

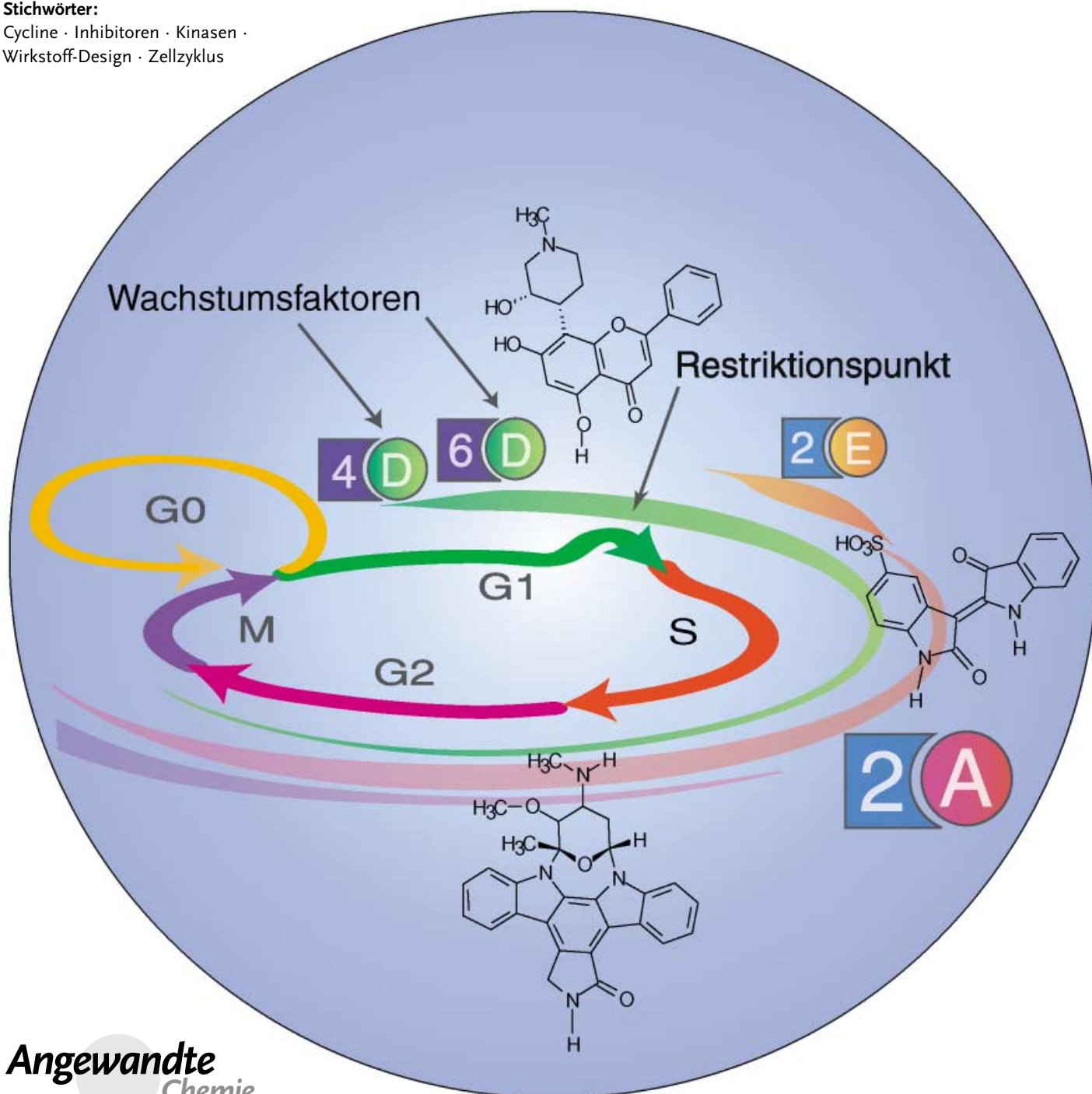
Niedermolekulare Enzyminhibitoren

Niedermolekulare Verbindungen als Inhibitoren Cyclin-abhängiger Kinasen

Axel Huwe, Ralph Mazitschek und Athanassios Giannis*

Stichwörter:

Cycline · Inhibitoren · Kinasen ·
Wirkstoff-Design · Zellzyklus



Für multizelluläre Organismen ist die Zellteilung (Mitose) eine grundlegende Voraussetzung. Erst durch die Fähigkeit einer Zelle, sich zu replizieren, können komplexe Zellverbände entstehen. Fehlregulationen in den Kontrollmechanismen des Zellzyklus führen zu einer übermäßigen Zellproliferation und sind die Ursache für Krebs. Die Schlüsselstellung der Cyclin-abhängigen Kinasen (CDKs) und ihrer direkten Mitspieler sowie die Tatsache, dass bei vielen malignen Erkrankungen Komponenten dieser zentralen Schrittmacher des Zellzyklus defekt sind, hat ein großes Interesse für die Entwicklung von niedermolekularen CDK-Inhibitoren geweckt. Im Folgenden wird ein Überblick über die verschiedenen Strukturklassen ATP-kompetitiver Inhibitoren für CDKs gegeben, die mit der Absicht entwickelt wurden, maligne Erkrankungen zu bekämpfen. Der Aufsatz zeigt, wie weit die Entwicklung von selektiven CDK-Inhibitoren ist und inwiefern sich die Erwartungen in solche Wirkstoffe bisher erfüllt haben.

1. Einleitung

Für den Aufbau und das Überleben eines vielzelligen Organismus ist die Zellteilung (Mitose) eine essenzielle Voraussetzung. Zum einen kann erst durch die Fähigkeit einer Zelle, sich selbst zu replizieren, ein komplexer Zellverband entstehen, zum anderen müssen ständig absterbende Zellen durch neue ersetzt werden. Da sich ein Lebewesen meist aus vielen Milliarden dieser kleinsten Bausteine zusammensetzt, wird eine strenge Koordination und Regulation dieses Prozesses benötigt. Die Zellteilung ist meist die Reaktion auf mehrere mitogene Signale benachbarter Zellen. Bevor sich die Zelle jedoch teilen kann, muss sie eine ausreichende Größe erreicht haben. Außerdem muss sie ihre DNA verdoppeln und die duplizierten Chromosomen räumlich trennen, damit jede Tochterzelle eine vollständige Kopie der genetischen Information erhält. Der Vorgang, von der Reaktion auf extrazelluläre Wachstumssignale bis zur Bildung beider Tochterzellen, wird als Zellzyklus bezeichnet.

Der Zellzyklus lässt sich in vier Phasen unterteilen (Abbildung 1). Zu Beginn der ersten Phase (G1-Phase, G steht für gap = Lücke) ist die Zelle noch von der Stimulation durch extrazelluläre Wachstumsfaktoren abhängig und das Fortschreiten des Zyklus kann immer noch durch Zugabe von antiproliferativen Wirkstoffen gehemmt werden. Das endgültige Signal zur Zellteilung wird in der späten G1-Phase durch Überschreiten des Restriktionspunkts gegeben. Ab diesem Zeitpunkt ist die Progression des Zellzyklus von äußeren Einflüssen unabhängig und die Zelle trifft grundlegende Vorbereitungen, z.B. werden Enzyme und andere Proteine synthetisiert, die an der DNA-Replikation beteiligt sind. Mit Beginn der DNA-Synthese geht die G1- in die Synthese(S)-Phase über, in der die Chromosomen repliziert werden. Am Ende der S-Phase schließt sich die G2-Phase an. Während dieser Phase wird die neu synthetisierte DNA auf Fehler geprüft und gegebenenfalls repariert. Im Weiteren bereitet sich die Zelle auf den Übergang in die Mitose(M)-Phase vor, in der die duplizierte DNA getrennt wird und sich die Tochterzellen abschnüren. Nach der Trennung der beiden

Aus dem Inhalt

1. Einleitung	2171
2. Niedermolekulare Inhibitoren Cyclin-abhängiger Kinasen	2174
3. Zusammenfassung und Ausblick	2183

Tochterzellen können diese wieder in die G1-Phase übergehen und in einen weiteren Teilungszyklus eintreten oder in einem Ruhezustand, der als G0-Phase bezeichnet wird, verweilen.

Ein erfolgreicher Teilungszyklus setzt voraus, dass die einzelnen

Phasen geregelt und nacheinander durchlaufen werden. Dies wird durch eine Reihe von Kontrollmechanismen gewährleistet, die einen Übergang in die nächste Passage erst zulassen, wenn bestimmte kritische Faktoren erfüllt sind.

