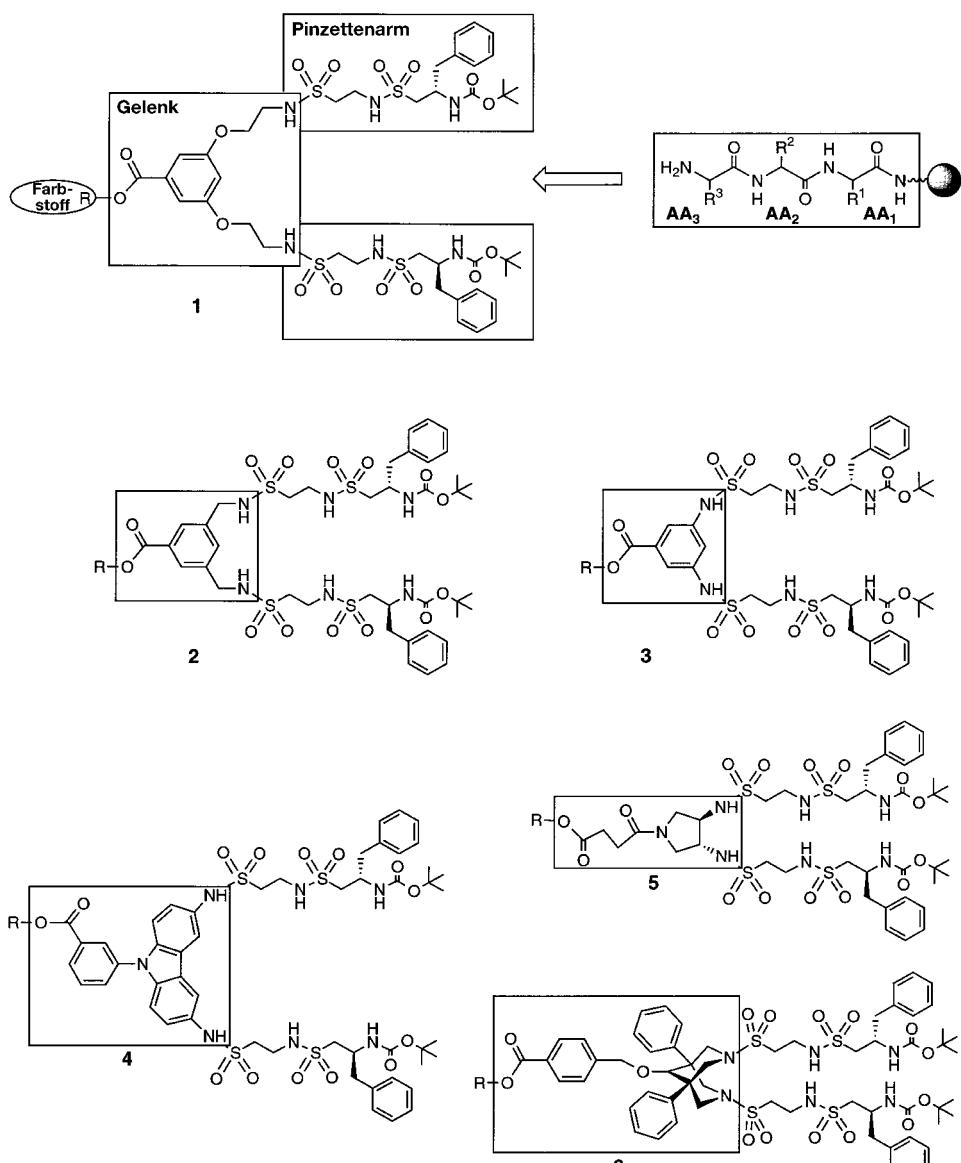


## Molekulare Pinzetten mit unterschiedlichem Biß – Erhöhung der Affinität synthetischer Rezeptoren durch Variation der Gelenkgruppe\*\*

Dennis W. P. M. Löwik,  
M. David Weingarten,  
Matthias Broekema,  
Arwin J. Brouwer,  
W. Clark Still und  
Rob M. J. Liskamp\*

Beim Entwurf und bei der Synthese von Rezeptormolekülen mit geplanten Bindungseigenschaften wurden zwar große Fortschritte erzielt, doch ist es noch immer schwierig, einen Bindungspartner für einen bestimmten Liganden zu entwerfen. Bei neueren Versuchen wandte man sich einem eher biomimetischen Ansatz zu und stellte mit Hilfe der kombinatorischen Chemie Bibliotheken synthetischer Rezeptoren her, die die gewünschten Liganden binden konnten. Inspiriert wurde diese Vorgehensweise durch den kombinatorischen Ansatz, der in der Natur beim Immunsystem eindrucksvoll zum Tragen kommt.

