

schließlich) den Corrin-Ring von Cobalamin bindet.^[29] In dieser Arbeit haben wir Coenzym B₁₂ **1** zur Bildung eines Antikörpers verwendet, der selektiv die Base-on-Form von **1** und anderer B₁₂-Coenzyme erkennt. Die Nucleotid-Schleife, ein den Base-on-Formen vollständiger Cobamide vorbehaltenes Strukturmotiv, steuert die Reaktivität der Cobalt-Corrine^[3,4] und dient außerdem als bisher kaum untersuchtes Erkennungsmerkmal der selektiven Interaktion mit B₁₂-bindenden Proteinen.^[8] Der Antikörper 2C2 erkennt die intakte DMB-Nucleotid-Schleife und bewirkt die Bildung der Base-on-Form von Coenzym B₁₂-Analoga, deren Strukturen in Lösung überwiegend Base-off sind. Es kann sich dabei um ein funktionales Modell für natürliche B₁₂-bindende Proteine, beispielsweise den (menschlichen) Intrinsischen Faktor und Transcobalamin handeln.^[23] Diese wichtigen B₁₂-Rezeptoren binden vorzugsweise Cobamide mit einem DMB-Nucleotid^[23,30] und sind selektiv bezüglich strukturell verwandter B₁₂-Derivate, die auch in Lösung eine Base-on-Konstitution vorziehen.

Eingegangen am 2. April 2002 [Z19024]

- [1] P. G. Lenhert, D. C. Hodgkin, *Nature* **1961**, *192*, 937–938.
- [2] J. Pickworth-Glusker in *B₁₂, Vol. I* (Hrsg.: D. Dolphin), Wiley, New York, **1982**, S. 24–106.
- [3] B. Kräutler in *Vitamin B₁₂ and B₁₂ Proteins* (Hrsg.: B. Kräutler, B. T. Golding, D. Arigoni), Wiley-VCH, Weinheim, **1998**, S. 3–43.
- [4] J. M. Pratt in *B₁₂, Vol. I* (Hrsg.: D. Dolphin), Wiley, New York, **1982**, S. 325–392.
- [5] a) C. L. Drennan, S. Huang, J. T. Drummond, R. G. Matthews, M. L. Ludwig, *Science* **1994**, *266*, 1669–1674; b) M. L. Ludwig, P. R. Evans in *Chemistry and Biochemistry of B₁₂* (Hrsg.: R. Banerjee), Wiley, New York, **1999**, S. 217–226.
- [6] F. Mancia, N. H. Keep, A. Nakagawa, P. F. Leadlay, S. McSweeney, B. Rasmussen, P. Bösecke, O. Diat, P. R. Evans, *Structure* **1996**, *4*, 339–350.
- [7] R. Reitzker, K. Gruber, G. Jogl, U. G. Wagner, H. Bothe, W. Buckel, C. Kratky, *Structure* **1999**, *7*, 891–920.
- [8] N. Shibata, J. Masuda, T. Tobimatsu, T. Toraya, K. Suto, Y. Morimoto, N. Yasuoka, *Structure* **1999**, *7*, 997–1008.
- [9] R. A. Lerner, S. J. Benkovic, P. G. Schultz, *Science* **1991**, *252*, 659–667.
- [10] P. G. Schultz, R. A. Lerner, *Science* **1995**, *269*, 1835–1842.
- [11] D. Hilvert, *Topics stereochem.* **1999**, *22*, 83–135.
- [12] D. Hilvert, *Annu. Rev. Biochem.* **2000**, *69*, 751–793.
- [13] *Catalytic Antibodies* (Hrsg.: D. J. Chadwick, J. Marsh), Wiley, Chichester, **1991** (Ciba Foundation Symposium 159).
- [14] P. Wentworth, Jr., L. H. Jones, A. D. Wentworth, X. Zhu, N. A. Larsen, I. A. Wilson, X. Xu, W. A. Goddard III, K. D. Janda, A. Eschenmoser, R. A. Lerner, *Science* **2001**, *293*, 1806–1811.
- [15] a) H. Gershman, N. Nathanson, R. Abeles, L. Levine, *Arch. Biochem. Biophys.* **1972**, *153*, 407–409; b) D. F. M. Van De Weil, W. T. Goedemans, M. G. Woldring, *Clin. Chim. Acta* **1974**, *56*, 143–149; c) S. S. Ahrenstedt, J. I. Thorell, *Clin. Chim. Acta* **1979**, *95*, 417–423; d) J. J. O'Sullivan, R. J. Leeming, S. S. Lynch, A. Pollock, *J. Clin. Pathol.* **1992**, *45*, 328–331; e) S. C. J. Meskers, P. J. M. Dekkers, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 6413–6414.
- [16] T. Toraya, K. Ohashi, H. Ueno, S. Fukui, *Bioinorg. Chem.* **1975**, *4*, 245–255.
- [17] E. Harlow, D. Lane, *A Laboratory Manual*, Cold Springs Laboratories, New York, **1988**.
- [18] B. R. Clark, E. Engvall, *Enzyme-Immunoassay*, CRC, Boca Raton, FL, **1980**, S. 167–179.
- [19] A. Eschenmoser, *Angew. Chem.* **1988**, *100*, 5–40; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1988**, *27*, 5–40, zit. Lit.
- [20] H. A. Barker, H. Weissbach, R. D. Smyth, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1958**, *44*, 1093–1097.
- [21] W. Fieber, B. Hoffmann, W. Schmidt, E. Stupperich, R. Konrat, B. Kräutler, *Helv. Chim. Acta* **2002**, *85*, 927–944.

