

- [17] D. Berndorff, R. Gessner, B. Kreft, N. Schnoy, A. M. Lajous-Petter, N. Loch, W. Reuter, M. Hortsch, R. Tauber, *J. Cell Biol.* **1994**, *125*, 1353.
- [18] a) H. Paulsen, J.-P. Hölck, *Carbohydrate Res.* **1982**, *109*, 89; b) H. Kunz, S. Birnbach, *Angew. Chem.* **1986**, *98*, 354, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1986**, *98*, 360; c) T. Rosen, J. M. Lico, D. T. W. Chu, *J. Org. Chem.* **1988**, *53*, 1580.
- [19] L. A. Carpino, A. El-Faham, C. Minor, F. Albericio, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1994**, 201.
- [20] Vorschrift zur Abspaltung: Das Harz wird mit 2 Äquiv. TBAF · 3 H₂O (0.2 mmol) in CH₂Cl₂ (15 mL) versetzt und 25 min geschüttelt. Es wird filtriert und dreimal mit 10 mL CH₂Cl₂ gewaschen. Die Filtrate werden mit 10 mL H₂O versetzt, um noch vorhandenes Fluorid zu entfernen. Der Abspaltvorgang wird mit ca. 0.7 Äquiv. TBAF · 3 H₂O (0.07 mmol, 2 Äquiv. bezogen auf noch auf dem Harz verbliebenes Produkt) wiederholt. Nach zweimaligem Waschen der vereinigten CH₂Cl₂-Lösungen mit Wasser wird über MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Peptid fällt in nahezu reiner Form an.
- [21] $R_f = 6.82$ min (Luna C18-2/75 × 4.6 mm, 3 µm; 1 mL min⁻¹; A: H₂O, B: CH₃CN; 0–0.75 min: 20 % B in A, 0.75–10 min: 20 % B in A bis 100 % B, 10–12.5 min: 100 % B, 12.5–13.5 min: 100 % B bis 20 % B in A, 13.5–15 min: 20 % B in A); $[\alpha]_D^{25} = 1.96$ ($c = 0.90$ in MeOH); ¹H-NMR (400 MHz, [D₆]DMSO, ¹H, ¹H-COSY): $\delta = 8.53$ (s, 1H; ω -NH, Q), 8.08–8.14 (m, 3H; NH, D, S, A), 7.85–7.98 (m, 5H; NH, 2 × A, Q, L, G), 7.61 (d, 1H; NH, GalNAc, $J = 8.6$ Hz), 7.14–7.26 (m, 15H; Trt), 6.85 (d, 1H; NH-Urethan, L, $J = 7.43$ Hz), 5.28 (s, 1H; H-4'), 5.00 (dd, 1H; H-3', $J_{H3,H4} = 2.74$, $J_{H3,H2} = 11.74$ Hz), 4.85 (d, 1H; H-1', $J_{H1,H2} = 3.13$ Hz), 4.56–4.64 (m, 1H; D^a); 4.47–4.52 (m, 1H; S^a), 3.94–4.40 (m, 9H; 3 × A^a, I^a, Q^a, L^a, H-2', H-5', H-6'), 3.88–3.92 (m, 2H; L^a, H-6'), 3.72–3.76 (m, 2H; G^a), 3.60–3.64 (m, 2H; S^b), 2.71–2.73 (m, 1H; D^b), 2.45–2.49 (m, 1H; D^b), 2.32–2.38 (m, 2H; Q^b), 2.07 (s, 3H; CH₃, NHAc), 1.71–1.94 (m, 12H; 3 × CH₃, OAc, I^b, Q^b), 1.52–1.59 (m, 2H; L^b), 1.36 (s, 9H; 3 × CH₃, Boc), 1.33 (s, 9H; 3 × CH₃, *t*Bu), 1.33–1.42 (m, 5H; 2 × L^b, I^b), 1.11–1.18 (m, 10H; 3 × A^b, I^b), 0.79–0.86 (m, 18H; 4 × L^b, I^b, I^b); ¹³C-NMR (100.6 MHz, [D₆]DMSO, Breitband, DEPT): $\delta = 172.86$, 172.69, 172.18, 172.11, 172.02, 171.53, 170.39, 170.19, 170.04, 169.97, 169.91, 169.71, 169.34, 169.05, 168.22, 168.11, 156.03 (C=O), 145.00 (C_{ipso}, Trt), 128.61 (C_{para}, Trt), 127.54 (C_{ortho}, Trt), 126.41 (C_{meta}, Trt), 97.29 (C-1'), 80.39 (C_{quart}, Boc), 78.34 (C_{quart}, *t*Bu), 69.37 (C_{quart}, Trt), 67.51 (C-3'), 66.96 (S^b), 66.83 (C-4'), 65.92 (C-5'), 61.14 (C-6'), 56.04 (I^a), 52.66, 52.39, 52.20 (2 × L^a, S^a), 50.87, 49.28, 48.08, 47.95, 47.59, 46.57 (D^a, Q^a, 3 × A^a, C-2'), 41.61 (G^a), 40.37, 40.22 (2 × L^b), 36.92 (D^b), 36.08 (I^b), 32.39 (Q^a), 27.89 (3 × CH₃, Boc), 27.66 (Q^b), 27.37 (3 × CH₃, *t*Bu), 24.46 (I^b), 23.94, 23.82 (2 × L^b), 22.69, 22.33, 21.21, 20.22 (4 × CH₃, Acetyl), 20.18, 20.13 (4 × L^b), 18.05, 17.67, 17.38 (3 × A^b), 15.24 (I^b), 11.08 (I^b); MALDI-TOF-MS (cca-Matrix, Positiv-Ionen-Modus): m/z : 1709.3 [M+Na]⁺, 1725.2 [M+K]⁺, 1731.3 [M+2Na]⁺.

