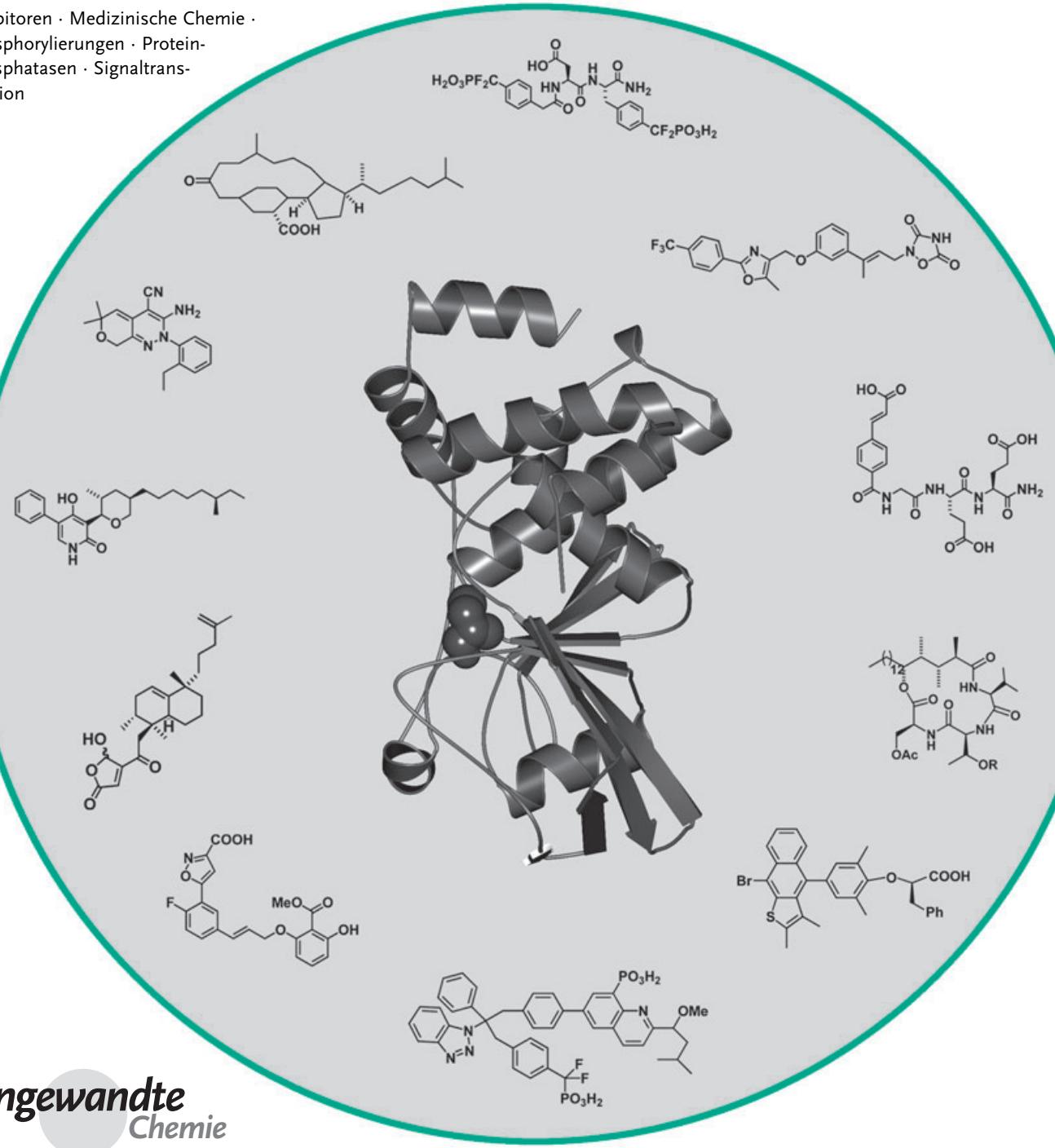


Inhibitoren der Proteintyrosinphosphatasen: Kandidaten für zukünftige Wirkstoffe?

Laurent Bialy und Herbert Waldmann*

Stichwörter:

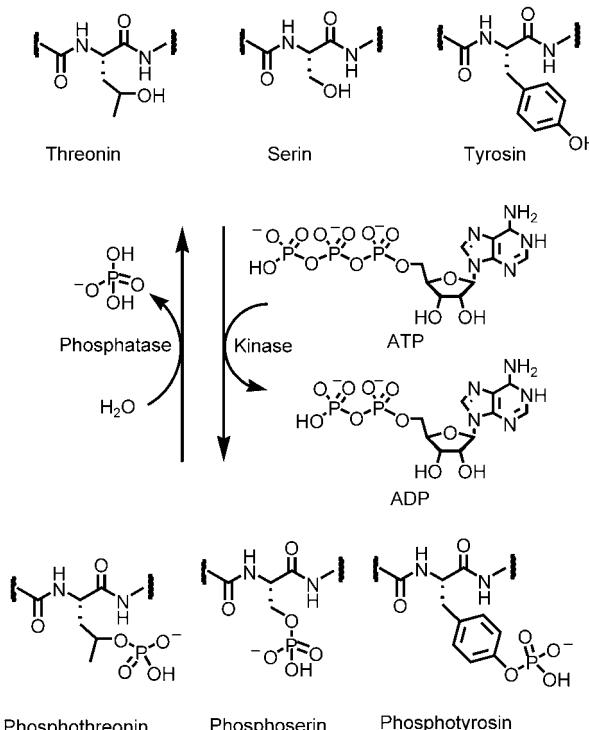
Inhibitoren · Medizinische Chemie ·

Phosphorylierungen · Protein-
phosphatasen · Signaltrans-
duktion

Proteintyrosinphosphatasen (PTPs) bilden eine Familie eng verwandter regulatorischer Schlüsselenzyme, die Phosphotyrosinreste in ihren Proteinsubstraten dephosphorylieren. Fehlfunktionen der PTPs wurden mit mehreren Krankheiten in Verbindung gebracht, darunter mit Krebs, neurologischen Störungen und Diabetes, weshalb PTPs seit einigen Jahren als Angriffspunkte (Targets) therapeutischer Eingriffe untersucht werden. Dieser Aufsatz diskutiert allgemeine Aspekte von PTPs sowie akademische und pharmazeutisch-industrielle Forschungsaktivitäten zur Entwicklung niedermolekularer Inhibitoren von PTPs. Zur Identifizierung wirksamer und selektiver Inhibitoren wurden unterschiedliche Strategien erfolgreich angewendet. Diese Studien bilden die Grundlage für eine mögliche künftige Entwicklung von PTP-Inhibitoren als Wirkstoffen.

1. Einleitung

Phosphorylierungs- und Dephosphorylierungsreaktionen von Proteinen in lebenden Organismen sind an der Regulation zahlreicher zellulärer Prozesse beteiligt, und fehlerhafte Phosphorylierungen tragen zur Entwicklung vieler Krankheiten beim Menschen, wie Krebs und Diabetes, bei.^[1] Die Phosphorylierungsschritte werden durch Proteinkinasen (PKs) gesteuert, die die Phosphorylierung von Proteinen katalysieren, während zur Dephosphorylierung Proteinphosphatasen (PPs) zum Einsatz kommen (Schema 1). Angesichts



Schema 1. Durch Kinasen und Phosphatasen katalysierte Phosphorylierungs- bzw. Dephosphorylierungsreaktionen.

Aus dem Inhalt

| | |
|---|------|
| 1. Einleitung | 3881 |
| 2. PTPs und Krankheiten | 3882 |
| 3. PTPs und dualspezifische Phosphatasen: allgemeine Klassifizierung | 3882 |
| 4. Struktur der katalytischen PTP-Domäne und Mechanismus der enzymatischen Katalyse | 3884 |
| 5. Intrazelluläre PTPs | 3886 |
| 6. Rezeptorproteintyrosinphosphatasen (RPTPs) | 3888 |
| 7. PTP-Inhibitoren | 3889 |
| 8. Schlussfolgerungen und Ausblick | 3902 |

dieses komplementären Verhaltens und der Tatsache, dass PKs etablierte Angriffspunkte (Targets) in der Wirkstoffsumme sind,^[2] überrascht es, dass mit der Entwicklung niedermolekularer Inhibitoren von PPs erst vor kurzem begonnen wurde. Mittlerweile hat sich die Untersuchung solcher Inhibitoren zu einem schnell wachsenden Forschungsgebiet innerhalb der klinischen Biologie und der medizinischen Chemie entwickelt. Proteinphosphatasen wurden nach ihrer Struktur und Substratspezifität in Protein-Serin/Threonin-(PSTPs) und Proteintyrosinphosphatasen (PTPs) klassifiziert. Insbesondere die Entwicklung niedermolekularer Inhibitoren für PTPs^[3] ist in den Fokus sowohl der Grundlagenforschung als auch der pharmazeutischen Forschung gerückt.^[4] Auslöser für dieses Interesse war zweifellos die Entdeckung, dass die Inaktivierung des *ptp1b*-Gens in Mäusen Resistenz gegen Fettleibigkeit verleiht und die Insulinempfindlichkeit ohne negative Nebenwirkungen erhöht (siehe Abschnitt 5.2).^[5] Darüber hinaus wurde gezeigt, dass sich die Abstoßung von Organtransplantaten sowie die Bildung von Alzheimer-Plaques in Tiermodellen unterdrücken lässt, wenn man die Aktivität der ersten entdeckten Transmembranphosphatase, CD45, durch Antikörper moduliert.^[6] In diesem Aufsatz diskutieren wir die jüngsten Fortschritte bei der Entwicklung von PTP-Inhibitoren, wobei wir uns auf solche Phosphatasen

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

konzentrieren, die als potenzielle Targets einer zukünftigen Wirkstoffgeneration gelten. Die Inhibition von Serin/Threonin-Phosphatasen wurde hauptsächlich aus Sicht der chemisch-biologischen Grundlagenforschung intensiv untersucht. Die Thematik wurde an anderer Stelle ausführlich diskutiert^[7] und ist nicht Gegenstand dieses Aufsatzes.

2. PTPs und Krankheiten

PTPs üben regulatorische Schlüsselfunktionen aus, sodass es wenig überrascht, dass Störungen der PTP-Aktivität mit mehreren Krankheiten in Zusammenhang gebracht wurden (Tabelle 1). Zum einen wurden Mutationen, durch die PTPs inaktiviert werden, mit genetisch bedingten Erkrankungen wie der Lafora-Krankheit^[8] oder der Autoimmunkrankheit SLE (systemischer Lupus erythematoses) in Verbindung gebracht.^[9] Zum anderen fungieren viele PTPs als Tumorsuppressoren^[10] und sind bei diversen Krebsarten mutiert oder unterexprimiert.

Einige PTPs können bestimmte Krankheitsformen verschlimmern, was eine mögliche Inhibition therapeutisch interessant macht. Beispielsweise inhibiert ein gegen Osteoporose eingesetzter Wirkstoff, das Bisphosphonat Alendronat (1; siehe Abschnitt 7.2, Abbildung 5), die Phosphatase PTP-ε, die eine wichtige Rolle bei der Entwicklung von Osteoklasten spielt, die wiederum für die Knochenresorption verantwortlich sind.^[11] Die Wirkung von Alendronat wird zumindest teilweise seiner PTP-inhibitorischen Wirkung zugeschrieben (Alendronat wirkt vermutlich auch durch Inhibition der Enzyme des Mevalonat-Stoffwechselweges). Viele Immunkrankheiten oder allergische Reaktionen hängen mit der Rezeptorphosphatase CD45 zusammen.^[12] Bei Krebserkrankungen verstärken Cdc25-Phosphatasen durch ihre stimulierenden Effekte auf den Zellzyklus das Zellwachstum, weshalb eine Inhibition von Cdc25 für die Krebstherapie infrage kommt.^[13] Ein weiteres interessantes Target, das derzeit bei Incyte erforscht wird, ist die dualspezifische Phosphatase MKP-1, die die Kinase JNK inaktiviert und bei mehreren Krebsarten überexprimiert wird.^[14] Bei neurologischen Störungen kommt PTPs ebenfalls eine wichtige Rolle zu, und insbesondere die Inhibition von CD45 könnte zu einer Alzheimer-Therapie führen.^[15] Manche Bakterien wie *Salmonella typhimurium* (der Typhus-Erreger) oder *Yersinia*

pestis (der Pest-Erreger) verwenden entweder ihre eigenen Phosphatasen (z. B. YopH bei *Yersinia*,^[16] die die Phagozytose durch Makrophagen blockiert) oder die Phosphatasen des Wirtes (z. B. RPTP-β bei *Helicobacter*),^[17] um ihre Wirtes zu infizieren oder um dessen Immunreaktion auszuweichen. Eine PTP-Inhibition bietet sich demnach als Strategie zur Bekämpfung von Infektionskrankheiten an. Ein anderer Bereich, der von PTP-Inhibitoren profitieren könnte, betrifft die Behandlung von Diabetes Typ 2 und Fettleibigkeit. Ein besonders vielversprechendes Target ist hier die Phosphatase PTP1B (siehe Abschnitt 5.2).^[5]

Tabelle 1 zeigt einige PTPs, die entscheidend an der Entwicklung von Krankheiten beteiligt sind. Einige dieser Phosphatasen bieten sich als therapeutische Targets an. Dieser Aufsatz fasst die Forschungen über niedermolekulare Phosphatase-Inhibitoren und mögliche therapeutische Strategien auf Grundlage solcher Wirkstoffe zusammen. Andere Strategien, etwa auf der Grundlage von Antisense-Wirkstoffen (ein Antisense-Wirkstoff gegen PTP1B, ISIS113715, wird derzeit bei ISIS in der klinischen Phase II zur Behandlung von Diabetes Typ 2 getestet) oder Antikörpern, werden hier nicht diskutiert.

3. PTPs und dualspezifische Phosphatasen: allgemeine Klassifizierung

Die PTP-Superfamilie verwandter Phosphatasen (107 humane PTP-Gene wurden bislang identifiziert) wurde entsprechend der Aminosäuresequenzen der katalytischen Domänen der PTPs in vier Kategorien eingeteilt (Abbildung 1).^[46] Die erste Gruppe umfasst die Cystein-basierten PTPs der Klasse I. Ihr gemeinsames charakteristisches Motiv ist die ca. 250 Aminosäuren lange, hoch konservierte „PTP-Domäne“, die die enzymatische Reaktion katalysiert, wobei das Cystein in der aktiven Bindungstasche eine zentrale Rolle spielt (siehe Abschnitt 4). Die klassischen, für Phosphotyrosin-Substrate spezifischen PTPs (Rezeptor- und Nichtrezeptor-PTPs) gehören zu dieser Gruppe. Einige Rezeptor-PTPs haben zwei PTP-Domänen, obwohl üblicherweise nur eine aktiv ist. Auch die dualspezifischen Phosphatasen (DSPs), die im Unterschied zu den klassischen PTPs die Dephosphorylierung sowohl von Tyrosin- als auch von Serin/Threonin-Resten ihrer Substrate katalysieren, gehören zu dieser PTP-



Herbert Waldmann, geboren 1957, promovierte 1985 an der Universität Mainz bei Horst Kunz. Nach einem Postdoc-Aufenthalt in Harvard bei George Whitesides und seiner Habilitation (1991, Mainz) wurde er 1991 auf eine Professur an die Universität Bonn berufen und wechselte 1993 als Professor für Organische Chemie an die Universität Karlsruhe. 1999 wurde er Direktor am Max-Planck-Institut für Molekulare Physiologie in Dortmund und Professor für Biochemie an der Universität Dortmund. Zu seinen Auszeichnungen gehören der Friedrich-Weygand-Preis, der Carl-Duisberg-Preis, der Otto-Bayer-Preis, der Steinhofer-Preis und die Max-Bergmann-Medaille.



Laurent Bialy, geboren 1974 in Karlsruhe, studierte bis 1998 Chemie in Karlsruhe und promovierte 2002 am Max-Planck-Institut für Molekulare Physiologie und an der Universität Dortmund mit einer Arbeit zur Synthese und biologischen Evaluierung des Phosphatase-Inhibitors Cytostatin und dessen Analoga. Als Postdoc bei Mark Bradley in Southampton befasste er sich mit Anwendungen von PNA-Peptid-Konjugaten und Mikroarraytechniken in der kombinatorischen Chemie. Zu seinen Auszeichnungen gehören ein DSM Award, der Preis der Karlsruher Chemischen Gesellschaft und der Klaus-Grohe-Preis für medizinische Chemie.

Tabelle 1: Mit Krankheiten in Zusammenhang gebrachte Proteintyrosinphosphatasen.

| Krankheitsklasse | beteiligte PTPs | physiologische Effekte |
|--|--|--|
| Immunkrankheiten, Organtransplantation, Entzündungen | SHP-1 | Mutation verursacht „mottenzerfressenen Phänotyp“ ^{[18][a]} negativer Regulator allergischer Reaktionen ^[19] |
| | CD45 | Inhibitoren als mögliche Wirkstoffe gegen Xenograft-Abstoßung ^[6] |
| | PTP-ε | Immunantwort ^[20] |
| Krebs | PTEN ^[a] | Tumorsuppressoren ^[21] |
| | PTPα | aktiviert Src- und Fyn-Kinase ^[22] |
| | Cdc25-A, Cdc25-B | stimulieren das Fortschreiten des Zellzyklus, oncogene Funktionen ^[13] |
| | FAP-1 ^[a] | Apoptoseinduktion ^[23] |
| | HePTP ^[a] | reguliert extrazellulär regulierte Kinasen (ERKs), Veränderungen in der HePTP-Expression wurden mit hämatopoetischer Malignität in Zusammenhang gebracht ^[24] |
| | PRL-3 | Tumormetastase ^[25] |
| | PTP1B | dephosphoryliert und aktiviert c-Src in humanen Brustkrebs-Zelllinien ^[26] |
| | JSP-1 | aktiviert die MAP-Kinase Jnk ^[27] |
| | SAP-1 ^[a] | negativer Regulator des Integrin-Signalwegs, in hepatozellulären Krebsgeschwüren herunterreguliert ^[28] |
| | RPTP-β/PTP-ζ ^[a] | in einer Glioblastom-Zelllinie hoch exprimiert ^[29] |
| | SHP-2 ^[a] | Mutation verursacht juvenile myelomonozytische Leukämie ^[30] |
| | SHP-1 ^[a] | Tumorsuppressor durch den Abbau von JAK-Kinasen ^[31] |
| | PTP-γ ^[a] | in Nieren- und Lungenkrebsarten häufig ausgeschaltet ^[32] |
| | CD45 | korreliert mit der Proliferation von Myelomzellen ^[33] |
| | PacP (saure Prostata-phosphatase) ^[a] | reduzierte Aktivität in Prostatakrebszelllinien ^[34] |
| | MKP-1 | bei einigen Krebsarten überexprimiert ^[14] |
| neurologische Erkrankungen und Neuroprotektion | Laforin ^[a] | Mutation verursacht progressive myoklonische Epilepsie vom Lafora-Typ ^[8] |
| | LAR | Herunterregulierung verhindert Apoptose, Inhibition könnte zur Nervenregeneration genutzt werden ^[35] |
| | PTP-σ | Nervenregeneration ist in PTP-σ-Knockout-Mäusen beschleunigt ^[36] |
| | CD45 | Alzheimer-Krankheit ^[15] |
| | SHP-1 | Neuroprotektion ^[37,38] |
| | SHP-2 ^[a] | Neuroprotektion ^[39] |
| Infektionskrankheiten | <i>Yersinia</i> YopH | essenziell für die Virulenz ^[16] |
| | <i>Salmonella</i> SptP | essenziell für die Virulenz ^[16] |
| | SHP-1 | Leishmaniose ^[40] |
| | SHP-2 | Aktivierung durch <i>Helicobacter pylori</i> ^[41] |
| | MPtpA und MPtpB | <i>Mycobacterium tuberculosis</i> ^[42] |
| | RPTP-α und RPTP-β/PTP-ζ | Target von VacA von <i>Helicobacter pylori</i> ^[17] |
| Diabetes | PTP1B | PTP1B-Knockout-Mäuse sind diabetesresistent ^[5] |
| | LAR | Überexpression verursacht Insulinresistenz ^[43] |
| Osteoporose | PTP-ε | Alendronat-Inhibitor ^[11] |
| | GLEPP-1 | renale rezeptorartige PTP, Inaktivierung führt zu einer veränderten Podozytenstruktur ^[44] |
| Fettleibigkeit | PTP1B | PTP1B-Knockout-Mäuse sind gegen Fettleibigkeit resistent ^[5] |
| | SHP-2 | negativer Regulator des bei Fettleibigkeit wichtigen Leptin-Signalwegs ^[45] |

[a] Krankheit wird durch Inaktivierung der Phosphatase verursacht; eine Inhibition wäre in diesen Fällen demnach kontraproduktiv.

Klasse. Darüber hinaus wurden spezielle Tyrosinphosphatasen in die DSP-Familie eingeordnet, etwa die Vertreter der Myotubularin-Familie (MTM),^[47b] die C-terminal prenylierten PRL-Phosphatasen,^[47c] die RNA-Triphosphatasen^[47d] oder die PTEN-Phosphatasen,^[47e] die Inositolphosphate als Substrate akzeptieren. Diese Phosphatasenarten werden hier jedoch nur kurz angesprochen.

Die zweite Gruppe sind die Cystein-basierten PTPs der Klasse II, die sich vor allem in bakteriellen Organismen finden. Beim Menschen wurde erst ein Gen dieses Typs (*LMPTP*) entdeckt. Dieser Phosphatasentyp wird in diesem Aufsatz nicht weiter besprochen.^[47a]

Die Cdc25-Phosphatasen katalysieren zwar ebenfalls die Dephosphorylierung von Tyrosin- und Serin/Threonin-

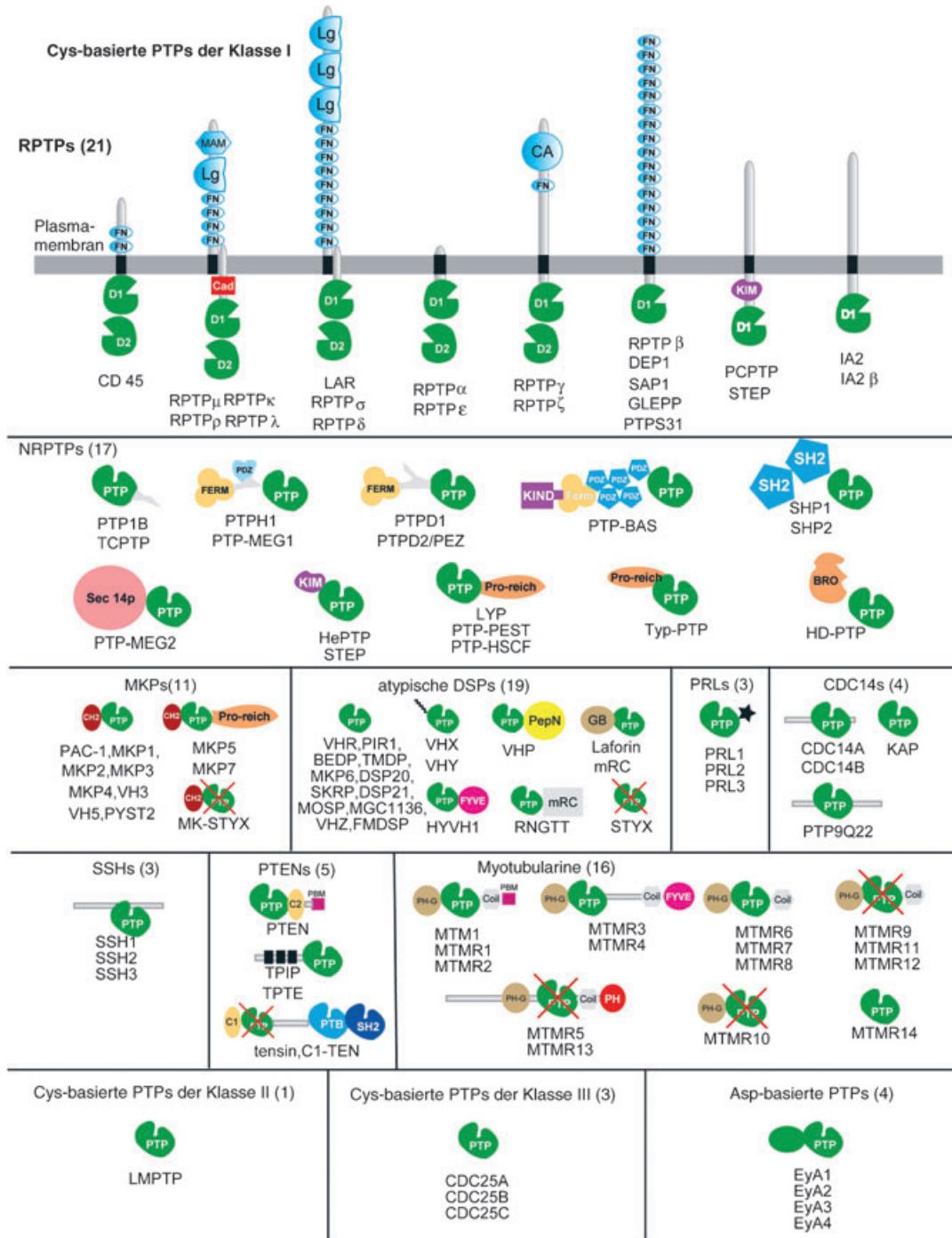


Abbildung 1. Klassifizierung der PTP-Familie bezüglich allgemeinem Aufbau und zellulärer Lokalisation (aus Lit. [46b] mit Genehmigung).

