

Inhibitor-Design

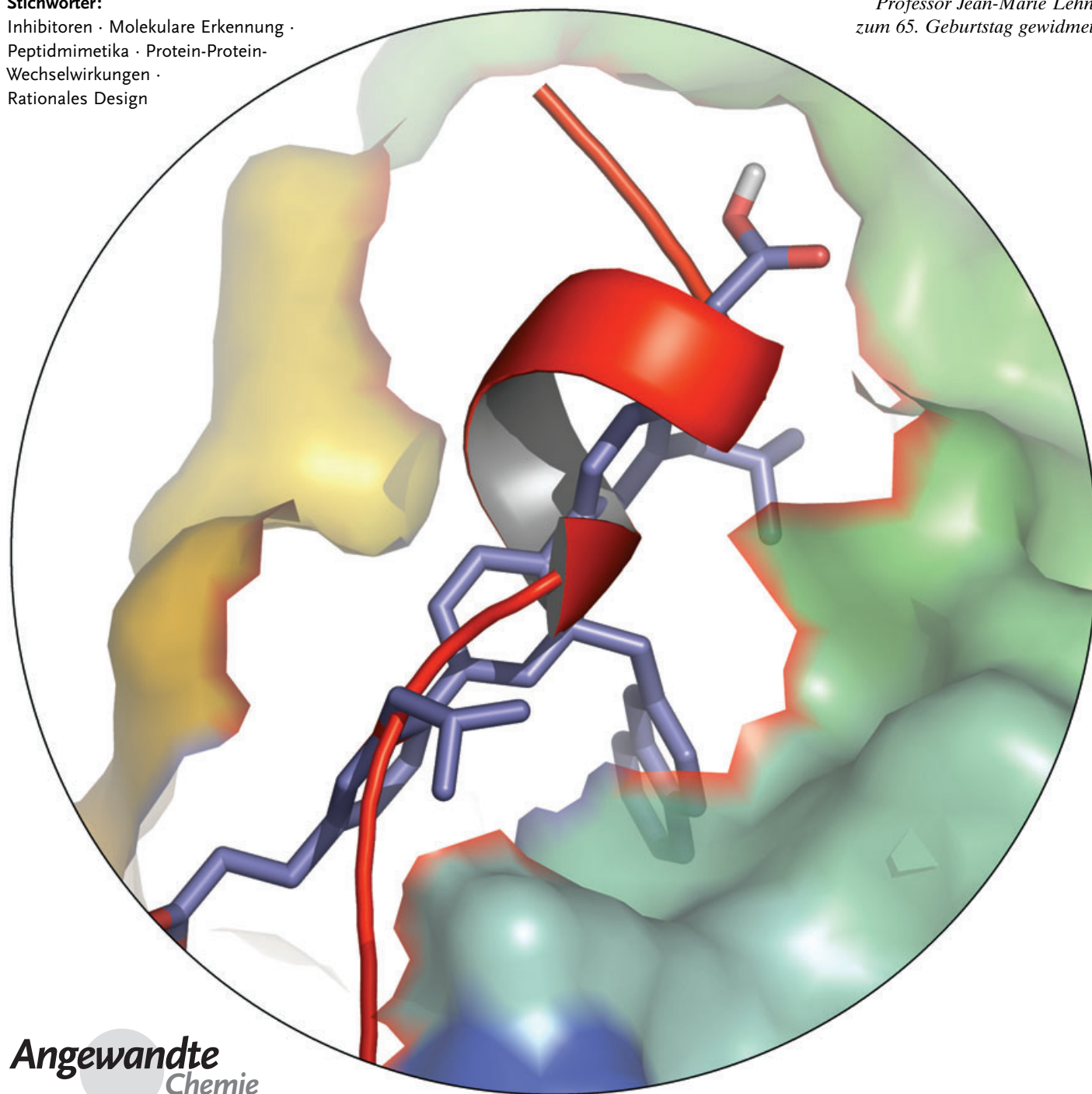
Strategien zur Modulation von Protein-Protein-Wechselwirkungen mit synthetischen Substanzen

Hang Yin und Andrew D. Hamilton*

Stichwörter:

Inhibitoren · Molekulare Erkennung ·
Peptidmimetika · Protein-Protein-
Wechselwirkungen ·
Rationales Design

*Professor Jean-Marie Lehn
zum 65. Geburtstag gewidmet*



Angewandte
Chemie

Die Entwicklung niedermolekularer Modulatoren von Protein-Protein-Wechselwirkungen gilt als wichtiges Forschungsziel mit großem Potenzial für die Entdeckung neuer Therapeutika. Trotz anspruchsvoller Voraussetzungen gibt es eine Reihe von Beispielen für die Inhibierung der Wechselwirkung großer Proteinbindungspartner durch einen niedermolekularen Liganden. In diesem Aufsatz geben wir einen Überblick über die Strategien zur Modulation von Protein-Protein-Wechselwirkungen und präsentieren den aktuellen Forschungsstand beim rationalen Design von Mimetika, die die Strukturen und Funktionen ihrer natürlichen Zielstrukturen abbilden.

1. Einleitung

Die pharmazeutische Industrie stützt sich maßgeblich auf das Geschick von Organochemikern – mit gelegentlicher Hilfe der Natur –, niedermolekulare Verbindungen (MW < 750 Da) zu identifizieren, die eine gegebene Zielstruktur hemmen (Proteine, DNA etc.), außerdem optimierte pharmakokinetische Eigenschaften haben und oral verfügbar sind. Durch die Entschlüsselung des menschlichen Genoms sind, theoretisch zumindest, alle für die Wirkstoffentwicklung verfügbaren Zielstrukturen preisgegeben. Frei nach Herbert Hoover („a chicken in every pot and a car in every garage“) formulierte Stuart Schreiber das Ziel, „... to identify a small molecule partner for every gene product“.^[1]

Ohne Zweifel waren die Arbeiten zum Design niedermolekularer Substanzen, die in das aktive Zentrum von Enzymen passen, bemerkenswert erfolgreich. Das Problem, Enzyminhibitoren zu identifizieren, vereinfacht sich durch die Natur ihrer aktiven Zentren. Meistens besteht die katalytische Domäne aus mehreren Erkennungsstellen innerhalb einer wohldefinierten Spalte oder Höhlung, wo sie mehr oder minder gut vom Solvens abgeschirmt sind. Die vorherrschenden Wechselwirkungen im aktiven Zentrum von Enzymen sind Wasserstoffbrücken, Salzbrücken und elektrostatische Wechselwirkungen, weshalb „wirkstoffähnliche“ Moleküle mit hydrophilen Strukturmotiven oder mit H-Donor- und H-Acceptorgruppen oft aktiv sind. Des Weiteren können die nativen Substrate als wirksame Matrices für Inhibitoren dienen. Schließlich sind die biologischen Testsysteme zur Aktivitätsbestimmung von Enzyminhibitoren meist einfach konzipiert und beruhen auf der Modulation der Enzymaktivität.

Im Unterschied dazu wird die Entwicklung niedermolekularer Modulatoren von Protein-Protein-Wechselwirkungen gemeinhin als eine schwierige Herausforderung gesehen, auch wenn dieser Ansatz ein großes Potenzial zur Entwicklung neuer Therapeutika birgt. Protein-Protein-Wechselwirkungen haben folgende Schlüsseleigenschaften, die auch dazu beitragen, die Modulation zu erschweren: 1) Von natürlichen proteinösen Liganden lassen sich kaum Rückschlüsse für das Design kleiner Moleküle ableiten, und die relevanten Aminosäurereste an den Kontaktflächen sind oft unbekannt.

Aus dem Inhalt

1. Einleitung	4201
2. Schlüsseleigenschaften von Protein-Protein-Assoziaten mit Relevanz für das Inhibitor-Design	4202
3. Strategien zur Erkennung von äußeren Proteinoberflächen	4203
4. Synthetische Modulatoren von Protein-Protein-Wechselwirkungen aus chemischen Bibliotheken	4208
5. Synthetische Inhibitoren von Protein-Protein-Wechselwirkungen aus rationalem Design	4221
6. Zusammenfassung und Ausblick	4228

2) Die Kontaktflächen zwischen Proteinen sind oft groß (typischerweise ca. 1600 Å² vergrabene Oberfläche, entsprechend etwa 170 Atomen), was die kompetitive Wirkung eines kleinen Moleküls stark kompensiert. 3) Die bindenden Regionen der Proteinpartner befinden sich oft nicht nebeneinander und können daher nicht durch einfache synthetische Peptide nachgeahmt werden. 4) Eine selektive Wechselwirkung mit einem individuellen Protein ist schwierig zu erreichen, weil viele Protein-Protein-Grenzflächen gering profiliert sind. 5) Durch Screening von Substanzbibliotheken auf wirksame Inhibitoren von Protein-Protein-Wechselwirkungen sind nur wenige „wirkstoffähnliche“ kleine Moleküle identifiziert worden. 6) Biologische Testsysteme beruhen in der Regel nicht auf der Enzymaktivität, und meist muss auf aufwändigere Techniken zurückgegriffen werden, die den Bindevorgang direkt verfolgen (z.B. Kalorimetrie, Oberflächenplasmonresonanz).

Trotz dieser schwierigen Voraussetzungen gibt es eine Reihe von Beispielen für die Inhibierung von Protein-Protein-Wechselwirkungen durch niedermolekulare Liganden. Mehrere aktuelle Übersichtsartikel zum Thema sind erschienen.^[2–8] Wir geben hier einen Überblick über die Strategien zur Modulation von Protein-Protein-Wechselwirkungen und über den Stand der Forschung beim rationalen Design von Mimetika, die die Strukturen und Funktionen ihrer natürlichen Zielstrukturen abbilden.

[*] Dr. H. Yin, Prof. Dr. A. D. Hamilton
Department of Chemistry
Yale University
P.O. Box 208107, New Haven, CT 06520-8107 (USA)
Fax: (+1) 203-432-6144
E-mail: andrew.hamilton@yale.edu

2. Schlüsseigenschaften von Protein-Protein-Assoziaten mit Relevanz für das Inhibitor-Design

2.1. „Hot Spots“ der Bindungsenergie

In einer richtungsweisenden Analyse gelang es Clackson und Wells, die Bindungsenergie des Komplexes aus dem menschlichen Wachstumshormon (hGH) und der extrazellulären Domäne seines primären Rezeptors (human growth hormone binding protein; hGHbp) einem kleinen komplementären Satz von Aminosäureresten an der Kontaktfläche zuzuordnen.^[9] Daraus wurde gefolgert, dass die Bindungsdomäne eines der Proteinpartner durch relativ einfache kleine Moleküle nachgeahmt werden könnte. Mit der Technik des „Alanin-Scannings“ (bei der die Aminosäuren an der Grenzfläche systematisch zu Alanin mutiert und die Änderungen der freien Bindungsenthalpie bestimmt werden) wurden die Reste identifiziert, die die entscheidende Bindungsregion („funktionelles Epitop“, „hot spot“) aufbauen. Wells et al. fanden heraus, dass von den 31 Seitenketten in der Bindungsregion von hGH acht Reste etwa 85 % der Bindungsenergie beisteuern, während die Hälfte der Reste keinen nennenswerten Beitrag leistet.^[10] In der Bindungsdomäne von hGHbp sind die Reste Trp 104 und Trp 169 dominant, die jeweils über $-4.5 \text{ kcal mol}^{-1}$ zu einer Gesamtenergie der hGH-hGHbp-Komplexbildung von $-12.3 \text{ kcal mol}^{-1}$ beitragen (Abbildung 1).

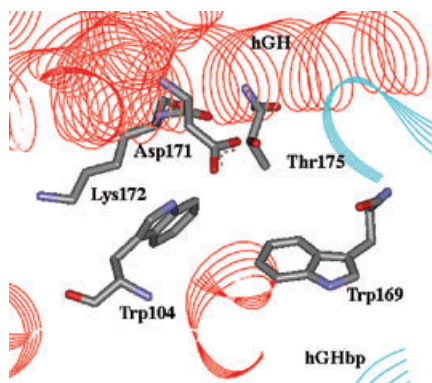


Abbildung 1. hGH-hGHbp-Kontaktfläche (die entscheidenden Reste sind als Stabmodelle gezeigt).

Das Vorkommen von „hot spots“ bei Protein-Protein-Wechselwirkungen ist in vielen Folgestudien untermauert worden.^[11] Bogan et al. untersuchten 2325 Alaninmutanten auf Veränderungen der freien Bindungsenthalpie und zeigten, dass die energetischen Beiträge der einzelnen Seitenketten nicht mit ihren vergrabenen Oberflächen korrelieren.^[12] In einigen Fällen war der „hot spot“ von energetisch irrelevanten Kontaktstellen umgeben, die offenbar wie ein Dichtring fungieren, um das Lösungsmittel fernzuhalten. Bestimmte Aminosäuren – besonders Tryptophan (21 %), Arginin (13 %) und Tyrosin (12 %) – kommen in den „hot spots“ häufiger vor (d. h., sie tragen mehr als 2 kcal mol^{-1} zu einer Bindung bei) als etwa Leucin, Methionin, Serin, Threonin und Valin, die jeweils weniger als 3 % aller Reste in „hot spots“ ausmachen.^[13] Tryptophan, Arginin und Tyrosin finden sich auch häufiger in den Proteingrenzflächen und dort mit einer Anreicherung von 3.91, 2.47 und 2.29 in den „hot spot“-Regionen. Eine Anreicherung von Tyrosin und Tryptophan und eine Verarmung an Valin, Isoleucin und Leucin wurde auch in antigenen Epitop-Sequenzen (complementarity-determining regions; CDRs) nachgewiesen.^[14] Padlan et al. begründeten diese Anreicherung damit, dass die aromatischen Aminosäurereste über hydrophobe Wechselwirkungen zur Bindungsenergie beitragen, ohne einen größeren entropischen Aufwand zu erfordern, da sie weniger frei rotierbare Bindungen aufweisen.

Neuere Entwicklungen in der Bioinformatik gaben weiteren Aufschluss über die Eigenschaften von Protein-Protein-Kontaktflächen und trugen zur Entdeckung von „hot spots“ bei. Eine Fülle von Daten über Alaninmutationen in Protein-Protein-Komplexen ist verfügbar und konnte zum Design kleiner Moleküle mit wechselwirkungsmodulierenden Eigenschaften genutzt werden.^[15] Andere Möglichkeiten zur Entdeckung von „hot spots“ bestehen in der Anwendung von Computermethoden zur Erzeugung kombinatorischer Bibliotheken funktioneller Epitope und zur Identifizierung wiederholt auftauchender Aminosäuremuster.^[16] Mit dieser Methode wurde die räumliche Anordnung von Schlüsselstrukturelementen an Protein-Protein-Kontaktflächen effizient aufgeklärt. Ein von Ben-Tal et al. entwickelter Algorithmus (Rate4Site; <http://consurf.tau.ac.il>) identifiziert funktionelle Kontaktflächen auf der Basis evolutionärer Beziehungen zwischen homologen Proteinen entsprechend ihres phylogenetischen Stammbaumes.^[17] Anhand der Topologie des



Hang Yin ist zurzeit Postdoc bei Prof. William F. DeGrado an der University of Pennsylvania School of Medicine. Er promovierte 2004 bei Prof. Andrew D. Hamilton an der Yale University über synthetische α -Helix-Mimetika als Inhibitoren von Protein-Protein-Wechselwirkungen. Seinen Abschluss als B.S. in Chemie hatte er zuvor an der Universität Peking erworben.



Andrew D. Hamilton ist zurzeit Dekan, Benjamin-Silliman-Professor für Chemie sowie Professor für Molekulare Biophysik und Biochemie an der Yale University. Er absolvierte sein Vorstudium an der University of Exeter, wechselte 1974 an die University of British Columbia und promovierte 1980 in Cambridge bei Sir Alan Battersby mit einer Arbeit zur Porphyrinchemie. Nach einem Postdoc-Aufenthalt in Straßburg bei Prof. Jean-Marie Lehn wurde er 1981 Assistant Professor in Princeton. 1988 wechselte er nach Pittsburgh, wo er 1992 Professor für Chemie und 1994 Leiter des Chemistry Department wurde. 1997 übernahm er seine jetzige Position in Yale.

Stammbaumes und der Zweiglängen, die die evolutionäre Beziehung zwischen zwei Proteinen wiedergeben, wurde mit der Methode eine homodimere Kontaktfläche eines hypothetischen Proteins Mj0577 vorhergesagt, die dann röntgenkristallographisch bestätigt wurde.

2.2. Enthalpie, Entropie und Wärmekapazität

In einer exzellenten Übersicht untersuchte Stites die thermodynamischen Aspekte von Protein-Protein-Assoziationen und die relative Bedeutung von Enthalpie, Entropie und Wärmekapazität für die Stabilisierung des Komplexes.^[7] Der wichtigste Parameter ist die Assoziationskonstante, die sich aus der Differenz der freien Enthalpien (ΔG) des assoziierten und des nichtassoziierten Zustandes der Proteine errechnet. Sie bestimmt, bei welcher Konzentration s signifikante Mengen an Proteinkomplex vorliegen.

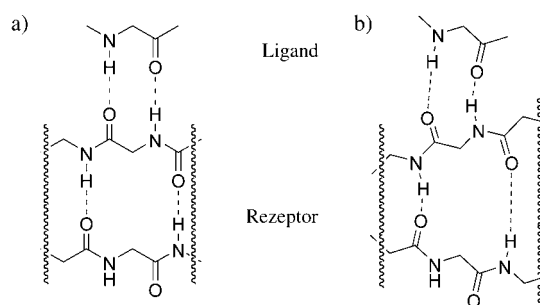
Es ist allgemein akzeptiert, dass der hydrophobe Effekt die Wärmekapazitätsänderung ΔC_p bei der Proteinfaltung und -bindung dominiert.^[18] Stites wies darauf hin, dass es keine eindeutige Korrelation zwischen ΔH oder ΔS und den Werten von ΔG und ΔC_p gibt, wohingegen zuvor erklärt worden war, Protein-Protein-Wechselwirkungen seien entweder enthalpie- oder entropiegetrieben.^[19] Er kam außerdem zu dem Schluss, dass im Allgemeinen hydrophobe Wechselwirkungen die entscheidende Triebkraft für die Bildung von Protein-Protein-Komplexen beisteuern. In manchen Fällen spielen allerdings auch andere Kräfte wie elektrostatische Effekte eine wichtige Rolle bei der Proteinassoziation.^[20] Der Anteil an polarer und unpolare Oberfläche, der bei einer Protein-Protein-Wechselwirkung vergraben wird, korreliert in vielen Fällen schlecht mit dem ΔC_p -Wert.^[21] Eine mögliche Erklärung wäre, dass eine große Zahl von Wassermolekülen an der Schnittstelle vergraben wird, die eine niedrigere Wärmekapazität als das freie Lösungsmittel haben könnten und große Veränderungen von ΔC_p bei Protein-Protein-Wechselwirkungen verursachen.

Cochran argumentierte, dass trotz der großen Kontaktfläche und hoher Bindungsenergien bei der Proteinassoziation kleine molekulare Antagonisten mit kompetitiven Bindungsaffinitäten gefunden werden können.^[6] Die treibende Kraft für das Aufbrechen der Komplexe sollte entweder von einer enthalpisch begünstigten Proteindestabilisierung oder einem entropisch begünstigten Ligandenaustausch stammen.

2.3. Positiv und negativ kooperative Wechselwirkungen

Williams et al. diskutierten komplexere Zusammenhänge der thermodynamischen Parameter von Protein-Protein-Wechselwirkungen.^[22] Sie analysierten die Kooperativität von Protein-Ligand-Wechselwirkungen und schlugen vor, dass die Bindungsenergie zum Teil von Veränderungen innerhalb des Rezeptorproteins herrührt.^[22–25] In diesem Fall hängt die Bindung zwischen zwei Proteinen nicht länger nur von den beteiligten Oberflächenregionen ab, sondern auch davon, wie sich die Protein-Protein-Wechselwirkung auf die innere Struktur der Proteine auswirkt.

Ein Bindungsereignis wird bezüglich einer zweiten Wechselwirkung als positiv kooperativ definiert, wenn die Affinität in Gegenwart dieser zweiten Wechselwirkung zunimmt. Umgekehrt ist ein Bindungsereignis negativ kooperativ, wenn die Affinität in Gegenwart der zweiten Wechselwirkung abnimmt (Schema 1). Die allgemeine Erwartung an eine positiv ko-



Schema 1. Strukturmodelle für a) positive und b) negative Kooperativität; die unteren beiden Wasserstoffbrücken befinden sich innerhalb eines Proteinrezeptors, die oberen beiden werden bei der Bindung eines Peptidliganden gebildet.

operative Bindung geht dahin, dass die Proteinstruktur verdichtet wird, einhergehend mit einem Gewinn an Enthalpie und einem Verlust an Entropie. Ein Beispiel ist der Biotin-Streptavidin-Komplex ($\Delta H = -134 \text{ kJ mol}^{-1}$ und $T\Delta S = -57 \text{ kJ mol}^{-1}$ bei 25°C).^[26] Bei einer positiv kooperativen Bindung reduziert der Ligand die Beweglichkeit der Aminosäurereste, mit denen er direkt wechselwirkt. Da nichtkovalente Bindungen durch die kinetische Bewegungsenergie gelockert werden, binden diese Reste nun fester an benachbarte Gruppen, was letztendlich zu einer dichteren Packung des gesamten Proteins führt.^[24]

Bei negativ kooperativer Ligandenbindung werden die wechselwirkenden Partner dagegen beweglicher, was mit einem Verlust an Enthalpie und einem Gewinn an Entropie einhergeht.^[25] Williams et al. wiesen nach, dass O_2 negativ kooperativ an Hämoglobin bindet.^[24] Die optimale Bindungsweise für O_2 ist mit der Geometrie im strukturell dichten T-Zustand (tense state) nicht kompatibel. Analog zu Schema 1 b) verzerrt der Ligand daher die Struktur des Rezeptors, erzwingt eine Lockerung des Hämoglobin-Tetramers durch den Bruch von Salzbrücken zwischen den Untereinheiten und überführt das Protein in den entspannten, bindenden R-Zustand (relaxed state).^[27]

3. Strategien zur Erkennung von äußeren Proteinoberflächen

Jedes Protein hat eine charakteristische äußere Oberfläche, die geladene, hydrophobe und hydrophile Domänen aufweist. Die Proteinoberflächen sind von entscheidender Bedeutung für die Vermittlung von Protein-Ligand- und Protein-Protein-Wechselwirkungen bei wichtigen biologischen Vorgängen wie Zellproliferation, -wachstum und -differenzierung. Daher könnte ein synthetisches Molekül, das an die elektrostatischen und strukturellen Eigenschaften

des Zielproteins angepasst ist, an die äußere Oberfläche binden und Protein-Protein-Wechselwirkungen aufbrechen. Daraus ergibt sich ein vielversprechender Ansatz zur Regulation biologischer Prozesse.^[28]

3.1. Erkennung von Proteinoberflächen: biologische Strategien

3.1.1. Künstliche Antikörper

Viele Anwendungen von Antikörpern in der Chemie und Medizin erfordern eine definierte molekulare Spezifität in Form monoklonaler Antikörper (mAKs).^[29] Frühere Arbeiten konzentrierten sich auf die Humanisierung von Antikörpern, die von mAKs aus Nagern abgeleitet waren. Ziel war es, Probleme der Immunogenität und ineffizienter sekundärer Immunfunktion zu lösen, die einen klinischen Einsatz oft behinderten.^[30] Die humanisierten Antikörper werden durch Transplantation der CDR-Schleifen aus den konstanten Regionen der Nager-Antikörper in die humanen Antikörper hergestellt. Die funktionalen Antikörperfragmente werden dann von *E. coli* sezerniert.^[31]

Monoklonale Antikörper, die die Wechselwirkung zwischen Interleukin 2 (IL2) und seinem Rezeptor (IL2R) blockieren, sind ein Beispiel für die erfolgreiche Modulation einer Protein-Protein-Wechselwirkung in der Immuntherapie.^[32] Mausantikörper gegen IL2R (anti-Tac) wurden gegen die Spender-gegen-Wirt-Krankheit (graft versus host disease; GVHD) und zur Unterdrückung von Autoimmunerkrankungen in Nagern verwendet.^[33,34] In klinischen Studien zeigte anti-Tac eine therapeutische Wirkung bei steroidresistenter GVHD. Jones et al. humanisierten anti-Tac durch Kombination von CDR aus Nagerantikörpern mit konstanten und Gerüstregionen aus menschlichen Antikörpern und reduzierten so die Xenoelemente auf ein Minimum.^[35] Queen et al. sowie Junghans et al. erzeugten einen humanisierten anti-Tac, der die CDR-Schleife der Maus enthielt, während praktisch der gesamte Rest des Moleküls aus humanem Immunglobulin IgG1_K stammte.^[36]

Es wurden einige Strategien getestet, um die Wirksamkeit der Immuntherapie zu verbessern. Ein Ansatz besteht darin, ein natürliches Toxin so zu modifizieren, dass es die Zellen abtötet, die das vom mAK erkannte Antigen exprimieren. Lorberboum-Galski et al. deletierten die für die Zellerkennung zuständige Domäne I des einkettigen *Pseudomonas*-Exotoxins (PE) und erzeugten so das modifizierte Toxin PE40.^[37] Das chimäre Protein, IL2-PE40, inhibiert die Proteinbiosynthese in IL2R exprimierenden Tumorzelllinien und verursacht den Zelltod. Große Proteintoxine sind allerdings immunogen und haben nur ein schmales therapeutisches Fenster, da der Wirt sehr rasch Antikörper gegen das Toxin entwickelt. Ein radiomarkierter mAK wurde als alternatives Immunkonjugat zum Transport des cytotoxischen Agens in die Zielzellen entwickelt.^[38] Waldmann et al. markierten anti-Tac-Antikörper mit Yttrium-90 zur Behandlung von Patienten mit adulter T-Zell-Leukämie (ATL). Bei 11 von 17 Patienten wurde eine teilweise (9) oder vollständige (2) Remission erzielt.^[33] Mit Radionukliden beladene anti-Tac-Antikörper sind somit ein wirksames Therapeutikum bei IL2R exprimierender Leukämie.

3.1.2. Miniaturproteine

Trotz der Erfolge des Protein-Engineerings bei der Herstellung funktioneller Antikörperfragmente versucht man aus mehreren Gründen, mit kleineren und kompakteren Proteingerüsten zu arbeiten.^[39] 1) Bei strukturierten Proteinen kann man höhere Affinitäten erwarten, weil der Entropieverlust bei der Bindung geringer ist.^[40] 2) Die Wechselwirkung an der Kontaktfläche lässt sich einfacher interpretieren, sofern die Gesamtstruktur des Stammproteins im Wesentlichen erhalten bleibt. 3) Ein gefaltetes Protein sollte stabiler gegen Proteolyse sein als ein Zufallsknäuel, sodass es sich besser für die rekombinante Herstellung eignet. 4) Ein räumlich begrenztes Gerüst kann möglicherweise hydrophobe Reste präsentieren, die in der Peptidform vergraben sind. 5) Die Bindungsaktivität einer Domäne bleibt mit größerer Wahrscheinlichkeit erhalten als die eines Peptids, wenn bei der Produktion eine Fusion mit einem anderen Protein oder einer anderen Domäne erfolgt.

Anstatt solche Proteingerüste de novo zu konstruieren, wurde vielfach von natürlich vorkommenden Proteinen oder Domänen ausgegangen. Mehrere native oder veränderte Proteingerüste wurden bislang verwendet, z. B. β -Barrels,^[41] α -Helixbündel^[42] und das Zinkfinger-Motiv,^[43] um künstliche Moleküle mit Bindungsaffinität zu entwerfen.

Schepartz et al. entwickelten die allgemeine Methode der Proteinpfpflung („protein grafting“), bei der das funktionale Epitop auf ein starres Miniaturproteingerüst aufgepfropft wird. Diese Methode, die oft in Kombination mit molekularer Evolution eingesetzt wird, dient zur Identifizierung von Miniaturproteinen mit hoher Affinität und Spezifität für Protein- und Nucleinsäure-Targets.^[44] Ein aktuelles Beispiel ist die Auffindung von hochaffinen Liganden für die KIX-Domäne des transkriptionalen Coaktivatorproteins (CBP).^[45] Der Komplex aus der CBP-KIX-Domäne und der kinase-induzierbaren Aktivierungsdomäne (KID) des Transkriptionsfaktors CREB gilt als schwieriges Target, da die KID-bindende Spalte an der Oberfläche von KIX flach ist und mehr einer lösungsmittel-exponierten Proteinoberfläche als einer typischen α -Helix-bindenden Höhlung ähnelt.^[46] Zur freien Enthalpie der KID^P-KIX-Komplexbildung tragen hydrophobe Wechselwirkungen wesentlich bei, denn die Seitenketten an den Positionen *i*, *i*+3, *i*+4 und *i*+7 (Tyr134, Ile137, Leu138 und Leu141) auf der gleichen Seite der helicalen Region von CREB-KID wechselwirken mit der Oberfläche von KIX. Diese Schlüsselreste wurden durch Proteinpfpflung an die lösungsmittel-exponierte α -helicale Seite eines kleinen, aber stabilen Proteins, des avianen Pankreaspolypeptids (aPP), gebunden.^[47] Das so erhaltene Phosphopeptid PPKID4^P (GPSQPTYPGDDAPVRRSL^PFFYILLDL^PYLDAPGVC, S^P = Phosphoserin), das das zusätzliche funktionale Epitop enthält (fettgedruckt), zeigte eine hohe Affinität ($K_d = 562 \pm 41$ nM). Seine Präferenz für CBP-KIX war höher als die von Carboanhydrase (CA) ($K_d = 106 \pm 12$ μ M), die ebenfalls hydrophobe Liganden bindet, und von Calmodulin (CaM) ($K_d = 52 \pm 12$ μ M), dessen nativer Ligand smMLCK (smooth muscle myosin light-chain kinase) ebenfalls eine α -helicale Konformation einnimmt, in der sich die entscheidenden bindenden Aminosäurereste in den Positio-

nen i , $i+3$ und $i+7$ (Trp800, Thr803 und Val807) befinden.^[48–50]

Vita et al. berichteten über das rationale Design von Miniaturproteinen, die die mit dem HIV-1-Hüllprotein wechselwirkende CDR2-ähnliche Region von CD4 nachbilden.^[51–53] Als Strukturgerüst diente das Skorpion-Toxin Charybdotoxin,^[54,55] ein kompaktes Polypeptid (37 Aminosäuren), das aus einem antiparallelen dreisträngigen β -Faltblatt und einer kurzen α -Helix besteht und im Zentrum durch drei Disulfidbrücken stabilisiert ist (Abbildung 2b).^[56,57] Dieses

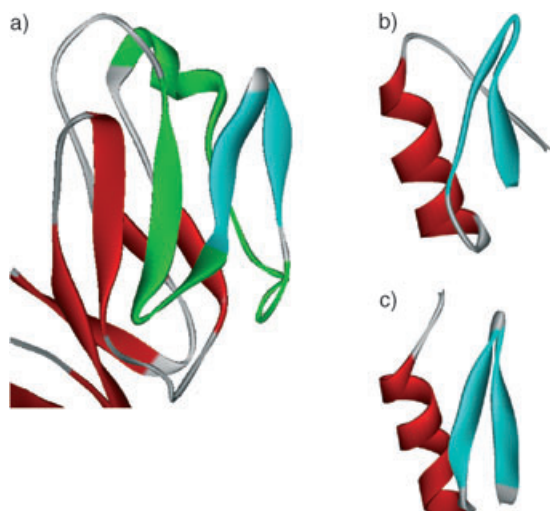


Abbildung 2. Strukturvergleich zwischen CD4 (a) und den Skorpion-Toxinen Charybdotoxin (b) und Scyllatoxin (c). Die Aminosäuren 25–64 von CD4 (grün) binden an gp120. Die CDR2-ähnliche Schleife 36–47 (cyan) wurde auf Charybdotoxin oder Scyllatoxin transferiert, die eine lösungsmittel-exponierte β -Haarnadelschleife (ebenfalls in cyan) mit ähnlicher Struktur wie die CDR2-ähnliche Schleife in CD4 enthalten.

