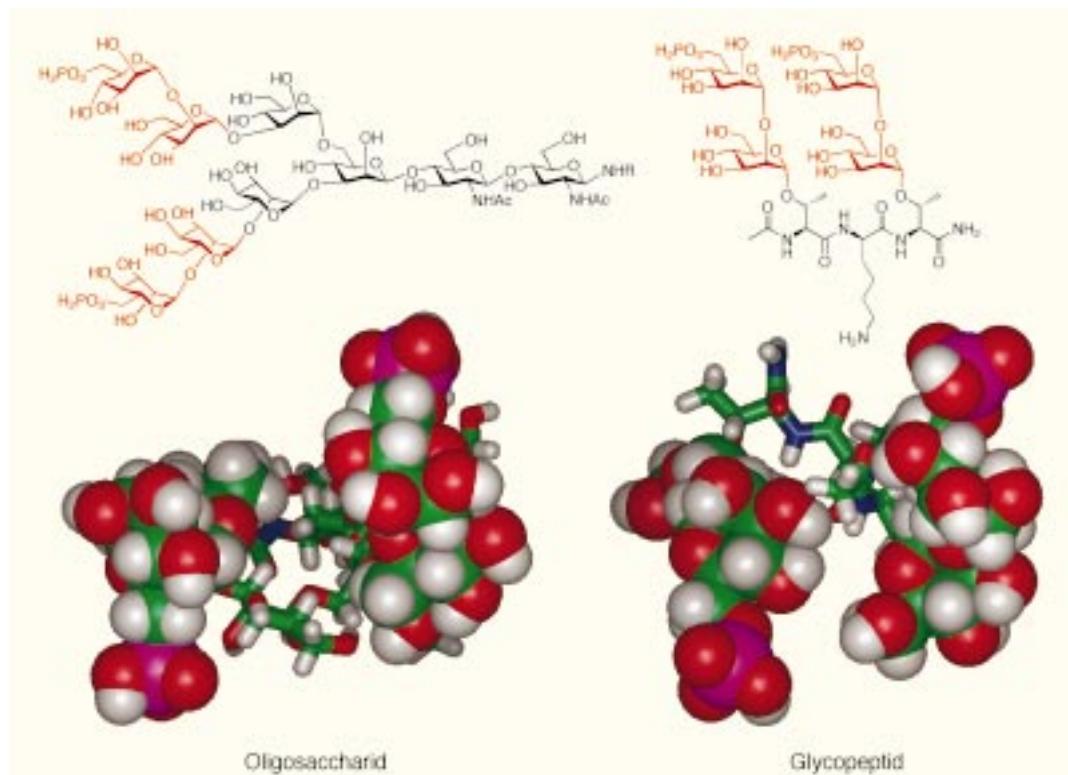


Abbildung 8. Durch Moleküldynamik-Rechnungen erhaltene Modelle von phosphoryliertem Mannose-reichem M7 und einem Glycopeptid-Mimetikum mit ähnlichen Konformationen, vom Punkt der Wechselwirkung mit dem Mannose-6-phosphat-Rezeptor aus gesehen. Disaccharidphosphate sind als Kugeln hervorgehoben.^[26]

hen, dass jede Trägerperle nur eine einzige Verbindung enthält. Für die Synthese von Glycosylaminosäurebausteinen hat sich die Glycosylierung von Fmoc-geschützten (Fmoc = Fluoren-9-ylmethoxycarbonyl) Aminosäure-OPfp-Estern (Pfp = Pentafluorphenyl) oder Aminosäuren als allgemeine und zweckmäßige Methode bewährt, die zur Herstellung komplexer Verbindungen für den direkten Einbau in Glycopeptidbibliotheken geeignet ist.^[123-127] Auch viele andere Verfahren wurden erfolgreich für die Synthese von Glycopeptiden eingesetzt, sie erfordern aber alle weitere Veränderungen der glycosylierten Bausteine vor ihrer Verwendung in Peptidsynthesen.^[128] Glycopeptidbibliotheken sind nicht nur wegen ihrer leichten Herstellung, sondern auch wegen der einfachen Charakterisierung wirksamer Verbindungen attraktive Alternativen zu Oligosaccharidbibliotheken.

8. Synthese von Glycopeptiden in Parallelanordnungen und Bibliotheken

8.1. Parallelsynthese von Glycopeptidanordnungen

Wenn die Struktur einer Protein-Kohlenhydrat-Wechselwirkung *a priori* gut bekannt ist, kann eine Reihe wirksamer Glycopeptid-Analoga durch gezielte Synthese mit einer Parallelmethode hergestellt werden. Dazu müssen hauptsächlich die Art der an der Wechselwirkung beteiligten Zucker und ihre räumliche Orientierung beim Kontakt mit dem Rezeptor bekannt sein. Mit solchen aus Kristallstrukturdaten oder Transfer-NOE-NMR-Untersuchungen zugängli-

chen Informationen wurde eine Reihe hochaffinier Glycopепtidliganden für mehrere Rezeptoren durch Parallelsynthese entwickelt.

Die Parallelsynthese von zwanzig zweizähnigen Glycopeptidliganden für den Mannose-6-phosphat-Rezeptor (MPR) lieferte Verbindungen mit annähernd 20-mal höherer Affinität zum Rezeptor als der natürliche Ligand.^[26] Die Reihe der Analoga enthielt glycosyierte lineare Tri-, Tetra- und Pentapeptide sowie cyclische Hexa-, Hepta- und Octapeptide. Die Glycane waren phosphorylierte 1→2- und 1→6-verknüpfte Mannodisaccharide und phosphorylierte Mannoside. Die Glycopeptide wurden durch Mehrfachsäulen-Peptidsynthese^[129, 130] (MCPS, multiple column peptide synthesis) an einem PEGA-Harz aus Fmoc-Aminosäure-OPfp-Estern hergestellt. Die glycosylierten Bausteine waren als Acetate oder Benzoate, die Phosphate mit Trichlorethylgruppen geschützt. Die freien Glycopeptide wurden in hoher Ausbeute und Reinheit erhalten. Ihre Untersuchung ergab, dass für die spezifische Wechselwirkung mit dem Rezeptor mindestens zwei Disaccharide an einem Gerüst sowie eine ausreichende, aber nicht übermäßige Beweglichkeit im Gerüst erforderlich sind. Die höchsten Affinitäten zum Rezeptor hatten zwei 6-P- α -Man-(1→2)- α -Man-Disaccharide an einem linearen Tripeptid. Versuche, die Affinität durch Cyclisieren des Peptids zu erhöhen, schlugen fehl.^[131]

In einer Parallelsynthese durch basenkatalysierte Michael-Addition von β -D-(C₁₂H₂₅CO)₄Gal-SAc an vier ungesättigte Ketone und ein α -Chlorketon und anschließende reduktive Aminierung mit sechs Aminosäuren wurden 120 Galactose-

haltige Verbindungen (30 Gemische aus je vier Diastereomen) hergestellt. Die 30 Produktgemische wurden durch Feststoffextraktion gereinigt und als Galactosidase-Inhibitoren getestet. Galactose sorgte für die Enzymspezifität, während die Affinität durch Wechselwirkung mit dem Aglycongerüst erreicht wurde. Auf diese Weise wurden Inhibitoren der Enzymaktivität ($K_d = 1.7 \mu\text{M}$) erhalten.^[119]

Durch MCPS wurde eine Reihe von Glycopeptidliganden mit variierendem Glycananteil synthetisiert, die an MHC-Klasse-II-E^k binden und mit dem T-Zell-Rezeptor wechselwirken (Abbildung 9 a).^[132, 133] Die glycosylierten Synthesebausteine wurden durch Glycosylierung von Fmoc-Aminosäure-OPfp-Estern erhalten und direkt in Kupplungsreaktionen eingesetzt. Zu den verwendeten Glycanen gehörten das Tn-(α -D-GalNAc)-Antigen, die Kernstrukturen 1–4 von Mucin sowie zahlreiche, nicht mit Mucin verwandte Saccharide. Die Untersuchung der in Abbildung 9 a gezeigten Glycopeptide ergab, dass sie hauptsächlich T- und Tn-Antigene erkannten und ihre immunogene Wirkung erheblich größer war (sehr viel höhere T-Zell-Titer bei Mäusen) als die anderer Glycane (Abbildung 9 b).^[28] Aus diesen Ergebnissen wird deutlich, dass es spezifisch gegen Tumor-assoziierte Antigene gerichtete TCRs gibt und die Verlängerung mit GlcNAc (z.B. Kernstrukturen 2 und 4) zu nicht immunogenen Verbindungen führt.

