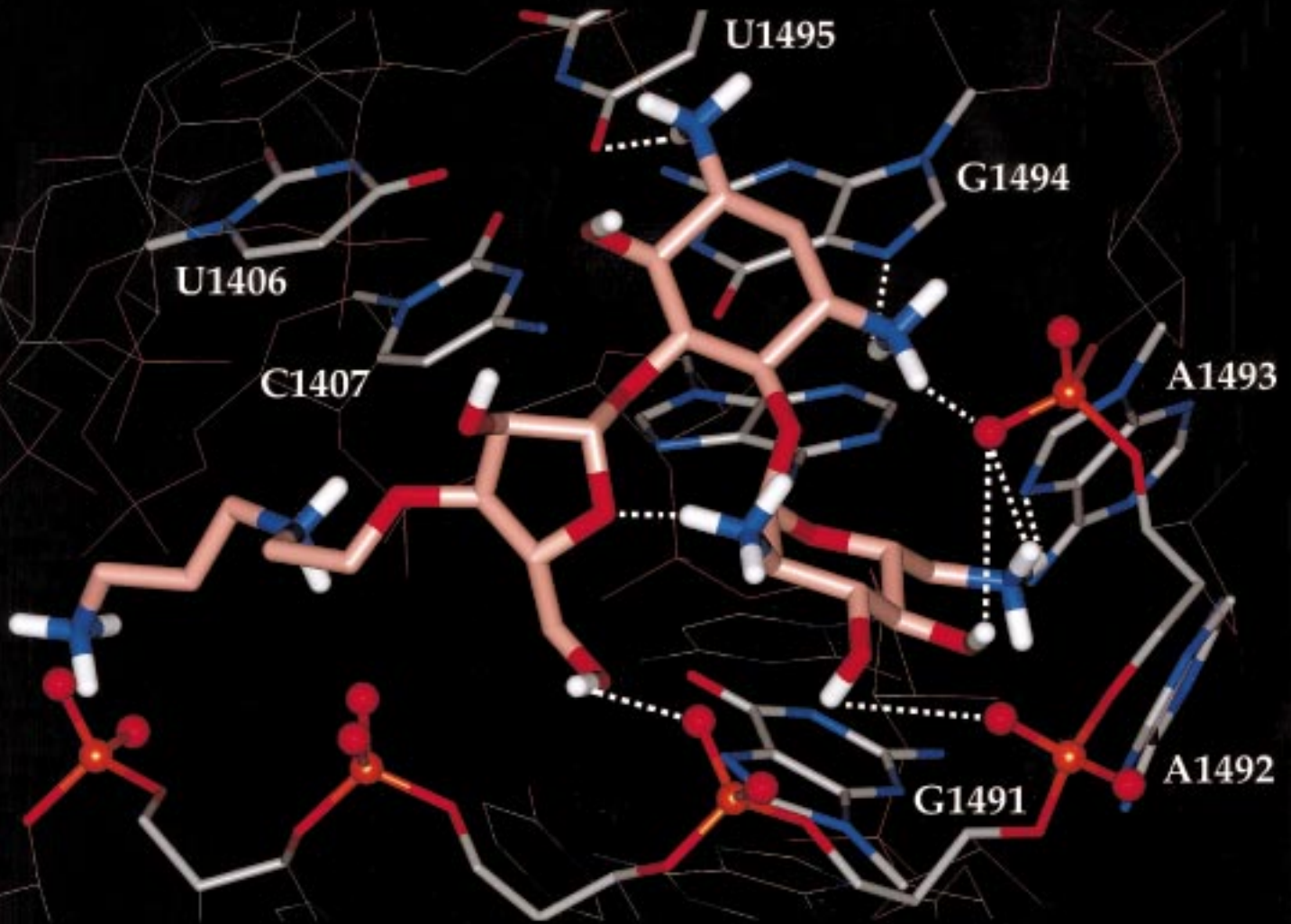
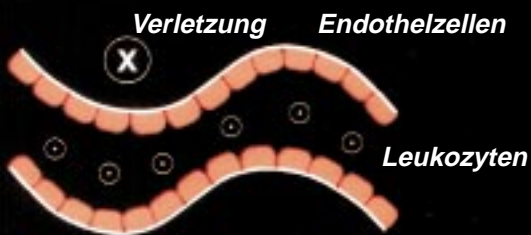


Ein synthetisches Aminoglycosidmimetikum mit bakterieller rRNA als Ziel

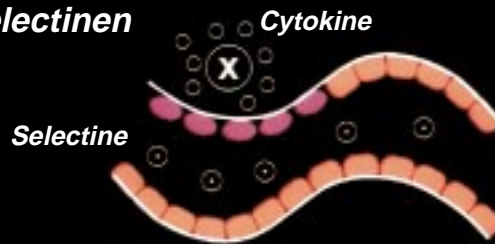


An der Entzündungs-Reaktion ist eine Selectin-Kohlenhydrat-Wechselwirkung beteiligt

A. Verletzung



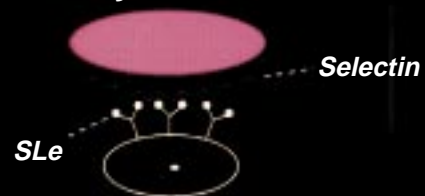
B. Freisetzung von Cytokinen, Produktion von Selectinen



C. Adhäsion



D. Rollen der Leukozyten



E. Durch Integrine vermittelte Adhäsion, Extravasation



E. Leukozyten erreichen Verletzungsstelle



Kohlenhydratmimetika: ein neuer Lösungsansatz für das Problem der kohlenhydratvermittelten biologischen Erkennung

Pamela Sears* und Chi-Huey Wong*

Professor George M. Whitesides gewidmet

Von den drei Hauptklassen der Biomoleküle – Proteine, Nucleinsäuren und Kohlenhydrate – wird die Klasse der Kohlenhydrate am wenigsten genutzt. Trotz der bedeutenden Rolle, die Saccharide in einer Vielzahl biologischer Erkennungsprozesse spielen (z. B. bei bakteriellen und Virus-Infektionen, Metastasenbildung und Entzündungen), sind die molekularen Details dieser Prozesse noch nicht vollständig verstanden. Demzufolge

schreitet die Entwicklung von Therapeutika auf Kohlenhydratbasis nur vergleichsweise langsam voran. Hinzu kommt der Mangel an verfügbaren Synthese- und Analysemethoden in der Kohlenhydratforschung sowie Probleme, die mit unerwünschten physikalisch-chemischen Eigenschaften der Saccharide als potentielle Medikamente verbunden sind. Neuere Fortschritte auf diesem Gebiet haben gezeigt, daß diese Probleme durch die Verwendung

von Kohlenhydratmimetika, kleinen Molekülen, die alle essentiellen Funktionalitäten (und oft noch zusätzliche hydrophobe oder geladene Gruppen) enthalten und deren Konformation der aktiven Konformation der ursprünglichen Struktur ähnelt, umgangen werden können.

Stichwörter: Kohlenhydrate • Kohlenhydratmimetika • Sialinsäuren

1. Einleitung

Kohlenhydrate sind allgegenwärtige und bedeutende Biomoleküle. Neben ihrer Rolle als Energiespeicher sind sie wichtige Grundbausteine von Zellwänden und Geweben. Als Bestandteil von Glycoproteinen, Glycolipiden und anderen Konjugaten sind sie Schlüsselemente einer Reihe von Prozessen, z. B. der Signalgebung, der Zell-Zell-Kommunikation sowie der molekularen und zellularen Erkennung.^[1–3] Lectine (an Zucker gebundene Proteine) z. B., die sich an der Oberfläche einer Zelle befinden, ermöglichen dieser die Reaktion auf eine Vielzahl von äußeren Reizen, wie die lokale Konzentration von Nährstoffen (Chemotaxie). Sie versetzen die Zellen darüber hinaus in die Lage, andere Zellen mit passenden Sacchariden zu lokalisieren und zu binden. Dies ist ein Prozeß, der für einen frühen Schritt der Entzündungsreaktion typisch ist. So binden die Säugetierlectine E- und P-Selectin, die sich nach einer Cytokin-Stimulierung an der Oberfläche einer Endothelzelle befinden, Sialyl-

Lewis^x (sLe^x; NeuAca2,3Gal β 1,4(Fuca1,3)GlcNAc) und verwandte Oligosaccharide, die sich auf zirkulierenden Leukozyten befinden. Dies führt zur Anheftung und schließlich zur Wanderung des Leukozyten in das umgebende Gewebe. Durch die Lectine wird es den Zellen weiterhin ermöglicht, glycosylierte Verbindungen und Mikroorganismen auszuwählen und aufzunehmen. Pathogene Mikroorganismen werden häufig von Makrophagen Lectin-vermittelt absorbiert. Dies wurde z. B. bei der Aufnahme des Pilzes *Pneumocystis carinii* über den Makrophage-Mannose-Rezeptor beobachtet.^[4] Glycoproteine können möglicherweise ganz ähnlich aufgenommen werden. Bestimmte pituitäre Hormone (das follikelstimulierende Hormon (FSH) und das luteinisierende Hormon (LH)) enthalten GalNAc-4-Sulfat, das für die Aufnahme dieser Hormone durch die Kupffer-Zellen der Leber verantwortlich ist.^[5]

Die Erkennung von Kohlenhydraten spielt eine Rolle im Fortschreiten einer Reihe von Krankheiten. Die Anbindung vieler Pathogene und biologischer Toxine an die Wirtszelle wird durch Kohlenhydrate vermittelt. *Helicobacter pylori*, ein Pathogen, das mit Gastritis und Magengeschwüren in Verbindung gebracht wird und vermutlich an Magenkrebs beteiligt ist, bindet an eine große Vielzahl von Sacchariden an der Oberfläche der Wirtszelle, wie Lewis b,^[6] 3'-Sialyllactose^[7] und andere.^[8] Eine solche Kohlenhydratanbindung ist in der bakteriellen Kolonisierung von Geweben weit ver-

[*] Prof. Dr. P. Sears, Prof. Dr. C.-H. Wong
Department of Chemistry and the Skaggs Institute for Chemical Biology
The Scripps Research Institute
10550 North Torrey Pines Road, La Jolla, CA 92037 (USA)
Fax: (+1) 858-784-2409
E-mail: wong@scripps.edu

breitet.^[2] Viren und Toxine nutzen ebenfalls häufig Oligosaccharidrezeptoren; der Grippe(Influenza)-Virus z. B. bindet an Sialinsäure über sein Hüllenprotein (Hämagglutinin), ein Vorgang, der für das Eindringen des Virus in die Wirtszelle erforderlich ist.^[9] Die potenten Pflanzentoxine Abrin und Ricin binden an D-Galactoside,^[10] während die bakteriellen AB₅-Toxine, heterohexamere Verbindungen, in denen die fünf B-Untereinheiten verantwortlich für die Erkennung sind, typischerweise an Ganglioside binden. Zwei Beispiele sind das Cholera- und das Shiga-Toxin, welche an G_{M1} bzw. G_{b3} binden.^[11] Man nimmt an, daß die Metastasenbildung in einigen Fällen auf demselben Erkennungsweg stattfindet, wie ihn auch Leukozyten nutzen: Bindung an Endothelzellen durch sLe^a- oder sLe^x-Selectin-Wechselwirkungen, der die Extravasation folgt.^[12]

Obgleich Kohlenhydrat-Erkennungsprozesse bisweilen am Fortschreiten einer Krankheit beteiligt sind, können sie ebenso Teil der Heilung sein. Das bakterielle Aminoglycosid Neomycin und verwandte Verbindungen werden vom bakteriellen Ribosom erkannt. Eine Bindung an das Ribosom verursacht eine Inhibierung der Translation und in höherer Konzentration eine Fehlkodierung.^[13] Die Lectin-vermittelte Aufnahme hat zu guten Erfolgen bei der Behandlung der Gaucher-Krankheit geführt, ein genetisch bedingter Mangel des Enzyms β -Glucocerebrosidase. Die Behandlung erfordert die Einnahme des Enzyms, jedoch muß dieses in das Innere der Ribosomen gelangen. Glycosidasen werden genutzt, um das N-verknüpfte Saccharid des gereinigten Enzyms auf die Pentamannoseeinheit zurechtzuschneiden, und dies erlaubt dann die Aufnahme mit einem Mannose-bindenden Lectin.^[14]

Das Eingreifen in oder in manchen Fällen die Nachahmung von Protein-Saccharid- oder Nucleinsäure-Saccharid-Wechselwirkungen bietet ein potentiell Ziel für Therapeutika. Leider sind Saccharide aus einer Vielzahl von Gründen häufig

keine guten Therapeutika. Viele natürliche Saccharide werden schnell von Verdauungs-, Plasma- und Zell-Glycosidasen abgebaut und binden häufig an ihr Ziel mit geringer Affinität, obgleich die Affinität der Kohlenhydrat-Rezeptor-Wechselwirkung an Zelloberflächen durch Polyvalenz erhöht werden kann.^[15] Die K_d -Werte befinden sich meist im Millimol-Bereich, wenngleich es Ausnahmen gibt. Das Arabinose-bindende Protein bindet z. B. Arabinose mit einem K_d -Wert von 0.098 μ M,^[16] das *Griffonia-simplicifolia*-Lectin GS-IV bindet das Lewis-b-Antigen mit $K_d = 24 \mu$ M,^[17] das Cholera-Toxin bindet das Gangliosid-G_{M1}-Pentasaccharid mit einer intrinsischen Bindungskonstante – d. h. Bindung eines einzelnen Liganden durch eine einzelne Untereinheit innerhalb des Pentamers – von 1 μ M,^[18] und der monoklonale Antikörper des anti-*Salmonella*-O-Antigens, Se155-4, bindet das Trisaccharid Abe α 1,3(Gal β 1,2)Man α OME mit $K_d = 15 \mu$ M.^[19] Außerdem sind Polysaccharide schwierig durch konventionelle organisch-chemische Verfahren zu synthetisieren, wegen der zunehmenden Verfügbarkeit von Glycosidasen und Glycosyltransferasen und die Einführung von Cofaktor-Recycling-Verfahren in den letzten Jahren sind enzymatische Syntheseverfahren auf dem Vormarsch.^[20, 21] Durch neue Synthesemethoden wurden darüber hinaus die Schwierigkeiten bei der chemischen Synthese verringert.^[22–27] Aus diesen Gründen ist es erstrebenswert, Verbindungen zu entwerfen, die Mimetika von Kohlenhydraten sind, welche an bedeutenden Signal- und Erkennungsprozessen beteiligt sind, jedoch verbesserte Eigenschaften in Bezug auf Stabilität, Spezifität, Affinität und synthetische Verfügbarkeit aufweisen.

Der Ausdruck „Kohlenhydratmimetika“ wird häufig für jedes Kohlenhydrat-Derivat oder jede andere Verbindung benutzt, die mehrere Hydroxygruppen tragen oder einem Zucker oder Saccharid ähneln. Wir dagegen möchten diesen Begriff für die Verbindungen vorbehalten, die tatsächlich die

Chi-Huey Wong erhielt seinen B.S.- und seinen M.S.-Titel an der National Taiwan University und promovierte 1982 in Chemie bei George M. Whitesides am Massachusetts Institute of Technology. Zusammen mit Professor Whitesides ging er an die Harvard University als Postdoc. Er lehrte sechs Jahre an der Texas A&M University und ist seit 1989 Professor und Inhaber des Ernest W. Hahn Chair in Chemistry am Scripps Research Institute. Darüber hinaus ist er seit 1996 Professor am Skaggs Institute for Chemical Biology at Scripps und seit 1991 Leiter des Frontier Research Program on Glycotechnology am RIKEN (Institute of Physical and Chemical Research) in Japan. Seine derzeitigen Forschungsinteressen liegen auf den Gebieten der Bioorganischen und der Synthesechemie sowie auf dem der Biokatalyse, insbesondere mit Blick auf die Entwicklung neuer Synthesemethoden unter Anwendung von enzymatischen und chemischen Reaktionen, der molekularen Glycobiologie und der rationalen, auf den Wechselwirkungsmechanismen basierenden Entwicklung von Inhibitoren von Enzymen und Kohlenhydratrezeptoren.



C.-H. Wong



P. Sears

Pamela Sears erhielt ihren B.S.-Titel in Technischer Biochemie und ihren M.S.-Titel in Technischer Chemie an der University of California at Berkeley. Sie promovierte auf dem Gebiet der makromolekularen und zellulären Strukturchemie am Scripps Research Institute bei Chi-Huey Wong. Sie ist seit 1997 Assistant Professor am Scripps Research Institute. Ihre derzeitigen Forschungsinteressen konzentrieren sich auf Enzym- und Protein-Engineering, enzymatische Methoden zur Glycoproteinsynthese und das Design von kohlenhydraterkennenden Proteinen und Peptiden.

strukturellen und funktionellen Aspekte eines bekannten Targets nachahmen. Diese Verbindung werden im Mittelpunkt dieser Übersicht stehen.^[28]

Kohlenhydratmimetika haben als Therapeutika mehrere Vorteile gegenüber den Verbindungen, von denen sie abgeleitet sind. Sie können so entworfen werden, daß sie 1) stabiler gegenüber endogenen abbauenden Enzymen sind, 2) eine bessere Bioverfügbarkeit und herabgesetzte Beseitigungsraten vorweisen und 3) aufgrund von Wechselwirkungen, die das natürliche Saccharid nicht eingehen kann, eine höhere Affinität und Selektivität gegenüber ihren verwandten Rezeptoren aufweisen. Durch die Konstruktion von Polymeren und Oligomeren mit mehrfachen Kopien des Mimetikums kann durch zusätzliche polyvalente Wechselwirkungen die Affinität weiter erhöht werden.^[15] Im Falle von Glycosyltransferase- und Glycosidaseinhibitoren sowie Inhibitoren von Enzymen zur Kohlenhydrat-Modifizierung (z. B. Sulfo-transferasen) können Mimetika entworfen werden, die den Übergangszustand (statt den Grundzustand) dieser Reaktionen imitieren und die Enzyme besser inhibieren als einfache Substratanaloga.

2. Strukturmerkmale der Kohlenhydrat-Protein-Wechselwirkungen

Um gute Mimetika herzustellen, ist es wichtig, sich über die Wechselwirkungen zwischen den Kohlenhydraten und ihren Targets (üblicherweise Proteine) klar zu werden. Eine Reihe von ihnen liefern einen Beitrag zur negativen Freien Bindungsenergie.^[29–31]

2.1. Wasserstoffbrückenbindung

Wasserstoffbrückenbindungen sind eine bedeutende Wechselwirkung. Sie werden häufig in den Kristallstrukturen von Zucker-bindenden Proteinen zwischen den Carbonyl- und NH-Gruppen des Proteingerüsts und den OH-Gruppen des Zuckers beobachtet. Die Häufigkeit solcher Wechselwirkungen beruht wahrscheinlich auf der großen Zahl verfügbarer Amidbindungen und der Steifheit des Peptidgerüsts: Da es weniger Freiheitsgrade als die Seitenketten hat, ist der Entropieverlust bei der Bildung einer H-Brücke aufgrund der Einschränkung der räumlichen Positionen von H-Brücken-Donor und -Acceptor geringer, wenn einer der beiden bereits fixiert ist. Im Unterschied dazu werden die hydroxylierten Aminosäuren Serin und Threonin weniger häufig genutzt, vermutlich wegen der ungünstigen Entropie des Fixierens zweier (zumindestens im Vergleich zum Peptidgerüst) recht flexibler Gruppen bei der Bindung.^[29] „Zweizählige“ H-Brücken-Seitenketten wie die in Asparaginsäure, Asparagin, Glutaminsäure, Glutamin und Arginin kommen ebenfalls häufig vor. Die beiden „Arme“ solch einer Seitenkette können H-Brücken zu vicinalen Hydroxygruppen bilden. Dies ist z. B. in der Kristallstruktur des Arabinose-bindenden Proteins mit gebundener Galactose beobachtet worden,^[32] wobei die Carbonylgruppe und das Amid-Stickstoffatom der Asparagin-232-Seitenkette H-Brücken mit der 3- und der

4-Hydroxygruppe der Galactose eingehen (Abbildung 1). In der gleichen Struktur bildet Arginin 151 H-Brücken sowohl zur 6-OH-Gruppe als auch zum Ringsauerstoffatom der Galactose. Viele der Wasserstoffbrückenbindungen zu Zucker-bindenden Proteinen sind durch Wasser vermittelt. Daß

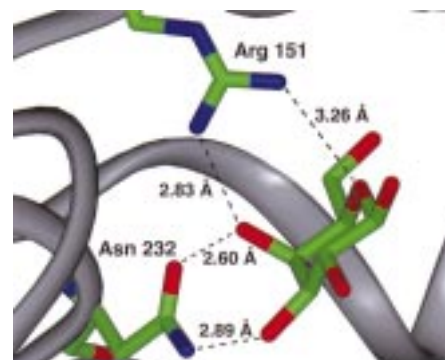


Abbildung 1. Schematische Darstellung der Wasserstoffbrückenbindungen zwischen β -D-Galactose und zwei Seitenketten des Arabinose-bindenden Proteins, die die „Zweizähligkeit“ der Wechselwirkung zeigt: Das Carbonylsauerstoffatom und das Amidstickstoffatom der Asparagin-232-Seitenkette bilden H-Brücken zu vicinalen (3- und 4-) Hydroxygruppen der gebundenen Galactose. (Kristallstruktur 5abp.pdb von Quijcho und Mitarbeitern,^[32] Brookhaven Protein-Datenbank, betrachtet mit dem Programm InsightII, MSI, San Diego, CA; rot: Sauerstoff, blau: Stickstoff, grün: Kohlenstoff)

wasservermittelte H-Brücken häufig als schwach und nicht spezifisch angesehen werden, ist nicht ganz treffend. In vielen dieser Fälle wird das beteiligte Wasser in den Kristallstrukturen sowohl bei unbesetzter als auch bei besetzter Bindungsstelle beobachtet und kann im wesentlichen als Erweiterung des Proteins angesehen werden.^[16] Im Arabinose-bindenden Protein (mit koordinierter Galactose) gibt es zwei Wassermoleküle, die jeweils H-Brücken zu drei Protein-Seitenketten bilden. Die vierte H-Bindungsstelle ist entweder durch die 2- oder die 6-OH-Gruppe der gebundenen Galactose besetzt. Solche Wassermoleküle liegen auch in den Kristallstrukturen mit komplexierter 2- oder 6-Desoxygalactose vor.^[32]

2.2. Assoziation mit Metallen

Lectine des C-Typs und verwandte Proteine sind Calcium-abhängige Proteine. Der Grund für diese absolute Abhängigkeit der Zuckerbindung vom Metall geht eindeutig aus der Kristallstruktur hervor: Vicinale Hydroxygruppen des Zuckers koordinieren das Calciumzentrum, wie im Mannose-bindenden Protein A,^[33] wo die 3- und die 4-OH-Gruppe der Mannose mit dem Calciumion wechselwirken (Abbildung 2). Vermutlich besteht eine ähnliche Koordination bei der Bindung von Sialyl-Lewis^x (NeuAca2,3Gal β 1,4(Fuca1,3)GlcNAc) an E-Selectin; wahrscheinlich koordinieren hier die vicinalen Hydroxygruppen der Fucose an das Calciumion der Bindungsstelle.^[34, 35] Die Kristallstruktur des Enzyms Xylose(Glucose)-Isomerase mit gebundener (linearer) Glucose zeigt, daß die 2- und die 4-OH-Gruppe sowie die Carbonylgruppe der gebundenen Glucose nicht nur ein, sondern zwei Magnesiumatome koordinieren, welche für die katalytische Aktivität notwendig sind.^[36]