Strukturmotiv findet sich in allen bekannten Skorpion-Toxinen,^[56,58] unabhängig von ihrer Größe, Aminosäuresequenz und Funktion (Blockade von K^+ -, Na^+ -, Cl^- -Kanälen etc.),^[59] was auf eine hohe Toleranz gegen Sequenzadoption schließen lässt. Da das Charybdotoxin die meisten Strukturelemente enthält, die man gewöhnlich auch in Proteinen findet (α -Helix, β -Faltblatt, β -Schleife, Schlaufen), ist es ein geeignetes Gerüst zum Aufpfropfen von funktionellen Aminosäuresequenzen aus Fremdproteinen. Das Zelloberflächenprotein CD4 bindet an das Glycoprotein gp120 der HI-Virenhülle, das eine wichtige Rolle bei der Zielfindung des HI-Virus und der Zellinfektion spielt.^[60] Eine hervorstechende β -Haarnadelschleife, die CDR2-ähnliche Schleife von CD4 (Abbildung 2a), liegt im Zentrum der CD4-gp120-Kontaktfläche und bildet ein antiparalleles β -Faltblatt mit dem β 15-Strang von gp120.^[61] Das Miniaturprotein CD4M, das durch Einbau der Schlüsselaminosäuren von CD4 in das Charybdotoxin-Gerüst (Abbildung 2b) erzeugt wurde, inhibierte die Bindung von gp120 an CD4 mit einem IC_{50} -Wert von 20 μ M.^[55]

Ausgehend von einem anderen Skorpion-Toxin, dem Scyllatoxin (Abbildung 2c), als Wirtsprotein stellten Vita et al. weitere wirksame Inhibitoren der CD4-gp120-Wechselwirkung her.^[52] Scyllatoxin ist ein 31 Aminosäuren langes

Polypeptid mit einem doppelsträngigen β -Faltblatt (18–29), dessen Struktur ebenfalls der CDR2-ähnlichen Schleife von CD4 ähnelt.^[52] Es ist etwas kürzer als das Charybdotoxin und enthält keinen N-terminalen β -Strang, außerdem präsentiert es eine kürzere Schleife an der Gelenkstelle zwischen Helix und erstem β -Strang. Dadurch ist die β -Haarnadelschleife des Scyllatoxins gegen hochmolekulare Wechselwirkungspartner vollständig exponiert, was es zu einer besseren Wirtsstruktur für die CDR2-ähnliche Schleife von CD4 macht. Das chimäre Protein CD4M9, das auf dem Scyllatoxingerüst aufbaut, inhibiert die CD4-gp120-Bindung mit einem IC_{50} -Wert von 0.4 μ M und ist damit 100-mal wirksamer als natives CD4.

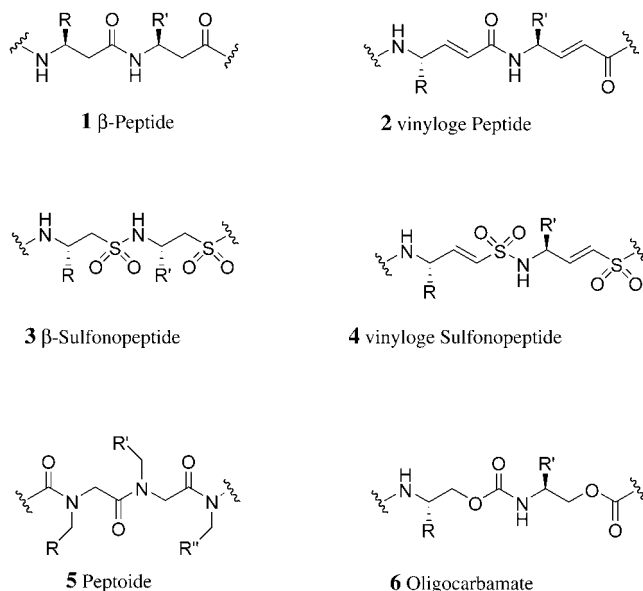
In einer Folgestudie wurde die Kontaktfläche von CD4M9 optimiert, sodass ein wirksames Miniatur-CD4 (CD4M33, IC_{50} = 4.0 nM) mit CD4-ähnlichen Eigenschaften erhalten wurde. Auch CD4M33 zeigte bei niedrigen nanomolaren Konzentrationen starke antivirale Aktivität und inhibierte die Zell-Zell-Fusion von HIV-1.^[53]

3.1.3. Funktionale Oligonucleotide

In Analogie zu Peptidbibliotheken wurde auch die Erzeugung und Selektion von Oligonucleotiden (Aptameren), die spezifische Liganden binden, vielfach für die Entwicklung pharmazeutischer Wirkstoffe und diagnostischer Testsysteme eingesetzt.^[62] Seit die systematische Evolution von Liganden durch ein exponentielles Anreicherungsverfahren (SELEX) 1990 erstmals beschrieben wurde,^[63] wurde das Leistungsvermögen dieser Technologie durch zahlreiche Modifikationen enorm verbessert.^[64] Durch Einführung modifizierter Nucleotide konnten aus den Selektionsansätzen Aptamere mit überraschend hoher In-vivo-Stabilität isoliert werden. Beispielsweise wurden nucleaseresistente Nucleinsäureliganden mit hoher Hemmwirkung (K_i = 100 pM) auf den VEGF (vascular endothelial growth factor; gefäßendothelialer Wachstumsfaktor) aus RNA-Aptamerbibliotheken identifiziert.^[65] Aptamere gegen die reverse Transkriptase des HI-Virus (HIV-RT) aus einem Pool von Einzelstrang-DNA banden mit K_i -Werten von 1 nM an das Enzym.^[66] Aptamere aus RNA und modifizierter RNA, die auf ihre Bindung an den basischen Fibroblasten-Wachstumsfaktor (bFGF) selektiert worden waren, inhibierten erfolgreich die Bindung von bFGF an Zelloberflächenrezeptoren bei Konzentrationen um 1 nM.^[67] Einsträngige Anti-Thrombin-DNA-Aptamere zeigten in vivo eine Hemmwirkung auf die Blutgerinnung.^[68] Die Faltungsmuster dieser selektierten Aptamere sind ausgesprochen divers und enthalten sekundäre Strukturelemente wie G-Quartetts, Stamm-Schleifen-Gebilde und Pseudoknoten.^[69]

3.1.4. Nichtnatürliche Biopolymere

Da Peptide und Nucleotide gegen enzymatischen Abbau anfällig sind, hat man begonnen, nach anderen Strukturgerüsten zu suchen. Untersucht wurden peptid- oder nucleotid-ähnliche Biopolymere wie β -Peptide, β -Sulfonopeptide, Peptoide, Oligocarbamate und PNA (Schema 2).^[70] So berichteten Seebach et al. über ein kleines Cyclo- β -tetrapeptid, das das natürliche Hormon Somatostatin nachahmt und biologische Aktivität sowie mikromolare Affinität für humane



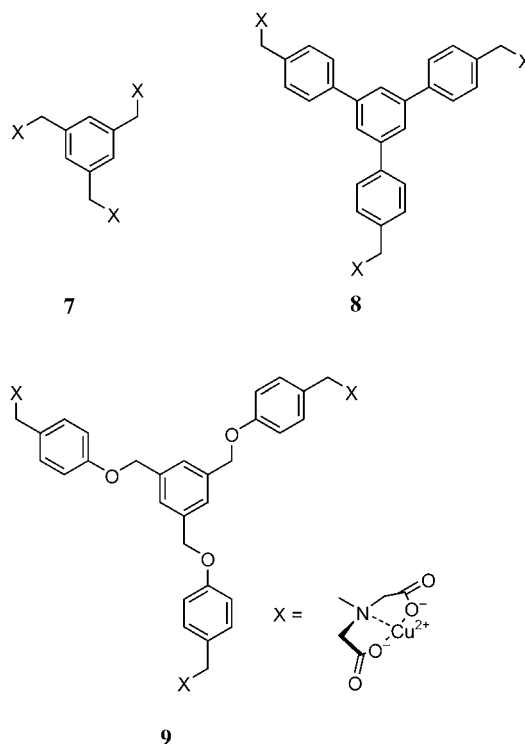
Schema 2. Nichtnatürliche Biopolymere mit peptidähnlichen Eigenschaften.

Rezeptoren zeigt.^[71] Schreiber et al. untersuchten die Konformationseigenschaften kleiner vinyloger Peptide^[72] und Gennari et al. die Faltung von Oligosulfonamiden (β -Sulfopeptiden und vinylogen Sulfopeptiden).^[73] Peptide, die zu den ersten nichtnatürlichen Oligomeren gehörten, die für pharmazeutische und kombinatorische Anwendungen entwickelt wurden, nehmen in Wasser feste Konformationen ein, wenn chirale Seitenketten an die Amid-Stickstoffatome gebunden sind.^[74] Schultz et al. berichteten über eine Familie von Oligocarbamaten, die den monoklonalen Antikörper 20D6.3 mit IC_{50} -Werten zwischen 60 und 180 nm binden. Über ihre Strukturpräferenzen herrscht allerdings Unklarheit.^[75]

3.2. Erkennung von Proteinoberflächen: Synthesestrategien

3.2.1. Erkennung der Carboanhydraseoberfläche durch Cu^{II} -Komplexe

Die Oberfläche eines Proteins exponiert geladene, polare, aliphatische und aromatische Gruppen, die das Angriffsziel oberflächenerkennender Agentien sein können. Ein Beispiel ist die Imidazolgruppe von Histidin, die starke Komplexe mit Übergangsmetallen bildet. Mallik et al. synthetisierten Moleküle mit proteinbindenden Eigenschaften, bestehend aus drei Cu^{2+} -Iminodiacetat-Seitenketten (Cu^{2+} -IDA) an einem aromatischen Moleküllern (Schema 3).^[48] Der Vorteil dieser Strategie besteht darin, dass die Metall-Ligand-Wechselwirkungen in Wasser stärker sind als andere nichtkovalente Kräfte, sodass komplementäre Wechselwirkungen zu einer festen und selektiven Anbindung führen können. Der Kupferkomplex **8** bindet an Carboanhydrase (CA) aus Rindererythrocyten, ein Protein mit sechs Histidinresten an der Oberfläche, mit einer Bindungskonstanten K_a von $3 \times 10^5 M^{-1}$. Der Cu-freie Ligand von **8** geht hingegen keine Bindung ein. Das Derivat **7**, das einen kürzeren Spacer zwischen den Cu^{2+} -



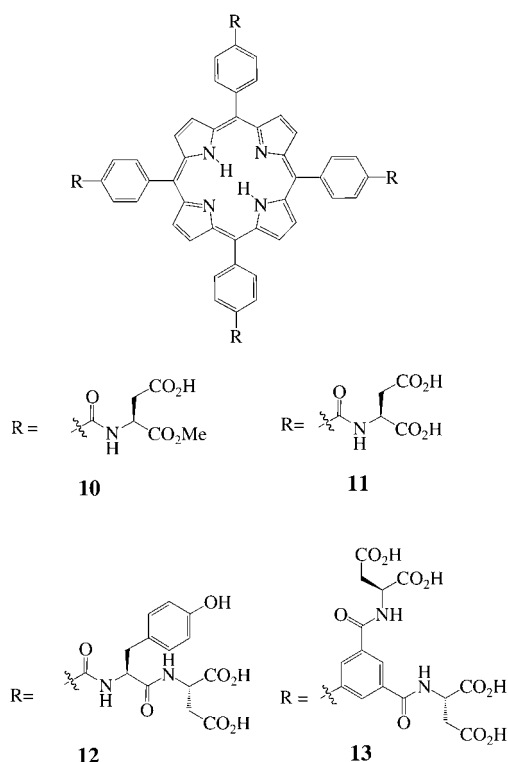
Schema 3. Cu^{2+} -IDA-Komplexe zur Bindung an die Carboanhydraseoberfläche.

IDA-Armen enthält, und das Derivat **9**, das flexiblere Seitenketten aufweist, binden beide schwächer an CA (**7**: $K_a = 7.5 \times 10^4 M^{-1}$; **9**: $K_a = 3.3 \times 10^4 M^{-1}$). Interessanterweise rührt die schwächere Bindung von **7** hauptsächlich von einer weniger günstigen Bindungsenthalpie her, was auf eine schlechtere geometrische Passform zwischen **7** und den Histidinresten von CA hindeutet. Der flexiblere Komplex **9** leistet zwar einen größeren Enthalpiebeitrag zur Bindung als **8**, steuert aber gleichzeitig einen weit ungünstigeren Entropieterm bei ($-T\Delta S$), wodurch insgesamt eine schwächere Bindung resultiert. Des Weiteren bindet **8** selektiv an CA gegenüber Hühnererei-Albumin, das an seiner Oberfläche ebenfalls sechs Histidinreste, allerdings in anderer räumlicher Orientierung enthält. Die Verbindungen **7** und **9** waren weniger selektiv. Diese Befunde zeigen, dass geometrische Passform und Vororganisation der Kupferarme relativ zu den Zielhistidinen wichtige Faktoren für hohe Affinität und Selektivität sind.

3.2.2. Oberflächenerkennung von Cytochrom c

Cytochrom c (Cyt c) aus Pferdeherz ist ein Elektronentransportprotein mit einem hohen isoelektrischen Punkt (pI 10).^[76] Die exponierte Oberfläche in der Häm-Region ist von einer Gruppe kationischer Reste umgeben, die als eigene Bindedomäne für verschiedene Proteinpartner wie Cytochromoxidase oder Cyt c-Reduktase fungieren. Diese Wechselwirkungen reagieren sehr empfindlich auf Modifikationen der oberflächensexponierten Lysinreste, was auf eine starke Abhängigkeit von elektrostatischen Kräften schließen

lässt.^[77] Jain et al. wiesen nach, dass diese Oberfläche von künstlichen Rezeptoren auf Basis eines Tetraphenylporphyrin(TPP)-Gerüsts mit verschiedenen Aminosäuren und Peptidderivaten an der Peripherie erkannt werden kann (Schema 4).^[78]

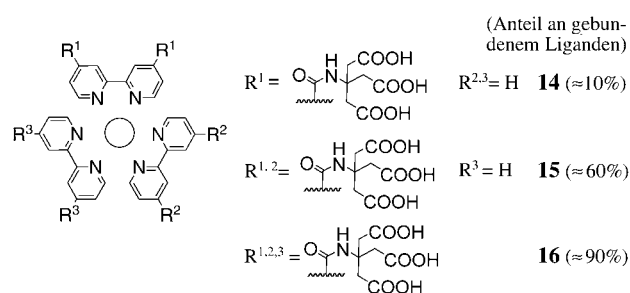


Schema 4. TPP-Derivate zur Erkennung der äußeren Oberfläche von Cytochrom c.

Mithilfe von Fluoreszenzlöschungsexperimenten gelang es auf einfache Weise, die Dissoziationskonstanten für eine Reihe von Derivaten zu bestimmen. Porphyrin **12**, das einen Tyr-Asp-Dipeptidrest an jedem Phenylring trägt, bindet fest an Cyt c mit einem K_d -Wert von 20 nM. Der Vergleich von K_d -Werten für eine Reihe von TPP-Derivaten ergab, dass die Affinität durch das Anbringen anionischer Reste am Porphyrinkern merklich gesteigert wird; so liegt die Affinität des octaanionischen Derivats **11** ($K_d = 160$ nM) etwa sechsmal höher als die des tetraanionischen Derivats **10** ($K_d = 900$ nM). Die thermodynamischen Parameter von **11** ähneln denen der Cyt c-Peroxidase, eines nativen Bindungspartners von Cyt c; ebenso verhält es sich mit der Ionenstärkeabhängigkeit der Wechselwirkungen von **11** und **12** mit Cyt c. Dieses ähnliche Verhalten legt nahe, dass die molekularen Oberflächen von **11** und **12** einen Teil der Bindungsdomäne von Cyt c-Peroxidase nachbilden. Der vom Tetraphenylporphyrin abgeleitete Rezeptor **13** mit seinem hydrophoben Kern und einer Peripherie mit 16 Ladungen zeigte die höchste Affinität mit einem K_d -Wert von 0,67 nM.^[79] Außerdem bindet **13** mit hoher Selektivität an Cyt c gegenüber dem nahe verwandten Protein Cytochrom c_{551} ($K_d = 180$ nM) und Ferredoxin ($K_d = 17$ μ M), was darauf hinweist, dass komplementäre Ladung und Größe Voraussetzungen für eine starke Bindung sind.

Die Effekte von TPP-Derivaten auf die Proteinfaltung wurden ebenfalls untersucht. Das thermische Denaturierungsprofil von Cyt c mit und ohne TPP-Rezeptoren wurde bei pH 7,4 mit Circular dichroismus(CD)-Spektroskopie verfolgt. Der Schmelzpunkt T_m von Cyt c sank in Gegenwart von Rezeptor **12** von 85 °C auf 64 °C. Das Kupferporphyrindimer von **12** induziert außerdem die Entfaltung von Cyt c mit einer Stöchiometrie von 2:1 unter physiologisch relevanten Bedingungen und beschleunigt die Geschwindigkeit des proteolytischen Abbaus.^[80]

Ein verwandtes Konzept zur Erkennung von Cyt c wurde durch Hamachi et al. entwickelt.^[81] Ein [Ru(bpy)₃]-Komplex mit Carboxylatgruppen an der Peripherie bindet Cyt c selektiv gegenüber Myoglobin, Meerrettichperoxidase und Cytochrom b₅₆₂. Der Vorteil dieses Ansatzes liegt in der Templاتفunktion des Metalls, die es ermöglicht, den Komplex durch schrittweise Ligation der einzelnen Bipyridin-Einheiten aufzubauen. Mit dieser Synthesestrategie wurde eine Serie unsymmetrisch substituierter Rezeptoren hergestellt; Verbindung **16** (Schema 5), das symmetrischste Derivat, ging dabei

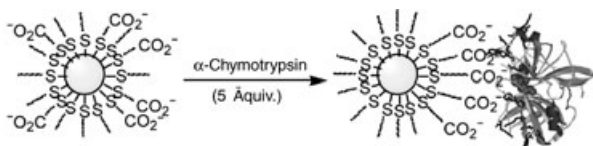


Schema 5. [Ru(bpy)₃]-Komplexe zur Oberflächenerkennung von Cytochrom c.

die stärkste Bindung ein. In Untersuchungen der Photoreduktion von Cyt c, die durch die Komplexe **14–16** katalysiert wird, erwies sich allerdings der Komplex **15** als der wirksamste Katalysator. Als Grund wurde eine fein ausgewogene Balance zwischen dem Bindungsvermögen des Ru-Komplexes und der Zugänglichkeit zum stöchiometrischen Reduktionsmittel genannt.

3.2.3. Inhibierung von Chymotrypsin mit Nanopartikel-Rezeptoren

Rotello et al. entwickelten mit einer gemischten Monolage beschichtete Goldcluster (MMPCs; mixed-monolayer protected gold clusters), die mit terminalen anionischen Gruppen zur Erkennung der positiv geladenen Oberfläche von α -Chymotrypsin (ChT) funktionalisiert waren (Schema 6).^[82] Das Enzym wird durch einen zweistufigen Mechanismus inhibiert, bestehend aus einem schnellen und reversiblen ersten Inhibierungsschritt, gefolgt von einem langsameren irreversiblen Schritt. Die Bindung ist sehr effizient mit einem K_i^{app} -Wert von $10,4 \pm 1,3$ nM und einer Stöchiometrie von fünf Proteinmolekülen pro MMPC. ChT wurde selektiv gegenüber Elastase, β -Galactosidase und dem zellulären Retinsäure-Bindeprotein erkannt, was die Wirk-



Schema 6. Oberflächenerkennung von Chymotrypsin durch einen Nanopartikel-Rezeptor.

samkeit der beteiligten elektrostatischen Wechselwirkungen belegt.

Mit dynamischer Lichtstreuung (DLS) ließ sich zeigen, dass die Hemmung ohne MMPC-Aggregation verläuft. Im CD-Spektrum wurden ein zeitabhängiger Anstieg und eine Verschiebung des Minimums bei 202 nm (entsprechend einem hohen Gehalt an β -Faltblattstrukturen) zu niedrigeren Wellenlängen beobachtet, was auf eine Konformationsänderung hin zum Zufallsknäuel und einen Verlust der nativen Sekundärstruktur hinweist.

In einer Folgepublikation berichteten die Autoren, dass die Zugabe kationischer Detergentien laut DLS-Messungen zur Ablösung von ChT von der Oberfläche der anionischen MMPCs führt.^[83] In einem Versuch, die native Struktur bei Bindung des Proteins aufrechtzuerhalten, wurden Oligoethylenglycolgruppen (OEGs) auf den MMPCs fixiert.^[84] CD- und Fluoreszenzanisotropiemessungen deuteten darauf hin, dass das Protein ein hohes Maß an struktureller Integrität behielt. ChT wurde auch durch erhöhte Ionenstärke unter Erhaltung der vollen enzymatischen Aktivität freigesetzt, was auf eine vollständige Rückbildung der nativen Struktur schließen ließ.

Diese Beispiele zeigen, dass zur Erkennung von Protein-oberflächen vorgesehene Moleküle gleichzeitig auch einen drastischen Einfluss auf die native Konformation des Zielproteins haben können. Es sind noch viele Fragen offen, etwa zum Mechanismus dieser Vorgänge und einer möglichen medizinischen Relevanz. Es sollte möglich sein, Moleküle zu identifizieren, die die Proteinfaltung durch Stabilisierung des nativen Zustandes unterstützen.

4. Synthetische Modulatoren von Protein-Protein-Wechselwirkungen aus chemischen Bibliotheken

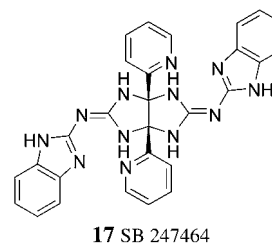
Eine bioinformatische Analyse sagt voraus, dass es ca. 6500 aussichtsreiche Zielproteine (Rezeptoren, Enzyme, Ionenkanäle usw.) für die Entwicklung neuer pharmazeutischer Wirkstoffe gibt.^[85] Diese Zahl erhöht sich dramatisch, wenn man die Protein-Protein-Wechselwirkungen als mögliche Angriffspunkte hinzuzählt. Das Ziel wäre die Entwicklung von effizienten und verlässlichen Strategien zur Auffindung von Molekülen, die, bei akzeptablen pharmakokinetischen Eigenschaften, Protein-Protein-Kontakte aufbrechen können. Hochdurchsatz-Techniken zur Datengewinnung, darunter die Mikroarrayanalyse, der Aufbau kombinatorischer chemischer Bibliotheken und In-silico-Screeningverfahren, sind für die Suche nach solchen Inhibitoren unverzichtbar geworden. Wenn zu einem bestimmten Zielprotein keine Strukturinformationen verfügbar sind, ist ein Screening wahrscheinlich die beste Methode, um synthetische Antago-

nisten der Protein-Protein-Wechselwirkung als Wirkstoffkandidaten zu finden.

4.1. Agonisten von Protein-Protein-Wechselwirkungen

4.1.1.1. *Kleine nichtpeptidische Mimetika von G-CSF*

Der granulocytenstämmige koloniestimulierende Faktor (G-CSF) ist ein Polypeptid-Wachstumsfaktor, der die Produktion neutrophiler Granulocyten reguliert, die als Basis von Wirtabwehrsystemen fungieren.^[86] G-CSF bindet an seine Rezeptoren (G-CSFr) und löst ihre Dimerisierung aus; als Folge werden die Protein-Tyrosinkinase JAK1 und JAK2 aktiviert.^[87,88] Die JAK-Kinasen phosphorylieren dann rezeptorassoziierte Proteine wie die Signaltransduktions- und Transkriptionsaktivatorproteine (STATs; signal transducers and activators of transcription) und regulieren so die Transkription.^[87,89] Die Verbindung **17** (Schema 7) wurde in einem



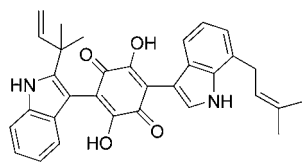
Schema 7. G-CSFr-Agonist 17 (SB 247464).

zellulären Hochdurchsatz-Screening als Agonist des G-CSF-Proteins mit 30% Wirksamkeit in einem Luciferase-Test identifiziert.^[90] Wie G-CSF löst **17** die Tyrosinphosphorylierung bei JAK1, JAK2 und bei G-CSFr aus, nicht allerdings beim Interleukin-3(IL-3)-Rezeptor, wodurch die spezifische Targeterkennung belegt ist. G-CFS und **17** induzieren beide die Phosphorylierung von STAT3 und STAT5. Der zeitliche Ablauf der STAT-Aktivierung durch **17** stimmt mit dem durch G-CSF ausgelösten Ablauf überein.

Weitere Untersuchungen ergaben, dass der Agonist **17** Knochenmarksprimärzellen der Maus stimuliert, die daraufhin Granulocytenkolonien bilden und die Zahl der neutrophilen Zellen im peripheren Blut erhöhen. Insgesamt betrachtet zeigen die Daten, dass **17** als Mimetikum von G-CSF die G-CSF-Rezeptoren aktiviert, indem es an eine andere Domäne von G-CSFr bindet.

4.1.2. Ein Agonist der Insulinrezeptor-Tyrosinkinase mit antidiabetischer Aktivität in vivo

Der aus einem Pilzextrakt isolierte Naturstoff L-783,281 (**18**; Schema 8) wirkt als Agonist der humanen Insulinrezeptor-Tyrosinkinase (IRTK).^[91] Die Entwicklung oral aktiver niedermolekularer Insulinmimetika ist eine der großen Herausforderungen in der medizinischen Chemie. Insulin bindet an die extrazellulären α -Untereinheiten seines Rezeptors und löst damit Konformationsänderungen aus, die die Tyrosinkinaseaktivität stimulieren und damit eine Autophosphorylie-



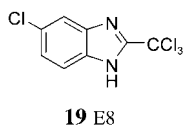
18 L-783,281

Schema 8. Insulinmimetikum **18** (L-783,281), das die Aktivierung der Insulinrezeptor-Tyrosinkinase induziert.

ung der transmembranären β -Einheiten verursachen.^[92] Verbindung **18** wurde aus einer 50000 synthetische Verbindungen und Naturstoffe umfassenden Bibliothek selektiert. Sie induzierte 50 % des maximalen Effekts von Insulin auf die IRTK-Aktivität bei niedriger Konzentration (3–6 μM). Im Mausmodell bewirkte **18** eine deutliche Senkung des Blutglucosespiegels.

4.1.3. Niedermolekulare Schalter für die hGH-hGHbp-Wechselwirkung

Schultz et al. berichteten über Studien zur zweistufigen Regulation des menschlichen Wachstumshormons (hGH) und der extrazellulären Domäne des hGH-Rezeptors (hGHbp).^[93] Zunächst wurden die beiden Reste Thr175 (im hGH) und Trp104 (im hGHbp) zu Glycin mutiert, wodurch eine Höhlung an der Kontaktfläche zwischen hGH und hGHbp entstand. Im zweiten Schritt wurde eine Bibliothek niedermolekularer Substanzen durchmustert und daraus die Verbindung E8 (**19**, Schema 9) als Ligand identifiziert, der den Defekt in der Kontaktfläche komplementiert. Die Affinität von E8 wurde mit Oberflächenplasmonenresonanz bestimmt. Die Bindungsaffinität des mutierten Hormons für den mutierten Rezeptor war in Gegenwart von 100 μM E8 mehr als 1000fach größer als im Kontrollversuch ohne E8. JAK2-Phosphorylierungsassays zeigten, dass der mitogene Signaltransduktionsweg über den hGH-Rezeptor nur in Gegenwart des mutierten Hormons und 50 μM E8 stimuliert wird. Die dosisabhängige Proliferation von IL-3-abhängigen promye-



19 E8

Schema 9. Der Ligand E8 komplementiert eine defekte Kontaktfläche im hGH-hGHbp-Komplex bei Thr175Gly (hGH) und Trp104Gly (hGHbp).

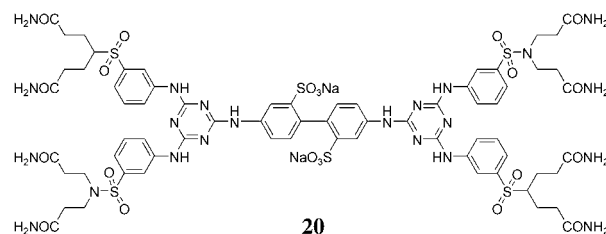
loiden Zellen (FDC-P1) zeigte andererseits, dass E8 die mitogene Signaltransduktion des mutierten hGH-hGHbp-Komplexes blockiert ($\text{EC}_{50} = 10 \text{ nM}$). Insgesamt lässt sich aus den Ergebnissen schließen, dass E8 nicht nur die Bindung des mutierten Hormons vermittelt, sondern auch den Signaltransduktionsweg umschaltet.

4.2 Inhibitoren aus Flüssig- oder Festphasen-Screenings

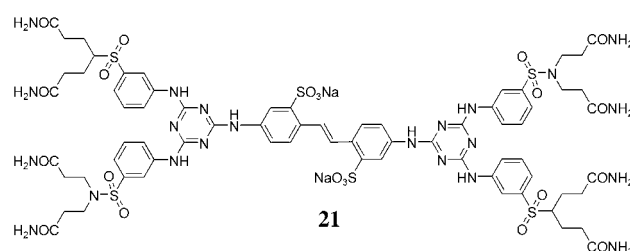
4.2.1. Bistriazin-Derivate zur Inhibierung von Fusionsprotein-multimeren des RS-Virus

Das RS-Virus (RSV; respiratory syncytial virus) ist einer der häufigsten Erreger von Infektionen der unteren Atem-

wege bei Kindern und Säuglingen und ein wichtiger Auslöser von ambulant erworbenen Atemwegserkrankungen bei Erwachsenen.^[94] Das virale 70K-Fusionsglycoprotein (F) des RSV bildet Homotetramere und vermittelt die Virenfusion.^[95] Beim Screening einer 20000 Verbindungen umfassenden Bibliothek mit einem Ganzzell-Testsystem fand eine Forschungsgruppe bei Wyeth-Ayerst Research eine Serie von Bistriazin-Derivaten mit Biphenyl- (**20**) oder Stilben-Linkern (**21**) (Schema 10), die die Virenfusion verhindern.^[96] Diese



20



21

Schema 10. Bistriazin-Inhibitoren der Fusionsprotein-Aggregation des RS-Virus.

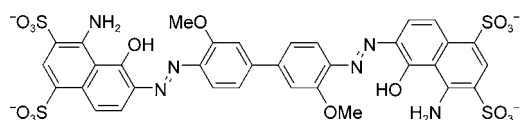
Inhibitoren greifen das RSV(F) an, das seine Funktion auf der Oberfläche des Virions in oligomerem Zustand ausübt. Speziell die Bistriazin-Inhibitoren blockieren selektiv die Aggregation des Fusionsproteins F, ohne andere Oberflächenglycoproteine zu stören. Die Inhibierung geht mit einer Destabilisierung des bioaktiven multimeren Zustandes des F-Proteins einher und führt zu einem verringerten Fusionsvermögen. Der Inhibitor **20** bindet fest an das F-Protein mit einem IC_{50} -Wert von 0.05 μM .

Untersuchungen der Struktur-Wirkungs-Beziehungen der Bistriazin-Derivate belegten die Bedeutung des negativ geladenen Moleküllkerns und der Starrheit des Moleküls rund um die zentrale Einheit. Ein Vorschlag war, dass der Inhibitor mit dem F-Protein durch zahlreiche Wasserstoffbrücken der terminalen Amidgruppen wechselwirkt. Durch Fluoreszenzstudien wurde nachgewiesen, dass **20** und **21** direkt an das F-Protein binden. Mehrere dieser Verbindungen werden gegenwärtig in klinischen Studien als mögliche prophylaktische Wirkstoffe gegen RSV untersucht.^[97]

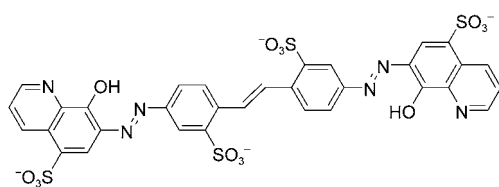
4.2.2. Bisazobenzol- und Bisazonaphthalin-Derivate als Anti-HIV-1-Wirkstoffe durch Unterbrechung der gp120-CD4-Fusion

Die Bekämpfung des humanen Immundefizienzvirus Typ 1 (HIV-1) ist nach wie vor ein zentrales Thema in der klinischen Forschung. Die dritte variable Domäne (V3-Schleife) des äußeren Hüllproteins von HIV-1, des Glyco-

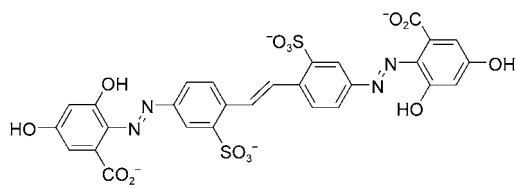
proteins gp120, bindet an die β -Chemokinrezeptoren CCR3 und CCR5 und erleichtert dadurch die Virusinfektion.^[98] Die aktiven Zentren der Corezeptoren CXCR4 und CCR5 werden durch die Bindung von CD4 an gp120 freigelegt, worauf das Virus an die Corezeptoren bindet und mit der Zelle fusioniert. Die Anheftung des Virus an der Zielzelle und die Fusion sind vielversprechende Angriffspunkte für die Wirkstoff-Forschung, wie der aktuelle Erfolg des bei Trimeris entwickelten T-20-Peptids bestätigt, der sich auch als Impuls zur Suche nach nichtpeptidischen Antagonisten erwies.^[99] Bei einem NCI-Screening (NCI = National Cancer Institute) auf antivirale Wirkstoffe wurde der Naphthalinsulfonsäure-Farbstoff Chicago Sky Blue (CSB, **22**, Schema 11) als aktiver



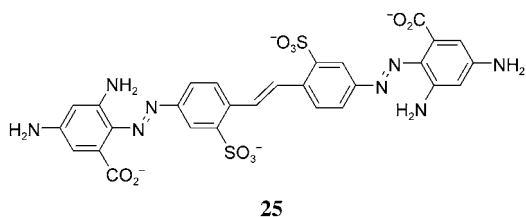
22 Chicago Sky Blue (CSB)



23 Chinoben



24 Resoben



25

Schema 11. Synthetische Inhibitoren der gp120-CD4-Wechselwirkung auf Bisazobenzol- und Bisazonaphthalin-Basis.