- [22] W. Friedrich in *Fermente, Hormone, Vitamine, Vol. III/2* (Hrsg.: R. Ammon, W. Dirscherl), Thieme, Stuttgart, **1975**, S. 10–152.
- [23] E. Nexø in *Vitamin B₁₂ and B₁₂ Proteins* (Hrsg.: B. Kräutler, D. Arigoni, B. T. Golding), Wiley-VCH, Weinheim, **1998**, S. 461–471.
- [24] E. N. G. Marsh, D. E. Holloway, H.-P. Chen in *Vitamin B₁₂ and B₁₂ Proteins* (Hrsg.: B. Kräutler, D. Arigoni, B. T. Golding), Wiley-VCH, Weinheim, **1998**, S. 253–264.
- [25] B. Hoffmann, M. Oberhuber, E. Stupperich, H. Bothe, W. Buckel, R. Konrat, B. Kräutler, *J. Bacteriology* **2000**, *182*, 4773–4782.
- [26] A. P. Campbell, T. M. Tarasow, W. Massefski, P. E. Wright, D. Hilvert, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1993**, *90*, 8663–8667.
- [27] A. Bax, G. W. Vuister, S. Greziesk, F. Delaglio, R. Tschudin, G. Zhu, *Methods Enzymol.* **1994**, *239*, 79–105.
- [28] J. R. Lorsch, J. W. Szostak, *Biochemistry* **1994**, *33*, 973–982.
- [29] D. Sussman, J. C. Nix, C. Wilson, *Nat. Struct. Biol.* **2000**, *7*, 53–57.
- [30] B. Elsenhans, I. H. Rosenberg, *Biochemistry* **1984**, *23*, 805–808.

Festphasensynthese und biologische Evaluierung einer Pepticinamin-E-Bibliothek**

Michael Thutewohl, Lars Kissau, Boriana Popkirova, Ionna-Maria Karaguni, Thorsten Nowak, Michael Bate, Jürgen Kuhlmann, Oliver Müller und Herbert Waldmann*

In ca. 30 % aller menschlichen Tumoren sind die kodierenden Gene der Ras-Proteine mutiert.^[1,2] Ihre korrekte biologische Funktion hängt entscheidend von ihrer posttranslationalen Modifizierung mit Lipidresten ab. Oncogenes Ras wirkt nur dann als molekularer Schalter beim Weiterleiten wachstumsfördernder Signale, wenn es am C-Terminus S-farnesyliert und nachfolgend an der Plasmamembran lokalisiert wird. Daher sind Inhibitoren der Proteinfarnesytrans-

[*] Prof. Dr. H. Waldmann, Dipl.-Chem. M. Thutewohl, Dipl.-Chem. L. Kissau
Max-Planck-Institut für molekulare Physiologie
Abt. Chemische Biologie
Otto-Hahn-Straße 11, 44227 Dortmund (Deutschland)
und
Fachbereich 3, Organische Chemie
Universität Dortmund (Deutschland)
Fax: (+49) 231-133-2499
E-mail: herbert.waldmann@mpi-dortmund.mpg.de
Dipl.-Biochem. B. Popkirova, Dipl.-Biol. I.-M. Karaguni,
Dr. J. Kuhlmann, Priv.-Doz. Dr. O. Müller
Max-Planck-Institut für molekulare Physiologie
Abt. Strukturelle Biologie
Otto-Hahn-Straße 11, 44227 Dortmund (Deutschland)
Dr. T. Nowak, M. Bate
AstraZeneca, Mereside, Alderley Park, Macclesfield,
Cheshire SK10 4TG (Großbritannien)

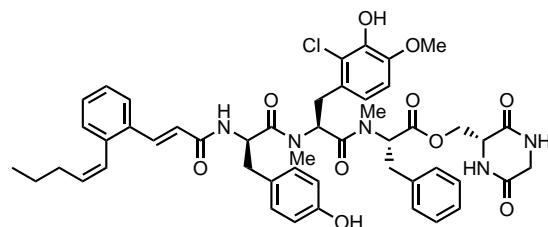
[**] Diese Arbeit wurde von der Deutschen Forschungsgemeinschaft, AstraZeneca (Case Award für M.T.) und dem Fonds der chemischen Industrie (Kekulé-Stipendium für M.T. und L.K.) unterstützt. Wir danken Helmut Kipp für die Bereitstellung des Fluoroscan-Plate-Readers und Christine Nowak für die Isolierung der Ratten-PFT.

 Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://www.angewandte.de> zu finden oder beim Autor anzufordern.

ferase (PFT) von großem Interesse als potenzielle, neue Antitumortherapeutika^[1,2] Allerdings sind einige der wichtigsten fundamentalen Aspekte dieser Anwendung der Signalthantransduktionstherapie^[3] bislang ungeklärt. So ist das entscheidende Substrat der PFT, dessen Farnesylierung durch die Wirkstoffe unterdrückt wird, unbekannt.^[2] Von besonderem Interesse sind darüber hinaus Inhibitoren, die Apoptose, d.h. den programmierten Zelltod, auslösen.^[2] Ebenfalls als überaus viel versprechend gelten Bissubstratinhibitoren der PFT.^[4]