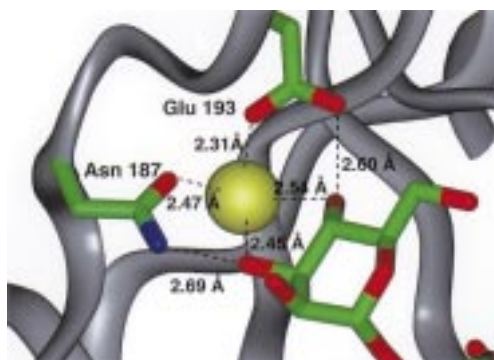


Abbildung 2. Koordination von vicinalen (3- und 4-) Hydroxygruppen der Mannose durch Calcium im Mannose-bindenden Protein A. (Kristallstruktur 2msb.pdb von Weis und Mitarbeitern;^[33] rot: Sauerstoff, blau: Stickstoff, grün: Kohlenstoff)

2.3. Hydrophobe Packung

Zwar werden Zucker als polare Moleküle angesehen, doch wird immer wieder festgestellt, daß sie beträchtlichen hydrophoben Charakter aufweisen, der mit ihren Ringflächen in Verbindung gebracht wird. Dies wird z. B. unterstrichen durch die Fähigkeit von Cyclodextrin, hydrophobe Verbindungen in Lösung zu bringen, und die Fähigkeit des linearen Dextrins poly(Glc1,4Glc), die Wasserlöslichkeit stark hydrophober Verbindungen (z. B. Steroide) zu erhöhen.^[37] Eine Packungswechselwirkung zwischen einem hydrophoben Ring und dem Zucker ist in den meisten Saccharid-bindenden Proteinen beobachtet worden,^[38] und ein exzellentes Beispiel liefert die Kristallstruktur des Maltose-bindenden Proteins mit koordinierter Maltose.^[39] Beide Glucosemoleküle des Disaccharids sind sandwichartig zwischen den aromatischen Ringen koordiniert (Abbildung 3). Die Flächen des Zuckers und des

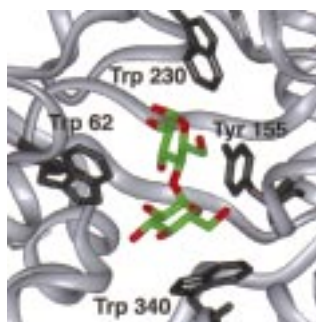


Abbildung 3. Wechselwirkung zwischen den aromatischen Seitenketten des Maltose-bindenden Proteins und den Ringflächen der beiden Glucoseinheiten von Maltose. (Kristallstruktur 1anf.pdb von Quijcho und Mitarbeitern;^[39] rot: Sauerstoff, blau: Stickstoff, grün: Kohlenstoff)

aromatischen Rings sind nicht immer perfekt zueinander ausgerichtet; in vielen zuckerbindenden Proteinen ist die Ebene der aromatischen Gruppe gegenüber der des Zuckers etwas gekippt.^[29] Einige Zucker haben hydrophobere Ringflächen als andere. Die Ringflächen der Zucker werden mit den Buchstaben A oder B bezeichnet, wobei die A-Seite diejenige ist, auf der die Nummer der Atome im Uhrzeigeransteigt.^[40] In Galactose weist die 4-OH-Gruppe auf

die A-Seite, und die B-Seite der D-Galactose ist entsprechend hydrophober als die der Mannose oder Glucose. Dies ist wahrscheinlich der Grund dafür, daß die B-Seite der Galactose fast immer sandwichartig an einen aromatischen Ring gebunden ist.^[29]

2.4. Ionische Wechselwirkungen

Auch ionische Wechselwirkungen treten in Komplexen zwischen Proteinen oder Nucleinsäuren und geladenen oder derivatisierten Zuckern (z. B. Sialinsäure, Aminosucker, phosphorylierte oder Sulfat-Gruppen tragende Zucker) auf. Zuckercarboxylate sind z. B. oft mit Arginin assoziiert, wie bei der Influenza-Neuraminidase mit koordinierter Sialinsäure (Abbildung 4).^[41] Ein Großteil der Bindungsaffinität von Aminoglycosid-Antibiotika gegenüber RNA ist ebenfalls auf die Wechselwirkungen zwischen der 1,3-Hydroxyamin-Struktur der Antibiotika und dem Phosphodiester-Grundgerüst (Abbildung 5) sowie der Hoogsten-Seite von Guanin zurückzuführen.^[42, 43]

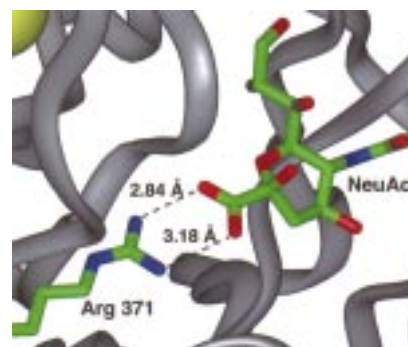


Abbildung 4. Wechselwirkung zwischen der Guanidinogruppe des Arg-371-Restes von Influenza-Neuraminidase und der Carboxylateinheit von Sialinsäure (NeuAc). (Kristallstruktur 2bat.pdb von Varghese und Mitarbeitern;^[41] rot: Sauerstoff, blau: Stickstoff, grün: Kohlenstoff)

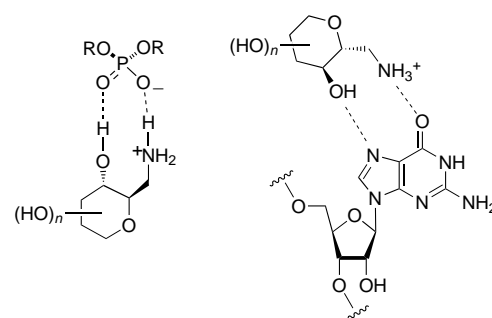


Abbildung 5. Wechselwirkung zwischen 1,3-Hydroxyaminen und dem Phosphodiester-Rückgrat von Nucleinsäuren sowie der Hoogsten-Seite von Guanin.

3. Strategien für das Design von Kohlenhydratmimetika

Das Verständnis der Wechselwirkungen zwischen Kohlenhydraten und ihren Proteinrezeptoren liefert nützliche Informationen für das Design von Kohlenhydratmimetika. Die geringe Affinität der Zucker-Protein-Wechselwirkungen hat

verschiedene Ursachen: 1) Es mangelt in den Zuckern an hydrophoben Gruppen, welche sehr häufig in Rezeptor-Ligand-Wechselwirkungen hoher Affinität dominieren; 2) die mit den vielen H-Brücken in Zucker-Protein-Erkennungsprozessen assoziierte Energie ist durch konkurrierendes Lösungsmittel signifikant vermindert; 3) die Flexibilität vieler H-Brücken bildender Gruppen hat einen beträchtlichen entropischen Nachteil zu Folge, wenn sie durch die Bindung in eine räumliche Anordnung gezwungen werden. Darüber hinaus sind vermutlich nicht alle funktionellen Gruppen eines Kohlenhydratligenanden für die Wechselwirkung mit dem Rezeptor erforderlich.

Mit diesen Informationen ist man in der Lage, verschiedene Strategien für das Design organischer Moleküle, die die aktive Konformation und die Funktion eines Kohlenhydratligenanden nachahmen, auszuwählen (Abbildung 6). In einem ersten Ansatz kann man unnötige funktionelle Gruppen entfernen und die ursprünglichen Glycosidbindungen und damit die Konformation erhalten (Abbildung 6, Mitte). Bei dieser Vorgehensweise wird die Polarität des Zuckers herabgesetzt und möglicherweise die Bindungsaffinität durch eine Verbesserung der hydrophoben Wechselwirkungen und die Verringerung der durch desolvatisierende polare Funktionalitäten entstehenden Nachteile erhöht. Die Synthese von Desoxyzuckern ist jedoch nicht trivial. Einige Variationen dieser Strategie wurden genutzt, um die Affinität und/oder die Stabilität durch Hinzufügen oder Veränderung von Funktionalitäten weiter zu verbessern. Der Einbau einer hydrophoben Gruppe birgt das Potential, die Bindungsaffinität bedeutend zu erhöhen, falls eine entsprechende hydrophobe Position am Rezeptor existiert. Dies ist eine potentiell sehr leistungsfähige Methode. Durch eine geladene Gruppierung können günstige ionische Wechselwirkungen hinzugefügt werden, falls eine komplementäre Gruppe an der Bindungsstelle existiert. In Fällen, in denen das Saccharid ein Metallion koordiniert, kann die Affinität möglicherweise durch den Austausch der koordinierenden Hydroxygruppen durch einen besseren Liganden für das Metallion erhöht werden.

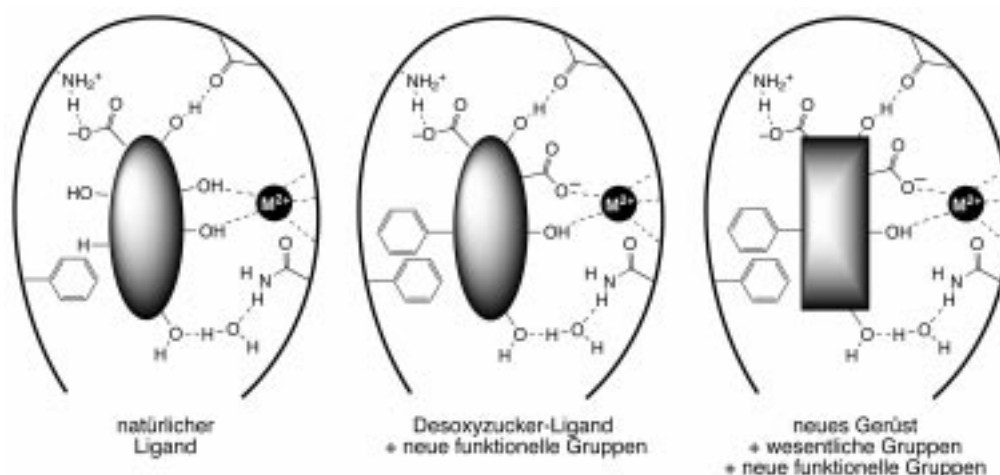


Abbildung 6. Zwei allgemeine Strategien für das Design von Kohlenhydratmimetika. Das linke Diagramm zeigt die Wechselwirkungen zwischen einem natürlichen Saccharid und einem Proteinrezeptor. Im mittleren ist ein Mimetikum dargestellt, in dem das Glycosidrückgrat erhalten blieb, jedoch unnötige Hydroxygruppen entfernt und zusätzliche Funktionalitäten eingebaut wurden, um die Wechselwirkung zu verstärken. Im rechten Diagramm wird auf das glycosidische Gerüst verzichtet.

Die Stabilität kann verbessert werden, indem man von O-verknüpften zu C- oder S-verknüpften Sacchariden oder zu O-verknüpften Carbocyclen übergeht. Obgleich die *exo*-anomeren und sterischen Effekte (Abbildung 7) die Hauptfaktoren für die Bestimmung des Glycosid-Torsionswinkels

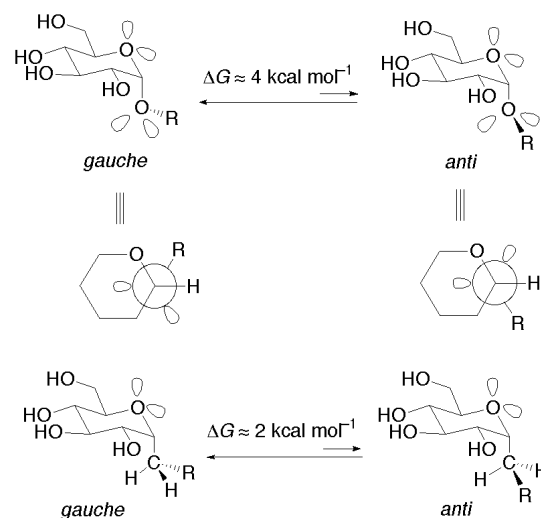


Abbildung 7. Die *exo*-anomeren und sterischen Effekte auf die Konformation eines Glycosids und die energetische Konsequenz des Wechsels von einem O- zu einem C-Glycosid.^[17]

sind, spielen sterische Effekte in den C-verknüpften Sacchariden eine Hauptrolle bei der Erhaltung der *gauche*-Konformation, die der Konformation des entsprechenden O-verknüpften Zuckers ähnelt.^[44] C-verknüpfte Glycoside werden darum häufig zur Nachahmung O-verknüpfter Strukturen genutzt, da sie stabiler gegenüber Säure- und Glycosidase-katalysierter Spaltung sind.

Ein zweiter Ansatz zur Konstruktion von Kohlenhydratmimetika ist der, auf das Glycosidgerüst völlig zu verzichten (Abbildung 6, rechts) und statt dessen ein neues, nicht auf

Kohlenhydraten basierendes Grundgerüst aufzubauen und die benötigten Funktionalitäten so anzubringen, daß sie die gleiche räumliche Orientierung haben wie in der ursprünglichen Struktur. Zusätzlich können neue hydrophobe oder geladene Gruppen eingebaut werden, um die Affinität weiter zu erhöhen.

Eine große Vielzahl von Molekülen ist genutzt worden, um Kohlenhydrate und deren Derivate nachzuahmen. Einige natürlich vorkommende sind in den Abbildungen 8–14 zusammen mit den von ihnen

nachgeahmten Strukturen gezeigt. Tunicamycin (Abbildung 8) ist seit langem als potenter Inhibitor der UDP:GlcNAc:Dolichylphosphat-*N*-Acetylglucosaminyltransferase bekannt, dem Enzym, das den ersten Schritt in der Synthese des perfekten Saccharidondors für die *N*-Glycosylierung von Proteinen katalysiert.^[1] Die Nachahmung der Pyrophosphat-

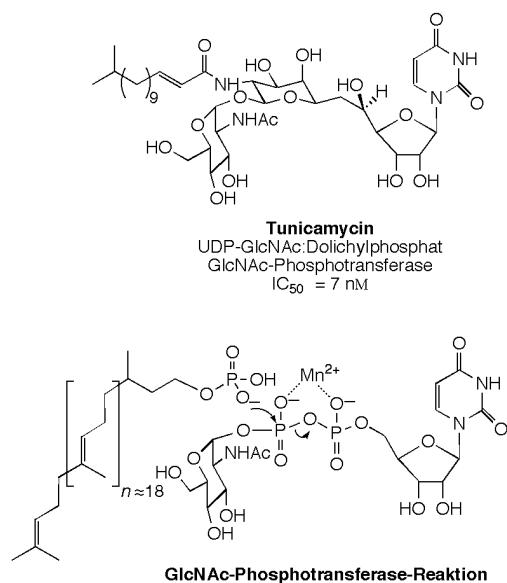


Abbildung 8. Der GlcNAc-Phosphotransferase-Inhibitor Tunicamycin^[156] und die von ihm nachgeahmte enzymatische Reaktion.

gruppe des Donors mit Galactosamin, welches mit Ribose C-verknüpft ist, ist hierbei neuartig. Moenomycin A (vermarktet als Flavomycin von der Fa. Hoechst; Abbildung 9)^[45]

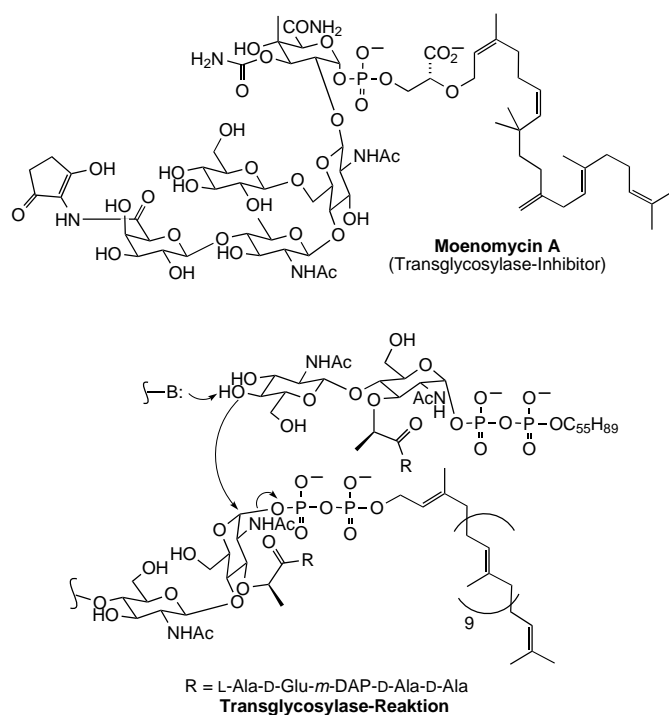


Abbildung 9. Der Transglycosylase-Inhibitor Moenomycin A (Strukturrevision von 1990^[45]) und die Transglycosylase-Reaktion.

ist ein Inhibitor der bakteriellen Transglycosylase, welches die schrittweise Kondensation von Disacchariden zum Polysaccharidgerüst der Peptidoglycan-Zellwand katalysiert. Wie Untersuchungen ergaben, kann ein Großteil des Moleküls unter Erhaltung der Aktivität entfernt werden.^[46, 47] Eine mögliche Transglycosylase-Inhibierung wurde kürzlich mit einer ganz anderen, vom Disaccharid des Vancomycins abgeleiteten Verbindung festgestellt.^[48] Verschiedene Typen natürlich vorkommender Glycosidase-Inhibitoren sind in den Abbildungen 10–13 zusammen mit den mutmaßlichen Übergangszuständen der inhibierten Reaktionen gezeigt.

Die chemische Synthese bietet noch mehr potentielle Kohlenhydratmimetika an, besonders auf dem Gebiet der Nucleinsäuremimetika (ein großes Gebiet, das Gegenstand einer Übersicht von Verma und Eckstein^[49] ist und hier nicht betrachtet werden soll) und auf dem Gebiet der Glycosidase- und Glycosyltransferase-Inhibitoren. Eine kleine Auswahl von Strukturtypen zur Nachahmung von Pyranoseringen

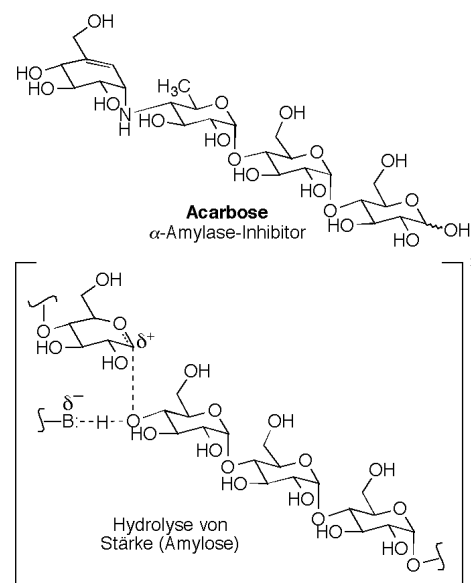


Abbildung 10. Der α -Amylase-Inhibitor Acarbose und die Amylase-katalysierte Hydrolysereaktion.

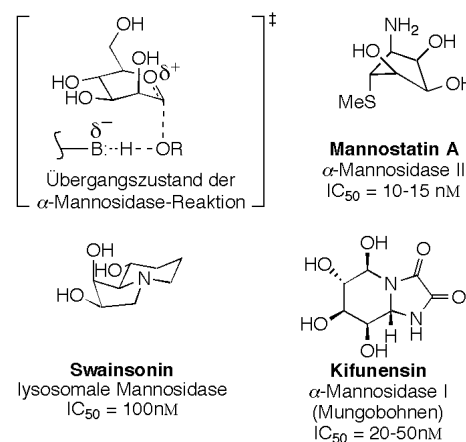


Abbildung 11. Die Mannosidase-Inhibitoren Mannostatin A,^[157] Swainsonin^[158] und Kifunensin^[159] sowie der mutmaßliche Übergangszustand der Mannosidase-katalysierten Reaktion.

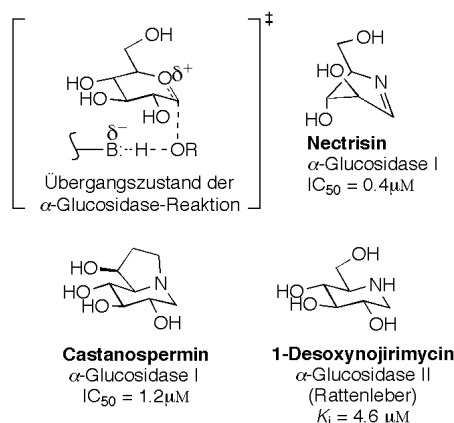


Abbildung 12. Die α -Glucosidase-Inhibitoren Nectrisin,^[160] Castanospermin^[160] und 1-Desoxyojirimycin^[161] sowie der mutmaßliche Übergangszustand der α -Glucosidase-katalysierten Reaktion.

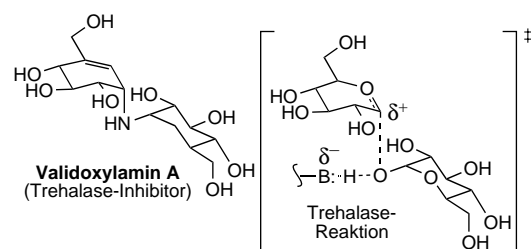


Abbildung 13. Der Trehalase-Inhibitor Validoxamin A sowie der mutmaßliche Übergangszustand der Trehalase-katalysierten Reaktion.

(oder den Übergangszuständen ihrer Hydrolyse) ist in Abbildung 14 gezeigt. Mehr darüber kann man in den Übersichtsartikeln von Vasella et al.,^[50] Tatsuta,^[51] Legler^[52] sowie

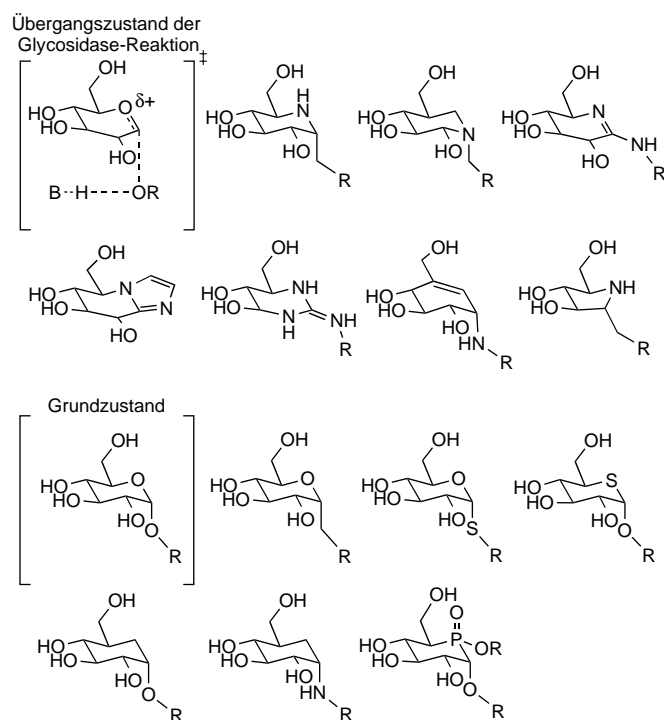


Abbildung 14. Einige einfache Mimetika des Grundzustandes eines rezeptorgebundenen Glycosids und des Übergangszustandes der enzymatischen Glycosid-Hydrolyse.

