

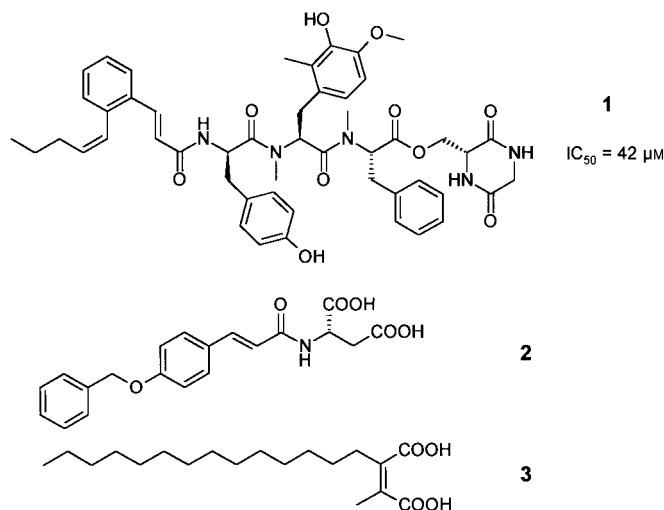
- [11] a) C. A. Ghilardi, S. Midollini, L. Saccini, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1981**, 47; b) D. Fenske, J. Ohmer, J. Hachgenei, *Angew. Chem.* **1985**, 97, 993; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1985**, 24, 993; c) M. Hong, Z. Huang, H. Liu, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1990**, 1210.
 [12] V. E. Fedorov, M. R. J. Elsegood, S. S. Yarvovoi, Y. V. Mironov, *Chem. Commun.* **1998**, 1861–1862.
 [13] A. C. T. North, D. C. Phillips, F. S. Mathews, *Acta Crystallogr. Sect. A* **1968**, 24, 351–359.
 [14] G. M. Sheldrick, *Acta Crystallogr. Sect. A* **1990**, 46, 467–473.
 [15] G. M. Sheldrick, *SHELXL97*, Universität Göttingen, **1997**.

Design, Synthese und Prüfung modular aufgebauter disubstratanaloger Hemmstoffe der Farnesyltransferase**

Martin Schlitzer* und Isabel Sattler

Die an der Innenseite von Zellmembranen lokalisierten Ras-Proteine spielen eine entscheidende Rolle bei der intrazellulären Weiterleitung von Signalen, die Zellwachstum und -differenzierung steuern. Punktmutationen im *ras*-Gen führen dazu, daß die zugehörigen Ras-Proteine ihre Fähigkeit, aus dem aktiven in den inaktiven Zustand zurückzukehren, verlieren, d. h., sie leiten kontinuierlich Wachstums-signale in den Zellkern. Bei ca. 30 % aller Tumore findet man solche mutierten Ras-Proteine, wobei die Inzidenz bei einzelnen Tumorarten bis 90 % betragen kann.^[1] Um die Membranlokalisation der Ras-Proteine zu gewährleisten, ist eine posttranslatorische Modifikation obligatorisch. Erster und für die Funktionsfähigkeit normaler wie auch durch Mutation veränderter Ras-Proteine entscheidender Schritt ist die Übertragung eines Farnesylrestes von Farnesylpyrophosphat (FPP) auf die SH-Gruppe einer Cysteinseitenkette durch das Enzym Farnesyltransferase (FTase). Dieser Cysteinrest ist Teil der CAAX-Sequenz (C: Cystein, A: aliphatische Aminosäure, X: Methionin oder Serin), die den C-Terminus der Ras-Proteine bildet und von der FTase erkannt und gebunden wird.^[1] Als strukturelles Vorbild für Hemmstoffe der FTase diente neben dem FPP vor allen das CAAX-Tetrapeptid. Eine weitere Klasse von FTase-Inhibitoren sind die Disubstratanaloga, denen sowohl das Peptidsubstrat als auch der Farnesylrest als strukturelles Vorbild dienen.^[1a, 2] Sie sind von besonderem Interesse, weil ihnen die freie SH-Gruppe, die bei fast allen CAAX-Peptidmimetika vorkommt, fehlt.^[3] Eine freie SH-Gruppe ist nicht nur wegen ihrer chemischen Labilität ungünstig, sondern auch als Auslöser ernster Nebenwirkun-

