

- [1] J.-M. Lehn, *Supramolecular Chemistry*, VCH, Weinheim, 1995.
- [2] a) G. M. Whitesides, J. P. Mathias, C. T. Seto, *Science* **1991**, 254, 1312–1319; b) J. Rebek, Jr., *Angew. Chem.* **1990**, 102, 261–272; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1990**, 29, 245–255.
- [3] a) S. Subramanian, M. J. Zaworotko, *Coord. Chem. Rev.* **1994**, 137, 357–401; b) O. Ermer, *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, 110, 3747–3754.
- [4] a) M. C. Etter, *Acc. Chem. Res.* **1990**, 23, 120–126; b) C. B. Aakeröy, K. R. Seddon, *Chem. Soc. Rev.* **1993**, 26, 397–407.
- [5] I. Weissbuch, R. P. Biro, M. Lahav, L. Leiserowitz, *Acta Crystallogr. Sect. B* **1995**, 51, 115–148.
- [6] a) G. R. Desiraju, *Crystal Engineering: The Design of Organic Solids*, Elsevier, Amsterdam, 1989; b) G. R. Desiraju, *Angew. Chem.* **1995**, 107, 2541–2558; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1995**, 34, 2311–2327.
- [7] J. C. MacDonald, G. M. Whitesides, *Chem. Rev.* **1994**, 94, 2383–2420.
- [8] a) M. J. Zaworotko, *Chem. Soc. Rev.* **1994**, 137, 283–288; b) A. D. Burrows, C.-W. Chan, M. M. Chowdhry, J. E. McGrady, D. M. P. Mingos, *Chem. Soc. Rev.* **1995**, 138, 329–339.
- [9] S. W. Kaiser, R. B. Saillant, W. M. Butler, P. G. Rasmussen, *Inorg. Chem.* **1976**, 15, 2681–2687.
- [10] M. Tadokoro, J. Toyoda, K. Isobe, T. Itoh, A. Miyazaki, T. Enoki, K. Nakasui, *Chem. Lett.* **1995**, 613–614.
- [11] M. M. Chowdhry, D. M. P. Mingos, A. J. P. White, D. J. Williams, *Chem. Commun.* **1996**, 899–900.
- [12] Kristallstrukturanalysen – allgemeines: Die kristallographischen Daten (ohne Strukturfiguren) der in dieser Veröffentlichung beschriebenen Strukturen wurden als „supplementary publication no. CCDC-103363–103366“ beim Cambridge Crystallographic Data Centre hinterlegt. Kopien der Daten können kostenlos bei folgender Adresse in Großbritannien angefordert werden: CCDC, 12 Union Road, Cambridge CB2 1EZ (Fax: (+44) 1223-336-033; E-mail: deposit@ccdc.cam.ac.uk). a) Kristallstrukturanalyse von **1**:  $C_{22}H_{31}O_2N_{13}Ni_2$ ,  $M_r = 568.27$ , trigonal, Raumgruppe  $P\bar{3}$  (Nr. 147),  $a = 11.167(2)$ ,  $c = 13.206(4)$  Å,  $V = 1426.1(3)$  Å<sup>3</sup>,  $Z = 2$ ,  $\rho_{\text{ber.}} = 1.323$  g cm<sup>-3</sup>,  $F(000) = 596$ , 106 Parameter;  $R_1 = 0.060$ ,  $R_w = 0.080$ , GOF = 1.55 für alle 1613 Daten ( $I > 3\sigma(I)$ ); max./min. Restelektronendichte: 0.79/–0.36 e Å<sup>-3</sup>. Diffraktometer: Rigaku AFC5R;  $\mu(\text{MoK}\alpha) = 7.24$  cm<sup>-1</sup>; LP-Korrektur; 3094 gemessene Reflexe; Lösung und Verfeinerung der Struktur mit den Programmen PATTY und DIRDIF92; Verfeinerung gegen  $F_o$  nach der Volle-Matrix-kleinste-Fehlerquadrate-Methode. b) Kristallstrukturanalyse von **2**:  $C_{62}H_{94}O_2N_{26}Ni_2$ ,  $M_r = 1353.00$ , orthorhombisch, Raumgruppe  $Pca2_1$  (Nr. 29),  $a = 18.667(2)$ ,  $b = 23.7236(8)$ ,  $c = 16.786(1)$  Å,  $V = 7433.6(8)$  Å<sup>3</sup>,  $Z = 4$ ,  $\rho_{\text{ber.}} = 1.209$  g cm<sup>-3</sup>,  $F(000) = 2880$ , 829 Parameter;  $R_1 = 0.065$ ,  $R_w = 0.079$ , GOF = 1.63 für alle 2803 Daten ( $I > 3\sigma(I)$ ); max./min. Restelektronendichte: 0.44/–0.27 e Å<sup>-3</sup>. Diffraktometer: Nonius CAD4;  $\mu(\text{CuK}\alpha) = 10.90$  cm<sup>-1</sup>; LP-Korrektur; 7729 gemessene Reflexe; Lösung und Verfeinerung der Struktur mit den Programmen SAPI91 und DIRDIF94; Verfeinerung gegen  $F_o$  nach der Volle-Matrix-kleinste-Fehlerquadrate-Methode. c) Kristallstrukturanalyse von **3**:  $C_{41}H_{67}O_{11}N_{12}NiK$ ,  $M_r = 1001.85$ , monoklin, Raumgruppe  $C2/m$  (Nr. 12),  $a = 19.077(3)$ ,  $b = 29.074(3)$ ,  $c = 9.769(3)$ ,  $\beta = 110.39(2)^\circ$ ,  $V = 5078(1)$  Å<sup>3</sup>,  $Z = 4$ ,  $\rho_{\text{ber.}} = 1.310$  g cm<sup>-3</sup>,  $F(000) = 2128$ , 287 Parameter;  $R_1 = 0.057$ ,  $R_w = 0.073$ , GOF = 1.77 für alle 1484 Daten ( $I > 3\sigma(I)$ ); max./min. Restelektronendichte: 0.29/–0.29 e Å<sup>-3</sup>. Diffraktometer: Rigaku AFC7R;  $\mu(\text{CuK}\alpha) = 18.38$  cm<sup>-1</sup>; LP-Korrektur; 4004 gemessene Reflexe; Lösung und Verfeinerung der Struktur mit den Programmen PATTY und DIRDIF94; Verfeinerung gegen  $F_o$  nach der Volle-Matrix-kleinste-Fehlerquadrate-Methode. d) Kristallstrukturanalyse von **4**:  $C_{60}H_{84}O_2N_{30}Ni_2$ ,  $M_r = 1374.92$ , tetragonal, Raumgruppe  $P4_22_1$  (Nr. 92),  $a = 19.061(1)$ ,  $c = 38.474(2)$  Å,  $V = 13977(1)$  Å<sup>3</sup>,  $Z = 8$ ,  $\rho_{\text{ber.}} = 1.307$  g cm<sup>-3</sup>,  $F(000) = 5808$ , 778 Parameter;  $R_1 = 0.075$ ,  $R_w = 0.109$ , GOF = 1.83 für alle 3213 Daten ( $I > 3\sigma(I)$ ); max./min. Restelektronendichte: 0.80/–0.36 e Å<sup>-3</sup>. Diffraktometer: Rigaku AFC7R;  $\mu(\text{CuK}\alpha) = 11.89$  cm<sup>-1</sup>; LP-Korrektur; 5374 gemessene Reflexe; Lösung und Verfeinerung der Struktur mit den Programmen SHLXS86 und DIRDIF94; Verfeinerung gegen  $F_o$  nach der Volle-Matrix-kleinste-Fehlerquadrate-Methode.
- [13] J. S. Moore, S. Lee, *Chem. Ind.* **1994**, 556–560.
- [14] L. Carlucci, G. Ciani, D. M. Proserpio, A. Sironi, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, 117, 4562–4569.

