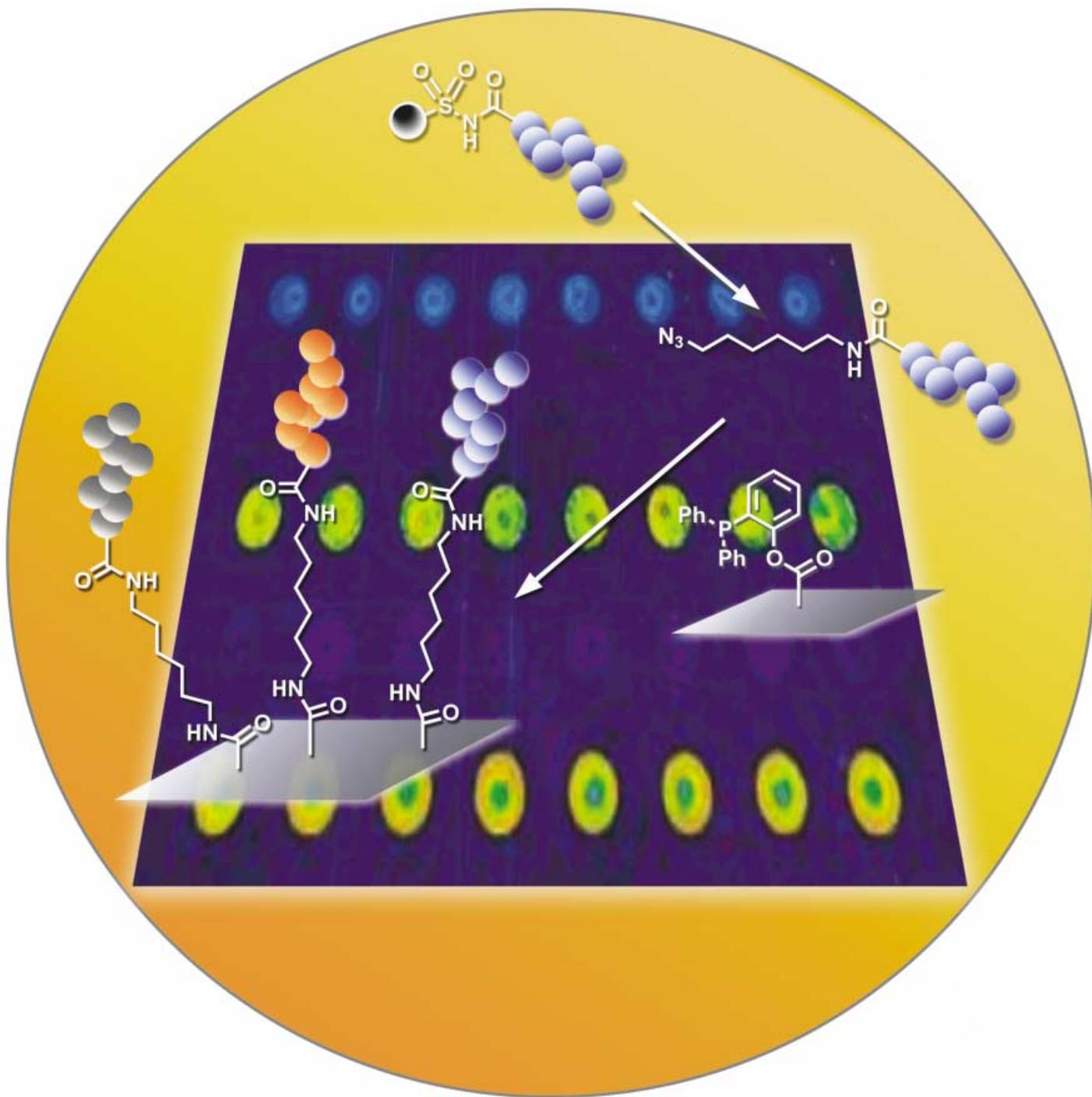


Zuschriften



Eine neuartige Abspaltungs-Aktivierungs-Strategie, die die kombinatorische Festphasensynthese mit der Erzeugung von Mikroarrays durch chemoselektive Immobilisierung vereint, stellen R. Breinbauer, C. M. Niemeyer und H. Waldmann et al. auf den folgenden Seiten vor.