Basierend auf dem erfolgreichen Konzept „pinzettähnlicher“ zweiarmiger synthetischer Rezeptoren<sup>[1]</sup> haben wir synthetische Rezeptoren entwickelt, die aus Peptidmimetika vom Peptidosulfonamidtyp bestehen.<sup>[2]</sup> Ziel war es, Bibliotheken pinzettähnlicher Rezeptoren herzustellen, die dann auf ihre Bindungsaffinität gegenüber Liganden wie Peptiden, anderen Biomolekülen, die z. B. auf der Oberfläche pathogener Organismen vorkommen, Wirkstoffen und signalvermittelnden Verbindungen untersucht werden sollten. Un-



Schema 1. Strukturen pinzettähnlicher synthetischer Rezeptoren. R = Disperse-Rot 1 (DispR); eingeklammert: Gelenkgruppen; AA<sub>1-3</sub> siehe Lit. [12].

[\*] Prof. Dr. R. M. J. Liskamp, D. W. P. M. Löwik  
M. Brockema, A. J. Brouwer  
Department of Medicinal Chemistry  
Utrecht Institute for Pharmaceutical Sciences  
Utrecht University  
P.O. Box 80082, NL-3508 TB Utrecht (Niederlande)  
Fax: (+31) 30-253-6655  
E-mail: R.M.J.Liskamp@far.ruu.nl

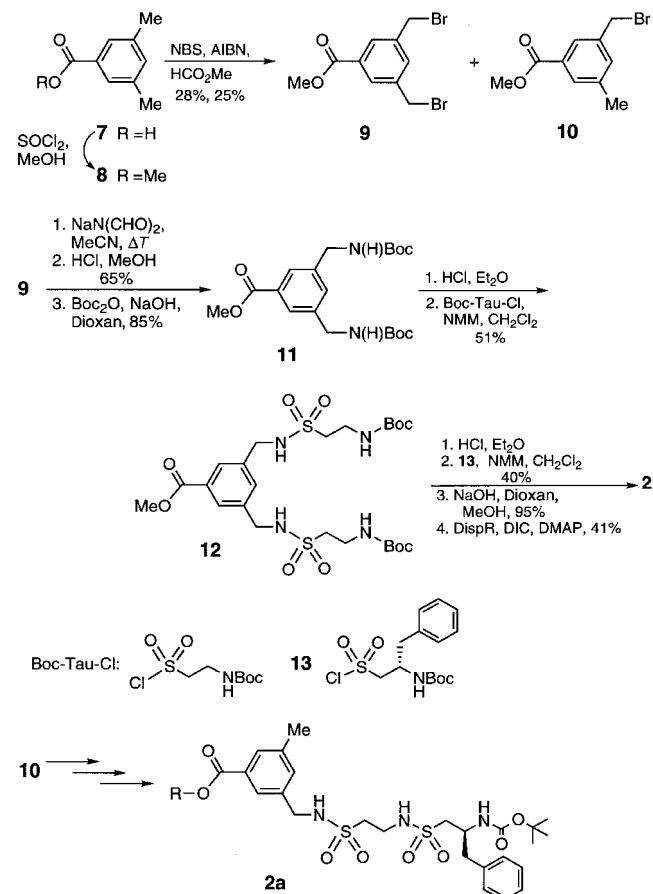
Dr. M. D. Weingarten, Prof. Dr. W. C. Still  
Department of Chemistry, Columbia University  
New York, NY 10027 (USA)  
Fax: (+1) 212-854-5429  
E-mail: clark@still3.chem.columbia.edu

[\*\*] Diese Arbeit wurde von der Niederländischen Stiftung für Chemische Forschung, SON, (D. W. P. M. L. und A. J. B.) von der Niederländischen Technologiestiftung und von der NATO (921326) gefördert.

ser verfügbarer synthetischer Rezeptor wies zwar eine bemerkenswerte Bindungsselektivität auf,<sup>[2]</sup> doch mußte die Bindungsaffinität gegenüber den Liganden mit Blick auf eine mögliche Anwendung gesteigert werden. Wir berichten hier, wie wir zu diesem Zweck weniger flexible „Gelenkgruppen“ in pinzettähnliche synthetische Rezeptoren eingefügt haben.

