

Die Synthese von naturstoffinspirierten Verbindungsbibliotheken

Kamal Kumar* und Herbert Waldmann*

Asymmetrische Synthesen · Festphasensynthese ·
Medizinische Chemie · Naturstoffe

Naturstoffe und ihre Derivate und Analoga gehören zu den wichtigsten Quellen neuer Wirkstoffkandidaten und Reagentien für die chemische Biologie und medizinische Chemie. Hieraus leitet sich ein großer Bedarf an effizienten Synthesemethoden ab, die einen Zugang zu naturstoffabgeleiteten oder -inspirierten Verbindungsbibliotheken ermöglichen. Um solche Verfahren entwickeln und anwenden zu können, ist es erforderlich, die vielstufigen stereoselektiven Synthesemethoden, wie sie für Naturstoffsynthesen charakteristisch sind, auf die Verfahrensweisen beim Aufbau von Verbindungsbibliotheken zu übertragen und entsprechend anzupassen. Neue Entwicklungen bei der Synthese naturstoffinspirierter Bibliotheken aus carbocyclischen und heterocyclischen Gerüststrukturen zeigen klar auf, dass dieses Ziel erreicht werden kann. Die bereits erzielten Fortschritte haben den Weg für die Einbeziehung naturstoffinspirierter Verbindungsbibliotheken in die medizinische Chemie und die biochemische Forschung geebnet.

1. Einleitung

Bioaktive Sekundärmetabolite (Naturstoffe) haben sich im Verlauf der medizinischen Chemie als reichhaltige Quelle therapeutisch wirksamer Substanzen erwiesen,^[1] und sie dienen darüber hinaus als wichtige Reagentien zur Untersuchung biologischer Phänomene. Ein anschauliches Beispiel für dieses Wechselspiel zwischen Naturstoffchemie und organischer Chemie, Biologie und medizinischer Chemie bieten die tubulinbindenden Naturstoffe Colchicin und die Vinkaalkaloide, die zum einen zur Untersuchung des Cytoskeletts und dessen dynamischem Verhalten verwendet wurden, und zum anderen zu einem neuen Prinzip der Tumorbehandlung führten, das bis heute als Grundlage für die Entwicklung von Medikamenten dient. Die ausgeprägte biologische Aktivität von Naturstoffen wurde damit erklärt, dass sie während der

Biosynthese und der Ausübung ihrer biologischen Wirkung mit zahlreichen Proteinen als Substraten und Targets wechselwirken.^[2]

In Anbetracht dessen, dass die Zahl der Struktur motive von Proteinen und Naturstoffen begrenzt ist (eine Klassifizierung der Naturstoff-

strukturen findet sich in Lit. [2a]), kann man die für Naturstoffe charakteristischen Molekülgerüste als „privilegiert“ bezeichnen und Verbindungsklassen, die von Naturstoffen abgeleitet oder inspiriert sind, als *biologisch relevant und vorbewertet* betrachten.^[3] Diese Einschätzung, zusammen mit Eigenschaften wie der strukturellen Komplexität und der generellen Wirkstoffähnlichkeit, macht solche Verbindungsklassen zu idealen Ausgangspunkten für medizinisch-chemische und biochemische Studien. Um aber den modernen Anforderungen von Hochdurchsatzstrategien zu genügen und mit der ständig steigenden Zahl verschiedenster Arten biologischer Targets Schritt halten zu können, müssen solche Verbindungen in Form von Sammlungen oder Bibliotheken individuell gut charakterisierter reiner Substanzen verfügbar sein. Es gibt daher einen großen Bedarf an der Entwicklung von Syntheseverfahren, die die Leistungsfähigkeit moderner organischer Synthesen mit kombinatorischen Methoden und Techniken der Parallelsynthese verbinden. Hier stellt sich nun die Frage, ob stereoselektive vielstufige Synthesen (mit oft mehr als zehn Reaktionsschritten) generell auf die Synthese von Verbindungsbibliotheken übertragen werden können und ob es gelingt, die Verfahren zur Totalsynthese von Naturstoffen erfolgreich an die Synthese naturstoffinspirierter Verbindungen anzupassen.

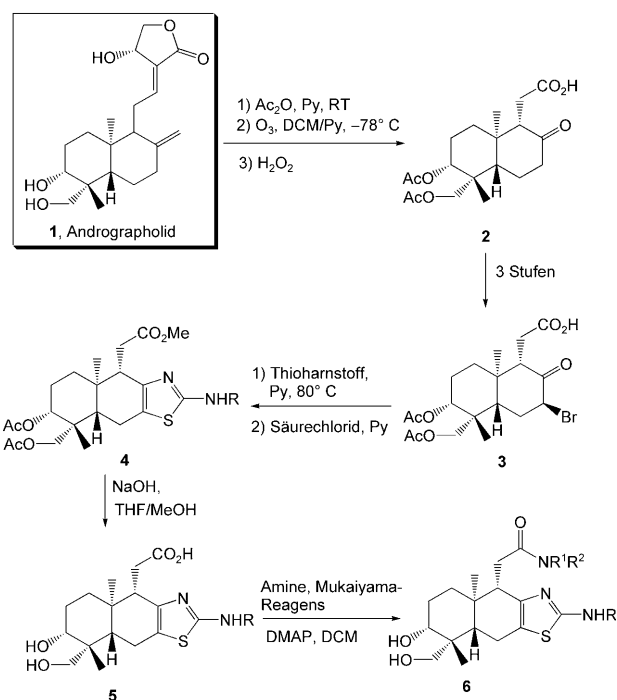
[*] Dr. K. Kumar, Prof. Dr. H. Waldmann
Max-Planck-Institut für molekulare Physiologie
Otto-Hahn-Straße 11, 44227 Dortmund (Deutschland)
und
Technische Universität Dortmund, Fachbereich Chemie
44221 Dortmund (Deutschland)
Fax: (+49) 231-133-2499
E-Mail: kamal.kumar@mpi-dortmund.mpg.de
herbert.waldmann@mpi-dortmund.mpg.de

In diesem Kurzaufsatz stellen wir den Stand der Technik anhand von ausgewählten Beispielen aus der aktuellen Literatur dar. Für ausführlichere Diskussionen^[4] und wegbereitende Beispiele^[5] sei auf andere Publikationen verwiesen.

2. Naturstoffabgeleitete und -inspirierte Verbindungsbibliotheken

Bei der Entwicklung von Verbindungsbibliotheken auf der Basis von Naturstoffstrukturen unterscheidet man zwischen Verbindungen, die von Naturstoffen *abgeleitet* sind, und solchen, die von Naturstoffen *inspiriert* sind. Die Herangehensweisen in den beiden Fällen unterscheiden sich erheblich.^[6] Bei Verbindungen, die von Naturstoffen abgeleitet sind, ist das Grundgerüst mit dem des ursprünglichen Naturstoffs identisch. Das Gerüst wird typischerweise durch chemische Modifikationen oder durch Abbau des isolierten Naturstoffs erzeugt, aber nicht etwa durch eine vielstufige Synthese. Das Substitutionsmuster ist hauptsächlich durch die Reaktivität des Naturstoffs und seiner Gerüststruktur vorherbestimmt, und die Stereochemie wird oft nicht verändert oder lässt sich nicht verändern. Die einzelnen Verbindungen der Bibliothek werden meistens durch individuelle Derivatisierung des bereits vorliegenden Grundgerüsts hergestellt.

Ein Beispiel für eine abgeleitete Bibliothek ist die vom Naturstoff Andrographolid (**1**) abstammende Substanzsammlung der Firma Analyticon (Schema 1).^[7] Andrographolid ist ein diterpenoides Lacton aus der Pflanze *Andrographis paniculata*, die in der traditionellen chinesischen und indischen Medizin verwendet wird. Andrographolid (**1**) wurde in drei Stufen (Acetylierung, Abbau durch Ozonolyse, oxidative Aufarbeitung) in das Abbauderivat **2** umgewandelt, das als Ausgangsverbindung zur Erzeugung verschiedener Bibliotheken diente. Um beispielsweise eine von Andrographolid abgeleitete Bibliothek mit angefügtem Thiazolrest zu erzeugen, wurde Verbindung **2** durch α -Bromierung in das β -Isomer **3** überführt und der Bromidrest anschließend mit Thioharnstoff zum Thiazol umgesetzt. Es folgten die Acylierung der Aminogruppe mit verschiedenen Acylchloriden und die Verseifung der Methylester- und Acetatgruppen mit 5N NaOH. Dabei fielen die Dirole **5** in guten Ausbeuten an. Im abschließenden Schritt der Synthese wurde die freie



Schema 1. Synthese einer von Andrographolid abgeleiteten Bibliothek. Py = Pyridin, DCM = Dichlormethan, DMAP = 4-Dimethylaminopyridin.

Carboxygruppe mit verschiedenen primären und sekundären Aminen zu Verbindungen vom Typ **6** amidiert.

Auf diese Weise wurde in einer Parallelsynthese in Lösung eine Bibliothek von 360 Verbindungen hergestellt. Die Selektion der synthetisierten Substanzen beruhte auf einer virtuell erzeugten Bibliothek und der Strukturbewertung anhand physikochemischer Parameter wie der oralen Bioverfügbarkeit (nach Lipinskis Fünferregel,^[8] der polaren Gesamtoberfläche (TPSA) und der Zahl frei drehbarer Bindungen^[9]), wodurch die pharmakologische Relevanz der Verbindungen sichergestellt wurde.

Bei naturstoffinspirierten Substanzsammlungen ist das Grundgerüst der Bibliothek meist eng verwandt, aber nicht identisch mit dem als Leitstruktur dienenden Naturstoff. Die individuellen Komponenten der Bibliothek werden in mehrstufigen Sequenzen synthetisiert, wobei das Molekülgerüst



Herbert Waldmann, geboren in Neuwied, studierte Chemie an der Universität Mainz und promovierte dort 1985 in organischer Chemie bei Prof. Horst Kunz. Nach einem Postdoktorat bei George Whitesides an der Harvard University habilitierte er 1991 an der Universität Mainz und wurde im selben Jahr zum Professor für Organische Chemie an die Universität Bonn berufen. 1993 folgte eine Professur an der Universität Karlsruhe. Seit 1999 ist er Direktor am Max-Planck-Institut für Molekulare Physiologie in Dortmund und Professor für Organische Chemie an der Universität Dortmund. Seine Forschungen gelten Signaltransduktionsmodulatoren, naturstoffabgeleiteten Verbindungsbibliotheken, Lipopeptiden und Mikroarraytechniken.



Kamal Kumar, geboren im indischen Amritsar, studierte Pharmazie an der Guru Nanak Dev University und promovierte dort im Jahr 2000 bei Prof. M. P. S. Ishar. Nach Forschungsaufenthalten in Kyoto bei Prof. M. Node und in Rostock bei Prof. M. Beller wechselte er 2004 an das Max-Planck-Institut für Molekulare Physiologie in die Gruppe von Prof. H. Waldmann. Seit Mai 2006 leitet er eine eigene Arbeitsgruppe in der dortigen Abteilung für Chemische Biologie. Seine Forschungen gelten der Entwicklung von Synthesemethoden für naturstoffbasierte Verbindungsbibliotheken und der Untersuchung biologischer Funktionen mithilfe niedermolekularer Verbindungen.

schrittweise aus einzelnen Bausteinen zusammengesetzt wird und die Substituenten im Verlauf der Synthese und nicht etwa durch nachfolgende Derivatisierung, z. B. einer bestimmten funktionellen Gruppe, eingeführt werden. Das Substitutionsmuster kann sich deutlich von dem des zugrundeliegenden Naturstoffs unterscheiden, und auch die Stereochemie kann im Verlauf der Synthese verändert werden (z. B. durch Synthese von Enantiomeren). Verglichen mit naturstoffabgeleiteten Synthesen kommen naturstoffinspirierte Synthesen der Logik und Stringenz von Totalsynthesen sehr viel näher. Ein anschauliches Beispiel ist die in Schema 2 gezeigte Synthese einer Bibliothek mit Indolchinolizidin als Strukturmotiv.^[6]

Naturstoffe mit einem Indol-[2,3-*a*]-chinolizidin als Grundstruktur weisen eine Vielzahl biologischer Aktivitäten auf. Zu dieser Gruppe gehören der Wirkstoff Dihydro-umsambarensin gegen Plasmodien,^[10] die antivirale Substanz Hirsutin^[11] und die cytotoxische Verbindung 10-Hydroxyangustin.^[12] Eine Sammlung von 450 Verbindungen mit diesem Strukturmotiv wurde in sechs- bis achtstufigen Festphasensynthesen mit folgenden Schlüsselschritten hergestellt: 1) Lewis-Säure-katalysierte Mannich-Michael-Reaktion zwischen immobilisierten D- oder L-Tryptophanaminen **8** und

elektronenreichen Silyloxydienen; 2) Säure- oder Phosgen-vermittelte Cyclisierung der Enaminone **9** zu tetracyclischen Ketonen **10** und Vinylchloriden **11**; 3) Derivatisierung; 4) base- oder säurekatalysierte Abspaltung der Indolchinolizidine **11**, **13** und **14** vom festen Träger (Schema 2). Die gesuchten Verbindungen entstanden in hohen Gesamtausbeuten, und die Isomerengemische wurden mit HPLC für nachfolgende Screening-Experimente aufgetrennt (> 99 % Reinheit).^[6a,b]

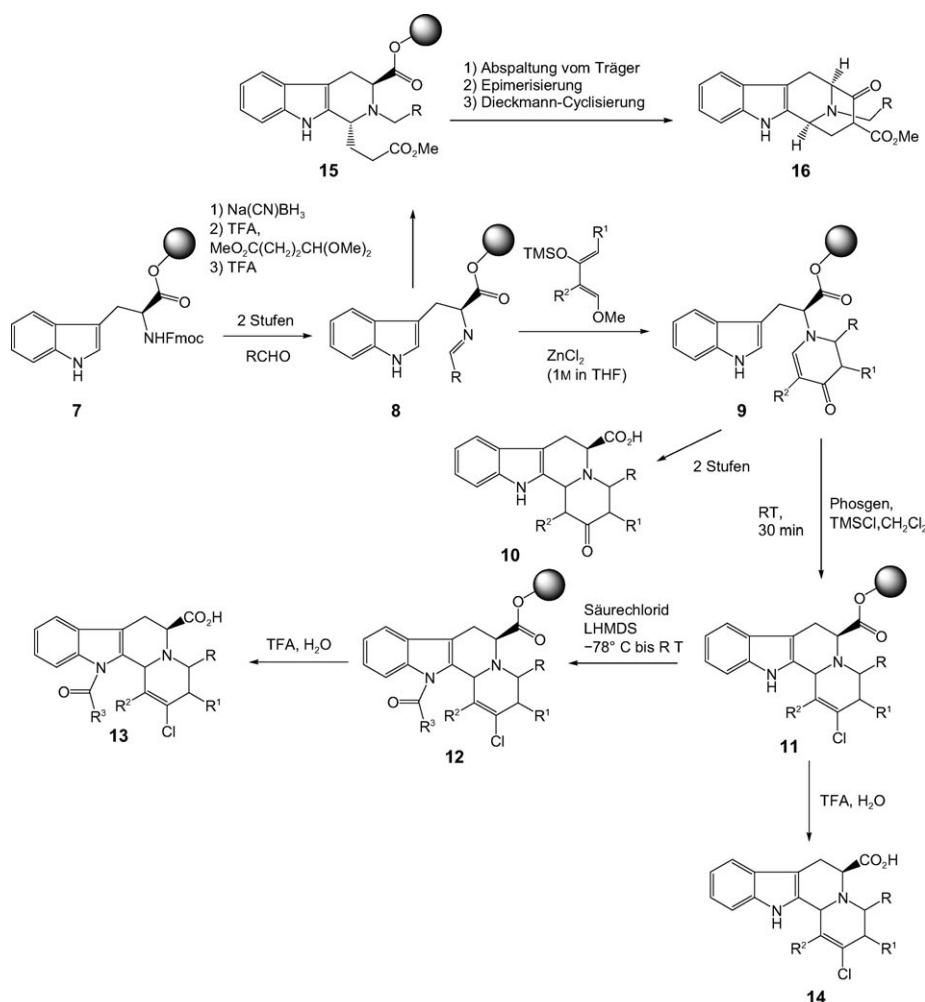
Auf ähnliche Weise wurde ausgehend von den Tryptophanaminen **8** eine Bibliothek tetracyclischer Indolderivate **16** synthetisiert, die an Macrolin-Naturstoffe erinnern; die Macroline sind eine Familie von mehr als 120 Indolalkaloiden mit einem tetracyclischen Cycloocta[*b*]indol als Strukturmotiv.^[6c] Die reduktive Aminierung des Imins **8** und anschließende Pictet-Spengler-Reaktion mit Methyl-4,4-dimethoxybutyrat ergaben die 1,3-*trans*- β -Carboline **15**. Um die noch erforderliche 1 \rightarrow 3-*cis*-Umlagerung zu erzielen, wurde **15** von der Festphase abgelöst und unter basischen Bedingungen regioselektiv epimerisiert. Die erhaltenen *cis*-Isomere wurden schließlich durch eine Dieckmann-Cyclisierung in die β -Ketoester **16** umgewandelt. Auf diese Weise wurde eine

Bibliothek von ca. 100 isomerenreinen tetracyclischen Alkaloidanaloga mit einer Reinheit von > 90 % synthetisiert.

