

schließlich) den Corrin-Ring von Cobalamin bindet.<sup>[29]</sup> In dieser Arbeit haben wir Coenzym B<sub>12</sub> **1** zur Bildung eines Antikörpers verwendet, der selektiv die Base-on-Form von **1** und anderer B<sub>12</sub>-Coenzyme erkennt. Die Nucleotid-Schleife, ein den Base-on-Formen vollständiger Cobamide vorbehaltenes Strukturmotiv, steuert die Reaktivität der Cobalt-Corrine<sup>[3,4]</sup> und dient außerdem als bisher kaum untersuchtes Erkennungsmerkmal der selektiven Interaktion mit B<sub>12</sub>-bindenden Proteinen.<sup>[8]</sup> Der Antikörper 2C2 erkennt die intakte DMB-Nucleotid-Schleife und bewirkt die Bildung der Base-on-Form von Coenzym B<sub>12</sub>-Analoga, deren Strukturen in Lösung überwiegend Base-off sind. Es kann sich dabei um ein funktionales Modell für natürliche B<sub>12</sub>-bindende Proteine, beispielsweise den (menschlichen) Intrinsischen Faktor und Transcobalamin handeln.<sup>[23]</sup> Diese wichtigen B<sub>12</sub>-Rezeptoren binden vorzugsweise Cobamide mit einem DMB-Nucleotid<sup>[23,30]</sup> und sind selektiv bezüglich strukturell verwandter B<sub>12</sub>-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 *B<sub>12</sub>, Vol. I* (Hrsg.: D. Dolphin), Wiley, New York, **1982**, S. 24–106.
- [3] B. Kräutler in *Vitamin B<sub>12</sub> and B<sub>12</sub> Proteins* (Hrsg.: B. Kräutler, B. T. Golding, D. Arigoni), Wiley-VCH, Weinheim, **1998**, S. 3–43.
- [4] J. M. Pratt in *B<sub>12</sub>, 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 B<sub>12</sub>* (Hrsg.: R. Banerjee), Wiley, New York, **1999**, S. 217–226.
- [6] F. Mancina, 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. Jögl, 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. Gershan, 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 B<sub>12</sub> and B<sub>12</sub>-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 B<sub>12</sub> and B<sub>12</sub> 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. Greziesiek, 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 Peptidcinnamin-E-Bibliothek\*\*

Michael Thutewohl, Lars Kissau, Borianna 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.<sup>[1,2]</sup> 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 Proteinfarnesyltrans-

[\*] 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 Helmuth Kipp für die Bereitstellung des Fluorescan-Plate-Readers und Christine Nowak für die Isolierung der Ratten-PFT.

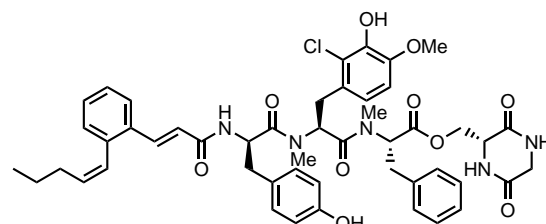


Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://www.angewandte.de> zu finden oder beim Autor anzufordern.

