

nen Protein-DNA-Wechselwirkungen.^[14] Erst kürzlich wurde ein solches Base flipping auch mit einem synthetischen Azoniacyclophan-Liganden erreicht; bei dessen Komplexierung mit ds-RNA fand eine Nucleobasen-Insertion in die Cyclophancavität statt.^[15] Im Unterschied dazu sind die in dieser Arbeit hergestellten Liganden alle mit dem Ziel entwickelt worden, mit der ss-Form von Nucleinsäuren wechselwirken zu können, dabei aber die Duplex-Konformation als solche intakt zu lassen. Die Phenylringe der neuen Liganden ermöglichen eine vielfältige Variation der Substituenten, welche einen erheblichen Einfluß auf die Destabilisierung der Basenpaarung in ds-Strängen haben. Bisher weiß man nur wenig über die Abhängigkeit der Affinität zu ss-Strängen von der Ligandenstruktur. Untersuchungen mit ds-DNA weisen auf eine erhebliche Abhängigkeit der Affinität vom Substitutionsmuster am Liganden hin.^[16, 17]

Agentien, die die Basenpaarung in ds-Nucleinsäuren aufheben und selektiv mit entfalteten Bereichen wechselwirken, können die Grundlage für neue Verbindungen mit potentiell antiviraler und cytostatischer Wirkung sein. Solche Verbindungen können auch RNA-Sekundärstrukturen, z.B. Haarnadelschleifen, aufbrechen, die wichtige Erkennungsstellen für Proteine sind, die an der Genregulation der viralen Replikation beteiligt sind. Ferner könnten solche Verbindungen von Interesse für molekulärbiologische Anwendungen wie die Polymerasekettenreaktion (PCR) oder die Sequenzierung von Nucleinsäuren sein, welche die Dissoziation von doppelsträngigen Nucleinsäuren voraussetzen.^[18]

Eingegangen am 25. Mai 1998 [Z11897]

Stichwörter: Amine • Intercalierungen • Nucleinsäuren • Stapelwechselwirkungen • Supramolekulare Chemie

- [1] a) W. D. Wilson in *Nucleic Acids in Chemistry and Biology* (Hrsg.: M. Blackburn, M. Gait), IRL, Oxford, Kap. 8, **1989**; b) J. W. Lown, *Anti-Cancer Drug Des.* **1988**, 3, 25; c) P. D. Dervan, *Science* **1986**, 232, 464; d) S. Neidle, Z. Abraham, *CRC Crit. Rev. Biochem.* **1984**, 17, 73; e) S. Neidle, T. Jenkins, *Mol. Des. Model. Part B* **1991**, 203, 433; f) für Wechselwirkungen von RNA mit kleinen Liganden siehe: „Design and Analysis of Molecular Motifs for Specific Recognition of RNA“: K. Li, M. Fernandez-Saiz, C. T. Rigl, A. Kumar, K. G. Ragunathan, A. W. McConaughie, D. W. Boykin, H.-J. Schneider, W. D. Wilson in, *Bioorg. Med. Chem.* **1997**, Symposium Issue: *Strategies for RNA Recognition*, 1157.
- [2] G. L. Eichhorn, *Nature* **1962**, 194, 474.
- [3] a) H.-P. Hsieh, J. G. Muller, C. J. Burrows, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, 116, 1207; b) H. R. Mahler, R. Goutarel, Q. Khuong-Huu, *Biochemistry* **1968**, 7, 1568.
- [4] Die Destabilisierung von Doppelsträngen wurde auch für einige intercalierende Reagentien wie Acridingelb berichtet, jedoch wurde dabei immer Niederschlagsbildung beobachtet: J. Kapuscinsky, Z. Darzynkiewicz, *Nucleic Acids Res.* **1983**, 11, 7555.
- [5] E. Kimura, T. Ikeda, M. Shionoya, *Pure Appl. Chem.* **1997**, 69, 2187.
- [6] D. W. Wilson, L. Ratmeyer, M. T. Cegla, J. Psychala, D. Boykin, M. Demeunynck, J. Homme, G. Krishnan, D. Kennedy, R. Vinayak, G. Zon, *New J. Chem.* **1994**, 18, 419.
- [7] J.-L. Dimicoli, C. Hélène, *Biochemistry* **1974**, 13, 724.
- [8] J. Sartorius, H.-J. Schneider, *FEBS Lett.* **1995**, 374, 387; H.-J. Schneider, J. Sartorius in *Physical Supramolecular Chemistry (NATO ASI Ser. Ser. C)* **1996**, 485) S. 11.
- [9] L. Kapciak, E. J. Gabbay, *J. Am. Chem. Soc.* **1975**, 97, 403; E. J. Gabbay, C. S. Baxter, *J. Am. Chem. Soc.* **1973**, 95, 7850.
- [10] D. L. Ollis, S. W. White, *Chem. Rev.* **1987**, 87, 981.
- [11] S. Chandrasekaran, S. Kusuma, D. W. Boykin, W. D. Wilson, *Magn. Reson. Chem.* **1986**, 24, 630; für ähnliche NMR-Verschiebungseffekte

in selbstassozierenden Nucleosidderivaten siehe: K. H. Scheller, H. Sigel, *J. Am. Chem. Soc.* **1983**, 105, 5891; O. Yamauchi, A. Odani, H. Masuda, H. Sigel, *Met. Ions Biol. Syst.* **1996**, 32, 207, zit. Lit.

- [12] W. Curtis Johnson, Jr., *Circular Dichroism and the Conformational Analysis of Biomolecules*, Plenum, New York, **1996**, S. 433–468.
- [13] C. Hélène, T. Montenay-Garestier, J. L. Dimicoli, *Biochim. Biophys. Acta* **1971**, 254, 349.
- [14] R. J. Roberts, *Cell* **1995**, 82, 9, zit. Lit.
- [15] M. Fernandez-Saiz, H.-J. Schneider, J. Sartorius, W. D. Wilson, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, 118, 4739.
- [16] L. Strekowski, J. L. Mokrosz, W. D. Wilson, M. J. Mokrosz, A. Strekowski, *Biochemistry* **1992**, 31, 10802; D. W. Wilson, L. Ratmeyer, M. T. Cegla, J. Psychala, D. Boykin, M. Demeunynck, J. Homme, G. Krishnan, D. Kennedy, R. Vinayak, G. Zon, *New J. Chem.* **1994**, 18, 419.
- [17] a) A. Korolkovas in *Essentials of Medicinal Chemistry*, Wiley, New York, **1988**; b) P. V. Scaria, J. C. Craig, R. H. Shafer, *Biopolymers* **1993**, 33, 887; c) J. Sartorius, H.-J. Schneider, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2* **1997**, 2319, zit. Lit.
- [18] Die Synthese der neuen Liganden werden wir zu einem späteren Zeitpunkt veröffentlichen. Für alle neuen Verbindungen wurden befriedigende analytische Daten erhalten.