In den naturstoffinspirierten Bibliotheken, deren Synthese in Schema 2 dargestellt ist, wurden zwei Verbindungen vom Typ **14** identifiziert, die die bispezifische Phosphatase Cdc25A mit ähnlicher Wirkung wie die Naturstoffleitstrukturen inhibieren. In der gleichen Bibliothek fanden sich auch potente Inhibitoren der Tyrosinphosphatase MptpB.

Die Kennzeichnung von Verbindungsbibliotheken als naturstoffinspiriert und naturstoffabgeleitet schließt natürlich nicht aus, dass es zu Überschneidungen kommen kann. Es ist denkbar, dass die Synthese einer naturstoffinspirierten Bibliothek zu einem Strukturgerüst führt, das mit dem eines Naturstoffs identisch ist; umgekehrt kann eine naturstoffabgeleitete Bibliothek auch Verbindungen mit veränderten Stereozentren oder Substituentenmustern enthalten. Wir verwenden die beiden Begriffe in erster Linie, um zwischen den prinzipiellen Synthesansätzen (Derivatisierung und Zusammenfügen der Grundstruktur) und den damit verbundenen Unterschieden in der Synthesestrategie zu unterscheiden.

Mit Blick auf die oben beschriebenen Herausforderungen in der Synthese konzentrieren wir uns in diesem Kurzaufsatz auf die Herstellung naturstoffinspirierter Verbindungsbibliotheken.



Schema 2. Synthese naturstoffinspirierter Bibliotheken von Indolchinolizidinen und tetracyclischen β -Ketoester-Alkaloiden. TFA = Trifluoressigsäure, Fmoc = 9-Fluorenylmethoxycarbonyl, TMS = Trimethylsilyl, LHMDS = Lithiumhexamethyldisilazid.

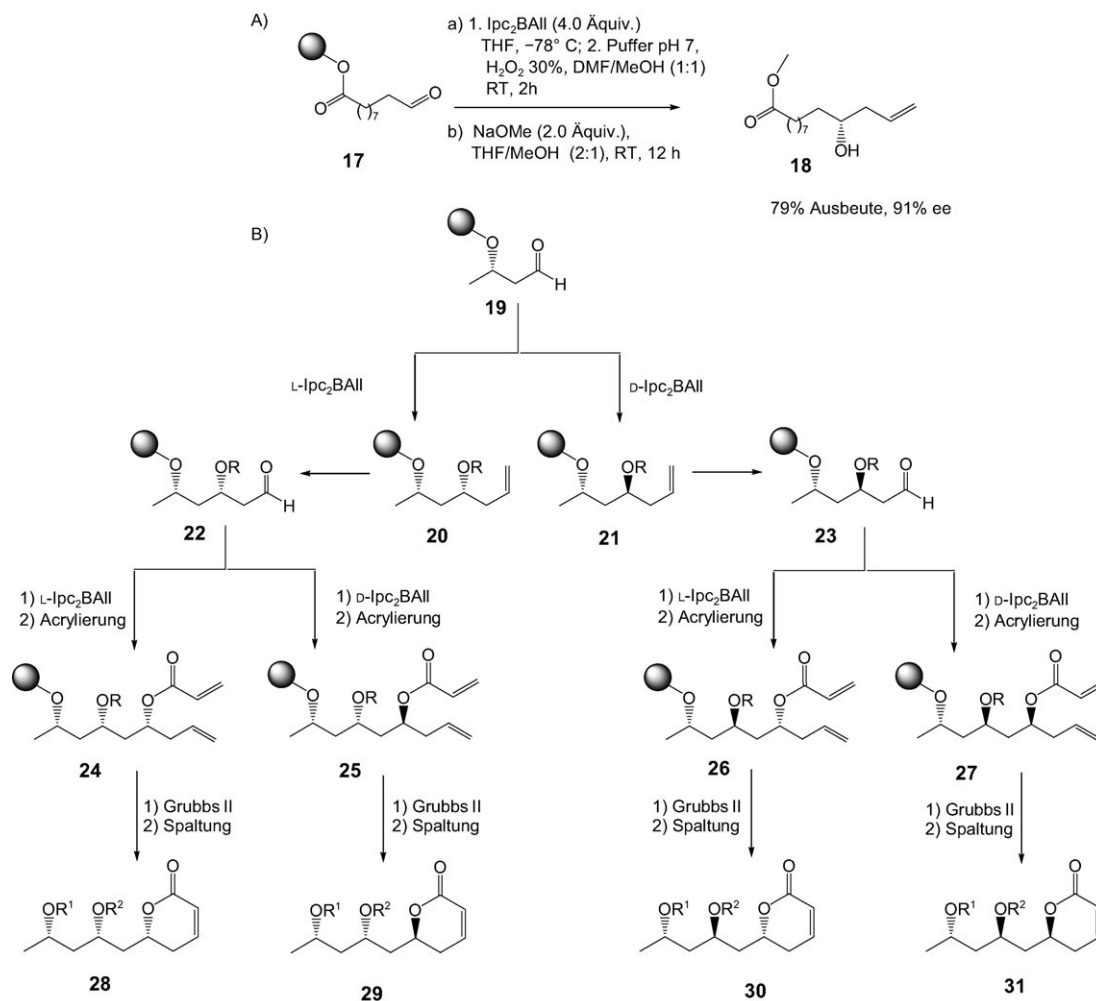
3. Syntheseformat: Festphase, in Lösung, mit Markierungen, Kaskaden

Für die Synthese naturstoffbasierter Verbindungsbibliotheken wurden verschiedene Formate eingeführt. Sehr oft werden die vielstufigen Synthesesequenzen, die für naturstoffinspierte Bibliotheken erforderlich sind, an fester Phase ausgeführt.^[13] Dieser Ansatz hat den Vorteil, dass alle im Verlauf der Reaktionen anfallenden Reagentien einfach ausgewaschen werden können, sodass keine unerwünschten Spezies angereichert werden. Allerdings ist es zunächst nötig, die für Lösungsreaktionen entwickelten Bedingungen an die Erfordernisse von Festphasenreaktionen anzupassen, was eine anspruchsvolle Aufgabe sein kann.

Als ein Beispiel betrachten wir die Anwendung der enantioselektiven Carbonylallylierung, eine der wichtigsten Methoden der organischen Synthese, in der stereoselektiven Festphasensynthese einer Bibliothek naturstoffinspirierter δ -Lactone (Schema 3).^[14] Um Reaktionsbedingungen zu finden, unter denen die Allylierungsprodukte mit hoher Enantioselektivität und hoher Ausbeute entstehen, wurde der immobilisierte Aldehyd **17** als Modellverbindung an einem Po-

lystyrolharz synthetisiert und unter verschiedenen Reaktionsbedingungen einer Allylierung mit *B*-Allyl(diisopinocampheyl)boran (Ipc₂BAll) unterworfen (Schema 3 A). Nach oxidativer Aufarbeitung wurde der Homoallylalkohol **18** vom Harz abgelöst.

Die hohen Ausbeuten und Enantiomerenüberschüsse bei der Festphasenallylierung von Aldehyden ließen vermuten, dass diese Methode für die naturstoffbasierte kombinatorische Synthese brauchbar sein sollte. Als Schlüsselreaktion in der Synthesesequenz lieferte diese Methode alle acht Stereoisomere des Naturstoffs *Cryptocarya*-diacetat, ein α,β -ungesättigtes δ -Lacton aus *Cryptocarya latifolia* und Vertreter einer großen Gruppe biologisch aktiver Sekundärmetabolite. Der Syntheseplan enthielt mehrere stereokomplementäre Allylierungsreaktionen an der polymeren Festphase mit anschließender Ringschlussmetathese zur Bildung der Naturstoffanaloga (Schema 3 B). Zunächst führte die Allylierung des polymergebundenen Aldehyds **19** mit L-Ipc₂BAll zum modifizierten Harz **20** im *syn/anti*-Verhältnis von 85:15. Nach vorsichtiger, sechsminütiger Ozonolyse der Doppelbindung wurde der entstehende Aldehyd erneut mit L-Ipc₂BAll allyliert, und der sekundäre Alkohol wurde in den Acryl-



Schema 3. Enantioselective Festphasensynthese einer δ -Lacton-Verbindungsbibliothek. Grubbs II = Grubbs-Katalysator der zweiten Generation.

säureester **24** überführt. Durch Ringschlussmetathese mit dem Grubbs-Katalysator **II** entstand das α,β -ungesättigte Lacton **28**. Nach Abspaltung von der Festphase, Entfernung der Silylgruppe mit Trifluoressigsäure und abschließender Acetylierung erhielt man eine Mischung aus vier Stereoisomeren, aus der das all-*syn*-Isomer des Cryptocarya-diacetats nach elf Synthesestufen mit einer einfachen Flash-Chromatographie in 11 % Gesamtausbeute isoliert wurde. Ausgehend von dieser Reaktionssequenz wurden alle acht möglichen stereoisomeren Konfigurationen für das Gerüst des Naturstoffs mithilfe der Allylierungsreaktionen stereokomplementär hergestellt (Schema 3).

Dieses Beispiel verdeutlicht, dass auch lange, vielstufige Synthesesequenzen zur Herstellung naturstoffinspirierter Bibliotheken individueller Stereoisomere genutzt werden können. Entsprechend konnte eine ganze Reihe von modernen leistungsfähigen enantio- und diastereoselektiven organischen Synthesemethoden in das Festphasenformat übertragen werden. Eine Übersicht findet sich in Lit. [15].

Besonders erfolgreich war die Implementierung Übergangsmetallkatalysierter Kupplungen in Festphasensynthesen zur Herstellung naturstoffbasierter Verbindungsbibliotheken. Ein Beispiel ist die Synthese der Lamellarine, einer wichtigen Gruppe mariner Naturstoffe mit einem Pyrrolring als Strukturmotiv.^[16] Ein modularer Ansatz zur Festphasensynthese dieser Naturstoffe, der auf einer Pd-katalysierten Kupplung geeigneter Bausteine beruht, wurde von Albericio und Álvarez entwickelt (Schema 4).^[17] Harzgebundenes Iodphenol **32** wurde durch Verdrängung des Cl-Substituenten am Harz durch eine Phenoxy-Funktion hergestellt. Die Pd⁰-katalysierte Negishi-Kreuzkupplung des metallorganischen Reagens **33** mit dem harzgebundenen Iodphenol **32** ergab das Brompyrrol **34**. Als zweite Pd-katalysierte Kupplung wurde eine Suzuki-Reaktion eingesetzt, diesmal zur Bildung der Aryl-Pyrrol-Bindung. Mit Borsäuren **35** in Dioxan (Rückfluss

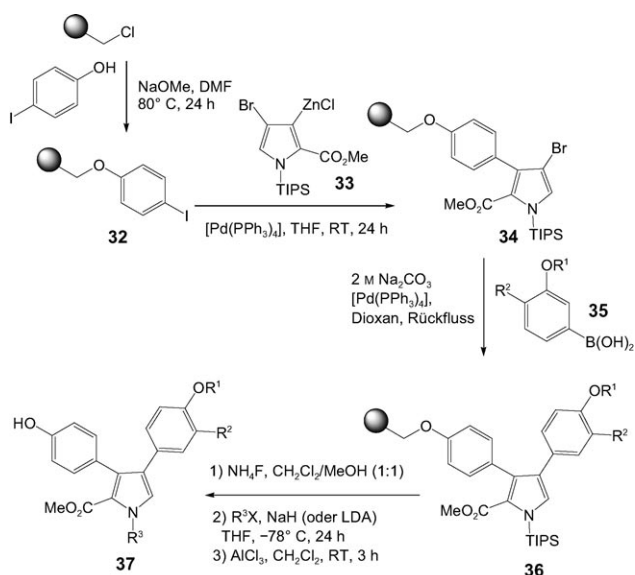
mit Pd-Katalyse) erhielt man **36**. Nach Abspaltung der TIPS-Gruppe und *N*-Alkylierung des Pyrrols wurde schließlich die Lamellarin-Bibliothek **37** erhalten.

Neben Festphasensynthesemethoden können auch vielstufige Synthesen in Lösung, die ohne Isolierung der Zwischenprodukte ablaufen, zur Herstellung naturstoffinspirierter Bibliotheken genutzt werden. In erstaunlich vielen Fällen lassen sich aufeinanderfolgende Stufen einer langen Reaktionssequenz als Eintopfreaktionen ausführen, wobei die anfallenden Produktmischungen anschließend aufgetrennt werden müssen. Solche Ansätze enthalten oft auch Domino- oder Mehrkomponentenreaktionen, die allerdings noch nicht oft zur Synthese naturstoffinspirierter Verbindungsbibliotheken eingesetzt wurden.^[18]

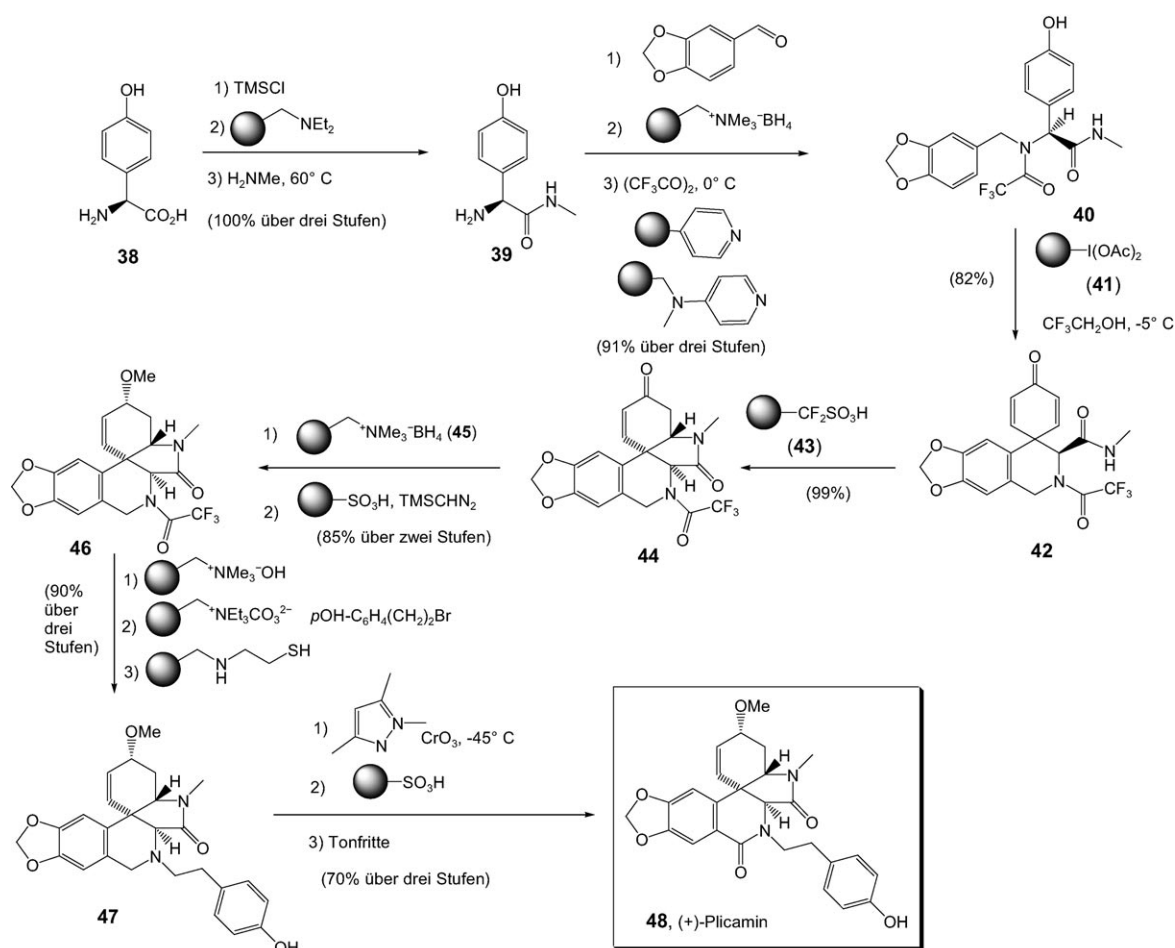
Eine wirkungsvolle Technik ist der Einsatz polymerimmobilisierter Abfangreagentien, die reaktive Zwischenstufen, die störende Wechselwirkungen mit nachfolgenden Reaktionen oder Reagentien eingehen können, aus dem Reaktionsgemisch entfernen.^[19] Ein Beispiel ist die Synthese von (+)-Plicamin aus der Gruppe der Amaryllidaceen-Alkaloide. Die erste Totalsynthese dieses Alkaloids und seines Enantiomers wurde von Ley und Mitarbeitern publiziert, die hierzu eine interessante Kombination von immobilisierten Reagentien und Abfangverbindungen verwendeten (Schema 5).^[20] Die Verbindung **40** wurde mithilfe der polymergebundenen hypervalenten Iodverbindung **41** in das Spirodienon **42** umgewandelt, das mit katalytischem Nafion-H (Fluorsulfonsäureharz, **43**) fast quantitativ in das pentacyclische Strukturmotiv **44** des Naturstoffgerüsts umgesetzt wurde. Nach stereo- und regioselektiver Reduktion von **44** mit harzgebundenem Borhydrid wurde der als Zwischenprodukt entstehende, sterisch stark gehinderte Alkohol mit Trimethylsilyldiazomethan und Sulfonsäureharz zu **46** methyliert. Drei einfache Schritte ergaben das Amin **47**, dessen abschließende Oxidation zu (+)-Plicamin (**48**) sich aber als schwierig erwies. Die Umwandlung gelang letztlich mit CrO₃, 3,5-Dimethylpyrazol und Amberlyst 15 als Abfangharz, wobei die Chromsalze durch Filtration (Varian Chem Elut CE 1005/Montmorillonit k10) anschließend vollständig entfernt wurden (Schema 5).

