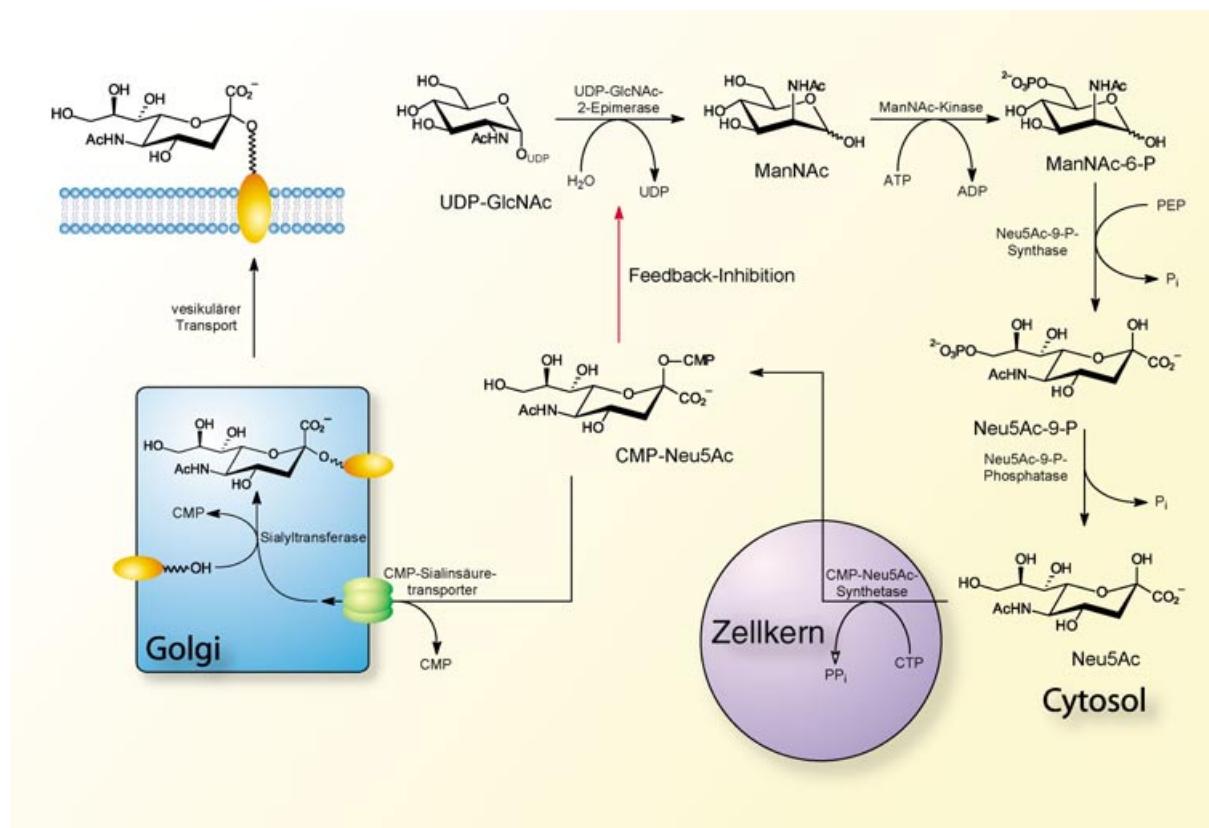


Sialinsäuren

Synthese und biochemische Eigenschaften
reversibler Inhibitoren der
UDP-N-Acetylglucosamin-2-EpimeraseSamy Al-Rawi, Stephan Hinderlich,* Werner Reutter
und Athanassios Giannis*

Sialinsäuren sind eine Familie von α -Ketosäuren mit einem Grundgerüst aus neun Kohlenstoffatomen. Die am häufigsten vorkommende Sialinsäure ist die *N*-Acetylneuraminsäure (Neu5Ac oder NANA; siehe Schema 1). Sie ist eine biosynthetische Vorstufe nahezu aller 50 natürlich vorkommender Sialinsäuren.^[1] Diese tragen wegen ihrer exponierten Position