Unsere pinzettähnlichen synthetischen Rezeptoren sind aus drei Komponenten zusammengesetzt (Schema 1): einer Gelenkgruppe, an die die Pinzettarne gebunden werden, einem Farbstoffmolekül oder einem Harzkugelchen, das mit der Gelenkgruppe verknüpft ist, und zwei Armen, die die Bindungsstellen aufweisen und die aus Peptidmimetika vom Peptidosulfonamidtyp bestehen. Ausgehend von der ursprünglichen Gelenkgruppe in **1** wurden für die Verbindungen **2–6** Gelenkgruppen ausgewählt, mit denen die Flexibilität und/oder der Kettenabstand zwischen den Aminostickstoffatomen der Bindungsstellen schrittweise variiert werden konnten.

Der Syntheseweg zu den pinzettähnlichen synthetischen Rezeptoren ist beispielhaft für **2** und **5** in den Schemata 2 bzw. 3 dargestellt. Das Bis(aminomethyl)benzoësäure-Gelenk im Rezeptor **2** wurde aus 3,5-Dimethylbenzoësäure **7** hergestellt.<sup>[3]</sup> Dabei verwendeten wir die Monobromverbindung **10**, die bei der Bromierung von **8** zu einem großen Teil entstand,



Schema 2. Synthese des Rezeptors **2** (mit der Bis(aminomethyl)benzoësäure-Gelenkgruppe) und der amputierten Pinzette **2a**; NBS = *N*-Bromsuccinimid, AIBN = Azobisisobutyronitril, Boc = *tert*-Butoxycarbonyl, NMM = *N*-Methylmorpholin, DIC = Diisopropylcarbodiimid, DMAP = 4-Dimethylaminopyridin.

zur Herstellung einer „amputierten Pinzette“ mit nur einem Arm (**2a**). Nach Abspaltung der Boc-Schutzgruppen in **11** wurden die Peptidosulfonamid-Arme nach dem Sulfonylchlorid-Verfahren eingeführt.<sup>[4]</sup> Anschließend wurde der Methylester verseift und das Produkt mit Disperse-Rot 1 (DispR) zum blutroten synthetischen Rezeptor **2** verknüpft. Analog wurde der amputierte Rezeptor **2a** erhalten (Schema 2).

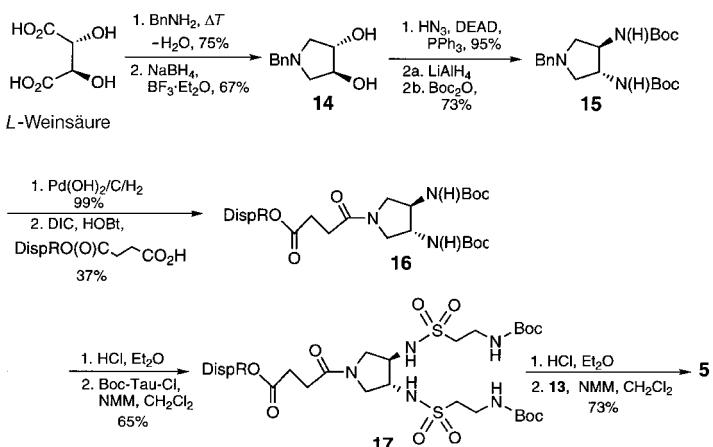
Ausgangsverbindung für das Pyrrolidinengelenk<sup>[5]</sup> in der Pinzette **5** war L-Weinsäure. Das Pyrrolidindiol **14** wurde nach Nagel et al.<sup>[6]</sup> hergestellt. Nach Umsetzung zum Diazid,<sup>[7]</sup> Reduktion und Einführen der Schutzgruppen an den entstandenen Aminogruppen erhielten wir **15**. Der an einen Spacer gebundene Farbstoff wurde nach Hydrogenolyse der Benzylgruppe angeknüpft.<sup>[8]</sup> Durch Abspaltung der Boc-Schutzgruppen in **16** und Einführen der Peptidosulfonamid-Arme nach dem Sulfonylchlorid-Verfahren wurde der synthetische Rezeptor **5** hergestellt.

