

A b s c h l u s s b e r i c h t

zum Vorhaben Kennziffer 2841

“Assay-Entwicklung und Inhibitorsynthese für die Trans-Sialidase aus *Trypanosoma cruzi*“

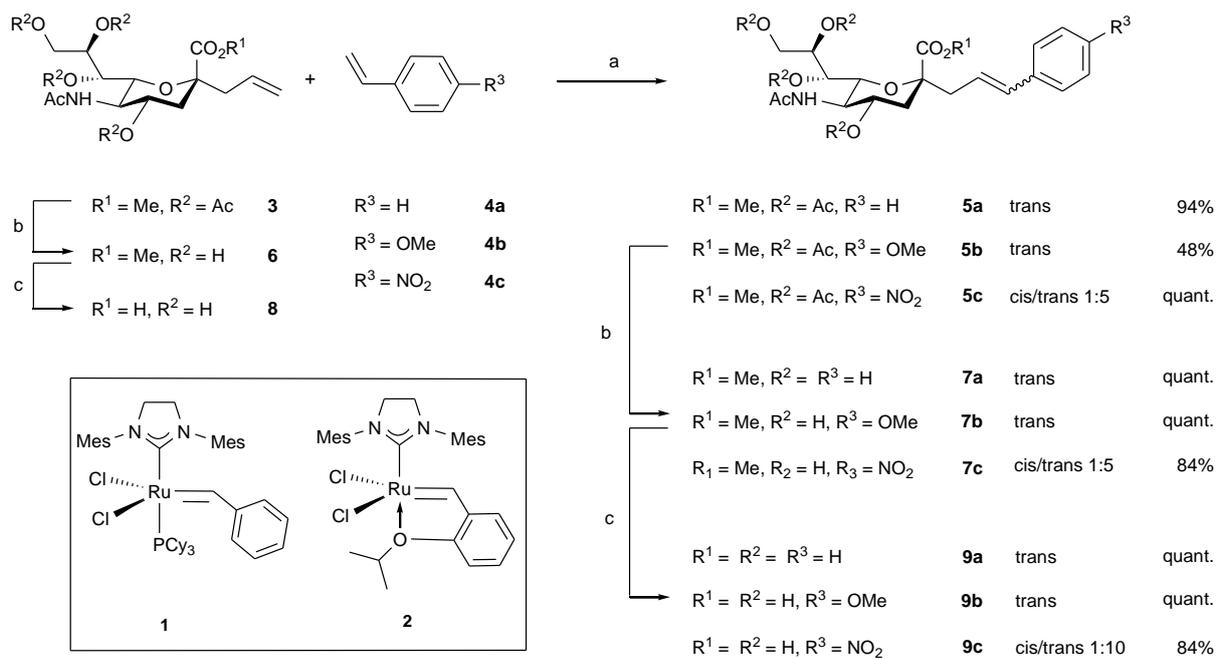
Abstract

Bei der südamerikanischen Trypanosomiasis (Chagas Krankheit) bewirkt die Transsialidase von *Trypanosoma cruzi* (TcTS) die Übertragung terminaler N-Acetylneuraminsäure von humanen Zellen auf die Zellepitope des Pathogens. Mit diesem ungewöhnlichen Übertragungsmechanismus schützt sich das Pathogen gegen die Erkennung und Eliminierung durch das humane Immunsystem. Bis heute gibt es keine wirksamen Inhibitoren gegen TcTS. Deshalb wird hier der Ansatz verfolgt, C-Sialoside mit aromatischen Funktionsgruppen zu gewinnen, die sowohl der Enzymhydrolyse widerstehen als auch zur Erkennung des Enzyms über seine spezifischen aromatischen Aminosäuresequenzen beitragen. Durch Metathesereaktionen werden eine Reihe aromatisch-funktionalisierter C-Sialoside gewonnen, und die Verbindungen weiter modifiziert. Oberflächenplasmonresonanzstudien mit zwölf neuen Liganden weisen einige Derivate auf, deren Affinitätskonstante interessant ist. Erste Inhibitortests zeigen deutliche Modulationen der TcTS-Transferwirkung. Weitere Studien aufbauend und ausgehend von diesen Derivaten sind von Interesse.

