

Niedermolekulare transmembranäre Anionentransporter für biologische Anwendungen

Nathalie Busschaert und Philip A. Gale*

Anionen · Ionentransport · Membranen ·
Supramolekulare Chemie · Wasserstoffbrücken

Im memoriam Hiroshi Tsukube

Niedermolekulare transmembranäre Anionentransporter für potenzielle Anwendungen in der Ionenkanalersatztherapie zur Behandlung von Krankheiten mit dysreguliertem Ionentransport (wie Mukoviszidose) und Krebs (durch Störung chemischer Gradienten in Zellen und Auslösen von Zelltod) sind derzeit ein intensiv bearbeitetes Forschungsgebiet. Dieser Kurzaufsatz fasst jüngste Entwicklungen beim Design niedermolekularer transmembranärer Anionentransporter zusammen. Ein Schwerpunkt liegt auf Studien zur Anwendung dieser Verbindungen in biologischen Systemen.

Einleitung

Der Transport von Anionen durch Phospholipid-Doppelschichten wird von Kanalproteinen vermittelt, die sich durch die Membran ziehen. Diese Vorgänge sind wichtig für die Regulation von pH-Werten, zur Aufrechterhaltung des osmotischen Gleichgewichts und für die zelluläre Signalgebung. Defekte bei Anionentransportproteinen können zu einer Reihe von Ionenkanalkrankheiten („channelopathies“) führen.^[1] Zu diesen Krankheiten gehört die Mukoviszidose (CF; cystic fibrosis), deren Ursache ein dysregulierter Anionentransport durch den CFTR-Anionenkanal in Epithelzellen der Membran ist. Bei Mukoviszidose sind sowohl der Chlorid- als auch der Bicarbonatfluss durch den CFTR-Kanal beeinträchtigt, was sich auf den Transport von Wasser durch die Membran auswirkt und in der Bildung zähen Schleims in Epithelzellen enthaltenden Organen (wie der Lunge; Ursache für chronisches Lungenleiden bei den meisten Mukoviszidose-Patienten) resultiert.^[2] Es wurde vorgeschlagen, dass synthetische Ionenkanäle die Funktion des CFTR-Kanals ersetzen könnten.^[3] Grundlegende, unabhängige Arbeiten der Gruppen von Tomich^[4] und Gokel^[5] über peptidbasierte Anionenkanäle und deren Anwendung in biologischen Systemen stellen wichtige Schritte in diese Richtung dar. Die eleganten Anion- π -Slides, über die Matile und Mitarbeiter berichteten,^[6] demonstrieren, dass auch vollständig synthetische Strukturen als Anionenkanäle fungieren können. In ei-

nem anderen Ansatz entwickelten Smith und Mitarbeiter Harnstoff-funktionalisierte Phospholipide, die, an beiden Seiten der Membran vorliegend, Anionen wie bei einer Staffelübergabe durch die Doppelschicht translozieren.^[7] Allerdings sind viele dieser kanalartigen Verbindungen zu groß, um sie als wirkstoffartig einstufen zu können. Seit jüngstem gibt es daher ein Interesse an der Entwicklung kleiner synthetischer Verbindungen, die in Anlehnung an supramolekulare Konzepte der Anionenbindung Anionen durch Lipiddoppelschichten transportieren können (Abbildung 1). Die Anionenrezeptorchemie ist ein relativ ausgereiftes Gebiet.^[8] Eine breite Vielfalt von Rezeptoren wurde beschrieben, die elektrostatische Wechselwirkungen, Wasserstoffbrücken, Anion- π -Wechselwirkungen, Halogenbindungen und Anion-Dipol-Wechselwirkungen zur Komplexbildung anionischer Gastmoleküle verwenden.^[9] Jedoch wissen wir nur wenig darüber, wie ein niedermolekularer Anionentransporter gestaltet sein muss, um ein anionisches Gastmolekül zu binden, dieses diffusiv durch eine Lipiddoppelschicht zu leiten und auf der anderen Seite der Membran wieder freizusetzen.^[10] Mehr Studien werden benötigt, um zu verstehen, welche molekularen Parameter optimiert werden müssen, um einen effizienten Transport mittels kleiner Moleküle in niedrigen Konzentrationen zu erreichen. In diesem Kurzaufsatz legen wir den Schwerpunkt auf Fortschritte bei der Entwicklung niedermolekularer wirkstoffartiger Anionentransporter, für die eine vielversprechende biologische Aktivität beobachtet wurde. Für einen vollständigen Überblick zum Thema transmembranärer Anionentransport verweisen wir auf die Literatur.^[10]

[*] N. Busschaert, Prof. Dr. P. A. Gale
Chemistry, University of Southampton
Highfield, Southampton, SO17 1BJ (Großbritannien)
E-Mail: philip.gale@soton.ac.uk
Homepage: <http://www.supramolecularchemistry.net>

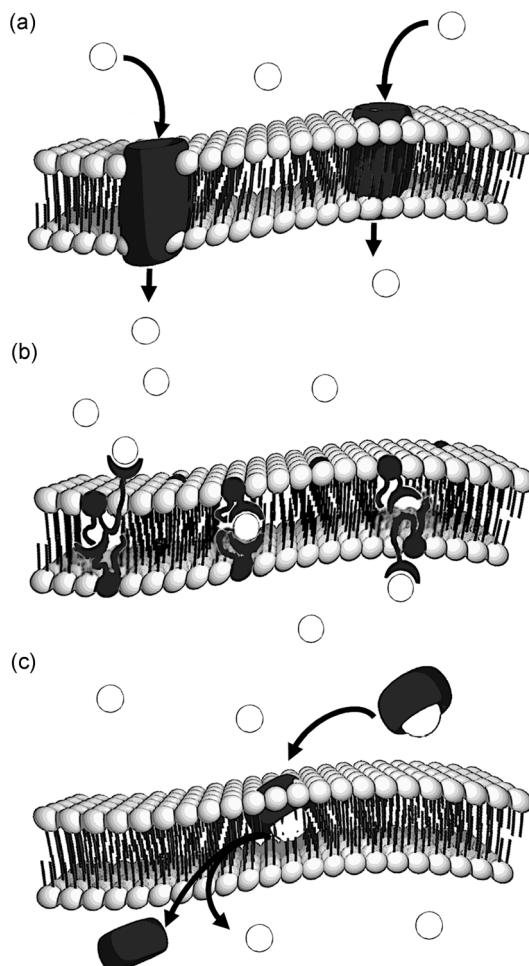
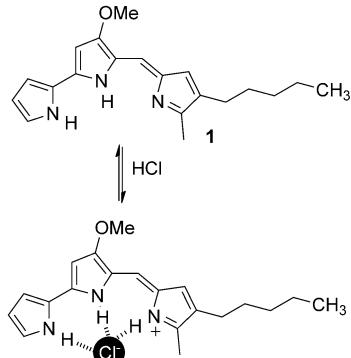


Abbildung 1. Überblick über die verschiedenen Arten von Anionentransportmechanismen. a) Kanalmechanismus: Der Rezeptor bildet eine Pore durch die Membran, durch die die Anionen diffundieren können. b) Staffelmechanismus: Modifiziertes Phospholipid bindet an das Anion und gibt es an ein anderes modifiziertes Phospholipid weiter. c) Beweglicher Träger: Der Rezeptor bindet das Anion, und der Komplex diffundiert an die andere Seite der Membran, wo das Anion freigesetzt wird.