gen, z. B. beim Antihypertensivum Captopril, erkannt.^[4] Darüber hinaus zeigen neuere enzymkinetische Untersuchungen, daß die FTase ihr Reaktionsprodukt, das farnesylierte Ras-Protein, ungewöhnlich fest bindet und erst nach der Bindung eines neuen FPP-Moleküls freisetzt.^[5] Disubstratanaloga, die als Produktanaloga anzusehen sind, sollten demnach gute FTase-Inhibitoren sein.^[5] Solche Disubstratanaloga sind bisher sehr wenig bearbeitet worden. Kürzlich wurde der Naturstoff Pepticinnamin **1** (Schema 1) von Waldmann et al. in einer vielstufigen Reaktionssequenz synthetisiert und als strukturelles Vorbild für modulare disubstratanaloge Hemmstoffe der FTase beschrieben.^[6]



Schema 1. Pepticinnamin E **1** und die nichtprenylischen, FPP-analogen FTase-Hemmer **2** und **3**.

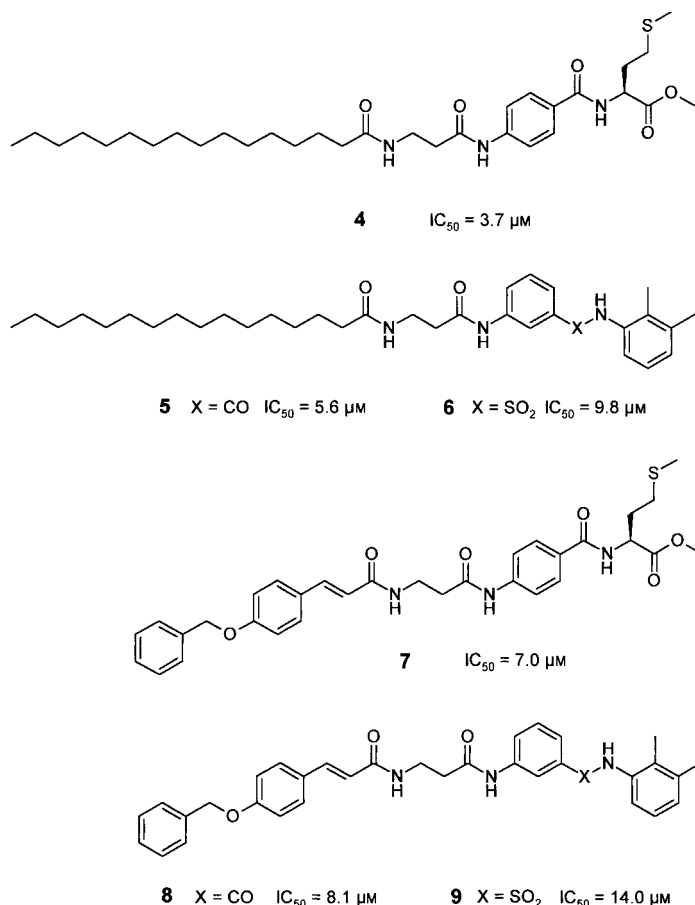
Wir stellen hier eine unabhängig von diesem Vorbild entwickelte Klasse von synthetischen, modular zusammengesetzten Disubstratanaloga vor. Ausgehend von der Struktur der natürlichen Enzymsubstrate (FPP und CAAX-Tetrapeptid) war das Ziel, einen disubstratanalogen Hemmstoff zu entwickeln, bei dem der Peptidteil durch ein Peptidmimetikum und der Farnesylrest durch einen lipophilen, aber nicht mehr prenylischen Molekülteil ersetzt ist. Mit Hilfe einer Reihe von *N*-Acylasparginsäuren, z. B. **2** (Schema 1), als FPP-analogen FTase-Inhibitoren haben wir den Benzyloxycinnamoylrest als ein geeignetes Farnesylmimetikum identifiziert.^[7] Der ebenfalls FPP-analoge Naturstoff Chaetomellinsäure **3**^[8] (Schema 1) läßt darauf schließen, daß auch langkettige Alkylreste anstelle des Farnesylrestes Verwendung finden können. Daher haben wir Palmitin- und 4-Benzyloxyzimtsäure über β -Alanin als Verbindungselement (Linker) mit der AAM- und AA-mimetischen Partialstruktur bekannter^[9] oder eigener^[10] CAAX-analoger FTase-Inhibitoren zu den neuartigen Disubstratanaloga **4–9** verknüpft (Schema 2). β -Alanin wurde als Linker gewählt, weil in diesem Molekül der Abstand zwischen dem Stickstoff- und dem Carbonylkohlenstoffatom dem zwischen dem SH-Schwefelatom und C-1 in Cystein entspricht.

