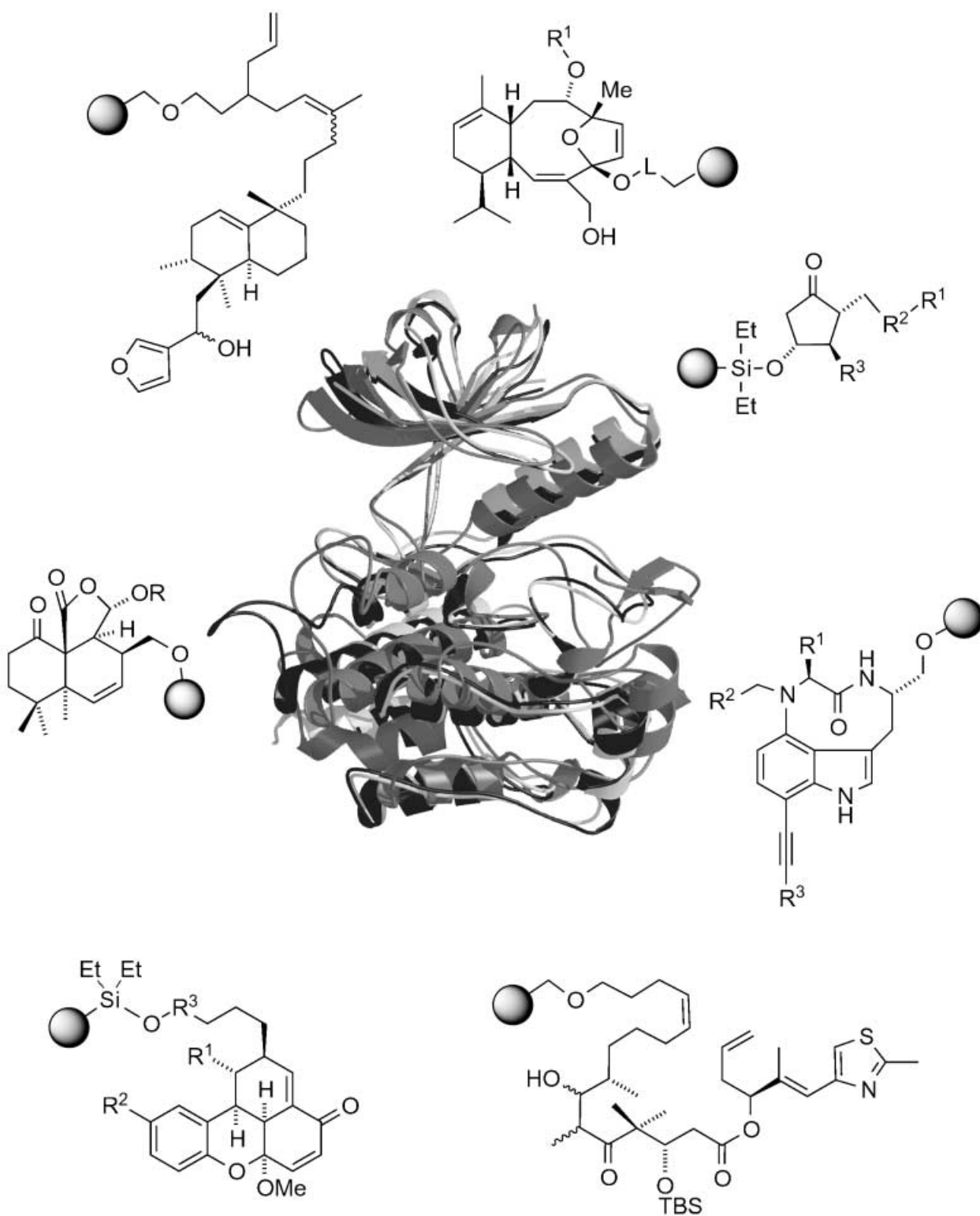


Von Proteindomänen zu Wirkstoffkandidaten



Von Proteindomänen zu Wirkstoffkandidaten – Naturstoffe als Leitstrukturen für das Design und die Synthese von Substanzbibliotheken

Rolf Breinbauer, Ingrid R. Vetter und Herbert Waldmann*

Die Kombinatorische Chemie hat sich bei der unermüdlichen Suche nach kleinen Molekülen, die die Funktion von Proteinen beeinflussen und letztlich zu neuen Medikamenten führen sollen, als eine sehr wirkungsvolle Methode profiliert. Entgegen der ursprünglichen Erwartung, dass große Substanzbibliotheken zu einer großen Anzahl an Treffern und neuen Leitstrukturen führen, hat sich gezeigt, dass die biologische Relevanz, das Design und die Diversität einer Substanzbibliothek von wesentlich größerer Bedeutung sind. Da die Gesamtheit der denkbaren chemischen Ver-

bindungen unendlich groß ist, stellt sich die Frage nach biologisch validierten Startpunkten für das Bibliotheksdesign. Die Natur selbst gibt eine Antwort: Naturstoffe wurden durch die Evolution darauf selektioniert, an Proteine zu binden. Ergebnisse aus der Strukturbiochemie und Bioinformatik belegen, dass die Anzahl an unterschiedlichen Proteinfamilien und Faltungstypen begrenzt ist. Diese strukturelle Selbstbeschränkung der Natur kann für das Design von biologisch relevanten Molekülen genutzt werden, die sich von an die Proteindomänen bindenden Naturstoffen ableiten las-

sen. Die Fortschritte bei der organischen Festphasensynthese ermöglichen es nun, kombinatorische Substanzbibliotheken auf der Basis komplexer Naturstoffe aufzubauen. Es sollten daher durch die von Naturstoffen inspirierten kombinatorischen Synthesen Leitstrukturen mit höherer Trefferquote und besserer Qualität auffindbar sein.

Stichwörter: Bioorganische Chemie • Festphasensynthesen • Kombinatorische Chemie • Naturstoffe • Proteinstrukturen

1. Einführung

Die Vollendung des Humangenomprojekts hat die „Karte“ skizziert, der man sich zukünftig bedienen wird, um ein vollständiges Verständnis der zellulären Prozesse auf molekularer Ebene zu erlangen. Insbesondere die Art, Funktion und Menge der Proteine, die unter bestimmten Bedingungen in einer Zelle exprimiert werden (Proteomik), ihr Zusammenspiel und ihre Wechselwirkung mit supramolekularen

Strukturen wie Membranen oder dem Cytoskelett sind von größtem Interesse. Seit kurzem gibt es Bemühungen, die Strukturen aller gefalteten Proteine, die vom menschlichen Genom exprimiert/kodiert werden, durch Röntgenkristallographie oder Kernresonanzspektroskopie zu bestimmen (strukturelle Genomik).^[1] Die Strukturbestimmung ist für das Verständnis der Proteinfunktion essentiell und wird an das Endziel heranführen: Die Funktion aller Proteine durch kleine Moleküle zu beeinflussen, welche ein spezifisches Protein entweder selektiv inhibieren oder aktivieren.^[2] Die Kombinatorische Chemie wird die Methode der Wahl sein, um diese große Aufgabe anzugehen. In diesem Aufsatz sammeln wir Argumente für die These, dass im unendlichen „Strukturraum“ denkbarer chemischer Verbindungen^[3] Naturstoffe einfach zugängliche, biologisch validierte Startpunkte für das Design von Substanzbibliotheken sind. Dabei werden Naturstoffe definiert als alle chemischen Verbindungen mit niedrigem Molekulargewicht, die von biologischen Organismen gebildet werden. Mit solchen von Naturstoffen inspirierten Bibliotheken sollte es möglich sein, Leitstrukturen mit einer höheren Trefferwahrscheinlichkeit und von besserer Qualität zu finden, wenn diese Bibliotheken in Hochdurchsatz-Screening-Prozessen eingesetzt werden.^[4, 5]

[*] Prof. Dr. H. Waldmann, Dr. R. Breinbauer
Max-Planck-Institut für molekulare Physiologie
Abteilung für Chemische Biologie
Otto-Hahn-Straße 11, 44227 Dortmund (Deutschland)
Fax: (+49) 231-133-2499
und
Universität Dortmund
Fachbereich 3, Organische Chemie
44221 Dortmund (Deutschland)
E-mail: herbert.waldmann@mpi-dortmund.mpg.de
Dr. I. R. Vetter
Max-Planck-Institut für molekulare Physiologie
Abteilung für Strukturbiochemie
Otto-Hahn-Straße 11, 44227 Dortmund (Deutschland)

1.1. Ernüchterung beim Design von kombinatorischen Bibliotheken

Der zu Beginn der 90er Jahre des letzten Jahrhunderts vorherrschende Enthusiasmus für die Kombinatorische Chemie als Methode in der pharmazeutischen Forschung wurde am Ende des Jahrtausends enttäuscht. Die ursprüngliche Hoffnung erfüllte sich nicht, dass mit der Synthese von Substanzbibliotheken, welche Millionen von Verbindungen enthalten, ähnlich viele oder sogar mehr Wirkstoffkandidaten erhalten werden als durch historische Substanzsammlungen pharmazeutischer Unternehmen und sich damit das Problem der Leitstruktursuche lösen lässt. Ganz im Gegenteil: einige dieser Bibliotheken enthielten fast keine Leitstruktur. Offensichtlich waren die den einzelnen Bibliothekssubstanzen zu

Grunde liegenden Strukturen biologisch nicht relevant. Rasch wurde deutlich, dass nicht die Anzahl der Substanzen die Qualität einer Bibliothek bestimmt, sondern die „Diversität“^[4] und die „Wirkstoff-Ähnlichkeit“ der Verbindungen^[6, 7] – qualitative Parameter, die es heute im Bibliotheksdesign zu berücksichtigen gilt.

Wegen dieser desillusionierenden Erfahrungen bemühte man sich intensiv, effiziente Leitprinzipien zu finden, die die Qualität und die biologische Relevanz von Bibliotheken verbessern und damit zu hohen Trefferzahlen führen. Im Zentrum solcher Entwicklungskonzepte steht das Identifizieren von Verbindungsklassen, deren Strukturen schon biologisch validiert wurden, die durch Synthese zugänglich sind und kombinatorisch variiert werden können, wobei dafür das Grundgerüst dieser Verbindungsklassen als Basis dient. Hier

Herbert Waldmann, geb. 1957, promovierte 1985 bei Prof. H. Kunz an der Universität Mainz. Nach einem Postdoc-Aufenthalt an der Harvard University bei G. Whitesides und seiner Habilitation 1991 an der Universität Mainz nahm er einen Ruf an die Universität Bonn an. 1993 wechselte er als C4-Professor für Organische Chemie an die Universität Karlsruhe. 1999 wurde er als Direktor am Max-Planck-Institut für molekulare Physiologie, Dortmund (Abteilung für Chemische Biologie), und als Ordentlicher Professor für Biochemie an die Universität Dortmund berufen. Für seine wissenschaftlichen Arbeiten erhielt er den Friedrich-Weygand-Preis für Fortschritte in der Peptidchemie, den Carl-Duisberg-Preis der Gesellschaft Deutscher Chemiker, den Otto-Bayer-Preis und den Steinhof-Preis der Steinhof-Stiftung. Seine gegenwärtigen Forschungsinteressen umfassen Bioorganische Chemie, Naturstoffsynthese, Biokatalyse, Stereoselektive Synthese und Kombinatorische Chemie. Ein Schwerpunkt seiner Forschungsaktivitäten liegt auf der Kombination von Organischer Chemie, Biophysik und Biologie zur Synthese und biologischen Untersuchung von Peptid- und Proteinkonjugaten, die an biologischen Signaltransduktionsprozessen beteiligt sind. In jüngerer Zeit wurde die Synthese von Naturstoffen und kombinatorischen Bibliotheken von Naturstoffderivaten an der festen Phase untersucht (weitere Informationen: <http://www.mpi-dortmund.mpg.de>).