Naturstoffe

Naturstoffe, die in der Lage sind, einen Anionentransport zu vermitteln, können als Inspiration für den Entwurf niedermolekularer Anionentransporter dienen. Allerdings gibt

es nur wenige Beispiele von Naturstoffen, die diese Eigenschaft haben, und ihre Wirkungsweise in biologischen Systemen ist Gegenstand der Debatte.^[11] Die am häufigsten untersuchte Familie von Naturstoffen mit der Fähigkeit zum transmembranären Anionentransport sind die Prodigiosine,^[12] die von *Streptomyces* und *Serratia* produziert werden. Die Struktur des Stamm-Prodigiosins **1** ist in Schema 1 gezeigt. Diese tripyrrolischen Verbindungen haben Antikrebs-eigenschaften. Mehrere Hypothesen wurden hierzu aufge-



Schema 1. Prodigiosin (**1**) bindet HCl durch drei Wasserstoffbrücken und durch elektrostatische Wechselwirkungen.

stellt, z.B. dass die Verbindungen acidische Kompartimente in Zellen durch HCl-Transport deacidifizieren können^[11] und dadurch den pH-Wert des Zytosplasmas von Krebszellen senken und Zelltod auslösen. Die protonierte Form von **1** kann über drei Wasserstoffbrücken an Chlorid koordinieren. Der entstehende Komplex ist fettlöslich und kann als Symporter für H^+/Cl^- agieren und damit einen Mechanismus für die Depolarisierung acidischer Kompartimente in Zellen bereitstellen. Neuere Studien haben gezeigt, dass Prodigiosin über einen Anionenaustauschprozess (Antiportprozess) als Chloridtransporter wirkt^[13] und Bicarbonatanionen transportieren kann.^[14] Die Verbindung ist bei niedrigen Konzentrationen wirksam (der Transport von Chlorid und Bicarbonat wurde in POPC-Liposomen bei Konzentrationen von 0.005 % Transporter bezüglich Lipid beobachtet)^[14] und übertrifft damit viele der unten beschriebenen synthetischen Systeme. Viele der in diesem Gebiet durchgeföhrten Studien werden in POPC- oder POPC/Cholesterin-Membranen durchgefördert. Diese sind zwar nützliche Modelle in frühen



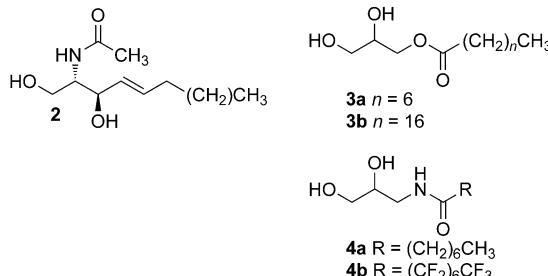
Philip A. Gale ist Professor für supramolekulare Chemie und Leiter des Chemieinstituts der University of Southampton. Er promovierte an der University of Oxford und absolvierte ein Postdoktorat an der University of Texas in Austin (Fulbright Fellow, 1995). 1997 wurde er Royal Society University Research Fellow in Oxford, bevor er 1999 als Lecturer an die University of Southampton wechselte. Seine Forschungen gelten der Erkennung, der Sensorik und dem Transmembrantransport anionischer Spezies.



Nathalie Busschaert studierte an der Universität Leuven, Belgien, und promoviert derzeit bei Prof. Philip A. Gale (University of Southampton) und Prof. Young-Tae Chang (Singapore Bio-Imaging Consortium) über Anionenerkennung und transmembranären Anionentransport.

Forschungsstadien, jedoch kann das Verhalten von Transportern in biologischen Membranen ganz anders sein.

Kürzlich entdeckten Davis und Mitarbeiter zwei weitere Beispiele von Naturstoffen, die, über einen diskreten molekularen Trägermechanismus, als transmembranäre Anionentransporter wirken können. Beide Naturstoffe verwenden OH...Anion-Wechselwirkungen zum Transport anionischer Gastmoleküle. Das erste Beispiel ist Sphingolipidceramid **2**, für das zuvor nachgewiesen wurde, dass es in hohen Konzentrationen Poren bildet und die Freisetzung von proapoptotischen Proteinen aus Mitochondrien auslöst.^[15] Anhand von Experimenten in EZPC/Liposomen konnten Davis und Mitarbeiter zeigen, dass **2** zur Bindung und zum Trans-



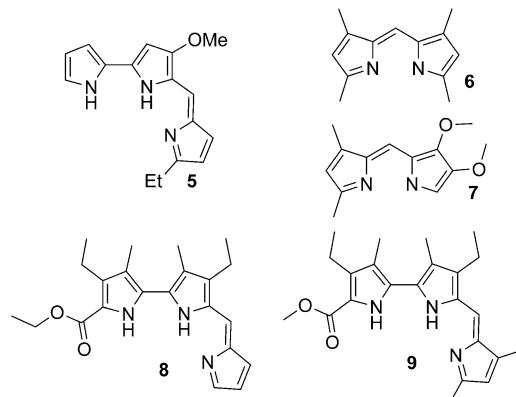
port von Chlorid und Bicarbonat in einem Antiportprozess befähigt ist, und zwar bei Konzentrationen (1 Mol-% Transporter bezüglich Lipid) unter der zur Selbstassoziation zu Poren erforderlichen Konzentration. ¹H-NMR-Experimente in CD_2Cl_2 sprechen dafür, dass das Chlorid an die beiden OH-Gruppen und die NH-Gruppe bindet.^[16] Auf ähnliche Weise fanden Davis und Mitarbeiter, dass die natürlich vorkommenden Monoacylglycerole **3a** und **3b** beim selben Transporter/Lipid-Verhältnis Chlorid über einen Chlorid/Nitrat-Antiportprozess durch EYPC-Membranen transportieren können, wobei die Anionen über OH... A^- -Wasserstoffbrücken gebunden werden. Einfache Modifikationen, die einen zusätzlichen Wasserstoffbrückendonor und eine perfluorierte Kette einführen, ergaben die synthetischen Analoga **4a** und **4b**, deren Anionentransportvermögen das des Naturstoffs **3a** übertraf. Dieses Beispiel illustriert, wie nützlich die Untersuchung von Naturstoffen als Inspiration für die Entwicklung neuer Anionophore sein kann.^[17]

Synthetische Systeme

1. Prodigiosin-Analoga

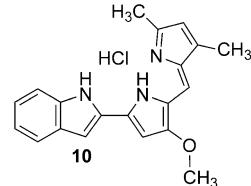
Da die Prodigiosine die am häufigsten untersuchte Familie von Naturstoffen mit signifikantem Anionentransportvermögen sowie gut dokumentierter Antikrebs- und immunsuppressiver Aktivität ist, überrascht es nicht, dass mehrere Forschungsgruppen an dieser Verbindungsklasse geforscht haben. 2005 untersuchten Sessler, Magda und Mitarbeiter die Chloridtransporteigenschaften einer Reihe strukturell verwandter acyclischer pyrrolischer Systeme, einschließlich der Prodigiosine **5**, **8** und **9** und der Dipyrrro-

methene **6** und **7**.^[18] In Vesikelstudien wurde für die Chloridtransportaktivität dieser Verbindungen die Reihenfolge **5** > **8** ≈ **6** > **7** > **9** gefunden. Der Transport verlief dabei hauptsächlich über einen H^+/Cl^- -Symportmechanismus. In-



