

Antithrombotika

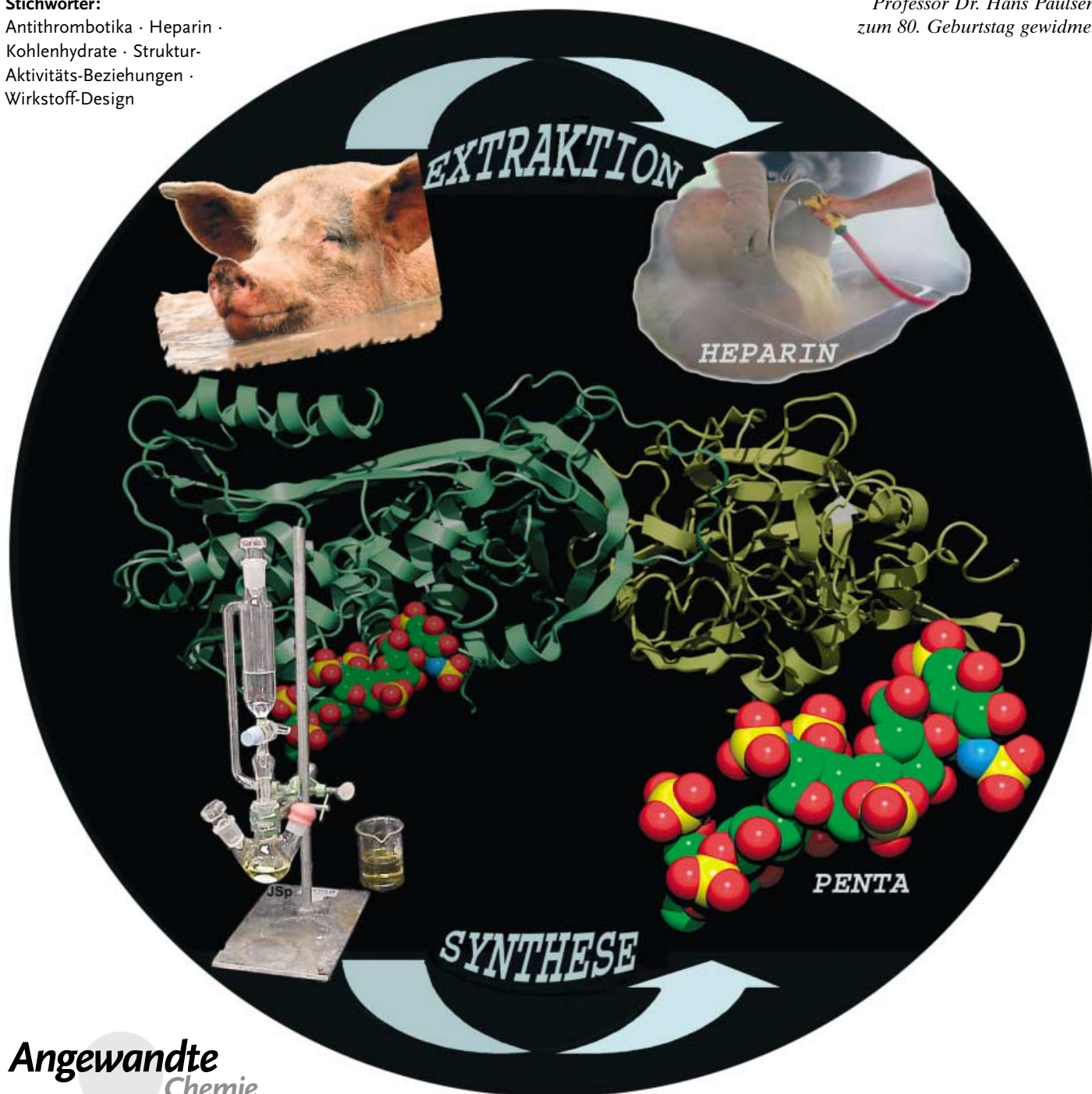
# Ein synthetisches Antithrombin III bindendes Pentasaccharid ist jetzt ein Wirkstoff! Was kommt danach?

Maurice Petitou\* und Constant A. A. van Boeckel\*

**Stichwörter:**

Antithrombotika · Heparin ·  
Kohlenhydrate · Struktur-  
Aktivitäts-Beziehungen ·  
Wirkstoff-Design

Professor Dr. Hans Paulsen  
zum 80. Geburtstag gewidmet

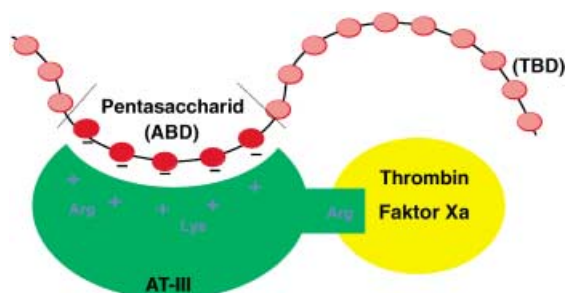


Angewandte  
Chemie

**H**eparin, ein aus tierischen Organen gewonnenes sulfatiertes Glycosaminoglycan, findet seit den 40er Jahren als antithrombotischer Wirkstoff klinische Verwendung. Ein Durchbruch in der Heparinforschung war in den frühen 80er Jahren die Entdeckung, dass eine charakteristische Pentasacchariddomäne in manchen Heparinketten den Serinproteaseinhibitor Antithrombin III (AT-III) aktiviert, der in der Gerinnungskaskade Thrombin und den Faktor Xa inhibiert. Sanofi-Synthélabo und Organon entwickelten das Analogon **2** (Fondaparinux) des Pentasaccharids. Die Verbindung wurde zum antithrombotischen Medikament Arixtra weiterentwickelt, das 2002 in den USA und Europa auf den Markt kam. Arixtra bewirkt ausschließlich die AT-III-vermittelte Inhibierung des Faktors Xa. Durch strukturbezogenes Design wurden auch Analoga mit längerer Wirkungsdauer wie Idraparinux sowie neue Konjugate und lange Oligosaccharide mit spezifischer Anti-Xa- und Antithrombin-Aktivität zugänglich. Die neuen Wirkstoffkandidaten wirken selektiver als Heparin, was insbesondere die Wahrscheinlichkeit einer Thrombopenie verringert.

## 1. Einleitung

1993 veröffentlichten wir einen Aufsatz mit dem Titel „Die charakteristische AT-III-Bindungsregion in Heparin: eine Leitstruktur für neue synthetische Antithrombotica“.<sup>[1]</sup> Darin haben wir beschrieben, dass endogenes Antithrombin III (AT-III) Heparin benötigt, um die Inhibierung zweier Schlüsselproteasen in der Blutgerinnungskaskade, Faktor Xa und Thrombin, zu beschleunigen. Diese Beschleunigung erfordert die Bindung einer charakteristischen sequenzspezifischen Pentasacchariddomäne von Heparin an AT-III. Die Wechselwirkung des Pentasaccharids induziert eine aktivierende Konformationsänderung in AT-III, die die Inhibierung von Faktor Xa, nicht aber die von Thrombin beschleunigt (Abbildung 1). Zur Inhibierung von Thrombin müssen außer-



**Abbildung 1.** Die Wechselwirkung von Heparin mit Antithrombin III (AT-III) führt zu einer Konformationsänderung im Serinproteaseinhibitor, sodass die Schleife mit dem reaktiven Zentrum mit Gerinnungsenzymen wie Thrombin und Faktor Xa wechselwirken kann. Um die Konformationsänderung in AT-III induzieren zu können, sollte die Heparinkette eine spezielle Pentasacchariddomäne, die Antithrombin-III bindende Domäne (ABD), enthalten. Das Pentasaccharid stimuliert ausschließlich die AT-III-vermittelte Inaktivierung von Faktor Xa (Anti-Xa-Aktivität), dagegen werden zur Stimulation der Antithrombinaktivität längere Heparinfragmente benötigt, die neben der Pentasacchariddomäne (ABD) eine Thrombin bindende Domäne (TBD) enthalten.

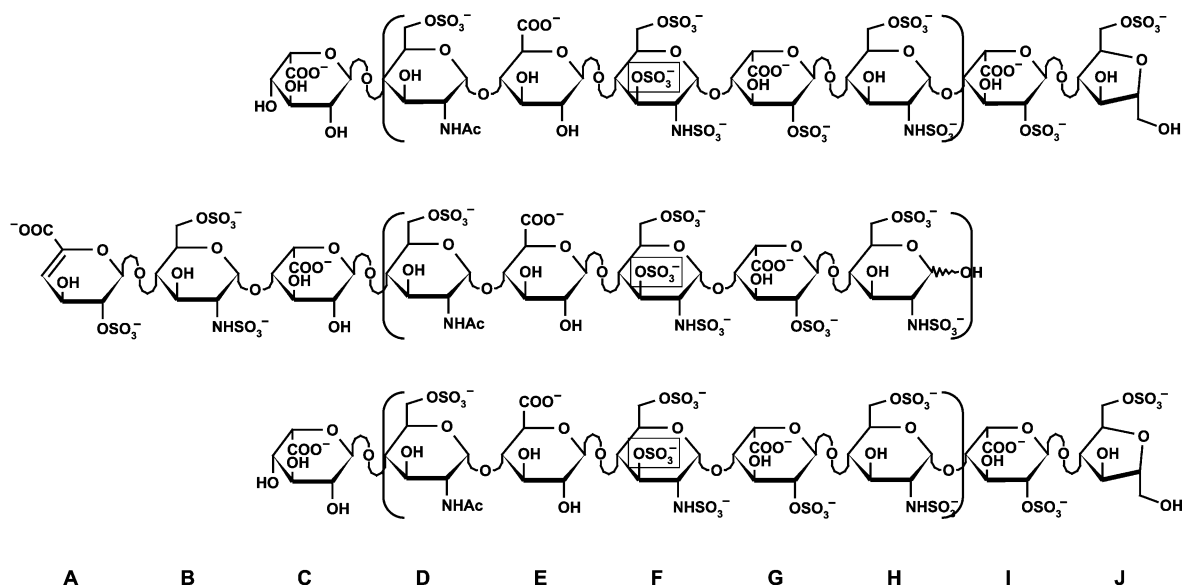
## Aus dem Inhalt

1. Einleitung	3187
2. Struktur-Aktivitäts-Beziehungen von synthetischen Pentasacchariden	3183
3. Aktivierung von AT-III gegen Serinproteasen	3187
4. Pentasaccharidkonjugate mit Antithrombinaktivität	3188
5. Synthetische lange Fragmente	3191
6. Schlussbemerkungen und Ausblick	3194

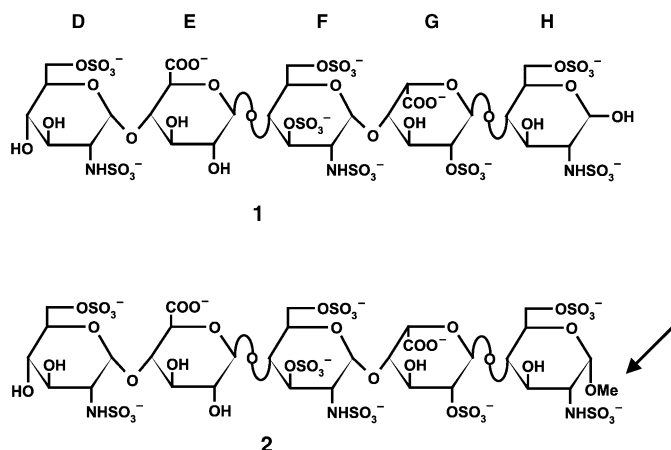
dem AT-III und Thrombin an dieselbe Heparinkette in Form eines ternären Brückenkomplexes gebunden sein. Die Arbeiten mehrerer Forschungsgruppen<sup>[2]</sup> führten in den frühen 80er Jahren zur Strukturaufklärung der charakteristischen Pentasacchariddomäne. Hierbei wurde die gemeinsame Sequenz von Hexa- und Octasacchariden identifiziert, die durch Heparinabbau und anschließende Affinitätschromatographie an trägerfixiertem AT-III erhalten worden waren (Abbildung 2).<sup>[3]</sup> Einige Jahre nach der Strukturaufklärung synthetisierten die Autoren nacheinander das erste Pentasaccharidanalogen (1 in Abbildung 3) der aktiven Region, das am Baustein D einen N-Sulfatrest anstelle einer N-Acetylgruppe enthält.<sup>[4,5]</sup> Dieses synthetische Pentasaccharid unterstützt tatsächlich nur die AT-III-vermittelte Inhibierung von Faktor Xa. Damit war die Basis für ein Forschungs- und Entwicklungsprogramm für eine neue Klasse von Kohlenhydrat-Antithrombotika, die selektiven Faktor-Xa-Inhibitoren, geschaffen.

Dieses neue Wirkstoff-Forschungsprogramm war seinerzeit allerdings sehr umstritten. Beispielsweise lieferte die über 60-stufige chemische Synthese das erste Pentasaccharid in sehr niedriger Ausbeute, und auch die Reinheit war für einen synthetischen Wirkstoff nicht ausreichend. Da das Pentasaccharid ausschließlich Anti-Xa-, aber keine Antithrombinaktivität hat, wurde es damals vielfach als ein nur schwaches

[\*] Dr. M. Petitou  
Département Cardiovasculaire/Thrombose  
Sanofi-Synthélabo  
195 route d'Espagne, 31036 Toulouse cedex (Frankreich)  
Fax: (+33) 56-116-2286  
E-mail: maurice.petitou@sanofi-synthelabo.com  
Prof. Dr. C. A. A. van Boeckel  
Medicinal Chemistry, N.V. Organon  
P.O. Box 20, 5340 BH, Oss (Niederlande)  
Fax: (+31) 412-663-508  
E-mail: stan.vanboeckel@organon.com



**Abbildung 2.** Typische Heparinfragmente, die durch Abbau mit Heparinase oder Salpetriger Säure und anschließende Affinitätschromatographie an trägergebundenem AT-III erhalten wurden. Die drei Fragmente enthalten die übereinstimmende Pentasaccharidsequenz DEFGH (eingeklammert) und eine 3-O-Sulfatgruppe am Glucosaminbaustein F, die die hohe Affinität für AT-III bewirken.



**Abbildung 3.** Das erste synthetische Analogon **1** der AT-III aktivierenden Domäne von Heparin und sein stabilisiertes Methylglycosid **2**, der antithrombotische Wirkstoff Fondaparinux.

