

Bioteknologi og kombinatorisk kemi

I moderne lægemiddelforskning er udviklingen af hurtige metoder til screening for substratspecificitet og inhibering af proteolytiske enzymer vigtig, hvilket kræver en stor forståelse for adskillige interdisciplinære teknikker. Multi-resistente bakterier såsom DT-104, TB og muterende vira (HIV) kræver til stadighed større fokus på rationelt design og nye koncepter til udvikling af lægemidler

Af Christian W. Tornøe, cwt@crc.dk, Caspar Christensen, cach@crc.dk og Morten Meldal, mpm@crc.dk, SPOCC, Kemisk afdeling, Carlsberg Laboratorium

Proteolytiske enzymer er involveret i virale, bakterielle og parasitiske infektioner, og de er derfor interessante mål for udvikling af nye potentielle lægemidler. Det humane genom er nu kortlagt og koder for mere end 2000 proteolytiske enzymer, og mange nye gener og proteiner med potentiel farmaceutisk relevans vil blive identificeret i de kommende år. Kombinatoriske metoder kan være med til at skræddersy relevante molekyler til bekæmpelse af dysfunktionelle regulerede enzymer. Det er i særdeleshed relevant for virale proteaser, der lader til at mutere med en kombinatorisk hastighed, som giver resistens over for kendte medikamenter.

Udvikling af nye resiner, følsomme analysemetoder, assays og fast fase kemi, rettet mod fremstilling af enzyminhibitorer, kan blive en afgørende metode til identifikation af nye lægemidler mod proteolytiske enzymer.

Polymerteknologi

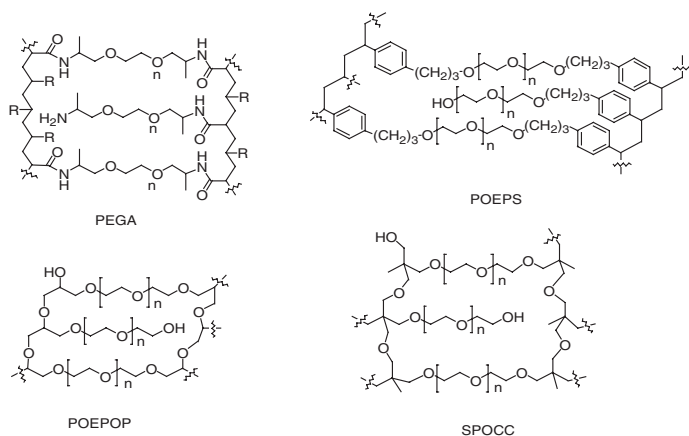
Grundlaget for de udviklede teknikker i Center for Solid Phase Organic Combinatorial Chemistry (SPOCC) under Carlsberg Laboratorium er polymerer med optimerede egenskaber for organisk syntese og enzymatisk studier. Disse polymerer/resiner er kompatible med alle solventer, således at både organiske reagenser og enzymer har mulighed for at gennemtrænge det polymere netværk. Det er essentielt, da størstedelen (>99%) af de

resin-bundne molekyler sidder i det indre af polymeren og ikke på overfladen. Polyethylenglycol (PEG) er hovedbestanddelen i resinerne (ca. 90-95%), den er hydrofil, inert og kendt som stabilisator af enzymer og proteiner. Derfor er PEG-baserede resiner ideelle til syntese af kemiske biblioteker og efterfølgende enzymatisk screening på fast fase. PEG modificeret i enderne og polymeriseret via radikalreaktioner (PEGA, POEPS), anioniske (POEPOP) eller kationiske (SPOCC) ringåbningsreaktioner, giver resiner med amino- eller hydroxy-funktionaliteter, som dernæst kan bruges til organisk syntese [1,2].

