

## Die Sialyl-Lewis-X-Gruppe und ihre Analoga als Liganden für Selektine: chemoenzymatische Synthesen und biologische Funktionen

Athanassios Giannis\*

Leukozyten sind zelluläre Bestandteile des Blutes, die bei der Immunüberwachung eine entscheidende Rolle spielen. Die Neutrophilen beispielsweise sorgen für die schnelle und unspezifische Immunabwehr, während B- und T-Lymphozyten für die spezifische Immunabwehr zuständig sind. Zur Ausübung dieser Funktionen verlassen die Leukozyten die Blutgefäße und gelangen in den Entzündungsherd und in die sekundären lymphatischen Organe. Austrittsort ist das Endothel der postkapillären Venolen im Bereich der Zielgewebe.

Der komplexe und mehrstufige Vorgang der Leukozytenauswanderung findet sowohl während eines normalen chronischen Entzündungsprozesses als auch bei einer akuten Entzündung statt. Er setzt eine spezifische und genau kontrollierte gegenseitige Erkennung von Leukozyten und Endothelzellen voraus. Dies wird durch die Wechselwirkung membranständiger Adhäsionsrezeptoren mit ihren entsprechenden, ebenfalls membranständigen Liganden gewährleistet. Dabei handelt es sich um folgende Adhäsionsrezeptoren<sup>[1]</sup>: a) Selektine, b) Integrine und c) Mitglieder der Immunglobulin-Superfamilie.

Die Selektinfamilie umfaßt drei Mitglieder, die allesamt Glycoproteine sind und die Initialphase der Leukozytenadhäsion wesentlich bestimmen (Abb. 1): L-, E- und P-Selektin. Das L-Selektin wird konstitutiv auf Leukozyten exprimiert. Es ist sowohl bei der Rezirkulation von Lymphozyten in die peripheren Lymphknoten als auch bei der Rekrutierung von Leukozyten an Entzündungsherden beteiligt. Das E-Selektin wird auf Endothelzellen exprimiert, und zwar einige Studien nach Stimulation dieser Zellen durch Interleukin 1 oder den Tumornekrosefaktor  $\alpha$ . Das P-Selektin wird in intrazellulären Speichern von Blutplättchen und Endothelzellen aufbewahrt. Durch Thrombin, Histamin, Substanz P, Peroxidradikale oder Komplementsfaktoren wird es innerhalb von Minuten aus diesen Speichern mobilisiert und auf die Zelloberfläche transportiert. Die genaue Struktur des membranständigen Kohlenhydratliganden für das L-Selektin ist bisher nicht bekannt. Man weiß jedoch, daß auf dem postkapillären Endothel der hochendothelialen Venolen (HEV) der peripheren Lymphknoten lokalisiert ist. Nach bisher vorliegenden Daten handelt es sich um ein sialinsäurehaltiges, sulfatiertes und möglicherweise auch fucosyierte Oligosaccharid<sup>[2]</sup>.

Die Sialyl-Lewis-X (SLe<sup>X</sup>)-Gruppe (I in Abb. 2 ohne R) dient als ein gemeinsamer Ligand für alle drei Selektine und ist eine Teilstuktur von Glycosphingolipiden und Glycoproteinen, die unter anderem auch auf der Leukozytenmembran lokalisiert sind. Die Bedeutung dieser Oligosaccharidgruppe für die Leukozytenadhäsion wurde kürzlich an einer Erbkrankheit, der Leukozytenadhäsionsdefizienz Typ 2, eindeutig belegt<sup>[3]</sup>: Wege einer (noch nicht in allen Details geklärten) Störung der SLe<sup>X</sup>-Biosynthese sind die Neutrophilen nicht in der Lage, an