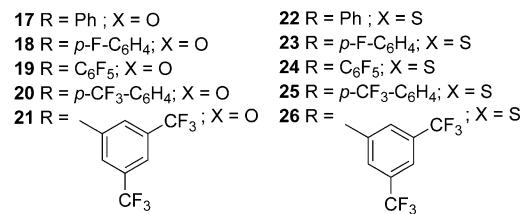
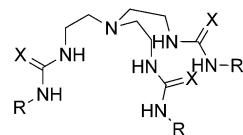
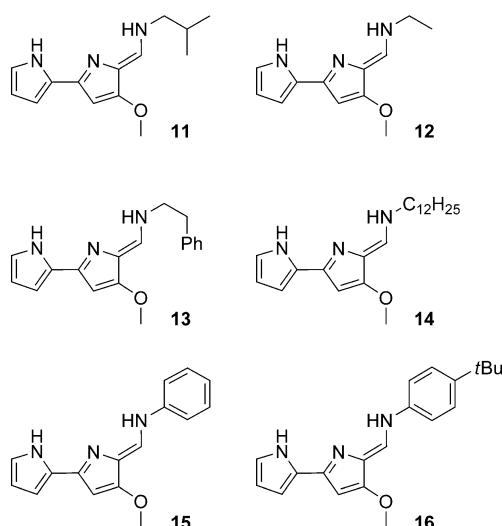
teressanterweise war Prodigiosin **5** beträchtlich aktiver als die anderen Analoga. Die Antikrebseigenschaften der Verbindungen wurden in A549- (Lungenkrebs) und PC3-Zelllinien (Prostatakrebs) untersucht. Die beobachtete Reihenfolge der antiproliferativen Aktivität deckte sich mit der Anionentransportaktivität der Verbindungen.

In einer neueren Studie fanden Quesada und Mitarbeiter, dass das synthetische, einen Indolring enthaltende Prodiginin Obatoclax (GX15-070; **10**; entwickelt von der Fa. Gemin X,



jüngst durch Cephalon akquiriert) eine vielversprechende Aktivität in präklinischen und klinischen Tests an verschiedenen Krebstypen zeigt und außerdem Chlorid- und Bicarbonationen durch Lipiddoppelschichtmembranen transportiert und acidische Kompartimente in GLC4-Krebszellen (kleinzelliges Lungenkarzinom) depolarisieren kann. Diese Ergebnisse liefern weitere Belege dafür, dass die Antikrebsaktivität der Prodigiosine auf ihre Fähigkeit zur Änderung des pH-Wertes von Tumorzellen durch Anionentransportprozesse und das Auslösen von Zelltod zurückzuführen ist.^[19]

Quesada und Mitarbeiter zeigten ebenfalls, dass die strukturell verwandten und synthetisch einfacher zugänglichen Tambjamin-Alkaloide **11**–**16** zum transmembranären Anionentransport befähigt sind.^[20] Der pK_s -Wert dieser Verbindungen liegt bei ungefähr 10, im Vergleich zu 7.2 für Prodigiosin. Das bedeutet, dass diese Verbindungen bei physiologischen pH-Werten protoniert bleiben, und Experimente mit Modellmembransystemen zeigten, dass sie, anders als die Prodigiosine, schlechte HCl -Cotransporter sind. Hin-



gegen erwiesen sich die Verbindungen als wirksame $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -Antiporter, wobei Verbindung **16** die höchste Aktivität zeigte. Die biologische und Antikrebsaktivität der Tambjamine wurde auch an GLC4-Zellen untersucht, die mit dem pH-abhängigen Farbstoff Acridinorange gefärbt waren. Es wurde gefunden, dass die Verbindungen **14** und **16** (die beiden aktivsten Transporter) die acidischen Kompartimente dieser Zellen deacidifizieren konnten. Ähnliche Ergebnisse wurden mit **11** und **15** erhalten, wohingegen **12** ein schlechtes Anionophor war und die Kompartimente nicht deacidifizierte. Die Autoren schlagen vor, dass der Bicarbonattransport für die pH-Änderungen in den Zellen verantwortlich sein könnte. Jüngste Studien an Tambjaminen zeigten außerdem eine Korrelation zwischen Lipophilie und Transportvermögen auf.^[21]

2. Antikrebsaktivität

Mit Blick auf die offensichtliche Verbindung zwischen Anionentransport und Antikrebsaktivität der Prodigiosine und ihrer Analoga gab es ein verstärktes Interesse an der Entwicklung anderer synthetischer Verbindungen mit ähnlichen Eigenschaften, die nicht auf der Struktur des Prodigiosins basieren. Besonders interessant waren Systeme basierend auf Tris(2-aminoethyl)amin (tren). 2009 zeigten Smith und Mitarbeiter in einer Serie von U-Rohr-Experimenten, dass tren-basierte Trisamide in der Lage sind, HCl durch eine organische Schicht zu transportieren.^[22] Gale und Mitarbeiter konnten kürzlich zeigen, dass tren-basierte Tristhioharnstoffe, z.B. **22**, Harnstoffanaloga wie **17** sowohl als Chlorid/Nitrat- wie auch als Chlorid/Bicarbonat-Antiporter deutlich übertreffen.^[23] Fluorierung der Phenylringe erhöhte die Lipophilie der Verbindungen (eine gängige Strategie zur Verbesserung der Bioverfügbarkeit von Molekülen). Die fluorierten Verbindungen zeigten eine signifikant erhöhte Transporteffizienz in Vesikeln und *in vitro*. Die besten Transporter (z.B. **25**) depolarisierten acidische Kompartimente in GLC4-Zellen und reduzierten die Zellviabilität in einer Reihe von Krebszelllinien. Versuche an GLC4-Zellen, die mit dem Farbstoffe

Hoechst 33342 gefärbt waren, bestätigten, dass die aktiven Transporter den Zelltod dieser Zellen auslösten (Abbildung 2).^[24]

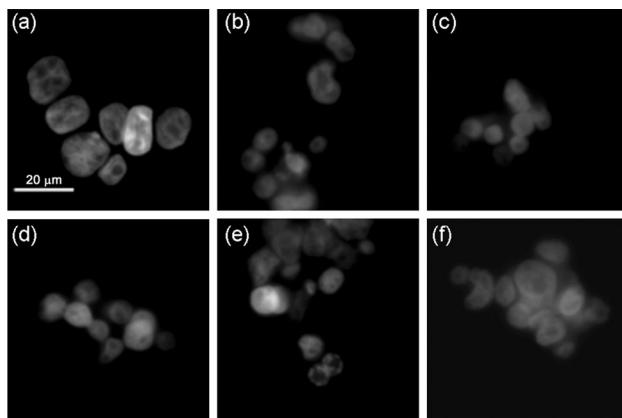
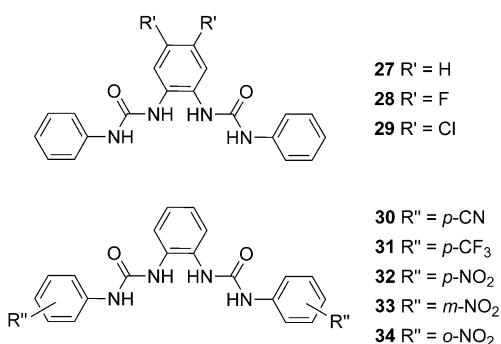


Abbildung 2. Mit Hoechst 33342 angefärbte GLC4-Zelllinie (blaue Anfärbung des Zellkerns) nach Einwirkung verschiedener Rezeptoren (24 h): a) unbehandelte Zellen, b) **18**, c) **20**, d) **23**, e) **24**, f) **25**. a, b) Zellen mit normaler Zellkernmorphologie; c-f) Zellen mit kondensierten Zellkernen und „bohnenförmige“ Zellen (Indiz für Apoptose). Nachdruck mit Genehmigung aus Lit. [24].

