

Naturstoffanaloga als Tyrosinkinaseinhibitoren: Identifikation von IGF1R-, Tie-2- und VEGFR-3-Inhibitoren**

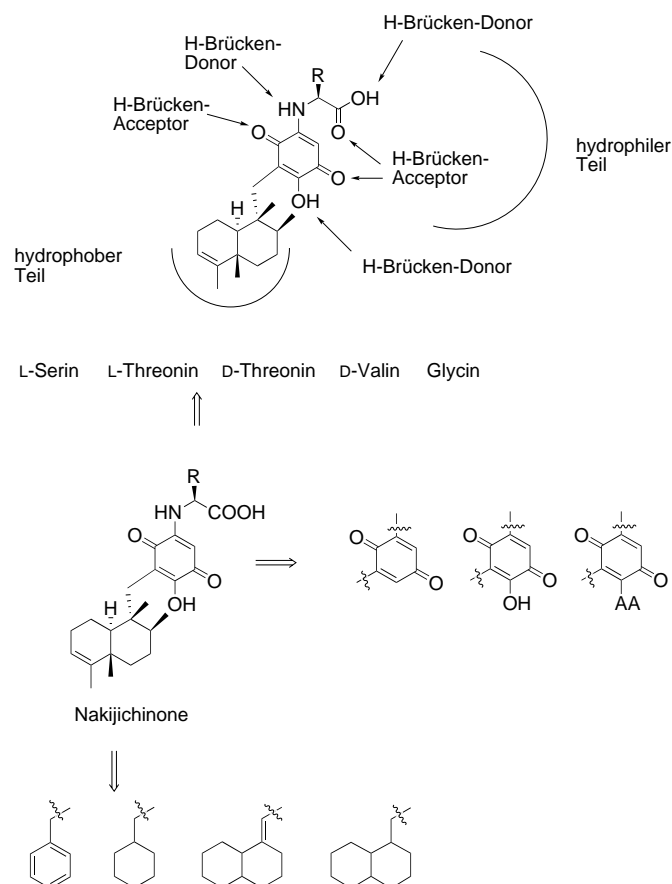
Petra Stahl, Lars Kissau, Ralph Mazitschek, Athanassios Giannis* und Herbert Waldmann*

Angiogenese, die Entwicklung neuer Blutgefäße aus bestehenden, ist für Wundheilung, Entzündungsprozesse und die embryonale Entwicklung von zentraler Bedeutung. Fehlgesteuerte Angiogenese gilt als Schlüsselschritt bei Tumorstadium, -ausbreitung und Metastasenbildung.^[1, 2] Die Gefäßneubildung hängt von Endothel-spezifischen Rezeptortyrosinkinasen ab, insbesondere von den VEGF-Rezeptoren 1–3 und dem Tie-2-Rezeptor.^[3] Alle diese Rezeptortyrosinkinasen wurden mit tumorbedingter Angiogenese in Verbindung gebracht.^[4–8] Die Antagonisierung von Tie-2, VEGFR-2 oder VEGF-D, einem Liganden von VEGFR-3, inhibiert Tumorstadium und Metastasierung *in vivo*.^[7, 9, 10] Die Entwicklung niedermolekularer Inhibitoren dieser Rezeptortyrosinkinasen ist einer der vielversprechendsten Ansätze zur Entwicklung neuer, alternativer Tumorthapeutika, und einige VEGFR-2-Inhibitoren sind in klinischer Entwicklung.^[11, 12] Bei Kombination von VEGFR-2-Inhibitoren mit Tie-2-Antagonisten sollte sich deren antiangiogene Wirkung potenzieren.^[6] Zusätzlich würden VEGFR-3-Inhibitoren lymphogene Tumormetastasierung unterdrücken. Allerdings sind bis heute nur vereinzelte Beispiele niedermolekularer Inhibitoren des Tie-2-Rezeptors und von VEGFR-3 bekannt.^[13] Wir beschreiben hier die Identifizierung von Inhibitoren dieser Proteine aus einer Substanzbibliothek, die von einem Naturstoff abgeleitet wurde.

Wir haben kürzlich ein neues Konzept zur Steigerung der Effizienz bei der Leitstruktursuche mithilfe der Kombinatorischen Chemie vorgestellt.^[14] Das grundlegende Prinzip dieses neuen Konzepts ist, Naturstoffe mit bekannter biologischer Aktivität als biologisch validierte Startpunkte im Strukturraum zu betrachten, die im Verlauf der Evolution für die Bindung an strukturell konservierte aber dennoch gene-

tisch mobile Proteindomänen selektiert wurden. Das Gerüst solcher Naturstoffe kann danach als Leitstruktur für die Entwicklung relativ kleiner Substanzbibliotheken dienen, die deutlich höhere Trefferquoten liefern sollten als sehr große Bibliotheken, die ausschließlich auf der Basis bekannter zuverlässiger Reaktionen aufgebaut wurden.

Auf der Grundlage dieses Konzepts synthetisierten wir eine Bibliothek von 56 Analoga der Nakijichinone (Schema 1), die einzigen als Her-2/Neu-Rezeptortyrosinkinaseinhibitoren bekannten Naturstoffe,^[15] und untersuchten diese Analoga als mögliche Inhibitoren von Rezeptortyrosinkinasen, die an der Angiogenese beteiligt sind.



Schema 1. Struktur der Nakijichinone und Plan für die Synthese von Nakijichinon-Analoga.