Naturstoffe sind biologisch validierte Startpunkte im Strukturraum zur Entwicklung von Substanzbibliotheken: Festphasensynthese von Analoga des Protein-Phosphatase-Inhibitors Dysidiolid**

Dirk Brohm, Susanne Metzger, Ajay Bhargava, Oliver Müller, Folker Lieb und Herbert Waldmann*

Die kombinatorische Synthese von Substanzbibliotheken an der festen Phase ist eine Schlüsseltechnologie zur Auf- findung von Protein-Liganden und -Inhibitoren, insbesondere bei der Entwicklung neuer Wirkstoffe und chemischer Werk- zeuge für das Studium biologischer Prozesse. Um bei diesem Prozess eine hohe Effizienz zu erreichen, sind wirkungsvolle Strategien für das Design von Substanzbibliotheken von größter Bedeutung. In dieser Arbeit beschreiben wir einen strukturbasierten Ansatz zur Lösung dieses fundamentalen Problems. Das grundlegende Prinzip dieses Ansatzes ist, das strukturelle Grundgerüst biologisch aktiver Naturstoffe, die von der Evolution für die Bindung an bestimmte Proteindomänen selektioniert wurden, als Basis für die Entwicklung von Substanzbibliotheken zu verwenden. Darüber hinaus belegen wir, dass die zentrale Herausforderung für diesen Ansatz, die vielstufige Synthese von Naturstoffen und ihrer Analoga an der festen Phase, erfolgreich bewältigt werden kann.

Proteine können als modular aufgebaute Biomoleküle betrachtet werden, die aus individuellen Domänen als Grund- bausteinen zusammengesetzt sind. Dabei scheint die Gesamt- zahl aller verfügbarer Proteindomänen eingeschränkt zu sein.^[1] Es ist daher zu erwarten, dass in neu entdeckten Proteinen mit stark variierenden Funktionen und Aktivitäten die gleichen oder strukturell nah verwandte Domänen in verschiedenen Kombinationen und Zusammensetzungen als

[*] Prof. Dr. H. Waldmann, Dipl.-Chem. D. Brohm
Max-Planck-Institut für Molekulare Physiologie
Abteilung Chemische Biologie
Otto-Hahn-Straße 11, 44227 Dortmund (Deutschland)
Fax: (+49) 231-133-2499
E-mail: herbert.waldmann@mpi-dortmund.mpg.de
und
Universität Dortmund, Fb. 3, Organische Chemie
Dipl.-Chem. D. Brohm
Semaia Pharmaceuticals
Emil-Figge-Straße 76–80, 44227 Dortmund (Deutschland)
Dr. S. Metzger
Bayer AG, Pharmaforschung
PH-R LSC-NP, Geb. 6200, 40789 Monheim (Deutschland)
Dr. A. Bhargava
Bayer Corporation
400 Morgan Lane, West Haven, CT 06525 (USA)
Dr. O. Müller
Max-Planck-Institut für Molekulare Physiologie
Abteilung Strukturelle Biologie
Otto-Hahn-Straße 11, 44227 Dortmund (Deutschland)
Dr. F. Lieb
Bayer AG, Zentrale Forschung und Entwicklung
ZF-LSC-SH, Geb. Q18, 51368 Leverkusen (Deutschland)

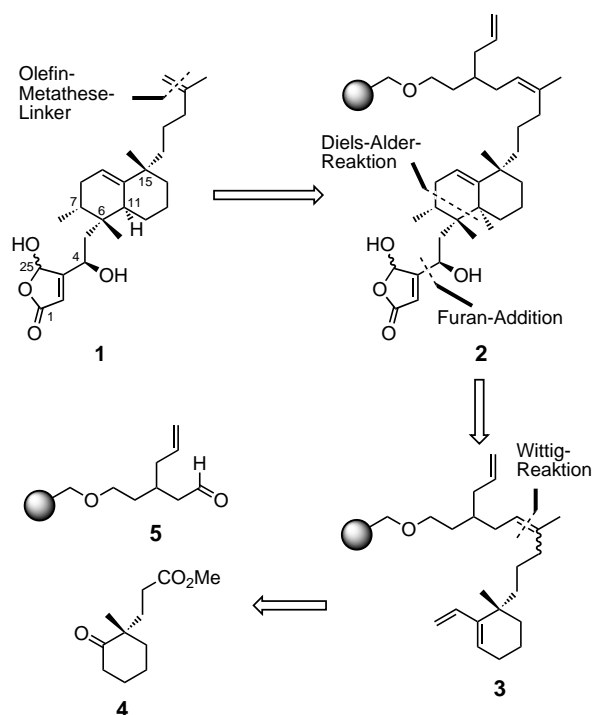
[**] Diese Arbeit wurde vom Fonds der Chemischen Industrie und von der Bayer AG unterstützt.