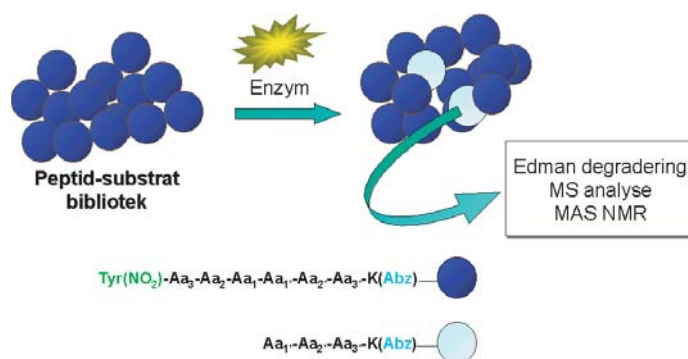
Resinerne polymeriseres som små dråber i silikoneolie, og ved hurtig omrøring kan partikelstørrelsen kontrolleres, og sfæriske partikler med en diameter i området fra 10 µm til 1000 µm kan produceres [3]. Hver resin kan fungere som en kemisk mikroreaktor med et begrænset volumen, hvor enten organiske reagenser eller enzymer kan virke. Dette princip kan bl.a. benyttes til fremstilling af kombinatoriske biblioteker på fast fase.

Kombinatoriske biblioteker

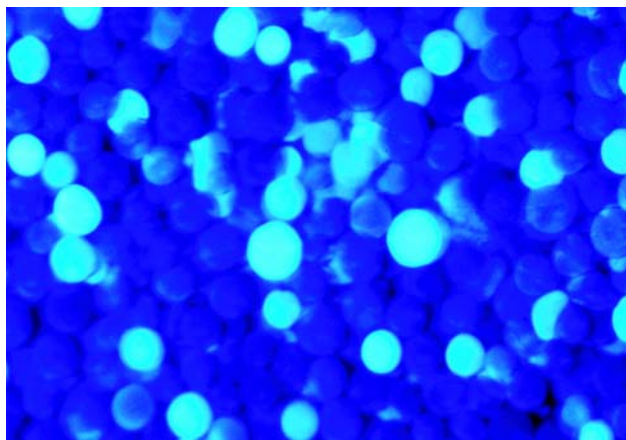
Proteolytiske enzymer er generelt involveret i vira, bakterie- og parasitinfectioner. De udgør et fordelagtigt mål ved medicinal forskning, og udvikling af specifikke enzyminhibitorer er stadig en stor udfordring i den farmaceutiske industri. For at kunne udføre enzymatiske assays på fast fase skal enzymet have fri adgang til substrat gennem hele det polymere netværk, og enzymet skal forblive aktivt. PEG-baserede resiner har vist



Figur 1. Strukturer af resiner fremstillet ved radikal-, anionisk og kationisk polymerisation.



Figur 2. Princip bag fluorescens-quenched »one-bead-one-compound« substratbibliotek. Abz er fluorescensdonor og $\text{Tyr}(\text{NO}_2)$ er acceptor. Aa_x er en vilkårlig aminosyre.



Figur 3. Substratbibliotek behandlet med enzym (trypsin) i 24 t visualiseret under UV-mikroskop. Gode substrater er bundet til fluorescerende resiner, som efterfølgende opsamles og analyseres.

sig at være ideelle polymerer og opfylder betingelserne for peptidsyntese, adskillige organiske reaktioner og enzymatiske interaktioner på fast fase.

Proteolytiske enzymer er karakteriseret ved deres nedbrydning af substrater, gennem et enzym-substratkompleks til et færdigt kløvet produkt. Anvendelse af et kombinatorisk bibliotek med potentielle substrater kan i princippet klarlægge ethvert enzyms substratspecificitet.

Med »split-and-mix«-metoden udviklet af Furk $\acute{a}$ [4] kan peptid-substratbiblioteker (også kaldet »one-bead-one-compound«-biblioteker) med stor diversitet fremstilles på kort tid. Proteolytisk kløvning af substrat bundet til resin detekteres vha. en fluorescerende gruppe (Abz) der »quences« i nærværelse af en kovalent bundet Tyr(NO₂) [5]. Ved enzymatisk kløvning af substrat frigøres Tyr(NO₂) fra resinen, hvorefter resiner med aktivt substrat vil fluorescere og identificeres ved simpel visuel udvælgelse. Fast fase kombinatoriske biblioteker af peptider har i vid udstrækning været brugt til karakterisering af proteolytiske enzymer såsom Subtilisin Carlsberg, trypsin, cysteinproteaser, matrix-metalloproteinaser m.fl. Karakterisering af et enzyms substratspecificitet er vigtig med henblik på opdagelse af nye enzyminhibitorer.