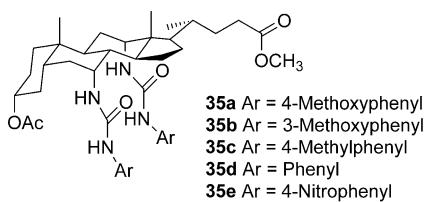
In einer jüngsten Veröffentlichung zeigten Gale und Mitarbeiter, dass Bisharnstoffe basierend auf *ortho*-Phenyldiamin (OPD) **27-34** wirksame Transporter für verschiedene Anionen, einschließlich Chlorid, Nitrat, Bicarbonat, Fumarat und Maleat sind.^[25] Modellversuche mit Phospholipidvesikeln ergaben, dass die Einführung einer elektronenziehenden Gruppe wie NO_2 (**32**) oder CN (**30**) das Anionentransportvermögen dieser Rezeptoren drastisch verbessern kann. Die Autoren konnten für die OPD-basierten Verbindungen auch Antitumoraktivität *in vitro* nachweisen. Ähnlich wie im Fall der oben diskutierten tripodalen Rezeptoren **17-26** ergaben Versuche an A375-Melanomzelllinien, die mit Acridinorange angefärbt waren, dass die Rezeptoren **28**, **29**, **31**, **32** und **33** zelluläre Kompartimente deacidifizieren. Tests der gleichen Zelllinie, diesmal mit Hoechst 33342 angefärbt, bestätigten, dass die Bisharnstoffe den Zelltod von Krebszellen auslösen können. Die wirksamsten Anionentransporter wiesen auch die höchste Antikrebsaktivität auf, was die Hypothese weiter stützt, dass die anionen-



transportinduzierte Änderung des pH-Wertes von Tumorzellen in einer vielversprechenden Antikrebsaktivität resultieren kann. Für Verbindung **34** wurde gefunden, dass sie Antikrebsaktivität aufweist, Organellen jedoch nicht deacifiziert und deshalb nach einem alternativen Mechanismus agieren könnte.

3. Behandlung von Mukoviszidose und ähnliche Anwendungen

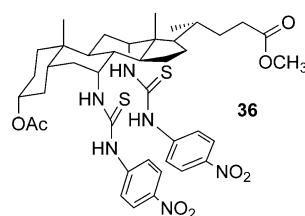
Neben der möglichen Verwendung in der Krebstherapie liegt der Schwerpunkt der Studien zum Anionentransport auf der Entwicklung von Kanalersatztherapien für Mukoviszidose. Bei Mukoviszidose-Patienten ist der Chlorid- und Bicarbonat-Transport durch die Zellmembran beeinträchtigt, einhergehend mit der Bildung einer dicken Schleimschicht, insbesondere auf Epithelzellen. Es wurde vorgeschlagen, dass synthetische wirkstoffartige Moleküle, die als transmembranäre Anionentransporter wirken, zur Behandlung dieses Zustands genutzt werden könnten. Tatsächlich zeigten einige der ersten und wirksamsten synthetischen Anionophore, die von Davis und Mitarbeitern entwickelt wurden, diesbezüglich vielversprechende Ergebnisse. Diese Systeme bestehen aus einem Cholsäure-Gerüst mit Wasserstoffbrückendonorgruppen. In einer richtungsweisenden Studie berichteten Smith, Davis und Sheppard über die Anionenbindungs- und Anionentransportfähigkeiten einer Serie von Cholapoden **35a-e**.^[26] Die Affinitätskonstanten für Chlorid wurden in



wassergesättigter Chloroformlösung gemessen und reichten von $3.4 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ (**35a**) bis $5.2 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$ (**35e**). Chloridtransportstudien mit POPC/Cholesterin-Vesikeln (7:3 ergaben, dass **35e** der deutlich beste Transporter dieser Serie für Chlorid/Nitrat ist. Die Autoren konnten mithilfe der Ussing-Kammer-Technik zeigen, dass **35e** Chlorid auch in MDCK-Epithelien (Madin Darby canine kidney) transportiert, was als ein erster Hinweis galt, dass diese Klasse von Verbin-

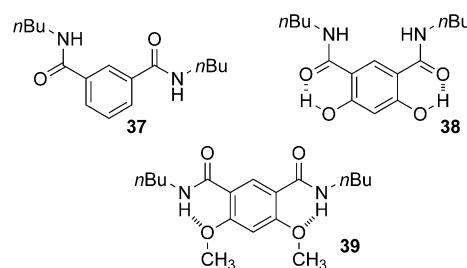
dungen für die Behandlung von Mukoviszidose nützlich sein könnte.

Smith, Davis und Mitarbeiter fanden in Struktur-Aktivitäts-Studien, bei denen die Substituenten am Cholapod-Gerüst variiert und die Transporteigenschaften der erhaltenen Verbindungen gemessen wurden,^[27] dass Verbindung **36** in



Konzentrationen von nur 1:250 000 (bezogen auf Lipid; entspricht weniger als zwei Transportermolekülen pro Vesikel) Chlorid durch POPC/Cholesterin(7:3)-Membranen transportieren kann. Die Autoren fanden, dass eine Erhöhung der Lipophilie des Cholapoden keinen Einfluss auf die Geschwindigkeit des Transports hat und dass positiv geladene Steroide niedrige Transportaktivitäten aufweisen. Die Studien wurden so durchgeführt, dass die Cholapoden vor den Transportexperimenten in die Vesikeln eingeführt wurden. In einer anderen Studien wurde *trans*-Decalin als Grundgerüst für die Anbringung von Harnstoffgruppen verwendet. Diese Systeme zeigten ebenfalls hohe Transportaktivitäten bei niedrigen Konzentrationen,^[28] über ihre biologische Aktivität wurde bisher aber nicht berichtet.

Über die letzten Jahre wurden weitere Strukturgerüste entwickelt, die Anionentransportfähigkeit zeigen, einschließlich einer Serie von Calixpyrrolen^[29] und Isophthalamiden. Davis, Gale, Quesada und Mitarbeiter haben gezeigt, dass die Präorganisation eines Transporters dramatische Auswirkungen auf seine Anionenaffinität und Anionentransportfähigkeit haben kann.^[30] Unter anderem wurden die Isophthalamide **37-39** beschrieben. Verbindung **38** enthält



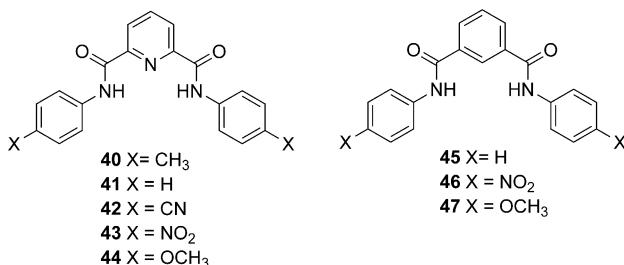
Hydroxygruppen in 4- und 6-Position, die eine Präorganisation der Amide zu einer *syn-syn*-Konformation bewirken, die für die Komplexierung von Anionen geeignet ist. Verbindung **39** enthält Methoxygruppen in 4- und 6-Position, die Wasserstoffbrücken mit den Amidgruppen eingehen; diese Verbindung bindet daher keine Anionen und wurde als Kontrolle verwendet. Durch Bestimmung der Stabilitätskonstanten mittels $^1\text{H-NMR}$ -Titration in CD_3CN wurde die Affinität von **37** und **38** für Chlorid, Bromid und Iodid aufgezeigt, und es

wurde nachgewiesen, dass der präorganisierte Rezeptor eine deutlich höhere Anionenaffinität hat (Tabelle 1). Die höhere Affinität könnte auch auf die Polarisation der Amidbindungen durch die intramolekularen Wasserstoffbrücken in **38** zurückzuführen sein. Verbindung **38** erwies sich als potenter Chlorid/Nitrat-Austauscher in EYPC-Vesikeln, wohingegen **37** und **39** inaktiv waren.