Eine elegante Alternative zu dieser Strategie ist die fluorige Synthese, bei der die in der Bibliothekssynthese eingesetzten Bausteine mit perfluorierten Kohlenwasserstoffen markiert sind, um so die Struktur zu codieren und die Produktisolierung zu erleichtern.^[21] Die fluorige Synthese nutzt Reaktionsbedingungen in flüssiger Phase in Kombination mit einer phasenmarkierten Produktabtrennung und kann als „trägerlose“ Hochgeschwindigkeitssynthesetechnik eingesetzt werden. Die markierten Moleküle enthalten eine perfluorierte Domäne, die zur Produkttrennung z. B. durch Festphasenextraktion mit fluoriertem Kieselgel oder durch HPLC genutzt werden kann, ohne dass fluorige Lösungsmittel erforderlich wären.^[22]

Curran et al. erzeugten mithilfe der fluorigen Synthesetechnik vier Isomere des Naturstoffs Cytostatin,^[23] der gegen Tumore wirkt und aus dem Kulturmedium von *Streptomyces* sp. isoliert wird (Schema 6). Die vier Isomere wurden in mehreren Schritten aus einem Gemisch der vier fluormarkierten Quasiisomere **57** gewonnen („Quasi-“, weil die Ver-



Schema 4. Festphasensynthese einer Verbindungsbibliothek auf der Basis von Lamellarin. TIPS = Triisopropylsilyl, LDA = Lithiumdiisopropylamid.



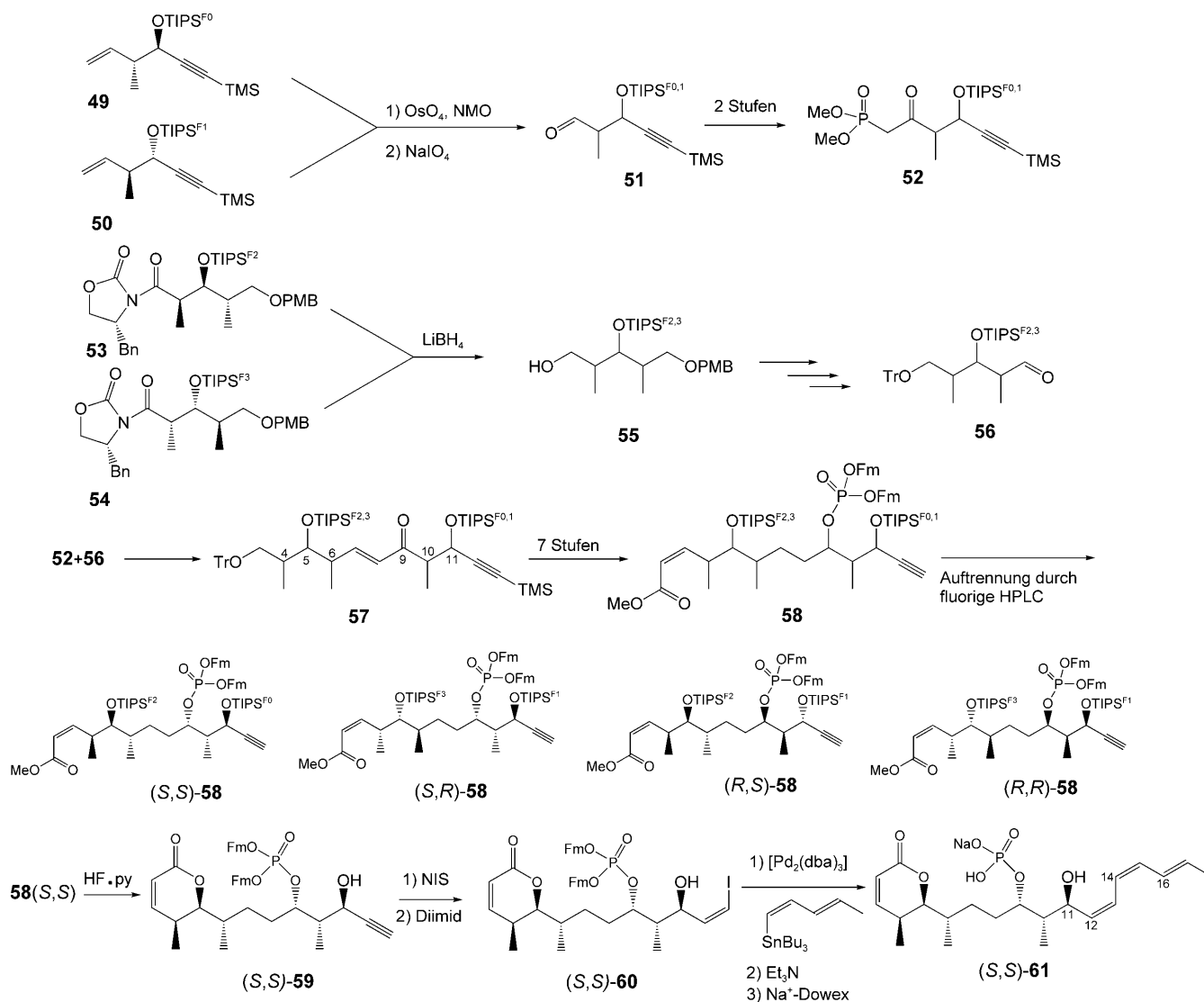
Schema 5. Totalsynthese von (+)-Plicamin mit immobilisierten Reagentien.

bindungen unterschiedliche fluorierte Markierungsgruppen tragen und somit keine echten Isomere sind). Die Verbindungen **57** wurden zuvor durch die Horner-Wadsworth-Emmons(HWE)-Kupplung zwischen den fluormarkierten quasiracemischen Aldehyden **56** und den quasiracemischen Ketophosphonaten **52** erhalten. Die stereochemischen Konfigurationen an den Zentren C4–C6 (*SSS* oder *RRR*) und C9–C11 (*SSS* oder *RRR*) sind durch unterschiedliche Silylgruppen codiert. Weil die Quasiisomere unterschiedlich viele Fluoratome tragen, kann mittels fluorierter HPLC das Isomeregemisch auf einer späten Stufe der Reaktionssequenz aufgetrennt werden. Die Fluoratome sind auf zwei Silylgruppen verteilt, daher ist ihre annähernde Additivität für die HPLC-Auftrennung wichtig. Die Synthesen der Quasiracemate **56** und **52** sind in Schema 6 zusammengefasst. Um das Quasiracemat **56** herzustellen, wurden ein einfach zugängliches Evans-Aldoladdukt und sein Enantiomer mit unterschiedlichen fluorierten Silylgruppen zur Codierung der stereochemischen Konfigurationen markiert, und die auf diese Weise markierten Produkte **53** und **54** wurden gemischt. Die reduktive Entfernung der Evans-Hilfsgruppe mit LiBH_4 führte in 77 % Ausbeute zum primären Alkohol **55**, der mit einer Tritylgruppe geschützt wurde. Nach selektiver Abspaltung der *para*-Methoxybenzyl(PMB)-Gruppe mit 2,3-Dichlor-5,6-dicyano-1,4-benzochinon (DDQ) und Oxidation mit

Dess-Martin-Periodinan (DMP) entstand der fluorierte Aldehyd **56** als quasiracemisches Gemisch in 84 % Ausbeute.

Um das Quasiracemat **52** (Schema 6) zu synthetisieren, wurden die isomerenrein markierten Enantiomere (*R,R*)-**49** und (*S,S*)-**50** gemischt, die durch Brown-Ramachandran-Allylborierung hergestellt und mit einer markierten Silylgruppe geschützt worden waren. Durch Behandlung mit OsO_4 und *N*-Methylmorpholin-*N*-oxid (NMO) in *t*BuOH/ H_2O (1:1) wurde ein Gemisch von Diolen erhalten, die mit NaIO_4 in zwei Stufen mit 90 % Ausbeute zu **51** umgesetzt wurden. Die Behandlung des Aldehyds **51** mit dem lithiierten $(\text{MeO})_2\text{P}(\text{O})\text{CH}_3$ -Anion und anschließende Oxidation mit Dess-Martin-Periodinan führte in zwei Stufen mit 82 % Ausbeute zum fluorierten Ketophosphonat **52** als quasiracemisches Gemisch.

Die Kupplung der Fragmente und die anschließende siebenstufige Synthese wurden mit den Gemischen der vier Quasiisomere durchgeführt. Die HWE-Reaktion zwischen **52** und **56** lieferte das Enon **57** in 80 % Ausbeute. Eine siebenstufige Reaktionssequenz mit selektiven Enon- und Keton-Reduktionen, einer Alkohol-Oxidation zum Aldehyd und einer Still-Gennari-Olefinierung ergab die α,β -ungesättigten Ester **58** in guter Gesamtausbeute. Vor der Abspaltung der fluorierten Markierungsgruppen wurde das Gemisch **58** durch präparative fluorige HPLC in die vier individuellen Quasi-



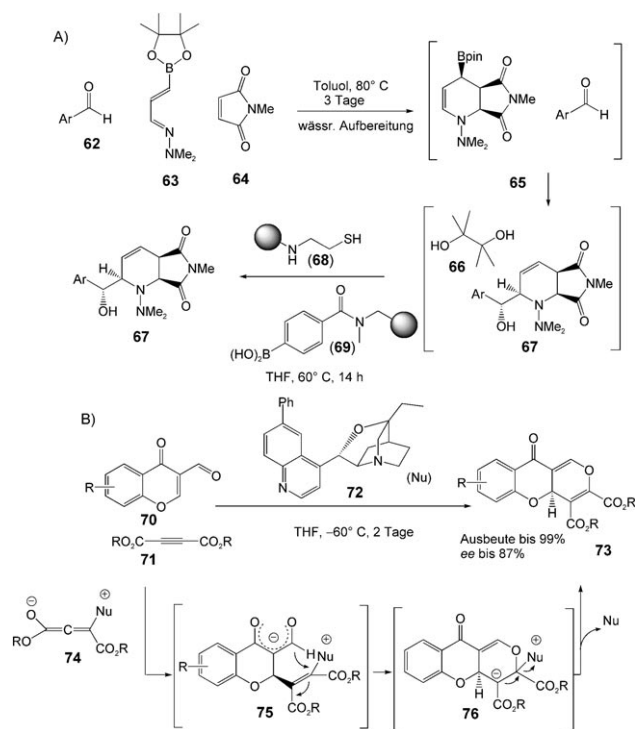
Scheme 6. Synthese von Cytostatinisomeren mithilfe einer Markierungsstrategie mit perfluorierten Kohlenwasserstoffen. Bn = Benzyl, Fm = 9-Fluorenylmethyl, TIPS^F = Triisopropylfluorsilyl, dba = Dibenzylidenacetone.

isomere (S,S)-58, (S,R)-58, (R,S)-58 und (R,R)-58 aufgetrennt.

Die restlichen Schritte wurden für jedes Isomer separat durchgeführt (Schema 6). Zwei Silylgruppen in (S,S)-58 wurden mit HF-Pyridin entfernt, wobei das Lacton (S,S)-59 mit 59% Ausbeute entstand. Die Iodierung der Dreifachbindung mit *N*-Iodsuccinimid (NIS) in Gegenwart katalytischer Mengen AgNO₃ ergab ein Iodalkin, das mit Diimid zum (Z)-Iodalken (S,S)-60 reduziert wurde. Die Stille-Kupplung wurde mit Stannan und [Pd₂(dba)₃] zum (12Z,14Z,16E)-Trien durchgeführt und das Produkt sorgfältig mit präparativer HPLC gereinigt. Nach Abspaltung der Fluorenylmethylgruppe unter basischen Bedingungen und Ionenaustausch über Dowex-Harz fiel das Stereoisomer (S,S)-61 an. Die anderen drei Isomere (R,S)-61, (S,R)-61 und (R,R)-61 wurden nach der gleichen Reaktionssequenz synthetisiert, wobei jeweils vom entsprechenden abgetrennten Produkt 58 ausgegangen wurde.

Von den verschiedenen Syntheseformaten, die wir in diesem Abschnitt diskutiert haben, wurden die schrittweisen Synthesen in flüssiger und fester Phase am ausführlichsten erforscht. Demgegenüber sind Domino- und Kaskadenreaktionen zur Synthese von naturstoffinspirierten Verbindungsbibliotheken noch nicht in vergleichbarem Ausmaß entwickelt worden, obwohl Tietze et al.^[18d] schon früh zeigten, dass Verbindungsklassen mit naturstoffähnlichen Strukturgerüsten durch einen solchen Ansatz effizient zugänglich sind. Der Entwurf von Dominosequenzen, die zu naturstoffinspirierten Verbindungsbibliotheken führen, ist natürlich keineswegs trivial, und ein verallgemeinertes Verfahren dürfte kaum realisierbar sein.

Dennoch sind solche Verfahren interessant, weil sie das Potenzial haben, komplexe molekulare Strukturen und davon abgeleitete Bibliotheken in höchst effizienten Eintopfreaktionen aufzubauen. Zwei aktuelle Beispiele sind in Schema 7 erläutert. Hall und Mitarbeiter entwickelten eine Dreikom-



Scheme 7. Ein Kaskaden-/Domino-Ansatz zur Synthese von Verbindungsbibliotheken: A) Tandem-Eintopfsynthese polysubstituierter Piperidine; B) organokatalytische Synthese naturstoffinspirierter tricyclischer Benzopyrone.

ponenten-Eintopfreaktion, in der das 1-Aza-4-Borbutadien **63** zunächst eine [4+2]-Cycloaddition mit *N*-substituiertem Maleimid **64** zum bicyclischen Allylboronat **65** durchläuft (Schema 7 A).^[24] Das Zwischenprodukt **65** reagiert dann stereokontrolliert mit dem Aldehyd zum polysubstituierten Piperidin **67** als Endprodukt. Die Effizienz dieser Tandemsynthese wurde durch Einsatz zweierlei Reagentien verbessert: durch Abfangharze wie **68**, um den Überschuss an Aldehyd und Maleimid zu entfernen, und durch die trägerfixierte Borsäure **69**, um ein als Nebenprodukt entstehendes Pinacol, **66**, abzufangen. Mit diversen Hydrazinen, Maleimiden und Aldehyden wurde eine Bibliothek aus 944 polysubstituierten Piperidinen synthetisiert.

Vor dem Hintergrund, dass Naturstoffe mit einem tricyclischen Benzopyron als Strukturmotiv antibakterielle Aktivitäten zeigen, wurde eine [4+2]-Anellierungsstrategie entwickelt, um eine Verbindungsbibliothek aus tricyclischen Benzopyronen zu erzeugen (**73**, Schema 7 B).^[25] Hierbei konnten zwei elektronenarme Systeme, das Oxadien **70** und die Acetylenecarboxylate **71**, durch nucleophile Katalyse anelliert werden. Durch Behandlung der Alkine **71** mit dem organischen Katalysator **72** bildet sich zunächst das Zwitterion **74**, das dann die Kaskade bestehend aus einer Michael-Addition und einer zweiten Michael-Addition/Eliminierung hin zur gewünschten Zielstruktur durchläuft. Mit Cinchona-abgeleiteten β -Isocupreidinen als Katalysatoren wurde eine Reaktionsfolge für die Synthese von (*S*)-**73** entwickelt.