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

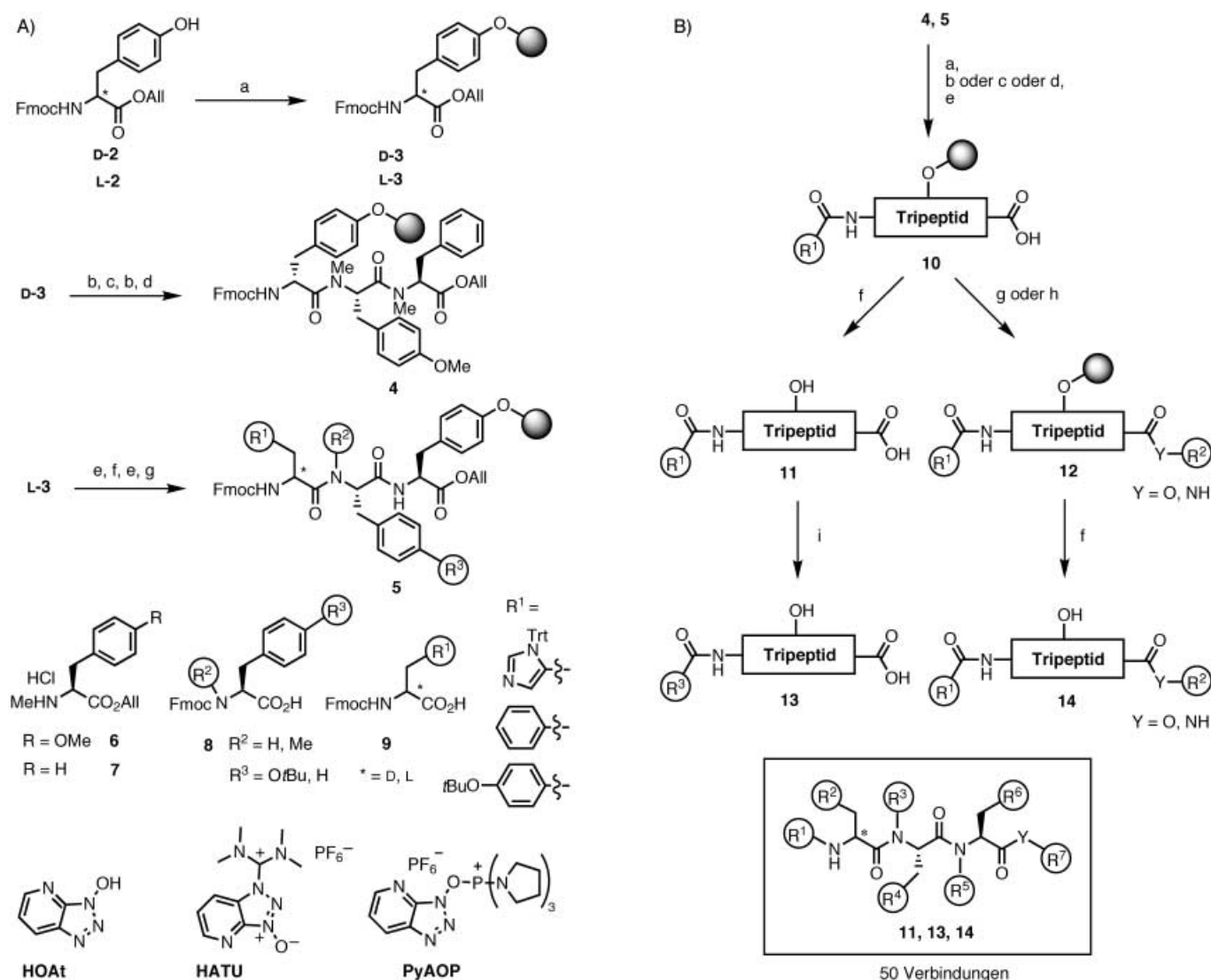
Um diese biologischen Fragestellungen gezielt, aber mit hoher Flexibilität angehen zu können, wäre die Verfügbarkeit einer Klasse potenzieller PFT-Inhibitoren besonders wünschenswert, deren Struktur rasch und effizient durch kombinatorische Synthese variiert werden kann. Dabei sollten sich Substanzen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

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



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

Schema 1. Der natürliche PFT-Inhibitor Pepticcinnamin E.



