

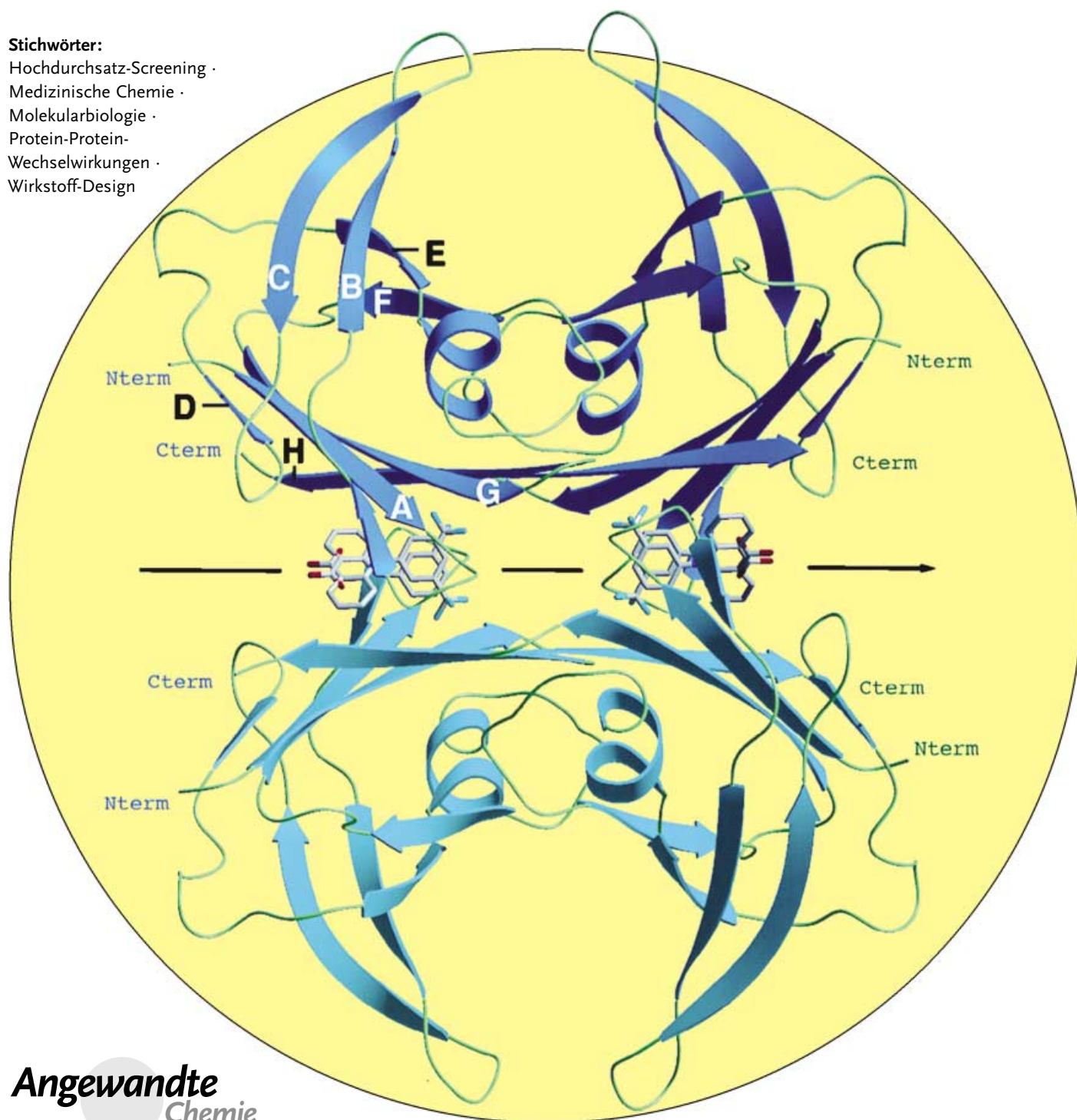
Protein-Protein-Wechselwirkungen

Modulation von Protein-Protein-Wechselwirkungen mit niedermolekularen organischen Molekülen

Thorsten Berg*

Stichwörter:

Hochdurchsatz-Screening ·
Medizinische Chemie ·
Molekularbiologie ·
Protein-Protein-
Wechselwirkungen ·
Wirkstoff-Design



Angewandte
Chemie

Viele Proteine üben ihre biologische Funktion als Bestandteile von Komplexen aus, und die Funktionen von Proteinen werden oft durch die spezifischen Wechselwirkungen mit anderen Proteinen bestimmt. Wegen der zentralen Bedeutung von Protein-Protein-Wechselwirkungen für zelluläre Prozesse kann die Modulation dieser Wechselwirkungen Funktionen bestimmter Proteine innerhalb der Zelle wirksam beeinflussen. Zellpermeable organische Modulatoren von Protein-Protein-Wechselwirkungen sind daher interessante Verbindungen sowohl für die Untersuchung physiologischer zellulärer Prozesse als auch für die Behandlung zahlreicher Krankheiten. Hier werden einige Protein-Protein-Wechselwirkungen vorgestellt, die weithin als pharmazeutische Angriffspunkte gelten, und der Leser wird mit erfolgreichen Strategien zur Identifizierung niedermolekularer Modulatoren dieser Wechselwirkungen vertraut gemacht. Diese Beispiele lassen erwarten, dass die interdisziplinäre Forschung in der funktionellen Proteomik, der Assay-Entwicklung und der organischen Synthese neuartige Wege und Möglichkeiten für die zukünftige Behandlung von Humankrankheiten eröffnen wird.

1. Einleitung

Eine der großen Herausforderungen der biomedizinischen Forschung ist das genaue Verständnis davon, wie die Expression von Proteinen innerhalb der Zelle die biologische Funktion bestimmt. Es ist offensichtlich geworden, dass die meisten Proteine nicht isoliert agieren, sondern als Bestandteile von Proteinkomplexen.^[1] Die zelluläre Funktion eines bestimmten Proteins kann von der genauen Zusammensetzung seines Proteinkomplexes abhängen. Wegen der zentralen Rolle von Proteinkomplexen in zellulären Prozessen können fehlerhafte Protein-Protein-Wechselwirkungen pathologische Erscheinungen hervorrufen; umgekehrt ermöglicht die Modulation solcher Protein-Protein-Wechselwirkungen mit niedermolekularen organischen Molekülen aber auch die Behandlung von Humankrankheiten.

Die prinzipielle Eignung niedermolekularer organischer Moleküle für die Beeinflussung von Protein-Protein-Wechselwirkungen ist anhand vieler Naturstoffe eindrucksvoll gezeigt worden. Die Taxane Paclitaxel (Taxol),^[2] ein Diterpenoid aus der Rinde der pazifischen Eibenart *Taxus brevifolia*, und sein semisynthetisches Derivat Docetaxel (Taxotère)^[3] sind für die Behandlung einiger Krebsarten beim Menschen zugelassen worden. Sie binden an die β -Untereinheit des Tubulin-Heterodimers und stabilisieren dadurch die Wechselwirkung zwischen Tubulin-Heterodimeren, wodurch die Polymerisation von Tubulin zu Mikrotubuli beschleunigt wird. Da Mikrotubuli während der Mitose nicht nur polymerisieren sondern auch depolymerisieren müssen, führt die Stabilisierung der Mikrotubuli durch Taxane zum Zellzyklusarrest, wodurch letztlich die Apoptose (programmierter Zelltod) von Krebszellen herbeigeführt wird. Weitere mikrotubulistabilisierende Naturstoffe^[4] sind unter anderem Laulimalid,^[5] die Epothilone A und B,^[6] Eleutherobin^[7] und Discodermolid.^[8] Ein Epothilon-B-Derivat befindet sich zurzeit in klinischen Studien.^[9] Brefeldin A, ein Pilzmetabolit,^[10]

der in der Zellbiologie als Inhibitor der Proteinsekretion genutzt wird, stabilisiert die Protein-Protein-Wechselwirkung zwischen Guanidindiphosphat(GDP)-gebundenen Proteinen der Arf-Familie und Sec7-Domänen.^[11] Die Fähigkeit bestimmter Naturstoffe zur Bindung an Proteine wurde in den bahnbrechenden Arbeiten von Schreiber und Crabtree zum Design von CID-Systemen genutzt (CID = chemical inducer of dimerization; chemischer Auslöser der Dimerisierung). Sowohl FK1012^[12] (ein Dimer der natürlich vorkommenden niedermolekularen Verbindung FK506) und ein aus FK506 und Cyclosporin A bestehendes Fusionsmolekül^[13] als auch Rapamycin und dimeres Cyclosporin A^[14] induzieren die Dimerisierung von Rezeptoren, deren extrazelluläre Dimerisierungsdomänen durch genetische Manipulation entfernt wurden, und bewirken damit die Signaltransduktion und die spezifische Aktivierung von Zielgenen.^[15] In ähnlicher Weise wurden FK506 und Rapamycin eingesetzt, um die Aktivität von Transkriptionsfaktoren wiederherzustellen, deren funktionelle Domänen voneinander getrennt und mit den Bindungsproteinen dieser organischen Moleküle verknüpft wurden.^[16] Die Weiterentwicklung des Forschungsansatzes hat in letzter Zeit neuartige CID-Systeme hervorgebracht.^[17]

Obwohl diese Beispiele die generelle Eignung niedermolekularer organischer Moleküle zur Modulation von Protein-Protein-Wechselwirkungen demonstrieren, bereitet die Anwendung dieses Prinzips in der Wirkstoffforschung einige Probleme. Die erste Schwierigkeit liegt in der Identifizierung von Leitstrukturen für die Modulation von Protein-Protein-

Aus dem Inhalt

1. Einleitung	2567
2. Von Dimerisierungsgrenzflächen abgeleitete Peptide und Peptidmimetika	2568
3. Niedermolekulare Modulatoren von Protein-Protein-Wechselwirkungen durch Screening chemischer Bibliotheken	2571
4. Computergestützte Ansätze zu niedermolekularen Modulatoren von Protein-Protein-Wechselwirkungen	2579
5. Zusammenfassung und Ausblick	2580

[*] Dr. T. Berg
Max-Planck-Institut für Biochemie
Abteilung für Molekularbiologie
Am Klopferspitz 18a, 82152 Martinsried (Deutschland)
Fax: (+49) 89-8578-2454
E-mail: berg@biochem.mpg.de

Wechselwirkungen, für die keine natürlich vorkommenden proteinbindenden niedermolekularen Moleküle bekannt sind. Falls die Protein-Protein-Grenzfläche aus kurzen zusammenhängenden Bindungsdomänen besteht, eignen sich von der Protein-Protein-Grenzfläche abgeleitete Peptide als Leitstrukturen für die nachfolgende chemische Optimierung. Das Vorliegen solcher zusammenhängender Sequenzmotive in den Protein-Protein-Wechselwirkungen zwischen Integrinen und ihren extrazellulären Liganden half vermutlich bei der Entdeckung zahlreicher niedermolekularer Inhibitoren dieser Protein-Protein-Wechselwirkungen. Ein Inhibitor wird zurzeit klinisch geprüft,^[18] und zwei weitere werden bereits klinisch eingesetzt.^[19] Allerdings sind die Bindungs-epitope vieler Protein-Protein-Grenzflächen in der Primärstruktur nicht kontinuierlich, wodurch die rationale Entwicklung von Mimetika der Bindungsstellen erschwert wird.

Des Weiteren ergaben Untersuchungen, dass die Fläche der Grenzflächen in Proteinkomplexen (in Abhängigkeit von der Natur des Komplexes) in der Regel größer als 1100 Å² ist^[20] und damit die potenzielle Bindungsfläche einer niedermolekularen Verbindung um ein Vielfaches übersteigt. Der Versuch, solche Protein-Protein-Wechselwirkungen mit niedermolekularen, oral einsetzbaren Verbindungen zu modulieren, schien daher auf den ersten Blick unmöglich. Es wurde jedoch gezeigt, dass selbst ein kleiner Teil der Protein-Protein-Grenzfläche einen großen Beitrag zur Freien Energie der Bindung zwischen den Proteinen leisten kann.^[21] Solche Hot-Spots der Freien Bindungsenergie scheinen in Protein-Protein-Grenzflächen generell vorzukommen.^[22] Hot-Spot-Aminosäuren treten gehäuft im Zentrum der Protein-Protein-Grenzfläche auf und sind von energetisch weniger wichtigen Aminosäuren umgeben, deren Funktion vermutlich im Abschirmen der Hot-Spots gegen Lösungsmittelmoleküle besteht.

Die dritte Schwierigkeit liegt darin begründet, dass Protein-Protein-Grenzflächen oft relativ eben sind und daher möglicherweise keine Bindungsstellen für kleine organische Moleküle aufweisen.^[23] Trotz dieser Schwierigkeiten wurden bislang einige niedermolekulare Modulatoren großflächiger Protein-Protein-Wechselwirkungen identifiziert und teilweise bereits in Übersichtsartikeln diskutiert.^[24]

Hier beschreiben wir einige pharmazeutisch interessante Protein-Protein-Wechselwirkungen, deren zugehörige Grenzflächen meist groß und nicht notwendigerweise kontinuierlich

sind, und machen den Leser mit Strategien zur Identifizierung niedermolekularer Modulatoren (sowohl Inhibitoren als auch Agonisten und Stabilisatoren) dieser Protein-Protein-Wechselwirkungen vertraut. Die vorgestellten Ansätze lassen sich in drei Gruppen teilen: Der erste Ansatz beruht auf der Identifizierung von Peptiden, die von der Grenzfläche zwischen den Proteinen abgeleitet sind und die Wechselwirkung zwischen den Proteinen durch kompetitive Bindung an eines der Proteine inhibieren. Diese Peptide werden anschließend durch den Einbau nichtnatürlicher Aminosäuren oder durch andere chemische Modifizierungen optimiert. Das letztgenannte Kriterium schließt viele unmodifizierte Peptidinhibitoren von Protein-Protein-Wechselwirkungen aus, von denen viele durch die Phagen-Display-Methode entdeckt wurden.^[24d,25] Der zweite Ansatz umfasst das In-vitro- oder zellbasierte Screening chemischer Bibliotheken nach Modulatoren von Protein-Protein-Wechselwirkungen. Der dritte Ansatz beschreibt das virtuelle (in silico) Screening chemischer Datenbanken nach kleinen Molekülen, die mit großer Wahrscheinlichkeit an einen Hot-Spot der betreffenden Protein-Protein-Wechselwirkung binden. Mit Ausnahme der im ersten Ansatz diskutierten Moleküle wird sich dieser Aufsatz auf nichtpeptidische Moleküle konzentrieren. Es werden weder Protein-Protein-Wechselwirkungen behandelt, die durch kurze zusammenhängende Bindungsdomänen vermittelt werden und in der Signaltransduktion eine Rolle spielen (z. B. Wechselwirkungen von SH2-^[26] oder SH3-Domänen^[27]), noch Inhibitoren der Wechselwirkungen zwischen Integrinen und Proteinen der extrazellulären Matrix; diese wurden bereits eingehend diskutiert.^[18,19,28] Der eindrucksvolle Fortschritt, der bis heute auf dem Gebiet der Modulation von Protein-Protein-Wechselwirkungen mit niedermolekularen organischen Molekülen erzielt wurde, veranschaulicht, dass das interdisziplinäre Zusammenspiel von biologischer und organisch-präparativer chemischer Forschung zu großen Fortschritten in der künftigen Wirkstoffforschung führen kann.

2. Von Dimerisierungsgrenzflächen abgeleitete Peptide und Peptidmimetika

2.1. Inhibitoren der HIV-Protease-Dimerisierung

Die von dem HIV-1-Genom codierte Protease (HIV-1-Protease) spielt eine wesentliche Rolle im Lebenszyklus des Human-Immunschwäche-Virus (HIV)-1. Sie wandelt die gag- und gag/pol-Proteinvorstufen zu funktionellen viralen Proteinen um, die für die virale Infektion weiterer Wirtszellen benötigt werden.^[29] Die zurzeit für die Inhibierung der HIV-1-Protease in HIV-Patienten verwendeten Medikamente inhibieren das Katalyse-Zentrum des Enzyms.^[30] Unser gegenwärtiges Unvermögen, HIV-Infektionen langfristig effektiv zu behandeln, ist das Resultat fortwährender viraler Mutationen, die die Wirksamkeit der vorhandenen Inhibitoren reduzieren.^[31]

Die HIV-1-Protease ist ein homodimeres Enzym; sowohl das aktive Zentrum als auch die Substrat-Bindungstasche liegen ausschließlich in der dimeren Form vor.^[32] Interessan-



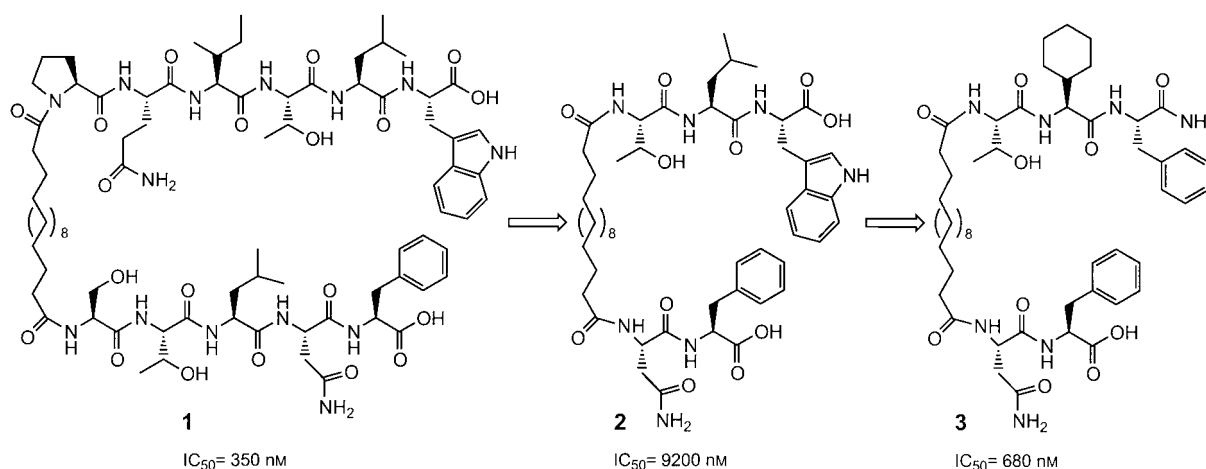
Thorsten Berg, geboren 1967, studierte Chemie an der Universität zu Köln als Stipendiat der Studienstiftung des deutschen Volkes (Diplomarbeit bei Prof. E. Vogel). Er promovierte 1996 bei Prof. D. Enders an der RWTH Aachen auf dem Gebiet der enantio-selektiven Synthese. Anschließend war er Postdoc am Scripps Research Institute in La Jolla, USA, bei Prof. K. D. Janda (1997–1998) und Prof. P. K. Vogt (1998–2001). Er befasste sich dort mit biochemischen und zellulären Assays zur Identifizierung nicht-peptidischer Antagonisten von Protein-Protein-Wechselwirkungen. Seit 2001 ist er Arbeitsgruppenleiter am Max-Planck-Institut für Biochemie in Martinsried.

terweise sind die Dimerisierungsdomänen in HIV-Isolaten hoch konserviert, möglicherweise weil eine Mutation in dieser Region in einem Proteinmolekül eine passende Mutation in einem anderen Proteinmolekül erfordert, um ein funktionelles Dimer zu bilden.^[33] Die Inhibierung der Assoziation von HIV-1-Protease-Untereinheiten wurde als alternatives therapeutisches Ziel für die HIV-1-Therapie vorgeschlagen, weil Inhibitoren der Assoziation von HIV-1-Protease-Untereinheiten wahrscheinlich weniger anfällig für Wirkstoffresistenzen sind.