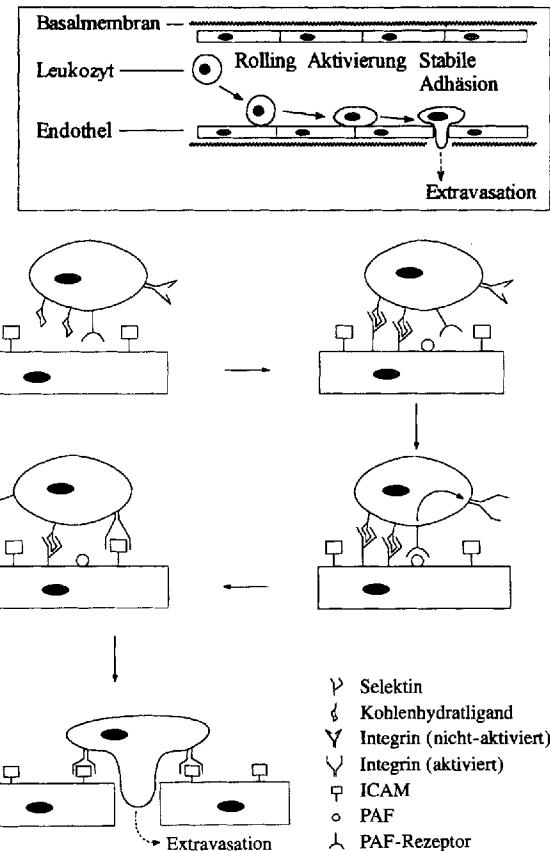


Abb. 1. Wechselwirkung zwischen Leukozyten und Endothelzellen der Blutgefäße. Oben: Überblick; unten: Einzelschritte mit Erläuterung der Symbole; modifiziert nach [1 e]. Die Stimulation von Endothelzellen durch Entzündungsmediatoren führt zur Expression von Selektinen und dem Thrombozyten-Aktivierungsfaktor PAF (platelet activating factor). Die Auswanderung der Leukozyten aus den postkapillären Venolen beginnt mit einer lockeren Anheftung, d. h. niedrig-affine Bindung, der Leukozyten an die Endothelzellen. Dabei verlangsamt sich die Leukozytengeschwindigkeit (Rolling). Dieses Anheften wird durch die Selektine vermittelt. In der zweiten Phase kommt es zu einer PAF-vermittelten Aktivierung der Leukozyten-Integrine, die dann in der dritten Phase eine hoch-affine Bindung mit ihrem auf den Endothelzellen lokalisierten Liganden ICAM (intercellular cell adhesion molecule) aus der Immunglobulin-Superfamilie eingehen. Dies hat eine stabile Adhäsion der Leukozyten an das Endothel und schließlich die Auswanderung aus dem Blutgefäß (Extravasation) zur Folge.

stimuliertem Endothel zu adhärieren und somit in einen Entzündungsherd einzuwandern. Die Patienten leiden unter immer wiederkehrenden, schweren bakteriellen Infektionen. Daneben gibt es aber auch eine Reihe von akuten wie chronischen Krankheiten, deren Verlauf durch eine übermäßige Ansammlung von Leukozyten im Bereich der Infektion bzw. des pathologischen Prozesses negativ beeinflußt wird. Als Beispiele seien aufgeführt: kardiogener Schock, Schlaganfall, Thrombosen, Rheuma, Psoriasis, Dermatitis, Atemnotsyndrom des Erwachsenen, bakterielle Meningitis und Encephalitis. Darüber hinaus scheint die Metastasierfähigkeit einiger Tumorzellen mit der Expression der SLe<sup>X</sup>- und anderer eng verwandter Oligosaccharidgruppen auf ihrer Membranoberfläche und deren Wechselwir-

\* Priv.-Doz. Dr. A. Giannis

Institut für Organische Chemie und Biochemie der Universität  
Gerhard-Domagk-Straße 1, D-53121 Bonn  
Telefax: Int. + 228/73 7778

kung mit Endothelselektinen zusammenzuhängen. Aufgrund dieser Tatsachen herrscht derzeit ein großes Interesse an der Entwicklung von Adhäsionsblockern, um sie als neuartige Antiphlogistika, Antithrombotika, Immunsuppressiva sowie als Mittel zur Verhinderung von Metastasen therapeutisch einzusetzen.