Staudinger-Ligation: eine Immobilisierungsstrategie zur Herstellung von Wirkstoff-Arrays**

*Maja Köhn, Ron Wacker, Carsten Peters,
Hendrik Schröder, Laurent Soulère, Rolf Breinbauer,*
Christof M. Niemeyer* und Herbert Waldmann**

*Professor Manfred T. Reetz
zum 60. Geburtstag gewidmet*

Wirkstoff-Arrays wurden in den letzten Jahren als ein Werkzeug für Hochdurchsatz-Versuche in der biologischen Forschung entwickelt.^[1,4a] Die fast schon zur Routine gewordene Anwendung von DNA-Chips^[2] und Protein-Arrays^[3] hat die Entwicklung dieser neuen Technik gefördert, da damit nicht nur der Vorteil der räumlichen Adressierbarkeit der Sondenmoleküle, sondern auch das Auskommen mit winzigen Mengen an Analysenproben erreicht werden kann. Um die notwendige Weiterentwicklung von Wirkstoff-Arrays vorantreiben zu können, bedarf es neuer Methoden, die unter milden Bedingungen die chemoselektive Anknüpfung von organischen Verbindungen an eine Oberfläche ermöglichen. Dafür sind Reaktionstypen erforderlich, die sich in ihrer Reaktivität orthogonal zu der Vielfalt an funktionellen Gruppen, wie sie für biologisch relevante Substanzklassen typisch sind, verhalten. Bis jetzt wurde nur eine beschränkte Zahl an Reaktionen für die Anknüpfung von Wirkstoffmolekülen an entsprechend funktionalisierte Glasoberflächen herangezogen,^[4] wobei meist funktionelle Gruppen genutzt wurden, die oftmals auch für die biologische Wirkung der zu

untersuchenden Moleküle ausschlaggebend sind, z.B. -NH₂, -OH, -SH oder -COOH.

Unser Ziel war es, eine Kupplungsstrategie zu entwickeln, die folgenden Design-Kriterien gerecht werden sollte: Verwendung einer funktionellen Gruppe mit singulärer Reaktivität, die 1) ein möglichst diverses Repertoire an anderen Funktionalitäten toleriert, 2) unter milden Reaktionsbedingungen an Luft und in Gegenwart von Wasser reagiert und 3) mit den sehr effizienten Methoden der kombinatorischen Festphasensynthese kompatibel ist. Im Idealfall ließe sich diese funktionelle Gruppe bei der Synthese der zu immobilisierenden Substanzbibliotheken im Abspaltungsschritt vom Harz einführen. Dadurch würde der Einsatz von zusätzlichen, aktivierenden Reagentien im Verknüpfungsschritt obsolet werden. Wir haben die Azid-Gruppe als eine für unsere Zwecke nahezu ideale Funktionalität erkannt, da Azide – trotz einer hohen intrinsischen Reaktivität – die chemoselektive Ligation mit einer sehr begrenzten Gruppe an Reaktionspartnern ermöglichen. Erst kürzlich haben Wong et al. über die Herstellung von Kohlenhydrat-Arrays berichtet, wobei sie die Sharpless-Bedingungen zur Cu-katalysierten [3+2]-Cycloaddition von Aziden und Alkinen nutzten.^[5]

Eine alternative, metallfreie Kupplungsstrategie ist die Staudinger-Ligation zwischen Aziden und entsprechend substituierten Phosphanen, bei der letztendlich eine thermodynamisch stabile Amidbindung geknüpft wird. Die Arbeiten von Bertozzi et al. und Raines et al. haben überzeugend die hervorragende Chemoselektivität dieses Ansatzes belegt, z.B. bei der erst kürzlich beschriebenen metabolisch vermittelten Manipulation von Zelloberflächen.^[6]

Wir berichten hier, dass Azid-funktionalisierte Wirkstoffmoleküle durch organische Festphasensynthese (SPOS) hergestellt und kovalent an Glasoberflächen geknüpft werden können (Schema 1). Mithilfe eines Kenner-Linkers^[7] ist es möglich, die Azid-Gruppe während der Safety-Catch-Abspaltung vom Harz in die Substanzbibliothek einzuführen. Die aktivierte Bibliotheksverbindungen **B**, die aus dem immobilisierten Sulfonamid **A** nach N-Alkylierung und anschließender Behandlung mit einem Azid-substituierten Amin gebildet wurden, können durch Staudinger-Ligation selektiv auf Glasoberflächen, die über kovalent angeknüpfte Phosphangruppen verfügen (**C**), immobilisiert werden. Da die nun auf der Oberfläche angeordneten Moleküle (**D**) in der Lage sind, Bindungsreaktionen mit Liganden einzugehen, z.B. mit Fluoreszenz-markierten Proteinen, bietet dieser Ansatz eine effiziente Strategie zur Herstellung von Wirkstoff-Arrays von Verbindungen, die mithilfe der kombinatorischen Chemie erzeugt wurden.^[8]