Heightman und Vasella^[53] nachlesen. Der letztere konzentriert sich auf die neuesten Versuche, die detaillierten mechanistischen Informationen über konfigurationserhaltende Glycosidasen durch das Design von Übergangszustandsanaloga zu verstehen. Im Falle von Glycosyltransferase-Inhibitoren sind hydrolyseunempfindliche Pyrophosphat-Analoga ebenfalls erwünscht. Ein Großteil der Bindungsenergie des Zuckerdonors resultiert aus der Bindung der Nucleotid-Abgangsgruppe, was dadurch unterstrichen wird, daß das freigesetzte Nucleotid unvermeidbar ein stark konkurrierender Inhibitor von Glycosyltransferasen ist. Analoga ausschließlich des Zuckerteils des Übergangszustands sind selten als gute Inhibitoren dieser Transferasen beobachtet worden. Bessere Inhibitoren enthalten Donor-Nucleotid- und/oder Acceptor-Mimetika. Die Abbildungen 8–10 zeigen eine Reihe natürlicher Verbindungen, die Pyrophosphat durch Zucker, Carboxylat- und Carbonylgruppen nachahmen. Eine Auswahl synthetischer Pyrophosphatmimetika ist in Abbildung 15 gezeigt. Unter diesen haben sich die Phosphonat- und Monosaccharid-Verbindungen als am vielversprechendsten erwiesen.^[54]

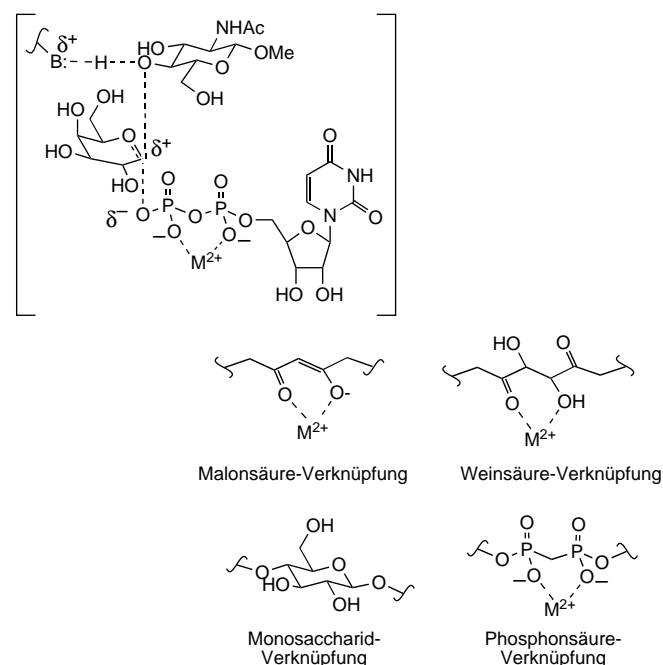


Abbildung 15. Der mutmaßliche Übergangszustand der Galactosyltransferase, der die Komplexbildung der Pyrophosphateneinheit durch ein zweiwertiges Metallion im aktiven Zentrum (z. B. Mn^{2+} oder Mg^{2+}) zeigt, und einige bereits verwendete Pyrophosphatmimetika.^[54]

4. Saccharidsynthese und Processing von Enzymen

Auf Zelloberflächen anzutreffende Oligosaccharide entstehen unter Beteiligung von Glycosyltransferasen und Glycosidasen. Die Saccharide können mit Proteinen durch eine Reihe verschiedener Bindungen verbunden sein, die am weitesten verbreiteten Verknüpfungen sind jedoch die mit Asparagin (N-verknüpft) oder Threonin/Serin (O-verknüpft). Während die O-Glycosylierung durch eine relativ einfache Addition eines einzelnen Zuckers an eine hydroxylierte

Seitenkette und Elaborierung mittels Glycosyltransferasen gelingt, ist die N-Glycosylierung komplizierter. Zuerst wird ein großes Oligosaccharid an ein spezialisiertes Phospholipid, Dolichylpyrophosphat, angeknüpft, dieses wird auf ein neu synthetisiertes Protein im endoplasmatischen Retikulum übertragen. Glycosidasen (Glucosidasen, Mannosidasen) schneiden das Saccharid auf ein viel kleineres Kernstück zurück, bevor es durch Glycosyltransferasen zum endgültigen N-Glycan umgesetzt wird.^[1]

Durch weitere Umformungen von Oligosacchariden wie Acetylierung, Sulfatisierung und Phosphorylierung kann ebenfalls das fertige Saccharid-Erkennungsmotiv erhalten werden.^[1] Glycosidasen und Glycosyltransferasen sind aus einer Vielzahl von Gründen wichtige Ziele für einen Eingriff. Das Fortschreiten einer Reihe von Krankheiten hängt von diesen Biokatalysatoren ab. Veränderungen in der Glycosylierung sind charakteristisch für Krebszellen^[55] und hängen häufig mit deren Metastasepotential zusammen. Insbesondere sind Krebszellen stärker sialyliert als ihre normalen Gegenstücke. Ihre N-Glycane sind grundsätzlich stärker verzweigt,^[56, 57] während die O-verknüpften Glycane eher verkürzt sind. Die Tn- (GalNAc-Ser/Thr)- und T-Antigene (Gal β 1,4GalNAc-Ser/Thr) sowie ihre sialylierten Versionen kommen ebenfalls weit häufiger auf Tumorzellen vor.^[58]

Die Vorbehandlung von Melanomzellen mit Tunicamycin (Abbildung 8), welches den ersten enzymatischen Schritt in der Protein-N-Glycosylierung inhibiert (UDP-GlcNAc:Dolichylphosphat-GlcNAc-Phosphotransferase), verringert ihre Bindung an Epithelzellen in Zellkulturen.^[59] Tunicamycin ist allerdings leider viel zu toxisch, um klinisch genutzt zu werden; viele Inhibitoren von Enzymen, die die ersten Schritte des Glycan-Processing katalysieren, sind extrem neurotoxisch. Selektivere Inhibitoren, die nur ein oder einige wenige Glycosylierungsenzyme inhibieren, werden folglich benötigt. Die Aktivität von Glycosidasen hat ebenfalls einen Einfluß auf die Metastasenbildung. Glycosidasen innerhalb des endoplasmatischen Retikulums und des Golgi-Apparates werden benötigt, um unreife N-Glycane vor ihrer Umwandlung in komplexere Strukturen anzupassen,^[1] während ausgeschiedene Glycosidasen die extrazelluläre Matrix abbauen und den Tumorzellen ermöglichen, in den Blutkreislauf zu gelangen. Die Enzyme, die an der Acetylierung, Phosphorylierung und Sulfatisierung von Kohlenhydraten involviert sind, sind weniger genau untersucht, können jedoch in Zukunft ebenfalls bedeutende Ziele für ein Eingreifen werden.

Mehrere mechanistische Studien deuten darauf hin, daß diese Art von Glycosidase- und Glycosyltransferase-Reaktionen nach einem S_N1-Mechanismus verlaufen,^[53, 60–62] wobei die Abgangsgruppe meist vor dem Angriff durch das Nucleophil (Wasser im Falle von Glycosidasen oder eine Zucker-Hydroxygruppe oder ein anderes Nucleophil im Falle von Glycosyltransferasen) abgespalten wird. Man nimmt an, daß der Übergangszustand ein verzerrter Ring in Halbsesselform mit einer erheblichen positiven Ladung am anomeren Kohlenstoffatom ist, die teilweise zum Ringsauerstoffatom delokalisiert ist (Abbildung 16). Diese Annahme wird durch viele Befunde gestützt, darunter solche aus Untersuchungen

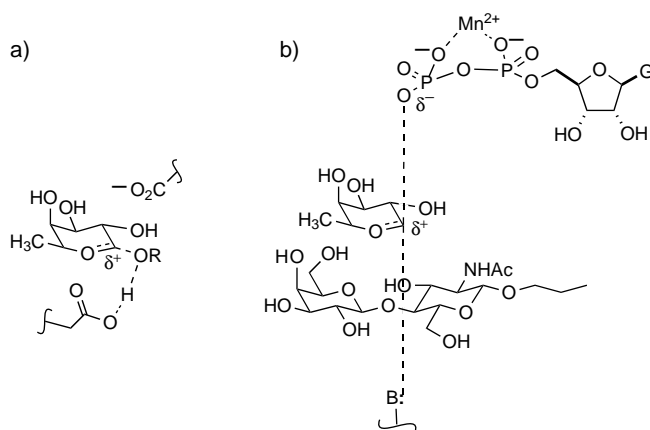


Abbildung 16. Übergangszustände der Fucosidase- (a) und der Fucosyltransferase-Reaktionen (b).^[63] G = Guanin.

kinetischer Isotopeneffekte^[63–67] und die starke inhibierende Wirkung von Verbindungen, die diese ebenen Ringoxocarbenium-Intermediate nachahmen^[53] oder destabilisieren.^[68, 69] Eine große Vielzahl von Molekülen ist synthetisiert worden, welche den vorgeschlagenen Übergangszustand verschiedener Glycosid-hydrolysierender Enzyme nachahmen. Der verzerrte Ring wird durch Ringe anderer Größe, durch den Einbau eines oder mehrerer sp²-Zentren in den Ring (z.B. ungesättigte Carbocyclen, Amidino- oder Guanidino-Zucker) oder durch die Störung der Konformation durch bicyclische oder verbrückte Systeme nachgeahmt. Die positive Ladung wird typischerweise durch Addition einer basischen Gruppierung, z.B. einer Amino-, Guanidin- oder Amidinogruppe, nachgeahmt. Die Verknüpfung dieser Verbindungen mit einer Abgangsgruppe (einem Zucker) oder einem Mimetikum liefert selektivere Glycosidase-Inhibitoren.^[68, 70] Die Anbindung an Nucleotide führt dagegen häufig zu Inhibitoren der verwandten Glycosyltransferasen. Viele der so erhaltenen Verbindungen, einige sind in Abbildung 17 dargestellt, sind starke Inhibitoren von Glycosidasen. Es ist klar, daß die Inhibierung sehr empfindlich gegenüber der Position des sp²-hybridisierten Atoms innerhalb des Rings (Abbildung 17 g und h) und der Position der positiven Ladung (Abbildung 17 i und j) sein kann. Einige der oben beschriebenen Azacyclen, insbesondere die fünfgliedrigen Iminocyclitole, wurden ebenfalls als Haptene genutzt, um zu katalytischen Antikörpern für die Katalyse der Glycosidspaltung zu gelangen.^[71] Ein alternativer Ansatz zur Inhibierung von konfigurationserhaltenden Glycosidasen, der über einen doppelten Inversion-Mechanismus mit einem kovalent gebundenen Enzym-Substrat-Intermediat verläuft,^[72, 73] ist die Verwendung eines Substrates, das ein stabiles kovalent gebundenes Intermediat bildet, wie 2- oder 5-Fluoroglycoside.^[68, 69] Bei Verwendung eines Fluoroglycosids mit einer guten Abgangsgruppe (entweder ein aktiviertes Glycosid wie das 2,4-Dinitrophenolat oder einfach das vom Enzym bevorzugte Aglycon^[68]) kann das Enzym den ersten Schritt, die Freisetzung der Abgangsgruppe und die Bildung des kovalent gebundenen Intermediats, katalysieren. Die anschließende Hydrolyse ist wegen der Destabilisierung des Oxocarbenium-Übergangszustandes durch das Fluor allerdings erschwert.

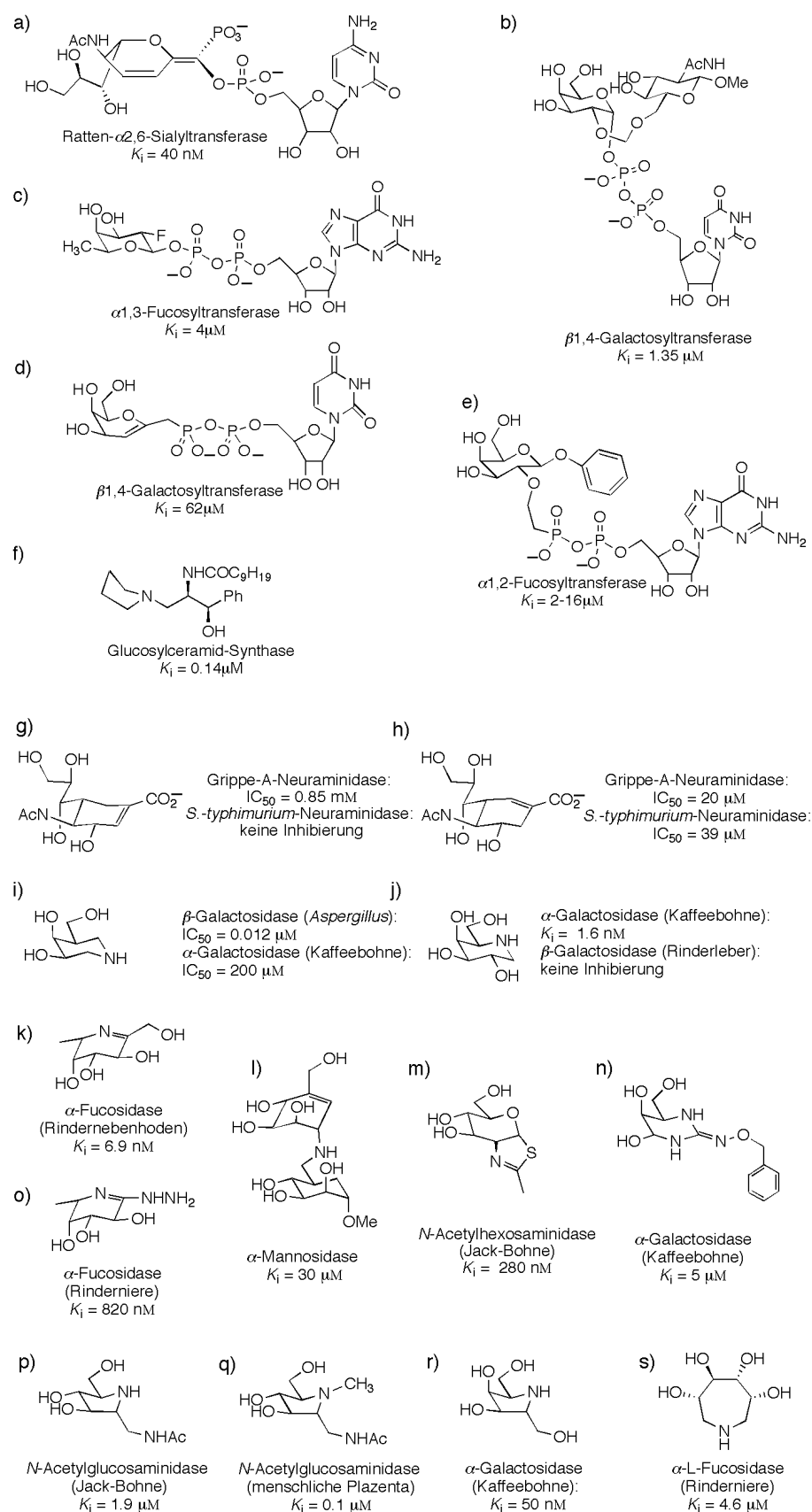


Abbildung 17. Ausgewählte Glycosidase- und Glycosyltransferase-Inhibitoren. a) Müller et al.,^[162] b) Hashimoto et al.,^[163] c) Murray et al.,^[63] d) Schmidt und Frische,^[164] e) Palcic et al.,^[165] f) Miura et al.,^[166] g, h) Vorwerk et al.,^[167] i) Ichikawa et al.,^[168] j) Bernotas et al.,^[169] Look et al.,^[170] k) Takayama et al.,^[171] l) Cottaz et al.,^[172] m) Knapp et al.,^[173] n) Jeong et al.,^[174] o) Schedler et al.,^[175] p) Takaoka et al.,^[176] q) Takebayashi et al.,^[177] r) Wang et al.,^[178] s) Moris-Varas et al.,^[179]

5. Mimetika von Mono- und Oligosaccharidliganden für Rezeptoren

Einfache Zuckermimetika können zu Oligosaccharidmimetika erweitert werden, aber die Art und Weise der Verknüpfung muß mit Vorbedacht entworfen werden. Saccharide binden an ihre Rezeptoren in einer genau definierten Konformation, die sich von der in Lösung völlig unterscheiden kann, wie im Fall der Bindung von Sialyl-Lewis^x an E-Selectin (siehe Abschnitt 5.1). Es sind mehrere Beispiele bekannt, in denen die Verknüpfung der Zucker durch nichtglycosidische Bindungen die Bindung an den Rezeptor oder einen Antikörper verhindert. So inhibieren „Carbopeptioide“ (Amid-verknüpfte 1-Iminocyclitole) Glycosidasen nicht (wenngleich ein Großteil dieses Effektes wahrscheinlich auf den Verlust der positiven Ladung am Ringstickstoffatom zurückzuführen ist).^[74] Monoklonale Antikörper gegen das G_{M3}-Lactam (das Lactam wird zwischen der Neu-Ac-Carboxylatgruppe und dem Stickstoffatom von Galactosamin gebildet) binden G_{M3} ebenfalls nicht, obwohl sie das G_{M3}-Lacton binden.^[75] Diese starke Differenzierung deutet darauf hin, daß das Lactam/Lacton und das nichtcyclisierte G_{M3} wahrscheinlich in unterschiedlichen Konformationen vorliegen.

Ein besserer Erfolg konnte durch den Austausch des glycosidischen Sauerstoffatoms durch Kohlenstoff (C-Glycoside) und Schwefel (Thioglycoside) erzielt werden. Einige Beispiele sind in den Abbildungen 18 und 19 dargestellt. Abbildung 18a zeigt PP-55B,^[76] einen exzellenten Inhibitor der Glc-P-Dol-Synthetase von Säugtieren, einem Enzym, das die Synthese einer Dolichylphosphoglucose (Glc-P-Dol) ausgehend von UDP-Glucose und Dolichylphosphat katalysiert. Glc-P-Dol ist eine Vorstufe für die Biosynthese des Dolichol-verknüpften Oligosaccharids, die während der Synthese N-verknüpfter Glycoproteine in einem Stück auf Asparagin übertragen wird. Der Inhibitor ahmt beide Substrate nach, und zwei der bemerkenswertesten Merkmale dieses Moleküls sind die ungeladenen

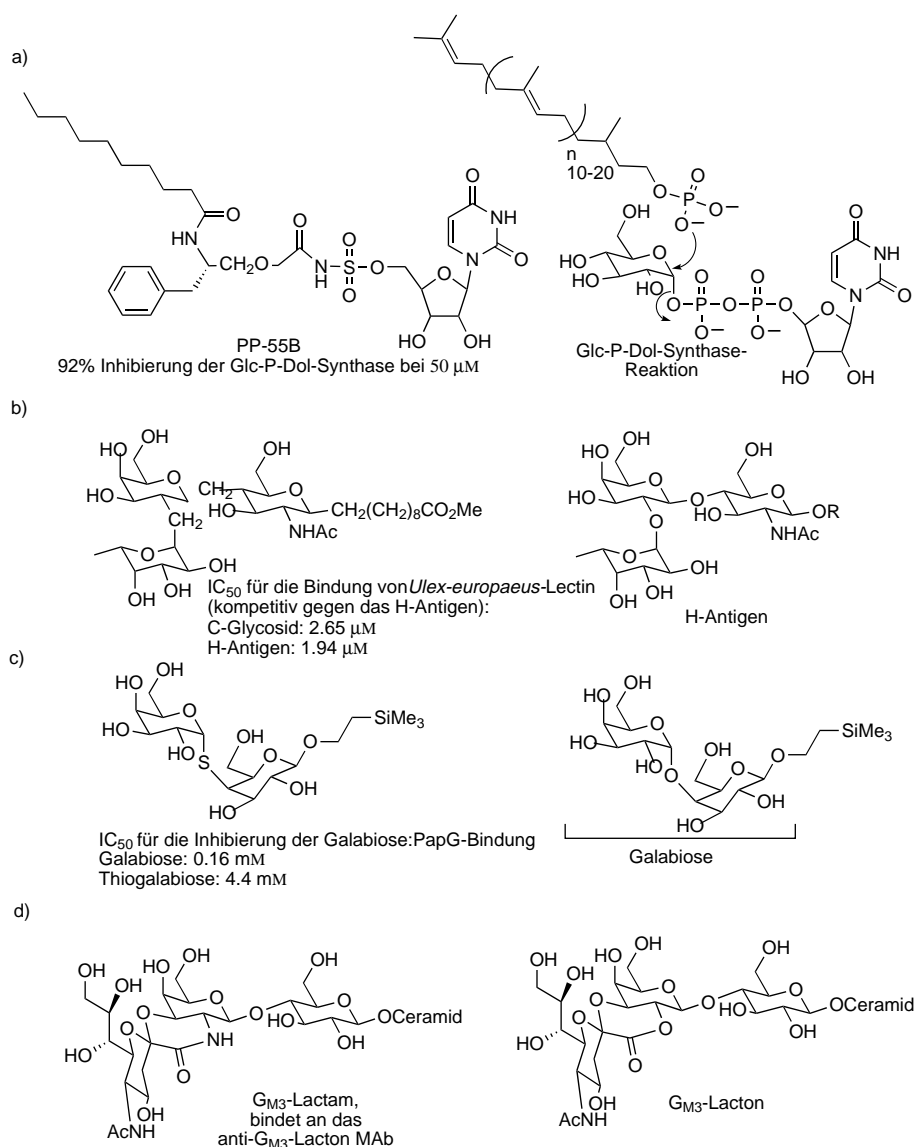


Abbildung 18. Ausgewählte Saccharidmimetika. a) PP-55B, ein Mimetikum der Reaktion zwischen Dolichylphosphat und UDP-Glucose;^[76] b) ein C-Glycosidmimetikum des H-Antigens;^[77] c) ein Thioglycosidmimetikum von Galabiose;^[79] d) Gangliosid- G_{M3} -Lactam, ein Mimetikum des Tumor-Antigens G_{M3} -Lacton.^[80]

Einheiten, die die Phosphat- und Pyrophosphat-Einheiten des Substrates nachahmen, und der komplette Austausch des Zuckerbausteins durch einen einfachen Phenylring.