## Bioaffinitäts-NMR-Spektroskopie – Identifizierung eines E-Selectin-Antagonisten in einem Substanzgemisch durch Transfer-NOE\*\*

Dirk Henrichsen, Beat Ernst, John L. Magnani, Wei-Tong Wang, Bernd Meyer\* und Thomas Peters\*

Bei der körpereigenen Bekämpfung von Gewebeläsionen oder mikrobiellen Infektionen spielen Leukozyten eine zentrale Rolle. Damit diese ihre Abwehrfunktion ausüben können, müssen sie gezielt in die betroffenen Gewebebereiche gelangen. Der erste Schritt in dieser inflammatorischen Kaskade ist die durch Cytokine vermittelte Expression von P- und E-Selectin, die, auf der Oberfläche von Endothelzellen plaziert, spezifisch mit Liganden auf Leukozytenoberflächen wechselwirken. Bei E-Selectin ist dies der ESL – 1- und bei P-Selectin der PSGL – 1-Ligand.<sup>[1]</sup> Die spezifischen Wechselwirkungen zwischen Selectinen und Liganden bewirken zunächst ein „Rolling“ der Leukozyten, das zu weiteren spezifischen Wechselwirkungen mit anderen membranständigen Proteinen führt und schließlich eine Auswanderung der Leukozyten in das betroffene Gewebe verursacht. In pathologischen Situationen, wie etwa bei Myocardinfarkt, Transplantation oder rheumatoider Arthritis, ist die Unterbindung der inflammatorischen Kaskade wünschenswert. Daher konzentrieren sich viele Bemühungen auf die Herstellung von potenten P- oder E-Selectin-Antagonisten.<sup>[2]</sup> Im Falle von E-Selectin konnte kürzlich die bioaktive Konformation des Sialyl-Lewis<sup>x</sup>-Mimetikums **2** mit Hilfe von Transfer-NOE-Experimenten aufgeklärt werden.<sup>[3]</sup> Es zeigte sich, daß die bioaktive Konformation dieses Antagonisten große Ähnlichkeit mit der bioaktiven Konformation von Sialyl-Lewis<sup>x</sup> **1** (siehe Schema 1) hat.<sup>[4]</sup>

Bei der Suche nach Sialyl-Lewis<sup>x</sup>-Mimetika ist man, wie generell bei der Suche nach Wirkstoffen, auf Screeningverfahren angewiesen, die die rasche Identifizierung von Verbindungen als Leitsubstanzen ermöglichen. Ein von uns

[\*] Prof. Dr. B. Meyer

Institut für Organische Chemie der Universität Hamburg  
Martin-Luther-King-Platz 6, D-20146 Hamburg  
Fax: (+49) 40-4123-2878  
E-mail: bernd.meyer@sg1.chemie.uni-hamburg.de

Prof. Dr. T. Peters, Dipl.-Chem. D. Henrichsen  
Institut für Chemie der Medizinischen Universität  
Ratzeburger Allee 160, D-23538 Lübeck  
Fax: (+49) 451-500-4241  
E-mail: tp@chemie.mu-luebeck.de

Prof. Dr. B. Ernst<sup>[+]</sup>  
Novartis Pharma AG  
St. Johann S-507.1.52, CH-4002 Basel (Schweiz)  
Dr. J. L. Magnani, Dr. W.-T. Wang  
GlycoTech Corp.  
14915 Brochart Rd., Rockville, MD 20850 (USA)

[+] Gegenwärtige Adresse:

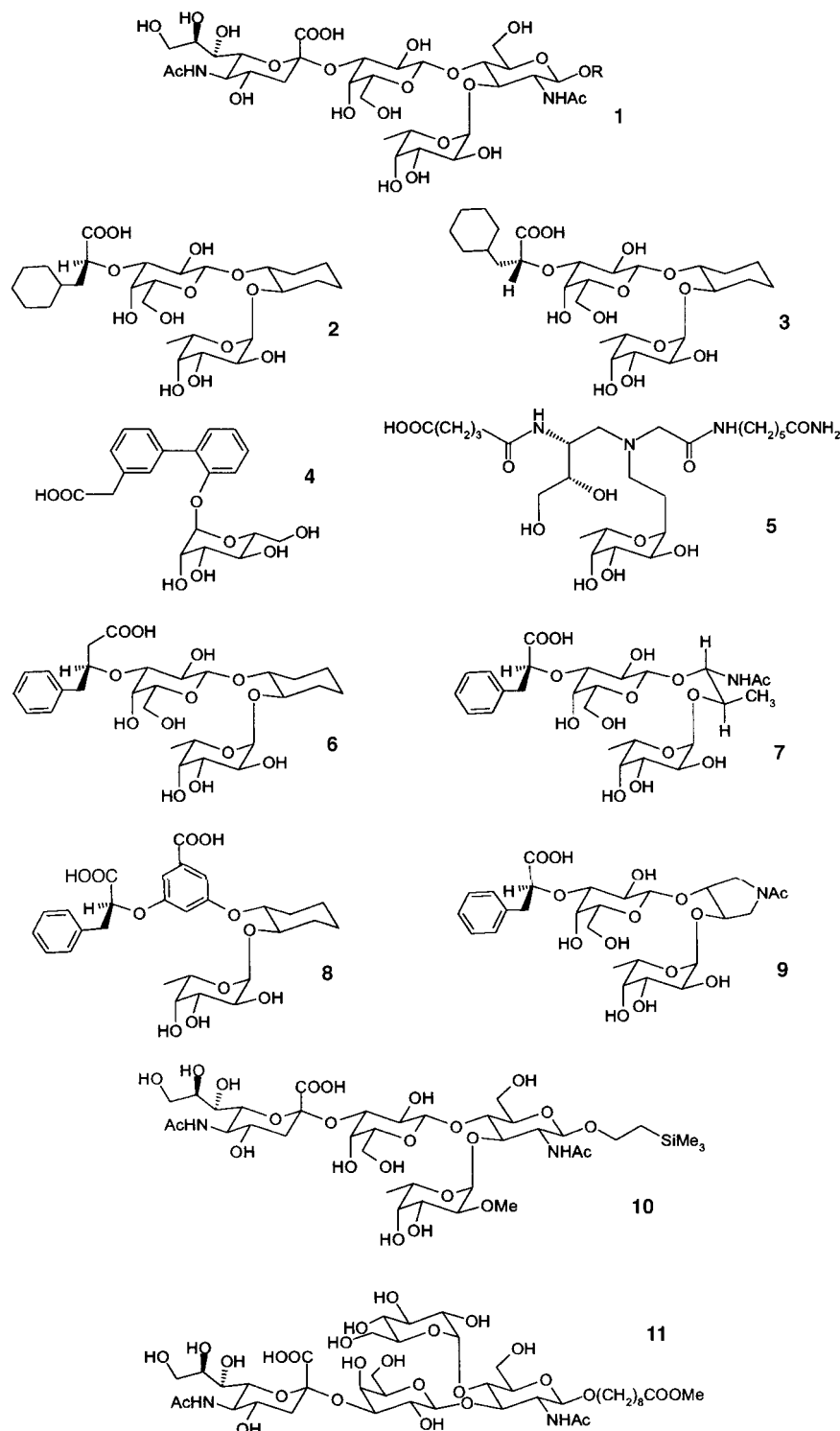
Universität Basel, Institut für Pharmazie  
Totengässlein 3, CH-4051 Basel (Schweiz)

[\*\*] Diese Arbeit wurde vom BMBF (FKZ 031161 und 0311395), von der Deutschen Forschungsgemeinschaft (Sonderforschungsbereich 470, Teilprojekt B3) und vom Fonds der Chemischen Industrie gefördert. Dr. T. Keller und Dr. G. Wolff (Bruker Analytik GmbH, Rheinstetten) danken wir für exzellente Unterstützung.

kürzlich beschriebenes Verfahren – die „Bioaffinitäts-NMR-Spektroskopie“ – basiert auf der selektiven Detektion von Transfer-NOEs (trNOEs),<sup>[5]</sup> d.h., es nutzt die Tatsache, daß kleine Moleküle (relative Molekülmasse bis ca. 2 kDa) bei der Bindung an ein Rezeptorprotein stark negative trNOEs zeigen und so von nichtbindenden Molekülen mit schwach positiven NOEs unterschieden werden können. Es ist weder eine Isotopenmarkierung des Proteins erforderlich, noch gibt es eine Beschränkung für die relative Molekülmasse des Rezeptorproteins. Leitsubstanzen in der pharmakologischen Forschung haben idealerweise relative Molekülmassen unter 1 kDa und sind daher prinzipiell gut mit Hilfe des genannten Verfahrens identifizierbar. Da sich trNOEs hervorragend für die Analyse bioaktiver Konformationen<sup>[6]</sup> eignen, sollte zudem die Analyse bioaktiver Konformationen von Liganden in Substanzgemischen möglich sein.

Für kleinere Proteine (<30 kDa) wurde in den letzten Jahren ein anderes Verfahren vorgestellt, das darauf beruht, daß ligandeninduzierte Änderungen der <sup>15</sup>N-chemischen Verschiebungen von Aminosäuren in der Bindungsstelle mit Hilfe von <sup>15</sup>N-HSQC-Spektroskopie beobachtet werden.<sup>[7]</sup> Wir konnten dieses Verfahren allerdings nicht anwenden, da das rekombinant gewonnene E-Selectin, das als IgG-Chimäre vorliegt, eine relative Molekülmasse von ca. 220 kDa hat und damit weit oberhalb des für die <sup>15</sup>N-HSQC-Spektroskopie zugänglichen Bereichs liegt.