Um eine maximale Oberflächenbedeckung zu erreichen, wurden Glas-Objektträger, wie von uns bereits beschrieben,^[9] zunächst mit einer Zwischenschicht aus Polyamidoamin(PAMAM)-Dendrimeren der 4. Generation belegt. Die primären NH₂-Gruppen des PAMAM-Dendrimers wurden mit Glutarsäureanhydrid umgesetzt und die erhaltenen freien HOOC-Gruppen mit 2-(Diphenylphosphanyl)phenol^[6a] nach bekannten Reaktionsprotokollen verestert.^[10] Die so modifizierten Glasoberflächen enthielten nun die Azid-reaktiven Phosphangruppen (**C**, Schema 1) und wurden als Substrate für die

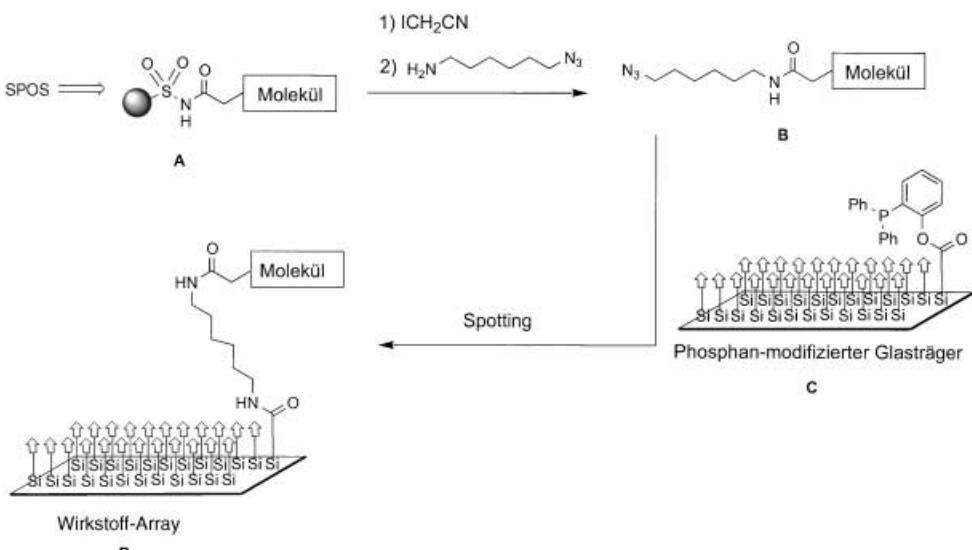
[*] Dr. R. Breinbauer, Prof. H. Waldmann, Dipl.-Chem. M. Köhn, Dr. C. Peters, Dr. L. Soulère
Abteilung für Chemische Biologie
Max-Planck-Institut für molekulare Physiologie
Otto-Hahn-Straße 11, 44227 Dortmund (Deutschland)
und
Universität Dortmund
Fachbereich Chemie, Organische Chemie
44227 Dortmund (Deutschland)
Fax: (+49) 231-133-2499
E-mail: rolf-peter.breinbauer@mpi-dortmund.mpg.de
herbert.waldmann@mpi-dortmund.mpg.de

Prof. C. M. Niemeyer, Dipl.-Biol. R. Wacker
Universität Dortmund
Fachbereich Chemie, Biologisch-Chemische Mikrostrukturtechnik
Otto-Hahn-Straße 6, 44227 Dortmund (Deutschland)
Fax: (+49) 231-755-7082
E-mail: cmn@chemie.uni-dortmund.de

Dipl.-Biol. R. Wacker, Dr. H. Schröder
Chimera Biotec GmbH

Emil-Figge-Straße 76a, 44227 Dortmund (Deutschland)

[**] Diese Arbeit wurde von der Deutschen Forschungsgemeinschaft, der Max-Planck-Gesellschaft, der Alexander von Humboldt-Stiftung (Forschungsstipendium für L.S.) und dem Fonds der Chemischen Industrie (Liebig-Stipendium für R.B.) finanziell unterstützt. Wir danken der Universität Dortmund für finanzielle Förderung im Rahmen des Forschungsprogramms „Molekulare Grundlagen der Biowissenschaften“.



Schema 1. Erzeugung einer Bibliothek von Azid-funktionalisierten Wirkstoffmolekülen mithilfe eines Kenner-Linkers (**A**). Die Azide (**B**) werden zur Herstellung von Wirkstoff-Arrays (**D**) durch Spotting an eine Phosphan-modifizierte Glasoberfläche (**C**) gebunden.

