

- [1] Der erste Übergangsmetall-Carbenkomplex wurde im Jahre 1964 von E. O. Fischer und A. Maasböl beschrieben: *Angew. Chem.* **1964**, 76, 645; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1964**, 3, 580.
- [2] Ausgewählte Übersichten: a) K. H. Dötz, *Angew. Chem.* **1984**, 96, 573; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1984**, 23, 587; b) K. H. Dötz in *Organometallics in Organic Synthesis* (Hrsg.: A. de Meijere, H. tom Dieck), Springer, Berlin, **1988**, S. 85; c) W. D. Wulff, *Adv. Met. Org. Chem.* **1989**, 1, 209; d) W. D. Wulff in *Comprehensive Organic Synthesis*, Vol. 5 (Hrsg.: B. M. Trost, I. Fleming), Pergamon, Oxford, **1991**, S. 1065.
- [3] M. F. Semmelhack, G. R. Lee, *Organometallics* **1987**, 6, 1839.
- [4] J. P. A. Harrity, W. J. Kerr, D. Middlemiss, *Tetrahedron* **1993**, 49, 5565.
- [5] a) S. Chamberlin, W. D. Wulff, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, 114, 10667; b) S. Chamberlin, W. D. Wulff, B. Bax, *Tetrahedron* **1993**, 49, 5531.
- [6] Übersicht: M. F. Semmelhack in *Comprehensive Organic Synthesis*, Vol. 4 (Hrsg.: B. M. Trost, I. Fleming), Pergamon, Oxford, **1991**, S. 517.
- [7] S. L. B. Wang, J. Su, W. D. Wulff, K. Hoogsteen, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, 114, 10665.
- [8] a) L. S. Hegedus, M. A. McGuire, L. M. Schultze, C. Yijun, O. P. Anderson, *J. Am. Chem. Soc.* **1984**, 106, 2680; b) L. S. Hegedus, G. deWeck, S. D'Andrea, *ibid.* **1988**, 110, 2122, zit. Lit.
- [9] Übersicht: a) M. A. Schwindt, J. R. Miller, L. S. Hegedus, *J. Organomet. Chem.* **1991**, 413, 143.
- [10] a) L. S. Hegedus, R. Imwinkelried, M. Alarid-Sargent, D. Dvorak, Y. Satoh, *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, 112, 1109; b) Y. Narukawa, K. N. Juneau, D. Snustad, D. B. Miller, L. S. Hegedus, *J. Org. Chem.* **1992**, 57, 5453; c) B. Roman, L. S. Hegedus, *Tetrahedron* **1993**, 49, 5549; d) P.-C. Colson, L. S. Hegedus, *J. Org. Chem.* **1993**, 58, 5918.
- [11] a) L. S. Hegedus, M. A. Schwindt, S. DeLombaert, R. Imwinkelried, *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, 112, 2264; b) J. M. Vernier, L. S. Hegedus, D. B. Miller, *J. Org. Chem.* **1992**, 57, 6914.
- [12] L. S. Hegedus, E. Lastra, Y. Narukawa, D. C. Snustad, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, 114, 2991.
- [13] E. Lastra, L. S. Hegedus, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, 115, 87.
- [14] J. R. Miller, S. R. Pulley, L. S. Hegedus, S. DeLombaert, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, 114, 5602; b) S. R. Pulley, L. S. Hegedus, *ibid.* **1993**, 115, 9037.
- [15] F. Stein, M. Duetsch, M. Noltemeyer, A. de Meijere, *Synlett* **1993**, 486.
- [16] C. A. Challener, W. D. Wulff, B. A. Anderson, S. Chamberlin, K. L. Faron, O. K. Kim, C. K. Murray, Y.-C. Xu, D. C. Yang, S. D. Darling, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, 115, 1359.
- [17] S. U. Tumer, J. W. Herndon, L. A. McMullen, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, 114, 8394.