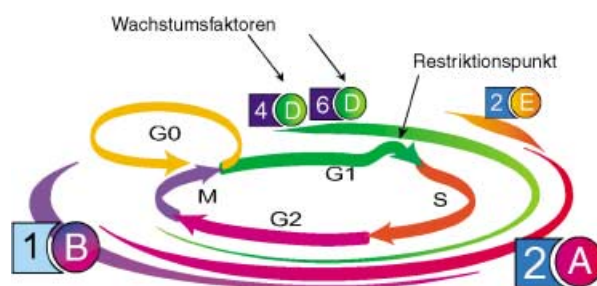


Abbildung 1. Die vier Phasen des eukaryontischen Teilungszyklus: In den beiden Phasen G1 und G2 können morphologisch keine wesentlichen Veränderungen beobachtet werden, in der S-Phase wird der Chromosomensatz verdoppelt und in der M-Phase bilden sich die beiden Tochterzellen. Die M- und S-Phase sind durch die beiden G-Phasen voneinander getrennt. Für das Durchlaufen eines Teilungszyklus benötigt eine eukaryontische Zelle ca. 10–20 h. Die Ruhephase einer Zelle, in der sie, je nach Zelltyp, über mehrere Jahre verweilen kann, bezeichnet man als G0-Phase. Der korrekte Ablauf der einzelnen Phasen wird durch die CDKs 1, 2, 3, 4 und 6 geregelt, deren enzymatische Aktivität durch spezifische regulatorische Untereinheiten, die Cycline A, B, D, E gesteuert wird. Die Konzentration der individuellen Cycline während des Zellzyklus wird durch die Dicke der gleichfarbigen Striche symbolisiert.

Diese Kontrollstationen werden auch als Checkpoints bezeichnet.^[1,2] Für das Überschreiten dieser Checkpoints sind im Wesentlichen die Cyclin-abhängigen Kinasen (CDKs,

[*] Prof. Dr. A. Giannis, Dipl.-Chem. A. Huwe, Dr. R. Mazitschek
Institut für Organische Chemie
Universität Leipzig
Johannisallee 29, 04103 Leipzig (Deutschland)
Fax: (+49) 341-9736-599
E-mail: giannis@chemie.uni-leipzig.de

cyclin dependant kinases) verantwortlich. Die zeitliche Regulierung der CDK-Aktivität wird gesteuert durch die Assoziation mit Cyclinen und spezifischen proteinogenen CDK-Inhibitoren sowie durch deren Phosphorylierungsstatus und durch Ubiquitin vermittelten Abbau.^[3–6] Die Schlüsselstellung der CDKs und ihrer direkten Mitspieler sowie die Tatsache, dass bei vielen malignen Erkrankungen Komponenten dieser zentralen Schrittmacher des Zellzyklus mutiert sind, haben ein großes Interesse an der Entwicklung von CDK-Inhibitoren geweckt.^[7–9]

Bisher wurden zehn CDKs (CDK1–CDK10) entdeckt, von denen im Wesentlichen nur die CDKs1, 2, 3, 4 und 6 direkt in den Zellzyklus eingreifen, während die CDK7 als Aktivator dieser CDKs nur indirekt beteiligt ist.^[6,10] Zudem fungiert CDK7, wie auch die CDK8 und CDK9, als Transkriptionsregulator.^[11–16] CDK5 ist für die neuronale Entwicklung und für die Funktion von Drüsen- und Nervenzellen von Bedeutung.^[17–19] Über die erst kürzlich identifizierte CDK10 ist bisher nur bekannt, dass sie mit dem Transkriptionsfaktor Ets2 interagiert und vermutlich ähnlich wie die CDKs7, 8 und 9 in die Steuerung der Transkription eingreift.^[20] CDKs erhalten erst nach Bindung ihrer positiv regulatorischen Untereinheit, der Cycline, ihre basale enzymatische Aktivität.^[21] Bisher wurden mindestens 15 Cycline identifiziert.^[22–24] Jede Phase des Zellzyklus ist durch die Expression bestimmter Cycline charakterisiert. Die Cycline selbst unterliegen einer strengen Kontrolle durch proteolytischen Abbau, wohingegen die CDKs im Allgemeinen in gleich bleibender Konzentration biosynthetisiert werden und gegenüber dem Abbau vergleichsweise stabil sind.^[25–31]

Als Antwort auf extrazelluläre mitogene Signale reagieren ruhende Zellen mit Expression der Cycline D1, D2 und D3, welche dann mit den (miteinander eng verwandten) CDKs4 und 6 assoziieren (Abbildung 2).^[32–34] Das Expressionsmuster der verschiedenen D-Typ-Cycline variiert dabei von Zelltyp zu Zelltyp. Der Komplex aus Cyclin D und CDK4, 6 ist in der Lage, in den Zellkern zu translozieren, in

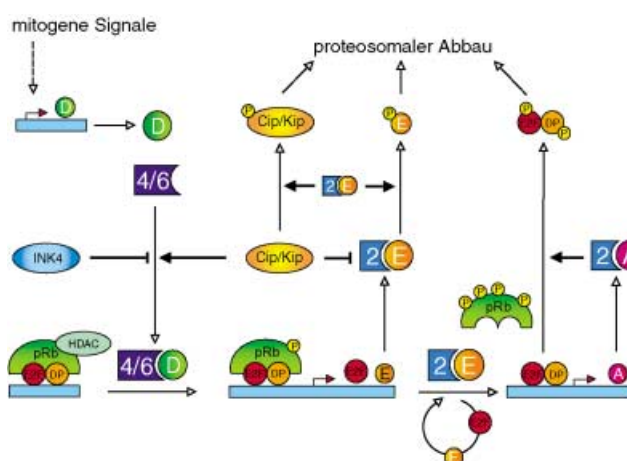


Abbildung 2. Die Translokation der Komplexe aus D-Typ-Cyclinen und CDK4, 6 in den Zellkern wird durch INK4 inhibiert und durch Cip/Kip gefördert. Für Einzelheiten siehe Text.

dem er durch CDK7/Cyclin H (CAK, CDK activating kinase) an einem spezifischen Threoninrest in der Nähe der ATP-Bindetasche des Enzyms phosphoryliert wird und damit seine volle Kinaseaktivität erhält.^[35–37] Die wichtigste Funktion des aktiven Holoenzym ist nun die Phosphorylierung des Retinoblastoma-Proteins (pRb) während der G1-Phase.^[38] pRb blockiert in seiner unphosphorylierten Form Mitglieder der E2F/DP-Transkriptionsfaktor-Familien durch Komplexbildung. E2F/DP-Heterodimere können sowohl als Gen-Aktivatoren wie auch als Gen-Repressoren fungieren.^[39] Letztere Aktivität ist in der Lokalisierung von pRb und der damit verbundenen Rekrutierung von Transkriptions-Repressoren wie Histon-Desacetylase (HDAC) an den Promotoren bestimmter Gene begründet.^[40–43] Im freien Zustand ist E2F/DP für die Transkription von Genen verantwortlich, deren Produkte für den G1-S-Übergang und für die DNA-Synthese benötigt werden.^[4] Die pRb-Phosphorylierung



an der Universität Karlsruhe und erhielt 1999 sein Diplom. Im Dezember 2002 promovierte er in Leipzig bei Prof. A. Giannis über die Synthese und biologische Evaluierung neuartiger anti-angiogener Wirkstoffe. Gegenwärtig beschäftigt er sich am Institute for Chemistry and Cell Biology der Harvard Medical School mit der Entwicklung neuer Methoden für den Einsatz im Bereich Chemical Genetics.

Athanasios Giannis wurde 1954 in Drama (Griechenland) geboren. Von 1972–1980 studierte er Chemie und von 1978–1988 Medizin an der Universität Bonn. Nach seiner Diplomarbeit bei Prof. M. T. Reetz promovierte er 1986 über die Synthese von C-Glykosiden bei Prof. K. Sandhoff. Er habilitierte sich 1992 für Organische Chemie und Biochemie und erhielt im November 1997 einen Ruf an die Universität Karlsruhe. Seit Mai 2002 ist er Professor für Organische Chemie und Naturstoffchemie an der Universität Leipzig. Sein Forschungsinteresse gilt dem rationalen Design und der Synthese von bioaktiven Naturstoffen und deren Analoga als Inhibitoren der Angiogenese und als Modulatoren der Apoptose und der Signaltransduktion.

Axel Huwe wurde 1972 in Landau/Pfalz geboren. Er studierte Chemie an der Universität Karlsruhe und schloss dort im Mai 1999 mit dem Diplom ab. Seit Juni 1999 ist er Doktorand in der Arbeitsgruppe von Prof. A. Giannis am Institut für Organische Chemie der Universität Leipzig. Sein Forschungsschwerpunkt ist die Synthese von Analoga der Naturstoffe Fumagillin und Ovalicin als Inhibitoren der Angiogenese.