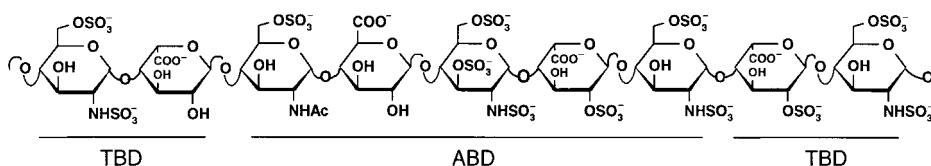
Die ersten synthetischen Kohlenhydrate mit den vollständigen antikoagulierenden Eigenschaften von Heparin**

Maurice Petitou,* Philippe Duchaussay, Pierre-A. Driguez, Guy Jaurand, Jean-P. Héroult, Jean-C. Lormeau, Constant A. A. van Boeckel und Jean-M. Herbert

Heparin, ein verbreitetes Mittel zur Vermeidung und Behandlung von cardiovasculären Erkrankungen, übt seine Wirkung über die Aktivierung des Serinproteinaseinhibitors Antithrombin III (AT III) aus, des wichtigsten physiologischen Inhibitors der Blutgerinnung.^[1, 2] Eine spezielle Pentasaccharidesequenz^[3] in diesem Polysaccharid bindet hochspezifisch an das Protein. Dies induziert eine Konformationsänderung, wodurch eine passende Präsentation der inhibitorischen Peptidschlaufe von AT III gegenüber den aktiven Zentren der Serinproteinasen hervorgerufen wird. Allein die Wechselwirkung mit aktiviertem AT III reicht aus, um den Gerinnungsfaktor Xa zu inhibieren. Dagegen benötigt die Thrombininhibition die Bildung eines ternären Komplexes aus Heparin, AT III und Thrombin.^[2] Dazu bedarf es einer längeren Heparinkette (Schema 1), die das oben erwähnte Pentasaccharid enthält, welches an beiden Enden mit sich wiederholenden trisulfatierten Disaccharideinheiten verlängert ist.^[4] Thrombin wird elektrostatisch über seine Exosite-

[*] Dr. M. Petitou, Dr. P. Duchaussay, Dr. P.-A. Driguez, Dr. G. Jaurand, Dr. J.-P. Héroult, Dr. J.-C. Lormeau, Dr. J.-M. Herbert
Sanofi Recherche, Haemobiology Research Department
195, route d'Espagne, F-31036 Toulouse Cedex (Frankreich)
Fax: (+33) 5-61-16-22-86
E-mail: maurice.petitou@sauofi.com
Prof. Dr. C. A. A. van Boeckel
N.V. Organon, Oss (Niederlande)

[**] Diese Arbeit ist Teil einer Zusammenarbeit zwischen N.V. Organon (Niederlande) und Sanofi Recherche (Frankreich) über antithrombotisch wirksame Oligosaccharide.



Schema 1. Ein gerinnungshemmendes Heparinmolekül enthält eine antithrombinbindende Domäne (ABD) die an beiden Seiten durch thrombinbindende Domänen (TBDS) verlängert ist. Eine ABD ist eine Pentasaccharidsequenz mit einer an ein N-Sulfo-3,6-di-O-sulfo- α -D-glucosamin gebundenen β -D-Glucuronsäure; TBDS bestehen hauptsächlich aus mehreren trisulfatierten Disaccharideinheiten aus 2-O-Sulfo- α -L-iduronsäure und N-Sulfo-6-O-sulfo- α -D-glucosamin.

II-Anionenbindungsstelle angezogen^[5] und gleitet die Kette entlang, bis es sich an der inhibierenden Schlaufe des aktivierte AT III einhakt.

Demnach sollte ein Oligosaccharidmolekül, das sowohl eine AT-III-bindende Domäne (ABD) als auch eine thrombinbindende Domäne (TBD) enthält, in der Lage sein, Heparin hinsichtlich seiner gerinnungshemmenden Aktivität vollständig zu imitieren. Mehrere biochemische Untersuchungen zur Größe solcher Moleküle wiesen auf Tetradeca-, Octadeca- und Eicosasaccharide hin.^[6] Es ist bemerkenswert, daß das die Kette entlanggleitende Thrombin sich von der richtigen Seite annähern muß, um inhibiert zu werden, wenn AT III an seine Bindungsdomäne angedockt hat. Es scheint also so zu sein, daß nur eine der beiden Möglichkeiten, die ABD mit einer TBD zu verlängern (am reduzierenden oder nichtreduzierenden Ende, Schema 2), eine Inhibition von Thrombin ermöglicht.^[7]

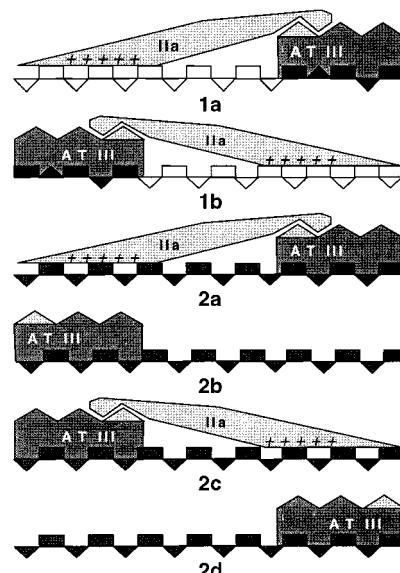
Die exakte Struktur des hypothetischen Heparinfragments bei Oligosacchariden dieser Größe zu reproduzieren ist bei der Synthese eines Oligosaccharids dieser Größe kaum durchführbar.^[9] In einem ersten Versuch diese Schwierigkeit zu umgehen, wurden zwei Zuckermoleküle, eine ABD und eine TBD, über einen nicht aus Kohlenhydraten bestehenden Linker verknüpft.^[8] Die entstehenden Konjugate inhibierten zwar Thrombin und Faktor Xa, in einigen Assays erwies sich die Inhibitorstärke aber als gering im Vergleich zu der von Heparin. In dem hier vorgestellten Ansatz nutzen wir die „Nicht-Glycosamino“-Glycanserien von Heparinanalogen,^[10] bei denen die N-Sulfonatgruppen durch O-Sulfonatgruppen ersetzt und die Hydroxygruppen alkyliert sind. Diese Strukturmodifikationen erhalten die spezifische Bindung an AT III vollständig, vereinfachen jedoch die Synthese erheblich.