H. Waldmann



I. Vetter



R. Breinbauer

Ingrid Vetter, geb. 1963, studierte Biologie in Frankfurt/Main. Nach ihrer Diplomarbeit bei Prof. H. Fasold/Prof. H. Rüterjans 1987 wechselte sie nach Heidelberg und schloss sich der Arbeitsgruppe von Prof. P. Rösch an, in der sie sich im Rahmen ihrer Dissertation mit NMR-Studien der Adenylatkinase beschäftigte. 1991 arbeitete sie als Postdoc auf dem Gebiet der Kristallographie in der Arbeitsgruppe von Prof. D. Tsernoglou (EMBL Heidelberg). Nach einem 20-monatigen Postdoc-Aufenthalt in der Gruppe von Prof. B. Matthews (University of Oregon, Eugene) wechselte sie ans Max-Planck-Institut für molekulare Physiologie in Dortmund, wo sie seither als Gruppenleiterin in der Abteilung von Prof. A. Wittinghofer tätig ist. Ihre gegenwärtigen Forschungsinteressen umfassen strukturelle Untersuchungen an Kerntransportproteinen sowie molekulares Modellieren.

Rolf Breinbauer wurde 1970 in Schärding (Österreich) geboren. Er studierte Chemie an der Technischen Universität Wien und der Universität Heidelberg, an der er seine Diplomarbeit auf dem Gebiet der asymmetrischen Katalyse unter der Anleitung von Prof. G. Helmchen durchführte. Während seiner Doktorarbeit (1995–1998) bei Prof. M. T. Reetz am Max-Planck-Institut für Kohlenforschung in Mülheim an der Ruhr beschäftigte er sich mit der Synthese und katalytischen Anwendung von Übergangsmetallkolloiden. Von 1998 bis 1999 arbeitete er als Erwin-Schrödinger-Stipendiat im Labor von Prof. E. N. Jacobsen an der Harvard University, wo er sich mit kooperativen Effekten in der asymmetrischen Katalyse beschäftigte. Im Jahr 2000 wechselte er als Liebig-Stipendiat nach Dortmund, wo er als Gruppenleiter in der Abteilung für Chemische Biologie am Max-Planck-Institut für molekulare Physiologie und am Institut für Organische Chemie der Universität Dortmund tätig ist. Sein Forschungsinteresse gilt der Entwicklung neuer Synthesemethoden und deren Anwendung in der Festphasensynthese und Kombinatorischen Chemie.

stellen wir Argumente für einen Ansatz zur Lösung dieses fundamentalen Problems vor, der die Struktur biologisch aktiver, für die Bindung an spezifische Proteine im Verlauf der Evolution selektierter Naturstoffe nutzt.

2. Proteinfaltung und Proteinfunktion

Proteine können als modular aufgebaute Biomoleküle betrachtet werden, die aus individuellen Bausteinen zusammengesetzt sind. Die Bausteine werden als Domänen bezeichnet: Sie sind Abschnitte eines Proteins, die unabhängig vom Rest des Moleküls eine kompakte Anordnung von Sekundärstrukturelementen (wie α -Helices, β -Faltblätter oder β -Schleifen) bilden und durch mehr oder weniger komplexe Peptidlinker verbunden sind. Als Domänenfamilie wird hier eine Familie von verwandten Sequenzen bezeichnet, die einen gemeinsamen „Vorfahren“ haben und sich durch divergente Evolution unterschiedlich entwickelt haben. Verschiedene Sequenzfamilien (oder Domänen) können dem gleichen Faltungstyp angehören (Abbildung 1). Dieses Phänomen kann entweder durch funktionelle oder physikalische Einschränkungen oder als Resultat einer divergenten Evolution erklärt werden.^[8] Domänen sind strukturell konservierte Einheiten, die aber genetisch mobil sein können.^[9]

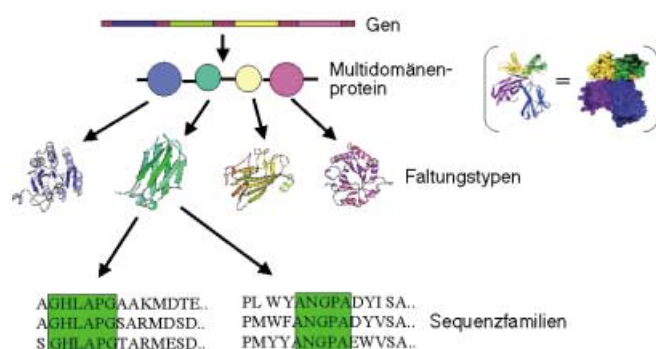


Abbildung 1. Der modulare Aufbau von Multidomänenproteinen.

Obwohl die Anzahl aller verschiedenen menschlichen Proteine auf 100 000 bis 450 000 geschätzt wird, herrscht Einigkeit darüber, dass die Anzahl der Domänenfamilien und – vor allem – die der topologisch unterschiedlichen Faltungstypen vermutlich viel kleiner ist. Gegenwärtig sind etwa 600 verschiedene Faltungstypen bekannt,^[10] die aus der dreidimensionalen Anordnung aller strukturell charakterisierten Proteine abgeleitet wurden.^[11, 12] Daten aus den laufenden Genomsequenzierungsprojekten ermöglichen es, die Anzahl aller in der Natur existierenden Faltungstypen und Sequenzfamilien zu schätzen. Gegenwärtige Schätzungen variieren zwischen 600 und 8000 verschiedenen Faltungstypen sowie 4000 und 60 000 Sequenzfamilien.^[12c, 13, 14]

Es gibt große Anstrengungen, die Zusammenhänge zwischen Proteinfunktion und Proteinfaltung zu verstehen.^[9a, 15] Insbesondere die stetig wachsenden Datenmengen aus den Genomsequenzierungsprojekten, evaluiert mithilfe der Bioinformatik, ermöglichen eine schnellere Erkennung von

Mustern, als es die aufwändigere Methode der strukturellen Genomik (die von der Struktur auf die Funktion zu schließen versucht) allein vermögen würde.^[9] Zum jetzigen Zeitpunkt sind wir noch weit von einem tiefen und einheitlichen Verständnis entfernt. Die Untersuchungen werden durch die geringe Anzahl an kristallographisch zugänglichen Strukturen von Proteinen mit gebundenen Liganden eingeschränkt.^[16] Dennoch wurden einige interessante Beobachtungen gemacht. Die folgenden Ausführungen sollen einen Überblick über die Diversität und evolutionären Beziehungen von Ligandenbindungsstellen in Proteinen geben.^[17]

2.1. Ähnlicher Faltungstyp bindet ähnliche Liganden – ein Konzept und seine Einschränkungen

Durch viele Beispiele ist belegt, dass Proteinfamilien ähnlichen Faltungstypen angehören können, obwohl sie auf den ersten Blick vollkommen verschiedene Sequenzen haben und/oder ganz verschiedene chemische Reaktionen katalysieren. Hierbei können die Reste im aktiven Zentrum unterschiedlich angeordnet sein. Diese Proteinfamilien sind aus den gleichen „Vorfahren“ hervorgegangen und können daher noch immer ähnliche Liganden binden.^[18] Da die Sequenzhomologie manchmal schwach oder nicht erkennbar ist, ist das Aufspüren solcher Fälle nicht immer einfach.

Ein eindrucksvolles Beispiel für dieses Prinzip ist die Leukotrien-A4-Hydrolase/Aminopeptidase (LTA4H), ein bifunktionelles Enzym, dessen Aminopeptidasefunktion mit einer weiteren Funktion, der vinylogenen Hydrolyse des Leukotrieneperoxids LTA₄ zu LTB₄, kombiniert ist. Beide Reaktionen werden im gleichen Zn-haltigen aktiven Zentrum katalysiert.^[19a] In diesem Fall war das Vorkommen von einigen kurzen konservierten Sequenzelementen ausreichend, die Verwandtschaft der Enzyme zu Metallopeptidasen zu belegen.^[19e] Die evolutionäre Beziehung des LTA4H-Faltungstyps (der zu dieser Zeit noch unbekannt war) zu M1-Metallopeptidasen hätte sofort nahegelegt, dass man Peptidaseinhibitoren als potentielle Liganden prüft. In der Tat inhibiert der Aminopeptidaseinhibitor Bestatin die Biosynthese von LTB₄.^[19c] Dieser Befund und die Tatsache, dass Captopril als Inhibitor des Angiotensin konvertierenden Enzyms (ACE; auch eine Metalloprotease) ebenfalls LTA4H inhibiert,^[19e] haben die Änderung der Leitstrukturen nahegelegt. Daraus gingen Moleküle hervor, die LTA4H im nanomolaren Bereich inhibieren.^[19b–d] Eine später durchgeführte Strukturbestimmung von LTA4H bestätigte, dass LTA4H und Thermolysin dem gleichen Faltungstyp angehören (Abbildung 2, Schema 1) Darüber hinaus wird der Faltungstyp der katalytischen Domäne von LTA4H auch von den Peptidasen Aureolysin, Neprilysin und Elastase eingenommen.

Empirische Beobachtungen zeigen, dass verwandte Sequenzen ähnliche Faltungstypen haben. Dies bedeutet aber nicht, dass die aktiven Zentren auch von sequentiell homologen Resten aufgebaut sein müssen: Petsko et al. haben durch eine sorgfältige, vergleichende Röntgenstrukturanalyse von Enzymen aus der Enolase-Superfamilie (Enolase, muconatolactonisierendes Enzym und Mandelat-Racemase) die gemeinsamen Prinzipien im Design dieser aktiven Zentren

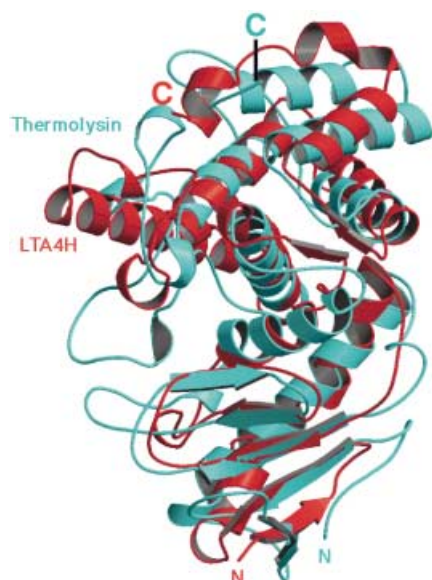
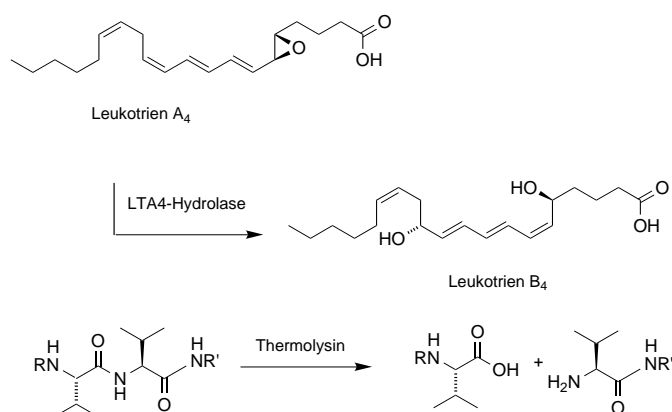


Abbildung 2. Überlagerung der Strukturen von LTA4H (rot) und Thermolysin (blau).



Schema 1. LTA4-Hydrolase und Thermolysin gehören dem gleichen Faltungstyp an und werden beide durch Bestatin inhibiert, katalysieren aber zwei verschiedene Reaktionen.

erkannt. Dabei spielt die Abstraktion eines α -Protons einer Carbonsäure eine entscheidende Rolle für die Gesamtreaktion.^[20] Obwohl die Reste mit den katalytischen funktionellen Gruppen an verschiedenen Stellen des gefalteten Proteins liegen und ihre Identität sowie Rolle im Katalyseprozess variieren, bleibt die Position der katalytischen Gruppen relativ zum Substrat unverändert. Die drei Enzyme zeigen signifikante Sequenzhomologien sowie den gleichen Faltungstyp und können deshalb zur selben Proteinfamilie gezählt werden. Auch wenn sie wohl nicht in dieselben funktionellen Targetfamilien eingeordnet worden wären, da sie unterschiedliche Reaktionen katalysieren, hätte die durch ihre ähnliche Struktur offenbarte Verwandtschaft eine rationale Suche nach Liganden nahegelegt, die an das aktive Zentrum mit seinen gemeinsamen Merkmalen binden.