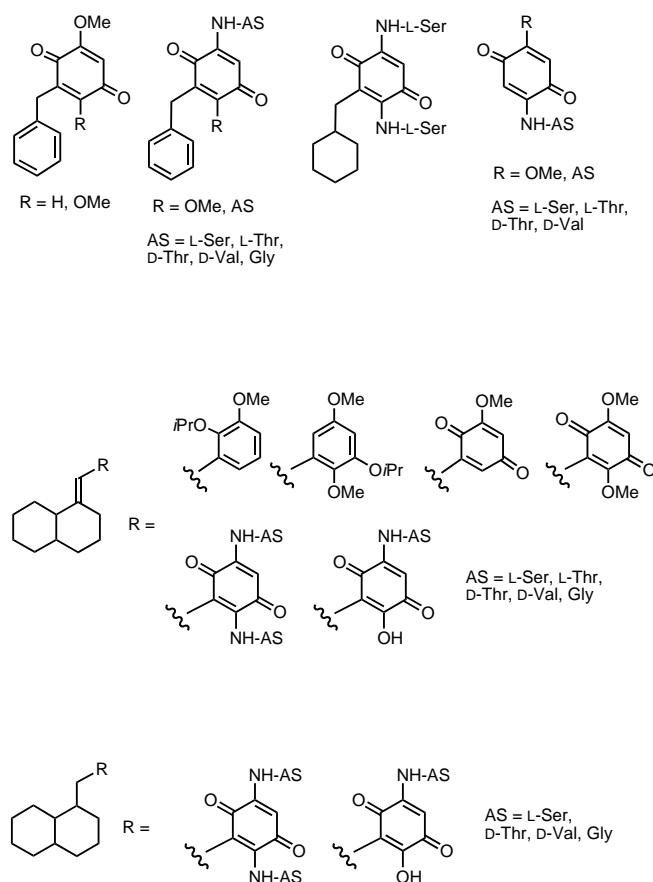
Die Nakijichinon-Analoga wurden anhand des modularen Aufbaus der Naturstoffe entworfen. Sie bestehen aus einer hydrophoben Diterpeneinheit, die möglicherweise mit einer hydrophoben Tasche in der Nähe der ATP-Bindungsstelle wechselwirkt,^[12] einer chinoiden Unterstruktur und einer Aminosäure. Letztere Strukturelemente könnten Wasserstoffbrücken in der ATP-Bindungstasche ausbilden. Folglich wurde die Diterpeneinheit durch einfache hydrophobe Strukturen ersetzt (Schema 1). Als hydrophile Aminosäuren wurden Serin und Threonin und als hydrophobe Valin und Glycin ausgewählt; zusätzlich wurden ihre Konfigurationen variiert. Um die Art und Zahl der Wasserstoffbrückendonoren und -acceptoren zu modifizieren, wurden entweder zwei Amino-

[*] Prof. Dr. H. Waldmann, Dr. P. Stahl, Dipl.-Chem. L. Kissau
Max-Planck-Institut für molekulare Physiologie
Abteilung Chemische Biologie
Otto-Hahn-Straße 11, 44227 Dortmund (Deutschland)
Fax: (+49) 231-133-2499
und
Universität Dortmund, Fachbereich 3, Organische Chemie
44221 Dortmund
E-mail: herbert.waldmann@mpi-dortmund.mpg.de
Prof. Dr. A. Giannis, Dipl.-Chem. R. Mazitschek
Institut für Organische Chemie
Universität Karlsruhe
Richard-Willstätter-Allee 2, 76128 Karlsruhe (Deutschland)
Fax: (+49) 721-608-7652
E-mail: giannis@ochhades.chemie.uni-karlsruhe.de

[**] Diese Arbeit wurde vom Fonds der chemischen Industrie gefördert. R.M. dankt dem Land Baden-Württemberg für ein Landesgraduiertenstipendium. L.K. dankt der Studienstiftung des deutschen Volkes und dem Fonds der chemischen Industrie für Promotionsstipendien. IGF1R = insuline-like growth factor 1 receptor, Tie-2 = tyrosine kinase with immunoglobulin and epidermal growth factor homology domains, VEGFR-3 = vascular endothelial growth factor receptor 3.

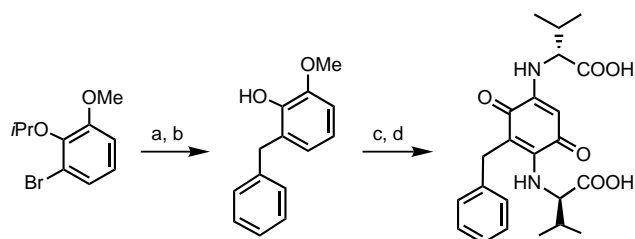
säuren, eine Aminosäure und eine Hydroxygruppe oder nur eine Aminosäure eingeführt.

In Schema 2 ist ein Großteil der synthetisierten Bibliothek gezeigt. Es wurde eine Serie von Analoga aufgebaut, in denen die Diterpeneinheit entweder durch eine Benzylgruppe, einen Cyclohexanring, eine *n*-Butylgruppe (nicht abgebildet) oder



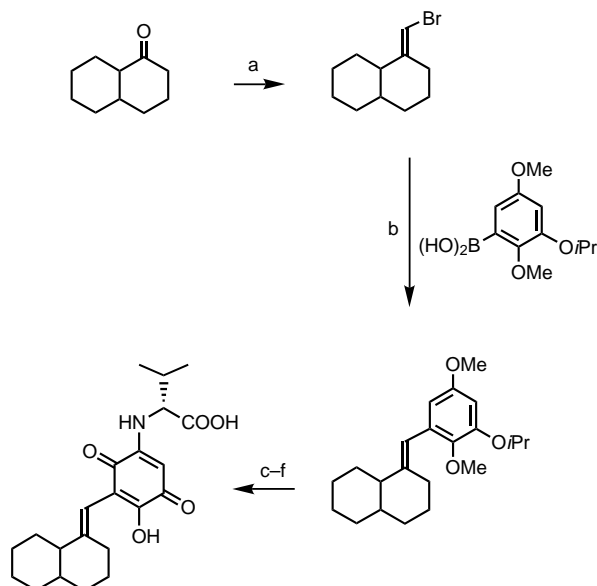
Schema 2. Charakteristische Mitglieder der Nakijichinon-Bibliothek.