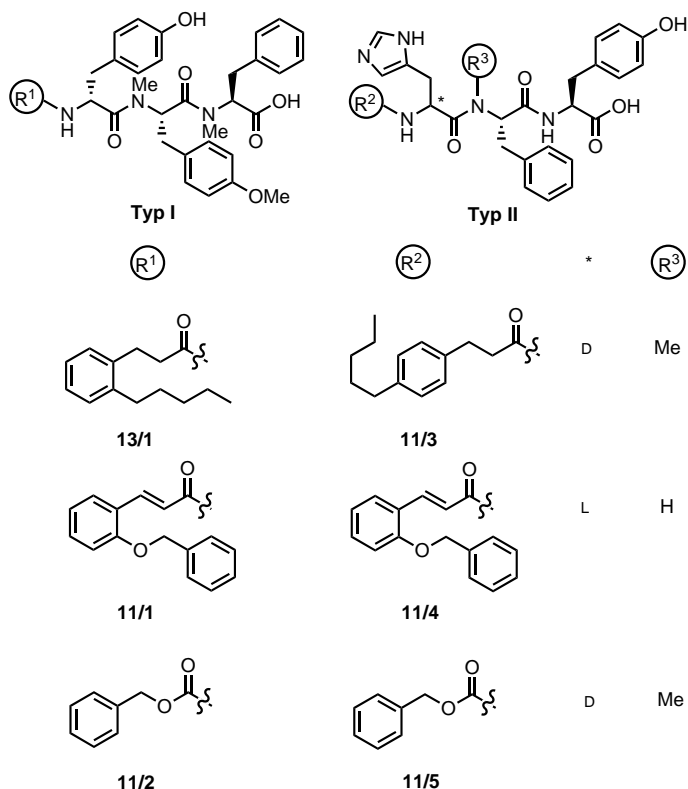
Schema 2. A): a) DEAD,  $\text{PPh}_3$ , THF,  $0^\circ\text{C}$ , 1 h, RT, 12 h, Beladung:  $0.50\text{--}0.53 \text{ mmol g}^{-1}$ , 54–59 %; b)  $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ ,  $\text{PhSiH}_3$  oder NMA, 24 h; c) 6, HATU, HOAt,  $i\text{PrNEt}_2$ , NMP;  $2 \times 24 \text{ h}$ ; d) 7, PyAOP, HOAt,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

gezeigte Festphasensynthese einer Bibliothek von Peptidcinnamin-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<sup>[7]</sup> mit Beladungsgraden von 0.5–0.53 mmol g<sup>-1</sup> an Wang-Harz geknüpft (Ausbeuten 54–59 %; die Beladung wurde mit der Fmoc-Methode<sup>[8]</sup> bestimmt). Zum Aufbau der Tripeptid-Einheit **4** durch C-terminale Verlängerung ausgehend von **D-3** wurden die Allylesterschutzgruppen Pd<sup>0</sup>-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).<sup>[9]</sup>

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 R<sup>1</sup>COOH sowie Benzylchlorformiate R<sup>1</sup>COCl angeknüpft, wobei die Anbindung der Zimtsäuren erst durch gemeinsame Anwendung von PyAOP mit DMAP zufriedenstellend gelang (Schema 2b). Freisetzung der Carbonsäuren mit Pd<sup>0</sup>-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 R<sup>3</sup> 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 Peptidcinnamin-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.<sup>[10]</sup>

Die so hergestellte Peptidcinnamin-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<sup>[11]</sup> zum Einsatz, das auf ein 96-Well-Mikrotiterplatten-Format angepasst wurde.<sup>[12]</sup> Zum anderen wurde Tritium-markiertes Farnesylpyrophosphat zusammen mit K-Ras-Protein als Substrat und humaner PFT aus Plazenta verwendet.<sup>[13]</sup> Die Bibliothek enthielt zwei Gruppen von Inhibitoren (zusammen 28 Verbindungen) mit bemerkenswerter Aktivität. Die Inhibitoren mit höchster



Schema 3. Ausgewählte Mitglieder der Peptidcinnamin-E-Bibliothek

Aktivität sind in Schema 3 dargestellt. Bei Inhibitoren vom Typ I ist das zentrale Tripeptidfragment des Naturstoffs weitgehend konserviert, der Rest R<sup>1</sup> 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 R<sup>1</sup>. 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 <sub>50</sub> ) [μM] <sup>[a]</sup>	PFT (IC <sub>50</sub> ) [μM] <sup>[b]</sup>	PFT <sup>[a]</sup> bezügl. CAAX <sup>[c]</sup>	PFT <sup>[a]</sup> bezügl. FPP <sup>[d]</sup>
1	<b>13/1</b>	> 50	6.4	nb	nb
2	<b>11/1</b>	9.3	57 % <sup>e</sup>	n. komp.	komp.
3	<b>11/2</b>	5.3	6.7	n. komp.	komp.
4	<b>11/3</b>	10.5	nb	komp.	n. komp.
5	<b>11/4</b>	6.4	19.2	komp.	komp.
6	<b>11/5</b>	8.0	6.4	komp.	n. komp.