Die Dimerisierungsgrenzfläche der HIV-1-Protease besteht zum großen Teil aus den N- und C-Termini der HIV-1-Protease-Monomere, die versetzt ineinander greifen und eine viersträngige antiparallele β -Faltblattstruktur bilden. Die Umgebung der N- und C-Termini entspricht ungefähr der Hälfte der gesamten Protein-Protein-Grenzfläche, trägt aber mehr als 75 % zur Freien Bindungsenergie des Homodimers bei.^[34] Die Möglichkeit, HIV-1-Protease durch Peptide aus der Grenzfläche zu inhibieren, wurde erstmals von Poorman et al. beschrieben. Diese berichteten, dass das vom C-Terminus der HIV-1-Protease abgeleitete Tetrapeptid Ac-Thr-Leu-Asn-Phe-COOH das Enzym über einen dissoziativen Mechanismus inhibiert.^[35] Chmielewski et al. versuchten, die ineinander greifenden Termini der HIV-1-Protease zu imitieren. Sie entwickelten verbesserte Dimerisierungsinhibitoren, bei denen vom N-Terminus abgeleitete Peptidsequenzen mithilfe eines flexiblen Linkermoleküls mit vom C-Terminus des Enzyms abgeleiteten Peptidsequenzen verknüpft wurden. **1** inhibierte HIV-1-Protease mit einem IC_{50} -Wert von 350 nM (bei 25 nM Protease) über einen dissoziativen Mechanismus und diente als Ausgangspunkt für die Untersuchung von Struktur-Aktivitäts-Beziehungen, deren Ziel die Identifizierung von Dimerisierungsinhibitoren von HIV-1-Protease-Untereinheiten mit verringertem Molekulargewicht war (Schema 1).^[36] Das Alanin-Scanning von **1** zeigte die Bedeutung der C-terminalen Aminosäuren beider Peptidketten für die Aktivität der Verbindung auf.^[37] Nacheinanderfolgende Deletionen von weniger wichtigen N-terminalen Aminosäuren von **1** führte zur Synthese des Peptids **2** (IC_{50} = 9200 nM), das das Enzym kompetitiv inhibiert.^[38]

Nachdem der dissoziative Inhibierungsmodus durch Ersatz des Trp-OH-Restes von **2** durch Phe-NH₂ wiederhergestellt worden war, verbesserte der zusätzliche Austausch der Isobutylgruppe des Leucinrestes durch eine Cyclohexylgruppe in **3** deutlich deren inhibitorische Aktivität (IC_{50} = 680 nM bei 25 nM Protease). Verbindung **3** könnte wegen ihres verringerten Molekulargewichts mit 933 g mol⁻¹ bezogen auf **1** mit 1586 g mol⁻¹ eventuell als Leitstruktur für die weitere chemische Optimierung dienen.

Möglicherweise führt die Flexibilität der von Chmielewski et al. verwendeten gesättigten aliphatischen Linkermoleküle einen ungünstigen Entropie-Term in die Freie Energie der Wechselwirkung des Komplexes zwischen dem Inhibitor und der monomeren Protease ein. Um die Hypothese zu prüfen, dass weniger flexible Linkermoleküle zwischen den Peptidketten aktivere Dimerisierungsinhibitoren ergeben, verknüpften Sicsic et al. die Peptidketten durch Arylgruppen.^[39] Die ursprünglichen N- und C-terminalen Tetrapeptidsequenzen wurden durch Aminosäureaustausch und Deletionen variiert. Um die Synthesen zu erleichtern, wurden identische Peptide an beiden Seiten des starren aromatischen Gerüsts synthetisiert. Die aktivste Verbindung, **4**, inhibierte die HIV-1-Protease mit einem IC_{50} -Wert von 2 μ M (bei 7.5 nM Protease) über einen dissoziativen Mechanismus (Abbildung 1). Interessanterweise bildet die in **4** enthaltene Peptidsequenz nicht die im antiparallelen β -Faltblatt der HIV-1-Protease enthaltenen Sequenzen nach. Kiso et al. verknüpften die N- und C-terminalen Aminosäuren der HIV-1-Protease mit 4-(2-Aminoethyl)-6-dibenzofuranpropionsäure und erreichten mit **5** die Inhibierung des Enzyms über einen dissoziativen Mechanismus mit einem IC_{50} -Wert von 12 μ M (3.2–23.8 nM Protease).^[40] Obwohl der direkte Vergleich des Einflusses der unterschiedlichen Linkermoleküle durch die uneinheitlichen Peptidketten und Assaybedingungen erschwert wird, lässt sich feststellen, dass die Verbindungen mit den flexiblen Alkyl-Linkermolekülen die höchste Aktivität aufweisen. Dies deutet darauf hin, dass die Flexibilität des Linkermoleküls in der Tat notwendig für die effiziente Bindung der Peptidketten an das HIV-1-Protease-Monomer sein kann. Die Beobachtung, dass die Ein-



Schema 1. Entwicklung des HIV-1-Protease-Dimerisierungsinhibitors **3** ausgehend von **1**.

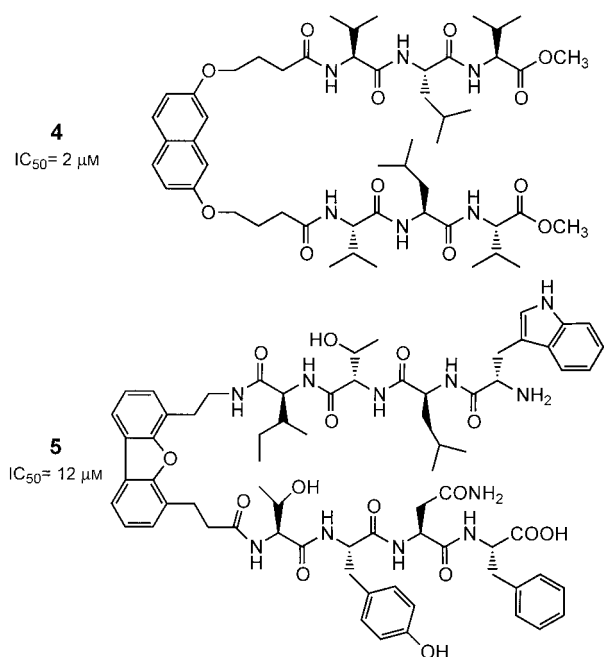


Abbildung 1. Von der Grenzfläche zweier HIV-1-Protease-Untereinheiten abgeleitete Inhibitoren **4** und **5** mit starren Linkermolekülen.

führung von *cis*- und *trans*-Alken-Funktionalitäten oder einer Alkylgruppe in den $(\text{CH}_2)_{14}$ -Linker von **1** dessen inhibitorische Wirksamkeit reduziert, stimmt mit diesem Erklärungsansatz überein.^[41]

Schramm et al. führten ausgiebige Mutations- und Deletionsanalysen sowie eine computergestützte Modellierung der C-terminalen HIV-1-Protease-Sequenzen durch.^[42] Diese Arbeiten führten zur Identifizierung zahlreicher N-palmitoylgeschützter Tripeptide mit IC_{50} -Werten im nanomolaren Konzentrationsbereich. Die Verbindung *N*-Palmitoyl-Tyr-Glu-Leu-OH inhibierte die Enzymdimerisierung mit $\text{IC}_{50} = 150 \text{ nM}$ ($15\text{--}30 \text{ nM}$ Protease)^[43] und könnte eine weitere Ausgangsstruktur für die Entwicklung von HIV-1-Protease-Dimerisierungsinhibitoren sein.

Natürlich vorkommende Inhibitoren der HIV-1-Dimerisierung sind eine interessante Alternative zu rational entworfenen Dimerisierungsinhibitoren. Obwohl sie nicht von der Grenzfläche der HIV-1-Protease abgeleitet sind, sollen sie an dieser Stelle besprochen werden, um einen direkten Vergleich zwischen den unterschiedlichen Ansätzen zu ermöglichen. Didemnaketol A (**6**) wurde aus der Seescheide *Didemnum sp.* isoliert und inhibierte HIV-1-Protease mit einem IC_{50} -Wert von $2 \mu\text{M}$ (Abbildung 2).^[44] Die Bestimmung der absoluten Konfiguration der stereogenen Zentren in der Pentaester-Seitenkette wurde durch die geringe Menge an zur Verfügung stehender Substanz von **6** verhindert. Das vereinfachte synthetische Analogon **7**, das der strukturellen Optimierung leichter zugänglich ist, wies die gleiche inhibitorische Wirkung wie Didemnaketol A auf und wirkt ebenfalls über einen dissoziativen Mechanismus.^[45] Wegen ihres nichtpeptidischen Charakters zählen **6** und **7** zu den vielversprechendsten Leitstrukturen zur Inhibierung der Assoziation von HIV-1-Protease-Untereinheiten.

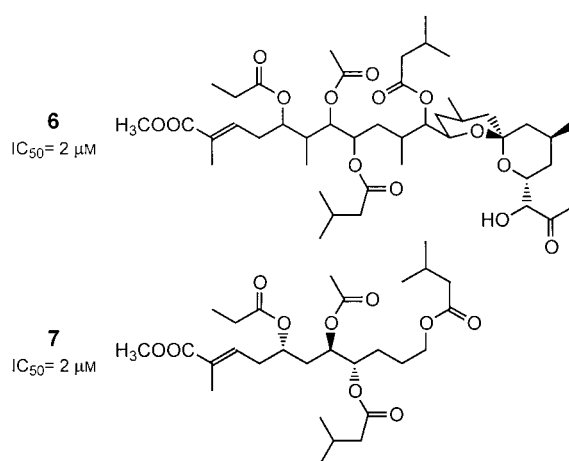


Abbildung 2. Didemnaketol A (**6**) und das synthetische Analogon **7**.

2.2. Inhibitoren der Assoziation von Ribonucleotid-Reduktase-Untereinheiten des Herpes-Simplex-Virus

Ein großer Teil der Weltbevölkerung ist mit dem Herpes-Simplex-Virus (HSV) vom Typ 1 oder 2 infiziert. Diese Viren können viele Krankheiten auslösen, darunter auch labialen und genitalen Herpes.^[46] Die zurzeit eingesetzten Medikamente sind Nucleosid-Analoga (z. B. Acyclovir), die zunächst von der viralen Thymidinkinase und anschließend von zellulären Kinasen phosphoryliert und somit in Inhibitoren der viralen DNA-Polymerase überführt werden.^[47] Das virale Enzym Ribonucleotid-Reduktase, das Ribonucleotiddiphosphate in die entsprechenden Desoxyribonucleotide konvertiert, wurde als ein weiteres potenzielles Ziel für die Behandlung der von HSV hervorgerufenen Symptome diskutiert.^[48] Die HSV-Typen 1 und 2 codieren für eigene Ribonucleotid-Reduktasen, die bei Mäusen wichtig für die virale Virulenz und die Reaktivierung aus der Latenz sind.^[49] Die aktive Form der Ribonucleotid-Reduktase entsteht durch Assoziation der großen Untereinheit R1 mit der kleinen Untereinheit R2.^[50] Der C-Terminus von R2 ist notwendig für die Assoziation beider Untereinheiten.^[51] Vom C-Terminus der R2-Untereinheit abgeleitete Peptide verhinderten die Assoziation der Untereinheiten und inhibierten dadurch die Enzymaktivität.^[52]

Das vom C-Terminus von HSV-R2 abgeleitete Hexapeptid Ala-Val-Val-Asn-Asp-Leu (**8**) war der Ausgangspunkt für die Entwicklung von Inhibitoren der Assoziation der Enzym-Untereinheiten. Die systematische Variation der Seitenketten^[53] dieses Hexapeptids gipfelte in der Entdeckung von BILD 1357 (**9**), das in einem In-vitro-Bindungsassay mindestens 58000-mal aktiver als das Hexapeptid **8** war ($\text{IC}_{50} < 1 \text{ nM}$; Abbildung 3).^[54] Trotz seines peptidischen Charakters inhibierte BILD 1357 die Replikation von HSV in Zellkultur hocheffizient ($\text{EC}_{50} = 0.8 \mu\text{M}$ gegen HSV-1; zum Vergleich Acyclovir: $2 \mu\text{M}$) und unterdrückte die HSV-1-induzierte Hornhautentzündung in einem Mausmodell beim Einsatz einer 0,3-proz. Creme. Die Entwicklung von BILD 1357 belegt eindrucksvoll, dass von der Protein-Protein-Grenzfläche abgeleitete kurze Peptide sehr wertvolle Leitstrukturen für die Wirkstoffforschung sein können.

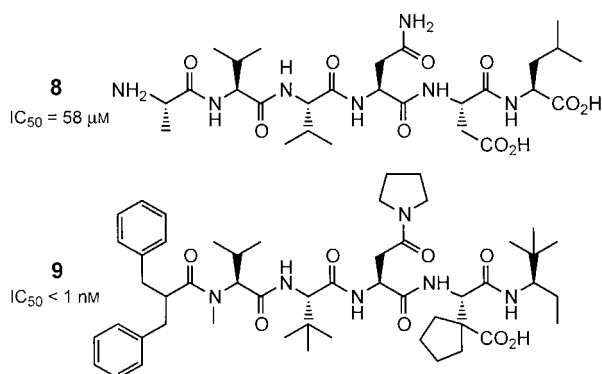


Abbildung 3. Peptid-Leitstruktur **8** und, optimierter Inhibitor der Assoziation von HSV-Ribonucleotid-Reduktase-Untereinheiten BILD 1357 (**9**).

2.3. Inhibitoren der p53/Hdm2-Wechselwirkung

Der Tumor-Suppressor p53 ist in den meisten Human-Tumoren entweder durch Missense-Mutationen^[55] oder durch Bindung an Onkoproteine inaktiviert.^[56] p53 trägt unter anderem zur Genom-Integrität der Zelle durch die Auslösung von Zellzyklusarrest^[57] und Apoptose^[58] als Reaktion auf die Schädigung der DNA^[59] bei. In mehr als 30% der menschlichen Sarkome kann die Inaktivierung von p53 mit der Amplifikation des für das Onkoprotein Hdm2 codierenden Gens in Verbindung gebracht werden.^[60] Die Wechselwirkung mit Hdm2 inhibiert p53 auf zwei unterschiedliche Weisen: Erstens bindet Hdm2 an die Transaktivierungsdomäne von p53 und inhibiert dadurch die Expression von p53-Zielgenen; zweitens vermittelt ein Proteinkomplex, der Hdm2 enthält, den Export von p53 aus dem Zellkern und den anschließenden Abbau von p53 durch cytoplasmatische Proteasomen.^[61]

Die röntgenographisch bestimmte Struktur des Komplexes zwischen einem von p53 abgeleiteten Peptid und Wildtyp-Hdm2 zeigt, dass die Aminosäuren 18–26 von p53 eine amphipathische α -Helix bilden, die an eine verlängerte hydrophobe Spalte von Hdm2 bindet.^[62] Die Aminosäuren Phe19, Trp23 und Leu26 von p53 binden entlang dieser Spalte, und die Substitution jeder einzelnen dieser Aminosäuren reduziert die Bindungsaffinität von p53 für Hdm2 erheblich. Das aus den Aminosäuren 16–27 von p53 bestehende Dodecapeptid **10** inhibierte die p53/Hdm2-Wechselwirkung durch Bindung an Hdm2 (IC₅₀ = 8.7 μM in vitro, Tabelle 1). Nach Optimierung der Sequenz durch Phagen-

Display^[63] und Verkürzung der Sequenz wurde das Octapeptid **11** als ebenso wirksamer Inhibitor identifiziert. Die Substitution derjenigen Aminosäuren, die die Protein-Protein-Grenzfläche nicht berühren, durch α,α' -disubstituierte Aminosäuren erhöhte die Helicalität der Peptide und vergrößerte damit die Affinität des Peptides **12** zu Hdm2. Die anschließende Substitution von Tyr durch Phosphonomethylphenylalanin (Pmp) stabilisierte eine Salzbrücke mit der ϵ -Aminogruppe eines Lysinrestes in Hdm2 (Verbindung **13**). Schließlich wurde die Bindungsaffinität durch Substitution von Trp23 mit 6-Chlortryptophan (ClTrp) (Verbindung **14**, IC₅₀ = 5 nM) drastisch erhöht. Das Chloratom von ClTrp füllt den verbleibenden Raum der Tryptophan-Bindungstasche von Hdm2 aus und erzeugt dadurch zusätzliche Van-der-Waals-Wechselwirkungen mit Hdm2.^[64] In zellulären Assays bewirkte **14** die Aktivierung und Akkumulierung von p53 und verursachte p53-abhängigen Zellzyklusarrest und Apoptose in einer Hdm2-überexprimierenden Krebszelllinie.^[65] Leider erforderte die geringe Zellpermeabilität von **14** dessen Verwendung in einer Konzentration von 100 μM in diesen zellulären Assays.

Weitere Inhibitoren der p53/Hdm2-Wechselwirkung wurden bei zwei unabhängigen Forschungsansätzen entdeckt. Durch Screening von 53 000 mikrobiellen Extrakten wurde der Pilzmetabolit Chlorofusin als Inhibitor der p53/Hdm2-Wechselwirkung identifiziert (IC₅₀ = 4.6 μM in vitro).^[66] Dieses zyklische Nonapeptid besteht aus natürlichen und nichtnatürlichen Aminosäuren und enthält ein Chromophor. Holak et al. fanden heraus, dass bestimmte Chalkone (1,3-Diphenyl-2-propen-1-one) an die Tryptophan-Bindungstasche von Hdm2 binden und die p53/Hdm2-Wechselwirkung im mikromolaren Konzentrationsbereich inhibieren können.^[67]

3. Niedermolekulare Modulatoren von Protein-Protein-Wechselwirkungen durch Screening chemischer Bibliotheken

3.1. Inhibitoren der Wechselwirkung zwischen Bcl-x_L oder Bcl-2 und Bak-BH3-Domänen

Die Resistenz gegen Chemotherapeutika ist ein ernsthaftes Problem bei der Behandlung von Krebserkrankungen.^[68] Die meisten konventionellen chemotherapeutischen Agentien schädigen zelluläre Bestandteile, was zu vielen Reaktionen führen kann. Einer der gewünschten Effekte ist die Induktion von Apoptose, eines genau regulierten zellulären Suizidprogramms. Dieses spielt eine wichtige Rolle in der Abwehr gegen Zellen, die sich den normalen Proliferations-Kontrollmechanismen zu entziehen drohen.^[69] Die Überexpression der anti-apoptotischen Gene *bcl-2* und *bcl-x_L* aus der *bcl-2*-Familie wurde häufig in einigen soliden Human-Krebsarten beobachtet und mit der Resistenz dieser Tumore gegen die Chemotherapie in Verbindung gebracht.^[70] Bcl-2 wurde weiterhin durch die Effekte eines Antisense-Oligonucleotids (Genasense, Genta Inc., USA), das zurzeit in Kombination mit Cytostatika für die Behandlung unterschiedlicher Krebsarten in klinischen Studien getestet wird,

Tabelle 1: Peptidinhibitoren der p53/Hdm2-Wechselwirkung.^[a]

Verb.	IC ₅₀ [μM]
10 Ac-Gln-Glu-Thr-Phe ¹⁹ -Ser-Asp-Leu-Trp ²³ -Lys-Leu-Leu ²⁶ -Pro-NH ₂	8.7
11 Ac-Phe ¹⁹ -Met-Asp-Tyr-Trp ²³ -Glu-Gly-Leu ²⁶ -NH ₂	8.9
12 Ac-Phe ¹⁹ -Met-Aib-Tyr-Trp ²³ -Glu-Ac ₃ C-Leu ²⁶ -NH ₂	2.2
13 Ac-Phe ¹⁹ -Met-Aib-Pmp-Trp ²³ -Glu-Ac ₃ C-Leu ²⁶ -NH ₂	0.3
14 Ac-Phe ¹⁹ -Met-Aib-Pmp-ClTrp ²³ -Glu-Ac ₃ C-Leu ²⁶ -NH ₂	0.005

[a] Abkürzungen: Aib = α -Aminoisobuttersäure, Pmp = Phosphonomethylphenylalanin, ClTrp = 6-Chlortryptophan, Ac₃C = 1-Aminocyclopropanecarbonsäure.

als Krebs-Zielmolekül validiert.^[71] Vermutlich verhindern Bcl-2 und Bcl-x_L die Apoptose, indem sie die Funktion anderer, pro-apoptotischer Mitglieder der Bcl-2-Familie wie Bax und Bak durch Bindung an deren BH3(Bcl-2-Homologie-3)-Domäne inhibieren. Niedermolekulare Inhibitoren der Wechselwirkung zwischen Bcl-2 oder Bcl-x_L und der BH3-Domäne pro-apoptotischer Bcl-2-Familienmitglieder könnten daher die biologischen Funktionen der pro-apoptotischen Bcl-2-Familienmitglieder wiederherstellen. Möglicherweise können solche Moleküle Krebsarten, die wegen der Überexpression anti-apoptotischer Bcl-2-Familienmitglieder resistent gegen Chemotherapie sind, wieder empfänglich für die Behandlung mit Chemotherapeutika machen.