Resten, bilden aber eine eigene, dritte Gruppe von Cys-basierten PTPs der Klasse III. Die Phosphatasen dieser Klasse sind hauptsächlich an der Zellzyklusprogression beteiligt. Die vierte Gruppe schließlich enthält Aspartat-anstelle von Cystein-basierten PTPs. Zu dieser Klasse, die hier ebenfalls nur kurz angesprochen wird, gehören Vertreter der Halosäure-Dehalogenase(HAD)-Superfamilie.^[47]

PTPs sind entscheidend an der Regulierung zellulärer Prozesse beteiligt, daher überrascht es nicht, dass PTPs selbst hoch regulierte Enzyme sind. Die Regulationsmechanismen

umfassen Genexpression, subzelluläre Lokalisation, alternatives Splicing, Phosphorylierung und reversible Oxidation der katalytischen Cysteinreste.^[48]

4. Struktur der katalytischen PTP-Domäne und Mechanismus der enzymatischen Katalyse^[46]

Die Kristallstrukturen von mehr als zwanzig PTPs wurden bislang gelöst. Zusammen mit Mutagenese-Experimenten

tragen sie entscheidend zum Verständnis der katalytischen Vorgänge und der Substraterkennung bei.^[49] PTPs sind α/β -Proteine und bilden β -Barrel-Strukturen mit flankierenden α -Helices. Das katalytische Zentrum befindet sich innerhalb einer Furche an der Proteinoberfläche, die bei klassischen PTPs tiefer ist (9 Å) als bei DSPs (6 Å) – ein Unterschied, der die höhere Substratselektivität der klassischen PTPs erklärt. Weitere Elemente der Domäne sind das charakteristische Motiv (H/V)C(X)₅R(S/T) und eine Schleife mit vermehrten sauren Resten an der Oberfläche (Abbildung 2).^[50]

Der allgemeine Mechanismus wird im Folgenden am Beispiel von PTP1B erklärt,^[51] einer wichtigen Phosphatase in der Insulinkaskade (siehe Abschnitt 5.2). Wahrscheinlich ist der Mechanismus für die meisten PTPs gültig.^[46] Das negativ geladene Phosphatsubstrat wird durch Wasserstoffbrücken zu Aminosäuren der phosphatbindenden Schleife (P-Schleife) und zu einem hoch konservierten Arginin (Arg 221 bei PTP1B; siehe Abbildung 2) stabilisiert. Darüber hinaus stabilisiert ein in der Nähe befindlicher α -Helix-Dipol das Phosphat. Die Bindung des Substrats bewirkt eine Konformationsänderung des Enzyms, wobei sich die WPD-Schleife über die substratbindende Tasche schiebt und weitere

stabilisierende Wechselwirkungen ermöglicht. Diese Wechselwirkungen sind für die Substratselektivität und die katalytische Aktivität entscheidend. Im geschlossenen Zustand befindet sich Asp 181 in der Nähe des Substrats und bildet eine Wasserstoffbrücke mit dem phenolischen Sauerstoffatom des Phosphotyrosins. Weiterhin wird der Phenylring des Phosphotyrosins zu beiden Seiten von Tyr 46 und Phe 182 eingeschlossen, mit denen er hydrophobe Wechselwirkungen eingeht. Der zentrale Schritt der Katalyse ist ein nucleophiler Angriff durch ein deprotoniertes Cystein (Cys 215), der zur Bildung einer kovalenten Thiophosphoryl-Zwischenstufe führt.^[52] Eine Mutationsanalyse ergab, dass eine Substitution des Cysteins in der aktiven Bindungstasche die enzymatische Aktivität komplett unterbindet.^[53] Der Cysteinrest in der aktiven Bindungstasche von PTPs ist besonders azide, weil mehrere Wasserstoffbrücken das Thiolat-Ion stabilisieren, von denen eine von der proximalen OH-Gruppe einer konservierten Ser/Thr-Domäne gebildet wird.^[54] Die fünffach koordinierte Zwischenstufe wird durch ionische Wechselwirkungen mit dem positiv geladenen Arg 221 stabilisiert.^[55] Das azide Asp 181 stabilisiert durch Protonierung den Aufbau einer negativen Ladung.^[56] In einem zweiten Schritt wird die

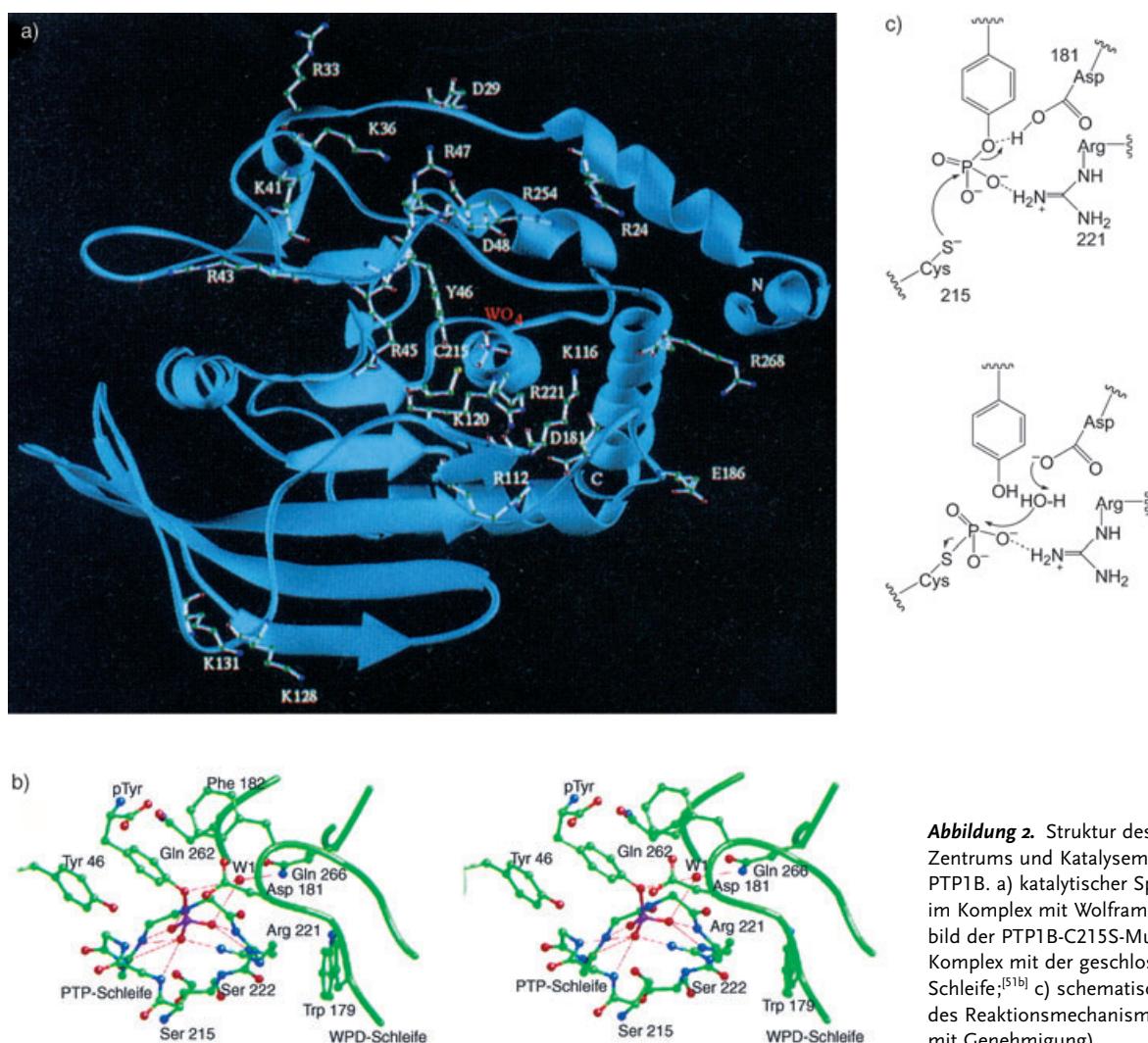


Abbildung 2. Struktur des katalytischen Zentrums und Katalysemechanismus von PTP1B. a) katalytischer Spalt von PTP1B im Komplex mit Wolframmat;^[51a] b) Stereobild der PTP1B-C215S-Mutante Tyr(P) im Komplex mit der geschlossenen WPD-Schleife;^[51b] c) schematische Darstellung des Reaktionsmechanismus (aus Lit. [51] mit Genehmigung).

Zwischenstufe durch ein Wassermolekül angegriffen, das von Asp 181 (jetzt in seiner basischen Form) deprotoniert wird. Dieser Schritt setzt das Cystein frei und regeneriert nach Abdissoziation des Produktes das ursprüngliche Enzym.^[57] Die konservierten, zum Arg 221 proximalen Ser/Thr-Reste in der katalytischen Schleife erleichtern die Hydrolyse des Enzym-Phosphoryl-Addukts, möglicherweise indem sie durch eine Wasserstoffbrücke den Aufbau einer negativen Ladung am Schwefelatom während der Hydrolyse der Phosphoryl-Enzym-Zwischenstufe stabilisieren.^[58]

5. Intrazelluläre PTPs

5.1. SHP1 und SHP2

Die SHP-Phosphatasen enthalten zusätzlich zur PTP-Domäne die ca. 100 Aminosäuren lange Phosphotyrosin-bindende SH2-Domäne (SH2 = Src-Homologie 2), die sich auch in vielen anderen Signalproteinen wiederfindet.^[59] SHP1 wird hauptsächlich in hämatopoetischen Zellen exprimiert und wirkt negativ regulatorisch in Signalwegen von Cytokinrezeptoren, Antigenrezeptoren und Rezeptortyrosinkinasen.^[60] SHP1 wechselt mit zahlreichen Wachstumsfaktorrezeptoren mit Tyrosinkinaseaktivität (z.B. dem EGF-Rezeptor)^[61] und mit Cytokinrezeptoren (z.B. IL-R^[62] und Epo-R^[63]).^[60] Fehlfunktionen von SHP1 in Lymphozyten wurden mit Lymphoma und Leukämie in Verbindung gebracht,^[64] außerdem wirkt SHP1 als Tumorsuppressor.^[31] SHP2 wird ubiquitär exprimiert und übt positive Funktionen bei der Signaltransduktion über Rezeptortyrosinkinasen aus.^[65] SHP2 wechselt mit über seine SH2-Domäne mit einer Vielzahl von Signalproteinen, wie dem PDGF-Rezeptor,^[66] dem EGF-Rezeptor^[67] und IRS-1.^[68] Beide Proteine haben zwei SH2-Domänen, von denen die N-terminale an die katalytische Domäne bindet und auf diese Weise autoinhibitorisch wirkt.^[69] Beispielsweise setzt die Bindung von Epo-R an die N-terminale SH2-Domäne die katalytische Domäne von SHP1 frei und aktiviert diese.^[70] SHP1 und SHP2 gelten als mögliche Angriffspunkte für die Behandlung von Infektionskrankheiten, vor allem seit herausgefunden wurde, dass Natriumbistibogluconat, ein bekanntes Mittel gegen Leishmaniose, SHP1 und SHP2 inhibiert.^[40] SHP2 ist an vielen biologischen Stoffwechselvorgängen beteiligt und wurde mit klinischen Erkrankungen wie dem Noonan-Syndrom,^[71] Neutropenie,^[72] Diabetes^[73] und juveniler myelomonozytischer Leukämie^[30] in Zusammenhang gebracht.

5.2. PTP1B

PTP1B war die erste gereinigte und charakterisierte Säuger-PTP.^[74] Zusätzlich zur katalytischen PTP-Domäne enthält sie eine prolinreiche Sequenz sowie eine Ankerdomäne, die das Enzym an das endoplasmatische Retikulum (ER) fixiert. Durch enzymatische Abspaltung von dieser Domäne kann die Phosphatase zu ihren zytosolischen Substraten migrieren. PTP1B hat eine Schlüsselfunktion in der insulinabhängigen Signalkaskade (Abbildung 3) und gilt als

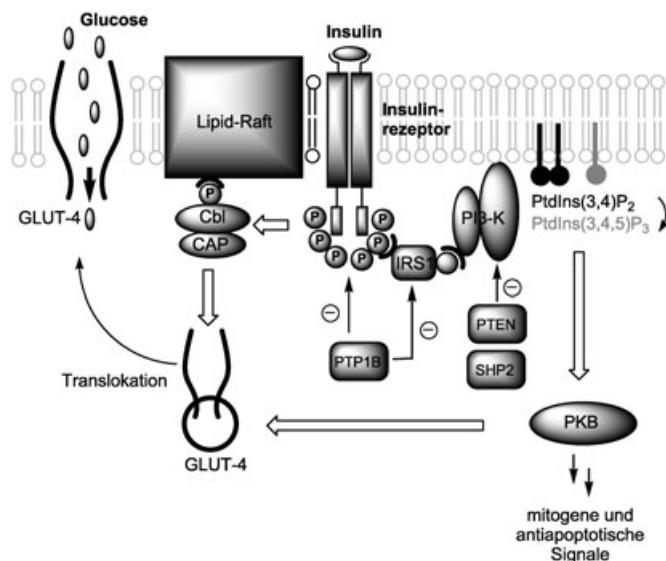


Abbildung 3. Schematische Darstellung des insulinabhängigen Signalingwegs und der relevanten Wechselwirkungen mit PTP1B. Auch von anderen Phosphatasen wie PTEN und SHP2 wurde berichtet, dass sie in diesen Signalweg eingreifen (aus Lit. [4] mit Genehmigung).

vielversprechendes Target bei der Behandlung von Diabetes Typ 2.

Insulin ist ein anaboles Peptidhormon, das von den Pankreas-β-Zellen sekretiert wird. Es bindet an die extrazellulären (α)-Domänen des dimeren Insulinrezeptors (IR), der zur Familie der Rezeptortyrosinkinasen gehört. Bei der Bindung des Insulins wird der IR an Tyrosinresten der zytosolischen (β)-Domänen autophosphoryliert (auf ähnliche Weise wie auch andere Rezeptortyrosinkinasen).^[75] In seiner phosphorylierten Form rekrutiert und phosphoryliert der IR weitere zytosolische Moleküle, darunter das Insulinrezeptorsubstrat 1 (IRS-1). Phosphoryliertes IRS-1 wird durch andere Proteine, die die SH2-Domäne enthalten, erkannt, speziell durch die Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI-3-K), die ihrerseits weitere Substrate phosphoryliert. Über diese Kaskade reguliert Insulin zahlreiche biologische Prozesse, darunter die Synthese von Glykogen, Fettsäuren und Proteinen sowie mitotische Prozesse.^[76] Von zentraler Bedeutung ist die Translokation des Glucosetransporters GLUT-4 aus intrazellulären Vesikeln an die Zellmembran, da hierdurch die zelluläre Aufnahme von Glucose aus dem Plasma ermöglicht wird.^[77]

Diabetes Typ 2, das 95 % aller Diabetesfälle ausmacht, ist durch eine defizierte Insulinkaskade gekennzeichnet, die zur Insulinresistenz führt. PTP1B wirkt als Insulin-Antagonist durch Dephosphorylierung und Inaktivierung des Insulinrezeptors an den Positionen Tyr 1150 und Tyr 1151. Nachgewiesen wurde dies durch Abfangen von Substraten mit einer inaktiven C215S-Mutante^[78] sowie durch kinetische und kristallographische Daten.^[79] Vermutlich gibt es weitere Substrate von PTP1B, ein mögliches Beispiel ist IRS-1.^[80] Die Wirkung von PTP1B als Insulin-Antagonist wurde durch viele Experimente bestätigt. Die spektakulärsten Ergebnisse wurden mit PTP1B-Knockout-Mäusen erhalten, in denen das

ptp1b-Gen desaktiviert war.^[5] PTP1B wird in der Embryonalentwicklung nicht benötigt, sodass die Mutation nicht letal ist. Die Tiere zeigten eine Überempfindlichkeit gegen Insulin und waren resistent gegen Fettleibigkeit. Negative Nebenwirkungen der Mutation wurden nicht festgestellt. In der pharmazeutischen Industrie waren diese Ergebnisse Auslöser intensiver Forschungen zu PTP1B-Inhibitoren als mögliche Wirkstoffe gegen Diabetes oder Fettleibigkeit.^[4]

Neben seiner zentralen Rolle in der Insulinkaskade ist PTP1B noch an einer Reihe anderer wichtiger Stoffwechselprozesse beteiligt. Von besonderer Bedeutung ist die Tatsache, dass PTP1B bei humanem Brust- und Eierstockkrebs überexprimiert wird.^[81] PTP1B dephosphoryliert und aktiviert dadurch die Kinase c-Src in humanen Krebszelllinien.^[26] Außer diesen aktivierenden Funktionen wirkt PTP1B auch negativ regulatorisch, etwa im Signalweg des EGF-Rezeptors^[82] oder bei der integrinvermittelten Zelladhäsion.^[83] In Anbetracht dieser vielfältigen Funktionen scheint es etwas überraschend, dass bei PTP1B-Knockout-Mäusen keine schwerwiegenden Nebenwirkungen auftreten.

5.3. Dualspezifische Phosphatasen^[48]

DSPs enthalten das charakteristische PTP-Motiv (H/V)C(X)₅R(S/T) im aktiven Zentrum, ansonsten ist die Sequenzidentität zwischen den beiden Phosphataseklassen gering. DSPs haben ein breiteres Substratspektrum und sind katalytisch aktiv gegenüber Phosphotyrosin, Phosphoserin, Phosphothreonin und *in vitro* sogar gegenüber Nichtproteinsubstraten wie Phospholipiden und RNA. Der Prototyp dieser Familie ist das Enzym VH-1, das im *Vaccinia*-Virus nachgewiesen wurde.^[84]

5.3.1. VHR

VHR ist eine humane dualspezifische Phosphatasen.^[85] Sie dephosphoryliert und inaktiviert die extrazellulär regulierten Kinasen (ERKs; aus der Familie der MAP-Kinasen).^[86] Die Kristallstruktur von VHR wurde bestimmt, und es konnte gezeigt werden, dass die Substratbindungstasche flacher ist als bei PTP1B.^[87] Dieser Unterschied könnte erklären, warum DSPs nicht nur Phosphotyrosin, sondern auch Phosphoserin und Phosphothreonin als Substrate akzeptieren. Andere Vertreter der DSP-Familie haben zusätzliche Bindungsdomänen, z.B. CH-Domänen (CH = Cdc25-Homologie), die eine entscheidende Rolle bei der Substratbindung und -erkennung spielen. DSPs treten im Zytosol und im Zellkern auf, und ihre Expression ist gewebeabhängig.

Die Hauptfunktion von VHR ist offenbar die Dephosphorylierung und Inaktivierung der MAP-Kinasen in der Aktivierungsschleife TXY, die eine wichtige Rolle in Signalkaskaden spielt (sowohl T als auch Y müssen phosphoryliert sein, damit MAPKs enzymatische Aktivität zeigen).^[48] Unterschiedliche DSPs sind überraschend selektiv in der Erkennung ihrer Substrate und tragen zur korrekten räumlichen und zeitlichen Regulierung der MAP-Kinasen bei.^[48]

5.3.2. Cdc25-Phosphatasen

Die ebenfalls dualspezifischen Cdc25-Phosphatasen werden als eigene Klasse kategorisiert, da sie sich in ihrer Primär- und Tertiärstruktur von den übrigen DSPs unterscheiden. Sie kommen im Menschen in drei homologen Formen A, B und C vor.^[88] Von besonderem Interesse ist ihre zellzyklusregulierende Wirkung, die auf einer Dephosphorylierung der cyclinabhängigen Kinasen beruht.^[89] Speziell Cdc25B, deren Überexpression mit der Malignität von Tumoren in Zusammenhang gebracht wurde, steht im Fokus der Forschung.^[13] Selektive Inhibitoren von Cdc25B gelten als vielversprechende Kandidaten für Tumortherapeutika. Cdc25B aktiviert den Cdc2-(Cyclin-B)-Komplex im Zytoplasma (vor dessen Transport in den Zellkern) durch Dephosphorylierung von Cdc2 an der Position Tyr15, die sich in der Nähe der ATP-Bindungsstelle des Enzyms befindet.^[90] Der Cdc2-(Cyclin-B)-Komplex phosphoryliert und aktiviert Cdc25C, die wiederum nucleäres Cdc2-(Cyclin-B) dephosphoryliert und aktiviert. Resultat ist ein positiver Rückkopplungsmechanismus, der den Übergang von der G2- in die M-Phase einleitet.^[91]

Die Cdc25A-Phosphatasen wird in der frühen G1-Phase exprimiert und steuert den Übergang von der G1- zur S-Phase.^[92] Sie wird zur Aktivierung des (Cyclin-E)/Cdk2-Komplexes benötigt und wird ihrerseits durch diesen Komplex in einer positiven Rückkopplungsschleife phosphoryliert (ähnlicher Mechanismus wie oben für Cdc25C beschrieben; eine ausführliche Diskussion zu Cdc25A findet sich in Lit. [93]). Es wird vermutet, dass eine fehlerhafte Aktivierung und/oder Verstärkung von Cdc25A und Cdc25B eine wichtige Rolle bei mehreren Humankrebsarten spielt.^[13] Die katalytischen Domänen von Cdc25A und Cdc25B wurden anhand mehrerer Kristallstrukturen beschrieben.^[94]

5.4. Sonstige Phosphatasen

Weitere Phosphatasen mit recht unterschiedlichen Funktionen sind beschrieben worden. Einige von ihnen prozessieren Phospholipide als Substrate, etwa die Phosphatasen PTEN (ein Tumorsuppressor)^[95] oder Myotubularin (MTM), die spezifische Inositolphosphate dephosphorylieren. Vertreter der MTM-Familie wurden mit muskulären und neurodegenerativen Erkrankungen beim Menschen in Zusammenhang gebracht.^[96] Eine weitere Klasse von dualspezifischen Phosphatasen bilden die Enzyme Mc1 und BVP, die RNA-Triphosphate dephosphorylieren.^[97] Nicht mit den „klassischen“ PTPs verwandte Proteintyrosinphosphatasen finden sich in der Superfamilie der Halosäure-Dehalogenasen (HADs). Kürzlich konnte gezeigt werden, dass der zu dieser Familie gehörende nucleäre Transkriptionsfaktor „Eyes absent“ eine Tyrosinphosphatasen ist, die ihre Substrate nicht wie die klassischen PTPs durch einen nucleophilen Cysteinrest, sondern durch einen Asparaginsäurerest angreift und hydrolysiert.^[98] Ein weiterer Phosphatasen Typ wird durch das prenylierte Enzym PRL-3 repräsentiert, das in metastasierenden Tumoren überexprimiert wird und ein interessantes therapeutisches Target für die Krebstherapie wäre.^[25]

6. Rezeptorproteintyrosinphosphatasen (RPTPs)

Rezeptor-PTPs sind aus einer extrazellulären Domäne mit verschiedenen Strukturmotiven aufgebaut (Immunoglobulin-artig, Fibronectin-Typ etc.), die sich auch in anderen Zelladhäsionsmolekülen wiederfinden. Dies deutet darauf hin, dass RPTPs bei Zell-Zell- und Zell-Matrix-Wechselwirkungen eine Rolle spielen. Neben einer einzelnen Transmembrandomäne enthalten sie intrazelluläre Domänen, die durch eine oder zwei PTP-Domänen (von denen normalerweise nur eine katalytisch aktiv ist) oder durch andere, nichtkatalytische Domänen, die an Regulationsprozessen oder der subzellulären Lokalisation der Enzyme beteiligt sind, gebildet werden. Anhand struktureller und evolutionärer Merkmale wurden die RPTPs in acht und die NRPTPs (Nichtrezeptor-PTPs) in neun Unterfamilien eingeteilt (Abbildung 1).^[99] Interessanterweise besteht eine enge Korrelation zwischen der Sequenzidentität der PTP-Domänen und dem strukturellen Aufbau der vollständigen Proteine.^[100]

Die genauen Funktionsweisen der RPTPs sind noch nicht vollständig aufgeklärt, sodass nur einige allgemeine Eigenschaften vorgestellt werden, mit Schwerpunkt auf der am besten charakterisierten Transmembranphosphatase CD45. Diese kommt in hämatopoetischen Zellen vor und ist essenziell für die Signaltransduktion der Antigenrezeptoren in T- und B-Zellen.^[12] CD45 wird in mehreren Isoformen exprimiert, die sich durch alternatives Splicing der Exons der N-terminalen Sequenz in ihren extrazellulären Domänen unterscheiden.^[12] Die variablen N-terminalen extrazellulären Regionen bestehen aus etwa 200 Aminosäuren und sind hochgradig glycosyliert, sodass die Isoformen deutlich unterschiedliche Glycosylierungsmuster haben. An die N-terminalen Region schließen sich an: eine Cystein-reiche Region, drei Wiederholungseinheiten von Fibronectin Typ 3 und eine einzelne Transmembranregion (Abbildung 4). Auf der zytoplasmatischen Seite setzt sich die Phosphatase aus zwei

Phosphatase-Untereinheiten (D1 und D2) zusammen, von denen allerdings nur die membrannahe Domäne D1 für die Phosphataseaktivität eine Rolle spielt. D2 ist an Protein-Protein-Wechselwirkungen und der richtigen Faltung der Phosphatase beteiligt. Die Expression der unterschiedlichen Isoformen von CD45 ist zelltypspezifisch und hängt außerdem vom Differenzierungszustand der hämatopoetischen Zellen ab.^[12]

Einige extrazelluläre Liganden der RPTPs wurden identifiziert, etwa das sekretierte Protein Galectin-1 (für CD45), das einen inhibitorischen Effekt auf die Phosphataseaktivität von CD45 haben könnte,^[101] ein Laminin-Nidogen-Komplex in der extrazellulären Matrix (für LAR)^[102] und der Wachstumsfaktor Pleiotrophin, der vermutlich PTP- ζ bindet und inhibiert.^[29]

RPTPs scheinen auch homodimere und heterodimere Komplexe zu bilden.^[103] Dabei ist wichtig, dass eine Dimerisierung der RPTPs die katalytische Aktivität reguliert – was an die Aktivierung von Rezeptorproteintyrosinkinasen (RPTKs) durch Dimerisierung erinnert.^[104] So wurde etwa gezeigt, dass die Dimerisierung von CD45 zur Inhibition der katalytischen Aktivität führt. Die inhibitorische Teilstruktur einer D1-Domäne (der membrannahen, katalytisch aktiven PTP-Domäne) bindet und inhibiert die D1-Domäne der zweiten Phosphatase.^[105] Die Heterodimerisierung von RPTPs könnte eine wichtige Rolle beim „cross talk“ zwischen unterschiedlichen RPTP-vermittelten Stoffwechselwegen spielen.

