

Ein enzymgebundener Disubstrathybrid-Inhibitor der Adenylsuccinat-Synthetase**

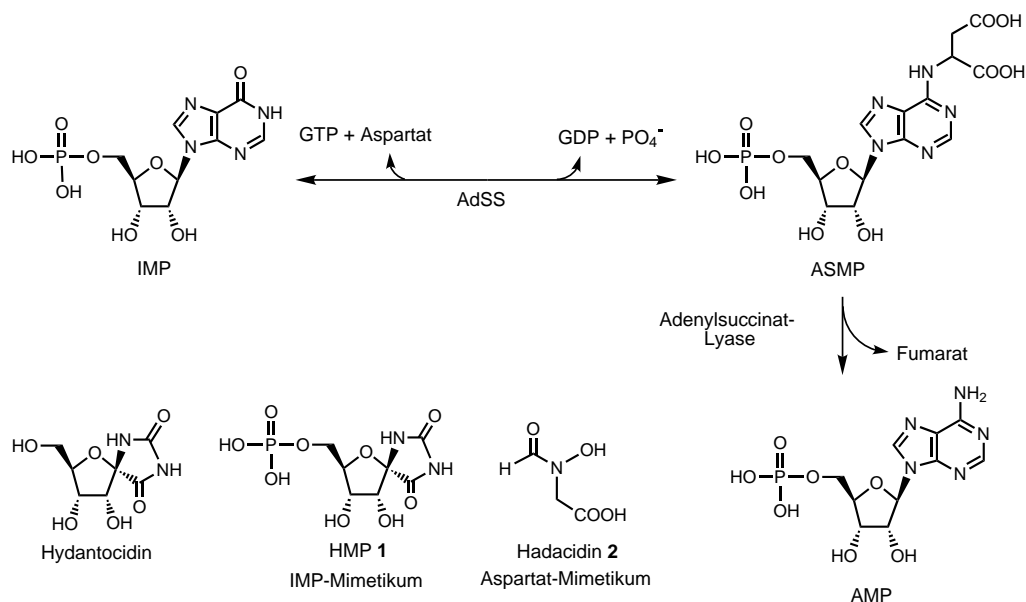
Stephen Hanessian,* Pu-Ping Lu, Jean-Yves Saneau, Philippe Chemla, Keigo Gohda, Raymonde Fonne-Pfister, Lars Prade und Sandra W. Cowan-Jacob

Die Natur hält eine Vielzahl von Verbindungen mit einem faszinierenden Aufgebot an Strukturen, Funktionen und stereochemischer Vielfalt bereit. Solche Verbindungen zeigen auch eine Vielzahl physiologischer Wirkungen in der Tier- und Pflanzenwelt. Nirgends wird dies deutlicher als bei der Wirkstoff-Forschung und der Entwicklung von therapeutisch wichtigen Arzneimitteln.^[1] Die großen Fortschritte bei den physikalischen Methoden zur Proteinstrukturaufklärung, wie Röntgenstrukturanalyse und NMR-Spektroskopie, haben dem Synthetiker wirksame Hilfsmittel zur Verfügung gestellt, um auf „rationale“ Weise neue Inhibitoren zu entwerfen.^[2] So bietet die Struktur eines organischen Moleküls, das im aktiven Zentrum eines Enzyms gebunden vorliegt,^[3] eine gute Visualisierung von wichtigen Wechselwirkungen, die zur Optimierung durch chemische Modifikation genutzt werden können. Während in der medizinischen Chemie diese Forschungsansätze mit großem Aufwand verfolgt werden, ist von gezielt entworfenen Inhibitoren in der pflanzlichen Enzymologie relativ wenig bekannt.^[4]

Das Enzym Adenylsuccinat-Synthetase (AdSS) ist am ersten Schritt der Umwandlung von Inosinmonophosphat (IMP) in Adenosinmonophosphat (AMP) beteiligt (Schema 1).^[5] Die Reaktion benötigt GTP, Magnesiumionen und Aspartat und führt unter Freisetzung von GDP und Phosphat zum aspartylierten Nucleotid Adenylsuccinatmonophosphat (ASMP). Das Enzym Adenylsuccinat-Lyase vollendet im

Anschluß die Umsetzung mit der Erzeugung von AMP unter Abspaltung von Fumarat.