Immobilisierung von Aziden mithilfe eines Piezo-getriebenen Spotting-Roboters verwendet.^[11]

In einem ersten Versuch haben wir unterschiedlich konzentrierte Lösungen des Biotin-Aminocapronsäure-Azidoheptanamid-Konjugats **1** (Positivkontrolle, PC) durch Spotting an Phosphan-modifizierte Glasoberflächen gebunden (Abbildung 1). Als Negativkontrolle (NC) verwendeten wir das

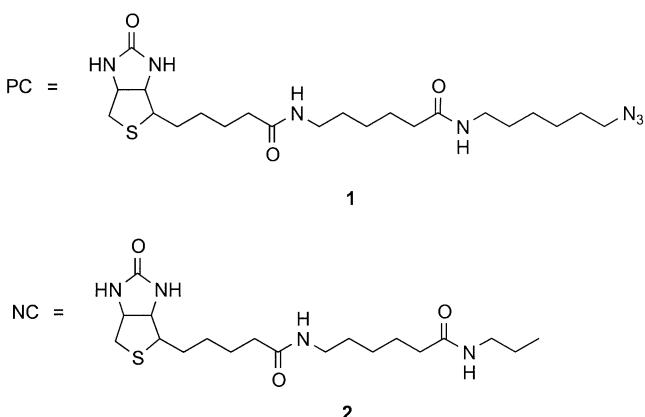


Abbildung 1. Biotin-Derivate, die in der Staudinger-Festphasenligation eingesetzt wurden.

entsprechende Azid-freie Analogon **2**. Nach dem Spotting-Vorgang wurden die Glasträger mit Pufferlösung gewaschen und anschließend mit Cy5-markiertem Antibiotin-Immunoglobulin G (abIgG) behandelt.^[12] Durch erneutes Waschen mit Pufferlösung wurde überschüssiges Reagens entfernt und danach die Fluoreszenzintensität der Signale aufgenommen und quantifiziert.

Wie in Abbildung 2 ersichtlich, führte die Immobilisierung des Biotins **1** bis zu einer Konzentration von 100 µM hinab zu Signalen mit hervorragendem Signal-Rausch-Verhältnis, während mit der Kontrollverbindung **2** bei keiner

Konzentration signifikante Signale erhalten wurden (Abbildung 2a). Anschließende Behandlung des Objektträgers mit einem Puffer, der 0.1% Natriumdodecylsulfat enthielt (15 min, 60 °C), führte zu einer sechsfach niedrigeren Signalintensität (Abbildung 2b). Bemerkenswerterweise konnte die fortwährende Anwesenheit des Wirkstoffmoleküls, das durch eine stabile Peptidbindung kovalent an die Oberfläche gebunden war, nachgewiesen werden, indem erneut mit Cy5-markiertem abIgG behandelt wurde (Abbildung 2c). Dabei wurden Fluoreszenzsignale im Bereich der ursprünglichen Intensität erhalten. Dies lässt den Schluss zu, dass nach obigem Verfahren hergestellte Arrays für mehrfachen Gebrauch geeignet sein sollten.

Im nächsten Schritt wurden das biotinierte Peptidfragment **3** (14% Ausbeute über 7 Stufen) und ein Analogon eines Biphenyl-Antibiotikums^[13] (**4**; 6% Ausbeute über 7 Stufen) gemäß unserer in Schema 1 skizzierten mehrstufigen Tandem-SPOS-Aktivierungsstrategie hergestellt, wobei der Kenner-Linker **5** eingesetzt wurde (Schema 2).^[7b] Die beiden Synthesen umfassten eine Reihe von Reaktionstypen, darunter eine Pd-katalysierte Kreuzkupplung, reduktive Aminierung und Amid-Bildungen. Die Verbindungen **3** und **4** sind Beispiele für Wirkstoffmoleküle, wie sie für die Festphasensynthese in der Pharmaforschung und in der Chemischen Biologie typisch sind.