Modifizierte Peptide und Peptidmimetica als potentielle Tumorerhemmer

Rob M. J. Liskamp *

Wegen der Nachteile, die ihr Einsatz in biologischen Systemen mit sich bringt, können (unmodifizierte) Peptide nur in geringem Umfang als Medikamente eingesetzt werden. Ein nicht-modifiziertes lineares Peptid wird leicht abgebaut, beispielsweise von Proteasen, es ist meist zu gut wasserlöslich, um die Zellmembran und damit auch die Blut-Hirn-Schranke zu durchdringen, und es wird rasch ausgeschieden. Hinzu kommt noch, daß es sich bei Peptiden um flexible Strukturen handelt, deren biologisch aktive Konformation meist nur eine von mehreren tausend möglichen Konformationen ist.

Der Wunsch, diese Nachteile zu beheben und dadurch zu pharmazeutisch nutzbaren Verbindungen zu kommen, führte zur Entwicklung modifizierter Proteine und Peptidmimetica^[1, 2]. Alle bedeutenden pharmazeutischen Firmen betreiben heutzutage Forschungs- und Entwicklungsarbeiten auf diesem Gebiet, und die Zahl der möglichen Anwendungen dieser Substanzen steigt stetig an. Die Bedeutung modifizierter Peptide und Peptidmimetica zeigt sich in mehreren ihrer Anwendungsmöglichkeiten. So wurden sie beispielsweise bisher eingesetzt zur Entwicklung von Medikamenten, die den Blutdruck und die Blutgerinnung regulieren, zur Entwicklung von Inhibitoren der HIV-Protease und von Immunsuppressiva und zur Entwicklung von Neuropeptiden und deren (Ant)agonisten.

Zwei unlängst erschienene Arbeiten beschreiben eine neue vielversprechende Anwendungsmöglichkeit modifizierter Peptide und Peptidmimetica als potentielle Krebsmedikamente zur

Behandlung von Tumoren, bei denen onkogene Ras-Proteine (siehe unten) Transformation und abnormes Größenwachstum ausgelöst haben^[3, 4]. Zwei Forschungsergebnisse aus diesen Veröffentlichungen sind besonders bemerkenswert:

- Die Hemmung der malignen Transformation fand nicht auf der DNA-Ebene statt;
- die Hemmung wurde durch die Inhibierung der posttranslationalen Modifikation der Proteine bewirkt.

Bei der herkömmlichen Krebs-Chemotherapie wirkt das Medikament meist auf die DNA ein. Der Eingriff in das genetische Material oder seine Beschädigung führt dazu, daß Zellwachstum und unkontrollierte Zellteilung zum Stillstand kommen. Diese Medikamente zerstören jedoch meist auch andere Zellen, die sich häufig teilen und beispielsweise am Aufbau des Knochenmarks, der Schleimhäute, des Gastrointestinaltraktes und der Haarfollikel beteiligt sind. Hierdurch entstehen die wohl bekannten Nebenwirkungen. Zusätzlich bedeutet der Eingriff in den genetischen Code, daß diese Substanzen von Natur aus carcinogen und/oder mutagen wirken. Daher ist die Entwicklung von Medikamenten, die auf anderen zellulären Ebenen wirken, von besonderem Interesse.