Zur Synthese der Zielverbindungen **4–9** (Schema 3) wurde Methioninmethylester **10** mit 4-Nitrobenzoylchlorid sowie

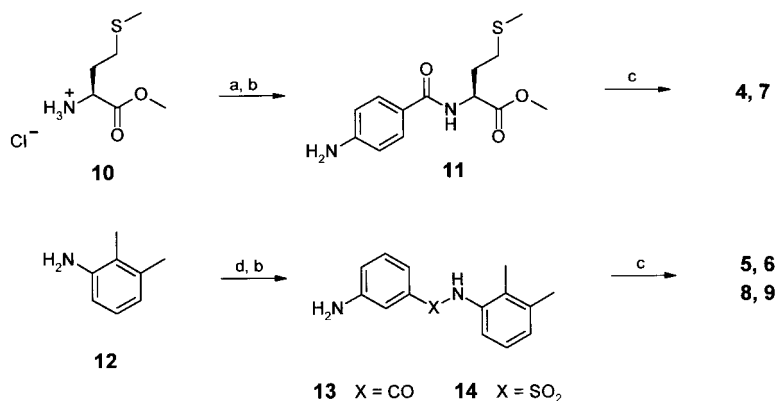
[*] Dr. M. Schlitzer
 Institut für Pharmazeutische Chemie der Universität
 Marbacher Weg 6, D-35032 Marburg
 Fax: (+49) 6421-28-7052
 E-mail: schlitze@mail.uni-marburg.de

Dr. I. Sattler
 Hans-Knöll-Institut für Naturstoff-Forschung e.V., Jena

[**] Wir danken Prof. Tamanai (UCLA) für die pGEX-DPR1- und pBCRAM2-Plasmide sowie Prof. Dr. W. Hanefeld (Marburg), Prof. Dr. S. Grabley und Dr. R. Thiericke (Jena) für großzügige Unterstützung.



Schema 2. Die modular aufgebauten, nichtprenylischen, nichtpeptidischen disubstrat/produktanalogen FTase-Hemmer 4–9.



Schema 3. Synthese von 4–9. a) 4-Nitrobenzoylchlorid, CH_2Cl_2 , *N*-Methylmorpholin (NMM), 12 h, $0^\circ C$, 90%; b) $SnCl_4 \cdot 2H_2O$, EtOAc, 2 h, Rückfluß, 11 88%, 13 81%, 14 80%; c) *N*-Palmitoyl- oder *N*-(4-Benzoyloxycinnamoyl)- β -alanin, *i*BuOCOCl, NMM, Dimethylformamid (DMF), $-15^\circ C \rightarrow RT$, 16 h, 4 78%, 5 82%, 6 68%, 7 53%, 8 77%, 9 13%; d) 3-Nitrobenzoylchlorid oder 3-Nitrobenzolsulfonylchlorid, CH_2Cl_2 , NMM, 12 h, $0^\circ C$, 86% bzw. 95%.

2,3-Dimethylanilin 12 mit 3-Nitrobenzoylchlorid oder 3-Nitrobenzolsulfonylchlorid umgesetzt. Anschließend wurde die Nitrogruppe der Amide mit Zinn(II)-chlorid zur Aminogruppe reduziert.^[11] Die Zwischenprodukte 11, 13 bzw. 14 wurden mit *N*-Acyl- β -alaninen, die aus β -Alanin und den entsprechenden Carbonsäurechloriden in wäßrig-alkalischer Lösung^[12] erhalten worden waren, zu den Zielverbindungen 4–9 verknüpft.