Dieser auf der Sequenzanalyse beruhende Ansatz verspricht langfristig eine Verkürzung des Prozesses von der Genidentifizierung bis zum Aufspüren der Leitstruktur.^[21] Beispielsweise könnte die Analyse eines Gens mithilfe der

Bioinformatik ergeben, dass das entsprechende Protein ein sich aus schon bekannten Domänen zusammensetzendes Multidomänenprotein ist.^[22] Sind für diese Domänen schon Liganden bekannt, dann könnten diese als Startpunkte für das Design und die Synthese von Substanzbibliotheken dienen (Abbildung 3). Die Inhibitorentwicklung könnte ohne weitere Informationen der ansonsten durch Röntgenstrukturanalyse oder NMR-Spektroskopie bestimmten dreidimensionalen Struktur des Proteins begonnen werden – sogar ohne weiteres Wissen über die biologische Funktionen, Bindungspartner usw., die man durch biochemische oder zellbiologische Methoden erhält.

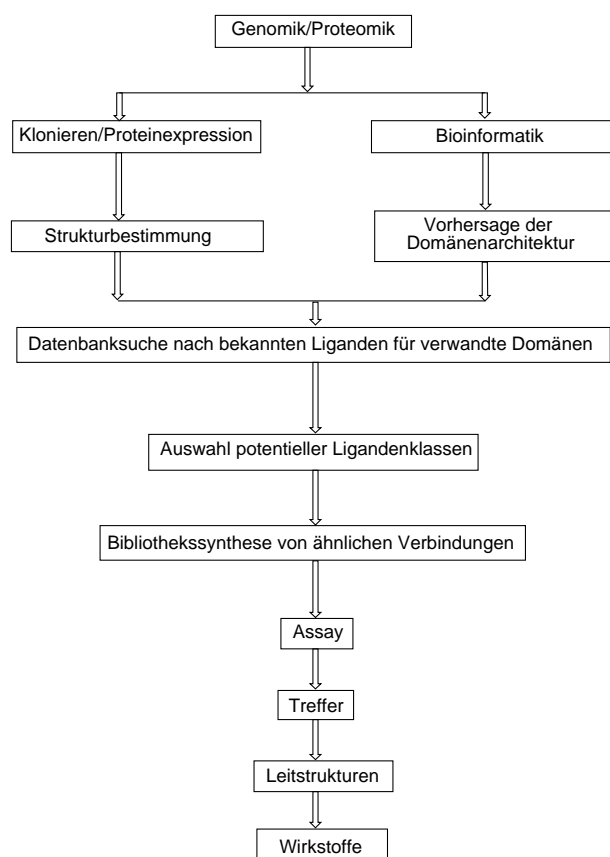


Abbildung 3. Der Einfluss der Sequenzanalyse auf den Wirkstofffindungsprozess.

Der Ansatz „ähnlicher Faltungstyp bindet ähnliche Liganden“ kann aber versagen, wenn die divergente Evolution zu weit fortgeschritten ist und die „Ähnlichkeiten“ in der Bindungstasche verloren gegangen sind.^[17a] Aber auch in diesen Fällen können noch Übereinstimmungen bestehen, z.B. die Position der Bindungsstelle innerhalb des Faltungstyps. Dafür wurde der Begriff „Supersite“ eingeführt, wie im Ferredoxin-Faltungstyp.^[23] Eine potentielle Supersite kann auch im Cystatin-Faltungstyp erkannt werden (Abbildung 4). Vermutlich leiten sich diese Übereinstimmungen aus einer divergenten Evolution ab.^[24] Auch wenn die Diversität innerhalb der Bindungstasche nicht durch eine kombinatorische Bibliothek um ein einzelnes Strukturgerüst abgedeckt werden kann, könnten die evolutionären

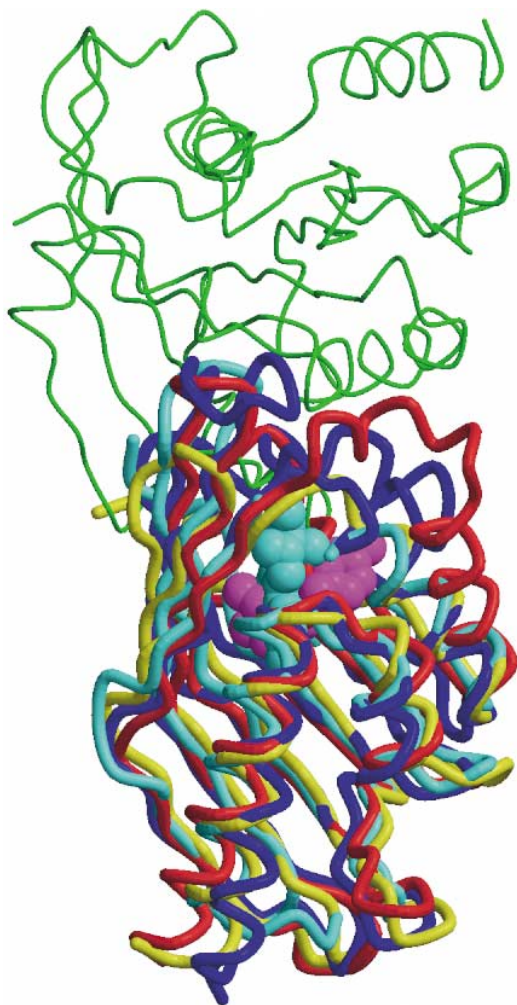


Abbildung 4. Proteine, die dem Cystatin-Faltungstyp angehören. Türkis: Δ^5 -3-Ketosteroidisomerase, komplexiert mit dem Reaktionsintermediat Equilenin (PDB Code 4TSU); blau: Scytalondehydratase, komplexiert mit dem Inhibitor Carpropamid (pink) (PDB Code 2STD); rot: Naphthalin-1,2-dioxygenase- β -Untereinheit (kein gebundener Ligand) (PDB Code 1EG9); orange: NTF2 als Komplex mit Ran (grün) (PDB Code 1A2K).

Verwandtschaftsbeziehungen Hinweise geben, welche anderen Leitstrukturen in Frage kommen.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass der Vorteil der Klassifikation nach Domänenfamilien anders als bei der konventionellen Klassifikation nach funktionellen Zielverbindungen (Kinasen, Proteasen, Phosphatasen usw.) darin liegt, Erstere allein aus der Sequenzinformation ableiten zu können. Dies kann vor allem in der ersten Phase eines Screening-Prozesses hilfreich sein, wenn noch sehr wenig über das gesuchte Protein bekannt ist. Dabei sollen bekannte Liganden geprüft werden, die an sequenziell verwandte Proteine binden, wie im Fall des Peptidase-Inhibitors Bestatin und der Leukotrien-A4-Hydrolase.

2.2. Verschiedene Faltungstypen binden den gleichen Liganden – privilegierte Strukturen

Der Begriff der privilegierten Struktur wurde von der Gruppe um Evans bei Merck eingeführt, die in ihren

pharmakologischen Untersuchungen der Benzodiazepine erkannten,^[25] dass Derivate innerhalb dieser Verbindungsklasse nicht nur an den Benzodiazepin-Rezeptor des zentralen Nervensystems binden, sondern auch an Cholecystokinin-Rezeptoren, obwohl die natürlichen Substrate dieser Rezeptoren nur geringe Gemeinsamkeiten mit dieser Verbindungsklasse aufweisen. Periphere Benzodiazepin-Rezeptoren sind eine dritte Klasse von Rezeptoren, an die diese Substanzklasse bindet. Man nimmt an, dass Benzodiazepine als Peptidmimetika eine intrinsisch gute Bindungsaffinität zu einigen Proteinen haben, die ähnliche Regionen von Peptiden oder Proteinen binden. Nach Evans et al. sind privilegierte Strukturen als eine Verbindungsklasse definiert, deren Mitglieder mit verschiedenartigen Proteinrezeptorbindungsstellen wechselwirken können.

3. Naturstoffe und privilegierte Strukturen

Naturstoffe verfügen oftmals über privilegierte Strukturen gemäß der in Abschnitt 2.2. vorgestellten Definition, da sie von verschiedenen Proteinen synthetisiert oder modifiziert werden und daher an diese Proteine binden müssen. Zudem schließt ihre eigentliche biologische Funktion oft das Binden an weitere Proteine ein. Beispielsweise binden Nucleotidtriphosphate (NTP) (neben anderen Proteinen) an P-Schleifen-haltige Nucleotidtriphosphat-Hydrolasen – die vierthäufigste Domäne in der gegenwärtigen Humangenomdatenbank. Des Weiteren binden sie auch an Proteinkinasen (fünfhäufigste Domäne), an die Actin-Typ-Domäne und viele andere. Nucleotide werden daher von einer Vielzahl von verschiedenen Proteinen gebunden, die dabei entweder ähnlichen oder auch völlig verschiedenen Faltungstypen angehören (Abbildung 5

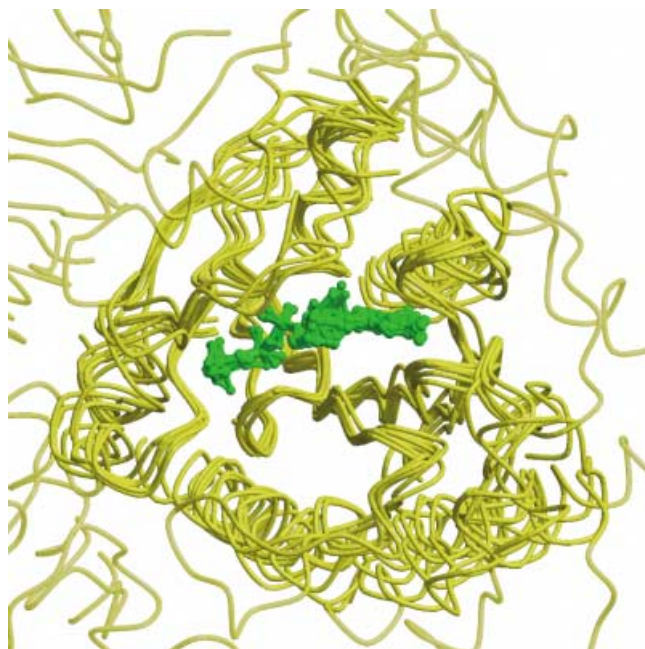


Abbildung 5. Überlagerung der GTP-Bindungsstellen einiger bekannter Strukturen von GTP-bindenden Proteinen, einschließlich kleiner GTP-bindender Proteine, heterotrimerer G-Proteine und des Elongationsfaktors Tu. Die Nucleotide sind in grün, das Proteinrückgrat in gelb dargestellt.

und 6).^[26] Im Fall von verschiedenen Faltungstypen (wie den P-Schleifen-haltigen NTP-Hydrolasen und den Proteinkinasen) sind die ähnlichen Formen und Eigenschaften der Bindungstaschen für die Nucleotide in den verschiedenen Gerüsten das Ergebnis einer konvergenten Evolution. So verfügen sowohl die Proteinkinasen als auch die P-Schleifen-haltige NTPasen über ein glycinreiches Motiv, um die Phosphate der Nucleotide zu binden, unterscheiden sich aber in der spezifischen Anordnung der Glycinreste.^[27]

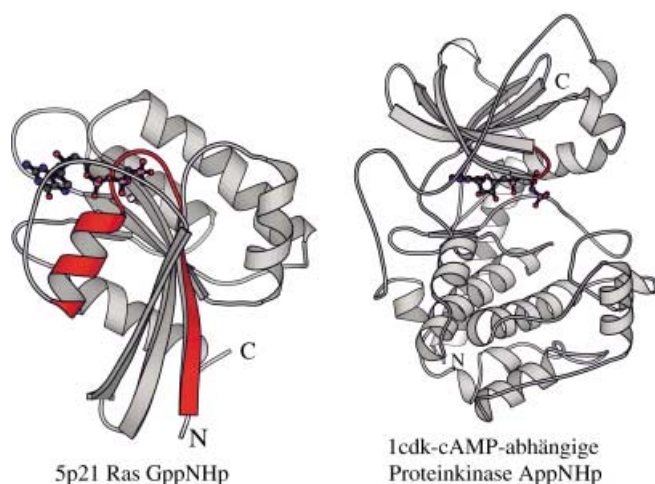


Abbildung 6. NTP-Bindungsstellen in zwei verschiedenen Faltungstypen: Ras (links) und Proteinkinase C (rechts).