Die nach Spotting der Haptene **3** und **4** auf Phosphan-modifizierte Glasträger und anschließender Inkubation mit Cy5-markiertem Streptavidin (STV) sowie mit Cy5-abIgG erhaltenen Fluoreszenzsignale belegen eindeutig die spezifische Anknüpfung und die ungestörten Funktionalitäten der Haptensubstanzen (Abbildung 3).^[12]

Um zu belegen, dass der oben beschriebene Ansatz nicht auf biotinierte Verbindungen beschränkt ist, wurde das von der Mannose abgeleitete Azid **6** synthetisiert und auf einem Phosphan-derivatisierten Glasträger immobilisiert. Unsubstituierte Mannose (**7**) wurde als Negativkontrolle eingesetzt (Abbildung 4). Inkubation mit AlexaFluor-647-markiertem

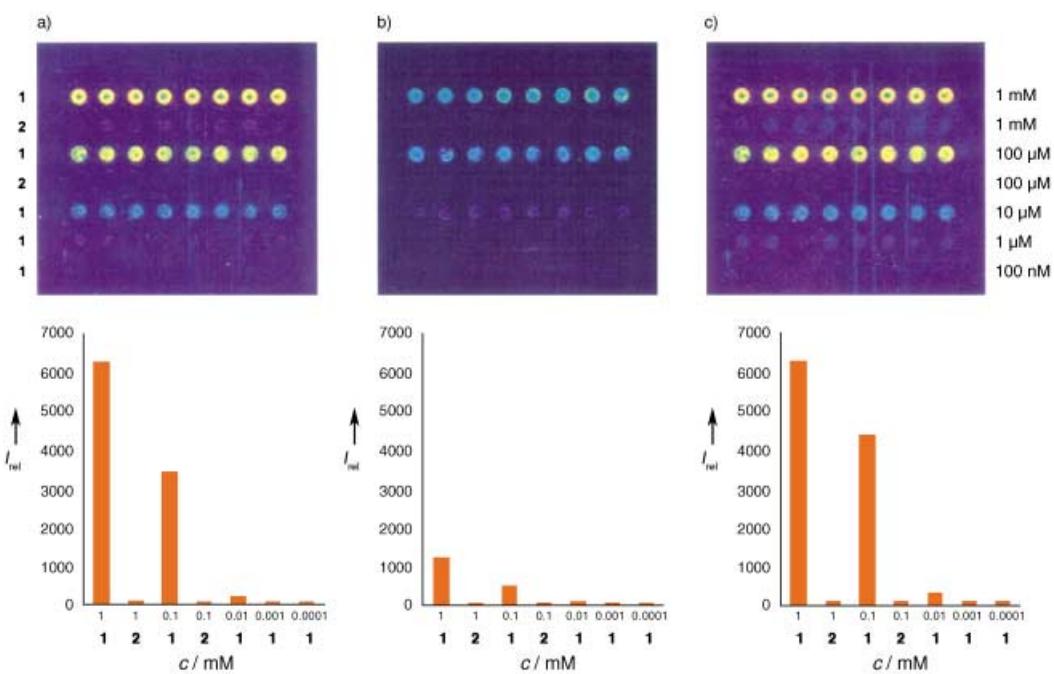
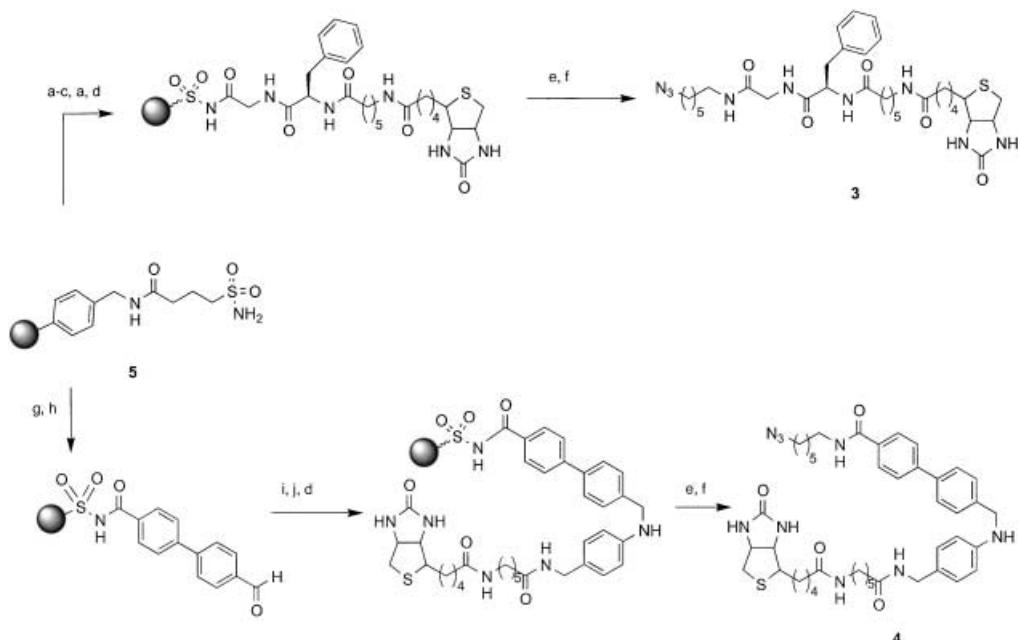


Abbildung 2. Bindung von Cy5-markiertem ablgG-Antikörper an die durch Staudinger-Ligation auf einer Glasoberfläche immobilisierten Verbindungen **1** und **2**.^[12] Die Histogramme repräsentieren die Signalintensitäten, die durch Quantifizierung der Cy5-Fluoreszenz erhalten wurden. Die Oberflächen können regeneriert werden, wie in (b) und (c) gezeigt ist.