Die Strukturen der Zielmoleküle ergeben sich aus folgenden Überlegungen: a) Im Unterschied zur hochspezifischen Wechselwirkung zwischen AT III und Heparin resultiert die Wechselwirkung zwischen Thrombin und dem Polysaccharid nur aus einer elektrostatischen Anziehung, die durch die negative Ladungsdichte der Polysaccharidkette bestimmt wird.^[4] Daher kann auch die ABD, die mindestens sechs negative Ladungen aufweist (Schema 3), Thrombin anziehen und binden. b) Eine Kette aus ABDs würde notwendigerweise auch die ABD und die TBD in der richtigen relativen Position zueinander aufweisen, da AT III an beide Enden des Moleküls binden und Thrombin durch die restliche Kette angezogen werden kann (Schema 2). c) Damit Thrombin mit AT III wirksam um eine Bindung an eine Kette aus ABDs konkurrieren kann, muß die Affinität des AT III/ABD-Paares möglichst in demselben Bereich liegen wie die des

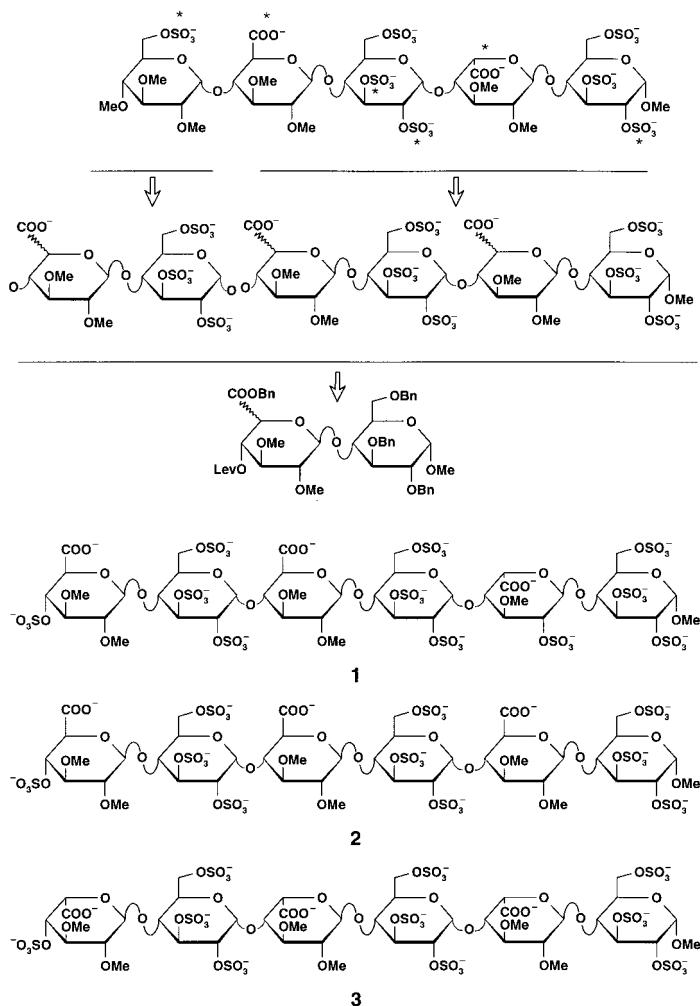
Thrombin/Heparin-Paars, d. h. im μ M-Bereich und damit um zwei bis drei Größenordnungen niedriger als die höchste Affinität, die mit einigen synthetischen Pentasacchariden erreicht wurde.^[11] Aus dieser Überlegung folgt, daß wir bis zu einem bestimmten Grad die Struktur der ABD an unsere Synthesestrategie anpassen dürfen (bei Erhaltung ausreichender Bindungsaffinität).

Dies ist ein nicht zu unterschätzender Vorteil für die Synthese der anvisierten langen Saccharidfragmente.

Schema 3 zeigt die Struktur eines Pentasaccharids mit hoher Affinität für AT III.^[12] Das Vorhandensein von zwei Typen Uronsäuren zum einen mit D-gluco- und zum andern mit L-ido-Konfiguration ist ein Strukturmerkmal von Verbindungen mit hohen Affinitäten. Ausgehend von dieser Struktur war unsere Überlegung, daß Hexasaccharide, die aus der Wiederholungseinheit einer Disaccharideinheit bestehen, eine hohe Affinität für AT III aufweisen könnten, möglicherweise sogar in dem erwünschten μ M-Bereich. Solche Hexa-



Schema 2. Inhibition von Thrombin durch AT III und Heparin. Bei einer aktiv gerinnungshemmenden Verbindung bindet AT III über das ABD-Pentasaccharid (siehe Schema 1, in **1a**, **b** durch schwarze Rechtecke und Dreiecke symbolisiert) an Heparin und setzt dadurch seine aktivierte inhibitorische Peptidschlaufe (helles graues Dreieck) dem katalytischen Zentrum des Thrombins (auch Faktor IIa genannt) aus. Thrombin wird durch die negativen Ladungen der TBD (weiße Rechtecke und Dreiecke) angezogen und gleitet die Kette entlang, bis es sich an der exponierten Peptidschlaufe des Inhibitors einhakt. Heparin und AT III sind in einer speziellen, noch nicht bekannten Weise aneinander gebunden (**1a** oder **1b**), wobei sich Thrombin offenbar von der richtigen Seite annähern muß, um inhibiert zu werden. Unter diesen beiden möglichen Anordnungen von ABD und TBD (beide liegen in einem Heparinmolekül vor, siehe Schema 1) war nicht bekannt, welche die wirksame war.^[7] Daher entwarfen wir ein Hybridmolekül (dunkle Rechtecke und Dreiecke), das aus aneinander gereihten ABDs besteht. AT III kann an jedes der beiden Enden des Moleküls binden (**2a** oder **2b**), kann Thrombin gebunden und inhibiert werden (**2a** oder **2c**), vorausgesetzt die Zuckerkette ist lang genug, um beide Proteine zu binden.

