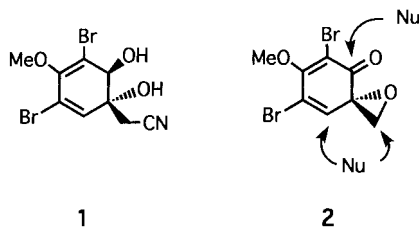


Selektive Inhibierung von Rezeptor-Tyrosin-kinasen mit Aeroplysinin-Analoga**

Herbert Waldmann,* Klaus Hinterding, Peter Herrlich,* Hans Jobst Rahmsdorf und Axel Knebel

Viele Transmembranrezeptoren, z. B. die Rezeptoren des insulinartigen Wachstumsfaktors (IGFR), des Nervenwachstumsfaktors (NGFR), des epidermalen Wachstumsfaktors (EGFR) und des Blutplättchenwachstumsfaktors (PDGFR), phosphorylieren sich nach Bindung eines extrazellulären Liganden selbst an Tyrosinresten. Diese Rezeptor-Tyrosinkinase (RTKs) lösen so intrazelluläre Signalkaskaden aus, durch die Zellwachstum und -teilung sowie andere genetische Programme gesteuert werden.^[1] Eine Fehlregulierung dieser Prozesse kann zur Etablierung vielfältiger Krankheiten beitragen. So fördert eine erhöhte Aktivität von Rezeptor-Tyrosinkinase das Tumorstadium und trägt zur Carcinogenese und zur Entwicklung proliferativer Krankheiten wie der Psoriasis bei.^[2] Diese signaltransduzierenden Proteine sind daher vielversprechende Ziele für die Wirkstoffentwicklung, und die daraus hervorgehenden Wirkstoffe können wertvolle Hilfsmittel für die Analyse von Signalwegen sein. Für die Anwendung eines RTK-Inhibitors in biologischen Studien ist eine hohe In-vitro- und In-vivo-Aktivität notwendig. Die IC_{50} -Werte der Mehrzahl der bisher entwickelten Verbindungen liegen im niedrigen μM -Bereich,^[2–6] wobei die Tyrphostine^[2a, b, 6] am häufigsten eingesetzt wurden. Kürzlich wurden jedoch effizientere Inhibitoren vorgestellt.^[5, 6] Diese Befunde lassen ausreichend Raum für weitere Verbesserungen, und die Entwicklung neuer und alternativer Typen von Inhibitoren für Rezeptor-Tyrosinkinase ist von großer Bedeutung für die medizinische und die bioorganische Chemie.

Der hochfunktionalisierte marine Naturstoff Aeroplysinin **1** ist für menschliche Brustkrebszellen cytotoxisch und inhibiert in einem In-vitro-Testsystem den Rezeptor des epidermalen Wachstumsfaktors.^[7] Seine Struktur unterscheidet sich signifikant von den Strukturen der bisher entwickelten RTK-Inhibitoren, die nahezu ausschließlich aromatische Verbindungen sind. **1** könnte daher eine vielversprechende Leitstruktur für die Ent-



wicklung einer neuen Klasse dieser Wirkstoffe sein. Substanzen, die ähnlich wie **1** aufgebaut sind, wurden bisher jedoch noch nicht untersucht, und Daten zur In-vivo-Effizienz von **1** stehen nicht zur Verfügung. Um diese Lücke zu schließen, haben wir geprüft, ob **1** den EGFR in einem Ganzzellsystem (siehe unten) inhibiert.^[8] Der Naturstoff erwies sich dabei aber als inaktiv.