4. Naturstoffinspierte Verbindungsbibliotheken

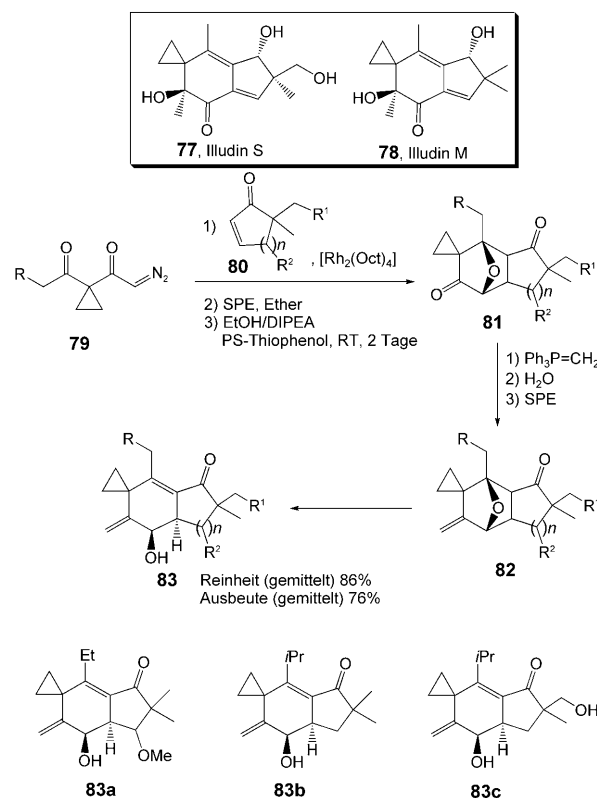
4.1. Verbindungsbibliotheken mit carbocyclischen Strukturmotiven

Naturstoffe enthalten sehr oft Sauerstoff- und Stickstoff-Heterocyclen, aber auch rein carbocyclische Verbindungen kommen in der Natur oft vor. Die Strukturen und biologischen Aktivitäten carbocyclischer Moleküle haben zahlreiche Synthesen von Verbindungsbibliotheken nach sich gezogen.

4.1.1. Illudin-inspierte Verbindungsbibliotheken

Die Illudine sind eine Gruppe von Sesquiterpenen, deren erste Vertreter, Illudin M und S, aus dem Ölbaumpilz *Omphalotus illudens* isoliert wurden.^[26] Sie besitzen ein carbocyclisches Gerüst mit einem anellierten Cyclohexenon-Cyclopentenol-Motiv und weisen interessante Antitumoraktivitäten auf. Um Einblick in die biologischen Aktivitäten der Illudine zu gewinnen, synthetisierten Pirrung et al. in einer Parallelsynthese mithilfe von Abfangharzen 49 Verbindungen mit dem Illudin-Grundgerüst.^[27] Das Synthesekonzept war an eine Arbeit von Padwa und Kinder^[28] angelehnt, die eine rhodiumkatalysierte dipolare Cycloaddition von Carbonyliden und Enonen beschrieben hatten.

In der Reaktion wurden Diazocarbonylverbindungen **79** und Enone **80** eingesetzt, wobei die leichter verfügbaren Enone im Überschuss vorlagen (Schema 8). Polare Neben-



Scheme 8. Synthese einer Illudin-basierten Verbindungsbibliothek. SPE = Festphasenextraktion, DIPEA = *N,N*-Diisopropylethylamin.

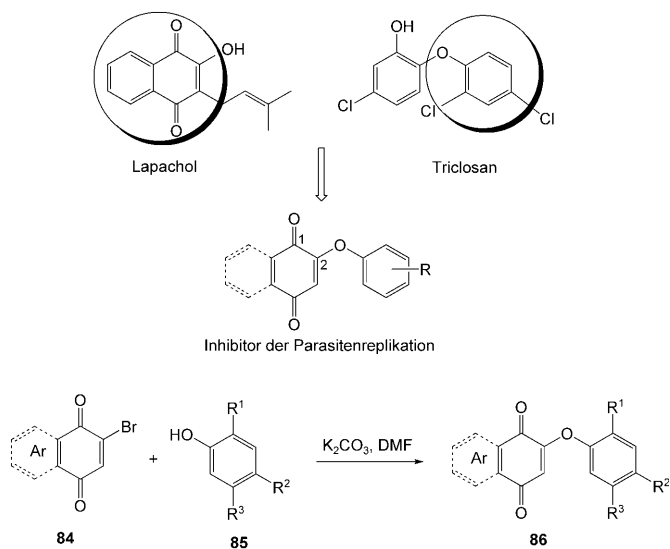
produkte wurden durch Festphasenextraktion mit $\text{SiO}_2/\text{CH}_2\text{Cl}_2$ abgetrennt. Nach Austausch des Lösungsmittels wurde das überschüssige Enon mit einem Thiophenol-Abfangharz entfernt^[29] und Verbindung **81** in ca. 70 % Ausbeute gewonnen. Anschließend wurde die Carbonylgruppe selektiv in eine Olefingruppe umgewandelt und die Etherbrücke entfernt, wodurch Verbindung **83** entstand. Der Einsatz eines Parallelsyntheseroboters und die Anwendung von Festphasenextraktionsverfahren zur Reinigung erleichterten die Reaktionssequenz.

Die Bibliothek wurde auf die Wachstumshemmung von MCF7-Brustkrebszellen, nichtkleinzellige H460-Lungentumorzellen und SF-268-ZNS-Zellen untersucht. Drei Verbindungen (**83a–c**) zeigten eine vollständige Inhibierung des Zellwachstums von H460-Zellen bei 100 μM .

4.1.2. Eine Lapochol-inspirierte Naphthochinon-Bibliothek

Die Synthese von naturstoffinspirierten Verbindungsbibliotheken ist besonders dann vielversprechend, wenn es schon eine Verbindung der entsprechenden Strukturklasse mit der gewünschten biologischen Aktivität gibt.^[30] Eine solche Vorabinformation nutzten Cavalli und Mitarbeiter beim Entwurf einer Verbindungsbibliothek, die Aktivität gegen Trypanosomen und Leishmanien zeigen sollte.^[31] Der Entwurf der Bibliothek sah vor, die Chinoneinheit natürlich vorkommender Naphthochinone als Grundgerüst für die Strukturvariationen zu verwenden.

Naphthochinone und verwandte Chinone sind eine der wichtigsten Naturstoffklassen mit signifikanter Aktivität gegen Leishmanien und Trypanosomen.^[32] Lapachol (Schema 9) zeigt eine starke Wirkung gegen diese Parasiten, ohne ernsthafte toxische Nebenwirkungen auf den Menschen.^[33] Ausgehend von 1,4-Naphthochinon und 1,4-Anthrachinon als Naturstoff-Strukturelementen wurde eine kleine fokussierte Bibliothek von 16 Verbindungen synthetisiert, die an der Position 2 verschiedene aromatische Substituenten trugen, die ein Strukturelement von Triclosan nachahmen sollten.

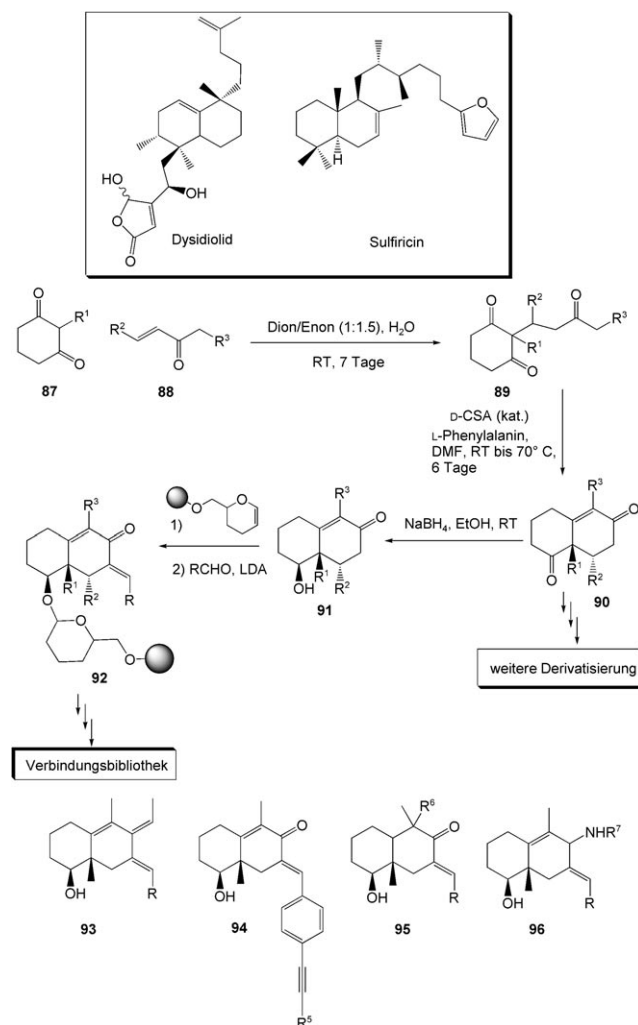


Schema 9. Synthese einer Lapachol-basierten Naphthochinon-Bibliothek.

Triclosan ist ein breitwirkendes Biozid, das die procyclischen und die im Blutkreislauf zirkulierenden Formen von *Trypanosoma brucei* abtötet.^[34] Mehrere Verbindungen dieser kleinen Sammlung waren in niedriger Konzentration aktiv gegen Trypanosomen. Das Derivat **86a** ($\text{Ar} = \text{Ph}$, $\text{R}^1 = \text{R}^2 = \text{R}^3 = \text{H}$) zeigte einen IC_{50} -Wert von 80 nM gegen Zellen von *T. b. rhodesiense* und einen Selektivitätsindex (SI) von 74, was den Spezifikationen der WHO/TDR für Antitrypanosomen-Wirkstoffe sehr nahe kommt.

4.1.3. Verbindungsbibliotheken mit Decalin als Strukturmotiv

Das Decalingerüst ist ein häufiges Strukturelement in Naturstoffen. Bekannte Beispiele sind Dysidiolid und Sulfiricin (Schema 10), die die Cdc25A-Proteinphosphatase, ein wichtiges Target für tumorhemmende Wirkstoffe, inhibieren.^[35,36] Eine systematische Studie ergab, dass der Austausch des Decalin-Elements im Sulfiricin gegen Benzimidazol, Benzothiazol oder Naphthalin zum Verlust der Phosphatasehemmung führt. Der Decalinrest kann daher als „privilegiertes“ Strukturelement angesehen werden,^[37] infolgedessen die Festphasensynthese einer Bibliothek mit dem Decalin-



Schema 10. Festphasensynthese einer Verbindungsbibliothek mit einem Decalin-Strukturmotiv. CSA = Camphersulfonsäure.

kern als zentralem Strukturmotiv unternommen wurde. Dieses Beispiel einer biologieorientierten Synthese (BIOS)^[6,38] zeigt, dass naturstoffinspierte Verbindungsbibliotheken Wirkstoffkandidaten nicht nur für einzelne Proteine, sondern auch für eine Gruppe von Proteinen liefern können, wenn diese nach der strukturellen Ähnlichkeit ihrer ligandenbindenden Regionen zusammengefasst werden (PSSC, protein structure similarity clustering).^[39]

In der ersten Phase der Synthese wurden unterschiedlich funktionalisierte Decalinderivate in Lösung als Bausteine für die weitere Derivatisierung an der Festphase hergestellt (Schema 10). Ungesättigte Decalinole **91** wurden synthetisiert, wobei eine C-C-Kupplung in Form einer enantioselektiven Robinson-Anellierung der Schlüsselschritt war. Zusätzlich wurde das Zwischenprodukt **90** weiter derivatisiert, um die Verbindungsbibliothek zu vergrößern. Die vom Decalin abgeleiteten Alkohole wurden an Merrifield-Harz immobilisiert, das mit einem Dihydropyran-Linker versehen war. Die immobilisierten Aldolkondensationsprodukte **92** wurden einer Reihe von Transformationen unterworfen, mit denen die Diversität der Bibliothek noch weiter erhöht wurde. Zu den verwendeten Umwandlungen gehörten Sonogashira-, Suzuki- und Heck-Reaktionen, die kupferkatalysierte konjugierte Addition, Grignard-Reaktionen, Alkylierungen in α -Position zu einer Ketogruppe, Wittig-Reaktionen und reduktive Aminierungen, die letztlich die in Schema 10 gezeigten Verbindungsklassen **93–96** ergaben.

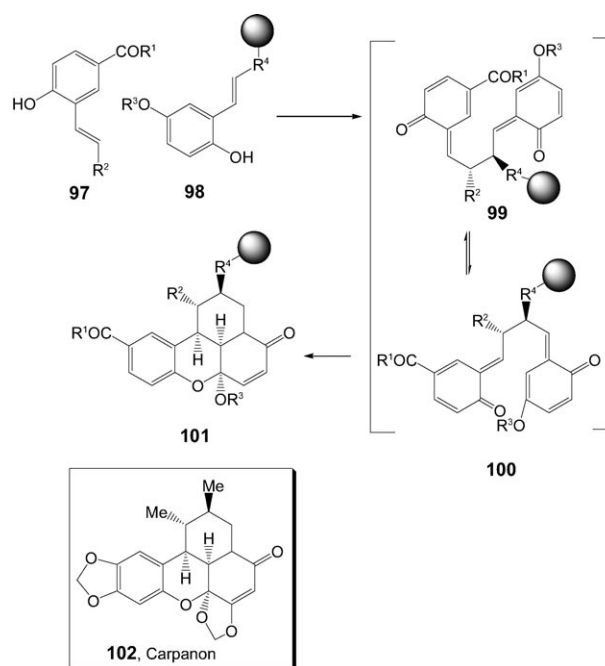
Nach der Abspaltung vom Harz mit Trifluoressigsäure fielen die Produkte in Reinheiten von 23–98 % an und wurden mit präparativer HPLC bis zur Homogenität aufgereinigt. Insgesamt wurden 483 Verbindungen in Mengen von mehreren Milligramm erhalten. Die Ausbeuten betrugen typischerweise 40–60 % nach der drei- bis fünfstufigen Reaktionssequenz am Harz.^[85]

4.2. Verbindungsbibliotheken mit Sauerstoff-Heterocyclen als Strukturmotiven

Statistisch gesehen enthalten Naturstoffe mehr Sauerstoffatome und weniger Stickstoffatome als Wirkstoffmoleküle. Dennoch ist das Vorliegen eines Sauerstoffheterocyclen oft entscheidend für die biologische Aktivität eines Moleküls. Diese Erkenntnis und die strukturelle Komplexität von oxacyclischen Naturstoffen führten dazu, dass Synthesen naturstoffbasierter Verbindungsbibliotheken zahlreich beschrieben wurden.

4.2.1. Carpanon-inspierte Verbindungsbibliotheken

Festphasenreaktionen können die Molekülkomplexität steigern und gleichzeitig eine Vielfalt von Strukturen zugänglich machen, wodurch sich exzellente Möglichkeiten ergeben, Moleküle mit neuen biologischen Eigenschaften zu entdecken. Vor diesem Hintergrund beschrieben Shair und Mitarbeiter die Verwendung von biomimetischen Festphasenreaktionen, die in einem Schritt tetracyclische Moleküle aus leicht verfügbaren Ausgangsmaterialien liefern (**101**, Schema 11).^[40]



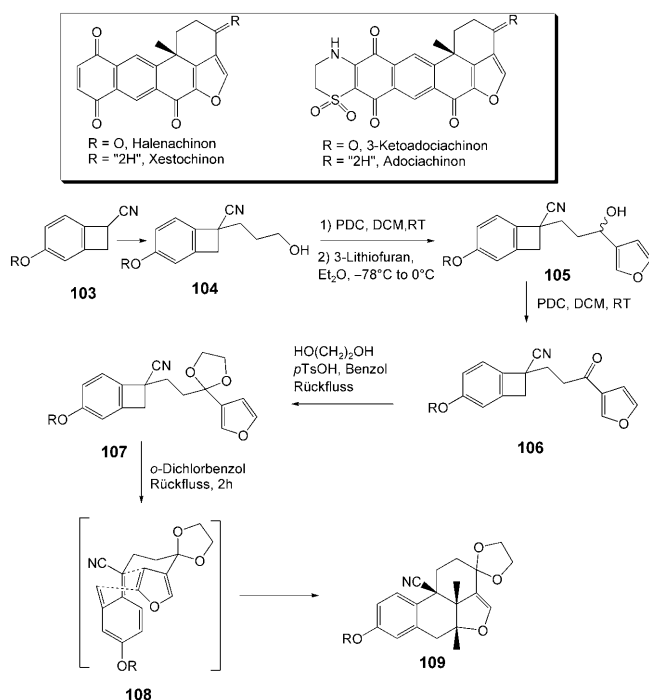
Schema 11. Festphasensynthese einer Carpanon-inspierten Verbindungsbibliothek.

Der Schlüsselschritt in dieser Strategie war die intermolekulare oxidative Heterodimerisierung von *o*-Hydroxystyrolen an fester Phase. Die harzgebundenen elektronenreichen Phenole **98** wurden mit den elektronenarmen Phenolen **97** in einer Heterocyclisierung in Gegenwart von $\text{PhI}(\text{OAc})_2$ gekuppelt. Eine nachfolgende Diels-Alder-Cycloaddition mit inversem Elektronenbedarf ergab die gewünschten Carpanonderivate **101** über das Zwischenprodukt **100**. Die Diels-Alder-Reaktion mit inversem Elektronenbedarf ist elektronisch kontrolliert, was die selektive Bildung eines einzigen Isomers von **101** gewährleistete.