Peptido-organiske biblioteker til identifikation af enzyminhibitorer

Ved at forene det store potentiale ved kombinatorisk kemi med peptid- og organisk syntese på fast fase kan et centralt placeret inhibitorelement omgrænses af aminosyrer. Mange organiske reaktioner er blevet overført til fast fase, men kun et begrænset antal er så kvantitative, at de på kombinatorisk vis kan benyttes til biblioteker, hvor aktive komponenter analyseres ved massespektrometri eller NMR.

»One-bead-two-compounds«-biblioteket er en udvidelse af peptid-substratbiblioteker. Hver resin indeholder to forskellige komponenter, en kombinatorisk fremstillet komponent og et substrat med det førnævnte fluorescens donor-acceptor-par. Substratet er specifikt for det testede enzym og fælles for alle resiner i biblioteket. Ved enzymatisk inkubation kan to forskellige situationer i princippet opstå:

1. Bibliotekskomponenten på resinen er ikke en god inhibitor for det pågældende enzym, substratdelen kløves og resinen vil efterfølgende fluorescere.

2. Omvendt vil en god inhibitor være i stand til at binde enzymet og blokere for substratkløvning, så resinen vil forblive mørk.

Udvælgelse af de mørkeste resiner vil derfor give de bedste inhibitorer. Højopløsnings MALDI-TOF (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Time Of Flight) MS er en værdifuld metode til strukturel analyse af den fundne inhibitor vha »laddersyntese« udviklet af Youngquist *et al.* [6]. En 9:1 opløsning af Fmoc (9-fluorenylmethyloxycarbonyl)- og Boc (*tert*-butyloxycarbonyl)-aminosyrer benyttes for at gengive den syntetiske historie af hver unikke komponent på den enkelte resin, da et lille fragment fra hver kobling forbliver intakt [7]. En til flere randomiserede positioner kobles med naturlige og unaturlige aminosyrer vha. den førnævnte »split-and-mix« i en cyklisk kombinatorisk procedure.

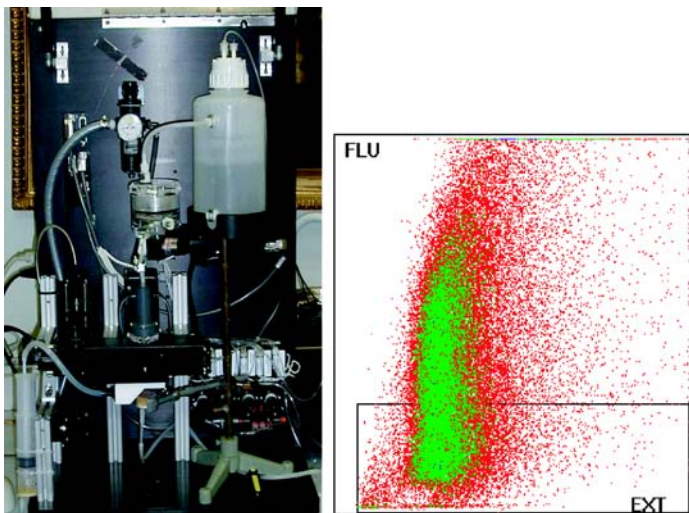


Figur 4. En 20 brønds tefloncylinder (multiple column peptide synthesizer [12] (MCPS)) udgør den praktiske foranstaltning ved fremstilling af kombinatoriske biblioteker.

Forskellige kvantitative organiske reaktioner på fast fase er blevet udviklet til direkte introduktion af inhibitorelementer. Resinbundne aldehyder er blevet benyttet som elektrofil til fremstilling af reducerede amidbindinger, i aldolkondensationer, Wittig-reaktioner og til fremstilling af heterocykliske komponenter [8,9]. Yderligere er silylenolater af ketoner blevet benyttet til Diels-Alder-reaktioner på fast fase [10]. Fælles for alle disse reaktioner er, at de indeholder en aminofunktionalitet, som kan benyttes til at fortsætte inhibatoren med en til flere randomiserede aminosyrepositioner. Alternativt kan dipeptid-lignende inhibitorelementer fremstilles i opløsning og efterfølgende indgå i en kombinatorisk procedure på fast fase. Det er eksemplificeret ved phosphin-transition-state-analogen Boc- og Fmoc-GlyΨ{PO₂(Ad)CH₂}Leu-OH til fremstilling af MMP-inhibitorer [11]. Differentiering mellem aktive og ikke aktive komponenter samt strukturel opklaring af inhibitorer er afgørende for bibliotekets succes.