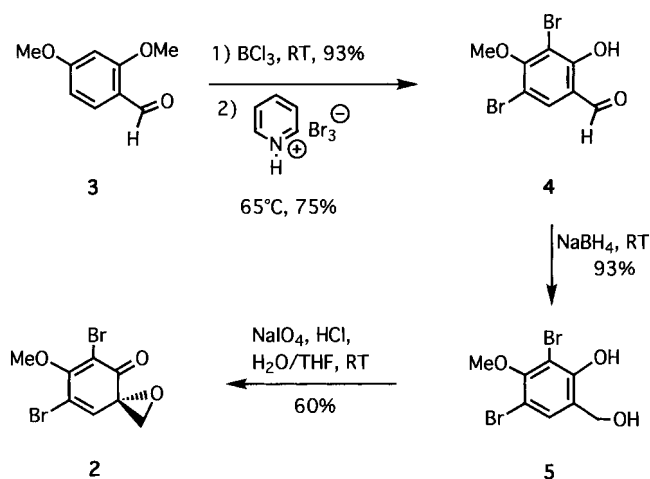
[*] Prof. Dr. H. Waldmann, Dipl.-Chem. K. Hinterding
Institut für Organische Chemie der Universität
Richard-Willstätter-Allee 2, D-76128 Karlsruhe
Telefax: Int. + 721/608-4825
E-mail: waldmann@ochhades.chemie.uni-karlsruhe.de

Prof. Dr. P. Herrlich, Prof. Dr. H. J. Rahmsdorf, Dipl.-Biol. A. Knebel
Institut für Genetik, Forschungszentrum Karlsruhe GmbH
D-76344 Eggenstein-Leopoldshafen
Telefax: Int. + 721/825-070
E-mail: genetic@igen.fzk.de

[**] Diese Arbeit wurde von der Deutschen Forschungsgemeinschaft und dem Fonds der Chemischen Industrie gefördert.

Das Ausbleiben der Inhibierung unter In-vivo-Bedingungen ist höchstwahrscheinlich darauf zurückzuführen, daß **1** wegen seiner polaren *trans*-Diolenheit nicht die Plasmamembran durchdringen kann (die Kinase-Domäne der RTKs befindet sich auf der cytosolischen Seite der Membran). Wir haben daher das Aeroplysinin-Analogon **2** als möglichen RTK-Inhibitor entworfen, da für dieses eine höhere Membranpermeabilität und eine erhöhte Inhibitorwirkung erwartet werden konnte. In **2** wurden die Strukturelemente vicinales Diol und β -Hydroxycyanid von **1** durch das Strukturelement α -Spiroepoxyketon ersetzt. **2** sollte daher einerseits deutlich lipophiler als **1** sein, und andererseits sollte es leicht am Epoxid und/oder am vinylogenen Keton nucleophil angreifbar sein und so den Rezeptor effizient durch kovalente Modifizierung von Nucleophilen in der Bindungstasche inaktivieren.

Das spirocyclische Epoxyketon **2** wurde in einer vierstufigen Sequenz aus dem leicht zugänglichen Aldehyd **3**^[9] aufgebaut (Schema 1). Hierfür wurde in **3** regioselektiv die zur Aldehyd-



Schema 1. Synthese des spirocyclischen Aeroplysinin-Analogons **2**.

funktion *ortho*-ständige Methyletherfunktion mit BCl_3 gespalten, und das entstandene Phenol mit dem Pyridiniumhydrobromid/Brom-Komplex^[10] in die Dibromverbindung **4** überführt. Die Reduktion der Aldehydfunktion in **4** lieferte den Benzylalkohol **5**, der durch eine Becker-Adler-Oxidation^[11] zum gewünschten **2** oxidiert wurde.