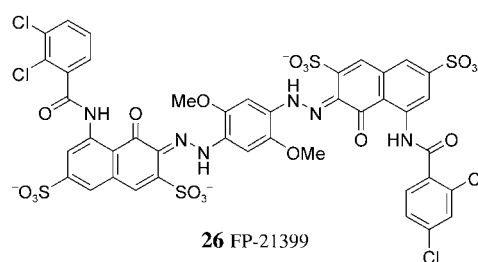
Inhibitor gegen HIV identifiziert. CSB wirkt durch Spaltung der gp120-CD4-Wechselwirkung.^[100] Die Verbindung war in vivo aktiv ($IC_{50} = 4.8 \mu M$), der Azobenzidin-Kern wird jedoch zu carcinogenen aromatischen Aminen metabolisiert, weshalb die Weiterentwicklung gestoppt wurde.

Ein weiteres Screening von CSB-Analoga lieferte Verbindungen wie **23–25** (Schema 11), bei denen die zentrale Biphenylgruppe durch Stilben ersetzt ist, um einen Molekülabbau zu vermeiden.^[101] Die Verbindungen **23** (Chinoben) und **24** (Resoben) unterbrechen die gp120-CD4-Bindung mit

moderaten IC_{50} -Werten von $1.3 \mu M$ und $1.4 \mu M$, während **25** deutlich weniger wirksam ist ($IC_{50} = 31 \mu M$).

Zu Beginn der Studien waren die molekularen Rezeptoren dieser Inhibitoren noch unbekannt. Im Laufe der Untersuchungen zeigte sich jedoch, dass Resoben (**24**) an die V3-Domäne von gp120 und nicht an CD4 bindet. Die Hauptneutralisationsdomäne (PND, principal neutralizing domain) der V3-Schleife ist mit hydrophoben und kationischen Resten angereichert, weshalb die passende Orientierung von anionischen und elektronenreichen Heteroatomen zusammen mit dem aromatischen Charakter der Wirkstoffe wahrscheinlich ein wichtiger Faktor für die Bindung an V3 ist. Resoben (**24**), das das beste pharmakologische Profil von allen untersuchten Verbindungen aufweist, wurde als topisches Mikrobizid zur Verhinderung der HIV-Übertragung vorgeschlagen.^[102]

Ein unabhängiges Screening bei Lexigen lieferte die Verbindung FP-21399 (**26**; Schema 12) als Inhibitor der



26 FP-21399

Schema 12. FP-21399.

Wechselwirkung zwischen gp120 und Antikörpern gegen die V3-Domäne.^[103] FP-21399 hindert gp120 an der Verbreitung T-Zell-topischer Stämme und geht spezifische Wechselwirkungen mit dem gp120-gp41-Komplex während des Virus-eintritts in die Zelle ein.^[104] Ono et al. wiesen nach, dass FP-21399 bereits in Konzentrationen von $1 \mu g mL^{-1}$ Membranfusionen vermittelt. Im Tierversuch reduzierte FP-21399 den Anteil von infizierten Mäusen in einer Population von 71 % (Kontrolle) auf 21–13 % bei einer Dosis von $10\text{--}50 \text{ mg kg}^{-1}$. FP-21399 befindet sich momentan in der klinischen Erprobung in Phase II als Anti-HIV-Medikament; seine Wirkung beruht auf der Unterbrechung der Virusfusion mit der Zellmembran.^[105] Diese Erfolge bei der Suche nach Inhibitoren der HIV-Fusion dienen als gute Beispiele für die Entwicklung synthetischer Liganden als Inhibitoren von Protein-Protein-Wechselwirkungen durch Screening chemischer Bibliotheken.

4.2.3. Bisnaphthalinsulfonate und kationische Porphyrine als Anti-FGF-Wirkstoffe

Fibroblasten-Wachstumsfaktoren (FGF) kommen in einer Reihe von Zelltypen vor und werden mit der Zelldifferenzierung und -entwicklung einschließlich Mitose und Angiogenese in Zusammenhang gebracht. Die FGF-Familie hat mindestens 19 Mitglieder, darunter FGF-1 (saurer FGF) und FGF-2 (basisches FGF), die als die wichtigsten Wachstumsfaktoren angesehen werden und an Heparinsulfat-Proteoglycane binden.^[106] Röntgenkristallographische Untersu-

chungen ergaben, dass FGF-2-Proteine eine dreiblättrige β -Struktur mit einer zentralen Höhlung bilden; das Zentrum ist von hydrophoben Resten umgeben, die in allen Proteinen der FGF-Familie konserviert sind.^[107,108] Durch Mutagenese-Experimente an FGF-2 wurden getrennte funktionelle Domänen für die Bindung des Heparins und des FGF-Rezeptors nachgewiesen (Abbildung 3).^[107,109]

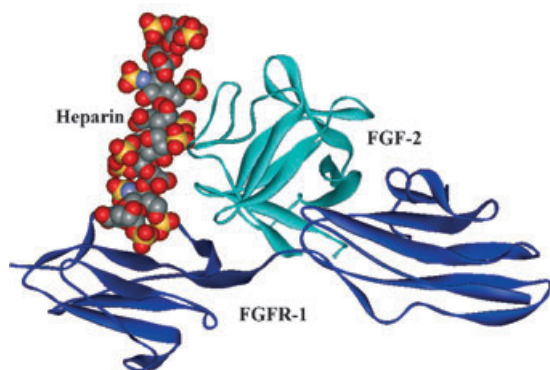


Abbildung 3. Kristallstruktur eines ternären Komplexes aus FGF-2 (cyan), FGFR-1 (blau) und einem Heparinhexamer (UA-P-SGN-IDU-SGN-IDU-SGN).

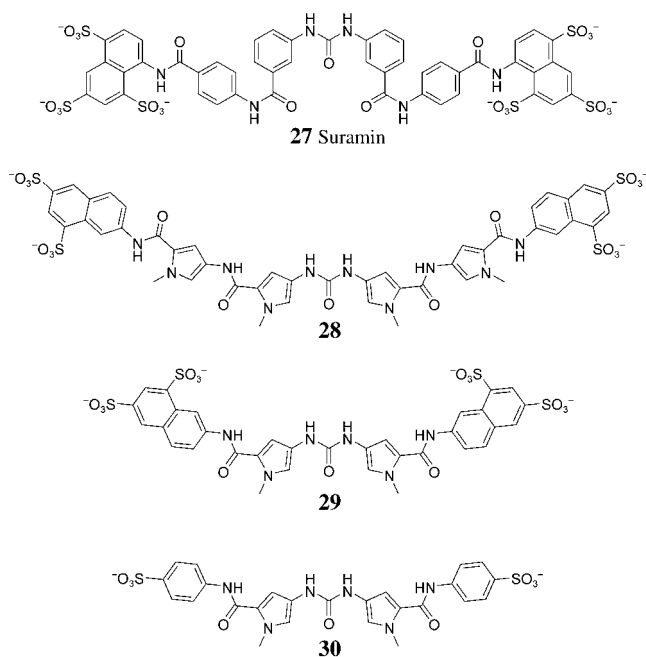
Suramin (**27**; Schema 13), ein Prototyp eines Wachstumsfaktor-Antagonisten, unterbricht die Wechselwirkung zwischen FGF2 und seinem Rezeptor (FGFR) in verschiedenen Zelllinien. Die klinische Weiterentwicklung von Suramin wurde jedoch wegen der hohen Toxizität und der mangelnden Selektivität gestoppt. So zeigten beispielsweise Takano et al., dass Suramin zu Tumorergrößerung führt, wahrscheinlich wegen seiner immunsuppressiven Aktivität.^[110] Gagliardi et al. untersuchten im Detail die Struktur-Wirkungs-Bezie-

hungen von 70 oligoanionischen Suramin-Analoga durch Bestimmung der antiangiogenetischen Aktivität in vivo in der Hühnerei-Chorionallantoismembran (CAM).^[111] Von den 70 Verbindungen hatte **30** (Schema 13) eine antiangiogenetische Wirkung, die der von Suramin gleichkam, sieben weitere Verbindungen wirkten sogar deutlich stärker als Suramin. Alle sieben Analoga leiteten sich von einem Naphthalinsulfonsäure-Gerüst ab und enthielten Harnstoffgruppen. Aus den Experimenten wurde geschlossen, dass die Anwesenheit der Naphthalinsulfonatgruppen ebenso wie die richtige Zahl starrer Spacer entscheidend für die Aktivität sind. Aufbauend auf diesen Befunden versuchten Manetti et al., das pharmakologische Profil von Suramin zu optimieren, ohne seine Affinität zu beeinträchtigen. Der Ansatz bestand in der Synthese heterocyclischer Suramin-Analoga wie **28**.^[112] Verglichen mit **27** wurden diese Analoga mit weniger Sulfonsäuregruppen an den α - oder den β -Aminonaphthalinresten ausgerüstet, um die Bindung an Plasmaproteine zu modulieren. Außerdem wurden die Benzolringe durch Pyrrol oder Pyrazol ersetzt. Die Analoga hatten bessere Toxizitätsprofile als Suramin und gelten als die aussichtsreicheren Kandidaten für Anti-FGF-Wirkstoffe.

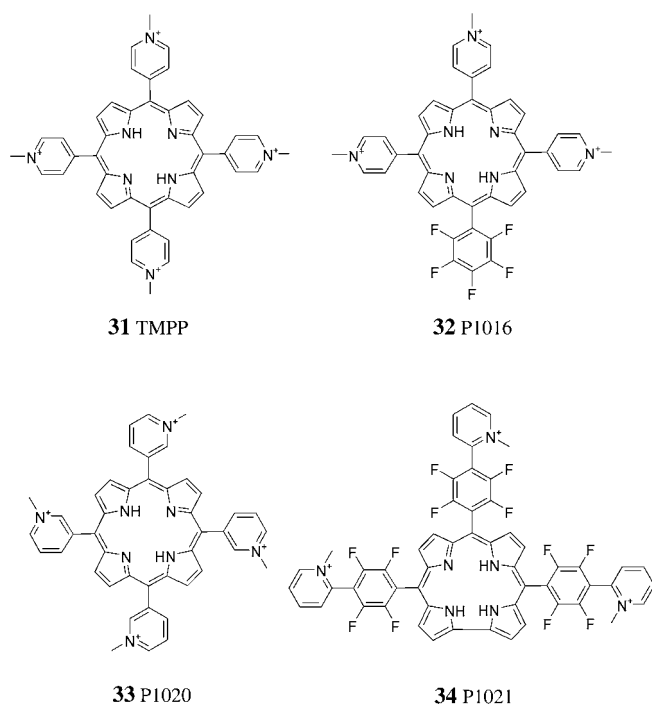
Struktur-Aktivitäts-Untersuchungen ergaben, dass Verbindung **29**, der auf jeder Seite ein Pyrrol-Spacer fehlt, und auch das Naphthalinsulfonat **30** weniger aktiv waren als **28**. Eine der mit Molecular Modeling erhaltenen energiearmen Konformationen von **28** entspricht einem bogenförmigen Molekül, dessen NH-Gruppen alle zur gleichen Seite zeigten. Ein Modell dieser Konformation in Wechselwirkung mit der FGF-Oberfläche erwies sich elektrostatisch und geometrisch als außergewöhnlich komplementär, was auch mit den Ergebnissen der Struktur-Aktivitäts-Untersuchungen korreliert. Zamaï konnte dieses Modell mit Fluoreszenzanisotropiemessungen teilweise validieren und bestätigte eine 1:1-Stöchiometrie für den Komplex aus **28** und FGF ($K_d = 0.127 \mu\text{M}$).^[113] Die Wechselwirkung erweist sich bei Zugabe von Heparin als reversibel, was in Einklang mit der modellierten Struktur darauf hinweist, dass **28** an die heparinbindende Domäne von FGF bindet. Zur weiteren Bestätigung wurde gefunden, dass die Einfach- und Doppelmутanten K128Q ($K_d = 1.23 \mu\text{M}$) und K128-K138Q ($K_d = 5.12 \mu\text{M}$) viel schwächer binden, was auf die Bedeutung der kationischen Seitenketten bei der Komplexbildung hinweist.

Yayon und Mitarbeiter fanden synthetische Porphyrinderivate, die die FGF2-FGFR-Bindung unterbrechen (Schema 14).^[114] Das kationische Tetra(methylpyridinium)porphyrin (TMPP) **31** wurde zunächst in einem Hochdurchsatz-Screening gefunden. TMPP inhibiert die Bindung von ^{125}I -markiertem FGF an FGFR mit einem IC_{50} -Wert von $1 \mu\text{M}$. Es hat auch eine gewisse Affinität zum VEGF und inhibiert dessen Bindung an VEGFR mit $\text{IC}_{50} = 10 \mu\text{M}$. Dagegen wurde die Bindung von EGF, der kein heparinbindender oder heparinabhängiger Wachstumsfaktor ist, an seine Tyrosin-Rezeptorkinase nicht durch TMPP beeinträchtigt. Aufgrund dieser Selektivität wurde vorgeschlagen, dass die Störung der Heparinbindung der entscheidende Faktor für die Wirkung von TMPP ist.

Mehrere Analoga von **31** wurden synthetisiert und in ähnlicher Weise auf ihre Fähigkeit getestet, den FGF2-



Schema 13. Von Bisnaphthalinsulfonat abgeleitete Anti-FGF-Wirkstoffe.



Schema 14. FGF-Inhibitoren auf Basis des TMPP-Gerüsts.

FGFR-Komplex zu unterbrechen. Interessanterweise zeigte das unsymmetrische Derivat **32**, das eine geladene Gruppe weniger enthält, *in vitro* eine 50fach stärkere Wirkung ($IC_{50} = 20$ nM) als TMPP. Derivat **33** mit einer *N*-Methyl-3-pyridinium-Modifikation ist 10-mal weniger aktiv als TMPP, woraus geschlossen wurde, dass die Position der Ladungen wichtig für die Wirkung ist. Da sich **32** im Unterschied zu TMPP (**31**) *in vivo* als völlig inaktiv bei der Metastasierungssuppression des Lewis-Lungencarcinoms zeigte, wurde nach anderen Derivaten gesucht, die sowohl *in vivo* als auch *in vitro* hoch wirksam sind. Das Corrin-Derivat **34**, das wie **32** drei positive Ladungen sowie die gleichen Seitenketten wie **33** trägt, scheint der am besten ausbalancierte Wirkstoff zu sein. Seine *In-vitro*-Aktivität ist zehnmal höher ($IC_{50} = 100$ nM) als die von TMPP, und auch die *In-vivo*-Aktivität ist besser. Es inhibierte die Tumormetastasierung bei einem Fünftel der Konzentration von TMPP.

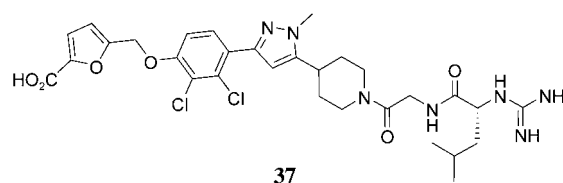
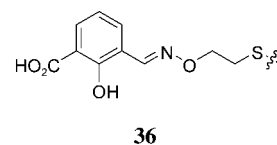
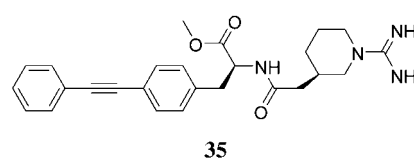
Der genaue Inhibierungsmechanismus ist gegenwärtig noch unklar. Abgesehen von dem Nachweis, dass der ternäre FGF-FGFR-Komplex unterbrochen wird, wurde die direkte Bindung von **34** an FGF oder FGFR nicht näher charakterisiert. Mit Blick auf das Bindungsvermögen von oligoanionischen Komponenten wie Suramin und seinen Derivaten ist es unwahrscheinlich, dass diese kationischen Porphyrine an die gleiche Stelle des FGF binden; möglicherweise legen sie andere molekulare Oberflächen als Zielstrukturen frei, die in dem bioaktiven ternären Komplex eine Rolle spielen.

4.2.4. Inhibitoren der IL2-IL2R α -Wechselwirkung

Die Entwicklung eines synthetischen Antagonisten der Bindung von IL-2 an die α -Untereinheit seines Rezeptors (IL-2R α) ist ein interessantes Beispiel für das Zusammen-

wirken von rationalem Design, Bibliotheks-Screening und einer guten Portion Glück. IL-2 initiiert die T-Zell-Proliferation durch die Erkennung eines heterotrimeren Rezeptorkomplexes, der α -, β - und γ -Untereinheiten enthält, auf der Oberfläche der T-Zelle.^[32] Nach Röntgenstrukturanalyse besteht IL-2 aus einem Bündel aus vier Helices. Durch ortsspezifische Mutagenese wurden die Aminosäuren K35, K38, T41, F42, K43 und Y45 in der AB-Schleife und E61 und L72 in der Helix B als die entscheidenden Reste für die (IL-2)-(IL-2R α)-Komplexbildung identifiziert.^[115] Frühere Untersuchungen hatten ergeben, dass monoklonale Antikörper gegen IL-2R (anti-TAC) effektive immunsuppressive Wirkstoffe sind.^[32,116] In diesen Studien wurden die Vorzüge niedermolekularer Liganden, die in der Lage sind, die (IL-2)-(IL-2R α)-Bindung zu stören, deutlich aufgezeigt.

Bei Hoffmann-LaRoche wurde gefunden, dass der synthetische Inhibitor **35** (Schema 15) die Wechselwirkung zwi-



Schema 15. Synthetische Antagonisten der Bindung zwischen IL-2 und IL-2R α .

schen IL-2 und IL-2R α unterbricht.^[117] **35** war als Mimetikum der R38-F42-Region von IL-2 entworfen worden, wobei Acylphenylalanin verwendet wurde, um die Reste R38 und F42 im Kontakt mit dem IL-2R α -Protein zu emulieren. Verbindung **35** und ihr Enantiomer wurden synthetisiert und in einem kompetitiven Scintillation-Proximity-Assay getestet. **35** zeigte eine moderate Wirkung bei der Spaltung des (IL-2)-(IL-2R α)-Komplexes bei pH 7.4 ($IC_{50} = 3 \mu M$), während das Enantiomer inaktiv war. ¹⁵N-HSQC-NMR-Messungen belegten, dass **35** durch Bindung an IL-2 und nicht an IL-2R α wirkt.^[118]

Der Inhibitor **35** ist ein Beispiel für eine künstlich entworfene niedermolekulare Verbindung, die ein diskontinuierliches Epitop einer Proteinoberfläche nachahmt, und es ist die erste gut charakterisierte nichtpeptidische Substanz, die die Bindung eines Cytokins an seinen Rezeptor inhibiert.

Niedermolekulare IL-2-Inhibitoren mit verbesserter Wirksamkeit wurden vor kurzem bei Sunesis entwickelt.^[119]

Die Strategie beruhte auf der Identifizierung synthetischer Fragmente mit moderater Affinität für Proteinoberflächen mithilfe einer Ankertechnik (Abbildung 4).^[120] Dazu wird eine Bibliothek von Thiol-derivatisierten Fragmenten mit

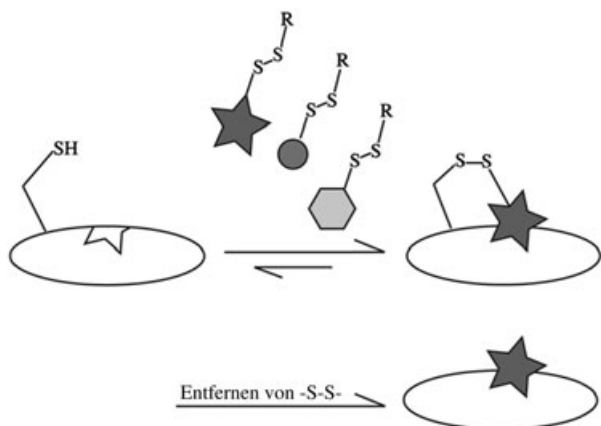


Abbildung 4. Prinzip der Ankertechnik zur Suche nach Leitstrukturen, die eine spezifische Stelle auf der Proteinoberfläche erkennen.

einem Cystein-haltigen oder Cystein-modifizierten Protein unter reduktiven Bedingungen verknüpft. In dem sich einstellenden Gleichgewicht sind diejenigen Fragmente, die zusätzlich zur Disulfidbrücke noch Bindungen zur Proteinoberfläche bilden, angereichert und können massenspektrometrisch detektiert werden. Die Methode eignet sich nicht nur zum Screening großer Bibliotheken von Fragmenten; durch Änderung der Position der Cysteinreste lassen sich auch unterschiedliche Regionen des Proteins erkennen. Damit ist es möglich, zwei oder mehr Fragmente, die mit moderater Affinität an verschiedene Regionen des Proteins binden, zu einem fest bindenden Inhibitor zu verknüpfen.

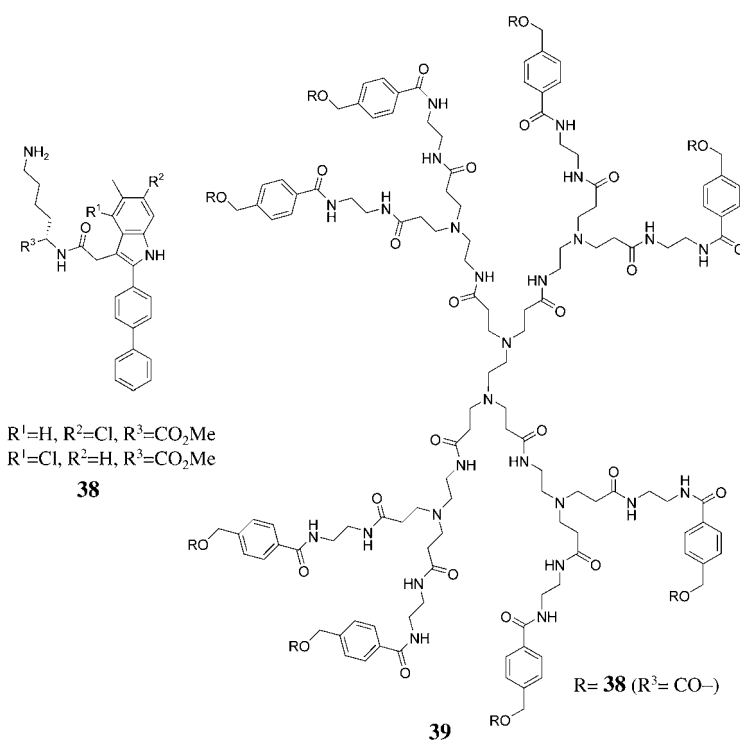
Braisted et al. durchsuchten mit der Ankertechnik eine Substanzbibliothek nach IL-2-Inhibitoren und fanden mithilfe von mutierten Proteinen eine Reihe von aktiven Fragmenten, z. B. **36** (Schema 15).^[119] Eine statistische Analyse ergab, dass die Mutanten Y31C und L72C bevorzugt kleine aromatische Carbonsäuren selektieren. Ein Kernsatz von zwanzig Derivaten wurde zusätzlich zum Carbonsäurederivat **36** synthetisiert. Acht dieser zwanzig Derivate inhibierten die (IL-2)-(IL-2R α)-Bindung in submikromolaren Konzentrationen mit einer 5- bis 50fach verbesserten Wirkung im Vergleich zur Leitstruktur. Das Derivat **37** zeigte die stärkste Bindung mit einem IC₅₀-Wert von 60 nM. Die 1:1-Stöchiometrie für die Bindung von **37** an IL-2 wurde durch Oberflächenplasmonenresonanz bestätigt. Weitere Untersuchungen ergaben, dass **35** und **37** an einen „hot spot“ von IL-2 binden.^[121] Dieser wurde durch eine Konformationsänderung aufgeklärt, die durch die Bindung des niedermolekularen Liganden ausgelöst wird.

Diese Untersuchung zeigt, dass die Suche in einer gerichteten Bibliothek eine gute Alternative zum strukturbasierten, rationalen Design von Inhibitoren von Protein-Protein-Bindungen sein kann. Das strukturbasierte Design stützt sich auf Röntgenkristallographie oder NMR-Strukturen zur Identifi-

zierung von starren, gut definierten Taschen; hingegen haben die Methoden der Fragmentaggregation dann Vorteile, wenn es gilt, Proteinoberflächen mit anpassungsfähigen oder dynamischen Bereichen zu erkennen.

4.2.5 Ein Antagonist der EPO-EPOR-Wechselwirkung, der die EPOR-Dimerisierung induziert

Erythropoetin (EPO) bindet an die EPO-Rezeptoren (EPOR) auf roten Blutkörperchen und reguliert die Proliferation und Differenzierung der Blutstammzellen.^[122] Durch die Bindung von EPO wird eine Dimerisierung von EPOR ausgelöst, die wiederum verschiedene biologische Reaktionen in Gang setzt. Qureshi et al. führten eine Studie mit dem Ziel durch, das funktionale EPO-Protein mithilfe niedermolekularer Verbindungen zu imitieren und auf diese Weise die EPOR-Dimerisierung zu induzieren. Stattdessen wurde, durch Screening der chemischen Bibliothek von Merck, ein Antagonist der EPO-EPOR-Wechselwirkung identifiziert (Verbindung **38**, von der zwei Regioisomere existieren; Schema 16).^[123] Die antagonistische Wirkung von **38** auf die EPO-EPOR-Bindung (IC₅₀ = 59.5 \pm 1.1 μ M) wurde durch Radiomarkierung analysiert.



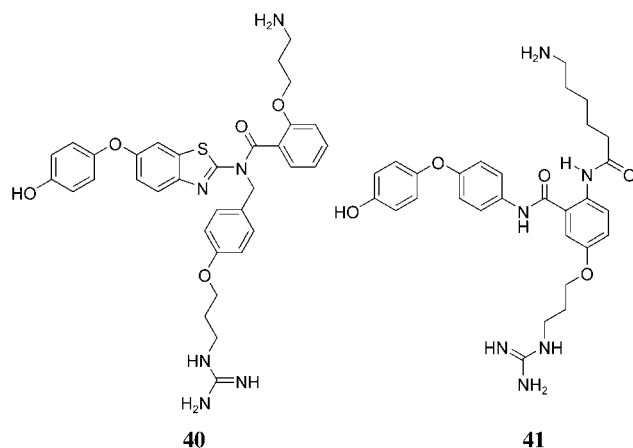
Schema 16. Synthetische Antagonisten der EPO-EPOR-Komplexbildung.

Eine verzweigte Verbindung **39**, die acht Einheiten des Fragments **38** enthält, zeigte eine verbesserte Wirksamkeit (IC₅₀ = 4.4 \pm 1.9 μ M) und war in der Lage, die EPOR-Dimerisierung auszulösen. Analog zu natürlichem EPO konnte **39** auch ein STAT-abhängiges Luciferase-Reportergen in BAF-Zellen aktivieren, die menschliches EPOR exprimieren. Außerdem förderte es die Proliferation von EPOR-exprimierenden Tumorzelllinien und die Differenzierung menschl-

cher Vorläuferzellen zu Kolonien oder blutbildenden Zellen. Diese Ergebnisse zeigen, dass **38** ein schwacher Antagonist der EPO-EPOR-Bindung ist und dass **39**, das mehrere identische Bindedomänen enthält, als Aktivator von EPOR wirkt.

4.2.6. Ein niedermolekularer Modulator eines Calciumkanals vom N-Typ

Der Calciumkanal vom N-Typ ist ein Schlüsselprotein für die Freisetzung von Neurotransmittern im zentralen und peripheren Nervensystem.^[124] Die Organisation der Proteinuntereinheiten innerhalb des Calciumkanals ist essentiell für die biologische Funktion, und in früheren Arbeiten wurde nachgewiesen, dass die Aktivität des Calciumkanals durch eine Modulation der Wechselwirkung zwischen den Unter-einheiten beeinflusst werden kann.^[125] Mit Computermodellierung wurde ein Mimetikum des diskontinuierlichen, drei Reste umfassenden Pharmakophors des ω -Conotoxins GVIA entworfen. GVIA ist ein nativer Ligand von spannungsabhängigen Calciumkanälen vom N-Typ.^[126] Das Benzothiazol-derivat **40** (Schema 17) wurde ausgewählt, um den K2- und



Schema 17. Inhibitoren von Calciumkanälen des N-Typs.

Y13-C α -C β -Bindungsvektor entsprechend der Vorhersage des Computermodells nachzuahmen. Eine weitere Strukturoptimierung führte zum Anthranilamid **41**, dessen Konformation flexibler ist. Bei der funktionalen Blockade des Calciumkanals vom N-Typ wurden moderate Aktivitäten beobachtet (**40**, IC₅₀ = 98 μ M; **41**, IC₅₀ = 68 μ M).

4.2.7. Allosterische Inhibitoren der iNOS-Dimerisierung

Bei den Isoformen der Stickstoffoxidsynthase (NOS) aus Säugern handelt es sich um homodimere Proteine, die die NADPH-abhängige Oxidation von L-Arginin zu Stickoxid (NO) und L-Citrullin katalysieren.^[127] Die Kristallstrukturen der drei NOS-Isoformen (eNOS, nNOS und iNOS) ließen eine gemeinsame katalytische Häm-Domäne erkennen, die in unmittelbarer Umgebung des aktiven Hämzentrums hoch konserviert ist.^[128] Da die NOS-Isoformen nur als Homodimere aktiv sind,^[129] hätten synthetische Substanzen, die die

Dimerisierung der Untereinheiten unterbrechen, ein breites therapeutisches Potenzial bei iNOS-vermittelten Erkrankungen.

Eine Forschungsgruppe bei Berlex Bioscience fand hoch wirksame und selektive Pyrimidinimidazol-basierte Inhibitoren beim Screening einer 8649 Verbindungen umfassenden Bibliothek (hergestellt in drei kombinatorischen Schritten an einer festen Phase).^[130] In einem zellulären Testsystem auf iNOS-Aktivität wurde die Erzeugung freier NO \cdot -Radikale detektiert; dabei wurden 53 Verbindungen (entsprechend 0.6 % der Bibliothek) als vorläufige Leitstrukturen identifiziert. Die Bindungsweise einer der aktivsten Verbindungen, **42** (K_i = 2.2 nM), wurde durch Röntgenkristallographie weiter charakterisiert (Abbildung 5). In der Kristallstruktur erkennt

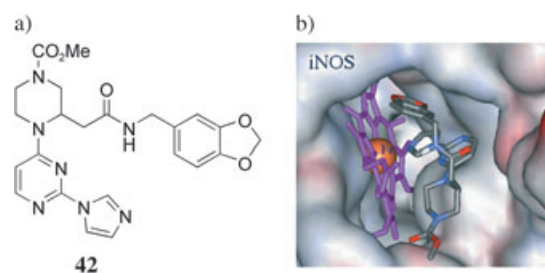
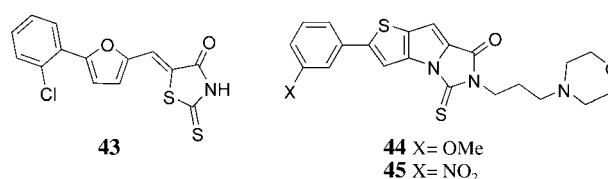


Abbildung 5. a) iNOS-Inhibitor auf Pyrimidinimidazol-Basis; b) die Kristallstruktur des Inhibitor-iNOS-Komplexes zeigt, dass **42** mit dem Häm im aktiven Zentrum koordiniert ist.

man, dass **42** die Argininbindestelle der iNOS-Oxygenasedomäne besetzt und direkt mit der Hämgruppe koordiniert ist. Die Helix 7a der iNOS (nicht gezeigt) wird ebenso wie der für die Argininbindung maßgebliche Rest Glu371 durch die Bindung von **42** verdrängt, und die dadurch entstehende Störung wirkt sich auf die Kontaktfläche des Dimers so aus, dass die Dimerisierung durch einen allosterischen Effekt gehemmt wird. Dies ist einer der relativ seltenen Fälle, in denen der Inhibitionsmechanismus eines niedermolekularen Liganden einer Protein-Protein-Bindung vollständig aufgeklärt wurde.