Tabelle 1: Assoziationskonstanten K_a [M^{-1}] für **37** und **38** für die Bindung von Chlorid, Bromid und Iodid (Tetrabutylammoniumsalze), gemessen bei 298 K in CD_3CN (Fehler < 10%).

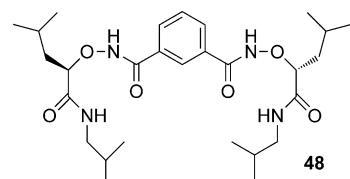
Verbindung	Cl^-	Br^-	I^-
37	195	60	15
38	5230	716	152

Gokel und Mitarbeiter untersuchten auch das Anionentransportvermögen von Isophthalamiden und Pyridin-Analoga (**40–47**).^[31] Die Autoren fanden, dass diese Verbindungen Chlorid durch DOPC-Membranen transportieren und



dass diejenigen Verbindungen mit der höchsten Anionenbindungsaffinität auch das höchste Anionentransportvermögen aufweisen. Ferner ließen Experimente mit planaren Lipiddoppelschichten darauf schließen, dass der potente Transporter **43** durch die Bildung eines Kanals oder einer Pore in der Lipiddoppelschicht wirkt. In einer neueren Studie nutzten Gokel und Mitarbeiter diese Verbindungen, um den Transfer von Plasmid-DNA in *E. coli* zu vermitteln. Es wurde gezeigt, dass sowohl die Isophthalamide als auch die Pyridin-Analoga als Transformationsreagentien für *E. coli*-Zellen wirken können; die höchsten Aktivitäten wurden dabei für **44** und **47** beobachtet. Obwohl die Transformationseffizienz eher moderat ist, konnten diese Studien ein interessantes neues Ziel für die biologische Anwendung von Anionentransportern aufzeigen.

Yang und Mitarbeiter untersuchten ein Isophthalamid mit zwei α -Aminoxäure-Einheiten (**48**).^[32] Die Autoren zeigten, dass **48** in $CDCl_3$ eine Vielzahl von Gastmolekülen binden kann und dabei eine gute Selektivität für Chlorid gegenüber anderen häufigen Anionen aufweist. Die Fähigkeit der α -Aminoxyverbindung, Chlorid durch Lipiddoppelschichten zu transportieren, wurde in Modellvesikeln sowie in lebenden MDCK-Zellen demonstriert. Patch-Clamp-Experimente mit Riesenliposomen lassen darauf schließen, dass die Transportaktivität von **48** auf die Bildung von Ionenkanälen

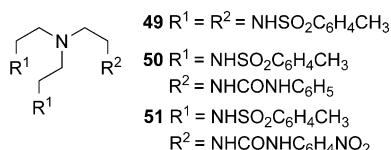


zurückzuführen ist.^[32] In einer separaten Studie untersuchten die Autoren die biologische Aktivität von **48** in größerem Detail.^[33] Verschiedene zellbasierte Experimente zeigten, dass **48** das Membranpotential lebender Zellen durch Chloridtransportprozesse verändert kann. Dies ist wichtig, weil Änderungen im Zellmembranpotential als Ergebnis eines Ionentransports das Verhalten der natürlichen Ionenkanäle in lebenden Zellen beeinflussen werden; diese Tatsache macht es schwierig, den Einfluss eines synthetischen Anionentransporters auf biologische Systeme vorauszusagen. Ein Rezeptor, der in Vesikelstudien als Antiporter wirkt, muss dies nicht notwendigerweise auch in lebenden Zellen tun, da der durch den synthetischen Transporter vermittelte Chloridtransport durch eine Vielzahl anderer zellulärer Prozesse kompensiert werden kann. Zum Beispiel ist bekannt, dass hohe extrazelluläre K^+ -Konzentrationen starke Auswirkungen auf das Membranpotential weicher Muskelzellen haben und auf diese Weise spannungsgesteuerte Ca^{2+} -Kanäle aktivieren und Muskelkontraktion verursachen. Yang und Mitarbeiter konnten zeigen, dass die Verbindung **48** Aortenringe der Maus zu relaxieren vermag (die durch hohe extrazelluläre K^+ -Konzentrationen vorkontrahiert waren), vermutlich durch Repolarisierung des Membranpotentials durch Chloridtransport und Deaktivierung spannungsgesteuerter Ca^{2+} -Kanäle. Diese Ergebnisse legen den Schluss nahe, dass die Anionentransportaktivität synthetischer Rezeptoren viele andere zelluläre Prozesse beeinflussen kann und verweist auf eine mögliche Anwendung künstlicher Anionentransporter zur Behandlung von Bluthochdruck (der auf Muskelrelaxation beruht).

4. Flippase-Aktivität

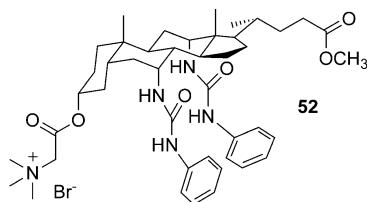
Ein Prozess, der mit dem transmembranären Anionentransport konkurriert oder diesen komplementieren kann, ist die so genannte „Flippase“-Aktivität. Bei diesem Vorgang interagiert der Rezeptor mit einer Phospholipid-Kopfgruppe der Doppelschicht und transloziert das Phospholipidmolekül von der äußeren zur inneren Deckschicht der Membran und umgekehrt. In biologischen Systemen sind die Phospholipide asymmetrisch zwischen den beiden Deckschichten der Membran verteilt, und diese Asymmetrie spielt eine entscheidende Rolle bei einer Reihe zellulärer Funktionen wie Exozytose, Membranfusion, Blutgerinnung und Signaltransduktion.^[34] Die asymmetrische Verteilung wird normalerweise von spezialisierten Proteinen aufrechterhalten, und die Entwicklung einer synthetischen Flippase könnte für therapeutische Zwecke nützlich sein.