Für den synthetischen Rezeptor **3** wurde die kommerziell erhältliche Diaminobenzoësäure als Gelenkgruppe verwendet. Das Carbazolengelenk in **4** wurde nach Rebek et al.<sup>[9]</sup> synthetisiert. Anhand der Arbeiten von Diederich et al.<sup>[10]</sup> wählten wir die präorganisierte Gelenkgruppe des Rezeptors **6** aus, die nach Reduktion und Anknüpfung des Farbstoffs erhalten wurde.<sup>[11]</sup>

Die Rezeptoren **1–6** wurden auf ihre Bindungseigenschaften gegenüber einer 24389 (=  $29^3$ ) Verbindungen großen, schutzgruppenfreien Tripeptidbibliothek auf TentaGel ( $\text{AA}_3-\text{AA}_2-\text{AA}_1-\text{N}(\text{H})$ -TentaGel) untersucht.<sup>[12]</sup> Dabei wurde die harzgebundene Tripeptidbibliothek in einer Chloroform-Lösung des Rezeptors äquilibriert (Abb. 1).<sup>[13]</sup> Bei **2–4** wurde eine erhöhte Affinität festgestellt, denn die Konzentration, bei der diese Rezeptoren an das Harz banden, war niedriger als die, bei der der Ausgangsrezeptor **1** band (Tabelle 1). Eine ähnliche Bindungsaffinität wie der Ausgangsrezeptor weist der Pyrrolidin-haltige Rezeptor **5** auf. Da die Pinzette mit nur einem Arm (**2a**) selbst bei einer Konzentration von  $425 \mu\text{M}$  nicht in nennenswertem Ausmaß bindet, wird deutlich, daß beide Arme zur Bindung notwendig sind. Auf den ersten Blick ist es überraschend, daß der Rezeptor **6** nicht gebunden wird. Dies kann auf die Abstoßung zwischen den freien Elektronenpaaren der Sulfonamidsauerstoffatome am Diazabicyclonanon-Teil zurückgeführt werden: Dadurch wird die Bildung der Wannen-Sessel-Konformation gegenüber der Sessel-Sessel-Konformation begünstigt und die Pinzette geöffnet.<sup>[14]</sup>

Nach 72stündiger Äquilibrierung wurden die farbigen Harzkügelchen abgetrennt und nach photolytischer Abspaltung der molekularen Marker durch Elektroneneinfang-Gas-chromatographie (EC-GC) analysiert.<sup>[15]</sup> Die Zahl der Kügelchen, die für jeden synthetischen Rezeptor dekodiert wurde, geht aus Tabelle 1 hervor. Darüber hinaus sind die Konsensus-Sequenzen dargestellt, die von jedem Rezeptor gebunden wurden, und die Häufigkeit, mit der sie bei den dekodierten Kügelchen sowie in der harzgebundenen Tripeptidbibliothek auftraten.

Nahezu alle Konsensus-Sequenzen aller molekularen Pinzetten enthalten einen sauren Aminosäurerest, meist in der Position  $\text{AA}_3$ .  $\text{AA}_2$  ist fast ausnahmslos ein polarer Amino-



Schema 3. Synthese des Rezeptors **5** mit der Pyrrolidin-haltigen Gelenkgruppe; Bn = Benzyl, HOBT = Hydroxybenztriazol, DEAD = Diethylazodicarboxylat.