Um niedermolekulare Inhibitoren der Wechselwirkung zwischen Bcl-x_L und der BH3-Domäne von Bak zu identifizieren, entwickelten Yuan et al.^[72] einen auf Fluoreszenzpolarisation (FP)^[73] beruhenden In-vitro-Assay. Dieser homogene Assay ist allgemein anwendbar für die Analyse von Protein-Protein-Wechselwirkungen, wenn das Molekulargewicht des größeren Proteins das Molekulargewicht des kleineren Peptides oder Proteins um ein Vielfaches übersteigt, und kann leicht an ein Hochdurchsatzformat angepasst werden. Das Maß der Wechselwirkung zwischen der fluoreszenzmarkierten BH3-Domäne von Bak und rekombinantem Bcl-x_L-Protein wurde durch Messung der Polarisation der emittierten Fluoreszenz nach Anregung mit polarisiertem Licht analysiert (Abbildung 4). In Abwesenheit eines Inhibi-

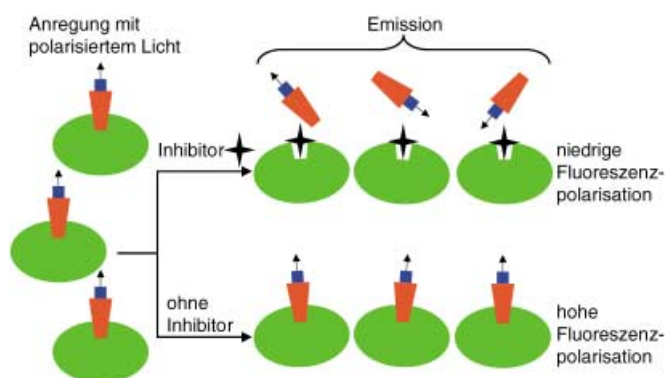


Abbildung 4. Prinzip des für die Suche nach Bcl-x_L/Bak-BH3-Inhibitoren verwendeten Fluoreszenzpolarisationsassays. Grünes Oval: großes Bcl-x_L-Protein, roter Keil: kleines BH3-Peptid, blaues Quadrat: Fluorophor, Pfeil: Vektor des Übergangsdipolmoments der Fluoreszenzemission.

tors ist das fluoreszenzmarkierte BH3-Peptid an das größere Bcl-x_L-Protein gebunden. Da sich die räumliche Orientierung des großen Peptid/Proteinkomplexes zwischen den Zeitpunkten der Fluoreszenzanregung und der Fluoreszenzemission kaum verändert, ist die Polarisation der emittierten Fluoreszenz relativ hoch. Inhibitoren der Bcl-x_L/Bak-BH3-Wechselwirkung setzen das kleine, fluoreszenzmarkierte BH3-Peptid frei, dessen erhöhte Rotationsbeweglichkeit im ungebundenen Zustand zu einer Reduktion der Fluoreszenzpolarisation führt.

Eine aus 16320 Substanzen bestehende käufliche Bibliothek wurde durchmustert, und die drei Verbindungen BH3I-1 (**15**), BH3I-1' (**16**) und BH3I-2 (**17**) wurden als Inhibitoren der Bcl-x_L/Bak-BH3-Wechselwirkung identifiziert ($K_i = 2.4\text{--}4.1\text{ }\mu\text{M}$; Abbildung 5). Analoga dieser Verbindungen wurden

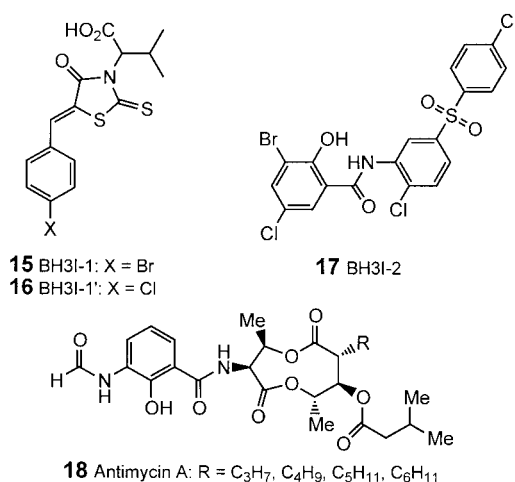


Abbildung 5. Inhibitoren der Wechselwirkung zwischen Bcl-x_L und BH3-Domänen.

auch als Bcl-x_L/Bak-BH3-Inhibitoren identifiziert. NMR-Untersuchungen zeigten, dass die Inhibitoren an die BH3-Bindungstasche von Bcl-x_L binden. Die Bcl-x_L/Bak-BH3-Inhibitoren stellten die biologische Funktion der pro-apoptotischen Bcl-2-Familienmitglieder in Zellkulturexperimenten wieder her und gestatteten vormals resistenten Zellen den Eintritt in die Apoptose. In einem unabhängigen Ansatz fanden Hockenbery et al. heraus, dass eine Mischung der Antimycin-A-Isomere (**18**), die zuvor als Inhibitor des mitochondrialen Elektronentransfers verwendet wurde, ebenfalls die Bindung der BH3-Domäne von Bcl-2 oder Bcl-x_L an ein BH3-Peptid kompetitiv inhibiert.^[74] Die chemische Optimierung dieser Inhibitoren könnte zu neuartigen Ansätzen zur Behandlung von Krebsarten führen, die resistent gegen Chemotherapeutika sind.

3.2. Inhibitoren der Myc/Max-Dimerisierung

Der Transkriptionsfaktor c-Myc spielt bei schätzungsweise jedem siebten Krebsstadium eine Rolle.^[75] Im Burkitt-Lymphom und anderen lymphatischen Erkrankungen ist das c-myc-Gen in die unmittelbare Umgebung eines Immunglobulin-Enhancers transloziert, wodurch das Gen konstitutiv exprimiert wird.^[76] Das c-myc-Gen ist auch in Lungen-^[77] und Brustkarzinomen amplifiziert,^[78] und eine erhöhte Expression des c-Myc-Proteins liegt in der Mehrzahl der Darmkarzinome vor.^[79] Die gezielte Überexprimierung von c-myc verursacht hämatopoetische Tumore in transgenen Mäusen,^[80] und die dauerhafte Aktivierung von c-Myc genügt, um prä maligne Veränderungen in der Hautepidermis hervorzurufen.^[81] Da die onkogene Aktivität von c-Myc vollständig von dessen Bindung an seinen Aktivierungspart-

ner Max abhängt,^[82] könnten Inhibitoren der Myc/Max-Wechselwirkung die Aktivität von c-Myc regulieren. Damit sind sie von pharmakologischem Interesse für die Behandlung von Krebsarten, die von der konstitutiven Aktivierung von c-Myc abhängen.

c-Myc und Max weisen unmittelbar aufeinander folgende basische, Helix-Loop-Helix und Leucin-Zipper(bHLH-LZ)-Domänen auf. Die Struktur des verwandten Max/Max-Homodimers im Kristall lässt vermuten,^[83] dass das Myc/Max-Dimer als ein paralleles linksgängiges 4-Helix-Bündel vorliegt, in dem jedes Monomer zwei durch eine Schleife getrennte α -helicale Segmente aufweist. Während die basischen Domänen und die N-terminalen Helices die Bindung an spezifische DNA-Sequenzen in den Promotoren von c-Myc-Zielgenen vermitteln, besteht die Dimerisierungsgrenzfläche aus den C-terminalen Helix-Motiven und den Leucin-Zippeln, die als parallele ineinander gewundene Helices (coiled-coil) vorliegen. Die Protein-Protein-Grenzfläche besteht größtenteils aus hydrophoben Aminosäuren.^[84]

Wegen des parallelen Verlaufs und der identischen Länge der Dimerisierungsdomänen von c-Myc und Max war ein auf Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfer (FRET)^[85] beruhender Bindungsassay für das Durchmustern nach Inhibitoren der Myc/Max-Wechselwirkung sehr gut geeignet. FRET kann zwischen zwei Fluorophoren auftreten, wenn das Emissionsspektrum des Donor-Fluorophors mit dem Anregungsspektrum des Acceptor-Fluorophors überlappt. Da die Effizienz von FRET in reziproker Beziehung zur sechsten Potenz des Abstands zwischen den Fluorophoren steht, ermöglicht diese Methode die Analyse von Bindungsgleichgewichten zwischen Molekülen, die mit zwei geeigneten Fluorophoren fusioniert sind. Vogt et al. exprimierten die Dimerisierungsdomänen von c-Myc und Max als Fusionsproteine mit cyanfarbenem fluoreszierendem Protein (CFP) bzw. gelb fluoreszierendem Protein (YFP).^[86] Nach Anregung von CFP ermöglichte die geringe Entfernung zwischen den Fluorophoren im c-Myc/Max-Dimer den Energietransfer von CFP zu YFP (Abbildung 6). Inhibitoren der Wechselwirkungen zwischen den Dimerisierungsdomänen von c-Myc und Max erhöhten die mittlere Entfernung zwischen c-Myc und Max und verringerten dadurch die zwischen den Fluorophoren übertragene Energie, was zu charakteristischen Veränderungen im Fluoreszenzspektrum führte.

Das Durchmustern von etwa 7000 chemischen Verbindungen^[87,96] resultierte in der Entdeckung von vier niedermolekularen Antagonisten der Wechselwirkung zwischen den

Dimerisierungsdomänen von c-Myc und Max. Diese Verbindungen wurden anschließend in unabhängigen In-vitro-Assays validiert. Die beiden aktivsten Inhibitoren in vitro, IIA4B20 (**19**) und IIA6B17 (**20**), inhibierten zusätzlich die c-Myc-induzierte onkogene Transformation von Hühnerembryofibroblasten mit IC_{50} -Werten von ca. 20 μ M. Verbesserte Inhibitoren der c-Myc/Max-Wechselwirkung, die möglicherweise aus Sekundärbibliotheken hervorgehen werden, könnten als Leitstrukturen für die Wirkstoffforschung und als neuartige molekulare Werkzeuge für die Identifizierung von c-Myc Zielgenen dienen (Abbildung 7).^[88]

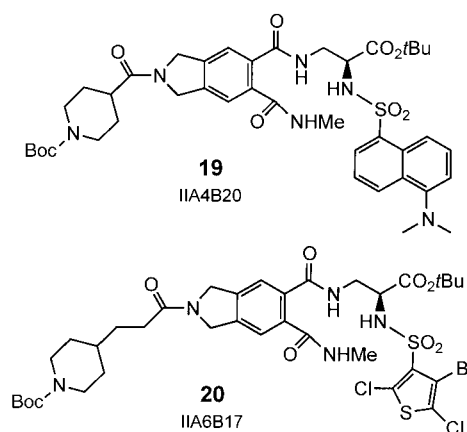


Abbildung 7. Strukturen der Myc/Max-Inhibitoren IIA4B20 (**19**) und IIA6B17 (**20**).

3.3. Inhibitoren der MMP2/Integrin- $\alpha_v\beta_3$ -Wechselwirkung

Das Wachstum von Tumoren erfordert die Bildung neuer Blutgefäße. Die frühen Schritte dieses als Angiogenese^[89] bezeichneten Vorgangs umfassen die Migration von Endothelzellen aus dem existierenden Blutgefäßsystem. Hierbei werden die vaskuläre Basallamina und die extrazelluläre Matrix (ECM) ummodelliert.^[90] Matrix-Metalloproteinasen (MMPs) in der extrazellulären Umgebung sind für die Zerstörung der Basallamina und der ECM verantwortlich.^[91] Wegen der Fülle der Funktionen von MMPs im erwachsenen Organismus haben Inhibitoren des aktiven Zentrums von MMPs leider schädliche Nebenwirkungen,^[92] die deren klinische Verwendung als Antiangiogenese-Agentien einschränkt. Die Entdeckung, dass eine der Matrix-Metalloproteinasen, MMP-2, in vivo mit dem Integrin $\alpha_v\beta_3$ auf der Oberfläche invasiver angiogener vaskulärer Zellen und Melanomzellen assoziiert vorliegt^[93] und dass die Inhibierung der MMP-2/ $\alpha_v\beta_3$ -Wechselwirkung durch ein aus der $\alpha_v\beta_3$ -Bindungsdomäne von MMP-2 bestehendes Polypeptid die Angiogenese unterdrückt,^[94] eröffnete eine weitere therapeutische Möglichkeit zur Verhinderung der Angiogenese in Tumoren.

Um niedermolekulare Inhibitoren der MMP-2/ $\alpha_v\beta_3$ -Wechselwirkungen zur Verwendung als Antiangiogenese-Agentien zu identifizieren, analysierte ein interdisziplinäres Forschungsteam unter der Leitung von Boger und Cheresch die Wechselwirkungen zwischen MMP-2 und $\alpha_v\beta_3$ in Gegen-

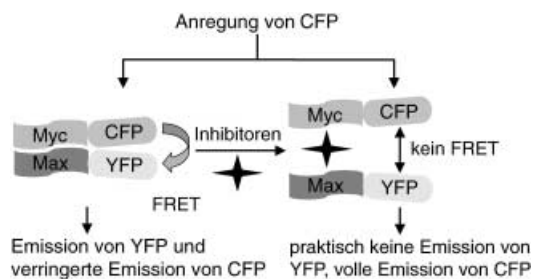
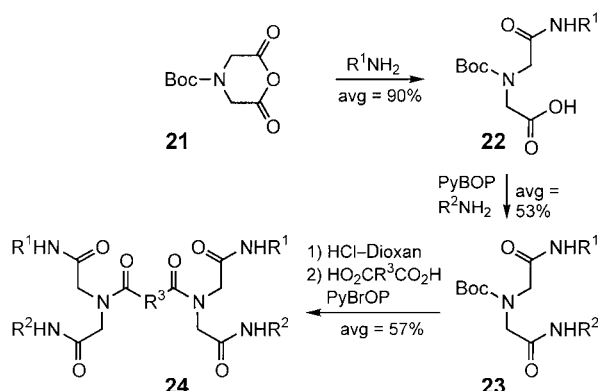


Abbildung 6. Vereinfachtes Prinzip des für das Durchmustern nach Myc/Max-Inhibitoren verwendeten FRET-Assays.

wart von Elementen einer chemischen Bibliothek.^[95] Diese wurde durch Kombination von sechs unterschiedlichen Aminen R^1 mit zehn unterschiedlichen Aminen R^2 über ein Iminodiessigsäure-Linkermolekül synthetisiert.^[96] Die Dimerisierung von jeder der 60 Einzelverbindungen **23** mit einer Mischung von zehn starren Dicarbonsäuren R^3 generierte 60 Mischungen aus jeweils zehn unterschiedlichen Verbindungen (**24**; Schema 2).



Schema 2. Synthese der für die Suche nach Inhibitoren der MMP-2/ $\alpha_v\beta_3$ -Wechselwirkung verwendeten chemischen Bibliothek. Boc = *tert*-Butoxycarbonyl, PyBOP = Benzotriazol-1-yloxytripyrrolidinophosphonium-hexafluorophosphat, PyBrOP = Bromtripyrrolidinophosphonium-hexafluorophosphat; avg = durchschnittliche Ausbeute.

Ohne genaue Strukturinformationen über die MMP-2/ $\alpha_v\beta_3$ -Grenzfläche wurde die Bindung zwischen $\alpha_v\beta_3$ und MMP-2 in einem Enzym-Immunassay (ELISA) analysiert. Gereinigtes $\alpha_v\beta_3$ wurde zunächst auf die Oberfläche einer Mikrotiterplatte gebunden und danach das immobilisierte $\alpha_v\beta_3$ mit biotinyliertem MMP-2 in Gegenwart der Testsubstanzen inkubiert (Abbildung 8). Schließlich wurde ein Anti-Biotin-Antikörper, der an das Enzym Meerettich-Peroxidase (horseradish peroxidase, HRP) gekuppelt war, hinzugegeben und das Maß der Bindung zwischen MMP-2 und $\alpha_v\beta_3$ in Gegenwart der Testsubstanzen mithilfe eines HRP-Substrats kolorimetrisch quantifiziert.

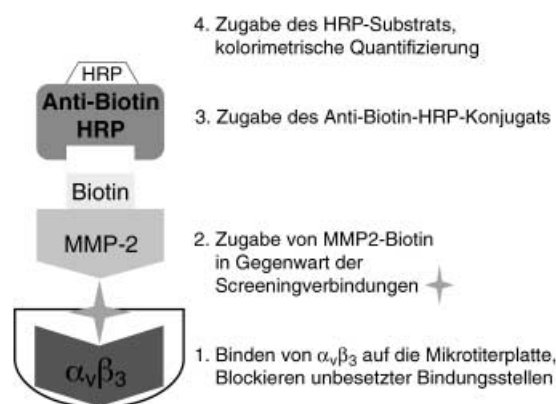
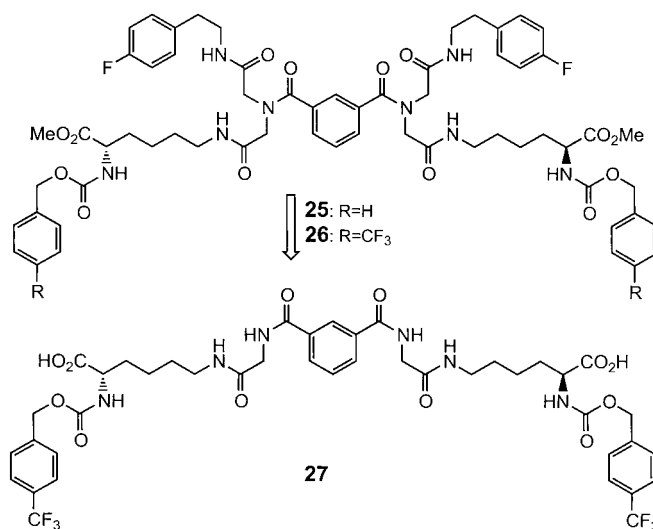


Abbildung 8. Aufbau des ELISA für die Detektion von MMP-2/ $\alpha_v\beta_3$ -Wechselwirkungen.

Nach Dekonvolution der aktiven Substanzmischungen wurde die Verbindung A6B10C4 (**25**) als Inhibitor der MMP-2/ $\alpha_v\beta_3$ -Wechselwirkung identifiziert (79% Inhibierung bei 3 μ M Verbindung; Schema 3). Interessanterweise zeigte das Enantiomer von **25** keine inhibitorische Aktivität, was ein-



Schema 3. Entwicklung von MMP-2/ $\alpha_v\beta_3$ -Inhibitoren.

drucksvoll die Bedeutung der Stereochemie für das Design niedermolekularer Modulatoren von Protein-Protein-Wechselwirkungen veranschaulicht. Die strukturelle Optimierung von **25** führte zur Identifizierung der Verbindung **26** und des vereinfachten Analogons **27**, das wegen seiner verbesserten Löslichkeit und seines geringen Molekulargewichts besser für In-vivo-Tests geeignet war ($IC_{50} = 1 \mu$ M für beide Verbindungen im In-vitro-Bindungsassay). Sowohl **26** als auch **27** banden spezifisch an $\alpha_v\beta_3$, nicht aber an MMP-2. Die Fähigkeit $\alpha_v\beta_3$ -infizierter Melanomzellen, den Hauptbestandteil der Basallamina (Kollagen IV) zu zersetzen, wurde durch **27** im unteren mikromolaren Konzentrationsbereich unterdrückt. **27** inhibierte ebenfalls die Angiogenese und das Tumorstadium in vivo, ohne die Aktivierung von MMP-2 zu beeinflussen. Die Identifizierung der Verbindung **27** bestätigt die prinzipielle Möglichkeit, MMP-2/ $\alpha_v\beta_3$ -Wechselwirkungen mit niedermolekularen organischen Molekülen zu beeinflussen, und weckt damit Hoffnungen, die fehlerhafte Angiogenese in Krebserkrankungen in Zukunft mit Medikamenten behandeln zu können, die weniger schwere Nebenwirkungen verursachen.