4.2.8. Photochemisch verstärkte Inhibitoren der (TNF- α)-TNFRc1-Wechselwirkung

Eine Forschungsgruppe bei DuPont entwickelte eine Gruppe photochemisch verstärkter niedermolekularer Inhibitoren des Tumornekrosefaktors alpha (TNF- α),^[131] eines pleiotropen Cytokins, das am Entzündungsgeschehen beteiligt ist.^[132] In einem orientierenden Screening wurde Verbindung **43** (Schema 18) als Leitstruktur mit moderater Hemm-



Schema 18. Photochemisch verstärkte TNF- α -Inhibitoren.

wirkung der Bindung von TNF- α an seinen nativen Rezeptor TNFRc1 identifiziert ($IC_{50} = 2.9 \mu M$). Aus Untersuchungen der Struktur-Wirkungs-Beziehungen ergab sich, dass ein Ersatz des internen heterocyclischen Schwefels zu einer verbesserten Wirkung führt. Entsprechend zeigten die modifizierten Verbindungen **44** und **45** IC_{50} -Werte von 50 nM bzw. 270 nM. Noch interessanter aber war, dass **43** zwischen den Rezeptoren TNFRc1 und TNFRc2 mit einer Selektivität vom Faktor 2000 unterscheidet. Der Methylether **44** inhibierte die TNF-induzierte Phosphorylierung von I κ -B in Ramos-Zellen mit einem IC_{50} -Wert von 600 nM und war bis zu Konzentrationen von 100 μM nicht cytotoxisch. Die Röntgenstruktur ließ erkennen, dass **45** kovalent an das Stickstoffatom im Proteinrückgrat bei A62 von TNFRc1 bindet. Seine Wirkung besteht wahrscheinlich in der Blockade der Wechselwirkungen zwischen der exponierten Tyr-haltigen β -Schleife der nativen Liganden und der Region nahe A62 in TNFRc1.

Eine ganz wesentliche Eigenschaft der Rhodamin-Thiocarbonylderivate ist, dass sie lichtabhängige TNF- α -Inhibitoren sind. **45** bindet offenbar reversibel im Dunkeln und irreversibel nach Belichtung. Die Autoren schlagen einen Mechanismus vor, nach dem die Inhibitoren mit niedriger Affinität reversibel an TNFRc1 binden und die Rezeptoren dann kovalent in einer photochemischen Reaktion modifizieren.

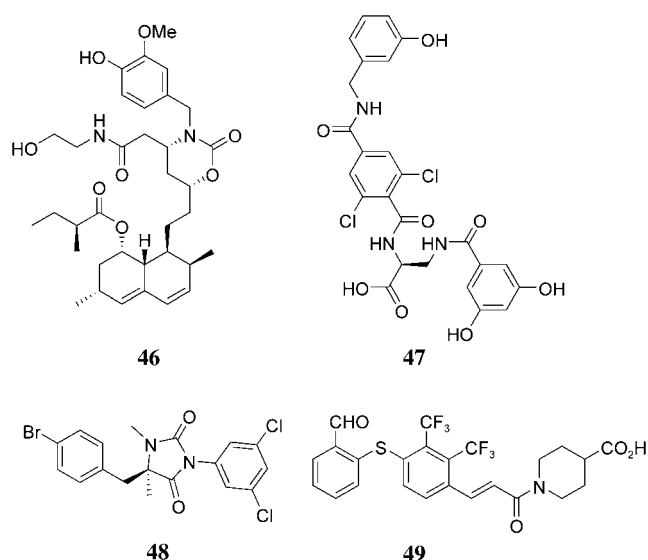
4.2.9. Inhibitoren der (ICAM-1)-(LFA-1)-Wechselwirkung

Integrine sind eine große Familie von Zelloberflächen-Rezeptorproteinen, die die mechanischen und chemischen Signale der extrazellulären Matrix (ECM) durch die Zellmembran weiterleiten.^[133] Viele Integrinsignale laufen beim Zellzyklus zusammen und modulieren zelluläre Prozesse wie Proliferation und Differenzierung. Funktionale Integrine sind Heterodimere aus zwei transmembranären Glycoproteinuntereinheiten α und β , die nichtkovalent gebunden und zueinander homolog sind. Jede α , β -Kombination hat ihre eigene Bindungsspezifität und eigenen Signaleigenschaften.

Die Wechselwirkung zwischen dem LFA-1 (leucocyte function-associated antigen 1) und dem intrazellulären Adhäsionsmolekül 1 (ICAM-1) wird wegen ihrer wichtigen Rolle bei der Regulation von Immunantwort und Entzündungsreaktionen intensiv erforscht.^[134] LFA-1 bildet einen Komplex mit ICAM-1, indem es in die I-Domäne zwischen die β -Faltblattregionen 2 und 3 einer siebenblättrigen mutmaßlichen β -Propellerregion in der α_L -Untereinheit inseriert.^[135] Gleich mehrere Forschungsgruppen berichteten in letzter Zeit über die Identifizierung niedermolekularer Inhibitoren der (ICAM-1)-(LFA-1)-Wechselwirkung durch Screening-Verfahren (siehe Schema 19 und Tabelle 1).

4.2.10. Mediatoren des zellulären Signaltransduktionsweges aus kombinatorischen Flüssigphasen-Bibliotheken

Das in der Arbeitsgruppe um Boger entwickelte Verfahren zum Aufbau kombinatorischer Bibliotheken in Lösung ist eine wichtige Methode zur Untersuchung niedermolekularer Modulatoren zellulärer Signalwege, die als Inhibitoren, Promotoren oder Mimetika von Protein-Protein-Wechselwirkungen



Schema 19. Synthetische Inhibitoren der (ICAM-1)-(LFA-1)-Wechselwirkung (siehe Tabelle 1).

Tabelle 1: Inhibitoren der (ICAM-1)-(LFA-1)-Komplexbildung (siehe Schema 19).

Verbindung	Quelle	In-vitro-Affinität	Hemmung der Zelladhäsion	Bindung an die I-Domäne
46 ^[235, 245]	Novartis	$IC_{50} = 40 \text{ nM}$	$IC_{50} = 0.4 \mu M$	+
47 ^[235]	Genentech	$IC_{50} = 20 \text{ nM}$		–
48 ^[246]	Boehringer Ingelheim	$K_d = 26 \text{ nM}$	$IC_{50} = 2.6 \mu M$	+
49 ^[247]	Abbott Laboratories	$IC_{50} = 5 \text{ nM}$	$IC_{50} = 0.1 \text{ nM}$	+

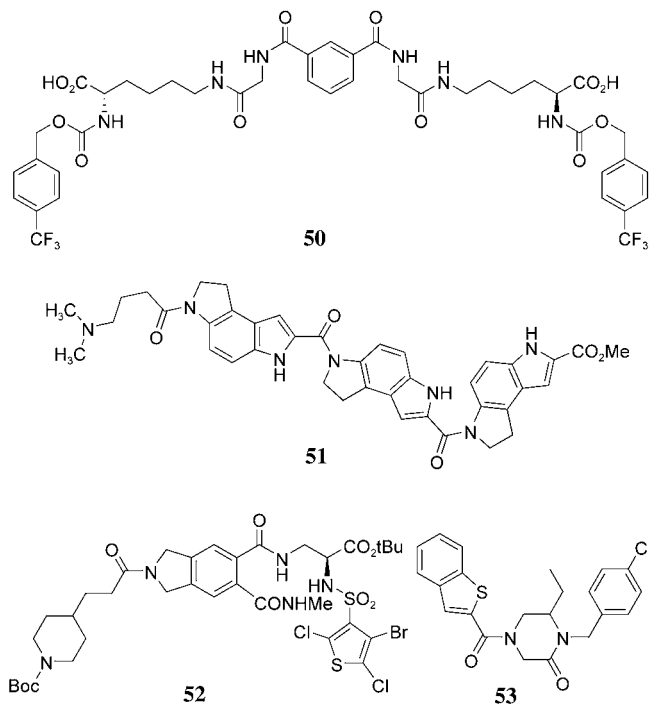
gen fungieren.^[3] Die Synthese kombinatorischer Bibliotheken in Lösung hat gegenüber den Festphasenstrategien den Vorteil, dass viel größere Substanzmengen hergestellt werden können. Dies wiederum ermöglicht den wiederholten Einsatz einzelner Bibliothekskomponenten, ohne dass eine Nachsynthese erforderlich wäre. Das Verfahren ist denkbar einfach und für viele Bibliotheksentwürfe geeignet. Boger et al. wählten mehrere Angriffspunkte in Signaltransduktionswegen aus, in denen Protein-Protein-Wechselwirkungen auf verschiedenen Ebenen der Modulation zellulärer Signalgebung Schlüsselrollen spielen.^[3] In Tabelle 2 sind Angriffspunkte, Screeningmethoden und gefundene Substanzen mit ihrer Hemmwirkung zusammengestellt (siehe auch Schema 20). Ausführlichere Diskussionen finden sich an anderer Stelle.^[2–4]

4.2.11. Antagonisten von MDM2, die die Akkumulation von p53 induzieren

p53 ist ein Transkriptionsfaktor, der in etwa 50% der Tumoren beim Menschen mutiert ist.^[136] Die Überexpression von Wildtyp-p53 induziert eine große Zahl nachgeordneter

Tabelle 2: Synthetische Mediatoren zellulärer Signaltransduktionswege, identifiziert beim Screening von löslichen kombinatorischen Bibliotheken (siehe Schema 20).

Wechselwirkung	Screening-Methode	Inhibitor	IC ₅₀ [μM]	Hemmmechanismus
MMP-2/α _v β ₃	ELISA	50	1.0	antiangiogenetische Wirkstoffe ^[248]
Paxillin/α ₄	ELISA	51	0.3	Hemmung der Zellwanderung
c-Myc/Max	FRET	52	20	Hemmung der c-Myc-induzierten onkogenen Transformation ^[249]
LEF-1/β-Catenin	Reporter-Assay	53	4	Hemmung der LEF-1/β-Catenin-vermittelten Gentranskription

**Schema 20.** Mediatoren zellulärer Signaltransduktionswege.

Gene, die einen Zellzyklusarrest oder Apoptose auslösen. In ungestressten, normalen Zellen ist p53 nur in sehr geringen Konzentrationen vorhanden, weil es über den ubiquitinabhängigen Proteasomweg schnell abgebaut wird. Eine Forschungsgruppe bei Pfizer identifizierte niedermolekulare Verbindungen, die p53 stabilisieren, indem sie die Ubiquitinierung hemmen und so die Apoptose menschlicher Tumorzellen induzieren.^[137]

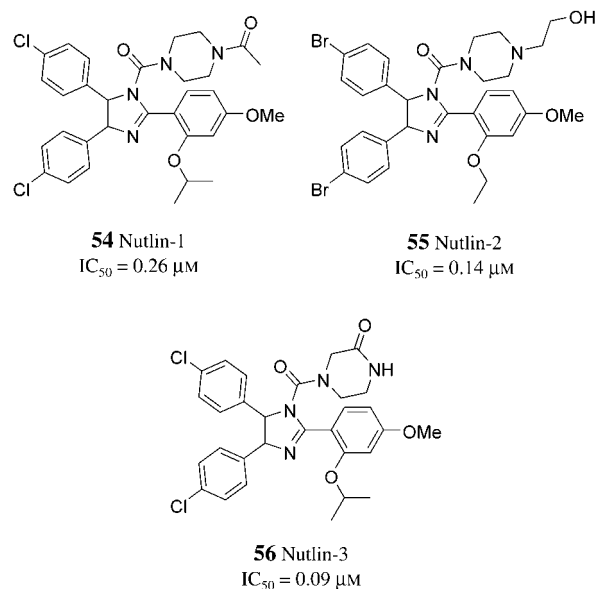
Das Onkoprotein MDM2 (mouse double minute 2) reguliert den p53-Umsatz, indem es die Ubiquitinierung fördert.^[138] Die Überexpression von MDM2 wirkt der Fähigkeit von p53 entgegen, einen Zellzyklusarrest oder Apoptose auszulösen.^[139] In etwa 40–60 % der menschlichen Knochen Sarkome und etwa 30 % der Sarkome der Weichgewebe ist MDM2 überexprimiert, was auf eine Beteiligung an der Entwicklung dieser Tumoren hindeutet.^[140] Die Überexpression von MDM2 spielt eine Schlüsselrolle bei der Toleranz von Wildtyp-p53 und macht das Protein zu einem vielversprechenden Angriffspunkt für mögliche Tumorthapeutika.

In der letzten Zeit wurden mehrere Anläufe zur Modulation der p53-MDM2-Wechselwirkung unternommen.

Chen et al. wiesen nach, dass die Hemmung der MDM2-Expression mit Antisense-Oligonucleotiden zur Aktivierung von p53 und in der Folge zum Zellzyklus-Arrest oder zur Apoptose führte.^[141] Blaydes et al. inhibierten die p53-MDM2-Bindung durch Mikroinjektion des 3G5-anti-MDM2-Antikörpers; Folge war eine Aktivierung der p53-Funktion in den Zellen.^[142] García-Echeverría et al. beschrieben ein Hexapeptid, das aus den Resten 18–23 von p53 bestand und das kleinstmögliche Bindungssepitop für die

HDM2-Erkennung war (HDM2 ist das menschliche Analogon zu MDM2). Mit diesem Peptid war es möglich, die Wechselwirkung von HDM2 und p53 mit einem IC₅₀-Wert von 700 μM zu blockieren. Ein 13 Aminosäurereste langes Peptid aus der Region 16–28 von p53 band noch besser (IC₅₀ = 8.7 μM).^[143] Robinson et al. berichteten über eine Gruppe von α-Helix-Mimetika, die auf einem Gerüst aus einer β-Haarnadelschleife aufsetzen und als Antagonisten der p53-MDM2-Bindung wirken.^[144] Diese Untersuchungen bestätigen die Wirksamkeit des Konzepts, p53 durch die Blockierung von MDM2 zu aktivieren. Die diversen Oligonucleotide, Antikörper und Polypeptide sind allerdings für In-vivo-Untersuchungen nicht geeignet, was den Bedarf an niedermolekularen Wirkstoffen noch verdeutlicht.

Eine Forschungsgruppe bei Roche berichtete erst kürzlich über eine Serie niedermolekularer Antagonisten von MDM2, die in zellulären Tests die Akkumulation von p53 verursachten.^[145] Drei *cis*-Imidazolinderivate, **54–56** (Nutline, Schema 21), wurden in einem orientierenden Screening mit Oberflächenplasmonenresonanz gefunden (IC₅₀ = 90–260 nM). Die Bindungsweise dieser Inhibitoren wurde durch Röntgenkristallographie bestimmt. Das Imidazolingerüst bildet Eigenschaften des helicalen Rückgrats des p53-Proteins nach und dirigiert die Seitenketten in die Taschen von MDM2, die normalerweise durch die Reste Phe 19, Trp 23 und

**Schema 21.** Von *cis*-Imidazolin abgeleitete MDM2-Inhibitoren.

Leu26 von p53 besetzt werden (Abbildung 6). Die Halogensubstituenten an den Phenylgruppen füllen die Trp23-Tasche aus und verstärken die Bindung, was mit einem früheren Befund übereinstimmt, wonach das p53-Protein mit einer 6-

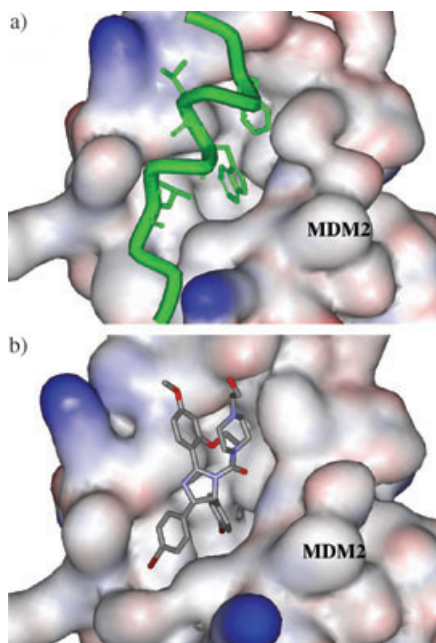


Abbildung 6. Röntgenkristallstrukturen a) des p53-MDM2-Komplexes und b) des **55**-MDM2-Komplexes.

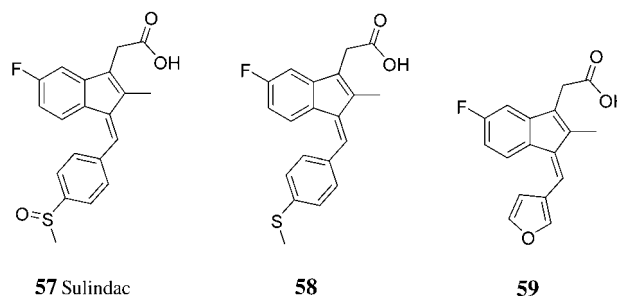
Cl-Trp23-Mutation eine höhere Affinität für MDM2 aufweist.^[146] Nutlin-1 (**54**) induziert die Akkumulation von p53 ebenso wie die des stromabwärts gelegenen cyclinabhängigen Kinasehemmstoffs p21^{waf1/Cip1} und MDM2 in HCT116 und RKO-Tumorzellen. In Zellen mit deletiertem oder mutiertem p53 wurde keine Akkumulation von MDM2 oder p21 beobachtet, obwohl p53 in hohen Konzentrationen vorlag. Diese Ergebnisse besagen, dass Wildtyp-p53 in mit **54** behandelten Zellen akkumuliert und eine Zunahme des Proteinspiegels von MDM2 und p21 verursacht; dies ist konsistent mit einer Aktivierung über den p53-Signalweg. Eine andere Möglichkeit, nämlich dass die Imidazolinderivate die p53-Akkumulation über eine DNA-Schädigung induzieren, wurde ausgeschlossen, da die Phosphorylierung von Serinresten, die normalerweise von DNA-schädigenden Substanzen ausgelöst wird, nicht nachweisbar war. Weitere Untersuchungen erbrachten, dass **56** in Tumorzellen mit intaktem p53 Apoptose einleitet. In Tierversuchen gelang es, mit **56** das Tumorumfugen in Nacktmäusen (zweimal täglich 200 mg kg⁻¹) über 20 Tage bei tolerierbarer Toxizität zu reduzieren.

Das aktuellste Beispiel für einen niedermolekularen Inhibitor der p53-HDM2-Bindung ist ein Terphenyl-basiertes helicales Mimetikum von p53, das das HDM2-Protein angreift.^[147] Issaeva et al. berichteten über eine niedermolekulare Verbindung mit der Bezeichnung RITA (reaction of p53 and induction of tumor cell apoptosis), die an p53 bindet und dessen Akkumulation in Tumorzellen induziert, indem sie die p53-HDM2-Bindung aufricht.^[148]

4.2.12. Inhibitoren der Ras-Raf-Wechselwirkung

An der Modulation von GTPasen aus der Ras-Familie durch niedermolekulare Wirkstoffe besteht ein lebhaftes Interesse, denn diese Proteine spielen eine wichtige Rolle bei der Wachstumsfaktor-aktivierten Zellproliferation, der Differenzierung und dem Überleben von Zellen.^[149] Der Signalweg, der über Raf (einen stromabwärts liegenden Effektor von Ras), die mitogenaktivierte Proteinkinase-Kinase (MEK) und die extrazelluläre signalregulierte Kinase (ERK) verläuft, ist für die Ras-regulierte Zellproliferation erforderlich.^[150]

Mit einem zellulären Testsystem identifizierten Waldmann et al. eine Serie synthetischer Verbindungen, die die Ras-Raf-Wechselwirkung unterbrechen können.^[151] Zuvor war gefunden worden, dass der Metabolit **58** des nichtsteroidalen Entzündungshemmers Sulindac **57** (Schema 22) in den



Schema 22. Strukturen von Sulindac und seinen Analoga, die die Ras-Raf-Bindung unterbrechen.

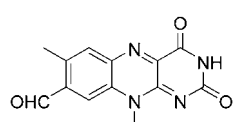
Ras-Signalweg eingreifen kann; der molekulare Angriffspunkt der Verbindung ist allerdings noch unbekannt.^[152] In einem Phänotyp-basierten Screening einer Festphasen-Bibliothek mit 188 Sulindac-Analoga wurden 23 Leitstrukturen gefunden. Alle diese Verbindungen konnten die Reversion des transformierten Phänotyps von MDCK-F3-Zellen (MDCK = Madine-Darby canine kidney) einleiten und Apoptose induzieren. Vier Verbindungen unterbrachen die Ras-Raf-Wechselwirkung. Die aktivste Substanz, **59**, blockierte die Ras-Raf-Bindung mit einem IC₅₀-Wert von 30 μm in vitro und einem IC₅₀-Wert von 10 μm im zellulären Cytotoxizitätstest.

Einen anderen Ansatz zur Identifizierung niedermolekularer Inhibitoren der Ras-(Raf-1)-Bindung verfolgten Tamaoui et al.,^[153] die hierzu ein bereits früher entwickeltes Zwei-Hybrid-System mit einem zweifachen Köder einsetzten.^[154] 73400 Verbindungen einer Bibliothek wurden auf die Fähigkeit durchsucht, die Wechselwirkung zwischen DBD-H-Ras und AD-Raf-1 (Volllängenprotein, exprimiert in SKY54-Zellen) zu blockieren; davon wirkten 3009 Verbindungen wachstumshemmend. Von diesen Leitstrukturen induzierten 708 einen Phänotyp mit reduziertem Wachstum und β-Galactosidase-Aktivität mit einer gewissen Selektivität für (H-Ras)-(Raf-1) gegenüber der Negativkontrolle. Nach weiteren Prüfungen blieben 38 Verbindungen übrig, die eine eindeutige Verminderung der β-Galactosidaseaktivität bei 30 μm in DBD-H-Ras und AD-Raf-1 exprimierenden SKY54-Zellen bewirkten. Ein SRE-Luciferase-Test (SRE =

serum response element) wurde als Sekundärtest verwendet, um die Fähigkeit der 38 Substanzen zu bestimmen, die Ras-induzierte transkriptionelle Aktivierung durch SRE und AP-1-Stellen vom c-fos-Promotor zu hemmen.^[155] MCP1 ($C_{29}H_{27}ClN_2O_3$, M_r 487 g mol⁻¹, Struktur nicht verfügbar), das ein ausgezeichnetes Wirkungsprofil im primären Zwei-Hybrid-Test hatte, wies auch eine robuste Dosisabhängigkeit in CHO-Zellen auf und konnte die H-Ras(V-12)-induzierte Aktivierung von AP-1 in HEK293-Zellen inhibieren. Ein anderer Mechanismus, dem zufolge die MCP-Verbindungen die Ras-Raf-Bindung indirekt durch Hemmung von Hsp90 und Destabilisierung des strukturell fragilen Raf-1 stören, wurde ausgeschlossen,^[156] weil MCP1 die Konzentration an endogenem Raf-1 bei 40 Stunden Inkubation in HT1080-Zellen nicht reduzierte. MCP1 inhibierte auch die Ras-induzierte Raf-1-Aktivierung in HEK293-Zellen, die Aktivität von Raf-1 und MPK1 in HT1080-Fibrosarkomzellen sowie die durch den epidermalen Wachstumsfaktor induzierte Raf-1-Aktivierung in A549-Lungentumorzellen.

4.2.13. Ein Antagonist des Nervenwachstumsfaktors

Ein niedermolekularer Antagonist des Nervenwachstumsfaktors (nerve growth factor; NGF) mit guter Selektivität wurde von einer Forschungsgruppe bei Hoffmann-La Roche gefunden.^[157] NGF ist ein homodimeres Protein, das, mit verschiedenen Domänen, zwei Neurotrophin-Liganden bindet: p75^{NTR}, ein nichtselektiver Rezeptor der Tumornekrosefaktor(TNF)-Superfamilie, und p140^{Trk} (TrkA), ein Tyrosinkinase-Rezeptor, der die trophischen Effekte von NGF vermittelt.^[158] In Zellen, die beide NGF-Rezeptoren exprimieren, wird die TrkA-Aktivität durch p75^{NTR} moduliert.^[159] Wenn Zellen TrkA nicht ausprägen, leitet p75^{NTR} durch Bindung an NGF die Apoptose ein.^[160] Niederhauser et al. fanden heraus, dass Ro08-2750 (**60**, Schema 23) selektiv die Bindung von NGF an p75^{NTR} über TrkA hemmt.^[157] Die



60 Ro 08-2750

Schema 23. Der NGF-Inhibitor Ro08-2750.

Hemmwirkung von Ro08-2750 wurde in einem zellulären Testsystem durch Konkurrenz mit radioaktiv markiertem NGF-Protein bestimmt. Es blockiert die NGF-Bindung an p75^{NTR} effizient mit einem IC₅₀-Wert im unteren mikromolaren Bereich. Außerdem schützen 10 nM Ro08-2750 die Zellen vollständig

vor NGF-induzierter Apoptose, was darauf hinweist, dass der Inhibitor die NGF-p75^{NTR}-Komplexierung verhindert. Ein toxischer Effekt wurde nicht beobachtet. Die Autoren schlugen vor, dass Ro08-2750 mit der Zeit eine Konformationsänderung von NGF einleitet, denn die beobachtete Inhibition ist zeitabhängig. Es wurde aber auch die Möglichkeit geäußert, dass die Änderung durch eine kovalente Bindung entstehen könne; eine weitere Aufklärung des Inhibitionsmechanismus ist also erforderlich.^[8]

4.2.14. Antagonisten des immunregulatorischen Proteins B7.1

Erbe et al. berichteten über niedermolekulare Verbindungen, die die Bindung des Proteins B7.1 beim Menschen

hemmen.^[161] B7.1 ist ein T-Zell-Oberflächenrezeptor für CD28 und CTLA4 und hat eine entscheidende Funktion bei der Aktivierung nativer T-Zellen.^[162] Die Signalgebung über CD28 beschleunigt die T-Zell-Antwort, während die über CTLA4 sie dämpft.^[163] Die Kristallstruktur des B7.1-CTLA4-Komplexes ergab, dass CTLA4-Dimere und B7.1-Dimere sich in periodischer Abfolge zusammenlagern (Abbildung 7a).^[164] Abbildung 7b zeigt, dass die ⁹⁹MYPPPY¹⁰⁴-

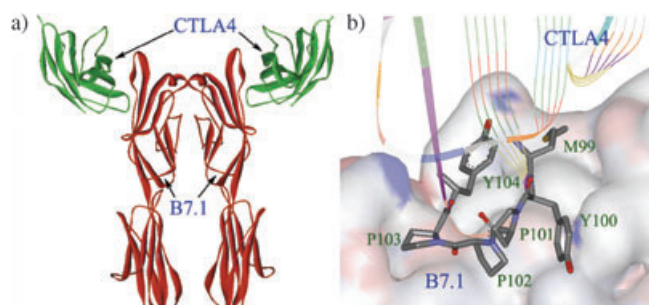
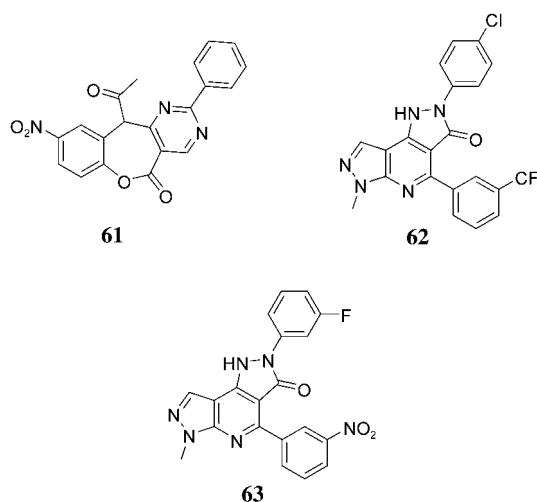


Abbildung 7. a) Überblick über den B7.1-CTLA4-Komplex; CTLA4 und B7.1 lagern sich periodisch zusammen, wobei divalente CTLA4-Homodimere die divalente B7.1-Homodimere verbrücken. b) Vergrößerter Ausschnitt der B7.1-CTLA4-Kontaktfläche.

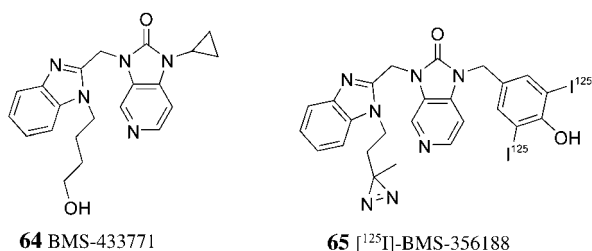
Schleife von CTLA4 in eine flache Höhlung in der Oberfläche von B7.1 eingepasst ist, wozu ein hohes Maß an Formkomplementarität erforderlich ist. Zwei Verbindungen, **61** (IC₅₀ = 30 nM) und **62** (IC₅₀ = 60 nM), wurden in einem Hochdurchsatz-Screening als Inhibitoren der B7.1-CD28-Wechselwirkung identifiziert (Schema 24). Beide binden an der gleichen Stelle in der N-terminalen Domäne von humanem B7.1. Die Stelle fehlt im homologen Protein B7.2 ebenso wie in B7.1 der Maus, sodass beide Verbindungen das Humanprotein B7.1 in Konkurrenz mit den beiden Homologen hoch selektiv inhibieren. Untersuchungen der Struktur-Wirkungs-Beziehungen identifizierten das Dihydrodipyrzoloypyridin-Derivat **63** als den wirksamsten Inhibitor für die B7.1-CD28-Wechselwirkung (IC₅₀ = 4 nM).^[165]



Schema 24. Inhibitoren des B7.1-Proteins beim Menschen.

4.2.15. Ein photoaffinitätsmarkierter Inhibitor des RSV-Fusionsproteins

Das transiente hexamere Helixbündel, das am Vireneintritt in Zellen beteiligt ist, ist ein wichtiger Angriffspunkt und war als solcher Gegenstand zahlreicher Untersuchungen. Trotz einer intensiven Suche nach niedermolekularen Inhibitoren des HIV-gp41-Glycoproteins und anderer viraler Fusionsproteine^[166,167] sind bislang keine gut charakterisierten Wirkstoffe dieses Typs bekannt. Eine Forschungsgruppe bei Bristol-Myers Squibb bestimmte vor kurzem mit Photoaffinitätsmarkierung die Bindestelle des bereits früher beschriebenen Inhibitors **64** am Fusionsprotein des RS-Virus (Schema 25).^[168] Ein photomarkiertes Analogon, **65**, bindet



Schema 25. Niedermolekulare Inhibitoren des RSV-Fusionsproteins.

an Tyr198 in der hydrophoben Tasche am N-terminalen Trimer aus siebenfachen Repeats (HR-N), die Teil der RSV-Fusionsmaschinerie sind. Mit Molekulardynamik(MD)-Simulationen wurde die Orientierung von **65** in der Bindungsspalte vorhergesagt. Die Photoaffinitätsmarkierung ist eine allgemein anwendbare Methode, um die Bindungsweise von Hemmstoffen an Protein-Protein-Kontaktflächen zu untersuchen.