Um zu prüfen, ob **2** RTKs inhibiert, wurde zunächst die Inhibierung der Tyrosinkinase des Rezeptors des epidermalen Wachstumsfaktors untersucht. Im verwendeten Assay-System wurden immortalisierte rat-1-HER-Zellen^[12] (Ratten-Fibroblasten, die den menschlichen EGF-Rezeptor überexprimieren) fünf Minuten mit unterschiedlichen Konzentrationen des Inhibitors behandelt, und anschließend wurde der epidermale Wachstumsfaktor zugegeben, um die Phosphorylierung von nichtblockiertem Rezeptor zu induzieren. Die Zellen wurden nachfolgend lysiert, die Proteine durch Elektrophorese getrennt, und das Ausmaß der Phosphorylierung des EGFR an seinen Tyrosinresten wurde durch Phosphotyrosin-Immunoblotting bestimmt (Abb. 1).^[13]

Die Ergebnisse waren sehr vielversprechend: **2** inhibierte die Kinase-Aktivität des EGF-Rezeptors mit einem IC_{50} -Wert von $10 \mu M$ (siehe Tabelle 1). Dieser Effekt wurde bereits durch wenige Minuten Vorinkubieren der Zellen erzielt, während unter den Bedingungen unseres Assay-Systems für ein Inhibieren der RTK mit Tyrphostinen mehrere Stunden vorinkubiert werden mußte. Diese Befunde belegen, daß **2** ausreichend lipophil ist und über eine substantielle In-vivo-Aktivität verfügt. Um zu

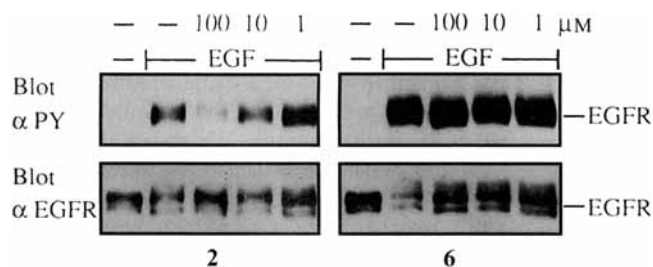


Abb 1. Bestimmung des IC_{50} -Wertes der Inhibierung des EGF-Rezeptors durch Immunoblot gegen Phosphotyrosin (α PY) und gegen EGFR (α EGFR), um zu bestätigen, daß gleiche Mengen Protein aufgetragen wurden. Die Resultate belegen, daß das Aeropylsinin-Analogon **2**, nicht aber Isoaeropylsinin **6** die EGF-induzierte tyrosinspezifische Autophosphorylierung des EGF-Rezeptors in rat-1-HER-Zellen inhibiert (repräsentatives Beispiel). Die Zahlen 100, 10 und 1 μ M in der ersten Zeile geben die Konzentration des Inhibitors bei der jeweiligen Inkubierung an (siehe Text).

prüfen, ob **2** Rezeptorsubtypen-Spezifität zeigt, wurde in ersten Experimenten die Inhibierung des Rezeptors des Blutplättchenwachstumsfaktors durch Behandeln von NIH-3T3- β -PDGFR-Zellen^[14] unter den vorstehend beschriebenen Assay-Bedingungen untersucht. **2** inhibierte diesen Rezeptor bis zu einer Konzentration von 100 μ M überhaupt nicht, was auf eine ausgeprägte Subtypenselektivität hindeutet.

Um festzustellen, welche strukturellen Eigenschaften von **2** für seine Aktivität bei der RTK-Inhibierung wesentlich sind, wurden mehrere Analoga synthetisiert und im oben beschriebenen In-vivo-Assay-System als mögliche Inhibitoren des EGF- und des PDGF-Rezeptors untersucht. Tabelle 1 ist zu entnehmen,

Tabelle 1. Inhibierung der EGF- und PDGF-Rezeptor-Tyrosinkinasen durch Aeropylsinin-Analoga in einem In-vivo-Assay-System (für die Beschreibung des Assay siehe Text)[a].