Intrazelluläre Substrate für RPTPs wurden in den letzten Jahren in zunehmender Zahl identifiziert und hinsichtlich ihrer physiologischen Funktionen aufgeklärt. Zum ersten Subtratyp zählen die PTKs. So ist CD45 entscheidend an der Aktivierung von T-Zellen beteiligt. Der T-Zell-Rezeptor (TCR) ist über CD4 mit der Src-Kinase Lck verbunden. CD45 ist entscheidend an der Signaltransduktion in T-Zellen beteiligt, indem sie Lck durch Dephosphorylierung des

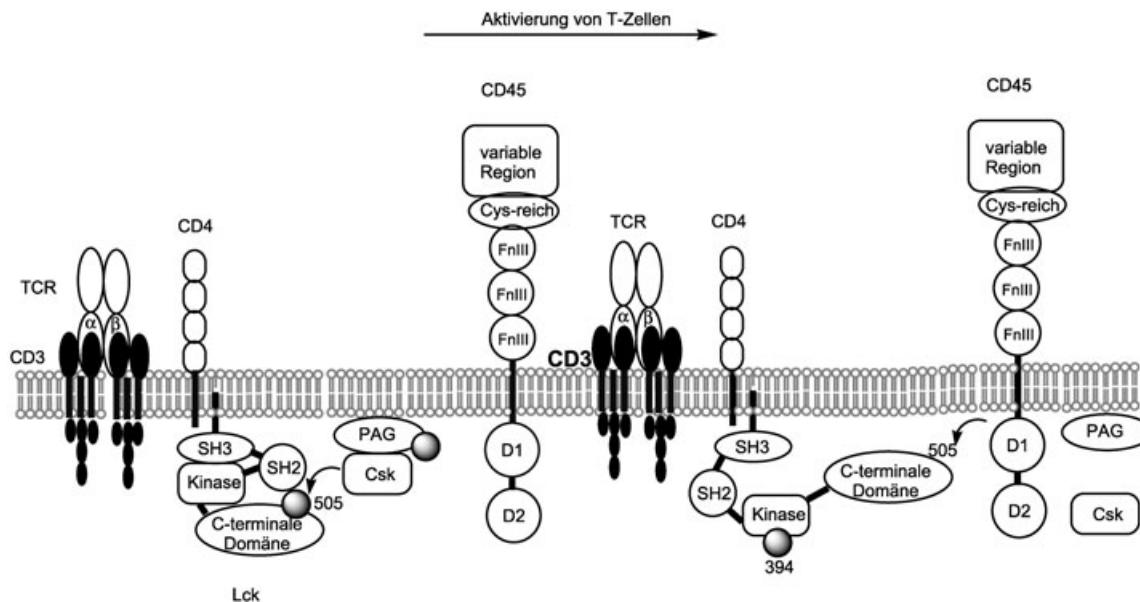


Abbildung 4. Die Rolle von CD45 bei der Signaltransduktion in T-Zellen.

inhibitorischen Restes Tyr505 aktiviert (Abbildung 4). Im inaktiven Zustand wird dieser Rest durch die Kinase Csk phosphoryliert gehalten. Csk ist über eine SH2-Domäne mit dem Transmembranphosphoprotein PAG verbunden (PAG ist ein mit Glycosphingolipid angereicherten Mikrodomänen assoziiertes Phosphoprotein).^[106] Durch die Zellaktivierung wird PAG dephosphoryliert und Csk wird in das Zytosol freigesetzt, sodass es nicht mehr in der Lage ist, den Tyr505-Rest von Lck in seiner phosphorylierten Form zu halten. CD45 kann nun mit der SH2-Domäne und der N-terminalen Region von Lck assoziieren. Nach der Dephosphorylierung durch CD45 ist Tyr505 nicht mehr an die intramolekulare SH2-Domäne gebunden, was eine deutliche Konformationsänderung bei Lck verursacht. Die nun zugänglich gewordene SH2-Domäne ist in der Lage, Phosphoprotein-Substrate zu binden. Darüber hinaus ermöglicht die Konformationsänderung die Auto- und Transphosphorylierung des Restes Tyr394 von Lck, was wiederum eine räumliche Verlagerung der Aktivierungsschleife verursacht und einen weiter geöffneten katalytischen Spalt erzeugt.^[12] Interessanterweise hat CD45 auch eine negativ regulierende Funktion, indem sie Tyr394 dephosphoryliert und so zum Verlust der Lck-Aktivität führt.^[12]

Ähnliche stimulatorische Wirkungen zeigt CD45 auch bei anderen Src-Kinasen, z.B. Lyn in B-Zellen.^[107] Daneben beteiligen sich RPTPs aber auch an der Inhibition von Kinasen, z.B. CD45 bei Janus-Kinasen^[12,108] oder LAR bei der Signaltransduktion über Insulinrezeptoren.^[109] RPTPs scheinen an sehr vielfältigen Prozessen, wie der Zelladhäsion,^[103] der neuronalen Entwicklung^[110] oder an Ionenkanalvermittelten Vorgängen beteiligt zu sein.^[111] Auf besonderes Interesse stieß der Befund, dass eine Inhibition von CD45, z.B. durch Antikörper, die Aktivierung von T-Zellen *in vitro*^[112] und die Transplantatabstoßung in Mäusen blockiert.^[113] Selektive Inhibitoren von CD45 könnten daher Anwendung bei der Behandlung von Autoimmunkrankheiten und in der Transplantationsmedizin finden. Eine verminderte CD45-Expression und/oder -Aktivität wurde bei SLE-Patienten festgestellt.^[9] Eine Punktmutation im CD45-Gen (*ptprc*) wurde mit Autoimmunkrankheiten wie Multipler Sklerose^[113] und autoimmuner Hepatitis in Zusammenhang gebracht.^[114] Darüber hinaus kann eine Modulation der CD45-Aktivität durch Antikörper die Bildung von Alzheimer-Plaques hemmen.^[15] Die negativ regulierende Funktion von CD45 in der Signaltransduktion über Cytokinrezeptoren könnte der Grund dafür sein, dass bei verschiedenen Krebsarten wie Leukämie ein Verlust an CD45-Aktivität auftritt.^[115] CD45 wurde mit der Proliferation von Myelomzellen korreliert und kommt somit als therapeutisches Target für die Behandlung von multiplen Myelomen infrage.^[33]

7. PTP-Inhibitoren

Im Folgenden wird die Entwicklung von PTP-Inhibitoren diskutiert. Es werden nur solche Inhibitoren berücksichtigt, die auch zelluläre Aktivität zeigen, was nicht immer mit Phosphatase-Inhibition *in vitro* korrelieren muss.

7.1. Unspezifische und anorganische PTP-Inhibitoren

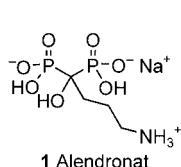
Vanadate sind als unspezifische Phosphatase-Inhibitoren eingesetzt worden. Ihre Wirkung beruht darauf, dass sie die Phosphatgruppe der natürlichen Enzymsubstrate imitieren. Vanadate wirken als Insulin-Mimetika und antimetastatisch.^[116] Andere Verbindungen wie Stickstoffmonoxid oder Phenylarsenoxid erzielen ihren pharmakologischen Effekt zwar in erster Linie durch Phosphatase-Inhibition,^[117] können aber auch andere Enzyme angreifen, was ihren therapeutischen Nutzen deutlich einschränkt.

7.2. Naturstoffe und Naturstoffderivate als PTP-Inhibitoren

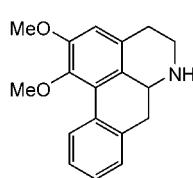
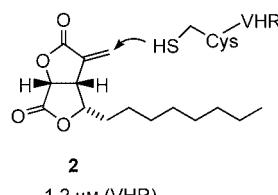
Naturstoffe liefern eine reiche Auswahl an PTP-Inhibitoren und dienten vielfach als Ausgangspunkt für die Entwicklung synthetischer Analoga. 4-Isoavenaciolid (**2**, Abbildung 5) wurde aus einer Pilzkultur isoliert und als ein irreversibler Inhibitor von VHR mit einem IC_{50} von 1.2 μM identifiziert.^[118] Einige andere Phosphatasen wie Cdc25B, Laforin und PTP1B wurden ähnlich wirksam inhibiert, CD45 und Serin/Threonin-Phosphatasen, wie PP2A oder PP1, jedoch überhaupt nicht. Eine Untersuchung des Inhibitionsmechanismus ergab, dass zwei Inhibitormoleküle kovalent an zwei der vier Cysteinreste von VHR binden, nämlich an Cys124 in der aktiven Bindungstasche und Cys171 an der Proteinoberfläche. Die Ergebnisse führten zu dem Vorschlag, dass ein hydrophober Spalt in der Nähe des Cysteinrestes für eine effiziente Bindung notwendig ist.

Das Alkaloid Nornuciferin (**3**) inhibiert CD45 mit einem IC_{50} von 5.3 μM . Die vom T-Zell-Rezeptor abhängige Produktion von IL-2 wurde inhibiert, andere Phosphatasen wie Calcineurin (PP2B), alkalische Phosphatase und saure Phosphatase hingegen nicht.^[119] Nornuciferin erwies sich als wirksam gegen Leishmaniose,^[120] und man nimmt an, dass es der antidepressiv wirkende Bestandteil in der Frucht der Stachel-Annone (*Annona muricata*) ist.^[121] Totalsynthesen von Nornuciferin und ähnlichen Verbindungen wurden beschrieben.^[122]

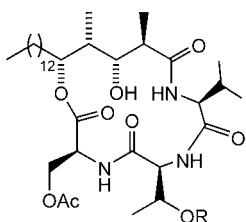
Eine interessante Klasse von Depsipeptiden, die Stevasteline (z.B. **4a–c**), wurde aus *Penicillium*-Spezies isoliert. Es sind immunsuppressive Wirkstoffe, die die Proliferation von T-Zellen inhibieren.^[123] Ihre Wirkung beruht darauf, dass sie die dualspezifische Phosphatase VHR inhibieren und dadurch die Zellzyklusprogression hemmen. Basierend auf einer kleinen Gruppe von Analoga wurde eine Struktur-Aktivitäts-Beziehung aufgestellt. Dabei stellte sich heraus, dass die lange Alkylseitenkette und die freie Hydroxygruppe des Threonins (Stevasteline vom Typ A; **4c**) für eine Aktivität gegen Jurkat-Zellen essenziell sind. Eine Derivatisierung der Hydroxygruppe durch Sulfatierung (**4a**) oder Phosphorylierung (**4b**) unterband jegliche inhibitorische Wirkung gegen IL-2- und IL-6-abhängige Genexpression in Jurkat-Zellen *in vivo*. Demgegenüber zeigten die sulfatierten Verbindungen (Typ A) *in vitro* eine gute inhibitorische Wirkung gegen VHR im mikromolaren Bereich, nicht aber gegen die PTP CD45 und die PTPs PP2A und PP2B. Die Inhibitorwirkung der desulfatierten Verbindungen gegen VHR war um eine



PTP-ε (2 μM),
Behandlung von Osteoporose

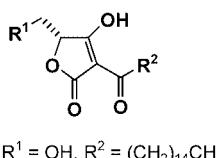


inhibiert die vom T-Zell-Rezeptor
vermittelte Produktion von IL-2



4b: R = PO₃H
4 μM (VHR)
> 25 μM (zelluläre Aktivität)

4c: R = H
19.8 μM (VHR)
4.6 μM (zelluläre Aktivität)
immunsuppressiv



5a: R¹ = OH, R² = (CH₂)₁₄CH₃
11.6 μM (VHR)

5b: R¹ = C(=N₂)-COOCH₂CH₃,
R² = (CH₂)₁₄CH₃
0.4 μM (Cdc25B)

Zellzyklus-Inhibitor

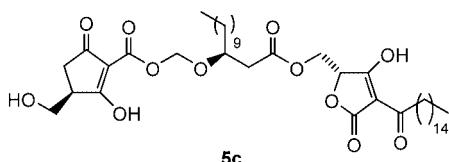


Abbildung 5. Aus Naturstoffen abgeleitete PTP-Inhibitoren. Die IC₅₀-Werte sind für alle Verbindungen angegeben, soweit nicht anders vermerkt.

Größenordnung geringer. Die Autoren erklären diesen Befund so, dass die Verbindungen nach der Aufnahme der ungeladenen Formen (Typ B) in die Zelle durch zelluläre Enzyme am Threoninrest phosphoryliert oder sulfatiert werden. Als nicht Calcineurin-abhängige Immunsuppressoren waren die Stevasteline das Ziel mehrerer Totalsynthesen.^[124]

Das Tetronsäure-Derivat RK-682 (**5a**) wurde aus einem *Streptomyces*-Stamm isoliert und erwies sich als kompetitiver Inhibitor der DSPs VHR und CD45. Es arretiert den Zellzyklus von Säugerzellen in der G₁-Phase.^[125] Eine aus der Untersuchung mehrerer Derivate abgeleitete Struktur-Aktivitäts-Beziehung zeigte, dass die hoch acide 3-Acyltetronsäuregruppe als Phosphat-Mimetikum fungiert.^[126] Als wichtig für die inhibitorische Wirkung gegen VHR erwiesen sich die hydrophobe Seitenkette an C-3 und die enolische

Hydroxygruppe an C-4. Das Entfernen der Hydroxygruppe im C-5-Substituenten hatte hingegen keinen Einfluss auf die Inhibition. Keines der Derivate zeigte eine Wirkung gegen die PTPs PP1, PP2A und PP2C. Einige Derivate inhibierten im submikromolaren Bereich Cdc25B und im mikromolaren Bereich VHR. Bemerkenswerterweise zeigte **5b** eine gewisse Selektivität für Cdc25B (IC₅₀ = 0.4 μM) gegenüber VHR (IC₅₀ = 12.4 μM) oder PTP-S2 (IC₅₀ > 100 μM), während bei **5a** eine umgekehrte Selektivität festgestellt wurde (IC₅₀ = 11.6 μM (VHR) und > 100 μM (Cdc25B)).^[127] Dieses Beispiel verdeutlicht, wie sich Selektivität für verwandte Enzyme innerhalb einer Naturstoffbibliothek fein abstimmen lässt. Auf der Grundlage von Molecular-Modeling-Studien, der Kristallstruktur von VHR und einer detaillierten kinetischen Analyse wurde ein Modell vorgeschlagen, in dem das Anion der Acyltetrosäure als Phosphat-Mimetikum mit mehreren Wasserstoffbrücken an die Schleife des aktiven Zentrums (Cys124–Arg130) bindet. Ein zweites Tetronsäuremolekül ist an der Inhibition beteiligt und wechselwirkt mit Arg158.^[128] Beide C₃-Alkylseitenketten wechselwirken mit der hydrophoben Furche des Enzyms (Abbildung 6). Ausgehend von diesem Modell wurde ein dimerer Inhibitor **5c** entworfen (Abbildung 5), der VHR stärker inhibiert als der Naturstoff

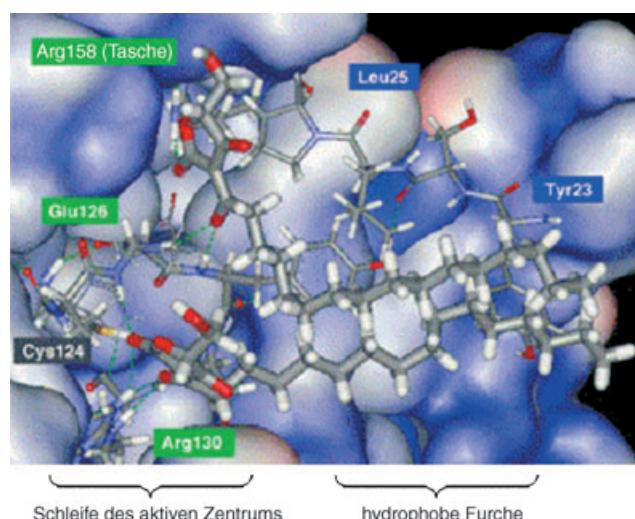


Abbildung 6. Bindung zweier Moleküle von **5a** an VHR (aus Lit. [128] mit Genehmigung).

(IC₅₀ = 1.83 μM). Interessant ist auch die Tatsache, dass die Umgebung des an der Bindung der zweiten Tetronsäure beteiligten Arginins (Arg158) bei unterschiedlichen Phosphatasen wenig konserviert ist. Dieser neue Typ dimerer Inhibitoren könnte sich sehr gut als Ausgangspunkt für die Entwicklung neuer, hoch selektiver Proteinphosphatase-Inhibitoren eignen.

Ein weiterer hoch interessanter Naturstoff, Dysidiolid (siehe das 6-Epimer **6**), wurde 1996 aus dem marinem Schwamm *Dysidea etheria* isoliert (Abbildung 7).^[129] Dysidiolid ist ein Sesterterpen mit einer γ-Hydroxybutenolidgruppe und wirkt als Inhibitor von Cdc25A (IC₅₀ 9.4 μM). Andere

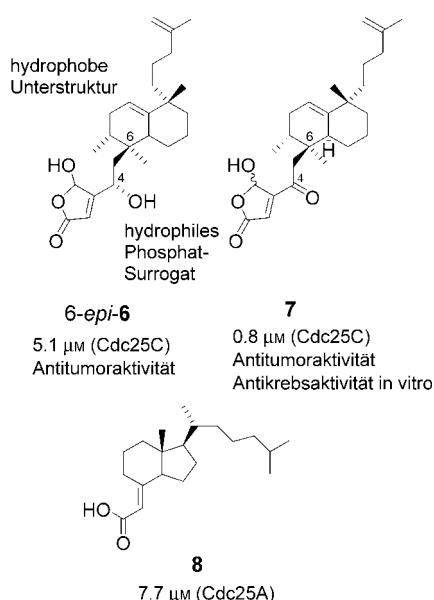


Abbildung 7. Von Dysidiolid abgeleitete Inhibitoren; IC₅₀-Werte sind angegeben.

Phosphatasen wie Calcineurin, CD45 und LAR werden bei dieser Konzentration nicht inhibiert. Dysidiolid inhibiert in mikromolaren Konzentrationen das Wachstum der Lungenkarzinomzellen A-459 und der murinen Leukämiezellen P388. Dass Dysidiolid als Phosphatase-Inhibitor wirkt, wurde allerdings in einer späteren Arbeit angezweifelt. Es wurde stattdessen der Schluss gezogen, dass eine nicht identifizierte Verunreinigung die inhibitorische Aktivität verursacht.^[130] Mehrere Totalsynthesen^[131] und Synthesen einfacher Analoga^[132] des Dysidiolids und eine Reihe ähnlicher Naturstoffe mit Antitumoraktivität wurden beschrieben.^[133] Aufbauend auf der Totalsynthese von Dysidiolid synthetisierten Shirai und Mitarbeiter eine Reihe von Analoga des Naturstoffs in Lösung.^[134] Untersuchungen an dieser Verbindungsreihe zeigten, dass ein Ersetzen der bicyclischen Struktur durch einen Cyclohexanring zum Verlust der Aktivität führt. Eine Änderung der Konfiguration an C-4 und C-6 hatte keinen Einfluss auf die Aktivität. Offenbar ist die Orientierung der Hydroxybutenolid-Einheit relativ zum hydrophoben Teil nicht ausschlaggebend. Einige dieser Diastereomere inhibierten Cdc25A und Cdc25B sogar stärker als der Naturstoff.

Berichtet wurde auch über die kombinatorische Synthese einer kleinen Bibliothek von Dysidiolid-Analoga an der festen Phase. Die Bibliothek wurde gegen Cdc25C und mehrere Krebszelllinien getestet, darunter die Dickdarmkrebszelllinie HCT116, die Prostatakrebszelllinie PC3 und die Brustkrebszelllinie MDA-MB231.^[135] Zu den Schlüsselschritten der Synthese gehören eine asymmetrische Diels-Alder-Reaktion zum Aufbau der bicyclischen hydrophoben Unterstruktur und die Oxidation eines Furanringes zur γ -Hydroxybutenolid-Einheit durch Singulett-Sauerstoff. Zur Bindung an den festen Träger wurde ein spurloser Linker entwickelt, der durch Ringschlussmetathese gespalten wird.

Mit dieser kombinatorischen Strategie wurden Inhibitoren für Cdc25C erhalten, die wirksamer sind als das natürliche *epi*-Dysidiolid (IC₅₀ = 5.1 μM), z.B. das Keton **7** (IC₅₀ = 0.8 μM) (Abbildung 7). Diese Analoga zeigten im mikromolaren Bereich auch eine Wirkung gegen Tumorzelllinien in vitro, die Aktivität korrelierte allerdings nicht streng mit der Phosphatase-Inhibition.