Es ist daher wahrscheinlich, dass noch weitere nutzbare privilegierte Strukturen wie das Peptidmimetikum Benzodiazepin unter den Liganden zu finden sind, die in der Evolution für die Bindung an besondere Bindungstaschen oder Faltungstypen selektioniert wurden. Gleichzeitig wurden die Bindungstaschen ebenfalls von der Natur bei ihrem Bestreben selektioniert, modulare Domänen effizient zu nutzen.

Wenn man bei den Naturstoffen nach privilegierten Strukturen sucht, stellt sich die Frage, warum Naturstoffe aus verschiedenen Organismen (oft unerwartete) Heilwirkungen beim Menschen haben und warum die Trefferquote bei Naturstoffsammlungen in Hochdurchsatz-Screeningverfahren oft drastisch höher ist als die Trefferquote bei großen klassischen Bibliotheken aus der Kombinatorischen Chemie.^[28] Zwei Fälle können dabei unterschieden werden: Naturstoffe binden zufällig an einzelne menschliche Proteine oder sie wurden in der Evolution darauf selektioniert, an Proteine zu binden, die den menschlichen Proteinen ähnlich sind. Der zweite Fall erscheint in Anbetracht der engen Verwandtschaft der Genome aller Organismen als sehr plausibel. Darüber hinaus kann angenommen werden, dass zumindest die meisten der von der Natur gebildeten Substanzen für den herstellenden Organismus einen Zweck erfüllen. Viele Pflanzen bilden Alkaloide, um sich vor dem „Gefressenwerden“ durch Tiere, insbesondere Säugetiere, zu schützen. Demnach wurden Alkaloide darauf selektioniert, an bestimmte Säugetierproteine zu binden und giftig für den entsprechenden Organismus zu sein. Wirkstoffe wie Morphin, Nicotin, Ephedrin, Strychnin, Chinin und Atropin sind solche

Alkaloide. Andere Beispiele sind die Gifte von Schlangen, Fröschen oder Spinnen, die auch dafür geschaffen wurden, Säugetiere zu vergiften oder zu lähmen. Unter anderem wirken sie dabei auf Ionenkanäle in Säugetierzellmembranen ein.

Wahrscheinlich werden sogar Wirkstoffe wie Cyclosporin, FK506 und Rapamycin zur chemischen Verteidigung ihres herstellenden Organismus gebildet.^[29] Es gibt z. B. in der Hefe Proteine, die homolog zu denen an der Immunsuppression beteiligten menschlichen Proteinen sind. Daher ist es kein Zufall, dass diese Substanzen auch aktiv gegen menschliche Proteine sind, obwohl sie letztlich dort eine ganz andere Wirkung entfalten.

Ein gegebenes Strukturgerüst kann somit im chemischen Sinne als privilegiert betrachtet werden, d. h. es verfügt über eine notwendige Kombination aus Flexibilität und Starrheit, und präsentiert funktionelle Gruppen in adäquater räumlicher Anordnung (z. B. Biphenyle). Zweitens, und vielleicht zusätzlich, kann ein solches Gerüst auch im biologischen Sinne privilegiert sein, indem Naturstoffe nachgeahmt werden, die an unterschiedliche Proteindomänen binden. Beispielsweise ist der Proteinkinaseinhibitor Genistein ein kompetitiver Inhibitor der ATP-Bindung durch Proteintyrosinkinasen (PTK), der aber auch Topoisomerase II und 1-Phosphatidylinositol-4-kinase inhibiert und mit dem Östrogenrezeptor interagiert.^[30] Ein privilegiertes Grundgerüst ist eine Basis für das Auffinden von guten Proteinliganden. Es ist sicherlich notwendig, die zu Grunde liegende Struktur einem Optimierungsprozess zu unterwerfen, um sowohl die Bindungsaffinität als auch die -selektivität zu verbessern. Nicht notwendigerweise, aber überraschend oft zeigen bestimmte Naturstoffe bereits vorteilhafte pharmakokinetische Eigenschaften. Dies erscheint logisch, da in ihrem biologischen Umfeld (z. B. nach der Bildung durch einen Organismus zum Zweck der Selbstverteidigung) diese Substanzen den Weg zum Zielprotein in anderen Organismen finden müssen. Die Bedeutung der Naturstoffe in der Wirkstoffforschung und -entwicklung spiegelt sich darin wider, dass etwa die Hälfte der meistverkauften Medikamente entweder Naturstoffe oder Naturstoffderivate sind.^[31–33] Ihre Rolle bei antibakteriellen und immunsuppressiven Wirkstoffen oder Krebstherapeutika ist dabei sogar noch ausgeprägter.

4. Biologisch validierte Startpunkte für das Bibliotheksdesign

Wenn für bestimmte Domänenfamilien Ligandentypen oder Grundgerüste bereits aus der Untersuchung evolutionär verwandter Proteine bekannt sind, dann könnte die zugrundeliegende Struktur dieser Liganden als Leitprinzip für die Entwicklung einer Bibliothek genutzt werden. Solche Liganden würden die gesuchten biologisch validierten Startpunkte im chemischen „Strukturraum“ für die zielgerichtete Entwicklung einer Bibliothek sein. Wie bereits ausgeführt, können Naturstoffe als biologisch validierte strukturelle Einheiten angesehen werden.

Bibliotheken, die in Anlehnung an das Grundgerüst von Naturstoffen geplant und synthetisiert werden, sollten bei

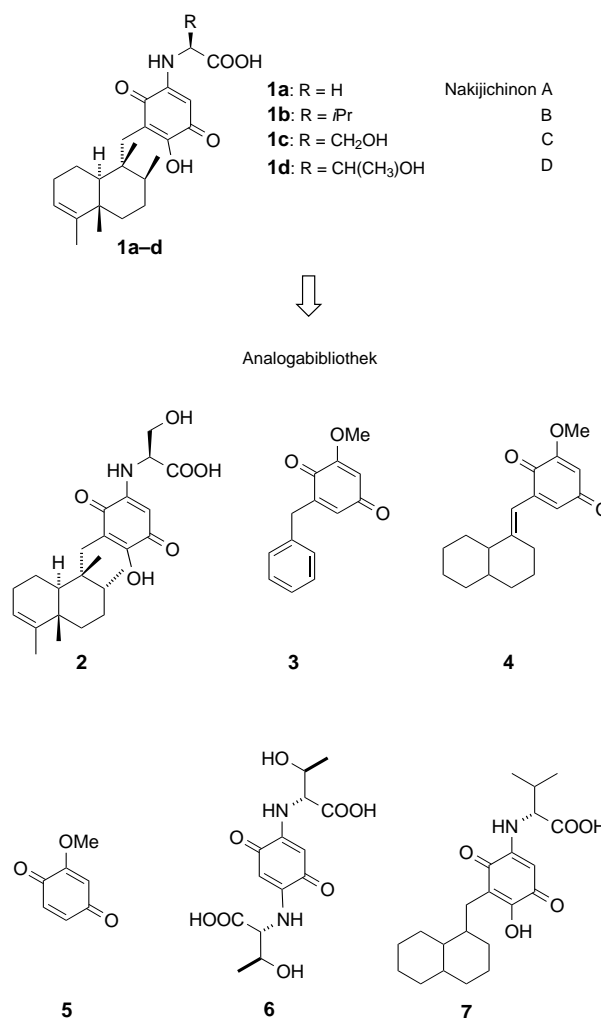
einer signifikant reduzierten Bibliotheksgröße Proteinaktivitätsmodulatoren mit einer höheren Trefferquote liefern. Innerhalb einer Gruppe von eng verwandten Proteindomänen variieren die Details der Struktur üblicherweise substanzziell. Diese Variationen bilden die Basis für selektive Bindung und Inhibierung (z.B. in der ATP-Bindungstasche von Proteinkinasen). Daher müssen Konfiguration und Substitution des Grundgerüsts der potentiellen Liganden mit funktionellen Gruppen ebenfalls variiert werden. Es ist nicht notwendig und wahrscheinlich sogar kontraproduktiv, einen Naturstoff in jedem strukturellen Detail exakt nachzubauen.

Der vorstehend abgeleitete Ansatz auf Struktur-Basis unterscheidet sich in seinen grundsätzlichen Überlegungen von verwandten Konzepten, die sich auf die Generierung chemischer Diversität konzentrieren. Dieser Aspekt wird aber trotzdem vom Ansatz auf Struktur-Basis nicht vernachlässigt – dieser baut vielmehr auf der von der Natur selbst geschaffenen Diversität auf. Damit lassen sich neue privilegierte Strukturen aus der Natur identifizieren, die für verschiedene Anwendungen in der Chemischen Biologie und Biomedizin von großem Nutzen sein können.

Die Tragfähigkeit dieses Ansatzes wurde von Waldmann, Giannis und Mitarbeitern belegt.^[34] Die Nakijichinone **1a–d** sind die einzigen bisher bekannten natürlich vorkommenden Inhibitoren der Her-2/Neu-Rezeptor-Tyrosinkinase, die in über 30 % aller primären Brust-, Eierstock- und Magenkarzinome überexprimiert wird. Mit dem Ansatz auf Struktur-Basis wurde eine Bibliothek bestehend aus 56 Analoga dieser Leitstruktur synthetisiert und diese Analoga auf ihre inhibitorische Aktivität gegenüber anderen Rezeptor-Tyrosinkinasen untersucht, die eine Rolle bei Zellsignalprozessen und Proliferation spielen, z.B. den Rezeptoren der vaskulären endothelialen Wachstumsfaktoren (VEGFR1–3), dem Tie-2-Rezeptor, dem insulinähnlichen Wachstumsfaktor-1-Rezeptor (IGF1R) und dem Rezeptor des epidermalen Wachstumsfaktors (ErbB-1). Obwohl keiner der Naturstoffe **1a–d** signifikante inhibitorische Aktivität gegenüber dem neuen Satz Rezeptorkinasen aufwies, konnten sechs Verbindungen der Bibliothek als Kinaseinhibitoren im niederen mikromolaren Bereich identifiziert werden (Schema 2, Abbildung 7, Tabelle 1). Insbesondere wurde ein Strukturtyp identifiziert, der die selektive Inhibierung der Tie-2-Rezeptorkinase ermöglicht. Dieses Protein spielt eine wichtige Rolle in der Regulation der Blutgefäßbildung und damit in der Krebsentstehung. Die Ergebnisse unterstreichen die Notwendigkeit, kombinatorische Bibliotheken auf der Basis von Naturstoffen aufzubauen anstatt nur die Naturstoffe selbst zu nutzen. Beim Screening der natürlichen Substanzen allein wäre dieser Inhibitorotyp nicht gefunden worden.

5. Aufbau von Naturstoffbibliotheken durch Festphasensynthese

Unabdingbar für den Erfolg des Ansatzes auf Struktur-Basis beim Bibliotheksdesign ist, dass effiziente, verlässliche Methoden und Mehrstufensynthesesequenzen für die Totalsynthese von Naturstoffen und deren Analoga an polymeren Trägern verfügbar sind. Die entsprechenden Umsetzungen



Schema 2. Verbindungen **2–7** einer Bibliothek bestehend aus 56 Nakijichinonanaloga.

müssen ähnlich selektiv und robust sein wie die verwandten klassischen Umsetzungen - unabhängig von den Einschränkungen und unterschiedlichen Ansprüchen, die sich durch die Anknüpfung an die feste Phase ergeben.

In den letzten fünf Jahren hat die Herstellung von Naturstoffbibliotheken wachsende Aufmerksamkeit gefunden. Da dieses Gebiet erst kürzlich in Übersichtsartikeln zusammengefasst wurde,^[35] legen wir hier den Schwerpunkt auf Festphasensynthesen, bei denen ganze Molekülgerüste aufgebaut werden. Die nachgeschaltete Derivatisierung von in Lösung synthetisierten und dann immobilisierten Naturstoffgrundgerüsten wird nur exemplarisch erwähnt. Anhand von ausgewählten Beispielen werden sowohl der gegenwärtige Stand dieser Methode als auch deren Grenzen aufgezeigt.