Nr.	Verbindung	Inhibierung des EGF-Rezeptors IC_{50} [μ M]	Inhibierung des PDGF-Rezeptors IC_{50} [μ M]
1		inaktiv	inaktiv
2		inaktiv	inaktiv
3		10	inaktiv
4		55	inaktiv
5		inaktiv	inaktiv
6		35	inaktiv
7		120	30
8		inaktiv	inaktiv
9		inaktiv	inaktiv

[a] IC_{50} = Konzentration, bei der 50% der Autophosphorylierungsaktivität inhibiert sind; „inaktiv“ = keine Inhibierung bei einer Inhibitor-Konzentration < 100 mM.

men, daß weder Aeropylsinin **1**, noch sein Isomer **6**^[7b] in Konzentrationen bis zu 100 μ M in vivo die EGF- oder die PDGF-RTK inhibiert. Auch das Analogon **7**, in dem gegenüber **2** der Epoxidring geöffnet, der resultierende tertiäre Alkohol aber als Ester maskiert ist, inhibiert den EGF-Rezeptor, obwohl es weniger wirksam als **2** ist. Die Kinase-Aktivität des PDGF-Rezeptors wird von allen bisher genannten Verbindungen überhaupt nicht blockiert. Erhöhung der Polarität durch Spaltung des Acetats ergab eine Verbindung (**8**), die unter den Assay-Bedingungen nicht aktiv war, wahrscheinlich weil sie während der Dauer des Assay die Plasmamembran nicht in ausreichendem Maß passieren konnte. Interessanterweise inhibierten auch die aromatischen Aldehyde **9** (der keine Methoxygruppe enthält) und **4** den EGFR (Nr. 6 bzw. 7), allerdings weniger effizient als **2**. Weiterhin inhibierte **9** (aber nicht der Methoxyaldehyd **4**) den PDGFR mit einem IC_{50} -Wert von 30 μ M. Dagegen sind weder der Aldehyd **3** (Nr. 8), noch der Alkohol **5** (Nr. 9) Inhibitoren. Zusammengenommen legen diese Befunde den Schluß nahe, daß für die Aktivität als Inhibitor die Bromatome – möglicherweise um die Lipophilie zu gewährleisten – und eine elektrophile Gruppe vorhanden sein müssen. Die Art der elektrophilen Gruppe kann dabei variieren.

Zusammenfassend haben wir gezeigt, daß α -substituierte Cyclohexadienone wie **2** und **7** und strukturell verwandte Verbindungen Rezeptor-Tyrosinkinasen inhibieren. Sie zeigen eine ausgeprägte In-vivo-Aktivität und eine begrüßenswerte Rezeptorsubtypen-Spezifität. Analoga des Naturstoffs Aeropylsinin **1** sind daher interessante Leitstrukturen für die Entwicklung neuer Wirkstoffe und Werkzeuge für die bioorganische und die medizinische Chemie, z. B. für die Analyse von Signaltransduktionskaskaden und die Einführung neuer Tyrosinkinase-Inhibitoren in die medizinische Anwendung.

Eingegangen am 8. Januar 1997 [Z 9975]

Stichworte: Aeropylsinin • Bioorganische Chemie • Enzyminhibitoren • Kinasen • Tyrosinkinasen