Im folgenden zeigen wir, daß mit der Bioaffinitäts-NMR-Spektroskopie bioaktive Komponenten auch dann identifiziert werden können, wenn strukturell verwandte Liganden in einer Bibliothek zugegen sind. Die gewählte Substanzbibliothek bestand aus zehn Verbindungen (2–11, Schema 1), von denen sieben eine vom Lewis<sup>a</sup>- oder Lewis<sup>x</sup>-Motiv abgeleitete Grundstruktur haben (2, 3, 6, 7, 9, 10, 11). Dabei sind die Tetrasaccharide 10 und 11 nur sehr gering modifizierte Derivate des Sialyl-Lewis<sup>x</sup>- bzw. Sialyl-Lewis<sup>a</sup>-Tetrasaccharids. 10 unterscheidet sich von Sialyl-Lewis<sup>x</sup> 1 lediglich dadurch, daß die 2-Hydroxyfunktion der L-Fucose als Methylether vorliegt. Das Sialyl-Lewis<sup>a</sup>-Derivat 11 enthält statt der L-Fucose eine L-Galactose. Die Verbindungen 4,<sup>[8]</sup> 5 und 8 sind weiter vereinfachte Sialyl-Lewis<sup>x</sup>-Mimetika, die einzig



Schema 1. Formeln der in der Substanzbibliothek vorhandenen Verbindungen 2–11 im Vergleich zur Sialyl-Lewis<sup>x</sup>-Grundstruktur 1.

den Fucoserest und die Carboxygruppe der natürlichen Verbindung 1 als potentiell Wirkprinzip enthalten.

Von dieser Ligandenbibliothek wurden NOESY-Spektren bei mehreren Temperaturen aufgenommen. Es zeigte sich, daß einige Liganden bei Raumtemperatur schwach negative NOEs, die meisten aber schwach positive NOEs aufweisen, wie es für niedermolekulare Verbindungen typisch ist. Bei

310 K wurden keine negativen NOEs mehr beobachtet, so daß bei dieser Temperatur eine klare Unterscheidung zwischen trNOEs (negatives Vorzeichen) und NOEs (positives Vorzeichen) möglich war. Das NOESY-Spektrum des Substanzgemisches zeigte erwartungsgemäß ein komplexes Signalmuster, das die Identifizierung einzelner Komponenten unmöglich machte (Abbildung 1, links).

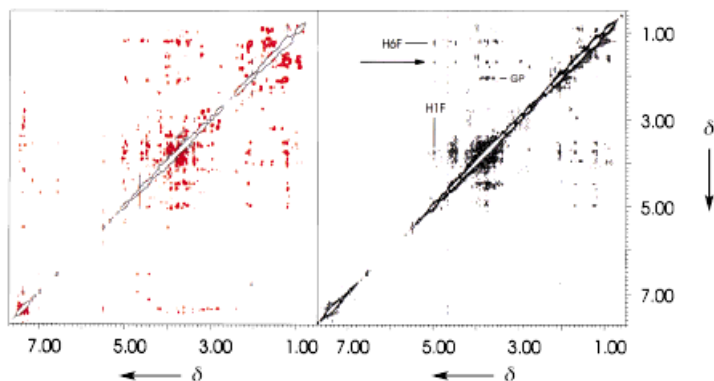


Abbildung 1. Links: 2D-NOESY-Spektrum des Substanzgemisches in  $D_2O$  bei 310 K. Die Mischzeit betrug 900 ms. Es traten ausschließlich positive NOEs (rot) auf. Rechts: 2D-trNOESY-Spektrum des Substanzgemisches in Gegenwart von E-Selectin bei einer Mischzeit von 300 ms und einer Temperatur von 310 K. Es wurde ein Spinlockfilter<sup>[10]</sup> von 15 ms verwendet. Das Molverhältnis von Bindungsstellen zu Liganden war 1:15 (siehe Experimentelles). Die gezeigten Kreuzsignale sind negativ (trNOEs) und können der bioaktiven Komponente **2** zugeordnet werden. Es sind ausschließlich negative Kreuzsignale (schwarz) dargestellt. Kreuzsignale, die durch Spindiffusion hervorgerufen wurden, sind mit einem Pfeil gekennzeichnet. GP kennzeichnet Signale des Glycananteils von E-Selectin.

Für die trNOE-Experimente wurde das rekombinante E-Selectin/hIgG enzymatisch deglycosyliert, da bekannt war, daß die Signale der kovalent gebundenen Sialyl-*N*-acetylglucosaminketten die trNOE-Messungen stören.<sup>[4]</sup> Die Behandlung mit Glycopeptidase F (PNGase F) und Neuraminidase aus *Clostridium perfringens* konnte den Anteil kovalent gebundener Kohlenhydratketten auf etwa ein Sechstel reduzieren. Die Sialinsäurereste wurden dabei zu mehr als 90 % entfernt. Die anschließende Behandlung mit  $\beta$ -Galactosidase aus *E. coli* führte zu einer Reduzierung der E-Selectin-Aktivität auf etwa 10 %, so daß eine weitere Deglycosylierung nicht möglich war. NOESY-Spektren des deglycosylierten E-Selectins zeigten, daß die üblicherweise intensiven  $^1H$ -NMR-Signale der Sialinsäurereste nahezu verschwunden waren, während die *N*-Acetylglucosaminsignale weiterhin einen Störfaktor darstellten.

Bei 310 K wurden trnoesy-Spektren der Ligandenbibliothek in unterschiedlich hohem Überschuß relativ zu deglycosyliertem E-Selectin aufgenommen, um sicherzustellen, daß für Komponenten, die in unterschiedlichen Konzentrationen in der Mischung zugegen sind, günstige Verhältnisse für die Beobachtung potentieller trNOEs vorliegen. Die Verhältnisse waren 5:1, 8:1, 12:1, 15:1 und 20:1. In allen Fällen konnten trNOEs beobachtet werden, wobei sich ein Überschuß von 15:1 als optimal (maximale trNOEs) erwies.