Antithrombotikum eingestuft. Auch die Halbwertszeit im Menschen war umstritten. Heparin (ein hochmolekulares Polysaccharid) hat eine Halbwertszeit von nur einer Stunde, und man nahm an, dass die Halbwertszeit des kleinen Pentasaccharids wegen der schnelleren renalen Clearance noch kürzer sein würde als die von Heparin. Glücklicherweise gab es auch optimistischere Einschätzungen, und einige Wissenschaftler waren überzeugt, dass das Pentasaccharid nicht nur synthetisiert werden konnte, sondern dass durch molekulare Modifizierungen und molekulares Design strukturell vereinfachte Analoga mit maßgeschneiderten pharmakologischen Eigenschaften zugänglich wären. Es bestand auch Zuversicht dahingehend, dass sich die „aktive Substanz“ von Heparin selbst, die nur einen geringen Prozentsatz des Kohlenhydratanteils von Heparin ausmacht, als hervorragender Wirkstoff erweisen würde. In den frühen 80er Jahren wurden auch verschiedene klinische Tests an niedermolekularen (low molecular weight, LMW) Heparinen durchgeführt, die durch Heparinfragmentierung erhalten wurden. Bemer-



Constant A. A. van Boeckel, geboren 1956 in Brunei, studierte Chemie an der Universität von Leyden. Er erhielt 1979 ein Diplom im Fach Chemie und promovierte 1982 bei J. van Boom. Danach wechselte er in die pharmazeutische Industrie (N.V. Organon, Oss). Zurzeit ist er Leiter der Abteilung Medicinal Chemistry bei Organon. Sein Hauptforschungsinteresse gilt der Wirkstoffentwicklung. Er ist außerordentlicher Professor für Bioorganische Chemie an der Universität Leyden.

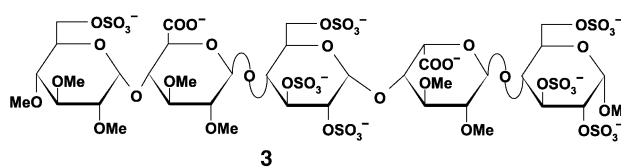


Maurice Petitou, geboren 1949 in Frankreich, studierte Chemie in Clermont-Ferrand und Orléans. 1971 erwarb er den Masterabschluss, seine Promotion beendete er 1974. Danach war er drei Jahre Mitarbeiter bei der Ligue Nationale Française Contre le Cancer (LNFC). 1978 wechselte er an das Institut Choay, 1988 wurde er zum Research Associate Director des Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS) ernannt. Seit 1989 ist er Leiter des Carbohydrate Chemistry Department, jetzt Teil des Cardiovascular Research Department, bei Sanofi-Synthelabo, Toulouse.

kenswerterweise verhinderten die LMW-Heparine wirksam eine Thrombose tiefer Venen und hatten dabei ein besseres therapeutisches Fenster als Heparin, obwohl ihr Anti-Xa-/Antithrombin-Verhältnis wesentlich höher ist. 1987 beschlossen die beteiligten Firmen Sanofi (jetzt Sanofi-Synthelabo) und Organon, ihre risikoreichen Forschungs- und Entwicklungsaktivitäten in einem Jointventure fortzusetzen, was den Durchbruch für das Projekt bedeutete: In dem Jahr wurde das der natürlichen Sequenz sehr ähnliche und von beiden Firmen (unter SR 90107 und Org 31540) hergestellte Pentasaccharid **2** (Abbildung 3) zur Weiterentwicklung ausgewählt.<sup>[1,9]</sup> Die Wahl fiel auf ein Derivat von **2** mit einer Methylgruppe am anomeren Zentrum. Zuvor hatte sich herausgestellt, dass derartig substituierte Derivate leichter zu synthetisieren und zu reinigen sind, weil der reaktive Aldehyd am reduzierenden Ende permanent geschützt ist.<sup>[1]</sup> Tatsächlich konnten 1989 mehr als 20 g hoch reines SR 90107/Org 31540 für toxikologische und klinische Phase-I-Tests an gesunden Probanden zu Verfügung gestellt werden. Nach einem erfolgreichen klinischen Entwicklungsprogramm in den 90er Jahren wurde SR 90107/Org 31540 (**2**, Fondaparinux) 2001 als neues Antithrombosemittel unter dem Namen Arixtra in den Vereinigten Staaten und in Europa registriert.<sup>[7]</sup> Derzeit wird dieses Medikament zur Prävention venöser Thromboembolien nach Protheseoperationen des Knie- oder Hüftgelenks und nach Hüftfrakturen eingesetzt. Die weitere Entwicklung richtet sich auf andere prophylaktische Indikationen und die Behandlung von Thrombosen der tiefen Venen, von Lungenembolie und Erkrankungen der Herzkranzgefäße.

Rückblickend auf die pessimistischen Aussichten vor 15 Jahren lässt sich heute sagen, dass die Synthese zwar noch immer viele Stufen erfordert, aber erfolgreich in der Industrie durchgeführt wird und das hochreine Pentasaccharid **2** im Kilogramm-Maßstab liefert. Seine Halbwertszeit im Menschen beträgt etwa 17 h, es muss daher nur einmal täglich verabreicht werden und nicht wie die Heparine zwei- oder dreimal täglich. Zudem haben mehrere klinische Tests die bessere Wirksamkeit von Fondaparinux (**2**) gegenüber Heparin bewiesen;<sup>[7]</sup> die Anwendung von **2** bei größeren orthopädischen Operationen senkt das Thromboserisiko gegenüber LMW-Heparinen um mehr als 50 %. Bei diesen Untersuchungen wurden nur 2.5 mg Arixtra pro Tag verabreicht, während die Dosis des LMW-Heparins Enoxaparin 40 mg einmal täglich oder 30 mg zweimal täglich betrug.

In unserem 1993er Aufsatz beschrieben wir auch die Synthese vieler Analoga und detaillierte Struktur-Aktivitäts-Beziehungen (siehe Abschnitt 2).<sup>[1]</sup> Unter anderem konnte ein Pentasaccharid erhalten werden, in dem alle Hydroxygruppen O-sulfatiert oder O-methyliert sind (**3**, Abbildung 4). Dieses ist nicht nur erheblich leichter zu synthetisieren, sondern verfügt auch über eine höhere Aktivität und längere Wirkungsdauer (Halbwertszeit im Menschen etwa 120 h), sodass es nur einmal wöchentlich verabreicht werden muss.<sup>[8,9]</sup> Eine Phase-II-Dosierungsstudie (PERSIST) ergab, dass das Pentasaccharid **3** (Idraparinux) bei einer Dosis von 2.5 mg einmal wöchentlich mindestens so wirksam ist wie bestehende Behandlungen zur Vorbeugung venöser Thromboembolien (VTEs, venous thromboembolic events). Idraparinux befindet sich inzwischen in der fortgeschrittenen klinischen



**Abbildung 4.** Idraparinux (**3**) ist ein Analogon des natürlich vorkommenden Pentasaccharids, das wegen seiner langen Halbwertszeit (d. h. länger anhaltende antithrombotischen Wirkung) nur einmal wöchentlich verabreicht werden muss. Diese Verbindung befindet sich derzeit in der letzten Phase der klinischen Entwicklung.

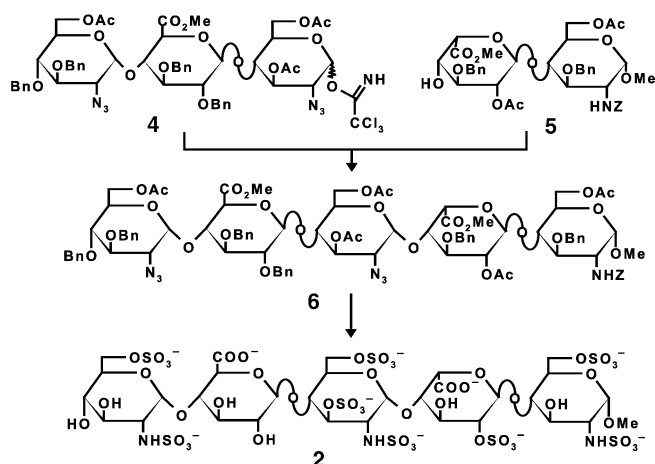
Entwicklung (Phase III) zur Prävention von Thromboembolievorfällen bei Patienten mit Vorhofflimmern sowie zur Vorbeugung und Behandlung von VTE (Vergleich mit Heparin plus Vitamin-K-Antagonisten). Im Anschluss daran konzentrierten wir uns auf Pentasaccharidderivate, die ebenfalls Antithrombinaktivität aufweisen. Ausgehend von einem strukturbezogenen Ansatz (siehe Abschnitt 3) entwickelten wir Pentasaccharidkonjugate mit maßgeschneiderter Inhibitorwirkung gegen Thrombin (siehe Abschnitt 4), synthetisierten aber auch lange heparinähnliche Oligosaccharide (siehe Abschnitt 5) mit besserer Antithrombinaktivität als Heparin. Mehrere dieser Verbindungen befinden sich in vorklinischen und ersten klinischen Entwicklungsphasen.

## 2. Struktur-Aktivitäts-Beziehungen von synthetischen Pentasacchariden

### 2.1. Struktur-Aktivitäts-Beziehungen von heparinähnlichen Pentasacchariden

Um die Rolle unterschiedlicher negativ geladener funktioneller Gruppen des Pentasaccharids zu untersuchen, wurden zahlreiche Analoga synthetisiert und auf ihre Anti-Xa-Aktivität und ihre Bindung an AT-III getestet. Die Synthese des Pentasaccharids **2** ist in Abbildung 5 zusammenfasst. Ein wichtiges Merkmal dieser Synthese ist eine orthogonale Schutzgruppenstrategie,<sup>[1]</sup> wobei die zu sulfatierenden Hydroxygruppen zunächst verestert und die später freien Hydroxygruppen als Benzylether geschützt sind. Das durch Verknüpfen der Bausteine **4** und **5** gebildete vollständig geschützte Pentasaccharid **6** wird verseift, die entstandenen freien Hydroxygruppen werden anschließend O-sulfatiert. Nachfolgende Hydrogenolyse der Benzyl- und Azidgruppen und selektive N-Sulfatierung liefern das gewünschte Pentasaccharid **2**.

Mit dieser Strategie lassen sich verhältnismäßig leicht Analoga herstellen,<sup>[1]</sup> denen an bestimmten Positionen O-Sulfatgruppen fehlen, d. h., in der geschützten Verbindung muss an der fraglichen Position eine Esterfunktion durch einen Benzylether ersetzt werden. Um die Rolle der Carboxylatgruppe zu untersuchen, kann man nicht auf die Anpassung des Schutzgruppenschemas zurückgreifen, sondern muss nach neuen Kohlenhydratbausteinen suchen. Beispielsweise wurde die Rolle der Carboxylatgruppe von L-Iduronsäure (Baustein G) untersucht, indem ein Analogon mit einer D-Xylopyranoseeinheit synthetisiert wurde, dem die

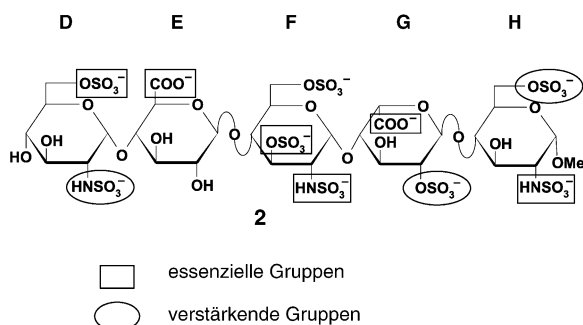


**Abbildung 5.** Der antithrombotische Wirkstoff Fondaparinux (**2**) wird durch Blocksynthese in etwa 55 Stufen aus natürlich vorkommenden Kohlenhydraten hergestellt. Entscheidend ist die Verknüpfung des vollständig geschützten Trisaccharids **4** mit dem Disaccharid **5** zum komplett geschützten Pentasaccharid **6**. Hierbei schützen Acetylgruppen (Ac) die später sulfatierten Hydroxygruppen, während „freie“ Hydroxygruppen als Benzylether (Bn) geschützt sind und durch Hydrogenolyse freigesetzt werden.

Carboxylatgruppe der Iduronsäure fehlt. Die Rolle der N-Sulfatgruppen wurde anhand von Analoga nachgewiesen, die an der entsprechenden Position Hydroxy- oder N-Acetylgruppen tragen.

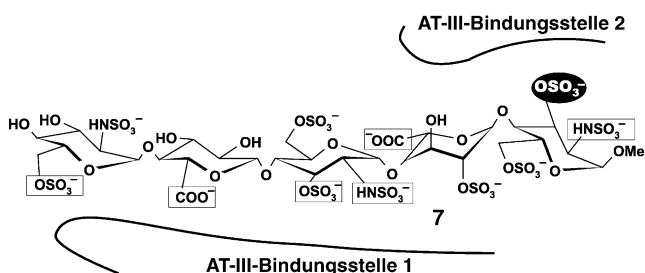
In diesem Zusammenhang muss erwähnt werden, dass die biologische Aktivität eines synthetischen, im Baustein D N-acetylierten Pentasaccharidderivats, das der am häufigsten vorkommenden AT-III bindenden Domäne von Schweineheparin (siehe Abbildung 2) entspricht,<sup>[1]</sup> nur halb so hoch ist wie die von Fondaparinux (**2**). Anders ausgedrückt hat der Pentasaccharidwirkstoff eine höhere Affinität für AT-III und eine höhere Anti-Xa-Aktivität als die AT-III bindende Pentasacchariddomäne von Standardheparin und NMW-Heparinen. Schließlich wurde die Rolle der einzelnen geladenen Gruppen des Pentasaccharids **2** bei der Aktivierung von AT-III eindeutig zugeordnet (Abbildung 6).

Die erhaltenen Struktur-Aktivitäts-Beziehungen bildeten eine solide Basis für das Design weiterer Analoga. Auf der



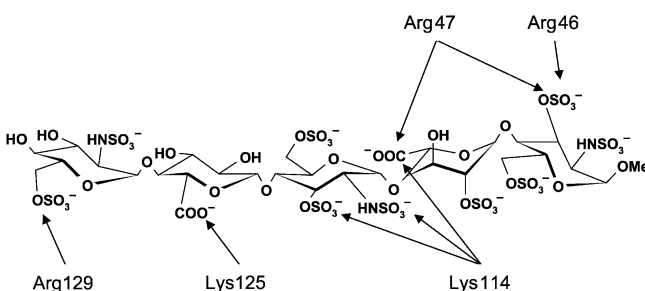
**Abbildung 6.** Struktur-Aktivitäts-Beziehungen von Fondaparinux (**2**). Durch die Synthese von Analoga, denen eine bestimmte Sulfat- oder Carboxylatgruppe fehlte, wurde festgestellt, dass die durch einen Kasten markierten Gruppen für die Aktivierung von AT-III essenziell sind, während die eingekreisten Gruppen nur zur Verstärkung der biologischen Aktivität beitragen.