als terminale Gruppe vieler Oligosaccharidketten von Glykokonjugaten maßgeblich zu deren biologischen Eigenschaften bei. So spielen sialinsäurehaltige Glykokonjugate bei einer Reihe fundamentaler physiologischer und pathologischer Vorgänge eine entscheidende Rolle (z.B. bei Embryogenese, Organbildung, Immunabwehr, Migration und Homing von Leukozyten, Metastasierung neoplastischer Zellen sowie Entzündungsprozessen, aber auch beim Eindringen von Pathogenen in Zellen).^[2] Zahlreiche Tumoren tragen große Mengen an Sialinsäuren wie einen Schutzheld auf ihrer Oberfläche. Die Influenzainfektion ist das bedeutendste Beispiel für eine sialinsäurevermittelte Zell-Virus-Interaktion. Sowohl das Eindringen in die Zelle als auch das Freisetzen neugebildeter Viren verlaufen über sialinsäurehaltige Verbindungen. Inhibitoren des virusfreisetzenden Enzyms, der Influenza-Sialidase, werden bereits therapeu-



Schema 1. Biosynthese von Neu5Ac und ihr Einbau in Glykokonjugate der Zelloberfläche.

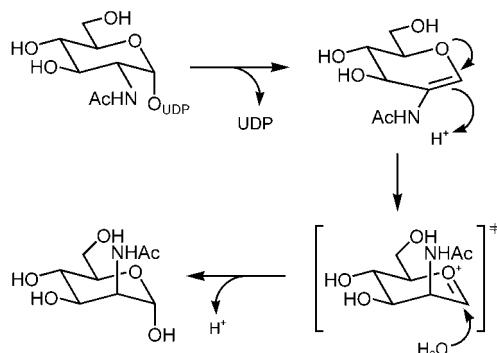
[*] Dr. S. Hinderlich, Prof. Dr. W. Reutter
Charité – Universitätsmedizin Berlin
Campus Benjamin Franklin
Institut für Molekularbiologie und Biochemie
Arnimallee 22, 14195 Berlin-Dahlem (Deutschland)
Fax: (+49) 30-8445-1541
E-mail: stephan.hinderlich@charite.de
Dipl.-Chem. S. Al-Rawi, Prof. Dr. A. Giannis
Institut für Organische Chemie
Universität Leipzig
Johannisallee 29, 04103 Leipzig (Deutschland)
Fax: (+49) 341-973-6599
E-mail: giannis@chemie.uni-leipzig.de

tisch eingesetzt (Zanamivir, Oseltamivir).^[3] Zwar sind die einzelnen Schritte der Neu5Ac-Synthese seit längerem bekannt,^[4] jedoch sind erst wenige Inhibitoren entwickelt worden.^[5,6] Wir berichten hier über Entwurf, Synthese und biochemische Eigenschaften eines potenzen reversiblen Inhibitoren der UDP-GlcNAc-2-Epimerase (UDP = Uridindiphosphat, GlcNAc = *N*-Acetylglucosamin), des Schlüsselenzymes der Neu5Ac-Biosynthese.

Die Biosynthese von Neu5Ac beginnt mit der Epimerisierung von UDP-GlcNAc unter Freisetzung von UDP. Das entstehende *N*-Acetylmannosamin (ManNAc) wird dann an

der OH-6-Position phosphoryliert. Diese beiden Schritte werden von einem bifunktionellen Enzym, der UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase, katalysiert (siehe Schema 1).^[7,8] Dieses Schlüsselenzym wird komplexe reguliert.^[7–10] Lymphozyten ohne dieses Enzym sind nicht mehr in der Lage, eigenständig Sialinsäuren zu bilden und weisen Defekte bei sialinsäureabhängigen Funktionen auf.^[11] Wird bei Mäusen das Enzym durch gezielte Mutagenese ausgeschaltet, zeigen ihre Embryonen eine deutliche Hyposalylierung und sterben spätestens am Tag 8.5 der Embryonalentwicklung.^[12] Diese Ergebnisse unterstreichen die zentrale Bedeutung der UDP-GlcNAc-2-Epimerase bei der *N*-Acetylneuraminsäure-Biosynthese und machen dieses Enzym zu einem interessanten Target für die Entwicklung effektiver Inhibitoren.

Die seit kurzem in rekombinanter Form zugängliche UDP-GlcNAc-2-Epimerase von Säugern unterscheidet sich in ihrer Funktionsweise^[13] kaum vom bakteriellen^[14] Enzym: Bei beiden Enzymen entsteht nach der *anti*-Eliminierung von UDP zunächst das Intermediat 2-Acetamidoglucal. Positional-Isotope-Exchange-Experimente zeigten einen Bindungsbruch der C-O-Bindung am anomeren Zentrum. Gekoppelte NMR-Spektren belegten, dass Wasser nachfolgend an die Unterseite des Acetamidoglucals addiert, sodass es sich bei dem freigesetzten ManNAc um das α -Anomer handelt (Schema 2). Im Übergangszustand der Addition von Wasser an das Acetamidoglucal könnte eine Oxocarbeniumspezies vorliegen.