Die Verbindungen in Abbildung 18b und c sind C-Glycosid- und Thioglycosidmimetika von Tri- und Disacchariden. Das Lectin UEA-I aus *Ulex europaeus* bindet das H-Antigen, ein Blutgruppen-Antigen, von dem man annimmt, daß es ein Rezeptor für einige Pathogene wie *H. pylori* ist.^[8] Das C-Glycosidanalogon des Blutgruppen-Antigens bindet an das Lectin im Vergleich zum normalen Saccharid mit nur leicht vermindeter Affinität, ist jedoch gegenüber Hydrolyse stabil.^[77] Galabiose (Gala1,4-Gal; Abbildung 18c) ist ein Charakteristikum in den Globo-Serien von Glycolipiden und wird von verschiedenen bakteriellen Adhesinen (z.B. *E. coli*-PapG) gebunden.^[78] Das Disaccharid und dessen Analoga sind Gegenstand von Untersuchungen zur Verhinderung der bakteriellen Adhäsion. Das Thioglycosidanalogon

weist eine leicht veränderte Konformation auf und inhibiert die PapG-Galabiose-Adhäsion mit einer etwas geringeren, aber immer noch beachtlichen Aktivität.^[79]

Das Lacton des G_{M3} -Gangliosids (Abbildung 18d), in dem die Carbonsäurefunktion der Sialinsäure eine Estergruppe mit der 2-OH-Gruppe der benachbarten Galactose bildet, ist ein tumorassoziiertes Antigen.^[80] Das Lactam, das stabilere Analogon, war immunogen und regte die Bildung von Antikörpern an, die zwar mit dem Lacton, jedoch nicht mit dem Gangliosid reagierten.^[81]

Das Cholera-Toxin, das für die Mehrzahl der Symptome der Infektion mit *Vibrio cholerae* verantwortlich ist, ist ein AB_5 -hexameres Toxin.^[11] Die fünf identischen B-Untereinheiten sind, auf kooperative Art und Weise, für die Bindung an den Zelloberflächen-Liganden (Gangliosid G_{M1} , Abbildung 19a) von entscheidender Bedeutung.^[18] Die B-Untereinheiten übertragen und liefern die A-Untereinheit zur Zielzelle. Die A-Einheit ist ein Enzym, welches die ADP-Ribosylierung von G_s , einem an Signaltransduktionskaskaden beteiligten Protein, katalysiert. Das modifizierte G_s bleibt als Ergebnis ständig „angeschaltet“, was eine Überstimulierung der Adenylat-Cyclase zur Folge hat.^[11] Die wichtigsten Bindungsdeterminanten für das Cholera-Toxin innerhalb des G_{M1} -Gangliosids sind die terminale Sialinsäure und die Galactosereste. Ein Gangliosid-Analogon, in dem

der Glucoserest am reduzierenden Ende durch einen einfachen Cyclohexandiolrest ersetzt ist (Abbildung 19b), weist im Vergleich zum natürlichen Gangliosid nahezu identische konformative und bindende Eigenschaften auf.^[82]

5.1. Bindung von Sialyl-Lewis^x an E-Selectin

Ein genau untersuchtes Ziel für therapeutische Eingriffe ist die Wechselwirkung von Sialyl-Lewis^x mit dem Zelloberflächenrezeptor E-Selectin. Wie schon in der Einleitung diskutiert wurde, findet dieser Bindungsvorgang in einer frühen Phase der Entzündungsantwort statt und repräsentiert einen der ersten Schritte in der Bereitstellung von weißen Blutkörperchen an das beschädigte Gewebe (Abbildung 20). Eine unzureichende oder übermäßige Bereitstellung von Leukozyten kann zu Schädigungen führen. Viele akute Entzün-

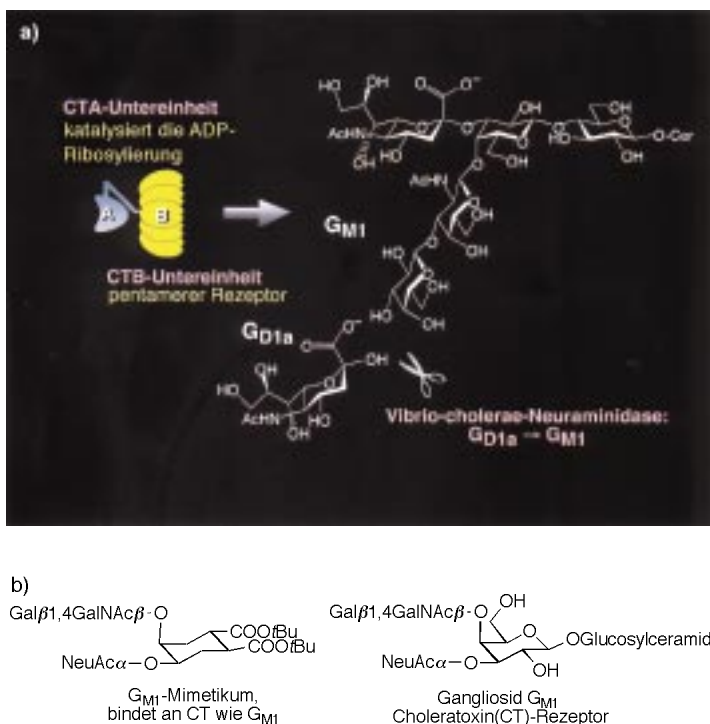


Abbildung 19. a) Bindung des Cholera-toxins an Zellen. Vibrio-cholerae-Neuraminidase entfernt Sialinsäure vom Gangliosid G_{D1a} , so daß Gangliosid G_{M1} entsteht, welches der Rezeptor für das Cholera-toxin ist. b) Inhibitor der Cholera-toxin-Bindung an G_{M1} : ein G_{M1} -Mimetikum auf einem Cyclohexan-Grundgerüst.^[82]

dungszustände (z.B. Reperusionsverletzungen und septischer Schock) sowie chronische Entzündungskrankheiten (z.B. rheumatische Arthritis und Asthma) können mit Antagonisten dieser Wechselwirkung behandelt werden. Seitdem es Anhaltspunkte dafür gibt, daß diese Wechselwirkungen für das große Metastasepotential bestimmter Tumorzelllinien (z.B. Melanome, die sich durch ein hohes Niveau an sialylierten Lewis-Antigenen auszeichnen) verantwortlich sind,^[55] besteht die Hoffnung, daß die Intervention an dieser

Stelle einen neuen Ansatzpunkt für eine Krebs-Chemotherapie bilden könnte.

Eine große Vielzahl von sLe^x-Analoge ist entworfen und synthetisiert worden, basierend auf 1) der bekannten NMR-Struktur des an E- und P-Selectin gebundenen Tetrasaccharids (die sich deutlich von der des freien Tetrasaccharids in Lösung unterscheidet, wobei der Hauptunterschied in der Konformation der Sialylsäurereste liegt; Abbildung 21),^[83] 2) der Kristallstruktur der Lectin- und der EGF-artigen-Domänen von E-Selectin^[34] und 3) dem Wissen um die bedeutenden strukturellen Funktionalitäten für eine Bindung an Selectin.^[84, 85] In einem neueren Übersichtsartikel^[86] wird eine Zusammenfassung über dieses Gebiet gegeben, einiges davon wird hier vorgestellt. Die bedeutenden Wechselwirkungen zwischen Sialyl-Lewis^x (oder dessen Sulfat-Derivaten) und E-, P- und L- Selectinen sind in Abbildung 21 dargestellt. Für eine E-Selectin-Erkennung sind alle drei Hydroxygruppen der Fucose notwendig. Dies macht Sinn, da die 3- und die 4-OH-Gruppe ein Calciumatom koordinieren,^[34, 35] ähnlich der Bindung von Mannose durch das Mannose-bindende Protein (Abbildung 2). Die Fucose ist in der Tat in einigen aktiven Verbindungen durch D-Mannose ersetzt worden.^[86] Die 4- und die 6-OH-Gruppe von Galactose sind ebenfalls notwendig, wie auch die Carboxylateinheit der Sialinsäure. GlcNAc scheint keine Funktionalitäten, die für die Bindung explizit notwendig sind, beizutragen und ist durch eine Reihe difunktionaler Linker ersetzt worden. Der Austausch der Zucker durch aromatische oder andere hydrophobe Gruppen (in der Hoffnung, die hydrophoben Wechselwirkungen zu verbessern) führte zu Verbindungen mit höherer Affinität zu E-Selectin als Sialyl-Lewis^x (Tabelle 1).

Ein weiterer effektiver Ansatz zur Herstellung von Verbindungen höherer Affinität ist die Nachahmung der polyvalenten Natur der Leukozyten durch den Einbau von Sialyl-Lewis^x in vernetzte Liposome oder lineare Polymere (Abbildung 22; für eine neuere Übersicht über Polyvalenz in biologischen Systemen siehe Mammen et al.^[15]). Ähnliche Ansätze wurden verfolgt, um sLe^x- und Sulfo-sLe^x-Mimetika

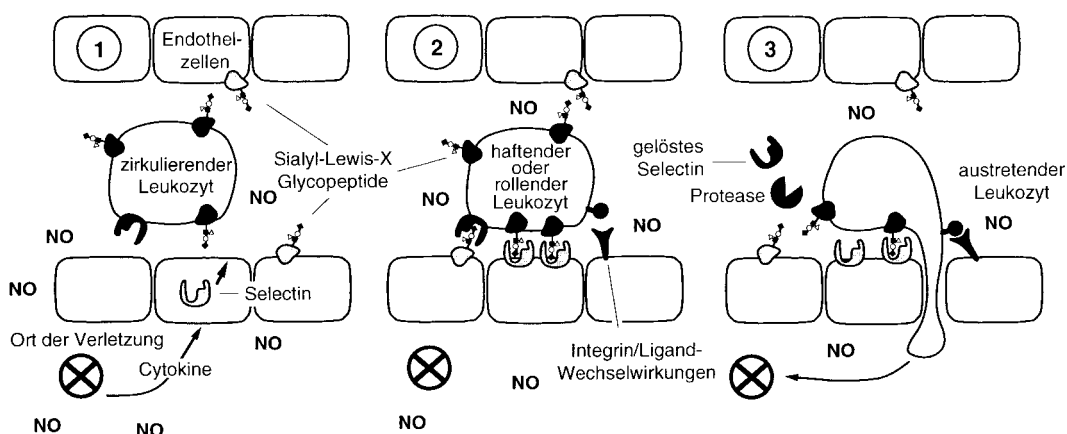


Abbildung 20. Schematische Darstellung der Entzündungs-Reaktionskaskade. 1) Eine Gewebeerletzung findet statt; Cytokine und Stickstoffoxid werden freigesetzt. 2) Selectine auf der Zelloberfläche wechselwirken mit dem Sialyl-Lewis^x-Liganden. (E- und P-Selectine befinden sich auf der Oberfläche von Endothelzellen, während L-Selectin auf der Leukozyten-Oberfläche zu finden ist.) sLe^x befindet sich auf der Oberfläche der Leukozyten oder der Endothelzellen. sLe^x-6-Sulfat ist ein bevorzugter Ligand für L-Selectin. 3) Integrin-ICAM-1-Wechselwirkung und anschließende Extravasation von Leukozyten.

zur Bindung an P- und L-Selectine zu entwickeln. Die Entwicklung von P-Selectin-Antagonisten ist eine große Herausforderung, da sLe^x an P-Selectin mit einer Dissoziationskonstanten von ca. 8 mM bindet. Zusätzlich trägt eine zweite Bindungsstelle für den Sulfotyrosinrest des P-Selectin-Glycoprotein-Liganden (PSGL-1) bedeutend zur Bindung bei (Abbildung 23). Ein kurzes, eine zusätzliche Sulfatgruppe tragendes sLe^x-Glycopeptid^[87] bindet an P-Selectin mit $K_d = 70$ nM. Bislang ist jedoch kein brauchbares Mimetikum bekannt, das auf beide Bindungsstellen von P-Selectin zielt, obgleich das sulfatisierte Glycopeptid im Prinzip in großen Mengen enzymatisch hergestellt werden kann, da Regenerationsverfahren für 3'-Phosphoadenosin-5'-phosphosulfat (PAPS) und Zuckernucleotide vorliegen (Abbildung 23).^[86, 88] L-Selectin bindet eine Reihe von sulfatiserten Sacchariden, einschließlich Heparinsulfat^[89] und Phosphomannan.^[90] Neueste Befunde deuten darauf hin, daß sLe^x-6-Sulfat sehr wohl der natür-

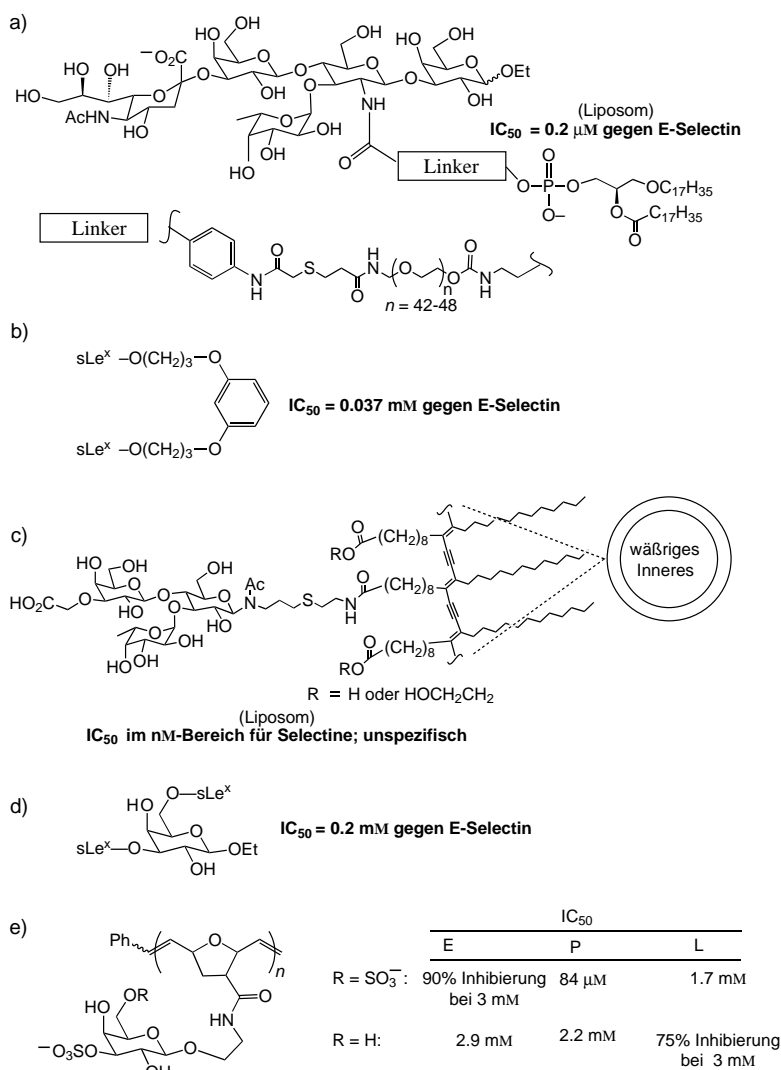


Abbildung 22. Polyvalente sLe^x-Mimetika. a) DeFrees et al.;^[181] b) Miyauchi et al.;^[182] c) Spevak et al.;^[183] d) DeFrees et al.;^[184] e) Manning et al.^[146]

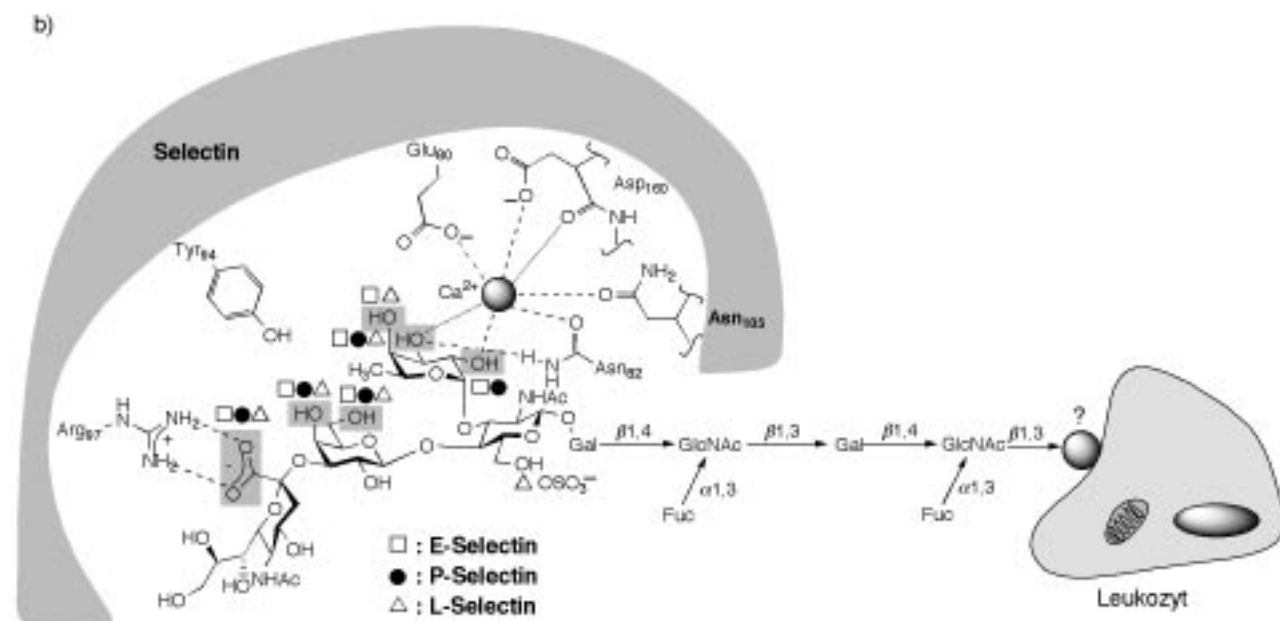
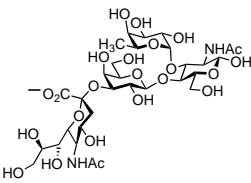
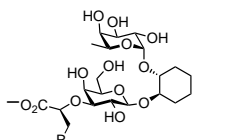
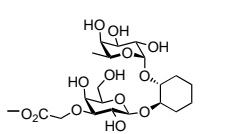
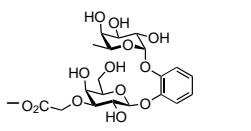
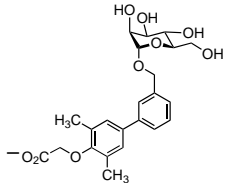
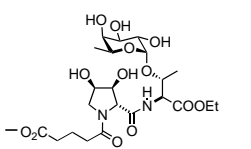
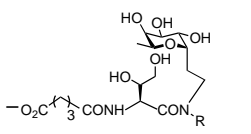
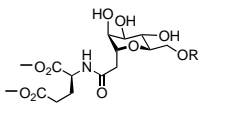
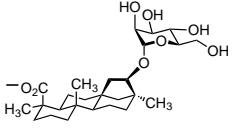
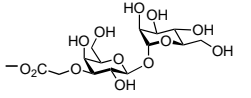
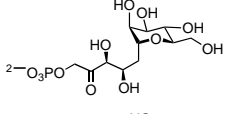
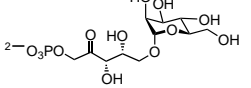


Abbildung 21. a) Lösungskonformationen von L-Selectin-gebundenem (weiß) sowie von E- und P-Selectin-gebundenem sLe^x (gelb).^[83] b) Bindungs-determinanten für die Bindung von Sialyl-Lewis^x an die Selectine.

Tabelle 1. sLe^x sowie Sialyl-Lewis^x-Mimetika und deren Aktivitäten.^[83] n.b. = nicht bestimmt.

	E-Selectin	P-Selectin	L-Selectin
 (sLe ^x)	0.7 mM	8 mM	4 mM
 R = Cyclohexyl R = Phenyl	80 μM ^[a] 350 μM ^[a]	— —	— —
	0.5 mM ^[b]	—	—
	> 10 mM ^[b]	—	—
	50 μM ^[c]	n.b.	n.b.
	50 μM ^[d]	n.b.	n.b.
 R = CH ₂ CONH(CH ₂) ₁₃ CH ₃ R = H	37 μM ^[e] 0.3 mM ^[e]	7 μM ^[e] 4 mM ^[e]	190 μM ^[e] > 5 mM ^[e]
 R = (CH ₂) ₁₅ CH ₃ R = H	53 μM ^[f] 0.1 mM ^[f]	2.2 μM ^[f] > 3 mM ^[f]	7.6 μM ^[f] 2.7 mM ^[f]
	> 3 mM ^[g]	80 mM ^[g]	> 3 mM ^[g]
	100 μM ^[h]	1.8 μM ^[h]	2.0 μM ^[h]
	800 μM ^[i]	5 μM ^[i]	40 μM ^[i]
	100 μM ^[i]	0.6 μM ^[i]	95 μM ^[i]

[a] Kolb und Ernst.^[148] [b] Bamford et al.^[149] [c] Dupre et al.^[150] [d] Lin et al.^[151] [e] Woltering et al.^[152]
[f] Wong et al.^[153] [g] Ikeda et al.^[154] [h] Hiruma et al.^[155]

liche Ligand sein kann,^[91, 92] und sowohl das 6-Sulfo-sLe^X- als auch das modifizierte 6-Sulfo-de-N-acetylierte sLe^X-tragende Gangliosid sind durch Totalsynthese hergestellt worden.^[93] Interessanterweise scheint die de-N-acetylierte Verbindung der bessere L-Selectin-Ligand zu sein.