struktur- und funktionsbestimmende Einheiten wiederholt werden. Von entscheidender Bedeutung für die Entdeckung neuer Liganden und Inhibitoren für bekannte und insbesondere für neu entdeckte Proteine ist die Identifizierung von Substanzklassen, die bereits als spezifische Liganden von Proteindomänen biologisch validiert sind. Diese Substanzklassen können dann als Startpunkte im Strukturraum zur Entwicklung von Bibliotheken dienen. Bibliotheken, die um die Grundstruktur solcher Substanzen entworfen und synthetisiert werden, sollten Modulatoren der Proteinaktivität mit hoher Trefferquote hervorbringen. Darüber hinaus sollten sie Modulatoren von Proteinen mit variierender Funktion, Aktivität und Ursprung liefern, die gleiche oder sehr ähnliche Domänen enthalten. Innerhalb einer Gruppe verwandter Proteindomänen ist die individuelle Aminosäuresequenz und die damit verbundene detaillierte Struktur, die oft die Basis für die selektive Inhibition des Proteins ist (z. B. in den ATP-Bindungsstellen von Proteinkinasen), normalerweise unterschiedlich. Es ist daher von zentraler Bedeutung, dass eine vorgegebene Struktur nicht in jedem Detail aufgebaut werden muss. Vielmehr muss das strukturelle Grundgerüst für die individuellen Mitglieder einer Substanzbibliothek erhalten bleiben, und die Konfiguration sowie die funktionellen Gruppen müssen variiert werden, um Selektivität zwischen verwandten Proteinen zu erreichen.

Biologisch aktive Naturstoffe können als strukturelle Einheiten betrachtet werden, die von der Evolution für die Bindung an bestimmte Proteindomänen selektioniert wurden. Sie sind damit bereits biologisch validiert, und die ihnen zugrunde liegende strukturelle Architektur sollte ein wirksames Leitprinzip für die Synthese von Substanzbibliotheken sein. Dieses strukturbasierte Konzept unterscheidet sich in seiner grundlegenden Argumentation von verwandten Ansätzen,^[2] die sich auf die Erzeugung chemischer Diversität konzentrieren. Unser Konzept vernachlässigt diesen Gesichtspunkt jedoch nicht, sondern ist auf der Diversität der Natur selbst aufgebaut.

Voraussetzung für den Erfolg dieses Ansatzes ist, dass effiziente, verlässliche Methoden und vielstufige Sequenzen für die Totalsynthese von Naturstoffen und deren Analoga an der festen Phase verfügbar sind. Die entsprechenden Umsetzungen müssen ähnlich robust und selektiv wie verwandte Umsetzungen in Lösung ablaufen, unabhängig von den Einschränkungen und unterschiedlichen Anforderungen, die durch die Ankergruppe und den festen Träger vorgegeben werden. In einigen Fällen ist die strukturelle Variation von Naturstoffen mit Festphasenmethoden gelungen,^[3] meistens durch Modifikationen einer zuvor in Lösung erzeugten Grundstruktur während der letzten Synthesestufen. Die Totalsynthese eines Naturstoffs und seiner Derivate über eine lange vielstufige Sequenz (d. h. zehn Stufen und mehr) an der festen Phase war bisher nur in einem einzigen Fall erfolgreich.^[3, 4] Hier beschreiben wir die Festphasensynthese von Analoga des Protein-Phosphatase-Inhibitors Dysidiolid, die schnell zu Verbindungen mit signifikant erhöhter biologischer Aktivität führte.

Das Sesterterpen Dysidiolid **1** (Schema 1) war der erste natürlich vorkommende Inhibitor der dual-spezifischen Cdc25-Protein-Phosphatasen, die wichtige Funktionen bei

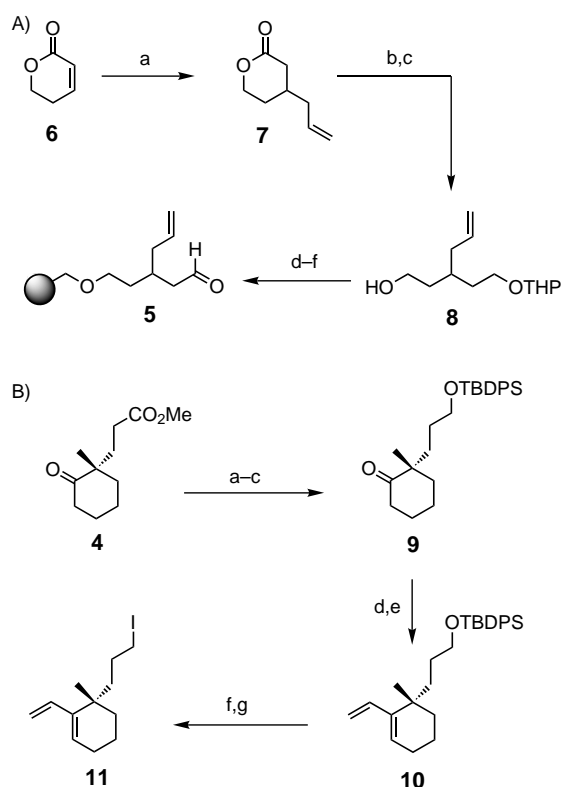


Schema 1. Retrosynthese von Dysidiolid und Strategie zur Festphasensynthese unter Verwendung eines Olefin-Metathese-Linkers.

der Regulation des Zellzyklus erfüllen.^[5] Wegen dieser Eigenschaft und der damit verbundenen Antitumoraktivität ist dieser Naturstoff für Chemiker, Biologen und Pharmakologen von großem Interesse.^[6]