[a] Fluoreszenz-Test gegenüber Ratten-PFT;<sup>[12]</sup> [b] Radioaktiver Test gegenüber humaner PFT;<sup>[13]</sup> [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 Pepticcinnamin E flexibel und effizient unterschiedliche Typen von Farnesyltransferase-Inhibitoren entwickelt werden können. Die verschiedenen Inhibitionsmodi der gefundenen Inhibitoren wurden mit Molecular-Modelling-Experimenten untersucht.<sup>[14]</sup> 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 belegt.

Schließlich wurde mit eines von uns entwickelten Assays<sup>[15]</sup> geprüft, ob die Pepticcinnamin-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.<sup>[16]</sup> 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  $\mu\text{M}$  Inhibitorkonzentration wurde nach 6 h Apoptose im Endstadium beobachtet, bei 50  $\mu\text{M}$  Konzentration war nach 6 h Apoptose im Frühstadium erkennbar. Ein Vergleichstest unter ansonsten identischen Bedingungen zeigte gegenüber Wildtyp-MDCK-

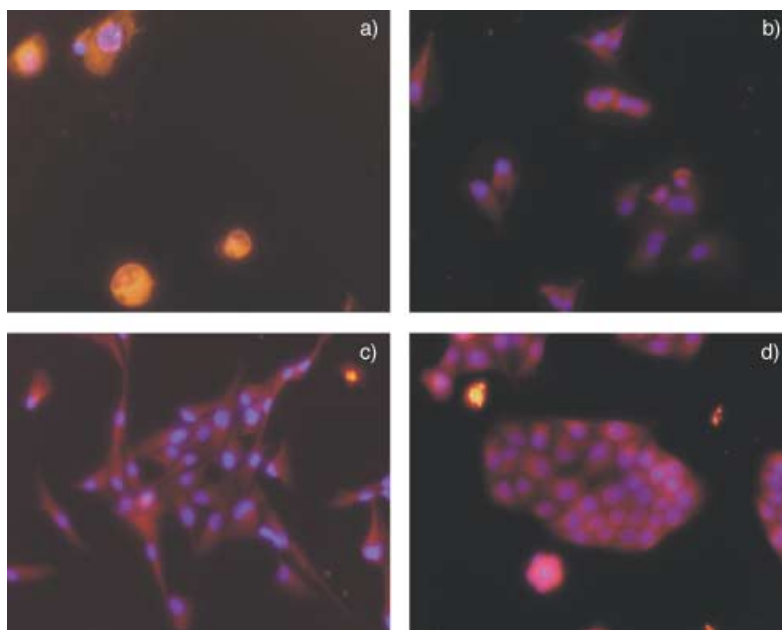


Abbildung 2. Wirkung des Inhibitors **13/1** auf MDCK-f3-Zellen: a) 100  $\mu\text{M}$ , 6 h (Apoptose); b) 50  $\mu\text{M}$  (Apoptose Frühstadium); c) Negativ Kontrolle MDCK-f3 ohne Inhibitor (keine Apoptose); d) Wirkung von **13/1** (100  $\mu\text{M}$ , 6 h) auf MDCK-Zellen (Wild-Typ) (keine Apoptose).

Zellen keinen Apoptose-auslösenden Effekt<sup>[17]</sup> 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 Pepticcinnamin-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.<sup>[18]</sup>

Eingegangen am 24. April 2002 [Z19161]