Die Parallelsynthese von 62 Fucosyltripeptiden ergab zwei Liganden mit submikromolarer Affinität zu P-Selectin, allerdings konnte die gewünschte Aktivität bei E-Selectin nicht nachgewiesen werden.^[134] Die Selektivität für E-Selectin verlangte den Einbau einer Hydroxygruppe, die die 4-Hydroxygruppe der zentralen Galactose in SLe^x nachahmt, sowie einen Fucosylrest und eine Carboxylatgruppe; auf diese Weise wurden Liganden mit mehr als der zehnfachen Aktivität des SLe^x-Tetrasaccharids erhalten.^[117] Einer der besten Liganden entstand aus Thr(α -Fuc)-OEt, das zuerst mit einer Hydroxyaminosäure N-acyliert und danach mit einer Dicarbonsäure zum sauren Mimetikum von Sialinsäurecarboxylat verlängert wurde (Abbildung 10). Dieses Verfahren wurde zu einer Festphasenmethode weiterentwickelt, bei der die Verbindungen über die unveränderte Fucosyleinheit mit dem festen Träger verbunden sind.^[135]

Bei einem anderen eleganten Zugang wurde eine Reihe C-verknüpfter Glycopeptid-ähnlicher Mimetika von SLe^x über eine Ugi-Vierkomponentenreaktion parallel synthetisiert.^[136] Die Umsetzung anomerer, um zwei oder drei Kohlenstoffatome verlängerter C-Glycosylaldehyde oder -säuren mit trägegebundenen Aminen, Isonitrilen oder anderen Säuren und Aldehyden lieferte eine Reihe C-verknüpfter Analoga. Diese Methode ist einfach und mit guten Ausbeuten an der Festphase durchzuführen. Allerdings sind mit diesem Verfahren nur gemischte und keine „One-Bead-one-Compound“-Bibliotheken zugänglich, da sie durch eine Mehrkomponentenreaktion entstehen, bei der alle Reaktionskomponenten in einem einzigen Schritt zugefügt werden. Um die Verbindungen der Bibliothek zu identifizieren, sind Dekonvolutionsstrategien wie Positionsscanning oder iterative Synthese erforderlich. Dagegen eignet sich die Dekonvolution mit schnellem Screening, weil die Produkte rasch hergestellt werden.

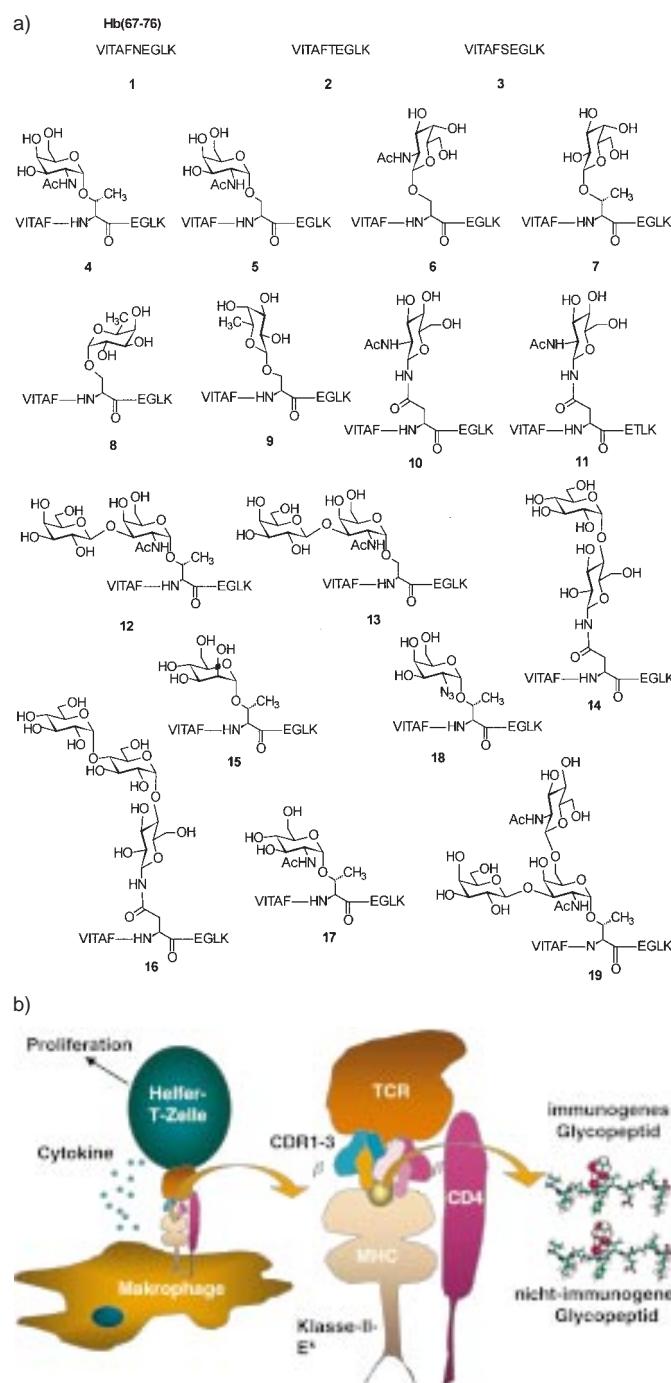


Abbildung 9. a) Die zur Untersuchung der Glycanspezifität der MHC/TCR-Erkennung verwendeten Glycopeptide. Immunitätstests mit den Glycopeptiden bei Mäusen und anschließende Bestimmung des Proliferationsindex von T-Zellen aus Lymphknoten ergaben nur für die Tn- und T-Antigene starke immunogene Wirkung.^[28] b) Glycopeptid/MHC/TCR-Wechselwirkung. Die beiden Glycopeptide lassen erkennen, dass bereits eine geringfügige Veränderung – der Austausch von α -GalNAc gegen α -GlcNAc, d.h. die Änderung einer axialen 4-Hydroxygruppe in eine äquatoriale – zum völligen Verlust der Immunogenität führt.^[28]

8.2. Synthese und Analyse von Glycopeptidbibliotheken an der Festphase

Im Unterschied zur Parallelsynthese von Glycopeptidanordnungen, die mit der Bausteinmethode leicht gelingt^[125]

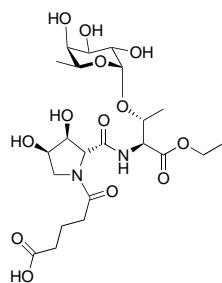


Abbildung 10. Ein Ligand mit hoher Affinität zu E-Selectin. Die Wechselwirkung mit dem Rezeptor erfolgt über die 2- und 3-Hydroxygruppen der Fucose, vermutlich über die Hydroxygruppen des Dihydroxyprolinrings sowie mit dem Carboxylat. In Abbildung 4 ist ein Ligand mit ähnlich hoher Affinität der Struktur von SLe^x gegenübergestellt.^[118]

tion 4.^[138] Allerdings wurden die Verbindungen der Bibliothek nicht charakterisiert und keine Screening-Resultate angegeben. Derzeit ist nur eine kombinatorisch hergestellte Glycopeptidbibliothek bekannt, die sich für Screening und Strukturanalyse eignet.^[52] Die Herstellung einer Bibliothek