Für die geplante Festphasensynthese beabsichtigten wir, die olefinische Seitenkette an einen robusten Anker zu kuppeln, der die endständige Alkenstruktur nach Abspaltung von der festen Phase unter milden Bedingungen spurlos freisetzt. Der in **2** enthaltene neue Olefin-Metathese-Anker sollte diese Anforderungen erfüllen. Es war geplant, die γ -Hydroxybutenolid-Einheit durch Addition von 3-Lithiofuran an einen entsprechenden Aldehyd und nachfolgende Oxidation des Heterocyclus mit Singulett-Sauerstoff aufzubauen (Schema 1). Die bicyclische Grundstruktur von **1** sollte durch eine Diels-Alder-Strategie erhalten werden, die bereits von uns erprobt^[7] ($2 \Rightarrow 3$) und von verschiedenen Arbeitsgruppen erfolgreich bei der Totalsynthese von natürlichem Dysidiolid in Lösung angewendet wurde.^[6b-e] In unseren Arbeiten zeigte sich, dass die Cycloaddition zunächst zu dem Grundgerüst des 6-Epimers von **1** führt. Dies wurde von uns jedoch bewusst in Kauf genommen, da es nach dem oben dargestellten Konzept nicht notwendig ist, jedes strukturelle Detail eines Naturstoffs nachzubauen. Es war geplant, ausgehend von dem kommerziell erhältlichen chiralen Ketoester **4** das Dien für die Diels-Alder-Reaktion in Lösung zu synthetisieren. Das Dien sollte dann in einer konvergenten Strategie durch eine Wittig-Reaktion an das Ankerharz **5** gekuppelt werden ($3 \Rightarrow 4 + 5$).

Der Anker **8** wurde durch Reaktion von Dihydropyranon **6** mit in situ erzeugtem Diallylzink in Gegenwart von Trimethylsilylchlorid (TMSCl), nachfolgende Reduktion des Lactons **7** mit LiAlH_4 und Mono-Schüttung des erhaltenen Diols synthetisiert (Schema 2A). Die Blockierung einer Hydroxy-



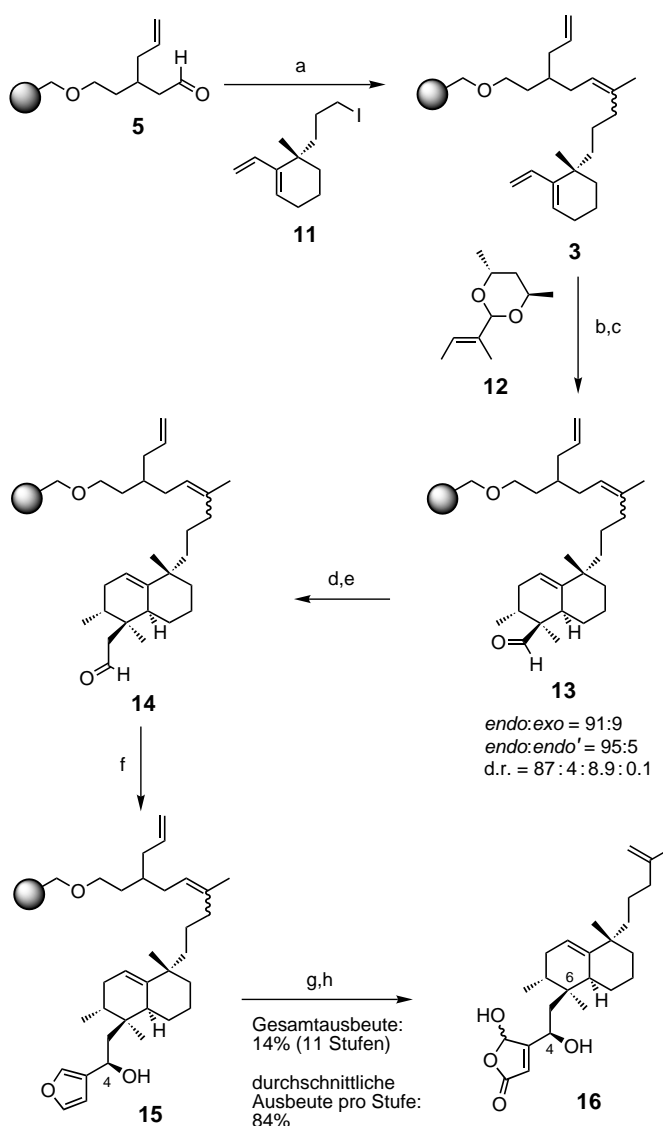
Scheme 2. A) Synthese des Linkers und Kupplung an das Harz. a) Allylmagnesiumbromid, ZnBr_2 , TMSCl , THF, -78°C , 6 h, 52%; b) LiAlH_4 , THF, RT, 1 h, 97%; c) 3,4-Dihydropyran, Dowex50WX2, Toluol, RT, 3 h, 95%; d) NaH , $n\text{Bu}_4\text{NI}$, Merrifield-Cl-Harz (1.1 mmol g^{-1}), DMF, RT, 18 h; e) Pyridinium-*p*-toluolsulfonat, EtOH, Dichlorethan, Δ , 18 h; f) IBX, THF/DMSO 1:1, RT, 8 h; 90% (drei Stufen). B) Synthese des Diens. a) LiAlH_4 , THF, 0°C , 30 min, 100%; b) TBDPSCl, Dimethylaminopyridin, Et_3N , Dichlormethan, RT, 17 h, 80%; c) PCC, Dichlormethan, RT, 4 h, 94%; d) Vinylmagnesiumbromid, THF, RT, 5 h; e) $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$, Benzol/THF 4:1, Δ , 43% (d–e); f) $n\text{Bu}_4\text{NF}$, THF, RT, 3 h, 95%; g) I_2 , Imidazol, PPh_3 , Dichlormethan, RT, 1 h, 85%.