Schema 2. Tandem-SPOS der Haptene **3** und **4**. a) Fmoc-Gly-OH, PyBOP, DIPEA (*N,N*-Diisopropylethylamin), DMF, 16 h; b) Piperidin/DMF (1:4), 2×10 min; c) Fmoc-Phe-OH, HBTU, HOEt, DIPEA, DMF, 1 h; d) Biotin-ACA, HBTU, HOEt, DIPEA, 1 h; e) TMS-CH₂N₂, Hexan/CH₂Cl₂ (1:1), 3 h, RT; f) 6-Azidohexanamin, DMF, 40°C, DMF; g) 4-Iodbenzoic acid, PyBOP, DIPEA, DMF, 16 h; h) 4-Formylphenylboronic acid, Pd(OAc)₂, K₂CO₃, DIPEA, 16 h, 90°C; i) 4-(*N*-Boc-aminomethyl)anilin, NaBH(OAc)₃, Na₂SO₄, AcOH, CH₂Cl₂, 12 h, Ultraschall; j) TFA/CH₂Cl₂ (1:1).

Concanavalin A zeigte, dass die Anknüpfung des Mannoseazids **6** durch Staudinger-Ligation selektiv erfolgte, sodass die biomolekulare Erkennung durch das Lectin möglich wurde.^[12] Bei Verwendung der nativen Mannose wurden keine Signale beobachtet (Abbildung 4). Diese Ergebnisse

liefern zusätzliche Hinweise für die Chemoselektivität der Staudinger-Ligation und deren Anwendbarkeit für die Herstellung von Wirkstoff-Arrays.

Wir konnten zeigen, dass die Staudinger-Ligation unter Verwendung von 2-(Diphenylphosphanyl)phenol-modifizier-

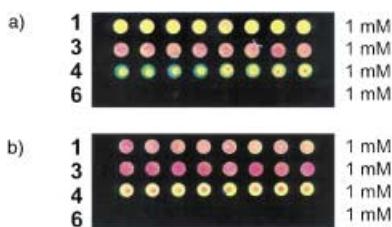


Abbildung 3. Wirkstoff-Arrays mit den Haptenen **3** und **4** (**1** als Positivkontrolle, **6** als Negativkontrolle). Visualisierung mit a) Cy5-ablgG, b) Cy5-Streptavidin.

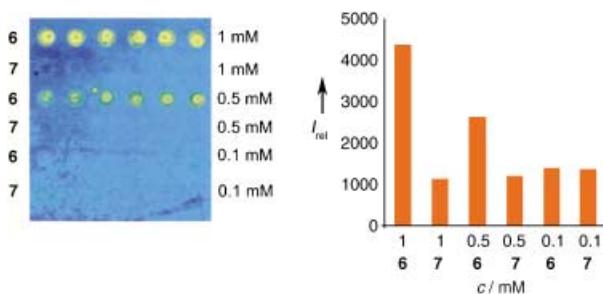
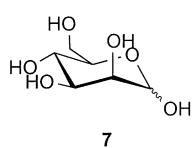
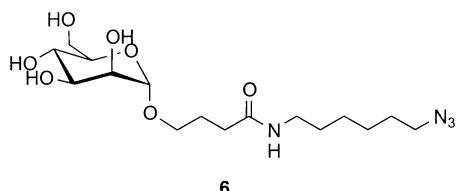


Abbildung 4. Bindung von AlexaFluor-647-markiertem Concanavalin A an die immobilisierten Verbindungen **6** und **7**.

ten Glasträgern als eine neue und effiziente Kupplungsstrategie für die Herstellung von Wirkstoff-Arrays genutzt werden kann. Gegenüber bisherigen Strategien verfügt die Staudinger-Ligation über den Vorteil der chemischen Orthogonalität zu funktionellen Gruppen, die häufig für die Wechselwirkung mit biologischen Systemen wichtig sind (z.B. Hydroxy-, Carboxy- oder Sulfanylgruppen). Unsere Tandem-SPOS-Aktivierungsstrategie verknüpft die synthetische Effizienz der kombinatorischen Festphasensynthese mit den analytischen Vorteilen der Wirkstoff-Arrays, wie der Möglichkeit zum Hochdurchsatz-Screening und dem Auskommen mit nur geringen Mengen an Analyt und Sondenmolekülen.

