

Hochdurchsatz-Screening**Mit dem Bären auf den Fersen***Jean-Louis Reymond****Stichwörter:**

Biokatalyse · Hochdurchsatz-Screening · Kombinatorische Chemie · Selbstorganisation · Wirkstoff-Forschung

Chemie ist die Kunst, Materie umzuwandeln. Aus Blei Gold zu machen hat zwar nicht so recht funktioniert, dennoch haben Chemiker ihre Methoden zum Design, zur Selektierung und zur Synthese neuer Verbindungen mit außergewöhnlichen Eigenschaften, vor allem Wirkstoffen zur Behandlung von Krankheiten, bis zur Perfektion entwickelt. Ein entscheidender Aspekt bei der Wirkstoff-Findung ist die Selektion aktiver Verbindungen, denn es ist nicht möglich, die Natur und Stärke molekularer Wechselwirkungen zwischen einem Zielmolekül, etwa einem Enzym, und dem Wirkstoff selbst verlässlich vorherzusagen. Die Selektion aktiver Verbindungen stützt sich daher auf ein Hochdurchsatz-Screening, in dem ein Standardtest mit einer Verbindung mit bekannter Aktivität als Referenz für den Test ganzer Verbindungsserien zugrundegelegt wird.^[1]

Die Entwicklung des Hochdurchsatz-Screenings war eine Folge des Aufkommens der kombinatorischen Chemie, einer Technologie, die es erlaubt, innerhalb kurzer Zeit Millionen von Verbindungen – anstelle von vielleicht zehn oder wenig mehr – zu synthetisieren.^[2] Das Prinzip der kombinatorischen Synthese besteht darin, eine große Zahl von Verbindungen mithilfe nur weniger Reaktionen herzustellen, z.B. beim Split-and-Mix-Verfahren.^[3] Bei diesen Methoden wurden zum Teil auch Verbindungsgemische verarbeitet, was sich aber als wenig praktikabel erwiesen hat

und in der Folge weitgehend ausgeklammert wurde, sodass sich die moderne kombinatorische Chemie hauptsächlich mit der Entwicklung von parallelen und Festphasen-Synthesen für Einzelverbindungen beschäftigt.^[4]

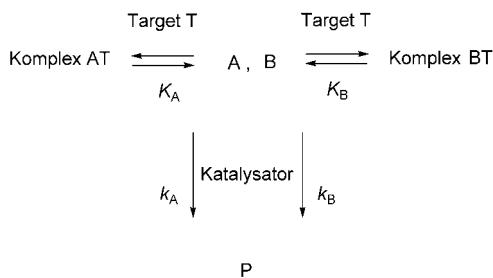
Die Idee, Verbindungsgemische zu verwenden, war damit allerdings nicht am Ende, sondern tauchte bald in einem ganz anderen Zusammenhang, nämlich in der supramolekularen Chemie, wieder auf. Nach einer Definition von Lehn und Whitesides ist es das Ziel der supramolekularen Chemie, komplexe Systeme durch die Selbstorganisation molekularer Bausteine über nichtkovalente Wechselwirkungen ohne Einwirkung von außen aufzubauen.^[5] Die nichtkovalente Selbstorganisation aus Mischungen von Bausteinen ist eine Grundvoraussetzung zur Herstellung komplexer Supramoleküle, die durch schrittweise Synthese nicht zugänglich sind. Das Konzept erwies sich darüber hinaus als geeignet, kovalent gebundene Substanzen zu äquilibrieren,^[6] und wurde in der Wirkstoff-Findung wieder aufgegriffen, als erkannt wurde, dass in äquilibrierten Mischungen von Bausteinen niedermolekularer Inhibitoren wie Peptide^[7] und Imine^[8] in Gegenwart eines Zielproteins der am besten bindende Inhibitor angereichert wird. Dieser Typ äquilibrierender Mischungen wurde dynamische kombinatorische Bibliothek (DCL) genannt.^[9]

Die Dynamik einer DCL kommt während der Gleichgewichtseinstellung in Gegenwart des Zielliganden zum Tragen. Dieser dynamische Zustand ist jedoch kurzlebig und geht unausweichlich in den statischen Zustand eines thermodynamischen Gleichgewichts über. Dies ist insofern problematisch, als es im Gleichgewicht fast unmöglich

ist, zwischen ähnlichen Verbindungen zu unterscheiden. Ein kleines Übergewicht einer Bibliothekskomponente gegenüber einer anderen, bezüglich der Bindungsstärke zur Zielverbindung, führt nur zu einem proportional kleinen Überschuss ihrer Konzentration. Daher lassen sich mit DCL die besten Verbindungen einer Bibliothek nur dann aufspüren, wenn ihre Bindungseigenschaften denen der übrigen Komponenten weit überlegen sind.^[10] Mit mathematischen Modellen ließ sich kürzlich zeigen, dass eine einzelne Verbindung einer DCL die Zielstruktur um drei bis vier Zehnerpotenzen besser binden muss, um einen nennenswerten Anteil (mehrere Prozent) der DCL im Gleichgewicht auszumachen.^[11] Eine ähnliche Situation stellt sich bei Target-beschleunigten Synthesen ein.^[12]