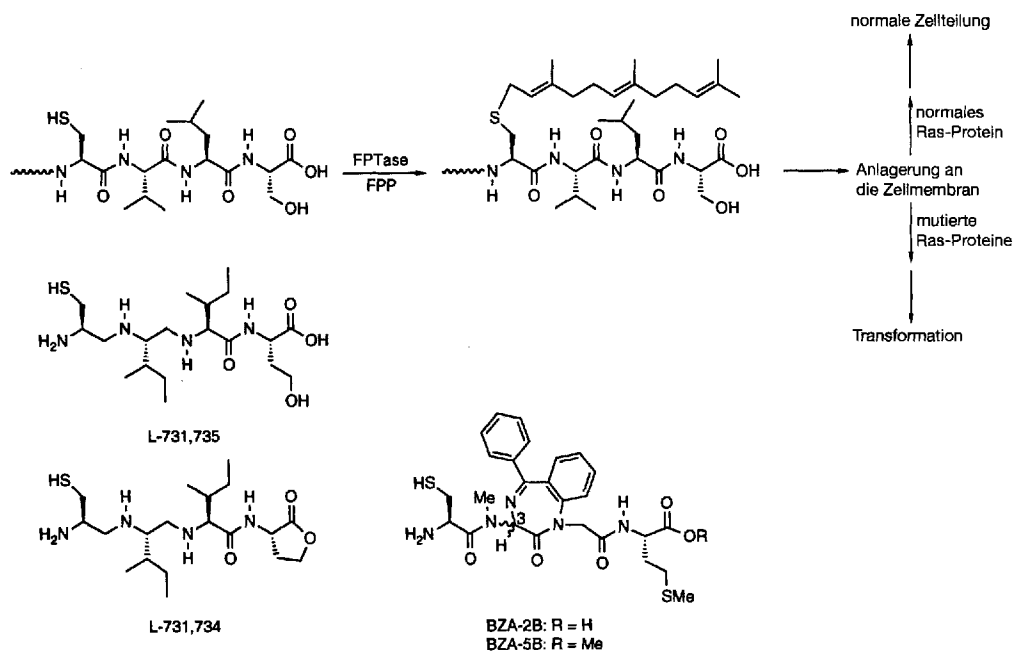
Der direkteste Weg hierzu ist, die Spaltung eines größeren Vorläuferproteins in die eigentlich aktive Form, die an einer biologischen Umsetzung – die man verhindern will – beteiligt ist, mit Hilfe von modifizierten Peptiden oder Peptidmimetica zu unterbinden. Ein Beispiel hierfür sind die Inhibitoren der HIV-Protease. Man nimmt an, daß sie die Spaltung der Peptidbindung zwischen Phenylalanin und Prolin in einem Vorläuferprotein von HIV verhindern. Dadurch werden die Proteine, die zum Zusammenbau neuer Viruspartikel nötig sind, nicht mehr gebildet, und die Ausbreitung von HIV vermindert sich. Andere,

[*] Dr. R. M. J. Liskamp
Department of Organic Chemistry, Gorlaeus Laboratories
University of Leiden
P.O. Box 9502, NL-2300 RA Leiden (Niederlande)
Telefax: Int. +71/274-537

indirekte und eventuell besser zu regulierende Verfahren, zielen auf die Modifizierung der Proteine, nachdem sie an den Ribosomen synthetisiert wurden und bevor sie ihre volle Funktion entfalten können (posttranslationale Modifikation). Modifizierte Peptide und Peptidmimetica sollen hier inhibierend wirken. Die posttranslationale Modifikation von Proteinen kommt häufig vor^[5] und ist in bezug auf die modifizierten Proteine oft hochselektiv. Daher bewirkt der Eingriff in einen bestimmten posttranslationalen Prozeß eine sehr spezifische Intervention in unerwünschte zelluläre Prozesse. Ein möglicher Ansatz, um in die Carcinogenese einzugreifen, bestand darin, die posttranslationale Phosphorylierung zu hemmen. Dieser Prozeß wird von

Proteine an Membranen anlagern. Genauso könnten aber auch der Isoprenylrest und der Methylester dazu beitragen, daß das Protein an einen spezifischen membranständigen Rezeptor koppelt^[8].

Das Ras-Protein ist ein faszinierendes Beispiel für ein Eukaryontenprotein, das farnesyliert wird (Schema 1). Ras ist ein Protein, das an Guanosintriphosphat (GTP) bindet. Wenn GTP an Ras bindet, wird die Zellteilung ausgelöst. Normales Ras-Protein hat GTPase-Aktivität, und das gebundene GTP wird zu GDP hydrolysiert, so daß das Mitose auslösende Signal rechtzeitig abgestellt wird. Es gibt jedoch in ca. 50 % aller menschlichen Coloncancerome und in 90 % aller Pankreascancerome



Schema 1. Posttranslationale Modifizierung durch Farnesylierung. Der Cysteinrest in der Konsensus-Sequenz CAAX (C, Cystein; A, aliphatische Aminosäure; X, Serin oder Methionin) in der Nähe des C-Terminus des Ras-Proteins wird von Farnesylpyrophosphat farnesyliert. Die Reaktion wird von der Farnesylproteintransferase (FPTase) katalysiert. Das farnesylierte Protein kann danach an die Plasmamembran anbinden. Die Farnesylierung mutierter Ras-Proteine und ihre Bindung an die Plasmamembran führt zur Transformation. Modifizierte Peptide [4] (L-731,735 und L-731,734), basierend auf der Konsensus-Sequenz CAAX, sowie Peptidmimetica [4] (BZA-2B und BZA-5B), denen die Konsensus-Sequenz und die vermutete CAAX-Schleifenkonformation zu Grunde liegen, wirken als kompetitive Inhibitoren der Ras-Farnesylierung.