Epithilone sind Naturstoffe, die aus Myxobakterien isoliert wurden. Sie induzieren Tubulinpolymerisation und sind daher cytotoxisch – auch gegen paclitaxelresistente Tumorzelllinien. Die erfolgreiche Festphasensynthese von Epithilon A durch Nicolaou et al. ist ein Meilenstein in der Synthese von komplexen Molekülen an der festen Phase.^[36] Ein polymergebundenes Wittig-Ylid **8** wurde bei einer Olefinierungsreaktion mit **9**, einer Aldolreaktion mit **10** und einer Veresterung mit **11** weiter umgesetzt (Schema 3). Bei einer durch Grubbs-

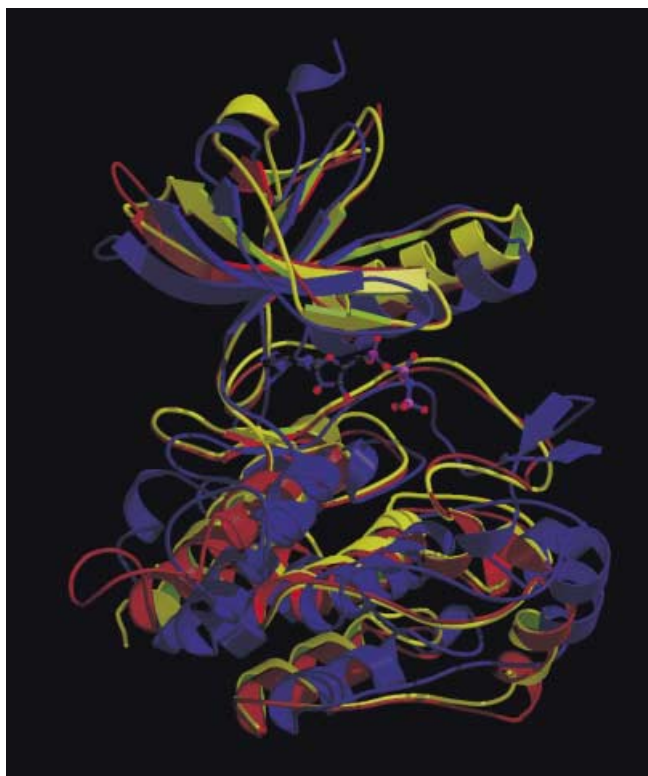


Abbildung 7. Überlagerung einiger Rezeptorkinasen, die von der Nakijichinonanalogaibibliothek inhibiert werden. Gelb: Tie-2-Rezeptorkinase, rot: VEGFR2, blau: IGF1R mit einem gebundenen ATP-Analogon. (Wir danken Lars Kissau für die Anfertigung dieses Bildes.)

Katalysator vermittelten Olefin-Metathese wurde in einer eleganten „ablösenden“ Cyclisierung aus der acyclischen Vorstufe der Makrocyclus **12** gebildet. Nach zwei abschließenden Umsetzungen in Lösung konnte Epothilon A **13** erhalten werden. Mit dieser Reaktionsfolge wurde zum ersten Mal gezeigt, dass die Vielstufensynthese von komplexen Naturstoffen an der festen Phase möglich ist. In einer nachfolgenden Arbeit stellten Nicolaou et al. eine Bibliothek von weiteren Analoga her, mit denen Struktur-Aktivitäts-Beziehungen innerhalb dieser Verbindungsklasse aufgestellt werden konnten.^[36b]

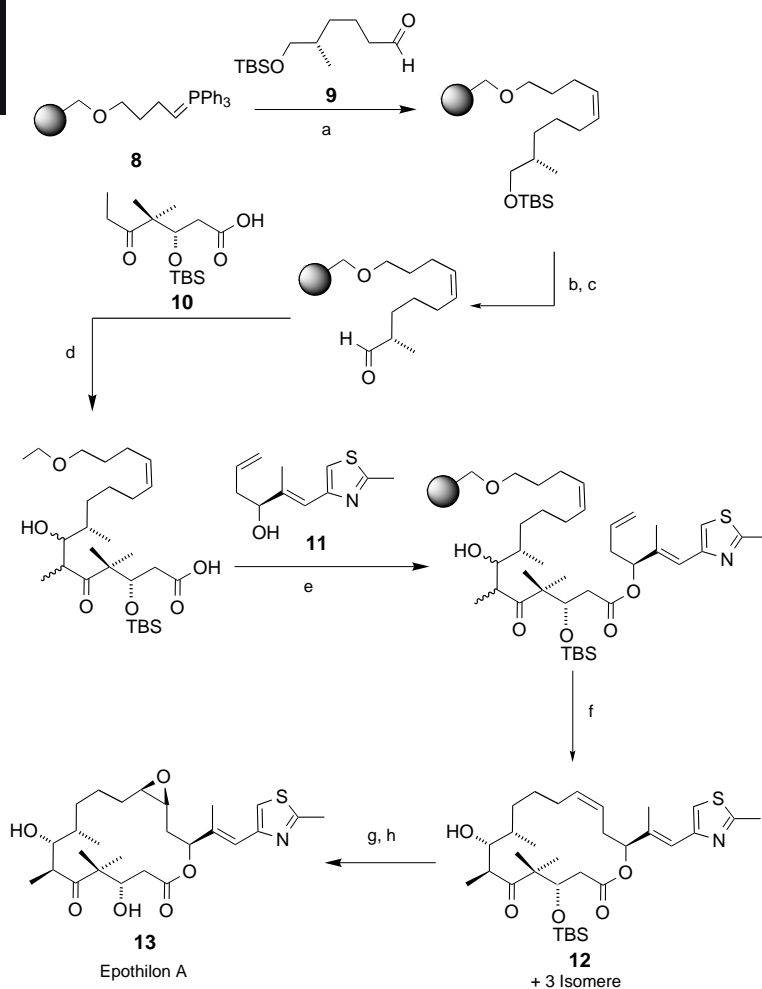
Prostaglandine spielen eine wichtige Rolle bei verschiedenen physiologischen Prozessen und zeigen dabei eine sehr subtile Struktur-Aktivitäts-Beziehung, was sie zu besonders interessanten Zielverbindungen der kombinatorischen Chemie macht. Ellman et. al haben die Festphasensynthese einer Bibliothek mit 26 Prostaglandin-E₁-Analoga **14** beschrieben. Nach dem Modifizieren der Kernstruktur **15** durch eine Suzuki-Kupplung mit **16** wurde die relative Konfiguration der die beiden Seitenketten tragenden Kohlenstoffatome durch eine diastereoselektive Michael-Addition des Cuprats **17** an das Enon **18** festgelegt (Schema 4).^[37]

In einer experimentell anspruchsvollen Arbeit gelang Shair et. al die biomimetische Synthese einiger von Carpanon abgeleiteten Verbindungen des Typs **19** durch eine $\text{PhI}(\text{OAc})_2$ -vermittelte oxidative Hetero-

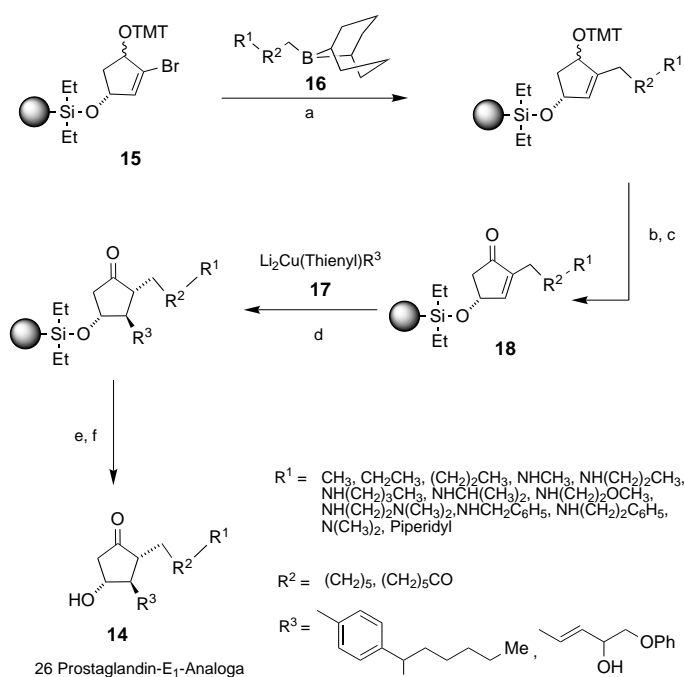
Tabelle 1. Inhibierung von verschiedenen Rezeptortyrosinkinasen mit Nakijichinonanaloga.

Verb.	EGFR	ErbB-2	IC ₅₀ [μM] für die Rezeptoren			
			IGF1R	VEGFR-2	VEGFR-3	Tie-2
1a–d	–	–	–	–	–	–
2	–	–	–	21	–	–
3	–	–	–	–	–	18
4	–	–	–	–	–	14
5	–	29	–	8	–	–
6	–	–	6	–	3	5
7	–	–	0.5	–	–	9

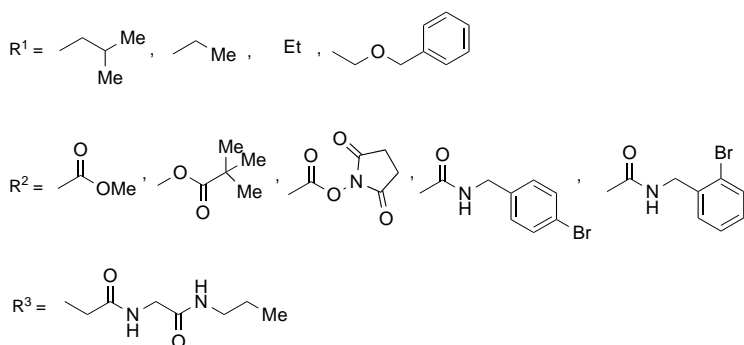
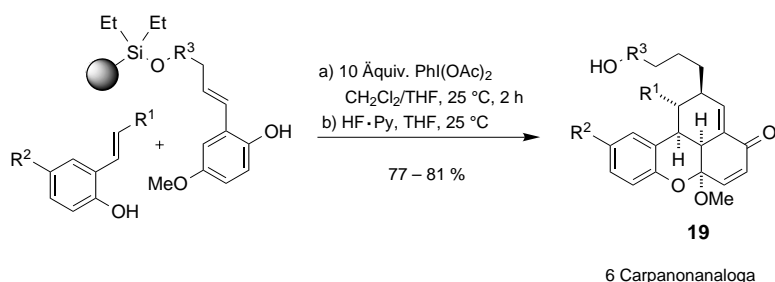
dimerisierung. Nach drei Stufen an fester Phase wurde eine Bibliothek bestehend aus sechs Verbindungen hoher struktureller Komplexität erhalten (Schema 5). Shair et al. kündigten die Synthese einer Bibliothek mit 100 000 Verbindungen und deren Verwendung im Hochdurchsatz-Screening an, was wegen der biologischen Aktivität von Carpanon auf großes Interesse stoßen wird.^[38]



Schema 3. Totalsynthese von Epothilon A an der festen Phase nach Nicolaou et al.: a) **9**, THF, 0 °C, 3 h; b) 10% HF·Pyridin in THF, 25 °C, 12 h; c) (COCl)₂, DMSO, Et₃N, –78 °C → RT; d) **10**, LDA, THF, –78 → –40 °C, 1 h; e) **11**, DCC, DMAP, RT, 15 h; f) Grubbs-Katalysator, CH₂Cl₂, RT, 48 h, 30% Ausbeute an erwünschtem Isomer; g) 20% TFA in CH₂Cl₂; h) Methyl(trifluormethyl)dioxiran, CH₃CN, 0 °C, 2 h. LDA = Lithiumdiisopropylamid, DCC = Dicyclohexylcarbodiimid, DMAP = 4-Dimethylaminopyridin, TFA = Trifluoressigsäure, TBS = *tert*-Butyldimethylsilyl.



Scheme 4. Synthese einer Prostaglandinbibliothek nach Ellman et al.: a) $[\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4]$, Na_2CO_3 , THF, 0°C ; b) 1M HCOOH , CH_2Cl_2 , 5 min; c) Dess-Martin-Periodinan, CH_2Cl_2 ; d) THF, $-78 \rightarrow -20 \rightarrow -78^\circ\text{C}$, 10% AcOH/THF ; e) $\text{HF} \cdot \text{Pyridin}$ in THF; f) TMSOCH_3 , TMS = Trimethylsilyl, TMT = Trimethoxytrityl.



Scheme 5. Synthese einer Bibliothek bestehend aus Carpanonanalog nach Shair et al.