Ein Ansatz mit momentan hoher Priorität ist die Synthese der SLe<sup>X</sup>-Gruppe und ihrer Analoga, die als alternative Selektinliganden die eigentliche Wechselwirkung zwischen Endothel und Leukozyten unterbinden können. Die Erwartungen an die Oligosaccharidsynthese sind Effizienz, hohe Regio- und Stereoselektivität sowie Durchführbarkeit in größerem Maßstab. Im Hinblick auf die potentielle Verwendung der Verbindungen als Pharmaka sollte die Synthese auch wirtschaftliche und ökologische Aspekte berücksichtigen (z.B. Vermeidung von Schwermetallverbindungen). Der Lösung dieser Probleme scheinen nun die Arbeitsgruppen von J. C. Paulson und C.-H. Wong durch die Ausarbeitung einer ausgeklügelten (nicht wenig komplizierten) enzymkatalysierten SLe<sup>X</sup>-Synthese<sup>[4]</sup> ein großes Stück näher gekommen zu sein (Abb. 2). Sie nutzen dabei die in der SLe<sup>X</sup>-Bio-

synthese involvierten Glycosyltransferasen. Die Schwierigkeiten, die es zu Beginn des Vorhabens zu überwinden galt, waren folgende:

a) Es standen weder die Neu5Ac-Transferase (Neu5AcT) noch die Fuc-Transferase (FucT), sondern nur die Galactosyl-Transferase zur Verfügung;

b) die notwendigen Glycosyldonoren (Zuckernucleotide) sind zu teuer, um sie in stöchiometrischen Mengen bei größeren Ansätzen einsetzen zu können, und

c) die Glycosyl-Transferasen werden durch die gebildeten End- und/oder Zwischenprodukte inhibiert.

Das erste Hindernis wurde durch die Klonierung und nachfolgende Expression der Gene für die Neu5Ac- und die Fuc-Transferase<sup>[5]</sup> in Sf-9- bzw. COS-1-Zellen überwunden. Auf diese Weise konnten die beiden Transferasen in größeren Mengen gewonnen werden. Durch eine neuartige in-situ-Cofaktor-Regenerierung konnten sowohl die Zuckernucleotide (UDP-Gal, CMP-Neu5Ac, GDP-Fuc) leicht hergestellt als auch die Enzyminhibierung durch die gebildeten Produkte weitgehend unterdrückt werden. Zur Erleichterung der Isolierung wurde die SLe<sup>X</sup>-Gruppe als *O*-Allylglycosid **1**, R = CH<sub>2</sub>CH=CH<sub>2</sub>, synthetisiert. In der Originalpublikation wurde dieses Oligosaccharid in mg-Mengen hergestellt, doch scheint inzwischen seine Synthese auch im g-Maßstab gelungen zu sein<sup>[6]</sup>.

Für NMR-spektroskopische Studien wurden auch <sup>13</sup>C-markierte SLe<sup>X</sup>-Derivate hergestellt. Bei diesen Untersuchungen stellte sich heraus, daß die SLe<sup>X</sup>-Gruppe in der energieärmeren Konformation gefaltet ist, wobei der L-Fucose-Rest oberhalb der D-Gal-Einheit platziert ist. Das Tetrasaccharid scheint somit somit eine wohldefinierte hydrophile Oberfläche entlang der Neu5Ac-Gal-Fuc-Gruppierung zu bilden, während unterhalb der Neu5Ac-Gal-GlcNAc-Einheit ein hydrophober Bereich existiert.

Die Tatsache, daß die Transferasen bezüglich der Glycosyl-acceptoren eine gewisse Flexibilität aufweisen, ermöglichte die Synthese einer Reihe von SLe<sup>X</sup>-Analoga (Abb. 3) wie des Glu-