Bereits in der ersten Veröffentlichung zur Isolierung und Strukturbestimmung von Dysidiolid war die Vermutung geäußert worden, dass die Hydroxybutenolid-Einheit ein nichtionisches Phosphat-Surrogat ist und das Decalingerüst einschließlich Alkylseitenkette hydrophobe Wechselwirkungen mit dem Enzym eingeht. Basierend auf dieser Hypothese beschrieben Shirai et al. vereinfachte Analoga des Naturstoffs, die ausgehend von Vitamin D₃ synthetisiert wurden und statt der Hydroxybutenolidgruppe eine Carbonsäurefunktion enthielten. Unter diesen Verbindungen zeigte das Derivat **8** im mikromolaren Bereich Inhibitorwirkung gegen Cdc25A und Antitumoraktivitäten, die mit denen des Naturstoffs vergleichbar waren (Abbildung 7).^[132a]

Einen interessanten Ansatz zur Synthese mikromolaler Inhibitoren ähnlicher Strukturen beschrieben Zalkow et al. (Abbildung 8). Nach Siliciumdioxid-vermittelter Pyrolyse des Azids **9**, das seinerseits aus Cholesterylacetat synthetisiert wurde, wurden zehn Verbindungen isoliert und durch chemische Umsetzung in eine Serie von Analoga überführt. Unter diesen wurde das Nitril **10** als reversibler, nichtkompetitiver Inhibitor von Cdc25A–C (IC₅₀ = 2.2, 8.3, 12.2 μM) identifiziert. Die Autoren postulierten, dass die Cyangruppe an einen

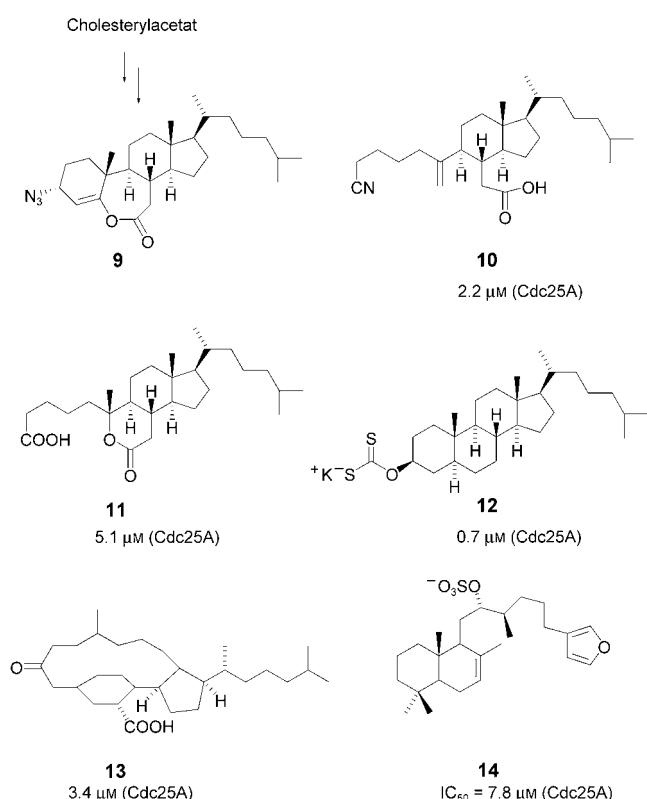


Abbildung 8. Vom Cholesterin abgeleitete PTP-Inhibitoren **9–13** und der Naturstoff Sulfircin (**14**); IC₅₀-Werte sind angegeben.

Argininrest außerhalb des Substratbindungsentrums bindet. Das Nitril **10** inhibierte auch CD45, während die Carbonsäure **11** und das *O*-Cholestanylxonanth **12** eine hohe Selektivität für Cdc25A ($IC_{50} = 5.1$ (**11**), $0.7 \mu\text{M}$ (**12**)) gegenüber CD45 ($IC_{50} > 100 \mu\text{M}$) zeigten.^[132b] Die meisten der Verbindungen zeigten *in vitro* eine inhibierende Wirkung gegen Krebszelllinien, es konnte aber keine eindeutige Korrelation mit der Inhibition von Phosphatasen hergeleitet werden. Demnach erwiesen sich einfache steroidale Derivate wie **12**, das mit einer Phosphatursurrogatkette funktionalisiert ist, zwar als sehr gute Phosphatase-Hemmer, ihre inhibierende Wirkung gegen Tumorzellwachstum war jedoch schwächer ausgeprägt als die Wirkung komplexerer Strukturen wie **11**. Die Autoren nahmen an, dass eine mangelhafte zelluläre Aufnahme und metabolischer Abbau die Antikrebsaktivität dieser Phosphatase-Inhibitoren beeinträchtigen.

Forscher bei Schering synthetisierten eine Reihe von mikromolaren Cdc25B-Inhibitoren mit sehr starrem makrocyclischem Gerüst.^[136] Am wirksamsten erwies sich das Derivat **13** mit einem IC_{50} von $5.6 \mu\text{M}$ (Abbildung 8). Es wurde angenommen, dass die Ketofunktion als Phosphat-Mimetikum fungiert und die Carboxygruppe an die Seitenketten von Arg544 oder von Arg482 bindet, die beide das Bindzentrum flankieren.

Der aus einem Schwamm isolierte Naturstoff Sulfircin (**14**, Abbildung 8)^[137] inhibierte Cdc25A mit einem IC_{50} -Wert von $7.8 \mu\text{M}$, die Selektivität bezüglich der Inhibition anderer PTPs war jedoch mäßig. Von Sulfircin wurden Analoga synthetisiert, wobei unter anderem die Sulfatgruppe durch eine Malonatgruppe ersetzt wurde.^[138]

Die Dnacine A1 und B1 (**15a** und **15b**, Abbildung 9), zwei Naphthyridinomycin-artige Antibiotika mit Antitumoraktivität, wurden aus *Actinomycetes*-Stämmen isoliert.^[139] Sie sind

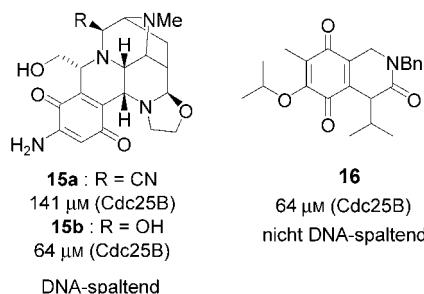


Abbildung 9. Dnacine A1 und B1 sowie eine vereinfachte Teilstruktur; IC_{50} -Werte sind angegeben.

schwache nichtkompetitive Inhibitoren von Cdc25B ($IC_{50} = 141 \mu\text{M}$ und $64 \mu\text{M}$),^[139] die durch ihre Fähigkeit zur Erzeugung von Superoxidradikalen außerdem DNA-spaltend wirken. Wipf und Mitarbeiter synthetisierten Dnacine-Derivate wie **16**, deren Wirkung als mikromolare Inhibitoren von PTPs aufrechterhalten blieb, die jedoch keine DNA-spaltende Aktivität mehr aufwiesen. Auf diese Weise gelang es den Autoren, die beiden biologischen Mechanismen dieser Verbindungsklasse zu „separieren“.^[140] Auch PTP1B, VHR, Cdc25A und Cdc25B wurden durch Derivate dieses Typs

inhibiert. Zwei Verbindungen zeigten außerdem Selektivität für Cdc25 und PTP1B gegenüber VHR. Aus den Ergebnissen wurde geschlossen, dass fragmentierte Derivate, denen die verbrückende Piperidin-Einheit fehlt, geeignete Leitverbindungen für die Entwicklung neuer Cdc25-Inhibitoren ohne DNA-spaltende Aktivität sind.

Eine neue Leitverbindung für die Entwicklung von PTP-Inhibitoren wurde von dem Antitumorwirkstoff TMC-69, einem 2-Pyridon, abgeleitet.^[141a-c] Biologische Tests der hydrierten Enantiomere (*17S*)-**17** und (*17R*)-**17** (Abbildung 10) zeigten entgegen früherer Studien eine moderate (d.h. mikromolare) inhibierende Wirkung gegen PTP1B, VHR und PP1 sowie eine geringe Wirkung gegen Cdc25A.^[141d]

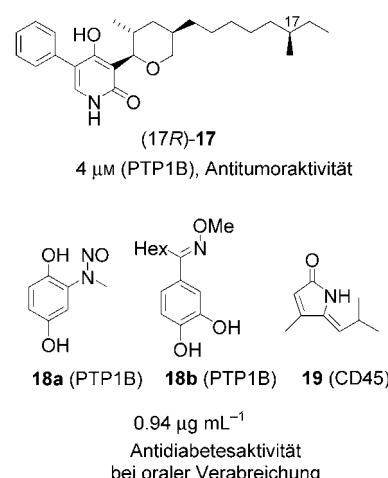


Abbildung 10. Analoga des antitumoral wirkenden 2-Pyridons TMC-69 sind PTP-Inhibitoren; IC_{50} -Werte sind angegeben.

Der Naturstoff Dephostatin (**18a**) wurde als mikromolarer kompetitiver PTP-Inhibitor in bestimmten *Streptomyces*-Spezies identifiziert.^[142a,b] Mithilfe von Molecular Modeling wurden später selektivere und stabilere Analoga ohne die potenziell carcinogene Nitrosamin-Einheit entworfen. CH- π -Wechselwirkungen der Alkylseitenkette spielen vermutlich eine wichtige Rolle bei der Bindung dieser als Tyrosin-Mimetika fungierenden Inhibitoren. Der beste Inhibitor, **18b**, wirkt mikromolar gegen PTP1B ($IC_{50} = 0.94 \mu\text{g mL}^{-1}$). Die Inhibitoren zeigen außerdem eine moderate Selektivität für PTP1B und SHPTP1 (30fach gegenüber CD45, mehr als 100fach gegenüber LAR). Von großer Bedeutung ist, dass die Verbindungen orale antidiabetische Wirkung in Mäusen zeigen, die auf einer Herunterregulierung hoher Blutglucosewerte basiert, ohne von schwerwiegenden toxischen Effekten begleitet zu sein.^[142c]

1997 isolierten Alvi et al. einen Naturstoff mit inhibitiver Wirkung gegen CD45 aus dem marinen Pilz *Corollospora pulchella*: das Pulchellalactam (**19**).^[143] Es enthält ein 3-Pyrrol-2-on als Kernstruktur und könnte ein interessantes Pharmakophor für die Entwicklung von Phosphatase-Inhibitoren sein.

Bei einer kürzlich veröffentlichten Studie wurden mehrere Glycolipide, darunter Glucolipin A, Cycloviracin B₁,

Caloporosid, Woodrosin I, Sophorolipid, Tricolorin G und einige Analoga, auf ihre Wirkung gegen die Phosphatasen PTP1B und Cdc25A getestet.^[144] Die meisten dieser Verbindungen (einige sind in Abbildung 11 dargestellt; **20–22**)

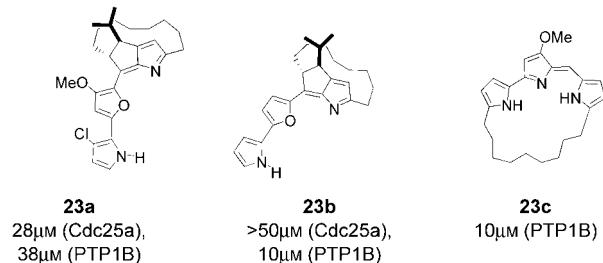
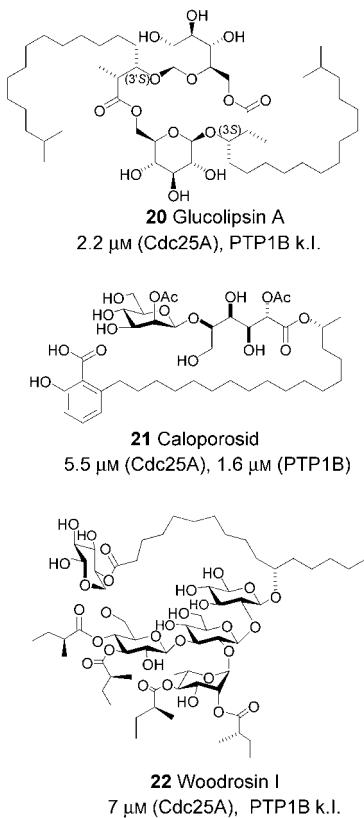


Abbildung 11. Strukturen von Glycolipiden und Alkaloiden, die als Phosphatase-Inhibitoren identifiziert wurden; IC₅₀-Werte sind angegeben. k.l.=keine Inhibition.

zeigten sich als mikromolare Inhibitoren von Cdc25A, während PTP1B nicht inhibiert wurde. Diese Ergebnisse überraschten, da Glycolipide bis dahin nicht als Phosphatase-Inhibitoren identifiziert worden waren. Analoga und Syntheseverstufen der Naturstoffe Roseophilin und der Prodigiosine^[145] wurden als Inhibitoren von Cdc25A, PTP1B und VHR identifiziert (**23a–c**; Abbildung 11). Obgleich keine der Verbindungen PP1 inhibierte, wurden einige mikromolare Phosphatase-Inhibitoren gefunden, was einmal mehr verdeutlicht, wie nützlich natürliche Verbindungen als Startpunkte zur Identifizierung von Phosphatase-Inhibitoren sind.^[146]

7.3. Mechanismusbasierte niedermolekulare Inhibitoren

Rationale Ansätze wie das auf der Grundlage von Röntgenkristallstrukturen von PTPs durchgeführte Molecular Modeling wurden erfolgreich zur Entwicklung von PTP-Inhibitoren angewendet. Ein Großteil dieser Arbeiten befasste sich mit der Entwicklung kompetitiver Inhibitoren mit einer nichthydrolysierbaren Phosphotyrosin-imitierenden Gruppe.

7.3.1. Nichthydrolysierbare Tyrosinphosphat-Mimetika

Ein rationales Konzept zum Design kompetitiver PTP-Inhibitoren basiert auf dem Ersatz des Phosphatteils peptidischer Substrate durch nichthydrolysierbare Phosphat-Mimetika. Mit diesem Ansatz wurden mehrere einfache anionische Strukturen entwickelt und erfolgreich für die Entwicklung von PTP-Inhibitoren verwendet. Die Phosphotyrosylgruppe wurde hierbei durch folgende Gruppen ersetzt: Sulfotyrosyl,^[147a] Thiophosphoryltyrosyl,^[147b] O-Dithiophosphoryltyrosyl,^[147c] O-Boranophosphoryltyrosyl,^[147c] Phosphonomethylphenylalanin (Pmp),^[147d] O-Malonyltyrosyl,^[147e] Fluor-O-malonyltyrosyl^[147f] und – mit den besten Resultaten – Difluorophosphonomethylphenylalanin (F₂Pmp).^[147g] Bei dem zuletzt genannten F₂Pmp-Derivat bilden die Fluoratome Wasserstoffbrücken mit NH-Bindungen der PTP, wodurch die Affinität um mehrere Größenordnungen erhöht wird.^[147h]

In frühen Ansätzen zum Inhibitor-Design fungierten peptidische Strukturen als Templat für die Phosphotyrosin-Mimetika. Ein Beispiel ist das von Burke et al. entwickelte Hexapeptid Asp-Ala-Asp-Glu-F₂Pmp-Leu-NH₂, das PTP1B mit einem IC₅₀ von 0.2 μM inhibiert.^[147g] Peptide sind jedoch im Allgemeinen schlechte Kandidaten für die Wirkstoffentwicklung, hauptsächlich wegen ihrer Anfälligkeit gegen Proteaseabbau und mangelhaften Zellmembranpermeabilität. Interessanterweise haben schon einfache aromatische Difluormethylphosphonate eine schwache inhibierende Wirkung auf PTPs und zeigen außerdem biologische Aktivität, etwa bei der Gefäßneubildung.^[148] Biphenyl- und Naphthylderivate wirken stärker als Phenylderivate, da die hydrophoben Wechselwirkungen eine wichtige Rolle bei der Stabilisierung der Inhibitor-Enzym-Wechselwirkungen spielen.^[149]

Der Hauptnachteil dieser zweifach negativ geladenen Phosphotyrosin-Mimetika ist ihre inhärent mangelhafte Zellmembranpermeabilität.^[150] Tatsächlich erweisen sich die meisten dieser Verbindungen trotz einer stark inhibierenden Wirkung auf Phosphatasen *in vitro* in zellbasierten Tests als biologisch inaktiv. Infolgedessen investierten akademische und pharmazeutisch-industrielle Arbeitsgruppen beträchtliche Forschungsaktivitäten in die Entwicklung nichtpeptidischer niedermolekularer PTP-Inhibitoren (insbesondere von PTP1B) mit starker „wirkstoffartigem“ Charakter und weniger negativ geladenen Phosphotyrosin-imitierenden Gruppen.^[4] Im folgenden Abschnitt werden einige auf diese Weise entwickelte Inhibitoren mit Schwerpunkt auf neueren Fortschritten diskutiert.

Forscher bei Merck Frosst entwickelten mehrere Difluormethylphosphonate mit Desoxybenzoin-Seitenketten, die als sehr starke (nanomolare) Inhibitoren von PTP1B wirkten

und, etwas überraschend, zelluläre Aktivität zeigten. Unter diesen zeichnete sich vor allem das Derivat **24** (Abbildung 12), das einen *ortho*-Brom-Substituenten am Phenylring enthält, durch seine orale Bioverfügbarkeit und glucosesenkende Wirkung in Rattenmodellen aus.^[151] Leider wurde nur

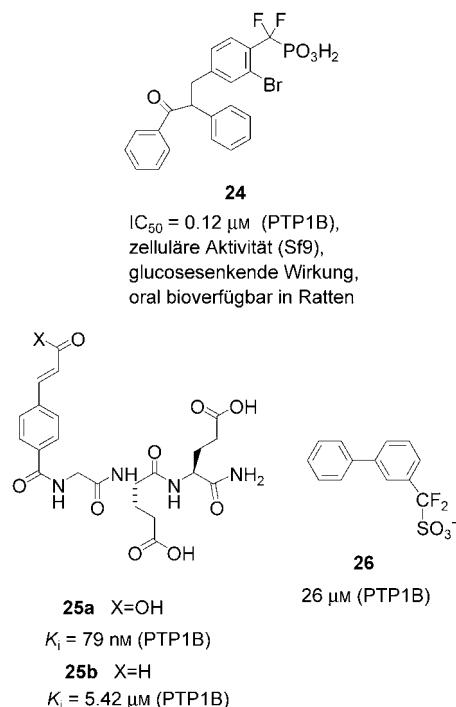


Abbildung 12. Zimtaldehyde, Zimtsäuren und Difluormethylen sulfonsäuren wirken als Phosphotyrosyl-Mimetika.

eine schwache Selektivität gegenüber der nahe verwandten Phosphatase TCPTP beobachtet. Aufgrund mangelnder Informationen zum Bindungsmechanismus dieser Inhibitoren konnte keine Verbesserung der Selektivität erzielt werden.

Moran et al. zeigten, dass mit einer Tripeptid-Einheit versehene Zimtsäure-Derivate (z.B. **25a**; Abbildung 12) wirksame Inhibitoren sind ($K_i = 79 \text{ nM}$ bezüglich PTP1B).^[152] Allerdings wird vermutet, dass diese Strukturen die Enzyme kovalent modifizieren, was in der Wirkstoffentwicklung meist unerwünscht ist. Pei et al. berichteten anschließend über verwandte Zimtsäurealdehyde (z.B. **25b**), die als mikromolare Inhibitoren von PTP1B und der katalytischen Domäne von SHP-1 wirkten, die dualspezifische Phosphatase VHR jedoch nur schwach inhibierten.^[153] Überraschenderweise agiert **25b** als Aktivator von SHP-1, indem es an die inhibitorische N-terminale SH2-Domäne des Enzyms bindet.^[154] NMR-Untersuchungen des Inhibitionsmechanismus legen nahe, dass die Aldehydgruppe und Arg221 von PTP1B reversibel ein Enamin bilden.

Taylor und Mitarbeiter beschrieben die Difluormethylen-sulfonsäure ($F_2\text{Smp}$) als ein monoanionisches Phosphatsurrogat und kuppelten sie mit Peptidstrukturen.^[155] Ein Vergleich mit anderen Phosphat-Mimetika im Produkt mit dem gleichen Peptidtemplat ergab, dass $F_2\text{Pmp}$ zwar weniger

wirksam ist als das bisanionische $F_2\text{Smp}$, mit der Wirkung anderer monoanionischer Surrogate aber konkurriert kann. Die gleiche Arbeitsgruppe synthetisierte auch mehrere einfache, nichtpeptidische aromatische Derivate mit IC_{50} -Werten zwischen 26 und 197 μM gegen PTP1B (z.B. **26**, Abbildung 12).

Forscher bei Pharmacia ersetzten die *O*-Malonyltyrosin-gruppe (**27a**) durch eine wirkungsvollere 2-Carboxymethoxybenzoësäuregruppe (**27b**) (Abbildung 13). Um die durch die schlechte Zellmembranpermeabilität verursachten Pro-

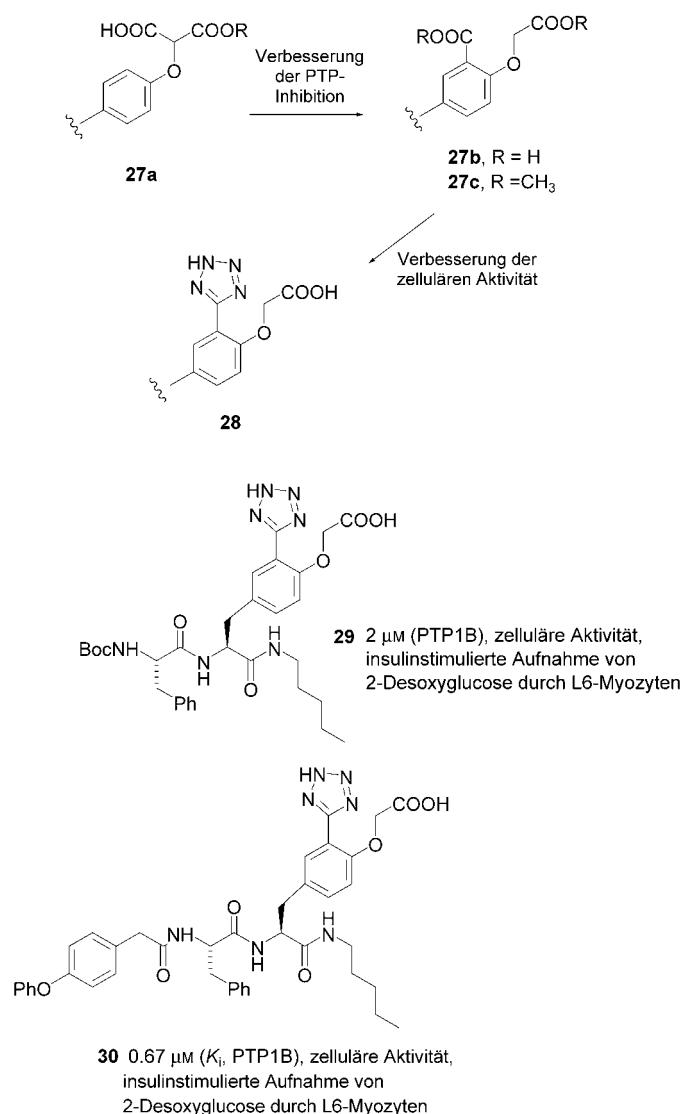


Abbildung 13. Verbesserung der PTP-Inhibition und zellulären Aktivität, ausgehend von *O*-Malonyltyrosiderivaten; die Tetrazolgruppe ist ein bewährtes Bioisosteres der Carbonsäuregruppe; K_i -Werte sind angegeben.

bleme zu beseitigen, wurde außerdem eine Carbonsäuregruppe von **27b** durch eine bioisostere Tetrazol-Einheit ersetzt (**28**).^[156] Die resultierende Verbindung **29** inhibierte PTP1B ($K_i = 2 \mu\text{M}$) und zeigte eine moderate zelluläre Aktivität (insulinstimulierte Aufnahme von 2-Desoxyglucose durch L6-Myozyten). Bei einem weiteren erfolgreichen

Ansatz wurde der entsprechende Diester **27c** als Prodrug eingesetzt. Dieser ist zellmembrangängiger als die Dicarbonäure und kann in der Zelle zur Freisetzung des aktiven PTP-Inhibitors enzymatisch gespalten werden.^[157] Durch Austausch der Boc-Gruppe in **29** durch Arylalkanoylgruppen erhielt man unter anderem den Inhibitor **30** mit submikromolaren K_i -Werten bezüglich PTP1B und einem verbesserten insulinstimulierten Glucosetransport durch L6-Myozyten bei 100 μM . Darüber hinaus zeigten die Verbindungen eine gewisse Selektivität bezüglich LAR und SHP-2.^[158]

Die Bindungsmechanismen dieser Inhibitoren wurden durch Röntgenstrukturanalysen untersucht (Abbildung 14).^[157] Das Peptidrückgrat nimmt die Konformation

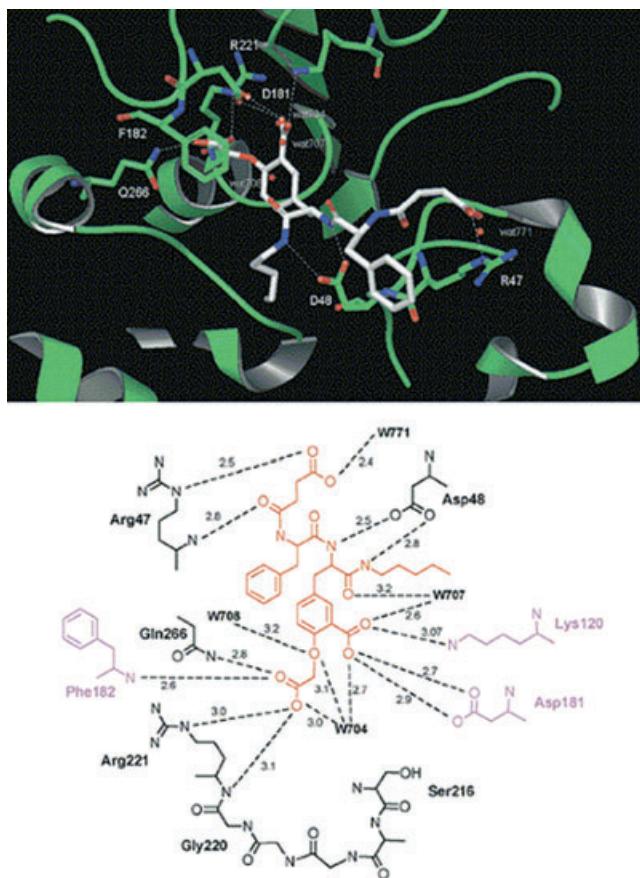
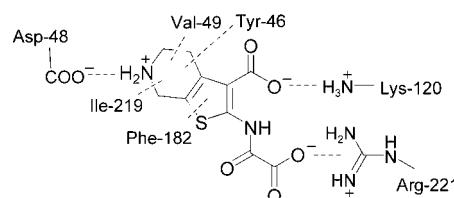
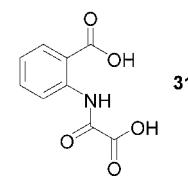
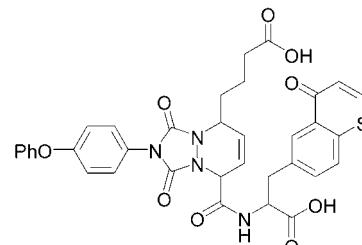


Abbildung 14. Bindung eines Inhibitors vom Typ **27b** (weiß) an das aktive Zentrum von PTP1B (grün); W = Wassermolekül (aus Lit. [157] mit Genehmigung).

eines β -Stranges an und bildet Wasserstoffbrücken zu Asp48 und Arg47 (PTP1B-Nummerierung). Die beiden Phenylringe gehen hydrophobe Wechselwirkungen mit den Seitenketten von Tyr46, Val49, Ala217, Ile219, Gln262 und Phe182 ein. Interessanterweise schließt sich bei der Bindung der Inhibitoren durch das Enzym die WPD-Schleife, ähnlich wie es bei der Bindung des Substrats geschieht. Die Carboxygruppen bilden Wasserstoffbrücken mit Wassermolekülen innerhalb des aktiven Zentrums und mit Amidgruppen und geraten dabei näher an die WPD-Schleife als die Phosphatgruppe von Substraten.