Vor kurzem fanden Kazlauskas, Gleason und Mitarbeiter^[13] eine Lösung zu diesem Problem der Selektion aus Gemischen, wobei sie von einem anderen Gebiet der Chemie, der Biokatalyse, ausgegangen waren. Bei der Biokatalyse verwendet man Enzyme für die organische Synthese, besonders wegen ihrer Eigenschaften als umweltfreundliche und hochselektive Katalysatoren.^[14] Die am weitesten verbreitete biokatalytische Reaktion ist die kinetische Racematspaltung; dabei wandelt ein Enzym bevorzugt eines der Enantiomere (z.B. A) aus einem racemischen Substrat (A,B) in ein neues Produkt P um, während das andere, B, nicht umgesetzt wird (Schema 1). Die mathematische Behandlung der kinetischen Racematspaltung nach Kagan und Fiaud^[15] deckt eine überraschende Eigenschaft auf: Sogar, wenn das Enzym nicht vollständig selektiv für eines der Enantiomere ist, bleibt nach der Reaktion das nicht-

[*] Prof. J.-L. Reymond
Department für Chemie und Biochemie
Universität Bern
Freiestrasse 3, 3012 Bern (Schweiz)
Fax: (+41) 31-631-8057
E-mail: reymond@ioc.unibe.ch



Schema 1. Prinzip der kinetischen Racematspaltung. Die Anreicherung von A gegenüber B wird entweder durch den Katalysator bewirkt ($k_A < k_B$, keine Zielstruktur) oder durch differenzierende Bindung an eine Zielstruktur T ($K_A < K_B$, nichtselektiver Katalysator, $k_A = k_B$).

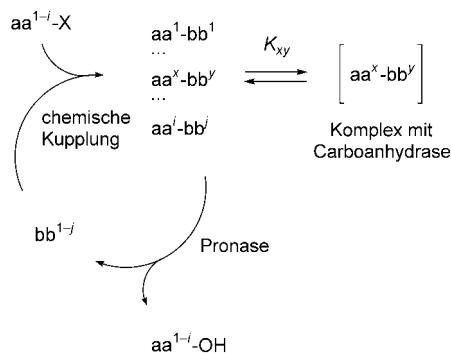
umgesetzte Enantiomer in einer höheren optischen Reinheit zurück, als aufgrund der intrinsischen Selektivität des Enzyms zu erwarten wäre (d.h. $R (= A/B) \gg S (= k_B/k_A)$ oder $= K_B/K_A$; Abbildung 1). Dieser höhere Reinheitsgrad hat seinen Preis, denn die Ausbeute an reinem, nichtumgesetztem Substrat liegt niedriger als das theoretische Maximum von 50%.

Kazlauskas, Gleason et al.^[13] erkannten, dass dieselbe Gleichung gilt, wenn man mit einem nichtselektiven Enzym ein Verbindungsgemisch in Gegenwart eines Überschusses von Zielprotein abbaut. Diese kinetisch kontrollierte Reaktionsführung sollte dazu führen, dass sich ein größeres Verteilungs-

verhältnis einstellt, als aufgrund der relativen Bindungskonstanten für die Bindung an das Zielprotein zu erwarten wäre. Das Konzept wurde an einer Mischung von Dipeptiden, die um die Bindung an Carboanhydrase als Zielprotein konkurrieren, überprüft. Als unselektives Enzym zum Abbau der schwächer bindenden Liganden diente die Protease Pronase (Schema 2). Ähnlich wie bei der kinetischen Racematspaltung musste die Selektionierung mit der Zerstörung der meisten Verbindungen bezahlt werden, darunter auch eines Teils der gut bindenden Liganden.

Die gleichen Autoren haben aufbauend auf diesem Konzept eine selbstselektierende DCL-Anordnung eingeführt, die ausschließlich die am besten bindenden Komponenten der DCL anreichert und die übrigen Verbindungen nur in Spuren behält.^[16] Die Aminotermini der Dipeptide, die durch die Wirkung der zur Zerstörung ungebundener Inhibitoren eingesetzten Pronase freigesetzt werden, kuppeln wiederkehrend an aktive Ester, wodurch sich die Dipeptid-Bibliothek aus ihren Komponenten ständig regeneriert; auf diese Weise entsteht eine pseudo-DCL (Schema 3).