Teil 1: Aufbau modifizierter C-Arylglycoside der N-Acetylneuraminsäure (Neu5Ac) als potentielle Modulatoren der Transsialidase

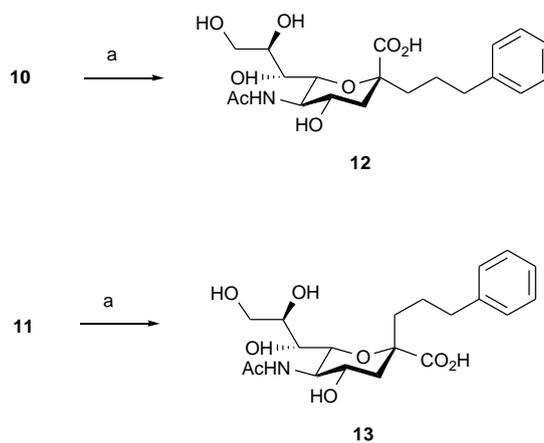
Qualitative Ansätze zum Inhibitor-Design lassen sich aus der Betrachtung der Kristallstruktur des Komplexes aus *Transsialidase cruzi* (TcTS) und Sialyllactose¹ ableiten. Wie in Fig. 1 dargestellt werden Derivatisierungen sowie Modifikation angestrebt.

Als vorteilhaftes Ausgangsmaterial kamen Alkyl-C-sialoside² infrage. Kürzlich konnten wir dieses Konzept in Olefin-Kreuzmetathesen zur Darstellung von C-Sialosiden mit aromatischen und Kohlenhydrat-Substituenten nutzen.³ Hier waren jetzt Feineinstellungen dieses Ansatzes zur Einbringung spezifischer elektronischer Effekte gefragt. Dazu wurden die Metathese-Katalysatoren der zweiten Generation nach Grubbs (**1**) sowie nach Grubbs-Hoyveda (**2**) herangezogen. Mit p-Nitrostyrol **4c** konnte kompletter Umsatz zum 1:5 *cis/trans*-Gemisch **5c** erreicht werden (Schema 1). Setzte man das entsprechende p-Methoxystyrol **4b** ein, so wurde in mittlerer Ausbeute ausschließlich das *trans*-Produkt **5b** gewonnen. In zwei Schritten wurden die Derivate **5a** – **5c** zunächst zu **7a** – **7c** nach Zémlen deacetyliert, und dann die Methylester basisch zu den C-Sialosiden **9a** – **9c** gespalten.



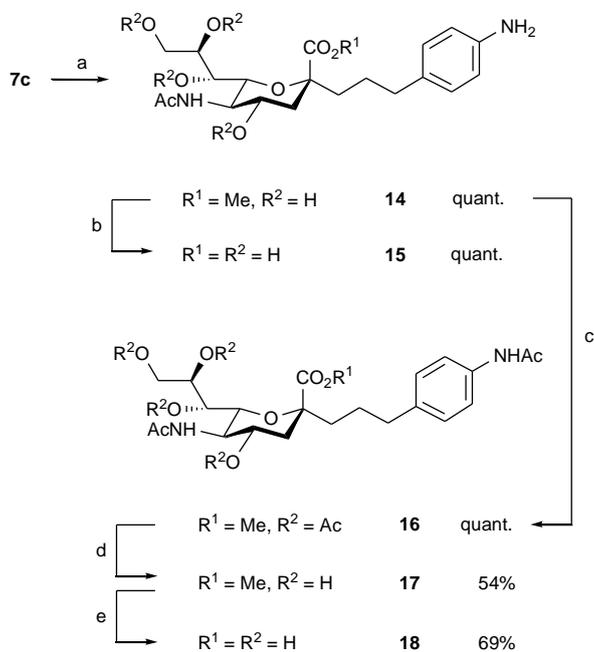
Schema 1 a) Ruthenium-Kat. 1 oder 2, CH_2Cl_2 , Rückfluß; b) NaOMe, MeOH, rt; c) 0.1 M NaOH, H_2O , rt.

Die kürzlich beschriebenen³ hydrierten Metatheseprodukte der C-Sialoside **10** und **11** wurden ebenfalls zu den Liganden **12** und **13** entschützt (Schema 2).