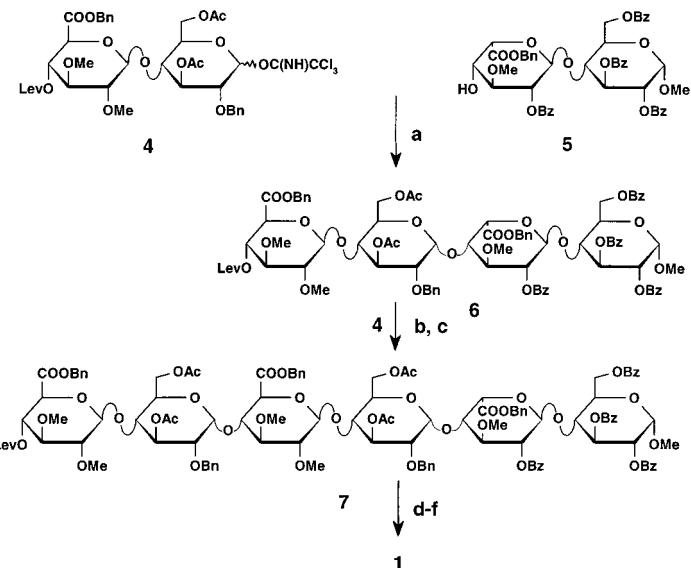


Schema 3. Vereinfachung der Struktur einer mit hoher Affinität bindenden Pentasaccharidsequenz. Die kritischen, an der Wechselwirkung mit AT III beteiligten anionischen Gruppen sind mit einem Stern markiert. Die vorgeschlagenen Veränderungen (zweite Zeile) führen eine weitere Sulfatgruppe an Position 3 der dritten Glucoseeinheit ein und kehren die Konfiguration an C5 der Uronsäuren um. Solche Änderungen würden die Synthese ausgehend von nur einem Disaccharidbaustein ermöglichen (dritte Zeile; Lev = Lävulinoyl). Dazu wurden die Verbindungen **1–3** synthetisiert: **1** enthält eine dritte trisulfatierte Glucoseeinheit, und die Hexasaccharide **2** und **3** bestehen ausschließlich aus Glucuronsäure bzw. Iduronsäure (diese wurde ausgehend von einem einzigen Disaccharidbaustein erhalten).

saccharide, die aus nur einem Disaccharidbaustein erhalten werden könnten, erfüllen unser Kriterium für eine einfache Synthese von langen Fragmenten (die Synthese der letztendlich gewünschten langen Oligosaccharide wäre damit ebenfalls mit dem gleichen Grundbaustein möglich). Um dies zu testen, synthetisierten wir die drei in Schema 3 dargestellten Hexasaccharide **1–3**. Mit **1** untersuchten wir den Einfluss einer weiteren trisulfatierten Glucoseeinheit, mit **2**, ob die leicht verfügbare D-Glucuronsäure L-Iduronsäure ersetzen könnte, und mit **3** eine Verbindung, die L-Iduronsäure als einzige Uronsäure enthält. Von allen Verbindungen bestimmten wir ihre Affinität für AT III.

Alle drei Hexasaccharide wurden mit solchen Strategien (Schema 4–6) erhalten, bei denen zunächst Disaccharidbausteine hergestellt, diese dann nach der Imidat-Glycosylie-

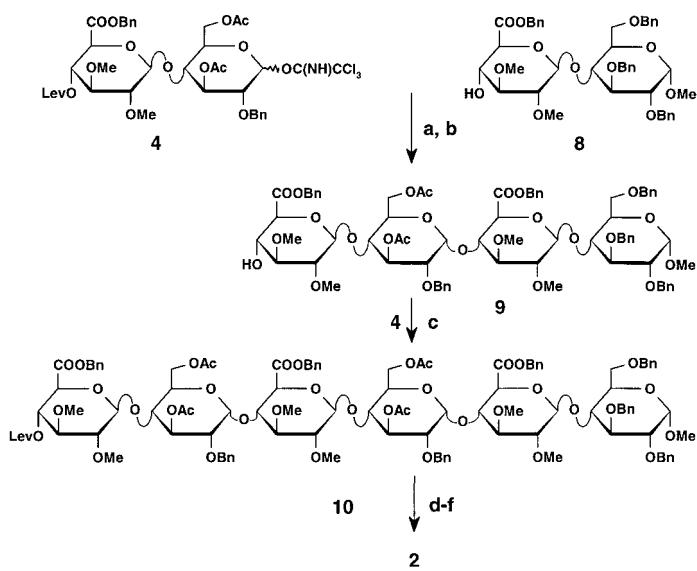
rungsmethode wiederholt kondensiert und die resultierenden Hexasaccharide entschützt und sulfatiert wurden.^[13] So lieferte die Reaktion des bekannten^[14] Glycosyldonors **4** und des Acceptors **5** (hergestellt wie für das Methylesteranalogon beschrieben^[10a]) in stöchiometrischen Mengen das Tetrasaccharid **6** (62%; Schema 4).^[15] Die selektive Spaltung des



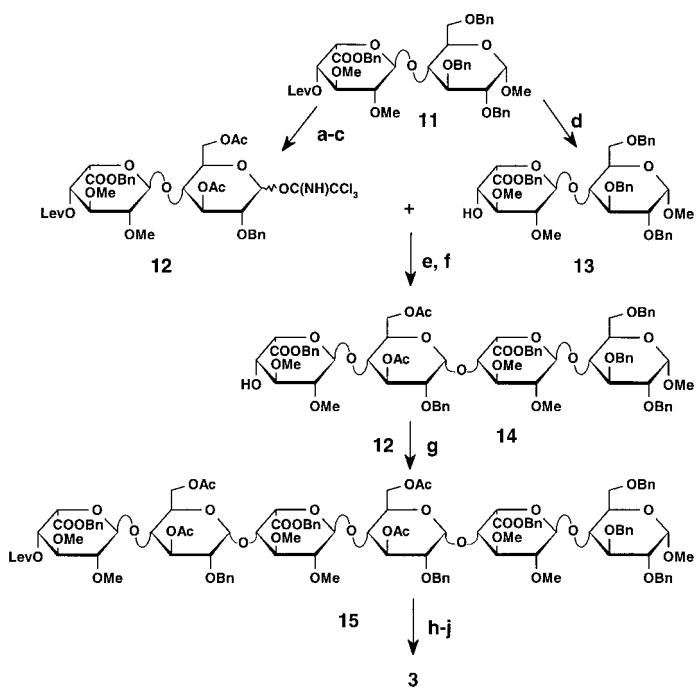
Schema 4. a) $\text{Me}_3\text{SiOSO}_2\text{CF}_3$ (TMSOTf), Toluol, 4-Å-Molekularsieb, -20°C , 30 min, 62%; b) 1M $\text{NH}_2\text{NH}_2/\text{H}_2\text{O}$ in Pyridin/AcOH (3/2), 15 min, 87%; c) wie a), 48%; d) H_2 , 10% Pd/C, MeOH, 24 h; e) 0.5M NaOH, 5 h, 91% (bezogen auf 7); f) Pyridin:SO₃, DMF, 55 °C, 24 h, 98%.