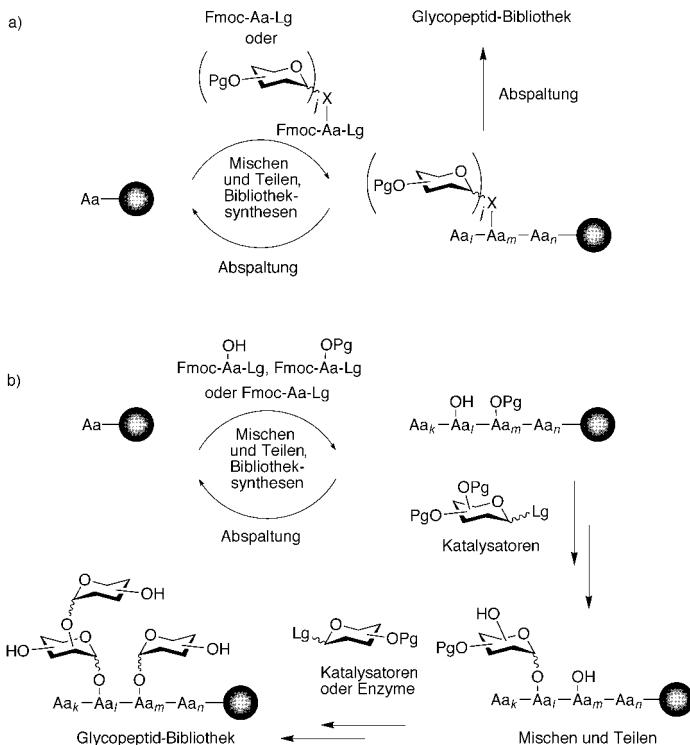
(Schema 3 a), muss die kombinatorische Synthese einer Glycopeptidbibliothek mit der Teilen-und-Mischen-Methode erst noch ein Routineverfahren werden. Die Schwierigkeit besteht in der Strukturanalyse der riesigen Zahl von Verbindungen, die in Picomolmengen an einem einzigen Trägerkügelchen hergestellt werden. Während Peptide an Harzkügelchen bequem durch stufenweises Sequenzieren an der Festphase^[137] oder durch Edman-Abbau analysiert werden können, sind diese Methoden wegen der Instabilität der Glycosidbindung unter den verwendeten sauren oder basischen Bedingungen für Glycopeptide nicht geeignet.

Eine frühe Arbeit beschreibt eine Pentaglycopeptid-Bibliothek mit drei Zufallspositionen und einem Asn(GlcNAc)-Baustein in Position 4.^[138] Allerdings wurden die Verbindungen der Bibliothek nicht charakterisiert und keine Screening-Resultate angegeben. Derzeit ist nur eine kombinatorisch hergestellte Glycopeptidbibliothek bekannt, die sich für Screening und Strukturanalyse eignet.^[52] Die Herstellung einer Bibliothek

mit 300000 Verbindungen und ihre Analyse wurde teilweise durch die Entwicklung eines massenspektrometrischen Verfahrens zur Identifizierung der Sequenz einzelner Glycopeptide in der Substanzbibliothek ermöglicht. Bei dieser Methode wird die Synthesegeschichte des Glycopeptids an den Trägerperlen festgehalten, indem in jedem Syntheseschritt ein kleiner Teil der wachsenden Oligomerkette abgefangen wird.^[139] Auf diese Weise entsteht an der Trägerperle keine Einzelverbindung, sondern eine Reihe verwandter Fragmente (Abbildung 6). Schwierigkeiten treten aber auf, wenn das Verfahren auf eine Glycopeptidbibliothek angewendet wird, bei der die Aminonucleophile signifikante Reaktivitätsunterschiede aufweisen. Um die unterschiedlichen Reaktivitäten von Aminen zu berücksichtigen, wurde eine In-situ-Abfangmethode entwickelt, die Fmoc-Aminosäuren im Gemisch mit 10% der Boc-geschützten Analoga verwendet (Boc = *tert*-Butoxycarbonyl).^[122] Die glycosylierten Fmoc-Aminosäure-OPfp-Ester waren durch Reaktion mit bestimmten Carbonsäure-OPfp-Estern markiert. Da die Substanzbibliothek über einen photolabilen Linker an den festen Träger gebunden war (Abbildung 6), konnten die aus den Harzkügelchen an einer MS-Elektrode durch 20-minütiges Bestrahlen mit einer Quecksilberlampe freigesetzten Verbindungen sofort analysiert werden. Die Reinheit der Substanzbibliothek wurde durch Sammeln einiger Trägerperlen und Analysieren mit der MALDI-TOF-Massenspektrometrie bestimmt. Die meisten der gesammelten Harzkügelchen lieferten Spektren der „Leitern“ (siehe Abbildung 6), die mit einem Computerprogramm zur Zuordnung der Massendifferenzen leicht entschlüsselt werden konnten.

Glycopeptidbibliotheken wurden außer durch das Bausteinverfahren auch durch Glycosylierung eines vorverknüpften Glycans oder der hydroxylierten Aminosäureseitenkette einer Peptidbibliothek hergestellt (Schema 3 b). Erste Arbeiten, bei denen ein bekanntes Glycopeptid mit 5–8 Äquivalenten des perbenzoylierten Glycosyltrichloracetimidat-Donors glycosyliert wurden, ergaben gute Ausbeuten (ca. 35 % der ursprünglichen Trägerbeladung) an Glycopeptiden mit Di- und Trisacchariden.^[55, 140] Die Glycosylierung wurde an den vier Trägerharzen Polyhipe, TentaGel, PEGA1900 und Macrosorb-SPR250 untersucht, gelang aber nur an PEGA und Polyhipe.

Erste Versuche zur direkten Festphasenglycosylierung eines längeren Peptids waren nicht viel versprechend, auch wenn ein Glycopeptidprodukt nachgewiesen werden konnte.^[128, 141] Die direkte Glycosylierung der Hydroxygruppe an einer Aminosäureseitenkette gelang zum Teil, allerdings mit niedriger Ausbeute.^[55, 142] Das Versagen polarer Harze wie PEGA könnte auf die vielen primären Amide im Gerüst zurückzuführen sein, die mit der Carbokation-Zwischenstufe interferieren. Die Amidbindungen von Peptiden scheinen weniger zu stören. Da für Festphasen-Bioassays aber polare Träger benötigt werden, entwickelte man für die Festphasenglycosylierung von Peptiden neue polare Harze, die nur Etherbindungen enthalten. Die quantitative Glycosylierung eines bekannten Peptids mit 5–8 Äquivalenten peracetyliertem oder perbenzoyliertem Trichloracetimidat gelang an POEPOP, einem nur Etherbindungen enthaltenden PEG-Harz.^[37] In einem „One-Bead-one-Compound“-Verfahren



Schema 3. Strategien für die Synthese von Glycopeptidbibliotheken. a) Synthesebausteine (X = O, C, S, N). b) Chemische oder enzymatische Glycosylierung eines Peptids oder Glycopeptids. Enzyme wurden bei der Festphasensynthese von Glycopeptidbibliotheken bisher zwar noch nicht eingesetzt, aber mehrere trägegebundene Glycopeptide wurden enzymatisch glycosyliert.^[44, 148] Lg = Abgangsgruppe, Pg = Schutzgruppe.

wurden zwei trägergebundene Peptide mit geschützten und freien Hydroxygruppen zuerst mit Galactose und nach Entschützen der zweiten Hydroxygruppe mit Fucose zu einer kleinen Bibliothek aus vier Glycopeptiden glycosyliert. Diese wurden vom Träger abgespalten, getrennt und massenspektrometrisch charakterisiert.