Ein Vergleich des NOESY-Spektrums der freien Bibliothek (Abbildung 1, links) mit dem trNOESY-Spektrum der Biblio-

thek in Gegenwart von E-Selectin (Abbildung 1, rechts) zeigt, daß die Mehrzahl der Kreuzsignale im trNOESY-Spektrum fehlt (sie treten unter diesen Meßbedingungen als schwach positive NOEs in Erscheinung, die dadurch leicht von den stark negativen trNOEs unterschieden werden können). Beispielsweise werden im Bereich der chemischen Verschiebungen aromatischer Protonen keine trNOEs beobachtet, so daß die Verbindungen **4**, **6**, **7**, **8** und **9** als bioaktive Komponenten ausscheiden. Auch fehlen die für *N*-Acetylneuraminsäurereste typischen Signalmuster, z. B. die Kreuzsignale zwischen den geminal angeordneten Protonen an C3 der *N*-Acetylneuraminsäureeinheiten. Somit scheiden die Verbindungen **10** und **11** als bioaktive Komponenten ebenfalls aus. Verbindung **5**, die L-Fucose in C-glycosidischer Verknüpfung enthält, zeichnet sich durch das Vorhandensein von 13  $CH_2$ -Gruppen aus. Im trNOESY-Spektrum findet sich jedoch kein Anzeichen für eine derartige Vielzahl an  $CH_2$ -Gruppen. Somit ist das beobachtete trNOE-Kreuzsignalmuster entweder Verbindung **2** oder Verbindung **3** zuzuordnen. Beide sind von der natürlichen Sialyl-Lewis<sup>x</sup>-Struktur **1** abgeleitet, wobei der *N*-Acetylglucosaminrest durch einen Cyclohexandiolring (Cyc) und die *N*-Acetylneuraminsäure durch einen Cyclohexylmilchsäurerest (Lact) ersetzt ist. In **2** ist die Cyclohexylmilchsäure *S*- und in **3** *R*-konfiguriert. Eine Unterscheidung dieser beiden Verbindungen anhand des trNOE-Kreuzsignalmusters war nicht möglich. Hier wurde ein Vergleich mit den NOESY-Spektren der Einzelverbindungen erforderlich. Dieser ergab, daß es sich bei der bioaktiven Komponente um Verbindung **2** handelt, wie im folgenden näher ausgeführt wird.

Eine vollständige Zuordnung der  $^1H$ -NMR-Signale ist für das Sialyl-Lewis<sup>x</sup>-Mimetikum **2** bereits erfolgt,<sup>[3]</sup> und die bioaktive Konformation konnte mit Hilfe von trNOE-Experimenten ermittelt werden. Daher soll im folgenden nur die Zuordnung einiger wichtiger Signale kurz diskutiert werden. Besonders charakteristisch für die bioaktive Verbindung **2** sind die in Abbildung 2 gezeigten Ausschnitte aus dem NOESY- (links) und dem trNOESY-Spektrum (rechts). Es

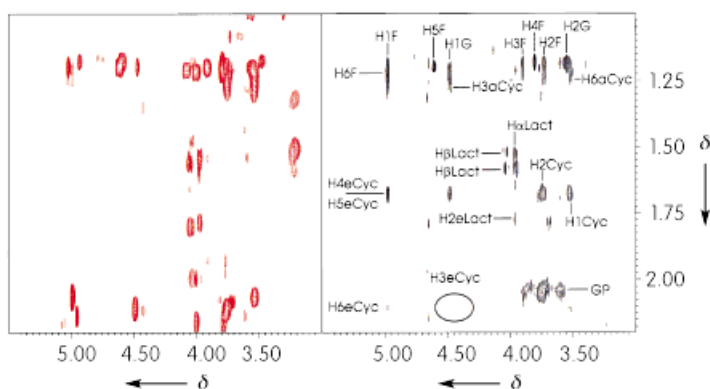


Abbildung 2. Links: Ausschnitt aus dem 2D-NOESY-Spektrum in Abbildung 1. Rechts: Ausschnitt aus dem 2D-trNOESY-Spektrum in Abbildung 1. Deutlich zu erkennen sind die für **2** typischen Kreuzsignalmuster, von denen einige beschriftet sind. Unter diesen Kreuzsignalen befinden sich interglycosidische trNOEs zwischen den anomeren Protonen von Fucose und Galactose und dem Cyclohexanring. Der eingekreiste Bereich weist auf die Auslöschung eines interglycosidischen trNOE durch Überlagerungen mit positiven NOEs der freien Bibliothek hin (siehe Diskussion im Text).

finden sich eine Reihe interglycosidischer trNOEs zwischen dem Cyclohexandiolring (Cyc) einerseits und der Fucose (F) sowie der Galactose (G) andererseits, von denen einige in Abbildung 2 gekennzeichnet sind. Von H1<sup>G</sup> ausgehend finden sich beispielsweise interglycosidische trNOEs nach H3a<sup>Cyc</sup>, H4a<sup>Cyc</sup>, H4e<sup>Cyc</sup> und H5e<sup>Cyc</sup>, von denen die letzten drei durch Spindiffusion im Cyclohexanring hervorgerufen werden. Auch der interglycosidische trNOE zwischen H2<sup>G</sup> und H6<sup>F</sup> ist zweifelsfrei zu erkennen. Ein weiterer charakteristischer trNOE zwischen Hα<sup>Lact</sup> und H3<sup>G</sup> wird ebenfalls beobachtet (im Ausschnitt von Abbildung 2 nicht zu sehen). Weitere für **2** typische Kreuzsignale werden sowohl innerhalb des Cyclohexanrings als auch innerhalb des Cyclohexylmilchsäurerests beobachtet, wie dies in Abbildung 2 angedeutet ist. Ausgehend von H1<sup>F</sup> finden sich interglycosidische trNOEs nach H6a<sup>Cyc</sup>, H6e<sup>Cyc</sup>, H4a<sup>Cyc</sup>, H4e<sup>Cyc</sup>, H5e<sup>Cyc</sup> und H3a<sup>Cyc</sup>. Da nur die Effekte nach H6a<sup>Cyc</sup> und H6e<sup>Cyc</sup> als „direkte“ trNOEs bezeichnet werden können, ist auch hier ein hoher Anteil an Spindiffusion vorhanden. Das Kreuzsignal für die per Spindiffusion vermittelte Konnektivität zwischen H1<sup>F</sup> und den Protonen H4e<sup>Cyc</sup> und H5e<sup>Cyc</sup> liegt auf einer Spur von weiteren Kreuzsignalen (diese ist in Abbildung 1, rechts mit einem Pfeil gekennzeichnet), die nahezu ausschließlich auf Spindiffusion zurückzuführen sind. Dies wird beim Vergleich mit dem NOESY-Spektrum der freien Bibliothek (Abbildung 2, links) deutlich, da dort diese Kreuzsignale fehlen. Ebenfalls auf Spindiffusion ist die Tatsache zurückzuführen, daß alle Protonen der Fucose intraglycosidische trNOEs zu der C6-Methylgruppe der Fucose zeigen (Abbildung 2, rechts). Während Spindiffusion für die strukturelle Charakterisierung biologischer Makromoleküle eher von Nachteil ist,<sup>[9]</sup> erleichtert sie hier die zweifelsfreie Zuordnung der bioaktiven Komponente **2** erheblich. Überlagerungen positiver NOE- und negativer trNOE-Kreuzsignale führen allerdings auch zur Auslöschung eines interglycosidischen NOE, nämlich des zwischen H1<sup>G</sup> und H3e<sup>Cyc</sup> (eingekreister Bereich in Abbildung 2, rechts).