3.4. Inhibitoren der Bindung von TNF- α an seinen Rezeptor TNFRc1

Das Cytokin Tumor-Nekrose-Faktor- α (TNF- α) spielt eine wichtige Rolle bei der Reaktion des Immunsystems auf Gewebeschäden und unterschiedliche virale und bakterielle Infektionen.^[97] TNF- α bildet Homotrimer, die an die TNF- α -Rezeptoren 1 und 2 binden und die Rezeptor-Trimerisierung induzieren.^[98] In Abhängigkeit vom zellulären Kontext

kann die Trimerisierung des TNF- α -Rezeptors-1 (TNFRc1) zur Aktivierung des Immunsystems über den NF- κ B-Signalweg führen. Da die übermäßig erhöhte TNF- α -Aktivität auch zu Gewebeschäden führen kann, sind TNF- α -Inhibitoren von klinischem Interesse für die Behandlung von Autoimmunerkrankheiten wie rheumatische Arthritis oder Morbus Crohn.^[99] Diese krankhaften Beschwerden werden zurzeit mit Anti-TNF- α -Antikörpern und löslichen Rezeptormolekülen behandelt, die TNF- α neutralisieren.^[100] Die Inhibierung der Wechselwirkung zwischen TNF- α und seinem Rezeptor TNFRc1 könnte ein alternativer Ansatz zur Unterdrückung der Aktivität von TNF- α sein.

Carter und Mitarbeiter entwickelten ein Bindungsassay an fester Phase, um chemische Datenbanken nach Antagonisten der TNF- α /TNFRc1-Wechselwirkung zu durchmustern. Dazu wurde der TNF- α -Rezeptor TNFRc1 auf Mikrotiterplatten immobilisiert, und die Bindung von fluoreszenzmarkiertem TNF- α an seinen Rezeptor wurde in Gegenwart der Testsubstanzen quantifiziert. Das Durchmustern identifizierte *N*-Alkyl-5-arylalkyliden-2-thioxo-1,3-thiazolidin-4-one als Antagonisten der TNF- α /TNFRc1-Wechselwirkung (Abbildung 9).^[101] Die aktivste Verbindung IW927 (**28**) inhibierte

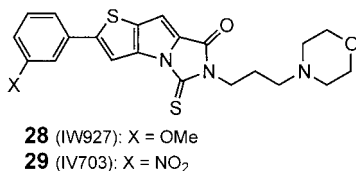


Abbildung 9. Inhibitoren der Bindung von TNF- α an seinen Rezeptor TNFRc1.

die TNF- α /TNFRc1-Wechselwirkung mit einem effektiven IC₅₀ von 50 nM und blockierte auch die TNF- α -stimulierte Phosphorylierung von I κ B, die eine Zwischenstufe in der Aktivierung des NF- κ B-Signalwegs ist. Überraschenderweise wiesen die Verbindungen eine um bis zu 1000-mal niedrigere Aktivität auf, wenn die Bindungsassays im Dunkeln durchgeführt wurden. Die Röntgenstrukturanalyse und andere Untersuchungsmethoden ergaben, dass die analoge Verbindung IV703 (**29**) im Dunkeln reversibel mit nur mikromolarer Affinität an TNFRc1 bindet. Unter normalen Lichtbedingungen reagierte der Nitrophenylring von **29** anschließend mit dem Stickstoffatom eines Alaninrestes am Grundgerüst von TNFRc1, wodurch die Bindung von TNF- α an seinen Rezeptor verhindert wurde. Da im lebenden Organismus die lichtinduzierte Aktivierung von Verbindungen nicht generell möglich ist, muss die Aktivität der Verbindungen im Dunkeln als Nutzungskriterium angewendet werden. Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass die biologische Aktivität von Verbindungen mit einer *N*-Alkyl-5-arylalkyliden-2-thioxo-1,3-thiazolidin-4-on-Untereinheit sehr gründlich analysiert werden muss.

3.5. Inhibitoren der LFA-1/ICAM-1-Wechselwirkung

Die Bindung von aktiviertem LFA-1 (leukocyte function-associated antigen) an seinen Endothelzell-Liganden ICAM-1 (intrazelluläres Adhäsionsmolekül-1) ist ein wichtiger Schritt in der Migration der Leukocyten vom Blutkreislauf zum umgebenden Gewebe in den frühen Stadien der Entzündungsreaktion.^[102] Das auf allen Leukocyten exprimierte^[103] Integrin LFA-1 besteht aus einer großen α_L -Untereinheit (CD11a) und einer kleinen β_2 -Untereinheit (CD18) und wird durch Cytokine und entzündungsfördernde Moleküle aktiviert.^[104] Zusätzlich zu dieser Rolle im frühen Stadium der Entzündungsreaktion liefert die Wechselwirkung zwischen LFA-1 auf der Oberfläche von T-Zellen und ICAM-1 ein starkes co-stimulatorisches Signal bei der Aktivierung von T-Zellen.^[105] Die T-Zellen-Aktivierung und -Proliferation ist eine wesentliche Komponente der Immunantwort. Inhibitoren der LFA-1/ICAM-1-Wechselwirkung haben daher das Potenzial, sowohl die Entzündungs- als auch die Immunantwort zu inhibieren. Inhibitoren der LFA-1/ICAM-1-Wechselwirkung, die für die Behandlung von Entzündungskrankheiten^[106] und Abstoßungsreaktionen^[107] nach Transplantationen entwickelt wurden, beruhen meist auf monoklonalen Antikörpern^[108] gegen CD11a, die α -Kette von LFA-1. CD11a enthält ein aus mehreren Domänen bestehendes β -Propeller-Motiv. Zwischen zwei Domänen dieses β -Propellers ist eine als I-Domäne bezeichnete Domäne inseriert.^[109] Ein Teil dieser I-Domäne ist eine magnesiumionenbindende Domäne, die Metallion-abhängige Adhäsions-Stelle (MIDAS),^[110] die direkt an der Bindung zwischen CD11a und ICAMs beteiligt ist.

Der cholesterinspiegel-senkende Wirkstoff Lovastatin^[111] wurde in einem LFA-1-abhängigen Adhäsionsassay^[112] als Inhibitor der LFA-1/ICAM-1-Wechselwirkung identifiziert. Anschließend wurde ein Analogon von Lovastatin, LFA703, mit verbesserter Aktivität (IC₅₀ = 200 nM in einem Festphasen-Bindungsassay) gefunden, das die Immunantwort in einem Mausmodell für akute Entzündung unterdrückte.^[113] LFA451 (**30**; IC₅₀ = 40 nM) ist der bislang aktivste Statin-Inhibitor der LFA-1/ICAM-1-Wechselwirkung (Abbildung 10).^[114] Eine andere Forschungsgruppe entdeckte das Hydantoin BIRT 377 (**31**) als nanomolaren Antagonisten der LFA-1/ICAM-1-Wechselwirkung beim Durchmustern chemischer Bibliotheken mit anschließender Strukturoptimie-

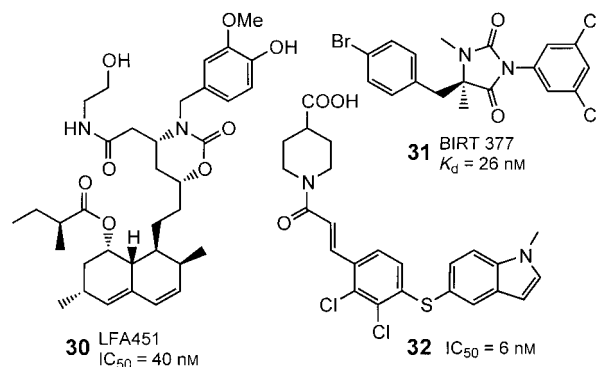


Abbildung 10. Inhibitoren der LFA-1/ICAM-1-Wechselwirkung.

rung.^[115] Interessanterweise berichten die Autoren, dass das Enantiomer von BIRT377 eine 35-mal geringere Wirksamkeit aufweist, wodurch die Bedeutung der Stereochemie für die Entwicklung niedermolekularer Inhibitoren von Protein-Protein-Wechselwirkungen abermals hervorgehoben wird. Wissenschaftler der Firma Abbott (und ICOS) identifizierten *p*-Arylthiozimsäureamide^[116] als Antagonisten der LFA-1/ICAM-1-Wechselwirkung und führten ausführliche Struktur-Aktivitäts-Untersuchungen auf der Grundlage eines NMR-basierten Modells des Komplexes zwischen den Verbindungen und deren LFA-1-Bindungsstellen durch. Diese Untersuchungen ergaben schließlich **32** als nanomolaren Inhibitor ($IC_{50} = 6 \text{ nM}$ in einem Festphasen-Bindungsassay).^[117] Die Verbindung **32** unterdrückte die Zellmigration durch Blockierung der LFA-1/ICAM1-Wechselwirkung in vivo und könnte daher möglicherweise die Schwere einer Entzündungsreaktion in vivo reduzieren.

Strukturuntersuchungen deuten darauf hin, dass keiner der besprochenen Inhibitoren direkt die Bindung von ICAM-1 durch Wechselwirkung mit der MIDAS-Domäne von LFA-1 inhibiert. Stattdessen binden sie an eine Stelle innerhalb der I-Domäne von LFA-1 mit möglicher regulatorischer Funktion. Damit verhindern sie eine allosterische Veränderung in LFA-1, die für die Einnahme derjenigen Konformation notwendig ist, in der ICAM-1 mit hoher Affinität gebunden wird.^[118] Diese allosterische Regulierung von Protein-Protein-Wechselwirkungen ist ein interessanter Ansatz, weil dadurch potenzielle Schwierigkeiten bei der Modulation großer, möglicherweise unzusammenhängender Protein-Protein-Grenzflächen mit kleinen Molekülen umgangen werden.

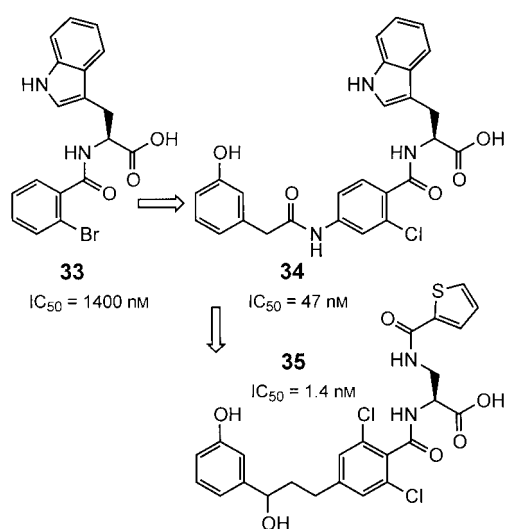
Der bislang wirksamste Inhibitor der LFA-1/ICAM-1-Wechselwirkung wurde mithilfe von rationalem Design identifiziert.^[119] Die LFA-1-Bindungsseptide von ICAM-1 bestehen aus den Aminosäuren Glu34, Lys39, Met64, Tyr66, Asn68 und Gln73.^[120] Molecular Modeling und Alanin-Scanning identifizierten das Sequenzmotiv Arg-Gly-Asp-Met-Pro als Mimikry der ICAM-1-Reste Glu34 und Lys39. Die Analyse der über Disulfidbrücken cyclisierten Heptapeptidbibliotheken auf der Grundlage des Arg-Gly-Asp-Met-

Pro-Epitops führte zur Identifizierung des Inhibitorpeptids $H_2N\text{-Cys-Gly-Tyr(m)-Asp-Met-Pro-Cys-COOH}$ (Tyr(m) = *meta*-Tyrosin). Im Zuge dieser Untersuchungen wurde in unabhängigen Studien *ortho*-Brombenzoyltryptophan (**33**) als Inhibitor der LFA-1/ICAM-1-Wechselwirkung entdeckt. Der Vergleich von *ortho*-Brombenzoyltryptophan mit dem C-Terminus von $H_2N\text{-Cys-Gly-Tyr(m)-Asp-Met-Pro-Cys-COOH}$ ließ darauf schließen, dass eine Verlängerung an Position 4 des Benzoylrings um drei Atome die *meta*-Phenolfunktion des *meta*-Tyrosins nachahmen könnte. In der Tat ist die entsprechend modifizierte Verbindung **34** 30-mal aktiver als *ortho*-Brombenzoyltryptophan **33** (Schema 4). Die weitere Optimierung führte zur Entdeckung von **35**, das in einem In-vitro-Bindungsassay die LFA-1/ICAM-1-Wechselwirkung mit einem IC_{50} von 1.4 nM inhibierte. **35** inhibierte die LFA-1-vermittelte Lymphocytenproliferation und -adhäsion in vitro und ist genauso wirksam wie ein Anti-CD11a-Antikörper in der Inhibierung der Immunantwort in vivo. Es scheint denkbar, dass **35** ein echtes Mimikry des LFA-1-Bindungs-epitops von ICAM-1 ist, da manche seiner funktionellen Gruppen auch im LFA-1-Bindungssepitop von ICAM-1 enthalten sind.

3.6. Inhibitoren der iNOS-Dimerisierung

Stickstoffmonoxid ist an vielen physiologischen Funktionen im Bereich des zentralen Nervensystems, des kardiovaskulären Systems und des Immunsystems beteiligt.^[121] Stickstoffmonoxid kann als schnell reversibles, spezifisches und lokales Signaltransduktionsmolekül agieren, aber auch unspezifisch Gewebe schädigen.^[122] Stickstoffmonoxid wird aus L-Arginin durch die Enzymfamilie der Stickstoffmonoxidsynthasen (NOS) über den Arginin-Stickstoffmonoxid-Syntheseweg freigesetzt.^[123] NOS-Isoformen sind enzymatisch nur als Homodimere aktiv.^[124] Da die induzierbare Stickstoffmonoxidsynthase (iNOS) an einer Reihe von Entzündungs- und Autoimmunkrankheiten^[125] beteiligt ist, könnten niedermolekulare iNOS-Inhibitoren von therapeutischem Nutzen sein.

Auf der Grundlage früherer Beobachtungen, dass Phenylimidazole die Aktivität von iNOS inhibieren,^[126] synthetisierten Devlin et al. eine Bibliothek strukturell ähnlicher Pyrimidinimidazole.^[127] Das Durchmustern dieser Bibliothek in einem zellulären Assay, der die Produktion von NO misst, führte zur Identifizierung des iNOS-Inhibitors **36** ($IC_{50} = 1.1 \text{ nM}$; Abbildung 11). Überraschenderweise war diese Ver-



Schema 4. Entwicklung des LFA/ICAM-1-Inhibitors **35**.

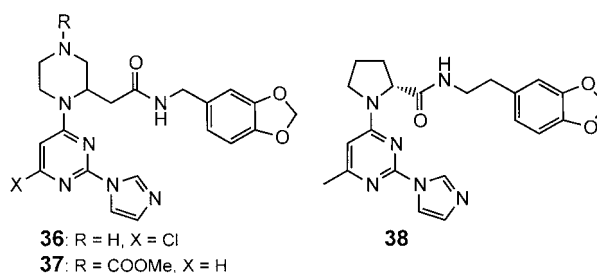


Abbildung 11. iNOS-Inhibitoren.

bindung nicht in der Lage, partiell gereinigtes, rekombinantes humanes iNOS in seiner natürlichen dimeren Form zu inhibieren. Daher vermuteten die Autoren, dass **36** die Dimerisierung von iNOS-Monomeren zu enzymatisch aktiven Homodimeren unterbindet. In der Tat ergab die Ausschluss-Chromatographie zellulärer Extrakte, dass die analoge Verbindung **37** die intrazelluläre Assoziation von iNOS-Monomeren inhibiert. Weiterhin zeigte die kristallographisch bestimmte Struktur des an die monomere Oxygenase-Domäne von iNOS gebundenen Inhibitors **37**, dass die Verbindung an das katalytische Zentrum von iNOS bindet und dadurch allosterische Konformationsänderungen im Monomer hervorruft, was die Bildung von stabilen Homodimeren verhindert. Die aktivste Verbindung, **38** ($IC_{50} = 0.5 \text{ nM}$), stellte sich als hochselektiver, zellpermeabler Marker für die Untersuchung zellulärer iNOS-Funktionen heraus.^[128] Dieses Beispiel veranschaulicht einmal mehr, dass dimere Enzyme nicht nur von Inhibitoren des katalytischen Zentrums, sondern auch von Inhibitoren der Assoziation der Enzym-Untereinheiten inhibiert werden können (siehe Abschnitte 2.1 und 2.2).

3.7. Agonisten des Erythropoietin-Rezeptors

Die Bildung roter Blutzellen wird von dem Hormon Erythropoietin (EPO) reguliert.^[129] Analog zu anderen Cytokinen aktiviert auch EPO seinen Rezeptor durch Bindung an zwei Rezeptormoleküle und induziert dadurch die Dimerisierung des Rezeptors.^[130] Die Bindung des 34-kDa-Glycopro-

teins EPO an den Erythropoietin-Rezeptor (EPOR) führt zur Proliferation und Differenzierung von Erythrocyten-Vorläuferzellen zu roten Blutzellen.^[131] Beim Menschen wird EPO hauptsächlich in der Niere produziert,^[132] und durch Nierenversagen verursachte Anämien^[133] werden zurzeit mit rekombinantem EPO behandelt.^[134] Weil EPO durch wiederholte Injektionen verabreicht werden muss, wären oral verabreichbare niedermolekulare EPO-Mimetika sehr wünschenswert.^[135]

Während die Inhibierung von Protein-Protein-Wechselwirkungen mit niedermolekularen Molekülen lediglich erfordert, dass die Moleküle an eines der Proteine in einer Weise binden, die die Wechselwirkung zwischen den Proteinen verhindert, erfordert die Induzierung der Wechselwirkung zwischen zwei Proteinen die gleichzeitige Bindung der kleinen Moleküle an beide Proteine in einer konstruktiven Weise. Die Induzierung der Dimerisierung zweier EPORs könnte somit entweder durch ein rezeptorbindendes Molekül, das in zwei oder mehr Kopien auf einem Dendrimer präsentiert wird, oder durch eine symmetrische Verbindung erreicht werden, die nur einen Satz ihrer funktionellen Gruppen für die Bindung eines Rezeptormoleküls verwendet. In Anlehnung an den erstgenannten Ansatz identifizierten Qureshi et al. **39** als EPOR-bindendes Molekül aus einer chemischen Bibliothek (Abbildung 12).^[136] Anschließend wurden acht Moleküle **39** an einem Dendrimer angebracht, um so die gleichzeitige Bindung von mindestens zwei EPOR-bindenden Molekülen an den EPOR zu ermöglichen. **40** bindet an den EPOR mit etwas höherer Affinität als **39** (berechnet auf Monomerenbasis) und ist im Unterschied zu

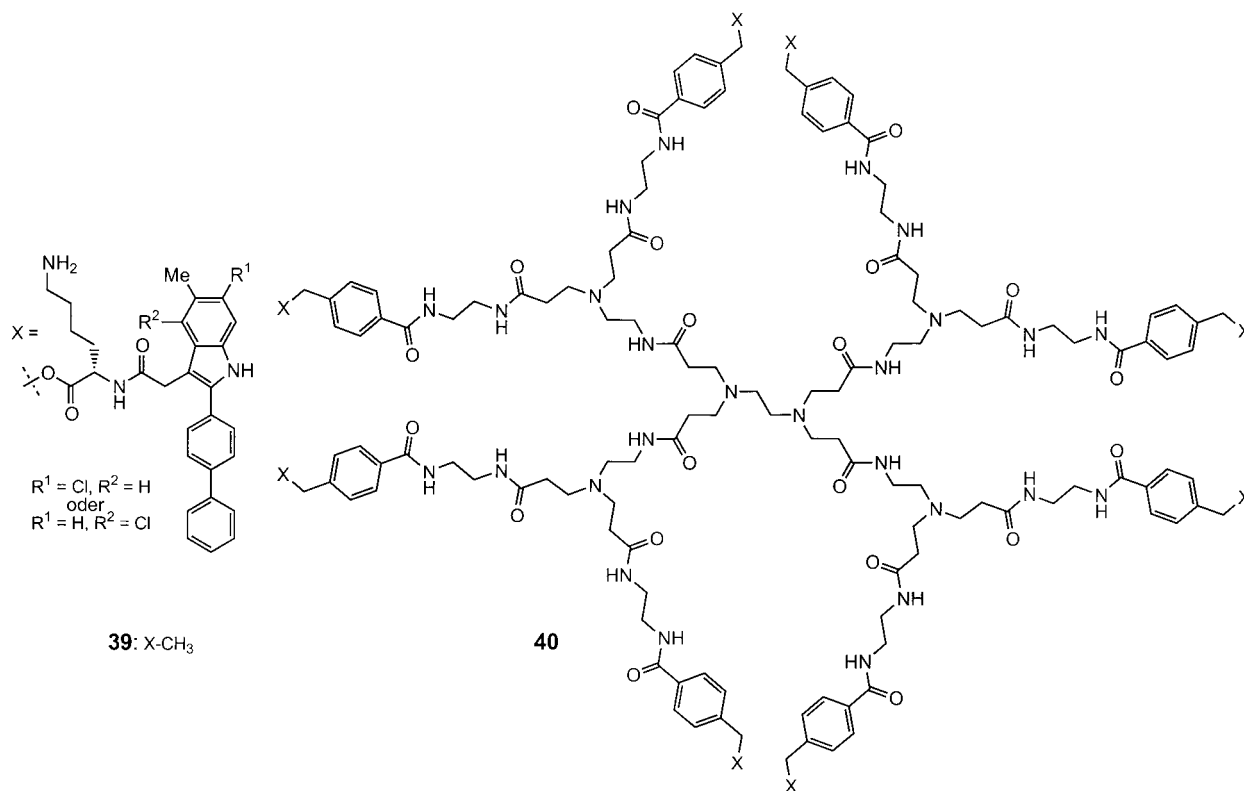


Abbildung 12. EPO-Mimetika von Qureshi et al.^[136]

39 in der Lage, die Dimerisierung des Rezeptors *in vitro* zu induzieren ($EC_{50} = 15.9 \mu\text{M}$). Die Verbindung **40** aktiviert den EPOR auf ähnliche Weise wie EPO selbst; z. B. verstärkt sie die Proliferation zahlreicher Krebszelllinien, die den EPOR exprimieren, und induziert die Differenzierung humaner Erythrocyten-Vorläuferzellen in Kolonien in der Zellkultur.