Hydantocidin, eine einzigartige spirocyclische Hydantoin-ribose, isoliert aus *Streptomyces hygroscopicus*,^[6] inhibiert sowohl AdSS aus *E. coli* als auch das pflanzliche Enzym. Als Präherbizid wird es zuerst zum 5'-Phosphat **1** (Hydantocidinmonophosphat, HMP) umgesetzt und soll so IMP oder AMP imitieren.^[7] Als überzeugender Beweis dient die Kristallstruktur eines Komplexes aus HMP und AdSS, in dem das Inhibitormolekül den Platz von IMP im aktiven Zentrum besetzt hat.^[7c]



Schema 1. Biosynthese von AMP und Strukturen der natürlichen Inhibitoren von AdSS.

Der nicht verwandte Naturstoff Hadacidin (*N*-Formyl-*N*-hydroxyglycin) **2**, der ebenfalls herbizid wirkt, fungiert als kompetitiver Inhibitor der Asparaginsäure und wechselwirkt deshalb mit einem anderen Zentrum des Enzyms.^[8] Ein Beispiel für das Visualisieren des simultanen Bindens von zwei unterschiedlichen Inhibitoren an ein Enzym ist mit der Kristallstruktur des Komplexes aus AdSS, HMP und Hadacidin gegeben.^[9] Die beiden genannten kristallographischen Studien boten die einzigartige Gelegenheit, neue Aspekte für das Design von AdSS-Inhibitoren zu testen.^[7c, 9]

Angesichts der relativen Orientierungen von HMP, Hadacidin, Mg^{2+} und Phosphat (Schema 2) schien es wahrscheinlich, daß die kovalente Verknüpfung von HMP und Hadacidin mittels eines sorgfältig ausgewählten Linkers zu einem HMP-Hadacidin-Hybrid führen könnte, das besser an das Enzym binden und daher stärker herbizid wirken würde. Molecular-Modeling-Studien und Simulationen der Substratbindung ergaben, daß ein Disubstrathybrid mit einer aliphatischen C_3 -Brücke und einem (2*S*)-*N*-Formyl-*N*-hydroxyaminosäure-Rest am Ende wie **3** besser geeignet sein sollte als das 2*R*-Isomer **4** oder das Analogon mit einer C_2 -Brücke. Wir beschreiben hier die Bestätigung dieser Hypothese mittels Synthese und Röntgenstrukturanalyse.

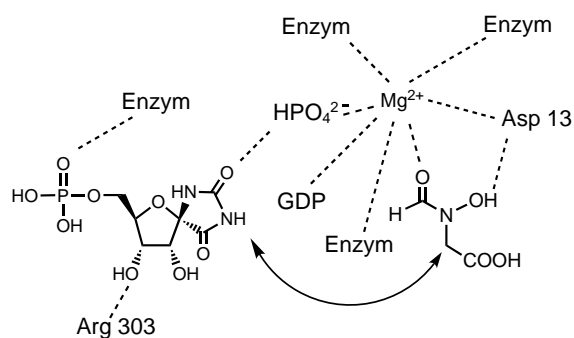
Das Camphersultamderivat **5**^[10] lieferte mit Allylbromid in Gegenwart von Zink in einer Mischung aus wäßriger Ammoniumchloridlösung und THF das (*S*)-Allylglycinderivat **6** in

[*] Prof. Dr. S. Hanessian, P.-P. Lu, J.-Y. Saneau
Department of Chemistry
Université de Montréal
C.P. 6128, Succ. Centre-ville
Montreal, QC, H3C 3J7 (Kanada)
Fax: (+1) 514-343-5728
E-mail: hanessia@ere.umontreal.ca