der Proteinkinase C (PKC) oder von Tyrosinkinasen katalysiert, und man nimmt an, daß PKC an der Carcinogenese beteiligt ist^[6]. Diese Hemmung der PKC-katalysierten Phosphorylierung wirkt aber verheerend auf normale Zellen, da in ihnen auch viele andere Proteine von PKC phosphoryliert werden und nicht nur jene, die an der Transformation beteiligt sind. So gesehen scheint der Eingriff in eine sehr spezifische posttranslationale Modifizierung wie die *Farnesylierung* vielversprechender und zukunftsreicher für die Entwicklung von Krebsmedikamenten zu sein. Eukaryontische Polypeptide mit einem Cysteinrest an vierter Stelle vom C-Terminus aus sind im Prinzip Kandidaten für eine posttranslationale Modifikation, an der die S-H-Gruppe des Cysteins beteiligt ist. Die S-H-Gruppe kann in einer durch Farnesylproteintransferase (FPTase) katalysierten Reaktion von Farnesylpyrophosphat (FPP) alkyliert werden. FPP gehört zu den Isoprenoiden und ist auch an der Biosynthese des Cholesterins beteiligt. Diesem Schritt können später weitere posttranslationale Modifikationen folgen: die Abspaltung der drei Aminosäurereste am C-Terminus und danach dessen Veresterung zum Methylester^[7]. Die Rolle der Farnesylierung oder Geranylgeranylierung ist derzeit noch nicht klar. Der hydrophobe Isoprenylrest könnte dafür verantwortlich sein, daß sich

mutierte Ras-Proteine, deren GTPase-Aktivität beeinträchtigt ist. Diese Beeinträchtigung der GTPase-Aktivität hat zur Folge, daß das mutierte Ras-Protein fest an GTP gebunden bleibt und dadurch ungehemmtes Zellwachstum und maligne Transformation stattfindet. Sowohl das normale als auch das onkogene Ras-Protein müssen farnesyliert sein, um an die Zellmembran zu binden und anschließend biologisch aktiv zu werden. Im Falle des mutierten Ras-Proteins scheint die Fähigkeit zur Transformation von Zellen von der Farnesylierung abzuhängen. Wenn man nun diese unterbindet, dann kann sich Ras nicht mehr an die Membran anlagern^[9]. Dies wäre ein einfacher und eleganter Weg, um die Transformation zu verhindern.

Tetrapeptide mit Aminosäuresequenzen, die mit den Sequenzen im C-Terminus der Proteine, die von der FPTase farnesyliert werden, identisch sind, können mit Ras um die Farnesylierung konkurrieren. Um zu verhindern, daß die andere Isoprenylierungsreaktion (das Anbringen einer Geranylgeranylgruppe) gehemmt wird, kann man Peptide einsetzen, die die Konsensus-Sequenz CAAX enthalten. C steht hierbei für Cystein, A ist eine aliphatische Aminosäure und X steht für Serin oder Methionin. Bei den von der Merck-Gruppe konstruierten modifizierten Peptiden wurden die N-terminalen Peptidbindungen reduziert,

um das Molekül gegen Angriffe von Aminopeptidasen zu schützen^[3]. Zusätzlich wurden Serin oder Methionin am C-Terminus durch Homoserin oder dessen Lacton ersetzt. Man nahm an, daß das Lacton besser in Zellen eindringen kann, da ihm die geladene Carboxygruppe fehlt. Die beiden Verbindungen L-731,735 und L-731,734 (siehe Schema 1) zeigten eine hohe Wirksamkeit als Inhibitoren von aufgereinigter FTPase, wobei die Homoserinverbindung aktiver war ($IC_{50} \approx 18 \text{ nM}$) als das Lactonderivat ($IC_{50} 282 \text{ nM}$).