Die in Schema 11 gezeigte Reaktionsfolge ist ein elegantes Beispiel für eine stereoselektive Festphasensynthese eines strukturell komplexen Moleküls, das in diesem Fall fünf stereogene Zentren enthält. Die Festphasenreaktion toleriert außerdem eine Reihe an funktionellen Gruppen, was sie für eine diversitätsorientierte Synthese (DOS)^[41] und die Erzeugung von Bibliotheken aus carpanonähnlichen Molekülen geeignet macht.

4.2.2. Mehrfach anellierte Furanderivate

Natürlich vorkommende polycyclische Furane wie Halenachinon^[42] zeigen interessante biologische Eigenschaften,^[43] darunter antibiotische, cardiotonische, antivirale und Proteintyrosinkinase-hemmende Aktivitäten. Ausgehend von einer tetracyclischen furanhaltigen Leitstruktur^[44] synthetisierten Nemoto und Mitarbeiter eine Bibliothek aus mehrfach anellierten Furanderivaten mit naturstoffähnlicher Architektur.^[45] Das Strukturgerüst wurde über eine intramolekulare [4+2]-Cycloaddition von *o*-Chinodimethanen synthetisiert, wobei letztere durch thermische Ringöffnung von Benzocyclobutanderivaten zugänglich sind (Schema 12).^[46] Mit



Scheme 12. Synthese in Lösung einer Bibliothek tetracyclischer Verbindungen mit anelliertem Furanrest. PDC = Pyridiniumdichlorodichromat.

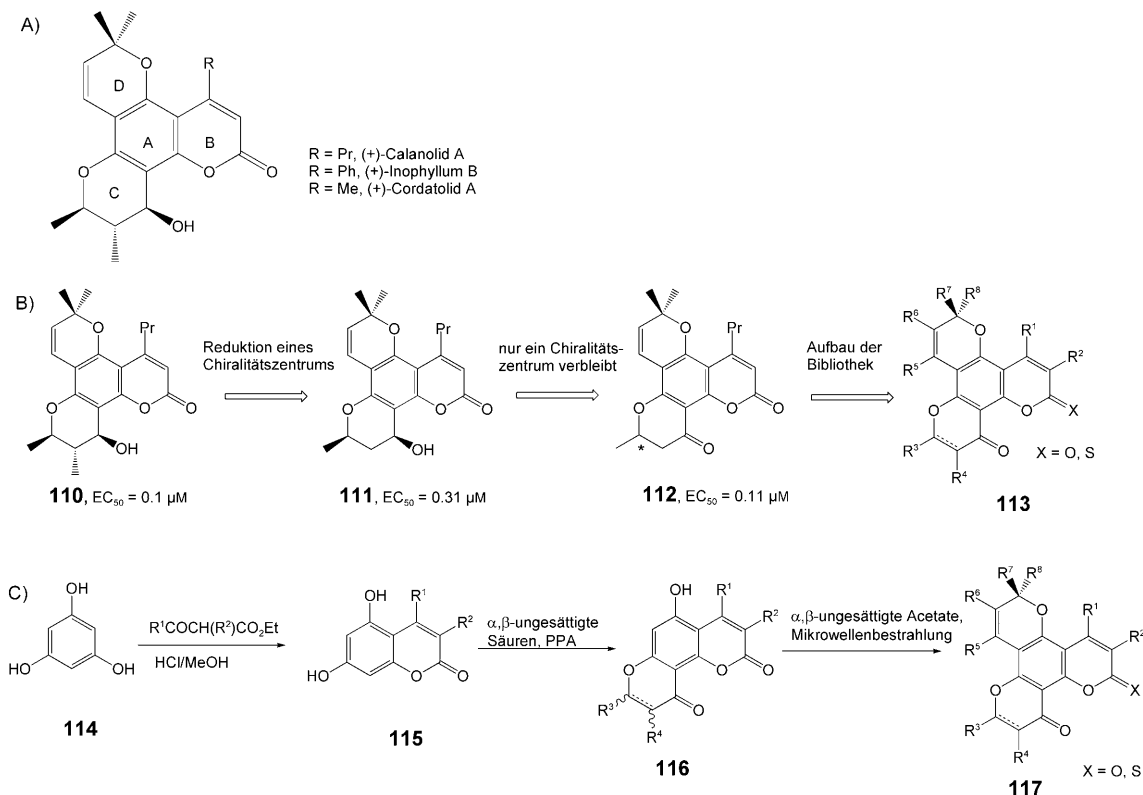
furanhaltigen Benzocyclobutenderivaten als Substrate ließen sich hoch stereoselektive Synthesen erreichen.

Die erhaltenen Derivate wurden mithilfe der Hämagglutinin-Methode auf eine Inhibition des Viruswachstums getestet. Hierbei wurden vielversprechende Kandidaten für neue antivirale Wirkstoffe mit hoher Aktivität und gutem therapeutischem Index entdeckt. Halenachinone und verwandte Naturstoffe sind bekannt für ihre inhibierende Wirkung auf Proteinkinasen;^[42,43,47] manche hemmen außerdem auch die Cdc25B-Phosphatase.^[48] Diese Grundgerüste könnten daher interessante Ausgangspunkte für neue Verbindungsbibliotheken zur Entwicklung von Wirkstoffkandidaten sein.

4.2.3. Calanolid-inspirierte Verbindungsbibliotheken

(+)-Calanolid A (Schema 13 A) ist der erste gegen HIV-1 wirksame Naturstoff, und die Substanz befand sich in jüngster Zeit in der klinischen Testphase II/III.^[49] Andere Cumarin-Analoga wie (+)-Inophyllum B^[50] und (+)-Cordatolid A^[51] wurden aus Vertretern der Pflanzengattung *Calophyllum* isoliert und als spezifische Inhibitoren der HIV-1-reversen Transferase identifiziert. Sie enthalten das tetracyclische Dipyrancumarin als gemeinsames Strukturmotiv, tragen aber unterschiedliche Substituenten an C-4.

Liu et al. demonstrierten, dass (+)-11-Demethylcalanolid A (**111**) ebenfalls HIV-1 inhibiert und mit Indinavir, AZT und T-20 synergistisch zusammenwirkt.^[52] Auch 11-Demethyl-12-oxocalanolid A (**112**) zeigte eine inhibierende Wirkung gegen HIV-1, bei einem nun jedoch besseren therapeutischen Index. Vor diesem Hintergrund entwarfen Liu et al. eine Bibliothek auf Basis des tetracyclischen Dipyrancumarins.



Scheme 13. Synthese in Lösung einer Calanolid-inspirierten Verbindungsbibliothek.

cumaringerüsts, um die Untersuchung der Struktur-Wirkungs-Beziehungen vertiefen zu können.^[53] Durch Strukturmodifikationen des tetracyclischen Grundgerüsts wurden neun Diversitätspunkte eingeführt (**113**, Schema 13B).

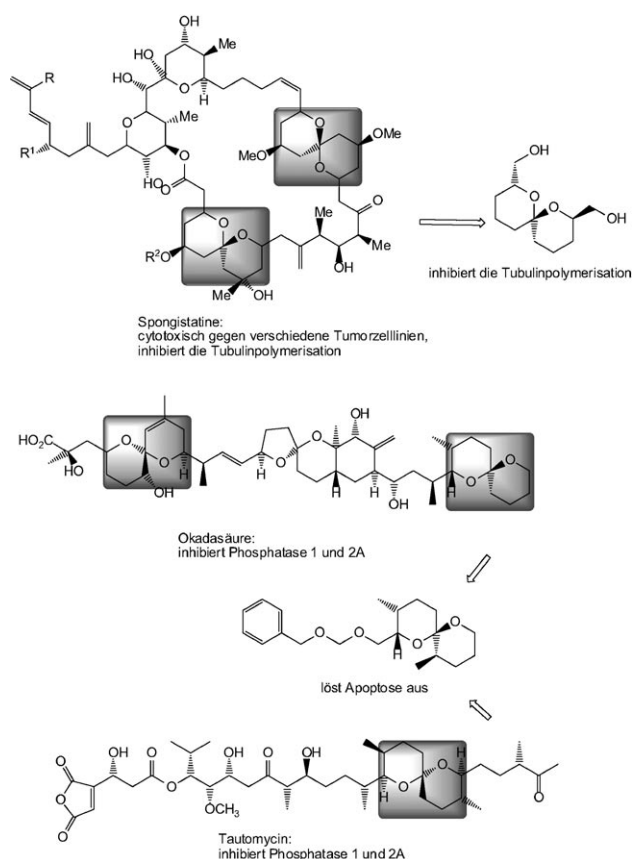
Ausgehend von Phloroglucin (**114**) wurde durch schrittweisen Aufbau der drei anderen Ringe – d. h. Cumarin (Ringe A und B, **115**), 2,3-Dimethylchromanon (Ring C, **101**) und 2,2-Dimethylchromen (Ring D, **117**) – racemisches Calanolid A erhalten (Schema 13C). Die Acylierung von 5,7-Dihydroxy-4-propyl-2H-chromen-2-on (**115**) und der Ringschluss zu **116** gelangen in einer Stufe mithilfe einer Friedel-Crafts-Reaktion mit Tigloylchlorid in Polyphosphorsäure (PPA), die als Katalysator und Lösungsmittel in einem Dienste. Die Verbindungskategorie **117** wurde durch Anellierung von **116** mit 1,1-Diethoxy-3-methyl-2-buten unter Mikrowellenbestrahlung mit Pyridin als Katalysator gewonnen. Die 10,11-*trans*- und 10,11-*cis*-Isomere wurden chromatographisch aus dem Reaktionsgemisch abgetrennt. Insgesamt wurden 85 Verbindungen parallel synthetisiert.

Biologische Tests ergaben, dass die neuartige Verbindung 10-Bromomethyl-11-demethyl-12-oxocalanolid A (**117**, R³ = Br) eine viel stärkere Hemmwirkung und einen besseren therapeutischen Index (EC₅₀ = 2.85 nM, TI > 10526) als Calanolid A aufweist. Modifikationen in Position 10 am Ring C von (+)-Calanolid A können also die Aktivität gegen HIV-1 erhöhen.

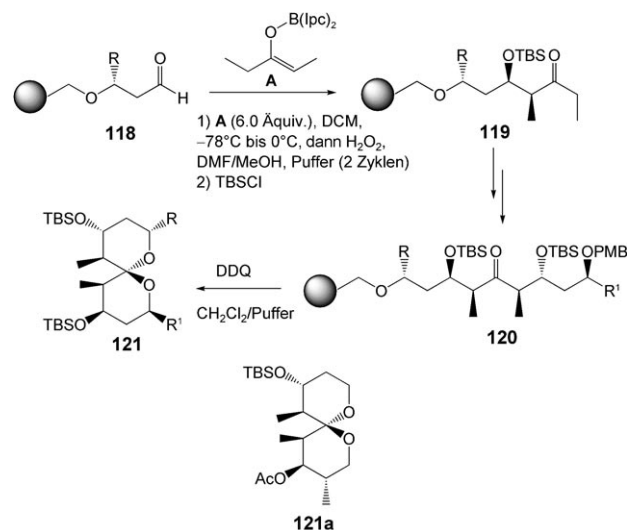
4.2.4. Verbindungsbibliotheken mit einem Spiroacetal als Strukturmotiv

Naturstoffe mit Spiroacetalstrukturen kommen überall im Insektenreich vor und sind für ihre Pheromonaktivität bekannt.^[54] Das Spiro[5.5]ketal bildet ein starres molekulares Gerüst, das in zahlreichen komplexen Naturstoffen mit breitem biologischem Aktivitätsprofil vorliegt (Schema 14). Zum Beispiel enthalten die außerordentlich wirksamen tubulinpolymerisationsinhibierenden Spongistatine,^[55] die Proteinphosphatasehemmer Okadasäure^[56] und Tautomycin^[57] und der HIV-1-Proteaseinhibitor Integramycin das Spiroacetal-Element. Interessanterweise zeigen strukturell vereinfachte Derivate, die aber noch die charakteristische Spiroketal-Gruppierung aufweisen, oft eine vergleichbare biologische Aktivität wie die natürliche Stammverbindung.^[59]

In einer asymmetrischen Festphasensynthese von Spiro[5.5]ketalen^[60] wurde ausgehend vom immobilisierten Aldehyd **118** (Schema 15) durch Aldolreaktion mit dem vorab gebildeten *Z*-Borenolat **A** das enantiomerenangereicherte Aldoladdukt **119** erhalten. Im Unterschied zur Lösungsreaktion waren zwei Zyklen mit sechs Äquivalenten des chiralen Reagens **A** nötig, um den Aldehyd vollständig umzusetzen. Die stereokontrollierte Bildung des *E*-Borenolats an der festen Phase war entscheidend, um eine zweite, *anti*-selektive Aldolreaktion mit einem Satz von Aldehyden ausführen zu können. Hierdurch entstanden die geschützten Bis- β -hydroxyketone **120**, die fortgeschrittene Vorstufen der gewünschten Spiroacetale **121** sind. Abspaltung der PMB-Gruppe und Acetalisierung wurden in einem Schritt durch oxidative Spaltung mit DDQ erreicht, wobei die Spiroketale vom Harz abgelöst wurden. Die Analyse der Diastereome-



Schema 14. Naturstoffe mit Spiroacetalstruktur und vereinfachte Analoga mit biologischer Aktivität.



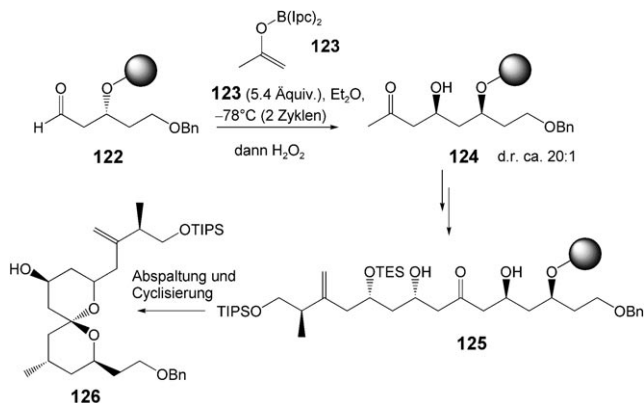
Schema 15. Asymmetrische Festphasensynthese einer Spiroacetal-Bibliothek.

renverhältnisse zeigte, dass es in der zweiten Aldolreaktion sehr vom Aldehydreaktanten abhängt, ob die Produktisomere hoch selektiv entstehen oder nicht.

Verbindung **121a** (Schema 15) erwies sich als Inhibitor der Phosphatasen VHR und PTP1b mit IC₅₀-Werten von 6 bzw. 39 μ M. Darüber hinaus unterbrach die Verbindung **121a**

die korrekte Anordnung des Mikrotubulinnetzwerks in einer humanen Karzinomzelllinie.

In einem ähnlichen Ansatz synthetisierten Paterson et al. an fester Phase ein Fragment des Naturstoffs Spongistatin mit einer zentralen Spiroketalgruppe (**126**, Schema 16),^[61] wobei ein immobilisierter β -Hydroxyaldehyd stereoselektiven Aldolreaktionen unterworfen wurde.^[62] Das chirale Borenolat



Schema 16. Festphasensynthese eines Spongistatin-Fragments.

123 reagierte mit dem harzgebundenen Aldehyd **122** (immobilisiert über einen Silyl-Linker) zu **124**, das mit einem Diastereomerenverhältnis von $>20:1$ erhalten wurde. Auch in diesem Fall wurde nach der Enolatbildung eine zweite Aldolreaktion durchgeführt. Das geschützte Polyol **125** wurde schließlich durch Abspaltung vom Harz und Cyclisierung in die gewünschte Verbindung **126** überführt.

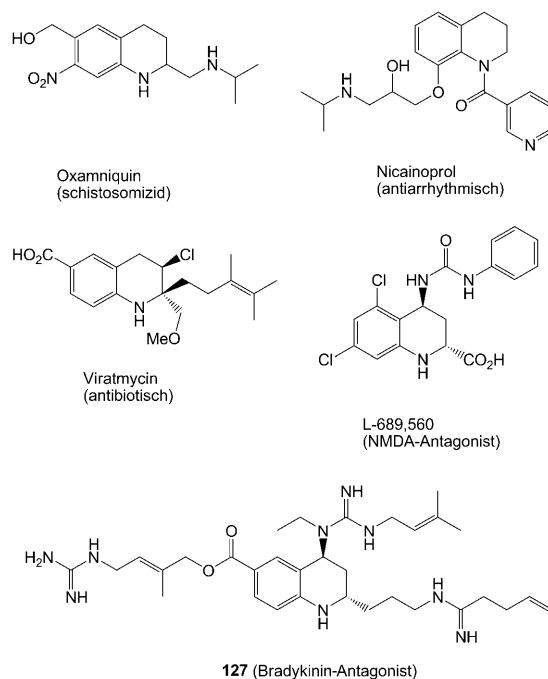
Die in diesem Abschnitt vorgestellten Beispiele verdeutlichen, dass hohe Stereoselektivitäten, wie sie in Lösung erzielt werden, auch mit immobilisierten Substraten möglich sind. Einschränkend gilt allerdings, dass die Aldoladditionen zwei Reaktionszyklen und einen Überschuss an chiralen Reagentien erfordern, um eine vollständige Umsetzung zu erreichen.