In dem pseudo-DCL-Experiment wird die Selektion durch Bindung an die Zielverbindung in Konkurrenz zum



Schema 3. Pseudodynamische kombinatorische Bibliothek von Dipeptiden.^[16] Die Aminotermini bb^{1-j} des hydrolysierten Dipeptids werden durch zeitlich festgelegte Zugabe mit aktivierte Estern ($aa^{1-i}-X$) gekuppelt. Die Ester sind an eine feste Phase gebunden, und die Pronase ist vom Zielprotein Carboanhydrase durch eine Dialysemembran getrennt. In diesem Experiment gibt es vier aktivierte Carbonsäureester $aa-X$ ($i=4$) und zwei Aminosäuren bb ($j=2$), die acht mögliche Dipeptide aa^x-bb^y bilden.

Abbau der Verbindungen durch Pronase in mehreren Zyklen wiederholt; dadurch kann auch eine kleine Präferenz bei der Bindung an das Zielprotein in einer starken Anreicherung des besser bindenden Dipeptids resultieren. Ebenso wie zwei glücklose Jäger, die versuchen, einem wütenden Bären davonzu laufen, kann keine der Verbindungen der pseudo-DCL der Pronase entkommen. Ein kleiner Affinitätsvorsprung

vor den übrigen Verbindungen der Bibliothek reicht allerdings aus, damit der bessere Inhibitor „überlebt“ und die schwächeren Inhibitoren „gefressen“ werden. Nach sieben Zyklen mit wiederkehrenden Kupplungen in 16-Stunden-Intervallen blieb nur ein einziger Inhibitor in einem Überschuss von 100:1 zurück, und dass, obwohl er in Bezug auf die Bindung von Carboanhydrase nur 2.3-mal wirksamer war als die nächstbessere Komponente der Bibliothek. Das Experiment war insofern glücklich gewählt, als die C-terminale Aminosäure des Dipeptids nicht mit Carboanhydrase wechselwirkt und sich daher ohne Probleme im System anreichern kann.

Die pseudo-DCL enthält Elemente, die an ein lebendiges System erinnern. Zu nennen wären der molekulare „Tod“ von Verbindungen

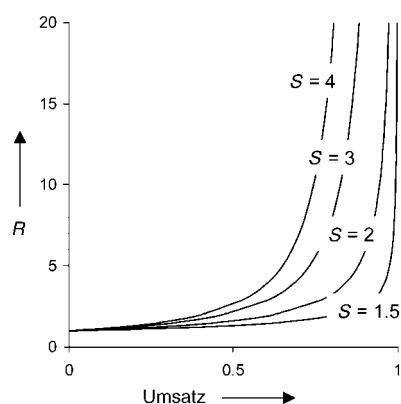
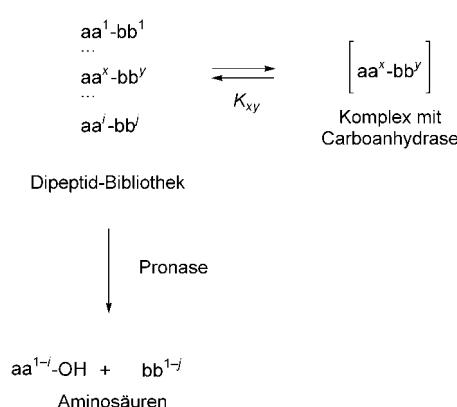


Abbildung 1. Verhältnis der verbleibenden Substrate, $R = A/B$, als Funktion des Gesamtumsatzes und der Selektivität, $S = k_B/k_A$ (selektives Enzym) oder $S = K_B/K_A$ (Bindung an ein Zielprotein). Auftragung gegen den Umsatz des Substrates A,B zum Produkt P; $S = \ln[(1-c)(1-ee)]/\ln[(1-c)(1+ee)] = \ln[(1-c)(2/(R+1))]/\ln[(1-c)(2R/(R+1))]$; Enantiomerenüberschuss ee = (A-B)/(A+B). Bei hohen Umsätzen ist R viel größer als S.