Grundlage von <sup>1</sup>H-NMR-Analysen und Molekular-Modeling-Studien postulierten wir ein Wechselwirkungsmodell mit zwei Bindungsstellen zwischen AT-III und dem Pentasaccharid.<sup>[1]</sup> Entsprechend Abbildung 7 wurde eine ausgedehnte AT-III bindende Region als komplementär zum unteren Teil des Pentasaccharids bestimmt, während eine zweite, kleinere



**Abbildung 7.** In den späten 80er Jahren wurde ein Wechselwirkungsmodell postuliert, in dem zwei vorläufige AT-III-Bindungsstellen um ein Modell des Pentasaccharids **2** angeordnet waren. Dieses Wechselwirkungsmodell resultierte aus der Überlegung, dass die essenziellen negativ geladenen Gruppen des Pentasaccharids (durch Kästen markiert) mit komplementären (positiv geladenen) Resten der Heparin-bindungsstelle von AT-III wechselwirken. Ausgehend von diesem Modell führten wir eine zusätzliche 3-O-Sulfatgruppe am Baustein H ein (schwarz unterlegt), die die Wechselwirkung mit AT-III verstärken sollte. Tatsächlich war die Bindung des so erhaltenen Derivats **7** wesentlich stärker.

Wechselwirkungsdomäne rechts oben lokalisiert werden konnte. Diese Rezeptorkartierung wurde 1997 interessanterweise durch eine Kristallstrukturanalyse<sup>[10]</sup> des Komplexes von AT-III mit dem Analogon **8**<sup>[8]</sup> bestätigt (schematische Übersicht in Abbildung 8). Auf der Grundlage des beschriebenen Modells synthetisierten wir das Derivat **7** mit einer zusätzlichen Sulfatgruppe an der 3-O-Position von Baustein H, die eine günstige Wechselwirkung mit der vermuteten zweiten Bindungsstelle von AT-III aufweisen sollte (Abbildung 7). Tatsächlich ist die Bindung des Pentasaccharids **7** an AT-III um eine Größenordnung stärker, was die Xa-Inhibition erhöht.<sup>[11]</sup> Eigentlich ist die von der zusätzlichen 3-O-Sulfatgruppe an Baustein H verursachte stärkere Wechselwirkung mit AT-III ungewöhnlich, denn zusätzliche Sul-

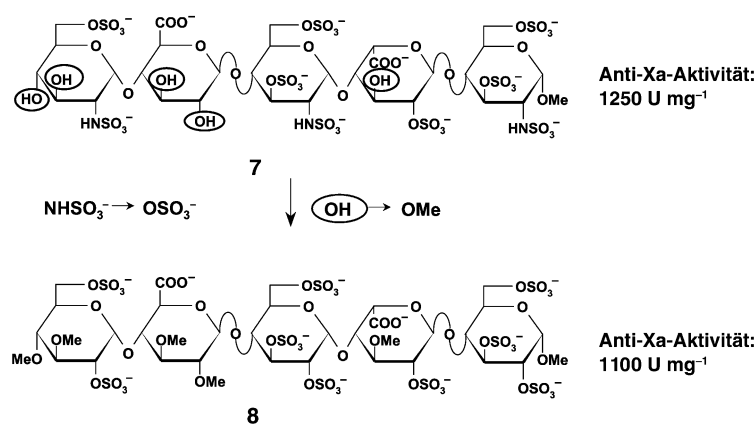


**Abbildung 8.** Ende der 90er Jahre belegte die Kristallstrukturanalyse eines Pentasaccharidkomplexes mit AT-III, dass in diesem Komplex wie zuvor postuliert (siehe Abbildung 7) zwei Bindungsstellen zu AT-III vorliegen. Die zusätzliche 3-O-Sulfatgruppe am Baustein H wechselwirkt mit Arg47 und Arg46, was die stärkere Bindung dieser Analoga an AT-III erklärt.

fatgruppen an anderen Positionen wirken sich nachteilig auf die Aktivität aus. Die oben erwähnte Kristallstruktur lässt erkennen, dass die zusätzliche 3-O-Sulfatgruppe mit positiv geladenen Aminosäuren (Arg46 und Arg47) von AT-III wechselwirkt (Abbildung 8). Auch die Art der Ladung ist anscheinend für die biologische Aktivität entscheidend,<sup>[1]</sup> denn der Sulfatrest lässt sich nicht ohne Auswirkungen auf die biologische Aktivität durch eine Phosphat- oder Carbonylatgruppe ersetzen.

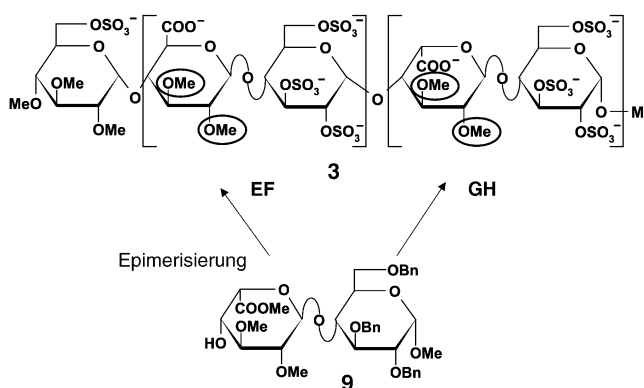
## 2.2. Methylierte und andere strukturell vereinfachte Analoga

Da die Synthese der Heparinanaloga in der AT-III-Bindung langwierig und mühsam ist, konzentrierten wir uns auf Analoga, die leichter zu synthetisieren, aber dennoch biologisch aktiv sind. Unseren Überlegungen zufolge sollte ein Derivat mit einem O-Sulfatrest anstelle des N-Sulfatrestes und O-Methylethergruppen anstelle von Hydroxygruppen wesentlich leichter synthetisierbar sein.<sup>[1]</sup> Bei dieser Synthese sind weder orthogonale Schutzgruppen erforderlich noch müssen Amino- oder Azidozucker hergestellt werden, sodass sich Verfahren zur Schutzgruppenabspaltung und Sulfatierung verkürzen. Ein gutes Beispiel für diese Strategie ist die vollständige Modifizierung des Derivats **7** zu **8** nach den oben genannten Vorgaben (Abbildung 9).<sup>[8]</sup> Die so erhaltenen Analoga haben gegenüber den natürlichen Verbindungen nahezu unveränderte biologische Aktivitäten. In dieser Reihe wurden zahlreiche Derivate hergestellt (von uns als Nichtglycosaminoglycan-Analoga bezeichnet), wobei sich Derivate



**Abbildung 9.** Design und Synthese vereinfachter Analoga durch Austausch der N-Sulfatgruppen gegen O-Sulfatgruppen und permanentes Schützen aller Hydroxyfunktionen in Form von Methylethern. Die erhaltenen Analoga (z. B. **8**) haben ähnliche Aktivitäten wie die natürlichen Verbindungen.

mit einer „pseudo-alternierenden“ Sequenz, wie das Pentasaccharid **3** (Idraparinux in den Abbildungen 4 und 10), als besonders erfolversprechend erwiesen. Da die beiden in Abbildung 10 eingeklammerten Disaccharidbausteine das gleiche Substitutionsmuster haben, sind sie aus der gleichen Disaccharidvorstufe **9** erhältlich, die wiederum aus Glucose hergestellt wird.<sup>[8,12]</sup> Mit dieser Strategie besteht die Totalsynthese aus nur etwa 25 Stufen.



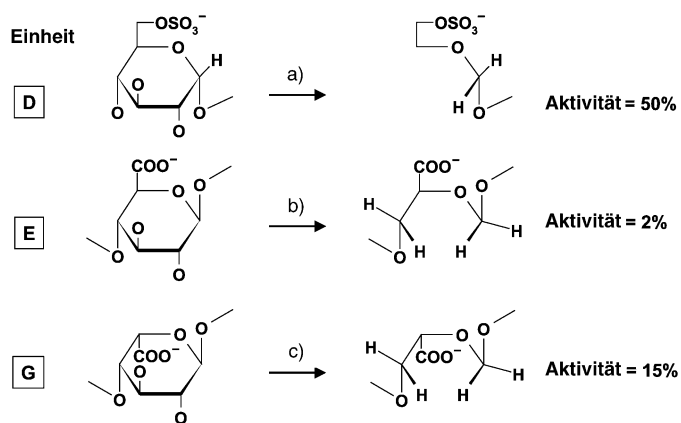
**Abbildung 10.** Vereinfachte Pentasaccharide mit „pseudo-alternierender“ Sequenz können aus nur einem Disaccharidbaustein hergestellt werden (z. B. Synthese von **3** aus **9**). Die L-Iduronsäureeinheit des GH-Bausteins **9** lässt sich durch Basen zur D-Glucuronsäure epimerisieren und liefert so den passenden EF-Baustein.

Wie bereits erwähnt ist die Wechselwirkung des Pentasaccharids **3** ( $K_D \approx 1$  nM) mit AT-III stärker als die mit dem Pentasaccharid **2** ( $K_D = 50$  nM), und auch seine Anti-Xa-Aktivität ist besser (1600 gegenüber 700 U mg<sup>-1</sup>).<sup>[1,8,13]</sup> Die höhere Aktivität ist teilweise auf die zusätzliche 3-O-Sulfatgruppe am Baustein H zurückzuführen. Dies genügt als Erklärung allerdings nicht, denn mit den 2-O-Sulfatgruppen der Bausteine D und G fehlen zwei andere wichtige Funktionen. Zur höheren Aktivität tragen außerdem die Methylether bei (die vermutlich mit komplementären lipophilen Gruppen an der Proteinoberfläche wechselwirken) und das ausschließliche Vorliegen von Iduronsäure in der bevorzugten Skew-Boot-Konformation (siehe Abschnitt 2.3).

In Abbildung 11 sind einige andere von uns durchgeführte Modifizierungen zusammengestellt. Beispielsweise ersetzen wir die Einheit D mit dem essenziellen 6-O-Sulfatrest durch eine flexible O-Sulfoglycol-2-O-methyl-Einheit,<sup>[14]</sup> wobei 50 % der biologischen Aktivität erhalten blieben (Schritt a). In unserem 1993er Aufsatz haben wir beschrieben,<sup>[1]</sup> dass bei einem Austausch von D-Glucuronsäure (Baustein E) oder L-Iduronsäure (Baustein G) gegen flexible „offene“ Pyranoseeinheiten (d. h. Glycerinsäure-2-O-methyl-Einheiten) die biologische Aktivität praktisch vollständig (Schritt b) oder zu 85 % (Schritt c) verloren geht. Ein weiteres Beispiel für die chemische Modifizierung ist der Austausch des glycosidischen Sauerstoffatoms zwischen den Bausteinen D und E durch ein Kohlenstoffatom,<sup>[15]</sup> der zu einer nur leicht gesunkenen Aktivität führt.

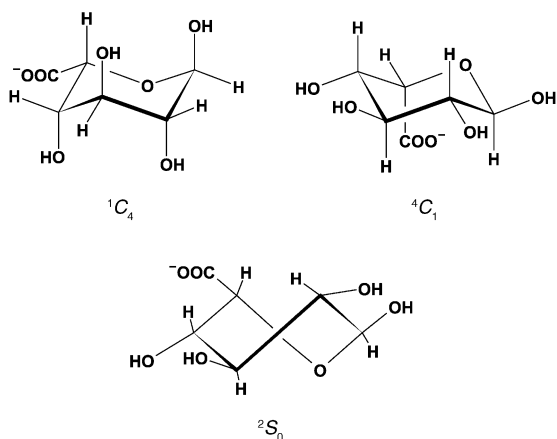
## 2.3. Rolle der flexiblen L-Iduronsäureeinheit

In unserem 1993er Aufsatz<sup>[1]</sup> haben wir über die Konformationsanalyse des Pentasaccharids und speziell über das eigentümliche konformative Verhalten der Iduronsäureeinheit (Baustein G) berichtet. Beobachtungen zufolge kann L-



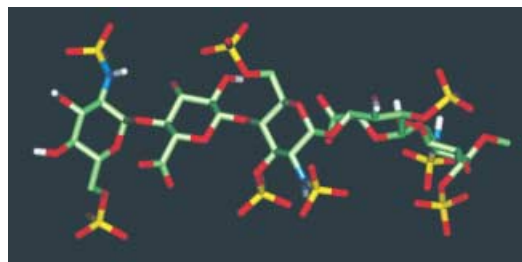
**Abbildung 11.** Einfluss der Starrheit von Kohlenhydrateinheiten im Pentasaccharidmolekül. Beim Ersatz mancher Kohlenhydrateinheiten (z. B. der Bausteine D und G) durch flexiblere Mimetika scheint eine signifikante Anti-Xa-Aktivität erhalten zu bleiben (50 % bzw. 15 %), andere Bausteine müssen hingegen unbedingt starr sein. So beträgt die Anti-Xa-Aktivität nur noch 2 %, wenn der Glucuronsäurebaustein E des Pentasaccharids durch ein flexibles Mimetikum ersetzt wird.