4.3. Verbindungsbibliotheken mit Stickstoff-Heterocyclen als Strukturmotiv

Stickstoff-Heterocyclen sind in der Natur weit verbreitet und kommen außerdem viel häufiger in Wirkstoffen vor als Sauerstoff-Heterocyclen.^[63] Es daher nicht verwunderlich, dass viele natürliche und synthetische N-heterocyclische Verbindungen in der Medizin und als Düngemittel eingesetzt werden.^[64] In den letzten Jahren wurden zahlreiche polymergestützte Synthesen von N-heterocyclischen Verbindungen beschrieben, die oft auch für kombinatorische Synthesen geeignet sind (siehe Übersichtsartikel in Lit. [65]). In den folgenden Abschnitten stellen wir einige Bibliotheken vor, die auf stickstoffhaltigen, in Naturstoffen vorkommenden Ringsystemen beruhen.

4.3.1. Verbindungsbibliotheken mit Tetrahydrochinolin als Strukturmotiv

1,2,3,4-Tetrahydrochinoline sind wegen ihrer biologischen Aktivitäten von besonderem Interesse für die medizinische Chemie. Mehrere Vertreter dieser Verbindungsklasse kommen natürlich vor, so findet sich 2-Methyl-1,2,3,4-tetrahydrochinolin im menschlichen Gehirn,^[66] und Discorhabdin C ist ein marines Alkaloid.^[67] Dynemycin, ein natürliches Zytostatikum mit antibiotischer Wirkung, hat eine komplexe Struktur, die auf einem Tetrahydrochinolinsystem aufbaut.^[68] Das 2,4,6-trisubstituierte Tetrahydrochinolin **127** (Schema 17)

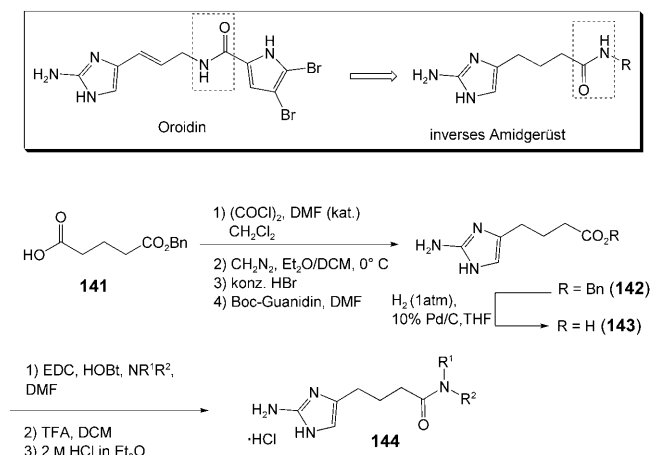


Schema 17. Biologisch aktive Moleküle mit Tetrahydrochinolin-Struktur.

wurde aus *Martinella iquitosensis* isoliert. Es wirkt als Bradykinin-Antagonist und bindet an α -adrenerge, histaminerge und muscarinische Rezeptoren.^[69] Viele relativ einfache synthetische 1,2,3,4-Tetrahydrochinoline werden bereits als Therapeutika eingesetzt oder wurden als potenzielle Wirkstoffe getestet. Beispiele sind Oxamniquin, ein Schistosomizid,^[70] Nicainoprol, ein Antiarrhythmikum,^[71] Viratmycin, ein neues Antibiotikum,^[72] und L-689,560 (Schema 17).

Arya et al. stellten eine Serie mittelgroßer Bibliotheken mit dem Tetrahydrochinolin als Grundgerüst her.^[73] Eine praktische Synthese des enantiomerenreinen Tetrahydrochinolin-Gerüsts gelang durch Anwendung einer asymmetrischen Aminohydroxylierung als Schlüsselschritt (Schema 18).^[74] Das Tetrahydrochinolin wurde an einem bromierten Wang-Harz immobilisiert (**132**) und die *O*-Alloc-Gruppe mit NaOMe in Methanol abgespalten. Strukturdiversität wurde erzeugt, indem die nun freie Alkoholgruppe mit unterschiedlichen Carboxygruppen gekuppelt wurde (**133**). Die *N*-Alloc-Gruppe wurde palladiumkatalysiert entfernt und die freie Aminogruppe anschließend mit Fmoc-geschützten

me vermittelt.^[77] Bakterien, die in Biofilmen leben, haben andere Phänotypen als die frei beweglichen Spezies und entwickeln stärkere Resistenzen gegen viele Antibiotika und Biozide.^[78] Melander et al. untersuchten die Entwicklung von Biofilminhibitoren auf der Basis von Oroidinen, einer Klasse mariner Alkaloide.^[79] Die Aktivität von Oroidin ist in Studien zur bakteriellen Adhäsion und Kolonisierung nachgewiesen worden.^[80] Bei der Konzeption der Bibliothek wurde die Amidbindung, die den Brompyrrolteil des Oroidins mit der 2-Aminoimidazolgruppe verbindet, invertiert (Schema 20).

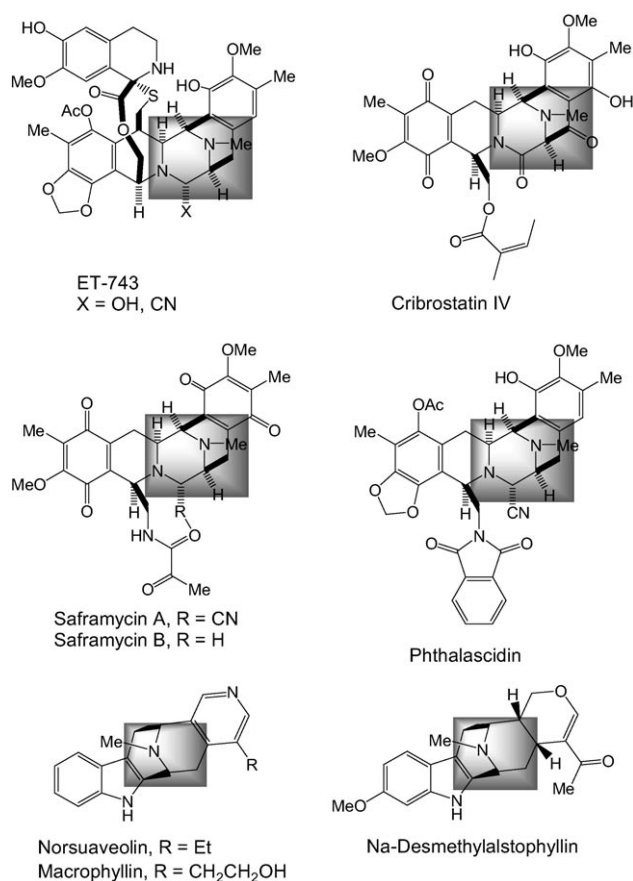


Schema 20. Synthese einer Verbindungsbibliothek ausgehend von der Struktur des Oroidins. EDC = *N*'-(3-Dimethylaminopropyl)-*N*-ethylcarbodiimid.

Die Synthese des Gerüsts begann mit der Umwandlung des Monobenzylesters **141** in das benzylgeschützte α -Bromketon. Dieses Zwischenprodukt wurde zum Boc-geschützten 2-Aminoimidazol **142** cyclisiert, das nach Entschützung und EDC/HOBt-vermittelter Kupplung die linearen Analoga ergab. Im letzten Schritt wurde die Boc-Gruppe mit TFA/ CH_2Cl_2 abgespalten. Die Verbindungen **144** wurden auf die Hemmung der Biofilmbildung durch PAO1 und PA14, zwei Stämme des medizinisch bedeutsamen *c*-Proteobakteriums *Pseudomonas aeruginosa*, getestet. Analoga mit einer langen, linearen Alkylkette hemmten die Biofilmbildung durch PAO1 und PA14 wirksamer als der Naturstoff. Die aktivste Verbindung der Bibliothek war in der Lage, PAO1- und PA14-Biofilme mit niedrigen mikromolaren Konzentrationen aufzulösen.

4.3.4. Naturstoffinspirierte Verbindungsbibliotheken mit Diaza-verbrückten Strukturmotiven

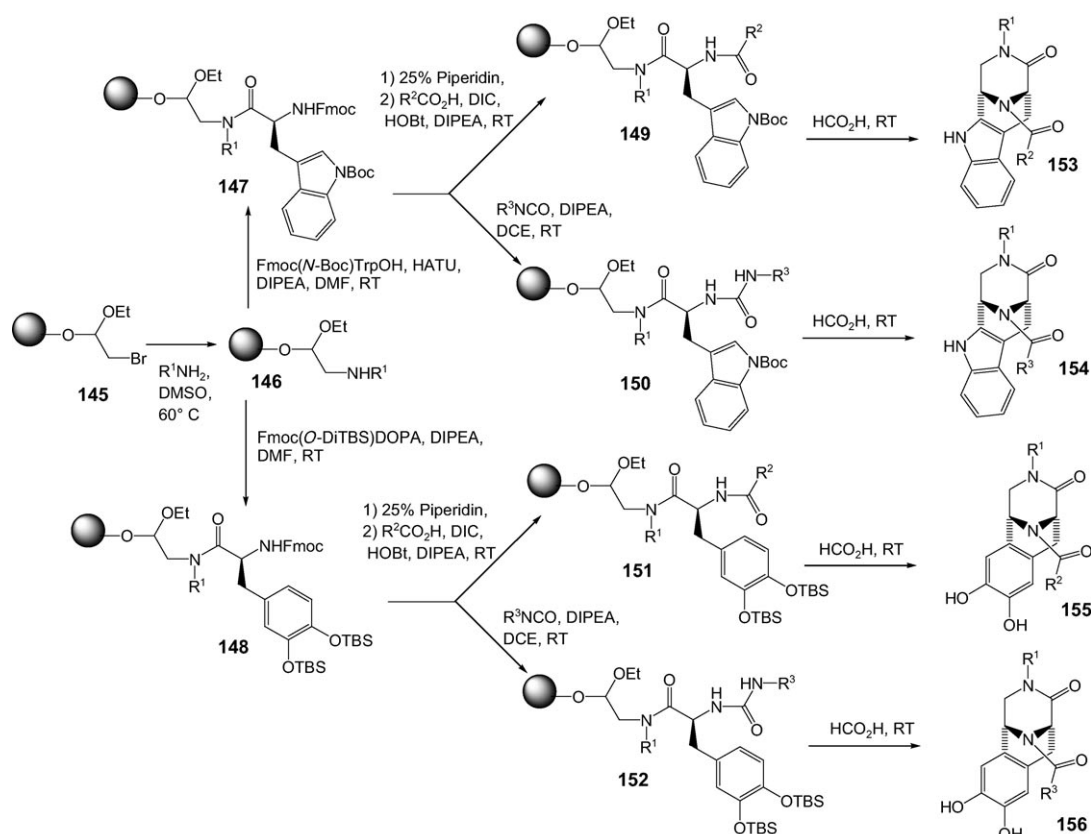
Die Ecteinaschine sind eine Familie mariner Tetrahydroisochinolin-Alkaloide mit stark tumorhemmender Wirkung.^[81] Eines dieser marinen Alkaloide, Yondelis (ET-743, Schema 21 A), wurde 2005 in den USA zur Behandlung von Eierstockkrebs zugelassen. Myers und Lanman^[82] publizierten eine Festphasensynthese einer kleinen Sammlung von Analoga des verwandten (–)-Saframycin A, und auch einige Indolalkaloide mit einem ähnlichen cyclischen Ringsystem wurden identifiziert.^[83] Jedoch erwiesen sich die geringen



Schema 21. Strukturen natürlich vorkommender Verbindungen mit verbrückten Azaheterocyclen.

Vorkommen dieser Naturstoffe und die Komplexität der genannten Synthesemethoden als sehr hinderlich für ihre Weiterentwicklung zu Zytostatika. Vor diesem Hintergrund entwarfen Park und Mitarbeiter eine Synthese zum Aufbau einer Bibliothek niedermolekularer, naturstoffähnlicher Moleküle mit einem gemeinsamen Diaza-verbrückten cyclischen Strukturmotiv, von dem angenommen wurde, dass es eine Reihe von biologischen Aktivitäten zeigt (Schema 22).^[84] Eine der entscheidenden Voraussetzungen für eine parallele kombinatorische Festphasensynthese war, die Reaktionsschritte so zu vereinfachen und zu optimieren, dass hohe Ausbeuten diastereomerenangereicherter niedermolekularer Verbindungen erhalten wurden.

Zu diesem Zweck wurde als erster Schritt der Bibliothekssynthese das Bromacetalharz **145** in Dimethylsulfoxid (DMSO) zum sekundären Amin **146** aminiert. Ein Teil des Harzes wurde mit Fmoc-geschütztem Tryptophan zu **147** umgesetzt, der andere Teil mit Fmoc-geschütztem (*O*-DiTBS)DOPA (DOPA = 3,4-Dihydroxyphenylalanin) zu **148** (Schema 22). Diversität wurde erzeugt, indem in **147** und **148** die Fmoc-Gruppe abgespalten und die nun frei zugängliche Aminogruppe zum Amid oder zum Harnstoffderivat umgesetzt wurde, wobei die Tryptophanderivate **149** und **150** bzw. die DOPA-Derivate **151** und **152** entstanden. Die so erhaltenen Spezies **149–152** wurden mit Ameisensäure behandelt, wodurch in einer Stufe die Abspaltung vom Harz und eine



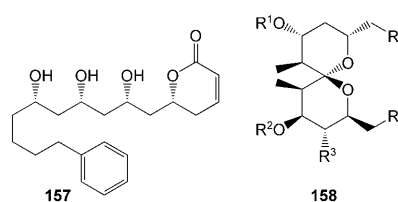
Scheme 22. Synthese einer Verbindungsbibliothek mit Diaza-verbrücktem Strukturmotiv.

Pictet-Spengler-Cyclisierung über in situ erzeugte cyclische Iminiumionen gelang. Der Cyclisierungsschritt war regioselektiv und diastereoselektiv, und die Endprodukte entstanden diastereomerenrein in hoher Ausbeute und Reinheit.

Diese Festphasenparallelsynthese lieferte ohne weitere Reinigung eine Bibliothek aus 384 Verbindungen mit dem 3,9-Diazabicyclo-[3.3.1]non-6-en-2-on als Grundgerüst, das mit Indol- und Dihydroxybenzolringen anelliert und mit diversen Substituenten an den beiden verbrückenden Stickstoffatomen versehen war.

5. Schlussfolgerungen und Ausblick

Die hier diskutierten Beispiele verdeutlichen, wie naturstoffinspierte Verbindungsbibliotheken heute durch unterschiedliche Syntheseformate zugänglich sind. In einer Reihe von Fällen konnten selbst vielstufige Reaktionsfolgen in Lösung oder an fester Phase erfolgreich umgesetzt werden, und etliche bekannte, leistungsfähige Verfahren der organischen Synthese ließen sich an die Randbedingungen einer Festphasensynthese anpassen. Anschauliche Beispiele sind die kombinatorische Synthese aller Isomere eines Naturstoffs (Schema 3, **28–31**), die 14-stufige stereoselektive Synthese des Naturstoffanalogs **157**^[14a] und die Synthese von naturstoffinspierten Spiroacetal-Bibliotheken (z. B. **158**),^[60,61] bei denen iterative enantioselektive Carbonyllalysierungen bzw. Aldolreaktionen als Schlüsseltransformationen Anwendung fanden und die belegen, dass die beiden Grundcharakteristi-



ken von Naturstoffsynthesen – Komplexität und Vielseitigkeit – auf die Synthese von Verbindungsbibliotheken übertragen werden können. Naturstoffinspierte Verbindungsbibliotheken können auf carbocyclischen, oxacyclischen oder azacyclischen Molekülen basieren, und sie enthalten überdurchschnittlich viele Verbindungen, die sich in Tests als biochemisch und biologisch aktiv erweisen.