In ersten Arbeiten auf diesem Gebiet entwickelten Smith und Mitarbeiter das tren-basierte Sulfonamid **49** und zeigten,



dass es mit Phospholipiden interagieren kann und sowohl in Modellvesikeln als auch in Erythrozyten Flippase-Aktivität für Phosphatidylcholin (PC) aufweist.^[35] In späteren Studien wurde gefunden, dass die Harnstoff-derivatisierten Sulfonamide **50** und **51** Phosphatidylserin (PS) durch die Membranen von Liposomen und Erythrozyten translozieren, nicht aber durch die Plasmamembran nukleierter Zellen. Die Autoren führen dies auf die geringe Aufenthaltszeit der Rezeptoren in der Membran zurück, einhergehend mit einer schnellen Verteilung von **50** und **51** in den Membranen interner Organellen in nukleierten Zellen; dieser Prozess kann in roten Blutkörperchen nicht stattfinden.^[35]

Smith und Davis untersuchten auch die Flippase-Aktivität der Cholapoden **35d** und **52**.^[36] Es wurde gezeigt, dass das neutrale Cholapod **35d** PC durch Vesikelmembranen trans-

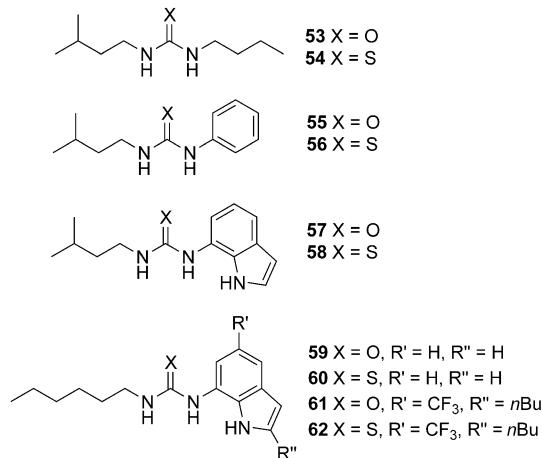


loziert, nicht aber PS. Auf der andere Seite wurde gezeigt, dass das kationische Cholapod **52** eine starke Translokation von PS sowohl durch Liposomen- als auch Erythrozytmembranen vermittelt. Die Autoren untersuchten auch die potenziellen therapeutischen Eigenschaften von **52**. Der Einfluss von **52** auf die Blutgerinnung wurde anhand der Umwandlung von Prothrombin zu Thrombin untersucht. Es wurde gefunden, dass **52** die vom Erythrozyt gebildete Menge an Thrombin deutlich steigern kann und dass dieser Effekt auf die erhöhte Menge an PS auf der Zelloberfläche des roten Blutkörperchens zurückzuführen ist.^[36]

5. Lipinskis Fünfer-Regel

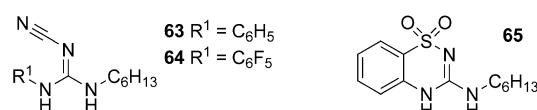
Wie oben diskutiert wurde, besitzen synthetische Anionentransporter Potenzial für pharmazeutische Anwendungen. Es überrascht daher nicht, dass Versuche unternommen wurden, etablierte Konzepte aus dem Bereich der Wirkstoffentwicklung auf die Entwicklung von Ionophoren anzuwenden. Medizinalchemiker benutzen eine Reihe von Faustregeln, wie z. B. Lipinskis Fünfer-Regel, um die Chancen für das Auffinden von Verbindungen mit akzeptablen AD-ME-Eigenschaften zu erhöhen (ADME = absorption, distribution, metabolism, and excretion).^[37] Verbindungen mit brauchbarem ADME-Verhalten haben ein Molekulargewicht

unter 500, besitzen nicht mehr als fünf Wasserstoffbrücken-donoren und nicht mehr als zehn Wasserstoffbrückenakzeptoren, und ihr Verteilungskoeffizient in Octanol/Wasser ($\log P$) ist nicht größer als 5. Anhand dieser Kriterien untersuchten Gale und Mitarbeiter das Potenzial kleinerer Monoharnstoff- und Monothioharnstoffsysteme **53–58**. Es wurde

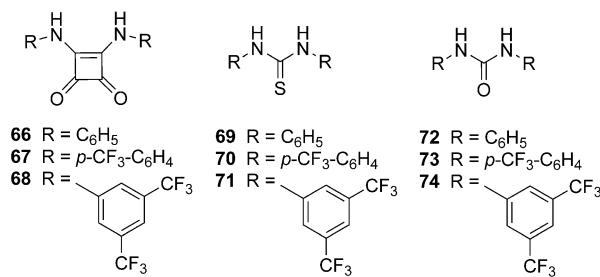


gefunden, dass Verbindung **58** (ein Thioharnstoff mit fusioniertem Indolring) eine deutlich höhere Aktivität für den Chlorid/Bicarbonat-Antiport durch eine POPC-Membran hat als die anderen Monoharnstoff- und Monothioharnstoffverbindungen sowie der Trisharnstoff **22**.^[38] Infolgedessen wurde eine Serie von Verbindungen ähnlicher Struktur synthetisiert, von denen einige zur Erhöhung der Lipophilie CF_3 -Gruppen enthielten (**59–62**).^[39] Chlorid/Nitrat-Antiportexperimente zeigten, dass Verbindung **59** praktisch inaktiv ist, die anderen Transporter aber aktiv sind. Verbindung **62** ist am wirksamsten, gefolgt von **60** und dann **61**. Das Harnstoffsystem wurde durch die Einführung der CF_3 -Gruppe erst aktiviert, beim Thioharnstoffsystem wurde der bereits stattfindende Transport beschleunigt. In-vitro-Studien an A375-Melanomzellen zeigten ferner, dass bereits diese einfachen Monoharnstoff- und Monothioharnstoff-haltigen fluorierten Indole (**61** und **62**) ein vielversprechendes Antitumorverhalten aufweisen.

Somit scheinen Thioharnstoffgruppen attraktive Strukturmotive für das Design von Anionentransportern zu sein. Allerdings gibt es Bedenken bezüglich der Giftigkeit dieser Gruppe,^[40] was eine Suche nach anderen einfachen Wasserstoffbrückenmotiven als wirksame Anionentransporter ausgelöst hat. Davis und Gale berichteten, dass Thioharnstoff-Isostere, wie die Cyanguanidine **63** und **64** und das 3-Amino-1,2,4-benzothiadiazin-1,1-dioxid **65**, als Chlorid/Nitrat-Antiporter für POPC-Membranen wirken und der Prozess in der Gegenwart von Valinomycin und einem Kaliumgradienten beschleunigt wird.^[41]



Die Anionentransporteigenschaften von Squaramiden wurden ebenfalls untersucht, und in diesem Fall zeigten die Verbindungen **66–68** bessere Aktivitäten im Chlorid/Nitrat- und Chlorid/Bicarbonat-Austausch als ihre Harnstoff- und



Thioharnstoffanaloga **69–71** bzw. **72–74**. Es wurde gefunden, dass die Einführung von CF_3 -Gruppen in die Stammverbindungen den Anionentransport deutlich beschleunigt.^[42] Die Lipophilien der Squaramide sind niedriger als die der analogen Thioharnstoffe, was Vorteile bezüglich der Einhaltung der Lipinski-Regel mit sich bringt. Die Autoren erklären den erhöhten Chlorid-Transport mit der signifikant höheren Chlorid-Affinität der Squaramide im Vergleich zu den Harnstoff- oder Thioharnstoff-Analoga.