Während die Festphasen-Glycosylierung zweifellos eine brauchbare Alternative zur Herstellung echter Glycopeptid-Zufallsbibliotheken mit Diversität im Peptid- und im Glycan-Teil ist, erweist sich die Analyse derartiger Bibliotheken gegenwärtig noch als ziemlich schwierig. Eine Möglichkeit ist die Fragmentierung der Verbindungen durch Massenspektrometrie sowie die Anwendung der in Abschnitt 5 besprochenen MAS-NMR-Spektroskopie.

9. Screening von Oligosaccharid- und Glycopeptidbibliotheken

Eine Hauptforderung für die erfolgreiche Anwendung kombinatorisch hergestellter Substanzbibliotheken bei der Entdeckung pharmazeutisch wirksamer Stoffe ist ihre Verwendung in leistungsfähigen Screenings (High-Throughput-Screening, HTS). Bei Oligosaccharid- und Glycopeptidbibliotheken hängt das HTS von der Synthese ab, es kann mit Substanzgemischen oder getrennten Verbindungen in Lösung und mit trägergebundenen Einzelverbindungen durchgeführt werden. Das Screening von Verbindungsgemischen ist nicht einfach; die für diesen Zweck brauchbaren Methoden wurden in einer Übersicht zusammengestellt.^[57] Eine der für das Screening einer Oligosaccharid-„Bibliothek“ verwendeten Methoden beruht auf NMR-Transfer-NOEs (tr-NOEs).^[143, 144] Beispielsweise wurde die Bindung von α -L-Fuc(1 → 6)- β -D-GlcNAc-OMe an das Agglutinin aus *Aleuria aurantia* in Gegenwart von fünf oder 14 anderen, nicht bindenden Oligosacchariden nachgewiesen.^[143] Die Methode ist aber nur eingeschränkt anwendbar, weil die Zahl der gleichzeitig zu untersuchenden Verbindungen in einem Gemisch begrenzt ist, Liganden mit niedriger oder sehr hoher Affinität schwer nachzuweisen sind und die Analyse der Spektren zeitaufwändig ist.

Bei einer anderen Methode wurde das durch Zufallsglycosylierung in Lösung erhaltene Gemisch aus zwölf Trisacchariden (Abschnitt 6.3) durch Messung von radioaktiv markierter inkorporierter GDP-Fuc auf Fucosyltransferase-Aktivität untersucht.^[98] Der Transfer wurde sogar noch bei Aczeptoren mit bis zu 5 % Anteil am Gemisch nachgewiesen. Mit einer kürzlich durch Reaktion von *p*-Aminophenylpyranosid mit Cyanurchlorid hergestellten Substanzbibliothek aus 640 Kohlenhydrat-Triazin-Derivaten wurde ein rasches Screening auf Proteasen-Faktor-Xa- und Plasmin-Inhibitoren durchgeführt.^[145] Die Synthese der Substanzbibliotheken als parallele Anordnungen getrennter Verbindungen in Platten mit 96 Vertiefungen erleichterte das HTS der Proteaseaktivität in diesen Platten durch spektrophotometrische Messung des hydrolytisch freigesetzten *p*-Nitroanilinderivats. Dabei wurden keine Inhibitoren auf der Basis von Kohlenhydraten nachgewiesen.

Wie bereits erwähnt wurde, erleichtert die Teilen-und-Mischen-Methode die rasche Herstellung einer großen Zahl von Verbindungen. Diese wurden danach üblicherweise vom Träger abgespalten, getestet und in Lösung analysiert. Aufgrund der Entwicklung fester Träger, die mit organischen und wässrigen Solventien kompatibel sind, kann das Screening der Substanzbibliothek seit kurzem auch am Träger selbst erfolgen. Aktive Liganden werden mit Immunfarbe- oder kolorimetrischen Methoden oder – direkter – mit einem fluoreszenzmarkierten Rezeptor nachgewiesen. So wurden an TentaGel gebundene Kohlenhydratliganden in Parallelanordnungen an einem Digoxigenin-markierten Agglutinin (Sialinsäure-spezifisches Lectin) aus *Maackia amurensis* getestet.^[146] Harzkügelchen mit gebundenem, fluoreszenzmarkiertem Lectin wurden mit Durchflusscytometrie detektiert.^[146] Das Festphasen-Screening der Kohlenhydratbibliothek mit 1300 Verbindungen (siehe Abschnitt 6.3) erfolgte mit einem kolorimetrischen Assay an der Gesamtbibliothek.^[59] Nach Inkubation der Trägerperlen mit einem Biotin-markierten Lectin aus *Burhnia purpurea* wurde gebundenes Lectin durch eine zweite Inkubation mit dem an Alkalische Phosphatase gebundenen Streptavidin nachgewiesen. Das Screening ergab mehrere nichtnatürliche Oligosaccharidliganden für das Lectin, überraschenderweise wurde aber der bekannte natürliche Ligand, der ebenfalls in der Substanzbibliothek vorliegen sollte, nicht nachgewiesen. Hierfür gibt es zwei Gründe: Entweder ist die Bindung des Lectins an diesen Liganden in irgendeiner Form gehindert, oder gerade dieses Oligosaccharid wurde nie synthetisiert. Mit Markierungsmethoden kann der Ausfall eines Syntheseschritts nicht nachgewiesen werden, dagegen lässt die Analyse der trägergebundenen Substanzen durch Massenspektrometrie oder NMR-Spektroskopie Probleme während der Synthese rasch erkennen. Bei späteren Assays in Lösung hatten der natürliche Ligand und die Mimetika ähnliche Bindungsaffinität.

Das Screening von Glycopeptidbibliotheken an der Festphase wurde auch mit löslichen Rezeptoren durchgeführt. Beispielsweise wurde die durch Stufensynthese an PEGA hergestellte Substanzbibliothek (Abschnitt 8.2) mit dem fluoreszenzmarkierten Lectin aus *Lathyrus odoratus* inkubiert (Abbildung 11a). Die am stärksten fluoreszierenden Trägerperlen wurden gesammelt und die Liganden durch MALDI-TOF-Massenspektrometrie identifiziert. Die höchste Aktivität hatten die Glycopeptide, die nur Mannose enthielten (T(α -D-Man)ALKPTHV, LHGGFT(α -D-Man)HV, T(α -D-Man)EHKGSKV, GT(α -D-Man)-FPGLAV und T(α -D-Man)-LFKGFHV): Ihre Fluoreszenz war bis zu 25-mal so hoch wie die der Lectinbindung an trägergebundene Mannose. Die Inhibierung der Lectinbindung an immobilisierte Mannose durch die synthetischen aktiven Glycopeptide (Abbildung 11b) lässt darauf schließen, dass die Glycopeptide und der natürliche Kohlenhydratligand an die gleichen oder an eng verwandte Bindungsstellen des Lectins binden.