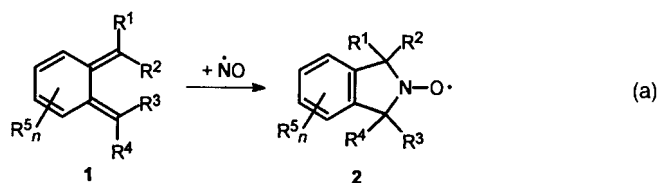
- [1] a) *Protein Phosphorylation* (Hrsg.: F. Marks), VCH, Weinheim, 1996; b) *Protein Kinases* (Hrsg.: J. R. Woodgett), Oxford University Press, Oxford, 1994; c) G. F. Cooper, *Oncogenes*, 2. Aufl., Jones and Bartlett, Boston, 1995.
- [2] a) A. Levitzki, A. Gazit, *Science* **1995**, 267, 1782; b) *Eur. J. Biochem.* **1994**, 226, 1; c) A. J. Bridges, *Chemtracts Org. Chem.* **1995**, 8, 73; d) D. W. Fry, *Annu. Rep. Med. Chem.* **1996**, 31, 151.
- [3] Für die Anwendung von Tyrosinkinase-Inhibitoren siehe z. B. Lit. [2, 4a, 6] und: a) H. Daub, F. U. Weiss, C. Wallasch, A. Ullrich, *Nature* **1996**, 379, 557; b) A. Novogrodsky, A. Vanichin, M. Patya, A. Gazit, N. Osherov, A. Levitzki, *Science* **1994**, 264, 1319; c) N. Meydan, T. Grünberger, H. Dadi, M. Shahar, E. Arpaia, Z. Lapidot, J. S. Leeder, M. Freedman, A. Cohen, A. Gazit, A. Levitzki, C. M. Raiffman, *Nature* **1996**, 379, 645; d) D. T. Dudley, L. Pong, S. J. Decker, A. J. Bridges, A. R. Saltiel, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1995**, 92, 7686; e) R. A. Lepley, F. A. Kirkpatrick, *Arch. Biochem. Biophys.* **1996**, 331, 141.
- [4] Für neue Arbeiten zu Tyrosinkinase-Inhibitoren siehe z. B. a) E. Buchdunger, J. Zimmermann, H. Mett, T. Meyer, M. Müller, U. Regenass, N. B. Lydon, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1995**, 92, 2558; b) J. Zimmermann, E. Buchdunger, H. Mett, T. Meyer, N. B. Lydon, P. Traxler, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1996**, 6, 1221; c) J. Kobayashi, T. Madono, H. Shigemomi, *Tetrahedron* **1995**, 51, 10867; d) K. Alvi, M. C. Diaz, P. Crews, D. L. Slate, R. H. Lee, R. Moretti, *J. Org. Chem.* **1992**, 57, 6604, sowie in Lit. [5] zitierte Arbeiten.
- [5] a) G. W. Rewcastle, B. D. Palmer, A. M. Thompson, A. J. Bridges, D. R. Cody, H. Zhou, D. W. Frey, A. McMichael, W. A. Denny, *J. Med. Chem.* **1996**, 39, 1823; b) W. Frey, A. J. Kratoch, A. McMichael, L. A. Ambrosio, J. M. Nelson, W. R. Leopold, R. W. Connors, A. J. Bridges, *Science* **1994**, 265, 1093; c) A. P. Spada, M. R. Myers, *Exp. Opin. Ther. Pat.* **1995**, 5, 805; d) A. J. Bridges, H. Zhou, D. R. Cody, G. W. Rewcastle, A. McMichael, H. D. H. Showalter, D. W. Fry, A. J. Kratoch, W. A. Denny, *J. Med. Chem.* **1996**, 39, 267; e) P. Traxler, N. Lydon, *Drugs Fut.* **1995**, 20, 1261.
- [6] Übersicht: A. Levitzki, *FASEB J.* **1992**, 6, 3275.
- [7] a) Bestimmung der biologischen Aktivität von Aeropylsinin **1**: M.-H. Kreuter, R. E. Leake, F. Rinaldi, W. Müller-Klieser, A. Maidhof, W. E. G. Müller, H. C. Schröder, *Comp. Biochem. Physiol.* **1990**, 97A, 151; b) Synthese von **1** und Isoaeropylsinin **6**: R. J. Andersen, D. J. Faulkner, *J. Am. Chem. Soc.* **1975**, 97, 936.