Iduronsäure in heparinähnlichen Verbindungen drei Konformationen einnehmen:  $^1C_4$ ,  $^4C_1$  und  $^2S_0$  (Abbildung 12).  $^1H$ -NMR-Analyse und Molecular Modeling ergaben, dass bei



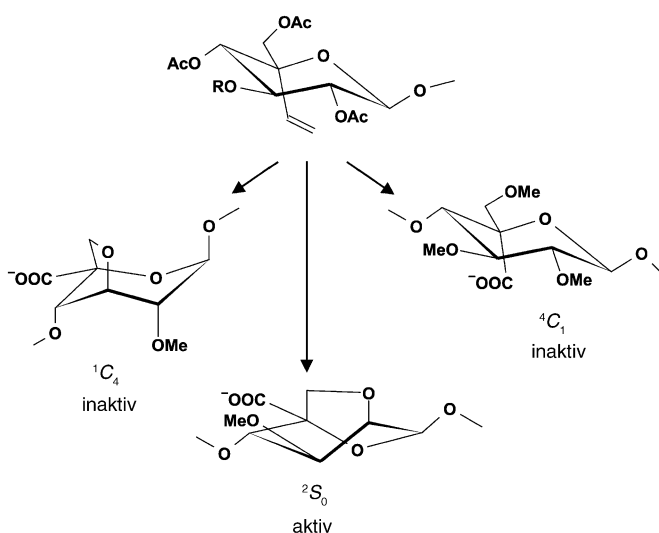
**Abbildung 12.** L-Idopyranuronsäure kann theoretisch die drei unterschiedlichen Konformationen  $^1C_4$ ,  $^4C_1$  und  $^2S_0$  einnehmen, in heparinähnlichen Verbindungen kommen aber nur die  $^1C_4$ - und die  $^2S_0$ -Konformationen vor.

biologisch aktiven Pentasacchariden die Iduronsäureeinheiten in einem Gleichgewicht zwischen der  $^1C_4$ - und der  $^2S_0$ -Konformation vorliegen, wobei letztere überwiegt. Diese Ergebnisse sind in Einklang mit einer späteren Untersuchung, wonach die biologische Aktivität abnimmt, wenn die L-Iduronsäure im Pentasaccharid **2** durch 3-Desoxy-L-iduronsäure ersetzt wird, deren Konformation wegen der Unterdrückung von 1,3-diaxialen Wechselwirkungen zu  $^1C_4$  verschoben ist.<sup>[16]</sup> Die dreidimensionale Darstellung des Pentasaccharids **2** in Abbildung 13 zeigt L-Iduronsäure in der bevorzugten  $^2S_0$ -Konformation. Da in Analoga wie **3** aus-



**Abbildung 13.** Die dreidimensionale Struktur des Pentasaccharids **2** (Fondaparinux) zeigt die L-Iduronsäureeinheit in der  $^2S_0$ -Konformation, wie sie kristallographisch in der Struktur des Komplexes mit Anti-thrombin III nachgewiesen wurde.

schließlich die  $^2S_0$ -Konformation vorliegt, lag der Schluss nahe, dass dies die aktive Konformation ist. Allerdings könnte sich diese konformative Priorität von L-Iduronsäure in Lösung unter anderen Bedingungen ändern (z. B., wenn das Pentasaccharid an AT-III gebunden ist). Versuche bei hohen Salzkonzentrationen lassen z. B. eine Verschiebung des Gleichgewichts von der  $^2S_0$ - zur  $^1C_4$ -Konformation erkennen. Dennoch mehren sich die Hinweise, dass die  $^2S_0$ -Form die aktive Konformation von L-Iduronsäure ist, wenn das Pentasaccharid an AT-III gebunden ist. So war ein Pentasaccharid mit in der  $^1C_4$ -Konformation (oder der  $^4C_1$ -Konformation) fixierten L-Iduronsäure biologisch inaktiv,<sup>[17]</sup> während das gleiche Derivat mit in der  $^2S_0$ -Konformation fixierten L-Iduronsäure ähnlich wirksam ist wie die Stammverbindung (Abbildung 14).<sup>[18,19]</sup> Überzeugende Beweise lieferte auch die



**Abbildung 14.** L-Iduronsäurebausteine mit fixierter  $^1C_4$ -,  $^2S_0$ - oder  $^4C_1$ -Konformation wurden zur Herstellung synthetischer Analoga verwendet. Nur das Pentasaccharid mit der starren  $^2S_0$ -Konformation ist biologisch wirksam.

hochaufgelöste Kristallstruktur des AT-III-Komplexes mit dem wirksamen Pentasaccharidanalogen **8**, deren Elektrendichtekarte zur  $^2S_0$ -Konformation von Iduronsäure passt.<sup>[10]</sup>

### 3. Aktivierung von AT-III gegen Serinproteasen

Nachdem wir Erfahrung in der Synthese komplexer Pentasaccharide gewonnen hatten, wagten wir uns an die Totalsynthese noch komplexerer Verbindungen, die die AT-III-vermittelte Inhibierung anderer Serinproteasen katalysieren können, besonders von Thrombin, das in der Pharmakologie als wichtiges Target für antithrombotische Wirkstoffe angesehen wird. Bevor wir näher auf das Verfahren eingehen, müssen wir uns die strukturellen Vorgaben ins Gedächtnis rufen, die die Aktivierung von Antithrombin gegen verschiedene Serinproteasen steuern.

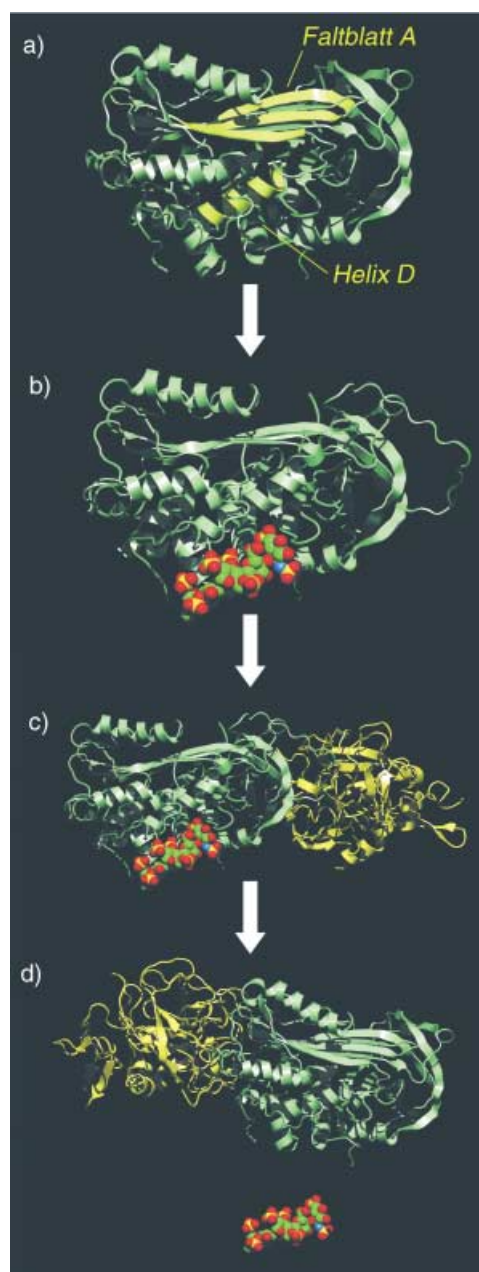
#### 3.1. Inhibierung von Faktor Xa

Im der Einleitung haben wir beschrieben, wie die charakteristische Pentasacchariddomäne von Heparin eine Konformationsänderung in AT-III induziert, um die Schleife mit dem reaktiven Zentrum in eine aktive Konformation zu bringen, sodass Gerinnungsproteasen wie Faktor Xa inhibiert werden können (Abbildung 1). Anhand von Untersuchungen der Kristallstruktur von natürlichem AT-III (Abbildung 15 a) und verwandten Serinproteaseinhibitoren schlugen wir für die AT-III-Aktivierung folgenden Mechanismus vor:<sup>[20]</sup> Die Wechselwirkung des Pentasaccharids mit AT-III führt zur Streckung der Helix D, wobei gleichzeitig die Schleife mit dem reaktiven Zentrum zugänglich und das Faltblatt A geschlossen wird. Dieser Vorgang wurde mit der Strukturauflösung des Komplexes im Kristall bestätigt (Abbildung 15 b). Die katalytische Aktivität des Pentasaccharids lässt sich mit dem umgekehrten Ereignis erklären: Nach Komplexbildung mit der Protease (Abbildung 15 c) fügt sich die freie Schleife wieder in das Faltblatt A ein, während sich die Helix D entspiralisiert und das Pentasaccharid freisetzt (Abbildung 15 d).

Da das Trisaccharid DEF aus drei in Heparin nur selten vorkommenden Monosacchariden aufgebaut ist, lag die Vermutung nahe, dass es sich dabei tatsächlich um den Teil der charakteristischen Pentasaccharidsequenz handelt, der entscheidend an der Erkennung von AT-III beteiligt ist. Wir konnten fluoreszenzspektrometrisch<sup>[21]</sup> und durch kinetische Fast-Flow-Studien nachweisen,<sup>[13]</sup> dass DEF tatsächlich die beschriebene Konformationsänderung auslösen kann (Abbildung 16). Aufgrund dieser Ergebnisse haben wir den folgenden Mechanismus für die Aktivierung von AT-III durch das Pentasaccharid DEFGH vorgeschlagen: Zuerst bindet der DEF-Teil und induziert eine Konformationsänderung im Protein, die anschließend durch den GH-Teil fixiert wird, wobei der L-Iduronsäurebaustein G die  $^2S_0$ -Konformation einnimmt.

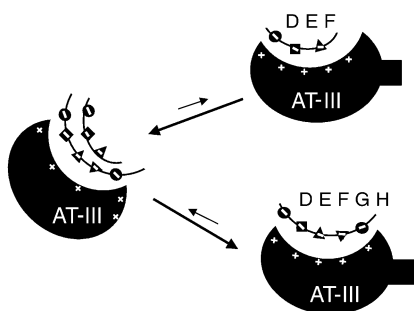
#### 3.2. Inhibierung von Thrombin

Im Fall von Thrombin genügt diese Konformationsänderung allerdings nicht, um das Enzym zu neutralisieren. Die charakteristische Pentasacchariddomäne muss vorhanden sein, aber Heparin sollte auch als negativ geladenes Templat



**Abbildung 15.** Kristallstrukturen von a) AT-III, b) dem AT-III-Pentasaccharid-Komplex, c) Faktor Xa (Faktor Xa gelb) und d) einem Proteaseinhibitor-Protease-Komplex. Die Strukturanalysen liefern präzise Informationen darüber, wie das Pentasaccharid die AT-III-vermittelte Inhibierung von Faktor Xa katalysiert (siehe Haupttext).

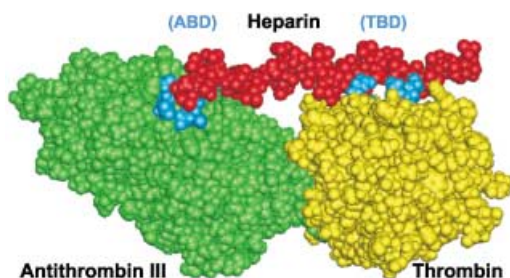
wirken, an das AT-III und Thrombin unter Bildung eines so genannten ternären Komplexes binden (schematische Darstellung in Abbildung 1).<sup>[22]</sup> Am wahrscheinlichsten ist die folgende Prozessreihe: AT-III wechselwirkt zuerst mit der charakteristischen Pentasacchariddomäne von Heparin, danach bindet Thrombin an eine entferntere Heparindomäne und wird passend orientiert. Die Wechselwirkung zwischen Thrombin und dieser Heparindomäne ist naturgemäß weniger spezifisch und etwa drei Größenordnungen schwächer als die Wechselwirkung zwischen AT-III und dem Pentasaccharid. Untersuchungen an isolierten Heparinfragmenten haben



**Abbildung 16.** Der DEF-Teil des Pentasaccharids bindet zuerst an Antithrombin III und induziert eine Konformationsänderung, die die Bindungsstelle für GH bereitstellt. Der Komplex mit DEF ist allerdings weit weniger stabil als der Komplex mit dem Pentasaccharid DEFGH.

ergeben, dass das Heparinfragment für eine Inhibitoraktivität gegen Thrombin etwa 18 Saccharideinheiten enthalten sollte.<sup>[23]</sup>

Auf der Basis der Kristallstruktur von AT-III und Thrombin haben wir 1995 ein zweckmäßiges Modell des ternären AT-III-Heparin-Thrombin-Komplexes beschrieben.<sup>[24]</sup> Mithilfe von Struktur-Aktivitäts-Beziehungen der Pentasaccharid-AT-III-Wechselwirkung, der Struktur von AT-III im Kristall und von Informationen über seine Heparin bindenden Aminosäurereste entwarfen wir ein Modell des AT-III-Pentasaccharid-Komplexes. Die asymmetrische Verteilung komplementärer Wechselwirkungspunkte führte zu einer ungewöhnlichen Pentasaccharidorientierung, in der die nichtreduzierende Kohlenhydrateinheit (d. h. Baustein D) in Richtung der AT-III-Schleife mit dem Reaktionszentrum zeigt. Im Jahr 2000 wurde diese Orientierung durch eine Kristallstrukturanalyse bestätigt, auch wenn die Position des Pentasaccharids gegenüber dem Modell um wenige Å verschoben ist. Danach wurde unter Verwendung der Kristallstruktur von Thrombin (die die Heparinbindungsstelle erkennen lässt), des oben erwähnten AT-III-Pentasaccharid-Komplexes und eines Molekülmodells von Heparin der ternäre Komplex konstruiert. Das Modell dieses Komplexes (Abbildung 17) zeigt eindeutig, dass sich die Thrombin bindende Domäne von Heparin in der Nähe des nichtreduzierenden Pentasaccharidterminus (Baustein D) befindet. Ein weiteres wichtiges Ergebnis war, dass Heparin tatsächlich eine Brücke zwischen den beiden positiv geladenen Proteinbereichen



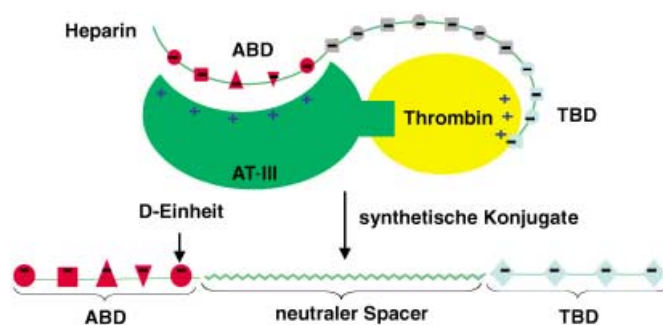
**Abbildung 17.** Molekülmodell des ternären AT-III-Heparin-Thrombin-Komplexes. Heparin bildet offensichtlich eine Brücke zwischen den Proteinen, wobei sechs bis acht sulfatierte Monosaccharideinheiten in der Brückenregion nicht mit den Proteinen wechselwirken.

bildet, diese etwa acht Zucker lange Brücke aber nicht mit positiv geladenen Resten der Proteine wechselwirkt. Aufbauend auf diesem Modell konnten wir neuartige maßgeschneiderte Glykokonjugate mit AT-III-vermittelter Inhibierung von Faktor Xa und Thrombin entwickeln.<sup>[24,25]</sup> Hierfür folgten wir zwei Ansätzen: Zum einen verknüpften wir ein Pentasaccharid mit AT-III bindender Domäne (ABD) und eine Thrombin bindende Domäne (TBD) über einen beweglichen Nichtkohlenhydrat-Spacer (siehe Abschnitt 4), zum anderen synthetisierten wir reine Oligosaccharidverbindungen (siehe Abschnitt 5), mit denen wir auch den Mechanismus der Aktivierung von AT-III durch Heparin eindeutig nachweisen konnten.