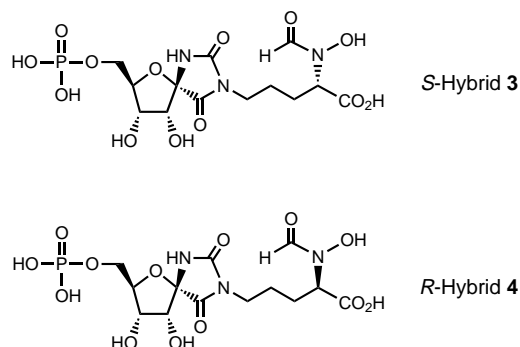
P. Chemla, K. Gohda, R. Fonne-Pfister
Novartis Crop Protection AG, Basel (Schweiz)
L. Prade, S. W. Cowan-Jacob
Novartis Pharma AG, Basel (Schweiz)

[**] Diese Arbeit wurde vom NSERC unterstützt (Medicinal Chemistry Chair Program).

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



Schema 2. Wechselwirkungen von Hydantocidinphosphat und Hadacidin mit AdSS.



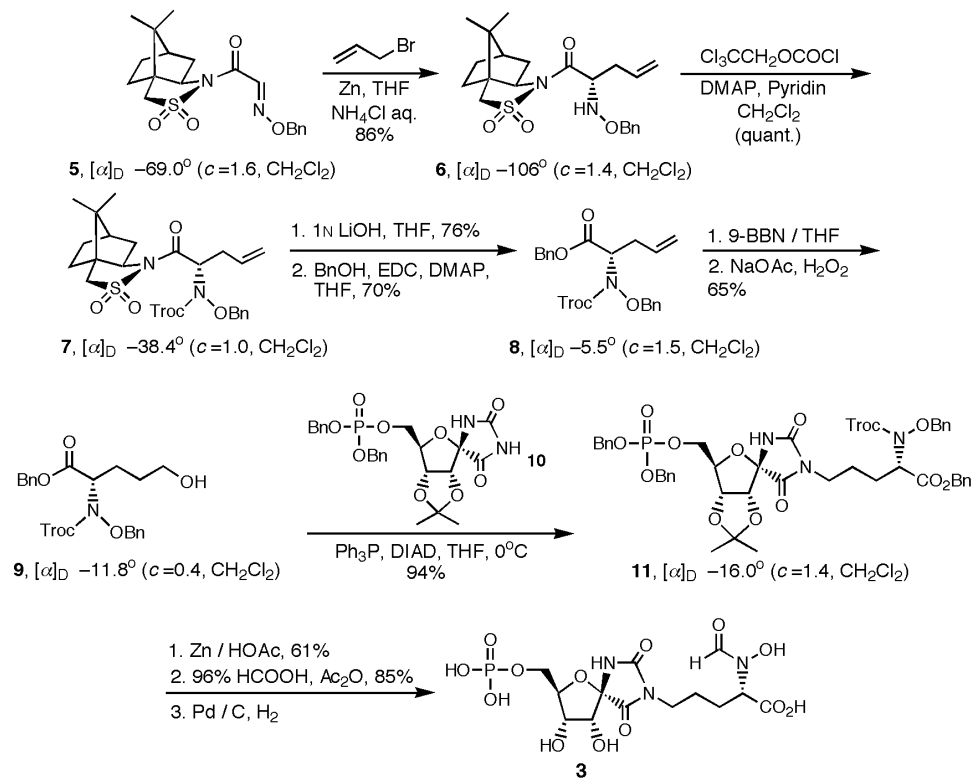
exzellenter Ausbeute und hoher Diastereoselektivität (Schema 3). Schutz der Aminogruppe als *N*-Trichlorethoxycarbonyl-derivat **7**, Spaltung des chiralen Amidmotivs und erneute