- [8] (+)-Aeroplysinin wurde freundlicherweise von Prof. Proksch, Lehrstuhl für Pharmazeutische Biologie, Universität Würzburg, zur Verfügung gestellt.
- [9] 3 kann im Chemikalienhandel bezogen werden.
- [10] L. F. Fieser, M. Fieser, *Reagents for Organic Synthesis*, Vol. 1, Wiley, New York, 1967, S. 967.
- [11] H.-D. Becker, T. Bremholt, E. Adler, *Tetrahedron Lett.* **1972**, 13, 4205. Für neuere Anwendungen der Becker-Adler-Oxidation in der Naturstoffsynthese siehe: E. J. Corey, J. P. Dittami, *J. Am. Chem. Soc.* **1985**, 107, 256; S. Danishefsky, M. D. Shair, *J. Org. Chem.* **1996**, 61, 16.
- [12] W. J. Wasilenko, D. M. Payne, D. L. Fitzgerald, M. J. Weber, *Mol. Cell Biol.* **1991**, 11, 309.
- [13] A. Knebel, H. J. Rahmsdorf, A. Ullrich, P. Herrlich, *EMBO J.* **1996**, 15, 5314.
- [14] Die NIH-3T3- β -PDGFR-Zellen wurden freundlicherweise von Prof. Dr. A. Ullrich, Max-Planck-Institut für Biochemie, Martinsried, zur Verfügung gestellt.

Eine neuartige Methode zum Nachweis von Stickstoffmonoxid (NO) durch Bildung fluoreszierender Produkte auf der Basis cheletroper Spinfänger

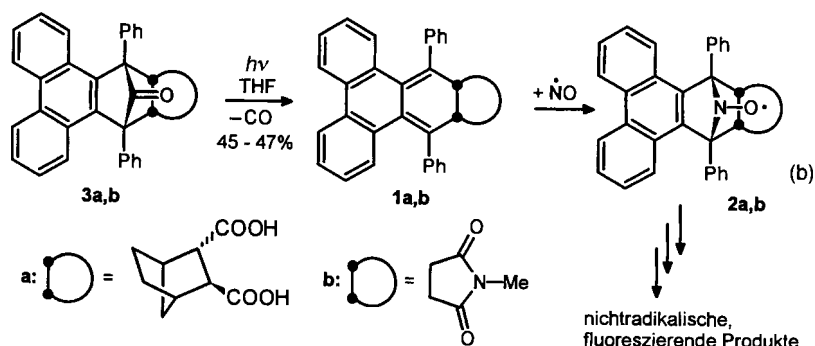
Michael Bätz, Hans-Gert Korth* und Reiner Sustmann*

Stickstoffmonoxid ist ein wichtiges intra- und interzelluläres Signalmolekül im lebenden Organismus.^[1] Wir haben in den letzten Jahren spezifische Nachweismethoden für Stickstoffmonoxid auf der Basis „NOCTs“ (Nitric Oxide Cheletropic Traps; 1) entwickelt, die NO im Sinne einer formal cheletropen Reaktion in cyclische Nitroxid-Radikale 2 überführen [Gl. (a)], die ESR-spektroskopisch beobachtet werden können.^[2]



Diese Methode ist erfolgreich bei Untersuchungen zur Cytotoxizität von NO^[3] und bei anderen Fragestellungen zur Chemie von NO^[2b] eingesetzt worden. Bei der Verwendung von Nitroxid-Radikalen in biologischen Systemen besteht jedoch ein genereller Nachteil in der signifikant verkürzten Lebensdauer dieser Radikale aufgrund ihres leichten reduktiven Abbaus zu Hydroxylamin-Derivaten.^[4] Wir berichten hier nun über eine neue, auf dem NOCT-Konzept basierende Methode, die den Einsatz der Fluoreszenz-Spektroskopie als empfindlicher Sonde für die Erfassung abgefangenen Stickstoffmonoxids erlaubt. Wir machen uns dabei zunutze, daß aromatische π -Elektronensysteme, die bei Einsatz geeigneter NOCTs durch die Reaktion mit NO gebildet werden [Gl. (a)] Fluoreszenzeigenschaften haben. Hierdurch läßt sich einerseits die Nachweisempfindlichkeit gegenüber der ESR-Spektroskopie erhöhen und andererseits die begrenzte Lebensdauer der primär gebildeten Nitroxid-Radikale in vorteilhafter Weise nutzen.^[5] In Analogie zu unserer bisherigen Synthesestrategie haben wir die stabilen cyclischen α -Chinodimethan-Derivate 1 als Prototypen für FNOCTs (Fluorescence Nitric Oxide Cheletropic Traps) hergestellt^[6] [Gl. (b)].