Die inhibitorische Potenz von 4–9 wurde mit dem gleichen Fluoreszenztest ermittelt, der auch von Waldmann et al.^[6] zur Bestimmung der Aktivität von 1 verwendet wurde. Hierbei wird die Geschwindigkeit der FTase-Reaktion in Abhängigkeit von der Konzentration der Testverbindung anhand der mit der Farnesylierung eines Dansyl-markierten Pentapeptids (Ds-GlyCysValIleSer) einhergehenden Zunahme der Fluoreszenzemission bei 505 nm gemessen.^[13] Rekombinante FTase aus *Saccharomyces cerevisiae* wurde in bekannter Weise^[14] in *E. coli* exprimiert und mit Hilfe des anklonierten Glutathion-S-Transferase-Ankers isoliert.

Wie die in Schema 2 angegebenen IC_{50} -Werte zeigen, hemmen die neuartigen Disubstrat/Produktanaloge die FTase bei geringeren Konzentrationen als der Naturstoff Peptidcinnamin E 1 (Schema 1). Ein besonderer Vorteil der Disubstratanaloga 4–9 ist neben dem Fehlen empfindlicher prenylischer oder peptidischer Strukturelemente ihr modularer Aufbau. Die drei Bausteine – AA(X)-Mimetikum, Verbindungselement und Farnesylmimetikum – sind synthetisch leicht zugänglich und gut zu verknüpfen. Dies ermöglicht die rasche Synthese von Strukturvarianten mit vorteilhafteren pharmakologischen Eigenschaften sowie die Bereitstellung von maßgeschneiderten „chemischen“ Werkzeugen, um zur weiteren Klärung der Zusammenhänge im Ras-Signaltransduktionsweg beizutragen.^[6, 15]

Eingegangen am 2. Februar 1999 [Z 12984]

International Edition: *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, 38, 2032–2034

Stichwörter: Enzyminhibitoren • Farnesyltransferase • Peptidmimetika • Signaltransduktion • Tumorthherapie

- [1] a) D. M. Leonhard, *J. Med. Chem.* **1997**, 40, 2971–2990; b) J. B. Gibbs, A. Oliff, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **1997**, 37, 143–166; c) K. Hinterding, D. Alonso-Diaz, H. Waldmann, *Angew. Chem.* **1998**, 110, 716–780; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, 37, 688–749.
- [2] S. L. Graham, *Exp. Opin. Ther. Patents* **1995**, 5, 1269–1285.
- [3] R. L. Rawls, *Chem. Eng. News* **1998**, 76 (16), 67–69.
- [4] U. Förstermann in *Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie*, 7. Aufl. (Hrsg.: W. Forth, D. Henschler, W. Rummel, K. Starke), Spektrum, Heidelberg, **1996**, S. 412.
- [5] W. R. Tschantz, E. S. Furfine, P. J. Casey, *J. Biol. Chem.* **1997**, 272, 9989–9993.
- [6] K. Hinterding, P. Hagenbuch, J. Retey, H. Waldmann, *Angew. Chem.* **1998**, 110, 1298–1301; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, 37, 1143–1146.
- [7] M. Schlitzer, I. Sattler, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, eingereicht.
- [8] J. B. Gibbs, D. L. Pompliano, S. D. Moser, E. Rands, R. B. Lingham, S. B. Singh, E. M. Scolnick, N. E. Kohl, A. Oliff, *J. Biol. Chem.* **1993**, 268, 7617–7620.
- [9] a) Y. Qian, M. A. Blaskovich, M. Saleem, C. M. Seong, S. P. Wathen, A. D. Hamilton, S. M. Sebt, *J. Biol. Chem.* **1994**, 269, 12410–12413; b) T. M. Ciccarone, T. M. Williams, C. J. Dinsmore, G. E. Stokker, J. S. Wai (Merck&Co., Inc.), WO-A 96/30014, **1996** [*Chem. Abstr.* **1996**, 125, 328305g].
- [10] M. Schlitzer, I. Sattler, H.-M. Dahse, *Arch. Pharm. Med. Chem.*, im Druck.
- [11] F. D. Bellamy, K. Qu, *Tetrahedron Lett.* **1984**, 25, 839–841.
- [12] M. Uchida, F. Tabusa, M. Komatsu, S. Morita, T. Kanbe, K. Nakagawa, *Chem. Pharm. Bull.* **1985**, 33, 3775–3786.