Aus Zellen, die mit dem onkogenen *ras*-Gen transformiert und mit L-731,734 behandelt worden waren, konnte nur lösliches Ras isoliert werden, das heißt kein isoprenyliertes und daher membranständiges Ras. Das beweist, daß das modifizierte Peptid tatsächlich die posttranslationale Farnesylierung stört. An Hand der Inhibierung des Wachstums bindingsunabhängiger Rat-1-Zellen, die mit *v-ras* transformiert worden waren, konnte die cytostatische Wirkung der Verbindung nachgewiesen werden. Das modifizierte Peptid war ab einer Konzentration von 1 mM in der Lage, das Wachstum dieser Zellen in Agar zu verhindern.

An der Universität von Texas und bei Genentech ging man noch einen Schritt weiter^[4]. Zur kompetitiven Hemmung der Farnesylierung des Ras-Proteins ist eine Tetrapeptidsequenz notwendig, die der CAAX-Konsensus-Sequenz entspricht und man postulierte, daß das Tetrapeptid in Schleifenkonformation an die FPTase bindet. Das N-terminale Cystein und das C-terminale Methionin kämen hierdurch in unmittelbare Nachbarschaft zum Zn^{2+} -Ion, von dem bekannt ist, daß es für die Bindung des Peptids an die FPTase notwendig ist. Ein Benzodiazepingerüst wurde benutzt, um die schleifenartige Konformation der beiden mittleren Aminosäuren in der Konsensus-Sequenz nachzuahmen. Am Benzodiazepingerüst waren der N-terminale Cysteinrest und ein C-terminaler Methionin-, Serin- oder Leucinrest angebracht^[10]. Mehrere Strukturmerkmale (siehe Schema 1) in den Peptidmimetica waren für eine wirksame Hemmung der Farnesylierung notwendig: a) Die bindende Aminogruppe zum Cysteinrest hin muß N-methyliert sein, b) die Konfiguration am C-3 Atom muß die richtige sein (diese ist bisher noch nicht ermittelt, nur eines der beiden Diastereomere ist aktiv), c) Methionin am C-Terminus hat die beste Wirkung und d) im in-vitro-Assay zeigte die freie Säure (BZA-2B) die besten Ergebnisse ($IC_{50} 0.85 \text{ nM}$); bei Versuchen mit einer Zelllinie aus dem Ovar des chinesischen Hamsters hingegen war der Ester (BZA-5B) und, etwas weniger ausgeprägt auch das Amid, aktiver. Dies deutet darauf hin, daß die letztgenannten Verbindungen aufgrund ihrer verringerten Polarität besser in die Zelle eindringen können. Fast vollständig gehemmt wurde die Farnesylierung bei einer Esterkonzentration von $25 \mu\text{M}$, die freie Säure hingegen muß hierfür in einer Konzentration $250 \mu\text{M}$ vorliegen. BZA-2B hemmte selektiv nur die Farnesylierung und nicht die Geranylgeranylierung und wurde selbst auch nicht farnesyliert.

Wenn man Rat-1-Fibroblasten, die mit einer aktivierten Mutante von H-Ras transformiert wurden, fünf Tage lang mit

einer $200 \mu\text{M}$ Lösung des Peptidmimeticums BZA-2B behandelt, dann ändert sich deren Phänotyp: die mehrlagigen Zellklumpen der transformierten Form wandeln sich in eine einlagige Zellschicht um. Das Wachstum von Ras-transformierten Rat-1-Zellen wurde in Gegenwart des Esters BZA-5B, der in einer Konzentration von $25 \mu\text{M}$ vorlag, nach zehn Tagen zu 90 % gehemmt.

Fassen wir zusammen: Ein neues und wichtiges Anwendungsgebiet von modifizierten Peptiden und Peptidmimetica ist ihr Einsatz als Inhibitoren der Ras-Farnesylierung^[11, 12]. Hierdurch wird die Transformation und letztendlich auch die Carcinombildung gehemmt. Ebenso wird deutlich, daß diese Verbindungen für einen fein abgestimmten Eingriff in komplexe biochemische und biologische Systeme taugen. Wenn Abläufe wie der Proteintransport und die Signalübertragung in der Zelle erst einmal besser verstanden sein werden, sollte es also möglich sein, mit entsprechend modifizierten Peptiden oder Peptidmimetica in diese Prozesse einzugreifen oder sie selektiv zu hemmen.