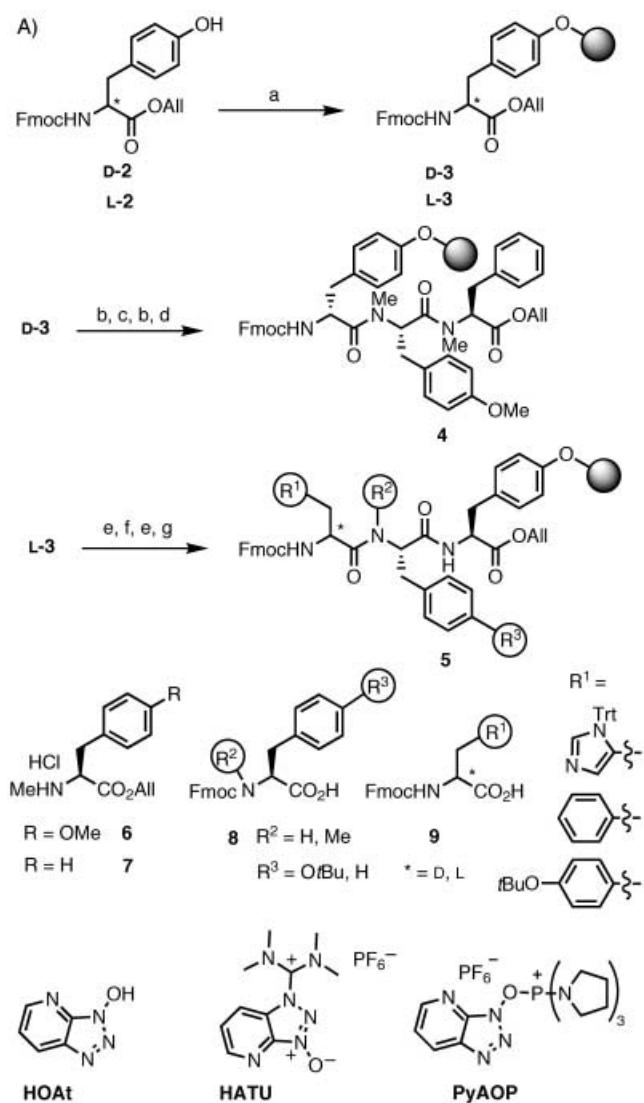
Um diese biologischen Fragestellungen gezielt, aber mit hoher Flexibilität angehen zu können, wäre die Verfügbarkeit einer Klasse potenzieller PFT-Inhibitoren besonders wünschenswert, deren Struktur rasch und effizient durch kombinatorische Synthese variiert werden kann. Dabei sollten sich Substanzen ergeben, die kompetitiv zum Proteinsubstrat, zum Farnesylypyrophosphat (FPP) oder sogar zu beiden Substraten sind und Substanzen, die in Ras-transformierten,

aber nicht in den entsprechenden untransformierten Zellen Apoptose auslösen. Pepticinamin E **1**^[5] (Schema 1) ist ein natürlicher Bissubstratinhibitor der PFT ($IC_{50} = 42 \mu\text{M}$). Basierend auf der erfolgreichen Totalsynthese dieses modular aufgebauten Naturstoffs^[6] haben wir die in Schema 2a und 2b

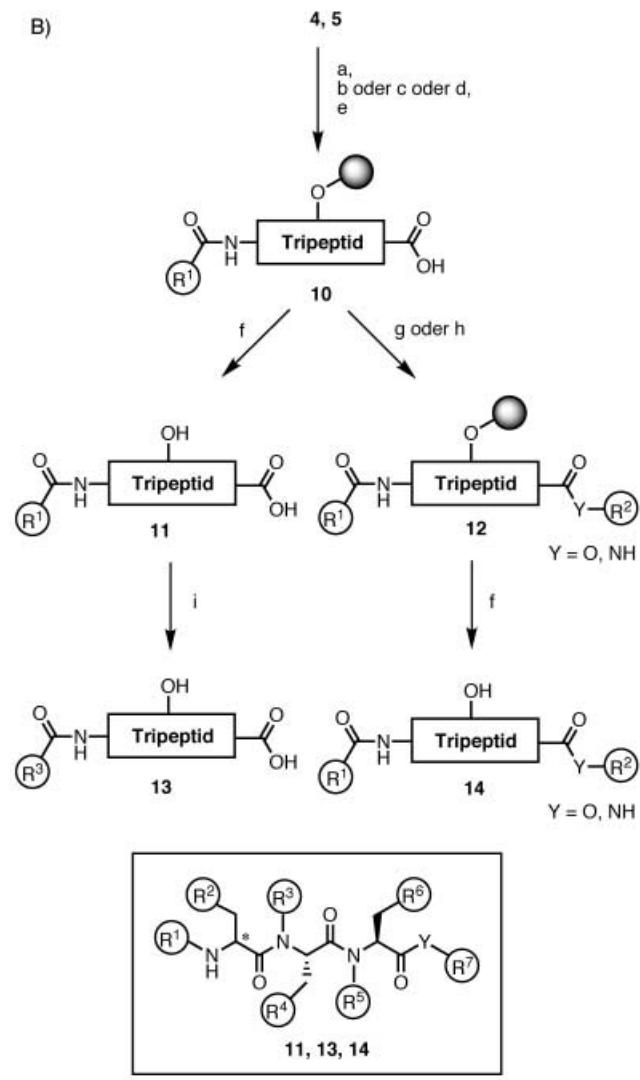


Pepticinamin E 1
 $IC_{50} = 42 \mu\text{M}$

Schema 1. Der natürliche PFT-Inhibitor Pepticinamin E.