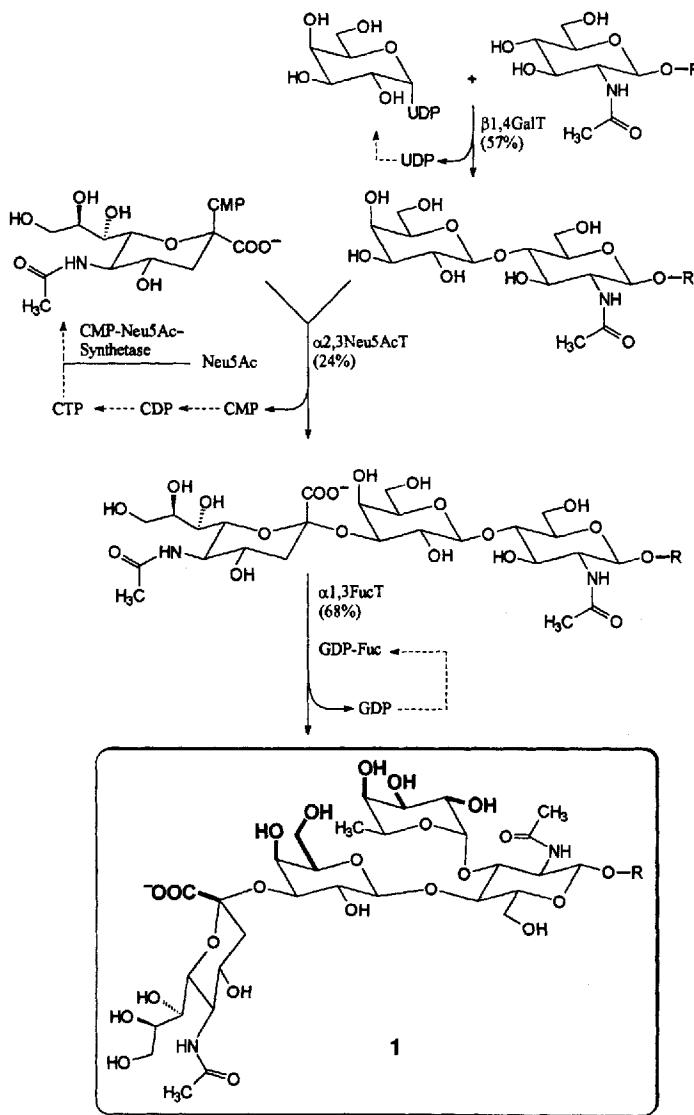


Abb. 2. Chemoenzymatische SLe<sup>X</sup>-Synthese nach Paulson, Wong et al.  
R = CH<sub>2</sub>-CH=CH<sub>2</sub>.

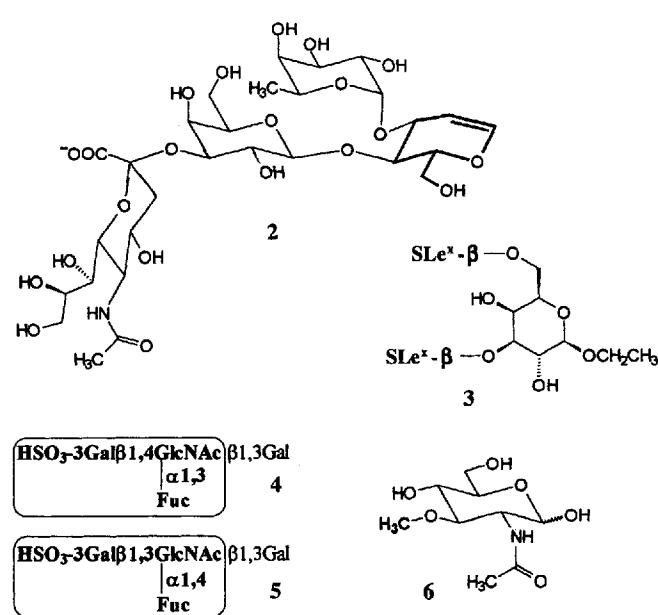


Abb. 3. Strukturen der Selektinliganden **2–5** und von *N*-Acetyl-3-*O*-methyl-d-glucosamin **6**, einem potenten Inhibitor der *N*-Acetylneuraminsäure-Biosynthese.

calderivats **2**<sup>[17]</sup> und des Di-SLe<sup>X</sup>-Derivats **3**, die zur Untersuchung von Struktur-Wirkungs-Beziehungen herangezogen wurden<sup>[8]</sup>. Dabei stellte sich heraus, daß die Affinität von **2** gegenüber dem E-Selektin ähnlich der der SLe<sup>X</sup>-Gruppe ist, während **3** sich als ein fünfmal besserer Ligand erwies. Basierend auf diesen Studien und unter Berücksichtigung der Tatsache, daß die aus biologischem Material isolierten Sulfatide **4** und **5** eine hohe Affinität zum E-Selektin zeigen<sup>[9]</sup>, postulierten Gaeta und Wong für die E-Selektin-SLe<sup>X</sup>-Wechselwirkung folgendes Modell<sup>[8]</sup>:

- a) Die Wechselwirkung ist multivalent<sup>[10]</sup>;
- b) die für die Erkennung der SLe<sup>X</sup>-Einheit durch das E-Selektin essentiellen Strukturelemente sind: die Carboxyfunktion als einziges Strukturelement seitens der *N*-Acetylneuraminsäure, Teile des Galactoserests (möglicherweise sogar nur die 4- und 6-Hydroxyfunktionen<sup>[11]</sup>) sowie die drei Hydroxygruppen des Fucoserests; die CH<sub>3</sub>-Gruppe dieses L-Zuckers scheint entbehrlich zu sein;
- c) die bioaktive, d. h. nach der Bindung an E-Selektin vorliegende Oligosaccharidkonformation ist identisch mit der NMR-spektroskopisch ermittelten energieärmeren Konformation in wäßriger Lösung.

Ein direkter Beweis für letztere Hypothese steht allerdings noch aus, zumal keine Untersuchungen über die Struktur des E-Selektin-SLe<sup>X</sup>-Komplexes bekannt sind. Die aufgestellten Struktur-Wirkungs-Beziehungen stimmen mit denen, die von Tyrell et al.<sup>[11]</sup> gefunden wurden, weitgehend überein. Die Pharmakophore sind in der Formel von SLe<sup>X</sup>-R **1** (Abb. 2) hervorgehoben.

Die Eignung von **1**, R = H, als antiinflammatorisches Mittel wurde nun von Mulligan et al.<sup>[12]</sup> in Tierversuchen eindeutig bewiesen. Infundiert man Ratten ein aus Kobra isoliertes Schlangengift (Cobra Venom Factor, CVF), so kommt es zu einer P-Selektin-induzierten Adhäsion von Neutrophilen an das Endothel der Blutgefäße der Lungen, gefolgt von einem massiven Austritt und der Akkumulation von Neutrophilen im Lungengewebe. Die gleichzeitige Erhöhung der Permeabilität der Gefäße führt zu einem Lungenödem und zu Blutungen in den Lungenbläschen. Daraus resultiert eine schwere Schädigung der Lungen. Diese Schädigung wird drastisch reduziert, wenn man den Tieren **1**, R = H, intravenös verabreicht! Der Effekt ist dosisabhängig und in Relation zur CVF-Infusion auch zeitabhängig. So führt eine Dosis von 200 µg **1**, R = H, kurz vor der Applikation des Schlangengifts verabreicht, zu einer ca. 50proz. Reduktion der Lungenblutung und der Ansammlung von Neutrophilen im Lungengewebe im Vergleich zu den unbehandelten Tieren. Gibt man dieselbe Dosis nach der Applikation des Schlangengifts, so ist der therapeutische Effekt weniger ausgeprägt. Andere, nichtfucosyierte Oligosaccharide wie Neu5Aca2,3Galβ1,4GlcNAc erwiesen sich als inaktiv. Überraschend bei diesen Versuchen ist die niedrige Dosis, die für die protektive Wirkung ausreicht: Die durch eine einmalige Gabe von 200 µg **1**, R = H, erreichbare Konzentration im Blut ist kleiner als 1 µmol L<sup>-1</sup>! Diese Lungen schädigung bei Ratten entspricht beim Menschen dem Atemnotsyndrom des Erwachsenen, das bisher schwer behandelbar ist, eine hohe Sterblichkeitsrate (60%) aufweist und sich z.B. in den USA jährlich bei ca. 150 000 Menschen entwickelt<sup>[13]</sup>.

Vor diesem Hintergrund scheint die Hoffnung, daß sich SLe<sup>X</sup>-haltige Oligosaccharide und ihre Analoga als neuartige entzündungshemmende Mittel etablieren können, als berechtigt. Dabei muß man allerdings bedenken, daß noch viele Aspekte der Selektin-Leukozyten-Wechselwirkung nicht geklärt sind<sup>[14]</sup> und daß die Selektine zum Teil auf die gleichen Liganden ansprechen und außerdem eine Vielzahl von Verbindungen als Liganden akzeptieren. Beispielsweise sind die Sulfatide **4** und **5** (Abb. 3) nicht nur potente E-Selektin-Liganden, sondern haben auch eine hohe Affinität für das L-Selektin<sup>[9b]</sup>. Die Entdeckung der Sulfooligosaccharide **4** und **5**<sup>[14]</sup> als Selektinliganden weist im übrigen auf die Möglichkeit hin, die SLe<sup>X</sup>-Gruppe durch einfachere und synthetisch leichter zugängliche Analoga zu ersetzen. Ein Fernziel ist, die SLe<sup>X</sup>-Gruppe durch Mimetica zu ersetzen, die oral wirksam sind, eine bessere Pharmakokinetik aufweisen und metabolisch stabiler sind.