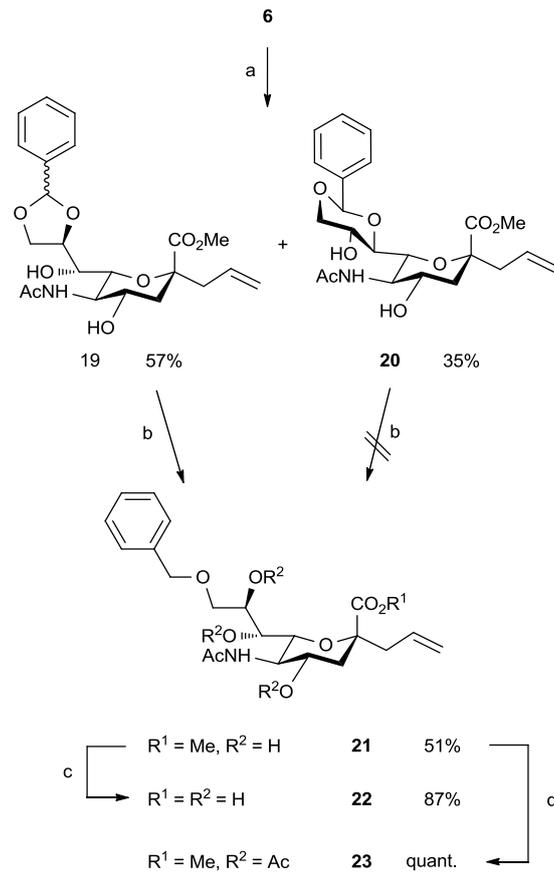
Schema 2 a) 0.1 M NaOH, H_2O , rt.

Das deacetylierte nitrosubstituierte Metatheseprodukt **7c** wurde zum gesättigten und aminosubstituierten Derivat **14** hydriert und dann zur freien Säure **15** entschützt. Durch Acetylierung wurde **16** erhalten (Schema 3).



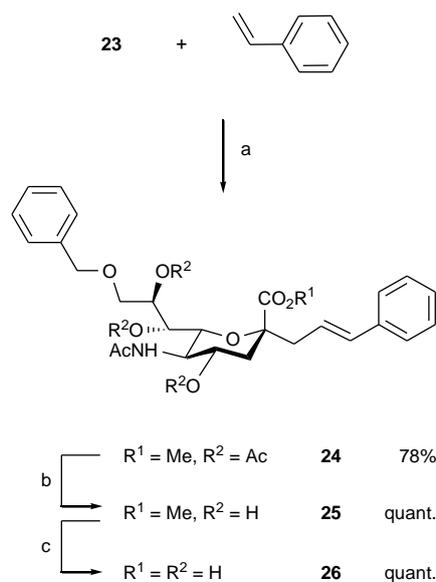
Schema 3 a) H₂, Pd/C, MeOH, rt; b) Et₃N, H₂O, rt; c) Ac₂O, Pyridin, rt; d) NaOMe, MeOH, rt; e) 0.1 M NaOH, H₂O, rt.

Ausgehend von Derivat **6** ließen sich mit Benzaldehyddimethylacetal das 8,9-(**19**) (als 1:1-Diastereomergemisch) sowie das 7,9-Benzylidenderivat (**20**) im Verhältnis ca. 2:1 gewinnen. Überraschenderweise konnte die reduktive Benzylidenringöffnung nicht auf **20**, wohl aber erfolgreich auf **19** angewendet werden. Dabei wurde einheitlich das gewünschte 9-O-Benzylderivat **21** erhalten, dessen doppelte Verseifung zum Liganden **22** gelang (Schema 4).