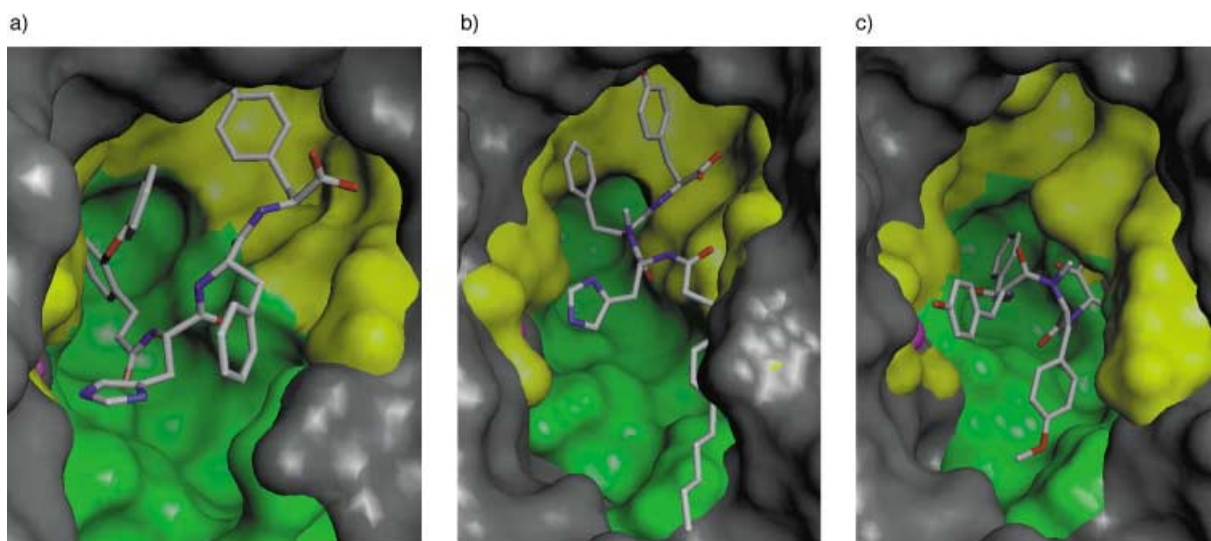


Abbildung 1. Ergebnisse der Molecular-Modelling-Experimente. Die Bindungsstelle des FPP ist grün, die des Peptidsubstrates gelb dargestellt. Das  $\text{Zn}^{2+}$ -Ion im aktiven Zentrum ist violett dargestellt. a) **11/4** im aktiven Zentrum der PFT; b) **11/3** im aktiven Zentrum der PFT; c) **11/2** 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. Cabrele, 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 Synthesergebnisse siehe Hintergrundinformationen (Tabelle S1 und Abbildung S1).
- [11] D. L. Pompilano, R. P. Gomez, N. J. Anthony, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 7945–7946.
- [12] Modifizierung der Vorschrift aus [11]: Verwendet wurde ein Fluorocan-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  $\mu\text{M}$ ), variierten 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  $\mu\text{M}$   $\text{ZnCl}_2$ , 5 mM  $\text{MgCl}_2$ , 0.2 % (w/v) *n*-Octyl- $\beta$ -D-glucopyranosid) gegeben und anschließend der Kurvenverlauf während 5 min bei 30 °C aufgenommen.
- [13] Modifizierung eines Verfahrens gemäß D. L. Pompilano, 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  $\text{mg L}^{-1}$ ), humaner PFT, im Puffermedium (8.6 mM  $\text{MgCl}_2$ , 17.1  $\mu\text{M}$   $\text{ZnCl}_2$ , 1.32  $\text{mg mL}^{-1}$  DTT, 86 mM Tris/HCl pH 8.0) werden 10  $\mu\text{L}$  [ $^3\text{H}$ ]-FPP-Lösung (3.3 mM, 15–30 Ci  $\text{mmol}^{-1}$ , 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. Böhm, I. Sattler, H. M. Dahse, M. Schlitzer, *J. Med. Chem.* **2001**, *44*, 2886–2899; b) M. Schlitzer, M. Böhm, 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. Mörry, 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]-1H-1,2,3-triazolo-[4,5b]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*-Methylamin, 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,\* József 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.<sup>[1]</sup> Ein Design auf der Basis von Struktur-Wirkungs-Beziehungen setzt die möglichst genaue Kenntnis der räumlichen Anordnung der proteinogenen Aminosäuren dieser Bindungsregionen voraus.<sup>[1]</sup> Da die Strukturaufklärung bei integralen Membranproteinen außerordentlich problematisch ist, gründen sich Theorien über ihre Funktion und deren Beeinflussung mit Wirkstoffen häufig auf Modelle.<sup>[1,2]</sup> 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 Molekelpumpen P-Glycoprotein (P-GP) und das Multidrug-Resistance-assoziierte Protein (MRP).<sup>[3,4]</sup> 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 Molekelpumpen 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.<sup>[5]</sup> 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.