Lävulinsäureesters gab den entsprechenden Glycosylacceptor (87%), der mit **4** unter Bildung des vollständig geschützten Hexasaccharids **7** kondensiert wurde (es bildete sich eine 5:1-Mischung aus dem α - und dem β -Anomer, aus der nach Chromatographie an Silicagel **7** in 39% Ausbeute erhalten wurde). Der katalytischen Hydrogenolyse der Benzylgruppen folgte die Verseifung der Ester (91%). Die vollständige Entfernung der Schutzgruppen wurde Hochfeld-¹H-NMR-spektroskopisch kontrolliert. Nach Sulfatierung und Gefriertrocknung wurde **1** als weißes Pulver erhalten (98%).^[15] Verbindung **2**^[15] wurde analog (Schema 5) aus **4** und dem Acceptor **8** hergestellt, der wie sein Methylesteranalogon synthetisiert wurde.^[12] Eine ähnliche Reaktionssequenz (Schema 6) lieferte **3**.^[15] Sie ging von **12** und **13** aus, welche beide aus einer gemeinsamen Vorstufe, dem Disaccharid **11**, erhalten wurden, die nach dem für das Methylesteranalogon beschriebenen Verfahren hergestellt worden war.^[12]

Die Affinität von **1–3** zu AT III wurde fluoreszenzspektroskopisch^[15] bestimmt und mit der des Pentasaccharids in Schema 3 verglichen ($K_d = 1.4 \pm 0.2 \text{ nm}$). Die Einführung einer dritten trisulfatierten Glucoseeinheit am nichtreduzierenden Ende der Pentasaccharidsequenz war mit der Erkennung von AT III vereinbar ($K_d(\mathbf{1}) = 0.8 \pm 0.3 \text{ nm}$). Der Ersatz von L-Iduronsäure durch D-Glucuronsäure führte dagegen zu einer deutlichen Verringerung der Affinität ($K_d(\mathbf{2}) = 3.4 \pm 0.3 \mu\text{m}$). Der umgekehrte Austausch von D-Glucuronsäure durch L-Iduronsäure entsprach – auch wenn auch hier die Affinität für AT III geringer war – sehr gut unserem obigen Kriterium (c) der relativen Affinität, weil die Affinität von **3**



Schema 5. a) TMSOTf, CH_2Cl_2 , -20°C , 30 min, 69%; b) 1M $\text{NH}_2\text{NH}_2/\text{H}_2\text{O}$ in Pyridin/AcOH (3/2), 15 min, 95%; c) wie a), 63%; d) H_2 , 10% Pd/C, MeOH, 24 h; e) 0.5 M NaOH, 5 h, 99% (bezogen auf 10); f) Pyridin:SO₃, DMF, 55°C , 24 h, 95%.

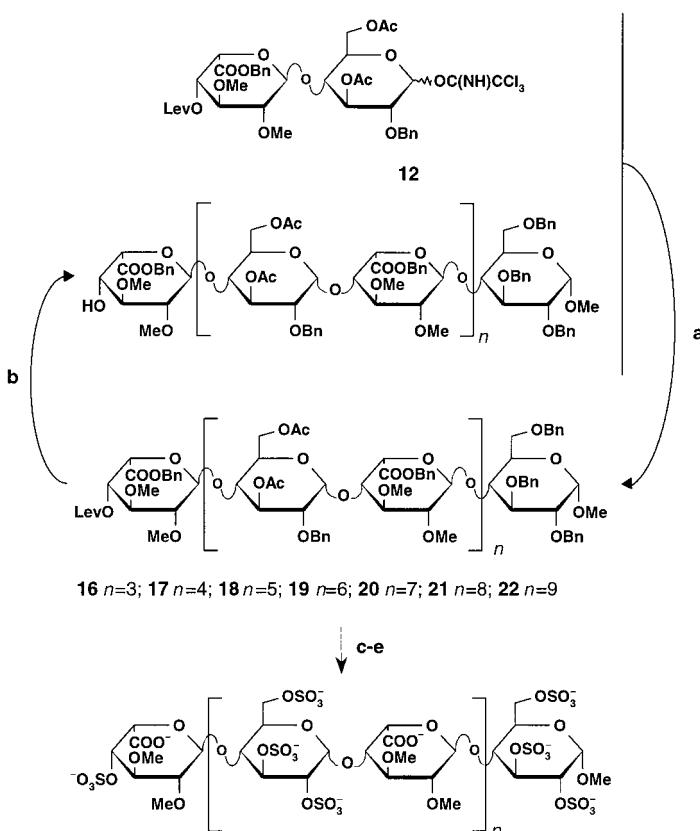


Schema 6. a) $\text{CF}_3\text{COOH}/\text{Ac}_2\text{O}/\text{AcOH}$, 60°C , 4 h, 67%; b) $\text{HOCH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$, THF, RT, 74%; c) CCl_4CN , K_2CO_3 , CH_2Cl_2 , RT, 1.5 h, 94%; d) 1M $\text{NH}_2\text{NH}_2/\text{H}_2\text{O}$ in Pyridin/AcOH (3/2), 15 min, 91%; e) $t\text{BuMe}_2\text{SiOSO}_2\text{CF}_3$ (TBDMSOTf), Toluol, 4-Å-Molekularsieb, -20°C , 30 min, 54%; f) wie d), 99%; g) wie e), 64%; h) H_2 , 10% Pd/C, MeOH, 24 h; i) 0.5 M NaOH, 5 h; j) Pyridin:SO₃, DMF, 55°C , 24 h, 60% (bezogen auf 15).

für AT III ($K_d = 0.35 \pm 0.01 \mu\text{m}$) der von Thrombin und Heparin ($1 \mu\text{m}$) sehr ähnelte.^[11] Wir erwarteten, daß 3 (es weist wie Heparin vier negative Ladungen pro Disaccharideinheit auf) eine ähnliche Affinität für Thrombin hat. Interessanterweise wies 3 ebenfalls eine signifikante Anti-Faktor-Xa-Aktivität auf ($325 \text{ units mg}^{-1}$). Erfreulicherweise beinhaltete die Synthese von 3 mehrere Glycosylierungen an der Position 4 eines L-Iduronsäurederivates, die nach unserer

Erfahrung mit einem Imidat als Glycosyldonor fast immer ausschließlich das erwünschte α -verknüpfte Produkt liefern.

Nachdem wir eine leicht aus einem einzigen Disaccharidbaustein aufbaubare ADB identifiziert hatten (11), strebten wir die Synthese von längeren Fragmenten an, die aus sich wiederholenden Disaccharideinheiten bestehen. Die Strategie zur Herstellung von 3 wurde, wie in Schema 7 gezeigt, auf die Synthese längerer Oligosaccharide übertragen: Das



Schema 7. a) TMSOTf, Toluol, 4-Å-Molekularsieb, -20°C , 30 min; b) 1M $\text{NH}_2\text{NH}_2/\text{H}_2\text{O}$ in Pyridin/AcOH (3/2), 15 min; c) H_2 , 10% Pd/C, MeOH, 24 h; d) 0.5 M NaOH, 5 h; e) Pyridin:SO₃, DMF, 55°C , 24 h.