5.2. Heparin-Antithrombin

Die „Heparinoide“, Heparin und Heparinsulfat, sind viele Sulfatgruppen tragende und sich aus wiederholenden Einheiten von [D-Glucosaminy- α -1,4-hexuronosyl- β ,1,4-] zusammensetzende Glycosaminoglycane, in denen die Hexuronsäure entweder Glucuronsäure oder Iduronsäure (das C-5-Epimer von Glucuronsäure) ist.^[94] Das Glucosamin ist entweder N-sulfatisiert oder N-acetyliert. O-Sulfate findet man ebenfalls an einer Reihe von Positionen, besonders an C-2 der Iduronsäure, an C-6 (und manchmal an C-3) des Glucosamins und gelegentlich an C-2 der Glucuronsäure. Heparin ist eine höherentwickelte Form des Heparinsulfats und enthält mehr Iduronsäureeinheiten und Sulfatgruppen. Heparinoide haben viele biologische Wirkungen, sie wirken unter anderem antikoagulierend und erhöhen die Stabilität und die Aktivität von sauren und basischen Fibroblast-Wachstumsfaktoren. Sie binden bekanntermaßen an über einhundert verschiedene Proteine.^[95]

Die Antigerinnungswirkung von Heparin ist seit über 60 Jahren bekannt und wird klinisch genutzt. Heparin inhibiert die Aktivität von Thrombin (Faktor IIa) und Faktor Xa durch Wechselwirkung mit Antithrombin III (ATIII; Abbildung 24 und 25). Die Bindung einer AT-III-erkennenden Sequenz (Abbildung 26a) verursacht eine Konformationsänderung in ATIII.^[96] Dies ist für die Inhibierung des Faktors Xa ausreichend. Die Inhibierung von Thrombin erfordert hingegen die Wechselwirkung von Thrombin sowohl mit dem Heparin-aktivierten ATIII als auch direkt mit Heparin. Es wird vermutet, daß Heparin sowohl zur Aktivierung von ATIII als auch als „Adapter“ zwischen ATIII und Thrombin dient.^[97] Folglich ist ein längeres Heparinmolekül (ca. 18 Saccharide lang^[97]) für die Inhibierung von Throm-

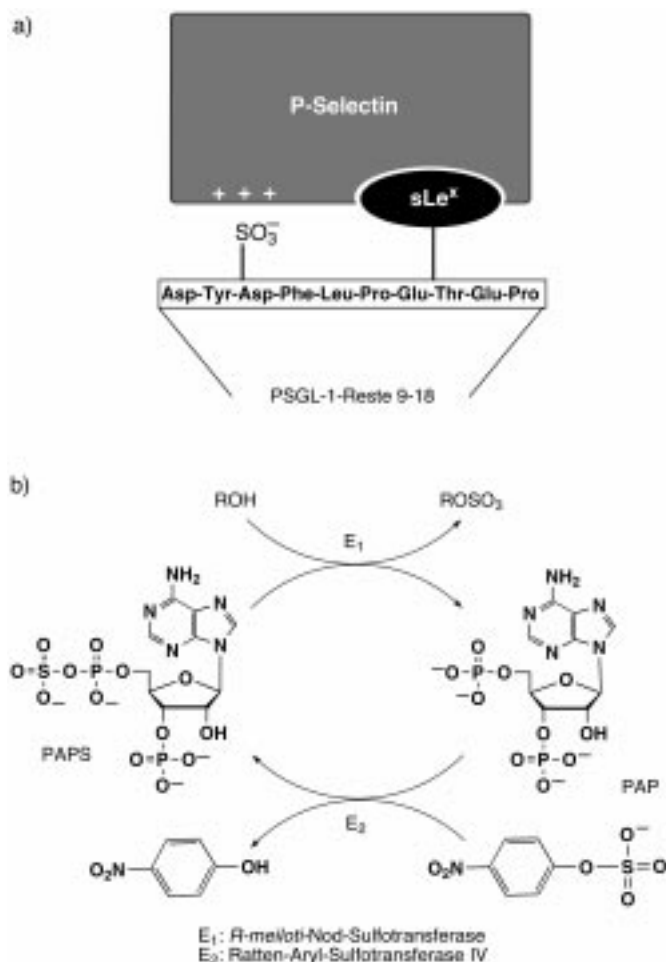


Abbildung 23. a) Zusätzliche Wechselwirkungen zwischen P-Selectin und dem Tyrosinsulfatrest seines Glycoproteinliganden, PSGL-1.^[87] b) Neuartige Regeneration von PAPS aus PAP unter Verwendung von *p*-Nitrophenylsulfonat und einer rekombinanten Arylsulfotransferase.^[88]

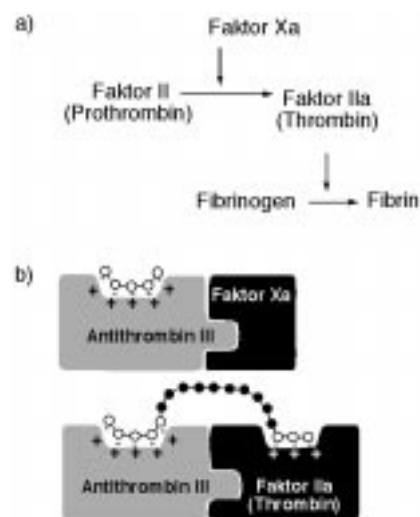


Abbildung 24. a) Die letzten Schritte der Gerinnungskaskade. b) Schematische Darstellung der Wechselwirkungen zwischen Heparin (dargestellt als Kette aus Kreisen) und Antithrombin III sowie zwischen Heparin und Thrombin. Man beachte, daß die Bindung des Thrombins ein größeres Heparin-Fragment (>18mer) erfordert, während für die AT-III-Bindung nur ein Pentamer benötigt wird.

bin notwendig als für die Inhibierung von Faktor Xa. Ein Großteil der Bindungswechselwirkungen ist elektrostatischer Natur.

Grootenhuys und van Boeckel haben ein Modell der Assoziation zwischen dem Heparin-Pentasaccharid und ATIII vorgeschlagen.^[98] Eine dreidimensionale Struktur von ATIII wurde postuliert, basierend auf seiner Homologie zu α 1-Antitrypsin, einem Protein bekannter Struktur. Die Notwendigkeit der Reste 41–49 für eine Heparinbindung war schon vorher bekannt, und in der Tat fielen diese Seitenketten in eine Region von konzentrierter positiver Ladung. Die Ankopplung des Heparin-Pentasaccharids an diese Region lieferte ein Modell für die Bindungsstelle, in der das Pentasaccharid mehr oder weniger in Lysin- und Argininresten „badet“. Die für eine Bindung an ATIII kritischen funktionellen Gruppen (vier Sulfat- und zwei Carboxylatreste^[94]) sind in Abbildung 26a gezeigt. Die N-Sulfate können durch O-Sulfate ersetzt sein, und viele der Hydroxygruppen können methyliert werden ohne einen Verlust an Aktivität (tatsächlich sogar mit einer leichten Zunahme der Aktivität) gegenüber Faktor Xa.^[94]

Die Umwandlung der Glucuronsäure in eine Iduronsäureeinheit hat einen moderaten Aktivitätsverlust zur Folge, aber dies wird durch die Leichtigkeit der Synthese mehr als wieder gut gemacht: Ein polymeres Heparinmimetikum kann ausgehend von dimeren Einheiten synthetisiert werden.^[99] Dies ermöglichte die mühelose Synthese des in Abbildung 26b gezeigten Mimetikums, welches lang genug ist, eine AT-III-Inhibierung von Faktor Xa und Faktor IIa (Thrombin) zu verursachen, und Thrombin nahezu ebenso inhibiert wie Heparin. Man nimmt an, daß die nichtspezifische Bindung der Heparinoide an bestimmte Proteine (z. B. den Plättchenfaktor PF4) und fundamentale Proteine (z. B. Fibrinogen und den von-Willebrand-Faktor) die unerwünschten Nebenwirkungen der Heparintherapie, die bekanntesten sind Thrombozytopenie und Blutsturz, auslöst. Weiterhin wurde postuliert, daß eine Verringerung der Ladungsdichte in der Region zwischen der AT-III-Bindungsstelle und der Thrombin-Bindungsstelle die nichtspezifischen Bindungseffekte herabsetzen könnte.^[100]

Dreef-Tromp und Mitarbeiter^[101] verbanden eine Thrombin-Bindungsstelle und eine AT-III-Bindungsregion mit ungeladenen, flexiblen Ketten. Sie verknüpften eine Thrombin-Bindungsregion (persulfatierte Maltotriose) mit dem Pentasaccharid aus Abbildung 26a über einen flexiblen Polyethylenlinker (Abbildung 26c) oder über einen ungeladenen Polysaccharidlinker. Beide Produkte wiesen eine starke Thrombin-inhibierende Wirkung auf, der Polysaccharidlinker war allerdings, vermutlich wegen seiner geringen Flexibilität, überlegen. Eine ähnliche Verbindung mit einer anderen Thrombin-bindenden Domäne ist in Abbildung 26d gezeigt. Voruntersuchungen zur PF4-Bindung und zu Blutungszeiten in Anwesenheit dieses Heparinmimetikums legen nahe, daß es weniger Nebenwirkungen als Heparin hat.^[100]

Es ist erwähnenswert, daß sich die Bindungsstelle von Heparin für den Fibroblast-Wachstumsfaktor (FGF) deutlich von der AT-III-Bindungsstelle unterscheidet. Die übereinstimmende Sequenz für eine FGF-Bindung ist das 14mer Oligo-H (GlcA- β 1,4-GlcNSO₃- α 1,4-[IdoA(2S)- α 1,4-GlcNSO₃]₅- α 1,4-IdoA- α 1,4-GlcNAc).^[102] Willkürlich (mit Car-

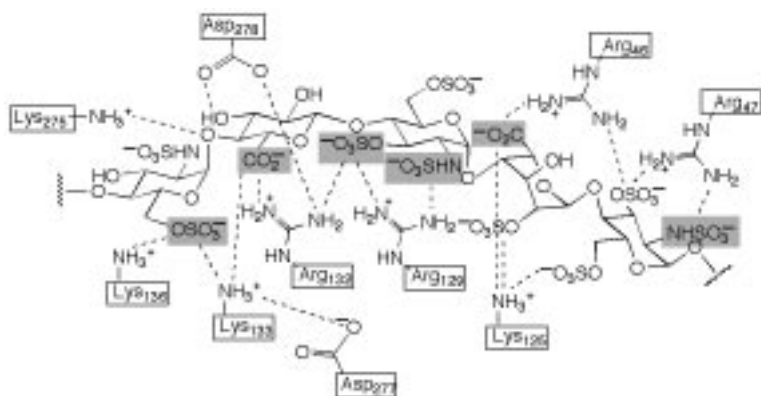


Abbildung 25. Bedeutende Wechselwirkungen zwischen Heparin und Antithrombin III, basierend auf einem Modell von Grootenhuis und van Boeckel.^[98]

boxymethyl, Benzylamid und Benzylamidsulfonat) derivatisierte Dextrane können Heparin^[103] in bezug auf FGF-Aktivierung und Stabilisierung zwar ersetzen, haben aber nur eine minimale antikoagulierende Wirkung.

5.3. Lipid A, das LPS-bindende Protein und CD14

Gram-negative Bakterien sind durch eine zweite Membran außerhalb der Peptidoglycan-Matrix charakterisiert. Ein Hauptbestandteil dieser Membran sind Lipopolysaccharide. Wenn sich auch die

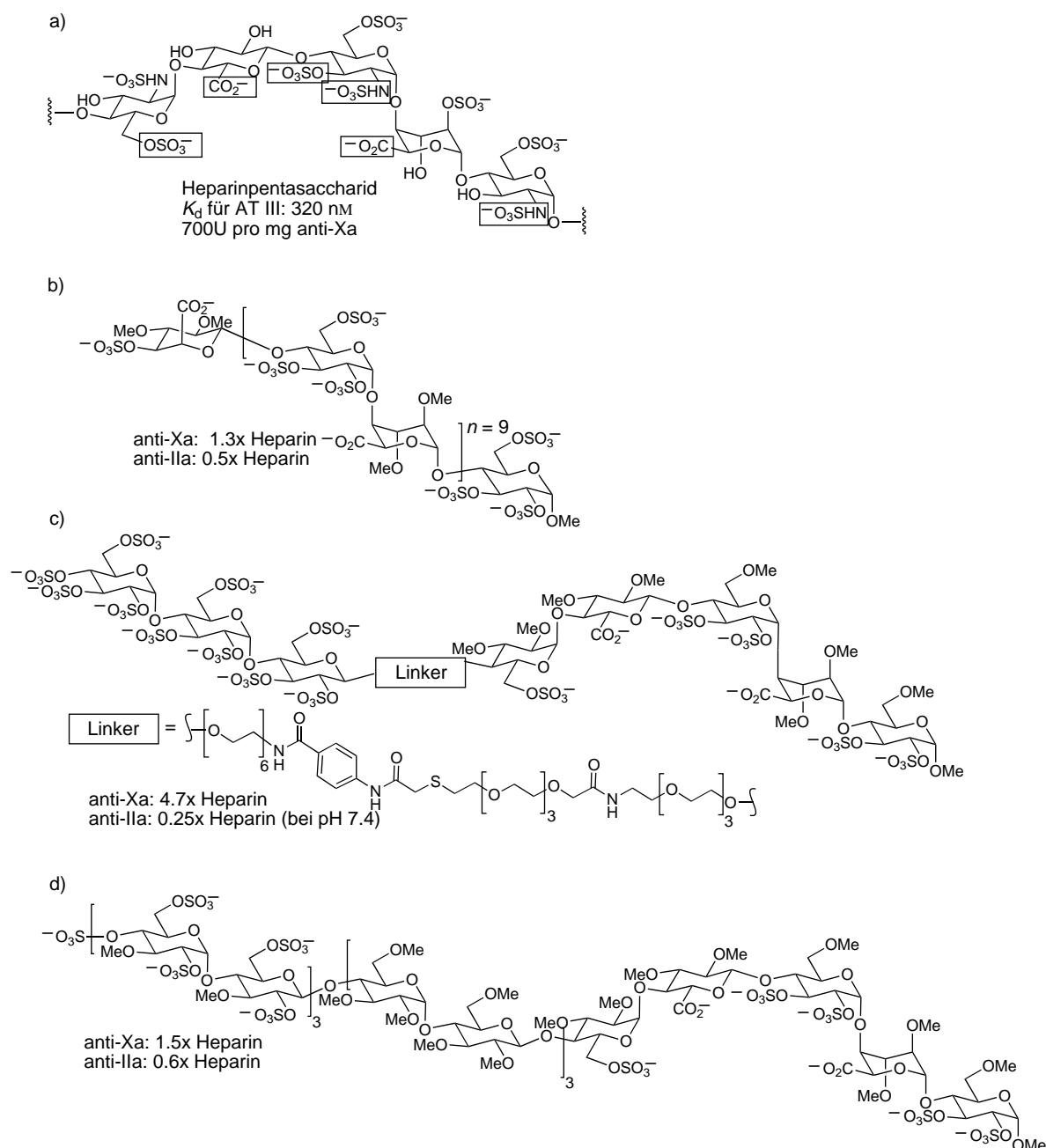


Abbildung 26. a) Die Erkennungssequenz für Antithrombin III (ATIII). b)–d) Heparinmimetika, die sowohl AT III als auch Thrombin binden.

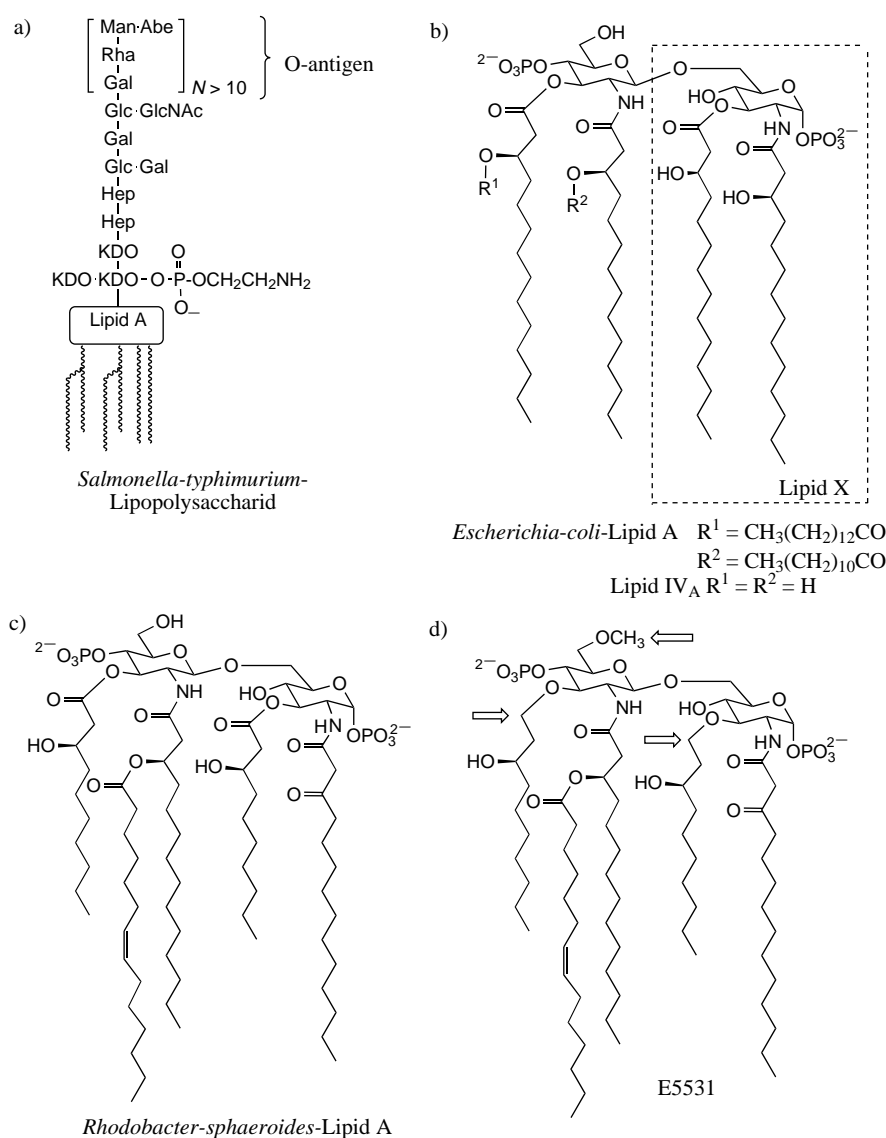


Abbildung 27. Gram-negative bakterielle Lipopolysaccharide (LPS). a) *Salmonella-typhimurium*-LPS. b) Lipid A verschiedener bakterieller Spezies: *E.-coli*-Lipid X, Lipid A und Lipid IV_A. c) *Rhodobacter-sphaeroides*-Lipid A. d) E5531. Abe = Abequose; Hep = L-Glycero-D-mannoheptose; KDO = 2-Keto-3-desoxyoctansäure.

Lipopolysaccharide einzelner Bakterien voneinander unterscheiden, folgen sie doch dem gleichen allgemeinen Aufbauprinzip. Der „Anker“ ist eine große Struktur, das sogenannte Lipid A (Abbildung 27), ein phosphoryliertes Disaccharid mit mehreren Fettsäureketten, die durch Ester- und Amidbindungen angebracht sind. Dieser Anker ist mit dem „Kern“-Polysaccharid verbunden und schließlich mit einer sich wiederholenden Struktur, dem O-Antigen, einem sehr variablen und Spezies-spezifischen Saccharid, verknüpft. Lipopolysaccharide vieler Bakterien sind hochtoxisch für den Menschen (daher ihr Name „Endotoxine“) und verantwortlich für den septischen Schock.^[104]

Der septische Schock ist ein ernstzunehmendes Problem und ein unglückseliges Beispiel für die alte Redewendung: „Operation erfolgreich – Patient tot“. Eine Behandlung mit Antibiotika kann pathogene Gram-negative Bakterien abtöten, aber die von den zerstörten Bakterien freigesetzten

Endotoxine können akutere Symptome und lebensbedrohendere Zustände verursachen als die ursprüngliche Infektion. Der Mechanismus der toxischen Wirkung beginnt mit der Bindung der Lipopolysaccharide (LPS) an ein lösliches Bindungsprotein (LBP) im Serum. Dieser Komplex bindet an das Glycosylphosphatidylinositol(GPI)-verknüpfte Protein CD14 und den Rezeptor TLR2 an der Oberfläche von Makrophagen und Neutrophilen, was zur Produktion verschiedener Cytokine durch die Zellen führt (Abbildung 28).^[105, 106] Die Hoffnung, einen Wirkstoff gegen Endotoxemie zu finden, hat durch die Entdeckung nichttoxischer Glycolipide mit Endotoxin-antagonistischer Aktivität (wie Lipid A aus *Rhodobacter sphaeroides*^[107] und den Lipid-A-Vorstufen Lipid X und Lipid IV_A, Abbildung 27) einen Auftrieb erhalten.^[104] *Rhodobacter*-Lipid A ist leider in wässriger Lösung instabil, die Esterfunktionen werden hydrolysiert. Mit der Synthese des stabilisierten Mimetikums E5531 (das 6'-O-methyliert ist und in dem die Ester- durch Etherbindungen ersetzt sind)^[104, 108] steht ein potentieller therapeutischer Wirkstoff gegen den septischen Schock zur Verfügung. Diese Verbindung weist eine hohe LPS-antagonistische Aktivität auf und wird derzeit klinisch erprobt. Eine Vielzahl von anderen Verbindungen, die entweder die *Rhodobacter*-Lipid-A- oder die LPS-antagonistischen Lipid-A-Vorstufen Lipid X und Lipid IV_A nachahmen, sind ebenfalls Gegenstand von Untersuchungen und waren kürzlich Thema einer Übersicht von Chaby.^[105]

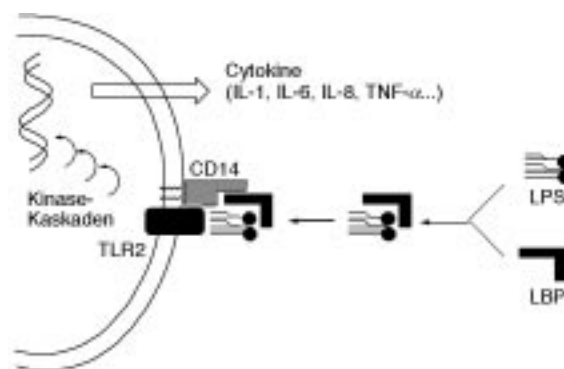


Abbildung 28. Schematische Darstellung der Immunaktivierung durch bakterielle LPS.^[105, 106]

5.4. Aminoglycosid-RNA-Wechselwirkung

Viele Aminoglycosid-Antibiotika wie Neomycin und Streptomycin (Abbildung 29) wechselwirken mit der 16S-Untereinheit des bakteriellen Ribosoms, inhibieren die Translation und verursachen Fehlcodierungen (Abbildung 30).^[13] Die Aminoglycoside haben einige Nachteile. Viele von ihnen sind oral inaktiv und/oder toxisch für den Menschen und müssen

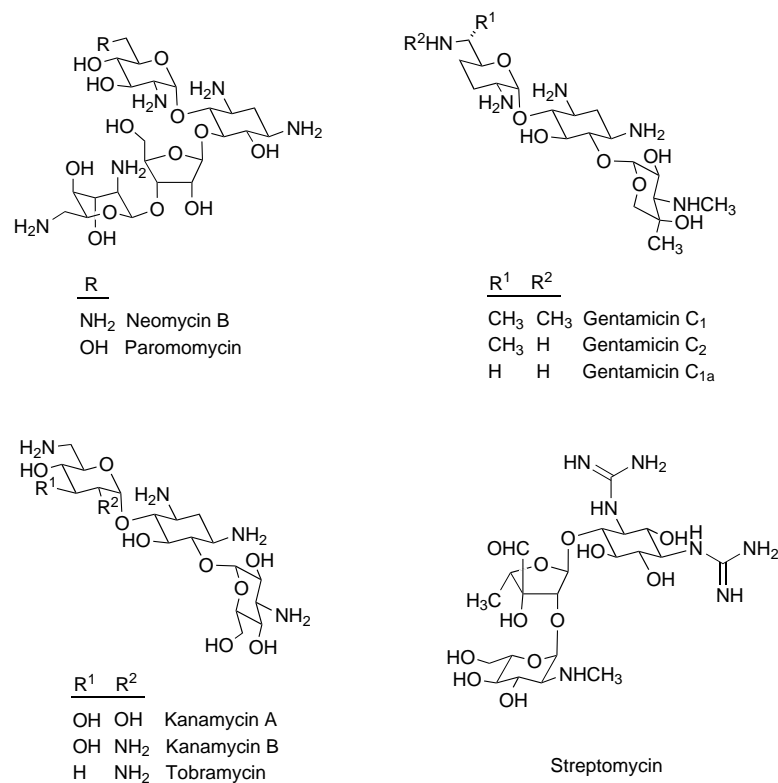


Abbildung 29. Strukturen ausgewählter Antibiotika.

durch Auftragung auf die Haut oder durch Injektion verabreicht werden. Sie reichern sich allgemein in den Nieren an, und viele sind stark nephrotoxisch.^[109] Zusätzlich gibt es viele gegen Aminoglycoside resistente Bakterienstämme. Diese Resistenzen werden durch verschiedene Mechanismen hervorgerufen, einschließlich Mutationen innerhalb der ribosomalen Bindungsstelle (Abbildung 31 a) und kovalenter Modifizierungen (Acetylierung, Phosphorylierung oder Adenylierung; Abbildung 31 b) des Antibiotikums.^[110, 111] Stabilere und weniger toxische Aminoglycosidmimetika sowie solche, die kein Substrat für modifizierende Enzyme sind, können therapeutisch nützlich sein.