In Anlehnung an den zweiten Ansatz durchmusterten Boger und Mitarbeiter eine C_2 -symmetrische chemische Bibliothek nach Molekülen, die an den EPOR binden.^[137] Die gleiche chemische Bibliothek, die auch bei der Suche nach Inhibitoren der MMP2/ α_3 -Wechselwirkung eingesetzt wurde, wurde für ein erstes Durchmustern nach EPO-bindenden Molekülen durchsucht; interessanterweise wurde die gleiche Verbindung A6B10C4 (**25**) identifiziert, wenn auch mit weit geringerer Affinität für ihr Zielprotein. Die strukturelle Optimierung von **25** führte zur Entdeckung der Verbindung A7B10C1 (**41**), die die Bindung von EPO an seinen Rezeptor um 45 % reduziert (bei $50 \mu\text{M}$) und die Proliferation einer von EPO abhängigen Zelllinie um bis zu

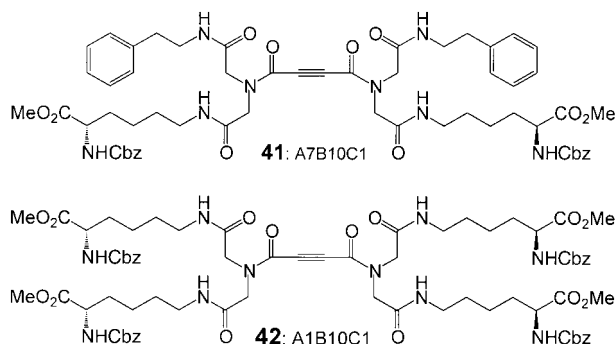


Abbildung 13. Kleine EPO-Mimetika von Boger et al.^[137] Cbz = Benzyl-oxycarbonyl.

175 % erhöht (Abbildung 13). Eine ähnliche Verbindung, A1B10C1 (**42**), war im nanomolaren Konzentrationsbereich genauso aktiv wie **40**, doch weist sie ein deutlich geringeres Molekulargewicht auf. A7B10C1 (**41**) und A1B10C1 (**42**) könnten schwache partielle Agonisten des EPOR sein; allerdings kann nicht ausgeschlossen werden, dass die Verbindungen nicht direkt auf den EPOR, sondern auf alternative Downstream-Ziele wirken.

3.8. Agonisten der Wechselwirkung von mutiertem menschlichem Wachstumshormon mit seinem mutierten Rezeptor

Menschliches Wachstumshormon (hGH) trägt zur Regulierung des normalen menschlichen Wachstums und der menschlichen Entwicklung bei.^[138] Ähnlich wie das EPO-EPOR-System führt die Bindung von hGH an seinen Rezeptor zur Rezeptordimerisierung und -aktivierung. Die Wechselwirkung zwischen hGH und der extrazellulären Domäne seines Rezeptors (hGHbp) wurde ausgiebig analysiert, unter anderem durch Röntgenstrukturanalysen^[139] und Mutationsanalysen.^[21,140] Die Entdeckung, dass eine zentrale Region im Rezeptor, die durch die beiden Tryptophanreste

Trp 104 und Trp 169 geprägt wird, mehr als 75 % zur Freien Energie der Bindung an hGH beiträgt, war ein Meilenstein der Forschung auf dem Gebiet der Protein-Protein-Wechselwirkungen und führte zur Aufstellung der Hot-Spot-Theorie (siehe Einleitung).^[21] Schultz et al. verwendeten die Wechselwirkung als Modellsystem für die Entwicklung eines molekularen Schalters für Protein-Protein-Wechselwirkungen.^[141] Im hGH/hGHbp-Komplex ist Trp 104 von hGHbp fest gegen Thr 175 von hGH gepackt. Die Mutation dieser beiden Aminosäuren reduziert die Bindungsaffinität zwischen dem Hormon und dem Rezeptor um den Faktor 10^6 . Eine aus etwa 200 Indolanaloga bestehende Bibliothek wurde anschließend nach Molekülen durchmustert, die die Protein-Protein-Wechselwirkung wiederherstellen konnten. 5-Chlor-2-trichlormethylbenzimidazol (**43**; Abbildung 14) erhöhte bei einer Konzentration von $100 \mu\text{M}$ die Bindungsaffinität des mutierten Hormons an seinen mutierten Rezeptor um mehr als den Faktor 1000 ($K_d = 260 \text{ nM}$). Das mutierte Hormon-Rezeptor-Paar vermittelte in Gegenwart von **43** die wachstumshormoninduzierte Signaltransduktion. Dies zeigt, dass Glycin-Mutationen von Aminosäureresten, die signifikant zur gesamten Freien Bindungsenergie einer Protein-Protein-Wechselwirkung beitragen, teilweise von niedermolekularen Molekülen kompensiert werden können, wenn diese ähnliche chemische Funktionalitäten wie die ursprünglich im Wildtyp-Protein vorkommenden Aminosäureseitenketten aufweisen.

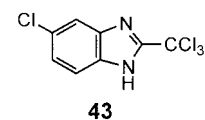


Abbildung 14. Agonist des mutierten hGH/hGHbp-Hormon/Rezeptor-Systems.

3.9. Stabilisierung von Transthyretin-Tetrameren

Unlösliche Protein-Fibrillen, die durch selbsttätige Aneinanderlagerung einer konformativen Zwischenstufe entstehen, werden als Auslöser einiger menschlicher Amyloidkrankheiten angesehen, z. B. Alzheimer-Krankheit, familiäre Amyloid-Polyneuropathie und senile systemische Amyloidose. Die beiden letztgenannten Krankheiten werden durch Abscheidung unlöslicher Transthyretin(TTR)-Fibrillen in den peripheren Nerven und dem Herzgewebe verursacht.^[142] TTR, ein tetrameres Protein, das im Plasma und der Gehirnflüssigkeit vorkommt, bindet an Thyroxin und transportiert Thyroxin^[143] sowie retinolbindendes Protein.^[144] Die Bildung unlöslicher TTR-Amyloid-Fibrillen erfordert als Zwischenstufe die Dissoziation des TTR-Tetramers in Monomere mit veränderter Tertiärstruktur.^[145] Untersuchungen von Kelly et al. zeigten, dass der TTR-Ligand Thyroxin die Bildung von TTR-Amyloid durch Stabilisierung des Tetramers gegen Dissoziation inhibiert; damit können kleine organische Moleküle zur Beeinflussung der TTR-assoziierten Amyloid-Fibrillen-Bildung verwendet werden.^[146] Da Thyroxin wegen seiner hormonellen Wirkung als Wirkstoff ungeeignet schien, wurden andere kleine Moleküle, die möglicherweise die bekannte Bindungsstelle von TTR ausfüllen konnten, auf ihre Eignung zur Inhibition der Bildung von TTR-Amyloid-Fibrillen untersucht. Der nichtsteroide ent-

zündungshemmende Wirkstoff (NSAID) Flufenaminsäure (FLU; **44**) inhibierte die Bildung der Amyloid-Fibrillen in vitro (Abbildung 15).^[147] Eine Röntgenstrukturanalyse zeigte, dass zwei FLU-Moleküle an das TTR-Tetramer gebunden sind und FLU das TTR-Tetramer durch die Bildung hydro-

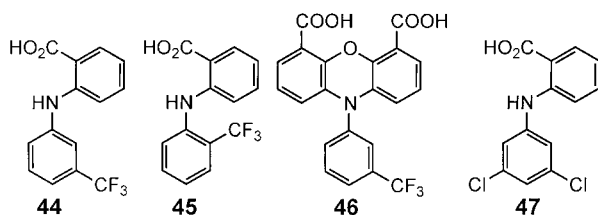


Abbildung 15. Inhibitoren der Bildung von Transthyretin-Amyloid-Fibrillen.

phober Wechselwirkungen und Wasserstoffbrücken zwischen den Untereinheiten stabilisiert. Das Durchmustern weiterer Verbindungen, von denen manche strukturell mit FLU verwandt waren, ergab, dass für die gute Stabilisierung von TTR-Tetrameren ein Molekül mit mindestens zwei aromatischen Ringen erforderlich ist, von denen einer eine acidische funktionelle Gruppe tragen muss.^[148] Mit dem langfristigen Gebrauch von FLU gehen leider unerwünschte Nebenwirkungen einher, wodurch dessen klinische Verwendung als Amyloidose-Inhibitor verhindert wird. Die Untersuchung anderer NSAIDs ergab, dass Diclofenac (Voltaren), Flurbiprofen und Resveratrol ebenfalls die Bildung von TTR-Amyloid-Fibrillen in vitro inhibieren.^[149] Detaillierte kristallographische Untersuchungen der Wechselwirkungen zwischen den Wirkstoffen und TTR sowie Molecular Modeling führten zur Entwicklung hochwirksamer Inhibitoren der TTR-Amyloid-Fibrillen-Bildung, nämlich *ortho*-Trifluormethylphenylanthranilsäure (*o*-FLU, **45**) und *N*-(*meta*-Trifluormethylphenyl)phenoxazin-4,6-dicarbonsäure (PHENOX, **46**).^[150] Die überragende Eignung von PHENOX und anderen *N*-Phenylphenoxazin-Derivaten für die Stabilisierung der TTR-Tetramere wurde durch massenspektrometrische Untersuchungen bestätigt.^[151] Weiterhin wurde gezeigt, dass das Diclofenac-Analogon **47** möglicherweise geeigneter als Diclofenac für die Behandlung der TTR-assoziierten Amyloidose ist, da **47** nicht nur ein wirksamer In-vitro-Inhibitor ist, sondern auch in stärkerem Maße als Diclofenac an TTR in menschlichem Plasma bindet.^[152] Diese Arbeiten belegen eindrucksvoll die Fähigkeit niedermolekularer organischer Liganden, die Bildung von Amyloid-Fibrillen zu beeinflussen.^[153]

4. Computergestützte Ansätze zu niedermolekularen Modulatoren von Protein-Protein-Wechselwirkungen

4.1. Strukturgestützte Entdeckung von Inhibitoren der Bcl-2/Bak-Wechselwirkung

Die Bedeutung der Wechselwirkung zwischen den antiapoptotischen Proteinen Bcl-2 oder Bcl-x_L und pro-apopto-

tischen Bcl-2-Familienmitgliedern über die BH3-Domäne wurde bereits diskutiert (siehe Abschnitt 3.1). Als Alternative zum Durchmustern diverser chemischer Bibliotheken in vitro durchsuchten zwei Forschungsgruppen Datenbanken kleiner organischer Moleküle nach Verbindungen, die wahrscheinlich an die BH3-Peptid-Bindungstasche von Bcl-2 binden. Da die Struktur von Bcl-2 in Lösung^[154] zu dem Zeitpunkt, an dem diese Arbeiten begannen, noch nicht publiziert worden war, wurde sie ausgehend von den verfügbaren Daten für das Homologe Bcl-x_L (sowohl unkomplexiert^[155] als auch im Komplex mit der BH3-Domäne von Bak^[156]) modelliert. Huang et al.^[157] durchmusterten eine virtuelle, aus 193 833 Substanzen bestehende Datenbank. Von 53 ausgewählten Verbindungen wurden 28 in einem Fluoreszenzpolarisationsassay untersucht (siehe Abschnitt 3.1). Die Diastereomerenmischung der Verbindung HA14-1 (**48**; Abbildung 16) inhibierte die Wechselwirkung zwischen Bcl-2

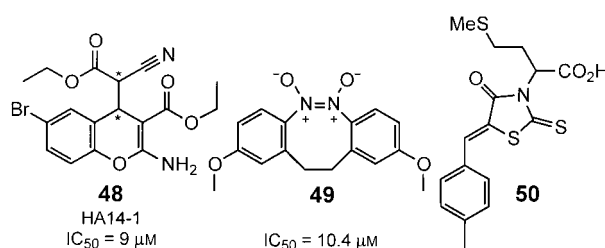


Abbildung 16. Durch virtuelles Durchmustern oder Ähnlichkeitsvergleich entdeckte Inhibitoren der Wechselwirkung zwischen Bcl-x_L und BH3-Domänen.

und dem Bak-BH3-Peptid in vitro ($IC_{50} = 9 \mu M$) und induzierte Apoptose in einer Tumorzelllinie, die Bcl-2 überexprimiert.

Auf ähnliche Weise durchmusterten die Forschungsgruppen um Wang und Yang die aus 206 876 Verbindungen bestehende dreidimensionale Datenbank des National Cancer Instituts (USA) nach Molekülen, die komplementär zu der BH3-Bindungstasche des modellierten Bcl-2-Proteins sind.^[158] Von 35 ausgewählten Molekülen inhibierten sieben Verbindungen die Bcl-2/Bak-BH3-Wechselwirkung mit IC_{50} -Werten von unter $15 \mu M$ in einem Fluoreszenzpolarisationsassay. NMR-Untersuchungen ergaben, dass die Verbindung **49** an die BH3-Bindungstasche von Bcl-x_L bindet (Abbildung 16). Im unteren mikromolaren Konzentrationsbereich inhibierte sie das Wachstum von Krebszelllinien, die Bcl-2 exprimieren, und induzierte Apoptose. Die Wirksamkeit von **49** korrelierte mit dem Maß der Expression von Bcl-2 in Krebszellen, was ein Anzeichen für einen spezifischen Effekt auf Bcl-2 ist. In einem anderen Ansatz durchsuchten Wagner et al. chemische Datenbanken nach Molekülen, die den zuvor identifizierten Bcl-x_L/Bak-BH3-Inhibitoren **15–17** ähnelten.^[159] 93 ausgewählte Moleküle wurden näher durch Molekül-Docking-Rechnungen untersucht, und **50** wurde als weiterer Bcl-x_L/Bak-BH3-Inhibitor identifiziert. Bemerkenswerterweise bestehen zwischen den hier diskutierten Inhibitoren der Wechselwirkung zwischen Bcl-2 oder Bcl-x_L und der BH3-Domäne von Bak (**15–17**, **50**, **18**, **48**, **49**) keine offen-

sichtlichen strukturellen Ähnlichkeiten. Da alle Verbindungen IC_{50} -Werte im unteren mikromolaren Konzentrationsbereich aufweisen und niedrige Molekulargewichte haben, sollten sie vielversprechende Ausgangsstrukturen für die Wirkstoffforschung sein.

4.2. Inhibitoren der CD4/MHC-Klasse-II-Wechselwirkung

Obwohl CD4⁺-T-Zellen notwendig für die Immunantwort sind, tragen sie doch zur Pathogenese einer Reihe von Krankheiten bei, z. B. zu zahlreichen Autoimmunerkrankungen,^[160] Abstoßungen allogener Organtransplantate^[161] und Transplantat-gegen-Empfänger-Reaktionen (graft-versus-host disease) nach Knochenmarkstransplantationen.^[162] Die Wechselwirkung zwischen CD4 und dem Klasse-II-Haupthistokompatibilitätskomplex (major histocompatibility complex class II; MHC class II) auf der Oberfläche antigenpräsentierender Zellen ist ein wichtiger Schritt bei der Aktivierung von CD4⁺-T-Zellen.^[163] Niedermolekulare Inhibitoren der CD4/MHC-Klasse-II-Wechselwirkung könnten daher als immunsuppressive Agentien zur Behandlung oder Vorbeugung dieser Krankheiten eingesetzt werden.

CD4 ist ein Glycoprotein, das auf der Oberfläche von Helfer-T-Zellen exprimiert wird und aus vier immunglobulinartigen extrazellulären Domänen besteht, die als D1–D4 bezeichnet werden.^[164] Der auf der Oberfläche von antigenpräsentierenden Zellen exprimierte MHC-Klasse-II-Komplex ist ein heterodimeres Glycoprotein. Antigene Peptide aus der lokalen Umgebung binden an das MHC-Klasse-II-Dimer vor ihrer Präsentation auf der Zelloberfläche, und der MHC-Klasse-II-Peptidkomplex wird vom T-Zellrezeptor erkannt. Diese Wechselwirkung wird von einer zweiten Wechselwirkung zwischen dem MHC-Klasse-II-Dimer und CD4 stabilisiert.^[165] Die Struktur des CD4/MHC-Klasse-II-Komplexes ist unklar, aber die Grenzfläche besteht wahrscheinlich aus zahlreichen Kontaktstellen, die über eine große Fläche verteilt sind.^[166] Zur Identifizierung potenzieller Bindungstaschen für kleine Moleküle innerhalb der D1-Domäne von CD4 wurden Algorithmen zur Suche nach Oberflächenliganden-Bindungsstellen eingesetzt^[167,168] und Berechnungen der lösungsmittelzugänglichen Oberfläche^[169] und Analysen der elektrostatischen Eigenschaften der CD4-Oberflächenstrukturen durchgeführt.^[170] Eine Bindungstasche in der D1-Domäne von CD4 wurde identifiziert, die mit aus Mutationsanalysen stammenden Daten übereinstimmt.^[171,166c] Interessanterweise konnte ein cyclisches Heptapeptid, das eine zu der vorgeschlagenen Bindungstasche gehörende Oberflächenschleife nachahmt, die CD4/MHC-Klasse-II-Wechselwirkung sowie CD4-vermittelte Immunantworten *in vitro* und *in vivo* inhibieren.^[172] Eine Röntgenstrukturanalyse der menschlichen CD4-D1-Domäne diente als Rezeptor für die Molekül-Docking-Rechnungen.^[173] Die Mitglieder einer aus etwa 150 000 Molekülen bestehenden virtuellen chemischen Bibliothek wurden bezüglich Formkomplementarität und Kraftfeldenergie mithilfe eines Molekül-Docking-Programms beurteilt.^[168] Die jeweils 1000 besten Verbindungen bezüglich eines der beiden Kriterien wurden anschließend nach Verbindungen mit charakte-

ristischen chemischen Strukturen und Rezeptorbindungsmodi sowie elektrostatischer und räumlicher Komplementarität durchsucht. Von den 41 Verbindungen, die schließlich in einem CD4/MHC-Klasse-II-Zelladhäsionsassay getestet wurden, inhibierten acht die Protein-Protein-Wechselwirkung (31–74 % Inhibition bei 100 μ M). Die Verbindung TJU103 (**51**; $IC_{50} \approx 90 \mu$ M) wies *in vivo* keine Toxizität gegen Lymphocyten auf und schien die CD4⁺-T-Zellen-vermittelte Immunantwort spezifisch zu inhibieren (Abbildung 17). Weiterhin bewirkte TJU103 eine signifikante Inhibition der Immunantwort in Tiermodellen für Autoimmunerkrankheiten und Organabstoßungen.^[174]

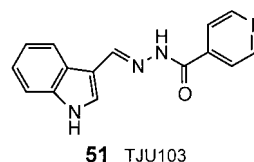


Abbildung 17. TJU103, Inhibitor der CD4/MHC-Klasse-II-Wechselwirkung.