Veresterung ergaben den Benzylester **8** in guter Gesamtausbeute. Die anschließende Hydroborierung wurde problemlos durchgeführt und lieferte den primären Alkohol **9**, der unter den Bedingungen der Mitsunobu-Reaktion^[11] mit dem HMP-Dibenzylderivat **10** in hervorragender Ausbeute zu **11** verknüpft wurde. Ablösen der *N*-Troc-Schutzgruppe und *N*-Formylierung bei gleichzeitiger Hydrolyse der Acetaleinheit führten zu einem O-Benzyl-geschützten Vorläufer der Zielverbindung. Debenzylierung durch katalytische Hydrogenolyse unter genauer Überwachung ergab das Hybridmolekül **3** als amorphes Pulver. Die analoge (*2R*)-Aminosäure **4** wurde ausgehend vom enantiomeren Sultam auf die gleiche Weise hergestellt.

Inhibierungsmessungen zeigten erfreulicherweise, daß das 2*S*-Hybrid **3** AdSS aus *E. coli* und aus Weizen schon bei Konzentrationen von 0.043 bzw. 0.200 μM inhibiert, d.h. bei deutlich niedrigeren als das 2*R*-Isomer **4** und die natürlichen Substrate **1** und **2** (Tabelle 1).^[12] Die Verknüpfung zweier relativ schwacher Inhibitoren zu einem Hybridmolekül verbesserte somit die Inhibierungswirkung gegenüber der der natürlichen Substrate deutlich.

Tabelle 1. Inhibierungswirkung von HMP, Hadacidin und den Disubstrathybriden **3** und **4** auf AdSS aus *E. coli* und Weizen.

Inhibitor	IC ₅₀ [μM]	
	<i>E. coli</i> -AdSS	Weizen-AdSS
HMP 1	0.675	1.35
Hadacidin 2	3.5	12
3	0.043	0.200
4	0.665	8.93



Schema 3. Synthese des Hybrids **3**. 9-BBN = 9-Borabicyclo[3.3.1]nonan, Bn = Benzyl, DIAD = Diisopropylazodicarboxylat, DMAP = Dimethylaminopyridin, EDC = 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid, Troc = Trichlorethoxycarbonyl.

Die Ergebnisse der biologischen Tests konnten durch die mit einer Auflösung von 2.0 und 2.2 Å ermittelten Kristallstrukturen der Komplexe von AdSS mit dem 2*S*- bzw. 2*R*-Isomer abgesichert werden.^[13] Abbildung 1 zeigt links das 2*S*-Hybridmolekül **3** in den aktiven Zentren, die normalerweise IMP bzw. Aspartat binden. Das Magnesium- und das Phosphat-Ion befinden sich an den erwarteten Stellen, und auch Wechselwirkungen mit dem Enzym sind erkennbar. Die C₃-Brücke des 2*S*-Hybrids **3** nimmt eine Konformation ein, die vermutlich die festeste Bindung von HMP- und Hadacidin-Einheit an AdSS ermöglicht.^[14] Kurioserweise besetzt das 2*R*-Hybrid **4** die gleichen relativen Positionen, allerdings mit kleinen Unterschieden im Aminosäureteil und in der Konformation der C₃-Brücke^[14] (Abbildung 1 rechts).

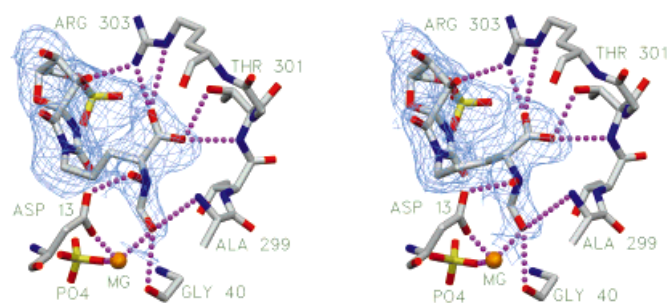


Abbildung 1. Strukturen der Komplexe von **3** (links) und **4** (rechts) mit AdSS im Kristall. Bei den Liganden ist die Elektronendichte für 1σ gezeigt; Wasserstoffbrückenbindungen mit Aminosäuren der AdSS sind als gepunktete Linien wiedergegeben. Man beachte die unterschiedlichen Konformationen der C_3 -Brücke in **3** und **4**.^[14]