Parallelanordnungen trägergebundener Glycopeptide und immobilisierte Glycopeptidbibliotheken sind auch für das HTS ganzer Zellen eingesetzt worden. Eine an Polystyrolharz gebundene GlcNAc-haltige Pentapeptidbibliothek wurde mit Erythrocyten inkubiert, die auftretende Adhäsion wurde aber nicht weiter untersucht.^[138] Später verwendete man in Roset-

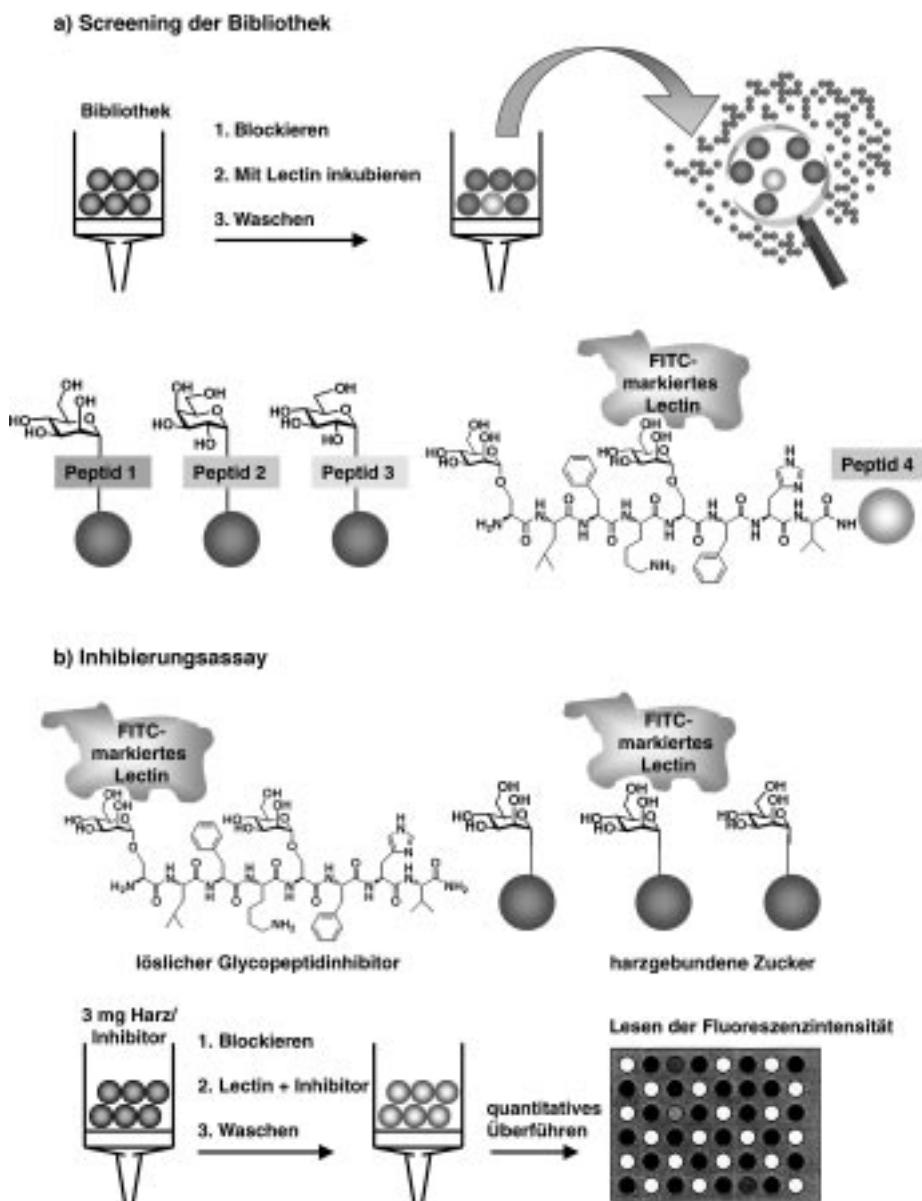


Abbildung 11. a) Screening einer Glycopeptidbibliothek mit einem fluoreszenzmarkierten Lectin und an PEGA immobilisierten Liganden. Wirksame Verbindungen wurden durch Massenspektrometrie analysiert. b) Die Bindung von FITC-markiertem Lectin an trägergebundene Mannose konnte durch lösliche Glycopeptide, die durch Screening einer Substanzbibliothek erhalten wurden, inhibiert werden. Die Inhibition wurde durch Aufzeichnen der Lectinfluoreszenz quantifiziert. Nur jede zweite Vertiefung der Mikrotiterplatte wurde verwendet; nichtfluoreszierende Harzkügelchen zeigten gute Inhibitoren an.^[52] FITC = Fluoresceinisothiocyanat.

tentests an TentaGel gebundene Glycopeptid-Dendrimere mit dem Tn-Antigen und erhielt eine positive Reaktion mit Anti-Tn-Antikörpern und Tn + -Erythrocyten.^[147] Die Immunisierung von Tieren mit einem der aktivsten Glycopeptid-Dendrimere führte zu einem erstaunlichen Anstieg des Anti-Tn-Spiegels.

10. Zusammenfassung und Ausblick

Protein-Kohlenhydrat-Wechselwirkungen spielen bei zahlreichen biologischen Vorgängen zweifellos eine wesentliche Rolle, und die Entwicklung von Kohlenhydrat-Mimetika, die

in diese Vorgänge eingreifen, bietet ein wirkungsvolles Verfahren, um bestimmte biologische Wirkungen zu verändern oder zu verbessern. In den letzten Jahren wurden neue Methoden zur Synthese von Oligosaccharid- und Glycopeptidbibliotheken beschrieben, die einen raschen Zugang zu derartigen Kohlenhydrat-Mimetika ermöglichen sollten. Bis zu einem gewissen Grad wurden auch Techniken entwickelt, mit denen aktive, aus Festphasenbibliotheken isolierte Oligosaccharid- und Glycopeptidliganden für diese Kohlenhydrat-bindenden Proteine identifiziert werden können. Trotz des überzeugenden Konzepts gibt es erhebliche Einschränkungen, die den Fortschritt bei Synthese, Charakterisierung und Screening von Kohlenhydratbibliotheken hemmen. Dazu gehören unter anderem das Fehlen geeigneter Methoden zur Miniaturisierung und Analyse von Verbindungen an der Festphase. Außerdem muss die Wirkung des festen Trägers auf die Screening-Ergebnisse sorgfältig untersucht werden. Auch wenn die Synthese und Analyse von Oligosaccharidbibliotheken eine Herausforderung bleibt, so erfordert die alternative Verwendung großer Lösungsbibliotheken eine schwierige Dekonvolutionssynthese, die für Oligosaccharide wegen ihrer Komplexität und Dauer nicht praktikabel ist. Viel versprechend sind hingegen Glycopeptide, die leicht an der Festphase gebildet und einfacher in hoher Reinheit erhalten werden können und deren Peptidteil zusätzlich für günstige Bindungaffinität sorgt. Die derzeit zweckmäßigste Synthesemethode für Glycopeptidbibliotheken nutzt ein In-situ-Abfangverfahren mit einem Gemisch aus Boc- und Fmoc-geschützten Amino-

säuren, während glycosyierte Aminosäuren getrennt durch Reaktion mit Carbonsäuren kodiert werden. Die Analyse der Verbindungen wird durch direkte photolytische Abspaltung vom PEG-Träger und anschließende MALDI-TOF-Massenspektrometrie erleichtert. Die Anwendung dieser Verfahren liefert Liganden mit hoher Affinität zu Kohlenhydrat-bindenden Proteinen.

Danksagung

Einige unserer hier geschilderten Forschungsarbeiten wurden von der Mitzutani Foundation und der Danish National

Research Foundation gefördert. P.M.S. dankt der EU für ein Stipendium (Nr. ERBIC18CT970225).