Schema 2. A): a) DEAD, PPh_3 , THF, 0°C , 1 h, RT, 12 h, Beladung: $0.50\text{--}0.53 \text{ mmol g}^{-1}$, 54–59 %; b) $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$, PhSiH_3 oder NMA, 24 h; c) **6**, HATU, HOAt, $i\text{PrNEt}_2$, NMP; 2×24 h; d) **7**, PyAOP, HOAt, $i\text{PrNEt}_2$, NMP; 2×24 h; e) Piperidin/DMF 1:4, 2×5 min; f) **8**, HATU, $i\text{PrNEt}_2$, NMP, 2.5 h; g) **9**, HATU, DIPEA, NMP oder DIC, HOAt, DMF, 14 h. B): a) Piperidin/DMF 1:4, 2×5 min; b) $\text{R}^1\text{CO}_2\text{H}$, HATU, HOAt, $i\text{PrNEt}_2$, NMP, 12 h ($\text{R}^1 = \text{ArCH}_2\text{CH}_2\text{--}$); c) $\text{R}^1\text{CO}_2\text{H}$, PyAOP, DMAP, $i\text{PrNEt}_2$, CH_2Cl_2 /DMF 1:2, 12 h ($\text{R}^1 = \text{ArCH} = \text{CH--}$); d) R^1COCl , HOAt, DMAP, $i\text{PrNEt}_2$, CH_2Cl_2 /DMF 2:1, 7 h; e) $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$, Morpholin, THF, 4 h; f) TFA/ H_2O 95:5, 5 h; g) R^2NH_2 , PyAOP, $i\text{PrNEt}_2$, NMP, 2×8 h ($\text{Y} = \text{NH}$); h) Cs_2CO_3 , KI, RX, DMF, 24 h, RT ($\text{X} = \text{Br}$) oder 24–48 h, 50°C ($\text{X} = \text{Cl}$); i) 10% Pd/C, H_2 , Dioxan oder MeOH, 8 h. (Abkürzungen siehe Lit. [18].)



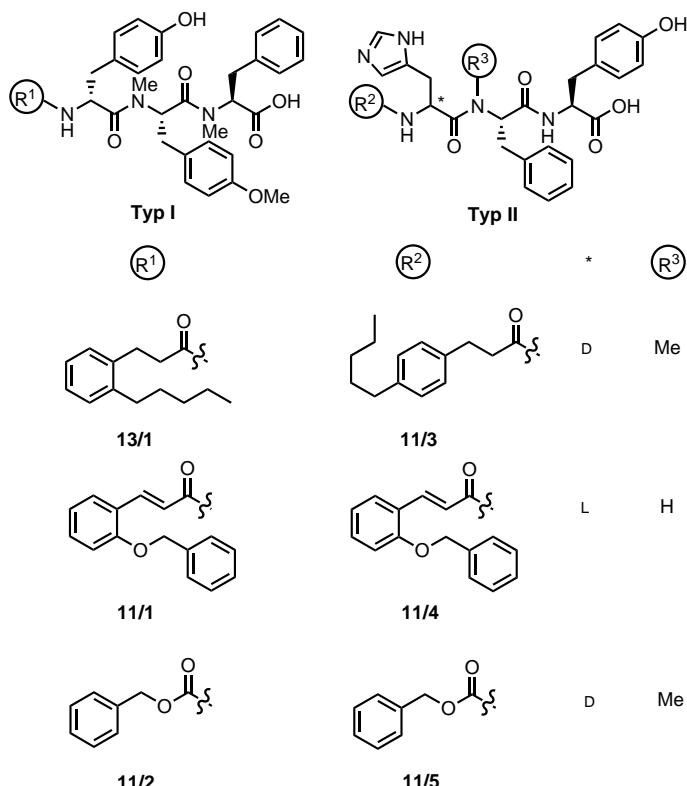
50 Verbindungen

gezeigte Festphasensynthese einer Bibliothek von Pepticinnamin-E-Analoga entwickelt.

Um alle drei zentralen Aminosäurefragmente breit und unabhängig variieren zu können, wurden zwei verschiedene Synthesesequenzen ausgehend von unterschiedlichen Positionen im Naturstoff entwickelt. Die orthogonal geschützten Tyrosine **D-2** und **L-2** wurden über eine Mitsunobu-Reaktion^[7] mit Beladungsgraden von 0.5–0.53 mmol g⁻¹ an Wang-Harz geknüpft (Ausbeuten 54–59%; die Beladung wurde mit der Fmoc-Methode^[8] bestimmt). Zum Aufbau der Tripeptid-Einheit **4** durch C-terminale Verlängerung ausgehend von **D-3** wurden die Allylesterschutzgruppen Pd⁰-katalysiert mit Phenylsilan oder *N*-Methylanilin als Allylfänger gespalten und die N-methylierten Aminosäurebausteine **6** und **7** wurden dann mit den hochleistungsfähigen Kupplungsreagentien HATU und PyAOP angeknüpft (Schema 2a).^[9]

Die alternative N-terminale Verlängerung ausgehend von **L-3** durch sequentielle basische Fmoc-Spaltung und anschließende Kupplung der Fragmente **8** und **9** lieferte die Tripeptide **5** (Schema 2a). Nach Abspaltung der Fmoc-Gruppe aus den Tripeptiden **4** und **5** wurden verschiedene Zimtsäure- und Hydrozimtsäure-Derivate R¹COOH sowie Benzylchlorformate R¹COCl angekuppelt, wobei die Anbindung der Zimtsäuren erst durch gemeinsame Anwendung von PyAOP mit DMAP zufriedenstellend gelang (Schema 2b). Freisetzung der Carbonsäuren mit Pd⁰-katalysiertem Allyltransfer auf Morpholin und saure Abspaltung der N-acylierten Tripeptide **10** vom polymeren Träger lieferte die Verbindungen **11**, aus denen durch Hydrierung der Doppelbindung des Zimtsäurefragments weitere Analoga **13** mit gesättigten Resten R³ hergestellt wurden. Ausgehend von den polymergebundenen Verbindungen **10** ließen sich durch effiziente Alkylierung der Carbonsäurefunktion bzw. PyAOP-vermittelte Aminkupplung festphasengebundene Ester und Amide **12** erhalten. Saure Ablösung vom Harz lieferte die Verbindungen **14**. Mit dieser Vorgehensweise wurde durch Variation von bis zu acht Strukturparametern eine Bibliothek aus 50 Pepticinnamin-E-Analoga durch 6–9-stufige Synthese am polymeren Träger mit Gesamtausbeuten zwischen 3% und 63% über alle Stufen erhalten. Dies entspricht einer mittleren Ausbeute von 65–91% je Stufe (im Regelfall werden ca. 80% erreicht). Die Zielverbindungen wurden in der Regel mit Reinheiten >90% isoliert.^[10]