Das Hybrid mit einer C_2 -Brücke – leicht herstellbar aus dem gemeinsamen Zwischenprodukt **8** durch oxidative Spaltung, Reduktion, Mitsunobu-Kupplung und Abspaltung der Schutzgruppen – war ebenfalls wirksamer als HMP oder Hadacidin, aber nicht so wirksam wie das Hybrid **3** mit der C_3 -Brücke.^[15] Es ist wahrscheinlich, dass sich in diesem Fall das Enzym durch eine Konformationsänderung an den Inhibitor anpassen muß und nicht umgekehrt.

Es gibt sehr wenige Beispiele dafür, daß zwei Moleküle erfolgreich zu einem Hybrid verbunden wurden, das stärker inhibierend wirkt als die Komponenten.^[16] Vor wenigen Jahren hat es allerdings durch äußerst geschicktes Nutzen von Struktur-Aktivitäts-Beziehungen (SARs), die NMR-spektroskopisch ermittelt wurden, zur Entdeckung hochaffiner Liganden große Fortschritte gegeben.^[17] So weit uns bekannt ist, haben wir aber für den Bereich der Herbizide hier erstmals das Design und die Synthese eines Disubstrathybrid-Inhibitors beschrieben.

Eingegangen am 3. Mai,

veränderte Fassung am 12. Juli 1999 [Z13362]

International Edition: *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, 38, 3160–3162

Stichwörter: Enzyminhibitoren • Herbizide • Strukturaufklärung

- [1] Eine hervorragende Abdeckung des Themas bietet *Burger's Medicinal Chemistry and Drug Discovery*, Vol. 1–5 (Hrsg.: M. W. Wolff), Wiley, New York, **1997**.
- [2] Siehe zum Beispiel: a) R. B. Silverman in *The Organic Chemistry of Drug Design and Drug Action*, Academic Press, New York, **1992**; b) J. Green, J. W. Erickson, J. I. Baldwin, M. D. Varney, *J. Med. Chem.* **1994**, 37, 1035; Y. C. Martin, *J. Med. Chem.* **1992**, 35, 2145.
- [3] K. Appelt, R. J. Bacquet, C. A. Bartlett, C. L. J. Booth, S. T. Freer, M. A. M. Fuhry, M. R. Gehring, S. M. Herrmann, E. F. Howland, C. A. Janson, T. R. Jones, C. C. Kan, V. Kathardekar, K. K. Lewis, G. P. Marzoni, D. A. Matthews, C. Mohr, E. W. Moornaw, C. A. Morse, S. J. Oatley, R. C. Ogden, M. R. Reddy, S. H. Reich, W. S. Schoattlin, W. W. Smith, M. D. Varney, J. E. Villafranca, R. W. Ward, S. Webber, S. E. Webber, K. M. Welsh, J. White, *J. Med. Chem.* **1991**, 34, 1925.
- [4] G. M. Ramos Tombo, D. Bellus, *Angew. Chem.* **1991**, 10, 1219; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1991**, 30, 1193.
- [5] C. Kang, H. J. Fromm, *J. Biol. Chem.* **1995**, 270, 15 539.
- [6] a) T. Haneishi, M. Nakajima, T. Torikata, T. Okasaki, T. M. Tohjigamori, K. Kawakubo (Sankyo Co. Ltd.), EP-B 0232572 A2, **1987**; b) H. Haruyama, T. Takayama, T. Kinoshita, M. Kondo, M.

Nakajima, T. Haneishi, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* **1991**, 1637; c) J. P. Pachlatko, H. Zähler (Ciba-Geigy AG), DE-B 4129-616-A1, **1992**; d) Mitsubishi Kasei Corp., JP-A 04222589-A, **1992**; e) M. Nakajima, K. Itoi, Y. Takamatsu, T. Kinoshita, T. Okasaki, K. Kawakubo, M. Shindou, T. Honma, M. Tohjigamori, T. Haneishi, *J. Antibiot.* **1991**, 44, 293.