Eingegangen am 18. Mai 1999,
ergänzte Fassung am 5. November 1999 [A 345]
Übersetzt von Dr. Kathrin-M. Roy, Langenfeld

- [1] Aktueller Aufsatz über vollsynthetische Antitumor-Impfstoffe auf Kohlenhydratbasis: S. J. Danishefsky, J. R. Allen, *Angew. Chem.* **2000**, *112*, 882–911; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000**, *39*, 836–863.
- [2] a) M. J. Sofia, *Mol. Diversity* **1998**, *3*, 75–94; b) M. J. Sofia, *Drug Discovery Today* **1996**, *1*, 27–34.
- [3] D. Kahne, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **1997**, *1*, 130–135.
- [4] P. Arya, R. N. Ben, *Angew. Chem.* **1997**, *109*, 1335–1337; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1997**, *36*, 1280–1282.
- [5] H. M. I. Osborn, T. H. Khan, *Tetrahedron* **1999**, *55*, 1807–1850.
- [6] P. Arya, R. N. Ben, K. M. K. Kutterer in *Organic Synthesis Highlights*, Vol. IV, Wiley-VCH, im Druck.
- [7] Z.-G. Wang, O. Hindsgaul, *Adv. Exp. Med. Biol.* **1998**, *435*, 219–236.
- [8] M. J. Sofia, *Med. Chem. Res.* **1998**, *8*, 362–378.
- [9] F. Schweizer, O. Hindsgaul, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **1999**, *3*, 291–298.
- [10] C. A. Bush, P. Cagas in *Advances in biophysical chemistry*, Vol. 2, (Hrsg.: C. A. Bush), Jai, Greenwich, CT, **1992**, S. 149–180.
- [11] R. A. Dwek, *Chem. Rev.* **1996**, *96*, 683–720.
- [12] H. Lis, N. Sharon, *Chem. Rev.* **1998**, *98*, 637–674.
- [13] C.-H. Wong, *Acc. Chem. Res.* **1999**, *32*, 376–385.
- [14] P. Sears, C.-H. Wong, *Angew. Chem.* **1999**, *111*, 2446–2471; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, *38*, 2300–2324.
- [15] G. Kretzschmar, A. Toepfer, C. Hüls, M. Krause, *Tetrahedron* **1997**, *53*, 2485–2494.
- [16] Aufsatz über polyvalente Wechselwirkungen in biologischen Systemen: M. Mammen, S.-K. Choi, G. M. Whitesides, *Angew. Chem.* **1998**, *110*, 2908–2953; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, *37*, 2754–2794.
- [17] P. Y. Tong, W. Gregory, S. Kornfeld, *J. Biol. Chem.* **1989**, *264*, 7962–7969.
- [18] Y. C. Lee in *Carbohydrate recognition in cellular function* (Hrsg.: G. Bock, S. Harnett), Wiley, Chichester, **1989**, S. 80–95.
- [19] R. T. Lee, Y. C. Lee, *Glycoconjugate J.* **1997**, *14*, 357–363.
- [20] M. Vinson, S. Mucklow, A. P. May, E. Y. Jones, S. Kelm, P. R. Crocker, *Trends Glycosci. Glycotechnol.* **1997**, *9*, 283–297.
- [21] K. Miyamura, K. M. B. Reid, U. Holmskov, *Trends Glycosci. Glycotechnol.* **1994**, *6*, 286–309.
- [22] H. Franzky, M. Meldal, H. Paulsen, S. Thiel, J. C. Jensenius, K. Bock, *Bioorg. Med. Chem.* **1996**, *4*, 1881–1899.
- [23] W. I. Weis, K. Drickamer, *Structure* **1994**, *2*, 1227–1240.
- [24] K. Bock, *Pure Appl. Chem.* **1983**, *55*, 605–622.
- [25] K. Bock, J. Arnarp, J. Lönngren, *Eur. J. Biochem.* **1982**, *129*, 171–178.
- [26] M. K. Christensen, M. Meldal, K. Bock, H. Cordes, S. Mouritsen, H. Elsner, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* **1994**, 1299–1310.
- [27] H. C. Hansen, S. Haataja, J. Finne, G. Magnusson, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 6974–6979.
- [28] L. Galli-Stampino, E. Meinjohanns, K. Frische, M. Meldal, T. Jensen, O. Werdelin, S. Mouritsen, *J. Cancer Res.* **1997**, *57*, 3214–3222.
- [29] G. Ragupathi, T. K. Park, S. Zhang, I. J. Kim, L. Gruber, S. Adluri, K. O. Lloyd, S. J. Danishefsky, P. O. Livingston, *Angew. Chem.* **1997**, *109*, 125–128; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1997**, *36*, 125–128.
- [30] P. P. Deshpande, S. J. Danishefsky, *Nature* **1997**, *387*, 164–166.
- [31] L. Poppe, G. S. Brown, J. S. Philo, P. V. Nikrad, B. H. Shah, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 1727–1736.
- [32] B. Merrifield, *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, *85*, 2149–2153.
- [33] M. Meldal in *Methods in Enzymology: Solid-Phase Peptide Synthesis* (Hrsg.: G. Fields), Academic Press, London, **1997**, S. 83–104.
- [34] S.-S. Wang, *J. Am. Chem. Soc.* **1973**, *95*, 1328–1333.
- [35] W. Rapp, L. Zhang, R. Häbisch, E. Bayer, *Pept. Proc. Eur. Pept. Symp. 20th* **1988**, 199–201.
- [36] M. Meldal, *Tetrahedron Lett.* **1992**, *33*, 3077–3080.
- [37] M. Renil, M. Meldal, *Tetrahedron Lett.* **1996**, *37*, 6185–6188.
- [38] J. Buchardt, M. Meldal, *Tetrahedron Lett.* **1998**, *39*, 8695–8698.
- [39] J. Rademann, M. Grötl, M. Meldal, K. Bock, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 5459–5466.
- [40] J. Vagner, G. Barany, K. S. Lam, V. Krchnák, N. F. Sepetov, J. A. Ostrem, P. Strop, M. Lebl, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1996**, *93*, 8194–8199.
- [41] R. Quarrell, T. D. W. Claridge, G. W. Weaver, G. Lowe, *Mol. Diversity* **1995**, *1*, 223–232.
- [42] S. Leon, R. Quarrell, G. Lowe, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1998**, *8*, 2997–3002.
- [43] F.-I. Auzanneau, M. Meldal, K. Bock, *J. Peptide Sci.* **1995**, *1*, 31–44.
- [44] M. Meldal, F.-I. Auzanneau, O. Hindsgaul, M. M. Palcic, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1994**, 1849–1850.
- [45] J. A. Camarero, G. J. Cotton, A. Adeva, T. W. Muir, *J. Peptide Res.* **1998**, *51*, 303–316.
- [46] M. T. Burger, P. A. Bartlett, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 12697–12698.
- [47] H. K. Smith, M. Bradley, *J. Combinatorial Chem.* **1999**, *1*, 326–332.
- [48] P. M. St. Hilaire, M. Willert, M. A. Juliano, L. Juliano, M. Meldal, *J. Combinatorial Chem.* **1999**, *1*, 509–523.
- [49] M. Renil, M. Ferreras, J. M. Delaisse, N. T. Foged, M. Meldal, *J. Peptide Sci.* **1998**, *4*, 195–210.
- [50] M. Meldal, I. Svendsen, L. Juliano, M. A. Juliano, E. Del Nery, J. Scharfstein, *J. Peptide Sci.* **1998**, *4*, 83–91.
- [51] J. C. Spetzler, V. Westphal, J. R. Winther, M. Meldal, *J. Peptide Sci.* **1998**, *4*, 128–137.
- [52] P. M. St. Hilaire, T. L. Lowary, M. Meldal, K. Bock, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 13312–13320.
- [53] B. Yan, *Acc. Chem. Res.* **1998**, *31*, 621–630.
- [54] S. Manabe, Y. Ito, T. Ogawa, *Synlett* **1998**, 628–630.
- [55] H. Paulsen, A. Schleyer, N. Mathieu, M. Meldal, K. Bock, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* **1997**, 281–293.
- [56] R. Rodebaugh, S. Joshi, B. Fraser-Reid, H. M. Geysen, *J. Org. Chem.* **1997**, *62*, 5660–5661.
- [57] D. C. Schriemer, O. Hindsgaul, *Combinatorial Chem. High Throughput Screening* **1998**, *1*, 155–170.
- [58] F. Balkenhohl, C. von dem Bussche-Hünnefeld, A. Lansky, C. Zechel, *Angew. Chem.* **1996**, *108*, 2436–2487; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1996**, *35*, 2288–2337.
- [59] R. Liang, L. Yan, J. Loebach, M. Ge, Y. Uozumi, K. Sekanina, N. Horan, J. Gildersleeve, C. Thompson, A. Smith, K. Biswas, W. C. Still, D. Kahne, *Science* **1996**, *274*, 1520–1522.
- [60] H. P. Nestler, P. A. Bartlett, W. C. Still, *J. Org. Chem.* **1994**, *59*, 4723–4724.
- [61] B. J. Egner, S. Rana, H. Smith, N. Bouloc, J. G. Frey, W. S. Brocklesby, M. Bradley, *Chem. Commun.* **1997**, 735–736.
- [62] K. C. Nicolaou, X.-Y. Xiao, Z. Parandoosh, A. Senyei, M. P. Nova, *Angew. Chem.* **1995**, *107*, 2476–2479; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1995**, *34*, 2289–2291.
- [63] X.-Y. Xiao, C. Zhao, H. Potash, M. P. Nova, *Angew. Chem.* **1997**, *109*, 799–801; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1997**, *36*, 780–782.
- [64] Y.-H. Chu, Y. M. Dunayevskiy, D. P. Kirby, P. Vouros, B. L. Karger, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 7827–7835.
- [65] S. Goletz, M. Leuck, P. Franke, U. Karsten, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **1997**, *11*, 1387–1398.
- [66] G. J. Rademaker, J. Haverkamp, J. Thomas-Oates, *Org. Mass Spectrom.* **1993**, *28*, 1536–1541.
- [67] M. J. Kieliszewski, M. O'Neill, J. Leykam, R. Orlando, *J. Biol. Chem.* **1995**, *270*, 2541–2549.
- [68] D. J. Harvey, T. J. P. Naven, B. Küster, *Biochem. Mass Spectrom.* **1996**, *24*, 905–912.
- [69] T. Yamagaki, Y. Mitsuishi, H. Nakanishi, *Chem. Lett.* **1998**, 57–58.
- [70] D. I. Papac, A. Wong, A. J. S. Jones, *Anal. Chem.* **1996**, *68*, 3215–3223.
- [71] Y. Mechref, M. V. Novotny, *Anal. Chem.* **1998**, *70*, 455–463.
- [72] T. Yamagaki, Y. Ishizuka, S.-I. Kawahara, H. Nakanishi, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **1997**, *11*, 527–531.
- [73] Y. Zhao, S. B. H. Kent, B. T. Chait, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1997**, *94*, 1629–1633.