Die mit „GP“ versehene Spur von Kreuzsignalen in Abbildung 1 und 2 ist für die freie Bibliothek nicht zu beobachten. Es handelt sich um Signale, die den *N*-Acetylgruppen der kovalent gebundenen *N*-Acetylactosaminreste in E-Selectin zugeordnet werden müssen. Dies ist durch Vergleich mit einem NOESY-Spektrum von E-Selectin unmittelbar ersichtlich. Offensichtlich filtert der bei der Aufnahme der trNOESY-Spektren zu Beginn der *t*<sub>1</sub>-Evolutionsperiode applizierte Spinlockpuls<sup>[10]</sup> zwar effektiv die störenden Proteinsignale, nicht jedoch die Signale der beweglichen, kovalent gebundenen Kohlenhydratketten. Dieser Effekt läßt sich gezielt nutzen, um selektiv Kohlenhydratketten von Glycoproteinen zu beobachten, ist hier allerdings unerwünscht.<sup>[11]</sup>

Insgesamt zeigen die NMR-Experimente, daß die Bibliothek nur eine Komponente enthält, die Bindungsaktivität gegenüber E-Selectin erkennen läßt – Verbindung **2**. Generell läßt sich sagen, daß mit der Bioaffinitäts-NMR-Spektroskopie die Identifizierung von Liganden mit Dissoziationskonstanten *K*<sub>D</sub> im Bereich von 10<sup>-7</sup> bis 10<sup>-3</sup> möglich ist. Es soll abschließend noch erwähnt werden, daß das Derivat **4**, das als potentielles E-Selectin-Mimetikum beschrieben wurde,<sup>[8]</sup>

keine trNOEs zeigt. Gleiches gilt für Verbindung **5**, die eng mit Fucoseptiden, für die gute Bindungsaktivität berichtet wurde,<sup>[2d]</sup> verwandt ist. Trotz der strukturellen Ähnlichkeiten werden jedoch auch für **5** keine trNOEs beobachtet. Somit sollten die *K*<sub>D</sub>-Werte von **4** und **5** größer als 10<sup>-3</sup> M sein.

Um unsere Ergebnisse zu verifizieren, führten wir unabhängig ELISA-Aktivitätsmessungen<sup>[12]</sup> durch. Diese bestätigen das Ergebnis der trNOE-Experimente.<sup>[13]</sup>

Insgesamt zeigen die Untersuchungen, daß das von uns kürzlich beschriebene Bioaffinitäts-NMR-Verfahren<sup>[5]</sup> gut geeignet ist, auch in Fällen, in denen wegen erheblicher struktureller Ähnlichkeiten starke Signalüberlappungen herrschen, eine Identifizierung bioaktiver Komponenten vorzunehmen. Gegenüber herkömmlichen Verfahren hat Bioaffinitäts-NMR-Spektroskopie einige Vorteile, die abschließend zusammengefaßt werden sollen. 1) Eine Trennung von Komponenten einer Bibliothek oder allgemein eines Substanzgemisches vor dem Aktivitätstest ist nicht erforderlich. 2) Es sind geringe Mengen an Protein ausreichend, da die Liganden im zehn- bis zwanzigfachen Überschuß eingesetzt werden. 3) Das zu testende Protein kann nach Dialyse für weitere Tests eingesetzt werden. 4) Weder das Protein noch die Liganden müssen immobilisiert werden. 5) Die Vorgehensweise erlaubt kompetitive Experimente sowie insbesondere die Untersuchung allosterischer Effekte.

### Experimentelles

Rekombinantes E-Selectin/hIgG wurde wie beschrieben<sup>[4a]</sup> gewonnen; die Verbindungen **2–11** wurden synthetisiert.<sup>[14]</sup>

Deglycosylierung von E-Selectin/hIgG mit PNGase F und Neuraminidase: 10 mg E-Selectin/hIgG (1.75 mg pro mL phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS)) wurden auf pH 8.6 gebracht. Es wurden 40 Einheiten (200 µL) PNGase F (Sigma, G-8031) zugegeben und 16 h bei 37 °C inkubiert. Die Deglycosylierung wurde durch Ausschluß-Chromatographie und SDS-PAGE verfolgt. Nach Abschluß der Umsetzung wurde über eine Sephacryl-S-400-Säule in PBS (pH 7.4) getrennt. Die Inkubation mit an Agarose immobilisierter Neuraminidase aus *Clostridium perfringens* erfolgte nach gleichem Schema bei pH 4.5 und 37 °C. Die Aktivität wurde gegen an HSA gekoppeltes Sialyl-Lewis<sup>a</sup> getestet (HSA = humanes Serumalbumin).