Analytiske metoder til undersøgelse af biblioteker

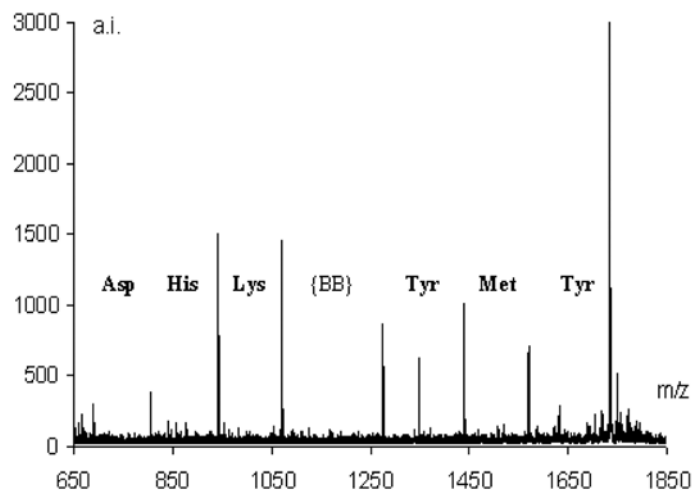
Inhibitorer findes ved inkubation med et proteolytisk enzym og efterfølgende evaluering af de enkelte resiners fluorescens under mikroskop. Manuel sortering under UV-mikroskop er meget tidskrævende (ca. 10.000 resiner/dag og der er typisk 500.000 resiner i hvert enkelt bibliotek). En resin-sorteringsmaskine, COPAS BEADS, er blevet udviklet i et samarbejde mellem SPOCC og Union Biometrica (Massachusetts, USA) og er oprindeligt baseret på sortering af transgene fluorescensmærkede organismer. Instrumentet består af et prøvekammer og en solvent-feeder, der analyserer kuglerne enkeltvis og der-



Figur 5. COPAS Beadsorter samt resultat af en sortering af ca. 50.000 resiner fra et »one-bead-two-compounds«-inhibitorbibliotek sorteret efter fluorescens som funktion af størrelse.

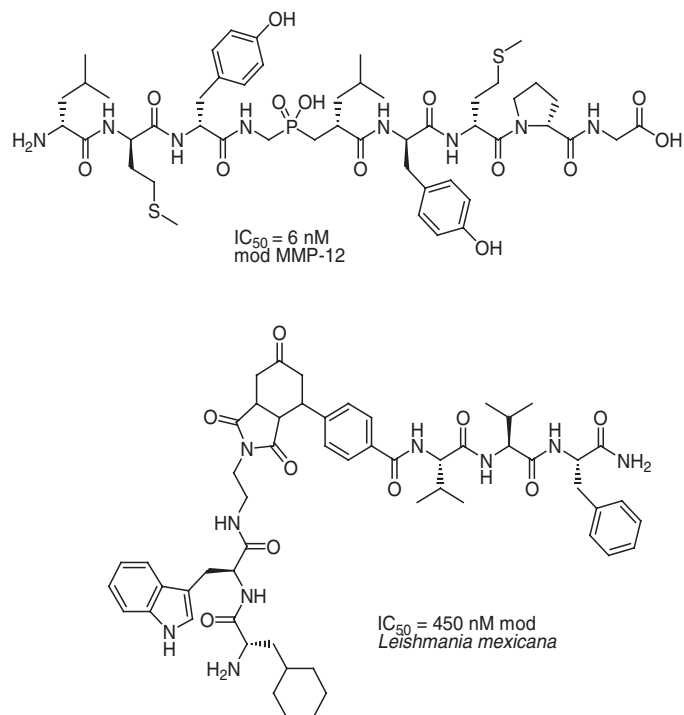
efter opsamler positive hits (op til 200.000 resiner/timen). Hver resin rammes af to uafhængige laserstråler, der analyserer størrelse, fluorescens og sorterer resinene ud fra brugerdefinerede parametre. Efterfølgende kan de ønskede resiner analyseres på forskellige måder afhængig af bibliotekets natur, det biologiske assays karakter og tiden til rådighed.