- [74] D. Garozzo, V. Nasello, E. Spina, L. Sturiale, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **1997**, *11*, 1561–1566.
- [75] J. R. Chapman, *Methods Mol. Biol.* **1997**, *61*, 161–253.
- [76] M. Meldal, P. M. St. Hilaire, M. Willert, J. Rademann, M. Grötl, J. Buchardt, C. H. Gotfredsen, M. A. Juliano, L. Juliano in *Proceeding of the 5th Chinese Peptide Symposium Lanchou 1998*, Kluwer Academic, Dordrecht, **1999**, im Druck.
- [77] C. H. Gotfredsen, M. Grötl, M. Willert, J. Ø. Duus, M. Meldal, *J. Chem. Soc. Perkin Trans I*, im Druck.
- [78] M. Pursch, G. Schlotterbeck, L.-H. Tseng, K. Albert, W. Rapp, *Angew. Chem.* **1996**, *108*, 3034–3036; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1996**, *35*, 2867–2869.
- [79] M. Baldus, R. J. Iuliucci, B. H. Meier, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 1121–1124.
- [80] I. E. Pop, C. F. Dhalluin, B. P. Deprez, P. C. Melnyk, G. M. Lippens, A. L. Tartar, *Tetrahedron* **1996**, *52*, 12209–12222.
- [81] R. S. Garigipati, B. Adams, J. L. Adams, S. K. Sarkar, *J. Org. Chem.* **1996**, *61*, 2911–2914.
- [82] P. H. Seeberger, X. Beebe, G. D. Sukenick, S. Pochapsky, S. J. Danishefsky, *Angew. Chem.* **1997**, *109*, 507–510; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1997**, *36*, 491–493.
- [83] C. Dhalluin, C. Bouillon, A. Tartar, G. Lippens, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 10494–10500.
- [84] M. Meldal in *Combinatorial Peptide Libraries* (Hrsg.: C. Shmuel), Humana, Totowa, NJ, **1998**, S. 51–82.
- [85] J. Ø. Duus, P. M. St. Hilaire, M. Meldal, K. Bock, *Pure Appl. Chem.* **1999**, *71*, 755–765.
- [86] A. Schleyer, M. Meldal, M. Renil, H. Paulsen, K. Bock, *Angew. Chem.* **1997**, *109*, 2064–2067; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1997**, *36*, 2064–2067.
- [87] P. J. Garegg, C. Hendrichson, T. Norberg, *Carbohydr. Res.* **1983**, *116*, 162–165.
- [88] L. Yan, C. M. Taylor, J. Goodnow, D. Kahne, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 6953–6954.
- [89] G. Grundler, R. R. Schmidt, *Liebigs Ann. Chem.* **1984**, 1826–1847.
- [90] C.-H. Wong, X.-S. Ye, Z. Zhang, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 7137–7138.
- [91] T. Murata, T. Usui, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **1997**, *61*, 1059–1066.
- [92] J. Li, D. E. Robertson, J. M. Short, P. G. Wang, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1999**, *9*, 35–38.
- [93] R. Öhrlein, G. Baisch, A. Katopodis, M. Streiff, F. Kolbinger, *J. Mol. Catal. B* **1998**, *5*, 125–127.
- [94] C. Zheng, P. H. Seeberger, S. J. Danishefsky, *Angew. Chem.* **1998**, *110*, 831–834; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, *37*, 786–789.
- [95] K. Fukase, K. Egusa, Y. Nakai, S. Usumoto, *Mol. Diversity* **1996**, *2*, 182–188.
- [96] D. Weigelt, G. Magnusson, *Tetrahedron Lett.* **1998**, *39*, 2839–2842.
- [97] K. C. Nicolaou, N. Watanabe, J. Li, J. Pastor, N. Winssinger, *Angew. Chem.* **1998**, *110*, 1636–1638; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, *37*, 1559–1561.
- [98] Y. Ding, O. Kanke, J. Labbe, M. M. Palcic, B. Ernst, O. Hindsgaul in *Glycoimmunology* (Hrsg.: A. Alavi, J. S. Axford), Plenum Press, New York, **1995**, S. 261–269.
- [99] O. Kanke, 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*, 2720–2721.
- [100] Y. Ding, J. Labbe, O. Kanke, O. Hindsgaul, *Bioorg. Med. Chem.* **1996**, *4*, 683–692.
- [101] G.-J. Boons, B. M. Heskamp, F. Hout, *Angew. Chem.* **1996**, *108*, 3053–3056; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1996**, *35*, 2845–2847.
- [102] M. Izumi, Y. Ichikawa, *Tetrahedron Lett.* **1998**, *39*, 2079–2082.
- [103] T. Zhu, G.-J. Boons, *Angew. Chem.* **1998**, *110*, 2000–2003; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1998**, *37*, 1898–1900.
- [104] G. Hummel, O. Hindsgaul, *Angew. Chem.* **1999**, *111*, 1900–1902; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, *38*, 1782–1784.
- [105] C.-H. Wong, X.-S. Ye, Z. Zhang, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 7137–7138.
- [106] D. R. Bundle, B. W. Sigurskjold in *Methods in Enzymology*, Vol. 247 (Hrsg.: J. N. Abelson, M. I. Simon), Academic Press, San Diego, **1999**, S. 288–305.
- [107] B. W. Sigurskjold, E. Altman, D. R. Bundle, *Eur. J. Biochem.* **1991**, *197*, 239–246.
- [108] M. C. Chervenak, E. J. Toone, *Bioorg. Med. Chem.* **1996**, *4*, 1963–1977.
- [109] R. Lumry, S. Rajender, *Biopolymers* **1970**, *9*, 1125–1227.
- [110] B. Lee, *Biophys. Chem.* **1994**, *51*, 271–278.
- [111] R. U. Lemieux, *Acc. Chem. Res.* **1996**, *29*, 373–380.