#### 4. Pentasaccharidkonjugate mit Antithrombinaktivität

##### 4.1. Design und Synthese von Konjugaten mit maßgeschneiderter Anti-Xa/Antithrombinaktivität

Das Modell des ternären AT-III-Heparin-Thrombin-Komplexes (Abbildung 17) diente als Grundlage für die in Abbildung 18 schematisch dargestellte Arbeitshypothese.<sup>[24]</sup>

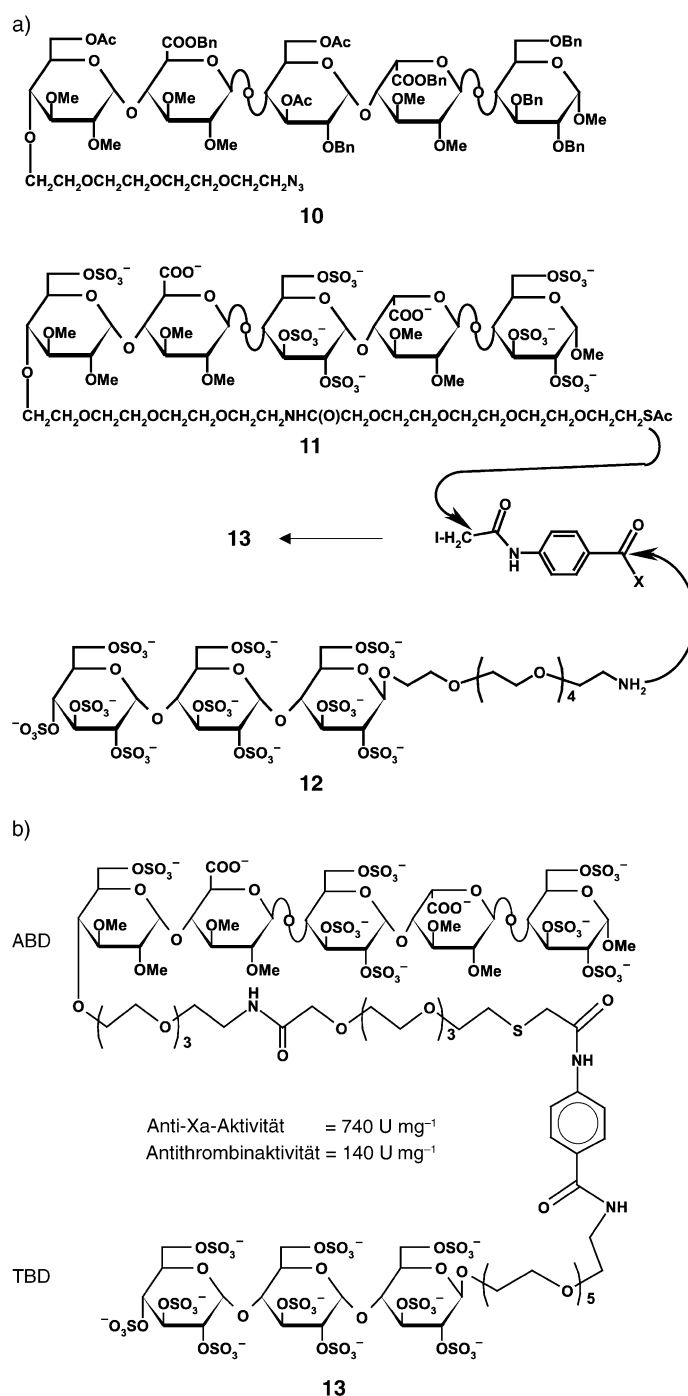


**Abbildung 18.** Das Modell aus Abbildung 17 diente als Grundlage für das Design neuer synthetischer Konjugate, die AT-III-vermittelte Anti-thrombinaktivität haben sollten. Demnach enthalten die Konjugate als AT-III bindende Domäne (ABD) ein charakteristisches Pentasaccharid, dessen nichtreduzierendes Ende (Baustein D) einen ausreichend langen neutralen Spacer trägt, der seinerseits mit einer negativ geladenen Thrombin bindenden Domäne (TBD) verknüpft ist.

Demnach können Verbindungen mit gemischter Anti-Xa/Antithrombinaktivität synthetisiert werden, indem man ein synthetisches Pentasaccharid als AT-III bindende Domäne (ABD) am nichtreduzierenden Ende über einen Spacer mit einer negativ geladenen Thrombin bindenden Domäne (TBD) verknüpft. Wir gingen zudem von einem neutralen Spacer aus,<sup>[24]</sup> sodass sich Heparinmimetika mit geringerer negativer Ladung herstellen lassen, die wegen ihrer schwächeren unspezifischen Bindung an andere positiv geladene Proteine selektiver wirken. Da Literaturangaben zufolge zwischen der TBD von Heparin und Thrombin unspezifische Wechselwirkungen bestehen, nahmen wir an, dass als TBD ein einfaches sulfatiertes Oligosaccharid verwendet werden kann. Unter Berücksichtigung unseres Modells wurde das

Konjugat **13** synthetisiert (Abbildung 19b).<sup>[25]</sup> Dieses besteht aus einem Nichtglycosaminoglycan-Pentasaccharid als ABD, einem Spacer mit etwa 50 Atomen und einem vollständig sulfatierten Maltotriosid als TBD. Die Schlüsselschritte der Synthese sind in Abbildung 19a zusammengefasst. Die vollständig geschützte ABD **10** wurde ähnlich synthetisiert wie verwandte Nichtglycosaminoglycan-Pentasaccharide, wobei ein leicht modifiziertes Verfahren zur Einführung der 13-Azidotetraethylenglycoleinheit am reduzierenden Ende des Pentasaccharids verwendet wurde. Nach Hydrogenolyse der Benzyl- und Azidgruppen und anschließender Verseifung der verbliebenen Acetylestere wurde die erhaltene 13-Aminotetraethylenglycoleinheit mit einem Tetraethylenglycolspacer verlängert, der eine acetylgeschützte Thiolgruppe enthielt. Durch anschließende O-Sulfatierung der freien Hydroxygruppen wurde die ABD **11** erhalten. Das funktionalisierte O-sulfatierte Maltotriosid **12** (TBD) mit einer reaktiven Aminogruppe wurde in mehreren Stufen aus Maltotriose synthetisiert. Anschließend wurden die ABD und TBD in einem Schritt über den kommerziell erhältlichen difunktionalen Linker Sulfo-SIAB verknüpft und das Konjugat **13** nach Größenausschlusschromatographie in guter Ausbeute erhalten.<sup>[25]</sup> Tatsächlich hatte **13** mit  $140 \text{ U mg}^{-1}$  beträchtliche Antithrombinaktivität (Heparin:  $160 \text{ U mg}^{-1}$ ). Die modulare Zusammensetzung derartiger Konjugate aus ABD-, Spacer- und TBD-Komponente ermöglicht einen direkten Zugang zu neuen maßgeschneiderten Antithrombotika. Beispielsweise erwarteten wir, dass sich eine Änderung der ABD nach den Vorgaben des Stammpentasaccharids auf die Anti-Xa-Aktivität und die Halbwertszeit auswirkt (Abbildung 20). Eine Änderung des Spacers (Länge und Starrheit) und der Ladungsdichte an der TBD sollte die Antithrombinaktivität beeinflussen. Erfreulicherweise zeigten die Ergebnisse, dass die Struktur-Aktivitäts-Beziehungen dieser Konjugate den Erwartungen entsprechen.

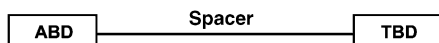
In einer Konjugatreihe behielten wir die ABD und die TBD bei<sup>[25]</sup> und variierten die Länge des Spacers zwischen diesen beiden Einheiten (Abbildung 21). Erwartungsgemäß besteht zwischen der Spacerlänge und der Antithrombinaktivität ein klarer Zusammenhang: Wird der Spacer zu kurz, kann kein ternärer Komplex gebildet werden. Abbildung 22 zeigt eine Reihe von Konjugaten, in denen nur die Ladungsdichte der TBD variiert.<sup>[25–27]</sup> Es wird deutlich, dass die Antithrombinaktivität proportional mit der negativen Ladungsdichte an der TBD zunimmt. Die Art der negativ geladenen Gruppe an der TBD scheint dabei weniger relevant zu sein. Phosphatgruppen sind wegen ihrer höheren Ladungsdichte wirksamer als Sulfatgruppen. Dieses Ergebnis beweist, dass die TBD-Thrombin-Wechselwirkung von Natur aus tatsächlich weniger spezifisch ist als die Wechselwirkung zwischen ABD und AT-III, bei der beispielsweise die Sulfate nicht durch Phosphate ersetzt werden können (siehe Abschnitt 2.1). Durch Verändern des ABD-Teils konnte auch ein Konjugat mit einer völlig neuen gerinnungshemmenden Charakteristik hergestellt werden. So lieferte die Verknüpfung eines Pentasaccharids relativ niedriger Affinität (ABD:  $K_D \approx 1000$  nM) mit einer vollständig sulfatierten Maltopentose (TBD) über einen langen Spacer aus 56 Atomen das erste Heparinmimetikum, bei dem das Aktivi-



**Abbildung 19.** a) Ausgehend von Pentasacchariden wie **10**, die am Baustein D ein kleines Spacermolekül mit einer reaktiven Aminogruppe enthalten, können Konjugate mit potenzieller AT-III-vermittelter Antithrombinaktivität hergestellt werden. Durch Verknüpfen der Aminogruppe mit einem difunktionalen Linker lässt sich der Spacer wunschgemäß verlängern. Die so entstehende Zwischenverbindung **11** enthält eine geschützte Thiolgruppe und kann mit der Thrombin bindenden Domäne **12** (über ein difunktionales Reagens) zum Konjugat **13** verknüpft werden. b) Das Konjugat **13** aus einer AT-III bindenden Domäne (ABD) und einem sulfatierten Trisaccharid als Thrombin bindender Domäne (TBD), die über einen flexiblen Spacer verknüpft sind, hat beträchtliche Antithrombinaktivität.

tätsverhältnis Anti-Xa/Antithrombin wesentlich niedriger ist (Verhältnis = 0.15; 40 U mg<sup>-1</sup> Anti-Xa und 280 U mg<sup>-1</sup> Anti-

Struktur-Aktivitäts-Beziehungen von Konjugaten



Möglichkeiten	vorhergesagte Konsequenzen
Änderung der ABD:	Effekt auf die Halbwertszeit und die Xa-Inhibierung
Änderung der TBD:	Effekt auf die Thrombininhibierung
Änderung des Spacers:	Effekt auf die Thrombininhibierung

**Abbildung 20.** Durch modulares Vorgehen lassen sich ABD, TBD und Spacer in den Konjugaten so modifizieren, dass neue Antithrombotika mit maßgeschneiderten Eigenschaften entstehen.

Änderung des Spacers  
Rolle der Spacerlänge

ABD	Spacer	TBD
$K_D = 20 \text{ nM}$		$10 \text{ SO}_3^-$
TBD	Spacerlänge Zahl der Atome	Antithrombinaktivität [U mg <sup>-1</sup> ]
$10 \text{ SO}_3^-$	18	1
$10 \text{ SO}_3^-$	32	15
$10 \text{ SO}_3^-$	46	20
$10 \text{ SO}_3^-$	59	120

**Abbildung 21.** Struktur-Aktivitäts-Beziehungen von Konjugaten: Die Antithrombinaktivität nimmt bei Verlängerung des molekularen Spacers zwischen ABD und TBD erheblich zu.

thrombin) als das von Heparin (Verhältnis = 1;  $160 \text{ U mg}^{-1}$  Anti-Xa und  $160 \text{ U mg}^{-1}$  Antithrombin).

Die beschriebenen Konjugate haben zwischen der ABD und der TBD einen flexiblen Spacer. Allerdings sollte die richtige Orientierung des flexiblen Spacers bei der Bildung

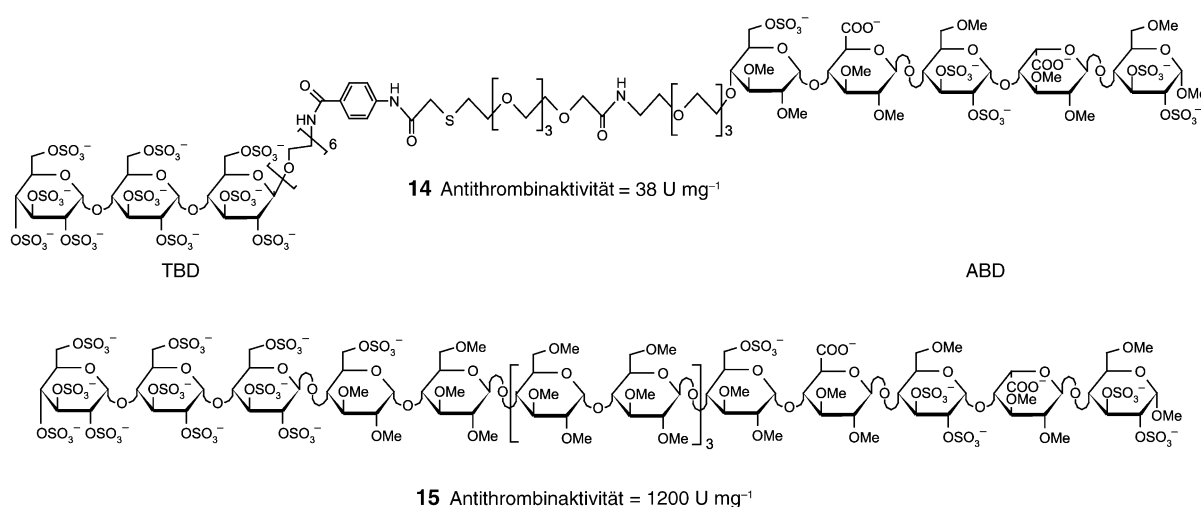
Änderung der TBD  
Rolle der geladenen Gruppen

ABD	Spacer	TBD
	53 Atome	
TBD	negativ geladene Gruppen	Antithrombinaktivität [U mg <sup>-1</sup> ]
Dermatan-Typ	4 $\text{SO}_3^-$	2
Dermatan-Typ	5 $\text{SO}_3^-$	10
Heparin-Typ	6 $\text{SO}_3^-$	10
Cellobiose	7 $\text{SO}_3^-$	10
Cellobiose	7 $\text{SO}_3^{2-}$	26
Maltotriose	10 $\text{SO}_3^-$	65
Maltotriose	10 $\text{SO}_3^{2-}$	167
Maltopentose	16 $\text{SO}_3^-$	330

**Abbildung 22.** Struktur-Aktivitäts-Beziehungen von Konjugaten: Die Antithrombinaktivität ist proportional zur Ladungsdichte an der TBD.

des ternären Komplexes mit einem ungünstigen Entropieverlust einhergehen. Wir erwarteten daher, dass ein in der passenden Konfiguration fixierter Linker die Bildung des ternären Komplexes verstärkt und so zu höherer Antithrombinaktivität führt (Abbildung 23). Als neutralen starren Spacer verwendeten wir ein Octasaccharid aus Glucopyranosebausteinen mit alternierenden  $\alpha$ - und  $\beta$ -1,4-Glycosidbindungen,<sup>[28]</sup> das der Gerüststruktur von Heparin sehr ähnlich ist. Dieses versteifte Konjugat ist eigentlich ein Hexadecasaccharid (**15** in Abbildung 23) und hat bessere Antithrombinaktivität ( $1200 \text{ U mg}^{-1}$ ) als das Konjugat **14** ( $40 \text{ U mg}^{-1}$ ) oder Heparin ( $160 \text{ U mg}^{-1}$ ). Das Hexadecasaccharid gehört zu den synthetischen langen heparinähnlichen Fragmenten, die hervorragende Antithrombinaktivität aufweisen (siehe Abschnitt 5).<sup>[28]</sup>

Änderung des Spacers  
Rolle der Starrheit des Spacers



**Abbildung 23.** Struktur-Aktivitäts-Beziehungen von Konjugaten: Die Antithrombinaktivität nimmt sehr stark zu, wenn der flexible Spacer durch einen starren Kohlenhydrat-Spacer ersetzt wird. Zudem ist die Antithrombinaktivität des versteiften Konjugats besser als die von Heparin.