Ralph Mazitschek wurde 1971 in Karlsruhe geboren. Er studierte Chemie an der Universität Karlsruhe und erhielt 1999 sein Diplom. Im Dezember 2002 promovierte er in Leipzig bei Prof. A. Giannis über die Synthese und biologische Evaluierung neuartiger anti-angiogener Wirkstoffe. Gegenwärtig beschäftigt er sich am Institute for Chemistry and Cell Biology der Harvard Medical School mit der Entwicklung neuer Methoden für den Einsatz im Bereich Chemical Genetics.

durch CDK4,6/Cyclin D führt zu einer Abspaltung der HDAC und ermöglicht die Transkription von Cyclin E, das im Folgenden von CDK2 gebunden wird. Das hypophosphorylierte pRb komplexiert jedoch weiterhin E2F und hält die Repression des Cyclin-A-Promotors aufrecht.^[44] Der katalytisch aktive CDK2/Cyclin-E-Komplex kann nun pRb an zusätzlichen Stellen phosphorylieren und damit vollständig inaktivieren. Das hyperphosphorylierte pRb ist nicht mehr in der Lage, E2F/DP zu binden, wodurch die pRb-bedingte Inhibierung vollständig aufgehoben wird.^[45,46] Dies hat zur Folge, dass sich die Konzentration an freiem E2F noch stärker erhöht, was wiederum zu einer weiteren Anhäufung von Cyclin E führt. Außerdem stimuliert nun E2F auch seine eigene Transkription.^[4] Beides resultiert in einer positiven Rückkopplung und führt den Zellzyklus aus der Wachstumsfaktor-abhängigen Phase (Cyclin-D-gesteuert) irreversibel über den Restriktionspunkt in die Wachstumsfaktor-unabhängige Phase (Cyclin-E-gesteuert).

Die frühe S-Phase ist nicht nur durch den Beginn der DNA-Synthese, sondern auch durch den schnellen, Ubiquitin-vermittelten Abbau von Cyclin E charakterisiert.^[27,28] Die Position von Cyclin E wird nun von Cyclin A eingenommen. Der Cyclin A/CDK2-Komplex bindet anders als das Cyclin-E-Analogon an die unterschiedlichen E2Fs und phosphoryliert deren DP-1-Untereinheit, wodurch ihre DNA-Bindefähigkeit inhibiert wird.^[47–49] Zudem bewirkt der Cyclin A/CDK2-Komplex durch Phosphorylierung von cdc6, einem essenziellen Initiator der DNA-Replikation, dessen Export aus dem Zellkern und verhindert so die Re-Replikation der DNA.^[50] Außer den erwähnten Regulatoren wurden weitere Cyclin A/CDK2-spezifische Substrate identifiziert, die an der Regulation der DNA-Replikation beteiligt sind.^[51] Cyclin A kann durch Assoziation nicht nur CDK2, sondern auch CDK1 aktivieren.^[52,53] Über die genaue Funktion von Cyclin A/CDK1 ist bisher jedoch erst wenig bekannt. Eine Bedeutung für die Progression des Zellzyklus ist jedoch unumstritten.^[54]

Nach Komplettierung der S-Phase beginnt die Aktivierung des Cyclin B/CDK1-Komplexes, der während der G2-Phase und späten S-Phase als inaktives Dimer gebildet wird.^[55–57] Die Inaktivierung wird durch die Phosphorylierung spezifischer Tyrosin/Threonin-Reste (Tyr 15, Thr 14) durch die difunktionellen Proteinkinasen Wee1 und Myt1 gewährleistet und verhindert den Eintritt in die Mitose, bevor die DNA-Synthese abgeschlossen ist und die DNA auf Replikationsfehler untersucht wurde.^[58–61] Die Aktivierung erfolgt durch die Abspaltung dieser Phosphatreste durch Mitglieder der cdc25-Phosphatasen.^[10,62] Zu den Substraten von Cyclin B/CDK1 zählen sowohl Strukturproteine, die für die Ausführung der Mitose benötigt werden, als auch regulatorische Proteine, die für den zeitlichen Ablauf und die Steuerung dieses Prozesses verantwortlich sind.^[63] Cyclin B/CDK1 gewährleistet auch die globale Inhibierung der Proteinbiosynthese sowie der DNA-Replikation und -Transkription.^[64–67] Zudem ist Cyclin B/CDK1 an der Aktivierung proteolytischer Abbaumechanismen beteiligt, die es der Zelle ermöglichen, M-Phase-Proteine zu eliminieren und so wieder den anfänglichen Zustand einzunehmen.^[68,69] Nicht nur die Aktivierung und Inaktivierung der einzelnen CDKs durch Änderung ihres Phosphorylierungsstatus und die sequenzielle

Expression und Degradation von Cyclinen, sondern auch proteinogene Inhibitoren (CKIs) sind entscheidend an der Regulation der Kinaseaktivität beteiligt.^[70] Diese Inhibitoren lassen sich basierend auf ihrer Spezifität und Sequenzhomologie in zwei Familien einteilen: die CIP/KIP- und die INK4-Familie.^[71,72]

Die CIP/KIP-Familie besteht aus p21^{CIP1,WAF1}, p27^{KIP1} und p57^{KIP2} und bildet die erste Klasse von CDK-Inhibitoren.^[73–80] Anders als für p21 und p27 ist über die exakte biologische Funktion von p57 noch wenig bekannt. Zunächst wurde diesen Proteinen die Eigenschaft zugeschrieben, alle Cyclin-D-, -E- und -A-abhängigen Kinasen zu blockieren. Neuere Untersuchungen zeigen jedoch, dass das einfache Bild einer pauschalen Inhibierung von CDKs durch die CIP/KIP-Proteine durch eine differenziertere Betrachtung ersetzt werden muss.^[44,81–83] Tatsächlich inhibieren p21 und p27 CDK2 im Komplex mit Cyclin E und Cyclin A durch Trimerisierung und eine Überexpression von CIP/KIP-Inhibitoren führt zu einer Arretierung des Zellzyklus in der G1-Phase.^[84] Auch Cyclin-D-abhängige Kinasen werden von p21 und p27 gehemmt, allerdings erst bei weitaus höheren Konzentrationen.^[85] Überraschenderweise agieren p21 und p27 aber auch als positive Regulatoren für die Cyclin-D-abhängigen Kinasen. So sind die CIP/KIP-Proteine für die Komplexbildung von Cyclin D mit CDK4, die metabolische Stabilität des Cyclin D/CDK4,6-Komplexes und dessen Translokation in den Kern verantwortlich.^[71,83] Dementsprechend sollten diese CKIs als Aktivatoren von CDK4 und als Inhibitoren von CDK2 betrachtet werden.

Die zweite Klasse von CDK-Inhibitoren wird wegen ihrer Spezifität für CDK4 und 6 als INK4-Familie (Inhibitors of CDK4) bezeichnet. Sie umfasst vier strukturverwandte Mitglieder: p16^{INK4a}, p15^{INK4b}, p18^{INK4c} und p19^{INK4d}.^[86–90] INK4-Proteine können anstelle von Cyclin D an CDK4 und 6 binden oder einen trimeren Komplex bilden und so die enzymatische Aktivität des Enzymkomplexes blockieren.^[91,92] Da INK4-Proteine bei ihrer Bindung an CDK4 und 6 auch eventuell gebundenes CIP/KIP freisetzen, wird CDK2 indirekt ebenfalls durch INK4 inhibiert. Damit gewährleisten diese endogenen Inhibitoren den Stopp des Zellzyklus in der G1-Phase. Die Eigenschaft von INK4-Proteinen, Zellen in dieser frühen Phase zu arretieren, setzt jedoch ein funktionelles pRb voraus. Tatsächlich weisen über 60 % der menschlichen Tumore Defekte in p16^{INK4a} oder pRb auf.^[8,9]

Erstaunlicherweise codiert der INK4a-Genlocus in einem alternativen Leseraster (ARF, alternative reading frame) für einen zweiten potenten Tumor-Suppressor, p19^{ARF}. Überschreiten mitogene Signale einen kritischen Schwellenwert, wird die Expression von p19^{ARF} induziert, der wiederum den p53-vermittelten Zellzyklusarrest stimuliert.^[93] Das p53-Protein ist bei Tumoren das am häufigsten mutierte Gen, was seine zentrale Bedeutung für die Steuerung des Zellzyklus unterstreicht.^[94–97] p53 ist in normalen Zellen ein sehr kurzlebiges Protein und wird nur in geringem Umfang exprimiert. Bei einer Schädigung der DNA wird p53 jedoch stabilisiert und in den Zellen akkumuliert.^[98,99] p53 induziert die Expression von p21^{CIP1,WAF1} und bewirkt auf diesem Wege eine Arretierung des Zellzyklus, wodurch der Zelle die Möglichkeit gegeben wird, die DNA-Defekte zu reparieren.