Eingegangen am 16. September 2003 [Z52877]

Online veröffentlicht am 21. Oktober 2003

Stichwörter: Bioorganische Chemie · Festphasensynthesen · Kombinatorische Chemie · Mikroarrays · Staudinger-Ligation

- [1] Übersichtsartikel: a) K. S. Lam, R. Renil, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2002**, 6, 353–358; b) C. Ortiz Mellet, J. M. García Fernández, *ChemBioChem* **2002**, 3, 819–822; c) R. Breinbauer, M. Köhn, C. Peters in *Bioorganic Chemistry II* (Hrsg.: C. Schmuck, H. Wennemers), Wiley-VCH, Weinheim, im Druck.
- [2] Aktueller Übersichtsartikel: M. C. Pirrung, *Angew. Chem.* **2002**, 114, 1326–1341; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, 41, 1276–1289.
- [3] Aktuelle Übersichtsartikel: a) M. F. Templin, D. Stoll, M. Schrenk, P. C. Traub, C. F. Vohringer, T. O. Joos, *Trends Biotechnol.* **2002**, 20, 160–166; b) D. S. Wilson, S. Nock, *Angew. Chem.* **2003**, 115, 510–517; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, 42, 494–500.
- [4] Immobilisierung von Wirkstoffmolekülen mit Sulfanyl-Funktionen: a) G. MacBeath, A. N. Koehler, S. L. Schreiber, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, 121, 7967–7968; mit Hydroxy-Funktionen: b) P. J. Hergenrother, K. M. Depew, S. L. Schreiber, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, 122, 7849–7850; Oxim-Bildung: c) J. R. Falsey, M. Renil, S. Park, S. Li, K. S. Lam, *Bioconjugate Chem.* **2001**, 12, 346–353; durch Hybridisierung von PNA-Markern: d) N. Winsinger, J. L. Harris, B. J. Backes, P. G. Schultz, *Angew. Chem.* **2001**, 113, 3254–3258; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, 40, 3152–3155; e) N. Winsinger, S. Ficarro, P. G. Schultz, J. L. Harris, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2002**, 99, 11139–11144; f) F. G. Kuruvilla, A. F. Shamji, S. M. Sternson, P. J. Hergenrother, S. L. Schreiber, *Nature* **2002**, 416, 653–657; Kohlenhydrat-Arrays: g) D. Wang, S. Liu, B. J. Trummer, C. Deng, A. Wang, *Nat. Biotechnol.* **2002**, 20, 275–281; h) S. Fukui, T. Feizi, C. Galustian, A. M. Lawson, W. G. Chai, *Nat. Biotechnol.* **2002**, 20, 1001–1017; i) B. T Houseman, M. Mrksich, *Chem. Biol.* **2002**, 9, 275–281; Peptid-Arrays: j) C. M. Salisbury, D. J. Maly, J. A. Ellman, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, 124, 14868–14870; k) Q. Zhu, M. Uttamchandani, D. Li, M. L. Leasaicherre, S. Q. Yao, *Org. Lett.* **2003**, 5, 1257–1260; Immobilisierung von schwach aciden Wirkstoffmolekülen: l) D. Barnes-Seeman, S. B. Park, A. N. Koehler, S. L. Schreiber, *Angew. Chem.* **2003**, 115, 2478–2481; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, 42, 2376–2379.
- [5] F. Fazio, M. C. Bryan, O. Blixt, J. C. Paulson, C.-H. Wong, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, 124, 14397–14402.
- [6] a) E. Saxon, J. I. Armstrong, C. R. Bertozzi, *Org. Lett.* **2000**, 2, 2141–2143; b) E. Saxon, C. R. Bertozzi, *Science* **2000**, 287, 2007–2010; c) H. C. Hang, C. R. Bertozzi, *Acc. Chem. Res.* **2001**, 34, 727–736; d) K. L. Kiick, E. Saxon, D. A. Tirrell, C. R. Bertozzi, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2002**, 99, 19–24; e) E. Saxon, S. J. Luchansky, H. C. Hang, C. Yu, S. C. Lee, C. R. Bertozzi, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, 124, 14893–14902; f) M. B. Soellner, B. L. Nilsson, R. T. Raines, *J. Org. Chem.* **2002**, 67, 4993–4996; g) B. L. Nilsson, R. J. Hondal, M. B. Soellner, R. T. Raines, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, 125, 5268–5269.
- [7] a) G. W. Kenner, J. R. McDermott, R. C. Sheppard, *Chem. Commun.* **1971**, 636–637; b) H. S. Overkleft, P. R. Bos, B. G. Hekking, E. J. Gordon, H. L. Ploegh, *Tetrahedron Lett.* **2000**, 41, 6005–6009.
- [8] Während der Abfassung dieses Manuskripts erschien ein Bericht von Raines et al., die die Staudinger-Ligation zwischen (Diphenylphosphorylmethyl)thioester-funktionalisierten Glasoberflächen und Azid-modifizierten Peptiden zur Herstellung von RNase-Protein-Arrays genutzt haben: M. B. Soellner, K. A. Dickson, B. L. Nilsson, R. T. Raines, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, 125, 11790–11791.
- [9] a) R. Benters, C. M. Niemeyer, D. Wöhrle, *ChemBioChem* **2001**, 2, 686–694; b) R. Benters, C. M. Niemeyer, D. Drutschmann, D. Blohm, D. Wöhrle, *Nucleic Acids Res.* **2002**, 30, E10; c) H.