durch ein Wasserstoffatom ersetzt wurde. Generell wurden diese Verbindungen von geeignet substituierten und selektiv geschützten Phenolethern über eine Reaktionssequenz aus selektiver Entschützung, Oxidation zum Chinon und Addition der Aminosäure an den entstandenen vinylogenen Ester aufgebaut (analog zu bei der Totalsynthese der Nakijichinone beschriebenen Methoden;^[15] ein repräsentatives Beispiel ist in Schema 3 aufgeführt).



Schema 3. Synthese eines Aminosäure-substituierten Chinons. a) *n*BuLi, THF, -78°C , 30 min, dann CuI, -40°C ; -78°C , Benzylbromid, THF, 55 %; b) BCl_3 , CH_2Cl_2 , 0°C , 88 %; c) O_2 , Salcomin, DMF, 70 %; d) D-Valin, NaHCO_3 , EtOH, 75 %.

Mit den gleichen aromatischen Bausteinen und unter Einsatz der bekannten Methodik zur Oxidation und Anknüpfung der Aminosäuren wurden Analoga mit Decalingerüst synthetisiert. Die Verknüpfung mit einem *trans*-Decalin-Baustein mit exocyclischer Doppelbindung gelang durch Suzuki-Kupplung von substituierten Arylboronsäuren an das vom entsprechenden Decalin abgeleitete Vinylbromid (ein Beispiel hierfür ist in Schema 4 gezeigt). Durch Reduktion der in den Produkten der Suzuki-Kupplung enthaltenen Doppelbindung wurden Analoga mit Alkylseitenketten am Decalingerüst erhalten.



Schema 4. Synthese eines Decalinanalogs der Nakijichinone; a) $\text{BrCH}_2\text{PPh}_3\text{Br}$, KOtBu, THF, $-78^{\circ}\text{C} \rightarrow \text{RT}$, 63 %; b) $[\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4]$, Toluol, EtOH, Na_2CO_3 , 90°C , 24 h, 74 %; c) BCl_3 , CH_2Cl_2 , 0°C , 89 %; d) $\text{ON}(\text{SO}_3\text{K})_2$, H_2O , Benzol, Aliquat 336, Na_2CO_3 , 78 %; e) KOH, MeOH, H_2O , 59 %; f) D-Valin, NaHCO_3 , EtOH, 56 %.

Diese Synthesen lieferten eine Bibliothek von 56 Verbindungen, die als mögliche Inhibitoren von Rezeptortyrosinkinasen getestet wurden. Die Kinasen wurden aufgrund der Diversität ihrer biologischen Aktivität ausgewählt.

Zu diesem Zweck wurden neben VEGFR-2 (KDR, flk-1) auch VEGFR-3 (flt-4), Tie-2, Her2/Neu, EGFR (ErbB-1), ErbB-2 und IGF1R ausgewählt. Das Her-2/Neu-Protoonkogen gehört zur Familie der EGF-Rezeptortyrosinkinasen. Es ist in etwa 30 % aller primären Brust-, Eierstock- und Magentumore überexprimiert.^[16] Der EGF-Rezeptor (EGF: epidermal growth factor; ErbB-1), der eng mit Her-2/Neu verwandt ist, ist in die menschliche Tumorigenese, z. B. von Glioblastoma und einer großen Zahl weiterer Tumorerkrankungen epithelialen Ursprungs einschließlich Brust- und Speiseröhrentumore, involviert.^[17] Die Wirkung des IGF-1-Rezeptors auf mitotische Prozesse, Transformation und Überleben der Zelle sowie Insulin-ähnliche Wirkung wird durch Bindung der Liganden IGF1 und IGF2 ausgeübt. Dieser Rezeptor beeinflusst die postnatale Entwicklung, und ein Zusammenhang zwischen seiner Aktivität und bösartigen Erkrankungen wie Brustkrebs wurde bereits nachgewiesen.^[18] Der durch das IGF1/IGF1R-System induzierte antiapoptoti-

sche Effekt korreliert mit der Induktion von Chemoresistenz in verschiedenen Tumoren.^[19]

Von den 56 Verbindungen, die im Kinase-Assay untersucht wurden, zeigten fünf eine inhibierende Wirkung im niedrigen mikromolaren Bereich. Die Bibliothek der Nakijichinon-Analoga enthielt keine Inhibitoren von Her-2/Neu, EGFR, ErbB-2 und VEGFR-2, die Anlass zu einer weiteren Untersuchung gegeben hätten. Bemerkenswerterweise entpuppten sich vier der untersuchten Verbindungen als Inhibitoren des Tie-2-Rezeptors (Tabelle 1). Zwei dieser Verbindungen (Einträge 1 und 2) waren selektiv für diese Kinase, d. h., die anderen Kinasen in diesem Assay wurden bei Konzentrationen von 70 μM nicht signifikant inhibiert. Angesichts dieser Ergebnisse wurden 14 weitere eng verwandte Analoga der Nakijichinone sowie die synthetischen Nakijichinone A, C und D^[15] ebenfalls als potentielle Inhibitoren der genannten Kinasen untersucht, aber kein weiterer Inhibitor wurde gefunden.