gruppe mit 3,4-Dihydropyran war notwendig, um Kreuzreaktionen bei der anschließenden Kupplung des Ankers an Merrifield-Harz durch Veretherung zu verhindern. Nach Entschützung und anschließender Oxidation der Hydroxygruppe wurde das aktive Ankerharz **5** mit hoher Ausbeute und einer Beladung von bis zu 1.1 mmol g^{-1} erhalten (90%, 3 Stufen an der festen Phase).

Das Dien wurde ausgehend von dem kommerziell erhältlichen chiralen Ketoester **4** in Lösung synthetisiert. Nach Reduktion mit LiAlH_4 zum Diol wurde die primäre Hydroxygruppe mit *tert*-Butyldiphenylsilylchlorid (TBDPSCl) geschützt und der sekundäre Alkohol mit Pyridiniumchlorochromat (PCC) oxidiert, wobei das Keton **9** in hoher Ausbeute entstand (Schema 2B). Addition von Vinylmagnesiumchlorid an die Carbonylgruppe ergab den entsprechenden tertiären Alkohol, der sich durch Lewis-Säure-katalysierte Eliminierung von Wasser in das Dien **10** überführen ließ. Nach Abspaltung der Schutzgruppe wurde aus dem Alkohol das Alkyljodid **11** erhalten, das als Vorstufe für die anschließende Wittig-Reaktion diente.

In einem zweistufigen Eintopf-Verfahren wurde **11** zunächst mit dem durch Deprotonierung von EtPPh_3I erhalte-

nen Ylid umgesetzt, wobei durch nucleophile Substitution ein sekundäres Phosphonium-Salz entstand. Dieses wurde mit einem zweiten Äquivalent Base deprotoniert, und schließlich wurde das Aldehyd-Harz **5** zugegeben (Schema 3). Anschließend wurde das erhaltene Dien-Harz **3** mit dem chiralen ungesättigten Acetal **12**^[8] in einer Lewis-Säure-katalysierten Diels-Alder-Reaktion bei -78°C umgesetzt. Die bicyclische Grundstruktur des Zielmoleküls entstand dabei mit hoher Diastereoselektivität (*endo:exo*-Verhältnis 91:9; Verhältnis der *endo*-Isomere 95:5; *endo:endo':exo:exo'* 87:4:8.9:0.1, bestimmt durch $^1\text{H-NMR}$ -Spektroskopie nach Hydrolyse der Acetale und Abspaltung der erhaltenen Aldehyde von der festen Phase durch Olefin-Metathese). Struktur und Konfiguration wurden durch Vergleich mit Literaturdaten bestimmt.^[6d, 7]



Scheme 3. Festphasensynthese von **16**. a) EtPPh_3I , $n\text{BuLi}$, **11**, THF, RT, 16 h, dann $n\text{BuLi}$, 0°C , 2 h; b) Trimethylsilyltrifluormethansulfonat, Dichlormethan, -78°C , 7 h; c) *p*-Toluolsulfonsäure, Aceton, Dichlorethan, H_2O , Δ , 20 h; d) $\text{Ph}_3\text{PCH}_2\text{OMeCl}$, KO^tBu , THF, RT, 4 h; e) Pyridinium-*p*-toluolsulfonat, THF, 1% H_2O , Δ , 16 h; f) 3-Bromfuran, $n\text{BuLi}$, THF, -78°C , 5 h; g) O_2 , EtPr_2N , Bengalrosa, $h\nu$, Dichlormethan, -78°C , 5 h, dann RT, 10 min; h) $[(\text{PCy}_3)_2\text{Cl}_2\text{Ru}=\text{CHPh}]$ ($2 \times 10 \text{ Mol-\%}$), Dichlormethan, RT, 16 h.

Nach der Hydrolyse des Acetals wurde die Kohlenstoffkette von **13** durch Wittig-Reaktion mit $\text{Ph}_3\text{PCH}_2\text{OMeCl}$ und anschließende Hydrolyse des Methylenolethers unter Bildung von **14** verlängert. Die nucleophile Addition von 3-Lithiofuran an **14** ergab ein 2:1-Gemisch der epimeren Alkohole **15** (bestimmt durch GC-MS).