In einer jüngeren Studien nutzten Matile und Mitarbeiter Halogenbindungen für die Entwicklung kleiner Anionophore. Die Autoren untersuchten Calix[4]arene mit perfluorierten Phenylsubstituenten, die Anionen über Anion- π -Wechselwirkungen (z.B. **75**) und Halogenbrücken (z.B. **76**) binden.^[43] Die gleiche Arbeitsgruppe zeigte kürzlich auch, dass

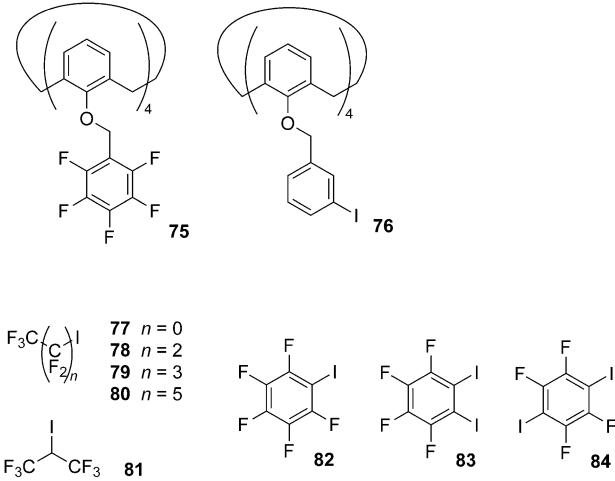
ein wichtiger therapeutischer Vorteil für die Behandlung von Mukoviszidose sein, da der Transporter mithilfe eines Inhalators direkt in die Lunge verabreicht werden könnte.^[44]

Zusammenfassung und Ausblick

Anionentransporter bieten potenzielle Anwendungsmöglichkeiten zur Behandlung von Mukoviszidose und Krebs. Um dieses Ziel zu erreichen, müssen wir verstehen, wie die molekularen Parameter zu optimieren sind, um einen effektiven Transport bei niedrigen Konzentrationen zu bewirken. Mithilfe von Fluorierungen ist es bei einer Reihe von Systemen gelungen, die Transportgeschwindigkeiten deutlich zu steigern.^[17,23,39,42] Faustregeln, wie z.B. Lipinskis Fünfer-Regel, können helfen, die Biokompatibilität der Verbindungen zu gewährleisten. Die Korrelation zwischen molekularen Eigenschaften und Transportfähigkeit ist derzeit Gegenstand unserer Studien. Diese Studien, zusammen mit den Arbeiten anderer Gruppen, geben zunehmend Aufschluss darüber, wie die Transporteigenschaften von Anionenrezeptoren zu optimieren sind. Sobald dies erreicht ist, wird der nächste Schritt darin bestehen, die Effekte der Transporter in Zellen und biologischen Systemen zu erforschen. Eine zukünftige Herausforderung wird sein, die Wirkungsmechanismen dieser Verbindungen in Zellen exakt aufzuklären. Dies ist kein triviales Problem, der potenzielle Nutzen solcher Systeme als zukünftige Therapeutika macht die Forschungen auf diesem Gebiet aber unbedingt lohnenswert.

Eingegangen am 17. September 2012

Online veröffentlicht am 2. Januar 2013



die sehr einfachen halogenierten Verbindungen **77–84** den Anionentransport durch Lipiddoppelschichtmembranen durch die Bildung von Halogenbrücken mit dem zu transportierenden Anion vermitteln können. Dies ist ein bemerkenswerter Befund, da diese Verbindungen klein, einfach und kommerziell erhältlich sind und der Lipinski-Regel gehorchen. Des Weiteren zeigten die Autoren, dass Verbindung **77** den transmembranären Anionentransport auch dann vermittelt, wenn sie in der Gasphase zugesetzt wird. Dies könnte

- [1] F. M. Ashcroft, *Ion Channels and Disease*, Academic Press, San Diego, **2000**.
- [2] P. M. Quinton, *Lancet* **2008**, *372*, 415–417; M. A. Garcia, N. Yang, P. M. Quinton, *J. Clin. Invest.* **2009**, *119*, 2613–2622.
- [3] J. M. Tomich, U. Bukovnik, J. Layman, B. D. Schultz in *Cystic Fibrosis. Renewed Hopes Through Research* (Hrsg.: D. Sriramulu), InTech, Rijeka, **2012**, S. 291–332.
- [4] U. Bukovnik, J. Gao, G. A. Cook, L. P. Shank, M. B. Seabra, B. D. Schultz, T. Iwamoto, J. Chen, J. M. Tomich, *Biochim. Biophys. Acta Biomembr.* **2012**, *1818*, 1039–1048.
- [5] R. Pajewski, R. Garcia-Medina, S. L. Brody, W. M. Leevy, P. H. Schlesinger, G. W. Gokel, *Chem. Commun.* **2006**, 329–331.
- [6] Beispiele: a) V. Gorteau, M. D. Julliard, S. Matile, *J. Membr. Sci.* **2008**, *321*, 37–42; b) J. Mareda, S. Matile, *Chem. Eur. J.* **2009**, *15*, 28–37.
- [7] B. A. McNally, E. J. O’Neil, A. Nguyen, B. D. Smith, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 17274–17275.
- [8] J. L. Sessler, P. A. Gale, W.-S. Cho, *Anion Receptor Chemistry* (Hrsg.: J. F. Stoddart), Royal Society of Chemistry, London, **2006**.
- [9] *Anion Coordination Chemistry* (Hrsg.: K. Bowman-James, A. Bianchi, E. García-España), Wiley-VCH, Weinheim, **2012**.
- [10] Übersichtsartikel: a) J. T. Davis, O. Okunola, R. Quesada, *Chem. Soc. Rev.* **2010**, *39*, 3843–3862; b) P. R. Brotherhood, A. P. Davis, *Chem. Soc. Rev.* **2010**, *39*, 3633–3647; c) P. A. Gale, *Acc. Chem. Res.* **2011**, *44*, 216–226; d) S. Matile, A. Vargas Jentzsch, J. Montenegro, A. Fin, *Chem. Soc. Rev.* **2011**, *40*, 2453–2474.