Ist die Schädigung irreparabel, kann p53 auch den kontrollierten Zelltod (Apoptose) einleiten.^[99,100]

Die meisten, wenn nicht alle Tumore weisen in mindestens einer dieser zentralen Komponenten des Zellzyklus, die im gesunden Organismus den reibungslosen Ablauf der Zellteilung gewährleisten, genetische Defekte auf.^[8,101] Zu den häufigsten Mutationen zählen neben der Fehlregulation von p53 vor allem die Inaktivierung endogener Inhibitoren wie p16, die konstitutive Aktivierung von CDK4 oder die Überexpression ihrer aktivierenden Partner Cyclin D1 und Cyclin E, A und nicht zuletzt der Verlust an funktionellem pRb.^[8] Diese Mutationen machen die Zelle unabhängig vom Einfluss extrazellulärer Wachstumssignale und resultieren letztendlich in einer unkontrollierten Zellproliferation.

Entsprechend dieser Vielzahl möglicher Ursachen fehlgeleiteter Zellproliferation gibt es mehrere Möglichkeiten, von außen regulierend in den Zellzyklus einzugreifen.^[7] Die unterschiedlichen Strategien zielen dabei entweder direkt auf die CDKs oder versuchen, durch indirekte Manipulation die CDK-Aktivität zu inhibieren. Zu den indirekten Methoden zählen neben der Modulation des Phosphorylierungsstatus der CDKs, z.B. durch Blockierung aktivierender Enzyme (CAK, cdc25) oder Stimulation inhibierender Kinasen wie Wee1/Myt1, auch die Aktivierung des proteolytischen Abbaus der CDKs und ihrer Cycline.

Direkte Inhibitoren sind meist niedermolekulare Verbindungen, welche die enzymatische Aktivität der CDKs blockieren. Im Folgenden wird ein Überblick über die Strukturklassen ATP-kompetitiver Inhibitoren für CDKs gegeben, die zur Bekämpfung maligner Erkrankungen entwickelt und synthetisiert wurden. Dieser Aufsatz zeigt, wie weit die Entwicklung selektiver Verbindungen fortgeschritten ist und inwiefern sich die Erwartungen in solche Wirkstoffe bisher erfüllt haben.

2. Niedermolekulare Inhibitoren Cyclin-abhängiger Kinasen

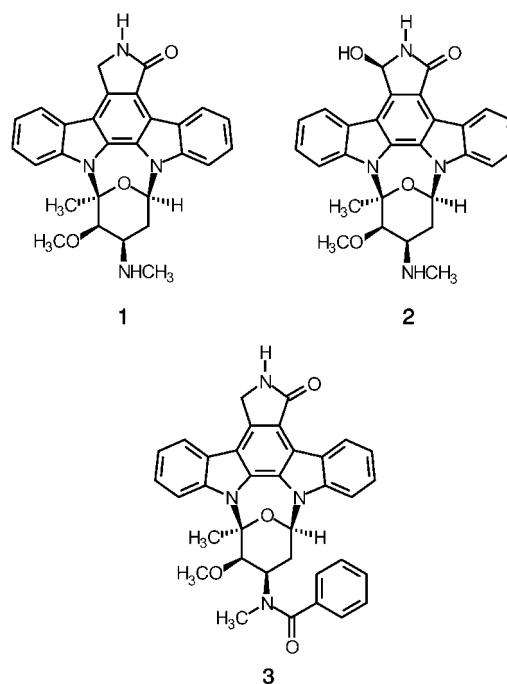
Die ATP-kompetitiven CDK-Inhibitoren lassen sich entsprechend ihrer Selektivität in zwei Klassen einteilen. Die erste Klasse bilden die unspezifischen Kinase-Inhibitoren. Darunter sind alle Verbindungen zu verstehen, die nicht nur CDKs, sondern auch unselektiv andere, nicht verwandte Serin/Threonin- und Tyrosin-Kinasen in ähnlichen Konzentrationen inhibieren. Hierzu zählen unter anderem die Wirkstoffe Staurosporin (**1**) und dessen Analoga wie UCN-01 (**2**). Die zweite Klasse ist in ihrer Struktur etwas komplexer. Sie umfasst selektive CDK-Inhibitoren, die alle Untergruppen der CDK-Familie mit gleicher Potenz blockieren (z.B. Flavopiridol (**4**)), und solche, die eine starke Präferenz für eine Gruppe innerhalb der CDK-Familie aufweisen.

Man sollte sich bei der Betrachtung und dem Vergleich von IC_{50} -Werten immer vor Augen halten, dass es sich um ATP-kompetitive Wirkstoffe handelt. Die IC_{50} -Werte sind dementsprechend von der in den Testsystemen verwendeten ATP-Konzentration abhängig und daher nicht immer direkt vergleichbar. Zudem sollte beim Vergleich mit In-vivo-Daten

auch beachtet werden, dass die zelluläre ATP-Konzentration im unteren millimolaren Bereich liegt, während die meisten In-vitro-Assays Konzentrationen zwischen 2 und 40 μ M verwenden. Dennoch ist die Verwendung niedriger ATP-Konzentrationen aus zweierlei Gründen durchaus sinnvoll. Zum einen können auch schlecht lösliche oder weniger aktive Verbindungen bei der Suche nach neuen Leitstrukturen identifiziert werden, zum anderen liegen die Limitierungen in der Natur des Assays begründet. Da die meisten Assays mangels geeigneter Antikörper zum Nachweis radioaktiv markiertes ATP einsetzen, versucht man die Belastung so gering wie möglich zu halten.

2.1. Staurosporine

Staurosporin (**1**), ein Metabolit aus *Streptomyces* sp., ist einer der wenigen ATP-kompetitiven Naturstoffe. Das Indolo[2,3-*a*]carbazol wurde ursprünglich bei einem Screening nach Inhibitoren der Proteinkinase C (PKC) als potenter



Wirkstoff ($IC_{50} = 1$ nM) identifiziert.^[102] Spätere Untersuchungen ergaben jedoch, dass **1** ein unspezifischer Inhibitor ist und unter anderem auch Cyclin B/CDK1 mit einem IC_{50} -Wert von 3.2 nM hemmt.^[103] Die geringe Selektivität von **1** lässt sich gut anhand der Strukturen von verschiedenen Enzym-Inhibitor-Komplexen erklären.^[104–106] Die Überlagerung von ATP mit **1** zeigt, dass **1** ATP einfach „zu gut“ nachahmt. Das heterocyclische Ringsystem von **1** überlappt beinahe deckungsgleich mit der Adenylgruppe von ATP, wobei der Lactamteil die gleichen Wasserstoffbrückenbindungen wie Adenin zum Enzym bildet, während die Glycosylgruppe in der Ribose-Tasche gebunden wird (Abbildung 3 a und b). Wie die Strukturanalyse und Vergleiche mit