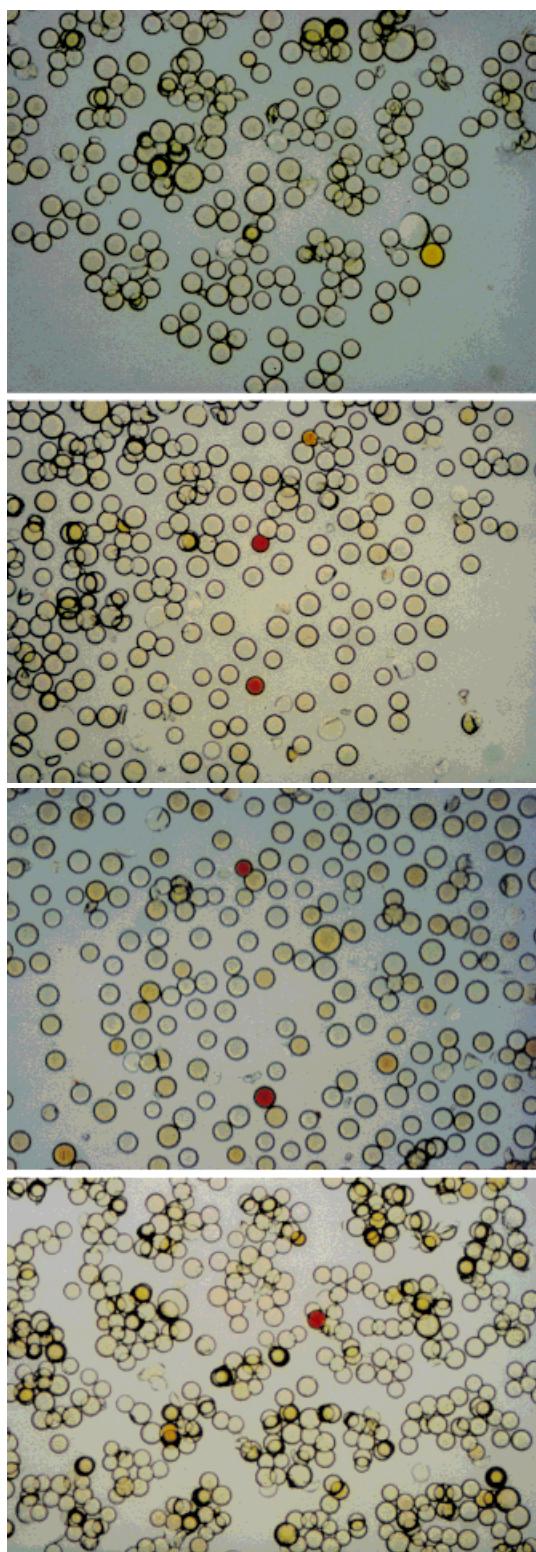


Abb. 1. Photographien von Versuchen mit den Rezeptoren **1–3** und **5**, deren Bindungseigenschaften gegenüber der harzgebundenen Tripeptidbibliothek untersucht wurden.

säurerest, z. B. Asn und oft His. Ebenso wie **1** reagieren der Diaminobenzoësäure-haltige Rezeptor **3** sowie der Pyrrolidin-haltige (**5**) bis zu einem gewissen Grad diastereoselektiv: Zwar kommen L-Glu-D-His oder D-Glu-L-His vor, nicht aber die zugehörigen diastereomeren Sequenzen L-Glu-L-

Tabelle 1. Bindungsselektivität der Rezeptoren **1–6** für Tripeptide einer 24389 Verbindungen großen, schutzgruppenfreien Tripeptidbibliothek auf TentaGel (AA<sub>3</sub>-AA<sub>2</sub>-AA<sub>1</sub>-N(H)-TentaGel).

Rezeptor	c <sub>Aqu.</sub> [μM]	n <sup>[a]</sup>	Konsensus-Sequenz AA <sub>3</sub> -AA <sub>2</sub> -AA <sub>1</sub>	f <sub>gef.</sub> [%] <sup>[b]</sup>	f <sub>Bib.</sub> [%] <sup>[c]</sup>
<b>1</b> <sup>[f]</sup>	70	34	L/D-Ala-D/L-Asp-L/D-Xxx <sup>[e]</sup>	50	0.1
			L-Glu-D-HisAsn-Xxx	20	0.3
<b>2</b>	40	28	Glu-Xxx-Xxx <sup>[d]</sup>	61	6.9
			L/D-Glu-D/L-His-Xxx <sup>[e]</sup>	32	0.2
			L/D-Glu-Xxx-L/D-Val	21	0.2
			Gly-Asn/His-Asp/Glu	21	0.07
<b>2a</b>	425	3	Glu/Asp-Xxx-Xxx	100	14
<b>3</b>	20	33	Glu-Xxx-Xxx	64	6.9
			Xxx-His-Xxx	70	6.9
			Xxx-Xxx-Asp	27	6.9
			L/D-Glu-D/L-His-Xxx <sup>[e]</sup>	61	0.2
<b>4</b>	40	16	Glu-Xxx-Xxx	63	6.9
			Xxx-His-Xxx	56	6.9
			L/D-Glu-D/L-His-Xxx <sup>[e]</sup>	38	0.2
<b>5</b>	80	19	L/D-Glu-D/L-His-Xxx	95	0.2
			L/D-Glu-D/L-His-Phe <sup>[e]</sup>	26	0.02
<b>6</b>	500	keine	keine		