- [11] Ein exzelter Überblick über die Chemie der Prodigiosine mit Blick auf ihre Struktur-, Anionentransport- und Antitumoreigenschaften: J. T. Davis in *Topics in Heterocyclic Chemistry, Vol 24* (Hrsg.: P. A. Gale, W. Dehaen), Springer, Berlin, **2010**, S. 145–176.
- [12] A. Fürstner, *Angew. Chem.* **2003**, *115*, 3706–3728; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42*, 3582–3603.
- [13] J. L. Seganish, J. T. Davis, *Chem. Commun.* **2005**, 5781–5783.
- [14] J. T. Davis, P. A. Gale, O. A. Okunola, P. Prados, J. C. Iglesias-Sánchez, T. Torroba, R. Quesada, *Nat. Chem.* **2009**, *1*, 138–144.
- [15] a) L. J. Siskind, M. Colombini, *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 38640–38644; b) L. J. Siskind, R. N. Kolesnick, M. Colombini, *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 26796–26803; c) L. J. Siskind, A. Davoodi, N. Lewin, S. Marshall, M. Colombini, *Biophys. J.* **2003**, *85*, 1560–1575; d) L. J. Siskind, R. N. Kolesnick, M. Colombini, *Mitochondrion* **2006**, *6*, 118–125.
- [16] W. A. Harrell, Jr., M. L. Bergmeyer, P. Y. Zavalij, J. T. Davis, *Chem. Commun.* **2010**, *46*, 3950–3952.
- [17] S. Bahmanjah, N. Zhang, J. T. Davis, *Chem. Commun.* **2012**, *48*, 4432–4434.
- [18] J. L. Sessler, L. R. Eller, W.-S. Cho, S. Nicolaou, A. Aguilar, J. T. Lee, V. M. Lynch, D. J. Magda, *Angew. Chem.* **2005**, *117*, 6143–6146; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 5989–5992.
- [19] B. D. de Gruñu, P. I. Hernández, M. Espona, D. Quiñonero, M. E. Light, T. Torroba, R. Pérez-Tomás, R. Quesada, *Chem. Eur. J.* **2011**, *17*, 14074–14083.
- [20] P. I. Hernández, D. Moreno, A. A. Javier, T. Torroba, R. Pérez-Tomás, R. Quesada, *Chem. Commun.* **2012**, *48*, 1556–1558.
- [21] V. Saggiomo, S. Otto, I. Marques, V. Félix, T. Torroba, R. Quesada, *Chem. Commun.* **2012**, *48*, 5274–5276.
- [22] K. J. Winstanley, S. J. Allen, D. K. Smith, *Chem. Commun.* **2009**, 4299–4301.
- [23] N. Busschaert, P. A. Gale, C. J. E. Haynes, M. E. Light, S. J. Moore, C. C. Tong, J. T. Davis, W. A. Harrell, Jr., *Chem. Commun.* **2010**, *46*, 6252–6254.
- [24] N. Busschaert, M. Wenzel, M. E. Light, P. Iglesias-Hernández, R. Pérez-Tomás, P. A. Gale, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 14136–14148.
- [25] S. J. Moore, C. J. E. Haynes, J. González, J. L. Sutton, S. J. Brooks, M. E. Light, J. Herniman, G. J. Langley, V. Soto-Cerrato, R. Pérez-Tomás, I. Marques, P. J. Costa, V. Félix, P. A. Gale, *Chem. Sci.* **2013**, *4*, 103–117.
- [26] A. V. Koulov, T. N. Lambert, R. Shukla, M. Jain, J. M. Boon, B. D. Smith, H. Li, D. N. Sheppard, J.-B. Joos, J. P. Clare, A. P. Davis, *Angew. Chem.* **2003**, *115*, 5081–5083; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42*, 4931–4933.
- [27] B. A. McNally, A. V. Koulov, T. N. Lambert, B. D. Smith, J.-B. Joos, A. L. Sisson, J. P. Clare, V. Sgarlata, L. W. Judd, G. Magro, A. P. Davis, *Chem. Eur. J.* **2008**, *14*, 9599–9606.
- [28] S. Hussain, P. R. Brotherhood, L. W. Judd, A. P. Davis, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 1614–1617.
- [29] Beispiele: a) P. A. Gale, C. C. Tong, C. J. E. Haynes, O. Adeosun, D. E. Gross, E. Karnas, E. Sedenberg, R. Quesada, J. L. Sessler, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 3240–3241; b) M. Yano, C. C. Tong, M. E. Light, F. P. Schmidtchen, P. A. Gale, *Org. Biomol. Chem.* **2010**, *8*, 4356–4363; c) I.-W. Park, J. Yoo, B. Kim, S. Adhikari, S. K. Kim, Y. Yeon, C. J. E. Haynes, J. L. Sutton, C. C. Tong, V. M. Lynch, J. L. Sessler, P. A. Gale, C. H. Lee, *Chem. Eur. J.* **2012**, *18*, 2514–2523.
- [30] P. V. Santacroce, J. T. Davis, M. E. Light, P. A. Gale, J. C. Iglesias-Sánchez, P. Prados, R. Quesada, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 1886–1887.
- [31] a) C. R. Yamnitz, S. Negin, I. A. Carasel, R. K. Winter, G. W. Gokel, *Chem. Commun.* **2010**, *46*, 2838–2840; b) J. L. Atkins, M. B. Patel, M. M. Daschbach, J. W. Meisel, G. W. Gokel, *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 13546–13549.
- [32] X. Li, B. Shen, X.-Q. Yao, D. Yang, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 7264–7265.
- [33] a) X. Li, B. Shen, X.-Q. Yao, D. Yang, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 13676–13680; b) B. Ma, H. Zha, N. Li, D. Yang, G. Lin, *Mol. Pharm.* **2011**, *8*, 1073–1082; B. Shen, X. Li, F. Wang, X. Yao, D. Yang, *PloS ONE* **2012**, *7*, e34694.
- [34] a) N. Kato, M. Nakanishi, N. Hirashima, *Biochemistry* **2002**, *41*, 8068–8074; b) S. Manno, Y. Takakuwa, N. Mohandas, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2002**, *99*, 1943–1948; c) A. J. Verkleij, J. A. Post, *J. Membr. Biol.* **2000**, *178*, 1–10; d) R. F. Zwaal, A. J. Shroit, *Blood* **1997**, *89*, 1121–1132.
- [35] a) J. M. Boon, B. D. Smith, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 11924–11925; b) J. M. Boon, B. D. Smith, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 6221–6226; c) J. M. Boon, T. N. Lambert, B. D. Smith, A. M. Beatty, V. Ugrinova, S. N. Brown, *J. Org. Chem.* **2002**, *67*, 2168–2174; d) Y. Sasaki, R. Shukla, B. D. Smith, *Org. Biomol. Chem.* **2004**, *2*, 214–219; e) K. M. DiVittorio, F. T. Hofman, J. R. Johnson, L. Abu-Esba, B. D. Smith, *Bioorg. Med. Chem.* **2009**, *17*, 141–148.
- [36] a) T. N. Lambert, J. M. Boon, B. D. Smith, M. N. Pérez-Payán, A. P. Davis, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 5276–5277; b) J. M. Boon, T. N. Lambert, A. L. Sisson, A. P. Davis, B. D. Smith, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 8195–8201.
- [37] C. A. Lipinski, F. Lombardo, B. W. Dominy, P. J. Feeney, *Adv. Drug Delivery Rev.* **2001**, *46*, 3–26.
- [38] N. J. Andrews, C. J. E. Haynes, M. E. Light, S. J. Moore, C. C. Tong, J. T. Davis, W. A. Harrell, Jr., P. A. Gale, *Chem. Sci.* **2011**, *2*, 256–260.
- [39] S. J. Moore, M. Wenzel, M. E. Light, R. Morley, S. J. Bradberry, P. Gómez-Iglesias, V. Soto-Cerrato, R. Pérez-Tomás, P. A. Gale, *Chem. Sci.* **2012**, *3*, 2501–2509.
- [40] a) P. B. Smith, C. Crespi, *Biochem. Pharmacol.* **2002**, *63*, 1941–1948; b) R. C. A. Onderwater, J. N. M. Commandeur, E. J. Groot, A. Sitters, W. M. P. B. Menge, N. P. E. Vermeulen, *Toxicology* **1998**, *125*, 117–129; c) S. A. Svarovsky, R. H. Simoyi, S. V. Makarov, *J. Phys. Chem. B* **2001**, *105*, 12634–12643.
- [41] M. Wenzel, M. E. Light, A. P. Davis, P. A. Gale, *Chem. Commun.* **2011**, *47*, 7641–7643.
- [42] N. Busschaert, I. L. Kirby, S. Young, S. J. Coles, P. N. Horton, M. E. Light, P. A. Gale, *Angew. Chem.* **2012**, *124*, 4502–4506; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 4426–4430.
- [43] A. Vargas Jentzsch, D. Emery, J. Mareda, S. K. Nayak, P. Metrangolo, G. Resnati, S. Matile, *Angew. Chem.* **2011**, *123*, 11879–11882; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 11675–11678.
- [44] A. Vargas Jentzsch, D. Emery, J. Mareda, S. K. Nayak, P. Metrangolo, G. Resnati, N. Sakai, S. Matile, *Nat. Commun.* **2012**, *3*, 905.