Schema 2. Vorgeschlagener Reaktionsmechanismus der UDP-GlcNAc-2-Epimerase von Säugern und postulierter Übergangszustand für die *syn*-Addition von Wasser an das 2-Acetamidoglucal.

Die – bei physiologischen pH-Werten protonierten – Iminozucker **2–4** (Abbildung 1), deren Synthese wir hier vorstellen, sind mögliche Inhibitoren der UDP-GlcNAc-2-Epimerase, denn bekanntlich binden stabile Analoga des Übergangszustands stärker an das aktive Zentrum des Enzyms als Analoga des Substrats im Grundzustand.^[15] Als zentraler chiraler Baustein für die Synthese eines 1-Desoxyiminozuckers diente das bicyclische Gerüst des Typs **9** (Schema 3). In Anlehnung an die Arbeit von Martin et al.^[16] wurde der

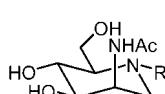
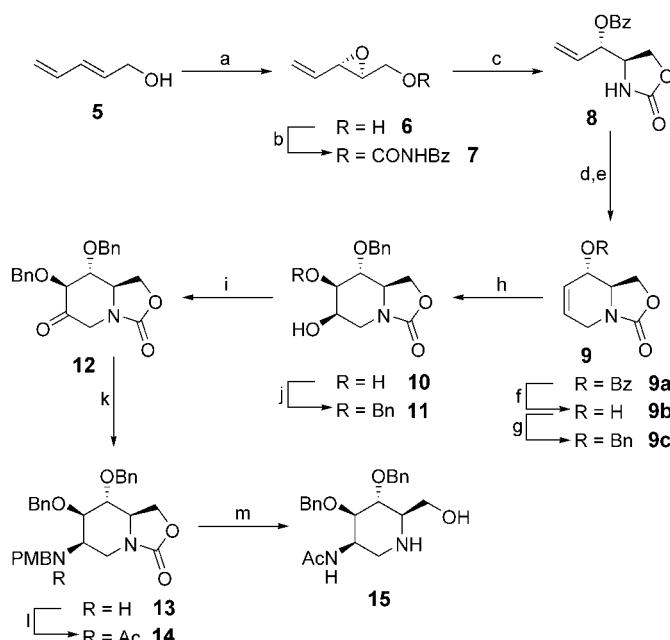


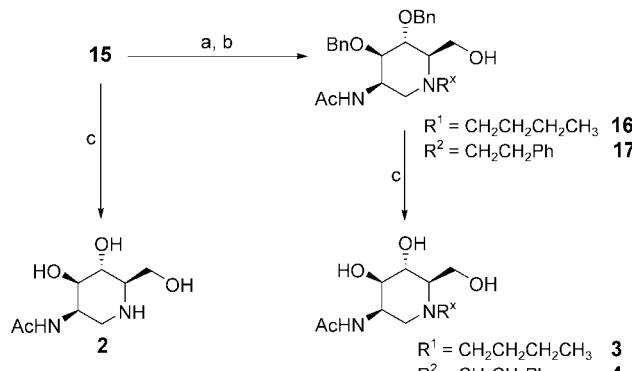
Abbildung 1. Analoga des Übergangszustands der UDP-GlcNAc-2-Epimerase; **2:** R=H, **3:** R=nBu und **4:** R=CH₂CH₂Ph.