Planung, Synthese und Anwendung modifizierter Peptide, Peptidmimetica und peptidähnlicher Verbindungen wie der Peptoide ist ein Forschungsgebiet, daß schnell wächst und ständig an Bedeutung gewinnt^[13]. Diese Forschung kann und wird aber nur dann weiter gedeihen, wenn Forscher aus vielen Disziplinen eng miteinander zusammenarbeiten, wie es in den hier diskutierten Arbeiten geschehen ist.

- [1] Modifizierte Peptide sind definiert als Peptide, deren Aminosäuresequenz im wesentlichen unverändert vorliegt, die aber z.B. nichtnatürliche Aminosäuren, modifizierte Cysteinreste oder phosphorylierte Aminosäuren enthalten. Peptidmimetica sind Verbindungen, die die Struktur eines Peptids nachahmen und/oder den biologischen Effekt des Peptids auf Rezeptorebene imitieren [2]. Daher können die unterschiedlichsten Moleküle als Peptidmimetica wirken; die Spanne reicht von Peptid-isosteren Molekülen bis hin zu Verbindungen, die keinerlei erkennbare Ähnlichkeit mit Aminosäuren oder Peptiden haben.
- [2] Überblick über den neuesten Stand auf dem Gebiet der Peptidmimetica: A. Giannis, T. Kolter, *Angew. Chem.* **1993**, *105*, 1303–1326; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1993**, *32*, 1244–1267.
- [3] N. E. Kohl, S. D. Mosser, S. J. deSolms, E. A. Giuliani, D. L. Pompliano, S. L. Graham, R. L. Smith, E. M. Scolnick, A. Oliff, J. B. Gibbs, *Science* **1993**, *260*, 1934–1937.
- [4] G. L. James, J. L. Goldstein, M. S. Brown, T. E. Rawson, T. C. Sommer, R. S. McDowell, G. W. Crowley, B. K. Lucas, A. D. Levinson, J. C. Marsters, *Science* **1993**, *260*, 1937–1942.
- [5] Glycosylierung siehe beispielsweise: M. A. Kukuruzinska, M. L. E. Bergh, B. J. Jackson, *Annu. Rev. Biochem.* **1987**, *56*, 915–944; Acylierung: D. A. Towler, J. I. Gordon, S. P. Adams, L. Glaser, *ibid.* **1988**, *57*, 69–99; Phosphorylierung: E. G. Krebs, J. A. Beavo, *ibid.* **1979**, *48*, 923–959; Isoprenylierung: Lit. [7].
- [6] PKC-Inhibitoren auf der Basis modifizierter Peptide: T. Eichholtz, D. B. A. de Bont, J. de Widt, R. M. J. Liskamp, H. L. Ploegh, *J. Biol. Chem.* **1993**, *268*, 1982–1986.
- [7] S. Clarke, *Annu. Rev. Biochem.* **1992**, *61*, 355–386.
- [8] J. A. Glomset, M. H. Gelb, C. C. Farnsworth, *Trends Biochem. Sci.* **1990**, *15*, 139–142.
- [9] J. B. Gibbs, *Cell* **1990**, *65*, 1–4.
- [10] Das Benzodiazepingerüst als Mimeticum für β -Schleifen: W. C. Ripka, G. V. De Lucca, A. C. Bach II, R. S. Pottorf, J. M. Blaney, *Tetrahedron* **1993**, *49*, 3593–3608.
- [11] J. Travis, *Science* **1993**, *260*, 1877–1878.
- [12] Neuere Übersicht über Inhibitoren der Ras-Farnesyltransferasen, inklusive der bisher als solche identifizierten mikrobiologischen Produkte: F. Tamanai, *Trends Biochem. Sci.* **1993**, *18*, 349–353.
- [13] Peptoide wurden kürzlich in einem Highlight-Artikel näher betrachtet: H. Kessler, *Angew. Chem.* **1993**, *105*, 572–573; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1993**, *32*, 543–544.

[*] IC_{50} ist die Konzentration, bei der eine 50proz. Inhibierung teilgereinigter FPTase aus Rinderhirn auftrat.