Die so hergestellte Pepticinnamin-E-Bibliothek wurde in zwei Assays auf mögliche Inhibitoren der PFT geprüft. Zum einen kam ein Fluoreszenz-basierter Assay unter Verwendung von Ratten-Farnesyltransferase und einem Dansyl-markierten Ras-Peptid^[11] zum Einsatz, das auf ein 96-Well-Mikrotiterplatten-Format angepasst wurde.^[12] Zum anderen wurde Tritium-markiertes Farnesylpyrophosphat zusammen mit K-Ras-Protein als Substrat und humarer PFT aus Plazenta verwendet.^[13] Die Bibliothek enthielt zwei Gruppen von Inhibitoren (zusammen 28 Verbindungen) mit bemerkenswerter Aktivität. Die Inhibitoren mit höchster



Schema 3. Ausgewählte Mitglieder der Pepticinnamin-E-Bibliothek

Aktivität sind in Schema 3 dargestellt. Bei Inhibitoren vom Typ I ist das zentrale Tripeptidfragment des Naturstoffs weitgehend konserviert, der Rest R¹ wurde variiert. Bei Inhibitoren vom Typ II ist die Struktur des zentralen Tripeptids variiert, insbesondere enthalten sie ein Histidin. Darüber hinaus variiert die Struktur des lipophilen Restes R¹. In beiden Typen fehlt das C-terminale Diketopiperazin. Während die Verbindungen **11/1–11/5** Ratten-Farnesyltransferase im niedrigen, weitgehend einstelligen mikromolaren Bereich inhibieren, ist **13/1** gegenüber diesem Enzym nur schwach aktiv (Tabelle 1). Allerdings wird die humane PFT von dieser Substanz effizient inhibiert, ebenso von **11/1**, **11/2**, **11/4**, **11/5**.

Verbindungen **11/1–11/5** wurden hinsichtlich ihres Inhibitionsmechanismus näher untersucht (Tabelle 1, siehe auch die Hintergrundinformationen). Dabei zeigte sich, dass **11/1** und **11/2** bezüglich Farnesylpyrophosphat kompetitiv inhibieren, während **11/3** und **11/5** nur mit dem Peptidsubstrat konkurrieren. Darüber hinaus konnte mit Verbindung **11/4** wie

Tabelle 1. Inhibition der PFT durch ausgewählte Verbindungen.

Eintrag	Verb.	PFT (IC ₅₀) [μM] ^[a]	PFT (IC ₅₀) [μM] ^[b]	PFT ^[a] bezügl. CAAAX ^[c]	PFT ^[a] bezügl. FPP ^[d]
1	13/1	> 50	6.4	nb	nb
2	11/1	9.3	57% ^e	n. komp.	komp.
3	11/2	5.3	6.7	n. komp.	komp.
4	11/3	10.5	nb	komp.	n. komp.
5	11/4	6.4	19.2	komp.	komp.
6	11/5	8.0	6.4	komp.	n. komp.

[a] Fluoreszenz-Test gegenüber Ratten-PFT;^[12] [b] Radioaktiver Test gegenüber humarer PFT;^[13]

[c] Variation der Dansyl-Peptidkonzentration in Gegenwart des Inhibitors bei konstanter FPP-Konz.;

[d] Variation der FPP-Konzentration in Gegenwart des Inhibitors bei konstanter Dansyl-Peptidkonzentration; [e] 57% Inhibition bei 30 μM Inhibitorkonzentration; komp. = kompetitiv; n. komp. = nicht kompetitiv; nb = nicht bestimmt.

erhofft auch ein Bisubstratinhibitor identifiziert werden. Die Resultate der Enzymassays belegen, dass auf der Basis des Naturstoffs Pepticinnamin E flexibel und effizient unterschiedliche Typen von Farnesytransferase-Inhibitoren entwickelt werden können. Die verschiedenen Inhibitionsmodi der gefundenen Inhibitoren wurden mit Molecular-Modelling-Experimenten untersucht.^[14] Abbildung 1 a zeigt den berechneten Bindungsmodus für den Bisubstratinhibitor **11/4**. Es ist klar ersichtlich, dass beide Bindungstaschen besetzt sind (der substituierte Zimtsäurerest ragt nach hinten in die FPP-Bindungstasche) und dass das Histidin das Zinkatom im aktiven Zentrum der PFT koordiniert. Abbildung 1 b zeigt, dass der zu FPP kompetitive Inhibitor **11/2** die entsprechende Bindungstasche blockiert, nicht jedoch die Bindungsstelle für das Peptid. Abbildung 1 c zeigt, dass der zum Peptidsubstrat kompetitive Inhibitor **11/3** die Peptidbindungsstelle, jedoch nicht die FPP-Bindungstasche besetzt.