Imidat 12 wurde als Glycosyldonor verwendet, um Disaccharideinheiten an den Glycosylacceptor anzuknüpfen, der durch die Spaltung des Lävulinsäureesters des Oligosaccharids aus dem jeweils vorhergehenden Schritt entstanden war.^[17] Der Prozeß wurde bis zur Bildung eines Eicosamers wiederholt. Die Strukturen der vollständig geschützten Intermediate (16-22) wurden Hochfeld-¹H-NMR-spektroskopisch und massenspektrometrisch aufgeklärt.^[15] Die Ausbeute in den jeweils anschließenden Kupplungsschritten betrug etwa 60% (nicht optimiert), ein β -verknüpftes Produkt trat in keinem Fall auf. Der deutliche Größenunterschied zwischen dem Glycosyldonor-Disaccharid einerseits und dem Glycosylacceptor und dem Reaktionsprodukt andererseits erleichterte die Isolierung einer Mischung aus nichtumgesetztem Acceptor und dem Produkt durch Gelpermeationschromatographie mit Dichlormethan/Ethanol erheblich. Diese Mischung konnte einer weiteren Glycosylierung unterworfen werden, um die

Ausbeute angesichts der teuren Acceptorien, die in den letzten Schritten der Kettenverlängerung eingesetzt werden, zu erhöhen. Die Schutzgruppenabspaltung der bei jedem Schritt erhaltenen Oligosaccharide (Deca- bis Eicosamer) beinhaltete, wie bei der Synthese der Hexasaccharide, die Hydrogenolyse und die Verseifung. Die vollständige Entfernung der Schutzgruppen wurde Hochfeld-¹H-NMR-spektroskopisch überprüft. Anschließend wurden die freien Hydroxygruppen sulfatiert. Die gewünschten sulfatierten Oligomere **23–28** wurden über diese drei Schritte in 49–86 % Ausbeute nach Gefriertrocknung als weiße Pulver erhalten. Ihre Reinheit wurde durch Kapillarelektrophorese bestimmt und ihre Struktur durch ¹H-NMR-Spektroskopie und Elektrospray-Ionisations-Massenspektrometrie (ESI-MS) aufgeklärt.^[15]

Diese Verbindungen wurden biologischen Tests unterworfen, um ihre Fähigkeit als Katalysator der Faktor-Xa-^[18] und Thrombininhibierung^[19] durch AT III zu bewerten (Tabelle 1). Alle diese Verbindungen enthalten eine ABD, die ihre Fähigkeit, an AT III zu binden, und ihre Anti-Faktor-Xa-

Tabelle 1. Eigenschaften der sulfatierten Iduronsäure-enthaltenden Oligosaccharide.

	3	23	24	25	26	27	28	Heparin
Saccharideinheiten	6	10	12	14	16	18	20	10–50
Molekulargewicht	2217	3606	4301	4995	5690	6384	7078	ca. 15000
Faktor-Xa-Inhibition ^[a]	325 (±16)	405 (±32)	360 (±29)	310 (±16)	359 (±29)	270 (±23)	236 (±19)	180
Thrombininhibition ^[b]	>10	>10	>10	>10	130	23	6.7 (113–133) (13–30)	3.3 (3–9) (3–4)

[a] [units mg⁻¹] (Standardabweichung) (n = 3). [b] IC₅₀ [ng mL⁻¹] (95 % Vertrauensintervall).

Aktivität erklärt. Die Hexa-, Deca-, Dodeca- und Tetradecasaccharide waren im Thrombininhibitionssassay inaktiv, während die Aktivität der Hexadeca-, Octadeca- und Eicosasaccharide in diesem Assay von deren Größe abhängig war. Die IC₅₀-Werte deuten darauf hin, daß das Eicosamer halb so wirksam wie gewöhnliches Heparin ist. Wahrscheinlich würde eine weitere Verlängerung der Kette die thrombininhibitorische Wirkung noch verstärken, worauf die höhere Aktivität von längeren Ketten (vergleiche **26–28**) hindeutet, die die wohlbekannte^[2] größere Fähigkeit von längeren Heparinfragmenten, Thrombin elektrostatisch anzuziehen, widerspiegelt.

Wir haben mit der Imidat-Glycosylierungsmethode^[13] Oligosaccharide synthetisiert, die sowohl die Anti-Faktor-Xa- als auch die Anti-Thrombin-AT-III-vermittelte Aktivität des Heparins aufweisen. Was die schon lange diskutierte Frage^[6] nach der für die Inhibition von Thrombin erforderliche Mindestgröße von Heparinfragmenten angeht, weisen die vorliegenden Ergebnisse auf Pentadeca- oder Hexadecasaccharid-Verbindungen hin.

Eingegangen am 25. Mai 1998 [Z11894]

Stichwörter: Enzyminhibitoren • Heparin • Oligosaccharide • Serinproteinasen • Wirkstoff-Forschung

[1] *Heparin* (Hrsg.: D. A. Lane, U. Lindahl), Edward Arnold, London, 1989.

[2] S. T. Olson, I. Björk, *Semin. Thromb. Hemost.* **1994**, 20, 373–409.

[3] a) U. Lindahl, G. Bäckström, L. Thunberg, I. G. Leder, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1980**, 77, 6551–6555; b) B. Casu, P. Oreste, G. Torri, G.

Zoppetti, J. Choay, J.-C. Lormeau, M. Petitou, P. Sinaÿ, *Biochem. J.* **1981**, 197, 599–609; c) J. Choay, J.-C. Lormeau, M. Petitou, P. Sinaÿ, J. Fareed, *Ann. NY Acad. Sci.* **1981**, 370, 644–649; d) L. Thunberg, G. Bäckström, U. Lindahl, *Carbohydr. Res.* **1982**, 100, 393–410.

[4] B. Casu, *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* **1985**, 43, 51–134.

[5] Übersicht: M. T. Stubbs, W. Bode, *Trends Biochem. Sci.* **1995**, 20, 23–28.

[6] 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, 15 467–15 473.

[7] Zu Beginn dieses Projektes war die relative Position der ABD und der TBD nicht bekannt. Die Ergebnisse von Kraftfeldrechnungen legten nahe, die ABD am nichtreduzierenden Ende zu verlängern.^[8a]

[8] a) P. D. J. Grootenhuis, P. Westerduin, D. Meuleman, M. Petitou, C. A. A. van Boeckel, *Nature Struct. Biol.* **1995**, 2, 736–739; b) 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.