Die Furan-Einheit wurde in Gegenwart von Hünig-Base mit Singulett-Sauerstoff zum γ -Hydroxybutenolid-Einheit oxidiert. Schließlich gelang die Abspaltung der Syntheseprodukte vom polymeren Träger unter sehr milden Bedingungen durch Olefin-Metathese mit dem Grubbs-Katalysator.^[9]

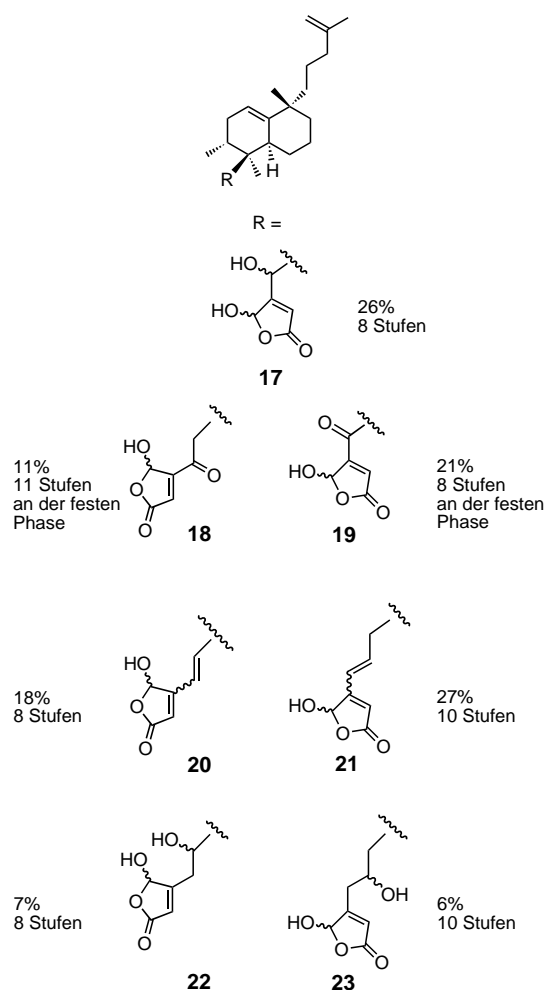
6-*epi*-Dysidiolid **16** und vier weitere Diastereomere konnten durch Flash-Chromatographie gereinigt und durch semi-präparative HPLC an SiO_2 getrennt werden (98 % *n*-Hexan, 2 % 2-Propanol). Die analytischen Daten ($^1\text{H-NMR}$, $^1\text{H-}^1\text{H-COSY}$, IR, HR-MS) bestätigen die in Schema 1 gezeigte Struktur und sind analog zu den Daten, die für den Naturstoff bestimmt wurden.

Die Synthesesequenz von der Anbindung von **8** an die feste Phase bis zur Ablösung von **16** umfasst insgesamt elf chemische Schritte und macht das gewünschte Naturstoffderivat mit einer Gesamtausbeute von 14 %, d.h. mit einer durchschnittlichen Ausbeute von 84 % pro Stufe, zugänglich. Von einem Gramm Harz mit einer Beladung von 1.1 mmol g^{-1} können so bis zu 48 mg des gewünschten Produkts erhalten werden.

Mit der entwickelten Synthesestrategie wurde ausgehend von den intermediär gebildeten Aldehyden **13** und **14** eine kleine Bibliothek von sieben Analoga synthetisiert. So wurde **17** (Schema 4) mit einer kürzeren Kohlenstoffkette durch Addition von 3-Lithiofuran an **13** und anschließende Oxidation des Furanrings hergestellt. **18** und **19** wurden durch Oxidation der sekundären Alkohole **16** bzw. **17** mit *o*-Iodoxybenzoesäure (IBX) nach Abspaltung von der festen Phase erhalten. Die Synthese von **20** und **21** gelang durch Wittig-Reaktion von **13** bzw. **14** mit dem aus 3-Furylmethyltriphenylphosphoniumbromid gebildeten Ylid und nachfolgende Oxidation mit Singulett-Sauerstoff. **22** und **23** wurden durch Addition von 3-Furylmethylmagnesiumbromid an die Carbonylgruppe und anschließende Oxidation des aromatischen Rings erhalten. Die Gesamtausbeuten bei den Synthesen von **17–23** betrugen 6–27 %.

Diese Ergebnisse zeigen, dass vielstufige Totalsynthesen von Naturstoffen und Analoga an der festen Phase prinzipiell durchführbar sind. Die Umsetzungen, die in den oben beschriebenen Synthesen angewendet wurden, umfassen eine breite Palette von gängigen Reaktionen, z.B. die asymmetrische Diels-Alder-Cycloaddition unter Verwendung einer chiralen Hilfsgruppe, verschiedene metallorganische Reaktionen, Olefinierungsreaktionen, verschiedene Oxidationsreaktionen, die saure Hydrolyse von Acetalen und Enolethern und die nucleophile Substitution.

Um zu prüfen, ob die Festphasensynthese mit hoher Trefferquote biologisch aktive Naturstoffanaloga geliefert hatte, wurden **16–23** als Inhibitoren der Protein-Phosphatase Cdc25C und in zellulären Cytotoxizitätstests untersucht. Von der Cdc25-Phosphatase-Familie wurde Cdc25C ausgewählt, da **16** bereits als Inhibitor von Cdc25A und Cdc25B untersucht wurde und damit ein Vergleich der Daten möglich wird.^[10]



Schema 4. Durch Festphasensynthese erhaltene Dysidiolid-Analoga.