32 0.29 μM , Ethyldiester-Prodrug zeigt zelluläre Aktivität



33 75 % Inhibition (PTP1B, 10 μM)

Abbildung 15. Phosphotyrosin-Mimetika: bei Novo Nordisk und Molecumetics entwickelte Inhibitoren; IC_{50} -Werte sind angegeben.

PTP1B und gute orale Bioverfügbarkeit in Ratten zeigen.^[159] Die Röntgenstruktur von **32** im Komplex mit PTP1B zeigte, dass die Oxalylaminocarboxygruppe Wasserstoffbrücken mit den Amidstickstoffatomen in den Hauptketten von Gly220 und Arg221 sowie eine Salzbrücke mit der Guanidinium-Seitenkette von Arg221 bildet. Die andere Carboxygruppe bildet eine Salzbrücke mit Lys120. Bei der Bindung des Inhibitors schließt sich die WPD-Schleife, ähnlich wie bei der Bindung von Phosphotyrosin. In dieser Konformation bildet Phe182 günstige Aren-Aren-Wechselwirkungen mit dem Thiophenring von **32**, während der Tetrahydropyridinring mit Ile219, Val49 und Tyr46 wechselwirkt. Eine weitere bemerkenswerte Wechselwirkung tritt zwischen dem Stickstoffatom des Tetrahydropyridinrings und Asp48 auf. Viele andere Phosphatasen wie SHP-1, PTP α und LAR enthalten an dieser Stelle ein Asn, sodass mit dem gleichen Stickstoffatom eine abstoßende Wechselwirkung resultiert – ein Umstand, der zur PTP-Selektivität dieser Inhibitorklasse beiträgt. Mithilfe eines Prodrug-Ansatzes (Ethylester) wurde versucht, dem Problem der schlechten zellulären Aufnahme dieser hoch geladenen Verbindungen zu begegnen. Damit gelang es, die Verbindungen im oberen mikromolaren Bereich (100 μM) zellaktiv zu machen (Erhöhung der 2-Desoxyglucoseakkumulation bei C2C12-Zellen).

Das gleiche Phosphotyrosin-Mimetikum wurde von Forschern bei Abbott zur Entwicklung nanomolarer PTP1B-Inhibitoren verwendet (siehe Abschnitt 7.3.2).

Aufbauend auf früheren Arbeiten von Ham et al.^[160] entwarfen Forscher bei Molecumetics ein Phenylalaninderivat.^[161] Durch Kombination mit einer Bibliothek von Triazolo-pyridazin-Templaten mit β -Strang-Struktur wurden mikromolare, irreversibel wirkende Inhibitoren von PTP1B erhalten (z.B. **33**, Abbildung 15).

Forscher bei Wyeth-Ayerst entwickelten und optimierten PTP-Inhibitoren mit einem Benzofuran- oder einem Benzo-thiophenring. Die besten dieser Inhibitoren inhibierten PTP1B bei IC_{50} -Werten von 20 bis 50 nm, und einige der Verbindungen normalisierten den Plasmaglucosespiegel bei einer intraperitonealen Dosis von 1 mg kg^{-1} . Als die beste Verbindung in vivo erwies sich das Derivat **34** (Abbildung 16).^[162] Weiterhin zeigten die Verbindungen eine zehn-

(PTP1B) bilden, das normalerweise das Phosphat des Substrats bindet. Im weiteren Sinne wirkt diese Gruppe daher als Phosphat-Mimetikum. Der zur Carbonsäuregruppe proximale Biphenylring schiebt sich zwischen Tyr46 und Phe182, ähnlich wie der Phenylring von Phosphotyrosin bei der Substratbindung. Die weiteren Wechselwirkungen, die zu der hohen Affinität des Inhibitors beitragen, sind zum Großteil hydrophober Natur. Der zweite Biphenylring bindet an die Ammoniumgruppe in der Seitenkette von Lys120, während die 2-Benzylbenzofuran- oder 2-Benzylbenzo-thiophen-Einheit mit der Seitenkette von Lys116 und dem aromatischen Ring von Phe182 wechselwirkt.

In der gleichen Veröffentlichung wurde ein ähnlicher Verbindungstyp mit einer Salicylsäure-Einheit als der polaren Gruppe beschrieben (z.B. **35**; Abbildung 16). Interessanterweise zeigen diese einen anderen Bindungsmodus als die oben genannten Inhibitoren, wie Röntgenstrukturanalysen des Komplexes mit PTP1B ergaben. Ein Molekül **35** bildet Amid-Wasserstoffbrücken mit Lys120 und Tyr46 und wechseltwirkt mit einem zum Arg221 verbrückenden Wassermolekül. Verglichen mit dem Inhibitor **34** sind die hydrophoben Gruppen in die entgegengesetzte Richtung orientiert (Abbildung 17). Eine ähnliche Verbindung, Ertiprotafib (PTP-112,

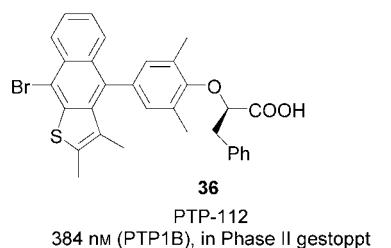
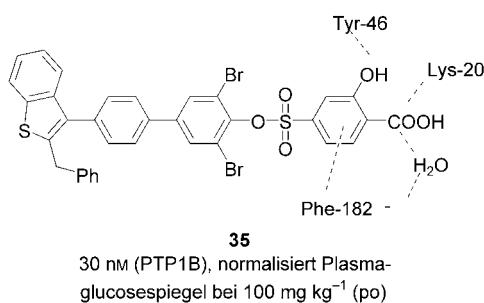
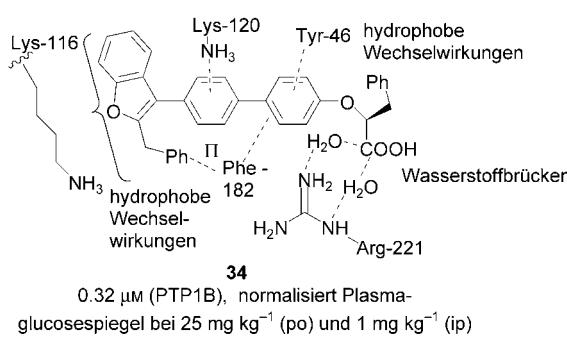


Abbildung 16. Von Benzofuran abgeleitete Carbonsäuren und ihre Wechselwirkungen mit den maßgeblichen Resten von PTP1B (po = peroral, ip = intraperitoneal).

bis hundertfache Selektivität gegenüber anderen PTPs. Basierend auf Röntgenstrukturdaten wurde ein Modell für den Bindungsmechanismus dieser Inhibitorklasse entwickelt. Demnach bindet die Carbonsäuregruppe an zwei Wassermoleküle, die eine Brücke zur Guanidinogruppe von Arg221

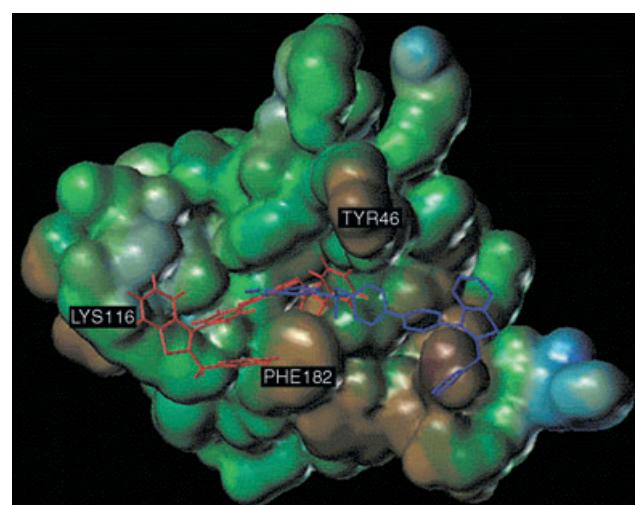
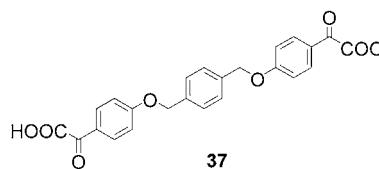


Abbildung 17. Unterschiedliche Bindungsmodi der Verbindungen vom Typ **34** (rot) und **35** (blau). Die Proteinoberfläche ist eingefärbt: lipophile Regionen sind braun, hydrophile Regionen blau und grün (aus Lit. [162] mit Genehmigung).

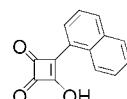
36, Abbildung 16), befand sich bei Wyeth als Wirkstoff gegen Diabetes Typ 2 in der Entwicklung. Die Entwicklung wurde jedoch 2002 in Phase II der klinischen Tests wegen unbefriedigender klinischer Wirksamkeit und dosislimitierender Nebenwirkungen eingestellt.^[4,63] Ertiprotafib erwies sich außerdem als PPAR-Modulator, und einige der biologischen Effekte könnten mit dieser Aktivität in Verbindung stehen.^[63b]

Ein weiteres Phosphat-Mimetikum, die α -Ketocarbonsäure, wurde von Seto und Mitarbeitern entwickelt.^[164] Durch Einbau dieser Struktur in Peptide wurden schwache Inhibitoren erhalten ($IC_{50} = 150 \mu\text{M}$ bezüglich PTP aus *Yersinia*). Weitaus höhere Affinitäten ergaben sich jedoch mit dimeren

Strukturen wie **37** (Abbildung 18).^[165] Der Einsatz von dimeren Phosphotyrosin-Mimetika wird im folgenden Abschnitt 7.3.2 ausführlich diskutiert. In der gleichen Arbeitsgruppe wurde entdeckt, dass auch Aryl-substituierte Quadratsäuren als Phosphotyrosin-Mimetika fungieren.^[166] Unter



0.7 μM (PTP aus *Yersinia*),
2.7 μM (PTP1B),
250 μM (LAR)



47 μM (PTP aus *Yersinia*),
400 μM (PTP1B)

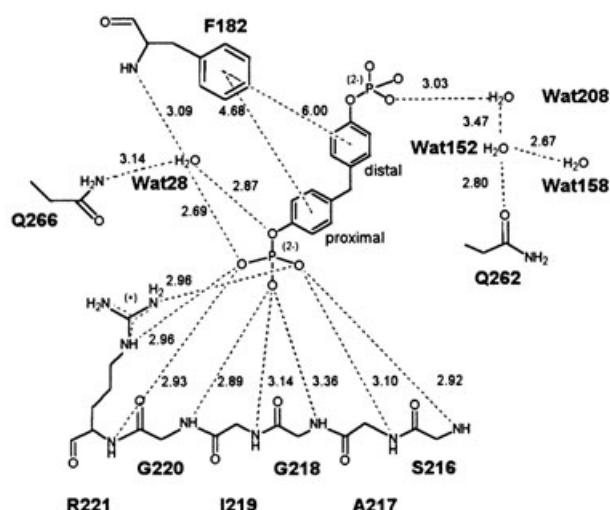
Abbildung 18. Phosphotyrosin-Mimetika: α -Ketocarbonsäuren und Quadratsäuren; IC₅₀-Werte sind angegeben.

den getesteten Verbindungen zeigte die Naphthyl-substituierte Quadratsäure **38** die stärkste inhibierende Wirkung (IC₅₀ = 47 μM gegen PTP aus *Yersinia*; Abbildung 18). Weiterhin ergab eine kinetische Analyse, dass die Verbindungen reversible kompetitive Inhibitoren sind, wodurch ihre Rolle als Phosphotyrosin-Mimetika bestätigt wurde.

7.3.2. „Zweizentrenbinder“ als selektive Inhibitoren von PTP1B

Ein Hauptproblem bei der Suche nach selektiven Inhibitoren für PTPs ist die hohe Sequenzhomologie der katalytischen Zentren bei unterschiedlichen Enzymen (bis zu 80 % Homologie bei TCPTP und PTP1B). Von besonderer Bedeutung ist daher die Entdeckung von Zhang und Mitarbeitern,^[167] die in der Nähe des aktiven Zentrums von PTP1B eine zweite, nichtkatalytische Bindungsstelle identifizierten, die eine geringere Sequenzhomologie innerhalb der Enzymklasse der Phosphatasen zeigt. Anhand der Kristallstruktur der katalytisch inaktiven PTP1B-Mutante (C215S) im Komplex mit den niedermolekularen Substraten Bis(*para*-phosphophenyl)methan oder Phosphotyrosin wurde gefunden, dass die Substrate an zwei Zentren des Enzyms binden können (Abbildung 19). Im katalytischen Zentrum bildet Phosphotyrosin ionische Wechselwirkungen mit Arg221, Wasserstoffbrücken mit den Stickstoffatomen in der Hauptkette von Ser216 und Arg221 sowie Aren-Aren-Wechselwirkungen mit Tyr46 und Phe182. Mit dem zweiten Bindungszentrum in der Nähe des katalytischen Zentrums bildet Phosphotyrosin ionische Wechselwirkungen mit Arg24 und Arg254, polare Wechselwirkungen mit Met258 und Gln262 sowie Van-der-Waals-Wechselwirkungen mit Ile219, Asp48 und Arg254.

a) BPPM A



b) BPPM B

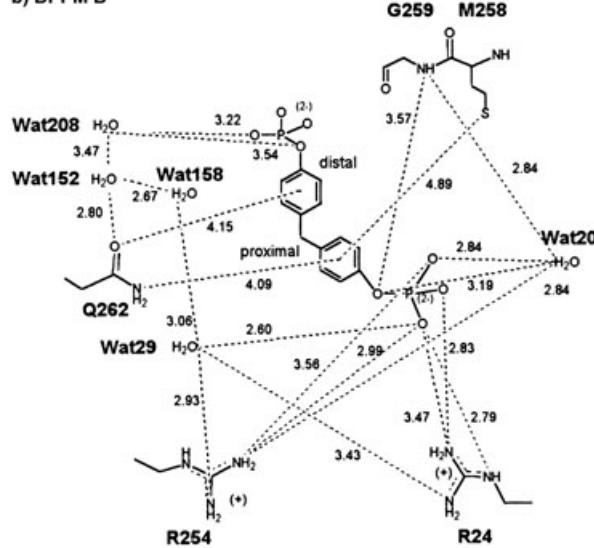


Abbildung 19. Der PTP1B-Inhibitor BPPM kann in zweierlei Weise an das Enzym binden, was auf das Vorliegen von zwei Bindungszentren für Arylphosphat in PTP1B schließen lässt: Der erste Bindungsmodus (a) ähnelt der Bindung des Phosphotyrosin-Substrats, beim zweiten Modus (b) sind Aminosäuren beteiligt, die innerhalb der Klasse der Phosphatasen weniger konserviert sind (aus Lit. [167a] mit Genehmigung).

Aus dieser Beobachtung ergeben sich neue Konzepte für das Ligandendesign, da das zweite Bindungszentrum für Arylphosphat innerhalb der Klasse der Phosphatasen weniger konserviert ist (abgesehen von Arg254 und Gln262, die sich in allen PTPs wiederfinden). Man kann annehmen, dass ein zweizähniger Ligand, der an beide Zentren bindet, einen potenziell selektiveren Inhibitor abgibt als klassische Verbindungen, die ausschließlich an das aktive Zentrum binden. Die Autoren wendeten dieses Konzept erfolgreich zur Entwicklung wirkungsvoller und bemerkenswert selektiver PTP1B-Inhibitoren an.^[167b] Zunächst wurde eine Bibliothek von 184 Verbindungen mit drei verschiedenen charakteristischen Do-

mänen synthetisiert: 1) einer unveränderlichen Arylphosphatgruppe, die an das aktive Zentrum bindet, 2) einer Aminosäure als Linker (23 Verbindungen) und 3) einer Einheit, die an das zweite Zentrum bindet (8 Verbindungen). Die Verbindungen der Bibliothek wurden auf ihre Bindung an die inaktive C215S-Mutante getestet. Ein Vorteil bei der Verwendung dieses Enzyms besteht darin, dass Inhibitoren, die aus dieser Studie hervorgingen, mit geringerer Wahrscheinlichkeit den katalytisch aktiven Cysteinrest irreversibel alkylieren oder oxidieren. Ein solches Verhalten wäre für die Wirkstoffentwicklung unerwünscht.^[168] Die am stärksten bindende Substanz wurde anschließend in ein nicht hydrolysierbares Phosphat-Mimetikum – das entsprechende Difluormethylphosphonat – umgewandelt. Die resultierende Verbindung **39** zeigte einen K_i -Wert von 2.4 nm (Abbildung 20).

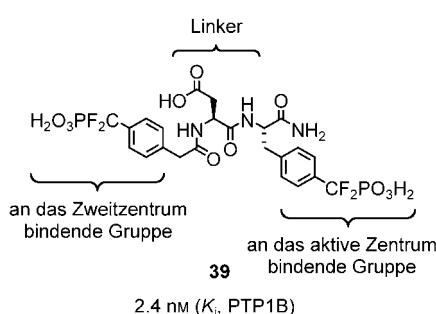


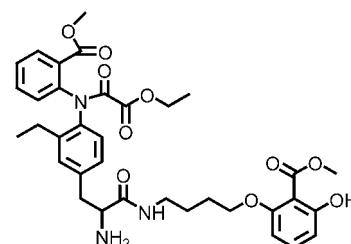
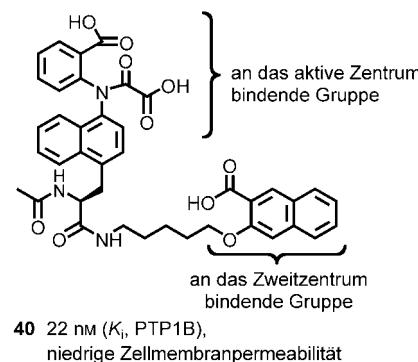
Abbildung 20. „Zweizentrenbinder“: ein alternativer Ansatz zum Design selektiver und wirksamer PTP-Inhibitoren.

Abgesehen von dieser bemerkenswerten Wirksamkeit zeigte die Verbindung eine außergewöhnliche Selektivität für PTP1B gegenüber anderen intrazellulären PTPs, Rezeptorartigen PTPs und DSPs (in den meisten Fällen von drei Größenordnungen). Bezüglich der nächst verwandten Phosphatase, TCPTP, wurde eine zehnfache Selektivität beobachtet. TCPTP ist an der Regulierung der T-Zell-Aktivierung beteiligt,^[169] und von einer Mutante wurde gezeigt, dass sie in der Embryonalentwicklung bei Mäusen letal ist.^[170] Aus therapeutischer Sicht ist eine Selektivität für PTP1B gegenüber TCPTP daher überaus wichtig.

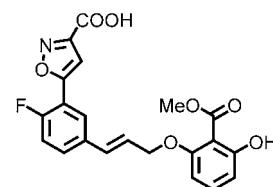
Die außergewöhnliche Wirksamkeit und Selektivität der Verbindung **39** konnte in Folgestudien anhand der Kristallstruktur einer sehr ähnlichen Verbindung im Komplex mit PTP1B erklärt werden.^[171] Während die dafür vorgesehene Phenyldifluormethylphosphonylgruppe in der erwarteten Weise an das aktive Zentrum band, fanden die Autoren, dass der Aspartat-Linker und die distale Difluormethylphosphonylgruppe vor allem Wechselwirkungen mit Lys41, Arg47 und Asp48 eingingen. Bei der Kristallisation eines Bisphosphonat-Inhibitors mit PTP1B hatten zuvor bereits andere Arbeitsgruppen ähnliche Wechselwirkungen festgestellt.^[172] Das zweite Phosphonat bindet demnach eher an Arg47 als an die ursprünglich identifizierte zweite Bindungsstelle.

Forscher bei Abbott verwendeten dieses Konzept zur Entwicklung nanomolarer PTP1B-Inhibitoren und erzielten gute bis außergewöhnliche Selektivitäten bezüglich anderer Phosphatasen.^[173a] Der als „linked-fragment approach“ be-

zeichnete Ansatz basierte auf einem NMR-Screening auf Strukturen, die an das aktive Zentrum und an die zweite Bindungsstelle schwach binden. Die Untersuchungen wurden mit einer Bibliothek aus 10000 Verbindungen und einer ^{13}C -angereicherten PTP1B durchgeführt („SAR by NMR“). Mithilfe von Röntgenstrukturdaten der Protein-Ligand-Komplexe und durch Kupplung der identifizierten Fragmente wurde die Verbindung **40** entworfen (Abbildung 21), die



41 Prodrug, gesteigerte insulininduzierte PKB-Phosphorylierung in FAO-Zellen



42 6.9 μM (PTP1B), 30fache Selektivität gegenüber TCPTP, zelluläre Aktivität in COS-Zellen

Abbildung 21. „Zweizentrenbinder“ als selektive PTP1B-Inhibitoren (30fache Selektivität gegenüber TCPTP durch **42**).