Schema 3. Synthese des geschützten Iminozuckers **15**: a) Ti(O*i*Pr)₄, L-(+)-DIPT, *t*BuOOH, CH₂Cl₂, 3 Å Molekularsieb, -15 °C, 57%; b) BzNCO, Et₂O, RT, 84%; c) K₂CO₃, (C₈H₁₇)₃CH₃NCl, CH₂Cl₂/H₂O, RT, 84%; d) NaH, Allylbormid, DMF, 0 °C → RT, 81%; e) Grubbs-Katalysator, Toluol, RT, 99%; f) K₂CO₃, MeOH, RT, 85%; g) NaH, BnBr, DMF, 0 °C → RT, 91%; h) (DHQD)₂Phal, K₂O₄O₄, K₂CO₃, K₃[Fe(CN)₆], CH₃SO₂NH₂, *t*BuOH/H₂O, RT, 90%; i) 1. *n*Bu₂SnO, Toluol, Rückfluss; 2. BnBr, Bu₄NBr, 100 °C, 69%; j) DMSO, (COCl)₂, DIPEA, CH₂Cl₂, -70 °C → RT, 86%; k) *p*-Methoxybenzylamin, AcOH, Na(OAc)₃BH, 1,2-Dichloroethan, RT, 78%; l) Pyridin, DMAP, AcCl, 0 °C → RT, 86%; m) 1. CAN, CH₃CN/H₂O, RT; 2. Ba(OH)₂·8H₂O, EtOH/H₂O, Rückfluss, 63%. DIPT=Diisopropyltartrat, Bz=Benzoyl, Bn=Benzyl, (DHQD)₂Phal=Hydrochinidin-1,4-phthalazindiyether, DIPEA=N,N-Diisopropylethylamin, PMB=*p*-Methoxybenzyl, DMAP=4-(Dimethylamino)pyridin, CAN=Cer(iv)-ammoniumnitrat.

doppelt ungesättigte Alkohol **5** unter Sharpless-Bedingungen epoxidiert.^[17] Die anschließende Umsetzung des (2*S*,3*S*)-Epoxyalkohols **6** mit Benzoylisocyanat lieferte das Benzoylcarbamat **7**. Unter milden Bedingungen in einem Zweiphasensystem führte die regioselektive Öffnung des Epoxids zu einer intramolekularen Wanderung der Benzoylgruppe unter Bildung des substituierten Oxazolidinons **8**. Anschließend wurde der Ringstickstoff allyliert. Nach einer Ringschlussmetathese wurde **9a** in nahezu quantitativer Ausbeute erhalten. Zur Vorbereitung der weiteren Syntheseschritte musste die Benzoylesterfunktion des Piperidinrings in eine Benzyletherfunktion transformiert werden. Die entsprechende Verbindung **9c** war aus **9a** in zwei Stufen zugänglich. **9c** wurde mit katalytischen Mengen Kaliumosmat und *N*-Methylmorpholin-N-oxid (NMMO) als Reoxidans in einem *t*BuOH/Wasser-Gemisch zum Diol umgesetzt. Dabei konnte allerdings kein ausreichender Diastereomerenüberschuss erzielt werden. Bei der Bishydroxylierung mit (DHQD)₂Phal als chiralem Auxiliar^[18] und K₃[Fe(CN)₆] als Reoxidans wurde **10** hingegen mit nahezu vollständiger Diastereoselektivität in sehr guten Ausbeuten erhalten. Die Struktur von **10** konnte mit NOE- und COSY-Experimenten belegt werden.

Die Umsetzung von **10** mit Dibutylzinnoxid liefert als Intermediat ein Dibutylzinnketal, das mithilfe von Benzylbromid und Tetrabutylammoniumbromid^[19] mit einer Regioselektivität von 3.5:1 zu Verbindung **11** umgesetzt wurde. Die nachfolgende Swern-Oxidation ergab **12**; die reduktive Aminierung mit *p*-Methoxybenzylamin und Natriumtriacetoxyborhydrid führte zu **13**. Die anschließende Acetylierung von **13** lieferte **14** in guter Ausbeute. oxidative Entfernung der *p*-Methoxybenzylgruppe durch Cer(IV)-ammoniumnitrat (CAN) und Öffnung des Oxazolidinonrings durch Bariumhydroxid ergab **15**. Nach Abspaltung der Schutzgruppen durch Hydrogenolyse wurde die Zielverbindung **2** erhalten (Schema 4).^[20] Die lipophileren N-alkylierten Derivate **3** und



Schema 4. Derivatisierung und Entschützung: a) Butyraldehyd, AcOH, $\text{Na(OAc)}_3\text{BH}$, 1,2-Dichlorethan, RT, 95%; b) Phenylacetalddehyd, AcOH, NaCNBH_3 , CH_3CN , RT, 85%; c) H_2 , Pd/C , HCl , EtOH , RT, **2**: 87%, **3**: 90%, **4**: 90%.