Der aktivste Inhibitor in dieser Untersuchung war das Dithreoninderivat **3** (Eintrag 3), das nicht nur Tie-2 mit einem IC_{50} -Wert von 5 μM inhibiert, sondern eine ähnliche Aktivität auch gegen VEGFR-3 zeigt. Dieses Resultat legt die Vermutung nahe, dass **3** für die Inhibition der Angiogenese generell und insbesondere für die Prävention der Lymphangiogenese von Interesse sein könnte. Darüberhinaus deutet die Funktionalisierung des zentralen Sechsrings mit zwei Aminosäuren an, dass sowohl Aktivität als auch Selektivität durch Variation der beiden Aminosäuren erreicht werden könnten.

Aus den Einträgen in Tabelle 1 ist zu erkennen, dass ein chinoides System, flankiert von einem hydrophoben Rest (Einträge 1 und 2) für die Bindung an den Rezeptor von Bedeutung ist. Dementsprechend inhibieren die **1** und **2** zugrunde liegenden Chinone ohne hydrophoben Rest weder Tie-2 noch VEGFR-3. Eine als vinyloges Amid angeknüpfte Aminosäure scheint die inhibitorische Wirkung zu verstärken, vermutlich durch das entstehende Wasser-

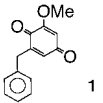
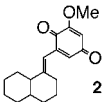
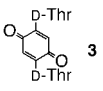
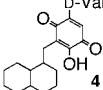
stoffbrückendonor/acceptormotiv. Bemerkenswert ist auch, dass **4** mit einem IC_{50} -Wert von 500 nM den IGF1-Rezeptor selektiv inhibiert. Das Ergebnis, dass in dieser kleinen Bibliothek von Nakijichinon-Analoga zwei IGF1R-Inhibitoren gefunden wurden, zeigt, dass diese Verbindungsklasse eine generell geeignete Leitstruktur für die Entwicklung aktiverer IGF1R-Inhibitoren darstellt.

Eine detaillierte Analyse der inhibitorischen Aktivität von **3** zeigte, dass dieser ein kompetitiver Inhibitor ist und mit ATP um die Bindungsstelle für das Nucleosidtriphosphat konkurriert. Der K_i -Wert wurde zu 3 μM , der K_M -Wert zu 19 μM bestimmt (ATP als Substrat).

Um die Selektivität beispielsweise von **4** (mit einem hydrophoben anellierten Ringsystem) zu erklären, untersuchten wir mögliche Bindungsmodi mittels Molecular Modeling. Zu diesem Zweck wurden für VEGFR-2, VEGFR-3 und Tie-2 Homologiemodelle erstellt, basierend auf den bekannten Kristallstrukturen für FGFR-1 im Komplex mit Inhibitoren (siehe Abbildung 1).^[12, 14, 20] Obwohl kürzlich eine Röntgenkristallstruktur von Tie-2 (Apoenzym) publiziert wurde,^[21] ist diese als Basis für Untersuchungen mit Molecular Modeling ungeeignet, da Rezeptortyrosinkinasen beim Binden von Liganden signifikante Konformationsänderungen eingehen.

Die Homologiemodelle für die Kinasedomänen von Tie-2, VEGFR-2 und VEGFR-3 wurden mit den Programmen CHARMM,^[22] MODELLER,^[23] WHATCHHECK^[24] und WitnotP^[25] unter Verwendung der Kristallstrukturen von FGFR-1 als Vorlage konstruiert. Die Strukturen von FGFR-1 wurden aufgrund der hohen Sequenzübereinstimmung innerhalb der Kinasedomänen mit VEGFR-3 ($\approx 51\%$), Tie-2 ($\approx 45\%$) und VEGFR-2 ($\approx 56\%$) ausgewählt. Diese Werte liegen über 30%, der unteren Grenze für ein verlässliches Homologiemodell.^[26] Zunächst wurden die Primärsequenzen mit DIALIGN^[27] an die Vorlage angepasst. Nach manueller Feinabstimmung wurde für die Fertigstellung der Homologie-

Tabelle 1. Inhibition von Rezeptortyrosinkinasen durch Nakijichinon-Analoga.

Eintrag	Verbindung	EGFR	Her-2/Neu	ErbB-2	IC_{50} für Rezeptor [μM] ^[a] IGF1R	VEGFR-2	VEGFR-3	Tie-2
1		–	–	–	–	–	–	18
2		–	–	–	–	–	–	14
3		–	–	–	6	–	3	5
4 ^[b]		–	–	–	0.5	–	–	9

[a] Zur Aktivitätsbestimmung der Inhibitoren wurde die durch Kinasen katalysierte Phosphorylierung von Poly(Glu-Tyr) bei unterschiedlichen Inhibitorkonzentrationen bestimmt. Die Kinasen wurden als Fusionsproteine der Glutathion-S-Transferase und der jeweiligen Kinasedomäne verwendet. Der Anteil an phosphoryliertem Substrat wurde mit Antiphosphotyrosin-ELISA bestimmt. Hierzu wurde ein an Meerrettichperoxidase (POD) konjugierter Antiphosphotyrosin-Antikörper verwendet. Nach Addition eines Chemolumineszenzsubstrats für POD wurden die gebundenen Antikörper anhand der Lichtemission bestimmt. [b] **4** wurde als Diastereomergemisch (nicht trennbar) getestet.