Eine interessante Struktureigenschaft dieser Antibiotika ist das Vorliegen eines *trans*-1,3-Hydroxyamin- oder *cis*-1,3-Diamin-Motivs. Neuere Studien legen nahe, daß die 1,3-Hydroxyamino-Gruppe stark sowohl mit dem Phosphodiestergerüst als auch mit der Hoogsteen-Seite von Guanin wechselwirkt (Abbildung 5).^[42] Diese Erkenntnis führte zum Design und zur Synthese einer Reihe von Aminoglycosidmimetika, die dieses Motiv enthalten (Abbildung 32 a). Die Affinität dieser Verbindungen für die Neomycin-Bindungsstelle der bakteriellen 16S-RNA wurde durch Oberflächen-Plasmonen-Resonanz (SPR)-Messungen bestimmt (Abbildung 32 b),^[112] und viele dieser Verbindungen erwiesen sich als gute Binder. Einige davon weisen exzellente antibiotische Aktivitäten auf.^[113] Computermodelle legen nahe, daß diese Analoga ähnlich wie die natürlich vorkommenden Substanzen binden (Abbildung 33). Andere Arbeitsgruppen sind ebenfalls an der Entdeckung von Aminoglycosidmimetika aktiv beteiligt. Viele der synthetisierten Strukturen enthalten weitere Amino-, Guanidino- oder 1,3-Hydroxyamin-Funktionalitäten.^[114, 115] Obgleich viele dieser Verbindungen noch nicht gegen resistente Stämme getestet wurden, dürften sie schlechte Substrate für Aminoglycosid-modifizierende Enzyme sein.

5.5. Sialinsäure-Wechselwirkungen mit Hämagglutinin und Neuraminidase

Das Influenza-Virus enthält zwei Proteine, die Sialinsäure auf der Oberfläche der Wirtszelle binden. Das eine, das Sialosid-bindende Hämagglutinin, ist für die anfängliche Bindung des Virus an die Wirtszelle verantwortlich. Das andere, Neuraminidase (Sialidase), spaltet Sialinsäure und ermöglicht den jungen Vironen, aus der

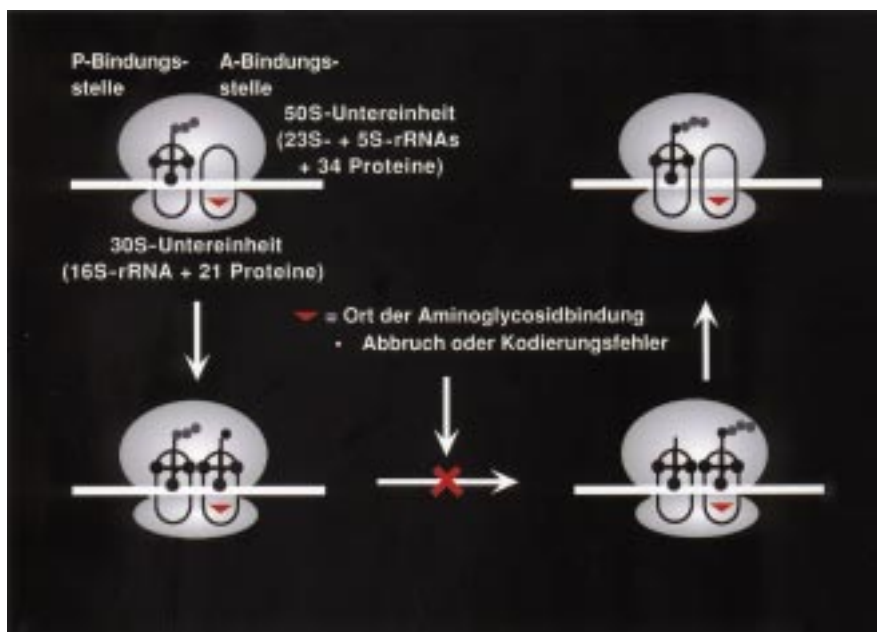


Abbildung 30. Schematische Darstellung der Aminoglycosid-Wechselwirkungen mit dem bakteriellen Ribosom.

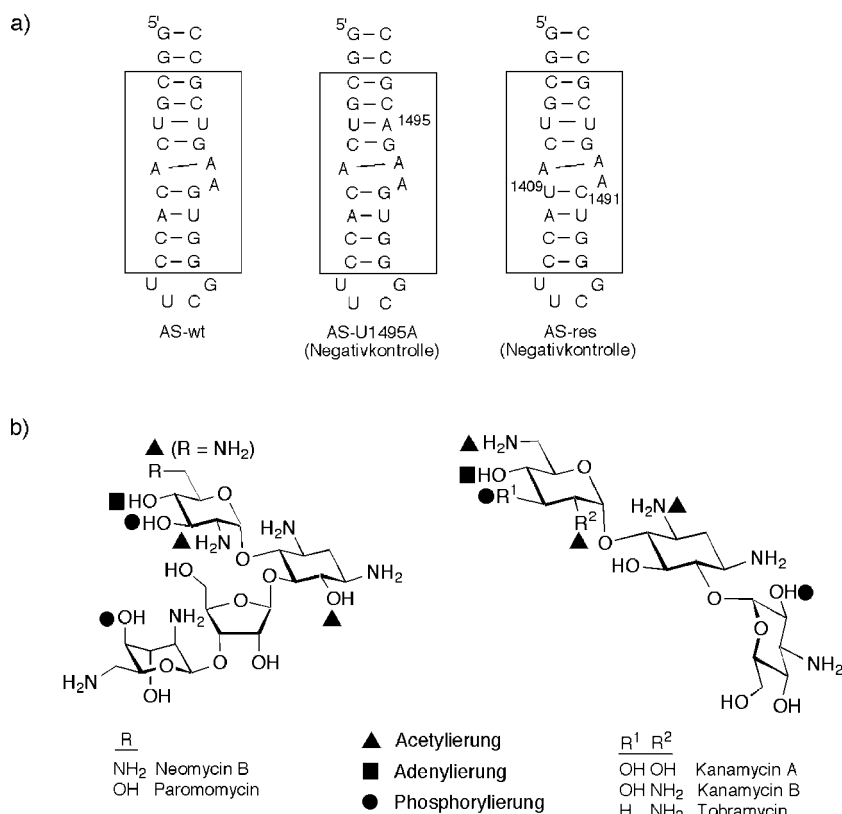


Abbildung 31. Arten der bakteriellen Resistenz gegenüber Neomycin und verwandten Antibiotika. a) Normale Bindungsstelle von Neomycin, ein kleiner Abschnitt der ribosomalen 16S-Untereinheit; der homologe 16S-RNA-Abschnitt in einer Neomycin-resistenten Mutante; eine Kontroll-RNA, in der die Bindungsdeterminanten für Neomycin entfernt sind. b) Neomycin-Desaktivierung durch kovalente Modifikation.

Wirtzelle zu entweichen und neue Zellen zu infizieren. Beide Wechselwirkungen sind potentielle Ziele für einen Eingriff.^[116, 117] Hämagglutinin ist ein homotrimeres Molekül, das sich in großer Zahl auf der Oberfläche des Virus befindet. Bedeutende Wechselwirkungen zwischen Hämagglutinin und dem Sialosidrezeptor sind in Abbildung 34 gezeigt. Da die einzelne Hämagglutinin-Bindungsstelle eine schwache Affinität für monovalente Sialoside aufweist ($K_d = 2 - 3 \text{ mM}$),^[118-120] ist die Wirksamkeit der meisten monomeren Sialinsäure-Analoga bei der Verhinderung der viralen Infektion nur schwach ausgeprägt, lediglich ein fluoreszierendes Derivat inhibiert die Hämagglutininierung im mikromolaren Bereich.^[121] Diese Verbindung hat mehrere zusätzliche hydrophobe Funktionalitäten, die mit hydrophoben Gruppen in der Bindungsstelle wechselwirken können. Ein weiterer Ansatz zur Verbesserung der Affinität ist die Nachahmung der polyvalenten Natur der Zelloberfläche. Zu diesem Zweck wurden verschiedene Strukturen wie Liposome und Polymere mit angeknüpften Sialosid- oder Sialinsäuremimetika (besonders C-verknüpfte Sialinsäure) hergestellt (Abbildung 35). Die Verbindung in Abbildung 35d, ein in picomolaren Mengen wirkender Inhibitor der Hämagglutininbindung, enthält eine hydrophobe Gruppe, die die Bindungsaffinität durch die Wechselwirkung mit hydrophoben Gruppen des Rezeptors erhöht. Zusätzlich hat sie den Vorteil, daß sie nicht nur eine einfache Sialinsäure, sondern eine Sialyllactoseeinheit trägt. Nach Neuramidasespaltung der terminalen Sialin-

säure werden Galactosereste freigelegt, die eine schnelle Virenbeseitigung durch rezeptorvermittelter Endocytose (z.B. durch den Asialoglycoprotein-Rezeptor;^[122] Abbildung 36) ermöglichen können.

Im Unterscheid zu Hämagglutinin bindet Neuramidase stark an den Übergangszustand (eher als an den Grundzustand) der Hydrolyse der Sialoside. Die dehydratisierte Form von Neuraminsäure, 2-Desoxy-2,3-didehydro-*N*-acetylneuraminsäure (DANA, Neu5Ac2en; Abbildung 37a), ist seit vielen Jahren als mäßig guter Inhibitor des Enzyms bekannt.^[123] Versuche, den Übergangszustand nachzuahmen, erhielten mehrere große Auftriebe: Die Kristallstruktur der Neuramidase wurde 1983 aufgeklärt.^[124] Einige Jahre später durchgeführte Isotopeneffekt-Untersuchungen zum Mechanismus der Neuramidasewirkung, der – wie aufgrund von Analogien zur Wirkung anderer Glycosidasen erwartet wurde – über eine Reaktion vom S_N1 -Typ verläuft, stützten diese Vorstellung von einem Katalysemechanismus.^[64]

Die Kristallstrukturen^[41, 125] des Enzyms in Gegenwart von zugegebener NeuAc und DANA lieferten bessere Informationen in bezug auf die Erkennung des Substrats durch das Enzym (Abbildung 38) und zeigten, daß NeuAc an die aktive Stelle in einer verzerrten Konformation gebunden

ist. Dieser Befund stützt den vorgeschlagenen Mechanismus. Daraufhin wurde eine Vielzahl von Analoga des Übergangszustandes rational entworfen^[126, 127] und synthetisiert (Abbildung 37). Eine Reihe von ihnen inhibiert verschiedene Influenza-Neuramidasen außerordentlich gut, und einige (z.B. GS4104 und GG167) befinden sich in klinischen Tests. (GS4104 ist eine veresterte Vorstufe von GS4071, die vom Verdauungstrakt absorbiert werden kann. Der Ester wird dann von natürlichen Esterasen gespalten.) Die Entdeckung einer von Ala246 und Ile222 flankierten hydrophoben Bindungstasche, die nicht von Sialinsäure, jedoch von GS4071 genutzt wird, gestattete das Design von Inhibitoren, die Wechselwirkungen eingehen, die vom natürlichen Substrat nicht genutzt werden.^[128] Jedoch erwies sich keine dieser Verbindungen (bei Verabreichung als Nasenspray) als besserer Inhibitor als GS4071.

5.6. Glycoproteine, Neoglycoproteine und Glycoproteinmimetika

Viele Proteine, besonders solche in eukariotischen Zellen, sind glycosyliert. Die Glycane sind typischerweise entweder an das Seitenketten-Amid-Stickstoffatom von Asparagin (N-verknüpft) oder an hydroxylierte Aminosäuren (z.B. Serin, Threonin) gebunden. Weitere Verknüpfungen sind bekannt,

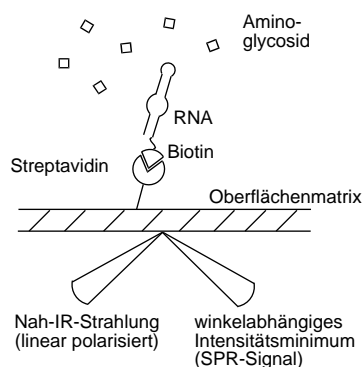
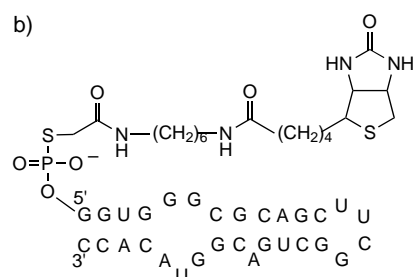
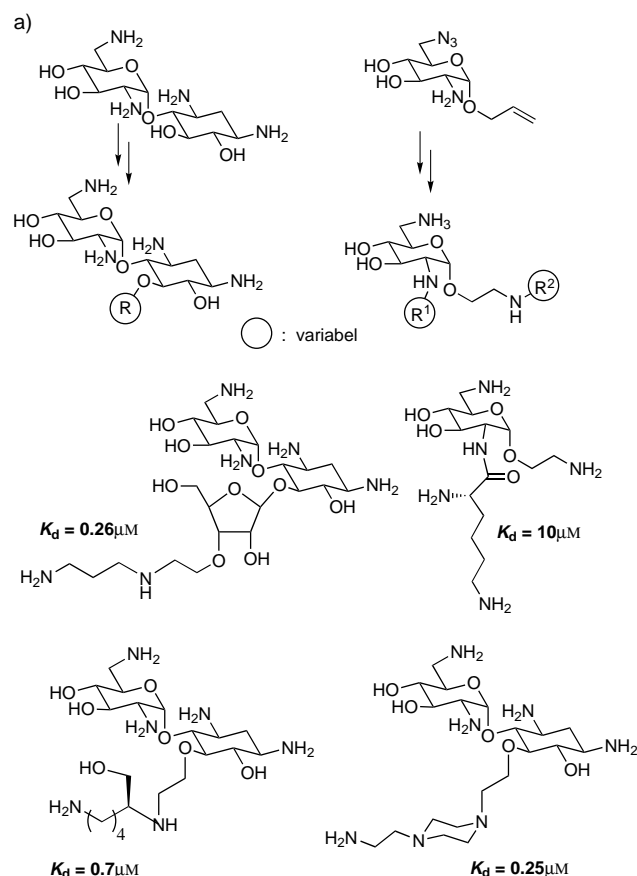


Abbildung 32. a) Eine Strategie zur Synthese von Aminoglycosidmimetika.^[113, 185] b) Oberflächen-Plasmonen-Resonanz (SPR)-Assay zur Charakterisierung der Bindung an 16S-rRNA.^[112] (Im SPR-Assay hängt der Winkel, bei welchem ein Minimum der reflektierten Lichtintensität beobachtet wird, empfindlich von den Brechungsindizes auf beiden Seiten des Trägers, einem dünnen Goldfilm, ab. Der Brechungsindex der (Lösungs-) Seite wird durch Bindungsereignisse beeinflusst.)

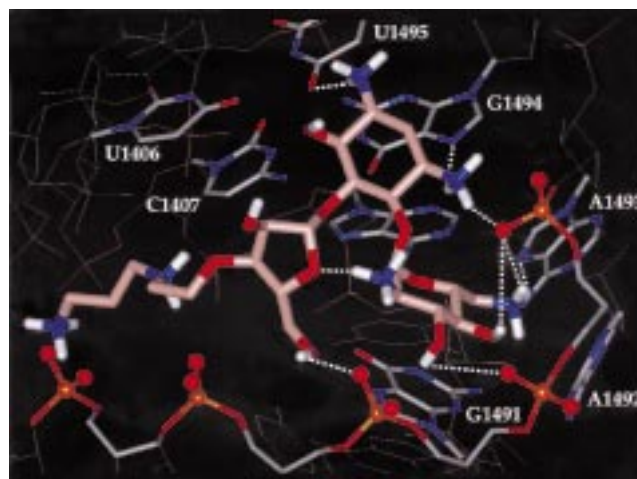


Abbildung 33. Modell der Bindung von Neomycinmimetika an die Stelle, an der auch das natürliche Aminoglycosid Paromomycin gebunden wird, basierend auf Modellierungsstudien unter Verwendung der NMR-Struktur eines Abschnitts der ribosomalen 16S-RNA.^[43]

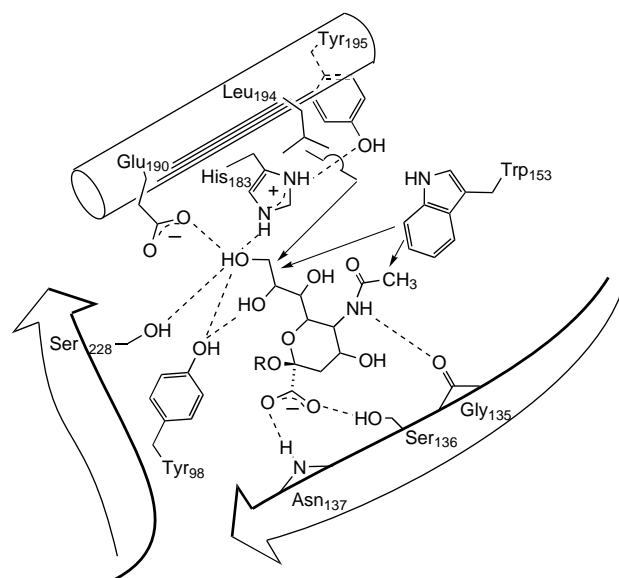


Abbildung 34. Wichtige Wechselwirkungen zwischen dem viralen Hämagglutinin und dem Rezeptor Sialinsäure. Gestrichelte Linien stellen potentielle Wasserstoffbrückenbindungen dar und dicke Pfeile hydrophobe Wechselwirkungen (z. B. zwischen der Hämagglutinin-Seitenkette Trp153 und den Atomen C8 und C9 des Sialosids). Die Darstellung basiert auf der Kristallstruktur von Weis et al.^[186]

jedoch weniger verbreitet, einschließlich einer ungewöhnlichen C-Verknüpfung zu Tryptophan.^[1] Eine Proteinglycosylierung kann eine Reihe von Auswirkungen haben.^[1, 3] Die Zucker können die physikalischen Eigenschaften des Proteins in Lösung erheblich beeinflussen. Dies ist für die Mucine bekannt, eine Klasse hoch O-glycosylierter Proteine, die für die Konsistenz der Schleimhautsekrete verantwortlich sind.^[9] Zusätzlich kann das Saccharid einen Einfluß auf die Stabilität, die Funktion und die Erkennungseigenschaften des Glycoproteins haben. Glycoprotein-/Glycopeptid-Mimetika werden aus einer Reihe von Gründen entworfen: z. B. zur Untersuchung der Saccharid-Funktion, zur Modifizierung der Erkennungseigenschaften und zur Verbesserung der biologischen Aktivität sowie wegen der vereinfachten Syn-

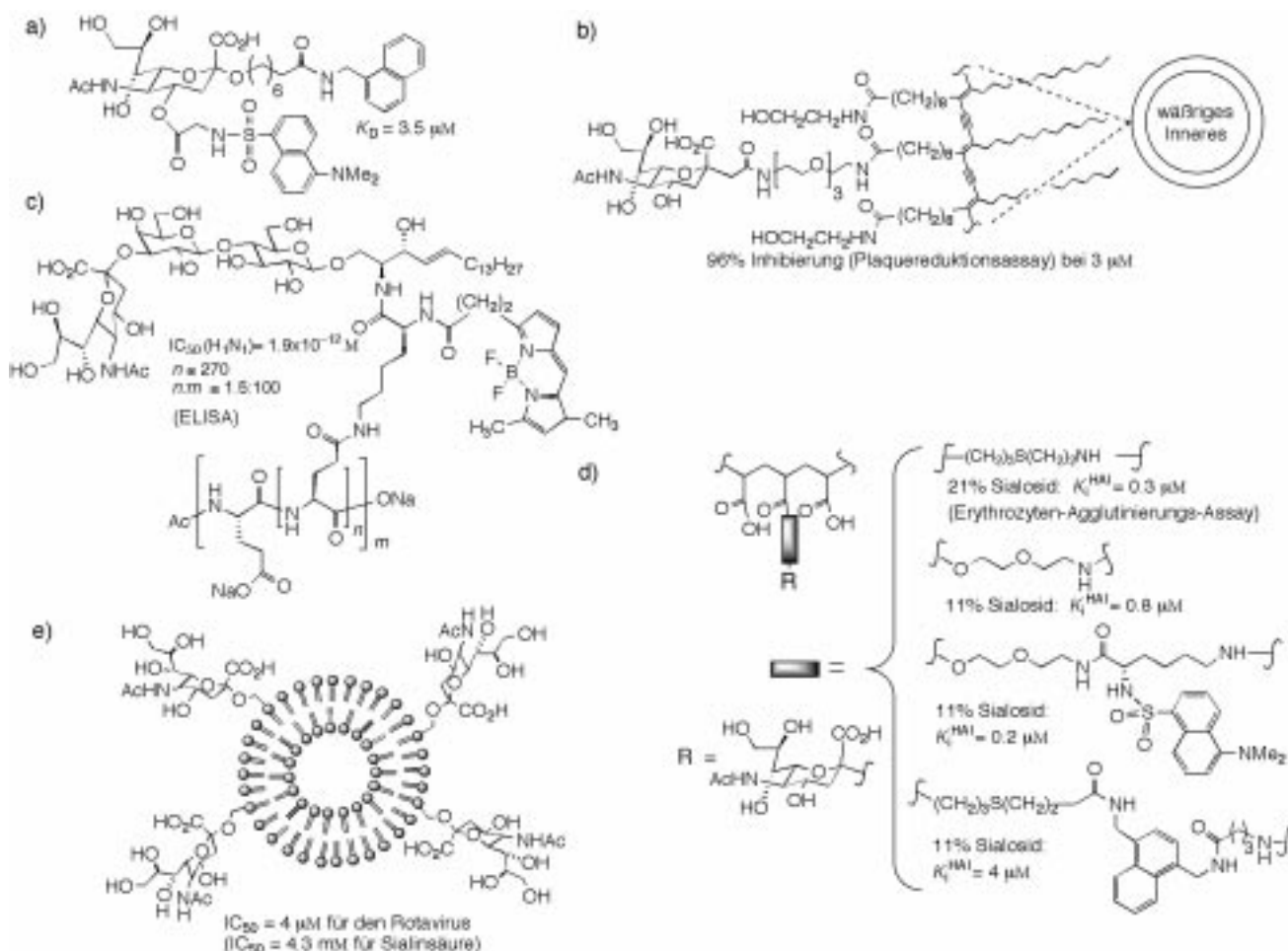


Abbildung 35. Inhibitoren der Hämagglutinin-vermittelten viralen Bindung. Zum Vergleich: Das Sialinsäure-Monomer (Methylglycosid) hat einen IC_{50} -Wert von 2 mM .^[118] a) Ein fluoreszierendes, stark bindendes monomeres Sialosid;^[121] b) ein quervernetztes Liposom von Spevak und Mitarbeitern;^[187] c) Polyglutamat mit angebundener Sialylactose von Kamitakahara et al.;^[188] d) Inhibitoren auf Polyacrylamidbasis von Choi et al.;^[189] e) auf Sialosyl-phospholipiden basierende Liposome, die gegen den Rotovirus wirksam sind, können möglicherweise auch gegen das Influenza-Virus angewendet werden.^[190]

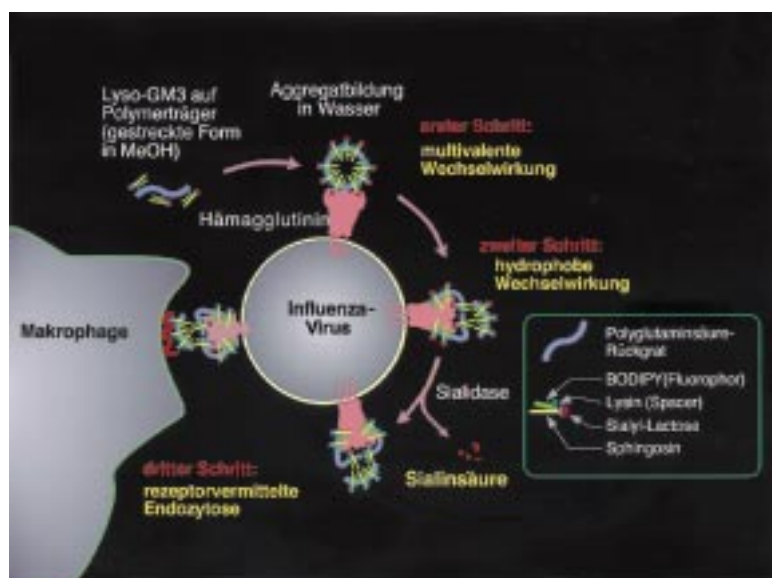


Abbildung 36. Schematische Darstellung der Bindung, der Desialylierung und der vorgeschlagenen Rezeptor-vermittelten Endocytose des Influenza-Virus durch die in Abbildung 35c dargestellte polyvalente Verbindung.

these. Verschiedene Strategien zur Herstellung von Glycoproteinmimetika sind in Abbildung 39 gezeigt. Im ersten Ansatz bleibt das Protein unverändert, und nur das Saccharid wird ersetzt. Im zweiten Fall wird bei unverändertem Protein und verändertem oder unverändertem Saccharid die Bindung zwischen Saccharid und Protein sowie die Position der Glycosylierung abgewandelt. Im radikalsten Ansatz ist entweder das Proteingerüst verändert oder komplett aufgegeben.