4.3. Rechnergestütztes Screening auf niedermolekulare Inhibitoren von Protein-Protein-Wechselwirkungen

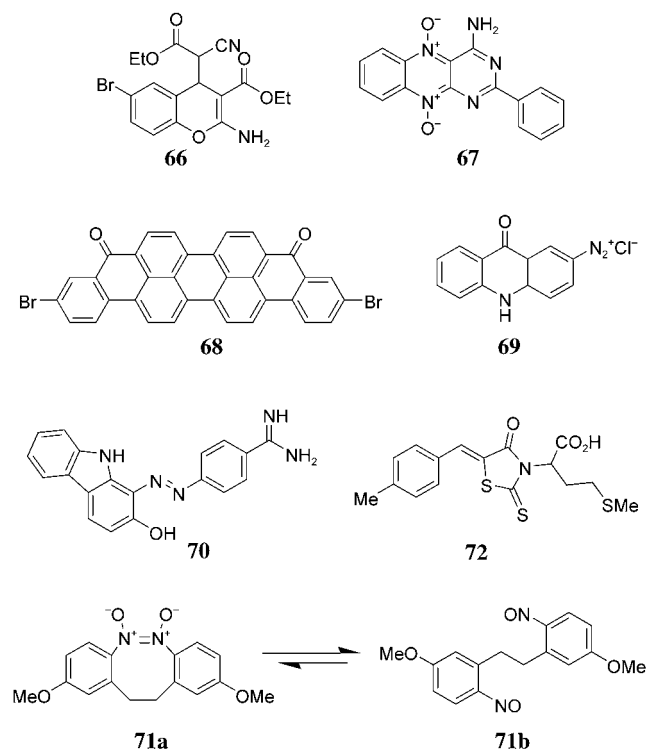
Dank großer Fortschritte bei den Hochdurchsatz-Techniken ist es heute möglich, bis zu 100 000 Verbindungen pro Tag zu testen. Trotzdem ließen sich die Verfahren noch effektiver gestalten, wenn man die Menge der Targets reduzieren würde. Ein vorgelagertes In-silico-Screening einer Bibliothek kann die Zahl der Verbindungen, die tatsächlich synthetisiert und getestet werden müssen, deutlich reduzieren. Es gibt zwei Arten von Verfahren: diversitätsbasierte und strukturbasierte. Diversitätsbasierte Designs verwendet man, um ausgehend von einer großen Bibliothek zu einer fokussierten Bibliothek mit geringerer Substanzzahl zu gelangen und dabei die Diversität der ursprünglichen Bibliothek zu erhalten.^[169] Eine Reihe von Rechnerprogrammen wird hierfür eingesetzt. Ihr Vorgehen beruht auf der Gruppierung der Verbindungen nach Ähnlichkeiten, der Rasterung des chemischen Diversitätsraumes oder der Anwendung genetischer Algorithmen.^[170] Während das diversitätsbasierte Verfahren die Methode der Wahl ist, wenn keine Strukturinformationen

verfügbar sind, nutzen strukturbasierte Methoden in erster Linie Informationen über die Struktur des Targets, um Entwurf und Auswahl der Leitstrukturen mit dreidimensionaler Komplementarität zur Bindestelle am Target zu unterstützen. Auf diese Weise lässt sich eine höhere Trefferquote erzielen als mit diversitätsbasierten Methoden.^[171] Die Technik des In-silico-Screenings wurde bereits vielfach zur Suche nach neuen Enzyminhibitoren für Indikationen wie AIDS und Parasiteninfektionen eingesetzt. Anwendungen zur Suche nach Inhibitoren von Protein-Protein-Wechselwirkungen sind bislang jedoch weithin unbekannt,^[172] wenngleich einige Fortschritte zu verzeichnen sind.^[173,174]

4.3.1. Inhibitoren der antiapoptotischen Bcl-2-Proteine

Proteine der Bcl-2-Familie spielen eine wichtige Rolle während der Apoptose.^[175] Viele onkogene Mutationen, besonders solche in p53, rühren von Störungen während der durch DNA-Schäden verursachten Apoptose nach einem Bcl-2-abhängigen Mechanismus her.^[176] Außerdem kann die Überexpression von Bcl-2 die Wirkung vieler gegenwärtig eingesetzter Chemotherapeutika durch eine Blockade der Apoptose aufheben.^[177] Daher sind Verbindungen, die die apoptotische Wirkung der BH3-Domäne der proapoptotischen Unterfamilie der Bcl-2-Proteine nachahmen, potenzielle Therapeutika.^[178]

Mehrere Arbeitsgruppen wendeten ein In-silico-Screening zur Suche nach niedermolekularen Inhibitoren von Bcl-2 oder Bcl-x_L an (Schema 26 und Tabelle 3).^[179] Einen der ersten Versuche unternahm Huang et al., die eine große



Schema 26. Inhibitoren gegen Bcl-2 (Bcl-x_L) aus einem virtuellen Screening.

Tabelle 3: Inhibitoren von Bcl-2 (Bcl-x_L), die durch In-silico-Screening entdeckt wurden (siehe Schema 26).

Verbindung	Target	IC ₅₀ [μM]	Docking-Programm	Bibliothek (Größe)	Größe der fokussierten Bibliothek
66 ^[180]	Bcl-2	9	DOCK 3.5	MDL/ACD 3D (193 833)	28
67 ^[181]	Bcl-2	1.6 ± 0.1	DOCK	NCI (208 876)	35
68 ^[181]	Bcl-2	7.7 ± 4.5			
69 ^[181]	Bcl-2	10.4 ± 1.2			
70 ^[181]	Bcl-2	5.8 ± 2.2			
71 ^[181]	Bcl-2 (Bcl-x _L)	10.4 (7)			
72 ^[182]	Bcl-x _L	8.5 ± 0.6	TreeDock	Chemnavigator, Chembridge (93)	3

kommerzielle Bibliothek auf eine Target-fokussierte Gruppe von Verbindungen reduzierten.^[180] Eine dreidimensionale Struktur des Bcl-2-Proteins, die von der NMR-Struktur des (Bcl-x_L)-Bak-Komplexes abgeleitet wurde, diente als virtuelles Target für 193 833 Verbindungen aus der MDL/ACD-3D-Datenbank (Molecular Design). Die Bindungsexperimente wurden mit dem Programm DOCK 3.5 und 1000 Substanzen simuliert, die anhand der Bewertungsfunktion für die Formkomplementarität (die einen Bezug zur anziehenden Van-der-Waals-Energie herstellt) ausgesucht worden waren. Ein Filter erzeugte zunächst 53 vorläufige Kandidaten, von denen 28 möglichst diverse Verbindungen für Synthese und Testung ausgewählt wurden.

Verbindung **66** zeigte eine mäßige Hemmwirkung auf die Bcl-2/Bak-Dimerisierung (IC₅₀ = 9 μM) und induzierte in HL-60 Apoptose durch Aktivierung der Caspase. **66** war der erste bekanntgewordene Antagonist der (Bcl-2)-Bak-Komplexbildung, der mit einem rechnergestützten Verfahren de novo identifiziert wurde. In ähnlicher Weise fanden Enyedy et al. fünf synthetische Verbindungen **67–71**, die die Wechselwirkung zwischen Bcl-2 (Bcl-x_L) und dem Bak-Peptid mit einem IC₅₀-Wert im unteren μM-Bereich unterbrechen.^[181] Lugovskoy et al. kombinierten strukturelle und rechnergestützte

Ansätze zur Vorauswahl von 93 Verbindungen. Kriterium war eine gute räumliche Übereinstimmung mit einer früher gefundenen Leitstruktur, die mit einer Feinkartierung der Kontaktfläche und erschöpfender Wechselwirkungsanalyse berechnet wurden.^[182] Ein im virtuellen Screening gefundenes Analogon, **72**, zeigte eine ähnliche Affinität wie die ursprüngliche Leitstruktur.

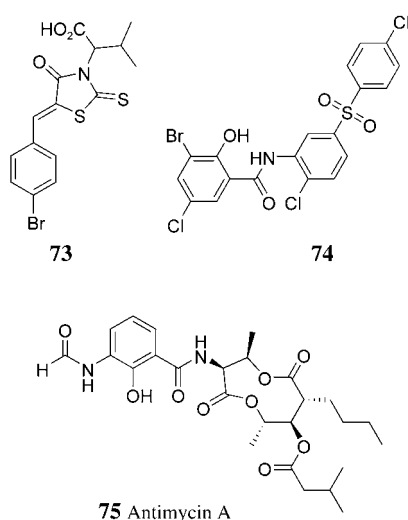
Zusätzlich zu dem In-silico-Ansatz wurden auch konventionelle Screeningverfahren genutzt, um Inhibitoren der Bcl-2- oder Bcl-x_L-Proteine zu finden. Detgrev et al. durchsuchten eine kommerzielle Bib-

liothek (ChemBridge) von 16320 Substanzen und identifizierten drei Verbindungen, die die Bildung des (Bcl-x_L)-Bak-Komplexes bereits bei niedrigen IC₅₀-Werten im Bereich weniger μM unterbrechen (Schema 27).^[183] Durch eine ¹⁵N-HSQC-Analyse wurde gezeigt, dass die synthetischen Inhibitoren sich in der hydrophoben Spalte anordnen, in der die BH3-Domäne an die Oberfläche von Bcl-2 bindet. Dies wurde durch ein NOESY-Experiment bestätigt, das einen direkten Kontakt zwischen **73** und den Resten Tyr65 und Phe107 anzeigte. Verbindung **73** induzierte in JK-Zellen mit überexprimiertem Bcl-x_L Apoptose, was auf eine mögliche Anwendung als Tumorthapeutikum hinweist.

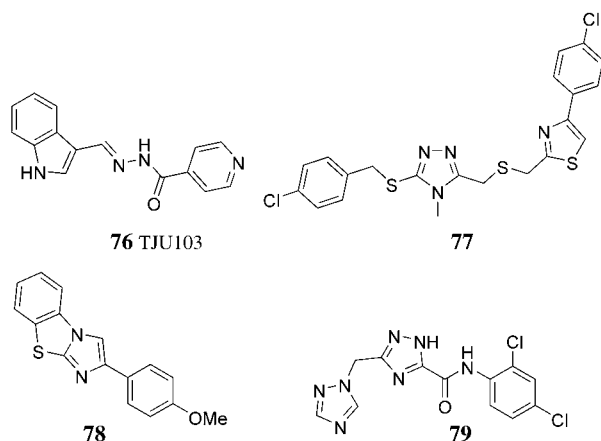
Antimycin A (**75**; Schema 27), ein Hemmstoff der mitochondrialen Elektronenkette, antagonisiert die Bindung von Bak an Bcl-x_L und induziert ein Anschwellen der Mitochondrien.^[2,179,184]

4.3.2. Nichtpeptidische CD4-Inhibitoren

Protein-Protein-Wechselwirkungen zwischen den Proteinen der Immunglobulin-Superfamilie (IgSF) spielen eine wichtige Rolle bei der Vermittlung der Zelloberflächen-Erkennung.^[185] Das Glycoprotein CD4 wird an der Oberfläche von T-Helferzellen exprimiert und wirkt als Corezeptor, der die Bindung zwischen T-Zell-Rezeptor und Antigen stabilisiert. Das Antigen wird von MHC-Molekülen der Klasse II, die an der Oberfläche antigenpräsentierender Zellen exprimiert werden, gebunden.^[186] CD4 bindet an nichtpolymorphe Regionen der MHC-Klasse-IIβ-Domäne,^[187] wodurch CD4, MHC und der T-Zell-Rezeptor cooligomerisiert werden und damit das Signal für die T-Zelle ausgelöst wird. Huang et al. durchsuchten rechnergestützt eine kommerzielle Bibliothek mit 150 000 niedermolekularen Substanzen mit dem Programm DOCK 3.5.^[173] Nach zwei Runden virtuellen Screenings wurden 41 Verbindungen ausgewählt und mit humanen Lymphocyten getestet. In der großen Bibliothek wurden vier Substanzen mit Inhibitorwirkung auf die alloreaktive T-Zell-Proliferation gefunden (Schema 28). Unter diesen war TJU103 (**76**) die aussichtsreichste Leitstruktur. Sie verlängerte die mittlere Überlebensdauer von allografttragenden Mäusen auf 52 Tage (im Vergleich zu 20 Tagen der unbehandelten Kontrollgruppe).



Schema 27. Inhibitoren gegen Bcl-x_L aus einem nasschemischen Screening.



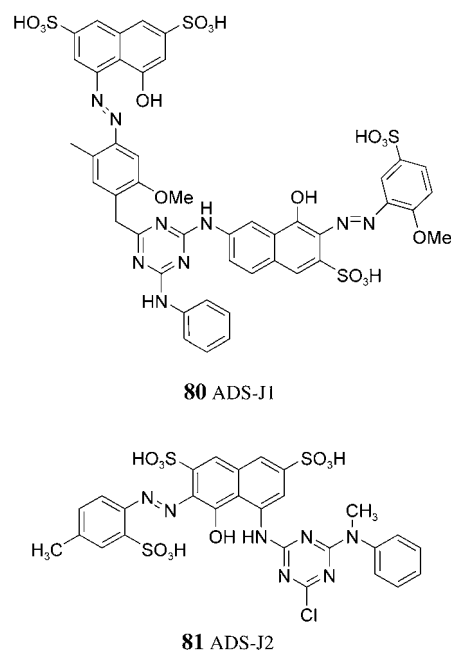
Schema 28. CD4-Inhibitoren aus einem In-silico-Screening.

4.3.3. Inhibitoren des hexameren Helixbündels von gp41

Debnath und Mitarbeiter verbesserten das strukturbasierte virtuelle Screening mit dem DOCK-Programmpaket,^[188] indem sie anstelle einer Formberechnung eine Kraftfeldberechnung vornahmen. Dieses Vorgehen berücksichtigt die Wechselwirkungen zwischen den umgebenden geladenen Gruppen der hydrophoben Spalte und den ionischen Gruppen der potenziellen Inhibitoren und liefert so verlässlichere Bindungsvorhersagen. Die Methode wurde bei der Suche nach Verbindungen eingesetzt, die den Kernbereich des gp41-Proteins von HIV-1 angreifen. Das Glycoprotein gp41 wurde zu einer bevorzugten Zielstruktur, zumal Inhibitoren der HIV-1-Reverse-Transkriptase (HIV-1-RT) oder der HIV-1-Protease nur eingeschränkt wirksam sind.^[189] Eine Datenbank aus 20000 niedermolekularen Verbindungen wurde durchsucht, und die 200 am besten bewerteten Verbindungen wurden zur näheren Inspektion durch Visualisierungstechniken zur direkten Bestimmung einer Rangfolge ausgewählt.^[190] 16 Verbindungen aus dem Screening wurden synthetisiert und in vitro auf ihre Fähigkeit getestet, das hexamere Helixbündel, das durch N-36/C-34-Komplexierung des gp41 gebildet wird, zu unterbrechen (ELISA-Test). Am aktivsten waren die Verbindungen **80** und **81** (Schema 29) mit IC_{50} -Werten von 0.73 und 3.18 $\mu\text{g mL}^{-1}$. In-vivo-Tests ergaben, dass **80** und **81** die HIV-1-vermittelte Zellfusion und den cytopathischen Effekt (CPE) unterdrücken. Das Ergebnis des In-silico-Screenings wurde somit bestätigt, denn **80** und **81** lagen auf Platz 1 und 3 des Computer-Rankings und zeigten die höchsten Aktivitäten im Test.

5. Synthetische Inhibitoren von Protein-Protein-Wechselwirkungen aus rationalem Design

Biologische Kenntnisse können in den Entwurf synthetischer Moleküle einfließen, z. B. durch Nachahmung struktureller und funktioneller Merkmale der komplementaritätsbestimmenden Region (CDR) des Zielproteins. Gestützt auf Röntgenkristallographie, NMR-Spektroskopie und Computersimulation können Chemiker biologische Vorgänge mit



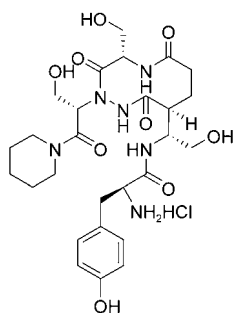
Schema 29. Niedermolekulare Inhibitoren gegen die Kernstruktur des HIV-Glycoproteins gp41.

hilfe kleiner synthetischer Substanzen, die Proteinoberflächen erkennen oder Protein-Protein-Wechselwirkungen unterbrechen, manipulieren. Beispielsweise entdeckten Hajduk et al. mit einem NMR-gestützten Screening, dass sich bestimmte Motive (z. B. Biphenylgruppen) besonders gut als Matrix für die Entdeckung und den Entwurf von Therapeutika mit hoher Affinität und Spezifität für eine große Zahl von Proteintargets eignen.^[191] Viele am Reißbrett entworfene Inhibitoren haben z. B. auch sehr starre Strukturen, um einen hydrophoben Kollaps zu vermeiden. Wenngleich solche theoretischen und empirischen Einblicke das rationale Design erleichtern, bleibt es noch immer eine große Herausforderung, kleine Moleküle zu konstruieren, die bestimmte Protein-Protein-Wechselwirkungen angreifen.

5.1. Rationales Design synthetischer Inhibitoren, die die äußeren Oberflächen von Proteinen erkennen

5.1.1. Ein synthetischer Inhibitor, der die komplementaritätsbestimmende Region von mAk87.92.6 imitiert

In richtungsweisenden Arbeiten befassten sich Saragovi et al. mit dem Entwurf niedermolekularer Antagonisten von Protein-Protein-Wechselwirkungen auf der Basis von Strukturinformationen und rechnergestützter Modellierung.^[192] Zielstruktur war der monoklonale Antikörper mAk87.92.6, der den zellulären Rezeptor des Reovirus Typ 3 (Reo3R) erkennt. Vorherige Arbeiten hatten gezeigt, dass cyclische Peptidanaloga der zweiten CDR des mAk87.92.6 die Wechselwirkung zwischen Antikörper und Rezeptor blockieren.^[193] Die proteinöse Natur der Peptidanaloga und die damit einhergehende schlechte Löslichkeit, eingeschränkte Permeabilität durch die Blut-Hirn-Schranke sowie die leichte proteolytische Abbaubarkeit verhinderten allerdings eine



82 87.1-Mimetikum

Schema 30. Struktur des 87.1-Mimetikums der komplementaritätsbestimmenden Region des monoklonalen Antikörpers 87.92.6.

Weiterentwicklung. Aus diesem Grund wurde das 87.1-Mimetikum **82** (Schema 30) entworfen und synthetisiert, um die zweite CDR des Antikörpers 87.92.6 nachzubilden. Dieser synthetische Inhibitor ist gut wasserlöslich, was ihn permeabel für die Blut-Hirn-Schranke macht. Bindungstests ergaben, dass **82** nach Immobilisierung spezifisch und mit 14fach stärkerer Affinität als die Negativkontrolle an mAk9BG5, den nativen Liganden von mAk87.92.6, bindet. **82** blockiert auch kompetitiv und dosisabhängig die Bindung von mAk9BG5 an VLSH, ein dimeres Peptid, das aus der zweiten CDR von mAk87.92.6 abgeleitet ist. Zelluläre Untersuchungen zeigten, dass **82** die Concanavalin-A(conA)-induzierte T-Zell-Proliferation von Milzzellen dosisabhängig hemmt, wie dies auch vom VLA5-Peptid und dem intakten mAk87.92.6 nachgewiesen wurde. Demgegenüber waren das Peptidanalogen und ein CD4-Mimetikum (das aus den Resten 41–54 von humanem CD4 abgeleitet wurde) im gleichen Testsystem inaktiv. Aus diesen Daten lässt sich schließen, dass **82** die Zellproliferation über den Reo3-Rezeptor inhibiert.

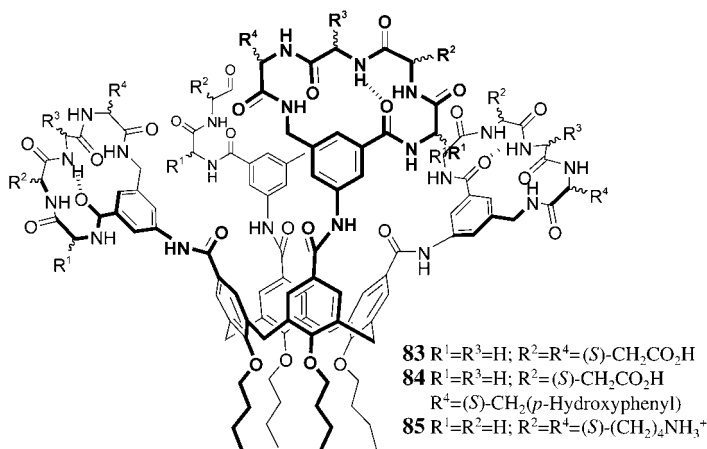
5.1.2. Calix[4]aren-basierte Inhibitoren des Plättchen-Wachstumsfaktors und von Cytochrom c

Calix[4]aren wird schon seit langem in der supramolekularen Chemie wegen seiner genau definierten Form und einfachen Synthese eingesetzt.^[194] Unsere Arbeitsgruppe berichtete über die Verwendung von Calix[4]arenen als synthetische Reagentien für die Erkennung von Proteinoberflächen.^[195] Dieser Ansatz fußt auf drei Eigenschaften von Calix[4]arenen: 1) Die relativ große Bindungsfläche von Calix[4]aren ($> 400 \text{ \AA}^2$) bietet ein geeignetes Gerüst, um die bindenden Regionen einer Antikörper-Antigen-Kontaktfläche nachzubilden. 2) Der modulare Aufbau und die mögliche schrittweise Funktionalisierung des oberen Randes von Calix[4]aren ermöglichen eine effiziente diversitätsorientierte Synthese von Inhibitoren. 3) Die Flexibilität des Calix[4]aren-Gerüsts erleichtert die Erkennung einer dynamischen Oberfläche durch den Mechanismus der „induzierten Passform“.

Am oberen Rand von Calix[4]aren stehen vier Positionen zur Verfügung, an die unterschiedliche Erkennungsdomänen gebunden werden können. Durch Variieren der Substituenten kann leicht eine hohe Diversität erzeugt werden. Da Proteinoberflächen intrinsisch asymmetrisch sind, kann man erwarten, dass synthetische Inhibitoren mit einer komplexen und asymmetrischen Verteilung von Ladung und Hydrophobie hohe Selektivitäten erzielen.

Der Plättchen-Wachstumsfaktor (PDGF) ist ein starker Induktor von Wachstums- und Bewegungsvor-

gängen wie Zellproliferation, Angiogenese, Wundheilung und Chemotaxis.^[196] PDGF bindet an seinen Rezeptor (PDGFR) auf der Zelloberfläche, der daraufhin dimerisiert, autophosphoryliert und Tumorzellen rekrutiert.^[197] In vielen Carcinomen wird PDGFR überexprimiert, und manche Krebspatienten haben hohe PDGF-Serumspiegel.^[198] Diese erhöhten PDGFR-Werte bei Tumorpacienten korrelieren mit schlechtem Ansprechverhalten auf eine Chemotherapie und kürzeren Überlebenszeiten. In unserer Arbeitsgruppe wurde die Oberflächenerkennung von PDGF durch synthetische Verbindungen untersucht, die in der Lage sind, diesen wieder von seinem Rezeptor abzulösen und so Antitumor- und antiangiogenetische Effekte zu verstärken.^[199] PDGF-BB ist ein Homodimer aus zwei Proteinen, die aus zwei β -Strängen mit drei intramolekularen Disulfidbrücken bestehen. Die drei Oberflächenschleifen, die die Stränge verbinden, befinden sich an einem Ende des durch die Aggregation verlängerten Dimers. Mutationsanalysen ergaben, dass die Schlüsselregionen für die Bindung in diesen Schleifenregionen liegen. Sie sind mit kationischen und hydrophoben Resten angereichert, und eine Erkennungsstrategie, die sich auf hydrophobe und elektrostatische Komplementarität stützt, könnte auf diese Domäne angewendet werden. Die Calix[4]arene **83–85** (Schema 31), bei denen mehrere Erkennungselemente am oberen Rand angebracht sind, wurden als Antagonisten gegen die PDGF-induzierte PDGFR-Autophosphorylierung und MAP-Kinaseaktivierung in NIH3T3-Zellen getestet. Die Hemmwirkung hing stark von der Schleifensequenz ab, die von der Calix[4]aren-Kernstruktur projiziert wurde. Das kationische Derivat **85** ($\text{IC}_{50} = 50 \text{ }\mu\text{M}$) hatte nur eine geringe Wirkung, während alle anionischen Derivate, darunter **83**, moderat aktiv waren ($\text{IC}_{50} < 10 \text{ }\mu\text{M}$). Die stärkste Wirkung zeigte das Derivat **84** mit einer cyclischen Gly-Asp-Gly-Tyridpeptidsequenz, die einen bemerkenswert niedrigen IC_{50} -Wert von 250 nM erreichte. Laut Gel-Shift-Experimenten bindet **84** direkt an den PDGF, sodass als Inhibitionsmechanismus dieser Bindungsvorgang angenommen werden kann. **84** war in der Lage, dosisabhängig ^{125}I -PDGF von PDGFR zu verdrängen, was darauf hindeutet, dass die Bindung ein Aufbrechen der PDGF-PDGFR-Wechselwirkung verursacht.



Schema 31. Künstliche Inhibitoren auf Basis von Calix[4]aren-Derivaten.

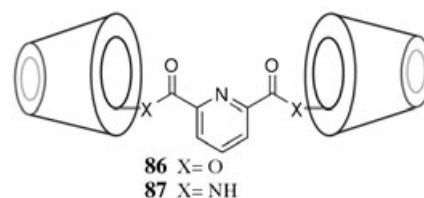
In zellulären Testsystemen konnte eine starke Antitumor- und Antiangiogenese-Wirkung von **84** gegen menschliche Tumoren auf Nacktmäusen nachgewiesen werden, weshalb die Verbindung derzeit Gegenstand weiterer biologischer Tests ist.

Über die Verwendung des Calix[4]arens **83** zur Unterbrechung einer Protein-Protein-Wechselwirkung berichteten Wei et al.^[200] Mit einem Fluoreszenztitrationstest wurde nachgewiesen, dass **83** als synthetischer Rezeptor die Bindung von Cytochrom c (Cyt c) an die Cytochrom-c-Peroxidase (Cyt cP) blockiert. **83** verdrängt Cyt cP und bildet einen 1:1-Komplex mit Cyt c mit einem K_a -Wert von 10^8 M^{-1} . Weitergehende Untersuchungen ergaben, dass der Komplex aus Cyt c und Apaf-1, einem maßgeblichen Intermediat des Apoptoseweges,^[201] durch Zugabe von **83** in 200fachem Überschuss gespalten wird.

5.1.3. β -Cyclodextrindimere als Inhibitoren der Lactatdehydrogenase- und Citratsynthase-Aggregation

Breslow und Mitarbeiter konnten nachweisen, dass β -Cyclodextrin(CD)-Dimere selektiv die Aggregation individueller Proteinuntereinheiten in komplexe Proteinaggregate wie das Citratsynthase(CS)-Dimer und das L-Lactatdehydrogenase(LDH)-Tetramer hemmen.^[202] Die Proteinkontaktflächen in solchen Aggregaten enthalten oft definierte hydrophobe Bereiche. Die Strategie für eine gezielte Inhibierung bestand in der Entwicklung von CD-Dimeren mit geeigneten Spacern zwischen den Monomereinheiten. In vorherigen Arbeiten war gezeigt worden, dass Cyclodextrine hydrophobe Seitenketten von Polypeptiden stark komplexieren; daher erwartete man, dass sie auch hydrophobe Seitenketten in den Kontaktregionen zwischen den Proteinuntereinheiten binden und damit die Aggregation hemmen.^[203]

Elf CD-Dimere mit unterschiedlichen Spacern und Orientierungen der CD-Höhlung wurden entworfen und synthetisiert. Die inhibierende Wirkung dieser Derivate auf die Proteinmultimerisierung wurde anhand der Enzymaktivität bestimmt. Von einer Gruppe ausgewählter Proteine sprachen nur CS und LDH auf die Hemmwirkung an, während Sorbitoldehydrogenase, Adenosindeaminase, D-Galactosedehydrogenase und Phosphohexoseisomerase bei Konzentrationen von CD-Dimeren bis $480 \mu\text{M}$ nicht beeinträchtigt wurden. Verbindungen, bei denen die Höhlungen der β - oder α -CDs vom zentralen Spacer wegorientiert sind, erwiesen sich als inaktiv, ebenso Verbindungen, bei denen die CD-Einheiten durch Etherbindungen verknüpft waren. Hingegen zeigten sich die CD-Dimere **86** und **87** mit Pyridyldiester- bzw. Pyridyldiamidbrücke zwischen den β -CD-Einheiten als selektive Inhibitoren der LDH- ($\text{IC}_{50} = 140 \mu\text{M}$) und CS-Aggregation ($\text{IC}_{50} = 30 \mu\text{M}$) (Schema 32). Die Negativkontrolle, bestehend aus β -Cyclodextrin und Pyridindicarboxylat allein, war inaktiv, was darauf hinweist, dass eine korrekte räumliche Anordnung des β -CD-Dimers erforderlich ist. Die genaue Ursache der Proteinspezifität und der exakte Wirkungsmechanismus sind noch unklar, man weiß aber, dass sich an der Oberfläche von LDH und CS mehrere aromatische Seitenketten befinden, an die die CD-Dimere binden könnten.



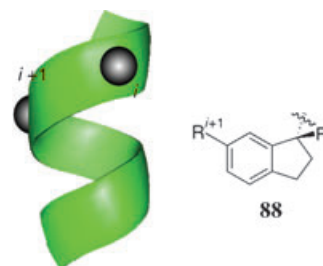
Schema 32. Cyclodextrin-Dimere als Inhibitoren der Aggregation von Proteinuntereinheiten.

5.2. Niedermolekulare Verbindungen als strukturelle und funktionale Mimetika der Sekundärstrukturen von Proteinen

Eine logische Weiterentwicklung des Konzepts, versteifte Peptide als Inhibitoren von Protein-Protein-Wechselwirkungen einzusetzen, besteht darin, leicht zugängliche synthetische Moleküle zu nutzen, die die Oberfläche solcher Peptide nachahmen. Die Vorteile solcher Moleküle sind: verbesserte biologische Stabilität, niedrigere Molekulargewichte und, in einigen Fällen, bessere Bioverfügbarkeit. Synthetische Moleküle, die unterschiedliche Sekundärstrukturen annehmen, sind gut dokumentiert;^[72,73,75,204] der folgende Abschnitt konzentriert sich auf niedermolekulare Verbindungen, die Protein-Protein-Bindungen aufbrechen, indem sie die strukturellen Eigenschaften von Proteinsekundärstrukturen nachahmen.

5.2.1. α -Helix-Mimetika

Mehrere synthetische Mimetika bindender Domänen an der Oberfläche von α -Helices wurden bereits veröffentlicht. In einer bahnbrechenden Studie zeigten Horwell et al., dass 1,6-disubstituierte Indane **88** eine Funktionalität in einer ähnlichen räumlichen Anordnung aufweisen wie die i - und $i+1$ -Reste einer α -Helix (Schema 33).^[205] Derivate mit großen

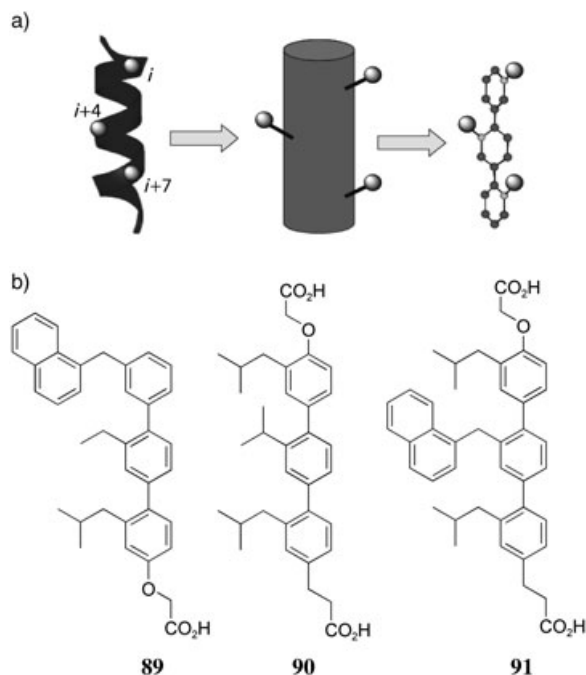


Schema 33. Das Indangerüst ahmt die Positionen i und $i+1$ einer α -Helix nach.

hydrophoben Peptidseitenketten (Phe-Phe und Trp-Phe) binden an die Tachykinin-Rezeptoren NK1, NK2 und NK3 mit mikromolaren Affinitäten. Diese Substanzen bedecken zwar nicht eine ausreichende Oberfläche, um wirklich als α -Helix-Mimetikum zu fungieren, zeigen aber eindrucksvoll das Potenzial nichtpeptidischer Gerüste auf, eine Erkennungsfunktionalität in geeigneter räumlicher Orientierung für die Bindung eines Targetproteins zu präsentieren.

Unsere Arbeitsgruppe berichtete vor kurzem über ein Terphenylgerüst, das die Oberfläche eines α -helicalen Pepti-

des hinreichend genau nachbilden kann; die 3,2',2''-Substituenten der Phenylringe präsentieren funktionelle Gruppen in einer räumlichen Anordnung, die den Seitenketten i , $i+3(4)$ und $i+7$ der α -Helix entspricht (Schema 34a). Diese Strategie



Schema 34. a) Rationales Design von terphenylbasierten α -Helix-Mimetika; b) terphenylbasierte Inhibitoren.

wurde erstmals bei der Entwicklung von Inhibitoren der Wechselwirkung zwischen Calmodulin und der smMLCK (small muscle myosin light chain kinase) angewendet.^[49] Mutationsstudien an der Sequenz eines 20-mer-Fragments der smMLCK identifizierten die Positionen Trp800, Thr803 und Val807 als entscheidend für die Wirkung. Die Tatsache, dass ein helicales Peptid, das aus der Calciumpumpe der Plasmamembran C20W abgeleitet wurde, an die gleiche Region von Calmodulin wie smMLCK bindet, weist ebenfalls auf die Bedeutung dieser hydrophoben Reste hin. Zur Vereinfachung der Synthese wurde in der Trp-Seitenkette Indol durch Naphthalin ersetzt, und die Hydroxygruppe des Threonins wurde weggelassen, was zu dem Liganden **89** führte (Schema 34b). Die Bindung von **89** an CaM wurde durch Affinitätschromatographie nachgewiesen. **89** inhibierte die CaM-vermittelte Aktivierung von 3',5'-Phosphodiesterase (PDE), von der angenommen wird, dass sie CaM an der gleichen Stelle bindet wie smMLCK. Das Terphenyl **89** konkurrierte mit dem smMLCK-Peptid mit einem IC_{50} -Wert von 9 nM.