VEGFR-2	823	D	A	S	K	W	E	F	P	R	D	R	L	K	L	G	K	P	L	G	R	G	A	F	G	Q	V	I	E	A	D	A	F	G	I	D	K	T	A	T	C	R	T	V	A	V	K	M	L	K	E	G	A	T	H	S	E	H	R	A	L
VEGFR-3	834	D	A	S	Q	W	E	F	P	R	R	L	K	L	G	R	V	L	G	R	G	A	F	G	Q	V	I	E	A	S	A	F	G	I	H	K	G	S	S	C	D	T	V	A	V	K	M	L	K	E	G	A	T	A	S	E	H	R	A	L	
Tie2	814	T	I	Y	P	V	L	D	W	N	D	I	K	F	Q	D	-	V	I	G	E	G	N	F	G	Q	V	L	K	A	R	I	K	D	G	L	R	M	D	-	A	-	A	I	K	R	M	K	E	Y	A	S	K	D	D	H	R	D	F		
FGFR-1	467	E	D	P	R	W	E	L	P	R	D	R	L	V	L	G	K	P	L	G	E	G	A	F	G	Q	V	L	A	E	A	I	G	L	P	N	-	-	R	V	T	K	V	A	V	K	M	L	K	S	D	A	T	E	K	D	L	S	D	L	
VEGFR-2		M	S	E	L	K	I	L	I	H	I	G	H	L	N	V	V	N	L	L	G	A	C	T	K	P	G	G	P	L	M	V	I	V	E	F	C	K	F	G	N	L	S	T	Y	L	R	S	K	R	N	E	F	V	P	Y	-	-	-	-	
VEGFR-3		M	S	E	L	K	I	L	I	H	I	G	H	L	N	V	V	N	L	L	G	A	C	T	K	P	G	G	P	L	M	V	I	V	E	F	C	K	Y	G	N	L	S	N	F	L	R	A	K	R	D	A	F	S	P	C	A	E	K	S	
Tie2		A	G	E	L	V	L	C	K	L	G	H	H	P	N	I	I	N	L	L	G	A	C	E	H	-	R	G	Y	L	L	A	I	E	Y	A	P	H	G	N	L	D	F	L	R	K	S	R	V	L	E	T	D	P	A	F	A	I			
FGFR-1		I	S	E	M	E	M	M	K	M	I	G	K	H	K	N	I	I	N	L	L	G	A	C	T	Q	-	D	G	P	L	Y	V	I	V	E	Y	A	S	K	G	N	L	R	E	Y	L	Q	A	R	R	P	P	E	E	Q	-	-	-	-	
VEGFR-2		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-			
VEGFR-3		P	E	Q	R	G	R	F	R	A	M	V	E	L	A	R	L	D	R	R	R	P	G	S	S	D	R	V	L	F	A	R	F	S	K	T	E	G	G	A	R	R	A	S	P	D	Q	E	A	E	D	L	W	L	S	P	-	-	-	-	
Tie2		A	N	S	T	A	S	T	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-			
FGFR-1		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-			
VEGFR-2		I	T	S	S	Q	S	S	A	S	S	G	F	V	E	E	K	S	L	S	D	V	E	E	E	E	A	P	E	D	L	Y	K	D	F	L	T	L	E	H	L	I	C	Y	S	F	Q	V	A	K	G	M	E	F	L	A	S	R	K	C	I
VEGFR-3		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-			
Tie2		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-			
FGFR-1		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-			
VEGFR-2		H	R	D	L	A	A	R	N	I	L	L	S	E	K	N	V	V	K	I	C	D	F	G	L	A	R	D	I	Y	K	D	P	D	Y	V	R	K	G	D	A	R	L	P	L	K	W	M	A	P	E	T	I	F	D	R	V	Y	T	I	Q
VEGFR-3		H	R	D	L	A	A	R	N	I	L	L	S	E	S	D	V	V	K	I	C	D	F	G	L	A	R	D	I	Y	K	D	P	D	Y	V	R	K	G	S	A	R	L	P	L	K	W	M	A	P	E	S	I	F	D	K	V	Y	T	T	Q
Tie2		H	R	D	L	A	A	R	N	I	L	V	G	E	N	Y	V	A	K	I	A	D	F	G	L	S	R	G	Q	E	V	-	-	Y	V	K	K	T	M	G	R	L	P	V	R	W	M	A	I	E	S	L	N	Y	S	V	Y	T	T	Q	
FGFR-1		H	R	D	L	A	A	R	N	I	V	L	V	T	E	D	N	V	M	K	I	A	D	F	G	L	A	R	D	I	H	I	D	Y	Y	K	K	T	T	N	G	R	L	P	V	K	W	M	A	P	E	A	L	F	D	R	I	Y	T	H	Q
VEGFR-2		S	D	V	W	S	F	G	V	L	L	W	E	I	F	S	L	G	A	S	P	Y	P	G	V	K	I	D	E	E	F	C	R	R	L	K	E	G	T	R	M	R	A	P	D	Y	T	T	P	E	M	Y	Q	T	M	L	D	C	W	H	G
VEGFR-3		S	D	V	W	S	F	G	V	L	L	W	E	I	F	S	L	G	A	S	P	Y	P	G	V	K	I	D	E	E	F	C	R	R	L	K	E	G	T	R	M	R	A	P	E	L	A	T	P	A	I	R	R	I	M	L	N	C	W	S	G
Tie2		S	D	V	W	S	F	G	V	L	L	W	E	I	V	S	L	G	G	T	P	Y	C	G	M	T	C	A	E	L	Y	-	E	K	L	P	Q	G	Y	R	L	E	K	P	L	N	C	D	E	V	Y	D	L	M	R	Q	C	W	R	E	
FGFR-1		S	D	V	W	S	F	G	V	L	L	W	E	I	F	T	L	G	G	S	P	Y	P	G	V	P	V	E	E	L	F	-	K	L	L	K	E	G	H	R	M	D	K	P	S	N	C	T	N	E	L	Y	M	M	M	R	D	C	W	H	A
VEGFR-2		E	P	S	Q	R	P	T	F	S	E	L	V	E	H	L	G	N	L	L	Q	A	N	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
VEGFR-3		D	P	K	A	R	P	A	F	S	E	L	V	E	I	L	G	D	L	L	Q	G	R	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
Tie2		K	P	Y	E	R	P	S	F	A	Q	I	L	V	S	L	N	R	M	L	E	E	R	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-			
FGFR-1		V	P	S	Q	R	P	T	F	K	Q	L	V	E	D	L	D	R	I	V	A	L	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-			