5. Zusammenfassung und Ausblick

In diesem Aufsatz wurden drei prinzipielle Ansätze für die Identifizierung kleiner organischer Modulatoren von Protein-Protein-Wechselwirkungen vorgestellt und zahlreiche erfolgreiche Anwendungen dieser Ansätze für die Identifizierung von Modulatoren von Protein-Protein-Wechselwirkungen mit möglichem therapeutischem Nutzen für die Behandlung menschlicher Krankheiten beschrieben. Alle drei Ansätze haben zur Entdeckung mikromolarer oder sogar nanomolarer Modulatoren von Protein-Protein-Wechselwirkungen geführt. Jeder Ansatz hat seine Vorteile und Einschränkungen, und der beste Ansatz für eine gegebene Protein-Protein-Wechselwirkung hängt von der Natur der Wechselwirkung und der Verfügbarkeit struktureller Daten ab.

Die Identifizierung inhibitorischer Peptide und Peptidmimetika, die von den Dimerisierungsgrenzflächen abgeleitet sind (Abschnitt 2), erfordert, dass die jeweiligen Grenzflächen kurze, zusammenhängende Aminosäuresequenzen aufweisen, die signifikant zur Gesamtaffinität zwischen den monomeren Proteineinheiten beitragen. Dabei muss nicht notwendigerweise die gesamte Grenzfläche aus in der Primärstruktur benachbarten Aminosäuren bestehen. Wenn diese Bedingung erfüllt ist, eignet sich der Ansatz zur Identifizierung von Inhibitorpeptiden, die von der Aminosäuresequenz der Proteine abgeleitet sind und als vorläufige Leitstrukturen für nachfolgende Strukturoptimierungen dienen können. Jedoch enthalten nicht alle Protein-Protein-Grenzflächen solche kontinuierlichen Sequenzen, und in deren Abwesenheit oder mangels ausreichender Kenntnisse über die Grenzfläche lässt sich dieser Ansatz nicht anwenden. Weiterhin müssen die mit der allgemein niedrigen metabolischen Stabilität und der geringen Bioverfügbarkeit von Peptiden zusammenhängenden Probleme gelöst werden.^[175]

Der zweite hier vorgestellte Ansatz, das Durchmustern kombinatorischer chemischer Bibliotheken nach Modulator-

ren von Protein-Protein-Wechselwirkungen (Abschnitt 3), ist vermutlich für die Wirkstoffforschung relevanter, weil auch nichtpeptidische Verbindungen gefunden werden können. Der Ansatz erfordert keine Vorkenntnisse über die Struktur der Dimerisierungsgrenzfläche, obwohl diese Information für die Entwicklung von leicht an das Hochdurchsatzformat anzupassenden Assays nützlich sein kann. Der Nachteil dieses Ansatzes liegt in der großen Zahl der zu prüfenden Verbindungen, wodurch das Durchmustern möglicherweise teuer wird. Bemerkenswerterweise verwendete die Mehrheit der Forschungsgruppen ungerichtete Bibliotheken für das primäre Screening, obwohl in den meisten Fällen Strukturdaten über die in Abschnitt 3 diskutierten Protein-Protein-Wechselwirkungen vorlagen. Dies beruht vermutlich darauf, dass sich die Verwendung solcher Strukturinformationen zur Voraussage der chemischen Substanzklassen, die möglicherweise zur Modulation der jeweiligen Protein-Protein-Wechselwirkung geeignet sind, schwierig gestaltet. Die Wahl der gerichteten chemischen Bibliothek, die für die Suche nach iNOS-Inhibitoren verwendet wurde (Abschnitt 3.6), orientierte sich nicht an Strukturdaten, sondern an bereits bekannten Inhibitoren. Dass die gefundenen Inhibitoren über die Inhibierung der Assoziation der Enzymuntereinheiten wirkten, war eine Überraschung. Nur in zwei der im Abschnitt 3 vorgestellten Beispiele gründete sich die Auswahl der Testsubstanzen unmittelbar auf Strukturinformationen über die jeweilige Protein-Protein-Grenzfläche. Bei der Suche nach Agonisten der Wechselwirkung zwischen dem mutierten menschlichen Wachstumshormon und seinem mutierten Rezeptor (Abschnitt 3.8) wurden die zu durchmusternden Verbindungen so ausgewählt, dass sie den aus der Mutation des Rezeptors resultierenden Verlust einer funktionellen Gruppe potenziell kompensieren konnten. In den auf die Identifizierung von Stabilisatoren des Transthyretin-Tetramers zielenden Arbeiten (Abschnitt 3.9) wurden lediglich Verbindungen untersucht, die möglicherweise in die bekannte Bindungsstelle der Tetramere passen konnten. In den beiden zuletzt genannten Untersuchungen konnten aktive Verbindungen aus kleineren Bibliotheken identifiziert werden. Dies zeigt die Nützlichkeit von Strukturinformationen für die Identifizierung organischer Modulatoren von Protein-Protein-Wechselwirkungen.

Virtuelles Durchmustern chemischer Datenbanken (Abschnitt 4) kann zur Vorselektion von Molekülen genutzt werden, die mit erhöhter Wahrscheinlichkeit an einen Hot-Spot einer Protein-Protein-Wechselwirkung binden und diese dadurch modulieren. In den beiden in Abschnitt 4 beschriebenen Beispielen hatten ungefähr 20% der *in silico* ausgewählten Verbindungen akzeptable biologische Aktivität *in vitro*. Die Tatsache, dass diese Erfolgsquote wesentlich über der beim Durchmustern ungerichteter Bibliotheken (Abschnitt 3) erzielten Quote liegt, zeigt, dass das virtuelle Screening chemischer Datenbanken, soweit möglich, eine wertvolle Hilfe ist. Diese Methode spart möglicherweise viel Zeit und Kosten, da nur solche Verbindungen synthetisiert oder erworben und im Labor getestet werden müssen, die mit hoher Wahrscheinlichkeit die jeweilige Protein-Protein-Wechselwirkung beeinflussen. Leider erfordert dieser Ansatz detaillierte Strukturdaten über die Protein-Protein-

Grenzfläche aus NMR- oder Kristallstrukturanalysen, die oft nicht verfügbar sind. Weiterhin werden proteinstrukturgestützte Voraussagen über chemischen Substanzklassen, die für die Modulation einer ausgewählten Wechselwirkung geeignet sein könnten, durch die Plastizität der Protein-Protein-Grenzflächen erschwert.^[176]

Die Tatsache, dass einige der in diesem Aufsatz beschriebenen niedermolekularen Modulatoren von Protein-Protein-Wechselwirkungen spezifische Effekte in Zellkultur und in Tiermodellen erzielen, ist ein weiterer Beleg dafür, dass früher gehegte Einwände gegen die Machbarkeit der Modulation von Protein-Protein-Wechselwirkungen mit niedermolekularen organischen Molekülen überdacht werden sollten. Kleine organische Inhibitoren von Protein-Protein-Wechselwirkungen müssen nicht unbedingt an die Protein-Protein-Grenzfläche, sondern können auch an allosterische Zentren der Proteine binden und dadurch eine konformative Änderung bewirken, die die Protein-Protein-Wechselwirkung erschwert. Dies wurde anhand der Inhibierung der LFA-1/ICAM-1-Wechselwirkung (Abschnitt 3.5) und der iNOS-Dimerisierung (Abschnitt 3.6) demonstriert. Dieser Wirkmechanismus umgeht Probleme, die mit der Beeinflussung großer Protein-Protein-Grenzflächen ohne Bindungsstellen für kleine organische Moleküle einhergehen.

Die systematische Identifizierung niedermolekularer Substanzklassen, die an spezielle Proteindomänen binden, wäre ein großer Durchbruch auf dem Forschungsgebiet. Dies würde es ermöglichen, Bibliotheken von domänenspezifischen Verbindungen für das Durchmustern nach Modulatoren ausgewählter Protein-Protein-Wechselwirkungen zu verwenden, vorausgesetzt, die jeweiligen Proteindomänen tragen signifikant zu der gesamten Freien Energie der Bindung zwischen den Proteinen bei. Zu den möglichen diesbezüglichen Ansätzen zählt die kovalente Knüpfung kleiner Liganden an vorbestimmte Stellen im Protein (Tethering), durch das auch schwach proteinbindende Liganden identifiziert werden können.^[177] Die Affinität der schwach an benachbarte Proteinstellen bindenden Moleküle könnte durch deren kovalente Verknüpfung vergrößert werden,^[178] entsprechend dem systematischen NMR-gestützten Ligandendesign (SAR-by-NMR).^[179] Da viele Naturstoffe von der Evolution zur Bindung an bestimmte Proteine optimiert worden sind, sind die Identifizierung ihrer Protein-Bindungsstellen sowie die Synthese und das Durchmustern von Bibliotheken solcher proteinbindender Naturstoffe weitere vielversprechende Ansätze zum besseren Verständnis der Wechselwirkung niedermolekularer organischer Moleküle mit Proteinen. Daraus könnte sich ein rationalerer Ansatz für das Auffinden von Modulatoren von Protein-Protein-Wechselwirkungen in der Zukunft ergeben.^[180]

Neben den eben erwähnten Ansätzen wird der wissenschaftliche Fortschritt auf diesem Gebiet von Fortschritten mehrerer wissenschaftlicher Disziplinen getragen werden. So werden neuartige Methoden zur Analyse von Protein-Protein-Wechselwirkungen und ein verbessertes Verständnis ihrer Relevanz für menschliche Krankheiten zum Auffinden neuartiger therapeutischer Ziele beitragen. Hochaufgelöste NMR-Spektren oder Strukturen von Proteinen und Protein-komplexen im Kristall werden das virtuelle Durchmustern

chemischer Datenbanken nach niedermolekularen Modulatoren für viele Protein-Protein-Wechselwirkungen ermöglichen und die Optimierung von Leitstrukturen erleichtern. Weitere Fortschritte im Bereich der Assayentwicklung und verbesserte Screeningmethoden werden einen noch höheren Durchsatz beim Durchmustern chemischer Bibliotheken gestatten. Schließlich kann die Bedeutung der präparativen organischen Chemie nicht genug betont werden, da die Synthese der für das primäre Screening verwendeten chemischen Bibliotheken und die Optimierung der Leitstrukturen von Organikern durchgeführt werden. Die besondere Bedeutung der stereoselektiven Synthese für die Modulation von Protein-Protein-Wechselwirkungen mit niedermolekularen Verbindungen zeigt sich an jenen Molekülen, deren biologische Aktivität ausdrücklich von der korrekten Stereochemie abhängt (z.B. **25** und **31**). Gemeinsame Forschungsprojekte innerhalb der oben genannten Disziplinen werden sehr wahrscheinlich neue Ansätze zur Identifizierung von Wirkstoffkandidaten gegen bislang unerkannte oder unbekannte Krankheits-Targets hervorbringen.

Mein ganz besonderer Dank gilt Professor Axel Ullrich für seine großzügige Unterstützung meiner Forschungsarbeiten. Bei Dr. Ulrich Kruse, Dr. Oliver Brümmer, Dr. Joel Goldberg, Dr. Torsten Kessler und ganz besonders bei MSc Angela Hollis möchte ich mich sehr herzlich für die konstruktive Kritik am Aufsatzmanuskript bedanken. Die Abbildung des durch zwei Flufenaminsäuremoleküle stabilisierten Transthyretin-Tetramers im Vortitel wurde mit freundlicher Genehmigung aus Lit. [147] übernommen (Copyright 2002, The National Academy of Sciences, USA).

Eingegangen am 23. September 2002 [A558]

- [1] a) A.-C. Gavin, M. Bösch, R. Krause, P. Grandi, M. Marzioch, A. Bauer, J. Schultz, J. M. Rick, A.-M. Michon, C.-M. Cruciat, M. Remor, C. Höfert, M. Schelder, M. Brajenovic, H. Ruffner, A. Merino, K. Klein, M. Hudak, D. Dickson, T. Rudi, V. Gnau, A. Bauch, S. Bastuck, B. Huhse, C. Leutwein, M.-A. Heurtier, R. R. Copley, A. Edelmann, E. Querfurth, V. Rybin, G. Drewes, M. Raida, T. Bouwmeester, P. Bork, B. Seraphin, B. Kuster, G. Neubauer, G. Superti-Furga, *Nature* **2002**, *415*, 141–147; b) Y. Ho, A. Gruhler, A. Heilbut, G. D. Bader, L. Moore, S.-L. Adams, A. Millar, P. Taylor, K. Bennett, K. Boutilier, L. Yang, C. Wolting, I. Donaldson, S. Schandorff, J. Shewnarane, M. Vo, J. Taggart, M. Goudreaux, B. Musk, C. Alfarano, D. Dewar, Z. Lin, K. Michalickova, A. R. Willems, H. Sassi, P. A. Nielsen, K. J. Rasmussen, J. R. Andersen, L. E. Johansen, L. H. Hansen, H. Jespersen, A. Podtelejnikov, E. Nielsen, J. Crawford, V. Poulsen, B. D. Sørensen, J. Matthiesen, R. C. Hendrickson, F. Gleeson, T. Pawson, M. F. Moran, D. Durocher, M. Mann, C. W. V. Hogue, D. Figeys, M. Tyers, *Nature* **2002**, *415*, 180–183.
- [2] E. K. Rowinsky, *Semin. Oncol.* **1997**, *24*, S19–S19–12.
- [3] D. Guénard, F. Guéritte-Vogelein, P. Potier, *Acc. Chem. Res.* **1993**, *26*, 160–167.
- [4] a) S. J. Stachel, K. Biswas, S. J. Danishefsky, *Curr. Pharm. Des.* **2001**, *7*, 1277–1290; b) M. Kavallaris, N. M. Verrills, B. T. Hill, *Drug Resist. Updates* **2001**, *4*, 392–401.
- [5] a) S. L. Mooberry, G. Tien, A. H. Hernandez, A. Plubrukarn, B. S. Davidson, *Cancer Res.* **1999**, *59*, 653–660; b) A. K. Ghosh, Y. Wang, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 11027–11028; c) I. Paterson, C. De Savi, M. Tudge, *Org. Lett.* **2001**, *3*, 3149–3152; d) J. Mulzer, E. Öhler, *Angew. Chem.* **2001**, *113*, 3961–3964; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 3842–3846.
- [6] a) D. M. Bollag, P. A. McQueney, J. Zhu, O. Hensens, L. Koupal, J. Liesch, M. Goetz, E. Lazarides, C. M. Woods, *Cancer Res.* **1995**, *55*, 2325–2333; b) K. C. Nicolaou, N. Winsinger, J. Pastor, S. Ninkovic, F. Sarabia, Y. He, D. Vourloumis, Z. Yang, T. Li, P. Giannakakou, E. Hamel, *Nature* **1997**, *387*, 268–272.
- [7] T. Lindel, P. R. Jensen, W. Fenical, B. H. Long, A. M. Casazza, J. Carboni, C. R. Fairchild, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 8744–8745.
- [8] a) E. ter Haar, R. J. Kowalski, E. Hamel, C. M. Lin, R. E. Longley, S. P. Gunasekera, H. S. Rosenkranz, B. W. Day, *Biochemistry* **1996**, *35*, 243–250; b) D. T. Hung, J. Chen, S. L. Schreiber, *Chem. Biol.* **1996**, *3*, 287–293.
- [9] H. M. McDaid, S. Mani, H. J. Shen, F. Muggia, D. Sonnichsen, S. B. Horwitz, *Clin. Cancer Res.* **2002**, *8*, 2035–2043.
- [10] E. Härrä, W. Loeffler, H. P. Sigg, H. Stähelin, C. Tamm, *Helv. Chim. Acta* **1963**, *46*, 1235–1243.
- [11] A. Peyroche, B. Antonny, S. Robineau, J. Acker, J. Cherfils, C. L. Jackson, *Mol. Cell* **1999**, *3*, 275–285.
- [12] D. M. Spencer, T. J. Wandless, S. L. Schreiber, G. R. Crabtree, *Science* **1993**, *262*, 1019–1024.
- [13] P. J. Belshaw, S. N. Ho, G. R. Crabtree, S. L. Schreiber, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1996**, *93*, 4604–4607.
- [14] P. J. Belshaw, D. M. Spencer, G. R. Crabtree, S. L. Schreiber, *Chem. Biol.* **1996**, *3*, 731–738.
- [15] a) D. M. Spencer, P. J. Belshaw, L. Chen, S. N. Ho, F. Randazzo, G. R. Crabtree, S. L. Schreiber, *Curr. Biol.* **1996**, *6*, 839–847; b) B. R. Stockwell, S. L. Schreiber, *Curr. Biol.* **1998**, *8*, 761–770.
- [16] a) V. M. Rivera, T. Clackson, S. Natesan, R. Pollock, J. F. Amara, T. Keenan, S. R. Magari, T. Phillips, N. L. Courage, F. Cerasoli, Jr., D. A. Holt, M. Gilman, *Nat. Med.* **1996**, *2*, 1028–1032; b) S. N. Ho, S. R. Biggar, D. M. Spencer, S. L. Schreiber, G. R. Crabtree, *Nature* **1996**, *382*, 822–826.
- [17] a) P. J. Belshaw, S. N. Ho, G. R. Crabtree, S. L. Schreiber, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1996**, *93*, 4604–4607; b) S. J. Kopytek, R. F. Standaert, J. C. Dyer, J. C. Hu, *Chem. Biol.* **2000**, *7*, 313–321; c) M. A. Farrar, J. Alberola-Ila, R. M. Perlmutter, *Nature* **1996**, *383*, 178–181; d) C. T. Rollins, V. M. Rivera, D. N. Woolfson, T. Keenan, M. Hatada, S. E. Adams, L. J. Andrade, D. Yaeger, M. R. van Schravendijk, D. A. Holt, M. Gilman, T. Clackson, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2000**, *97*, 7096–7101; e) J. F. Amara, T. Clackson, V. M. Rivera, T. Guo, T. Keenan, S. Natesan, R. Pollock, W. Yang, N. L. Courage, D. A. Holt, M. Gilman, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1997**, *94*, 10618–10623.
- [18] a) M. A. Dechantsreiter, E. Planker, B. Mathä, E. Lohof, G. Hölzemann, A. Jonczyk, S. L. Goodman, H. Kessler, *J. Med. Chem.* **1999**, *42*, 3033–3040; b) T. Taga, A. Suzuki, I. Gonzalez-Gomez, F. H. Gilles, M. Stins, H. Shimada, L. Barsky, K. I. Weinberg, W. E. Laug, *Int. J. Cancer* **2002**, *98*, 690–697.
- [19] a) G. Proimos, *J. Thromb. Thrombolysis* **2001**, *11*, 99–110; b) J. C. O'Shea, J. E. Tcheng, *Expert Opin. Pharmacother.* **2002**, *3*, 1199–1210.
- [20] L. Lo Conte, C. Chothia, J. Janin, *J. Mol. Biol.* **1999**, *285*, 2177–2198.
- [21] T. Clackson, J. A. Wells, *Science* **1995**, *267*, 383–386.
- [22] A. A. Bogan, K. S. Thorn, *J. Mol. Biol.* **1998**, *280*, 1–9.
- [23] a) S. Jones, J. M. Thornton, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1996**, *93*, 13–20; b) R. Preißner, A. Goede, C. Frömmel, *J. Mol. Biol.* **1998**, *280*, 535–550.
- [24] a) P. L. Toogood, *J. Med. Chem.* **2002**, *45*, 1543–1558; b) D. A. Ockey, T. R. Gadek, *Expert Opin. Ther. Pat.* **2002**, *12*, 393–400; c) A. G. Cochran, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2001**, *5*, 654–659; d) A. G. Cochran, *Chem. Biol.* **2000**, *7*, R85–R94; e) R. Zutshi,