## 5. Synthetische lange Fragmente

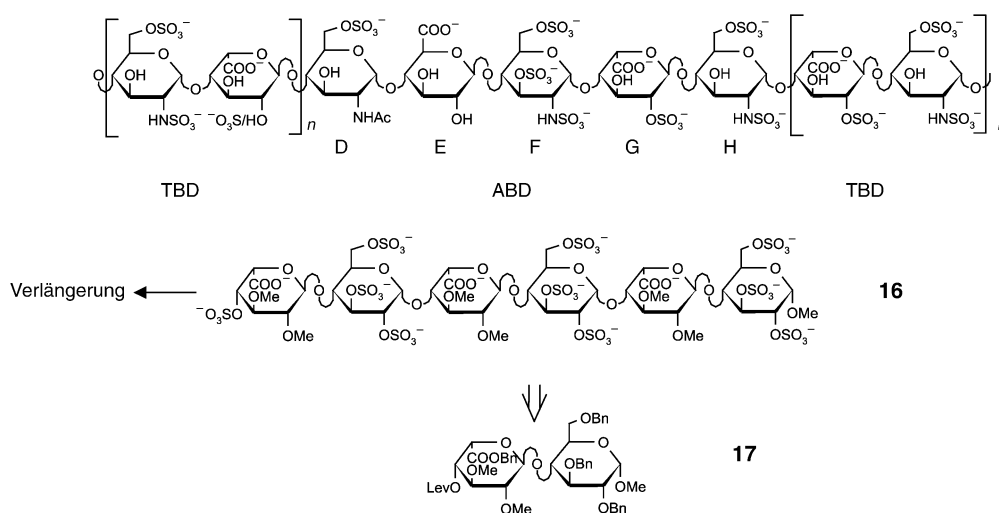
Verglichen mit der Synthese eines Oligosaccharids aus 20 Bausteinen bot die Konjugatstrategie den Vorteil einer vereinfachten Chemie. Ein weiterer notwendiger Schritt war aber die Synthese der längeren Oligosaccharide, um beurteilen zu können, inwieweit sich die chemische Struktur und besonders die des neutralen Spacers auf die Thrombininhibierung auswirkt. Diese Studien boten zudem die Möglichkeit, mehrere Fragen bezüglich der an der Inhibierung von Serinproteasen durch heparinaktiviertes AT-III beteiligten Molekülstrukturen zweifelsfrei zu klären: 1) Welche Mindestlänge muss ein Oligosaccharid haben, damit eine Thrombininhibierung in Gegenwart von AT-III stattfindet? 2) Welche relative Anordnung haben die ABD und die TBD? 3) Wie wirkt sich die chemische Struktur auf die Inhibierung von Thrombin (und anderen Gerinnungsfaktoren) aus? 4) Können Heparinmimetika entwickelt werden, die wirksamer als Heparin sind, aber frei von dessen Nebenwirkungen?

### 5.1. Thrombininhibitorwirkung erfordert mindestens ein 15-mer

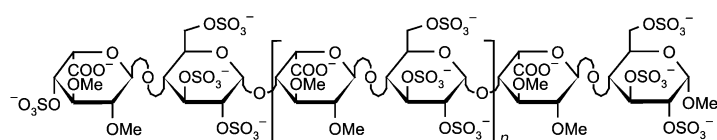
Wir wollten zunächst experimentell bestimmen, wie groß ein Oligosaccharid mindestens sein muss, um bezüglich der Thrombininhibierung als Heparinmimetikum wirken zu können. In Abschnitt 3 haben wir beschrieben, dass zur Inhibierung von Thrombin die Bildung eines ternären Heparin-AT-III-Thrombin-Komplexes erforderlich ist, in dem Heparin die Rolle eines Templates übernimmt, das über eine ABD an AT-III und über eine TBD an Thrombin bindet. Bei den meisten Heparinverbindungen ist die ABD auf beiden Seiten mit einer potenziellen TBD verknüpft (Abbildung 24,

oben), aber durch das präzise Andocken von AT-III an Heparin (wobei ein asymmetrisch orientierter Komplex entsteht) kann effektiv nur die in Nachbarschaft zur inhibitorischen Schleife von AT-III lokalisierte Domäne für die Thrombininhibierung genutzt werden. Dabei haben wir nicht berücksichtigt, ob die nutzbare TBD am reduzierenden oder am nichtreduzierenden Ende der ABD lokalisiert ist. Wir nahmen daher an, dass Verbindungen, an die AT-III an jede Hexasaccharidsequenz binden könnte (d.h., eine ununterbrochene Folge von ABDs), auch Thrombin sowie Faktor Xa inhibieren sollten, sobald das Fragment lang genug ist, um AT-III und Thrombin aufnehmen zu können; tatsächlich kann eine ABD Thrombin elektrostatisch anziehen und so auch als TBD fungieren.<sup>[29]</sup>

Als potenziellen Kandidaten zur Überprüfung dieser Hypothese wählten wir das Hexasaccharid **16** (Abbildung 24), eine dem hochaffinen Pentasaccharid **3** sehr ähnliche Verbindung.<sup>[29,30]</sup> Nach der Synthese von **16** aus dem Disaccharid **17** als einzigem Baustein stellten wir fest, dass seine Affinität zu AT-III zwar deutlich niedriger ist als die von **3** ( $0.35 \mu\text{M}$  gegenüber  $0.0019 \mu\text{M}$ ), aber ausreichen sollte, um die Mindestgröße eines zur Katalyse der Thrombininhibierung geeigneten Oligosaccharids zu ermitteln. Hierzu wurden größere Oligosaccharide durch „Polymerisation“ des Disaccharids **17** (das nach Acetolyse leicht in ein Imidat als Glycosyldonor überführt wird) synthetisiert. Wie aus Abbildung 25 hervorgeht, katalysierten alle erhaltenen Oligosaccharide die Inhibierung von Faktor Xa in Gegenwart von AT-III ( $1.5\text{--}2 \text{ Ummol}^{-1}$ ), dagegen konnten nur das 16-mer und größere Verbindungen Thrombin inhibieren (die mit der Kettenlänge steigende Aktivität spiegelt sich im  $\text{IC}_{50}$ -Wert wider, der von  $130 \mu\text{g mL}^{-1}$  für das 16-mer auf  $6.7 \mu\text{g mL}^{-1}$  für das 20-mer sinkt).<sup>[29–31]</sup>



**Abbildung 24.** Das Hexasaccharid **16** bindet trotz seiner alternierenden Sequenz an AT-III. Längere Fragmente aus dieser Disaccharidsequenz (siehe Abbildung 25) wurden zur Untersuchung der für eine Antithrombinaktivität erforderlichen Mindestlänge von heparinähnlichen Verbindungen verwendet. Bei langen Fragmenten dieser Art sollte es keine Rolle spielen, ob die TBD an das reduzierende oder das nichtreduzierende Ende der ABD gebunden ist (oben), denn jede Hexasaccharidsequenz des Oligomers kann AT-III aktivieren. Alle Fragmente wurden aus dem passend geschützten Disaccharidbaustein **17** synthetisiert.

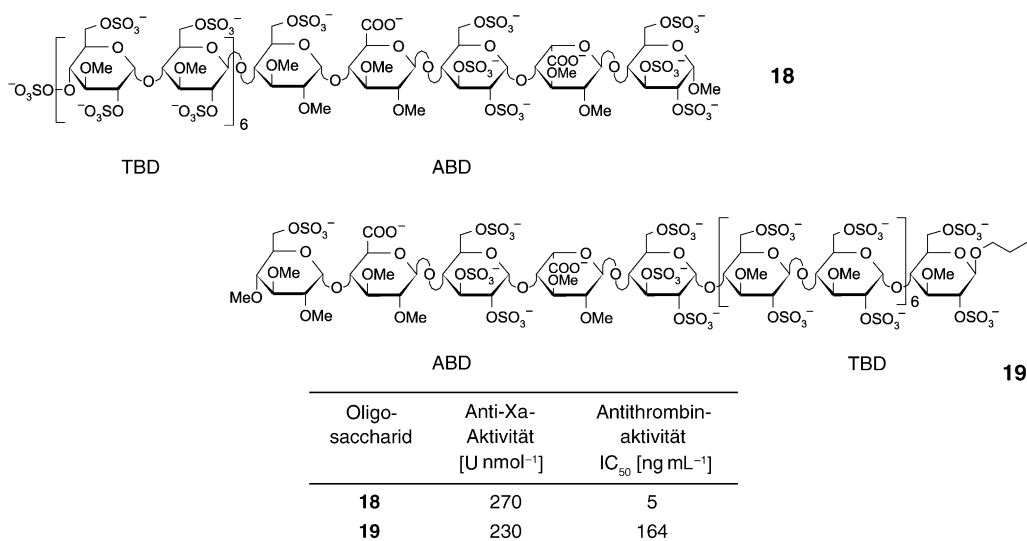


Oligosaccharid	Größe	Anti-Xa-Aktivität [U mg <sup>-1</sup> ]	Antithrombinaktivität IC <sub>50</sub> [ng mL <sup>-1</sup> ]
Heparin	–	170	3
<i>n</i> = 3	10-mer	325	>10 000
<i>n</i> = 4	12-mer	405	>10 000
<i>n</i> = 5	14-mer	360	>10 000
<i>n</i> = 6	16-mer	310	130
<i>n</i> = 7	18-mer	360	23
<i>n</i> = 8	20-mer	290	6.7

**Abbildung 25.** Lange heparinähnliche Fragmente mit alternierender Sequenz, in der jede Hexasaccharideinheit AT-III aktivieren kann. Alle Fragmente haben Anti-Xa-Aktivität, aber erst vom Hexadecasaccharid an tritt auch AT-III-vermittelte Antithrombinaktivität auf (IC<sub>50</sub> ist die Konzentration, bei der die Thrombinaktivität auf 50% abgenommen hat).

### 5.2. Relative Stellung der Thrombin bindenden und AT-III-bindenden Domänen

Das Molekülmodell des ternären Heparin-AT III-Thrombin-Komplexes lässt darauf schließen, dass die produktive TBD am nichtreduzierenden Ende der ABD lokalisiert ist (Abbildung 17). Die entsprechenden synthetischen Konjugate, in denen die ABD über einen flexiblen Spacer mit einer TBD verknüpft ist, zeigten Inhibitorwirkung gegen Thrombin (siehe Abschnitt 4). Um experimentelle Hinweise auch auf die relative Position dieser beiden Domänen zu erhalten, haben wir die Inhibitoreigenschaften von Heparinmimetika verglichen, die eine ähnliche Ladungsdichte und Ladungsverteilung wie Heparin sowie eine spezifische ABD und TBD in den beiden möglichen Anordnungen aufweisen.

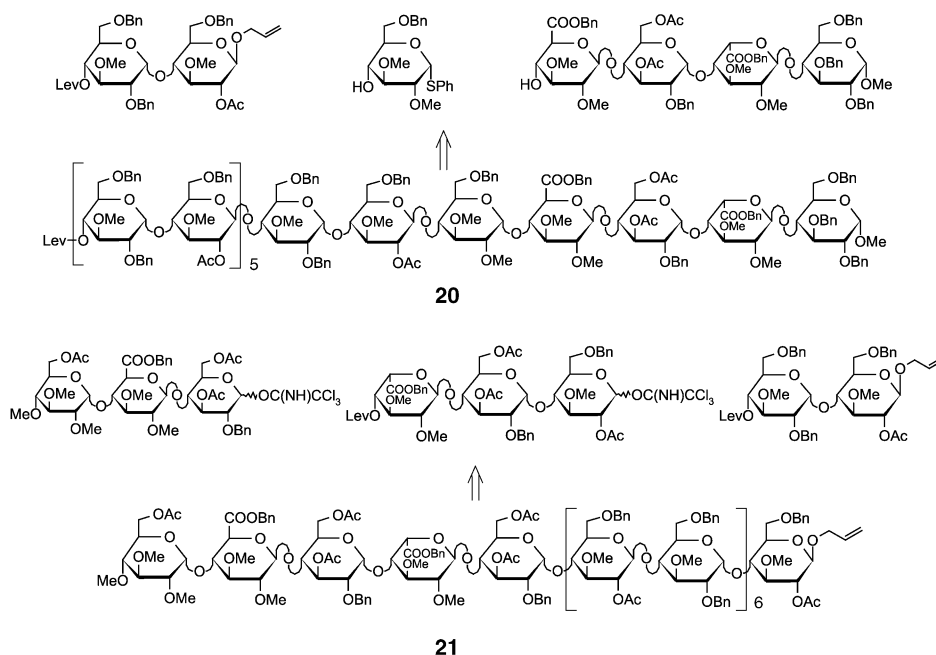


Oligo-saccharid	Anti-Xa-Aktivität [U nmol <sup>-1</sup> ]	Antithrombin-aktivität IC <sub>50</sub> [ng mL <sup>-1</sup> ]
<b>18</b>	270	5
<b>19</b>	230	164

**Abbildung 26.** Frühere Modellstudien und die Untersuchungen der Konjugate ließen darauf schließen, dass die TBD in Heparin an das nichtreduzierende Ende der ABD (Pentasaccharid) gebunden sein muss. Um dies zweifelsfrei zu beweisen, wurden die Fragmente **18** und **19** synthetisiert.