Abbildung 1. Ausrichtung der Aminosäuresequenzen von VEGFR-2, VEGFR-3, Tie-2 und FGFR-1. Die Sequenzen wurden der SWISS-PROT-Datenbank entnommen (VEGFR-2: P25968, VEGFR-3: P35916, Tie-2: Q02763, FGFR-1: P11362).

modelle die „kinase insert domain“ aus den Sequenzen entfernt.

Bei der Anordnung der Inhibitoren innerhalb der ATP-Bindungstasche orientierten wir uns an unseren vorangegangenen Arbeiten^[15] und an den von Mohammadi et al.^[20] beschriebenen wichtigen Wechselwirkungen von Inhibitoren mit Rezeptortyrosinkinasen. Nach manuellem Docking wurde der Ligand-Protein-Komplex mit CHARMM energieminimiert.^[22] Gemäß diesen Untersuchungen bindet **4** am ehesten in der in Abbildung 2 gezeigten Weise. **4** inhibiert Tie-2 im niedrigen mikromolaren Bereich, zeigt aber zugleich keine inhibierende Wirkung auf VEGFR-2 oder VEGFR-3. Unserer Ansicht nach sind ungünstige Wechselwirkungen des Decalingerüsts mit C989 in VEGFR-2 (entspricht C900 in VEGFR-3 und A981 in Tie-2) sowie die Möglichkeit zur Bildung einer Wasserstoffbrücke zwischen der Carboxylatgruppe von **4** und N834 von Tie-2 (entspricht A844 in VEGFR-2 und A855 in VEGFR-3) die Ursache für die beobachtete Selektivität. Der hier vorgeschlagene Bindungsmodus von **4** ermöglicht die Bildung essentieller Wasserstoff-

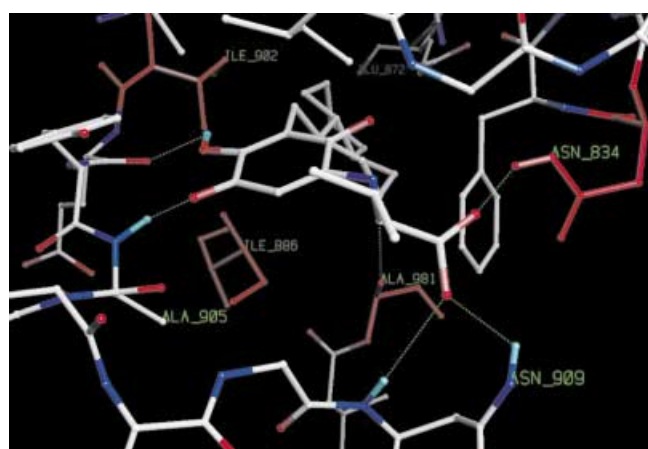


Abbildung 2. Vorgeschlagene Bindung von **4** im aktiven Zentrum von Tie-2; Seitenketten mit Einfluss auf die Selektivität sind rot gefärbt.

brücken mit E917, C919 und N909 von Tie-2. Hinzu kommt, dass durch I902 und I866 die hydrophobe Tasche in Tie-2 etwas kleiner ist als in VEGFR-2 und VEGFR-3. Das Decalingerüst füllt diese Tasche in Tie-2 besser aus als in VEGFR-2.

Wir haben gezeigt, dass eine relativ kleine Bibliothek basierend auf einem natürlichen Kinaseinhibitor weitere potente Inhibitoren für andere Kinasen mit hoher Trefferquote liefert. Dies führte zur Identifikation von IFG1R-, Tie-2- und VEGFR-3-Inhibitoren. Diese Ergebnisse könnten neue Möglichkeiten zur Unterdrückung von Angiogenese und Lymphangiogenese und für die Entwicklung neuer Tumortheraeutika eröffnen. Insbesondere stützen die Resultate unser Konzept zur Steigerung der Trefferquote in Bibliotheken und zur Verbesserung der Effizienz bei der Leitstruktursuche.^[14] Sie zeigen, dass durch die Synthese von Bibliotheken von Naturstoffanaloga ein Gegengewicht zur Variabilität der Aminosäuresequenzen von wiederholt vorkommenden Proteindomänen mit ähnlichen Strukturen geschaffen wird (in diesem Fall der Kinasedomänen); die Totalsynthese von Naturstoffen alleine hätte die gesuchten Inhibitoren nicht liefern können.