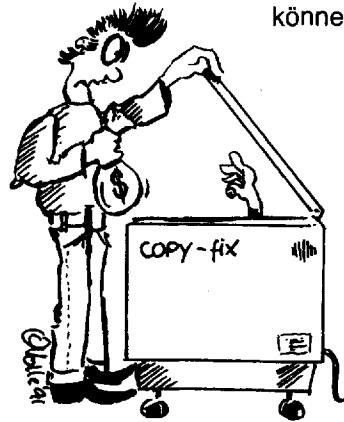
Wichtig für die Entwicklung solcher Kohlenhydratmimetica ist, die biologisch aktive, d. h. die nach der Bindung an Selektin vorliegende Konformation des Kohlenhydratliganden herauszufinden und anschließend die für die Erkennung essentiellen Gruppen an ein geeignetes Gerüst anzubringen. Dabei könnten die Methoden, die sich bei der Entwicklung von Peptidmimetica<sup>[15]</sup> etabliert haben, auch zum Design von Kohlenhydratmimetica herangezogen werden. Daß letztere nicht unbedingt eine Kohlenhydratstruktur haben müssen, konnte kürzlich belegt werden: Durch Screening wurden kleine Peptide gefunden, die als Monosaccharidmimetica die Wechselwirkung des Lektins Concanavalin A mit seinen Kohlenhydratliganden blockieren können<sup>[16]</sup>. Schließlich, da die Verhinderung der SLe<sup>X</sup>-induzierten Leukozytenadhäsion prinzipiell auch durch Hemmung der an der Biosynthese dieser Oligosaccharidgruppe beteiligten Enzyme erreicht werden kann, beobachtet man zur Zeit intensive Versuche zur Synthese solcher Inhibitoren<sup>[17]</sup>. Darüber hinaus steht seit kurzem ein Inhibitor der Neu5Ac-Biosynthese zur Verfügung: Das einfache D-Glucosaminidervat **6** (Abb. 3) ist ein spezifischer und potenter Inhibitor sowohl der GlcNAc-Kinase als auch der ManNAc-Kinase ( $K_i = 17$  bzw. 80 µM) und hemmt somit die Neu5Ac-Biosynthese<sup>[18]</sup>.

Diese Entwicklungen zeigen eindeutig, daß „knowledge of carbohydrate synthesis, structure and function can serve the medicinal chemist well in the design of new drug candidates“<sup>[19]</sup>.

- [1] Ausgezeichnete Übersichten: a) L. A. Lasky, *Science* **1992**, 258, 964; b) T. A. Springer, L. A. Lasky, *Nature* **1991**, 349, 196; c) T. A. Springer, *ibid.* **1990**, 346, 425; d) E. C. Butcher, *Cell* **1991**, 67, 1033; e) R. O. Hynes, A. D. Lander, *ibid.* **1992**, 68, 303; f) L. Stoolman in *Cell Surface Carbohydrates and Cell Development* (Hrsg.: M. Fukuda), CRC, Boca Raton, FL, USA, **1992**, S. 71.
- [2] Y. Imai, L. A. Lasky, S. D. Rosen, *Nature* **1993**, 361, 555.
- [3] A. Etzioni, M. Frydman, S. Pollack, I. Avidor, M. L. Phillips, J. C. Paulson, R. Gershoni-Baruch, *N. Engl. J. Med.* **1992**, 327, 1789.
- [4] Y. Ichikawa, Y.-C. Lin, D. P. Dumas, G.-J. Shen, E. Garcia-Junceda, M. A. Williams, R. Bayer, C. Ketcham, L. E. Walker, J. C. Paulson, C.-H. Wong, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, 114, 9283.
- [5] B. W. Weston, R. P. Nair, R. D. Larsen, J. B. Lowe, *J. Biol. Chem.* **1992**, 267, 4152.
- [6] S. Bormann, *Chem. Eng. News* **1992**, 70 (49), 25.
- [7] 2 wurde auch auf chemischem Wege synthetisiert und anschließend in SLe<sup>X</sup>-H 1, R = H, überführt: S. D. Danishefsky, K. Koseki, D. A. Griffith, J. Gervay, J. M. Peterson, F. McDonald, T. Oriyama, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, 114, 8331.
- [8] S. A. DeFrees, F. C. A. Gaeta, Y.-C. Lin, Y. Ichikawa, C.-H. Wong, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, 115, 7549.
- [9] a) C.-T. Yuen, A. M. Lawson, W. Chai, M. Larkin, M. S. Stoll, A. C. Stuart, F. X. Sullivan, T. J. Ahern, T. Feizi, *Biochemistry* **1992**, 31, 9126; b) P. J. Green,