Als Targets wurden das 17-mer **18** und das 18-mer **19** (Abbildung 26) gewählt,<sup>[32]</sup> die zu den Nichtglycosaminoglycanen gehören (siehe Abschnitt 2.2) und daher leichter zu synthetisieren sind. Das hochaffine Pentasaccharid **3** diente als ABD, und um die Synthese weiter zu vereinfachen, wurde die 2-*O*-Sulfonato- $\alpha$ -L-iduronsäure-Gruppe in der TBD durch 2,6-Di-*O*-sulfonato- $\beta$ -D-glucose ersetzt. Diese Vereinfachung beruhte auf der Überlegung, dass die Thrombin-Bindung an Heparin hauptsächlich durch elektrostatische Anziehung zwischen der anionenbindenden Exoposition II des Proteins und dem anionischen Polysaccharid erfolgt. Wir wollten auf diese Weise die Ladungsdichte (Zahl der Ladungen je Saccharideinheit) von Heparin beibehalten. Molecular-Modeling-Studien zufolge sind die Gesamtform und die Lokalisierung der negativen Ladungen in den Mimetika ähnlich wie in Heparin, obwohl das D-Glucose-Monomer eine andere Konfiguration hat als das L-Ido-Derivat. Dieser Effekt scheint praktisch unabhängig von der Konformation des L-Idosers (1C<sub>4</sub> oder 2S<sub>0</sub>) zu sein.

Unsere Synthesestrategie für das 17-mer **18** und das 18-mer **19** stützte sich auf die Herstellung der komplett geschützten Vorstufen **20** und **21** (Abbildung 27) der gewünschten Oligosaccharide, in denen Benzylether und Acetylerster die später sulfatierten Positionen schützen, während die Carboxylatgruppen von Glucuron- und Iduronsäure (Bausteine E und G) als Benzylester geschützt sind. Nach Abspaltung der Schutzgruppen und Sulfatierung wurden die Produkte in drei Schritten mit hoher Ausbeute erhalten. Auf diese Weise wurden langwierige und kostspielige Reinigungsschritte in diesem fortgeschrittenen Synthesestadium vermieden. Die Untersuchung der biologischen Eigenschaften dieser Verbindungen ergab, dass zwar beide die Inhibierung von Faktor Xa katalysieren können, aber nur **18** katalysiert die Thrombininhibierung.<sup>[32]</sup> Dies kann als endgültiger Beweis dafür angesehen werden, dass in der Struktur eines Thrombin-inhibierenden Heparinmoleküls die TBD am nichtreduzierenden Ende der ABD lokalisiert sein muss.

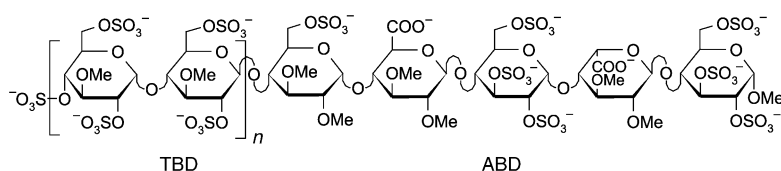


**Abbildung 27.** Die Synthese der langen heparinähnlichen Fragmente **18** und **19** erfordert die Herstellung der komplett geschützten Derivate **20** bzw. **21**. Wie die Retrosynthese zeigt, sind diese beiden Verbindungen aus je drei Bausteinen zugänglich.

### 5.3. Einfluss von Größe und Ladung auf die Serinproteaseinhibierung

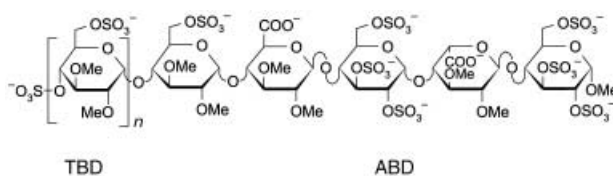
Nachdem feststand, dass die AT-III-vermittelte Thrombininhibierung ein geladenes Molekül voraussetzt, das mindestens die Länge eines Pentadecasaccharids hat und am reduzierenden Ende eine ABD trägt, synthetisierten wir mehrere Oligosaccharide, um den Einfluss von Größe und Ladung der TBD auf die Stärke der Thrombininhibierung zu bestimmen.<sup>[33]</sup> Im Oligosaccharid **22** ist die TBD um zwei Monosaccharide kürzer als in **18**, in **23** ist sie dagegen um zwei Monosaccharide länger. Erwartungsgemäß wirkt sich die Molekülgröße auf die Fähigkeit zur Thrombininhibierung aus, auf die Anti-Xa-Aktivität dagegen nicht (Abbildung 28). In den Oligosacchariden **24**, **25** und **26** (Abbildung 29) besteht die TBD aus  $\alpha$ -verknüpften Glucoseeinheiten mit nur einer Sulfatgruppe an C-6. Ihre Inhibitorwirkung für Thrombin war geringer als die der stärker geladenen Verbindungen **22**, **18** und **23** (Abbildung 28).

Mit diesen synthetischen Verbindungsreihen gelang uns die experimentelle Bestätigung wohlbekannter Regeln zur Steuerung der biologischen Eigenschaften von Heparin, wonach die Inhibierung von Thrombin eng mit der Molekülgröße und -ladung zusammenhängt. Die gleichen Strukturparameter steuern auch die Wechselwirkung von Heparin und, allgemeiner, von Polyanionen mit positiv geladenen biologischen Komponenten. Die Frage war nun, ob die chemische Synthese genutzt werden konnte, um wirksame heparinähnliche Verbindungen in einer für die Wirkstoffentwicklung günstigeren Weise zu modifizieren.



Oligosaccharid	<i>n</i>	Anti-Xa-Aktivität [U nmol <sup>-1</sup> ]	Antithrombin-aktivität IC <sub>50</sub> [ng mL <sup>-1</sup> ]
<b>22</b>	5	370	41
<b>18</b>	6	270	5
<b>23</b>	7	290	2

**Abbildung 28.** Bei langen heparinähnlichen Verbindungen hängt die Fähigkeit zur Thrombininhibierung erwartungsgemäß von der Molekülgröße ab, die Anti-Xa-Aktivität ändert sich hingegen kaum.



Oligosaccharid	<i>n</i>	Antithrombin-aktivität IC <sub>50</sub> [ng mL <sup>-1</sup> ]
<b>24</b>	11	490
<b>25</b>	13	360
<b>26</b>	15	88

**Abbildung 29.** Heparinähnliche Verbindungen, in denen die TBD aus  $\alpha$ -verknüpften 6-O-sulfatierten Glucoseeinheiten besteht, inhibieren zwar ebenfalls Thrombin, ihre Aktivität ist aber niedriger als die von langen Fragmenten mit stärker geladener TBD.

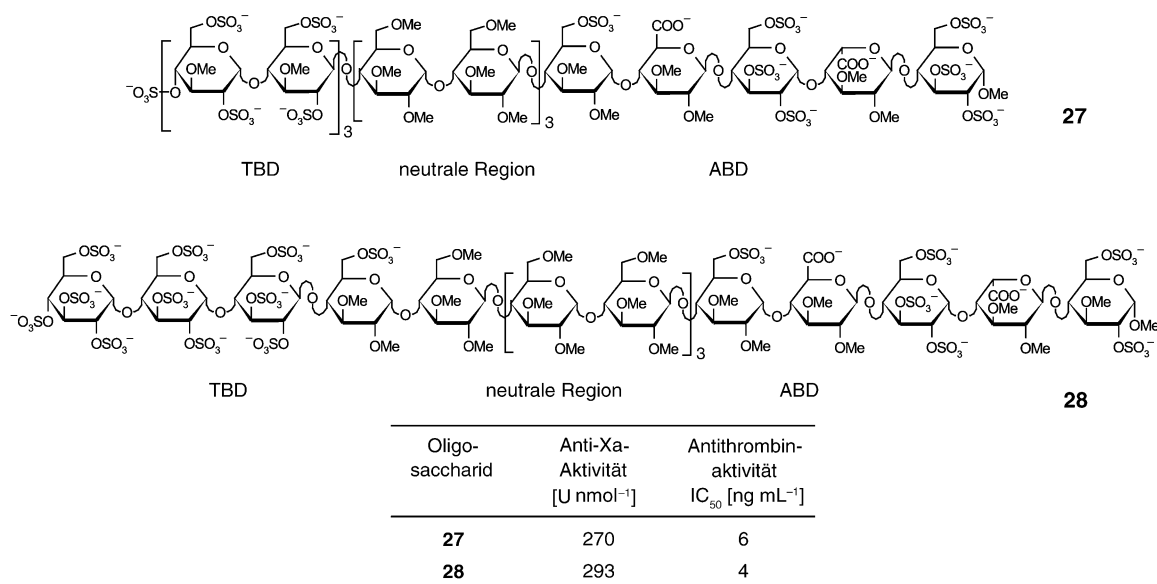
#### 5.4. Einfluss des Spacers zwischen ABD und TBD auf die Thrombininhibition: Synthese langer Fragmente mit verbessertem biologischem Profil

Dass sich Verlauf der klinischen Entwicklung des Pentasaccharids **2** dessen lange Halbwertszeit herausstellte (17 h in jungen gesunden Probanden), war eine unerwartete positive Überraschung, denn die damaligen Referenzverbindungen auf diesem Gebiet, Heparin und LMW-Heparin, hatten im Menschen relativ kurze Halbwertszeiten. Dieser Unterschied zwischen Fondaparinux und den Heparinen beruht darauf, dass die in jedem Heparinpräparat enthaltenen langen geladenen Moleküle mit Blut- und Gefäßkomponenten wechselwirken und daher rasch ausgeschieden werden, während das kleine Pentasaccharid vollständig an AT-III gebunden und so vor Ausscheidung geschützt ist. Neben der Halbwertszeit, bei der die Wechselwirkung mit den die Gefäßwand auskleidenden Zellen eine Rolle spielt, trägt die Wechselwirkung von Heparin mit dem von Blutplättchen freigesetzten Protein PF4 entscheidend zur Entwicklung der heparininduzierten Thrombopenie (HIT) bei, der gefürchtetsten Nebenwirkung einer Heparintherapie. Die Wechselwirkung von Heparin mit PF4 führt zu einer durch den PF4-Heparin-Komplex hervorgerufenen immunallergischen Reaktion.<sup>[34]</sup> Dagegen wechselwirkt das Pentasaccharid bisherigen Untersuchungen zufolge nicht mit PF4 und löst keine HIT aus. Außerdem weiß man, dass LMW-Heparine weniger zur Wechselwirkung mit PF4 neigen als Standardheparin. Wir wollten nun die Struktur der erwähnten Thrombininhibierenden Oligosaccharide so modifizieren, dass sie sich wie das Pentasaccharid **2** verhalten (das nicht mit PF4 wechselwirkt) und nicht wie Heparin oder LMW-Heparin. Dies könnte allerdings ein unüberwindliches Problem sein, denn die optimale Größe eines Oligosaccharids zur Bildung eines

Komplexes mit PF4 ist ein 16-mer.<sup>[35]</sup> Zwei entscheidende Beobachtungen ließen uns aber an eine Lösung des Problems glauben: 1) Ein Heparinoligosaccharid muss octamer sein, um signifikant an PF4 zu binden;<sup>[36]</sup> 2) im ternären Heparin-AT-III-Thrombin-Komplex sind die zentralen Einheiten nicht an der Wechselwirkung mit den Proteinen beteiligt (siehe Abbildung 17). Ein Oligosaccharid, in dem geladene die ABD und TBD durch eine neutrale Domäne getrennt sind, könnte demnach die Thrombininhibition katalysieren und dabei unerwünschte Wechselwirkungen, besonders mit PF4, vermeiden. Wir synthetisierten daher eine Reihe von Verbindungen wie **27** und **28** (Abbildung 30), in denen unterschiedliche TBDs und die ABD durch eine neutrale, vollständig methylierte Domäne getrennt sind.<sup>[28,37]</sup> Dabei kann die Größe der Thrombinbindungsstelle sogar bis auf ein kleines Mono- oder Disaccharidfragment verringert werden, und es bestätigte sich erneut, dass die Wechselwirkung mit Thrombin auch von der Ladungsdichte abhängt. Die im Verlauf der Synthese von Konjugaten gewonnene Erfahrung war für das Design der TBD von großem Nutzen. Erwähnt werden muss auch, dass die unterschiedlichen Domänen der Struktur modifiziert und so die pharmakodynamischen und pharmakokinetischen Eigenschaften der Verbindungen spezifisch beeinflusst werden können. Nach Untersuchungen der Struktur-Aktivitäts-Beziehungen scheint das 16-mer **28** (SanOrg 123781) ein geeigneter Kandidat für die pharmazeutische Entwicklung zu sein.<sup>[38]</sup>

#### 6. Schlussbemerkungen und Ausblick

Zu Beginn der 80er Jahre wurde Heparin, das Hauptmedikament auf dem Gebiet der venösen Thrombose, chemisch oder enzymatisch fragmentiert, und die erhaltenen



**Abbildung 30.** Lange heparinähnliche Fragmente wie **27** und **28** (vgl. auch **15** in Abbildung 23) enthalten neutrale Spacereinheiten, sodass diese Verbindungen eine geringere Ladungsdichte haben als Heparin. Die niedrige Ladungsdichte dieser Designermoleküle hat große Bedeutung für die Vermeidung von Wechselwirkungen mit dem von Blutplättchen freigesetzten Protein PF4, das im Komplex mit Heparin immunogen wirken und eine heparininduzierte Thrombopenie hervorrufen kann. Die verhältnismäßig niedrig geladenen Verbindungen **27** und **28** wechselwirken tatsächlich nicht mit PF4, haben aber durch ihr Design bessere Antithrombinaktivität als Heparin.

LMW-Heparine wurden mit einem derzeitigen weltweiten Umsatz von etwa zwei Milliarden Dollar marktführend bei den Antithrombotika.