Eingegangen am 10. Oktober 2001 [Z18042]

- [1] a) J. Folkman, *Nat. Med.* **1995**, *1*, 27–31; b) A. Giannis, F. Rübsam, *Angew. Chem.* **1997**, *109*, 606–609; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1997**, *36*, 588–590.
- [2] a) J. Folkman, *N. Engl. J. Med.* **1971**, *285*, 1182–1186; b) P. Carmeliet, R. K. Jain, *Nature* **2000**, *407*, 249–257.
- [3] G. D. Yancopoulos, S. Davis, N. W. Gale, J. S. Rudge, S. J. Wiegand, J. Holash, *Nature* **2000**, *407*, 242–248; P. C. Maisonpierre, C. Suri, P. F. Jones, S. Bartunkova, S. J. Wiegand, C. Radziejewski, D. Compton, J. McClain, T. H. Aldrich, N. Papadopoulos, T. J. Daly, S. Davis, T. N. Sato, G. D. Yancopoulos, *Science* **1997**, *277*, 55–60.
- [4] S. Hiratsuka, Y. Maru, A. Okada, M. Seiki, T. Noda, M. Shibuya, *Cancer Res.* **2001**, *61*, 1207–1213.
- [5] H. Kubo, T. Fujiwara, L. Jussila, H. Hashi, M. Ogawa, K. Shimizu, M. Awane, Y. Sakai, A. Takabayashi, K. Alitalo, Y. Yamaoka, S. I. Nishikawa, *Blood* **2000**, *96*, 546–553.

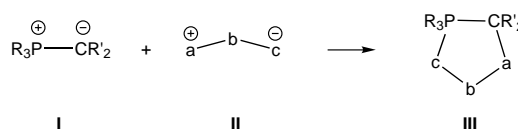
- [6] A. Stratmann, T. Acker, A. M. Burger, K. Amann, W. Risau, K. H. Plate, *Int. J. Cancer* **2001**, *91*, 273–282.
- [7] S. A. Stacker, C. Caesar, M. E. Baldwin, G. E. Thornton, R. A. Williams, R. Prevo, D. G. Jackson, S. Nishikawa, H. Kubo, M. G. Achen, *Nat. Med.* **2001**, *7*, 186–191.
- [8] M. Skobe, T. Hawighorst, D. G. Jackson, R. Prevo, L. Janes, P. Velasco, L. Riccardi, K. Alitalo, K. Claffey, M. Detmar, *Nat. Med.* **2001**, *7*, 192–198.
- [9] P. Lin, J. A. Buxton, A. Acheson, C. Radziejewski, P. C. Maisonpierre, G. D. Yancopoulos, K. M. Channon, L. P. Hale, M. W. Dewhirst, S. E. George, K. G. Peters, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1998**, *95*, 8829–8834.
- [10] J. Dreves, I. Hofmann, H. Hugenschmidt, C. Wittig, H. Madjar, M. Muller, J. Wood, G. Martiny-Baron, C. Unger, D. Marme, *Cancer Res.* **2000**, *60*, 4819–4824.
- [11] D. H. Boschelli, *Drugs Future* **1999**, *24*, 515–537.
- [12] Siehe z. B. G. Bold, K.-H. Altmann, J. Frei, M. Lang, P. W. Manley, P. Traxler, B. Wietfeld, J. Brüggen, E. Buchdunger, R. Cozens, S. Ferrari, P. Furet, F. Hofmann, G. Martiny-Baron, J. Mestan, J. Rösel, M. Sills, D. Stover, F. Acemoglu, E. Boss, R. Emmenegger, L. Lässer, E. Masso, R. Roth, C. Schlachter, W. Vetterli, D. Wyss, J. M. Wood, *J. Med. Chem.* **2000**, *43*, 2310–2323, zit. Lit.
- [13] Bei der Entwicklung von Ick-Inhibitoren wurden auch Tie-2-Inhibitoren gefunden: a) L. D. Arnold, D. J. Calderwood, R. W. Dixon, D. N. Johnston, J. S. Kamens, R. Munschauer, P. Rafferty, S. E. Ratnofsky, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2000**, *10*, 2167–2170; b) A. F. Burchat, D. J. Calderwood, G. C. Hirst, N. J. Holman, D. N. Johnston, R. Munschauer, P. Rafferty, G. B. Tometzki, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2000**, *10*, 2171–2174; VEGFR-3: V. Kirkin, R. Mazitschek, J. Krishnan, A. Steffen, J. Waltenberger, M. S. Pepper, A. Giannis, J. P. Sleeman, *Eur. J. Biochem.* **2001**, *268*, 5530–5540.
- [14] a) D. Brohm, S. Metzger, A. Bhargava, O. Müller, F. Lieb, H. Waldmann, *Angew. Chem.* **2002**, *114*, 319–323; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 307–311; b) R. Breinbauer, I. Vetter, H. Waldmann, *Angew. Chem./Angew. Chem. Int. Ed.*, im Druck.
- [15] P. Stahl, L. Kissau, R. Mazitschek, A. Huwe, P. Furet, A. Giannis, H. Waldmann, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 11586–11593. Weitere Einzelheiten zur Synthese der in dieser Arbeit beschriebenen Nakijichinon-Analoga können von den Autoren (H.W.) angefordert werden.
- [16] a) D. J. Slamon, G. M. Clark, S. G. Wong, W. J. Levin, A. Ullrich, W. L. McGuire, *Science* **1987**, *235*, 177–182; b) R. M. Hudziak, A. Ullrich, *J. Biol. Chem.* **1991**, *266*, 24109–24115; c) E. M. Dobrusin, D. M. Fry, *Annu. Rep. Med. Chem.* **1992**, *27*, 169–178.
- [17] C. Heldin, L. Rönstrand in *Oncogenes and Tumor Suppressors* (Hrsg.: G. Peters, K. Vousden), Oxford University Press, Oxford, **1997**, S. 62.
- [18] M. J. Ellis, S. Jenkins, J. Hanfelt, M. E. Redington, M. Taylor, R. Leek, K. Siddle, A. Harris, *Breast Cancer Res. Treat.* **1998**, *52*, 175–184.
- [19] A. Grothey, W. Voigt, C. Schober, T. Muller, W. Dempke, H. J. Schmoll, *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* **1999**, *125*, 166–173.
- [20] a) M. Mohammadi, J. Schlessinger, S. R. Hubbard, *Cell* **1996**, *86*, 577–587; b) M. Mohammadi, G. McMahon, L. Sun, C. Tang, P. Hirth, B. K. Yeh, S. R. Hubbard, J. Schlessinger, *Science* **1997**, *276*, 955–960; c) M. Mohammadi, S. Froum, J. M. Hamby, M. C. Schroeder, R. L. Panek, G. H. Lu, A. V. Eliseenkova, D. Green, J. Schlessinger, S. R. Hubbard, *EMBO J.* **1998**, *17*, 5896–5904.
- [21] L. M. Shewchuk, A. M. Hassell, B. Ellis, W. D. Holmes, R. Davies, E. L. Horne, S. H. Kadwell, D. D. McKee, J. T. Moore, *Structure* **2000**, *6*, 1105–1113.
- [22] B. R. Brooks, R. E. Brucoleri, B. D. Olafson, D. J. States, S. Swaminathan, M. Karplus, *J. Comput. Chem.* **1983**, *4*, 187–217.
- [23] A. Sali, T. L. Blundell, *J. Mol. Biol.* **1993**, *234*, 779–815.
- [24] a) G. Vriend, *J. Mol. Graph.* **1990**, *8*, 52–56; b) R. W. W. Hooft, G. Vriend, C. Sander, E. E. Abola, *Nature* **1996**, *381*, 272.
- [25] WitnotP ist eine von A. Widmer, Novartis AG, entwickelte Molecular-Modeling-Software. Sie wurde hauptsächlich als graphische Schnittstelle für die Erstellung von Dateien für CHARMM-Minimierungen und von Bildern verwendet.
- [26] M. A. Marti-Renom, A. C. Stuart, A. Fiser, R. Sanchez, F. Melo, A. Sali, *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **2000**, *29*, 291–325.
- [27] B. Morgenstern, *Bioinformatics* **1999**, *15*, 211–218.