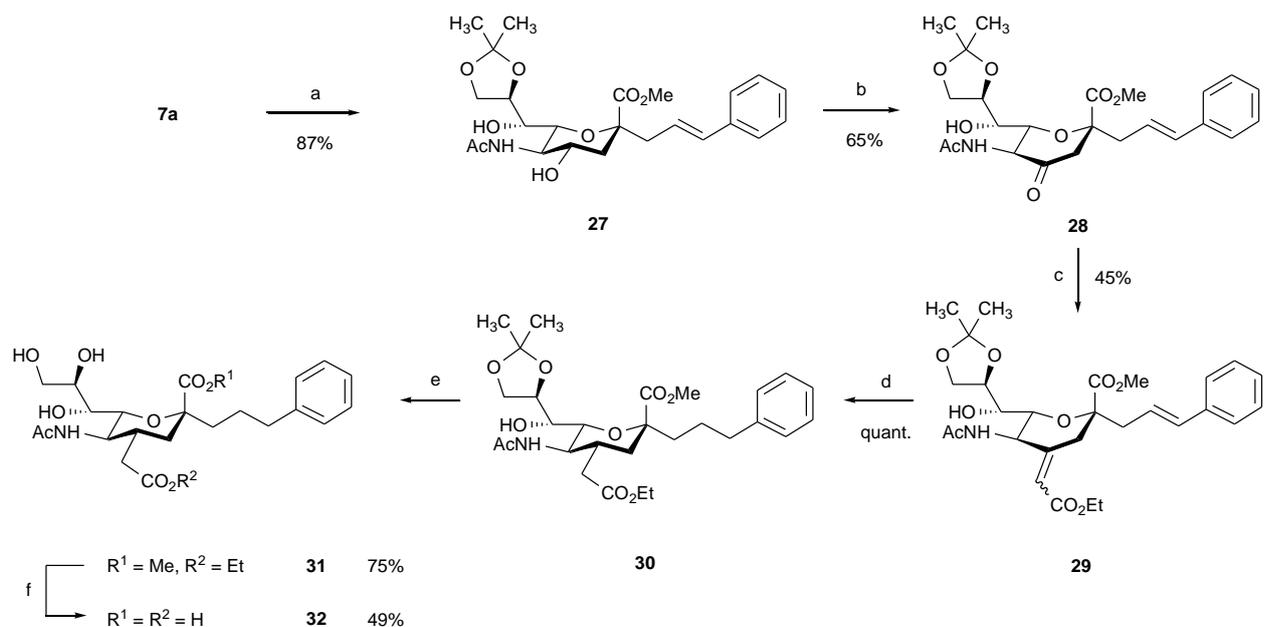
Schema 4 a) BADMA, pTSA, MeCN, 0 °C; b) BH₃-Me₃N, AlCl₃, THF, H₂O, rt; c) 0.1 M NaOH, H₂O, rt; d) Ac₂O, Pyridin.

Das aus **21** durch Acetylierung erhaltene Derivat **23** konnte mit Styrol zum Metatheseprodukt **24** umgesetzt werden, das wiederum im doppelten Umesterungs- und Verseifungsschritt über **25** den Liganden **26** ergab (Schema 5).



Schema 5 Kat. **1**, CH₂Cl₂, Rückfluß; b) NaOMe, MeOH, rt; c) 0.1 M NaOH, H₂O, rt

Es war von Interesse in Position 4 eine Carboxylgruppe einzubringen, die in Interaktion mit den Argininresten im Enzym in Wechselwirkung treten sollte. Daher wurde in Anlehnung an Arbeiten von Zbiral et al.⁴ das Ausgangsmaterial **7a** zum 8,9-Isopropylidenderivat **27** umgesetzt. Dessen Oxidation mit Pyridiniumdichromat gelang regiospezifisch zum 4-Ketoderivat **28**, und durch Wittigreaktion konnte der ungesättigte Ethylester **29** gewonnen werden. Nach Hydrierung zu **30**, Umesterung zu **31** und Esterverseifung wurde der Ligand **32** erhalten (Scheme 6).



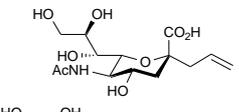
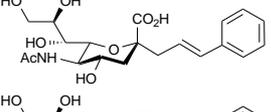
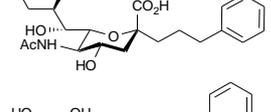
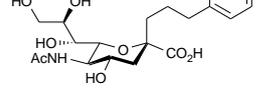
Schema 6 a) 2,2-Dimethoxypropan, H^+ , Aceton, rt; b) PCC, Molsieb 4 Å, CH_2Cl_2 , rt; c) $\text{Ph}_3\text{P}=\text{CHCO}_2\text{Et}$, THF, rt; d) H_2 , Pd/C, MeOH, rt; e) H^+ , H_2O , 60 °C; f) 0.1 M NaOH, H_2O , rt.