Der erste Ansatz erfordert Synthesemethoden zur Herstellung von homogenen Glycoproteinen, welche leider nur sehr schwierig präparativ zugänglich sind. Durch Fermentation erhaltene Glycoproteine sind sehr heterogen,^[1] allerdings kann die chemische Synthese von Glycoproteinen äußerst schwierig sein. Die Festphasen-Peptidsynthese (SPPS) mit Glycosylaminosäuren ist leider häufig durch relativ geringe Ausbeuten gekennzeichnet, insbesondere bei längeren Proteinen und Sacchariden. Das Vorliegen von Glycanen (insbesondere O-Glycanen) schließt die Verwendung vieler ge-

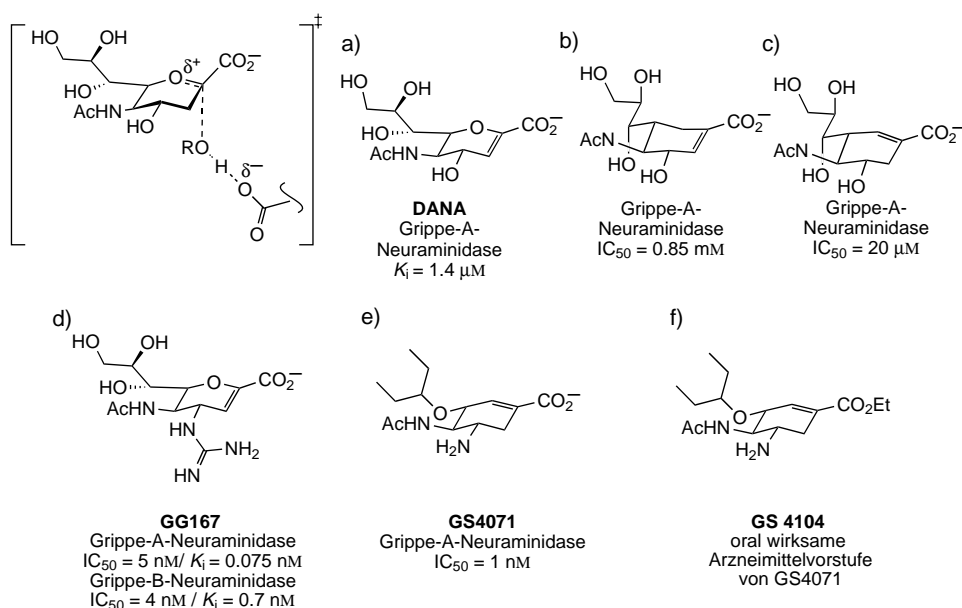


Abbildung 37. Inhibitoren der Influenza-Neuraminidase. a) DANA; b), c) carbocyclische DANA-Analoga;^[167] d) GG167;^[126] e), f) GS4071 und das oral aktive Prodrug GS4104.^[191]

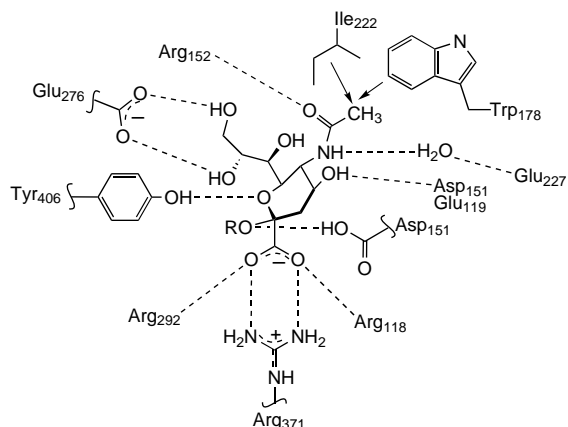


Abbildung 38. Bedeutende Wasserstoffbrückenbindungen sowie elektrostatische und hydrophobe Wechselwirkungen zwischen Neuraminidase und dem Substrat. Gestrichelte Linien stellen Wasserstoffbrückenbindungen und elektrostatische Wechselwirkungen dar, Pfeile hydrophobe Wechselwirkungen (z. B. zwischen der Methylgruppe der AcNH-Funktionalität und den Seitenketten von Ile 222 und Trp 178). Die Abbildung basiert auf der von Varghese et al. veröffentlichten Kristallstruktur.^[41]

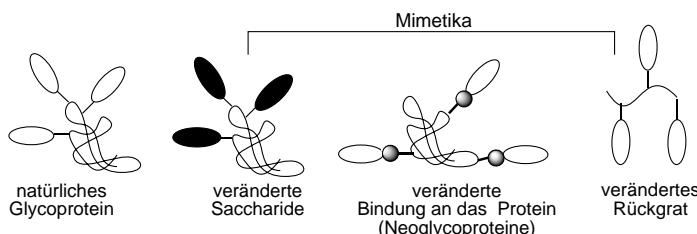


Abbildung 39. Ansätze für das Design von Glycoproteinmimetika.

wöhnlich für die SPPS benutzter Schutzgruppen aus, da die Glycosidbindungen unter den Entschützungsbedingungen instabil sind. Trotzdem hat man Fortschritte bei den Synthesemethoden erzielt.^[129–132] So wurden präparative Verfah-

ren für die Herstellung von Glycosylaminosäure-Bausteinen ausgearbeitet, die für die SPPS geeignet sind,^[133, 134] und durch chemische Synthese wurden z. B. „Mucin-ähnliche“ Peptide hergestellt, die als Krebsimpfstoffe verwendet werden.^[135] Enzymatische Ansätze sind ebenfalls vielversprechend: Zwei enzymatische Ansätze zur Produktion von homogenen N-verknüpften Glycoproteinen ausgehend von einer in vivo hergestellten heterogenen Population, sind in Abbildung 40 dargestellt. Im ersten Ansatz wird eine Endoglycosidase genutzt, um alle außer den erwünschten Zuckerresten am Protein zu verdauen. (Alternativ können Proteasen zur Kondensation von Glycopeptidfrag-

menten genutzt werden.) Glycosyltransferasen werden dann zur erneuten Ausarbeitung der Saccharide genutzt.^[136] Der zweite Ansatz beinhaltet die direkte Endoglycosidase-katalysierte Übertragung der Glycane von einem Oligosaccharyl-Asparagin-Donor unmittelbar auf das Glycoprotein.^[137, 138] Ein weiterer Synthesansatz basiert auf einer Intein-vermittelten Proteinspleißung.^[139, 140] Neuere Studien deuten darauf hin, daß Glycoproteine durch eine Intein-unterstützte Reaktion eines Extein-Intein-Fusionsproteins mit einem einen N-terminalen Cysteinrest enthaltenen Glycopeptid hergestellt werden können (Abbildung 41).

Ein anderer Ansatz zur Konstruktion von Glycoproteinmimetika ist die Herstellung eines „Neoglycoproteins“, in dem das Saccharid über eine nichtnatürliche Brücke angebracht ist.^[141] Die Anbindung des Saccharids an das Peptid kann durch chemische oder enzymatische Methoden erfolgen und kann ortsspezifisch oder willkürlich sein. Wang und Mitarbeiter^[138] nutzten den in Abbildung 40b gezeigten Ansatz, um ein C-verknüpftes Glycopeptid herzustellen, das ein kompetitiver Inhibitor von Glycoamidasen ist, die das gesamte Saccharid von N-verknüpften Proteinen (durch Hydrolyse einer Seitenkettenamidgruppe) abspalten. Bertozzi und Mitarbeiter haben eine Strategie für den chemoenzymatischen Aufbau von O-verknüpften Glycopeptiden durch enzymatische Oxidation der 6-OH-Gruppe eines GalNAc-Peptids zum Aldehyd und anschließende Oximbildung mit einem Hydroxyaminoglycosid entwickelt.^[142] Alternativ war es bei der Synthese von verschiedenen Saccharid-Impfstoffen erforderlich, Zucker oder Saccharid-Konjugate chemisch an ein Trägerprotein (z. B. Hämocyanin) anzubinden.^[135]

Der letzte Ansatz, die Konstruktion eines Glycoproteinmimetikums mit stark modifiziertem Proteingerüst oder vollständig nichtpeptidischem Gerüst, ist nützlich für die Nachahmung von Proteinen, in denen das Proteingerüst kaum Funktionen (außer als Gerüst für die vielen Kopien des Glycans) ausübt. An nichtnatürliche Peptide oder nicht-

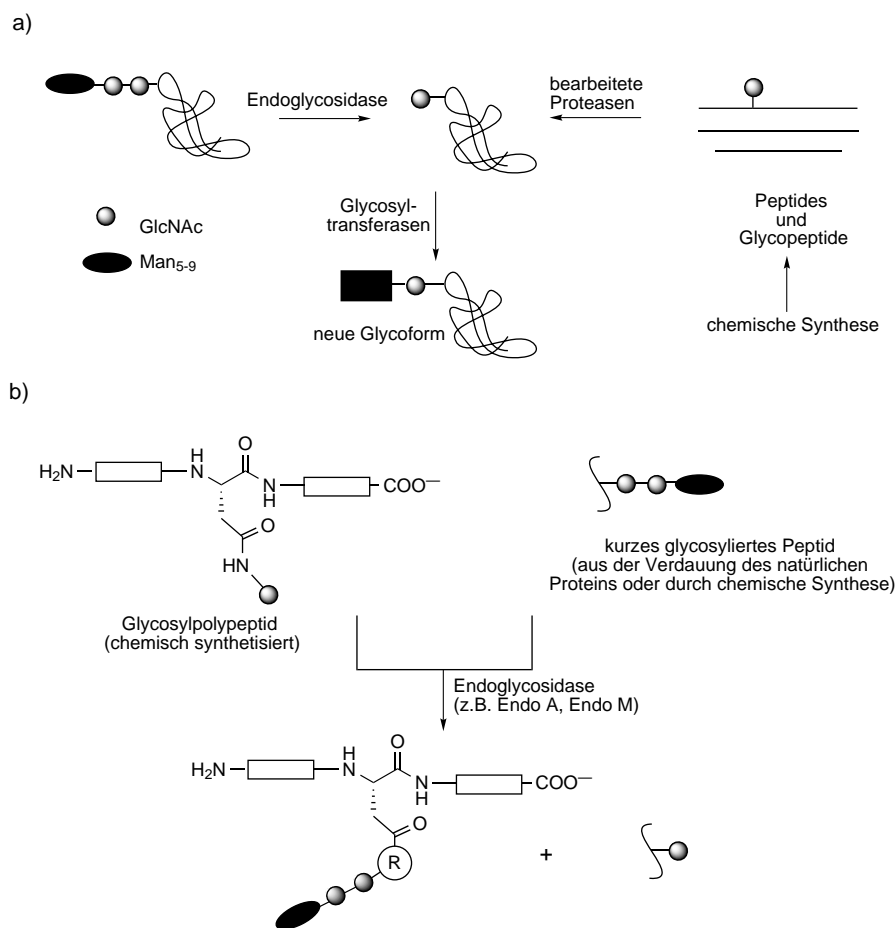


Abbildung 40. Enzymatische Methoden zur Synthese homogener Glycoproteine (Einzelheiten siehe Text).

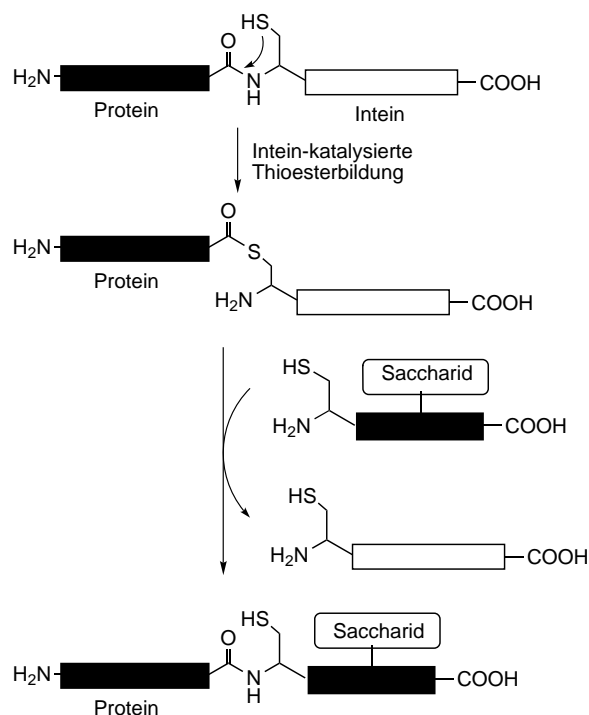


Abbildung 41. Verwendung von Inteinen zur Kondensation biologisch produzierter Proteine mit synthetischen Glycopeptiden.

peptidische Grundgerüste geknüpfte O-Glycosid-Cluster ahmen z. B. Mucine nach.^[143, 144] Sialyl-Lewis^x und andere Saccharide sind mit Polyacrylamid,^[145] „ROMP“-Polymeren (durch Ringöffnungs-methatase-Polymerisation hergestellten Oligomeren)^[146] und dendritischen Superstrukturen^[147] verknüpft worden.

6. Zusammenfassung und Ausblick

Die in der vorliegenden Übersicht beschriebenen Beispiele sind eine Auswahl aus den neuesten Fortschritten auf dem Gebiet des Designs von Kohlenhydratmimetika. Eine Reihe von Kohlenhydraten ist erfolgreich durch einfachere, synthetisch besser zugängliche und stabilere Verbindungen nachgeahmt worden. Mit der Herstellung von Kohlenhydratmimetika wurde es möglich, neue funktionelle Gruppen, die die Affinität des Moleküls gegenüber dem Target erhöhen, einzubeziehen. Man darf hoffen, daß die beschriebenen und beim Design der Mimetika benutzten Prinzipien breit anwendbar sind und das Design von Therapeutika ermöglichen, die in bedeutende biologische Kohlenhydrat-Erkennungsprozesse eingreifen.

Diese Arbeit wurde von der National Science Foundation und den National Institutes of Health sowie vom Skaggs Institute for Chemical Biology und von der Fa. Novartis unterstützt.

Eingegangen am 11. März 1999 [A 332]
International Edition: *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, 38, 2300–2324

- [1] P. Sears, C.-H. Wong, *Cell. Mol. Life Sci.* **1998**, 54, 223.
- [2] H. Lis, N. Sharon, *Eur. J. Biochem.* **1993**, 218, 1–27.
- [3] A. Varki, *Glycobiology* **1993**, 3, 97–130.
- [4] R. A. B. Ezekowitz, D. J. Williams, H. Koziel, M. Y. K. Armstrong, A. Warner, F. F. Richards, R. M. Rose, *Nature* **1991**, 351, 155–158.
- [5] D. Fiete, V. Srivastava, O. Hindsgaul, J. U. Baenziger, *Cell* **1991**, 67, 1103–1110.
- [6] T. Boren, P. Falk, K. A. Roth, G. Larson, S. Normark, *Science* **1993**, 262, 1892–1895.
- [7] P. M. Simon, P. L. Goode, A. Mobasser, D. Zopf, *Infect. Immun.* **1997**, 65, 750–757.
- [8] C. A. Lingwood, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **1998**, 2, 695–700.
- [9] P. Roussel, G. Lamblin in *Glycoproteins and Diseases* (Hrsg.: J. Montrieux, J. F. G. Vliegthart, H. Schacter), Elsevier, Amsterdam, **1996**, S. 351–393.
- [10] J. M. Lord, L. M. Roberts, J. D. Robertus, *FASEB J.* **1994**, 8, 201–208.
- [11] E. A. Merritt, W. G. J. Hol, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **1995**, 5, 165–171.