Sarcodictyine haben wegen ihrer strukturellen Komplexität und insbesondere wegen ihrer antikarzinogenen Wirkung (sie wirken ähnlich wie Paclitaxel auf die Interaktion von Tubulin und Microtubulin) große Aufmerksamkeit erregt. Nicolaou et al. haben eine Bibliothek mit den Sarcodictyinderivaten **20a–c** aufgebaut. Wegen der Komplexität dieser Naturstoffe entschieden sie sich für eine Strategie, bei der das Grund-

gerüst **21** des Naturstoffes zunächst in Lösung hergestellt und dann über einen säurelabilen Linker an die feste Phase angeknüpft wurde. Nachfolgend wurden drei reaktive funktionelle Gruppen des Grundgerüsts diversifiziert (Schema 6). In einer Bibliothek mit 22 Verbindungen wurden Substanzen mit einer höheren biologischen Aktivität als der des eigentlichen Naturstoffes identifiziert. Auch konnte eine Struktur-Aktivitäts-Beziehung abgeleitet werden.^[39]

Diese Kombination der Synthese des Grundgerüsts in Lösung mit anschließender diversifizierender Modifizierung an fester Phase wurde von Waldmann et al. bei ihrer Synthese einer Bibliothek bestehend aus 31 Analoga des Proteinkinase-C-Aktivators Indolactam V **22** verwendet (Schema 7).^[40]

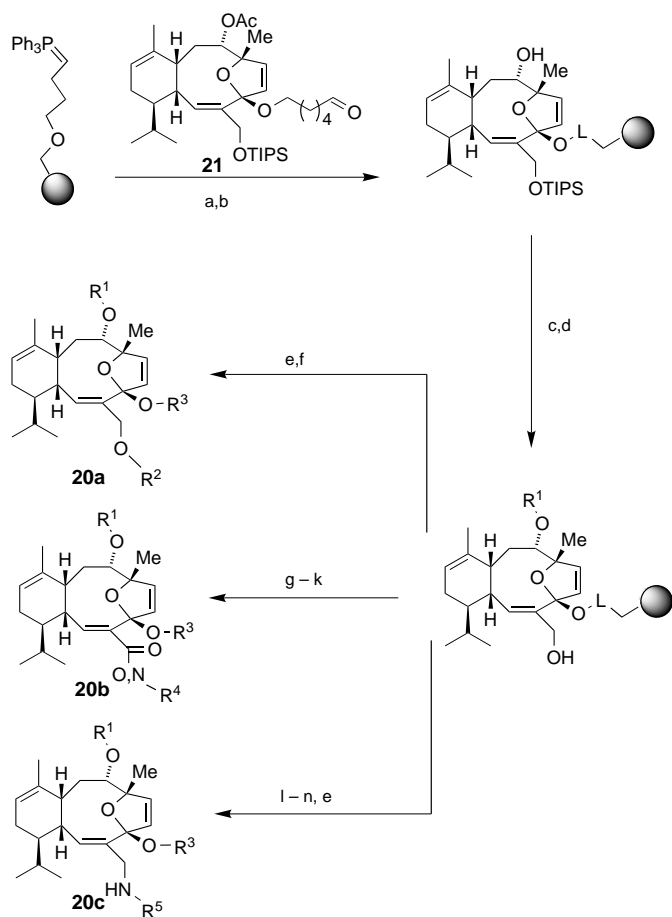
Waldmann et al. synthetisierten auch eine Bibliothek bestehend aus Analoga des antitumoral wirkenden Phosphataseinhibitors Dysidiolid.^[41] Bemerkenswert an dieser elfstufigen Festphasensynthese ist, dass viele verschiedene Reaktionen mit unterschiedlichen Anforderungen erfolgreich durchgeführt werden konnten. Schlüsselschritte der Synthese sind eine asymmetrische Diels-Alder-Reaktion mit dem chiralen Dienophil **25**, eine oxidative Modifizierung des Furans **26** mit Singulett-Sauerstoff und die vollständige Abspaltung des Produkts von der festen Phase durch Olefinmetathese (Schema 8). Die gesamte Sequenz ermöglicht einen raschen Zugang zu neun Analoga des Naturstoffes und die Identifizierung eines potenten Inhibitors der den Zellzyklus kontrollierenden Phosphatase *cdc25c* mit einem vielversprechenden Selektivitätsmuster. Anders als bei vielen anderen Naturstoffsynthesen an fester Phase wurde bei dieser Synthese das gesamte Grundgerüst in mehrstufigen Reaktionsfolgen aufgebaut, anstatt ein in Lösung generiertes fortgeschrittenes Intermediat an die feste Phase zu knüpfen und anschließend die Substituenten zu variieren. Damit ist überzeugend gezeigt, dass vielstufige Totalsynthesen von Naturstoffen und engen Verwandten am festen Träger durchgeführt werden können.

Jauch et al. haben kürzlich den Weg für die Festphasensynthese einer Bibliothek bestehend aus Mniopetalen geebnet. Aus dieser Verbindungsklasse sind schon Inhibitoren der HIV-Reverse-Transkriptase hervorgegangen.^[42] Bemerkenswert an ihrer Synthese ist die Bildung von **27** mithilfe einer Baylis-Hillman-Reaktion und dessen weitere Umsetzung in einer intramolekularen Diels-Alder-Reaktion zu **28** (Schema 9).

Jauch et al. haben kürzlich den Weg für die Festphasensynthese einer Bibliothek bestehend aus Mniopetalen geebnet. Aus dieser Verbindungsklasse sind schon Inhibitoren der HIV-Reverse-Transkriptase hervorgegangen.^[42] Bemerkenswert an ihrer Synthese ist die Bildung von **27** mithilfe einer Baylis-Hillman-Reaktion und dessen weitere Umsetzung in einer intramolekularen Diels-Alder-Reaktion zu **28** (Schema 9).

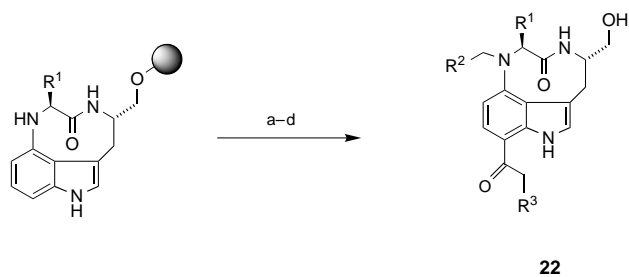
6. Alternative Ansätze

Der hier vorgestellte Ansatz ist nur einer unter mehreren. So haben in den letzten Jahren computergestützte Methoden großes Interesse bei der Entwicklung effizienterer Ansätze zur Leitstruktursuche gefunden.^[43] Von den verschiedenen Ansätzen, die gegenwärtig untersucht werden, ist die von Schreiber et al. eingeführte diversitätsorientierte Synthese konzeptionell dem naturstoffgestützten Bibliotheksdesign verwandt.^[44] Die diversitätsorientierte Synthese für chemische Genetik zielt auf Bibliotheken bestehend



22 Sarcodictyinanaloge

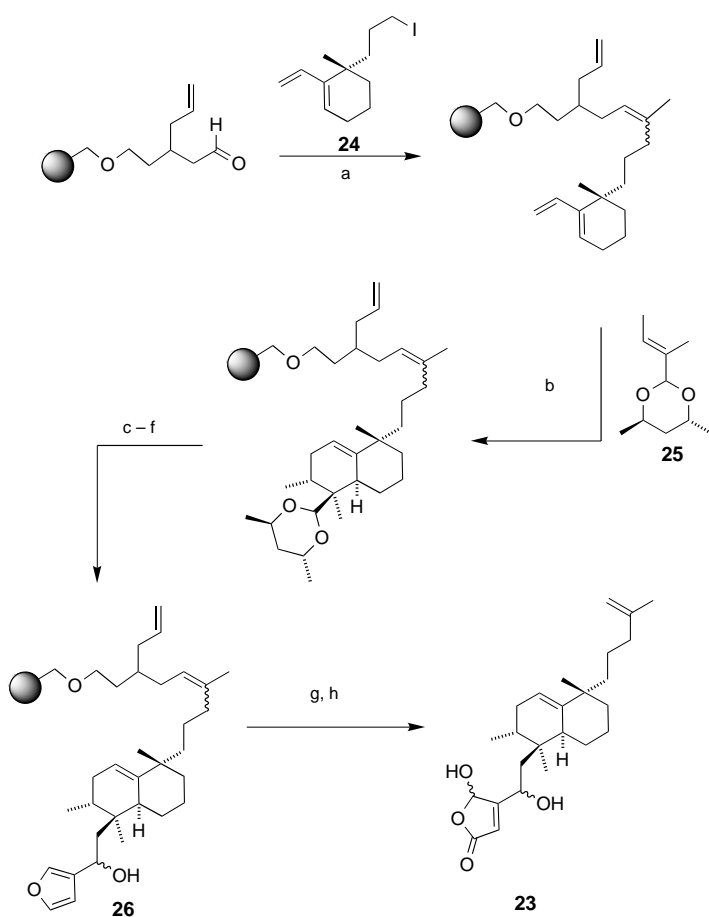
Schema 6. Synthese einer Bibliothek bestehend aus Sarcodictyinanaloge nach Nicolaou et al.: a) THF, $-78^{\circ}\text{C} \rightarrow \text{RT}$; b) NaOMe, MeOH; c) R^1X , Et_3N , DMF; d) TBAF, THF, 25°C ; e) R^2X , Et_3N , DMAP, CH_2Cl_2 , RT; f) PPTS, MeOH, RT; g) Dess-Martin-Periodinan, NaHCO_3 , Pyridin, CH_2Cl_2 , RT; h) NaClO_2 , KH_2PO_4 , 2-Methyl-2-buten, THF, THF/*t*BuOH/ H_2O (5:5:1), 25°C ; i) HOR^4 , DEAD, Ph_3P , THF, $0 \rightarrow 25^{\circ}\text{C}$, 12 h; j) H_2NR^4 , DCC, DMAP, DMF, RT, 20 h; k) CSA, HOR^3 , RT, 15 h; l) $(\text{PhO})_2\text{PON}_3$, DEAD, Ph_3P , THF, $0^{\circ}\text{C} \rightarrow \text{RT}$, 4 h; m) Ph_3P , H_2O , THF, RT, 8 h; n) XR^3 , Et_3N , CH_2Cl_2 , RT, 10 h. TBAF = Tetrabutylammoniumfluorid, PPTS = Pyridinium-*p*-toluolsulfonat, DEAD = Diethylazodicarboxylat, CSA = Camphersulfonsäure, TIPS = Triisopropylsilyl.



31 Indolactam-V-Analoge

Schema 7. Synthese einer Bibliothek bestehend aus Indolactam-V-Analoge nach Waldmann et al.: a) R^2CHO , $\text{NaBH}(\text{OAc})_3$, DMF/AcOH (99:1), RT; b) I_2 , Pyridin/1,4-Dioxan, 0°C ; c) R^3CCH , $[\text{PdCl}_2(\text{PPh}_3)_2]$, CuI, Et_3N , 1,4-Dioxan, RT; d) TFA/ H_2O (95:5).

aus Verbindungen mit riesiger dreidimensionaler struktureller Komplexität, Funktionalität und Diversität ab – in diesem Sinne können solche Substanzen als „Naturstoff-



9 6-epi-Dysidiolidanaloge

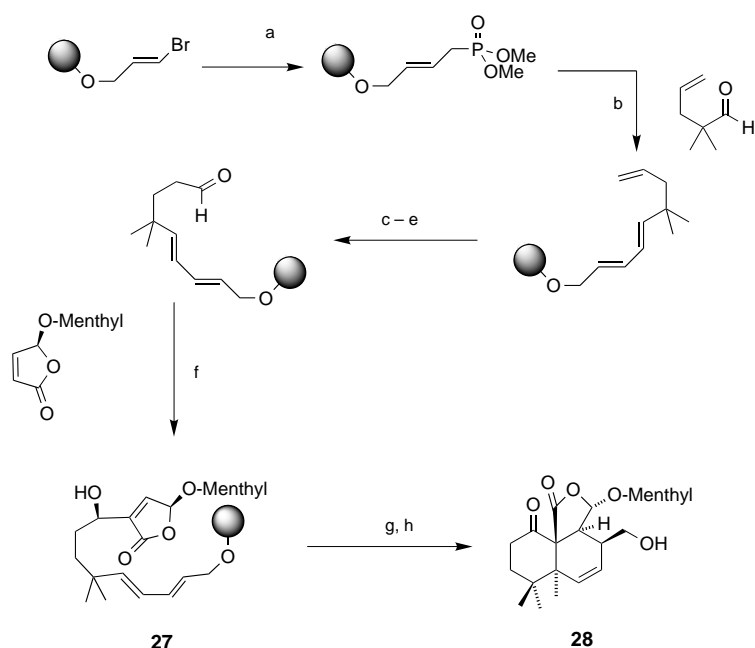
Schema 8. Synthese einer Bibliothek bestehend aus 6-epi-Dysidiolidanaloge nach Waldmann et al.: a) EtPPh_3I , $n\text{BuLi}$, **24**, THF, RT, 16 h, danach $n\text{BuLi}$, 0°C ; b) TMSOTf, CH_2Cl_2 , -78°C , 5 h; c) PTSA, Aceton, DCE, H_2O ; d) $(\text{Ph}_3\text{PCH}_2\text{OMe})\text{Cl}$, KO t Bu, THF, RT, 2 h; e) PPTS, THF, 1 % H_2O , Rückfluss, 16 h; f) 3-Bromfuran, $n\text{BuLi}$, THF, -78°C , 5 h; g) O_2 , Hünig-Basis, Bengalrosa, $h\nu$, -78°C , CH_2Cl_2 ; h) Grubbs-Katalysator ($2 \times 10\%$), CH_2Cl_2 , RT, 16 h. OTf = Trifluormethansulfonat, *p*-Toluolsulfonat, DCE = 1,2-Dichlorethan.