[*] Dr. H.-G. Korth, Prof. R. Sustmann, Dr. M. Bätz
Institut für Organische Chemie der Universität
Universitätsstraße 5, D-45117 Essen
Telefax: Int. + 201/183-3096
E-mail: sustmann@oc1.orgchem.uni-essen.de
hgk@oc1.orgchem.uni-essen.de



Phencyclon^[7] reagiert mit Norbornen-2,3-(*E*)-dicarbonsäure oder *N*-Methyl-maleinimid zu den überbrückten Ketonen 3a (84%; Schmp. 282 °C) bzw. 3b (50%; Schmp. 297–298 °C).^[8] Die Verbindungen 3a und 3b lassen sich durch 300-nm-Photolyse in 47% bzw. 45% isolierter Ausbeute zu 1a bzw. 1b umsetzen.^[8] Die α -Chinodimethan-Derivate 1a, 1b sind bei Raumtemperatur in Gegenwart von Sauerstoff stabil und gehen nicht die für α -Chinodimethane charakteristischen Reaktionen (1,5-H-Verschiebung, [4+2]-Cycloaddition, Cyclisierung zu Benzocyclobutenen)^[2a, b] ein. Die beiden Carboxygruppen gewährleisten für 1a eine hinreichende Löslichkeit in Puffern bei physiologischen pH-Werten.

Die UV/Vis-Spektren von 1a (Abb. 1, Kurve a) und 1b sind jeweils durch eine breite, für α -Chinodimethan-Derivate cha-

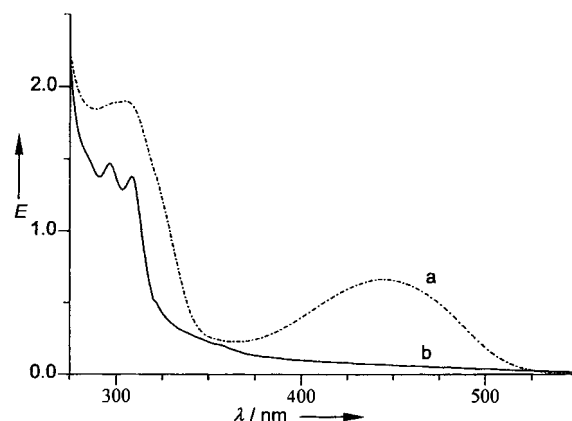


Abb. 1. a) UV/Vis-Spektrum von 1a (10^{-4} M) in Phosphat-Puffer pH 7.4. b) Spektrum von a) nach Zugabe von NO (Endkonzentration 5×10^{-4} M).

rakteristische Bande bei $\lambda_{\max}(\epsilon) = 450$ nm (8 300) (in Phosphat-Puffer pH 7.4) bzw. $\lambda_{\max}(\epsilon) = 384$ nm (8 700) (in THF) gekennzeichnet.

Unmittelbar nach Zugabe einer Stickstoffmonoxid-Lösung im gleichen Lösungsmittel läßt sich diese Bande bei NO in leichtem Überschuß nicht mehr nachweisen (Abb. 1, Kurve b). Statt dessen geben sich die erwarteten Nitroxid-Radikale 2a (Abb. 2) und 2b durch ihre ESR-Spektren zu erkennen. Anhand der ESR-Aufspaltungsparameter^[9] lassen sich den Nitroxid-Radikalen die in Schema 1 gezeigten Strukturen zuordnen.

Die Radikale 2a und 2b sind nicht sehr persistent und zerfallen zu nichtradikalischen Produkten. Die zeitliche Verfolgung der Intensitätsabnahme der ESR-Signale bei 20 °C ergibt für 2a eine Halbwertszeit von ca. 40 min in Puffer pH 7.4, 2b weist in THF eine ca. fünffach höhere Lebensdauer auf.