- [13] D. L. Pompliano, R. P. Gomez, N. J. Anthony, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 7945–7946.
 [14] K. Del Villar, H. Mitsuzawa, W. Yang, I. Sattler, F. Tamanoi, *J. Biol. Chem.* **1997**, *272*, 680–687.
 [15] A. D. Cox, C. J. Der, *Biochim. Biophys. Acta* **1997**, *1333*, F51–F71.

Synthese des ersten Biokonjugats aus einem chelatisierenden Bisphosphan und einem Peptid ausgehend von einem neuartigen funktionalisierten Phosphor(III)-hydrid-Synthon**

Hariprasad Gali, Srinivasa R. Karra,
V. Sreenivasa Reddy und Kattesh V. Katti*

Professor S. S. Krishnamurthy zum 60. Geburtstag gewidmet

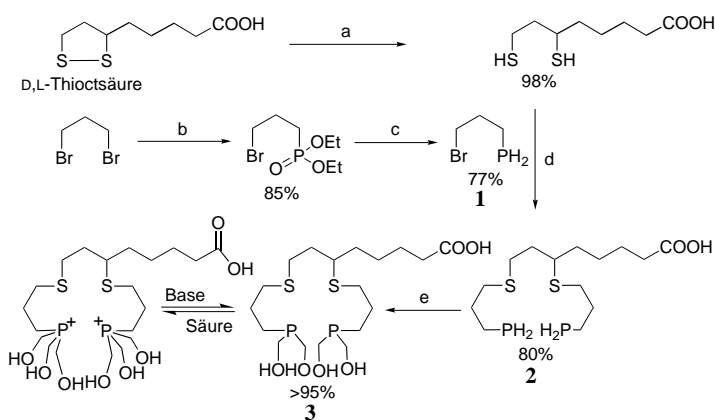
Der Einbau von Metall-chelatisierenden Einheiten in Peptidrückgrate (und in verwandte Biomoleküle) ist ein Forschungsgebiet, das wegen seiner möglichen Anwendungen bei der Katalyse^[1] und in der Biomedizin^[2] großes Interesse findet. Unter den verschiedenen zur Verfügung stehenden Liganden sind die Phosphane besonders geeignet, da sie mit Übergangsmetallen vielseitige Koordinationsverbindungen bilden können.^[3] Knüpft man sie an Peptide, so könnten deren Sekundär- und Tertiärstrukturen später helfen, die Reaktivität der phosphangebundenen Übergangsmetalle zu steuern. Insbesondere könnten die Chiralität und andere wichtige stereochemischen Eigenschaften der Biomoleküle (wie Peptide und Proteine) auf die Übergangsmetalle übertragen werden, wenn an die Peptide chelatisierende Einheiten geknüpft werden, die in der Lage sind, Übergangsmetalle zu koordinieren.^[4] Dieser Ansatz, katalytisch aktive Übergangsmetalle mit chiralen Biomolekülen zu verknüpfen, ist ein direkter Zugang zu chiralen Verbindungen, die Anwendung in der enantioselektiven Katalyse finden könnten.^[4] Der Einbau von Phosphanen in Peptide (und Proteine) wird auch dabei helfen, Metallbindungsstellen zu entwickeln, die konformative Stabilität, Biospezifität sowie erhöhte enzymatische Aktivität bewirken könnten.^[5]