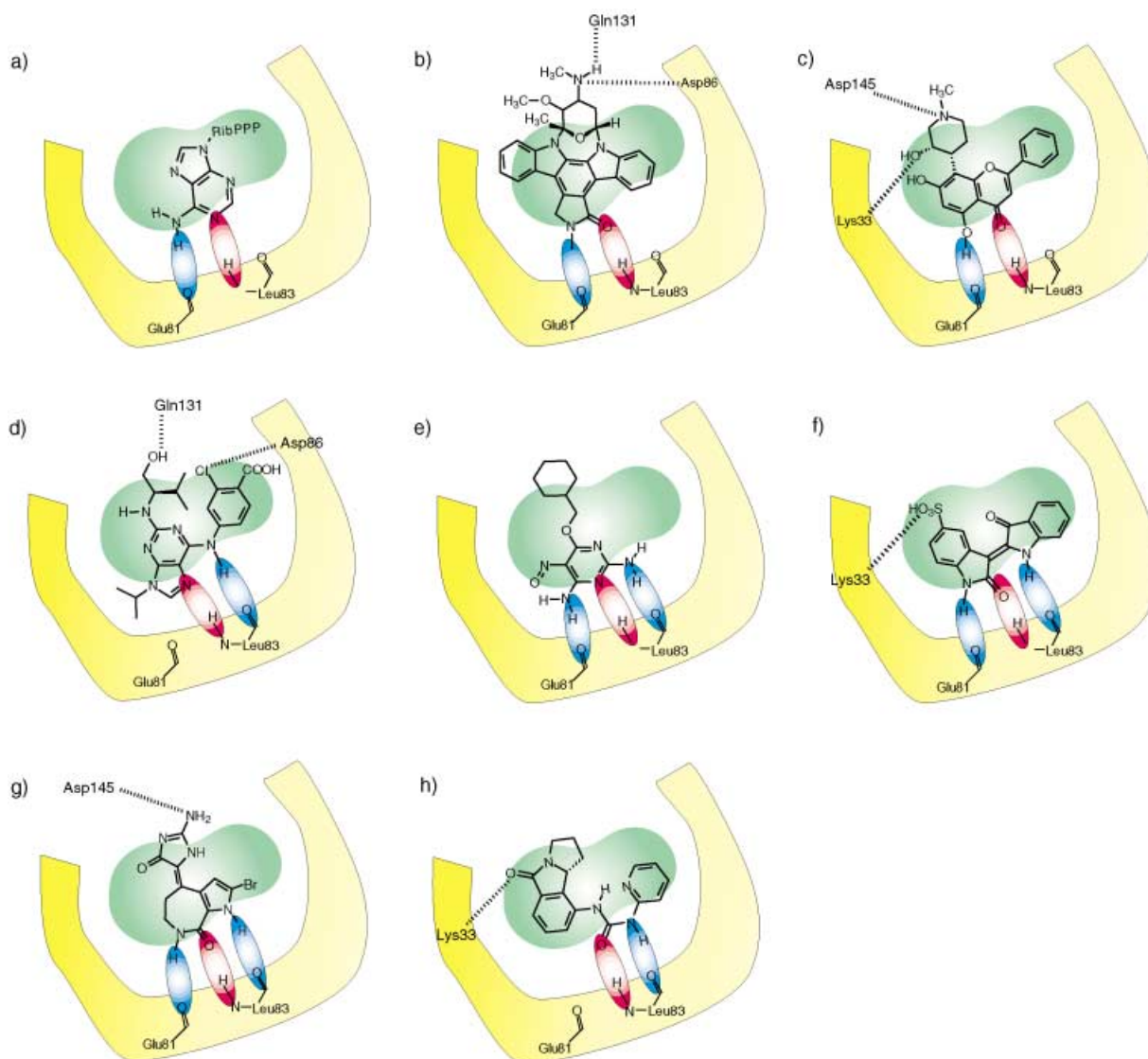


Abbildung 3. Schematische Darstellung der ATP-Bindetasche von CDK2 im Komplex mit verschiedenen Liganden. Die Wasserstoffbrückenbindungen zum Peptidrückgrat sind in Blau und Rot gekennzeichnet. Der hydrophobe Bereich der Bindetasche ist in Grün dargestellt. Die seitliche Abgrenzung der ATP-Bindetasche ist in Gelb wiedergegeben. a) ATP, b) Staurosporin (**1**), c) dechloriertes Flavopiridol (**5**), d) Purvalanol B (**21**), e) NU 6027 (**22**), f) Indirubin-5-sulfat (**32**), g) Hymenialdisin (**49**), h) Diarylharnstoff **52**.

verschiedenen Derivaten weiter verdeutlichen, sind vor allem die hydrophoben Wechselwirkungen mit dem Enzym für die hohe Affinität von **1** verantwortlich.

Trotz der geringen Selektivität wurde Staurosporin (**1**) zu „der“ Leitstruktur für die Entwicklung neuartiger PKC-Inhibitoren, die eine bessere Selektivität für PKC aufweisen sollten. Einige dieser Derivate, wie UCN-01 (**2**, 7-Hydroxystaurosporin, $IC_{50}(PKC) = 6.9 \text{ nM}$) und CGP41251 (**3**, *N*-Benzoylstaurosporin; $IC_{50}(PKC) = 50 \text{ nM}$), wirken zytotoxisch gegenüber einer Vielzahl humaner Krebszelllinien.^[107–109] Dass diese antiproliferativen Eigenschaften jedoch nicht nur auf eine Inhibierung der PKC zurückgeführt werden können, wurde durch nachfolgende Experimente gezeigt. UCN-01 (**2**) reduziert bei einer Konzentration von 100 nM in A549-Lungenadenocarcinomzellen die Menge an phosphoryliertem pRb und blockiert den G1/S-Übergang.

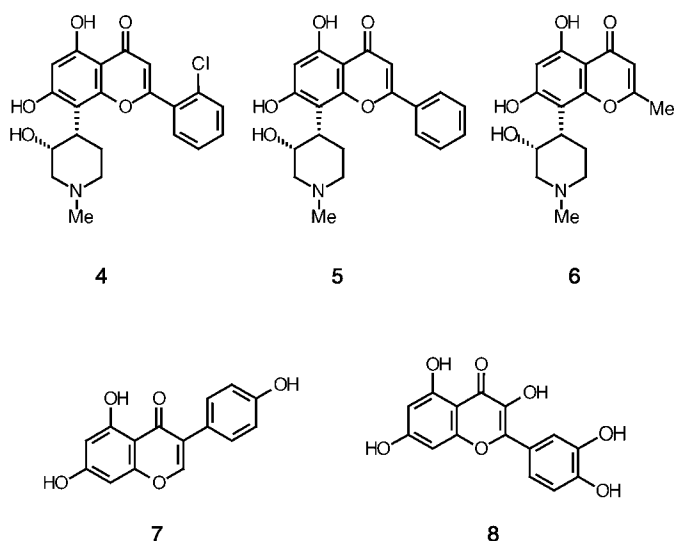
Diese Ergebnisse sind in Einklang mit der Eigenschaft dieser Verbindung, die Aktivität von CDK2, 4 und 6 bei Konzentrationen von 42, 32 bzw. 58 nM um 50 % zu reduzieren.^[107]

Jedoch hat **2** nicht nur eine inhibierende Wirkung auf den Zellzyklus. Nach Orlandi et al. lässt sich durch **2** ein durch DNA-Schädigung induzierter G2-Arrest aufheben, indem **2** die CDK1 auf indirektem Weg stimuliert.^[110] Die Stimulation ist dabei auf die Inaktivierung der negativ regulierenden Kinase Wee1 und der gleichzeitigen Aktivierung der Phosphatase cdc25 zurückzuführen und wird bereits bei Konzentrationen deutlich unterhalb der IC_{50} -Werte der einzelnen CDKs beobachtet.

Das Beispiel Staurosporin (**1**) belegt die Schwierigkeit, selektive Inhibitoren einer bestimmten Kinase oder Kinasefamilie zu entwickeln, zeigt aber auch, dass eine vollständige Selektivität nicht unbedingt erforderlich ist.

2.2. Flavone

Ebenfalls zu den Abkömmlingen eines Naturstoffs zählen Flavopiridol (**4**) und Dechlorflavopiridol (**5**), die sich beide von dem Alkaloid Rohitukin (**6**) ableiten.^[111–113] **4** wirkt, wie



auch die strukturell verwandten Flavone Genistein (**7**) und Quercetin (**8**), gegenüber einer Reihe von Tumorzelllinien inhibierend und cytotoxisch und ist der erste CDK-Inhibitor, der in die klinische Prüfung gelangte.^[114]

Flavopiridol (**4**) wurde ursprünglich als schon im mikromolaren Bereich wirksamer Inhibitor für eine Reihe von Proteinkinasen identifiziert, unter anderem für Rezeptor-Tyrosin-Kinasen (RTKs) (EGF-Rezeptor-Familie $IC_{50} = 21\text{--}25\text{ }\mu\text{M}$),^[115,116] Rezeptor-assoziierte Kinasen (src-Kinasen $50\text{ }\mu\text{M}$)^[117] und cytosolische Signaltransduktionskinasen (Proteinkinase A $122\text{--}145\text{ }\mu\text{M}$, PKC $6\text{ }\mu\text{M}$, Erk-1 $16\text{ }\mu\text{M}$),^[115,116,118] Die größte Aktivität zeigte der Wirkstoff jedoch gegenüber den CDKs, wie auch der evolutionär verwandten Glycogen-Synthase-Kinase β (GSK- β , 450 nM).^[119] Dabei ist **4** moderat selektiv für Cyclin D/CDK4 ($20\text{--}40\text{ nM}$), Cyclin D/CDK6 (60 nM) und Cyclin B/CDK1 ($30\text{--}40\text{ nM}$) im Vergleich Cyclin A/CDK2 und Cyclin E/CDK2 (100 nM) sowie Cyclin H/CDK7 ($100\text{--}300\text{ nM}$).^[115,117] Die an den isolierten CDKs gemessenen IC_{50} -Werte korrelieren gut mit den Ergebnissen zellulärer Assays.^[120] Weitere Studien belegen, dass **4** den Zellzyklus in der G1- oder G2/M-Phase arretiert, was mit der Fähigkeit zur Inhibierung von CDK1 und CDK2 in Einklang ist.^[113]

Kürzlich wurde zudem gezeigt, dass **4** auch P-TEFb (Positive Transcription Elongation Factor b) mit einem IC_{50} -Wert von 6 nM hemmt.^[121] P-TEFb, ein Komplex aus CDK9 und Cyclin T1, ist unter anderem zellulärer Cofaktor für den HIV-Transaktivator Tat. Interessanterweise hemmt **4** P-TEFb im Gegensatz zu den anderen CDKs bezüglich ATP nicht-kompetitiv. Außerdem kann **4** die Transkription von Cyclin D1 unterdrücken.^[122] Damit greift **4** auf mindestens drei Arten in den Zellzyklus ein: durch direkte Inhibierung

der CDKs, durch Inhibierung des Cyclin H/CDK7-Komplexes, der für die Aktivierung der anderen CDKs notwendig ist, und durch Suppression der Cyclin-D1-Expression.