Die in Tabelle 1 zusammengefassten Ergebnisse des Phosphatase-Assays zeigen, dass alle Dysidiolid-Analoga Cdc25C im niedrigen mikromolaren Bereich mit einem um den Faktor 20 variierenden IC_{50} -Wert inhibieren. Der IC_{50} -Wert von $5.1 \mu\text{M}$ für die Inhibition von Cdc25C durch **16** ist erheblich niedriger als der für Cdc25A ($13 \mu\text{M}$) und Cdc25B ($18 \mu\text{M}$). Darüber hinaus weist die aktivste Verbindung in diesem Enzymtest, **18**, einen IC_{50} -Wert im hohen nanomolaren Bereich auf (800 nM) und ist 6.4 mal aktiver als **16**. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass eine Selektivität zwischen den verschiedenen Phosphatasen, insbesondere zwischen den drei Mitgliedern der Cdc25-Familie, durch Dysidiolid-Analoga und davon abgeleitete Verbindungen erreicht werden kann. Die Daten zeigen außerdem, dass starke Veränderungen bestimmter struktureller Details des Naturstoffs toleriert und Inhibitoren mit signifikant gesteigerter Wirksamkeit erhalten werden können. So führt der Ersatz der Hydroxyethyl-Brücke zwischen dem anellierten Ringsystem des Grundgerüsts und der Hydroxybutenolid-Einheit in **16** durch eine ungesättigte C_3 -Einheit (siehe **21**) oder Einführung einer Keto-Funktion (siehe **18** und **19**) zu wirksameren Inhibitoren von Cdc25C.

Die synthetischen Dysidiolid-Analoga zeigten erhebliche und variierende biologische Aktivität in einem Cytotoxizitätstest^[11] an der Dickdarmkrebs-Zelllinie SW480 (Tabelle 1).

Tabelle 1. Ergebnisse der Inhibition von Cdc25C und der Cytotoxizitätstests mit den Dickdarmtumor-Zelllinien SW480 und HCT116, der Prostatakrebs-Zelllinie PC3 und der Brustkrebs-Zelllinie MDA-MB231.

Verbindung	Cdc25C ^[a] IC ₅₀ [μM]	SW480 ^[b] IC ₅₀ [μM]	HCT116 ^[c] IC ₅₀ [μM]	PC3 ^[c] IC ₅₀ [μM]	MDA-MB231 ^[c] IC ₅₀ [μM]
16	5.1	4	1.2	1	1.6
17	16	1			
18	0.8	> 33	15	> 20	> 10
19	1.5	20	11	13	> 10
20	6.8	4			
21	2.4	2			
22	6.1	> 33			
23	9	> 33			

[a] Für den Phosphataseassay wurden 5 μL einer Inhibitorlösung in DMSO zu einer Lösung von 0.2 μg rekombinantem Cdc25C-Protein in 85 μL Puffer gegeben (50 mM TRIS-HCl, pH 8.0, 100 mM NaCl, 1 mM Dithiothreitol, 1 mM EDTA und 10% DMSO). Nach 30 min Inkubation bei 30 °C wurde das Substrat Fluoresceindiphosphat bis zu einer Endkonzentration von 1 μM zugegeben. Die Platten wurden nach einer Reaktionszeit von 30 min bei 485/535 nm (ex/em.) gemessen. Orthovanadat (IC₅₀ = 0.1 μM) wurde als Referenz verwendet. [b] Die Zellen wurden mit den Substanzen bei Konzentrationen von 1.2–100 μM drei Tage inkubiert. Die Menge der überlebenden Zellen wurde mit Thiazolylblau-Tetrazoliumbromid bestimmt. Lebende Zellen reduzieren die Tetrazolium-Einheit durch eine mitochondriale Dehydrogenase von einem anfangs gelblichen zu einem tief violetten Farbstoff, der bei 570 nm gemessen wird. [c] Die Assays wurden mit einem CytoTox-96-Cytotoxicity-Assay-Kit der Promega Corporation, USA, durchgeführt. In einer 96-Loch-Mikrotiterplatte mit flachem Boden wurden 3000 Zellen pro Loch mit den Verbindungen bei Konzentrationen von 0.033–10 μM drei Tage inkubiert. Die Zellen wurden lysiert und die zelluläre Lactat-Dehydrogenase-Aktivität gemessen, die quantitativ die Anzahl der lebenden Zellen widerspiegelt.

Vier von acht untersuchten Verbindungen wiesen IC₅₀-Werte im sehr niedrigen mikromolaren Bereich und Antitumoraktivität auf. In diesem zellulären Test war **17** mit einer verkürzten Kohlenstoffkette die aktivste Verbindung. Dagegen waren **18** und **19**, die die niedrigsten IC₅₀-Werte im Phosphatase-Assay gezeigt hatten, sowie **22** und **23**, bei denen die Hydroxygruppe zwischen der Hydroxybutenolid-Gruppe und dem Grundgerüst von Dysidiol an unterschiedlicher Stelle steht, wesentlich weniger aktiv.

Dieser Trend konnte ebenso bei Cytotoxizitätstests von **18** und **19** sowie von **16** mit der Dickdarmkrebs-Zelllinie HCT116, der Prostatakrebs-Zelllinie PC3 und der Brustkrebs-Zelllinie MDA-MB231 beobachtet werden. **18** und **19** waren wieder wesentlich weniger aktiv als **16**, das die Zellproliferation in allen drei Fällen mit IC₅₀-Werten im sehr niedrigen mikromolaren Bereich inhibiert.

Diese Ergebnisse belegen, dass die kleine Bibliothek von Naturstoffanaloga bereits potente Verbindungen mit signifikant unterschiedlicher biologischer In-vitro- und In-vivo-Aktivität enthält. Die Beobachtung, dass die Reihenfolge der IC₅₀-Werte, die durch den Enzym-Assay bestimmt wurden, nicht notwendigerweise mit dem Ergebnis des zellulären Assays korrelieren, ist nicht ungewöhnlich.