Teil 2: Untersuchung zur Affinität der neuartigen Liganden sowie zu ihrem Einfluss auf die Enzymreaktion

Die rekombinante Transsialidase⁵ wurde an den käuflich verfügbaren CM5 Sensorchip (BIACOR) nach der vorgegebenen „Aminokupplungs-Methode“ immobilisiert. Die Affinitätsmessungen erfolgten mit dem Gerät BIACORE T 100 in Tri-HCl (pH=7.5, 100 mM) als Laufpuffer mit 7-10 verschiedenen konzentrierten Proben der synthetisierten Liganden mit Konzentrationen bis zu 5 mM. Die K_D -Werte wurden mit OriginPro 7.5 und der BIACORE-Auswerte-Software berechnet. Für diese Liganden bewegen sich die K_D -Werte zwischen 0.16 und 14 mM und liegen mithin im Bereich der üblichen monovalenten Kohlenhydrat-Protein-Wechselwirkungen.^{6,7}

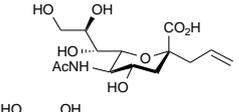
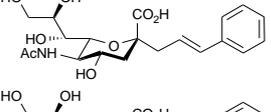
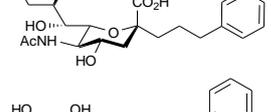
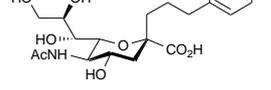
Die Ergebnisse in Tabelle 1 zeigen deutlich den Einfluss des eingebrachten Aromaten, der den präterminalen Zuckerbaustein minikriert dessen Lage sich zwischen dem aromatischen Aminosäure-Baustein Tyr₁₁₉ und Trp₃₁₂ im Enzym befindet. So fehlt der Aromat im Liganden **8** und ist falsch (nämlich β -konfiguriert) in **13**, so dass keine Bindung beobachtet wird. Durch Hydrierung von **9** und **12** steigt die Affinität erheblich an (Tabelle 1). Verbindung **12** zeigt den besten $K_D=0.16$ mM Wert in dieser Untersuchung.

Tabelle 1 Einfluß aromatischer Reste und der Konfiguration

Verbindung	K_D (mM)
<p>8</p> 	n. d. ^a
<p>9a</p> 	3.6 ± 0.6
<p>12</p> 	0.16 ± 0.02
<p>13</p> 	n. d. ^a

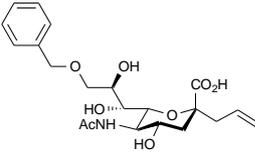
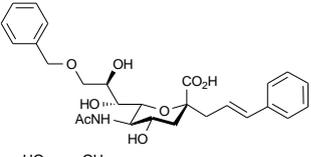
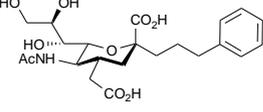
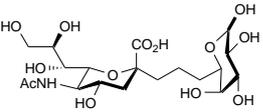
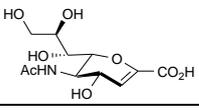
Verbesserungen durch den Einfluss elektronischer Effekte im Arylring ließen sich mit den Verbindungen **9c**, **9b**, **15** und **18** (Tabelle 2) nicht erreichen. Allenfalls das Derivat **15** erreicht in etwa den von Verbindung **12**.

Tabelle 2 Aromatische C-Sialoside mit Substituenten

Verbindung	K_D (mM)
<p>8</p> 	n. d. ^a
<p>9a</p> 	3.6
<p>12</p> 	0.16
<p>13</p> 	n. d. ^a

Die Einbindung eines Arylesters am Ende der Neu5Ac wie in **22** führt offenbar ebenfalls zu substantieller Bindung. Dies deckt sich mit Befunden von Withers et al.,⁸ wonach auch eine solche Anordnung zwischen den oben benannten aromatischen Aminosäuren gebunden wird. Zwei aromatische Reste wie in **26** geben dagegen keine weitere Steigerung, sondern eher eine Behinderung. Auch die zusätzliche Seitenkettencarboxylgruppe in **32** erhöht die Bindung keineswegs. Eine Zuckerkettenverlängerung, wie wir sie in **33** beschrieben haben³ zeigt eine nur sehr schwache Bindung, möglicherweise wegen der „falschen“ α ,2-6-Bindung. Das bekannte Derivat **34** als Inhibitor der viralen und bakteriellen Sialidasen und „Muster“ für die Entwicklung der modernen Influenzasialidase-Inhibitoren zeigt mit TcTS nur schwache Affinität (Tabelle 3).