Schließlich wurde mit eines von uns entwickelten Assays^[15] geprüft, ob die Pepticinnamin-E-Bibliothek Verbindungen enthält, die bei Ras-transformierten, nicht aber bei den entsprechenden untransformierten Zellen Apoptose auslösen. Bei diesem Assay werden MDCK-f3-Tumorzellen aus Hundenieren verwendet, die stabil mit onkogenem H-Ras transfiziert sind.^[16] Eine Zellteilung-inhibierende, Morphologie-verändernde oder Apoptose-induzierende Wirkung einer Substanz auf MDCK-f3-Zellen zeigt eine Beeinflussung des Ras-Signaltransduktionspfades an.

Erfreulicherweise löste der Inhibitor **13/1** Apoptose der Tumorzelllinie aus (Abbildung 2). Bei 100 μ M Inhibitorkonzentration wurde nach 6 h Apoptose im Endstadium beobachtet, bei 50 μ M Konzentration war nach 6 h Apoptose im Frühstadium erkennbar. Ein Vergleichstest unter ansonsten identischen Bedingungen zeigte gegenüber Wildtyp-MDCK-

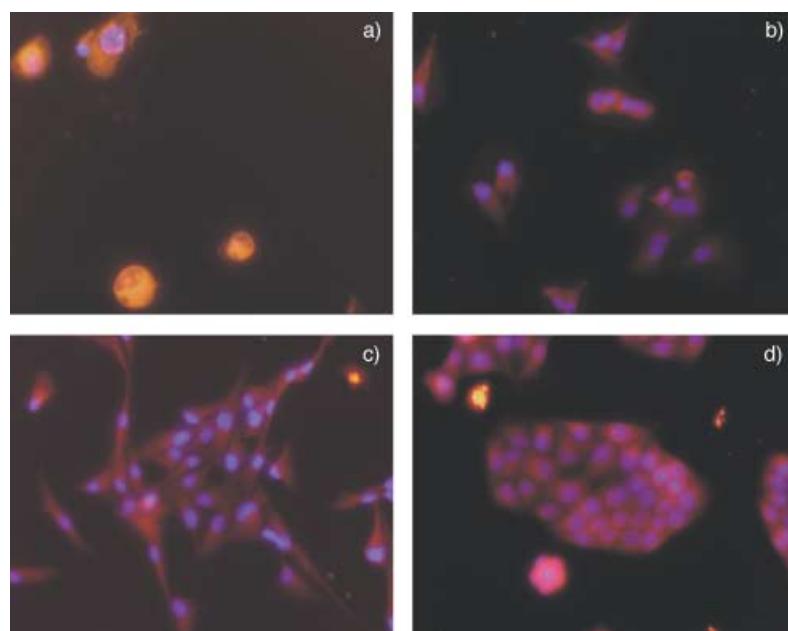


Abbildung 2. Wirkung des Inhibitors **13/1** auf MDCK-f3-Zellen: a) 100 μ M, 6 h (Apoptose); b) 50 μ M (Apoptose Frühstadium); c) Negativ Kontrolle MDCK-f3 ohne Inhibitor (keine Apoptose); d) Wirkung von **13/1** (100 μ M, 6 h) auf MDCK-Zellen (Wild-Typ) (keine Apoptose).

Zellen keinen Apoptose-auslösenden Effekt^[17] Verbindung **13/1** ist daher nicht generell cytotoxisch, ihre Wirkungsweise ist unmittelbar mit einer Beeinflussung des Ras-Signalweges verknüpft. Zusammenfassend haben wir eine flexible und effiziente Festphasensynthese für eine Pepticinnamin-E-Bibliothek entwickelt, die unterschiedliche Typen von PFT-Inhibitoren und Apoptose-auslösenden Substanzen liefert und deren biologische Aktivität durch Molecular Modelling gut rationalisiert werden kann. Diese Substanzklasse sollte der chemischen Biologie der Ras-Proteine neue Möglichkeiten eröffnen.^[18]

Eingegangen am 24. April 2002 [Z19161]