Es wurde auch nachgewiesen, dass geeignet entworfene Terphenylgerüste die Aggregation des hexameren gp41-Zentrums verhindern, das für die Fusion des HI-Virus-1 mit den Wirtszellen maßgeblich ist.^[167] Terphenylderivate können so konstruiert werden, dass sie die hydrophoben Funktionen an den Positionen i , $i+4$ und $i+7$ der α -helicalen heptameren repetitiven Regionen der C- und N-terminalen Peptide nachahmen können. Diese synthetischen Helix-Mimetika

stören die Bindung der C-terminalen Peptide an das trimere N-terminale Zentrum und verhindern das Eindringen von HIV-1 in die Wirtszellen. Das Derivat **90** spaltet ein Modellsystem aus zwei Peptiden (N36 und C34) der N- und C-heptameren repetitiven Regionen, die ein stabiles Bündel aus sechs Helices analog zum gp41-Zentrum bilden (Abbildung 8). Mit CD-Spektroskopie wurde nachgewiesen, dass

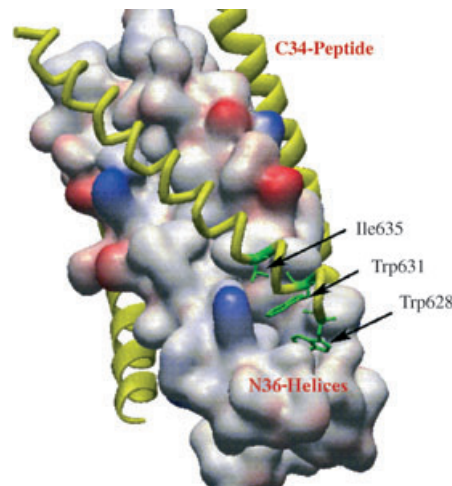


Abbildung 8. Kristallstruktur des aktiven Zentrums C34 von gp41 (Aminosäuren 628–661, dargestellt als helicale Röhren) im Komplex mit N36 (Aminosäuren 546–581). Der Komplex entsteht, indem die Seitenketten von Trp628, Trp631 und Ile635 in eine hydrophobe Spalte auf der Proteinoberfläche eindringen.

das C34-Peptid allein in Lösung ein Zufallsknäuel bildet, während das N36-Peptid konzentrationsabhängig aggregiert. Titriert man Verbindung **90** in eine PBS-gepufferte Lösung dieses Modellsystems, nimmt das CD-Signal bei 222 und 208 nm ab, was einer Abnahme der Helicität des hexameren Bündels entspricht, das mit drei Äquivalenten des Terphenyls gesättigt wird. Der T_m -Wert des N36-Zentrums in Gegenwart eines Überschusses an **90** ist signifikant niedriger als der des gp41-Zentrums und gleicht dem der N36-Region allein, was darauf hindeutet, dass das Terphenyl um die C34-Bindestelle konkurriert. Die elektrostatischen und hydrophoben Eigenschaften von **90** sind entscheidende Faktoren für diese Reaktion, denn Terphenyle ohne Alkylsubstituenten und mit positiv geladenen Gruppen hatten wenig Einfluss auf die CD-Eigenschaften des gp41-Zentrums. Mit einer ELISA-Messung mit einem Antikörper, der an das N36-C34-Helixbündel, nicht aber an die einzelnen Peptide bindet, ließ sich nachweisen, dass **90** die Bildung des hexameren Bündels mit einem IC_{50} -Wert von $13.18 \pm 2.54 \mu\text{g mL}^{-1}$ verhindert; außerdem hemmt **90** die HIV-1-vermittelte Zell-Zell-Fusion mit einem IC_{50} -Wert von $15.70 \pm 1.30 \mu\text{g mL}^{-1}$, wie sich aus einem Farbstofftransfer-Fusionstest ergab.

Die α -Helix-Strategie wurde verwendet, um einen Inhibitor des antiapoptotischen Proteins Bcl-x_L zu entwerfen.^[206] Ein geläufiges Verfahren zur Inhibierung der Bcl-x_L-Funktion besteht darin, die Bak-Erkennungsregion auf Bcl-x_L zu blockieren und so den Protein-Protein-Kontakt zu unterbrechen. Eine NMR-spektroskopisch bestimmte Struktur des

(Bcl-x_L)-Bak-Komplexes zeigt, dass eine helicale Region von Bak (72–87, $K_d = 340$ nM) an eine hydrophobe Furche in der Oberfläche von Bcl-x_L bindet.^[207] Mit einem Alanin-Scan wurde nachgewiesen, dass Val 74, Leu 78, Ile 81 und Ile 85 die ausschlaggebenden Reste sind; diese befinden sich an den Positionen *i*, *i*+4, *i*+7 und *i*+11 auf einer Seite der Helix (Abbildung 9). Mehrere Terphenylderivate mit unterschied-

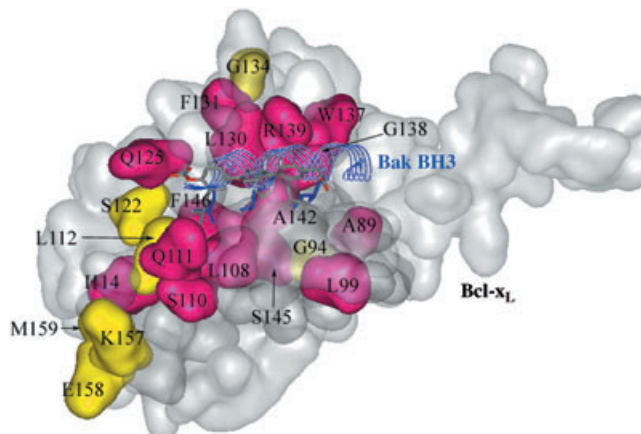
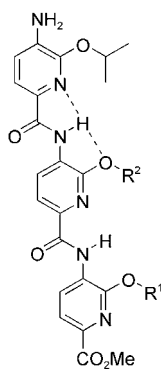


Abbildung 9. Ergebnisse der ¹⁵N-HSQC-Messung mit ¹⁵N-markiertem Bcl-x_L. Die Reste, die in Gegenwart von **91** eine chemische Verschiebung aufweisen, sind besonders hervorgehoben. Die wahrscheinlichste Konformation von Inhibitor **91** (Stabmodell), die mit einer Bindungssimulation rechnergestützt ermittelt wurde, ist zum Vergleich mit der helicalen Bak-BH3-Domäne (blau) überlagert.

lichen Sequenzen und Substitutionsmustern an den Positionen 3, 2' und 2'' wurden synthetisiert. Ihre Wechselwirkungen mit dem Zielpotein wurden mit Fluoreszenzpolarisationsmessungen bestimmt. Es zeigte sich, dass die Verbindung **91** mit zwei Carboxylatresten und einer Substituentensequenz bestehend aus Isobutyl, 1-Naphthylmethyl und Isobutyl ein wirksamer Inhibitor ist ($K_i = 114$ nM). Die Spezifität wurde durch Vertauschen der drei Schlüsselsubstituenten und einem Absinken von K_i um den Faktor 30 bestätigt. Ebenso führte die Entfernung der beiden Carboxygruppen oder ein Austausch gegen positiv geladene Gruppen zu einem Aktivitätsverlust. HSQC-NMR-Messungen mit **91** wiesen darauf hin, dass die Terphenylderivate in der gleichen hydrophoben Spalte auf der Oberfläche von Bcl-x_L binden wie Bak.



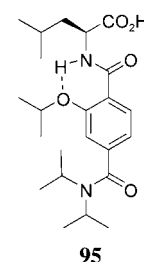
- 92** R¹ = R² = *i*Pr
93 R¹ = *i*Pr; R² = Bn
94 R¹ = R² = Bn

Schema 35. α-Helix-Mimetika auf der Basis eines Oligoamid-Foldamers. Bn = Benzyl.

Ein anderer Ansatz, um die bindende Oberfläche von α-Helices nachzuahmen, wurde in unserer Arbeitsgruppe auf der Basis eines Oligoamid-Foldamers entwickelt.^[208] Die erwartete Konformation des Foldamers ist in Schema 35 dargestellt. Die Konformation resultiert aus der eingeschränkten Beweglichkeit durch intramolekulare Wasserstoffbrücken zwi-

schen den Amid-Wasserstoffatomen und den Pyridin-Stickstoffatomen sowie aus der Tatsache, dass es in einer alternativen Konformation zu einer ungünstigen sterischen Wechselwirkung zwischen der Amid-Carbonylgruppe und dem Pyridin-Stickstoffatom käme. Eine weitere Stabilisierung entsteht durch die Wasserstoffbrücke zwischen der Amid-NH-Gruppe und dem Sauerstoff der Alkoxygruppe. Diese durch intramolekulare Wasserstoffbrücken fixierte Konformation wurde im festen Zustand durch Röntgenkristallographie bestätigt; zugleich wurde sichtbar, dass die Alkoxyseitenketten um 45° verdreht sind, um die Wechselwirkung des einsamen Elektronenpaares am Sauerstoff mit der Amid-NH-Gruppe zu maximieren. Das Foldamer wurde als proteomimetischer Antagonist von Bak getestet, der die Wechselwirkung mit Bcl-x_L stört. Im In-vitro-Test wurden drei Inhibitoren, **92–94**, mit K_i -Werten von 2,3, 9,8 und 1,6 μM identifiziert, während Foldamere mit Trisbenzyloxy- und Trismethoxy-Gruppen weniger aktiv waren, was eine gewisse Notwendigkeit für Passform und Sequenzspezifität zwischen Protein und Mimetikum aufzeigt.

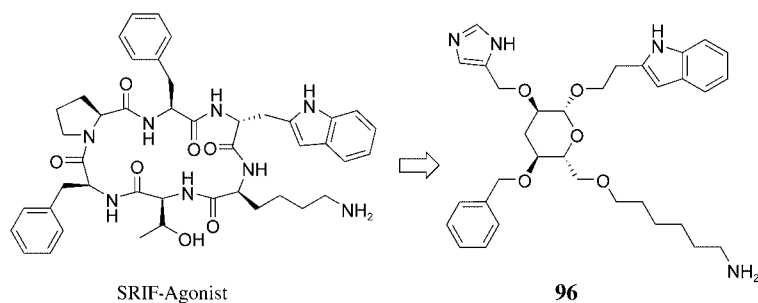
Wir beschrieben vor kurzem eine Gruppe neuartiger synthetischer Helix-Mimetika, die von einem Terephthalamid-Gerüst abgeleitet sind.^[209] Das Rückgrat des Terphenyls wurde auf ein einfacheres Terephthalamid reduziert (**95**, Schema 36), während die räumliche Anordnung der hervorstehenden Seitenketten beibehalten wurde. Die flankierenden Phenylringe des Terphenyl-Rückgrats wurden durch zwei funktionalisierte Carboxamidgruppen ersetzt, die die planare Geometrie der Phenylringe durch die eingeschränkte Rotation der Amidbindungen beibehalten. Die intramolekulare Wasserstoffbrücke zwischen der Amid-NH-Gruppe und dem Alkoxy-Sauerstoffatom in **95** stellt sicher, dass die 2-Isopropoxy-Gruppe und die obere Isobutylseitenkette zur gleichen Seite des Terephthalamids hin orientiert sind. Auch hier wurde mit einem Fluoreszenzpolarisationstest die Freisetzung des fluoreszenzmarkierten Bak-Peptids von Bcl-x_L durch **95** verfolgt, wobei der Inhibitor submikromolare Affinitätswerte aufwies ($K_i = 0,78$ μM). Bei Behandlung menschlicher HEK293-Zellen mit den Terephthalamid-Derivaten wurde ein Aufbrechen der (Bcl-x_L)-Bak-Wechselwirkung in ganzen Zellen beobachtet. HSQC-Messungen mit ¹⁵N-markiertem Bcl-x_L deuten darauf hin, dass das Terephthalamid und das Bak-BH3-Peptid die gleiche Region auf der äußeren Oberfläche von Bcl-x_L erkennen; dies bestätigt, dass Terephthalamid ein brauchbares alternatives Gerüst zu Terphenyl als α-Helix-Mimetikum ist.



Schema 36. α-Helix-Mimetikum auf der Basis von Terephthalamid.

5.2.2. Mimetika von β-Schleifen

Wichtige Beiträge zur Entwicklung nichtpeptidischer Peptidmimetika stammen von Hirschmann und Smith. Ein Beispiel ist das auf einem D-Glucose-Gerüst aufbauende Mimetikum **96** des cyclischen Peptids Somatostatin (SRIF) (Schema 37).^[210] Kohlenhydrate bieten sich als vielverspre-

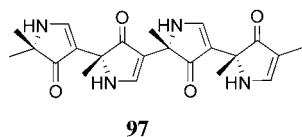


Schema 37. Nichtpeptisches, von D-Glucose abgeleitetes Peptidmimetikum von Somatostatin (SRIF).

chende Ausgangsstrukturen für die Nachahmung von β -Schleifen an, da sie mehrere geeignete Anknüpfungspunkte für Seitenketten und eine relativ starre Struktur haben. Form und Substitutionsmuster von D-Glucose erwiesen sich am besten geeignet, um die Seitenketten von Trp, Lys und Phe zu präsentieren. In einem radiologischen Bindungstest wurde nachgewiesen, dass **96** ^{125}I -CGP23996 mit einem IC_{50} -Wert von $1.9\ \mu\text{M}$ vollständig vom SRIF-Rezeptor auf Membranen von Hirnrinde, Hypophyse und AtT-20-Zellen verdrängt.

Vom gleichen Typ sind von β -D-Glucose abgeleitete Mimetika von Somatostatin (SRIF)^[211] und Antagonisten für Substanz P (NK-1),^[212] von Pyrrolinon abgeleitete Hemmstoffe gegen Renin,^[213] die HIV-1-Protease^[214,215] und Matrix-Metalloproteasen,^[216] kompetente nichtpeptidische Hybridliganden für das zu den humanen MHC-Proteinen der Klasse II gehörige HLA-DR1^[217] und azepinbasierte Cryptophycin-Mimetika.^[218]

Smith und Hirschmann entwickelten das Pyrrolinon-basierte Mimetikum **97** der β -Strang/ β -Faltblatt- und/oder β -Schleifen-Konformation von Peptiden,^[215,217,219] das alle entscheidenden Erkennungsmerkmale (d. h. Seitenketten und H-Brücken-Donoren und -Acceptoren) originalgetreu wiedergibt (Schema 38). Diese Grundstruktur wurde zur Entwicklung von Antagonisten der HIV-1-Protease und danach für Mimetika von Substraten der MHC-Klasse-II-Proteine genutzt.^[214,217]



Schema 38. Polypyrrolinon-basiertes Peptidmimetikum einer β -Schleife.

Rebek et al. veröffentlichten ein niedermolekulares β -Schleifen-Mimetikum, das die Wechselwirkung zwischen IL-1RI und dem Adapterprotein MyD88 unterbricht.^[220] Die IL-1R-Superfamilie und der Toll-like-Rezeptor (TLR), die eine konservierte Toll-IL-1R-Resistenz(TIR)-Domäne gemeinsam haben,^[221] sind entscheidende Komponenten für die angeborene und die erworbene Immunität.^[222] Das (IL-1)-Monomer wirkt als proinflammatorischer Mediator durch Dimerisierung und Rekrutierung des mutmaßlichen Adap-

terproteins MyD88, das ebenfalls eine TIR-Domäne enthält,^[223,224] über eine homotypische Bindung der TIR-Domäne zwischen IL-1RI und MyD88.^[224,225] Xu et al. hatten bereits zuvor die Kristallstruktur der TIR-Domänen aus humanem TLR1 und TLR2 bestimmt (Abbildung 10) und damit die strukturellen Grundlagen der TIR-TIR-Bindung zwischen IL-1RI und MyD88 aufgeklärt.^[226] Die hervorstechende BB-Schleife wurde als entscheidendes Element für die Komplexbildung angesehen, weil Mutationen in fast jeder Position dieser Region zu einer signifikanten Abnahme der Rezeptoraktivität bei der Signaltransduktion führten.

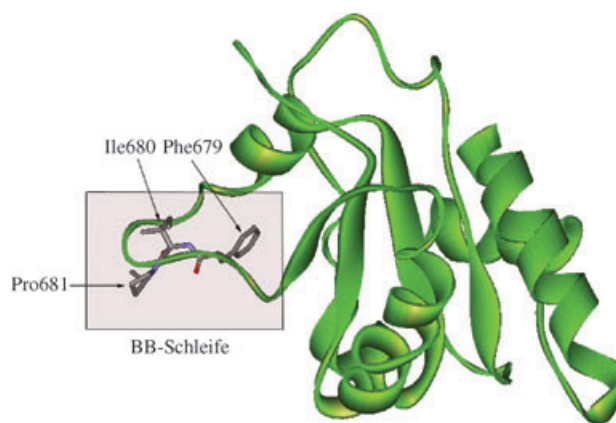
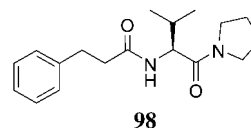


Abbildung 10. Kristallstruktur der TIR-Domäne; die BB-Schleife ist markiert.

Rebek et al. synthetisierten ein Analogon des zentralen Tripeptids der BB-Schleife (**98**), das die (F/Y)-(V/L/I)-(P/G)-Reste nachbildet (Schema 39), und untersuchten dessen Fähigkeit zur Unterbrechung der (IL-1RI)-MyD88-Bindung. **98** verzögerte die IL-1 β -vermittelte Aktivierung der p38-MAP-Kinase in mikromolaren Konzentrationen. Mit Sandwich-ELISA-Assays ließ sich zeigen, dass **98** die IL-1 β -vermittelte (IL-1RI)-MyD88-Bindung in EL4-Zellen verhindert. Die Spezifität von **98** für den Komplex aus IL-1RI und MyD88 wurde durch den Befund bestätigt, dass **98** andere Mitglieder der Toll-Rezeptor-Superfamilie (TLR1–10) nicht beeinträchtigt.



Schema 39. Niedermolekulares Mimetikum **98** der BB-Schleife.

5.2.3. β -Strang/ β -Faltblatt-Mimetika

Ein β -Strang ist ein lineares oder sägezahnähnliches peptidisches Strukturelement, das β -Faltblätter bilden kann; diese machen über 30 % aller Proteinsekundärstrukturen aus.

Im letzten Jahrzehnt wurde über einige niedermolekulare β -Strang/ β -Faltblatt-Mimetika und ihre Anwendung etwa bei der Entwicklung von Proteaseinhibitoren berichtet.^[227,228] Beispiele für synthetische Verbindungen, die β -Stränge bzw. β -Faltblätter nachbilden und damit Wechselwirkungen großer Proteine unterbrechen, sind aber noch immer selten.

Die Integrine sind eine Rezeptorfamilie, die an einer Reihe zellulärer Funktionen wie Wundheilung, Zelldifferenzierung, Homing von Tumorzellen und Apoptose beteiligt ist. Funktionale Integrine sind heterodimere Aggregate, die aus einer α - und einer β -transmembranären Glycoproteinuntereinheit bestehen, die nichtkovalent gebunden sind und homologe Sequenzen haben. Corbett et al. identifizierten wirksame und selektive $\alpha_v\beta_3$ -Integrinantagonisten beim Screening einer Festphasen-Bibliothek.^[229] Nicolaou und Mitarbeiter verwendeten **96** als Gerüst, um die Sequenz des cyclischen Peptids cRGDFV nachzubilden, das Integrin-Ligand-Bindungen hemmt.^[230]

Die ICAM-Proteine 1, 2 und 3 binden an LFA-1 (das Integrin $\alpha_L\beta_2$, CD11a/CD18) und vermitteln Adhäsion, Gefäßaustritt, Migration und Proliferation von Lymphocyten.^[231] Ein Epitop aus den Aminosäuren Glu34, Lys39, Met64, Tyr66, Asn68 und Gln73, das sich direkt gegenüber einem antiparallelen β -Faltblatt in der ersten Domäne von ICAM-1 befindet, wurde als essentiell für die Wechselwirkung mit LFA-1 identifiziert (Abbildung 11).^[232]

Eines der entscheidenden Probleme beim Entwurf niedermolekularer Proteomimetika als Inhibitoren von Protein-Protein-Wechselwirkungen besteht darin, dass die bindenden Elemente oft weit verstreut sind. Alle beteiligten funktionellen Gruppen eines Zielproteins in einer synthetischen Verbindung zu berücksichtigen, bleibt eine große Hürde. Eine

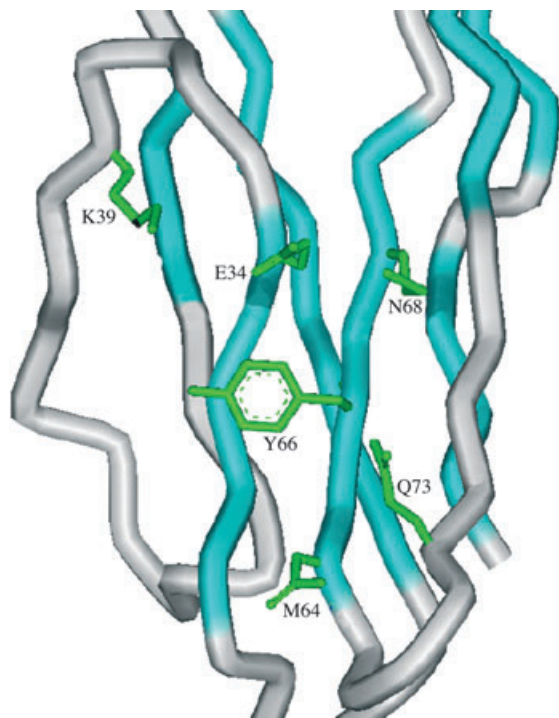
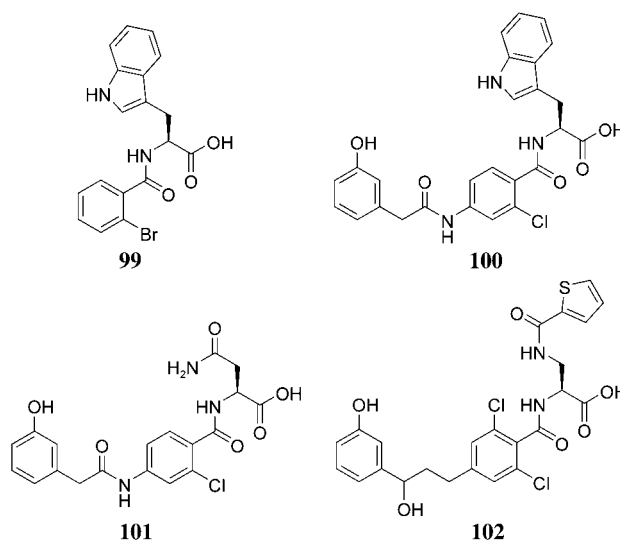


Abbildung 11. Das diskontinuierliche Bindungsepitop von ICAM-1 (in Grün dargestellt).

Forschungsgruppe bei Genentech stellte einen eleganten Ansatz vor, der darauf beruht, den nativen Liganden des betreffenden Rezeptors als Leitstruktur zu verwenden und niedermolekulare Antagonisten durch Erkundung des chemischen Diversitätsraumes zu identifizieren.^[233] Kistrin, ein Disintegrinprotein mit einer RGD-Sequenz, bricht in vitro die Bindung zwischen LFA-1 und ICAM-1 auf, indem es die entscheidenden bindenden Reste von ICAM-1 nachbildet. Die Peptidsequenz $\text{H}_2\text{N-CGY}^{(\text{m})}\text{DMPC-COOH}$ ($\text{Y}^{(\text{m})} = \text{meta-Tyrosin}$), die eine ähnliche Wirkung bei der Hemmung der (ICAM-1)-(LFA-1)-Bindung hat, wurde als Leitstruktur für die Entwicklung synthetischer Hemmstoffe ausgewählt.

Verbindung **100** (Schema 40), die in einem ähnlichen Ansatz mit einem IC_{50} -Wert von 1.6 μM gefunden worden war, wurde mit einer *meta*-Phenolgruppe modifiziert, um den $\text{Y}^{(\text{m})}$ -Rest in der peptidischen Leitstruktur nachzubilden, und



Schema 40. Synthetische Inhibitoren, die die (LFA-1)-(ICAM-1)-Bindung hemmen.

wirkte dann im ELISA-Test 30-mal besser. Das Molekül **100** wurde in fünf Module unterteilt, und jedes Modul wurde zur weiteren Optimierung modifiziert. Diese Erkundung des chemischen Diversitätsraumes führte zu den Verbindungen **101**, die die minimale Darstellung des Epitops mit hoher Wirksamkeit repräsentiert ($\text{IC}_{50} = 3.7 \text{ nM}$), und **102**, die eine der besten Kombinationen der molekularen Module darstellt ($\text{IC}_{50} = 1.4 \text{ nM}$). Im MLR-Test konnte man nachweisen, dass Substanz **102** ICAM-1 durch Bindung von LFA-1 antagonisiert und die Lymphocytenproliferation und -adhäsion in vitro vermittelt. Der Entwurf der Verbindungen **99–102** folgte aus der Betrachtung des diskontinuierlichen ICAM-1-Epitops mit fünf Aminosäureresten, die auf drei unterschiedliche β -Stränge an der Oberfläche des Proteins verteilt sind, ausgehend von Kistrin als Leitstruktur und dem Peptid $\text{H}_2\text{N-CGY}^{(\text{m})}\text{DMPC-COOH}$. Es folgte jedoch eine anhaltende Debatte, ob diese Verbindungen tatsächlich als ICAM-1-Mimetika wirken.^[234] Springer et al. argumentierten, dass es keine ICAM-1-Mimetika seien, da sie im Unterschied zu ICAM-1 nicht an die α_L - oder die α_M -I-Domäne binden, sondern die Bindung eines monoklonalen Antikörpers an die

β_2 -I-ähnliche Domäne stören, die nicht direkt an der Bindung von ICAM-1 beteiligt ist.^[234,235]

FtsZ, ein Homologes eukaryotischer Tubuline, ist ein essentieller Bestandteil der Septumringe, die die Zellteilung bei Gram-negativen Bakterien vermitteln.^[236] ZipA (Z interacting protein A) ist ein 36.4 kDa großes, in der Membran verankertes Protein, das in einem sehr frühen Stadium des Zellteilungszyklus durch Komplexierung mit FtsZ in die Septumregion gebracht wird. Die Zellteilung kann durch Unterbrechen der ZipA-FtsZ-Assoziation gestoppt werden, sodass diese Protein-Protein-Kontaktfläche ein möglicher Angriffspunkt für die Entwicklung neuer Antibiotika geworden ist. Röntgen- und NMR-Analysen deckten auf, dass FtsZ an eine breite und überwiegend hydrophobe Oberflächenregion an der lösungsmittel-exponierten Seite eines β -Faltblatts von ZipA bindet (Abbildung 12).^[237] Bei der Bindung nimmt das 17 Aminosäuren lange FtsZ-Peptid (³⁶⁷KEPDYLDIPAFLRKQAD³⁸³) die Konformation eines gestreckten β -Stranges in der Region 367–373 an, gefolgt von einer α -helicalen Domäne von 374–383. Direkte Kontakte zwischen den Atomen bestehen zwischen elf Aminosäureresten von ZipA und sieben Resten von FtsZ in der Region 370–381.

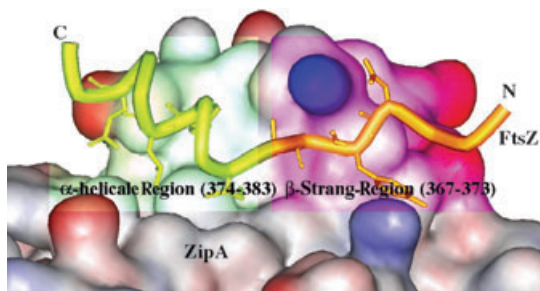
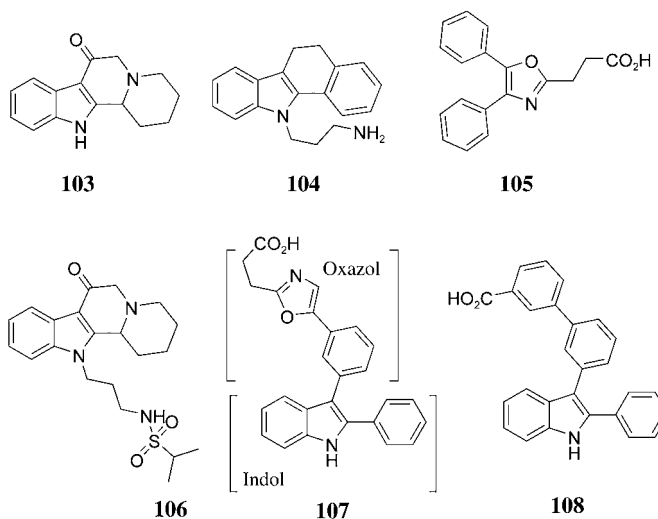


Abbildung 12. Die ZipA-FtsZ-Kontaktfläche (Aminosäuren 367–383); das FtsZ-Peptid (als Röhre dargestellt) bindet an eine hydrophobe Tasche in der Oberfläche von ZipA. Es hat die Form eines gestreckten β -Strangs (367–373), gefolgt von einer α -Helix (374–383).

Eine Forschungsgruppe bei Wyeth Research berichtete kürzlich über die Entwicklung niedermolekularer Inhibitoren der ZipA-FtsZ-Wechselwirkung auf der Basis der Schlüsselaminosäuren in der Protein-Protein-Kontaktfläche.^[238] Die Verbindungen **103–105** (Schema 41) zeigten nur eine schwache Hemmwirkung in Fluoreszenzpolarisationsmessungen (IC_{50} = 1.17, 2.06 und 2.75 mM).^[239] Die Röntgenstrukturanalyse ergab, dass **103** und **104** im Wesentlichen die gleiche Stelle erkennen, während **105** und **106** eine andere Region an der Oberfläche von ZipA belegen. Die Indolringe in **103** und **104** erkennen die lipophile Tasche, während **105** an eine hydrophile Region bindet. Ausgehend von der Strukturinformation, die aus der Leitstruktur erhalten wurde, wurde ein chimäres Molekül **107** entworfen, das die strukturellen Eigenschaften des Indol- und des Oxazolmotivs kombiniert. Der wirksamste Hemmstoff, **108** (ein Analogon des chimären Moleküls; Schema 41), zeigte einen IC_{50} -Wert von 192 μ M für die Unterbrechung der ZipA-FtsZ-Bindung. Die Zielstruktur der Inhibitoren wurde mit 2D-¹⁵N-HSQC-Messungen bestätigt.



Schema 41. Synthetische Inhibitoren der ZipA-FtsZ-Komplexbildung.

6. Zusammenfassung und Ausblick

Es wurden aktuelle Beispiele synthetischer Substanzen vorgestellt, die Protein-Protein-Wechselwirkungen unterbrechen. Die meisten dieser Verbindungen wurden durch Screening chemischer Bibliotheken identifiziert oder durch strukturbasiertes rationales Design entwickelt. Die nächsten Jahre werden eine Fortentwicklung hin zu effizienteren Techniken zur Herstellung und Bewertung von Bibliotheken sehen. Damit wird es möglich sein, Bibliotheken aus vielen Tausenden von Verbindungen auf einfache Weise aufzubauen und nach Wirkstoffen zu durchsuchen.^[3,4] Die Anwendung von Massenspektrometrie, NMR-Spektroskopie und Nanotechnologie im Hochdurchsatz-Screening führte zu verbesserten Screening-Verfahren zur Auffindung niedermolekularer Inhibitoren von Protein-Protein-Wechselwirkungen.^[240] Neue Techniken wie die Ankertechnik (Abschnitt 4.2.4) ermöglichen die Identifizierung von Leitstrukturen mit nur schwacher bis mäßiger Wirksamkeit,^[120] die als Ausgangspunkte für die Entwicklung hoch aktiver Inhibitoren dienen. Benkovic et al. berichteten kürzlich über ein neues Verfahren zur genetischen Selektion, das mithilfe ganzer Zellen als Reporter niedermolekulare Antagonisten von Protein-Protein-Wechselwirkungen identifiziert und so die inhärenten Grenzen der In-vitro-Analyse umgeht.^[241]

Synthetische Verbindungen, die im Hochdurchsatz-Screening gefunden wurden, dienen als wertvolle Leitstrukturen für Untersuchungen der Struktur-Affinitäts-Beziehungen mit dem Ziel einer Wirkungsverbesserung oder verbesserten Bioverfügbarkeit unter Beibehaltung der Bindungsaffinität. Pharmakophor-Modelle, die aus diesen Struktur-Affinitäts-Beziehungen abgeleitet wurden, müssen dann in weiteren Bindungsstudien erhärtet werden.