Die Biokonjugation cytotoxischer Übergangsmetalle an rezeptoraktive Peptide könnte sogar effektive Vehikel liefern,

mit denen man über rezeptorvermittelte Wechselwirkungen mit Agonisten oder Antagonisten cytotoxische Verbindungen gezielt in Tumore einbringen kann.^[6] In diesem Zusammenhang sind Peptide (oder an Rezeptoren bindende Biomoleküle), die Phosphansubstituenten enthalten, für das Design und die Entwicklung tumorspezifischer Radiopharmaka wichtig.^[7, 8] Trotz der bedeutenden katalytischen und biomedizinischen Anwendungen, die durch solche Peptide (und Proteine) offenstünden, stecken die Synthesemethoden zur Herstellung solcher Biokonjugate noch in den Kinderschuhen. Die elegante Arbeit von Gilbertson und Mitarbeitern über den Einbau von Aryl- und Cyclohexylphosphanen in bestimmte Peptide lieferte entscheidende Impulse in diesem Bereich, in dem die chemische und biomedizinische Wissenschaft eine Blütezeit erleben könnte.^[9]

Im Rahmen unserer Untersuchungen zur Entwicklung funktionalisierter Phosphane für Anwendungen in Biomedizin und Katalyse^[10] haben wir kürzlich eine neuartige Strategie entwickelt, die es uns ermöglicht, unter milden Bedingungen Bisphosphane mit Heteroatomen und chelatisierenden Gruppen direkt in Peptidrückgrate einzubauen. Dabei entstanden die ersten Biomoleküle, die mit hydrophilen chelatisierenden Phosphaneinheiten funktionalisiert sind. Hier berichten wir über die Verwendung von 3-Brompropylphosphan **1** zur Synthese eines funktionalisierten, wasserlöslichen Phosphans, das auf dem Dithiobisphosphan-Grundgerüst (P_2S_2) von 6,8-Bis[(3-phosphanylpropyl)thio]octansäure **2** basiert. Wir zeigen auch, daß die COOH-Gruppe von **2** effizient an Peptide gebunden werden kann, wobei die Phosphaneinheiten erhalten bleiben.

Schema 1 zeigt unseren Ansatz zur Synthese des Liganden-gerüsts von **2**. Er beinhaltet die Verwendung von **1** als Schlüsselsynthon, das wir vor kurzem bei der Reduktion von Diethyl-3-brompropylphosphonat mit $AlHCl_2$ ^[11] erhielten. Die Reaktion von **1** mit dem Dianion von D,L-6,8-Thioctsäure (D,L- α -Liponsäure) lieferte das COOH-funktionalisierte P_2S_2 -Gerüst **2**. Das protonengekoppelte ^{31}P -NMR-Spektrum von **2** wies zwei überlagerte Triplets auf ($^1J_{PH} = 193.2$ Hz), die das Vorhandensein zweier unterschiedlicher Phosphanylgruppen bestätigen. Das thermisch stabile P^{III} -Hydrid **2** wurde dann mit 37proz. Formaldehydlösung in Ethanol formyliert, wobei



Schema 1. a) $NaBH_4$ (3.0 Äquiv.), H_2O , EtOH, 25 °C, 5 h; b) $P(OEt)_3$ (0.2 Äquiv.), Δ , 1 h; c) $LiAlH_4$ (1.5 Äquiv.), $AlCl_3$ (4.6 Äquiv.), Tetraglyme, 0 \rightarrow 25 °C, 12 h; d) NaH (4.1 Äquiv.), THF, Δ , 12 h; e) $HCHO$ (4.0 Äquiv.), EtOH, 25 °C, 15 min.

[*] Prof. Dr. K. V. Katti, H. Gali, Dr. S. R. Karra, Dr. V. S. Reddy
 Department of Radiology
 Center for Radiological Research
 Allton Building Laboratories, Room 106
 University of Missouri-Columbia
 Columbia, MO 65211 (USA)
 Fax: (+1) 573-884-5679
 E-mail: kattik@missouri.edu

[**] Wir danken Professor Wynn A. Volkert für wertvolle wissenschaftliche Anregungen und Unterstützung. Diese Arbeit wurde von DuPont Pharmaceuticals, USA, und vom U.S. Department of Energy gefördert.

Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://www.wiley-vch.de/home/angewandte/> zu finden oder vom Autor anzufordern.