[a] n = Zahl dekodierter Harzkügelchen. [b] f<sub>gef.</sub> = festgestellte Häufigkeit. Es sind nur Konsensus-Sequenzen aufgeführt, die auf  $\geq 20\%$  der Kügelchen auftreten. [c] f<sub>Bib.</sub> = Häufigkeit, mit der die Sequenzen tatsächlich in der Bibliothek vorkommen. [d] Fehlt das Präfix L oder D, so weist der Rezeptor keine Präferenz für eines der Enantiomere auf. [e] Diese Anordnung der Präfixe L und D bedeutet, daß z. B. L-Glu-D-His-Xxx und D-Glu-L-His-Xxx vorkommen, nicht aber L-Glu-L-His-Xxx oder D-Glu-D-His-Xxx. [f] Siehe Lit. [2].

His oder D-Glu-D-His. Diese Diastereoselektivität tritt darüber hinaus – wenn auch weniger ausgeprägt – bei den Rezeptoren **2** und **4** auf, die ebenfalls die Sequenz Glu-His erkennen können. Wie beim Rezeptor **1** wurde bei den anderen Rezeptoren die größte Variabilität an der Position festgestellt, die sich am nächsten zum Polymer befindet (AA<sub>1</sub>). Beim Ausgangsrezeptor **1** handelt es sich dabei vorwiegend um einen polaren Aminosäurerest; in den Rezeptoren **2** und **3**, deren weniger flexible Gelenkgruppen vom Ausgangsrezeptor abgeleitet sind, sowie im Carbazol-haltigen Rezeptor **4** kommen ungefähr gleich viele polare und unpolare Aminosäurereste vor, im Pyrrolidin-haltigen Rezeptor **5** befindet sich dagegen eine unpolare Aminosäure an der Position AA<sub>1</sub>.

Zwar waren wir auf dem richtigen Weg zu unserem Hauptziel, der Erhöhung der Bindungsaffinität, doch mußten die Peptidsequenzen, die wir bei der Dekodierung der Harzkügelchen identifiziert hatten, durch Bindungsexperimente mit Peptiden gleicher Sequenz, die durch unabhängige Synthese erhalten wurden, bestätigt und einige repräsentative Bindungskonstanten ermittelt werden. Die Sequenzen, die wir nach Auswertung der Dekodierungsexperimente „resynthetisierten“, sind in Tabelle 2 dargestellt.

Darüber hinaus ermittelten wir mehrere Bindungskonstanten. Die Bindungsaffinität einer Sequenz, die mit hoher Selektivität an den Ausgangsrezeptor **1** bindet (z. B. D-Ala-L-Asp-D-Ser), konnte um mehr als das zehnfache (von  $K_a = 320$  auf  $K_a = 4100 \text{ M}^{-1}$ ) beim synthetischen Rezeptor **2** gesteigert werden. Eine Zunahme der Affinität wurde auch für die Sequenz L-Glu-D-Asn-L-Val festgestellt, die an den Aus-

Tabelle 2. Bindungsaffinität der Rezeptoren **1–6** für Peptide, die anhand der bei der Dekodierung nachgewiesenen Sequenzen synthetisiert wurden.