4 kamen als mögliche Inhibitoren in Zellsystemen und für die Untersuchung von Struktur-Wirkungs-Beziehungen in Frage. Ihre Synthese gelang problemlos durch reduktive Aminierung von **15** unter Zusatz von Butyraldehyd bzw. Phenylacetalddehyd. Die Zwischenprodukte **16** und **17** ergaben nach Hydrogenolyse die Zielverbindungen **3** bzw. **4** (Schema 4).

Die Aktivität der durch eine Standardpräparation^[21] erhaltenen UDP-GlcNAc-2-Epimerase wurde von **2–4** nicht gehemmt – weder in äquimolaren Konzentrationen (1 mM) noch im Verhältnis 4:1 zu UDP-GlcNAc. Möglicherweise waren **2–4** nicht in der Lage, das aktive Zentrum der UDP-GlcNAc-2-Epimerase zu erreichen, weil dieses durch UDP-GlcNAc oder durch (zur Enzymstabilisierung zugesetztes) UDP blockiert war. In einer weiteren Versuchsreihe wurde daher eine Enzympräparation ohne UDP durchgeführt.^[21] Nach Vorinkubation dieser Proben mit **2–4** war die Enzymaktivität deutlich gehemmt (bis zu 70%). Wurde den Enzymproben vor der Inhibitorzugabe 0.1 mM UDP zugesetzt und dann erst die Vorinkubation gestartet, war wiederum nur eine geringe Inhibition (weniger als 10%) zu detektieren. Außerdem wurde keine Inhibition erreicht, wenn UDP-freie Enzympräparationen ohne Vorinkubation gleich in den Enzymaktivitätstest eingesetzt wurden (d.h., wenn das Enzym zeitgleich mit dem Substrat UDP-GlcNAc und den Inhibitoren versetzt wurde). Die synthetisierten Verbindungen waren also durchaus in der Lage, an das aktive Zentrum der UDP-

GlcNAc-2-Epimerase zu binden, sofern es nicht durch UDP und/oder UDP-GlcNAc blockiert war.

Die Inhibitoren wurden zur Untersuchung ihrer Wirkungsweise in unterschiedlichen Konzentrationen eingesetzt (Abbildung 2): Alle inhibierten die UDP-GlcNAc-2-Epime-

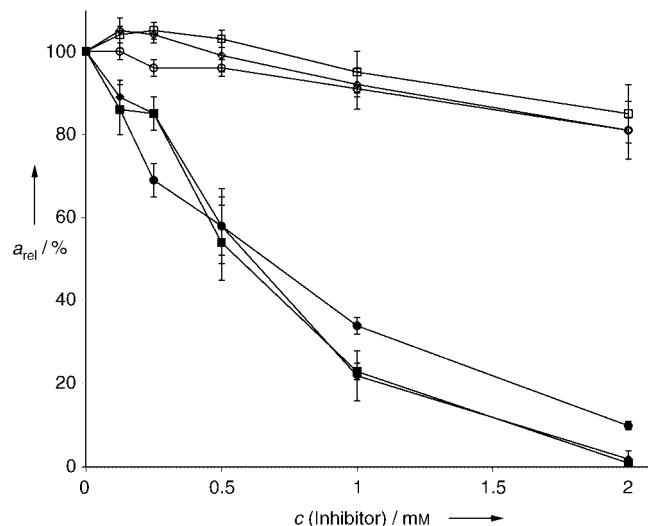


Abbildung 2. Inhibition der UDP-GlcNAc-2-Epimerase durch die Verbindungen **2–4**: \blacklozenge : **2**, \diamond : **2** + UDP, \blacksquare : **3**, \square : **3** + UDP, \bullet : **4**, \circ : **4** + UDP. Das Enzym wurde mit den Inhibitoren 20 min bei 37°C in Abwesenheit oder Gegenwart von 0.1 mM UDP vorinkubiert und anschließend auf seine Aktivität getestet. Die angegebenen Konzentrationen beziehen sich auf das Volumen beim Aktivitätstest. Die gezeigten Werte sind die Mittelwerte (\pm Standardabweichung) aus drei unabhängigen Experimenten. $a_{\text{rel}} =$ relative UDP-GlcNAc-2-Epimerase-Aktivität.