[9] Übersichtsartikel über die Synthese von Heparin-Fragmenten: a) M. Petitou, C. A. A. van Boeckel, *Prog. Chem. Org. Nat. Prod.* **1992**, 60, 143–210; b) C. A. A. van Boeckel, M. Petitou, *Angew. Chem.* **1993**, 105, 1741–1761; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1993**, 32, 1671–1690; c) M. Petitou, C. A. A. van Boeckel, *Pure Appl. Chem.* **1997**, 67, 1839–1846.

[10] a) G. Jaurand, J. Basten, I. Lederman, C. A. A. van Boeckel, M. Petitou, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1992**, 2, 897–900; b) J. Basten, G. Jaurand, B. Olde-Hanter, M. Petitou, C. A. A. van Boeckel, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1992**, 2, 901–904; c) J. Basten, G. Jaurand, B. Olde-Hanter, P.

Duchaussoy, M. Petitou, C. A. A. van Boeckel, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1992**, 2, 905–910.

[11] S. T. Olson, *J. Biol. Chem.* **1988**, 263, 1698–1708.

[12] 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. Overkift, *Bioorg. Med. Chem.* **1994**, 2, 1267–1280.

[13] R. R. Schmidt, W. Kinzy in *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.*, Vol. 50 (Hrsg.: D. Horton), Academic Press, London, **1994**, S. 21–123.

[14] M. Petitou, P. Duchaussoy, G. Jaurand, F. Gourvenec, I. Lederman, J.-M. Strassel, T. Barz, B. Crépon, J.-P. Héault, J.-C. Lormeau, A. Bernat, J.-M. Herbert, *J. Med. Chem.* **1997**, 40, 1600–1607.

[15] Alle neuen Verbindungen wurden ¹H-NMR-spektroskopisch und massenspektrometrisch, einige darüber hinaus auch durch HPLC charakterisiert. Verbrennungsanalysen wurden nur mit den Disaccharidbausteinen systematisch durchgeführt. Ausgewählte analytische Daten: ¹H-NMR wurde bei 500 MHz in D₂O (externer Standard TSP; für polare Verbindungen) oder in CDCl₃ (interner Standard TMS) durchgeführt. Die NMR-Daten werden beginnend mit den anomeren Protonen der nichtreduzierenden (NR) bis hin zu denen der reduzierenden Endeinheiten (R) angegeben. Die MS-Daten wurden durch Flüssigkeits-Sekundärionen-Massenspektrometrie (LSI-MS) oder ESI-MS erhalten. **1:** ¹H-NMR: δ (*J*_{1,2} [Hz]) = 4.64 (7.5; NR), 5.52 (3.7; NR-1), 4.63 (8.1; NR-2), 5.48 (3.5; R-2), 5.10 (6.5; R-1), 5.10 (3.5; R); LSI-MS: *m/z*: 2280.4 [*M* – Na]⁺; $[\alpha]_D$ = +30 (c = 1 in H₂O). **2:** ¹H-NMR: δ (*J*_{1,2} [Hz]) = 4.66 (ca. 8; NR), 5.54 (3.7; NR-1), 4.64 (ca. 8; NR-2), 5.54 (3.7; R-2), 4.63 (ca. 8; R-1), 5.14 (3.6; R); LSI-MS: *m/z*: 2192.8 [*M* – Na]⁺; $[\alpha]_D$ = +43 (c = 0.7 in H₂O). **3:** ¹H-NMR: δ (*J*_{1,2} [Hz]) = 5.10 (ca. 1; NR), 5.41 (ca. 3; NR-1), 5.06 (2.2; NR-2), 5.41 (ca. 3; R-2), 5.09 (ca. 1; R-1), 5.15 (3.7; R); LSI-MS: *m/z*: 2192.6 [*M* – Na]⁺; $[\alpha]_D$ = +28 (c = 1 in H₂O). **7:** ¹H-NMR: δ (*J*_{1,2} [Hz]) = 4.16 (8; NR), 5.43 (3.5; NR-1), 4.03 (8; NR-2), 4.88 (ca. 3; R-2), 5.47 (6.1; R-1), 5.05 (ca. 3; R); $[\alpha]_D$ = +76 (c = 0.3 in CH₂Cl₂). **10:** ¹H-NMR: δ (*J*_{1,2} [Hz]) = 4.17 (ca. 8; NR), 5.39 (3.8; NR-1), 4.20 (ca. 8; NR-2), 5.33 (3.6; R-2), 4.14 (ca. 8; R-1), 4.56 (3.5; R); $[\alpha]_D$ = +86 (c = 0.6 in

CH_2Cl_2). **15:** $^1\text{H-NMR}$: δ ($J_{1,2}$ [Hz]) = 4.90 (4.3; NR), 5.10 (3.9; NR-1), 5.23 (6.5; NR-2), 5.12 (3.9; R-2), 4.89 (6.8; R-1), 4.56 (ca. 3; R); $[\alpha]_D$ = +23 ($c = 0.5$, CH_2Cl_2). – Die $^1\text{H-NMR}$ -Spektren von **16–22** ähneln sich in Hinblick auf die chemischen Verschiebung sehr stark; wie erwartet variieren nur die relativen Intensitäten der Signale. Die folgenden Signale wurden für die unterscheidbaren anomeren Protonen gemessen: δ ($J_{1,2}$ [Hz]) = 4.92 (4–4.3; NR), 5.10 (3.3–3.5; NR-1), 5.26 (6–7; R-1), 4.56 (3.5; R). Die optischen Drehwerte von **16–22** lagen alle im Bereich +20–22 ($c = 0.5$ –1 in H_2O). Positiv-Ionen-LSI-MS (Thioglycerin + NaCl/Thioglycerin + KF): **16:** m/z : 2771/2787; **17:** m/z : 3402/3418; **18** (nach Abspaltung der Lävulinsäuregruppe): m/z : 3934/3950; **19:** m/z : 4664/4680; **20:** m/z : nicht bestimmt/5310; **21:** m/z : nicht bestimmt/5940. – Die $^1\text{H-NMR}$ -Spektren von **23–28** ähneln sich in Hinblick auf die chemischen Verschiebung sehr stark; wie erwartet variieren nur die relativen Intensitäten der Signale. Die folgenden Signale wurden für die unterscheidbaren anomeren Protonen gemessen: δ ($J_{1,2}$ [Hz]) = 5.08–5.11 (1–2; NR), 5.38–5.41 (3–4; NR-1), 5.04–5.09 (1–2; CNR), 5.40–5.42 (3–4; CR), 5.05–5.09 (1–2; R-1), 5.10–5.15 (3.5; R). Die optischen Drehwerte lagen alle im Bereich +27–34 ($c = 0.4$ –0.6 in H_2O); ESI-MS (monoisotope Masse/Durchschnittsmasse/experimentelle Masse \pm Standardabweichung): **23:** m/z : 3603.5/3606.3/3605.13 \pm 0.9; **24:** m/z : 4297.5/4300.7/4296.8 \pm 0.9; **25:** m/z : 4991.4/4995.2/4993.0 \pm 2.2; **26:** m/z : 5685.3/5689.6/5687.6 \pm 2.3; **27:** m/z : 6379.2/6384.1/6381.4 \pm 3.2; **28:** m/z : 7073.1/7078.5/7077.3 \pm 3.2.