- [7] a) D. R. Heim, C. Cseke, B. C. Gerwick, M. G. Murdoch, S. B. Green, *Pestic. Biochem. Physiol.* **1995**, 53, 138; b) C. Cseke, B. C. Gerwick, G. D. Crouse, M. G. Murdoch, S. B. Green, D. R. Heim, *Pestic. Biochem. Physiol.* **1996**, 55, 210; c) R. Fonné-Pfister, P. Chemla, E. Ward, M. Girardet, K. E. Kreuz, R. B. Honzatko, H. J. Fromm, H. P. Schär, M. G. Grütter, S. W. Cowan-Jacob, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1996**, 93, 9431; d) D. L. Siehl, M. V. Subramanian, E. W. Walters, L. Shy-Fuh, R. J. Anderson, A. G. Toschi, *Plant Physiol.* **1996**, 110(3), 753; e) E. W. Walters, S. Lee, T. Niderman, P. Bernasconi, M. V. Subramanian, D. Siehl, *Plant Physiol.* **1997**, 114(2), 549.
- [8] M. D. Hatch, *Phytochemistry* **1967**, 6, 115.
- [9] B. W. Poland, S. Lee, M. V. Subramanian, D. L. Siehl, R. J. Anderson, H. J. Fromm, R. B. Honzatko, *Biochemistry* **1996**, 35, 15753.
- [10] S. Hanessian, R. Y. Yang, *Tetrahedron Lett.* **1996**, 37, 5723.
- [11] O. Mitsunobu, *Synthesis* **1981**, 1; D. L. Hughes, *Org. React.* **1992**, 42, 335.
- [12] Siehe Lit. [7c] für die Enzym-Assays.
- [13] Siehe die Hintergrundinformationen für Details der Strukturbestimmung und -analyse.
- [14] Die Diederwinkel der C_3 -Brücke in **3** und **4** sind in Tabelle 2 zusammengefaßt.

Tabelle 2. Diederwinkel der C_3 -Brücke in **3** und **4**.

Winkel [°]	3	4
N(Hydantoin)-C1-C2-C3	66.4	– 51.9
C1-C2-C3-Cα(Glycin)	– 166	– 178
C2-C3-Cα-CO ₂ H	167	– 150
C2-C3-Cα-NH ₂	– 72.8	89.4

- [15] Der IC_{50} -Wert für AdSS betrug sowohl beim *R*- als auch beim *S*-Analogon mit der C_2 -Brücke $0.24 \mu\text{M}$: S. Hanessian, P.-P. Lu, J.-Y. Sanceau, P. Chemla, K. Gohda, R. Fonné-Pfister, L. Prade, S. W. Cowan-Jacob, unveröffentlichte Ergebnisse.
- [16] a) J. P. Priestle, J. Rahuel, H. Rink, M. Tones, M. G. Gruetter, *Protein Sci.* **1993**, 2, 1630; b) A. Ricouart, J. C. Gesquiere, A. Tartar, C. J. Sergheraert, *J. Med. Chem.* **1991**, 34, 73; c) E. Skordalakes, S. Elgendy, C. A. Goodwin, D. Gree, M. F. Scully, V. Kakkar, J. M. Freyssinet, G. Dodson, J. J. Deadman, *Biochemistry* **1998**, 37, 14420.
- [17] S. B. Shuker, P. J. Hadjuk, R. P. Meadows, S. W. Fesik, *Science* **1996**, 274, 1531; P. J. Hadjuk, G. Shepard, D. G. Nettesheim, E. T. Olejniczak, S. B. Shuker, R. P. Meadows, D. H. Steinman, G. M. Carrera, Jr., P. A. Marcotte, J. Severin, K. Walter, H. Smith, E. Gubbins, R. Simmer, T. F. Holzman, D. W. Morgan, S. K. Davidsen, J. Summers, S. W. Fesik, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, 119, 5818.