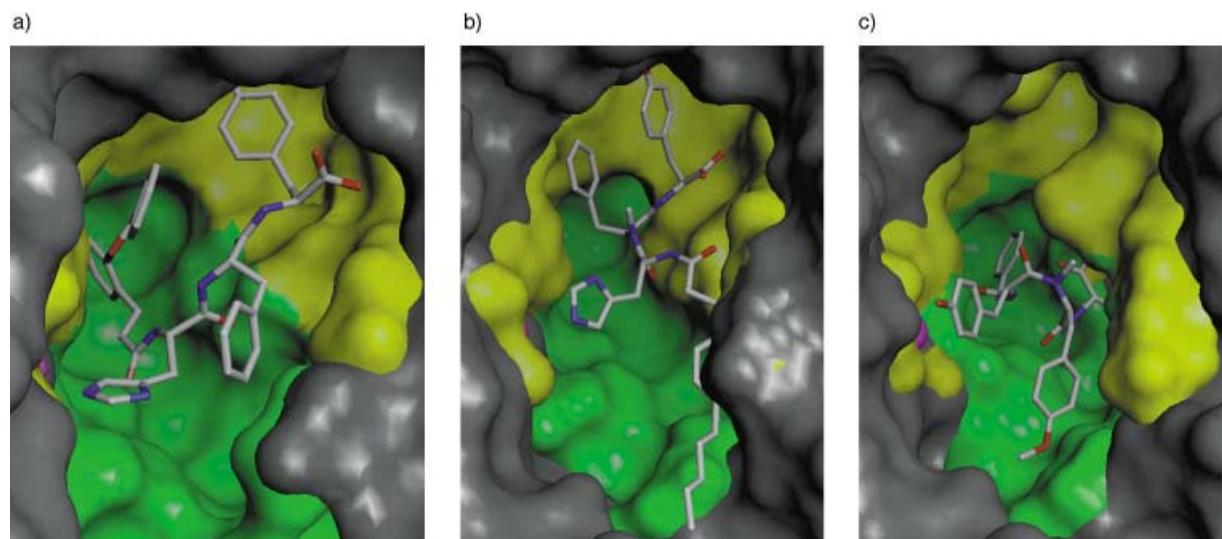


Abbildung 1. Ergebnisse der Molecular-Modelling-Experimente. Die Bindungsstelle des FPP ist grün, die des Peptidsubstrates gelb dargestellt. Das Zn²⁺-Ion im aktiven Zentrum ist violett dargestellt. a) **11/4** im aktiven Zentrum der PFT; b) **11/3** im aktiven Zentrum der PFT; c) **11/2** im aktiven Zentrum der PFT.

- [1] a) H. Waldmann, M. Thutewohl, *Top. Curr. Chem.* **2001**, *211*, 117–130; b) A. Wittinghofer, H. Waldmann, *Angew. Chem.* **2000**, *112*, 4360–4383; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000**, *39*, 4192–4214.
- [2] S. M. Sebti, A. D. Hamilton, *Oncogene* **2000**, *19*, 6584–6593.
- [3] A. Levitzki, *Eur. J. Biochem.* **1994**, *226*, 1–3.
- [4] a) M. Schlitzer, M. Böhm, I. Sattler, H.-M. Dahse, *Bioorg. Med. Chem.* **2000**, *8*, 1991–2006; b) V. Manne, N. Yan, J. M. Carboni, A. V. Tuomari, C. S. Ricca, J. Gullo Brown, M. L. Andahazy, R. J. Schmidt, D. Patel, R. Zahler, R. Weinmann, C. J. Der, A. D. Cox, J. T. Hunt, E. M. Gordon, M. Barbacid, B. R. Seizinger, *Oncogene* **1995**, *10*, 1763–1779.
- [5] K. Shiomi, H. Yang, J. Inokoshi, D. Van der Pyl, A. Nakagawa, H. Takeshima, S. Omura, *J. Antibiot.* **1993**, *46*, 229–234.
- [6] a) K. Hinterding, P. Hagenbuch, J. Rétey, H. Waldmann, *Angew. Chem.* **1998**, *110*, 1298–1301; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, *37*, 1236–1239; b) K. Hinterding, P. Hagenbuch, J. Rétey, H. Waldmann, *Chem. Eur. J.* **1999**, *5*, 227–236.
- [7] C. Cabrelé, M. Langer, A. G. Beck-Sickinger, *J. Org. Chem.* **1999**, *64*, 4353–4361.
- [8] J. Meienhofer, M. Waki, E. P. Heimer, T. J. Lambros, R. C. Makofske, C. D. Chang, *Int. J. Pept. Protein Res.* **1979**, *13*, 35–42.
- [9] Die bei der Anknüpfung des Bausteins **7** unter Standardbedingungen auftretende beträchtliche Racemisierung konnte durch Kupplung mit PyAOP weitgehend zurückgedrängt werden.
- [10] Für eine detaillierte Zusammenstellung der Syntheseergebnisse siehe Hintergrundinformationen (Tabelle S1 und Abbildung S1).
- [11] D. L. Pompiano, R. P. Gomez, N. J. Anthony, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 7945–7946.
- [12] Modifizierung der Vorschrift aus [11]: Verwendet wurde ein Fluoroscan-FL-Fluorometer der Firma Ascent Labsystems; Filter: $\lambda_{\text{ex}} = 355 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 460 \text{ nm}$. 96er Mikrotiterplatte: Pro Feld wurden $20 \mu\text{L}$ einer Lösung von Ratten-Farnesyltransferase ($2.6 \mu\text{M}$ im unten angegebenen Puffermedium) über die Dispenserfunktion des Gerätes zu $180 \mu\text{L}$ einer bei 30°C vorinkubierten Lösung von FPP ($10 \mu\text{M}$), Dansyl-GCVLS-Peptid ($10 \mu\text{M}$), varierten Konzentrationen des Inhibitors, in $20 \mu\text{L}$ Methanol und $160 \mu\text{L}$ Pufferlösung (50 mM Tris/HCl pH 7.5, 5 mM DTE, $10 \mu\text{M}$ ZnCl_2 , 5 mM MgCl_2 , 0.2% (w/v) *n*-Octyl- β -D-glucopyranosid) gegeben und anschließend der Kurvenverlauf während 5 min bei 30°C aufgenommen.
- [13] Modifizierung eines Verfahrens gemäß D. L. Pompiano, E. Rands, M. D. Schaber, S. D. Mosser, N. J. Anthony, J. B. Gibbs, *Biochemistry* **1992**, *31*, 3800–3807. Zu $100 \mu\text{L}$ einer Lösung von K-Ras (0.27 mg L^{-1}), humarer PFT, im Puffermedium (8.6 mM MgCl_2 , $17.1 \mu\text{M}$ ZnCl_2 , 1.32 mg mL^{-1} DTT, 86 mM Tris/HCl pH 8.0) werden $10 \mu\text{L}$ [^3H]-FPP-Lösung (3.3 mM, 15–30 Ci mmol $^{-1}$, New England Nuclear) pipettiert und die Mischung für 30 min bei 37°C inkubiert. Dann wird die Reaktion durch Zugabe von $100 \mu\text{L}$ einer Lösung von konz. HCl in Ethanol (15%) abgebrochen, das ausgefallene Ras-Protein wird über Filtermatten (Typ B) in einem Tomtec-Harvester filtriert und die übertragene Radioaktivität mit einem Wallac 1024 Betaplate Szintillationszähler gemessen.
- [14] Für Details zum Molecular Modelling siehe die Hintergrundinformationen. Für Molecular-Modelling-Untersuchungen an der PFT siehe a) J. Sakowski, M. Bohm, I. Sattler, H. M. Dahse, M. Schlitzer, *J. Med. Chem.* **2001**, *44*, 2886–2899; b) M. Schlitzer, M. Bohm, I. Sattler, *Bioorg. Med. Chem.* **2002**, *10*, 615–620; c) A. Perdetti, L. Villa, G. Vistoli, *J. Med. Chem.* **2002**, *45*, 1460–1465.
- [15] I.-M. Karaguni, K.-H. Glüsenkamp, A. Langerak, C. Geisen, V. Ullrich, G. Winde, T. Möröy, O. Müller, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2002**, *12*, 709–713.
- [16] J. Behrens, M. Mareel, F. M. Van Roy, W. Birchmeier, *J. Cell. Biol.* **1989**, *108*, 2435–2447.
- [17] Bei $100 \mu\text{M}$ und höheren Inhibitorkonzentrationen bis zu 1 mM wurde bei MDCK-Zellen kein Effekt beobachtet.
- [18] Abkürzungen: DEAD = Azodicarbonsäure-diethylester, HATU = 1-[bis(dimethylamino)methylen]-1*H*-1,2,3-triazolo-[4,5*b*]-pyridinium hexafluorophosphat 3-oxid, PyAOP = 7-aza-1-hydroxybenzotriazol-1-yl-*N*-oxy-tris(pyrrolidino)phosphonium hexafluorophosphat, NMP = 1-Methyl-2-pyrrolidon, DIC = *N,N'*-Diisopropylcarbodiimid, HOAt = 7-aza-1-hydroxybenzotriazol, DTT = 1,4-Dithio-D,L-threit, DTE = 1,4-Dithioerythrit, DIPEA = Diisopropylethylamin, NMA = *N*-Methylanilin, Fmoc = 9-Fluorenylmethoxycarbonyl, DMAP = 4-Dimethylaminopyridin.