Ein detailliertes Verständnis der Selektivität von **4** für die unterschiedlichen CDKs gegenüber den anderen Kinasen ermöglicht die Röntgenstrukturanalyse von CDK2 im Komplex mit dem dechlorierten Analogon **5**.^[123] Dieses nimmt im Wesentlichen die Position von ATP ein (Abbildung 3a, c). Das flavonoide Ringsystem und Adenin liegen in etwa in der gleichen Ebene, sind aber um etwa 60° gegeneinander verdreht. Die Bindung an CDK2 beruht vor allem auf hydrophoben Wechselwirkungen. Von besonderem Interesse ist dabei die Region der Kinase, die durch den Phenylring von **5** besetzt wird. Dieser zeigt aus der ATP-Bindetasche und besetzt einen Bereich des Enzyms, der von ATP nicht genutzt werden kann. Diese zusätzliche Interaktion scheint für die hohe Affinität und Selektivität von **5** für CDK1 und CDK2 verantwortlich zu sein, da die wechselwirkenden Aminosäureseitenketten in dieser Region anders als bei anderen Proteinkinasen wie PKA nahezu vollständig homolog sind. Der Effekt wird durch die Einführung des Chlorsubstituenten (**4**→**5**) um den Faktor 10 verstärkt. Die gesteigerte Affinität wird auf die verbesserte Interaktion mit einer Isoleucin-Seitenkette zurückgeführt.^[124] Zur Gewinnung von Struktur-Aktivitäts-Beziehungen haben Murthi et al. einige Derivate synthetisiert. Die Ergebnisse bestätigen dabei die Erwartungen und sind in Abbildung 4 zusammengefasst.^[125]

Kleinere Modifikationen am Phenylrest werden toleriert, tragen aber nicht zu einer gesteigerten Aktivität bei. Die

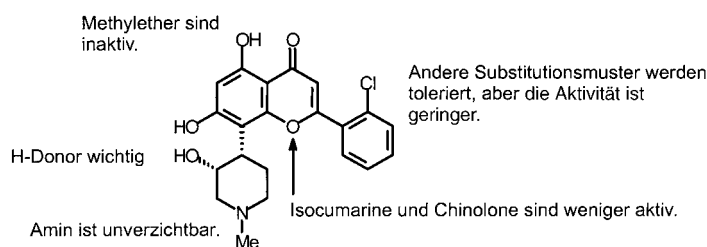
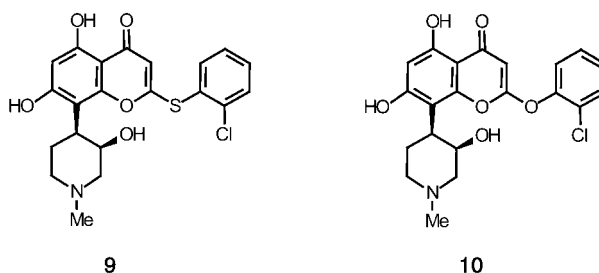


Abbildung 4. Struktur-Aktivitäts-Beziehungen von Flavopiridol-Analoga.

Hydroxyfunktionen und das Piperidin-Stickstoffatom sind für eine hohe Affinität unverzichtbar. Auch die Substitution des Chromon-Grundgerüsts durch Isocumarin oder Chinol-4-on führen zu einer verminderten Aktivität. Die Einführung eines Schwefel- (**9**) oder Sauerstoff-Linkers (**10**) in die Bindung zum Phenylring erhöht die Selektivität für CDK1/B gegen-



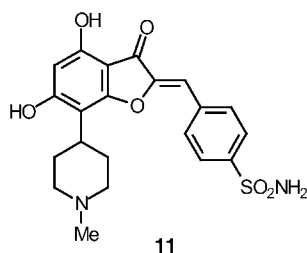
über CDK2/E und CDK4/D1 (Tabelle 1).^[124] Allerdings ist für diesen Selektivitätsgewinn die Reduktion der Affinität zu den beiden anderen Enzymen verantwortlich.

Tabelle 1: Aktivitätsprofil von Flavopiridol (**4**) und seinen Analoga **9** und **10** (IC₅₀-Werte in µM).

Inhibitor	CDK1/B	CDK2/E	CDK4/D1
9	0.11	2.10	16.2
10	0.13	2.11	6.15
4	0.03–0.04	0.1	0.02–0.04

Da die cytotoxischen Eigenschaften von Flavopiridol (**4**) nicht nur auf proliferierende Zellen beschränkt sind, tragen neben der Inhibierung von CDKs sicherlich auch andere Mechanismen zu seiner Aktivität bei. Zudem kann **4** den Effekt anderer Chemotherapeutika durch eine Sensibilisierung der Tumorzellen für die jeweiligen Wirkstoffe verstärken. Dieser Effekt soll unter anderem auch in neueren klinischen Studien genutzt werden, in denen **4** nicht mehr nur alleine, sondern auch in Kombination mit anderen Chemotherapeutika zum Einsatz kommt.^[126]

Wie Schoepfer et al. kürzlich zeigen konnten, lässt sich das 5-Hydroxychromon-Grundgerüst von Flavopiridol (**4**) sehr gut durch ein 4-Hydroxybenzofuranon-Gerüst ersetzen.^[127] Sie entwarfen, ausgehend von der Struktur von CDK2 im Komplex mit **5** im Kristall, entsprechende Mimetika von **4**. Als potenteste Verbindung erwies sich das Sulfonamid **11**.



11

Die Einführung eines Chlorsubstituenten in die *ortho*-Position des Phenylrings bewirkte für **5** im Vergleich zu **4** eine verminderte Aktivität. Die Verbindungen dieser neuen Klasse von CDK-Inhibitoren zeigen bei gleichzeitiger Aktivitätssteigerung eine beachtliche Präferenz für CDK1 und CDK2 gegenüber CDK4 und GSK3 (Tabelle 2 belegt dies für **11**). Auch nicht verwandte Rezeptor-Tyrosin-Kinasen (RTKs) wie der vaskuläre Endothelzell-Wachstumsfaktor-Rezeptor 2 (VEGFR2) und der Rezeptor für den epidermalen Wachstumsfaktor (EGF) werden erst bei deutlich höheren Kon-

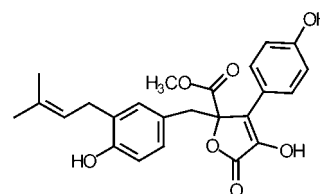
Tabelle 2: Aktivitätsprofil von Verbindung **11**.

IC ₅₀ [µM]				% Inhibierung bei 10 µM		
CDK1/B	CDK2/A	CDK4/D1	GSK3	PKCα	KDR	EGFR
0.009	0.03	1.87	3.7	42	25	36

zentrationen gehemmt. Die Inhibitoren wurden auf ihre antiproliferativen Eigenschaften in einem zellulären Assay (humane Colonkarzinom-Zellen, HCT-116) getestet. Leider war die Aktivität in diesem Testsystem nur gering.

2.3. Butyrolacton I

Kitagawa et al. testeten die Kulturen verschiedener Mikroorganismen auf ihre Fähigkeit, Cyclin B/CDK1 (Maus-Cyclin B/cdc2) zu inhibieren, und fanden, dass der Aspergillusstamm F-25799 eine Substanz mit starker inhibitorischer Aktivität produziert. Der Metabolit Butyrolacton I (**12**) wurde schließlich als aktive Verbindung isoliert und als Inhibitor von CDK1 (IC₅₀ = 0.68 µM) und CDK2 (IC₅₀ =

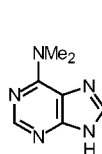


12

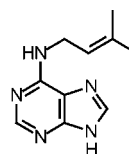
0.82 µM) identifiziert.^[128] Der ATP-kompetitive Naturstoff blockiert beide Kinasen bereits im submikromolaren Bereich, ohne dabei andere Kinasen (inkl. MAPK, PKC, Casein-Kinase I und II, EGFR) zu inhibieren. **12** kann außerdem die vollständige Phosphorylierung von pRB und Histon H1 verhindern. Eine Arretierung des Zellzyklus wird sowohl während der Progression in die S-Phase als auch während des G1M⁻¹-Übergangs beobachtet, was mit der Blockierung von CDK1 und 2 konsistent ist.^[129] Das Lacton **12** zeigt allerdings im zellulären Assay (Lungenkrebszellen) erst bei deutlich höheren Konzentrationen (IC₅₀ ca. 50 µg mL⁻¹) antiproliferative Eigenschaften, was wohl auf die geringe Membranpermeabilität der Substanz zurückzuführen ist.^[130]

2.4. Purine

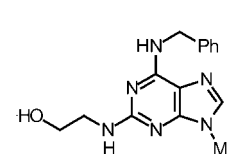
Die erste Substanz, die als CDK-Inhibitor bekannt wurde, war 6-Dimethylaminopurin (**13**).^[131] Ursprünglich war diese