- [112] H. Beierbeck, R. U. Lemieux, *Can. J. Chem.* **1990**, *68*, 820–827.
- [113] M. Meldal, I. Christiansen-Brams, M. K. Christensen, S. Mouritsen, K. Bock in *Complex carbohydrates in drug research. Structural and functional aspects* (Hrsg.: K. Bock, H. Clausen), Copenhagen, Munksgaard, **1994**, S. 153–165.
- [114] H. Jiao, O. Hindsgaul, *J. Carbohydr. Chem.* **1999**, *18*, 499–513.
- [115] R. Roy, *Top. Curr. Chem.* **1997**, *187*, 241–274.
- [116] D. Page, D. Zanini, R. Roy, *Bioorg. Med. Chem.* **1996**, *4*, 1949–1961.
- [117] C.-C. Lin, M. Shimazaki, M.-P. Heck, R. Wang, T. Kimura, H. Ritzen, S. Takayama, S.-H. Wu, G. Weitz-Schmidt, C.-H. Wong, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 6826–6840.
- [118] C.-C. Lin, T. Kimura, S.-H. Wu, G. Weitz-Schmidt, C.-H. Wong, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1996**, *6*, 2755–2760.
- [119] U. J. Nilsson, E. J. Fournier, O. Hindsgaul, *Bioorg. Med. Chem.* **1998**, *6*, 1563–1575.
- [120] Y. Ding, Y. Miura, J. R. Etchison, H. H. Freeze, O. Hindsgaul, *J. Carbohydr. Chem.* **1999**, *18*, 471–475.
- [121] A. Lohse, K. B. Jensen, M. Bols, *Tetrahedron Lett.* **1999**, *40*, 3033–3036.
- [122] P. M. St. Hilaire, T. Lowary, M. Meldal, K. Bock, *Pept. Proc. Eur. Pept. Symp. 32th* **1996**, 817–818.
- [123] M. Meldal, K. Bock, *Tetrahedron Lett.* **1990**, *31*, 6987–6990.
- [124] M. Meldal, K. J. Jensen, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1990**, 483–485.
- [125] M. Meldal, K. Bock, *Glycoconjugate J.* **1994**, *11*, 59–63.
- [126] M. Meldal, *Methods Companion Methods Enzymol.* **1994**, *6*, 417–424.
- [127] M. Elofsson, B. Walse, J. Kihlberg, *Tetrahedron Lett.* **1991**, *32*, 7613–7616.
- [128] D. M. Andrews, P. W. Seale, *Int. J. Pept. Protein Res.* **1993**, *42*, 165–170.
- [129] A. Holm, M. Meldal, *Pept. Proc. Eur. Pept. Symp. 20th* **1988**, 208–210.
- [130] M. A. Gallop, R. W. Barrett, W. J. Dower, S. P. A. Fodor, E. M. Gordon, *J. Med. Chem.* **1994**, *37*, 1233–1251.
- [131] H. Franzyk, M. K. Christensen, M. Jørgensen, M. Meldal, H. Cordes, S. Mouritsen, K. Bock, *Bioorg. Med. Chem.* **1997**, *5*, 21–40.
- [132] M. Meldal, E. Meinjohanns, K. Frische, T. Jensen, P. Hansen, O. Werdelin, L. Galli-Stampino, S. Mouritsen, K. Bock in *Peptides, Biology and Chemistry* (Hrsg.: X.-J. Xu, Y.-H. Ye, J. P. Tam), Kluwer Academic, Dordrecht, **1998**, S. 59–62.
- [133] K. Frische, M. Meldal, O. Werdelin, S. Mouritsen, T. Jensen, L. Galli-Stampino, K. Bock, *J. Peptide Sci.* **1996**, *2*, 212–222.
- [134] „Library of glyco-peptides useful for identification of cell adhesion inhibitors“: N. Rao, M. Meldal, K. Bock, O. Hindsgaul (Glycomed Corporation), US-A 664,303, [5,795,958], **1999** [*Chem. Abstr.* **1998**, *129*, 175 997].
- [135] T. F. J. Lampe, G. Weitz-Schmidt, C.-H. Wong, *Angew. Chem.* **1998**, *110*, 1761–1764; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, *37*, 1707–1711.
- [136] D. P. Sutherlin, T. M. Stark, R. Hughes, R. W. Armstrong, *J. Org. Chem.* **1996**, *61*, 8350–8354.
- [137] B. T. Chait, R. Wang, R. C. Beavis, S. B. H. Kent, *Science* **1993**, *262*, 89–92.
- [138] G. Dibo, F. Sebestyen, L. Urge, M. Hollosi, Z. Majer, A. Kovacs, A. Furka in *Peptide Chemistry 1992, Proc. 2nd Japan Pept. Symp.* (Hrsg.: N. Yanaihara), ESCOM, Leiden, **1993**, S. 70–71.
- [139] R. S. Youngquist, G. R. Fuentes, M. P. Lacey, T. Keough, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 3900–3906.
- [140] N. Mathieu, H. Paulsen, M. Meldal, K. Bock, *J. Chem. Soc. Perkin Trans I* **1997**, 2359–2368.
- [141] M. Hollosi, E. Kollat, I. Laczko, K. F. Medzhradszky, J. Thurin, L. Otvos, Jr., *Tetrahedron Lett.* **1991**, *32*, 1531–1534.
- [142] O. Seitz, H. Kunz, *J. Org. Chem.* **1997**, *62*, 813–826.
- [143] B. Meyer, T. Weimar, T. Peters, *Eur. J. Biochem.* **1997**, *246*, 705–709.

- [144] D. Henrichsen, B. Ernst, J. L. Magnani, W.-T. Wang, B. Meyer, T. Peters, *Angew. Chem.* **1999**, *111*, 106–110; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, *38*, 98–102.
- [145] G. R. Gustafson, C. M. Baldino, M.-M. E. O'Donnell, A. Sheldon, R. J. Tarsa, C. J. Verni, D. L. Coffen, *Tetrahedron* **1998**, *54*, 4051–4065.
- [146] D. Vetter, E. M. Tate, M. A. Gallop, *Bioconjugate Chem.* **1995**, *6*, 319–322.
- [147] J. Jezek, J. Velek, P. Veprek, V. Velková, T. Trnka, J. Pecka, M. Ledvina, J. Vondrasek, M. Pisacka, *J. Peptide Sci.* **1999**, *5*, 46–55.
- [148] M. Schuster, P. Wang, J. C. Paulson, C.-H. Wong, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 1135–1136.