raseaktivität konzentrationsabhängig. Eine 50-prozentige Inhibition wurde bei 0.5 mM beobachtet. **2** und **3** erreichten mit einer Konzentration von 2 mM im Vorinkubationsansatz eine nahezu vollständige Inhibition, bei **4** wurde noch eine Aktivität von etwa 10% gemessen. Durch UDP im Vorinkubationsansatz konnte die Inhibition bei allen Ansätzen fast vollständig unterdrückt werden. Wurden UDP oder UDP-GlcNAc erst nach der 20-minütigen Vorinkubation zugegeben, so hatten sie nahezu keine Auswirkung mehr auf die inhibitorische Wirkung von **2**, **3** und **4**. Dies deutet darauf hin, dass die Inhibitoren sehr fest an das Enzym gebunden werden, sobald sie das aktive Zentrum erreicht haben. Dies entspricht der Vorhersage, dass Übergangszustandsanaloga besser an das Enzym binden als die eigentlichen Substrate. Zwar lassen sich durch die hier beschriebenen Versuche keine exakten Bindungskonstanten für die Inhibitoren bestimmen, doch müssen sie deutlich unter den Bindungskonstanten von UDP und UDP-GlcNAc liegen, weil die nachträglich zugegebenen Substrate die Inhibitoren nicht mehr verdrängen können.^[22] Die K_m -Werte von UDP-GlcNAc und UDP liegen bei ca. 10 μM ,^[7] die K_i -Werte der Inhibitoren sollten also deutlich kleiner als dieser Wert sein.

Die spezifische Hemmwirkung der Inhibitoren wurde durch die fehlende Inhibitoreigenschaft der natürlichen Zucker ManNAc und GlcNAc, die in gleicher Weise wie die Inhibitoren auf die UDP-GlcNAc-2-Epimerase einwirken,

nachgewiesen. Die ManNAc-Kinase-Aktivität der bifunktionalen UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase wurde durch die Inhibitoren genausowenig beeinflusst wie dessen hexamere oligomere Struktur, die als Indikator für die Strukturintegrität fungiert.^[7] Bemerkenswert ist, dass das Ringstickstoffatom der Inhibitoren mit hydrophoben Resten versehen werden kann, ohne dass die Hemmwirkung beeinträchtigt wird. Dies kann für eine spätere Applikation in zellulären Systemen wichtig sein, da hydrophobe Substanzen bekanntlich leichter die Plasmamembran permeieren. Diese Inhibitoren, für die wir den Namen Nanastatine vorschlagen, sollten ein besseres Verständnis der Funktion von *N*-Acetylneuraminsäure-haltigen Konjugaten in physiologischen und pathologischen Prozessen ermöglichen.

Eingegangen am 27. Januar 2004,
veränderte Fassung am 19. Mai 2004 [Z53863]

Stichwörter: Biosynthese · Epimerasen · Inhibitoren ·
Kohlenhydrate · Sialinsäuren