- T. Tamatani, T. Watanabe, M. Miyasaka, A. Hasegawa, M. Kiso, C.-T. Yuen, M. S. Stoll, T. Feizi, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1992**, *188*, 244.
- [10] In diesem Zusammenhang sei auf die effiziente Synthese von N-Glycopeptid-Clustern mit Lewis<sup>X</sup>-Antigen-Seitenketten und deren Bindung an Trägerproteine hingewiesen: K. von dem Bruch, H. Kunz, *Angew. Chem.* **1994**, *106*, 87; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1994**, *33*, Nr. 1.
- [11] D. Tyrrell, P. James, N. Rao, C. Foxall, S. Abbas, F. Dasgupta, M. Nashed, A. Hasegawa, M. Kiso, D. Asa, J. Kidd, B. K. Brandley, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1991**, *88*, 10372.
- [12] M. S. Mulligan, J. C. Paulson, S. DeFrees, Z.-L. Zheng, J. B. Lowe, P. A. Ward, *Nature* **1993**, *364*, 149.
- [13] R. C. Bone, *N. Engl. J. Med.* **1993**, *328*, 431.
- [14] Die Sulfatide **4** und **5** wurden nun erstmals synthetisiert: K. C. Nicolaou, N. J. Bockovich, D. R. Carcanague, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 8843.
- [15] a) A. Giannis, T. Kolter, *Angew. Chem.* **1993**, *105*, 1303; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1993**, *32*, 1244; b) R. A. Wiley, D. H. Rich, *Med. Res. Rev.* **1993**, *13*, 327; c) R. Hirschman, *Angew. Chem.* **1991**, *103*, 1305; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1991**, *30*, 1278.
- [16] a) K. R. Oldenburg, D. Loganathan, I. J. Goldstein, P. G. Schultz, M. A. Gallop, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1992**, *89*, 5393; b) J. K. Scott, D. Loganathan, R. B. Easley, X. Gong, I. J. Goldstein, *ibid.* **1992**, *89*, 5398.
- [17] a) M. M. Palcic, L. D. Heerze, O. P. Srivastava, O. Hindsgaul, *J. Biol. Chem.* **1989**, *264*, 17174; b) S. Cai, M. R. Stroud, S. Hakomori, T. Toyokumi, *J. Org. Chem.* **1992**, *57*, 6693, zit. Lit.; c) C.-H. Wong, D. P. Dumas, Y. Ichikawa, K. Koseki, S. J. Danishefski, B. W. Weston, J. B. Lowe, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 7321.
- [18] R. Zeitler, A. Giannis, S. Danneschewski, E. Henk, T. Henk, C. Bauer, W. Reutter, K. Sandhoff, *Eur. J. Biochem.* **1992**, *204*, 1165.
- [19] J. H. Musser, *Annu. Rep. Med. Chem.* **1992**, *27*, 301.

## Nur Kopieren ist teurer...



... und zudem mühsamer! Diplomanden und Doktoranden können als studentische Mitglieder der GDCh die "Angewandte" für ca. Fünfmarkachtzig (DM 5.80!!) pro Heft druckfrisch frei Haus erhalten. Das sind weniger als sechs Pfennige pro Seite!

### Interessiert?

Dann rufen Sie doch einfach bei Beate Geiß an (Tel. 06201/606-199) oder schicken Sie ihr ein Fax (06201/606-184). Aber natürlich können Sie ihr auch schreiben:



**VCH-Leserservice, Postfach 10 11 61, 69451 Weinheim**