13



14

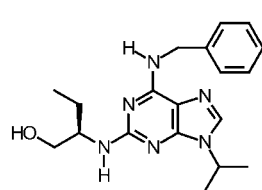


15

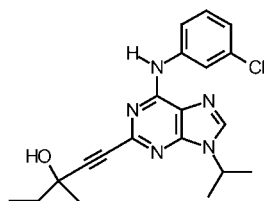
Verbindung als Analogon von Puromycin – einem Inhibitor der Proteinbiosynthese – geplant, es stellte sich jedoch heraus, dass sie die Mitose von Seeigel-Oocyten inhibiert, ohne dabei

die Proteinbiosynthese zu blockieren. Demnach musste ein anderer Wirkmechanismus existieren, und schließlich wurde CDK1 ($IC_{50}=120\text{ }\mu\text{M}$) als eigentliches Target identifiziert. Weitere aktive Purinderivate wurden nach Etablierung eines In-vitro-Kinase-Assays in groß angelegten Screening-Kampagnen gefunden, darunter Isopentenyladenin (**14**, $IC_{50}=55\text{ }\mu\text{M}$) und Olomoucine (**15**).^[103,132] Insbesondere **15**, ein moderater Inhibitor von CDK1, 2 ($IC_{50}=7\text{ }\mu\text{M}$) und 5 ($IC_{50}=3\text{ }\mu\text{M}$), erwies sich als bemerkenswert selektiv gegenüber anderen Kinasen (inklusive CDK4,6 und PKC) und diente als Leitstruktur bei der Suche nach weiteren 2,6,9-trisubstituierten Purinen.

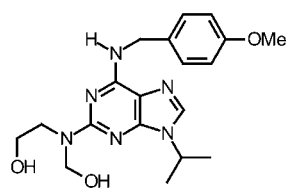
(*R*)-Roscovitin (**16**),^[133,134] ein leicht modifiziertes Derivat von Olomoucine (**15**), zeigte dasselbe Selektivitätsprofil und war um ca. einen Faktor 10 aktiver als die Stammverbindung



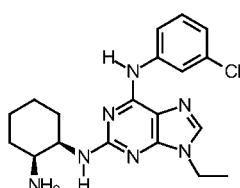
16



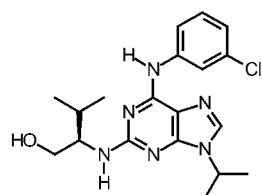
17



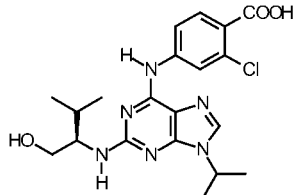
18



19



20



21

(Tabelle 3). Die Strukturen von **14**, **15** und **16** im Komplex mit CDK2 verdeutlichten, dass alle drei Substanzen mit der ATP-Bindetasche des Enzyms wechselwirken.^[133,135] Interessanterweise stimmt die Orientierung des Purin-Bicyclus der Inhibitoren nicht mit der des Adeninrests von ATP überein. Beide Heterocyclen befinden sich zwar in derselben Ebene, sind jedoch um fast 160° gegeneinander verdreht. Dennoch findet sich bei der Wechselwirkung mit dem Peptidrückgrat ein Donor-Acceptor-Motiv ähnlich dem für ATP wieder. Im

Tabelle 3: Aktivitätsprofil ausgewählter Purin-basierter CDK-Inhibitoren (IC_{50} -Werte in μM).

Inhibitor	CDK1/B	CDK2/A	CDK2/E	CDK4/D	CDK5/p35
15	7.0	7.0-	7.0	> 1000	3.0
16	0.45	0.7	0.7	> 100	0.16
17	0.06	–	–	–	–
18	4.2	0.5	0.5	215	–
19	0.025	–	–	–	–
20	0.004	0.07	0.035	0.850	0.075
21	0.006	0.006	0.009	> 10	0.006

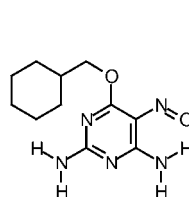
Gegensatz zu ATP, das mit Glu81 und Leu83 wechselwirkt (Abbildung 3a), bildet **16** zwei Wasserstoffbrückenbindungen mit Leu83 aus. Als H-Acceptor dient nicht das Pyrimidin-Stickstoffatom (N1), wie im Fall von ATP, sondern das unsubstituierte Imidazol-Stickstoffatom (N7), wie in Abbildung 3d für Purvalanol B (**21**) gezeigt ist.

Die Kristallstrukturdaten ermöglichten eine detaillierte Charakterisierung der Ligand-Protein-Interaktionen, was für die Planung verbesserter Derivate von Vorteil war. Unter Zuhilfenahme kombinatorischer Methoden^[136] und des Hochdurchsatz-Screenings wurden weitere Purine entwickelt, darunter 2-alkinlierte Derivate wie **17**,^[137,138] CVT 313 (**18**),^[139] das diaminierte **19**,^[140] Purvalanol A (**20**) und Purvalanol B (**21**) (Tabelle 3).^[136]

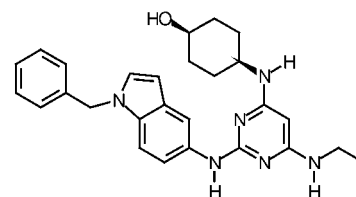
Purvalanol A (**20**) verursacht einen Stopp des Zellzyklus von menschlichen Fibroblasten in der G1/S- und der G2/M-Phase, was mit einer Inhibition von CDK1 und CDK2 übereinstimmt. Wie Untersuchungen an den Krebszelllinien des National Cancer Institute (NCI) zeigten, wirkt **20** (mit einem durchschnittlichen IC_{50} -Wert von $2\text{ }\mu\text{M}$) wahrscheinlich wegen seiner besseren Membranpermeabilität stärker antiproliferativ als Purvalanol B (**21**), obwohl dieses am isolierten Enzym aktiver ist.

2.5. Pyrimidine

Das Pyrimidin NU 6027 (**22**) wurde als Analogon zu den Purin-basierten Derivaten (siehe Abschnitt 2.4) entworfen.^[141] **22** blockiert ATP-kompetitiv CDK1 und CDK2,



22



23

ähnlich wie Olomoucine (**15**), im unteren mikromolaren Bereich ($K_i=2.5$ bzw. $1.3\text{ }\mu\text{M}$). Wie die Struktur im Kristall verdeutlicht, ist das H-Donor-Acceptor-Donor-Motiv von **22** in der Lage, drei Wasserstoffbrückenbindungen zum Peptidrückgrat von CDK2 zu bilden (Abbildung 3e). Die 5-Nitrosogruppe, die die Wechselwirkung der 6-Aminogruppe mit

Glu81 gewährleistet, ist dabei für die konformative Fixierung des Pyrimidins essentiell. In Zelltests zeigte sich, dass **22** sogar aktiver als das Purin Roscovitin (**16**) ist, was für eine bessere Bioverfügbarkeit des Pyrimidins spricht.

Soni et al. konnten in einem Hochdurchsatz-Screening Verbindung **23** (CINK4: Chemical Inhibitor of CDK4) als Inhibitor von CDK4 identifizieren.^[142] Neben CDK4 ($IC_{50} = 1.5 \mu M$) und CDK6 ($IC_{50} = 5.6 \mu M$) blockiert **23** in geringerem Maße auch CDK5 ($IC_{50} = 25 \mu M$). Andere getestete Kinasen (IGF-1R, Insulin-R, v-abl, c-met) werden erst bei Konzentrationen $> 10 \mu M$ beeinträchtigt, während zur Inhibierung von CDK1 und CDK2 Konzentrationen $> 50 \mu M$ notwendig sind. Das Pyrimidinderivat kann die pRb-Phosphorylierung blockieren und verursacht bei pRb(+)-Zellen einen Stopp des Zellzyklus während der G1-Phase. Im Maus-Xenograft-Modell verlangsamte **23** wie der endogene Inhibitor p16 das Tumorstadium und führte zu statistisch signifikant kleineren Tumoren.

2.6. Pyrido[2,3-d]pyrimidinone

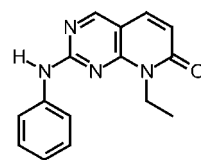
Pyrido[2,3-d]pyrimidinone wurden zunächst als Inhibitoren für Tyrosin-Kinasen bekannt. Insbesondere 6-Arylderivate wie Verbindung **24** zeigen eine hohe Affinität für eine Reihe von RTKs (EGFR, FGFR, PDGFR) und Rezeptor-assoziierte Kinasen (c-Src), sind jedoch inaktiv gegenüber CDKs.^[143] Um einen Einblick in die molekularen Wechselwirkungen der Inhibitoren mit den Kinasen zu erhalten, wurde von Hollis Showalter und Mitarbeitern ein Bindungsmodell erstellt,^[144] welches die Selektivität gegenüber CDKs auf den sperrigen 6-Arylsubstituenten zurückführt.