Für die NMR-Untersuchungen wurden 2.5 mg (11.25 nmol) E-Selectin/hIgG gegen 100 mM deuteriertes Imidazol (pH 7.4) und 1 mM CaCl<sub>2</sub> in D<sub>2</sub>O dialysiert und mit Centricon YM-50 (Amicon) auf ein Probenvolumen von 0.5 mL konzentriert. Die Verbindungen **2–11** waren in folgenden Mengen in der Mischung zugegen: **2** (*M*<sub>rel</sub> = 600.64) 1.66 µmol, **3** (*M*<sub>rel</sub> = 600.64) 1.91 µmol, **4** (*M*<sub>rel</sub> = 412.38) 3.12 µmol, **5** (*M*<sub>rel</sub> = 614.63) 2.74 µmol, **6** (*M*<sub>rel</sub> = 586.6) 0.99 µmol, **7** (*M*<sub>rel</sub> = 592.58) 1.66 µmol, **8** (*M*<sub>rel</sub> = 590.54) 1.76 µmol, **9** (*M*<sub>rel</sub> = 623.59) 1.84 µmol, **10** (*M*<sub>rel</sub> = 957.0) 1.25 µmol, **11** (*M*<sub>rel</sub> = 1037.05) 1.205 µmol. Das Substanzgemisch wurde zur Herstellung folgender E-Selectin:Liganden-Molverhältnisse zugegeben (jede E-Selectin/hIgG-Chimäre enthält zwei Bindungsstellen für ESL – 1): 1:5, 1:8, 1:12, 1:15, 1:20. Die Angaben für den Liganden beziehen sich jeweils auf Verbindung **11**.

Alle Spektren wurden auf einem Bruker-DRX-500-NMR-Spektrometer (500.13 MHz) aufgenommen. Die phasensensitiven 2D-NOESY-Spektren des Substanzgemisches wurden bei 300 oder 310 K mit 512 Inkrementen à 32 Scans in *t*<sub>1</sub> (TPPI) und mit je 2 K Datenpunkten in *t*<sub>2</sub> aufgenommen. Die spektrale Weite betrug 10 ppm in beiden Dimensionen. Vor der Fourier-Transformation wurde die Datenmatrix auf 2 K × 1 K Datenpunkte mit Nullen aufgefüllt. Für die Aufnahme der 2D-trNOESY-Spektren der Substanzbibliothek in Gegenwart von E-Selectin/hIgG wurde nach dem ersten π/2-Puls ein Spinlockpuls (3.2 kHz) von 15 ms Dauer appliziert.<sup>[10]</sup> Es wurden 48 Scans pro *t*<sub>1</sub>-Inkrement aufgenommen.

Eingegangen am 5. August 1998 [Z12253]

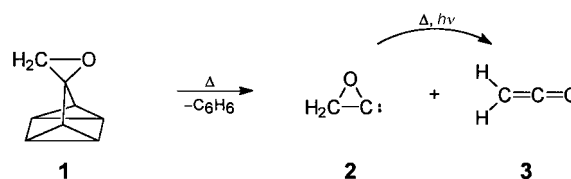
International Edition: *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, 38, 98–102

**Stichwörter:** NMR-Spektroskopie • Oligosaccharide • Selectine • Substanzbibliotheken

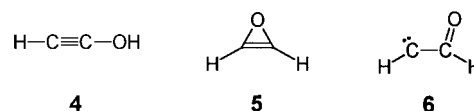
## Oxiranyliden\*\*

Günther Maier,\* Hans Peter Reisenauer und Michael Cibulka

Es ist vierzehn Jahre her, daß wir durch Hochvakuum-Blitzpyrolyse eines von Hoffmann et al.<sup>[1]</sup> hergestellten Quadricyclan-Derivats erstmals Cyclopropenyliden erhalten und matrixspektroskopisch identifizieren konnten.<sup>[2]</sup> Damit war der Boden für ein intensives Studium der C<sub>3</sub>H<sub>2</sub>-Energiehyperfläche bereit.<sup>[3]</sup> Es war naheliegend, auf analogem Wege ausgehend vom Quadricyclan-Abkömmling **1** die Synthese von Oxiranyliden **2** zu versuchen, dies um so mehr, als Hoffmann und Schüttler<sup>[4]</sup> schon früher bei der Thermolyse von **1** die Bildung von Keten **3** nachweisen konnten. Die Frage, ob dabei als Primärprodukt Oxiranyliden **2** auftritt, mußte damals unbeantwortet bleiben. Es bot sich nun an, die



Suche nach **2** mit der heute zur Verfügung stehenden Methodik (Kombination von Hochvakuum-Blitzthermolyse und Matrixisolation) erneut aufzunehmen. Dies war nicht zuletzt deshalb verlockend, weil **2** reges theoretisches Interesse beansprucht und die Rechnungen anzeigen, daß es in einer genügend tiefen Mulde auf der C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>O-Energiehyperfläche liegt, um in einer Matrix bei 10 K stabil zu sein.<sup>[5, 6]</sup> Im folgenden wird gezeigt, daß in der Tat außer Keten **3** und Ethinol **4**<sup>[7]</sup> auch Oxiranyliden **2** eine existenzfähige C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>O-Spezies ist.



Pyrolysiert man den Polycyclus **1**<sup>[4]</sup> im Hochvakuum (Quarzrohr: Durchmesser 8 mm, Heizzone 5 cm, ca. 10<sup>-5</sup> mbar, 500 °C) und kondensiert die Reaktionsprodukte mit Stickstoff oder Argon auf einem 10 K kalten CsI-Fenster, dann lassen sich im IR-Spektrum außer den Banden von Benzol und Keten **3** die in Tabelle 1 aufgeführten Absorptionen registrieren. In festem Stickstoff sind diese Banden scharf, in Argon durch Matrixeffekte aufgespalten. Ihre Intensität hängt von den Pyrolysebedingungen ab. Sie ist am größten, wenn die Temperatur so gewählt wird, daß im Kondensat noch Edukt nachweisbar ist. Wird eine höhere Temperatur (bis 600 °C) angewendet, so sind die in Tabelle 1 aufgeführten Banden schwächer und diejenigen von **3** intensiver. Die

[\*] Prof. Dr. G. Maier, Dr. H. P. Reisenauer, Dipl.-Chem. M. Cibulka  
Institut für Organische Chemie der Universität  
Heinrich-Buff-Ring 58, D-35392 Gießen  
Fax: (+49) 641-99-34309

[\*\*] Diese Arbeit wurde vom Fonds der Chemischen Industrie und von der Deutschen Forschungsgemeinschaft unterstützt.