PTP1B mit 22 nm inhibiert. Die Diaryloxamsäuregruppe bindet an das aktive Zentrum und die Naphthoquinonegruppe an die zweite Bindungsstelle. Andere Phosphatasen wie LAR, SHP-2 und CD45 wurden bei weitaus höheren Konzentrationen inhibiert (1–54 μM), gegenüber der nächst verwandten Phosphatase TCPTP war die Verbindung zweifach weniger wirksam. Anhand der Röntgenstrukturdaten des Protein-Inhibitor-Komplexes entwickelten die Autoren ein Modell für den Inhibitionsmechanismus von **40** (Abbildung 22). Die Oxamsäure-Einheit fungiert als Phosphat-Mimetikum und bindet an die offene Konformation des Enzyms, wobei die Trp179-Ser187-Schleife eine konformativ ähnliche Form wie beim freien Enzym beibehält. Der Ben-

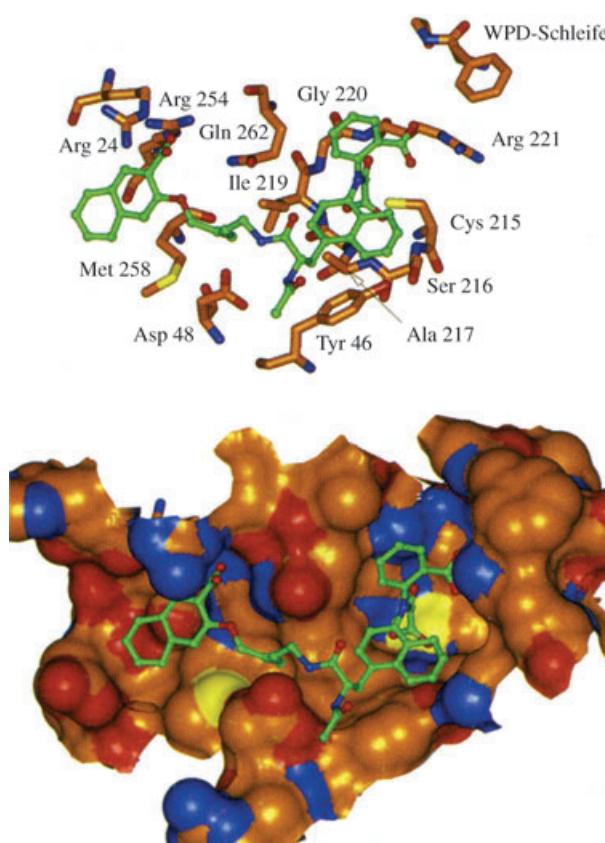


Abbildung 22. Inhibitor **40** im Komplex mit PTP1B (aus Lit. [173a] mit Genehmigung).

zoesäuerung der Oxamsäure geht hydrophobe Wechselwirkungen mit Gln262 ein, während das Carboxylat mit Arg221 wechselwirkt. Die Naphthalin-Einheit geht hydrophobe Wechselwirkungen mit Tyr46 ein. Die sich anschließende C₄-Diamidokette ragt aus dem aktiven Zentrum heraus und bildet Wasserstoffbrücken zu Asp48. Die Naphthoësäuregruppe ist an der zweiten Bindungsstelle lokalisiert und geht ionische Wechselwirkungen mit Arg254 und Arg24 ein, wobei der Naphthalinring schwache hydrophobe Wechselwirkungen mit Met258 ausbildet. Die Verbindung **40** ist in vitro ein guter Phosphatase-Inhibitor, zeigt jedoch wegen der hohen Polarität eine niedrige Zellmembranpermeabilität. Um diesem Nachteil zu begegnen, wurde **40** in das Diester-Prodrug **41** überführt, das eine erhöhte insulininduzierte PKB-Phosphorylierung in FAO-Zellen bewirkt.^[173b] In einem weiteren Ansatz wurde ein NMR-basiertes Screening angewendet, wobei von weniger polaren Verbindungen ausgegangen wurde.^[173c] Aus diesen Arbeiten resultierte die Struktur **42**, in der die Oxamsäure-Einheit durch eine Isoxazolcarbonsäure ersetzt ist. Der Inhibitor **42** zeigt einen *K_i*-Wert (gegen PTP1B) von 6.9 μm und eine 30fache Selektivität gegenüber TCPTP. Weitere Phosphatasen (LAR, CD45, Cdc25, SHP-2) wurden bei Konzentrationen von bis zu 300 μm nicht inhibiert, sodass **42** bislang einer der selektivsten PTP1B-Inhibitoren ist. Darüber hinaus ist **42** im Leptin-Stoffwechselweg bei COS-7-Zellen aktiv (zu ähnlichen Untersuchungen bei Abbott, siehe Lit. [173]).

Trotz der bemerkenswerten Fortschritte bei der Entwicklung von PTP-Inhibitoren gibt es gewisse Zweifel, ob sich dieses Konzept generell zur Entwicklung wirklich selektiver PTP-Inhibitoren eignet, da einige der an der Bindung der zweiten Arylgruppe beteiligten Reste (besonders Arg47) außer in PTP1B auch in anderen Phosphatasen präsent sind, speziell in TCPTP.^[172a]

Andere Aminosäuren wie Phe52 und Ala27 (PTP1B) wurden von Forschern bei Merck-Frosst anvisiert, da diese in TCPTP durch Tyr bzw. Ser ersetzt sind. Basierend auf Röntgenstrukturdaten wurde der Inhibitor **43** entwickelt (Abbildung 23), der folgende Strukturelemente enthält:

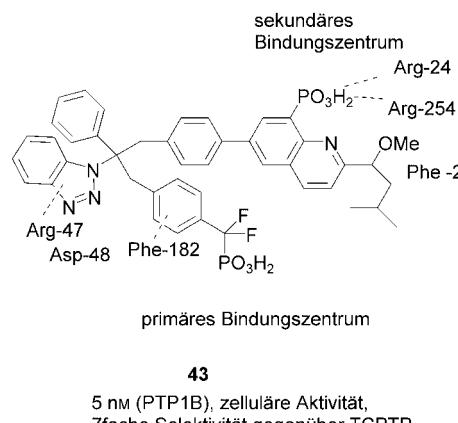


Abbildung 23. Struktur des PTP-Inhibitors **43** und dessen Wechselwirkungen mit PTP1B.

1) ein Phenyldifluormethylphosphonat zur Bindung an das primäre, aktive Zentrum, 2) eine Benzotriazolgruppe, die mit Arg47 und Asp48 wechselwirkt, und 3) eine substituierte Chinolin-Einheit, die in Richtung Phe52 und Ala27 zeigt und durch einen starren Biphenyl-Linker mit dem Rest des Moleküls verknüpft ist. Die Phosphonat-Einheit des Chinoxins wechselwirkt mit Arg24 und Arg254, den Resten der ursprünglich von Zhang et al. definierten sekundären Bindungsstelle, wogegen die Methoxy- und die Isobutylgruppen Wechselwirkungen mit Phe52 eingehen (Abbildung 24). **43** ist ein sehr wirksamer PTP1B-Inhibitor ($IC_{50} = 5 \text{ nm}$) mit zellulärer Aktivität ($IC_{50} = 58 \text{ nm}$) (vgl. **24**, Abbildung 12), zeigt aber nur eine sehr moderate Selektivität gegenüber TCPTP (7fach). Hier wird erneut deutlich, dass die Entwicklung wirklich selektiver PTP1B-Inhibitoren eine schwierige Aufgabe ist.^[174]

7.3.3. Chinone

Viele PTP-Inhibitoren enthalten ein Chinon, wobei man intuitiv erwarten würde, dass Chinone kovalent an das Cystein des aktiven Zentrums binden oder dieses oxidieren. Die tatsächlich gefundenen Inhibitionsmechanismen der von Chinonen abgeleiteten Inhibitoren unterscheiden sich jedoch manchmal von diesem Bild.

In einem interessanten Ansatz testeten Wipf et al. 10070 Verbindungen des National Cancer Institute (NCI) auf eine

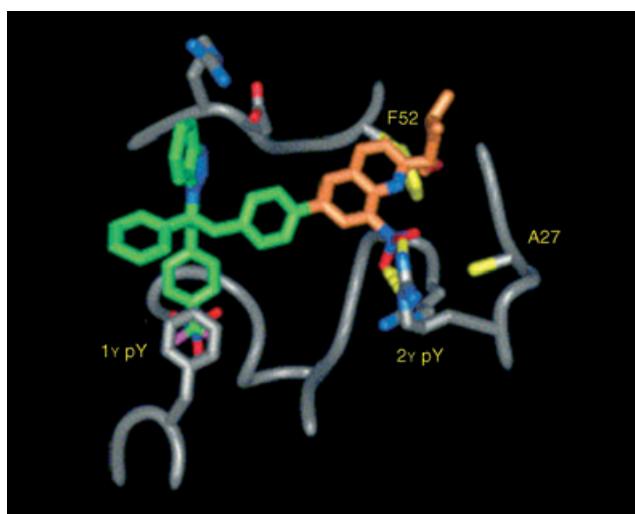


Abbildung 24. Röntgenstruktur von 43 im Komplex mit PTP1B: Die entscheidende Wechselwirkung mit Phe52 (in TCPTP befindet sich an dieser Stelle ein Tyrosin) hat eine 7fache Selektivität gegenüber TCPTP zur Folge (aus Lit. [174] mit Genehmigung).

inhibitorische Wirkung gegen Cdc25.^[175] 21 Verbindungen mit IC₅₀-Werten unter 1 μM wurden identifiziert; 75 % der Treffer waren Chinone, und mehr als 40 % waren *para*-Naphthochinone, darunter die Verbindung **44** (NSC95397, IC₅₀-Cdc25B = 0.125 μM , Abbildung 25). Diese ist mit dem

Naphthochinon **45** verwandt, einem Vitamin-K-Analogon, das bereits zuvor als Inhibitor beschrieben worden war.^[176] Die Verbindungen zeigen jedoch nur eine mäßige Selektivität gegenüber anderen Phosphatasen wie PTP1B und VHR. Sie inhibieren irreversibel, zeigen in vitro Antikrebsaktivität gegen eine Prostata- und zwei Brustkrebs-Zelllinien und induzieren in mikromolaren Konzentrationen die Arretierung des Zellzyklus bei tsFT210-Zellen. Mithilfe der bekannten Struktur von Cdc25B gelang es den Autoren, eine Bindungsstelle des Inhibitors an der Oberfläche des Enzyms zu postulieren. Sie schlugen einen Bindungsmodus vor, demzufolge die Naphthochinon-Einheit an ein sekundäres, Sulfat-bindendes Zentrum in Nachbarschaft zum aktiven Zentrum bindet.^[175, 94b] In diesem Modell bilden die Carbonylsauerstoffatome des Chinons Wasserstoffbrücken mit den beiden Argininresten Arg 482 und Arg 544. Der aromatische Ring wird durch hydrophobe Wechselwirkungen mit weiteren Aminosäuren (Arg 479, Thr 547, Tyr 428, Phe 543) im Inneren der Bindungstasche fixiert. Um ihr Modell zu bestätigen, synthetisierten die Autoren eine Reihe von Analoga. Dabei zeigte sich, dass die aromatische Gruppe und die *para*-Chinon-Einheit essenzielle Strukturelemente für eine inhibierende Wirkung sind. Eine weitere Substitution der Thiolseitenketten verstärkte die Aktivität nicht. An diesem Modell lässt sich auch erklären, warum so viele *para*-Chinone der NCI-Bibliothek keine Inhibitoren von Cdc25 sind. Die Bindungsstelle befindet sich in der Nähe des katalysierenden Cysteins (Cys 473), das durch das elektrophile Chinon kovalent modifiziert werden könnte.^[177]

In einem ähnlichen Ansatz identifizierten Choi et al. die 1,2-Naphthochinongruppe als Pharmakophor für PTP1B.^[178] Einige substituierte Derivate, wie **46**, zeigten eine bemerkenswerte inhibierende Wirkung gegen PTP1B (IC₅₀ = 0.32 μM) sowie eine 10- bis 60fache Selektivität gegenüber anderen Phosphatasen (etwa CD45, LAR, Yop, PP1 und Cdc25B). Die Verbindungen senken außerdem den Plasmaglucosespiegel in Mäusen.

Die ähnlichen Phenanthrendione (z.B. **47**, Abbildung 25), mit zellulärer Aktivität, wurden von Forschern bei AstraZeneca untersucht.^[179] Das wirksamste Derivat inhibierte CD45 im einstelligen mikromolaren Bereich, PTP1B wurde hingegen auch bei Konzentrationen von 30 μM nicht inhibiert. Die Verbindungen wirkten als reversible kompetitive Inhibitoren, und einige inhibierten auch die Proteasen Cathepsin L und S, nicht jedoch Cathepsin B.

Ein erschwerender Faktor bei der Suche nach Inhibitoren für dualspezifische Phosphatasen wie Cdc25 ist die offene und flache Form des aktiven Zentrums – eine Eigenschaft, die direkt mit der geringen Spezifität dieser Enzyme für ihre Substrate zusammenhängt. In Hinblick darauf beschrieben Rudolph und Mitarbeiter die Indolylhydroxychinon-Einheit (siehe **48**, Abbildung 25) als vielversprechende Leitstruktur zur Entwicklung reversibler kompetitiver Inhibitoren für Cdc25 mit submikromolaren Inhibitionskonstanten.^[180] Das Substitutionsmuster der Indolgruppe wurde systematisch variiert, und es zeigte sich, dass Substituenten an der 2- und der 4-Position zu einer deutlich verringerten Wirksamkeit führten und solche an der 1- und der 5-Position nur einen geringen Effekt hatten. Modifikationen an den

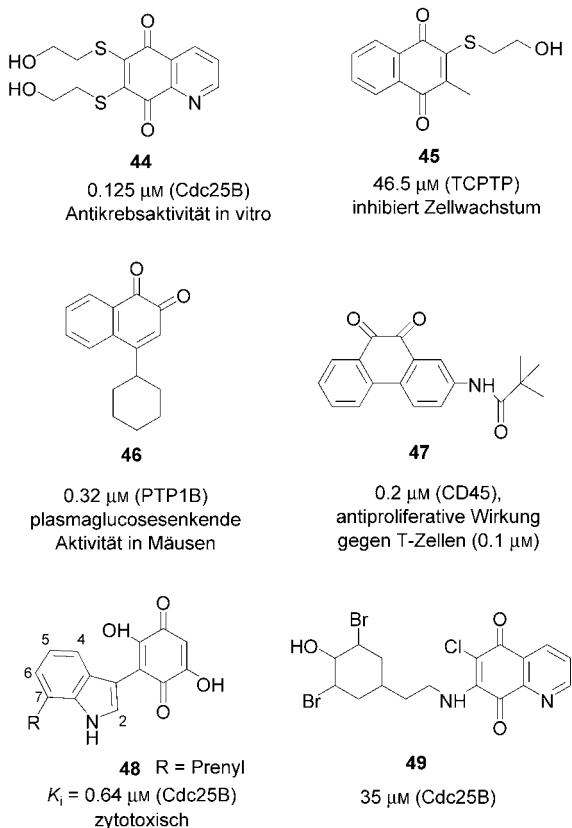


Abbildung 25. Von Chinon abgeleitete PTP-Inhibitoren; IC₅₀-Werte sind angegeben.

Positionen 6 und 7 ergaben hingegen eine verstärkte inhibierende Wirkung gegen Cdc25. Alle Isoformen von Cdc25 (A, B und C) wurden inhibiert, PTP1B wurde hingegen bei Konzentrationen bis zu 50 µm nicht angegriffen. Obgleich die Verbindungen den zuvor beschriebenen chinoiden Inhibitoren ähneln (siehe z. B. NSC668394, 49, Abbildung 25), konnten die Autoren nachweisen, dass ein anderer Inhibitionsmechanismus vorliegt (reversibel und kompetitiv). Der Befund, dass die Chinongruppe das Enzym nicht durch kovalente Bindung modifiziert, wurde mit der elektronenreichen Natur des Chinons (zwei Hydroxygruppen, eine Indolylgruppe) erklärt. Um den Inhibitionsmechanismus aufzuklären, wurden mehrere ortsgerichtete Mutanten und eine am C-Terminus verkürzte Variante von Cdc25B untersucht. Es wurde nachgewiesen, dass die drei Aminosäuren Glu474, Phe475 (die Teil der charakteristischen HCX₅R-Schleife sind) und Arg482 sowie der C-terminale Bereich für den Inhibitionsmechanismus von Bedeutung sind. Von Arg482 war bereits zuvor angenommen worden, dass es an andere chinoide Cdc25-Inhibitoren bindet.^[175] Der C-terminale Abschnitt spielt eine entscheidende Rolle bei der Wechselwirkung mit dem natürlichen Substrat von Cdc25, dem Komplex aus Cdk2 und Cyclin A.^[181] Besonders interessant ist, dass mit dem natürlichen Substrat höhere IC₅₀-Werte erhalten wurden (jedoch immer noch im mikromolaren Bereich) als mit dem häufig eingesetzten künstlichen Substrat 3-O-Methylfluoresceinphosphat. In vitro wurde eine zelltoxische Wirkung der Inhibitoren nachgewiesen; Ursache sind möglicherweise apoptotische Mechanismen. Bemerkenswerterweise wurde keine erhöhte Phosphorylierung der Cdk-Proteine beobachtet. Die beobachtete nichtspezifische Bindung der Inhibitoren an Serumalbumin könnte sich bei einer zukünftigen Weiterentwicklung dieser Verbindungen zu möglichen Wirkstoffkandidaten als Problem erweisen.

7.3.4. Weitere Ansätze

Ausgehend von einem Pharmakophor-Modell, das sich von Naturstoffinhibitoren der Serin/Threonin-Phosphatase PP1 ableitet,^[182] wurde ein kombinatorischer Ansatz genutzt, um neue Inhibitoren (z.B. **50**, Abbildung 26) für PTPs und DSPs zu erzeugen.^[183] Dies ist bemerkenswert, da sich Serin/Threonin-Phosphatasen von PTPs erheblich unterscheiden. Der Inhibitionsmechanismus dieser Verbindungen bleibt weitgehend unklar. Eine kinetische Analyse ergab, dass sie partiell kompetitive, reversible Inhibitoren von Cdc25B sind, bei anderen Phosphatasen jedoch nichtkompetitiv wirken. Die Verbindungen inhibierten das Tumorzellwachstum in Kultur. Eine wichtige Rolle beim Inhibitionsprozess spielen hydrophobe Wechselwirkungen mit dem Enzym, und sowohl die Carbonsäure- als auch die Oxazolgruppe bilden Wasserstoffbrücken. Der Cyclohexyldiamin-Linker verleiht den Molekülen konformative Steifigkeit und erhöht dadurch die Wirksamkeit der Verbindungen.

PTPs enthalten einen für die katalytische Aktivität essenziellen Cysteinrest. Dessen Oxidation inaktiviert das Enzym – ein Vorgang, der auch für die Regulierung des Enzyms *in vivo* relevant ist. So bewirkt z.B. früh in der Insulinkaskade ein explosionsartiger Anstieg der intrazellu-

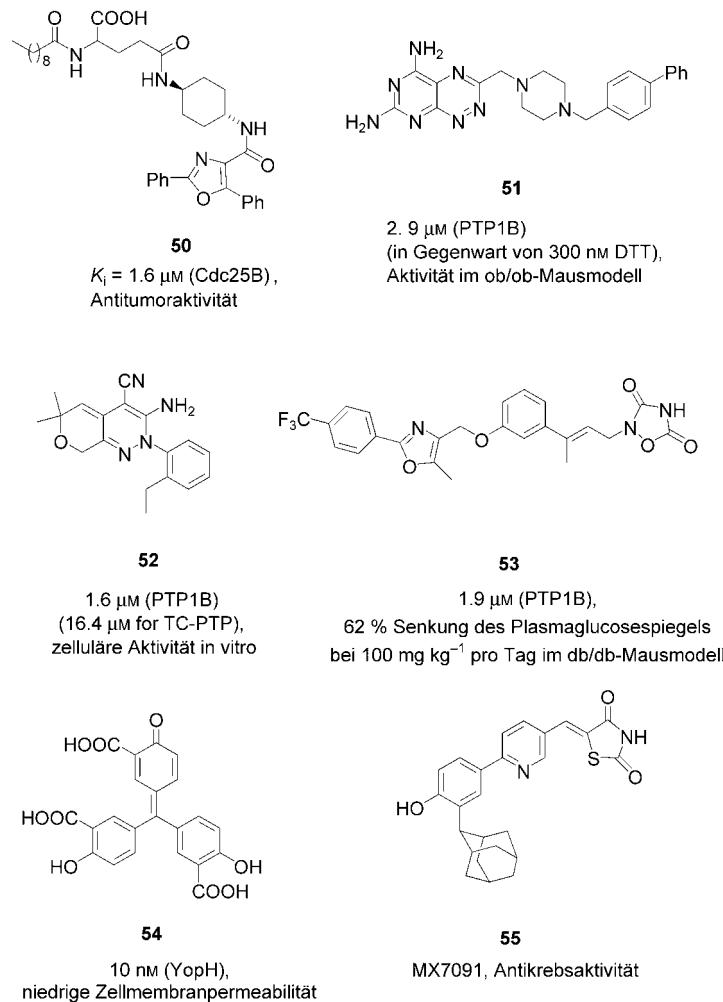


Abbildung 26. Durch diverse Ansätze gefundene PTP-Inhibitoren; außer für 50 und 55 sind die IC₅₀-Werte angegeben.

lären Wasserstoffperoxid-Konzentration die Inhibition der Phosphatase PTP1B, wodurch die Kaskade verstärkt wird.^[135] Dieser Prozess ist reversibel, da das resultierende Oxidationsprodukt durch Glutathion reduziert wird. Ein ähnlicher Mechanismus tritt vermutlich bei der Inhibition von PTP1B in vitro durch die bei Roche entwickelten Pyrimidotriazindiamin-Derivate auf (z. B. **51**, Abbildung 26), die das Enzym in Gegenwart von Dithiothreitol (DTT) reversibel inhibieren.^[184] Die Verbindungen sind in vivo im ob/ob-Mausmodell bei 30 mg kg^{-1} aktiv, zeigen jedoch nur eine geringe Selektivität gegenüber anderen Phosphatasen (LAR, PTP α , SHP-2).

Forscher bei Biovitrum identifizierten Pyridazin-Analoga wie **52** (Abbildung 26) als einen weiteren Inhibitortyp.^[185] Diese wirken als nichtkompetitive reversible Inhibitoren mit IC₅₀-Werten im unteren mikromolaren Bereich und binden an eine vom aktiven Zentrum abweichende Bindungsstelle. Positive Eigenschaften sind ihre hohe Selektivität für TCPTP (20fach gegenüber einigen anderen Analoga) und ihre gute Zellmembranpermeabilität, die orale Bioverfügbarkeit ermöglicht. Des Weiteren verstärken sie die insulinstimulierte Phosphorylierung des Insulinrezeptors.

Weitere niedermolekulare PTP-Inhibitoren wurden mehr oder minder durch Zufall entdeckt. Beispielsweise berichteten Forscher bei Wyeth-Ayerst über Azolidinonderivate mit submikromolaren IC₅₀-Werten bezüglich PTP1B. Einige der Derivate (ein Beispiel ist **53**, Abbildung 26) normalisierten die Plasmaglucose- und Plasmainsulinspiegel in Diabetes-Mausmodellen.^[186] Die Autoren weisen darauf hin, dass die Verbindungen als PPAR- γ -Agonisten wirken könnten (PPAR- γ = Peroxisomen-Proliferator-aktivierter Rezeptor γ).

Beim Versuch, neue Wirkstoffe gegen die Pest durch ein Screening von 720 kommerziell verfügbaren Carbonsäuren zu finden, entdeckten Zhang und Mitarbeiter einen hoch wirksamen und selektiven Inhibitor der für die Virulenz essentiellen Phosphatase YopH aus *Yersinia*.^[187] Aurintricarbonsäure (**54**) inhibierte YopH mit einem IC₅₀ von 10 nm bei einer 6- bis 120fachen Selektivität gegenüber anderen Phosphatasen wie PTP1B (61 nm) oder CD45 (250 nm). Die Verbindung stellte auch die T-Zell-Aktivität in YopH-transfizierten Jurkat-Zellen wieder her, allerdings musste zur zellulären Aufnahme der hoch geladenen Verbindung eine Elektroporation vorgenommen werden.

Inhibitoren der dualspezifischen Phosphatase MKP-1 befinden sich derzeit bei Incyte in Entwicklung. MKP-1 inhibiert die Apoptose durch Inaktivierung der Janus-Kinase (JNK). Einer der Inhibitoren, MX7091 (**55**, Abbildung 26), ist gegen solide Tumore in Mäusen wirksamer als Paclitaxel und zeigt zudem synergistische Effekte mit Cisplatin.^[14]

8. Schlussfolgerungen und Ausblick

Wir haben im vorliegenden Aufsatz einen Überblick über die Strukturen, Funktionen und die mögliche therapeutische Relevanz ausgewählter Proteintyrosinphosphatasen gegeben. Die Strukturen und enzymatischen Mechanismen mehrerer Phosphatasen sind heute recht gut verstanden. Hinsichtlich der Beteiligung von PTPs an Signalwegen und an der Ausbildung von Krankheiten und Infektionen verbleibt trotz beachtlicher Fortschritte ein großer Forschungsbedarf. Gleichermaßen gilt für die Identifizierung neuer PTPs.