Die Miteinbeziehung biologischer Methoden in chemische Strategien, etwa beim Phänotyp-Screening, führte zu völlig neuen Ansätzen.^[151] Da biologische Moleküle oft gleichzeitig an mehreren Targets angreifen, ist unser Modell von einzelnen Targets für hoch selektive niedermolekulare

Substanzen wahrscheinlich überholt. Zum Beispiel fanden Danial et al., dass Proteine der Bcl-2-Familie neben ihrer Funktion bei der Apoptose auch eine Rolle in verschiedenen Stoffwechselwegen spielen.^[242] Vergleichbar der Art und Weise, wie pflanzliche Medizin über Jahrtausende angewendet wurde, beginnt die moderne Wissenschaft, aktive Verbindungen in lebenden Organismen zu identifizieren, und erst dann ihre Targets.

Rationale Ansätze andererseits beruhen auf Struktur und Synthese von Molekülen mit targetkomplementären funktionellen Gruppen. Der Entwurf dieser Mimetika orientiert sich an Strukturmerkmalen auf Proteinoberflächen, z. B. Clustern hydrophober Gruppen, elektrostatischen Domänen und metallkoordinierenden Gruppen. Die Selektivität und allgemeine Anwendbarkeit von Inhibitoren, die nach dieser Strategie im Kontext zahlreicher anderer Proteintargets entwickelt wurden, bleibt abzuwarten. Die degenerierte Natur der nach außen gerichteten funktionellen Gruppen macht die spezifische Erkennung von Proteinoberflächen schwierig. Bei den meisten rationalen Designs, die in diesem Aufsatz beschrieben wurden, versuchte man, geometrische, elektrostatische und hydrophobe Anforderungen für Komplementarität zu definieren. In einigen Fällen wurde die Betrachtung auf die Messung der Targetselektivität durch indirekte (In-vivo-Toxizität) oder eingrenzende Techniken (Selektivität innerhalb eines kleinen Satzes verwandter Proteine) ausgedehnt. Diese Arbeiten sind wichtige erste Schritte hin zu verbesserter Affinität und Selektivität. Ein sehr vielversprechender Ansatz zur Suche nach synthetischen Inhibitoren von Protein-Protein-Kontaktflächen ist das rechnergestützte rationale Design. Eine verbesserte Selektivität bleibt die wichtigste Herausforderung bei der Entwicklung von Molekülen, die an der äußeren Oberfläche von Proteinen binden sollen. In dem Maß, wie unser Verständnis von Oberflächenbeweglichkeit und -funktionalität zunimmt und gleichzeitig eine genauere Computeranalyse verfügbar wird, werden Wirksamkeit und Selektivität in den Entwürfen verbessert werden.

Große organische Moleküle (MW > 750 Da) gelten im Allgemeinen als problematische Wirkstoffkandidaten.^[199,243] Der Nachteil großer Moleküle besteht im Wesentlichen darin, dass sie von den Lipinski-Regeln abweichen.^[244] Sie können allerdings besonders wertvoll sein in Fällen, in denen Proteinoberflächen keine eindeutigen Bindestellen aufweisen und eine hoch affine Anbindung kleiner Moleküle nicht möglich scheint. Wenn der Epitoptransfer auf kleine Moleküle schwierig ist, können große synthetische Verbindungen als pharmakologischer Proof-of-Principle dienen und dann zu einem aussichtsreichen Wirkstoffkandidaten minimiert oder modifiziert werden. Dies ist vor allem dann wahrscheinlich, wenn Verbindungen von Anfang an so konstruiert wurden, dass strukturelle Modifikationen einfach sind. Einige große Moleküle sind bereits in klinischen Studien getestet worden; ihre mäßige Toxizität und das moderate pharmakologische Profil weisen darauf hin, dass sich die Größe nicht immer nachteilig auswirkt. Außerdem kommt hinzu, dass andere große Molekültypen wie Antikörper und Peptide erfolgreich als Wirkstoffe eingesetzt werden. Polymere und Nanopartikel sind weitere vielversprechende Strukturen zur Modulation von Protein-Protein-Wechselwirkungen.

Ohne Frage wird die nähere Zukunft eine weiter zunehmende Verwendung synthetischer Verbindungen zur Inhibierung von Protein-Protein-Wechselwirkungen sehen. Und letzten Endes scheinen die Möglichkeiten, die die Natur uns dabei eröffnet, nahezu grenzenlos zu sein.

Die hier beschriebenen Arbeiten unseres Labors wurden von den National Institutes of Health (GM35208 und GM69850) gefördert.

Eingegangen am 25. August 2004,
veränderte Fassung am 24. Dezember 2004
Online veröffentlicht am 14. Juni 2005

Übersetzt von Dr. Burkard Neuß, Jülich

- [1] S. L. Schreiber, *Bioorg. Med. Chem.* **1998**, *6*, 1127.
- [2] T. Berg, *Angew. Chem.* **2003**, *115*, 2566; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42*, 2462.
- [3] D. L. Boger, J. Desharnais, K. Capps, *Angew. Chem.* **2003**, *115*, 4270; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42*, 4138.
- [4] D. L. Boger, *Bioorg. Med. Chem.* **2003**, *11*, 1607.
- [5] P. L. Toogood, *J. Med. Chem.* **2002**, *45*, 1543; A. G. Cochran, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2001**, *5*, 654; T. R. Gadek, J. B. Nicholas, *Biochem. Pharmacol.* **2003**, *65*, 1; A. V. Veselovsky, Y. D. Ivanov, A. S. Ivanov, A. I. Archakov, P. Lewi, P. Janssen, *J. Mol. Recognit.* **2002**, *15*, 405.
- [6] A. G. Cochran, *Chem. Biol.* **2000**, *7*, R85.
- [7] W. E. Stites, *Chem. Rev.* **1997**, *97*, 1233.
- [8] M. R. Arkin, J. A. Wells, *Nat. Rev. Drug Discovery* **2004**, *3*, 301.
- [9] T. Clackson, J. A. Wells, *Science* **1995**, *267*, 383.
- [10] B. C. Cunningham, J. A. Wells, *J. Mol. Biol.* **1993**, *234*, 554.
- [11] W. L. DeLano, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2002**, *12*, 14.
- [12] A. A. Bogan, K. S. Thorn, *J. Mol. Biol.* **1998**, *280*, 1.
- [13] B. Y. Ma, T. Elkayam, H. Wolfson, R. Nussinov, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2003**, *100*, 5772.
- [14] E. A. Padlan, *Proteins Struct. Funct. Genet.* **1990**, *7*, 112.
- [15] K. S. Thorn, A. A. Bogan, *Bioinformatics* **2001**, *17*, 284.
- [16] N. Leibowitz, Z. Y. Fligelman, R. Nussinov, H. J. Wolfson, *Proteins Struct. Funct. Genet.* **2001**, *43*, 235; B. Y. Ma, H. J. Wolfson, R. Nussinov, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2001**, *11*, 364.
- [17] F. Glaser, T. Pupko, I. Paz, R. E. Bell, D. Bechor-Shental, E. Martz, N. Ben-Tal, *Bioinformatics* **2003**, *19*, 163; R. E. Bell, N. Ben-Tal, *Comp. Funct. Genomics* **2003**, *4*, 420.
- [18] P. L. Privalov, S. J. Gill, *Adv. Protein Chem.* **1988**, *41*, 191; J. M. Sturtevant, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1977**, *74*, 2236.
- [19] G. Weber, *J. Phys. Chem.* **1993**, *97*, 7108; G. I. Makhadadze, P. L. Privalov, *Adv. Protein Chem.* **1995**, *48*, 307.
- [20] G. C. Kresheck, L. B. Vitello, J. E. Erman, *Biochemistry* **1995**, *34*, 8398.
- [21] T. N. Bhat, G. A. Bentley, G. Boulot, M. I. Greene, D. Tello, W. Dallacqua, H. Souchon, F. P. Schwarz, R. A. Mariuzza, R. J. Poljak, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1994**, *91*, 1089.
- [22] D. H. Williams, A. J. Maguire, W. Tsuzuki, M. S. Westwell, *Science* **1998**, *280*, 711.
- [23] D. H. Williams, E. Stephens, M. Zhou, *Chem. Commun.* **2003**, 1973.
- [24] D. H. Williams, E. Stephens, M. Zhou, *J. Mol. Biol.* **2003**, *329*, 389.
- [25] D. H. Williams, C. T. Calderone, D. P. O'Brien, R. Zerella, *Chem. Commun.* **2002**, 1266.
- [26] M. R. Eftink, A. C. Anusiem, R. L. Biltonen, *Biochemistry* **1983**, *22*, 3884.

- [27] M. F. Perutz, A. J. Wilkinson, M. Paoli, G. G. Dodson, *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **1998**, 27, 1.
- [28] C. A. Janeway, Jr., P. D. Travers, M. J. Walport, J. D. Capra, *Immunobiology: The Immune System in Health and Disease*, 3. Aufl., Garland, New York, **1997**.
- [29] W. Dall'Acqua, P. Carter, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **1998**, 8, 443; T. J. Vaughan, J. K. Osbourn, P. R. Tempest, *Nat. Biotechnol.* **1998**, 16, 535.
- [30] G. Winter, W. J. Harris, *Trends Pharmacol. Sci.* **1993**, 14, 139.
- [31] A. Skerra, A. Plückthun, *Science* **1988**, 240, 1038; M. Better, C. P. Chang, R. R. Robinson, A. H. Horwitz, *Science* **1988**, 240, 1041.
- [32] T. A. Waldmann, *Immunol. Today* **1993**, 14, 264.
- [33] T. A. Waldmann, *Science* **1986**, 232, 727.
- [34] T. B. Strom, V. R. Kelley, T. G. Woodworth, J. R. Murphy, *Immunol. Rev.* **1992**, 129, 131; T. Diamantstein, H. Osawa, *Immunol. Rev.* **1986**, 92, 5; R. L. Kirkman, L. V. Barrett, G. N. Gaulton, V. E. Kelley, A. Ythier, T. B. Strom, *J. Exp. Med.* **1985**, 162, 358.
- [35] P. T. Jones, P. H. Dear, J. Foote, M. S. Neuberger, G. Winter, *Nature* **1986**, 321, 522.
- [36] R. P. Junghans, T. A. Waldmann, N. F. Landolfi, N. M. Avdalo-
lovic, W. P. Schneider, C. Queen, *Cancer Res.* **1990**, 50, 1495; C. Queen, W. P. Schneider, H. E. Selick, P. W. Payne, N. F. Landolfi, J. F. Duncan, N. M. Avdalo-
lovic, M. Levitt, R. P. Junghans, T. A. Waldmann, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1989**, 86, 10029.
- [37] H. Lorberboumgalski, R. W. Kozak, T. A. Waldmann, P. Bailon, D. J. P. Fitzgerald, I. Pastan, *J. Biol. Chem.* **1988**, 263, 18650.
- [38] R. W. Kozak, A. Raubitschek, S. Mirzadeh, M. W. Brechbiel, R. Junghaus, O. A. Gansow, T. A. Waldmann, *Cancer Res.* **1989**, 49, 2639; R. W. Kozak, R. W. Atcher, O. A. Gansow, A. M. Friedman, J. J. Hines, T. A. Waldmann, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1986**, 83, 474.
- [39] P. A. Nygren, M. Uhlen, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **1997**, 7, 463.
- [40] R. C. Ladner, *Trends Biotechnol.* **1995**, 13, 426.
- [41] F. Martin, C. Toniatti, A. L. Salvati, S. Venturini, G. Ciliberto, R. Cortese, M. Sollazzo, *EMBO J.* **1994**, 13, 5303; F. Martin, C. Toniatti, A. L. Salvati, G. Ciliberto, R. Cortese, M. Sollazzo, *J. Mol. Biol.* **1996**, 255, 86; S. J. McConnell, R. H. Hoess, *J. Mol. Biol.* **1995**, 250, 460.
- [42] J. Ku, P. G. Schultz, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1995**, 92, 6552; K. Nord, E. Gunneriusson, J. Ringdahl, S. Stahl, M. Uhlen, P. A. Nygren, *Nat. Biotechnol.* **1997**, 15, 772.
- [43] Y. Choo, A. Klug, *Curr. Opin. Biotechnol.* **1995**, 6, 431.
- [44] J. W. Chin, A. Schepartz, *Angew. Chem.* **2001**, 113, 3922; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, 40, 3806; J. W. Chin, R. M. Grotzfeld, M. A. Fabian, A. Schepartz, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2001**, 11, 1501; J. W. Chin, A. Schepartz, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, 123, 2929; N. J. Zondlo, A. Schepartz, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, 121, 6938; J. K. Montclare, A. Schepartz, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, 125, 3416.
- [45] S. E. Rutledge, H. M. Volkman, A. Schepartz, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, 125, 14336.
- [46] I. Radhakrishnan, G. C. Perez Alvarado, D. Parker, H. J. Dyson, M. R. Montminy, P. E. Wright, *Cell* **1997**, 91, 741.
- [47] I. Glover, I. Haneef, J. Pitts, S. Wood, D. Moss, I. Tickle, T. Blundell, *Biopolymers* **1983**, 22, 293.
- [48] M. A. Fazal, B. C. Roy, S. G. Sun, S. Mallik, K. R. Rodgers, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, 123, 6283.
- [49] B. P. Orner, J. T. Ernst, A. D. Hamilton, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, 123, 5382.
- [50] W. E. Meador, A. R. Means, F. A. Quirocho, *Science* **1992**, 257, 1251.
- [51] E. Drakopoulou, J. Vizzavona, C. Vita, *Lett. Pept. Sci.* **1998**, 5, 241.
- [52] C. Vita, E. Drakopoulou, J. Vizzavona, S. Rochette, L. Martin, A. Menez, C. Roumestand, Y. S. Yang, L. Ylisastigui, A. Benjouad, J. C. Gluckman, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1999**, 96, 13091.
- [53] L. Martin, F. Stricher, D. Misse, F. Sironi, M. Pugniere, P. Barthe, R. Prado-Gotor, I. Freulon, X. Magne, C. Roumestand, A. Menez, P. Lusso, F. Veas, C. Vita, *Nat. Biotechnol.* **2003**, 21, 71.
- [54] C. Vita, C. Roumestand, F. Toma, A. Menez, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1995**, 92, 6404.
- [55] E. Drakopoulou, S. Zinn-Justin, M. Guenneugues, B. Gilquin, A. Menez, C. Vita, *J. Biol. Chem.* **1996**, 271, 11979.
- [56] F. Bontems, B. Gilquin, C. Roumestand, A. Menez, F. Toma, *Biochemistry* **1992**, 31, 7756.
- [57] C. Vita, F. Bontems, F. Bouet, M. Tauc, P. Poujeol, H. Vatanpour, A. L. Harvey, A. Menez, F. Toma, *Eur. J. Biochem.* **1993**, 217, 157.
- [58] F. Bontems, C. Roumestand, P. Boyot, B. Gilquin, Y. Doljansky, A. Menez, F. Toma, *Eur. J. Biochem.* **1991**, 196, 19; F. Bontems, C. Roumestand, B. Gilquin, A. Menez, F. Toma, *Science* **1991**, 254, 1521.
- [59] F. Dreyer, *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* **1990**, 115, 93; P. N. Strong, *Pharmacol. Ther.* **1990**, 46, 137.
- [60] R. W. Sweet, A. Truneh, W. A. Hendrickson, *Curr. Opin. Biotechnol.* **1991**, 2, 622; D. J. Capon, R. H. R. Ward, *Annu. Rev. Immunol.* **1991**, 9, 649.
- [61] P. D. Kwong, R. Wyatt, J. Robinson, R. W. Sweet, J. Sodroski, W. A. Hendrickson, *Nature* **1998**, 393, 648.
- [62] S. E. Osborne, I. Matsumura, A. D. Ellington, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **1997**, 1, 5.
- [63] C. Tuerk, L. Gold, *Science* **1990**, 249, 505; A. D. Ellington, J. W. Szostak, *Nature* **1990**, 346, 818.
- [64] S. E. Osborne, A. D. Ellington, *Chem. Rev.* **1997**, 97, 349.
- [65] L. S. Green, D. Jellinek, C. Bell, L. A. Beebe, B. D. Feistner, S. C. Gill, F. M. Jucker, N. Janjic, *Chem. Biol.* **1995**, 2, 683.
- [66] D. J. Schneider, J. Feigon, Z. Hostomsky, L. Gold, *Biochemistry* **1995**, 34, 9599.
- [67] D. Jellinek, L. S. Green, C. Bell, C. K. Lynott, N. Gill, C. Vargeese, G. Kirschenheuter, D. P. C. McGee, P. Abesinghe, W. A. Pieken, R. Shapiro, D. B. Rifkin, D. Moscatelli, N. Janjic, *Biochemistry* **1995**, 34, 11363; D. Jellinek, C. K. Lynott, D. B. Rifkin, N. Janjic, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1993**, 90, 11227.
- [68] L. C. Bock, L. C. Griffin, J. A. Latham, E. H. Vermaas, J. J. Toole, *Nature* **1992**, 355, 564; L. C. Griffin, G. F. Tidmarsh, L. C. Bock, J. J. Toole, L. L. K. Leung, *Blood* **1993**, 81, 3271.
- [69] R. R. Breaker, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **1997**, 1, 26; N. J. Jing, M. E. Hogan, *J. Biol. Chem.* **1998**, 273, 34992; D. J. Patel, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **1997**, 1, 32.
- [70] S. H. Gellman, *Acc. Chem. Res.* **1998**, 31, 173.
- [71] K. Gademann, M. Ernst, D. Hoyer, D. Seebach, *Angew. Chem.* **1999**, 111, 1302; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, 38, 1223.
- [72] M. Hagihara, N. J. Anthony, T. J. Stout, J. Clardy, S. L. Schreiber, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, 114, 6568.
- [73] C. Gennari, B. Salom, D. Potenza, A. Williams, *Angew. Chem.* **1994**, 106, 2181; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1994**, 33, 2067; M. Gude, U. Piarulli, D. Potenza, B. Salom, C. Gennari, *Tetrahedron Lett.* **1996**, 37, 8589.
- [74] K. Kirshenbaum, A. E. Barron, R. A. Goldsmith, P. Armand, E. K. Bradley, K. T. V. Truong, K. A. Dill, F. E. Cohen, R. N. Zuckermann, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1998**, 95, 4303; P. Armand, K. Kirshenbaum, R. A. Goldsmith, S. Farr-Jones, A. E. Barron, K. T. V. Truong, K. A. Dill, D. F. Mierke, F. E. Cohen, R. N. Zuckermann, E. K. Bradley, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1998**, 95, 4309.
- [75] C. Y. Cho, E. J. Moran, S. R. Cherry, J. C. Stephans, S. P. A. Fodor, C. L. Adams, A. Sundaram, J. W. Jacobs, P. G. Schultz, *Science* **1993**, 261, 1303.

- [76] R. A. Scott, A. G. Mauk, *Cytochrome c: A Multidisciplinary Approach*, University Science Books, Sausalito, **1996**.
- [77] W. H. Koppenol, E. Margoliash, *J. Biol. Chem.* **1982**, 257, 4426.
- [78] R. K. Jain, A. D. Hamilton, *Org. Lett.* **2000**, 2, 1721.
- [79] T. Aya, A. D. Hamilton, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2003**, 13, 2651.
- [80] A. J. Wilson, K. Groves, R. K. Jain, H. S. Park, A. D. Hamilton, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, 125, 4420; K. Groves, A. J. Wilson, A. D. Hamilton, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, 126, 12833.
- [81] H. Takashima, S. Shinkai, I. Hamachi, *Chem. Commun.* **1999**, 2345.
- [82] N. O. Fischer, C. M. McIntosh, J. M. Simard, V. M. Rotello, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2002**, 99, 5018.
- [83] N. O. Fischer, A. Verma, C. M. Goodman, J. M. Simard, V. M. Rotello, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, 125, 13387.
- [84] R. Hong, N. O. Fischer, A. Verma, C. M. Goodman, T. Emrick, V. M. Rotello, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, 126, 739.
- [85] G. C. Terstappen, A. Reggiani, *Trends Pharmacol. Sci.* **2001**, 22, 23.
- [86] G. D. Demetri, J. D. Griffin, *Blood* **1991**, 78, 2791.
- [87] J. N. Ihle, B. A. Witthuhn, F. W. Quelle, K. Yamamoto, O. Silvennoinen, *Annu. Rev. Immunol.* **1995**, 13, 369.
- [88] K. Shimoda, J. Feng, H. Murakami, S. Nagata, D. Watling, N. C. Rogers, G. R. Stark, I. M. Kerr, J. N. Ihle, *Blood* **1997**, 90, 597; S. S. Tian, P. Tapley, C. Sincich, R. B. Stein, J. Rosen, P. Lamb, *Blood* **1996**, 88, 4435.
- [89] C. Schindler, J. E. Darnell, *Annu. Rev. Biochem.* **1995**, 64, 621.
- [90] S. S. Tian, P. Lamb, A. G. King, S. G. Miller, L. Kessler, J. I. Luengo, L. Averill, R. K. Johnson, J. G. Gleason, L. M. Pelus, S. B. Dillon, J. Rosen, *Science* **1998**, 281, 257.
- [91] B. Zhang, G. Salituro, D. Szalkowski, Z. H. Li, Y. Zhang, I. Royo, D. Vilella, M. T. Diez, F. Pelaez, C. Ruby, R. L. Kendall, X. Z. Mao, P. Griffin, J. Calaycay, J. R. Zierath, J. V. Heck, R. G. Smith, D. E. Moller, *Science* **1999**, 284, 974.
- [92] S. R. Hubbard, *EMBO J.* **1997**, 16, 5572.
- [93] Z. H. Guo, D. M. Zhou, P. G. Schultz, *Science* **2000**, 288, 2042.
- [94] S. F. Dowell, L. J. Anderson, H. E. Gary, D. D. Erdman, J. F. Plouffe, T. M. File, B. J. Marston, R. F. Breiman, *J. Infect. Dis.* **1996**, 174, 456.
- [95] P. L. Collins, G. Mottet, *J. Gen. Virol.* **1991**, 72, 3095.
- [96] W. D. Ding, B. Mitsner, G. Krishnamurthy, A. Aulabaugh, C. D. Hess, J. Zaccardi, M. Cutler, B. Feld, A. Gazumyan, Y. Raifeld, A. Nikitenko, S. A. Lang, Y. Gluzman, B. O'Hara, G. A. Ellestad, *J. Med. Chem.* **1998**, 41, 2671.
- [97] A. A. Nikitenko, Y. E. Raifeld, T. Z. Wang, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2001**, 11, 1041; W. J. Weiss, T. Murphy, M. E. Lynch, J. Frye, A. Buklan, B. Gray, E. Lenoy, S. Mitelman, J. O'Connell, S. Quartuccio, C. Huntley, *J. Med. Primatol.* **2003**, 32, 82; V. Razinkov, C. Huntley, G. Ellestad, G. Krishnamurthy, *Antiviral Res.* **2002**, 55, 189; V. Razinkov, A. Gazumyan, A. Nikitenko, G. Ellestad, G. Krishnamurthy, *Chem. Biol.* **2001**, 8, 645.
- [98] H. Choe, M. Farzan, Y. Sun, N. Sullivan, B. Rollins, P. D. Ponath, L. J. Wu, C. R. Mackay, G. LaRosa, W. Newman, N. Gerard, C. Gerard, J. Sodroski, *Cell* **1996**, 85, 1135.
- [99] S. B. Jiang, Q. Zhao, A. K. Debnath, *Curr. Pharm. Des.* **2002**, 8, 563.
- [100] D. J. Clanton, R. A. Moran, J. B. McMahon, O. S. Weislow, R. W. Buckheit, M. G. Hollingshead, V. Ciminale, B. K. Felber, G. N. Pavlakis, J. P. Bader, *J. Acquired Immune Defic. Syndr.* **1992**, 5, 771.
- [101] P. Mohan, M. F. Wong, S. Verma, P. P. Huang, A. Wickramasinghe, M. Baba, *J. Med. Chem.* **1993**, 36, 4130.
- [102] S. M. Halliday, C. Lackman Smith, J. P. Bader, W. G. Rice, D. J. Clanton, L. H. Zalkow, R. W. Buckheit, *Antiviral Res.* **1996**, 33, 41.
- [103] M. Ono, Y. Wada, Y. M. Wu, R. Nemori, Y. Jinbo, H. Wang, K. M. Lo, N. Yamaguchi, B. Brunkhorst, H. Otomo, J. Wesolowski, J. C. Way, I. Itoh, S. Gillies, L. B. Chen, *Nat. Biotechnol.* **1997**, 15, 343.
- [104] J. L. Zhang, H. Choe, B. J. Dezube, M. Farzan, P. L. Sharma, X. C. Zhou, L. B. Chen, M. Ono, S. Gillies, Y. M. Wu, J. G. Sodroski, C. S. Crumpacker, *Virology* **1998**, 244, 530.
- [105] B. J. Dezube, T. A. Dahl, T. K. Wong, B. Chapman, M. Ono, N. Yamaguchi, S. D. Gillies, L. B. Chen, C. S. Crumpacker, *J. Infect. Dis.* **2000**, 182, 607.
- [106] W. H. Burgess, T. Maciag, *Annu. Rev. Biochem.* **1989**, 58, 575.
- [107] A. E. Eriksson, L. S. Cousens, B. W. Matthews, *Protein Sci.* **1993**, 2, 1274.
- [108] K. Ogura, K. Nagata, H. Hatanaka, H. Habuchi, K. Kimata, S. Tate, M. W. Raver, M. Jaye, J. Schlessinger, F. Inagaki, *J. Biomol. NMR* **1999**, 13, 11.
- [109] A. Baird, D. Schubert, N. Ling, R. Guillemin, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1988**, 85, 2324; X. Zhu, H. Komiya, A. Chirino, S. Faham, G. M. Fox, T. Arakawa, B. T. Hsu, D. C. Rees, *Science* **1991**, 251, 90; B. A. Springer, M. W. Pantoliano, F. A. Barbera, P. L. Gunyuzlu, L. D. Thompson, W. F. Herblin, S. A. Rosenfeld, G. W. Book, *J. Biol. Chem.* **1994**, 269, 26879; L. Y. Li, M. Safran, D. Aviezer, P. Bohlen, A. P. Seddon, A. Yayon, *Biochemistry* **1994**, 33, 10999; L. D. Thompson, M. W. Pantoliano, B. A. Springer, *Biochemistry* **1994**, 33, 3831.
- [110] S. Takano, S. Gately, M. E. Neville, W. F. Herblin, J. L. Gross, H. Engelhard, M. Perricone, K. Eidsvoog, S. Brem, *Cancer Res.* **1994**, 54, 2654.
- [111] A. R. T. Gagliardi, M. Kassack, A. Kreimeyer, G. Muller, P. Nickel, D. C. Collins, *Cancer Chemother. Pharmacol.* **1998**, 41, 117.
- [112] F. Manetti, V. Cappello, M. Botta, F. Corelli, N. Mongelli, G. Biasoli, A. L. Borgia, M. Ciomei, *Bioorg. Med. Chem.* **1998**, 6, 947.
- [113] M. Zama, C. Hariharan, D. Pines, M. Safran, A. Yayon, V. R. Caiola, R. Cohen-Luria, E. Pines, A. H. Parola, *Biophys. J.* **2002**, 82, 2652.
- [114] D. Aviezer, S. Cotton, M. David, A. Segev, N. Khaselev, N. Galili, Z. Gross, A. Yayon, *Cancer Res.* **2000**, 60, 2973.
- [115] B. J. Brandhuber, T. Boone, W. C. Kenney, D. B. McKay, *Science* **1987**, 238, 1707; K. Sauve, M. Nachman, C. Spence, P. Bailon, E. Campbell, W. H. Tsien, J. A. Kondas, J. Hakimi, G. Ju, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1991**, 88, 4636.
- [116] F. Vincenti, M. Lantz, J. Birnbaum, M. Garovoy, D. Mould, J. Hakimi, K. Nieforth, S. Light, *Transplantation* **1997**, 63, 33.
- [117] J. W. Tilley, L. Chen, D. C. Fry, S. D. Emerson, G. D. Powers, D. Biondi, T. Varnell, R. Trilles, R. Guthrie, F. Mennona, G. Kaplan, R. A. LeMahieu, M. Carson, R. J. Han, C. M. Liu, R. Palermo, G. Ju, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, 119, 7589.
- [118] S. D. Emerson, R. Palermo, C. M. Liu, J. W. Tilley, L. Chen, W. Danho, V. S. Madison, D. N. Greeley, G. Ju, D. C. Fry, *Protein Sci.* **2003**, 12, 811.
- [119] A. C. Braisted, J. D. Oslob, W. L. Delano, J. Hyde, R. S. McDowell, N. Waal, C. Yu, M. R. Arkin, B. C. Raimundo, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, 125, 3714.
- [120] D. A. Erlanson, A. C. Braisted, D. R. Raphael, M. Randal, R. M. Stroud, E. M. Gordon, J. A. Wells, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2000**, 97, 9367.
- [121] J. T. Nguyen, J. A. Wells, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2003**, 100, 7533.
- [122] S. B. Krantz, *Blood* **1991**, 77, 419.
- [123] S. A. Qureshi, R. M. Kim, Z. Konteatis, D. E. Biazzo, H. Motamedi, R. Rodrigues, J. A. Boice, J. R. Calaycay, M. A. Bednarek, P. Griffin, Y. D. Gao, K. Chapman, D. F. Mark, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1999**, 96, 12156.
- [124] K. Dunlap, J. I. Luebke, T. J. Turner, *Trends Neurosci.* **1995**, 18, 89; R. Newcomb, A. Palma, *Brain Res.* **1994**, 638, 95.