Rezeptor	Resynthetisiertes Peptid	Affinität beim Screening <sup>[a]</sup>	Bindungsaffinität <sup>[b]</sup>	$K_a [M^{-1}]^{[c]}$	$\Delta G [kJ mol^{-1}]$
<b>1</b>	D-Ala-L-Asp-D-Ser	+	++	320	-14.2
	L-Glu-D-Asn-L-Val	+	+	95	-11.2
<b>2</b>	D-Ala-L-Asp-D-Ser	[f]	+++	4100	-20.5
	L-Glu-D-Asn-L-Val	+++	+++	1680	-18.3
<b>3</b>	D-Ala-L-Asp-D-Ser	[e]	++	760	-16.4
	L-Glu-D-Asn-L-Val	[e]	+	[d]	[d]
	L-Glu-D-His-L-Val	++	+++	210	-13.2
<b>4</b>	Gly-L-His-L-Asp	++	+++	[d]	[d]
	Gly-L-His-L-Asp	+	+	[d]	[d]
<b>5</b>	D-Ala-L-Asp-D-Ser	[e]	++	$\approx 40$	$\approx -9$
	L-Glu-D-His-L-Val	+++	++	80	-10.8

[a] Ermittelt nach der Inkubation der harzgebundenen Tripeptidbibliothek: +++ : dunkelrote Kugelchen; ++ : dunkelorangefarbene bis rote Kugelchen; + : dunkelorangefarbene Kugelchen. [b] Ermittelt durch Inkubation der resynthetisierten Peptide mit den farbigen Rezeptoren in Chloroform. [c] Ermittelt über UV-Messungen. Die Fehlerbreite beträgt im allgemeinen  $\pm 10\%$ ; Ausnahmen:  $4100 M^{-1} \pm 5\%$ ; 210 und  $40 M^{-1}$  jeweils  $\pm 15\%$ . [d] Nicht ermittelt. [e] Nicht nachgewiesen. [f] Nicht nachgewiesen, obwohl die verwandte Sequenz D-Ala-L-Asp-D-Thr auftrat.

gangsrezeptor mit niedriger Affinität ( $K_a = 95 M^{-1}$ ), an die molekulare Pinzette **2** dagegen mit hoher Affinität ( $K_a = 1680 M^{-1}$ ) gebunden wurde. Ein Anstieg auf das Doppelte der Bindungsaffinität von D-Ala-L-Asp-D-Ser trat bei der starreren Pinzette **3** auf, obwohl diese weniger Raum zwischen den Peptidosulfonamid-Armen bietet.

Ähnlich gebaute Tripeptide, z.B. L-Glu-D-His-L-Val, die auch an den Ausgangsrezeptor **1** banden, wiesen nicht nur gegenüber dem Rezeptor **2**, sondern auch gegenüber **3** eine erhöhte Affinität auf. Zwar verfärbten sich die Kugelchen, an die die Tripeptide gebunden wurden, bei Konzentrationen des Carbazol-haltigen Rezeptors **4**, die ähnlich der des Benzyl-haltigen (**2**) waren, doch war keines der Kugelchen dunkelorangefarben oder rot. Die Bindungsaffinität war demnach nicht signifikant höher als die des Ausgangsrezeptors **1**: Offensichtlich ist trotz der starren Carbazol-Gelenkgruppe der Abstand zwischen den Armen zu groß, als daß die Affinität merklich erhöht wird. Die Pyrrolidingruppe schien als Gelenk sehr vielversprechend im Hinblick auf Starrheit und Chiralität, und die Selektivität der Pinzette mit dieser Gruppe (**5**) war sehr hoch. In 95 % der dekodierten Harzkugelchen trat die Sequenz L/D-Glu-D/L-His-Xxx auf; darüber hinaus kamen L-Glu-D-His-Xxx und D-Glu-L-His-Xxx vor, nicht aber die zugehörigen diastereomeren Sequenzen L-Glu-L-His-Xxx und D-Glu-D-His-Xxx (Tabelle 1). Die Bindungsaffinität war allerdings etwas enttäuschend. Die beiden Arme der Pinzette scheinen zu weit voneinander wegzuzuweisen, als daß eine signifikante Zunahme der Bindungsaffinität möglich wäre.

Durch Variation der Gelenkgruppe pinzettentypischer synthetischer Rezeptoren ist es möglich, die Bindungsaffinität für Tripeptide unter Erhaltung der Selektivität signifikant zu erhöhen. Da eine große Zahl von Gelenk- und Gerüstgruppen und von Bausteinen verfügbar ist, deren Auswahl durch die natürliche Vielfalt inspiriert wird, sollten alle Arten benötigter Bibliotheken zugänglich sein, auch solche, die andere Verbindungen als Peptide binden können.