ähnlich“ angesehen werden.^[45] Während Naturstoffbibliotheken von einem biologisch validierten Startpunkt bezogen auf die Konformation und Struktur von potentiellen proteinbindenden Molekülen ausgehen, deckt die diversitätsorientierte Synthese eine Verbindungskomplexität um einen Startpunkt ab, der vorwiegend wegen seiner chemischen Zugänglichkeit und seiner „Naturstoff-Ähnlichkeit“ im Sinne struktureller Komplexität ausgewählt wurde (Tabelle 2). In Tabelle 2 sind die Positionen für beide Ansätze aufgelistet. Es muss aber betont werden, dass beide Ansätze ineinander übergehen und für jede bisher synthetisierte kombinatorische Bibliothek Positionen aus beiden Strategien zutreffen – mit unterschiedlicher Ausprägung der spezifischen Charakteristika.

Proteinliganden, die aus dem Screening solcher diversitätsorientierter Bibliotheken hervorgehen, ergänzen den naturstoffgestützten Ansatz, da sie zu privilegierten Grundstrukturen führen können, die sich von den Naturstoffgerüsten unterscheiden (z.B. die Benzodiazepine).

Tabelle 2. Vergleich von Elementen der naturstoffgestützten kombinatorischen Synthese mit denen der diversitätsorientierten Synthese.

Naturstoffgestützt	Diversitätsorientiert
<ul style="list-style-type: none"> ● Ziel ist, eine fokussierte Diversität um einen biologisch validierten Startpunkt im chemischen „Strukturraum“ zu erhalten – die Diversität dieser Startpunkte wurde von der Natur gewählt ● Synthesemethoden werden primär danach gewählt, ob sie zur gewählten Kernstruktur führen; sogar dann, wenn dieses Ziel ein hohes Maß an Optimierung erforderlich macht ● Retrosynthesen werden auch danach beurteilt, ob sie Diversität generieren können ● Bausteine sind kommerziell erhältlich oder werden in Lösung synthetisiert ● Parallelsynthese oder Split-Pool-Synthese ● kleine bis mittlere Bibliotheksgröße 	<ul style="list-style-type: none"> ● Ziel ist, eine maximale Diversität um eine Position im chemischen „Strukturraum“ zu erhalten, die nach ihrer chemischen Zugänglichkeit und „Naturstoff-Ähnlichkeit“ (d. h. struktureller Komplexität) gewählt wurde ● Syntheseweg wird durch „wirkungsvolle“ chemische Reaktionen bestimmt (im Allgemeinen hohe Ausbeute, stereoselektiv, bindungsknüpfend, tolerant gegenüber funktionellen Gruppen usw.) ● vorwärtsgerichtete, diversitätsorientierte Syntheseplanung ● Bausteine sollen in großer Diversität kommerziell erhältlich sein ● kodierte Split-Pool-Synthese ist Methode der Wahl ● großes Bibliotheksformat



Schema 9. Synthese des zentralen Bausteins für eine Mniopetalbibliothek nach Jauch et al.: a) P(OMe)_3 , 90°C , 48 h; b) $-80 \rightarrow -10^\circ\text{C}$, 12 h; c) 4 Äquiv. 9-BBN, RT, 24 h; d) $\text{H}_2\text{O}_2/\text{NaOH}$, RT, 4 h; e) IBX, RT, 5 h; f) 5 Äquiv. PhSeLi , $-60 \rightarrow -30^\circ\text{C}$, 12 h; g) Dess-Martin-Periodinan, 2,6-Lutidin, CH_2Cl_2 , RT, 12 h; h) DDQ, RT, 40 min. 9-BBN = 9-Borabicyclo[3.3.1]nonan, IBX = *o*-Iodoxybenzoesäure, DDQ = 2,3-Dichlor-5,6-dicyan-1,4-benzochinon, Menthyl = (+)-Menthyl.

7. Zusammenfassung und Ausblick

Die Fortschritte bei der Herstellung von Naturstoffbibliotheken haben überzeugend gezeigt, dass die Festphasensynthese einen Stand erreicht hat, der ihren Einsatz in der Naturstoffsynthese gestattet. Es ist möglich, komplexe Zielmoleküle anzugehen, die eine zweistellige Anzahl an Syntheseschritten erfordern. Obwohl die Gesamtausbeuten der vorgestellten Synthesen hoch sind, ist der Bedarf an effizienten und selektiven Reaktionen, die für die Festphasensynthese verwendet werden können, größer als je zuvor. Es ist zu erwarten, dass der anhaltende Fortschritt in der Methodenentwicklung einen großen Beitrag für die Suche nach strukturell komplexeren und vielfältigeren Bibliotheken liefern wird. Eine weitere Richtung für zukünftige Untersuchungen wird sicherlich die Herstellung von größeren Bibliotheken

sein, bei denen die großen Vorteile der Festphasensynthese gegenüber der Synthese in Lösung den anfänglichen Optimierungsbedarf rechtfertigen werden.^[5, 38b] Der zusätzliche Syntheseaufwand, den kombinatorische Bibliotheken von strukturell komplexen Naturstoffanaloga erfordern, sollte durch höhere Trefferquoten und bessere Leitstrukturen mehr als kompensiert werden – und das bei Bibliotheken, die kleiner als die konventionellen sind.

Da die Naturstoffe schon von der Natur als biologisch relevante Leitstrukturen im unendlichen „Strukturraum“ selektioniert worden sind, gibt es gewichtige Argumente, kombinatorische Bibliotheken auf Basis dieser Strukturgerüste aufzubauen. Die Natur war sehr zurückhaltend im Gebrauch der Vielzahl möglicher Proteinstrukturen und hat sich selbst auf eine kleine Zahl von Domänen und Faltungstypen beschränkt. Diese wenigen Grundmuster wurden durch die individuellen Aminosäureseitenketten aber so mannigfaltig variiert, dass die Suche nach niedermolekularen Liganden für diese Proteine im chemischen „Strukturraum“ weiterhin sehr herausfordernd bleiben wird.

Wir danken Prof. G. A. Petsko (Brandeis University), Prof. R. Goody, Dr. I. Schlichting und Prof. A. Wittinghofer (Max-Planck-Institut für molekulare Physiologie, Dortmund), Dr. C. Ehrhardt, Dr. F. Petersen und Dr. K. Hinterding (Novartis, Basel) für anregende Diskussionen. Unsere Arbeiten wurde von der Max-Planck-Gesellschaft, der Deutschen Forschungsgemeinschaft und dem Fonds der Chemischen Industrie (Liebig-Stipendium für R.B.) finanziell unterstützt.

Eingegangen am 22. November 2001 [A 502]

- [1] Übersichtsartikel: a) P. R. E. Mittl, M. G. Grütter, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2001**, 5, 402–408; b) R. C. Stevens, S. Yokoyama, I. A. Wilson, *Science* **2001**, 294, 89–92; c) R. C. Stevens, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2000**, 10, 558–563; d) S. K. Burley, S. C. Almo, J. B. Bonanno, M. Capel, M. R. Chance, T. Gaasterland, D. Lin, A. Sali, F. W. Studier, S. Swaminathan, *Nat. Genet.* **1999**, 23, 151–157; e) G. Montelione, S. Anderson, *Nat. Struct. Biol.* **1999**, 6, 11–12; f) S. A. Teichmann, C. Chothia, M. Gerstein, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **1999**, 9, 390–399; g) T. Gaasterland, *Nat. Biotechnol.* **1998**, 16, 625–627; h) B. Rost, *Structure* **1998**, 6, 259–263.