Spätestens mit der Entdeckung, dass ein PTP1B-Knockout bei Mäusen nicht letal ist und einen Schutz vor Fettleibigkeit sowie eine verbesserte Insulinempfindlichkeit bewirkt, ist klar geworden, dass die Inhibition von PTPs nicht nur als Methode in der molekularbiologischen Forschung dienen kann (wie für die Serin/Threonin-Phosphatasen bereits etabliert), sondern möglicherweise auch die Entwicklung von Wirkstoffen gegen verbreitete Krankheiten wie Diabetes und Fettleibigkeit ermöglicht. Es wird auch erwartet, dass die Therapie anderer Krankheiten wie infektiöser, autoimmuner und neurologischer Erkrankungen oder Krebs von PTP-Inhibitoren profitieren kann. Obwohl auch etliche Naturstoffe als PTP-Inhibitoren identifiziert wurden, besteht die heute wichtigste Strategie im Design niedermolekularer Verbindungen, die auf nicht hydrolysierbaren Phosphotyrosin-Mimetika basieren. Zwar konnten sehr wirksame PTP-Inhibitoren *in vitro* identifiziert werden, zwei zentrale Herausforderungen verbleiben aber: 1) die Verbesserung der Zellmem-

branpermeabilität durch das Design ungeladener oder niedrig geladener Verbindungen – dies ist eine Voraussetzung für *in-vivo*-Aktivität; 2) die Identifizierung wirklich selektiver Inhibitoren, was sich angesichts der hochgradig konservierten Sequenz im aktiven Zentrum der PTPs als sehr schwierige Aufgabe erweist. Die Entdeckung einer zweiten Bindungsstelle für Arylphosphate bei PTP1B war hier ein wichtiges Ergebnis. Eine höchstmögliche Selektivität bezüglich anderer Phosphatasen, die vitale zelluläre Funktionen beeinflussen (etwa die T-Zell-PTP), ist zwingend erforderlich, um das Risiko unerwünschter Nebenwirkungen gering zu halten.

Angesichts der bisherigen Fortschritte bei der Entwicklung von PTP1B-Inhibitoren und der Leistungsfähigkeit der modernen medizinisch-chemischen Forschung scheinen die genannten Forschungsziele durchaus im Bereich des Möglichen. In Einklang damit geht die pharmazeutische Industrie davon aus, dass Phosphatasen einen beträchtlichen Anteil (4%) des durch Wirkstoffe adressierbaren Genoms („druggable genome“) ausmachen.^[188] Eine gründliche Analyse des Genoms deckte auf, dass es 107 Proteintyrosinphosphatasen gibt,^[189] die – aller Voraussicht nach – die primären Kandidaten für die Wirkstoffentwicklung sein werden. Bereits seit einigen Jahren sind Phosphatasen ein integraler Bestandteil der Screening Units pharmazeutischer Unternehmen, und ein erster Wirkstoffkandidat ist bereits klinisch getestet worden (Abschnitt 7.3.1). Verglichen mit anderen Target-Klassen des „druggable“ Genoms sind Phosphatasen erst in jüngster Zeit zunehmend in den Fokus der pharmazeutischen Forschung geraten, und die Arbeiten hierzu befinden sich noch im Anfangsstadium. Angesichts der entscheidenden Rollen dieser Enzyme bei zahlreichen biologischen Prozessen dürfte jedoch sicher sein, dass Phosphatase-Inhibitoren aussichtsreiche Kandidaten für zukünftige Wirkstoffe sind.

Diese Arbeit wurde durch die Max-Planck-Gesellschaft, die Deutsche Forschungsgemeinschaft und den Fonds der Chemischen Industrie unterstützt.

Eingegangen am 3. August 2004
Online veröffentlicht am 18. Mai 2005
Übersetzt von Dr. Thomas Fritzsch, Heidelberg

- [1] T. Hunter, *Cell* **2000**, *100*, 113–127.
- [2] Übersichten hierzu: a) A. J. Bridges, *Chem. Rev.* **2001**, *101*, 2541–2572; b) M. E. M. Noble, J. A. Endicott, L. N. Johnson, *Science* **2004**, *303*, 1800–1805; c) K. Grosios, P. Traxler, *Drugs Future* **2003**, *28*, 679–697; d) L. K. Shawver, D. Slamon, A. Ullrich, *Cancer Cell* **2002**, *1*, 117–123.
- [3] Eine Übersicht hierzu: Z. Y. Zhang, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **2002**, *42*, 209–234.
- [4] Übersichten hierzu: a) R. H. van Huijsdijnen, A. Bombrun, D. Swinnen, *Drug Discovery Today* **2002**, *7*, 1013–1019; b) G. Liu, *Curr. Med. Chem.* **2003**, *10*, 1407–1421; c) M. A. Lyon, A. P. Ducruet, P. Wipf, J. S. Lazo, *Nat. Rev. Drug Discovery* **2002**, *1*, 961–976.
- [5] a) M. Elchebly, P. Payette, E. Michaliszyn, W. Cromlish, S. Collins, A. L. Loy, D. Normandin, A. Cheng, J. Himms-Hagen, C. C. Chang, C. Ramachandran, M. J. Gresser, M. L. Tremblay, *Science* **1999**, *283*, 1544–1548; b) L. D. Klaman, O. Boss, O. D.

- Peroni, J. K. Kim, J. L. Martino, J. M. Zabolotny, N. Moghal, M. Lubkin, Y. B. Kim, A. H. Sharpe, A. Stricker-Krongrad, G. I. Shulman, B. G. Neel, B. B. Kahn, *Mol. Cell. Biol.* **2000**, *20*, 5479–5489.
- [6] A. I. Lazarovits, S. Poppema, Z. Zhang, M. Khandaker, C. E. LeFeuvre, S. K. Singhal, B. M. Garcia, N. Ogasa, A. M. Jevnikar, M. J. White, G. Singh, C. R. Stiller, R. Z. Zhong, *Nature* **1996**, *380*, 717–720.
- [7] Übersichten hierzu: a) R. E. Honkanen, T. Golden, *Curr. Med. Chem.* **2002**, *9*, 2055–2075; b) K. Hinterding, D. Alonso-Díaz, H. Waldmann, *Angew. Chem.* **1998**, *110*, 716–780; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, *37*, 688–749.
- [8] a) B. A. Minassian, L. Ianzano, M. Meloche, E. Andermann, G. A. Rouleau, A. V. Delgado-Escueta, S. W. Scherer, *Neurology* **2000**, *55*, 341–346; b) S. Ganesh, K. L. Agarwala, K. Ueda, T. Akagi, K. Shoda, T. Usui, T. Hashikawa, H. Osada, A. V. Delgado-Escueta, K. Yamakawa, *Hum. Mol. Genet.* **2000**, *9*, 2251–2261.
- [9] T. Takeuchi, M. Pang, K. Amano, J. Koide, T. Abe, *Clin. Exp. Immunol.* **1997**, *109*, 20–26.
- [10] T. Hunter, *Cell* **1989**, *58*, 1013–1016.
- [11] A. Schmidt, S. J. Rutledge, N. Endo, E. E. Opas, H. Tanaka, G. Wesolowski, C. T. Leu, Z. Huang, C. Ramachandaran, S. B. Rodan, G. A. Rodan, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1996**, *93*, 3068–3073.
- [12] Übersichten zu CD45: a) M. L. Hermiston, Z. Xu, A. Weiss, *Annu. Rev. Immunol.* **2003**, *21*, 107–137; b) J. Irie-Sasaki, T. Sasaki, J. M. Penninger, *Curr. Top. Med. Chem.* **2003**, *3*, 783–796.
- [13] Siehe z.B.: a) K. Galaktionov, A. K. Lee, J. Eckstein, G. Draetta, J. Meckler, M. Loda, D. Beach, *Science* **1995**, *269*, 1575–1577; b) D. Dixon, T. Moyana, M. J. King, *Exp. Cell Res.* **1998**, *240*, 236–243; c) Y. Kudo, W. Yasui, T. Ue, S. Yamamoto, H. Yokosaki, H. Nikai, E. Tahara, *Jpn. J. Cancer Res.* **1997**, *88*, 9947–9952.
- [14] a) H. Wang, Z. Cheng, C. C. Malbon, *Cancer Lett.* **2002**, 229–237; b) <http://www.albmolecular.com/features/tekreps/vol08/no17>.
- [15] J. Tan, T. Town, T. Mori, Y. J. Wu, M. Saxe, F. Crawford, M. Mullan, *J. Neurosci.* **2000**, *20*, 7587–7594.
- [16] Übersicht hierzu: R. DeVinney, O. Steele-Mortimer, B. B. Finlay, *Trends Microbiol.* **2000**, *8*, 29–32.
- [17] a) K. Yahiro, T. Niidome, M. Kimura, T. Hatakeyama, H. Aoyagi, H. Kurazono, K. Imagawa, A. Wada, J. Moss, T. Hirayama, *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 36693–36699; b) K. Yahiro, A. Wada, N. Nakayama, T. Kimura, K. Ogushi, T. Niidome, H. Aoyagi, K. Yoshino, K. Yonezawa, J. Moss, T. Hirayama, *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 19183–19189.
- [18] L. D. Schultz, P. A. Schweitzer, T. V. Rajan, T. Yi, J. N. Ihle, R. J. Matthews, M. L. Thomas, D. R. Beier, *Cell* **1993**, *73*, 1445–1454.
- [19] T. Kamata, M. Yamashita, M. Kimura, K. Murata, M. Inami, C. Shimizu, K. Sugaya, C.-R. Wang, M. Taniguchi, T. Nakayama, *J. Clin. Invest.* **2003**, *111*, 109–119.
- [20] J. L. Thompson, J. H. Jiang, N. Madamanchi, M. S. Runge, C. Patterson, *Am. J. Physiol.* **2001**, *281*, H396–H403.
- [21] A. Di Cristofano, P. P. Pandolfi, *Cell* **2000**, *100*, 387–390.
- [22] S. Ponniah, D. Z. Wang, K. L. Lim, C. J. Pallen, *Curr. Biol.* **1999**, *9*, 535–538.
- [23] G. Bompard, C. Puech, C. Prebois, F. Vignon, G. Freiss, *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 47861–47869.
- [24] S. M. Pettiford, R. Herbst, *Leukemia* **2003**, *17*, 366–378.
- [25] S. Saha, A. Bardelli, P. Buckhaults, V. E. Velculescu, C. Rago, B. St Croix, K. E. Romans, M. A. Choti, C. Lengauer, K. W. Kizler, B. Vogelstein, *Science* **2001**, *294*, 1343–1346.
- [26] J. D. Bjorge, A. Pang, D. J. Fujita, *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 41439–41446.
- [27] Y. Shen, R. Luche, B. Wei, M. L. Gordon, C. D. Diltz, N. K. Tonks, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2001**, *98*, 13613–13618.
- [28] a) Y. Seo, T. Matozaki, M. Tsuda, Y. Hayashi, H. Itoh, M. Kasuga, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1997**, *231*, 705–711; b) H. Nagano, T. Noguchi, K. Inagaki, S. Yoon, T. Matozaki, H. Itoh, M. Kasuga, Y. Hayashi, *Oncogene* **2003**, *22*, 4656–4663.
- [29] K. Meng, A. Rodriguez-Pena, T. Dimitrov, W. Chen, M. Yamin, M. Noda, T. F. Deuel, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2000**, *97*, 2603–2608.
- [30] M. L. Loh, S. Vattikuti, S. Schubert, M. G. Reynolds, E. Carlson, K. H. Lieuw, J. W. Cheng, C. M. Lee, D. Stokoe, J. M. Bonifas, N. P. Curtiss, J. Gotlib, S. Meschinrich, M. M. Le Beau, P. D. Emanuel, K. M. Shannon, *Blood* **2004**, *103*, 2325–2331.
- [31] C. Y. Wu, Q. Guan, Y. J. Wang, Z. J. Zhao, G. W. Zhou, *J. Cell. Biochem.* **2003**, *90*, 1026–1037.
- [32] T. Tsukamoto, T. Takahashi, R. Ueda, K. Hibi, H. Saito, *Cancer Res.* **1992**, *52*, 3506–3509.
- [33] R. Bataille, N. Robillard, C. Pellat-Deceunynck, M. Amiot, *Immunol. Rev.* **2003**, *194*, 105–111.
- [34] T. Igawa, F.-F. Lin, P. Rao, M.-F. Lin, *Prostate* **2003**, *55*, 247–258.
- [35] M. A. Tisi, Y. Xie, T. T. Yeo, F. M. Longo, *J. Neurobiol.* **2000**, *42*, 477–486.
- [36] J. McLean, J. Batt, L. C. Doering, D. Rotin, J. R. Bain, *J. Neurosci.* **2002**, *22*, 5481–5491.
- [37] A. Horvat, F. W. Schwaiger, G. Hager, F. Brocker, R. Streif, P. G. Knyazev, A. Ullrich, G. W. Kreutzberg, *J. Neurosci.* **2001**, *21*, 865–874.
- [38] M. B. Marrero, R. L. Papke, B. S. Bhatti, S. Shaw, M. Bencherif, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2003**, *309*, 16–27.
- [39] Z. Z. Chong, S. H. Lin, J. Q. Kang, K. Maiese, *Cell. Mol. Neurobiol.* **2003**, *23*, 561–578.
- [40] M. K. Pathak, T. Yi, *J. Immunol.* **2001**, *167*, 3391–3397.
- [41] H. Higashi, R. Tsutsumi, S. Muto, T. Sugiyama, T. Azuma, M. Asaka, M. Hatakeyama, *Science* **2002**, *295*, 683–686.
- [42] A. Koul, A. Choidas, M. Treder, A. K. Tyagi, K. Drlica, Y. Singh, A. Ullrich, *J. Bacteriol.* **2000**, *182*, 5425–5432.
- [43] J. M. Zablotny, Y. B. Kim, O. D. Peroni, J. K. Kim, M. A. Pani, O. Boss, L. D. Klaman, S. Kamatkar, G. I. Shulman, B. B. Kahn, B. G. Neel, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2001**, *98*, 5187–5192.
- [44] S. M. Suhr, S. Pamula, D. J. Baylink, K. H. W. Lau, *J. Bone Miner. Res.* **2001**, *16*, 1795–1803.
- [45] A. Kita, S. Uotani, H. Kuwahara, R. Takahashi, K. Oshima, H. Mizuguchi, T. Hayakawa, Y. Nagayama, Y. Yamaguchi, K. Eguchi, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2003**, *302*, 805–809.
- [46] a) Z.-Y. Zhang, *Acc. Chem. Res.* **2003**, *36*, 385–392; b) A. Alonso, J. Sasin, N. Bottini, I. Friedberg, I. Friedberg, A. Osterman, A. Godzik, T. Hunter, J. Dixon, T. Mustelin, *Cell* **2004**, *117*, 699–711.
- [47] a) G. Raugei, G. Ramponi, P. Chiarugi, *Cell. Mol. Life Sci.* **2002**, *59*, 941–949; b) M. J. Wishart, G. S. Taylor, J. T. Slama, J. E. Dixon, *Curr. Opin. Cell Biol.* **2001**, *13*, 172–181; c) Q. Zeng, X. Si, H. Horstmann, Y. Xu, W. Hong, C. J. Pallen, *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 21444–21452; d) T. Takagi, C. R. Moore, F. Diehn, S. Buratowski, *Cell* **1997**, *89*, 867–873; e) M. L. Sulis, R. Parsons, *Trends Cell Biol.* **2003**, *13*, 478–483; f) S.-A. Kim, P. O. Vacratsis, R. Firestein, M. L. Cleary, J. E. Dixon, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2003**, *100*, 4492–4497.
- [48] X.-L. Zhan, M. J. Wishart, K.-L. Guan, *Chem. Rev.* **2001**, *101*, 2477–2496.
- [49] <http://ptp.cshl.edu/>.
- [50] D. Barford, *Biochem. Soc. Trans.* **1999**, *27*, 751–766.
- [51] a) D. Barford, A. J. Flint, N. K. Tonks, *Science* **1994**, *263*, 1397–1404; b) A. D. B. Pannifer, A. J. Flint, N. K. Tonks, D. Barford, *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 10454–10462.

- [52] K. L. Guan, J. E. Dixon, *J. Biol. Chem.* **1991**, 266, 17026–17030.
- [53] M. Streuli, N. X. Krueger, T. Thai, M. Tang, H. Saito, *EMBO J.* **1990**, 9, 2399–2407.
- [54] J. A. Stuckey, E. B. Fauman, H. L. Schubert, Z.-Y. Zhang, J. E. Dixon, M. A. Saper, *Nature* **1994**, 370, 575–578.
- [55] Y. L. Zhang, F. Hollfelder, S. J. Gordon, L. Chen, Y. F. Keng, *Biochemistry* **1999**, 38, 12111–12123.
- [56] Z.-Y. Zhang, Y. Wang, E. J. Dixon, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1994**, 91, 1624–1627.
- [57] J. M. Denu, D. L. Lohse, J. Vijayalakshmi, M. A. Saper, J. E. Dixon, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1996**, 93, 2493–2498.
- [58] Z.-Y. Zhang, B. A. Palfey, L. Wu, Y. Zhao, *Biochemistry* **1995**, 34, 16389–16396.
- [59] T. Pawson, G. Gish, *Cell* **1992**, 71, 359–362.
- [60] C. Wu, M. Sun, L. Liu, G. W. Zhou, *Gene* **2003**, 306, 1–12.
- [61] S. Tomic, U. Greiser, R. Lammers, A. Kharitonov, E. Imanitov, A. Ullrich, F. D. Bohmer, *J. Biol. Chem.* **1997**, 272, 5966–5973.
- [62] T. Yi, A. L. F. Mui, G. Krystal, J. N. Ihle, *Mol. Cell. Biol.* **1993**, 13, 7577–7586.
- [63] a) U. Klingmueller, U. Lorenz, L. C. Cantley, B. G. Neel, H. F. Lodish, *Cell* **1995**, 80, 729–738; b) B. F. Burkey, M. Dong, L. Wennogle, R. Babb, M. Dressman, A. Islam, R. Deacon, C. Dragland, E. Kaplan, J. Tomesch, J. P. Gao, *Diabetes* **2002**, 51, A34, 138 Suppl.
- [64] M. Tabrizi, W. Yang, H. Jiao, E. M. de Vries, L. C. Platanias, M. Arico, T. Yi, *Leukemia* **1998**, 12, 200–206.
- [65] C.-K. Qu, *Biochim. Biophys. Acta* **2002**, 1592, 297–301.
- [66] G.-S. Feng, C. C. Hui, T. Pawson, *Science* **1993**, 259, 1607–1611.
- [67] W. Vogel, R. Lammers, J. Huang, A. Ullrich, *Science* **1993**, 259, 1611–1614.
- [68] M. R. Kuhne, T. Pawson, G. E. Lienhard, G.-S. Feng, *J. Biol. Chem.* **1993**, 268, 11479–11481.
- [69] D. Pei, U. Lorenz, U. Klingmueller, B. G. Neel, C. T. Walsh, *Biochemistry* **1994**, 33, 15483–15493.
- [70] D. Pei, J. Wang, C. T. Walsh, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1996**, 93, 1141–1145.
- [71] M. Tartaglia, E. L. Mehler, R. Goldberg, G. Zampino, H. G. Brunner, H. Kremer, I. van der Burgt, A. H. Crosby, A. Ion, S. Jeffery, K. Kalidas, M. A. Patton, R. S. Kucherlapati, B. D. Gelb, *Nat. Genet.* **2001**, 29, 465–468.
- [72] N. Tidow, B. Kasper, K. Welte, *Exp. Hematol.* **1999**, 27, 1038–1045.
- [73] J. A. Bonini, J. Colca, C. Hofmann, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1995**, 212, 933–938.
- [74] N. K. Tonks, C. D. Diltz, E. H. Fischer, *J. Biol. Chem.* **1988**, 263, 6731–6737.
- [75] M. F. White, C. R. Kahn, *J. Biol. Chem.* **1994**, 269, 1–4.
- [76] A. Cheng, N. Dubé, F. Gu, M. L. Tremblay, *Eur. J. Biochem.* **2002**, 269, 1050–1059.
- [77] J. E. Pessin, D. C. Thurmond, J. S. Elmendorf, K. J. Coker, S. Okada, *J. Biol. Chem.* **1999**, 274, 2593–2596.
- [78] a) B. L. Seely, P. A. Staubs, D. R. Reichhart, P. Berhanu, K. L. Milarski, A. R. Saltiel, J. Kusari, *Diabetes* **1996**, 45, 1379–1385; b) D. Bandyopadhyay, A. Kusari, K. A. Kenner, F. Liu, J. Chernoff, T. A. Gustafson, J. Kusari, *J. Biol. Chem.* **1997**, 272, 1639–1645.
- [79] A. Salmeen, J. N. Andersen, M. P. Myers, N. K. Tonks, D. Barford, *Mol. Cell* **2000**, 6, 1401–1412.
- [80] B. J. Goldstein, A. Bittner-Kowalsczyk, M. F. White, M. Tarbeck, *J. Biol. Chem.* **2000**, 275, 4283–4289.
- [81] J. R. Wiener, B. J. M. Kerns, E. L. Harvey, M. R. Conaway, J. D. Iggleheart, A. Berchuck, R. C. Bast, Jr., *J. Natl. Cancer Inst.* **1994**, 86, 372–378.
- [82] a) F. Liu, J. Chernoff, *Biochem. J.* **1997**, 327, 139–145; b) A. J. Flint, T. Tiganis, D. Barford, N. K. Tonks, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1997**, 94, 1680–1685.
- [83] J. Balsamo, C. Arregui, T. Leung, J. Lilien, *J. Cell Biol.* **1998**, 143, 523–532.
- [84] K. L. Guan, S. S. Broyles, J. E. Dixon, *Nature* **1991**, 350, 359–362.
- [85] T. Ishibashi, D. P. Bottaro, A. Chan, T. Miki, S. A. Aaronson, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1992**, 89, 12170–12174.
- [86] J. L. Todd, K. G. Tanner, J. M. Denu, *J. Biol. Chem.* **1999**, 274, 13271–13280.
- [87] J. Yuvaniyama, J. M. Denu, J. E. Dixon, M. A. Saper, *Science* **1996**, 272, 1328–1331.
- [88] a) K. S. Sadhu, I. Reed, H. Richardson, P. Russell, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1990**, 87, 5139–5143; b) J. B. Millar, J. Blevitt, L. Gerace, K. Sadhu, C. Featherstone, P. Russell, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1991**, 88, 10500–10504; c) A. Nagata, M. Igarashi, S. Jinno, K. Suto, H. Okayama, *New Biol.* **1991**, 3, 959–968.
- [89] A. J. Obaya, J. M. Sedivy, *Cell. Mol. Life Sci.* **2002**, 126–142.
- [90] a) C. Norbury, J. Blow, P. Nurse, *EMBO J.* **1991**, 10, 3321–3329; b) C. Lammer, S. Wagerer, R. Saffrich, D. Mertens, W. Ansorge, I. Hoffmann, *J. Cell Sci.* **1998**, 111, 2445–2453.
- [91] a) I. Hoffmann, P. R. Clarke, M. J. Marcote, E. Karsenti, G. Draetta, *EMBO J.* **1993**, 12, 53–63; b) U. Strausfeld, A. Fernandez, J.-P. Capony, F. Girard, N. Lautredou, J. Derancourt, J. C. Labbe, N. J. Lamb, *J. Biol. Chem.* **1994**, 269, 5989–6000.
- [92] I. Hoffmann, G. Draetta, E. Karsenti, *EMBO J.* **1994**, 13, 4302–4310.
- [93] I. Hoffmann, *Protoplasma* **2000**, 211, 8–11.
- [94] a) E. B. Faumann, J. P. Cogswell, B. Lovejoy, W. J. Rocque, W. Holmes, V. G. Montana, H. Piwnica-Worms, M. J. Rink, M. A. Saper, *Cell* **1998**, 93, 617–625; b) R. A. Reynolds, A. W. Yem, C. L. Wolfe, M. R. Deibel, Jr., C. G. Chidester, K. D. Watengaugh, *J. Mol. Biol.* **1999**, 293, 559–568.
- [95] M. L. Sulis, R. Parsons, *Trends Cell Biol.* **2003**, 13, 478–483.
- [96] S.-A. Kim, P. O. Vacratsis, R. Firestein, M. L. Cleary, J. E. Dixon, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2003**, 100, 4492–4497.
- [97] A. Martins, S. Shuman, *Biochemistry* **2002**, 41, 13403–13409.
- [98] P. J. Rayapureddi, C. Kattamuri, B. D. Steinmetz, B. J. Frankfurt, E. J. Ostrin, G. Mardon, R. S. Hedge, *Nature* **2003**, 426, 295–298.
- [99] S. M. Braday-Kalnay, N. K. Tonks, *Curr. Opin. Cell Biol.* **1995**, 7, 650–657.
- [100] J. N. Andersen, O. H. Mortensen, G. H. Peters, P. G. Drake, L. F. Iversen, O. H. Olsen, P. G. Jansen, H. S. Andersen, N. K. Tonks, N. P. H. Møller, *Mol. Cell. Biol.* **2001**, 21, 7117–7136.
- [101] H. Walzel, U. Schulz, P. Neels, J. Brock, *Immunol. Lett.* **1999**, 67, 193–202.
- [102] P. O'Grady, T. C. Thai, H. Saito, *J. Cell Biol.* **1998**, 141, 1675–1684.
- [103] Eine Übersicht hierzu: P. J. Beltran, J. L. Bixby, *Front. Biosci.* **2003**, 8, D87–D99.
- [104] Eine Übersicht hierzu: S. Brunelleschi, L. Penego, M. M. Santoro, G. Gaudino, *Curr. Pharm. Des.* **2002**, 8, 1959–1972.
- [105] A. Petrone, J. Sap, *J. Cell Sci.* **2000**, 113, 2345–2354.
- [106] a) M. Bergmann, T. Mustelin, C. Oetken, J. Partanen, N. A. Flint, K. E. Amrein, M. Autero, P. Burn, K. Alitalo, *EMBO J.* **1992**, 11, 2919–2924; b) L. M. L. Chow, M. Fournel, D. Davidson, A. Veillette, *Nature* **1993**, 365, 156–160.
- [107] a) T. Katagiri, M. Ogimoto, K. Hasegawa, K. Mizuno, H. Yakura, *J. Biol. Chem.* **1995**, 270, 27987–27990; b) S. Yanagi, H. Sugawara, M. Kurosaki, H. Sabe, H. Yamamura, T. Kuro-saki, *J. Biol. Chem.* **1996**, 271, 30487–30492.
- [108] J. Irie-Sasaki, T. Sasaki, W. Matsumoto, A. Opavsky, M. Cheng, G. Welstead, E. Griffiths, C. Krawczyk, C. D. Richardson, K.