- [1] S. C. Zimmerman, W. Wu, Z. Zeng, *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 196–201; R. Boyce, G. Li, H. P. Nestler, T. Suenaga, W. C. Still, *ibid.* **1994**, *116*, 7955–7956; S. R. Labrenz, J. W. Kelly, *ibid.* **1995**, *117*, 1655–1656; Y. Cheng, T. Suenaga, W. C. Still, *ibid.* **1996**, *118*, 1813–1814; H. Wennemers, S. S. Yoon, W. C. Still, *J. Org. Chem.* **1995**, *60*, 1108–1109; C. Gennari, H. P. Nestler, B. Salom, W. C. Still, *Angew. Chem. 1995*, *107*, 1894–1896; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1995**, *34*, 1765–1768.
- [2] D. W. P. M. Löwik, S. J. E. Mulders, Y. Cheng, Y. Shao, R. M. J. Liskamp, *Tetrahedron Lett.* **1996**, *37*, 8253–8256.
- [3] K. Kurz, M. G. Göbel, *Helv. Chim. Acta* **1996**, *79*, 1967–1979.
- [4] D. B. A. de Bont, G. H. Dijkstra, J. A. J. den Hartog, R. M. J. Liskamp, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1996**, *6*, 3035–3040.
- [5] Still et al. bauten diese Gelenkgruppe in synthetische Rezeptoren ein:  
a) S. S. Yoon, W. C. Still, *Tetrahedron* **1995**, *51*, 567–578; b) Y. Shao, W. C. Still, *J. Org. Chem.* **1996**, *61*, 6086–6087; c) Z. Pan, W. C. Still, *Tetrahedron Lett.* **1996**, *37*, 8699–8702; d) M. Torneiro, W. C. Still, *Tetrahedron* **1997**, *53*, 8739–8750.
- [6] U. Nagel, E. Kinzel, J. Andrade, G. Prescher, *Chem. Ber.* **1986**, *119*, 3326–3343.
- [7] J. Skarzewski, A. Gupta, *Tetrahedron: Asymmetry* **1997**, *8*, 1861–1867.
- [8] Siehe Lit. [5a].
- [9] R. J. Pieters, I. Huc, J. Rebek, Jr., *Chem. Eur. J.* **1995**, *1*, 183–192.
- [10] F. Diederich, D. R. Carnanague, *Helv. Chim. Acta* **1994**, *77*, 800–818.
- [11] Es war schwierig, an die sterisch gehinderte sekundäre Hydroxyfunktion im Diazabicyclonanon-Teil eine geeignete Ankergruppe anzu-knüpfen, an die das Farbstoffmolekül gebunden werden konnte. Erfolgreich verlief die Umsetzung mit p-Brommethylbenzoësäure-methylester in Gegenwart von Kaliumhydrid und [18]Krone-6, wobei die Gelenkgruppe von **6** erhalten wurde.
- [12] AA<sub>1-3</sub>: Gly, D- und L-Ala, D- und L-Val, D- und L-Leu, D- und L-Phe, D- und L-Pro, D- und L-Ser, D- und L-Thr, D- und L-Asn, D- und L-Gln, D- und L-Asp, D- und L-Glu, D- und L-His, D- und L-Lys, D- und L-Arg.
- [13] Wir versuchten, die Rezeptorkonzentration wenig unterhalb der Konzentration einzustellen, die für die Bindung von etwa 1 % der Harzkugelchen der Bibliothek notwendig ist (siehe Tabelle 1).
- [14] Das Bissulfonamid des Diazabicyclonanon-Teils nahm eine Sessel-Wannen-Konformation, das Bistrifluoracetylderivat dagegen eine Sessel-Sessel-Konformation ein: P. H. McCabe, N. J. Milne, G. A. Sim, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1985**, 625–626.
- [15] M. H. J. Ohlmeyer, R. N. Swanson, L. W. Dillard, J. C. Reader, G. Asouline, R. Kobayashi, M. Wigler, W. C. Still, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1993**, *90*, 10922–10926.

Eingegangen am 2. Januar 1998 [Z11316]

**Stichwörter:** Kombinatorische Chemie • Peptide • Peptid-mimetica • Rezeptoren • Sulfonamide