Da nun nachgewiesen ist, dass die Synthese naturstoffinspielter Verbindungsbibliotheken ein gangbarer Ansatz ist, und auch angesichts des nachwährenden Erfolgs von Naturstoffen, Naturstoffderivaten und Naturstoffanaloga in der Wirkstoffentwicklung, scheint es angezeigt, die Synthese und Evaluierung von naturstoffabgeleiteten und -inspierten Verbindungsbibliotheken als Standardverfahren in die chemisch-biologische und medizinisch-chemische Forschung einzubeziehen. Der Aufwand für die Synthese solcher Verbindungsbibliotheken mag anfangs höher sein als bei der Synthese von rein synthetischen, oftmals achiralen Bibliotheken. Aufgrund der nachgewiesenen biologischen Relevanz und der Vorbewertung von Naturstoffgerüsten kann man

aber erwarten, dass die daraus abgeleiteten Bibliotheken einen höheren Anteil biologisch aktiver Verbindungen enthalten. Daher kann es gut sein, dass sich ein höherer Aufwand am Ende als lohnend erweist.

Unsere Forschungen zur Synthese naturstoffinspirierter Verbindungsbibliotheken wurden von der Deutschen Forschungsgemeinschaft, der Max-Planck-Gesellschaft, der Humboldt-Stiftung, dem Europäischen Fonds für Regionale Entwicklung (Zentrum für Angewandte Chemische Genomik „ZACG“) und der Volkswagen-Stiftung gefördert. Die Namen der beteiligten Mitarbeiter unserer Arbeitsgruppe sind im Literaturteil vermerkt.

Eingegangen am 16. Juli 2008

Online veröffentlicht am 6. März 2009

Übersetzt von Dr. Burkard Neuß, Jülich

- [1] D. Newman, G. Cragg, *J. Nat. Prod.* **2007**, *70*, 461–477.
- [2] a) M. A. Koch, A. Schuffenhauer, M. Scheck, S. Wetzel, M. Casaulta, A. Odermatt, P. Ertl, H. Waldmann, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2005**, *102*, 17272–17277; b) S. Wetzel, A. Schuffenhauer, S. Roggo, P. Ertl, H. Waldmann, *Chimia* **2007**, *61*, 355–360; c) A. Schuffenhauer, P. Ertl, S. Roggo, S. Wetzel, M. A. Koch, H. Waldmann, *J. Chem. Inf. Model.* **2007**, *47*, 47–58.
- [3] a) R. Breinbauer, I. R. Vetter, H. Waldmann, *Angew. Chem.* **2002**, *114*, 3002–3015; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 2878–2890; b) M. A. Koch, H. Waldmann, *Drug Discovery Today* **2005**, *10*, 471–483.
- [4] a) J.-Y. Ortholand, A. Ganesan, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2004**, *8*, 271–280; b) A. M. Boldi, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2004**, *8*, 281–286; c) P. M. Abreu, P. S. Branco, *J. Braz. Chem. Soc.* **2003**, *14*, 675–712; d) J. Nielsen, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2002**, *6*, 297–305; e) P. Arya, S. Quevillon, R. Joseph, C.-Q. Wei, Z. Gan, M. Parisien, E. Sesmilo, P. T. Reddy, Z.-X. Chen, P. Durieux, D. Laforce, L.-C. Campeau, S. Khadem, S. Couve-Bonnaire, R. Kumar, U. Sharma, D. M. Leek, M. Daroszewska, M. L. Barnes, *Pure Appl. Chem.* **2005**, *77*, 163–178.
- [5] a) K. C. Nicolaou, J. A. Pfefferkorn, A. J. Roecker, G.-Q. Cao, S. Barluenga, H. J. Mitchell, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 9939–9953; b) K. C. Nicolaou, J. A. Pfefferkorn, H. J. Mitchell, A. J. Roecker, S. Barluenga, G.-Q. Cao, R. L. Affleck, J. E. Lillig, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 9954–9967; c) K. C. Nicolaou, J. A. Pfefferkorn, S. Barluenga, H. J. Mitchell, A. J. Roecker, G.-Q. Cao, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 9968–9976; d) T.-C. Chou, X. G. Zhang, C. R. Harris, S. D. Kuduk, A. Balog, K. A. Savin, J. R. Bertino, S. J. Danishefsky, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1998**, *95*, 9642–9647; e) T.-C. Chou, H. Dong, A. Rivkin, F. Yoshimura, A. E. Gabarda, Y. Shin Cho, W. P. Tong, S. J. Danishefsky, *Angew. Chem.* **2003**, *115*, 4910–4915; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42*, 4762–4767; f) D. Schinzer, K.-H. Altmann, F. Stuhlmann, A. Bauer, M. Wartmann, *ChemBioChem* **2000**, *1*, 67–70; g) B. Meseguer, D. Alonso-Díaz, N. Griebenow, T. Herget, H. Waldmann, *Angew. Chem.* **1999**, *111*, 3083–3087; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, *38*, 2902–2906; h) L. Bialy, H. Waldmann, *Angew. Chem.* **2002**, *114*, 1819–1822; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 1748–1751; i) C. Rosenbaum, P. Baumhof, R. Mazitschek, O. Müller, A. Giannis, H. Waldmann, *Angew. Chem.* **2004**, *116*, 226–230; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 224–228.
- [6] a) A. Nören-Müller, I. Reis-Corréa, Jr., H. Prinz, C. Rosenbaum, K. Saxena, H. Schwalbe, D. Vestweber, G. Cagna, S. Schunk, O. Schwarz, H. Schiewe, H. Waldmann, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2006**, *103*, 10606–10611; b) I. R. Corrêa, A. Nören-Müller, H.-D. Ambrosi, S. Jakupovic, K. Saxena, H. Schwalbe, M. Kaiser, H. Waldmann, *Chem. Asian J.* **2007**, *2*, 1109–1126; c) A. Nören-Müller, W. Wilk, K. Saxena, H. Schwalbe, M. Kaiser, H. Waldmann, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *120*, 6061–6066; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 5973–5977.
- [7] C. Mang, S. Jakupovic, S. Schunk, H.-D. Ambrosi, O. Schwarz, J. Jakupovic, *J. Comb. Chem.* **2006**, *8*, 268–274.
- [8] C. A. Lipinski, F. Lombardo, B. W. Doming, P. J. Feeney, *Adv. Drug Delivery Rev.* **1997**, *23*, 3–25.
- [9] D. F. Veber, S. R. Johnson, H.-J. Cheng, B. R. Smith, K. W. Ward, K. D. Kopple, *J. Med. Chem.* **2002**, *45*, 2615–2623.
- [10] M. Frederich, M. Tits, L. Angenot, *Chem. Nat. Prod.* **2003**, *39*, 513–519.
- [11] H. Takayama, Y. Iimura, M. Kitajima, N. Aimi, K. Konno, H. Inoue, M. Fujiwara, T. Mizuta, T. Yokota, S. Shigeta, K. Tokuhisa, Y. Hanasaki, K. Katsuura, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1997**, *7*, 3145–3148.
- [12] J. E. Saxton, *Nat. Prod. Rep.* **1993**, *10*, 349–395.
- [13] a) *Combinatorial Chemistry and Molecular Diversity in Drug Discovery* (Hrsg.: E. M. Gordon, J. F. Kerwin, Jr.), New York, Wiley-Liss, **1998**; b) F. Zaragoza Dörwald, *Organic Synthesis on Solid Phase. Supports, Linkers, Reactions*, Weinheim, Wiley-VCH, **2000**; c) *Solid Phase Organic Synthesis* (Hrsg.: K. Burgess), New York, Wiley-Interscience, **2000**; d) M. Mentel, R. Breinbauer, *Top. Curr. Chem.* **2007**, *278*, 209–241; e) C. Watson, *Angew. Chem.* **1999**, *111*, 2025–2031; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, *38*, 1903–1908; f) L. A. Wessjohann, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2000**, *4*, 303–309; g) L. Weber, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2000**, *4*, 295–302; h) P. Beroza, M. J. Suto, *Drug Discovery Today* **2000**, *5*, 364–372; i) C. M. Crews, R. Mohan, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2000**, *4*, 47–53; j) A. Ganesan, *Pure Appl. Chem.* **2001**, *73*, 1033–1039.
- [14] a) A. B. Garcia, T. Leßmann, J. D. Umarye, V. Mamane, S. Sommer, H. Waldmann, *Chem. Commun.* **2006**, 3868–3870; b) J. D. Umarye, T. Leßmann, A. B. Garcia, V. Mamane, S. Sommer, H. Waldmann, *Chem. Eur. J.* **2007**, *13*, 3305–3319; c) V. Mamane, A. B. Garcia, J. D. Umarye, T. Leßmann, S. Sommer, H. Waldmann, *Tetrahedron* **2007**, *63*, 5754–5767.
- [15] T. Leßmann, H. Waldmann, *Chem. Commun.* **2006**, 3380–3389.
- [16] a) R. J. Andersen, D. J. Faulkner, H. Chun-heng, D. Van Duyne, J. Clardy, *J. Am. Chem. Soc.* **1985**, *107*, 5492–5495; b) N. Lindquist, W. Fenical, *J. Org. Chem.* **1988**, *53*, 4570–4574; c) S. Urban, M. S. Butlet, R. J. Capon, *Aust. J. Chem.* **1994**, *47*, 1919–1924; d) S. Urban, L. Hobbs, J. N. A. Hooper, R. J. Capon, *Aust. J. Chem.* **1995**, *48*, 1491–1494; e) S. Urban, R. J. Capon, *Aust. J. Chem.* **1996**, *49*, 711–713; f) M. V. R. Reddy, D. J. Faulkner, *Tetrahedron* **1997**, *53*, 3457–3466; g) R. A. Davis, A. R. Carroll, G. K. Pierens, R. J. Quinn, *J. Nat. Prod.* **1999**, *62*, 419–424; h) M. V. R. Reddy, M. R. Rao, D. Rhodes, M. S. T. Hansen, K. Rubins, F. D. Bushman, Y. Venkateswarlu, D. J. Faulkner, *J. Med. Chem.* **1999**, *42*, 1901–1907.
- [17] M. Marfil, F. Albericio, M. Álvarez, *Tetrahedron* **2004**, *60*, 8659–8668.
- [18] a) D. G. Rivera, O. E. Vercillo, L. A. Wessjohann, *Org. Biomol. Chem.* **2008**, *6*, 1787–1795; b) L. F. Tietze, N. Rackelmann, *Pure Appl. Chem.* **2004**, *76*, 1967–1983; c) A. Ulaczyk-Lesanko, D. G. Hall, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2005**, *9*, 266–276; d) L. F. Tietze, M. E. Lieb, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **1998**, *2*, 363–371.
- [19] a) A. Solinas, M. Taddei, *Synthesis* **2007**, 2409–2453; b) I. R. Baxendale, S. V. Ley, *Curr. Org. Chem.* **2005**, *9*, 1521–1534; c) E. Gonthier, R. Breinbauer, *Mol. Diversity* **2005**, *9*, 51–62; d) H. Salimi, A. Rahimi, A. Pourjavadi, *Monatsh. Chem.* **2007**, *138*, 363–379.
- [20] a) I. R. Baxendale, S. V. Ley, C. Piutti, *Angew. Chem.* **2002**, *114*, 2298–2301; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 2194–2197; b) I. R. Baxendale, S. V. Ley, *Ind. Eng. Chem. Res.* **2005**, *44*, 8588–8592; c) I. R. Baxendale, S. V. Ley, M. Nessib, C. Piutti, *Tetrahedron* **2002**, *58*, 6285–6304.

- [21] a) Z. Luo, Q. Zhang, Y. Oderaotoshi, D. P. Curran, *Science* **2001**, 291, 1766–1769; b) W. Zhang, *Arkivoc* **2004**, 101–109; c) Q. Zhang, D. P. Curran, *Chem. Eur. J.* **2005**, 11, 4866–4880; d) D. P. Curran, T. Furukawa, *Org. Lett.* **2002**, 4, 2233–2235; e) W. Zhang, Z. Luo, C. H.-T. Chen, D. P. Curran, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, 124, 10443–10450; f) Q. Zhang, H. Lu, C. Richard, D. P. Curran, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, 126, 36–37; g) S. Dandapani, M. Jeske, D. P. Curran, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2004**, 101, 12008–12012; h) S. Manku, D. P. Curran, *J. Comb. Chem.* **2005**, 7, 63–68.
- [22] a) D. P. Curran in *The Handbook of Fluorous Chemistry* (Hrsg.: J. A. Gladysz, D. P. Curran, I. T. Horvath), Wiley-VCH, Weinheim, **2004**, S. 101–127; b) D. P. Curran in *The Handbook of Fluorous Chemistry* (Hrsg.: J. A. Gladysz, D. P. Curran, I. T. Horvath), Wiley-VCH, Weinheim, **2004**, S. 128–156.
- [23] W.-H. Jung, S. Guyenne, C. Riesco-Fagundo, J. Mancuso, S. Nakamura, D. P. Curran, *Angew. Chem.* **2008**, 120, 1146–1149; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, 47, 1130–1133.
- [24] A. Ulaczyk-Lesanko, E. Pelletier, M. Lee, H. Prinz, H. Waldmann, D. G. Hall, *J. Comb. Chem.* **2007**, 9, 695–703.
- [25] H. Waldmann, V. Khedkar, H. Dückert, M. Schürmann, I. M. Oppel, K. Kumar, *Angew. Chem.* **2008**, 120, 6975–6978; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, 47, 6869–6872.
- [26] a) F. R. Kinder, Jr., R.-M. Wang, W. E. Bauta, K. W. Bair, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1996**, 6, 1029–1032; b) T. C. McMorris, M. J. Kelner, W. Wang, J. Yu, L. A. Estes, R. Taetle, *J. Nat. Prod.* **1996**, 59, 896–899; c) T. C. McMorris, M. J. Kelner, W. Wang, M. A. Diaz, L. A. Estes, R. Taetle, *Experientia* **1996**, 52, 75–80; d) T. C. McMorris, J. Yu, *Tetrahedron* **1997**, 53, 14579–14590.
- [27] M. C. Pirrung, H. Liu, *Org. Lett.* **2003**, 5, 1983–1985.
- [28] a) A. Padwa, V. P. Sandanayaka, E. A. Curtis, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, 116, 2667–2668; b) A. Padwa, E. A. Curtis, V. P. Sandanayaka, *J. Org. Chem.* **1997**, 62, 1317–1325; c) F. R. Kinder, K. W. Bair, *J. Org. Chem.* **1994**, 59, 6965–6967.
- [29] a) D. L. Flynn, R. V. Devraj, *Curr. Opin. Drug. Dis. Dev.* **1998**, 1, 41–50; b) D. L. Flynn, R. V. Devraj, *Med. Chem. Res.* **1998**, 8, 219–243.
- [30] T. Lessmann, M. G. Leuenberger, S. Menninger, M. Lopez-Cañet, O. Müller, S. Hummer, J. Bormann, K. Korn, E. Fava, M. Zerial, T. U. Mayer, H. Waldmann, *Chem. Biol.* **2007**, 14, 443–451.
- [31] M. L. Bolognesi, F. Lizzi, R. Perozzo, R. Brunc, A. Cavalli, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2008**, 18, 2272–2276.
- [32] O. Kayser, A. F. Kiderlen, S. L. Croft, *Parasitol. Res.* **2003**, 90, S55–S62.
- [33] K. Krohn, H. Hussain, U. A. Viqar, A. M. Ghulam, I. R. Green, *Arkivoc* **2007**, ii, 145–171.
- [34] K. S. Paul, C. J. Bacchi, P. T. Englund, *Eukaryotic Cell* **2004**, 3, 855–861.
- [35] S. P. Gunasekera, P. J. McCarthy, M. KellyBorges, E. Lobkovsky, J. Clardy, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, 118, 8759–8760.
- [36] H. Kogen, T. Kiho, M. Nakajama, Y. Furukawa, T. Kinoshita, M. Inukai, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, 122, 10214–10215.
- [37] B. E. Evans, K. E. Rittle, M. G. Bock, R. M. Dipardo, R. M. Freidinger, W. L. Whitter, G. F. Lundell, D. F. Veber, P. S. Anderson, R. S. L. Chang, V. J. Lotti, D. J. Cerino, T. B. Chen, P. J. Kling, K. A. Kunkel, J. P. Springer, J. Hirshfield, *J. Med. Chem.* **1988**, 31, 2235–2246.
- [38] Übersichtsartikel: a) M. Kaiser, S. Wetzler, K. Kumar, H. Waldmann, *Cell. Mol. Life Sci.* **2008**, 65, 1186–1201; weitere Beispiele für Synthesen naturstoffabgeleiteter und -inspirierter Verbindungsbibliotheken und BIOS: b) D. Brohm, S. Metzger, A. Bhargava, O. Müller, F. Lieb, H. Waldmann, *Angew. Chem.* **2002**, 114, 319–323; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, 41, 307–311; c) D. Brohm, N. Philippe, S. Metzger, A. Bhargava, O. Müller, F. Lieb, H. Waldmann, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, 124, 13171–13178; d) S. Sommer, H. Waldmann, *Chem. Commun.* **2005**, 5684–5686; e) B. Meseguer, D. Alonso-DWaz, N. Griebenow, T. Herget, H. Waldmann, *Angew. Chem.* **1999**, 111, 3083–3087; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, 38, 2902–2906; f) M. A. Sanz, T. Voigt, H. Waldmann, *Adv. Synth. Catal.* **2006**, 348, 1511–1515.
- [39] M. A. Koch, L.-O. Wittenberg, S. Basu, D. A. Jeyaraj, E. Gourzoulidou, K. Reinecke, A. Odermatt, H. Waldmann, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2004**, 101, 16721–16726.
- [40] C. W. Lindsley, L. K. Chan, B. C. Goess, R. Joseph, M. D. Shair, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, 122, 422–423.
- [41] a) M. D. Burke, S. L. Schreiber, *Angew. Chem.* **2004**, 116, 48–60; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, 43, 46–58; b) D. R. Spring, *Org. Biomol. Chem.* **2003**, 1, 3867–3870; c) P. Arya, R. Joseph, Z. Gan, B. Rakic, *Chem. Biol.* **2005**, 12, 163–180; d) Y. Liao, Y. Hu, J. Wu, Q. Zhu, M. Donovan, R. Fathi, Z. Yang, *Curr. Med. Chem.* **2003**, 10, 2285–2316.
- [42] a) D. M. Roll, P. J. Scheuer, G. K. Matsumoto, J. Claedy, *J. Am. Chem. Soc.* **1983**, 105, 6177–6178; b) M. Kobayashi, N. Shimizu, Y. Kyogou, I. Kitagawa, *Chem. Pharm. Bull.* **1985**, 33, 1305–1308; c) M. Kobayashi, N. Shimizu, I. Kitagawa, Y. Kyogoku, N. Harada, H. Uda, *Tetrahedron Lett.* **1985**, 26, 3833–3836; d) H. Nakamura, J. Kobayashi, M. Kobayashi, Y. Ohizumi, Y. Hirata, *Chem. Lett.* **1985**, 713–716; e) F. J. Schmits, S. J. Bloor, *J. Org. Chem.* **1988**, 53, 3922–3925.
- [43] a) R. H. Lee, D. L. Slate, R. Moretti, K. A. Alvi, P. Crews, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1992**, 184, 765–772; b) K. A. Alvi, M. C. Diaz, P. Crews, D. L. Slate, R. H. Lee, R. Moretti, *J. Org. Chem.* **1992**, 57, 6604–6607.
- [44] a) N. Toyooka, M. Nagaoka, H. Kakuda, H. Nemoto, *Synlett* **2001**, 1123–1124; b) N. Toyooka, M. Nagaoka, E. Sasaki, H. Qin, H. Kakuda, H. Nemoto, *Tetrahedron* **2002**, 58, 6097–6101; c) Y. Matsuya, H. Qin, M. Nagaoka, H. Nemoto, *Heterocycles* **2004**, 62, 207–211.
- [45] Y. Matsuya, K. Sasaki, M. Nagaoka, H. Kakuda, N. Toyooka, N. Imanishi, H. Ochiai, H. Nemoto, *J. Org. Chem.* **2004**, 69, 7989–7993.
- [46] H. Nemoto, K. Fukumoto, *Tetrahedron* **1998**, 54, 5425–5464.
- [47] a) H. Fujiwara, K. Matsunaga, M. Saito, S. Hagiya, K.-I. Furukawa, H. Nakamura, Y. Ohizumi, *Eur. J. Pharmacol.* **2001**, 413, 37–45; b) H. Sakamoto, K.-I. Furukawa, K. Matsunaga, H. Nakamura, Y. Ohizumi, *Biochemistry* **1995**, 34, 12570–12575.
- [48] S. Cao, C. Foster, M. Brisson, J. S. Lazob, D. G. I. Kingston, *Bioorg. Med. Chem.* **2005**, 13, 999–1003.
- [49] a) Y. Kashman, K. R. Gustafson, R. W. Fuller, J. H. Cardellina II, J. B. McMahon, M. J. Currens, R. W. Buckheit, S. H. Hughes, G. M. Cragg, M. R. Boyd, *J. Med. Chem.* **1992**, 35, 2735–2743; b) M. T. Flavin, J. D. Rizzo, A. Khilevich, A. Kucherenko, A. K. Sheinkman, V. Vilaychack, L. Lin, W. Chen, E. M. Greenwood, T. Pengsuparp, J. M. Pezzuto, S. H. Hughes, T. M. Flavin, M. Cibulski, W. A. Boulanger, R. L. Shone, Z. Q. Xu, *J. Med. Chem.* **1996**, 39, 1303–1313; c) T. Creagh, J. L. Ruckle, D. T. Tolbert, J. Giltner, D. A. Eiznhamer, B. Dutta, M. T. Flavin, Z. Q. Xu, *Antimicrob. Agents Chemother.* **2001**, 45, 1379–1386; d) D. A. Eiznhamer, T. Creagh, J. L. Ruckle, D. T. Tolbert, J. Giltner, B. Dutta, M. T. Flavin, T. Jenta, Z. Q. Xu, *HIV Clin. Trials* **2002**, 3, 435–450.
- [50] A. D. Patil, A. J. Freyer, D. S. Eggleston, R. C. Haltiwanger, M. F. Bean, P. B. Taylor, M. J. Caranfa, A. L. Breen, H. R. Bartus, R. K. Johnson, *J. Med. Chem.* **1993**, 36, 4131–4138.
- [51] H. R. W. Dharmaratne, S. Sotheeswaran, S. Balasubramaniam, E. S. Waight, *Phytochemistry* **1985**, 24, 1553–1556.
- [52] L. Wang, X. Q. Zhang, H. S. Chen, P. Z. Tao, Y. Li, Y. Bai, J. P. Hu, T. Ma, Z. T. Xing, Z. G. Peng, C. M. Zhou, Q. Gao, X. Q. Zhang, G. Liu, *Acta Pharm. Sin.* **2008**, 43, 707–718.
- [53] T. Ma, L. Liu, H. Xue, L. Li, C. Han, L. Wang, Z. Chen, G. Liu, *J. Med. Chem.* **2008**, 51, 1432–1446.
- [54] F. Perron, K. F. Albizzati, *Chem. Rev.* **1989**, 89, 1617–1661.