Zur gleichen Zeit wurde die AT-III-Bindungsstelle von Heparin identifiziert, und diesem Durchbruch folgten Programme zur Kohlenhydratchemie, deren ehrgeiziges Ziel die Synthese von Wirksubstanzen mit den hervorragenden antithrombotischen Eigenschaften der komplexen Polysaccharide tierischen Ursprungs war. Als nach langjährigen riskanten Forschungs- und Entwicklungsprogrammen die Wirksamkeit des ersten Wirkstoffs am Patienten bewiesen war, begann sich die Oligosaccharidsynthese in der medizinischen Chemie zu etablieren. Dabei muss betont werden, dass diese Forschungsprogramme nicht nur die vielstufige Synthese der meisten bis dahin hergestellten Oligosaccharide im Labormaßstab umfassten, sondern auch die Maßstabsvergrößerung der Synthesen.

Fondaparinux (Arixtra), das erste synthetische antithrombotische Pentasaccharid, ist inzwischen weltweit erhältlich. Weitere Substanzen mit anderen vielversprechenden pharmakologischen Eigenschaften werden derzeit klinisch geprüft. Zu den wichtigsten Merkmalen dieser neuen Wirkstoffe gehören ihre molekulare Reinheit und ihre genau definierte Wirkungsweise.

Während dem Markt für Heparinantithrombotika ein Mangel an tierischen Rohstoffen droht, ermöglicht die Innovation in der Chemie die Synthese hochwirksamer Antithrombotika aus der ubiquitären Glucose als Ersatz für extrahierte Polysaccharide.

Die im Laufe von 20 Jahren zunächst von uns, inzwischen aber auch von anderen entwickelten chemischen Methoden ermöglichen die Synthese aller Oligosaccharide aus der Heparin/Heparansulfat-Familie.<sup>[39]</sup> Angesichts der physiologischen Bedeutung dieser natürlichen Polysaccharide ist die Wahrscheinlichkeit sehr groß, dass ausgehend von dieser Chemie weitere Wirkstoffe gegen andere Erkrankungen entwickelt werden. Wir haben außerdem nachgewiesen, dass durch organische Synthese und rationales Design heparinähnliche Verbindungen zugänglich sind, in denen sich nicht nur die AT-III-vermittelte Anti-Xa- und Antithrombinaktivität, sondern auch die Halbwertszeit im Blutkreislauf genau einstellen lässt, während unspezifische Wechselwirkungen mit anderen basischen Proteinen verringert werden können.

*Die in diesem Aufsatz zusammengefassten Forschungs- und Entwicklungsarbeiten wurden über einen Zeitraum von etwa 15 Jahren von mehreren Arbeitsgruppen bei Sanofi-Synthelabo und Organon durchgeführt. Wir danken allen Mitarbeitern dieser Arbeitsgruppen, die mit ihrer Unterstützung und ihrer Begeisterung zum erfolgreichen Verlauf des Projekts beigetragen haben. Besonders erwähnen möchten wir: Sjoerd van Aelst, Ron van Amsterdam, Dick Meuleman, Pieter Westerduin, Jan Basten, Hans Lucas, Marc Broekhoven, Vera de Kimpe, Marijke Tromp, Anita Rood, Henk van der Heijden, Jacques van Boom, Peter Grootenhuis, Gerard Vogel, Theo van Dinther, Rogier Buijsman, Huib Moelker, Frans Kaspersen, David Nicholson, Arie Visser, Jean-Claude Lormeau, Philippe Duchaussoy, Isidore Lederman, Françoise*

*Gourvenec, Marie-Line Ceccato, Bichdao N'Guyen, Jean-Marc Strassel, Pierre-Alexandre Driguez, Guy Jaurand, Jean-Pascal Héroult, Jean-François Branellec, Gérald Duc, Mohamed El Hajji, Jean Bouthier, Roger Cariou, Eric Garrigou, Jean-Marc Herbert, Jean-Pierre Maffrand, Marc Pascal, Jean-Claude Jacquinet, Pierre Sinaÿ. Unser besonderer Dank gilt dem Initiator des Projekts, Jean Choay.*

Eingegangen am 7. Oktober 2003 [A640]

Übersetzt von Dr. Kathrin-Maria Roy, Langenfeld

- [1] C. A. A. van Boeckel, M. Petitou, *Angew. Chem.* **1993**, *105*, 1741–1761; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1993**, *32*, 1671–1690.
- [2] Ein detaillierter Überblick: M. Petitou, B. Casu, U. Lindahl, *Biochimie* **2003**, *85*, 83–89.
- [3] a) U. Lindahl, G. Bäckström, L. Thunberg, I. G. Leder, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1980**, *77*, 6551–6555; b) J. Choay, J.-C. Lormeau, M. Petitou, P. Sinaÿ, B. Casu, P. Oreste, G. Torri, G. Gatti, *Thromb. Res.* **1980**, *18*, 573–578; c) J. Choay, J.-C. Lormeau, M. Petitou, P. Sinaÿ, J. Fareed, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1981**, *370*, 644–649; d) L. Thunberg, G. Bäckström, U. Lindahl, *Carbohydr. Res.* **1982**, *100*, 393–410.
- [4] a) P. Sinaÿ, J. C. Jacquinet, M. Petitou, P. Duchaussoy, I. Lederman, J. Choay, G. Torri, *Carbohydr. Res.* **1984**, *132*, C5–C9; b) M. Petitou, P. Duchaussoy, I. Lederman, J. Choay, P. Sinaÿ, J. C. Jacquinet, G. Torri, *Carbohydr. Res.* **1986**, *147*, 221–236.
- [5] C. A. A. van Boeckel, T. Beetz, J. N. Vos, A. J. M. de Jong, S. F. van Aelst, R. H. van den Bosch, J. M. R. Mertens, F. A. van der Vlugt, *J. Carbohydr. Chem.* **1985**, *4*, 293–321.
- [6] J. M. Herbert, M. Petitou, J. C. Lormeau, R. Cariou, J. Necciari, H. N. Magnani, P. Zandberg, R. G. M. van Amsterdam, C. A. A. van Boeckel, D. G. Meuleman, *Cardiovasc. Drug Rev.* **1997**, *15*, 1–26.
- [7] K. A. Bauer, D. W. Hawkins, P. C. Peters, M. Petitou, J.-M. Herbert, C. A. A. van Boeckel, D. G. Meuleman, *Cardiovasc. Drug Rev.* **2002**, *20*, 1, 37–52.
- [8] P. Westerduin, C. A. A. van Boeckel, J. E. M. Basten, M. A. Broekhoven, H. Lucas, A. Rood, H. van der Heijden, R. G. M. van Amsterdam, T. G. van Dinther, D. G. Meuleman, A. Visser, G. M. T. Vogel, J. B. L. Damm, G. T. Overklist, *Bioorg. Med. Chem.* **1994**, *2*, 1267–1280.
- [9] J. M. Herbert, J. P. Héroult, A. Bernat, R. G. M. van Amsterdam, J. C. Lormeau, M. Petitou, C. A. A. van Boeckel, P. Hoffmann, D. G. Meuleman, *Blood* **1998**, *91*, 4197–4205.
- [10] L. Jin, J.-P. Abrahams, R. Skinner, M. Petitou, R. N. Pike, R. W. Carrell, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1997**, *94*, 14683–14688.
- [11] a) C. A. A. van Boeckel, T. Beetz, S. F. van Aelst, *Tetrahedron Lett.* **1988**, *29*, 803–806; b) D. Carrie, C. Caranobe, S. Saivin, G. Houin, J.-C. Lormeau, C. A. A. van Boeckel, D. Meuleman, B. Boneu, *Blood* **1994**, *84*, 2571–2577.
- [12] H. Lucas, J. E. M. Basten, P. Konradsson, C. A. A. van Boeckel, *Angew. Chem.* **1993**, *105*, 462–464; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1993**, *32*, 434–436.
- [13] a) U. R. Desai, M. Petitou, I. Björk, S. T. Olson, *Biochemistry* **1998**, *37*, 13033–13041; b) U. R. Desai, M. Petitou, I. Björk, S. T. Olson, *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 7478–7487.
- [14] P. Westerduin, C. A. A. van Boeckel, Eur. Patent 0818459, **1996**.
- [15] A. Helmboldt, M. Petitou, J. Mallet, J. P. Héroult, J. C. Lormeau, P. A. Driguez, J. Herbert, P. Sinaÿ, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1997**, *7*, 1507–1510.
- [16] P. S. Lei, P. Duchaussoy, P. Sizun, J.-M. Mallet, M. Petitou, P. Sinaÿ, *Bioorg. Med. Chem.* **1998**, *6*, 1337–1346.
- [17] N. Sakairi, J. E. M. Basten, G. A. van der Marel, C. A. A. van Boeckel, J. H. van Boom, *Chem. Eur. J.* **1996**, *2*, 1007.

- [18] a) S. K. Das, J.-M. Mallet, J. Esnault, P.-A. Driguez, P. Duchaussoy, P. Sizun, J.-P. Héroult, J.-M. Herbert, M. Petitou, P. Sinaï, *Angew. Chem.* **2001**, *113*, 1723–1726; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 1670–1673; b) S. K. Das, J.-M. Mallet, J. Esnault, P. A. Driguez, P. Duchaussoy, P. Sizun, J.-M. Herbert, M. Petitou, P. Sinaï, *Chem. Eur. J.* **2001**, *7*, 4821–4833.
- [19] M. Hricovini, M. Guerrini, A. Bisio, G. Torri, M. Petitou, B. Casu, *Biochem. J.* **2001**, *359*, 265–272.
- [20] a) C. A. A. van Boeckel, P. D. J. Grootenhuis, A. Visser, *Nat. Struct. Biol.* **1994**, *1*, 423–425; b) C. A. A. van Boeckel, P. D. J. Grootenhuis, D. Meuleman, P. Westerduin, *Pure Appl. Chem.* **1995**, *67*, 1663–1672.
- [21] M. Petitou, T. Barzu, J.-P. Héroult, J.-M. Herbert, *Glycobiology* **1997**, *7*, 323–327.
- [22] S. T. Olson, I. Björk, *Semin. Thromb. Hemostasis* **1994**, *20*, 373.
- [23] a) T. C. Laurent, A. Tengblad, L. Thunberg, M. Höök, U. Lindahl, *Biochem. J.* **1978**, *175*, 691–701; b) G. M. Oosta, W. T. Gardner, D. L. Beeler, R. D. Rosenberg, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1981**, *78*, 829–833; c) D. A. Lane, J. Denton, A. M. Flynn, L. Thunberg, U. Lindahl, *Biochem. J.* **1984**, *218*, 725–732; d) A. Danielsson, E. Raub, U. Lindahl, I. Björk, *J. Biol. Chem.* **1986**, *261*, 15467–15473.
- [24] P. D. J. Grootenhuis, P. Westerduin, D. Meuleman, M. Petitou, C. A. A. van Boeckel, *Nat. Struct. Biol.* **1995**, *2*, 736–739.
- [25] P. Westerduin, J. E. M. Basten, M. A. Broekhoven, V. de Kimpe, W. H. A. Kuijpers, C. A. A. van Boeckel, *Angew. Chem.* **1996**, *108*, 339–342; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1996**, *35*, 331–333.
- [26] J. E. M. Basten, C. M. Dreef-Tromp, B. de Wijs, C. A. A. van Boeckel, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1998**, *8*, 1201–1206.
- [27] R. C. Buijsman, J. E. M. Basten, C. M. Dreef-Tromp, G. A. van der Marel, C. A. A. van Boeckel, J. H. van Boom, *Bioorg. Med. Chem.* **1999**, *7*, 1881–1890.
- [28] C. M. Dreef-Tromp, J. E. M. Basten, M. A. Broekhoven, T. G. van Dinther, M. Petitou, C. A. A. van Boeckel, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1998**, *8*, 2081–2086.
- [29] M. Petitou, P. Duchaussoy, P.-A. Driguez, G. Jaurand, J.-P. Héroult, J.-C. Lormeau, C. A. A. van Boeckel, J.-M. Herbert, *Angew. Chem.* **1998**, *110*, 3186–3191; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, *37*, 3009–3014.
- [30] P. Duchaussoy, G. Jaurand, P.-A. Driguez, I. Lederman, F. Gourvenec, J.-M. Srasel, P. Sizun, M. Petitou, J.-M. Herbert, *Carbohydr. Res.* **1999**, *317*, 63–84.
- [31] P. Duchaussoy, G. Jaurand, P.-A. Driguez, I. Lederman, F. Gourvenec, J.-M. Srasel, P. Sizun, M. Petitou, J.-M. Herbert, *Carbohydr. Res.* **1999**, *317*, 85–99.
- [32] M. Petitou, A. Imbert, P. Duchaussoy, P.-A. Driguez, M.-L. Ceccato, F. Gourvenec, P. Sizun, J.-P. Héroult, S. Perez, J.-M. Herbert, *Chem. Eur. J.* **2001**, *7*, 858–873.
- [33] a) M. Petitou, P. Duchaussoy, P.-A. Driguez, J.-P. Héroult, J.-C. Lormeau, J.-M. Herbert, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1999**, *9*, 1155–1160; b) M. Petitou, P. Duchaussoy, P.-A. Driguez, J.-P. Héroult, J.-C. Lormeau, J.-M. Herbert, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1999**, *9*, 1161–1166.
- [34] T. E. Warkentin, B. H. Chong, A. Greinacher, *Thromb. Haemostasis* **1998**, *79*, 1–7.
- [35] A. Greinacher, S. Alban, V. Dummel, G. Franz, C. Mueller-Eckardt, *Thromb. Haemostasis* **1995**, *74*, 886–892.
- [36] M. Maccarana, U. Lindahl, *Glycobiology* **1993**, *3*, 271–277.
- [37] M. Petitou, J.-P. Héroult, A. Bernat, P. A. Driguez, P. Duchaussoy, J.-C. Lormeau, J.-M. Herbert, *Nature* **1999**, *398*, 417–422.
- [38] J.-M. Herbert, J.-P. Héroult, A. Bernat, P. Savi, P. Schaeffer, P.-A. Driguez, P. Duchaussoy, M. Petitou, *Thromb. Haemostasis* **2001**, *85*, 852–860.
- [39] Weitere neuere Übersichten: a) F. Y. Avci, N. A. Karst, R. J. Linhardt, *Curr. Pharm. Des.* **2003**, *9*, 2323–2335; b) L. Poletti, L. Lay, *Eur. J. Org. Chem.* **2003**, 2999–3024.