-
- [1] T. Angata, A. Varki, *Chem. Rev.* **2002**, *102*, 439.
 - [2] S. Kelm, R. Schauer, *Int. Rev. Cytol.* **1997**, *175*, 137.
 - [3] M. J. Kiefel, M. von Itzstein, *Chem. Rev.* **2002**, *102*, 471.
 - [4] a) A. P. Corfield, R. Schauer in *Sialic Acids – Chemistry, Metabolism and Function* (Hrsg.: R. Schauer), Springer, Wien, **1982**, S. 195; b) A. Varki, *Glycobiology* **1993**, *3*, 97.
 - [5] R. Zeitler, A. Giannis, S. Danneschewski, E. Henk, T. Henk, C. Bauer, W. Reutter, K. Sandhoff, *Eur. J. Biochem.* **1992**, *204*, 1165.
 - [6] a) A. Blume, H. Chen, W. Reutter, R. R. Schmidt, S. Hinderlich, *FEBS Lett.* **2002**, *521*, 127; b) F. Stolz, M. Reiner, A. Blume, W. Reutter, R. R. Schmidt, *J. Org. Chem.* **2004**, *69*, 665.
 - [7] S. Hinderlich, R. Stäsche, R. Zeitler, W. Reutter, *J. Biol. Chem.* **1997**, *272*, 24313.
 - [8] R. Stäsche, S. Hinderlich, C. Weise, K. Effertz, L. Lucka, P. Moormann, W. Reutter, *J. Biol. Chem.* **1997**, *272*, 24319.
 - [9] S. Kornfeld, R. Kornfeld, E. F. Neufeld, P. J. O'Brien, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1964**, *61*, 371.
 - [10] R. Horstkorte, S. Nöhring, K. Danker, K. Effertz, W. Reutter, L. Lucka, *FEBS Lett.* **2000**, *470*, 315.
 - [11] O. T. Keppler, S. Hinderlich, J. Langner, R. Schwartz-Albiez, W. Reutter, M. Pawlita, *Science* **1999**, *284*, 1372.
 - [12] M. Schwarzkopf, K.-P. Knobeloch, E. Rohde, S. Hinderlich, N. Wiechens, L. Lucka, I. Horak, W. Reutter, R. Horstkorte, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2002**, *99*, 5267.
 - [13] W. K. Chou, S. Hinderlich, W. Reutter, M. E. Tanner, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 2455.
 - [14] P. M. Morgan, R. F. Sala, M. E. Tanner, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 10269.
 - [15] L. Pauling, *Chem. Eng. News* **1946**, *24*, 1375.
 - [16] R. Martin, A. Moyano, M. A. Pericas, A. Riera, *Org. Lett.* **2000**, *2*, 93.
 - [17] Y. Gao, J. M. Klunder, R. M. Hanson, H. Masamune, S. Y. Ko, K. B. Sharpless, *J. Am. Chem. Soc.* **1987**, *109*, 5765.
 - [18] K. B. Sharpless, W. Amberg, Y. L. Bennani, G. A. Crispino, J. Hartung, K. S. Jeong, H. L. Kwong, K. Morikawa, Z. M. Wang, D. Xu, X. L. Zhang, *J. Org. Chem.* **1992**, *57*, 2768.
 - [19] H. Böshagen, F. R. Heiker, A. M. Schüller, *Carbohydr. Res.* **1987**, *164*, 141.
 - [20] **2** war bereits früher chemoenzymatisch und ausgehend von geeignet funktionalisierten Kohlenhydraten synthetisiert sowie als Inhibitor unterschiedlicher Glycosidasen getestet worden, hatte sich allerdings als inaktiv erwiesen: a) G. W. Fleet, L. E. Fellows, P. W. Smith, *Tetrahedron* **1987**, *43*, 979; b) T. Kajimoto, K. K. C. Liu, R. L. Pederson, Z. Zhong, Y. Ichikawa, J. A. Porco, Jr., C. H. Wong, *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 6187.
 - [21] Rekombinante UDP-GlcNAc-2-Epimerase wurde aus Insekten-(Sf9)-Zellen wie beschrieben gereinigt (A. Blume, D. Ghaderi, V. Liebig, S. Hinderlich, P. Donner, W. Reutter, L. Lucka, *Protein Expression Purif.* **2004**, im Druck). Zur Herstellung UDP-freier Präparationen wurden die Proben auf eine PD-10-Säule (Amersham) gegeben und die Säule mit 10 mM NaH₂PO₄ (pH 7.5), 100 mM NaCl, 1 mM EDTA und 1 mM Dithiotreitol eluiert. UDP-GlcNAc-2-Epimerase-Assays enthielten 45 mM NaH₂PO₄ (pH 7.5), 10 mM MgCl₂, 1 mM UDP-GlcNAc, 0.2 mM NADH, 2 mM Phosphoenolpyruvat, 2 U Pyruvakinase, 2 U Lactatdehydrogenase, 5 µg gereinigte UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase und die angegebenen Inhibitorkonzentrationen (200 µL Gesamtvolumen). Der Ansatz wurde 20 min bei 37°C inkubiert, und die Reaktion wurde durch Zugabe von 800 µL 10 mM EDTA beendet. Anschließend wurde die Extinktion bei 340 nm bestimmt. Vorinkubationsansätze enthielten 5 µg gereinigte UDP-GlcNAc-2-Epimerase/ManNAc-Kinase und variable Inhibitorkonzentrationen (20 µL Gesamtvolumen). Der Ansatz wurde 20 min bei 37°C inkubiert, und die Enzymreaktion wurde durch die Zugabe der übrigen Komponenten in einem Gesamtvolume von 200 µL gestartet. Die im Text angegebenen Inhibitorkonzentrationen beziehen sich auf das Gesamtvolume.
 - [22] In diesem Zusammenhang wird die Verwendung chimärer Verbindungen aus den hier beschriebenen Iminozuckern und Teilen von UDP-GlcNAc interessant sein. Solche Verbindungen werden in unserem Labor zurzeit synthetisiert.