- [16] D. H. Atha, J.-C. Lormeau, M. Petitou, R. D. Rosenberg, J. Choay, *Biochemistry* **1987**, *26*, 6454–6461
- [17] Alternativ wurden ein Tetrasaccharid-Donor oder ein Hexasaccharid-Donor verwendet, die aus dem gleichen Disaccharid-Grundbaustein hergestellt wurden.
- [18] A. N. Teien, M. Lie, *Thromb. Res.* **1977**, *10*, 399–410.
- [19] J.-M. Herbert, J.-P. Héault, A. Bernat, R. G. M. van Amsterdam, G. M. T. Vogel, J.-C. Lormeau, M. Petitou, D. G. Meuleman, *Circ. Res.* **1996**, *76*, 590–600.

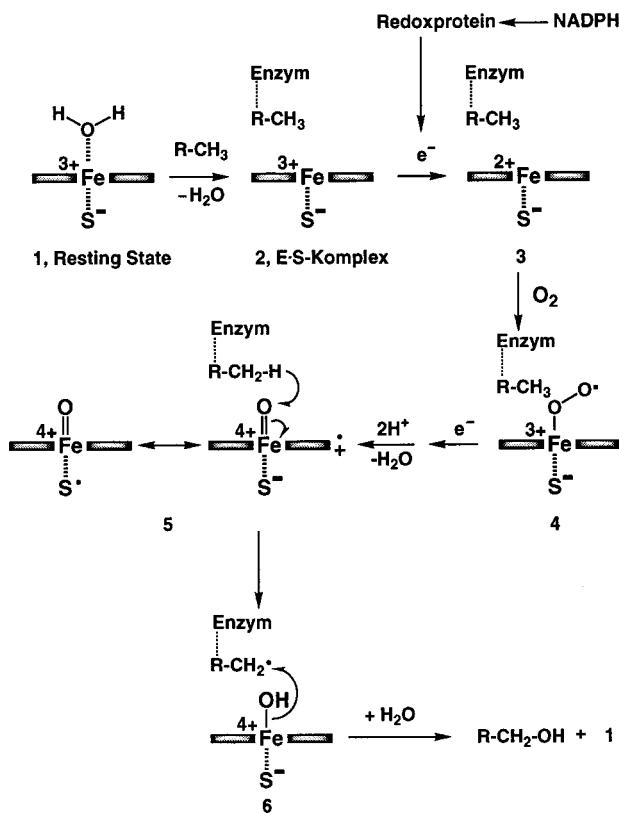
Zum Problem des Low-spin-Charakters von Cytochrom P450_{cam} im „Resting State“ – Untersuchungen von Enzymmodellen mit Puls-EPR- und ENDOR-Spektroskopie**

Hamed Aissaoui, Rainer Bachmann, Arthur Schweiger und Wolf-Dietrich Woggon*

Die in vielen Organismen vorkommenden Cytochrom-P450-Enzyme gehören zu den Häm-Thiolat-Proteinen und sind für den Metabolismus endogener und exogener Verbindungen von großer Bedeutung.^[1] Die ungewöhnliche Reaktivität dieser Enzyme beruht auf einem Eisen(III)-Protoporphyrin-IX-Komplex, der via Wasserstoffbrückenbindungen der beiden Propionsäureseitenketten und durch einen Thiolatliganden an das Protein gebunden ist. Der Thiolat-

gand koordiniert das Eisenzentrum von der proximalen Seite des Porphyrins und stammt von einem Cysteinrest einer konservativen Proteindomäne.

Die Kenntnis über verschiedene Zwischenprodukte des Katalysecyclus von Cytochrom P450 (Schema 1) beruht im wesentlichen auf Röntgenstrukturanalysen verschiedener



Schema 1. Katalysecyclus von Cytochrom P450.

Formen von Cytochrom P450_{cam}^[2,3] sowie auf zahlreichen Untersuchungen geeigneter Modellverbindungen.^[4] Demnach enthält der „Resting State“ von Cytochrom P450_{cam} **1** sechs Moleküle Wasser in der Substratbindungsdomäne, wovon eines direkt das Eisenzentrum koordiniert. Die Bindung des natürlichen Substrates Campher führt zu einer Entfernung sämtlicher Wassermoleküle, offenbar aber nicht durch den Substrateintrittskanal. Kürzlich durchgeführte Untersuchungen legen nahe, daß die Bindung von Campher mit einer Konformationsänderung im Bereich der Propionatseitenketten einhergeht. Es scheint, daß Arg299, das eine Salzbrücke mit einem der Propionate bildet, diese Veränderung auslöst, so daß an der proximalen Häm-Seite ein Wasseraustrittskanal zur Proteinoberfläche entsteht.^[5]

Die Veränderung der Ligandensphäre des Eisens ist begleitet von einem Wechsel des Spingleichgewichtes von >96 % Low-spin-Fe^{III} im „Resting State“ **1** zum Fe^{III} des E·S-Komplexes **2** mit überwiegendem High-spin-Charakter.^[6] Gleichzeitig verändert sich das Redoxpotential des Häm-Thiolat-Proteins von –300 mV für **1** zu –175 mV für **2**. Diese anodische Verschiebung ist essentiell für die Aufnahme eines Elektrons von NADPH über das Redoxprotein

[*] Prof. Dr. W.-D. Woggon, Dipl.-Chem. H. Aissaoui
Institut für Organische Chemie der Universität
St.-Johanns-Ring 19, CH-4056 Basel (Schweiz)
Fax: (+41) 61-267-11-02
E-mail: woggon@wolfi.chemie.unibas.ch

Dr. R. Bachmann, Prof. Dr. A. Schweiger
Laboratorium für Physikalische Chemie, Eidgenössische Technische Hochschule, CH-8092 Zürich (Schweiz)

[**] Diese Arbeit wurde vom Schweizerischen Nationalfonds zur Förderung der wissenschaftlichen Forschung unterstützt. Wir danken Gunnar Jeschke für hilfreiche Diskussionen.