- [12] M. Fukuda in *Glycoproteins and Disease* (Hrsg.: J. Montrieu, J. F. G. Vliegthart, H. Schacter), Elsevier, Amsterdam, **1996**, S. 311–329.
- [13] N. Tanaka in *Aminoglycoside Antibiotics* (Hrsg.: H. Umezawa, I. R. Hooper), Springer, New York, **1982**, S. 221–266.
- [14] Y. Sato, E. Beutler, *J. Clin. Invest.* **1993**, 91, 1909–1917.
- [15] M. Mammen, S.-K. Choi, G. M. Whitesides, *Angew. Chem.* **1998**, 110, 2908–2953; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, 37, 2754–2794.
- [16] F. A. Quiocho, *Biochem. Soc. Trans.* **1993**, 21, 442–448.
- [17] R. U. Lemieux, *Acc. Chem. Res.* **1996**, 29, 373–380.
- [18] A. Schon, E. Freire, *Biochemistry* **1989**, 28, 5019–5024.
- [19] B. W. Sigurskjold, E. Altman, D. R. Bundle, *Eur. J. Biochem.* **1991**, 197, 239–246.
- [20] C. H. Wong, G. M. Whitesides, *J. Org. Chem.* **1983**, 48, 3199–205.
- [21] C.-H. Wong, G. M. Whitesides, *Enzymes in Synthetic Organic Chemistry*, Pergamon, New York, **1994**.
- [22] Z. Zhang, I. R. Ollmann, X.-S. Ye, R. Wischnat, T. Baasov, C.-H. Wong, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, 121, 734–753.
- [23] P. J. Garegg, *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* **1997**, 52, 179.
- [24] H. Paulsen, *Angew. Chem.* **1990**, 102, 851–867; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1990**, 29, 823–839.
- [25] R. R. Schmidt, W. Kinzy, *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* **1994**, 50, 21.
- [26] S. Danishefsky, M. T. Bilodeau, *Angew. Chem.* **1996**, 108, 1482–1522; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1996**, 35, 1380–1419.
- [27] S. Hanessian, *Preparative Carbohydrate Chemistry*, Marcel Dekker, New York, **1997**.
- [28] C.-H. Wong, *Acc. Chem. Res.* **1999**, 32, 376–385.
- [29] W. I. Weis, K. Drickamer, *Annu. Rev. Biochem.* **1996**, 65, 441–73.
- [30] E. J. Toone, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **1994**, 4, 719–728.
- [31] F. A. Quiocho, *Trends Biochem. Sci.* **1993**, 21, 442–448.
- [32] F. A. Quiocho, D. K. Wilson, N. K. Vyas, *Nature* **1989**, 340, 404.
- [33] W. I. Weis, K. Drickamer, W. A. Hendrickson, *Nature* **1992**, 360, 127.
- [34] B. J. Graves, R. L. Crowther, C. Chandran, J. M. Rumberger, S. Li, K.-S. Huang, D. H. Presky, P. C. Familletti, B. A. Wolitzky, D. K. Burns, *Nature* **1994**, 367, 532–538.
- [35] Y. Hiramatsu, H. Tsujishita, H. Kondo, *J. Med. Chem.* **1996**, 39, 4547.
- [36] A. Lavie, K. N. Allen, G. A. Petsko, D. Ringe, *Biochemistry* **1994**, 33, 5469–5480.
- [37] D. Balasubramanian, B. Raman, C. S. Sundari, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, 115, 74–77.
- [38] N. K. Vyas, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **1991**, 1, 732–740.
- [39] F. A. Quiocho, J. C. Spurlino, L. E. Rodseth, *Nat. Struct. Biol.* **1997**, 5, 997.
- [40] I. A. Rose, K. R. Hanon, K. D. Wilkinson, M. J. Wimmer, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1980**, 77, 2439–2441.
- [41] J. N. Varghese, J. McKimm-Breschkin, J. B. Caldwell, A. A. Kortt, P. M. Colman, *Proteins Struct. Funct. Genet.* **1992**, 14, 327–332.
- [42] M. Hendrix, P. B. Alper, E. S. Priestley, C.-H. Wong, *Angew. Chem.* **1997**, 109, 119–122; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1997**, 36, 95–98.
- [43] D. Fourmy, M. I. Recht, S. C. Blanchard, J. D. Puglisi, *Science* **1996**, 274, 1367.
- [44] Y. Kishi, *Pure Appl. Chem.* **1993**, 65, 771–778.
- [45] H. W. Fehlhaber, G. Manfred, S. Gerhard, K. Hobert, P. Welzel, Y. Van Heijenoort, J. Van Heijenoort, *Tetrahedron* **1990**, 46, 1557–1568.
- [46] F.-T. Ferse, K. Floeder, L. Hennig, M. Findeisen, P. Welzel, *Tetrahedron* **1999**, 55, 3749–3766.
- [47] S. J. Hecker, M. L. Minich, K. Lackey, *J. Org. Chem.* **1990**, 55, 4904–4911.
- [48] M. Ge, H. R. Onishi, J. Kohler, L. L. Silver, R. Kerns, S. Fukuzawa, C. Thompson, D. Kahne, *Science* **1999**, 284, 507–511.
- [49] S. Verma, F. Eckstein, *Annu. Rev. Biochem.* **1998**, 67, 99–134.
- [50] A. Vasella, P. Ermert, R. Hoos, A. B. Naughton, K. Rupitz, W. Thiel, M. Weber, W. Weber, S. G. Withers in *Complex Carbohydrates in Drug Research*, Vol. 36 (Hrsg.: K. Bock, H. Clausen), Munksgaard, Copenhagen, **1994**, S. 134–150.
- [51] K. Tatsuta in *Carbohydrate Mimics* (Hrsg.: Y. Chapleur), WILEY-VCH, Weinheim, **1998**, S. 283–305.
- [52] G. Legler in *Carbohydrate Mimics* (Hrsg.: Y. Chapleur), WILEY-VCH, Weinheim, **1998**, S. 463–490.
- [53] T. D. Heightmann, A. T. Vasella, *Angew. Chem.* **1999**, 111, 794–815; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, 38, 750–770.
- [54] R. Wang, D. H. Steensma, Y. Takaoka, J. W. Yun, T. Kajimoto, C.-H. Wong, *Bioorg. Med. Chem.* **1997**, 5, 661–672.
- [55] S.-I. Hakomori in *Glycoproteins and Disease*, Vol. 30 (Hrsg.: J. Montrieu, J. F. G. Vliegthart, H. Schacter), Elsevier, Amsterdam, **1996**, S. 243–276.
- [56] J. W. Dennis, S. Laferte, C. Waghorne, M. L. Breitman, R. S. Kerbel, *Science* **1987**, 236, 582–584.
- [57] M. Pierce, J. Arango, *J. Biol. Chem.* **1986**, 261, 10772–10777.
- [58] G. F. Springer, *Science* **1984**, 224, 1198–1206.
- [59] T. Iramura, R. Gonzalez, G. L. Nicolson, *Cancer Res.* **1981**, 41, 5131–5136.
- [60] M. L. Sinnott, *Chem. Rev.* **1990**, 90, 1171–1202.
- [61] J. D. McCarter, S. G. Withers, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **1994**, 4, 885–892.
- [62] G. Davies, B. Henrissat, *Structure* **1995**, 3, 853–859.
- [63] B. W. Murray, V. Wittmann, M. Burkart, S.-C. Hung, C.-H. Wong, *Biochemistry* **1997**, 36, 823.
- [64] A. K. J. Chong, M. S. Pegg, N. R. Taylor, M. von Itzstein, *Eur. J. Biochem.* **1992**, 207, 335–343.
- [65] Y. Zhang, J. Boomuswamy, M. L. Sinnott, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, 116, 7557–7563.
- [66] Y. Tanaka, W. Tao, J. S. Blanchard, E. J. Hehre, *J. Biol. Chem.* **1994**, 269, 32306–32312.
- [67] S. C. Kim, A. N. Singh, F. M. Raushel, *Arch. Biochem. Biophys.* **1988**, 267, 54–59.
- [68] J. D. McCarter, W. Yeung, J. Chow, D. Dolphin, S. G. Withers, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, 119, 5792.
- [69] J. D. McCarter, S. G. Withers, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, 118, 241–242.
- [70] S. Ogawa in *Carbohydrate Mimetics* (Hrsg.: Y. Chapleur), WILEY-VCH, Weinheim, **1998**, S. 87–106.
- [71] K. D. Janda, L.-C. Lo, C.-H. L. Lo, M.-M. Sim, R. Wang, C.-H. Wong, R. A. Lerner, *Science* **1997**, 275, 945–948.
- [72] S. G. Withers, I. P. Street, *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, 110, 8551.
- [73] R. Kuroki, L. H. Weaver, B. W. Matthews, *Science* **1993**, 262, 2030–2033.
- [74] E. Byrgesen, J. Nielsen, *Tetrahedron Lett.* **1997**, 38, 5697–5700.
- [75] D. Kai, A. Rosen, A. K. Ray, G. Magnusson, *Glycoconjugate J.* **1992**, 9, 303–306.
- [76] P. Paul, T. M. Lutz, C. Osborn, S. Kyosseva, A. D. Elbein, H. Towbin, A. Radomska, R. R. Drake, *J. Biol. Chem.* **1993**, 268, 12933–12938.
- [77] A. Wei, K. M. Boy, Y. Kishi, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, 117, 9432–9436.
- [78] K.-A. Karlsson, M. A. Milh, C. Andersson, J. Angstrom, J. Bergstrom, D. Danielsson, M. Landergren, B. Lanne, I. Leonardsson, H. M. Podraza, B.-M. Olsson, M. O. Halvarsson, B. Schierbeck, S. Teneberg, C. Uggla, T. Wadstrom, U. Wilhelmsson, Z. Yang in *Complex Carbohydrates in Drug Research* (Hrsg.: K. Bock, H. Clausen), Munksgaard, Copenhagen, **1994**, S. 397–409.
- [79] U. Nilsson, R. Johansson, G. Magnusson, *Chem. Eur. J.* **1996**, 2, 295–302.
- [80] G. A. Nores, T. Dohi, M. Taniguchi, S.-I. Hakomori, *J. Immunol.* **1987**, 139, 3171–3176.
- [81] G. Magnusson, M. Wilstermann, A. K. Ray, U. Nilsson, *ACS Symp. Ser.* **1994**, 560, 233–248 (Synthetic Oligosaccharides).
- [82] A. Bernardi, A. Checchia, P. Brocca, S. Sonnino, F. Zuccotto, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, 121, 2032–2036.
- [83] L. Poppe, G. S. Brown, J. S. Philo, P. V. Nikrad, B. H. Shah, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, 119, 1727–1736.
- [84] B. K. Brandley, M. Kiso, S. Abbas, P. Nikrad, O. Srivastava, C. Foxall, Y. Oda, A. Hasegawa, *Glycobiology* **1993**, 3, 633.
- [85] J. Y. Ramphal, Z.-L. Zheng, C. Perez, L. E. Walker, S. A. DeFrees, F. C. A. Gaeta, *J. Med. Chem.* **1994**, 37, 3459.
- [86] E. E. Simanek, G. J. McGarvey, J. A. Jablonowski, C.-H. Wong, *Chem. Rev.* **1998**, 98, 833–862.
- [87] D. Sako, K. Comess, K. M. Barone, R. T. Camphausen, D. A. Cumming, G. D. Shaw, *Cell* **1995**, 83, 323–331.
- [88] M. Burkart, M. Izumi, C.-H. Wong, *Angew. Chem.*, im Druck; *Angew. Chem. Int. Ed.*, im Druck.
- [89] K. E. Norgard-Sumnicht, N. M. Varki, A. Varki, *Science* **1993**, 261, 480.
- [90] L. M. Stoolman, T. S. Tenforde, S. D. Rosen, *J. Cell. Biol.* **1984**, 99, 1535.

- [91] E. V. Chandrasekaran, R. K. Jain, R. D. Larsen, K. Wlasichuk, K. L. Matta, *Biochemistry* **1995**, *34*, 2925–2936.
- [92] C. Galustian, A. M. Laawson, S. Komb, H. Ishida, M. Kiso, T. Feizi, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1997**, *240*, 748.
- [93] S. Komba, C. Galustian, H. Ishida, T. Feizi, R. Kannagi, M. Kiso, *Angew. Chem.* **1999**, *111*, 1203–1206; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, *38*, 1131–1133.
- [94] C. A. A. van Boeckel, M. Petitou, *Angew. Chem.* **1993**, *105*, 1741–1761; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1993**, *32*, 1671–1690.
- [95] H. P. Wessel, *Top. Curr. Chem.* **1997**, *187*, 215–239.
- [96] P. A. Graig, S. T. Olson, J. D. Shore, *J. Biol. Chem.* **1989**, *264*, 5452–5461.
- [97] P. D. J. Grootenhuys, P. Westerduin, D. Meuleman, M. Petitou, C. A. A. van Boeckel, *Nat. Struct. Biol.* **1995**, *2*, 736–739.
- [98] P. D. J. Grootenhuys, C. A. A. van Boeckel, *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 2743–2747.
- [99] M. Petitou, P. Duchaussoy, P.-A. Driguez, G. Jaurand, J. P. Hérault, J. C. Lormeau, C. A. A. van Boeckel, J. M. Herbert, *Angew. Chem.* **1998**, *110*, 3186–3191, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, *37*, 3009–3014.
- [100] M. Petitou, J.-P. Hérault, A. Bernat, P.-A. Driguez, P. Duchaussoy, J.-C. Lormeau, J.-M. Herbert, *Nature* **1999**, *398*, 417–422.
- [101] C. M. Dreef-Tromp, J. E. M. Basten, M. A. Broekhoven, T. G. van Dinther, M. Petitou, C. A. A. van Boeckel, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1998**, *8*, 2081–2086.
- [102] J. E. Turnbull, J. T. Gallagher, *Biochem. Soc. Trans.* **1993**, *21*, 477–482.
- [103] M. Tardieu, C. Gamy, T. Avramoglou, J. Jozefonvicz, D. Barritault, *J. Cell. Physiol.* **1992**, *150*, 194–203.
- [104] A. J. Bridges, *Chemtracts: Org. Chem.* **1995**, *8*, 260–268.
- [105] R. Chaby, *DDT* **1999**, *4*, 209–221.
- [106] R. Ulevitch, P. S. Tobias, *Annu. Rev. Immunol.* **1995**, *13*, 437–457.
- [107] O. Holst, *Angew. Chem.* **1995**, *107*, 2154–2156; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1995**, *34*, 2000–2002.
- [108] W. J. Christ, O. Asano, A. L. Robidoux, M. Perez, Y. Wang, G. R. Dubuc, W. E. Gavin, L. D. Hawkins, P. D. McGuinness, M. A. Mullarkey, M. D. Lewis, Y. Kishi, T. Kawata, J. R. Bristol, J. R. Rose, D. P. Rossignol, S. Kobayashi, I. Hishinuma, A. Kimura, N. Asakawa, K. Katayama, I. Yamatsu, *Science* **1995**, *268*, 80–83.
- [109] T. Koeda, K. Umemura, M. Yokota in *Aminoglycoside Antibiotics* (Hrsg.: H. Umezawa, I. R. Hooper), Springer, New York, **1982**, S. 293–356.
- [110] H. Umezawa, S. Kondo in *Aminoglycoside Antibiotics* (Hrsg.: H. Umezawa, I. R. Hooper), Springer, New York, **1982**, S. 267–292.
- [111] D. M. Daigle, D. W. Hughes, G. D. Wright, *Chem. Biol.* **1999**, *6*, 99–110.
- [112] M. Hendrix, E. S. Priestley, G. F. Joyce, C.-H. Wong, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 3641–3648.
- [113] P. B. Alper, M. Hendrix, P. Sears, C.-H. Wong, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 1965.
- [114] Y. Wang, K. Hamasaki, R. R. Rando, *Biochemistry* **1997**, *36*, 768–779.
- [115] H. Wang, Y. Tor, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 8734–8735.
- [116] N. A. Meanwell, M. Krystal, *Drug Discovery Today* **1996**, *1*, 316–387.
- [117] N. A. Meanwell, M. Krystal, *Drug Discovery Today* **1996**, *1*, 388–397.
- [118] T. J. Prichett, R. Brossmer, U. Rose, J. C. Paulson, *Virology* **1987**, *160*, 502–506.
- [119] P. L. Toogood, P. K. Galliker, G. D. Glick, J. R. Knowles, *J. Med. Chem.* **1991**, *34*, 3140–3143.
- [120] N. K. Sauter, M. D. Bednarski, B. A. Wurzburg, J. E. Hanson, G. M. Whitesides, J. J. Skehel, D. C. Wiley, *Biochemistry* **1989**, *28*, 8388.
- [121] E. G. Weinhold, J. R. Knowles, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 9270–9275.
- [122] G. Ashwell, J. Harford, *Annu. Rev. Biochem.* **1982**, *51*, 531–534.
- [123] P. Meindl, H. Tuppy, *Monatsh. Chem.* **1969**, *100*, 1295.
- [124] J. N. Varghese, W. G. Laver, P. M. Coleman, *Nature* **1983**, *303*, 35–40.
- [125] M. N. Janakiraman, C. L. White, W. G. Laver, G. M. Air, M. Luo, *Biochemistry* **1994**, *33*, 8172–8179.
- [126] M. von Itzstein, W.-Y. Wu, G. B. Kok, M. S. Pegg, J. C. Dyason, B. Jin, T. V. Phan, M. L. Smythe, H. F. White, S. W. Oliver, P. M. Colman, J. N. Varghese, D. M. Ryan, J. M. Woods, R. C. Bethell, V. J. Hotham, J. M. Cameron, C. R. Penn, *Nature* **1993**, *363*, 418–423.
- [127] M. von Itzstein, J. C. Dyason, S. W. Oliver, H. F. White, W. Y. Wu, G. B. Kok, M. S. Pegg, *J. Med. Chem.* **1996**, *39*, 388–391.
- [128] C. U. Kim, W. Lew, M. A. Williams, H. Wu, L. Zhang, C. X., P. A. Escarpe, D. B. Mendel, W. G. Laver, R. C. Stevens, *J. Med. Chem.* **1998**, *41*, 2451–2460.
- [129] S. J. Danishefsky, J. Y. Roberge, *Glycopept. Relat. Compd.* **1997**, *245*–294.
- [130] H. Kunz, M. Schultz, *Glycopept. Rel. Compd.* **1997**, 23–78.
- [131] H. Paulsen, S. Peters, T. Bielfeldt, *New Compr. Biochem.* **1995**, *29a*, 87–121.
- [132] H. Paulsen, A. Schleyer, N. Mathieux, M. Meldal, K. Bock, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* **1997**, 281.
- [133] N. Mathieux, H. Paulsen, M. Meldal, K. Bock, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* **1997**, 2359–2368.
- [134] H. Kunz, *Prep. Carbohydr. Chem.* **1997**, 265–281.
- [135] S. D. Kuduk, J. B. Schwarz, X. T. Chen, P. W. Glunz, D. Sames, G. Ragupathi, P. O. Livingston, S. J. Danishefsky, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 12474–12485.
- [136] K. L. Witte, P. S. Sears, R. Martin, C.-H. Wong, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 2114–2118.
- [137] M. Mizuno, K. Haneda, R. Iguchi, I. Muramoto, T. Kawakami, S. Aimoto, K. Yamamoto, T. Inazu, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 284–290.
- [138] L.-X. Wang, M. Tang, T. Suzuki, K. Kitajima, Y. Inoue, S. Inoue, J.-Q. Fan, Y.-C. Lee, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 11137.
- [139] H. Paulus, *Chem. Soc. Rev.* **1998**, *27*, 375–386.
- [140] T. W. Muir, D. Sondhi, P. A. Cole, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1998**, *95*, 6705–6710.
- [141] R. T. Lee, Y. C. Lee in *Glycosciences* (Hrsg.: H.-J. Gabius, S. Gabius), Chapman & Hall, Weinheim, **1997**, S. 55–77.
- [142] E. C. Rodriguez, K. A. Winans, D. S. King, C. R. Bertozzi, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 9905–9906.
- [143] S. Bay, R. Lo-Man, E. Osinaga, H. Nakada, C. Leclerc, D. Cantacuzene, *J. Pept. Res.* **1997**, *49*, 620–625.
- [144] S. Hanessian, D. Qiu, H. Prabhakaran, G. V. Reddy, B. Lou, *Can. J. Chem.* **1996**, *74*, 1738–1747.
- [145] G. B. Sigal, M. Mammen, G. Dahmann, G. M. Whitesides, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 3789–3800.
- [146] D. D. Manning, L. E. Strong, X. Hu, P. J. Beck, L. L. Kiessling, *Tetrahedron* **1997**, *53*, 11937–11952.
- [147] R. Roy, W. K. C. Park, D. Zanini, C. Foxall, O. P. Srivastava, *Carbohydr. Lett.* **1997**, *2*, 259–266.
- [148] H. C. Kolb, B. Ernst, *Chem. Eur. J.* **1997**, *3*, 1571–1578.
- [149] M. J. Bamford, M. Bird, P. M. Gore, D. S. Holmes, R. Priest, J. C. Procter, V. Saez, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1996**, *6*, 239.
- [150] B. Dupre, H. Bui, I. L. Scott, R. V. Market, K. M. Keller, P. J. Beck, T. P. Kogan, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1996**, *6*, 569–572.
- [151] C.-C. Lin, M. Shimazaki, M.-P. Heck, S. Aoki, R. Wang, T. Kimura, H. Ritzen, S. Takayama, S.-H. Wu, G. Weitz-Schmidt, C.-H. Wong, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 6826–2840.
- [152] T. J. Woltering, G. Weitz-Schmidt, C.-H. Wong, *Tetrahedron Lett.* **1996**, *37*, 9033–9036.
- [153] C.-H. Wong, F. Moris-Varas, S.-C. Hung, T. G. Marron, C. C. Lin, K. W. Gong, G. Weitz-Schmidt, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 8152–8158.
- [154] T. Ikeda, T. Kajimoto, H. Kondo, C.-H. Wong, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1997**, *7*, 2485–2490.
- [155] K. Hiruma, T. Kajimoto, G. Weitz-Schmidt, I. R. Ollmann, C.-H. Wong, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 9265–9270.
- [156] A. Heifetz, R. W. Keenan, A. D. Elbein, *Biochemistry* **1979**, *18*, 2186–2192.
- [157] J. E. Tropea, G. P. Kaushel, I. Pastuszak, M. Mitchell, T. Aoyagi, R. J. Molyneux, A. D. Elbein, *Biochemistry* **1990**, *29*, 10062–10069.
- [158] P. R. Dorling, C. R. Huxtable, S. M. Colegate, *Biochem. J.* **1980**, *191*, 649–651.
- [159] A. D. Elbein, J. E. Tropea, M. Mitchell, G. P. Kaushel, *J. Biol. Chem.* **1990**, *265*, 15599–15605.
- [160] E. Tsujii, M. Muroi, N. Shiragami, A. Takatsuki, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1996**, *220*, 459–466.
- [161] N. Asano, K. Oseki, E. Kaneko, K. Matsui, *Carbohydr. Res.* **1994**, *258*, 243–254.

- [162] B. Müller, C. Schaub, R. R. Schmidt, *Angew. Chem.* **1998**, *110*, 3021–3024; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, *37*, 2893–2897.
- [163] H. Hashimoto, T. Endo, Y. Kajihara, *J. Org. Chem.* **1997**, *62*, 1914–1915.
- [164] R. R. Schmidt, K. Frische, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1993**, *3*, 1747–1750.
- [165] M. M. Palcic, L. D. Heerze, O. P. Srivastava, O. Hindsgaul, *J. Biol. Chem.* **1989**, *264*, 17174–17181.
- [166] T. Miura, T. Kajimoto, M. Jimbo, K. Yamagishi, J.-C. Inokuchi, C.-H. Wong, *Bioorg. Med. Chem.* **1998**, *6*, 1481–1489.
- [167] S. Vorwerk, A. Vasella, *Angew. Chem.* **1998**, *110*, 1765–1767; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, *37*, 1732–1734.
- [168] Y. Ichikawa, Y. Igarashi, M. Ichikawa, Y. Suhara, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 3007.
- [169] R. C. Bernotas, M. A. Pezzone, B. Ganem, *Carbohydr. Res.* **1987**, *167*, 305–311.
- [170] G. C. Look, C. H. Fotsch, C.-H. Wong, *Acc. Chem. Res.* **1993**, *26*, 182–190.
- [171] S. Takayama, R. Martin, J. Wu, K. Laslo, G. Siuzdak, C.-H. Wong, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 8146–8151.
- [172] S. Cottaz, J. S. Brimacombe, M. A. J. Ferguson, *Carbohydr. Res.* **1993**, *247*, 341–345.
- [173] S. Knapp, D. Vocadlo, Z. Gao, B. Kirk, J. Lou, S. G. Withers, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 6804–6805.
- [174] J.-H. Jeong, B. W. Murray, S. Takayama, C.-H. Wong, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 4227–4234.
- [175] D. J. A. Schedler, B. R. Bowen, B. Ganem, *Tetrahedron Lett.* **1994**, *35*, 3845–3848.
- [176] Y. Takaoka, T. Kajimoto, C.-H. Wong, *J. Org. Chem.* **1993**, *58*, 4809.
- [177] M. Takebayashi, S. Hiranuma, Y. Kanie, T. Kajimoto, O. Kanie, C.-H. Wong, *J. Org. Chem.*, im Druck.
- [178] Y. Wang, Y. Takaoka, C.-H. Wong, *Angew. Chem.* **1994**, *106*, 1343; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1994**, *33*, 1242–1244.
- [179] F. Moris-Varas, X.-H. Qian, C.-H. Wong, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 7647–7652.
- [180] A. K. Ray, U. Nilsson, G. Magnusson, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 2256.
- [181] S. A. DeFrees, L. Phillips, L. Guo, S. Zalipsky, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 6101–6104.
- [182] H. Miyauchi, M. Yuri, M. Tanaka, N. Kawamura, M. Hayashi, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1997**, *7*, 989–992.
- [183] W. Spevak, C. Foxall, D. H. Charych, F. Dasgupta, J. O. Nagy, *J. Med. Chem.* **1996**, *39*, 1018–1020.
- [184] S. A. DeFrees, W. Kosch, W. Way, J. C. Paulson, S. Sabesan, R. L. Halcomb, D.-H. Huang, Y. Ichikawa, C.-H. Wong, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 66–79.
- [185] W. A. Greenberg, E. S. Priestley, P. S. Sears, P. B. Alper, C. Rosenbohm, M. Hendrix, S.-C. Hung, C.-H. Wong, unveröffentlichte Ergebnisse.
- [186] W. Weis, J. H. Brown, S. Cusack, J. C. Paulson, J. J. Skehel, D. C. Wiley, *Nature* **1988**, *333*, 426–431.
- [187] W. Spevak, J. O. Nagy, D. H. Charych, M. E. Schaefer, J. H. Gilbert, M. D. Bednarski, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 1146–1147.
- [188] H. Kamitakahara, T. Suzuki, N. Nishigori, Y. Suzuki, O. Kanie, C.-H. Wong, *Angew. Chem.* **1998**, *110*, 1607–1611; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, *37*, 1524–1528.
- [189] S.-K. Choi, M. Mammen, G. M. Whitesides, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 4103–4111.
- [190] M. Koketsu, T. Nitoda, H. Sugino, L. R. Juneja, M. Kim, T. Yamamoto, N. Abe, T. Kajimoto, C.-H. Wong, *J. Med. Chem.* **1997**, *40*, 3332–3335.
- [191] C. U. Kim, W. Lew, M. A. Williams, H. Liu, L. Zhang, S. Swaminathan, Bischofberger, M. S. Chen, D. B. Mendel, C. Y. Tai, W. G. Laver, R. C. Stevens, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 681–690.