- Schroeder, R. Wacker, C. M. Niemeyer, *Nachr. Chem.* **2003**, *51*, 28.
- [10] Ein Schlenk-Gefäß, in dem sich ein auf einem Teflonhalter angebrachter COOH-funktionalisierter PAMAM-Glasobjektträger (Chimera Biotec, Dortmund) befand, wurde mit wasserfreiem CH_2Cl_2 , 4-Dimethylaminopyridin (0.96 mm), 2-(Diphenylphosphanyl)phenol (1.2 mm) und *N,N'*-Diisopropylcarbodiimid (1.32 mm) gefüllt, und die Lösung wurde über Nacht unter Argon gerührt. Die überstehende Lösung wurde entfernt, der Objektträger mit CH_2Cl_2 ausgiebig gespült und anschließend im Vakuum getrocknet. Die funktionalisierten Oberflächen wurden zwar unter Argon aufbewahrt, können aber auch ohne Aktivitätsverlust an der Luft gehandhabt werden.
- [11] Der Spotting-Prozess wurde mit einem GeSiM-Nanoplotter (Gesim, Dresden) durch viermaliges Spotting von 0.25-nL-Tropfen von Lösungen von **1–4**, **6**, **7** (in Wasser/1,4-Dioxan 1:2; Spot-Durchmesser ca. 400 μm) und anschließende Inkubation über Nacht durchgeführt.
- [12] Um eine unspezifische Bindung der Reagentien zu minimieren, wurden alle Objektträger nach der Wirkstoffimmobilisierung 30 min in einem Blockierungspuffer (Chimera Biotec GmbH) behandelt. Nach dem Trocknen wurden Hybridisierungskammern (Schleicher & Schuell) auf dem Objektträger angebracht. abIgG-Cy5 (100 nm) in TETBS-Puffer (150 mM NaCl, 20 mM Tris, 5 mM EDTA, 0.05% Tween20) wurde in die einzelnen Kammern gefüllt und 60 min bei Raumtemperatur inkubiert. Der Objektträger wurde mit TETBS und entionisiertem H_2O gewaschen und anschließend durch Zentrifugation getrocknet. Die Fluoreszenzintensität wurde mit einem Microarray-Laserscannersystem (Axon) gemessen (pmt: 500; 100% Laserleistung). Die Signale wurden mit der Software GenePix pro4.1 (Axon) ausgewertet und quantifiziert. Bei den in Abbildung 3 gezeigten Experimenten wurde die Bindung von abIgG-Cy5 (100 nm) und 100 nm Cy5-markiertem STV in ähnlicher Weise durchgeführt. Zur Bindung von Concanavalin A (Abbildung 4) wurde der Wirkstoff-Array mit TBSTS-Puffer (150 mM NaCl, 20 mM Tris, 0.05% Tween20, 1 mM CaCl_2 , 1 mM MnCl_2 , 1 mM MgCl_2 , enthält 1% BSA) blockiert und dann mit Concanavalin A (19.2 μm) in diesem Puffer 60 min bei Raumtemperatur inkubiert.
- [13] M. Artico, A. Mai, G. Sbardella, S. Massa, G. Lampis, D. Deidda, R. Pompei, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1998**, *8*, 1493–1498.