Schema 2. Kinetische Spaltung einer Dipeptid-Bibliothek mithilfe von Pronase.^[13] Die Protease Pronase ist vom Zielprotein Carboanhydrase durch eine Dialysemembran getrennt. K_{xy} ist die Dissoziationskonstante des Carboanhydrase-Dipeptid-Komplexes aa^x-bb^y . Die besten Liganden der Carboanhydrase unter den Dipeptiden „entkommen“ der Hydrolyse durch Pronase.

durch Hydrolyse durch Pronase, die molekulare „Geburt“ durch Resynthese und die Existenz einer Energiequelle in Form der aktivierte Ester, die für die Neukupplung verwendet werden. Die Einspeisung von Energie hält das System vom thermodynamischen Gleichgewicht fern, was eine essenzielle Voraussetzung für lebende Systeme ist. Im Vergleich zu früheren DCLs besteht der entscheidende Unterschied darin, dass die Resynthese-Zyklen so gesteuert werden können, dass das System periodisch zu hohen Umsätzen getrieben wird, bei denen die besten Liganden auch am besten selektiert werden (Abbildung 1). Da dieser Eingriff des Experimentators zur zeitlichen Steuerung schwierig zu ersetzen ist, erscheint die Entwicklung eines völlig autonomen Systems allerdings kompliziert.

- [1] W. P. Walters, M. Namchuk, *Nat. Rev. Drug Discovery* **2003**, 2, 259–266.
- [2] *Combinatorial Chemistry: Synthesis and Application* (Hrsg.: S. R. Wilson, A. W. Czarnik), Wiley, Weinheim, 1997.

- [3] a) A. Furka, F. Sebestyen, M. Asgedom, G. Dibo, *Int. J. Pept. Protein Res.* **1991**, 37, 487–493; b) K. S. Lam, S. E. Salmon, E. M. Hersh, V. J. Hruby, W. M. Kazmierski, R. J. Knapp, *Nature* **1991**, 354, 82–84; c) R. A. Houghten, C. Pinilla, S. E. Blondelle, J. R. Appel, C. T. Doolley, J. H. Cuervo, *Nature* **1991**, 354, 84–86.
- [4] A. T. Merritt, S. W. Gerritz, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2003**, 7, 305–307.
- [5] a) J.-M. Lehn, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2002**, 99, 4763–4768; b) G. M. Whitesides, M. Boncheva, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2002**, 99, 4769–4774.
- [6] P. A. Brady, R. P. Bonar-Law, S. J. Rowan, C. J. Suckling, J. K. M. Sanders, *Chem. Commun.* **1996**, 319.
- [7] P. G. Swann, R. A. Casanova, A. Desai, M. M. Frauenhoff, M. Urbancic, U. Slomczynska, A. J. Hopfinger, G. C. LeBreton, D. L. Venton, *Biopolymers* **1996**, 40, 617–625.
- [8] I. Huc, J.-M. Lehn, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1997**, 94, 2106–2110.
- [9] O. Ramström, T. Bunyapaioboonsri, S. Lohmann, J.-M. Lehn, *Biochim. Biophys. Acta* **2002**, 1572, 178–186.
- [10] A. V. Eliseev, M. I. Nelen, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, 119, 1147–1148.
- [11] a) Z. Grote, R. Scopelliti, K. Severin, *Angew. Chem.* **2003**, 115, 3951–3955; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, 42, 3821–3825; b) P. T. Corbett, S. Otto, J. K. M. Sanders, *Org. Lett.* **2004**, 6, 1825–1827; c) P. T. Corbett, S. Otto, J. K. M. Sanders, *Chem. Eur. J.* **2004**, 10, 3139–3143.
- [12] a) K. C. Nicolaou, R. Hughes, S. Y. Cho, N. Winssinger, C. Smethurst, H. Labischinski, R. Endermann, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000**, 39, 3823–3828; b) R. Nguyen, I. Huc, *Angew. Chem.* **2001**, 113, 1824–1826; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, 40, 1774–1776; c) W. G. Lewis, L. G. Green, F. Grynszpan, Z. Radic, P. R. Carlier, P. Taylor, M. G. Finn, K. B. Sharpless, *Angew. Chem.* **2002**, 114, 1095–1099; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, 41, 1053–1057.
- [13] J. D. Cheeseman, A. D. Corbett, R. Shu, J. Croteau, J. L. Gleason, R. J. Kazlauskas, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, 124, 5692–5701.
- [14] A. S. Bommarius, B. R. Riebel, *Biocatalysis*, Wiley-VCH, Weinheim, 2004.
- [15] H. B. Kagan, J. C. Fiaud in *Topics in Stereochemistry*, Bd. 18, Wiley, New York, **1988**, S. 249.
- [16] A. D. Corbett, J. D. Cheeseman, R. J. Kazlauskas, J. L. Gleason, *Angew. Chem.* **2004**, 116, 2486–2490; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, 43, 2432–2436.