- [1] a) M. P. Bevilacqua, S. Stengelin, M. A. Gimbrone, Jr., B. Seed, *Science* **1989**, 243, 1160–1165; b) L. A. Lasky, *Science* **1992**, 258, 964–969; c) A. Levinovitz, J. Muhloff, S. Isenmann, D. Vestweber, *J. Cell. Biol.* **1993**, 121, 449–459; d) M. Lenter, A. Levinovitz, S. Isenmann, D. Vestweber, *J. Cell. Biol.* **1994**, 125, 471–481; e) K. L. Moore, N. L. Stults, S. Diaz, D. F. Smith, R. D. Cummings, A. Varki, R. P. McEver, *J. Cell. Biol.* **1992**, 118, 445–456.
- [2] a) H. C. Kolb, B. Ernst, *Pure Appl. Chem.* **1997**, 69, 1879–1884; b) H. C. Kolb, B. Ernst, *Chem. Eur. J.* **1997**, 3, 1571–1578; c) K. E. Norman, G. P. Anderson, H. C. Kolb, K. Ley, B. Ernst, *Blood* **1998**, 91, 475–483; d) T. F. Lampe, G. Weitz-Schmidt, C.-H. Wong, *Angew. Chem.* **1998**, 110, 1761–1764; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, 37, 1707–1711; e) T. Uchiyama, V. P. Vassilev, T. Kajimoto, W. Wong, H. Huang, C.-H. Wong, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, 117, 5395–5396; f) E. E. Simanek, G. J. McGarvey, J. A. Jablonowski, C.-H. Wong, *Chem. Rev.* **1998**, 833–862.
- [3] W. Jahnke, H. C. Kolb, M. J. J. Blommers, J. L. Magnani, B. Ernst, *Angew. Chem.* **1997**, 109, 2715–2719; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1997**, 36, 2603–2607.
- [4] a) K. Scheffler, B. Ernst, A. Katopodis, J. L. Magnani, W.-T. Wang, R. Weisemann, T. Peters, *Angew. Chem.* **1995**, 107, 2034–2037; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1995**, 34, 1841–1844; b) K. Scheffler, J.-R. Brisson, R. Weisemann, J. L. Magnani, W.-T. Wang, B. Ernst, T. Peters, *J. Biomol. NMR* **1997**, 9, 423–436; c) R. M. Cooke, R. S. Hale, S. G. Lister, G. Shah, M. P. Weir, *Biochemistry* **1994**, 33, 10591–10596; d) L. Poppe, G. S. Brown, J. S. Philo, P. V. Nikrad, B. H. Shah, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, 119, 1727–1736.
- [5] a) B. Meyer, T. Weimar, T. Peters, *Eur. J. Biochem.* **1997**, 246, 705–709; b) T. Peters, B. Meyer, DE-B 19649359, **1996**.
- [6] a) H. N. B. Moseley, W. Lee, C. Arrowsmith, N. R. Krishna, *Biochemistry* **1997**, 36, 5239–5299; b) H. N. B. Moseley, E. V. Curto, N. R. Krishna, *J. Magn. Reson. B* **1995**, 108, 243–261; c) F. Ni, *Prog. NMR Spectrosc.* **1994**, 26, 517–606; d) T. Peters, B. M. Pinto, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **1996**, 6, 710–720.
- [7] a) S. B. Shuker, P. J. Hajduk, R. P. Meadows, S. W. Fesik, *Science* **1996**, 274, 1531–1534; b) H. Kessler, *Angew. Chem.* **1997**, 109, 857–859; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1997**, 36, 829–831.
- [8] T. P. Kogan, B. Dupré, K. M. Keller, I. L. Scott, H. Bui, R. V. Market, P. J. Beck, J. A. Voytus, B. M. Revelle, D. Scott, *J. Med. Chem.* **1995**, 38, 4976–4984.
- [9] a) J. Fejzo, W. M. Westler, J. L. Markley, S. Macura, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, 114, 1523–1524; b) C. Zwahlen, S. J. F. Vincent, L. D. Bari, M. H. Levitt, G. Bodenhausen, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, 116, 362–368; c) S. J. F. Vincent, C. Zwahlen, G. Bodenhausen, *J. Biomol. NMR* **1996**, 7, 169–172; d) S. J. F. Vincent, C. Zwahlen, C. B. Post, J. W. Burgner, G. Bodenhausen, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1997**, 94, 4383–4388.
- [10] T. Scherf, J. Anglister, *Biophys. J.* **1993**, 64, 754–761.
- [11] D. Henrichsen, I. Brockhausen, H. Schachter, T. Peters, *Glycoconjugate J.*, eingereicht.
- [12] Die Vorschrift für den E-Selectin-Bindungsassay findet sich in Zitat 17 in: G. Thoma, J. L. Magnani, R. Öhrlein, B. Ernst, F. Schwarzenbach, R. O. Duthaler, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, 7414–7415.
- [13] Als Referenz für die ELISA-Tests diente das Sialyl-Lewis<sup>x</sup>-Tetrasaccharid **1**, dessen relativer IC<sub>50</sub> auf 1 mM gesetzt wurde (die absoluten Werte liegen in einem Intervall von 0.9 bis 1.5 mM). Das Sialyl-Lewis<sup>x</sup>-Mimetikum **2** weist einen relativen IC<sub>50</sub> von 0.09 mM<sup>[2a]</sup> auf. Für Verbindung **4** wurde ein relativer IC<sub>50</sub> von 0.66 mM angegeben,<sup>[8]</sup> sie zeigt jedoch im ELISA-Test einen relativen IC<sub>50</sub> von > 10 mM und ist somit als inaktiv einzustufen. Die übrigen Komponenten der Substanzbibliothek, **3** und **5–11**, sind mit relativen IC<sub>50</sub>-Werten > 10 mM ebenfalls als inaktiv zu bezeichnen.
- [14] B. Ernst, unveröffentlichte Ergebnisse.