- Aitken, N. Iscove, G. Koretzky, P. Johnson, P. Liu, D. M. Rothstein, J. M. Penninger, *Nature* **2001**, 409, 349–354.
- [109] B. J. Goldstein, F. Ahmad, W. Ding, P. M. Li, W. R. Zhang, *Mol. Cell. Biochem.* **1998**, 182, 91–99.
- [110] Siehe z.B.: a) A. Petrone, F. Battalia, C. Wang, A. Dusa, J. Su, D. Zagzag, R. Bianchi, P. Casaccia-Bonelli, O. Arancio, J. Sap, *EMBO J.* **2003**, 22, 4121–4131; b) N. Sakaguchi, H. Muramatsu, K. Ichihara-Tanaka, N. Madea, M. Noda, T. Yamamoto, M. Michikawa, S. Ikematsu, S. Sakuma, T. Muramatsu, *Neurosci. Res.* **2003**, 45, 219–224; c) M. J. Wallace, J. Batt, C. A. Fladd, J. T. Henderson, W. Skarnes, D. Rotin, *Nat. Genet.* **1999**, 21, 334–338.
- [111] W. Tsai, A. D. Morielli, T. G. Cachero, E. G. Peralta, *EMBO J.* **1999**, 18, 109–118.
- [112] T. C. R. Prickett, D. N. J. Hart, *Immunology* **1990**, 69, 250–256.
- [113] M. Jacobsen, D. Schweer, A. Ziegler, *Nat. Genet.* **2000**, 26, 495–499.
- [114] A. Vogel, C. P. Strassburg, M. P. Manns, *Genes Immun.* **2003**, 4, 79–81.
- [115] Siehe z.B.: R. Ratei, C. Sperling, L. Karawajew, G. Schott, M. Schrappe, J. Harbott, H. Riehm, W. D. Ludwig, *Ann. Hematol.* **1998**, 77, 107–114.
- [116] Y. Shechter, J. Meyerovitch, Z. Farfel, J. Sach, R. Bruck, S. Bar-Meir, S. Amir, H. Degani, S. J. D. Karlish in *Vanadium in Biological Systems: Physiology and Biochemistry* (Hrsg.: N. D. Chasteen), Kluwer, Dordrecht, S. 129–142.
- [117] A. Caselli, P. Chiarugi, G. Camici, G. Manao, G. Ramponi, *FEBS Lett.* **1995**, 374, 249–252.
- [118] K. Ueda, T. Usui, H. Nakayama, M. Ueki, K. Takio, M. Ubukata, H. Osada, *FEBS Lett.* **2002**, 525, 48–52.
- [119] M. Miski, X. Shen, R. Cooper, A. M. Gillum, D. K. Fisher, R. W. Miller, T. J. Higgins, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1995**, 5, 1519–1522.
- [120] H. Montenegro, M. Gutierrez, L. I. Romero, E. Ortega-Barria, T. L. Capson, L. C. Rios, *Planta Med.* **2003**, 69, 677–679.
- [121] J. A. Hasrat, T. DeBruyne, J. P. DeBacker, G. Vauquelin, A. J. Vlietinck, *J. Pharm. Pharmacol.* **1997**, 49, 1145–1149.
- [122] M. M. V. Ramana, P. V. Potnis, *Tetrahedron Lett.* **1996**, 37, 1671–1674.
- [123] a) T. Morino, A. Masuda, M. Yamada, M. Nishimoto, T. Nishikiori, S. Saito, *J. Antibiot.* **1994**, 47, 1341–1343; b) T. Morino, K. Shimada, A. Masuda, M. Nishimoto, S. Saito, *J. Antibiot.* **1994**, 47, 1049–1051.
- [124] a) F. Sarabia, S. Chammaa, F. J. Lopez-Herrera, *Tetrahedron Lett.* **2002**, 43, 2961–2965; b) K. Kurosawa, T. Nagase, N. Chida, *Chem. Commun.* **2002**, 1280–1281.
- [125] T. Hamaguchi, T. Sudo, H. Osada, *FEBS Lett.* **1995**, 372, 54–58.
- [126] M. Sodeoka, R. Sampe, S. Kojima, Y. Baba, T. Usui, K. Ueda, H. Osada, *J. Med. Chem.* **2001**, 44, 3216–3222.
- [127] M. Sodeoka, R. Sampe, T. Kagamizono, H. Osada, *Tetrahedron Lett.* **1996**, 37, 8775–8778.
- [128] T. Usui, S. Kojima, S. Kidokoro, K. Ueda, H. Osada, M. Sodeoka, *Chem. Biol.* **2001**, 8, 1209–1220.
- [129] S. P. Gunasekera, P. J. McCarthy, M. Kelly-Borges, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, 118, 8759–8760.
- [130] J. L. Blanchard, D. M. Epstein, M. D. Boisclair, J. Rudolph, K. Pal, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1999**, 9, 2537–2538.
- [131] a) E. J. Corey, B. E. Roberts, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, 119, 12425–12431; b) J. Boukouvalas, Y. Cheng, J. Robichaud, *J. Org. Chem.* **1998**, 63, 228–229; c) S. T. Magnuson, L. Sepp-Lorenzino, N. Rosen, S. Danishefsky, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, 120, 1615–1616; d) M. Takahashi, K. Dodo, Y. Hashimoto, R. Shirai, *Tetrahedron Lett.* **2000**, 41, 2111–2114; e) M. Jung, N. Nishimura, *Org. Lett.* **2001**, 3, 2113–2115.
- [132] a) K. Dodo, M. Takahashi, Y. Yamada, Y. Sugimoto, Y. Hashimoto, R. Shirai, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2000**, 10, 615–617; b) H. Peng, W. Xie, D. M. Otterness, J. P. Cogswell, R. T. McConnell, H. L. Carter, G. Powis, R. T. Abraham, L. H. Zalkow, *J. Med. Chem.* **2001**, 44, 834–848.
- [133] Siehe z.B.: H. Miyaoka, M. Yamanishi, Y. Kajiwara, Y. Yamada, *J. Org. Chem.* **2003**, 68, 3476–3479.
- [134] a) M. Takahashi, K. Dodo, Y. Sugimoto, Y. Sugimoto, Y. Aoyagi, Y. Yamada, Y. Hashimoto, R. Shirai, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2000**, 10, 2571–2574; b) R. Shimazawa, T. Suzuki, K. Dodo, R. Shirai, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2004**, 14, 3291–3294.
- [135] a) D. Brohm, S. Metzger, A. Bhargava, O. Müller, F. Lieb, H. Waldmann, *Angew. Chem.* **2002**, 114, 319–323; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, 41, 307–311; b) D. Brohm, N. Philippe, S. Metzger, A. Bhargava, O. Müller, F. Lieb, H. Waldmann, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, 124, 13171–13178.
- [136] S. Bäuerle, T. Blume, J. Günther, D. Henschel, R. Hillig, M. Husemann, A. Mengel, C. Parchmann, E. Schmid, W. Skuballa, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2004**, 14, 1673–1677.
- [137] A. E. Wright, P. J. McCarthy, G. K. Schulte, *J. Org. Chem.* **1989**, 54, 3472–3474.
- [138] R. E. Cebula, J. L. Blanchard, M. D. Boisclair, K. Pal, N. J. Bockovich, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1997**, 7, 2015–2020, zit. Lit.
- [139] T. Horiguchi, K. Nishi, S. Hakoda, S. Tanida, A. Nagata, H. Okayama, *Biochem. Pharmacol.* **1994**, 48, 2139–2141.
- [140] P. Wipf, C. R. Hopkins, E. O. Phillips, J. S. Lazo, *Tetrahedron* **2002**, 58, 6367–6372.
- [141] a) N. Hirano, J. Kohno, S. Tsunoda, M. Nishio, N. Kishi, T. Okuda, K. Kawano, S. Komatsubara, *Tetrahedron* **2001**, 57, 421–427; b) J. Kohno, N. Hirano, K. Sugawara, M. Nishio, T. Hashiyama, N. Nakanishi, S. Komatsubara, *Tetrahedron* **2001**, 57, 1731–1735; c) K. Sugawara, J. Kohno, N. Nakanishi, T. Hashiyama, *Tennen Yuki Kagobutsu Toronkai Koen Yoshishu* **2000**, 42, 661–666; d) A. Fürstner, F. Feyen, H. Prinz, H. Waldmann, *Angew. Chem.* **2003**, 115, 5519–5522; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, 42, 5361–5364.
- [142] a) M. Imoto, H. Kakeya, T. Sawa, C. Hayashi, M. Hamada, T. Takeuchi, K. Umezawa, *J. Antibiot.* **1993**, 46, 1342–1346; b) H. Kakeya, M. Imoto, Y. Takahashi, H. Naganawa, T. Takeuchi, K. Umezawa, *J. Antibiot.* **1993**, 46, 1716–1719; c) K. Umezawa, M. Kawakami, T. Watanabe, *Pharmacol. Ther.* **2003**, 99, 15–24.
- [143] K. A. Alvi, A. Casey, B. G. Nair, *J. Antibiot.* **1997**, 51, 515–517.
- [144] A. Fürstner, J. Ruiz-Caro, H. Prinz, H. Waldmann, *J. Org. Chem.* **2004**, 69, 459–467.
- [145] Eine Übersicht hierzu: A. Fürstner, *Angew. Chem.* **2003**, 115, 3706–3728; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, 42, 3582–3603.
- [146] A. Fürstner, K. Reinecke, H. Prinz, H. Waldmann, *ChemBioChem* **2004**, 5, 1575–1579.
- [147] a) A. S. Liotta, H. K. Kole, H. M. Fales, J. Roth, M. Bernier, *J. Biol. Chem.* **1994**, 269, 22996–23001; b) K. T. Hiriyanna, W. R. Buck, S. S. Shen, T. S. Ingebritsen, *Exp. Cell Res.* **1995**, 216, 21–29; c) K. E. Jenkins, A. P. Higson, P. H. Seeberger, M. H. Caruthers, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, 124, 6584–6593; d) I. Marseigne, B. P. Roques, *J. Org. Chem.* **1988**, 53, 3621–3624; e) H. K. Kole, M. Akamatsu, B. Ye, X. Yan, D. Barford, P. P. Roller, T. R. Burke, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1995**, 209, 817–822; f) T. R. Burke, B. Ye, M. Akamatsu, H. Ford, X. Yan, H. K. Kole, G. Wolf, S. E. Shoeson, P. P. Roller, *J. Med. Chem.* **1996**, 39, 1021–1027; g) T. R. Burke, H. K. Kole, P. P. Roller, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1994**, 204, 129–134; h) L. Chen, L. Wu, A. Otaka, M. S. Smyth, P. P. Roller, T. R. Burke, J. Denhertog, Z. Y. Zhang, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1995**, 216, 976–984.
- [148] S. Soeda, T. Shimada, S. Koyanagi, T. Yokomatsu, T. Murano, S. Shibuya, H. Shimeno, *FEBS Lett.* **2002**, 524, 54–58.
- [149] V. S. Murthy, V. M. Kulkarni, *Bioorg. Med. Chem.* **2002**, 10, 897–906.

- [150] T. R. Burke, Jr., B. Ye, X. Yan, S. Wang, Z. Jia, L. Chen, Z.-Y. Zhang, D. Barford, *Biochemistry* **1996**, *35*, 15989–15989.
- [151] C. Dufresne, P. Roy, Z. Wang, E. Asante-Appiah, W. Cromlish, Y. Boie, F. Forghani, S. Desmarais, Q. Wang, K. Skorey, D. Waddleton, C. Ramachandran, B. P. Kennedy, L. Xu, R. Gordon, C. C. Chan, Y. Leblanc, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2004**, *14*, 1039–1042.
- [152] E. J. Moran, S. Sarsh, J. E. Cargill, M. M. Shahbaz, A. Lio, A. M. M. Mjall, R. W. Armstrong, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 10787–10788.
- [153] H. Fu, J. Park, D. Pei, *Biochemistry* **2002**, *41*, 10700–10709.
- [154] J. Park, H. Fu, D. Pei, *Biochemistry* **2003**, *42*, 5159–5167.
- [155] C. Leung, J. Grzyb, J. Lee, N. Meyer, G. Hum, C. Jia, S. Liu, S. D. Taylor, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2002**, *12*, 2309–2323.
- [156] C. Liljebris, S. D. Larsen, D. Ogg, B. J. Palazuk, J. E. Bleasdale, *J. Med. Chem.* **2002**, *45*, 1785–1798.
- [157] J. E. Bleasdale, D. Ogg, B. J. Palazuk, C. S. Jacob, M. L. Swanson, W.-Y. Wang, D. P. Thompson, R. A. Conradi, W. R. Mathews, A. L. Laborde, C. W. Stuchly, A. Heijbel, K. Bergdahl, C. A. Bannow, C. W. Smith, C. Liljebris, H. J. Schostarez, P. D. May, F. C. Stevens, S. D. Larsen, *Biochemistry* **2001**, *40*, 5642–5654.
- [158] S. D. Larsen, F. C. Stevens, T. J. Lindberg, P. M. Bodnar, T. J. O'Sullivan, H. J. Schostarez, B. J. Palazuk, J. E. Bleasdale, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2003**, *13*, 971–975.
- [159] a) L. F. Iversen, H. S. Andersen, S. Branner, S. B. Mortensen, G. H. Peters, K. Norris, O. H. Olsen, C. B. Jeppesen, B. F. Lundt, W. Ripka, K. B. Møller, N. P. H. Møller, *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 10300–10307; b) H. S. Andersen, O. H. Olsen, L. F. Iversen, A. L. P. Sørensen, S. B. Mortensen, M. S. Christensen, S. Branner, T. K. Hansen, J. F. Lau, L. Jeppesen, E. J. Moran, J. Su, F. Bakir, L. Judge, M. Shahbaz, T. Collins, T. Vo, M. J. Newman, W. C. Ripka, N. P. H. Møller, *J. Med. Chem.* **2002**, *45*, 4443–4459.
- [160] S. W. Ham, J. Park, S.-J. Lee, J. S. Yoo, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1999**, *9*, 185–186.
- [161] Z. Yan, M. Kahn, M. Qabar, J. Urban, H.-O. Kim, M. A. Blaskovich, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2003**, *13*, 2083–2085.
- [162] M. S. Malamas, J. Sredy, C. Moxham, A. Katz, W. Xu, R. McDevitt, F. O. Adebayo, D. R. Sawicki, L. Seestaller, D. Sullivan, J. R. Taylor, *J. Med. Chem.* **2000**, *43*, 1293–1310.
- [163] <http://www.wyeth.com>.
- [164] Y. T. Chen, J. Xie, C. T. Seto, *J. Org. Chem.* **2003**, *68*, 4123–4125.
- [165] Y. T. Chen, C. T. Seto, *J. Med. Chem.* **2002**, *45*, 3946–3952.
- [166] J. Xie, A. B. Comeau, C. T. Seto, *Org. Lett.* **2004**, *6*, 83–86.
- [167] a) Y. A. Puius, Y. Zhao, M. Sullivan, D. S. Lawrence, S. C. Almo, Z.-Y. Zhang, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1997**, *94*, 13420–13425; b) K. Shen, Y.-F. Keng, L. Wu, X.-L. Guo, D. S. Lawrence, Z.-Y. Zhang, *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 47311–47319.
- [168] K. I. Skorey, B. P. Kennedy, R. W. Friesen, C. Ramachandran, *Anal. Biochem.* **2001**, *291*, 269–278.
- [169] K. E. You-Ten, E. S. Muise, A. Itié, E. Michalisyn, J. Wagner, S. Jothy, W. S. Lapp, M. L. Tremblay, *J. Exp. Med.* **1997**, *186*, 683–693.
- [170] Siehe Lit. [169].
- [171] J. P. Sun, A. A. Fedorov, S. Y. Lee, X. L. Guo, K. Shen, D. S. Lawrence, S. C. Almo, Z. Y. Zhang, *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 12406–12414.
- [172] a) Z. Jia, Q. Ye, A. N. Dinat, Q. Wang, D. Waddleton, P. Payette, C. Ramachandran, B. Kennedy, G. Hum, S. D. Taylor, *J. Med. Chem.* **2001**, *44*, 4584–4594; b) E. Asante-Appiah, S. Patel, C. Dufresne, P. Roy, Q. Wang, V. Patel, R. W. Friesen, C. Ramachandran, J. W. Becker, Y. Leblanc, B. P. Kennedy, G. Scapin, *Biochemistry* **2002**, *41*, 9043–9051.
- [173] a) B. C. Szczepankiewicz, G. Liu, P. J. Hajduk, C. Abad-Zapatero, Z. Pei, Z. Xin, T. H. Lubben, J. M. Trevillyan, M. A. Stashko, S. J. Ballaron, H. Liang, F. Huang, C. W. Hutchins, S. W. Fesik, M. R. Jirousek, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 4087–4096; b) G. Liu, Z. Xin, H. Liang, C. Abad-Zapatero, P. J. Hajduk, D. A. Janowick, B. G. Szczepankiewicz, Z. Pei, C. W. Hutchins, S. J. Ballaron, M. A. Stashko, T. H. Lubben, C. E. Berg, C. M. Rondinone, J. M. Trevillyan, M. R. Jirousek, *J. Med. Chem.* **2003**, *46*, 3437–3440; c) G. Liu, Z. Xin, Z. Pei, P. J. Hajduk, C. Abad-Zapatero, C. W. Hutchins, H. Zhao, T. M. Lubben, S. J. Ballaron, D. L. Haasch, W. Kaszubska, C. M. Rondinone, J. M. Trevillyan, M. R. Jirousek, *J. Med. Chem.* **2003**, *46*, 4232–4235; d) Z. Xin, G. Liu, C. Abad-Zapatero, Z. Pei, B. G. Szczepankiewicz, X. Li, T. Zhang, C. W. Hutchins, P. J. Hajduk, S. J. Ballaron, M. A. Stashko, T. H. Lubben, J. M. Trevillyan, M. R. Jirousek, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2003**, *13*, 3947–3950; e) Z. Pei, X. Li, G. Liu, C. Abad-Zapatero, T. Lubben, T. Zhang, S. J. Ballaron, C. W. Hutchins, J. M. Trevillyan, M. R. Jirousek, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2003**, *13*, 3129–3132.
- [174] C. K. Lau, C. I. Bayly, J. Y. Gauthier, C. S. Li, M. Therien, E. Asante-Appiah, W. Cromlish, Y. Boie, F. Forghani, S. Desmarais, Q. Wang, K. Skorey, D. Waddleton, P. Payette, C. Ramachandran, B. P. Kennedy, G. Scapin, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2004**, *14*, 1043–1048.
- [175] J. S. Lazo, K. Nemoto, K. E. Pestell, K. Cooley, E. C. Southwick, D. A. Mitchell, W. Furey, R. Gussio, D. W. Zaharevitz, B. Joo, P. Wipf, *Mol. Pharmacol.* **2002**, *61*, 720–728.
- [176] Y. Nishikawa, M. Wang, J. Kerns, C. S. Wilcox, B. I. Carr, *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 34803–34810.
- [177] K. Tamura, E. C. Southwick, J. Kerns, K. Rosi, B. I. Carr, C. Wilcox, J. S. Lazo, *Cancer Res.* **2000**, *60*, 1317–1325.
- [178] J. H. Ahn, S. Y. Cho, J. D. Ha, S. Y. Chu, S. H. Jung, Y. S. Jung, J. Y. Baek, I. K. Choi, E. Y. Shin, S. K. Kang, S. S. Kim, H. G. Cheon, S.-D. Yang, J.-K. Choi, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2002**, *12*, 1941–1946.
- [179] R. A. Urbanek, S. J. Suchard, G. B. Steelman, K. S. Knappenberger, L. A. Sygowski, C. A. Veale, M. J. Chapdelaine, *J. Med. Chem.* **2001**, *44*, 1777–1793.
- [180] J. Sohn, B. Kiburz, Z. Li, L. Deng, A. Safi, M. C. Pirrung, J. Rudolph, *J. Med. Chem.* **2003**, *46*, 2580–2588.
- [181] M. Wilborn, S. Free, A. Ban, J. Rudolph, *Biochemistry* **2001**, *40*, 14200–14206.
- [182] P. Wipf, A. Cunningham, R. L. Rice, J. S. Lazo, *Bioorg. Med. Chem.* **1997**, *5*, 165–177.
- [183] A. P. Ducruet, R. L. Rice, K. Tamura, F. Yokokawa, S. Yokokawa, P. Wipf, J. S. Lazo, *Bioorg. Med. Chem.* **2000**, *8*, 1451–1466.
- [184] K. R. Guertin, L. Setti, L. Qi, R. M. Dunsdon, B. W. Dymock, P. S. Jones, H. Overton, M. Taylor, G. Williams, J. A. Sergi, K. Wang, Y. Peng, M. Renzetti, R. Boyce, F. Falcioni, R. Garippa, A. Olivier, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2003**, *13*, 2895–2898.
- [185] C. Liljebris, J. Martinsson, L. Tedenborg, M. Williams, E. Barker, J. E. S. Duffy, A. Nygren, S. James, *Bioorg. Med. Chem.* **2002**, *10*, 3197–3212.
- [186] M. S. Malamas, J. Sredy, I. Gunawan, B. Milan, D. R. Sawicki, L. Seestaller, D. Sullivan, B. R. Flam, *J. Med. Chem.* **2000**, *43*, 995–1010.
- [187] F. Liang, Z. Huang, S.-Y. Lee, J. Liang, M. I. Ivanov, A. Alonso, J. B. Bliska, D. S. Lawrence, T. Mustelin, Z.-Y. Zhang, *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 41734–41741.
- [188] A. L. Hopkins, E. R. Groom, *Nat. Rev. Drug Discovery* **2002**, *1*, 727–730.
- [189] A. Alonso, J. Sasin, N. Bottini, I. Friedberg, I. Friedberg, A. Osterman, A. Godzik, T. Hunter, J. Dixon, T. Mustelin, *Cell* **2004**, *117*, 699–711.