- M. Brickner, J. Chmielewski, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **1998**, *2*, 62–66.
- [25] J. F. Smothers, S. Henikoff, P. Carter, *Science* **2002**, *298*, 621–622.
- [26] a) S. M. Violette, W. C. Shakespeare, C. Bartlett, W. Guan, J. A. Smith, R. J. Rickles, R. S. Bohacek, D. A. Holt, R. Baron, T. K. Sawyer, *Chem. Biol.* **2000**, *7*, 225–235; b) B. Gay, S. Suarez, G. Caravatti, P. Furet, T. Meyer, J. Schoepfer, *Int. J. Cancer* **1999**, *83*, 235–241; c) C. García-Echeverría, *Curr. Med. Chem.* **2001**, *8*, 1589–1604.
- [27] a) S. V. Sharma, C. Oneyama, Y. Yamashita, H. Nakano, K. Sugawara, M. Hamada, N. Kosaka, T. Tamaoki, *Oncogene* **2001**, *20*, 2068–2079; b) C. Oneyama, H. Nakano, S. V. Sharma, *Oncogene* **2002**, *21*, 2037–2050.
- [28] S. L. Goodman, G. Hölzemann, G. A. G. Sulyok, H. Kessler, *J. Med. Chem.* **2002**, *45*, 1045–1051, zit. Lit.
- [29] a) N. E. Kohl, E. A. Emini, W. A. Schleif, L. J. Davis, J. C. Heimbach, R. A. Dixon, E. M. Scolnick, I. S. Sigal, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1988**, *85*, 4686–4690; b) S. Seelmeier, H. Schmidt, V. Turk, K. von der Helm, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1988**, *85*, 6612–6616.
- [30] D. R. Kaul, S. K. Cinti, P. L. Carver, P. H. Kazanjian, *Pharmacotherapy* **1999**, *19*, 281–298.
- [31] S. G. Deeks, M. Smith, M. Holodniy, J. O. Kahn, *JAMA J. Am. Med. Assoc.* **1997**, *277*, 145–153.
- [32] a) M. A. Navia, P. M. D. Fitzgerald, B. M. McKeever, C.-T. Leu, J. C. Heimbach, W. K. Herber, I. S. Sigal, P. L. Darke, J. P. Springer, *Nature* **1989**, *337*, 615–620; b) M. Miller, J. Schneider, B. K. Sathyanarayana, M. V. Toth, G. R. Marshall, L. Clawson, L. Selk, S. B. H. Kent, A. Wlodawer, *Science* **1989**, *246*, 1149–1152.
- [33] A. Gustchina, I. T. Weber, *Proteins Struct. Funct. Genet.* **1991**, *10*, 325–339.
- [34] M. J. Todd, N. Semo, E. Freire, *J. Mol. Biol.* **1998**, *283*, 475–488.
- [35] Z.-Y. Zhang, R. A. Poorman, L. L. Maggiora, R. L. Heinrikson, F. J. Kézdy, *J. Biol. Chem.* **1991**, *266*, 15591–15594.
- [36] R. Zutshi, J. Franciskovich, M. Shultz, B. Schweitzer, P. Bishop, M. Wilson, J. Chmielewski, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 4841–4845.
- [37] M. D. Shultz, J. Chmielewski, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1999**, *9*, 2431–2436.
- [38] M. D. Shultz, M. J. Bowman, Y.-W. Ham, X. Zhao, G. Tora, J. Chmielewski, *Angew. Chem.* **2000**, *112*, 2822–2825; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000**, *39*, 2710–2713.
- [39] A. Bouras, N. Boggetto, Z. Benatalah, E. de Rosny, S. Sicsic, M. Reboud-Ravaux, *J. Med. Chem.* **1999**, *42*, 957–962.
- [40] M. Song, S. Rajesh, Y. Hayashi, Y. Kiso, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2001**, *11*, 2465–2468.
- [41] L. G. Ulysse, J. Chmielewski, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1998**, *8*, 3281–3286.
- [42] a) H. J. Schramm, A. Billich, E. Jaeger, K.-P. Rücknagel, G. Arnold, W. Schramm, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1993**, *194*, 595–600; b) H. J. Schramm, J. Boetzel, J. Büttner, E. Fritsche, W. Göhring, E. Jaeger, S. König, O. Thumfart, T. Wenger, N. E. Nagel, W. Schramm, *Antiviral Res.* **1996**, *30*, 155–170.
- [43] H. J. Schramm, E. de Rosny, M. Reboud-Ravaux, J. Büttner, A. Dick, W. Schramm, *Biol. Chem.* **1999**, *380*, 593–596.
- [44] B. C. M. Potts, D. J. Faulkner, J. A. Chan, G. C. Simolike, P. Offen, M. E. Hemling, T. A. Francis, *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 6321–6322.
- [45] X. Fan, G. R. Flentke, D. H. Rich, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 8893–8894.
- [46] R. J. Whitley in *Fields Virology* (Hrsg.: B. N. Fields, D. M. Knipe, P. M. Howley), Lippincott-Raven, Philadelphia, **1996**, S. 2297–2342.
- [47] J. E. Reardon, T. Spector, *Adv. Pharmacol.* **1991**, *22*, 1–27.
- [48] P. Reichard, *Annu. Rev. Biochem.* **1988**, *57*, 349–374.
- [49] a) J. G. Jacobson, D. A. Leib, D. J. Goldstein, C. L. Bogard, P. A. Schaffer, S. K. Weller, D. M. Coen, *Virology* **1989**, *173*, 276–283; b) J. M. Cameron, I. McDougall, H. S. Marsden, V. G. Preston, D. M. Ryan, J. H. Subak-Sharpe, *J. Gen. Virol.* **1988**, *69*, 2607–2612; c) C. R. Brandt, R. L. Kintner, A. M. Pumfery, R. J. Visalli, D. R. Grau, *J. Gen. Virol.* **1991**, *72*, 2043–2049; d) Y. Yamada, H. Kimura, T. Morishima, T. Daikoku, K. Maeno, Y. Nishiyama, *J. Infect. Dis.* **1991**, *164*, 1091–1097; e) A. D. Idowu, E. B. Fraser-Smith, K. L. Poffenberger, R. C. Herman, *Antiviral Res.* **1992**, *17*, 145–156.
- [50] A. J. Darling, E. M. McKay, R. Ingemarson, V. G. Preston, *Virus Genes* **1989**, *2*, 187–194.
- [51] D. Filatov, R. Ingemarson, A. Gräslund, L. Thelander, *J. Biol. Chem.* **1992**, *267*, 15816–15822.
- [52] a) R. L. Krogsrud, E. Welchner, E. Scouten, M. Liuzzi, *Anal. Biochem.* **1993**, *213*, 386–394; b) N. Moss, R. Déziel, J. Adams, N. Aubry, M. Bailey, M. Baillet, P. Beaulieu, J. DiMaio, J.-S. Duceppe, J.-M. Ferland, J. Gauthier, E. Ghio, S. Goulet, L. Grenier, P. Lavallée, C. Lépine-Frenette, R. Plante, S. Rakhit, F. Soucy, D. Wernic, Y. Guindon, *J. Med. Chem.* **1993**, *36*, 3005–3009.
- [53] a) M. Liuzzi, R. Déziel, N. Moss, P. Beaulieu, A.-M. Bonneau, C. Bousquet, J. G. Chafouleas, M. Garneau, J. Jaramillo, R. L. Krogsrud, L. Lagacé, R. S. McCollum, S. Nawoot, Y. Guindon, *Nature* **1994**, *372*, 695–698; b) N. Moss, P. Beaulieu, J.-S. Duceppe, J.-M. Ferland, J. Gauthier, E. Ghio, S. Goulet, L. Grenier, M. Llinas-Brunet, R. Plante, D. Wernic, R. Déziel, *J. Med. Chem.* **1995**, *38*, 3617–3623.
- [54] N. Moss, P. Beaulieu, J.-S. Duceppe, J.-M. Ferland, M. Garneau, J. Gauthier, E. Ghio, S. Goulet, I. Guse, J. Jaramillo, M. Llinas-Brunet, E. Malenfant, R. Plante, M. Poirier, F. Soucy, D. Wernic, C. Yoakim, R. Déziel, *J. Med. Chem.* **1996**, *39*, 4173–4180.
- [55] M. S. Greenblatt, W. P. Bennett, M. Hollstein, C. C. Harris, *Cancer Res.* **1994**, *54*, 4855–4878.
- [56] M. Scheffner, B. A. Werness, J. M. Huibregtse, A. J. Levine, P. M. Howley, *Cell* **1990**, *63*, 1129–1136.
- [57] D. Schwartz, V. Rotter, *Semin. Cancer Biol.* **1998**, *8*, 325–336.
- [58] Y. Shen, E. White, *Adv. Cancer Res.* **2001**, *82*, 55–84.
- [59] N. D. Lakin, S. P. Jackson, *Oncogene* **1999**, *18*, 7644–7655.
- [60] J. D. Oliner, K. W. Kinzler, P. S. Meltzer, D. L. George, B. Vogelstein, *Nature* **1992**, *358*, 80–83.
- [61] D. A. Freedman, A. J. Levine, *Cancer Res.* **1999**, *59*, 1–7.
- [62] P. H. Kussie, S. Gorina, V. Marechal, B. Elenbaas, J. Moreau, A. J. Levine, N. P. Pavletich, *Science* **1996**, *274*, 948–953.
- [63] a) V. Böttger, A. Böttger, S. F. Howard, S. M. Picksley, P. Chène, C. García-Echeverría, H.-K. Hochkeppel, D. P. Lane, *Oncogene* **1996**, *13*, 2141–2147; b) A. Böttger, V. Böttger, C. García-Echeverría, P. Chène, H.-K. Hochkeppel, W. Sampson, K. Ang, S. F. Howard, S. M. Picksley, D. P. Lane, *J. Mol. Biol.* **1997**, *269*, 744–756.
- [64] a) P. Chène, J. Fuchs, J. Bohn, C. García-Echeverría, P. Furet, D. Fabbro, *J. Mol. Biol.* **2000**, *299*, 245–253; b) C. García-Echeverría, P. Chène, M. J. J. Blommers, P. Furet, *J. Med. Chem.* **2000**, *43*, 3205–3208.
- [65] C. García-Echeverría, P. Furet, P. Chène, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2001**, *11*, 2161–2164.
- [66] S. J. Duncan, S. Grüşchow, D. H. Williams, C. McNicholas, R. Purewal, M. Hajek, M. Gerlitz, S. Martin, S. K. Wrigley, M. Moore, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 554–560.
- [67] R. Stoll, C. Renner, S. Hansen, S. Palme, C. Klein, A. Belling, W. Zeslawski, M. Kamionka, T. Rehm, P. Mühlhahn, R. Schumacher, F. Hesse, B. Kaluza, W. Voelter, R. A. Engh, T. A. Holak, *Biochemistry* **2001**, *40*, 336–344.
- [68] M. M. Gottesman, *Annu. Rev. Med.* **2002**, *53*, 615–627.

- [69] a) S. W. Lowe, A. W. Lin, *Carcinogenesis* **2000**, *21*, 485–495; b) R. W. Johnstone, A. A. Ruefli, S. W. Lowe, *Cell* **2002**, *108*, 153–164.
- [70] Y. Gutierrez-Puente, P. Zapata-Benavides, A. M. Tari, G. Lopez-Berestein, *Semin. Oncol.* **2002**, *29*, Suppl. 11, 71–76.
- [71] R. J. Klasa, A. M. Gillum, R. E. Klem, S. R. Frankel, *Antisense Nucleic Acid Drug Dev.* **2002**, *12*, 193–213.
- [72] A. Degterev, A. Lugovskoy, M. Cardone, B. Mulley, G. Wagner, T. Mitchison, J. Yuan, *Nat. Cell Biol.* **2001**, *3*, 173–182.
- [73] J. C. Owicki, *J. Biomol. Screening* **2000**, *5*, 297–306.
- [74] S.-P. Tzung, K. M. Kim, G. Basañez, C. D. Giedt, J. Simon, J. Zimmerberg, K. Y. J. Zhang, D. M. Hockenbery, *Nat. Cell Biol.* **2001**, *3*, 183–191.
- [75] a) M. Henriksson, B. Lüscher, *Adv. Cancer Res.* **1996**, *68*, 109–182; b) C. V. Dang, *Mol. Cell. Biol.* **1999**, *19*, 1–11.
- [76] a) A. Gerbitz, J. Mautner, C. Geltinger, K. Hörtnagel, B. Christoph, H. Asenbauer, G. Klobeck, A. Polack, G. W. Bornkamm, *Oncogene* **1999**, *18*, 1745–1753; b) R. Dalla-Favera, M. Bregni, J. Erikson, D. Patterson, R. C. Gallo, C. M. Croce, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1982**, *79*, 7824–7827.
- [77] C. D. Little, M. M. Nau, D. N. Carney, A. F. Gazdar, J. D. Minna, *Nature* **1983**, *306*, 194–196.
- [78] D. J. Liao, R. B. Dickson, *Endocr.-Relat. Cancer* **2000**, *7*, 143–164.
- [79] M. D. Erisman, P. G. Rothberg, R. E. Diehl, C. C. Morse, J. M. Spandorfer, S. M. Astrin, *Mol. Cell. Biol.* **1985**, *5*, 1969–1976.
- [80] D. W. Felsher, J. M. Bishop, *Mol. Cell* **1999**, *4*, 199–207.
- [81] S. Pelengaris, T. Littlewood, M. Khan, G. Elia, G. Evan, *Mol. Cell* **1999**, *3*, 565–577.
- [82] B. Amati, M. W. Brooks, N. Levy, T. D. Littlewood, G. I. Evan, H. Land, *Cell* **1993**, *72*, 233–245.
- [83] A. R. Ferré-D'Amaré, G. C. Prendergast, E. B. Ziff, S. K. Burley, *Nature* **1993**, *363*, 38–45.
- [84] P. Lavigne, M. P. Crump, S. M. Gagné, R. S. Hodges, C. M. Kay, B. D. Sykes, *J. Mol. Biol.* **1998**, *281*, 165–181.
- [85] T. Förster, *Ann. Phys.* **1948**, *2*, 55–75.
- [86] T. Berg, S. B. Cohen, J. Desharnais, C. Sonderegger, D. J. Maslyar, J. Goldberg, D. L. Boger, P. K. Vogt, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2002**, *99*, 3830–3835.
- [87] D. L. Boger, J. K. Lee, J. Goldberg, Q. Jin, *J. Org. Chem.* **2000**, *65*, 1467–1474.
- [88] a) A. Menssen, H. Hermeking, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2002**, *99*, 6274–6279; b) H. A. Collier, C. Grandori, P. Tamayo, T. Colbert, E. S. Lander, R. N. Eisenman, T. R. Golub, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2000**, *97*, 3260–3265; c) C. Grandori, R. N. Eisenman, *Trends Biochem. Sci.* **1997**, *22*, 177–181.
- [89] W. Risau, *Nature* **1997**, *386*, 671–674.
- [90] Extrazelluläre Matrix: komplexes Netz aus Polysacchariden und Proteinen, die von Zellen abgesondert wurden; dient als Strukturelement in Geweben. Basallamina: dünne Matte extrazellulärer Matrix, die Epithelzellen und andere Zellarten vom Bindegewebe trennt.
- [91] I. E. Collier, S. M. Wilhelm, A. Z. Eisen, B. L. Marmer, G. A. Grant, J. L. Seltzer, A. Kronberger, C. He, E. A. Bauer, G. I. Goldberg, *J. Biol. Chem.* **1988**, *263*, 6579–6587.
- [92] a) S. Wojtowicz-Praga, J. Torri, M. Johnson, V. Steen, J. Marshall, E. Ness, R. Dickson, M. Sale, H. S. Rasmussen, T. A. Chiodo, M. J. Hawkins, *J. Clin. Oncol.* **1998**, *16*, 2150–2156; b) A. H. Drummond, P. Beckett, P. D. Brown, E. A. Bone, A. H. Davidson, W. A. Galloway, A. J. H. Gearing, P. Huxley, D. Laber, M. McCourt, M. Whittaker, L. M. Wood, A. Wright, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1999**, *878*, 228–235.
- [93] P. C. Brooks, S. Strömblad, L. C. Sanders, T. L. von Schalscha, R. T. Aimes, W. G. Stetler-Stevenson, J. P. Quigley, D. A. Cheresh, *Cell* **1996**, *85*, 683–693.
- [94] a) P. C. Brooks, S. Silletti, T. L. von Schalscha, M. Friedlander, D. A. Cheresh, *Cell* **1998**, *92*, 391–400; b) A. Pfeifer, T. Kessler, S. Siletti, D. A. Cheresh, I. M. Verma, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2000**, *97*, 12227–12232.
- [95] a) D. L. Boger, J. Goldberg, S. Silletti, T. Kessler, D. A. Cheresh, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 1280–1288; b) S. Silletti, T. Kessler, J. Goldberg, D. L. Boger, D. A. Cheresh, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2001**, *98*, 119–124.
- [96] a) D. L. Boger, P. Ducray, W. Chai, W. Jiang, J. Goldberg, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1998**, *8*, 2339–2344; b) D. L. Boger, J. Goldberg, W. Jiang, W. Chai, P. Ducray, J. K. Lee, R. S. Ozer, C.-M. Andersson, *Bioorg. Med. Chem.* **1998**, *6*, 1347–1378.
- [97] G. Kollias, E. Douni, G. Kassiotis, D. Kontoyiannis, *Immunol. Rev.* **1999**, *169*, 175–194.
- [98] V. Baud, M. Karin, *Trends Cell Biol.* **2001**, *11*, 372–377.
- [99] B. A. Beutler, *J. Rheumatol.* **1999**, *26*, Suppl. 57, 16–21.
- [100] L. W. Moreland, *J. Rheumatol.* **1999**, *26*, Suppl. 57, 7–15.
- [101] P. H. Carter, P. A. Scherle, J. K. Muckelbauer, M. E. Voss, R.-Q. Liu, R. L. A. Thompson, A. J. Tebben, K. A. Solomon, Y. C. Lo, Z. Li, P. Strzemiński, G. Yang, N. Falahatpisheh, M. Xu, Z. Wu, N. A. Farrow, K. Ramnarayan, J. Wang, D. Rideout, V. Yalamoori, P. Domaille, D. J. Underwood, J. M. Trzaskos, S. M. Friedman, R. C. Newton, C. P. Decicco, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2001**, *98*, 11879–11884.
- [102] A. van de Stolpe, P. T. van der Saag, *J. Mol. Med.* **1996**, *74*, 13–33.
- [103] R. O. Hynes, *Cell* **1992**, *69*, 11–25.
- [104] C. G. Gahmberg, *Curr. Opin. Cell Biol.* **1997**, *9*, 643–659.
- [105] G. A. van Seventer, Y. Shimizu, K. J. Horgan, S. Shaw, *J. Immunol.* **1990**, *144*, 4579–4586.
- [106] R. S. Cotran, T. Mayadas-Norton, *Pathol. Biol.* **1998**, *46*, 164–170.
- [107] E. K. Nakakura, R. A. Shorthouse, B. Zheng, S. M. McCabe, P. M. Jardieu, R. E. Morris, *Transplantation* **1996**, *62*, 547–552.
- [108] a) C. J. Cornejo, R. K. Winn, J. M. Harlan, *Adv. Pharmacol.* **1997**, *39*, 99–142; b) A. Fischer, W. Friedrich, A. Fasth, S. Blanche, F. Le Deist, D. Girault, F. Veber, J. Vossen, M. Lopez, C. Griscelli, M. Hirn, *Blood* **1991**, *77*, 249–256; c) M. Hourmant, B. Le Mauff, Y. Le Meur, J. Dantal, D. Cantarovich, M. Giral, P. Caudrelier, G. Albericci, J.-P. Soullillou, *Transplantation* **1994**, *58*, 377–380.
- [109] Y. Takada, T. Kamata, A. Irie, W. Puzon-McLaughlin, X. P. Zhang, *Matrix Biol.* **1997**, *16*, 143–151.
- [110] J. O. Lee, P. Rieu, M. A. Arnaout, R. Liddington, *Cell* **1995**, *80*, 631–638.
- [111] A. W. Alberts, J. Chen, G. Kuron, V. Hunt, J. Huff, C. Hoffman, J. Rothrock, M. Lopez, H. Joshua, E. Harris, A. Patchett, R. Monaghan, S. Currie, E. Stapley, G. Albers-Schonberg, O. Hensens, J. Hirshfield, K. Hoogsteen, J. Liesch, J. Springer, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1980**, *77*, 3957–3961.
- [112] J. Kallen, K. Welzenbach, P. Ramage, D. Geyl, R. Kriwacki, G. Legge, S. Cottens, G. Weitz-Schmidt, U. Hommel, *J. Mol. Biol.* **1999**, *292*, 1–9.
- [113] G. Weitz-Schmidt, K. Welzenbach, V. Brinkmann, T. Kamata, J. Kallen, C. Bruns, S. Cottens, Y. Takada, U. Hommel, *Nat. Med.* **2001**, *7*, 687–692.
- [114] K. Welzenbach, U. Hommel, G. Weitz-Schmidt, *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 10590–10598.
- [115] a) T. A. Kelly, D. D. Jeanfavre, D. W. McNeil, J. R. Woska, Jr., P. L. Reilly, E. A. Mainolfi, K. M. Kishimoto, G. H. Nabozny, R. Zinter, B.-J. Bormann, R. Rothlein, *J. Immunol.* **1999**, *163*, 5173–5177; b) K. Last-Barney, W. Davidson, M. Cardozo, L. L. Frye, C. A. Grygon, J. L. Hopkins, D. D. Jeanfavre, S. Pav, C. Qian, J. M. Stevenson, L. Tong, R. Zindell, T. A. Kelly, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 5643–5650.
- [116] G. Liu, J. T. Link, Z. Pei, E. B. Reilly, S. Leitz, B. Nguyen, K. C. Marsh, G. F. Okasinski, T. W. von Geldern, M. Ormes, K. Fowler, M. Gallatin, *J. Med. Chem.* **2000**, *43*, 4025–4040.