Intramolekulare [3+2]-Cycloaddition eines Nitriliumphosphan-Ylid-Komplexes an die P-Phenylgruppe eines Wittig-Ylides**

Nils Hoffmann, Peter G. Jones und Rainer Streubel*

Professor Masaaki Yoshifuji zum 60. Geburtstag gewidmet

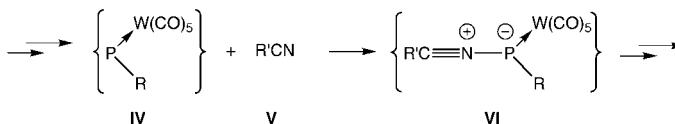
Wittig-Ylide^[1,2] des Typs $R_3P=CR'_2$ **I** zählen zu den meistverwendeten und daher am besten untersuchten Phosphorverbindungen in der Organischen Synthese. So sind z. B. Cycloadditionen von **I** mit 1,3-Dipolen **II** klassische Reaktionen der Heterocyclenchemie. In der Regel verlaufen solche Reaktionen glatt und führen zu Phosphor(v)-Fünfringheterocyclen **III** (Schema 1).^[1] Bislang sind weder Cycloadditionen an eine P-gebundene Phenylgruppe der Wittig-Ylide, in denen Erstere als 2π -Cycloadditionskomponente reagiert, noch solche an andere Benzol-Derivate bekannt.^[3] Cyclo-metallierungen von P-Phenyl-Wittig-Ylid-Derivaten sind hingegen bekannt, wenn auch selten, und wurden z. B. bei Reaktionen mit Zirkonium-^[4] und Platin-Komplexen^[5] beschrieben.



Schema 1. Cycloaddition von Wittig-Yliden mit 1,3-Dipolen (R, R' = beliebige organische Substituenten; a, b, c = Elementorganylfragmente).

Nitriliumphosphan-Ylid-Komplexe **VI**, deren intermediäres Auftreten wir durch Abfangreaktionen nachweisen konnten,^[6] sind mittlerweile ein etabliertes 1,3-Dipolsystem in der Heterocyclenchemie.^[7–9] Vor kurzem fanden wir mit der 1,1-Addition von elektrophilen terminalen Phosphandiyl-Komplexen **IV** an Nitrile **V** durch die Verwendung von 7-Phosphanornbornadien-Komplexen^[10,11] einen weiteren Zugang zu **VI** (Schema 2), sodass das präparative Potential von **VI** deutlich vergrößert werden konnte.

Wir suchen seit einiger Zeit nach Möglichkeiten, zu kinetisch stabilisierten Nitriliumphosphan-Ylid-Komplexen zu gelangen, um deren Eigenschaften studieren zu können.



Schema 2. Bildung von Nitriliumphosphan-Ylid-Komplexen durch 1,1-Addition von elektrophilen terminalen Phosphandiyl-Komplexen mit Nitrilen (R, R' = beliebige organische Substituenten).

[*] Prof. Dr. R. Streubel, Dipl.-Chem. N. Hoffmann, Prof. Dr. P. G. Jones
 Institut für Anorganische und Analytische Chemie
 Technische Universität Braunschweig
 Postfach 3329, 38023 Braunschweig (Deutschland)
 Fax: (+49) 531-391-5387
 E-mail: r.streubel@tu-bs.de

[**] Diese Arbeit wurde von der Deutschen Forschungsgemeinschaft und dem Fonds der Chemischen Industrie gefördert. Für die Durchführung der Röntgenstrukturanalyse danken wir Andreas Weinkauf.