- [125] D. Walker, D. Bichet, K. P. Campbell, M. De Waard, *J. Biol. Chem.* **1998**, 273, 2361; G. W. Zamponi, E. Bourinet, D. Nelson, J. Nargeot, T. P. Snutch, *Nature* **1997**, 385, 442.
- [126] J. B. Baell, S. A. Forsyth, R. W. Gable, R. S. Norton, R. J. Mulder, *J. Comput.-Aided Mol. Des.* **2001**, 15, 1119.
- [127] B. S. S. Masters, K. McMillan, E. A. Sheta, J. S. Nishimura, L. J. Roman, P. Martasek, *FASEB J.* **1996**, 10, 552; O. W. Griffith, D. J. Stuehr, *Annu. Rev. Physiol.* **1995**, 57, 707.
- [128] H. Y. Li, C. S. Raman, C. B. Glaser, E. Blasko, T. A. Young, J. F. Parkinson, M. Whitlow, T. L. Poulos, *J. Biol. Chem.* **1999**, 274, 21276; T. O. Fischmann, A. Hruza, X. D. Niu, J. D. Fossetta, C. A. Lunn, E. Dolphin, A. J. Prongay, P. Reichert, D. J. Lundell, S. K. Narula, P. C. Weber, *Nat. Struct. Biol.* **1999**, 6, 233; B. R. Crane, A. S. Arvai, D. K. Ghosh, C. Q. Wu, E. D. Getzoff, D. J. Stuehr, J. A. Tainer, *Science* **1998**, 279, 2121.
- [129] K. J. Baek, B. A. Thiel, S. Lucas, D. J. Stuehr, *J. Biol. Chem.* **1993**, 268, 21120; P. Klatt, S. Pfeiffer, B. M. List, D. Lehner, O. Glatter, H. P. Bachinger, E. R. Werner, K. Schmidt, B. Mayer, *J. Biol. Chem.* **1996**, 271, 7336; I. Rodriguez Crespo, N. C. Gerber, P. R. O. de Montellano, *J. Biol. Chem.* **1996**, 271, 11462.
- [130] K. McMillan, M. Adler, D. S. Auld, J. J. Baldwin, E. Blasko, L. J. Browne, D. Chelsky, D. Davey, R. E. Dolle, K. A. Eagen, S. Erickson, R. I. Feldman, C. B. Glaser, C. Mallari, M. M. Morrissey, M. H. J. Ohlmeyer, C. H. Pan, J. F. Parkinson, G. B. Phillips, M. A. Polokoff, N. H. Sigal, R. Vergona, M. Whitlow, T. A. Young, J. J. Devlin, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2000**, 97, 1506; E. Blasko, C. B. Glaser, J. J. Devlin, W. Xia, R. I. Feldman, M. A. Polokoff, G. B. Phillips, M. Whitlow, D. S. Auld, K. McMillan, S. Ghosh, D. J. Stuehr, J. F. Parkinson, *J. Biol. Chem.* **2002**, 277, 295.
- [131] P. H. Carter, P. A. Scherle, J. A. Muckelbauer, M. E. Voss, R. Q. Liu, L. A. Thompson, A. J. Tebben, K. A. Solomon, Y. C. Lo, Z. Li, P. Strzemienski, G. J. Yang, N. Falahatpisheh, M. Xu, Z. R. Wu, N. A. Farrow, K. Ramnarayan, J. Wang, D. Rideout, V. Yalamoori, P. Domaille, D. J. Underwood, J. M. Trzaskos, S. M. Friedman, R. C. Newton, C. P. Decicco, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2001**, 98, 11879.
- [132] G. Kollias, E. Douni, G. Kassiotis, D. Kontoyiannis, *Immunol. Rev.* **1999**, 169, 175.
- [133] F. G. Giancotti, E. Ruoslahti, *Science* **1999**, 285, 1028.
- [134] R. Vazeux, P. A. Hoffman, J. K. Tomita, E. S. Dickinson, R. L. Jasman, T. St. John, W. M. Gallatin, *Nature* **1992**, 360, 485; T. A. Springer, *Nature* **1990**, 346, 425; C. G. Gahmberg, *Curr. Opin. Cell Biol.* **1997**, 9, 643.
- [135] C. C. Huang, T. A. Springer, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1997**, 94, 3162.
- [136] M. Hollstein, K. Rice, M. S. Greenblatt, T. Soussi, R. Fuchs, T. Sorlie, E. Hovig, B. Smith-Sorensen, R. Montesano, C. C. Harris, *Nucleic Acids Res.* **1994**, 22, 3551.
- [137] W. G. Wang, R. Takimoto, F. Rastinejad, W. S. El-Deiry, *Mol. Cell. Biol.* **2003**, 23, 2171; R. Takimoto, W. G. Wang, D. T. Dicker, F. Rastinejad, J. Lyssikatos, W. S. El-Deiry, *Cancer Biol. Ther.* **2002**, 1, 47; B. A. Foster, H. A. Coffey, M. J. Morin, F. Rastinejad, *Science* **1999**, 286, 2507.
- [138] Y. Haupt, R. Maya, A. Kazaz, M. Oren, *Nature* **1997**, 387, 296; R. Honda, H. Tanaka, H. Yasuda, *FEBS Lett.* **1997**, 420, 25; M. H. G. Kubbutat, S. N. Jones, K. H. Vousden, *Nature* **1997**, 387, 299.
- [139] J. D. Chen, X. W. Wu, J. Y. Lin, A. J. Levine, *Mol. Cell. Biol.* **1996**, 16, 2445.
- [140] J. D. Oliner, J. A. Pietenpol, S. Thiagalingam, J. Gvuris, K. W. Kinzler, B. Vogelstein, *Nature* **1993**, 362, 857; C. Cordoncardo, E. Latres, M. Drobnjak, M. R. Oliva, D. Pollack, J. M. Woodruff, V. Marechal, J. D. Chen, M. F. Brennan, A. J. Levine, *Cancer Res.* **1994**, 54, 794.
- [141] L. H. Chen, S. Agrawal, W. Q. Zhou, R. W. Zhang, J. D. Chen, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1998**, 95, 195; L. H. Chen, W. G. Lu, S. H. Agrawal, W. Q. Zhou, R. W. Zhang, J. D. Chen, *Mol. Med.* **1999**, 5, 21.
- [142] J. P. Blaydes, V. Gire, J. M. Rowson, D. Wynford Thomas, *Oncogene* **1997**, 14, 1859.
- [143] C. García-Echeverría, P. Chene, M. J. J. Blommers, P. Furet, *J. Med. Chem.* **2000**, 43, 3205.
- [144] R. Fasan, R. L. A. Dias, K. Moehle, O. Zerbe, J. W. Vrijbloed, D. Obrecht, J. A. Robinson, *Angew. Chem.* **2004**, 116, 2161; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, 43, 2109.
- [145] L. T. Vassilev, B. T. Vu, B. Graves, D. Carvajal, F. Podlaski, Z. Filipovic, N. Kong, U. Kammlott, C. Lukacs, C. Klein, N. Fotouhi, E. A. Liu, *Science* **2004**, 303, 844.
- [146] C. García-Echeverría, P. Chene, M. J. J. Blommers, P. Furet, *J. Med. Chem.* **2000**, 43, 3205.
- [147] H. Yin, G. I. Lee, H. S. Park, G. A. Payne, J. M. Rodriguez, S. M. Sebt, A. D. Hamilton, *Angew. Chem.* **2005**, 117, 2764; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, 44, 2704.
- [148] N. Issaeva, P. Bozko, M. Enge, M. Protopopova, L. G. G. C. Verhoef, M. Masucci, A. Pramanik, G. Selivanova, *Nat. Med.* **2004**, 10, 1321.
- [149] D. R. Lowy, B. M. Willumsen, *Annu. Rev. Biochem.* **1993**, 62, 851; D. Bar-Sagi, *Mol. Cell. Biol.* **2001**, 21, 1441.
- [150] J. M. Shields, K. Pruitt, A. McFall, A. Shaub, C. J. Der, *Trends Cell Biol.* **2000**, 10, 147.
- [151] O. Müller, E. Gourzoulidou, M. Carpintero, I. M. Karaguni, A. Langerak, C. Herrmann, T. Möry, L. Klein-Hitpaß, H. Waldmann, *Angew. Chem.* **2004**, 116, 456; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, 43, 450; H. Waldmann, I. M. Karaguni, M. Carpintero, E. Gourzoulidou, C. Herrmann, C. Brockmann, H. Oschkinat, O. Müller, *Angew. Chem.* **2004**, 116, 460; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, 43, 454.
- [152] I. M. Karaguni, P. Herter, P. Debruyne, S. Chtarbova, A. Kasprzynski, U. Herbrand, M. R. Ahmadian, K. H. Glusenkamp, G. Winde, M. Mareel, T. Moroy, O. Müller, *Cancer Res.* **2002**, 62, 1718; C. Herrmann, C. Block, C. Geisen, K. Haas, C. Weber, G. Winde, T. Möry, O. Müller, *Oncogene* **1998**, 17, 1769.
- [153] J. Kato-Stankiewicz, I. Hakimi, G. Zhi, J. Zhang, I. Serebriiskii, L. Guo, H. Edamatsu, H. Koide, S. Menon, R. Eckl, S. Sakamuri, Y. C. Lu, Q. Z. Chen, S. Agarwal, W. R. Baumbach, E. A. Golemis, F. Tamanoi, V. Khazak, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2002**, 99, 14398.
- [154] I. Serebriiskii, V. Khazak, E. A. Golemis, *J. Biol. Chem.* **1999**, 274, 17080; I. G. Serebriiskii, O. V. Mitina, J. Chernoff, E. A. Golemis, *Regul. Eff. Small Gtpases F* **2001**, 332, 277.
- [155] C. S. Hill, R. Marais, S. John, J. Wynne, S. Dalton, R. Treisman, *Cell* **1993**, 73, 395.
- [156] S. Soga, T. Kozawa, H. Narumi, S. Akinaga, K. Irie, K. Matsumoto, S. V. Sharma, H. Nakano, T. Mizukami, M. Hara, *J. Biol. Chem.* **1998**, 273, 822.
- [157] O. Niederhauser, M. Mangold, R. Schubel, E. A. Kuszniir, D. Schmidt, C. Hertel, *J. Neurosci. Res.* **2000**, 61, 263.
- [158] M. Barbacid, *J. Neurobiol.* **1994**, 25, 1386.
- [159] P. Kahle, P. A. Barker, E. M. Shooter, C. Hertel, *J. Neurosci. Res.* **1994**, 38, 599.
- [160] J. M. Frade, A. Rodriguez Tebar, Y. A. Barde, *Nature* **1996**, 383, 166.
- [161] D. V. Erbe, S. Wang, Y. Z. Xing, J. F. Tobin, *J. Biol. Chem.* **2002**, 277, 7363.
- [162] E. A. Greenfield, K. A. Nguyen, V. K. Kuchroo, *Crit. Rev. Immunol.* **1998**, 18, 389; D. J. Lenschow, T. L. Walunas, J. A. Bluestone, *Annu. Rev. Immunol.* **1996**, 14, 233.
- [163] F. A. Harding, J. G. McArthur, J. A. Gross, D. H. Raulet, J. P. Allison, *Nature* **1992**, 356, 607; T. L. Walunas, D. J. Lenschow, C. Y. Bakker, P. S. Linsley, G. J. Freeman, J. M. Green, C. B. Thompson, J. A. Bluestone, *Immunity* **1994**, 1, 405; P. Waterhouse, J. M. Penninger, E. Timms, A. Wakeham, A. Shahinian,

- K. P. Lee, C. B. Thompson, H. Griesser, T. W. Mak, *Science* **1995**, 270, 985.
- [164] C. C. Stamper, Y. Zhang, J. F. Tobin, D. V. Erbe, S. Ikemizu, S. J. Davis, M. L. Stahl, J. Seehra, W. S. Somers, L. Mosyak, *Nature* **2001**, 410, 608.
- [165] N. J. Green, J. Xiang, J. Chen, L. R. Chen, A. M. Davies, D. Erbe, S. Tam, J. F. Tobin, *Bioorg. Med. Chem.* **2003**, 11, 2991.
- [166] S. B. Jiang, A. K. Debnath, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2000**, 270, 153; M. Ferrer, T. M. Kapoor, T. Strassmaier, W. Weissenhorn, J. J. Skehel, D. Orian, S. L. Schreiber, D. C. Wiley, S. C. Harrison, *Nat. Struct. Biol.* **1999**, 6, 953.
- [167] J. T. Ernst, O. Kutzki, A. K. Debnath, S. Jiang, H. Lu, A. D. Hamilton, *Angew. Chem.* **2001**, 113, 288; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, 40, 278.
- [168] C. Cianci, D. R. Langley, D. D. Dischino, Y. Sun, K.-L. Yu, A. Stanley, J. Roach, Z. Li, R. Dalterio, R. Colonno, N. A. Meanwell, M. Krystal, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2004**, 101, 15046.
- [169] D. Gorse, R. Lahana, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2000**, 4, 287.
- [170] J. H. Van Drie, M. S. Lajiness, *Drug Discovery Today* **1998**, 3, 274.
- [171] E. K. Kick, D. C. Roe, A. G. Skillman, G. C. Liu, T. J. A. Ewing, Y. X. Sun, I. D. Kuntz, J. A. Ellman, *Chem. Biol.* **1997**, 4, 297.
- [172] C. S. Ring, E. Sun, J. H. McKerrow, G. K. Lee, P. J. Rosenthal, I. D. Kuntz, F. E. Cohen, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1993**, 90, 3583; I. D. Kuntz, *Science* **1992**, 257, 1078.
- [173] S. Li, J. M. Gao, T. Satoh, T. M. Friedman, A. E. Edling, U. Koch, S. Choksi, X. B. Han, R. Korngold, Z. W. Huang, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1997**, 94, 73.
- [174] Z. W. Huang, S. N. Li, R. Korngold, *Biopolymers* **1997**, 43, 367.
- [175] J. C. Reed, *Nature* **1997**, 387, 773; J. M. Adams, S. Cory, *Science* **1998**, 281, 1322.
- [176] E. R. Fearon, B. Vogelstein, *Cell* **1990**, 61, 759; T. G. Graeber, C. Osmanian, T. Jacks, D. E. Housman, C. J. Koch, S. W. Lowe, A. J. Giaccia, *Nature* **1996**, 379, 88.
- [177] A. Strasser, D. C. S. Huang, D. L. Vaux, *Biochim. Biophys. Acta* **1997**, 1333, F151.
- [178] J. M. Adams, S. Cory, *Trends Biochem. Sci.* **2001**, 26, 61.
- [179] J. B. Baell, D. C. S. Huang, *Biochem. Pharmacol.* **2002**, 64, 851.
- [180] J. L. Wang, D. X. Liu, Z. J. Zhang, S. M. Shan, X. B. Han, S. M. Srinivasula, C. M. Croce, E. S. Alnemri, Z. W. Huang, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2000**, 97, 7124.
- [181] I. J. Enyedy, Y. Ling, K. Nacro, Y. Tomita, X. H. Wu, Y. Y. Cao, R. B. Guo, B. H. Li, X. F. Zhu, Y. Huang, Y. Q. Long, P. P. Roller, D. J. Yang, S. M. Wang, *J. Med. Chem.* **2001**, 44, 4313.
- [182] A. A. Lugovskoy, A. I. Degterev, A. F. Fahmy, P. Zhou, J. D. Gross, J. Y. Yuan, G. Wagner, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, 124, 1234.
- [183] A. Degterev, A. Lugovskoy, M. Cardone, B. Mulley, G. Wagner, T. Mitchison, J. Y. Yuan, *Nat. Cell Biol.* **2001**, 3, 173.
- [184] S. P. Tzung, K. M. Kim, G. Basanez, C. D. Giedt, J. Simon, J. Zimmerberg, K. Y. J. Zhang, D. M. Hockenbery, *Nat. Cell Biol.* **2001**, 3, 183.
- [185] Z. W. Huang, S. Li, R. Korngold, *Med. Chem. Res.* **1997**, 7, 137; A. F. Williams, A. N. Barclay, *Annu. Rev. Immunol.* **1988**, 6, 381; L. M. Amzel, R. J. Poljak, *Annu. Rev. Biochem.* **1979**, 48, 961.
- [186] M. C. Miceli, J. R. Parnes, *Adv. Immunol.* **1993**, 53, 59.
- [187] R. König, L. Y. Huang, R. N. Germain, *Nature* **1992**, 356, 796.
- [188] A. K. Debnath, L. Radigan, S. B. Jiang, *J. Med. Chem.* **1999**, 42, 3203.
- [189] H. F. Gunthard, J. K. Wong, C. C. Ignacio, J. C. Guatelli, N. L. Riggs, D. V. Havlir, D. D. Richman, *J. Virol.* **1998**, 72, 2422; J. K. Wong, H. F. Gunthard, D. V. Havlir, Z. Q. Zhang, A. T. Haase, C. C. Ignacio, S. Kwok, E. Emini, D. D. Richman, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1997**, 94, 12574; C. C. J. Carpenter, M. A. Fischl, S. M. Hammer, M. S. Hirsch, D. M. Jacobsen, D. A. Katzenstein, J. S. G. Montaner, D. D. Richman, M. S. Saag, R. T. Schooley, M. A. Thompson, S. Vella, P. G. Yeni, P. A. Volberding, *JAMA-J. Med. Assoc.* **1998**, 280, 78.
- [190] D. A. Gschwend, W. Sirawaraporn, D. V. Santi, I. D. Kuntz, *Proteins Struct. Funct. Genet.* **1997**, 29, 59; C. S. Ring, E. Sun, J. H. McKerrow, G. K. Lee, P. J. Rosenthal, I. D. Kuntz, F. E. Cohen, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1993**, 90, 3583.
- [191] P. J. Hajduk, M. Bures, J. Praestgaard, S. W. Fesik, *J. Med. Chem.* **2000**, 43, 3443.
- [192] H. U. Saragovi, D. Fitzpatrick, A. Raktabut, H. Nakanishi, M. Kahn, M. I. Greene, *Science* **1991**, 253, 792.
- [193] W. V. Williams, T. Kieberemmons, J. Vonfeldt, M. I. Greene, D. B. Weiner, *J. Biol. Chem.* **1991**, 266, 5182.
- [194] V. Böhmer, *Angew. Chem.* **1995**, 107, 785; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1995**, 34, 713.
- [195] S. M. Sebt, A. D. Hamilton, *Oncogene* **2000**, 19, 6566.
- [196] C. H. Heldin, A. Ostman, L. Ronnstrand, *Biochim. Biophys. Acta* **1998**, 1378, F79.
- [197] A. Kazlauskas, J. A. Cooper, *Cell* **1989**, 58, 1121; E. J. Lowenstein, R. J. Daly, A. G. Batzer, W. Li, B. Margolis, R. Lammers, A. Ullrich, E. Y. Skolnik, D. Barsagi, J. Schlessinger, *Cell* **1992**, 70, 431.
- [198] K. Forsberg, I. Valyinyag, C. H. Heldin, M. Herlyn, B. Westermark, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1993**, 90, 393; E. J. Battegay, J. Rupp, L. Iruelaarispe, E. H. Sage, M. Pech, *J. Cell Biol.* **1994**, 125, 917; R. Kumar, J. Yoneda, C. D. Bucana, I. J. Fidler, *Int. J. Oncol.* **1998**, 12, 749; R. Thommen, R. Humar, G. Misevic, M. S. Pepper, A. W. A. Hahn, M. John, E. J. Battegay, *J. Cell. Biochem.* **1997**, 64, 403.
- [199] M. A. Blaskovich, Q. Lin, F. L. Delarue, J. Sun, H. S. Park, D. Coppola, A. D. Hamilton, S. M. Sebt, *Nat. Biotechnol.* **2000**, 18, 1065.
- [200] Y. Wei, G. L. McLendon, A. D. Hamilton, M. A. Case, C. B. Purring, Q. Lin, H. S. Park, C. S. Lee, T. N. Yu, *Chem. Commun.* **2001**, 1580.
- [201] C. Purring, H. Zou, X. D. Wang, G. McLendon, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, 121, 7435; P. Li, D. Nijhawan, I. Budihardjo, S. M. Srinivasula, M. Ahmad, E. S. Alnemri, X. D. Wang, *Cell* **1997**, 91, 479; H. Zou, W. J. Henzel, X. S. Liu, A. Lutschg, X. D. Wang, *Cell* **1997**, 90, 405.
- [202] D. K. Leung, Z. W. Yang, R. Breslow, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2000**, 97, 5050.
- [203] R. Breslow, Z. W. Yang, R. Ching, G. Trojandt, F. Odobel, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, 120, 3536; M. Maletic, H. Wennemers, D. Q. McDonald, R. Breslow, W. C. Still, *Angew. Chem.* **1996**, 108, 1594; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1996**, 35, 1490.
- [204] Y. Hamuro, S. J. Geib, A. D. Hamilton, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, 118, 7529; J. S. Nowick, S. Mahrus, E. M. Smith, J. W. Ziller, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, 118, 1066; R. S. Lokey, B. L. Iverson, *Nature* **1995**, 375, 303; T. J. Murray, S. C. Zimmerman, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, 114, 4010.
- [205] D. Horwell, M. Pritchard, J. Raphy, G. Ratcliffe, *Immunopharmacology* **1996**, 33, 68; D. C. Horwell, W. Howson, G. S. Ratcliffe, H. M. G. Willems, *Bioorg. Med. Chem.* **1996**, 4, 33.
- [206] O. Kutzki, H. S. Park, J. T. Ernst, B. P. Orner, H. Yin, A. D. Hamilton, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, 124, 11838.
- [207] M. Sattler, H. Liang, D. Nettesheim, R. P. Meadows, J. E. Harlan, M. Eberstadt, H. S. Yoon, S. B. Shuker, B. S. Chang, A. J. Minn, C. B. Thompson, S. W. Fesik, *Science* **1997**, 275, 983.
- [208] J. T. Ernst, J. Becerril, H. S. Park, H. Yin, A. D. Hamilton, *Angew. Chem.* **2003**, 115, 553; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, 42, 535.
- [209] H. Yin, A. D. Hamilton, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2004**, 14, 1375; H. Yin, G. I. Lee, K. A. Sedey, J. M. Rodriguez, H. G. Wang, S. M. Sebt, A. D. Hamilton, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, 127, 5463.

- [210] R. Hirschmann, K. C. Nicolaou, S. Pietranico, J. Salvino, E. M. Leahy, P. A. Sprengeler, G. Furst, A. B. Smith, C. D. Strader, M. A. Cascieri, M. R. Candelore, C. Donaldson, W. Vale, L. Maechler, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 9217.
- [211] R. Hirschmann, K. C. Nicolaou, S. Pietranico, E. M. Leahy, J. Salvino, B. Arison, M. A. Cichy, P. G. Spoors, W. C. Shakespeare, P. A. Sprengeler, P. Hamley, A. B. Smith, T. Reisine, K. Raynor, L. Maechler, C. Donaldson, W. Vale, R. M. Freidinger, M. R. Cascieri, C. D. Strader, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 12550; J. Liu, D. J. Underwood, M. A. Cascieri, S. P. Rohrer, L. D. Cantin, G. Chicchi, A. B. Smith, R. Hirschmann, *J. Med. Chem.* **2000**, *43*, 3827.
- [212] R. Hirschmann, J. Hynes, M. A. Cichy-Knight, R. D. van Rijn, P. A. Sprengeler, P. G. Spoors, W. C. Shakespeare, S. Pietranico-Cole, J. Barbosa, J. Liu, W. Q. Yao, S. Rohrer, A. B. Smith, *J. Med. Chem.* **1998**, *41*, 1382.
- [213] A. B. Smith, R. Hirschmann, A. Pasternak, R. Akaishi, M. C. Guzman, D. R. Jones, T. P. Keenan, P. A. Sprengeler, P. L. Darke, E. A. Emini, M. K. Holloway, W. A. Schleif, *J. Med. Chem.* **1994**, *37*, 215.
- [214] A. B. Smith, R. Hirschmann, A. Pasternak, W. Q. Yao, P. A. Sprengeler, M. K. Holloway, L. C. Kuo, Z. G. Chen, P. L. Darke, W. A. Schleif, *J. Med. Chem.* **1997**, *40*, 2440; P. V. Murphy, J. L. O'Brien, L. J. Gorey-Feret, A. B. Smith, *Tetrahedron* **2003**, *59*, 2259; P. V. Murphy, J. L. O'Brien, L. J. Gorey-Feret, A. B. Smith, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2002**, *12*, 1763.
- [215] A. B. Smith, L. D. Cantin, A. Pasternak, L. Guise-Zawacki, W. Q. Yao, A. K. Charnley, J. Barbosa, P. A. Sprengeler, R. Hirschmann, S. Munshi, D. B. Olsen, W. A. Schleif, L. C. Kuo, *J. Med. Chem.* **2003**, *46*, 1831.
- [216] A. B. Smith, T. Nittoli, P. A. Sprengeler, J. J. W. Duan, R. Q. Liu, R. F. Hirschmann, *Org. Lett.* **2000**, *2*, 3809.
- [217] A. B. Smith, A. B. Benowitz, P. A. Sprengeler, J. Barbosa, M. C. Guzman, R. Hirschmann, E. J. Schweiger, D. R. Bolin, Z. Nagy, R. M. Campbell, D. C. Cox, G. L. Olson, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 9286.
- [218] A. B. Smith, Y. S. Cho, G. R. Pettit, R. Hirschmann, *Tetrahedron* **2003**, *59*, 6991.
- [219] A. B. Smith, W. Y. Wang, P. A. Sprengeler, R. Hirschmann, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 11037; A. B. Smith, H. Liu, R. Hirschmann, *Org. Lett.* **2000**, *2*, 2037; A. B. Smith, T. P. Keenan, R. C. Holcomb, P. A. Sprengeler, M. C. Guzman, J. L. Wood, P. J. Carroll, R. Hirschmann, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 10672; A. B. Smith, M. C. Guzman, P. A. Sprengeler, T. P. Keenan, R. C. Holcomb, J. L. Wood, P. J. Carroll, R. Hirschmann, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 9947.
- [220] T. Bartfai, M. M. Behrens, S. Gaidarova, J. Pemberton, A. Shivanyuk, J. Rebek, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2003**, *100*, 7971.
- [221] N. J. Gay, F. J. Keith, *Nature* **1991**, *351*, 355; D. S. Schneider, K. L. Hudson, T. Y. Lin, K. V. Anderson, *Genes Dev.* **1991**, *5*, 797.
- [222] J. A. Hoffmann, F. C. Kafatos, C. A. Janeway, R. A. B. Ezekowitz, *Science* **1999**, *284*, 1313; E. B. Kopp, R. Medzhitov, *Curr. Opin. Immunol.* **1999**, *11*, 13; K. V. Anderson, *Curr. Opin. Immunol.* **2000**, *12*, 13.
- [223] D. M. Underhill, A. Ozinsky, A. M. Hajjar, A. Stevens, C. B. Wilson, M. Bassetti, A. Aderem, *Nature* **1999**, *401*, 811; M. Muzio, J. Ni, P. Feng, V. M. Dixit, *Science* **1997**, *278*, 1612; H. Wesche, W. J. Henzel, W. Shillinglaw, S. Li, Z. D. Cao, *Immunity* **1997**, *7*, 837; K. Burns, F. Martinon, C. Esslinger, H. Pahl, P. Schneider, J. L. Bodmer, F. Di Marco, L. French, J. Tschopp, *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 12203.
- [224] R. Medzhitov, P. Preston-Hurlburt, E. Kopp, A. Stadlen, C. Q. Chen, S. Ghosh, C. A. Janeway, *Mol. Cell* **1998**, *2*, 253.
- [225] K. A. Lord, B. Hoffman-Liebermann, D. A. Liebermann, *Oncogene* **1990**, *5*, 1095.
- [226] Y. W. Xu, X. Tao, B. H. Shen, T. Horng, R. Medzhitov, J. L. Manley, L. Tong, *Nature* **2000**, *408*, 111.
- [227] M. L. West, D. P. Fairlie, *Trends Pharmacol. Sci.* **1995**, *16*, 67; D. Leung, G. Abbenante, D. P. Fairlie, *J. Med. Chem.* **2000**, *43*, 305.
- [228] W. A. Loughlin, J. D. Tyndall, M. P. Glenn, D. P. Fairlie, *Chem. Rev.* **2004**, *104*, 6085.
- [229] J. W. Corbett, N. R. Graciani, S. A. Mousa, W. F. DeGrado, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1997**, *7*, 1371.
- [230] K. C. Nicolaou, J. I. Trujillo, K. Chibale, *Tetrahedron* **1997**, *53*, 8751.
- [231] R. W. McMurray, *Semin. Arthritis Rheum.* **1996**, *26*, 215; N. Oppenheimer Marks, P. E. Lipsky, *Clin. Immunol. Immunopathol.* **1996**, *79*, 203.
- [232] J. M. Casasnovas, T. Stehle, J. H. Liu, J. H. Wang, T. A. Springer, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1998**, *95*, 4134.
- [233] T. R. Gadek, D. J. Burdick, R. S. McDowell, M. S. Stanley, J. C. Marsters, K. J. Paris, D. A. Oare, M. E. Reynolds, C. Ladner, K. A. Zioncheck, W. P. Lee, P. Gribbling, M. S. Dennis, N. J. Skelton, D. B. Tumas, K. R. Clark, S. M. Keating, M. H. Beresini, J. W. Tilley, L. G. Presta, S. C. Bodary, *Science* **2002**, *295*, 1086.
- [234] J. Takagi, T. A. Springer, *Immunol. Rev.* **2002**, *186*, 141.
- [235] K. Welzenbach, U. Hommel, G. Weitz-Schmidt, *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 10590.
- [236] Z. Liu, A. Mukherjee, J. Lutkenhaus, *Mol. Microbiol.* **1999**, *31*, 1853; C. A. Hale, P. A. J. de Boer, *J. Bacteriol.* **1999**, *181*, 167; C. A. Hale, P. A. J. de Boer, *Cell* **1997**, *88*, 175.
- [237] L. Mosyak, Y. Zhang, E. Glasfeld, S. Haney, M. Stahl, J. Seehra, W. S. Somers, *EMBO J.* **2000**, *19*, 3179; F. J. Moy, E. Glasfeld, L. Mosyak, R. Powers, *Biochemistry* **2000**, *39*, 9146; F. J. Moy, E. Glasfeld, R. Powers, *J. Biomol. NMR* **2000**, *17*, 275.
- [238] A. G. Sutherland, J. Alvarez, W. D. Ding, K. W. Foreman, C. H. Kenny, P. Labthavikul, L. Mosyak, P. J. Petersen, T. S. Rush, A. Ruzin, D. H. H. Tsao, K. L. Wheless, *Org. Biomol. Chem.* **2003**, *1*, 4138.
- [239] C. H. Kenny, W. D. Ding, K. Kelleher, S. Benard, E. G. Dushin, A. G. Sutherland, L. Mosyak, R. Kriz, G. Ellestad, *Anal. Biochem.* **2003**, *323*, 224.
- [240] K. B. Lee, S. J. Park, C. A. Mirkin, J. C. Smith, M. Mrksich, *Science* **2002**, *295*, 1702; C. A. Lepre, J. M. Moore, J. W. Peng, *Chem. Rev.* **2004**, *104*, 3641.
- [241] A. R. Horswill, S. N. Savinov, S. J. Benkovic, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2004**, *101*, 15591.
- [242] N. N. Danial, C. F. Gramm, L. Scorrano, C. Y. Zhang, S. Krauss, A. M. Ranger, S. R. Datta, M. E. Greenberg, L. J. Licklider, B. B. Lowell, S. P. Gygi, S. J. Korsmeyer, *Nature* **2003**, *424*, 952.
- [243] A. P. Li, *Drug Discovery Today* **2001**, *6*, 357.
- [244] C. A. Lipinski, F. Lombardo, B. W. Dominy, P. J. Feeney, *Adv. Drug Delivery Rev.* **1997**, *23*, 3.
- [245] J. Kallen, K. Welzenbach, P. Ramage, D. Geyl, R. Kriwacki, G. Legge, S. Cottens, G. Weitz-Schmidt, U. Hommel, *J. Mol. Biol.* **1999**, *292*, 1.
- [246] K. Last-Barney, W. Davidson, M. Cardozo, L. L. Frye, C. A. Grygon, J. L. Hopkins, D. D. Jeanfavre, S. Pav, C. G. Qian, J. M. Stevenson, L. Tong, R. Zindell, T. A. Kelly, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 5643; T. A. Kelly, D. D. Jeanfavre, D. W. McNeil, J. R. Woska, P. L. Reilly, E. A. Mainolfi, K. M. Kishimoto, G. H. Nabozny, R. Zinter, B. J. Bormann, R. Rothlein, *J. Immunol.* **1999**, *163*, 5173.
- [247] Z. H. Pei, Z. L. Xin, G. Liu, Y. H. Li, E. B. Reilly, N. L. Lubbers, J. R. Huth, J. T. Link, T. W. von Geldern, B. F. Cox, S. Leitza, Y. Gao, K. C. Marsh, P. DeVries, G. F. Okasinski, *J. Med. Chem.* **2001**, *44*, 2913; G. Liu, J. R. Huth, E. T. Olejniczak, R. Mendoza, P. DeVries, S. Leitza, E. B. Reilly, G. F. Okasinski, S. W. Fesik, T. W. von Geldern, *J. Med. Chem.* **2001**, *44*, 1202; G. Liu, J. T. Link, Z. H. Pei, E. B. Reilly, S. Leitza, B. Nguyen, K. C. Marsh, G. F. Okasinski, T. W. von Geldern, M. Ormes, K.

- Fowler, M. Gallatin, *J. Med. Chem.* **2000**, *43*, 4025; M. Winn, E. B. Reilly, G. Liu, J. R. Huth, H. S. Jae, J. Freeman, Z. H. Pei, Z. L. Xin, J. Lynch, J. Kester, T. W. von Geldern, S. Leitza, P. DeVries, R. Dickinson, D. Mussatto, G. F. Okasinski, *J. Med. Chem.* **2001**, *44*, 4393.
- [248] P. C. Brooks, S. Stromblad, L. C. Sanders, T. L. von Schalscha, R. T. Aimes, W. G. Stetler Stevenson, J. P. Quigley, D. A. Cheresh, *Cell* **1996**, *85*, 683.
- [249] R. Dallafavera, M. Bregni, J. Erikson, D. Patterson, R. C. Gallo, C. M. Croce, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1982**, *79*, 7824; A. Gerbitz, J. Mautner, C. Geltinger, K. Hörtnagel, B. Christoph, H. Asenbauer, G. Klobeck, A. Polack, G. W. Bornkamm, *Oncogene* **1999**, *18*, 1745.

Quality counts...

The best of chemistry every week



Wiley-VCH

P.O. Box 10 11 61
69451 Weinheim
Germany
Phone +49 (0) 6201-606-400
Fax +49 (0) 6201-606-184
e-mail: angewandte@wiley-vch.de

www.angewandte.org

Angewandte Chemie International
Edition is a journal of the GDCh,
the German Chemical Society

GDCh



WILEY-VCH