- [2] Übersichtsartikel und eine ausführliche Diskussion über den Beitrag von kleinen Molekülen bei der Aufklärung biochemischer Reaktionswege finden sich in: a) T. J. Mitchison, *Chem. Biol.* **1994**, *1*, 3–6; b) S. L. Schreiber, *Biorg. Med. Chem.* **1998**, *6*, 1127–1152; c) C. M. Crews, U. Splittergerber, *TIBS* **1999**, *24*, 317–320; d) B. R. Stockwell, *Trends Biotechnol.* **2000**, *18*, 449–455; e) B. R. Stockwell, *Nat. Rev. Genetics* **2000**, *1*, 116–125; f) P. J. Alaimo, M. A. Shogren-Knaak, K. M. Shokat, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2001**, *5*, 360–367.
- [3] a) R. S. Bohacek, C. McMartin, W. C. Guida, *Med. Res. Rev.* **1996**, *16*, 3–50; b) H. C. Kolb, M. G. Finn, K. B. Sharpless, *Angew. Chem.* **2001**, *113*, 2056–2075; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 2004–2021.
- [4] Diskussion über das Problem der Diversität in kombinatorischen Bibliotheken: a) A. Golebiowski, S. R. Klopfenstein, D. E. Portlock, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2001**, *5*, 273–284; b) J. S. Mason, M. A. Hermesmeier, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **1999**, *3*, 342–349; c) J. M. Blaney, E. J. Martin, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **1997**, *1*, 54–59; Diskussion über das Problem der Diversität in historischen Substanzsammlungen eines großen pharmazeutischen Unternehmens: d) R. W. Spencer, *Biotechnol. Bioeng.* **1998**, *61*, 61–67.
- [5] Eine Diskussion über kombinatorischen Bibliotheken, die auf privilegierten Strukturen basieren, und eine experimentelle Bestätigung dieses Konzepts: a) K. C. Nicolaou, J. A. Pfefferkorn, A. J. Roecker, G.-Q. Cao, S. Barluenga, H. J. Mitchell, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 9939–9953; b) K. C. Nicolaou, J. A. Pfefferkorn, H. J. Mitchell, A. J. Roecker, S. Barluenga, G.-Q. Cao, R. L. Affleck, J. E. Lillig, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 9954–9967; c) K. C. Nicolaou, J. A. Pfefferkorn, S. Barluenga, H. J. Mitchell, A. J. Roecker, G.-Q. Cao, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 9968–9976.
- [6] Übersichtsartikel zu wirkstoffähnlichen Eigenschaften von kombinatorischen Bibliotheken: W. P. Walters, Ajay, M. A. Murcko, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **1999**, *3*, 384–387.
- [7] Arzneimitteldatenbanken wurden analysiert, um Muster in molekularen Gerüsten und Funktionalitäten zu erkennen: a) G. W. Bemis, M. A. Murcko, *J. Med. Chem.* **1996**, *39*, 2887–2893; b) Ajay, W. P. Walters, M. A. Murcko, *J. Med. Chem.* **1998**, *41*, 3314–3324; c) J. Sadowski, H. Kubinyi, *J. Med. Chem.* **1998**, *41*, 3325–3329; d) A. K. Ghose, V. N. Viswanadhan, J. J. Wendoloski, *J. Comb. Chem.* **1999**, *1*, 55–68; e) M.-L. Lee, G. Schneider, *J. Comb. Chem.* **2001**, *3*, 284–289.
- [8] a) A. N. Lupas, C. P. Ponting, R. B. Russell, *J. Struct. Biol.* **2001**, *134*, 199–203 und Lit. [12d]; b) S. Govindarajan, R. A. Goldstein, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1996**, *93*, 3341–3345.
- [9] a) M. Weir, M. Swindells, J. Overington, *Trends Biotechnol.* **2001**, *19*, S61–S66; b) C. P. Ponting, J. Schultz, R. P. Copley, M. A. Andrade, P. Bork, *Adv. Protein. Chem.* **2000**, *54*, 185–244; c) K. Hofmann in *Handbook of Enzymes in Organic Synthesis* (Hrsg.: H. Waldmann, K. H. Drauz), Wiley-VCH, Weinheim, **2002**.
- [10] SCOP-Datenbank: A. G. Murzin, S. E. Brenner, T. Hubbard, C. Chothia, *J. Mol. Biol.* **1995**, *247*, 536–540.
- [11] C. Branden, J. Tooze, *Introduction to Protein Structure*, Garland, New York, **1998**.
- [12] a) C. A. Orengo, D. T. Jones, J. M. Thornton, *Nature* **1994**, *372*, 631–634; b) J. M. Thornton, D. T. Jones, M. W. MacArthur, C. A. Orengo, M. B. Swindells, *Philos. Trans. R. Soc. London Ser. B* **1995**, *348*, 71–79; c) Y. I. Wolf, N. V. Grishin, E. V. Koonin, *J. Mol. Biol.* **2000**, *299*, 897–905; d) S. Govindarajan, R. Recabarren, R. A. Goldstein, *Proteins* **1999**, *35*, 408–414.
- [13] a) C. Chothia, *Nature* **1992**, *357*, 543–544; b) P. Green, D. Lipman, L. Hillier, R. Waterston, D. Stobes, J. M. Claverie, *Science* **1993**, *259*, 1711–1716.
- [14] N. Alexandrov, N. Go, Abstract präsentiert auf der Konferenz Bioinformatics-Genome-Regulation-Structure (Novosibirsk), **1998**.
- [15] a) A. Danchin, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **1999**, *9*, 363–367; b) R. L. Tatusov, D. A. Natale, I. V. Garkavtsev, T. A. Tatusova, U. T. Shankararam, B. S. Rao, B. Kiryutin, M. Y. Galperin, N. D. Fedorova, E. V. Koonin, *Nucleic Acids Res.* **2001**, *29*, 22–28.
- [16] Eine Recherche in der PDB-Datenbank hat ergeben, dass gegenwärtig ca. 7000 Strukturen von Proteinen mit niedermolekularen Liganden gelöst worden sind (zusammengestellt aus der IMP-Bibliothek von biologischen Makromolekülen, <http://www.imb-jena.de/ImgLibPDB/>).
- [17] Übersichtsartikel über den Zusammenhang von Proteinfunktion und Faltungstyp: a) J. A. Gerlt, P. C. Babbitt, *Annu. Rev. Biochem.* **2001**, *70*, 209–246; b) A. E. Todd, C. A. Orengo, J. M. Thornton, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **1999**, *3*, 548–556; c) J. A. Gerlt, P. C. Babbitt, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **1998**, *2*, 607–612.
- [18] a) L. Holm, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **1998**, *8*, 372–379; b) L. Holm, C. Sander, *Proteins* **1997**, *28*, 72–82.
- [19] a) M. M. G. M. Thunnissen, P. Nordlund, J. Z. Haeggström, *Nat. Struct. Biol.* **2001**, *8*, 131–135; b) M.-Q. Zhang, *Curr. Med. Chem.* **1997**, *4*, 67–78; c) A. Wetterholm, J. Z. Haeggström, B. Samuelsson, W. Yuan, B. Munoz, C.-H. Wong, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1995**, *275*, 31–37; d) I. R. Ollmann, J. H. Hogg, B. Munoz, J. Z. Haeggström, B. Samuelsson, C.-H. Wong, *Biorg. Med. Chem.* **1995**, *3*, 969–995; e) L. Orning, G. Krivi, F. A. Fitzpatrick, *J. Biol. Chem.* **1991**, *266*, 1375–1378.
- [20] M. S. Hasson, I. Schlichting, J. Moulai, K. Taylor, W. Barrett, G. L. Kenyon, P. C. Babbitt, J. A. Gerlt, G. A. Petsko, D. Ringe, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1998**, *95*, 10396–10401.
- [21] a) G. Wess, M. Urmann, B. Sickenberger, *Angew. Chem.* **2001**, *113*, 3443–3453; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 3341–3350; b) J. Drews, *Science* **2000**, *287*, 1960–1964.
- [22] Übersicht über einen chemogenomischen Ansatz in der Wirkstoffforschung: P. R. Caron, M. D. Mullican, R. D. Mashal, K. P. Wilson, M. S. Su, M. A. Murcko, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2001**, *5*, 464–470.
- [23] R. B. Russell, P. D. Sasieni, M. J. E. Sternberg, *J. Mol. Biol.* **1998**, *282*, 903–918.
- [24] A. G. Murzin, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **1998**, *8*, 380–387.
- [25] B. E. Evans, K. E. Rittle, M. G. Bock, R. M. DiPrado, R. M. Freidinger, W. L. Whitter, G. F. Lundell, D. F. Veber, P. S. Anderson, R. S. L. Chang, V. J. Lotti, D. J. Cerino, T. B. Chen, P. J. Kling, K. A. Kunkel, J. P. Springer, J. Hirshfield, *J. Med. Chem.* **1988**, *31*, 2235–2246.
- [26] K. A. Denessiouk, M. S. Johnson, *Proteins* **2000**, *38*, 310–326.
- [27] I. Vetter, A. Wittinghofer, *Q. Rev. Biophys.* **1999**, *32*, 1–56.
- [28] Aus den Erfahrungen eines führenden pharmazeutischen Unternehmens in Bindungstests an Proteinen kann die Trefferquote aus historischen Substanzsammlungen um zwei Größenordnungen höher angenommen werden als die aus zufälligen kombinatorischen Bibliotheken. Die Trefferquote von isolierten Naturstoffen kann sogar als signifikant höher beurteilt werden als Erstere (persönliche Mitteilung von Frank Petersen, Novartis). Die Autoren sind sich bewusst, dass trotz dieses generellen Trends das Resultat eines spezifischen Screening-Prozesses unterschiedliche Resultate zeigen kann, abhängig von dem individuellen Aufbau der historischen Substanzsammlung einer Pharmafirma, dem biologischen Target und dem gewählten Assay-Typ. Siehe auch Lit. [4d] und K. U. Bindseil, J. Jakupovic, D. Wolf, J. Lavayre, J. Leboul, D. van der Pyl, *Drug Discovery Today* **2001**, *6*, 840–847.
- [29] J. Clardy in *Chemical Ecology* (Hrsg.: T. Eisner, J. Meinwald), National Academy Press, Washington, DC, **1995**.
- [30] Genistein inhibiert PTK und Topoisomerasen: a) T. Akiyama, J. Ishida, S. Nakagawa, H. Ogawara, S. Watanabe, N. Itoh, M. Shibuya, Y. Fukami, *J. Biol. Chem.* **1987**, *262*, 5592–5595; b) K. Kiguchi, A. I. Constantinou, E. Huberman, *Cancer. Commun.* **1990**, *2*, 271–277; c) G. Peterson, *J. Nutr.* **1995**, *125* (3. Suppl.), 7845–7895; d) A. Constantinou, E. Huberman, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **1995**, *218*, 109–115; Genistein inhibiert PI(4)K: e) F. Shen, G. Weber, *Oncol. Res.* **1997**, *9*, 597–602; Genistein mit Östrogenrezeptor: f) D. T. Zava, G. Duwe, *Nutr. Cancer* **1997**, *27*, 31–40.
- [31] Zur Rolle von Naturstoffen bei Pharmazeutika: C. M. Cragg, D. J. Newman, K. M. Snader, *J. Nat. Prod.* **1997**, *60*, 52–60.
- [32] a) T. Henkel, R. M. Brunne, H. Müller, F. Reichel, *Angew. Chem.* **1999**, *111*, 688–691; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, *38*, 643–647; b) Y.-Z. Shu, *J. Nat. Prod.* **1998**, *61*, 1053–1071; c) J. Mann, *Nat. Rev. Cancer* **2002**, *2*, 143–148.
- [33] D. G. I. Kingston in *The Practice of Medicinal Chemistry* (Hrsg.: C. G. Wermuth), Academic Press, London, **1996**.
- [34] a) P. Stahl, L. Kissau, R. Mazitschek, A. Huwe, P. Furet, A. Giannis, H. Waldmann, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 11586–11593; b) P. Stahl, L. Kissau, R. Mazitschek, A. Giannis, H. Waldmann, *Angew. Chem.* **2002**, *114*, 1222–1226; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 1174–1178.

- [35] Aktuelle und umfassende Übersichtsartikel zur Synthese von Naturstoffbibliotheken in Lösung und an der festen Phase: a) L. Wessjohann, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2000**, *4*, 303–309; b) L. J. Wilson in *Solid-Phase Organic Synthesis* (Hrsg.: K. Burgess), Wiley-Interscience, New York, **2000**; c) D. G. Hall, S. Manku, F. Wang, *J. Comb. Chem.* **2001**, *3*, 125–150; d) C. Watson, *Angew. Chem.* **1999**, *111*, 2025–2031; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, *38*, 1903–1908.
- [36] 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. Verdier-Panard, E. Hamel, *Angew. Chem.* **1997**, *109*, 2181–2187; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1997**, *36*, 2097–2103.
- [37] a) L. A. Thompson, F. L. Moore, Y.-C. Moon, J. A. Ellman, *J. Org. Chem.* **1998**, *63*, 2066–2067; b) D. R. Dragoli, L. A. Thompson, J. O'Brien, J. A. Ellman, *J. Comb. Chem.* **1999**, *1*, 534–539; Synthese einer Prostanoidbibliothek an löslichen Polymeren und deren Untersuchung auf antivirale Aktivität: c) K. J. Lee, A. Angulo, P. Ghazal, K. D. Janda, *Org. Lett.* **1999**, *1*, 1859–1862.
- [38] a) C. W. Lindsley, L. K. Chan, B. C. Goess, R. Joseph, M. D. Shair, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 422–423; b) Kürzlich haben Shair et al. eine Festphasensynthese einer Bibliothek mit 2527 Verbindungen unter Anwendung einer ähnlichen biomimetischen oxidativen Kupplung an der festen Phase beschrieben: H. E. Pelish, N. J. Westwood, Y. Feng, T. Kirchhausen, M. D. Shair, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 6740–6741.
- [39] K. C. Nicolaou, N. Winssinger, D. Vourloumis, T. Ohshima, S. Kim, J. Pfefferkorn, J. Y. Xu, T. Li, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 10814–10826.
- [40] a) B. Meseguer, D. Alonso-Diaz, N. Griebenow, T. Herget, H. Waldmann, *Angew. Chem.* **1999**, *111*, 3083–3087; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, *38*, 2902–2906; b) B. Meseguer, D. Alonso-Diaz, N. Griebenow, T. Herget, H. Waldmann, *Chem. Eur. J.* **2000**, *6*, 3943–3954.
- [41] 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.
- [42] U. Reiser, J. Jauch, *Synlett* **2001**, 90–92.
- [43] a) J. Augen, *Drug Discovery Today* **2002**, *7*, 315–323; b) A. R. Leach, M. M. Hann, *Drug Discovery Today* **2000**, *5*, 326–336.
- [44] Eine exzellente Beschreibung dieses Konzepts und dessen konzeptionellen Unterschiede zur Zielmolekül-orientierten Synthese: S. L. Schreiber, *Science* **2000**, *287*, 1964–1969.
- [45] Einige Beispiele für diesen Ansatz: a) D. S. Tan, M. A. Foley, B. R. Stockwell, M. D. Shair, S. L. Schreiber, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 9073–9087; b) D. S. Tan, M. A. Foley, M. D. Shair, S. L. Schreiber, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 8565–8566; c) D. Lee, J. K. Sello, S. L. Schreiber, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 10648–10649; d) D. Lee, J. K. Sello, S. L. Schreiber, *Org. Lett.* **2000**, *2*, 709–712; Übersichtsartikel: e) R. Arya, M.-G. Baek, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2001**, *5*, 292–301.