Tabelle 3 Weitere C-Sialoside

Verbindung	K_D (mM)
	0.37
	2.0
	3.5
	14
	0.65

Erste Untersuchungen zur Inhibition wurden mit dem Liganden **12** vorgenommen, der im SPR den besten $K_D=0.16$ mM gezeigt hatte. Als Grundreaktion wurde die von uns ausgearbeitete TcTS-katalysierte Sialylierung des Akzeptors Methyl-allolactosid mit p-Nitrophenylsialosid als Donor in D_2O herangezogen,⁵ die sich hervorragend und einfach NMR-spektroskopisch erfassen lässt. Wie in Figure 2 deutlich tritt eine erhebliche

Modulation der Transsialidase-Aktivität bei einer Ligandkonzentration von 1 mM auf. Hier besteht jetzt ein Ansatz zur weiteren Verbesserung und Ermittlung besserer Liganden.

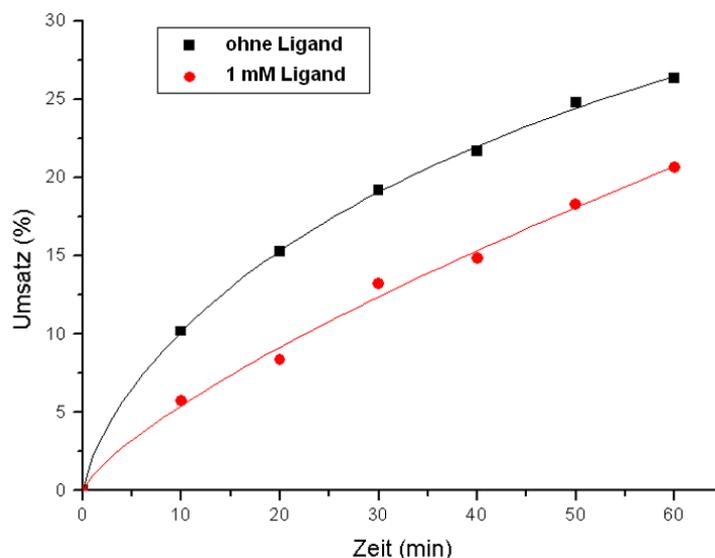


Fig. 2 Transferraten (NMR)

Literatur

1. M. F. Amaya, A. G. Watts, I. Damager, A. Wehenkel, T. Nguyen, A. Buschiazio, G. Paris, A. C. Frasch, S. G. Withers and P. M. Alzari, *Structure (Cambridge MA U. S.)*, **2004**, *12*, 775–784.
2. H. Paulsen and P. Matschulat, *Liebigs Ann. Chem.*, **1991**, 487–495.
3. S. Meinke and J. Thiem, *Carbohydr. Res.*, **2008**, *343*, 1824–1829.
4. H. H. Brandstetter and E. Zbiral, *Liebigs Ann. Chem.*, **1983**, 2055–2065.
5. A. Schroven, S. Meinke, P. Ziegelmueller and J. Thiem, *Chem.–Eur. J.*, **2007**, *13*, 9012–9021.
6. M. Ambrosi, N. R. Cameron and B. G. Davis, *Org. Biomol. Chem.*, **2005**, *3*, 1593–1608.

7. J. C. Paulson, O. Blixt and B. E. Collins, *Nat. Chem. Biol.*, **2006**, 2, 238–248.
8. S. Buchini, A. Buschiazzi and S. G. Withers, *Angew. Chem., Int. Ed.*, **2008**, 47, 2700–2703.

Folgende Veröffentlichungen haben eine Förderung der Max-Buchner-Stiftung durch dies Vorhaben 2841 erfahren:

- a) A. M. Scheppokat, A. Gerber, A. Schroven, S. Meinke, S. Kopitzki, E. Beketow, J. Thimm, J. Thiem, *Eur. J. Cell. Biol.* **2010**, 89, 39-52.
- b) S. Meinke, A. Schroven, J. Thiem, *Org. Biomol. Chem.* **2011**, 9, 4487–44497.

Danksagung

Wir danken der Max-Buchner-Forschungsstiftung für die Förderung dieser Untersuchungen.