Eingegangen am 31. August 2001 [Z17833]

- [1] Yu. I. Wolf, N. V. Grishin, E. V. Koonin, *J. Mol. Biol.* **2000**, 299, 897–905.
 [2] S. L. Schreiber, *Science* **2000**, 287, 1964–1969.
 [3] Aktuelle Übersicht: D. G. Hall, S. Manku, F. Wang, *J. Comb. Chem.* **2001**, 3, 125–150.

- [4] a) K. C. Nicolaou, N. Winssinger, J. Pastor, S. Ninkovic, F. Sarabia, Y. He, D. Vourloumis, Z. Yang, T. Li, P. Giannakakou, E. Hamel, *Nature* **1997**, 387, 268–272; b) K. C. Nicolaou, D. Vourloumis, T. Li, J. Pastor, N. Winssinger, Y. He, S. Ninkovic, F. Sarabia, H. Vallberg, F. Roschangar, N. P. King, M. R. V. Finlay, P. Giannakakou, P. Verdierpinard, E. Hamel, *Angew. Chem.* **1997**, 109, 2181–2187; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1997**, 36, 2097–2103.
 [5] G. Draetta, J. Eckstein, *Biochim. Biophys. Acta* **1997**, 1332, M53–M63.
 [6] a) E. J. Corey, B. E. Roberts, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, 119, 12425–12431; b) S. R. Magnuson, L. Sepp-Lorenzino, N. Rosen, S. J. Danishefsky, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, 120, 1615–1616; c) J. Boukouvalas, Y.-X. Cheng, J. Robichaud, *J. Org. Chem.* **1998**, 63, 228–229; d) M. Takahashi, K. Dodo, Y. Hashimoto, R. Shirai, *Tetrahedron Lett.* **2000**, 41, 2111–2114; e) M. Jung, N. Nishimura, *Org. Lett.* **2001**, 3, 2113–2115; f) E. Piers, S. Caillé, G. Chen, *Org. Lett.* **2000**, 2, 2483–2486; g) D. Demeke, C. J. Forsyth, *Org. Lett.* **2000**, 2, 3177–3179; h) H. Miyaoka, Y. Kajiwar, Y. Yamada, *Tetrahedron Lett.* **2000**, 41, 911–914; i) J. W. Eckstein, *Invest. New Drugs* **2000**, 18, 149–156.
 [7] D. Brohm, H. Waldmann, *Tetrahedron Lett.* **1998**, 39, 3995–3998.
 [8] T. Sammakia, M. A. Berliner, *J. Org. Chem.* **1994**, 59, 6890–6891.
 [9] P. Schwab, M. B. France, J. W. Ziller, R. H. Grubbs, *Angew. Chem.* **1995**, 107, 2197–2181; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1995**, 34, 2039–2041.
 [10] M. Takahashi, K. Dodo, Y. Sugimoto, Y. Aoyagi, Y. Yamada, Y. Hashimoto, R. Shirai, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2000**, 10, 2571–2574.
 [11] T. Mosman, *J. Immunol. Methods* **1983**, 65, 55–63.

Durch Selbstorganisation zu hybriden Metallacoronaten oder eindimensionalen, oxoverbrückten Metallsträngen – Koordinationszahl-gesteuerte Produktbildung**

Rolf W. Saalfrank,* Harald Maid, Nicolai Mooren und Frank Hampel

Professor Kenneth N. Raymond zum 60. Geburtstag gewidmet

Fortschritte beim Design und bei der Synthese supramolekularer anorganischer Strukturen mit neuartigen Eigenschaften eröffnen faszinierende Perspektiven.^[1] So haben wir bereits über die templatvermittelte Selbstorganisation berichtet, die ausgehend von Dialkylketipinaten H₂L¹ zu dreigliedrigen Kupfercoronaten **1** und Metallsandwichkomplexen **2** führt (Schema 1).^[2] In diesen Komplexen werden die Alkali- oder Erdalkalimetallionen von den inneren Carbonsäurestoffatomen koordiniert.

[*] Prof. Dr. R. W. Saalfrank, Dr. H. Maid, Dipl.-Chem. N. Mooren, Dr. F. Hampel
 Institut für Organische Chemie der Universität Erlangen-Nürnberg
 Henkestraße 42, 91054 Erlangen (Deutschland)
 Fax: (+49) 9131-852-1165
 E-mail: saalfrank@organik.uni-erlangen.de

[**] Chelatkomplexe, 20. Mitteilung. Diese Arbeit wurde von der Deutschen Forschungsgemeinschaft (Sa 276/25-1, SFB 583, GK 312), dem Bayerischen Langzeitprogramm *Neue Werkstoffe* und dem Fonds der Chemischen Industrie gefördert. N.M. dankt der Studienstiftung des deutschen Volkes für ein Stipendium. C. Zapf danken wir für die in seiner Diplomarbeit dokumentierte Pionierarbeit. – 19. Mitteilung: R. W. Saalfrank, H. Glaser, B. Demleitner, F. Hampel, M. M. Chowdhry, V. Schünemann, A. X. Trautwein, G. B. M. Vaughan, R. Yeh, A. V. Davis, K. N. Raymond, *Chem. Eur. J.* **2002**, 8, 493–497.