Substrater fundet i »one-bead-one-compound«-peptidbiblioteker kan identificeres ved simpel Edman-degradering, hvor hver aminosyre fjernes enkeltvis og analyseres på HPLC. En direkte sekventiel bestemmelse af aminosyrer fås på en nem og følsom måde, men den er kostbar og tidskrævende (ca. 2 sekunder/dag). NMR er en ikke-destruktiv teknik, men mindre følsom end Edman-degradering. NMR bliver til stadighed mere sensitiv og teknikker såsom Magic Angle Spinning NMR (MAS NMR) har revolutioneret fast fase NMR. Alle slags biblioteker kan undersøges, da det kun er kompleksiteten af strukturen eller spektrene, der sætter en begrænsning. Massespektrometri er en følsom, men destruktiv analysemetode, der kan analysere næsten alle former for biblioteker. Ladder-syntese giver massen af den fulde struktur og alle fragmenter på den enkelte resin, så hver struktur kan analyseres på under en ½ time. Selvom der findes adskillige eksempler på god korrelation, mellem



Figur 6. MALDI-TOF MS af inhibitor, hvor ladder-syntese giver alle terminerede fragmenter til opklaring af den fulde struktur. {BB} indikerer det centralt placerede inhibitorelement.

enzyminhibitorer i opløsning med polymerbundne inhibitorer, er det vigtigt at undersøge de fundne strukturer i opløsning og opnå kvantitative data, såsom IC_{50} -værdier og K_i -værdier, til direkte sammenligning og validering af bibliotekets kvalitet.



Figur 7. Eksempler på nanomolar inhibitorer fundet ved »one-bead-two-compounds«-biblioteker og teknikker beskrevet i teksten [13,14].

Statistisk analyse af de fundne aminosyrer/inhibitorelementer fra et bibliotek giver information om enzymet og dets binding til inhibatoren. Der kan være store præferencer for visse aminosyrer i enkelte positioner, som kan danne grundlag for design af selektive inhibitorer ud fra et statistisk grundlag.

Fremtidigt arbejde

Flere teknikker er blevet patenteret, og på baggrund af disse er biotekfirmaet Combio A/S dannet i november 2000. Det er firmaets mål at identificere nye biologiske targets og designe selektive lægemidler.

Referencer.

- Meldal, M. *Tetrahedron Lett.* 1992, 33, 3077-3080.
- Grøtli, M.; Gotfredsen, C. H.; Rademann, J.; Buchardt, J.; Clark, A. J.; Duus, J. Ø.; Meldal, M. *J. Comb. Chem.* 2000, 2, 108-119.
- Grøtli, M.; Rademann, J.; Groth, T.; Lubell, W. D.; Miranda, L. P.; Meldal, M. *J. Comb. Chem.* 2001, 3, 28-33.
- Furka, Á.; Sebestyén, F.; Asgedom, M.; Dibó, G. *Int. J. Pept. Prot. Res.* 1991, 37, 487-493.
- Meldal, M.; Svendsen, I.; Breddam, K.; Auzanneau, F. I. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1994, 91, 3314-3318.
- Youngquist, R. S.; Fuentes, G. R.; Lacey, M. P.; Keough, T. *J. Am. Chem. Soc.* 1995, 117, 3900-3906.
- St. Hilaire, P. M.; Lowary, T. L.; Meldal, M.; Bock, K. *J. Am. Chem. Soc.* 1998, 120, 13312-13320.
- Groth, T.; Meldal, M. *J. Comb. Chem.* 2001, 3, 45-63.
- Rademann, J.; Meldal, M.; Bock, K. *Chem. Eur. J.* 1999, 5, 1218-1225.
- Graven, A.; Meldal, M. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* 2001, 3198-3203.
- Buchardt, J.; Ferreras, M.; Krog-Jensen, C.; Delaissé, J.-M.; Foged, N. T.; Meldal, M. *Chem. Eur. J.* 1999, 5, 2877-2884.
- Meldal, M. *Methods: A Companion to Methods in Enzymology* 1994, 6, 417-424.
- Buchardt, J.; Schiødt, C. B.; Krog-Jensen, C.; Delaissé, J.-M.; Foged, N. T.; Meldal, M. *J. Comb. Chem.* 2000, 2, 624-638.
- Graven, A.; St. Hilaire, P. M.; Sanderson, S. J.; Mottram, J. C.; Coombs, G. H.; Meldal, M. *J. Comb. Chem.* 2001, 3, 441-452.