- [55] C. W. Phoon, S. Oliver, C. Abell, *Tetrahedron Lett.* **1998**, 39, 7959–7962.
- [56] a) M. G. Organ, J. Q. Wang, *J. Org. Chem.* **2003**, 68, 5568–5574; b) J. Nokami, K. Nomiyama, S. Matsuda, N. Imai, K. Kataoka, *Angew. Chem.* **2003**, 115, 1311–1314; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, 42, 1273–1276; c) J. Nokami, M. Ohga, H. Nakamoto, T. Matsubara, I. Hussain, K. Kataoka, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, 123, 9168–9169; d) M. T. Crimmins, J. D. Katz, *Org. Lett.* **2000**, 2, 957–960; e) M. T. Crimmins, D. G. Washburn, *Tetrahedron Lett.* **1998**, 39, 7487–7490; f) M. Eh, D. Schomburg, K. Schicht, M. Kalesse, *Tetrahedron* **1995**, 51, 8983–8992.
- [57] D. A. Evans, M. J. Dart, J. L. Duffy, D. L. Rieger, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, 117, 9073–9074.
- [58] a) Z. Y. Zhang, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2001**, 5, 416–423; b) T. O. Johnson, J. Ermoloeff, M. R. Jirousek, *Nat. Rev. Drug Discovery* **2002**, 1, 696–709; c) L. Bialy, H. Waldmann, *Angew. Chem.* **2005**, 117, 3880–3906; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, 44, 3814–3839; d) J. L. Todd, K. G. Tanner, J. M. Denu, *J. Biol. Chem.* **1999**, 274, 13271–13280; e) T. Usui, S. Kojima, S. Kidokoro, K. Ueda, H. Osada, M. Sodeoka, *Chem. Biol.* **2001**, 8, 1209–1220; f) T. Hamaguchi, A. Masuda, T. Morino, H. Osada, *Chem. Biol.* **1997**, 4, 279–286.
- [59] A. B. Smith, R. M. Corbett, G. R. Pettit, J. C. Chapuis, J. M. Schmidt, E. Hamel, M. K. Jung, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2002**, 12, 2039–2042.
- [60] a) O. Barun, S. Sommer, H. Waldmann, *Angew. Chem.* **2004**, 116, 3258; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, 43, 3195–3199; b) O. Barun, K. Kumar, S. Sommer, A. Langerak, T. U. Mayer, O. Müller, H. Waldmann, *Eur. J. Org. Chem.* **2005**, 4773–4788.
- [61] I. Paterson, D. Gottschling, D. Menchle, *Chem. Commun.* **2005**, 3568–3570.
- [62] a) I. Paterson, M. Donghi, K. Gerlach, *Angew. Chem.* **2000**, 112, 3453–3457; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, 39, 3315–3319; b) I. Paterson, T. Temal-Laib, *Org. Lett.* **2002**, 4, 2473–2476.
- [63] *Comprehensive Heterocyclic Chemistry* (Hrsg.: A. Katritzky, C. W. Rees, E. F. V. Scriven), Elsevier, Oxford, **1996**.
- [64] a) S. F. Martin in *The Alkaloids*, Bd. 30 (Hrsg.: A. Brossi), Academic, New York, **1987**, S. 251–377; b) J. R. Lewis, *Nat. Prod. Rep.* **1994**, 11, 329–332; c) P. W. Jeffs in *The Alkaloids*, Bd. 19 (Hrsg.: R. G. A. Rodrigo), Academic Press, New York, **1981**, S. 1–80.
- [65] a) L. A. Thompson, J. A. Ellman, *Chem. Rev.* **1996**, 96, 555–600; b) R. C. D. Brown, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* **1998**, 3293–3320; c) J. H. Maarseveen, *Comb. Chem. High Throughput Screening* **1998**, 1, 185–216; d) C. J. Andres, D. J. Denhart, M. S. Deshpande, K. W. Gillman, *Comb. Chem. High Throughput Screening* **1999**, 2, 191–210; e) R. G. Franzén, *J. Comb. Chem.* **2000**, 2, 195–214; f) M. Izumi, *J. Pestic. Sci.*, **2006**, 31, 1–5; g) S. Bräse, C. Gil, K. Knepper, *Bioorg. Med. Chem.* **2002**, 10, 2415–2437.
- [66] T. Niwa, N. Takeda, N. Kaneda, Y. Hashizume, T. Nagatsu, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1987**, 144, 1084–1089.
- [67] a) N. B. Perry, J. W. Blunt, J. D. McCombs, M. H. G. Munro, *J. Org. Chem.* **1986**, 51, 5476–5478; b) N. B. Perry, J. W. Blunt, M. H. G. Munro, *Tetrahedron* **1988**, 44, 1727–1734; c) N. B. Perry, J. W. Blunt, M. H. G. Munro, T. Higa, R. J. Sakai, *J. Org. Chem.* **1988**, 53, 4127–4128; d) S. Nishiyama, J.-F. Cheng, X. L. Tao, S. Yamamura, *Tetrahedron Lett.* **1991**, 32, 4151–4154; e) Y. Kita, H. Tohma, M. Inagaki, K. Hatanaka, T. Yakura, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, 114, 2175–2180; f) J. D. White, K. M. Yager, T. Yakura, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, 116, 1831–1838.
- [68] a) M. Konishi, H. Ohkuma, T. Tsuno, T. Oki, *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, 112, 3715–3716; b) P. A. Wender, C. K. Zercher, S. Beckham, E.-M. Hauhold, *J. Org. Chem.* **1993**, 58, 5867–5869.
- [69] K. M. Witherup, R. W. Ransom, S. L. Varga, S. M. Pitzemberger, V. J. Lotti, W. J. Lumma, US Pat. 5,288,725, **1994**.
- [70] a) G. O. Kokwaro, G. Taylor, *Drug Chem. Toxicol.* **1990**, 13, 347–354; b) L.-J. C. Wong, G.-C. Tsao, J. I. Bruce, S. S. Wang, *Experientia* **1990**, 46, 461–464; c) N. A. El Ragehy, M. F. El Tarras, F. I. Khattah, A. K. S. Ahmad, *Spectrosc. Lett.* **1991**, 24, 81–97; d) K. E. H. El Tahir, A. M. H. Al-Kharji, A. M. Ageel, *Gen. Pharmacol.* **1992**, 23, 131–139; e) R. J. Prankerd, S. M. Ahmed, *J. Pharm. Pharmacol.* **1992**, 44, 259–261; f) R. J. Prankerd, S. M. Ahmed, *J. Pharm. Pharmacol.* **1992**, 44, 261–263.
- [71] a) T. Kimura, S. Imanishi, M. Arita, *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **1989**, 13, 767–773; b) K. Hashimoto, K. Akiyama, H. Mitsuhashi, *Jpn. J. Pharmacol.* **1989**, 49, 245–254; c) E. Rekka, R. M. Mannhold, A. Bast, H. Timmerman, *Biochem. Pharmacol.* **1990**, 39, 95–100; d) J. Weirich, H. Antoni, *Cardiovasc. Pharmacol.* **1990**, 15, 998–1009.
- [72] a) S. Omura, A. Nakagawa, *Tetrahedron Lett.* **1981**, 22, 2199–2202; b) C. L. Francis, A. D. Ward, *Aust. J. Chem.* **1994**, 47, 2109–2117; c) N. M. Williamson, D. R. March, A. D. Ward, *Tetrahedron Lett.* **1995**, 36, 7721–7724.
- [73] a) S. Couve-Bonnaire, D. T. H. Chou, Z. Gan, P. Arya, *J. Comb. Chem.* **2004**, 6, 73–77; b) S. Khadem, R. Joseph, M. Rastegar, D. M. Leek, K. A. Oudatchin, P. Arya, *J. Comb. Chem.* **2004**, 6, 724–734; c) P. Arya, S. Couve-Bonnaire, P. Durieux, D. Laforce, R. Kumar, D. M. Leek, *J. Comb. Chem.* **2004**, 6, 735–745; d) P. Arya, P. Durieux, Z.-X. Chen, R. Joseph, D. M. Leek, *J. Comb. Chem.* **2004**, 6, 54–64; e) U. Sharma, S. Srivastava, M. Prakesch, M. Sharma, D. M. Leek, P. Arya, *J. Comb. Chem.* **2006**, 8, 735–761; f) M. Prakesch, S. Srivastava, D. M. Leek, P. Arya, *J. Comb. Chem.* **2006**, 8, 762–773; g) M. Prakesch, U. Sharma, M. Sharma, S. Khadem, D. M. Leek, P. Arya, *J. Comb. Chem.* **2006**, 8, 715–734.
- [74] a) G. Li, H.-T. Chang, K. B. Sharpless, *Angew. Chem.* **1996**, 108, 449–452; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1996**, 35, 451–454; b) G. Li, H. H. Angert, K. B. Sharpless, *Angew. Chem.* **1996**, 108, 2995–2999; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1996**, 35, 2813–2817.
- [75] D. H. R. Barton, G. W. Kirby, *J. Chem. Soc.* **1962**, 806–817.
- [76] H. E. Pelish, N. J. Westwood, Y. Feng, T. Kirchhausen, M. D. Shair, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, 123, 6740–641.
- [77] D. Davies, *Nat. Rev. Drug Discovery* **2003**, 2, 114–122.
- [78] a) P. Stoodley, K. Sauer, D. G. Davies, J. W. Costerton, *Annu. Rev. Microbiol.* **2002**, 56, 187–209; b) T. B. Rasmussen, M. Givskov, *Int. J. Med. Microbiol.* **2006**, 296, 149–161.
- [79] J. J. Richards, T. E. Ballard, C. Melander, *Org. Biomol. Chem.* **2008**, 6, 1356–1363.
- [80] a) S. R. Kelly, E. Garo, P. R. Jensen, W. Fenical, J. R. Pawlik, *Aquat. Microb. Ecol.* **2005**, 40, 191–203; b) S. R. Kelly, P. R. Jensen, T. P. Henkel, W. Fenical, J. R. Pawlik, *Aquat. Microb. Ecol.* **2003**, 31, 175–182.
- [81] a) J. F. González, E. Cuesta, C. Avendano, *Tetrahedron* **2004**, 60, 6319–6326; b) C. Chan, R. Heid, S. Zheng, J. Guo, B. Zhou, T. Furuuchi, S. J. Danishefsky, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, 127, 4596–4598; c) A. G. Myers, D. W. Kung, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, 121, 10828–10829.
- [82] A. G. Myers, B. A. Lanman, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, 124, 12969–12971.
- [83] Y. Peng, W. Tao, Y. Fuxiang, J. M. Cook, *Tetrahedron Lett.* **1997**, 38, 6819–6822.
- [84] S.-C. Lee, S. B. Park, *J. Comb. Chem.* **2006**, 8, 50–57.
- [85] R. A. Houghten, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1985**, 82, 5131–5135.
- [86] a) K. S. Lam, M. Lebl, V. Krchnák, *Chem. Rev.* **1997**, 97, 411–448; b) R. A. Houghten, C. Pinilla, S. E. Blondelle, J. R. Appel, C. T. Dooley, J. H. Cuervo, *Nature* **1991**, 354, 84–86.