- [117] a) M. Winn, E. B. Reilly, G. Liu, J. R. Huth, H.-S. Jae, J. Freeman, Z. Pei, Z. Xin, J. Lynch, J. Kester, T. W. von Geldern, S. Leitza, P. DeVries, R. Dickinson, D. Mussatto, G. F. Okasinski, *J. Med. Chem.* **2001**, *44*, 4393–4403; b) Z. Pei, Z. Xin, G. Liu, Y. Li, E. B. Reilly, N. L. Lubbers, J. R. Huth, J. T. Link, T. W. von Geldern, B. F. Cox, S. Leitza, Y. Gao, K. C. Marsh, P. DeVries, G. F. Okasinski, *J. Med. Chem.* **2001**, *44*, 2913–2920; c) G. Liu, J. R. Huth, E. T. Olejniczak, R. Mendoza, P. DeVries, S. Leitza, E. B. Reilly, G. F. Okasinski, S. W. Fesik, T. W. von Geldern, *J. Med. Chem.* **2001**, *44*, 1202–1210.
- [118] a) J. R. Woska, Jr., D. Shih, V. R. Taqueti, N. Hogg, T. A. Kelly, T. K. Kishimoto, *J. Leukocyte Biol.* **2001**, *70*, 329–334; b) J. R. Huth, E. T. Olejniczak, R. Mendoza, H. Liang, E. A. S. Harris, M. L. Lupher, Jr., A. E. Wilson, S. W. Fesik, D. E. Staunton, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2000**, *97*, 5231–5236.
- [119] T. R. Gadek, D. J. Burdick, R. S. McDowell, M. S. Stanley, J. C. Marsters, Jr., K. J. Paris, D. A. Oare, M. E. Reynolds, C. Ladner, K. A. Zioncheck, W. P. Lee, P. Gribbling, M. S. Dennis, N. J. Skelton, D. B. Tumas, K. R. Clark, S. M. Keating, M. H. Beresini, J. W. Tilley, L. G. Presta, S. C. Bodary, *Science* **2002**, *295*, 1086–1089.
- [120] K. L. Fisher, J. Lu, L. Riddle, K. J. Kim, L. G. Presta, S. C. Bodary, *Mol. Biol. Cell* **1997**, *8*, 501–515.
- [121] a) S. Moncada, R. M. J. Palmer, E. A. Higgs, *Pharmacol. Rev.* **1991**, *43*, 109–142; b) F. Murad, *Angew. Chem.* **1999**, *111*, 1976–1989; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, *38*, 1856–1868; c) R. F. Furchgott, *Angew. Chem.* **1999**, *111*, 1990–2000; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, *38*, 1870–1880; d) L. J. Ignarro, *Angew. Chem.* **1999**, *111*, 2002–2013; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, *38*, 1882–1892; e) S. Pfeiffer, B. Mayer, B. Hemmens, *Angew. Chem.* **1999**, *111*, 1824–1844; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, *38*, 1714–1731.
- [122] V. L. Dawson, T. M. Dawson, *Adv. Pharmacol.* **1995**, *34*, 323–342.
- [123] S. Moncada, A. Higgs, *N. Engl. J. Med.* **1993**, *329*, 2002–2012.
- [124] W. K. Alderton, C. E. Cooper, R. G. Knowles, *Biochem. J.* **2001**, *357*, 593–615.
- [125] a) C. Nathan, *J. Clin. Invest.* **1997**, *100*, 2417–2423; b) D. O. Stichtenoth, J. C. Frolich, *Br. J. Rheumatol.* **1998**, *37*, 246–257.
- [126] a) D. J. Wolff, A. Lubeskie, S. Umansky, *Arch. Biochem. Biophys.* **1994**, *314*, 360–366; b) R. M. Chabin, E. McCauley, J. R. Calaycay, T. M. Kelly, K. L. MacNaul, G. C. Wolfe, N. I. Hutchinson, S. Madhusudanaraju, J. A. Schmidt, J. W. Koza-rich, K. K. Wong, *Biochemistry* **1996**, *35*, 9567–9575.
- [127] K. McMillan, M. Adler, D. S. Auld, J. J. Baldwin, E. Blasko, L. J. Browne, D. Chelsky, D. Davey, R. E. Dolle, K. A. Eagen, S. Erickson, R. I. Feldman, C. B. Glaser, C. Mallari, M. M. Morrissey, M. H. Ohlmeyer, G. Pan, J. F. Parkinson, G. B. Phillips, M. A. Polokoff, N. H. Sigal, R. Vergona, M. Whitlow, T. A. Young, J. J. Devlin, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2000**, *97*, 1506–1511.
- [128] E. Blasko, C. B. Glaser, J. J. Devlin, W. Xia, R. I. Feldman, M. A. Polokoff, G. B. Phillips, M. Whitlow, D. S. Auld, K. McMillan, S. Ghosh, D. J. Stuehr, J. F. Parkinson, *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 295–302.
- [129] S. B. Krantz, *Blood* **1991**, *77*, 419–434.
- [130] a) C.-H. Heldin, *Cell* **1995**, *80*, 213–223; b) J. A. Wells, *Curr. Opin. Cell Biol.* **1994**, *6*, 163–173.
- [131] W. Jelkmann, *Physiol. Rev.* **1992**, *72*, 449–489.
- [132] S. T. Koury, M. C. Bondurant, M. J. Koury, *Blood* **1988**, *71*, 524–527.
- [133] F. Valderrábano, *Kidney Int.* **1996**, *50*, 1373–1391.
- [134] J. L. Spivak, *Annu. Rev. Med.* **1993**, *44*, 243–253.
- [135] D. L. Boger, J. Goldberg, *Bioorg. Med. Chem.* **2001**, *9*, 557–562.
- [136] S. A. Qureshi, R. M. Kim, Z. Konteatis, D. E. Biazzo, H. Motamedi, R. Rodrigues, J. A. Boice, J. R. Calaycay, M. A. Bednarek, P. Griffin, Y.-D. Gao, K. Chapman, D. F. Mark, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1999**, *96*, 12156–12161.
- [137] J. Goldberg, Q. Jin, Y. Ambroise, S. Satoh, J. Desharnais, K. Capps, D. L. Boger, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 544–555.
- [138] R. K. Chawla, J. S. Parks, D. Rudman, *Annu. Rev. Med.* **1983**, *34*, 519–547.
- [139] A. M. de Vos, M. Ultsch, A. A. Kossiakoff, *Science* **1992**, *255*, 306–312.
- [140] a) B. C. Cunningham, J. A. Wells, *J. Mol. Biol.* **1993**, *234*, 554–563; b) J. A. Wells, B. C. Cunningham, G. Fuh, H. B. Lowman, S. H. Bass, M. G. Mulkerrin, M. Ultsch, A. M. deVos, *Recent Prog. Horm. Res.* **1993**, *48*, 253–275.
- [141] Z. Guo, D. Zhou, P. G. Schultz, *Science* **2000**, *288*, 2042–2045.
- [142] M. D. Benson, M. R. Wallace in *The Metabolic Basis of Inherited Disease* (Hrsg.: C. R. Scriver, A. L. Beaudet, W. S. Sly, D. Valle), McGraw-Hill, New York, **1989**, S. 2439–2460.
- [143] L. Bartalena, J. Robbins, *Clin. Lab. Med.* **1993**, *13*, 583–598.
- [144] H. L. Monaco, M. Rizzi, A. Coda, *Science* **1995**, *268*, 1039–1041.
- [145] Z. Lai, W. Colón, J. W. Kelly, *Biochemistry* **1996**, *35*, 6470–6482.
- [146] G. J. Miroy, Z. Lai, H. A. Lashuel, S. A. Peterson, C. Strang, J. W. Kelly, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1996**, *93*, 15051–15056.
- [147] S. A. Peterson, T. Klabunde, H. A. Lashuel, H. Purkey, J. C. Sacchettini, J. W. Kelly, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1998**, *95*, 12956–12960.
- [148] a) P. W. Baures, S. A. Peterson, J. W. Kelly, *Bioorg. Med. Chem.* **1998**, *6*, 1389–1401; b) P. W. Baures, V. B. Oza, S. A. Peterson, J. W. Kelly, *Bioorg. Med. Chem.* **1999**, *7*, 1339–1347.
- [149] T. Klabunde, H. M. Petrassi, V. B. Oza, P. Raman, J. W. Kelly, J. C. Pacchettini, *Nat. Struct. Biol.* **2000**, *7*, 312–321.
- [150] a) V. B. Oza, H. M. Petrassi, H. E. Purkey, J. W. Kelly, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1999**, *9*, 1–6; b) H. M. Petrassi, T. Klabunde, J. Sacchettini, J. W. Kelly, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 2178–2192.
- [151] M. G. McCammon, D. J. Scott, C. A. Keetch, L. H. Greene, H. E. Purkey, H. M. Petrassi, J. W. Kelly, C. V. Robinson, *Structure* **2002**, *10*, 851–863.
- [152] a) H. E. Purkey, M. I. Dorrell, J. W. Kelly, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2001**, *98*, 5566–5571; b) V. B. Oza, C. Smith, P. Raman, E. K. Koepf, H. A. Lashuel, H. M. Petrassi, K. P. Chiang, E. T. Powers, J. Sacchettini, J. W. Kelly, *J. Med. Chem.* **2002**, *45*, 321–332.
- [153] a) J. C. Sacchettini, J. W. Kelly, *Nat. Rev. Drug Discovery* **2002**, *1*, 267–275; b) P. Kuner, B. Bohrmann, L. O. Tjernberg, J. Näslund, G. Huber, S. Celenk, F. Grüniger-Leitch, J. G. Richards, R. Jakob-Røtne, J. A. Kemp, C. Nordstedt, *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 1673–1678; c) B. Bohrmann, M. Adrian, J. Dubochet, P. Kuner, F. Müller, W. Huber, C. Nordstedt, H. Döbeli, *J. Struct. Biol.* **2000**, *130*, 232–246; d) J. McLaurin, D.-S. Yang, C. M. Yip, P. E. Fraser, *J. Struct. Biol.* **2000**, *130*, 259–270.
- [154] A. M. Petros, A. Medek, D. G. Nettekheim, D. H. Kim, H. S. Yoon, K. Swift, E. D. Matayoshi, T. Oltersdorf, S. W. Fesik, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2001**, *98*, 3012–3017.
- [155] a) S. W. Muchmore, M. Sattler, H. Liang, R. P. Meadows, J. E. Harlan, H. S. Yoon, D. Nettekheim, B. S. Chang, C. B. Thompson, S.-L. Wong, S.-L. Ng, S. W. Fesik, *Nature* **1996**, *381*, 335–341; b) M. Aritomi, N. Kunishima, N. Inohara, Y. Ishibashi, S. Ohta, K. Morikawa, *J. Biol. Chem.* **1997**, *272*, 27886–27892.
- [156] M. Sattler, H. Liang, D. Nettekheim, R. P. Meadows, J. E. Harlan, M. Eberstadt, H. S. Yoon, S. B. Shuker, B. S. Chang, A. J. Minn, C. B. Thompson, S. W. Fesik, *Science* **1997**, *275*, 983–986.
- [157] J.-L. Wang, D. Liu, Z.-J. Zhang, S. Shan, X. Han, S. M. Srinivasula, C. M. Croce, E. S. Alnemri, Z. Huang, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2000**, *97*, 7124–7129.

- [158] I. J. Enyedy, Y. Ling, K. Nacro, Y. Tomita, X. Wu, Y. Cao, R. Guo, B. Li, X. Zhu, Y. Huang, Y.-Q. Long, P. P. Roller, D. Yang, S. Wang, *J. Med. Chem.* **2001**, *44*, 4313–4324.
- [159] A. A. Lugovskoy, A. I. Degterev, A. F. Fahmy, P. Zhou, J. D. Gross, J. Yuan, G. Wagner, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 1234–1240.
- [160] a) T. D. Brumeanu, C. A. Bona, S. Casares, *Int. Rev. Immunol.* **2001**, *20*, 301–331; b) J. J. Goronzy, C. M. Weyand, *Curr. Dir. Autoimmun.* **2001**, *3*, 112–132; c) H. Schulze-Koops, P. E. Lipsky, *Curr. Dir. Autoimmun.* **2000**, *2*, 24–49.
- [161] B. Watschinger, *Nephrol. Dial. Transplant.* **1995**, *10*, 1556–1558.
- [162] A. C. Fischer, P. P. Ruvolo, R. Burt, L. R. Horwitz, E. C. Bright, J. M. Hess, W. E. Beschoner, A. D. Hess, *J. Immunol.* **1995**, *154*, 3713–3725.
- [163] a) D. A. A. Vignali, *Behring Inst. Mitt.* **1994**, *94*, 133–147; b) D. A. A. Vignali, C. Doyle, M. S. Kinch, J. Shin, J. L. Strominger, *Philos. Trans. R. Soc. London Ser. B* **1993**, *342*, 13–24.
- [164] a) P. J. Maddon, S. M. Molineaux, D. E. Maddon, K. A. Zimmerman, M. Godfrey, F. W. Alt, L. Chess, R. Axel, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1987**, *84*, 9155–9159; b) K. Bowers, C. Pitcher, M. Marsh, *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **1997**, *29*, 871–875.
- [165] a) C. Doyle, J. L. Strominger, *Nature* **1987**, *330*, 256–259; b) K. Eichmann, *Angew. Chem.* **1993**, *105*, 56–66; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1993**, *32*, 54.
- [166] a) J. Wang, Y. Yan, T. P. J. Garrett, J. Liu, D. W. Rodgers, R. L. Garlick, G. E. Tarr, Y. Husain, E. L. Reinherz, S. C. Harrison, *Nature* **1990**, *348*, 411–4418; b) D. Lamarre, A. Ashkenazi, S. Fleury, D. H. Smith, R.-P. Sekaly, D. J. Capon, *Science* **1989**, *245*, 743–7746; c) S. Fleury, D. Lamarre, S. Meloche, S.-E. Ryu, C. Cantin, W. A. Hendrickson, R.-P. Sekaly, *Cell* **1991**, *66*, 1037–1049.
- [167] K. P. Peters, J. Fauck, C. Frömmel, *J. Mol. Biol.* **1996**, *256*, 201–2213.
- [168] E. C. Meng, B. K. Shoichet, I. D. Kuntz, *J. Comput. Chem.* **1992**, *13*, 505–524.
- [169] B. Lee, F. M. Richards, *J. Mol. Biol.* **1971**, *55*, 379–400.
- [170] S. Li, J. Gao, T. Satoh, T. M. Friedman, A. E. Edling, U. Koch, S. Choksi, X. Han, R. Korngold, Z. Huang, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1997**, *94*, 73–78.
- [171] a) L. K. Clayton, M. Sieh, D. A. Pious, E. L. Reinherz, *Nature* **1989**, *339*, 548–551; b) D. Lamarre, A. Ashkenazi, S. Fleury, D. H. Smith, R.-P. Sekaly, D. J. Capon, *Science* **1989**, *245*, 743–746.
- [172] a) T. Satoh, J. M. Aramini, S. Li, T. M. Friedman, J. Gao, A. E. Edling, R. Townsend, U. Koch, S. Choksi, M. W. Germann, R. Korngold, Z. Huang, *J. Biol. Chem.* **1997**, *272*, 12175–12180; b) A. E. Edling, S. Choksi, Z. Huang, R. Korngold, *J. Neuroimmunol.* **2001**, *112*, 115–128.
- [173] S.-E. Ryu, P. D. Kwong, A. Truneh, T. G. Porter, J. Arthos, M. Rosenberg, X. Dai, N.-h. Xuong, R. Axel, R. W. Sweet, W. A. Hendrickson, *Nature* **1990**, *348*, 419–426.
- [174] a) Z. Huang, S. Li, R. Korngold, *Biopolymers* **1997**, *43*, 367–382; b) A. E. Edling, S. Choksi, Z. Huang, R. Korngold, *J. Autoimmun.* **2002**, *18*, 169–179.
- [175] C. Adessi, C. Soto, *Curr. Med. Chem.* **2002**, *9*, 963–978.
- [176] a) H. Gohlke, G. Klebe, *Angew. Chem.* **2002**, *114*, 2764–2798; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 2644–2676; b) W. L. DeLano, M. H. Ultsch, A. M. de Vos, J. A. Wells, *Science* **2000**, *287*, 1279–1283.
- [177] D. A. Erlanson, A. C. Braisted, D. R. Raphael, M. Randal, R. M. Stroud, E. M. Gordon, J. A. Wells, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2000**, *97*, 9367–9372.
- [178] a) P. J. Hajduk, G. Sheppard, D. G. Nettesheim, E. T. Olejniczak, S. B. Shuker, R. P. Meadows, D. H. Steinman, G. M. Carrera, Jr., P. A. Marcotte, J. Severin, K. Walter, H. Smith, E. Gubbins, R. Simmer, T. F. Holzman, D. W. Morgan, S. K. Davidsen, J. B. Summers, S. W. Fesik, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 5818–5827; b) D. J. Maly, I. C. Choong, J. A. Ellman, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2000**, *97*, 2419–2424.
- [179] S. B. Shuker, P. J. Hajduk, R. P. Meadows, S. W. Fesik, *Science* **1996**, *274*, 1531–1534.
- [180] a) R. Breinbauer, I. R. Vetter, H. Waldmann, *Angew. Chem.* **2002**, *114*, 3002–3015; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 2878–2890; b) 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.