Mit molekularer Symmetrie zu neuen Wirkstoffen: Hydroxymethyl-substituierte 3,9-Diazatetraasterane als erste eigenständige Klasse symmetrischer MDR-Modulatoren**

Andreas Hilgeroth,* Józef Molnár und Eric De Clercq

Integrale Proteine als Ionenkanäle, Neurorezeptoren oder Transportproteine sind problematische Targetstrukturen für die moderne Wirkstoffentwicklung, da die Erkennungs- oder Bindungsregionen von funktionsmodifizierenden Arzneistoffen häufig nicht oder nur unzureichend bekannt sind.^[1] Ein Design auf der Basis von Struktur-Wirkungs-Beziehungen setzt die möglichst genaue Kenntnis der räumlichen Anordnung der proteinogenen Aminosäuren dieser Bindungsregionen voraus.^[1] Da die Strukturauflösung bei integralen Membranproteinen außerordentlich problematisch ist, gründen sich Theorien über ihre Funktion und deren Beeinflussung mit Wirkstoffen häufig auf Modelle.^[1,2] Zu diesen bislang in ihrer Funktion nur modellhaft beschriebenen und hochaktuellen Targetstrukturen für die Bekämpfung der problematischen Mehrfachresistenz (multidrug resistance, MDR) in der Krebstherapie gehören die transmembranständigen Molekülpumpen P-Glycoprotein (P-GP) und das Multidrug-Resistance-assoziierte Protein (MRP).^[3,4] Durch ihre Einbindung in die fluide Membran der Zelle ist eine Kristallisation erheblich erschwert, die notwendig wäre für die Strukturaufklärung der Bindungsregion für modifizierende Arzneistoffe, die die MDR im Sinne einer Blockade der Molekülpumpen modulieren oder umkehren könnten. Bis heute ist damit eine gezielte Entwicklung von so genannten MDR-Modulatoren auf der Basis von Targetstrukturen nicht möglich. Dennoch konnten bislang zahlreiche Arzneistoffe aus unterschiedlichen Wirkstoffklassen wie Verapamil (VRP) oder Cyclosporin A als MDR-Modulatoren in In-vitro-Assays charakterisiert werden, die bei Applikation mit den P-GP- und MRP-Substraten deren Ausschleusen aus den Tumorzellen als Inhibitoren der Pumpen vermindern.^[5] Ihre pharmakologische Eigenwirksamkeit, durch die auch weiterentwickelte, strukturell modifizierte Verbindungen gekennzeichnet

[*] Priv.-Doz. Dr. A. Hilgeroth
Martin-Luther-Universität
Institut für Pharmazeutische Chemie
Wolfgang-Langenbeck-Straße 4
06120 Halle (Deutschland)
Fax: (+49) 345-55-27026
E-mail: hilgeroth@pharmazie.uni-halle.de

Prof. Dr. J. Molnár
Universität Szeged
Abteilung für Medizinische Mikrobiologie
Dom ter 10, 6720 Szeged (Ungarn)
Prof. Dr. E. De Clercq
Katholieke Universiteit Leuven
Rega Institute for Medical Research
3000 Leuven (Belgien)

[**] Diese Arbeit wurde von der Deutschen Pharmazeutischen Gesellschaft und von der EU im Rahmen der COST-B16-Aktion gefördert.
Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://www.angewandte.de> zu finden oder beim Autor anzufordern.