Später stellte sich heraus, dass Verbindungen ohne 6-Arylsubstituent auch CDKs inhibieren können. So blockiert Verbindung **25** Cyclin D/CDK4 schon im submikromolaren Bereich ($IC_{50} = 0.62 \mu M$) und ließ darüber hinaus erste Präferenz gegenüber Tyrosin-Kinasen (cSrc und FGFR) erkennen.^[145] Ermutigt durch dieses Ergebnis synthetisierten Barvian et al. Analoga von **25** und gelangten einerseits zum sehr potenten, recht unselektiven Kinase-Inhibitor **26** und andererseits zum selektiven CDK4-Inhibitor **27** (Tabelle 4).^[145]

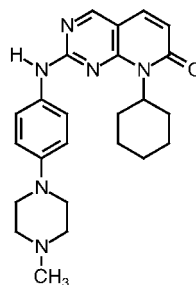
Ähnliches wie für die Pyrido[2,3-d]pyrimidinone gilt auch für deren Desaza-Analoga, die Chinazoline. Auch Chinazoline wurden ursprünglich als Inhibitoren für RTKs identifiziert.^[146–149] Eine besondere Rolle wird dieser Stoffklasse vor

Tabelle 4: Aktivitätsprofil der Pyrido[2,3-d]pyrimidinone **25–27** (IC_{50} -Werte in μM).

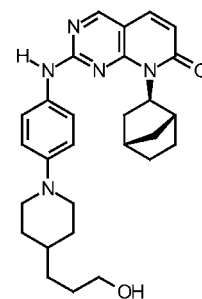
Inhibitor	CDK1/B	CDK2/A	CDK2/E	CDK4/D	FGFR
25	1.015	0.129	0.41	0.620	3.295
26	0.079	0.015	0.020	0.004	0.051
27	> 40	0.209	0.165	0.008	8.62



25



26

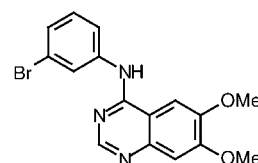


27

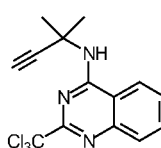
allem wegen der hohen Aktivität bei gleichzeitiger Selektivität zuteil.^[150] Das 3-(Bromanilino)chinazolin **28**, ein hochselektiver Inhibitor für den EGFR, ist mit einem IC_{50} -Wert von 29 pM (!) einer der potentesten bekannten Kinase-Inhibitoren.^[149] CDK2 wird von dieser Verbindung mit einem IC_{50} -Wert von 250 μM nur unbedeutend gehemmt.^[150]

Eine gezielte Verwendung des Chinazolin-Grundgerüsts für die Entwicklung von CDK-Inhibitoren wurde von Sielecki et al. beschrieben.^[151] Ausgehend von Verbindung **29**, welche sich in einem Screening als mäßig potenter Inhibitor für CDK4/D1 ($IC_{50} = 24 \mu M$), CDK2/E ($IC_{50} = 13.5 \mu M$) und CDK1/B ($IC_{50} = 15 \mu M$) erwiesen hatte, wurde durch systematische Variation an den Positionen 2, 4 und 6 ein Struktur-Aktivitäts-Profil erstellt (Abbildung 5).

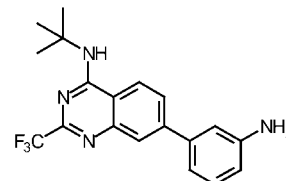
Dabei wird als Substituent in 2-Position ein kleiner, elektronenziehender Substituent wie Trifluormethyl oder Trichlormethyl bevorzugt. Für die 4-Position sind verzweigte Alkylgruppen wie *tert*-Butyl oder *tert*-Amyl geeignet, während an der 6-Position eine Vielzahl funktioneller Gruppen, einschließlich Arenen, Heteroarenen und Amiden, toleriert wird. Bei diesen Untersuchungen wurde Verbindung **30** als potenter Inhibitor für Cyclin E/CDK2 identifiziert. Die Ver-



28

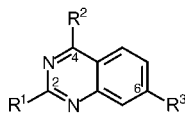


29



30

R²: verzweigte Alkylgruppen wie *tert*-Butyl oder *tert*-Amyl geeignet



R¹: bevorzugt kleine, elektronenziehende Substituenten wie CF₃

R³: Arene, Heteroarene und Amide werden toleriert.

Abbildung 5. Struktur-Aktivitäts-Beziehungen Chinazolin-basierter CDK-Inhibitoren.

bindung zeigt mit einem IC₅₀-Wert von 0.6 µM leichte Selektivität gegenüber CDK4 (IC₅₀ = 2.1 µM). Ein Vergleich der Aktivität gegenüber verschiedenen RTKs ist wegen fehlender Daten nicht möglich. Dabei wäre wegen der besonderen Präferenz dieser Stoffklasse für den EGF-Rezeptor vor allem die Affinität gegenüber Rezeptoren dieser RTK-Familie von Interesse.

2.7. Oxindole

Die traditionelle chinesische Medizin hat sich als reichhaltige Quelle für neue, biologisch wirksame Substanzen erwiesen. Indirubin (**31**, Tabelle 5) ist der Wirkstoff aus

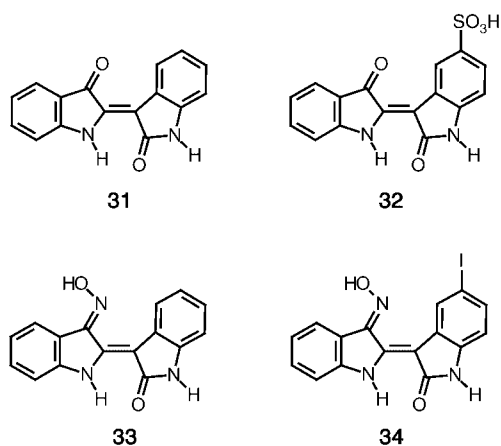


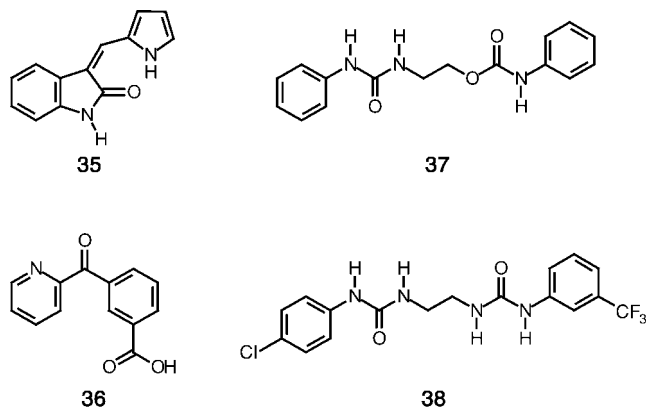
Tabelle 5: Aktivitätsprofil der Indirubine **31–34** (IC₅₀-Werte in µM).

Inhibitor	CDK1/B	CDK2/A	CDK2/E	CDK4/D	CDK5/p35	GSK-3β
31	10	2.2	7.5	12	5.5	0.6
32	0.055	0.035	0.15	0.3	0.065	0.28
33	0.18	0.44	0.25	3.33	0.1	0.022
34	0.025	–	–	–	0.02	0.009

Danggui Longhui Wan, einer Mischung von Pflanzen, die schon vor viertausend Jahren zur Behandlung chronischer Krankheiten wie Leukämie verwendet wurde.^[152] **31** zeigte in In-vitro-Tests eine deutliche Selektivität für CDKs gegenüber anderen Proteinkinasen. Wegen der geringen Wasserlöslichkeit und der schlechten Bioverfügbarkeit von **31** wurden Derivate mit verbesserten pharmakologischen Eigenschaften synthetisiert. Analoga wie das Indirubinsulfat **32** und das

Indirubinmonoxim **33** waren aktiver und ließen eine Präferenz für CDK1, 2 und 5 gegenüber CDK4 erkennen. Die Struktur von **32** im Komplex mit CDK2 belegt, dass es sich auch hier um ATP-kompetitive Verbindungen handelt. Das Oxindol **32** bildet drei Wasserstoffbrückenbindungen zum Peptidrückgrat (Glu81 und Leu83, Abbildung 3 f) und bindet recht tief in die ATP-Tasche.^[153] Die Wirkung der Indirubine beruht offensichtlich auf Interaktionen mit CDKs, obwohl auch schwache Wechselwirkungen mit der DNA bekannt sind.^[154] Das Oxim **33** inhibiert durch die Blockierung von CDK1 und CDK2 die Proliferation einer Reihe von Zellen während der späten G1- und in der G2/M-Phase. Neuere Studien ergaben, dass Indirubine auch potente Inhibitoren des evolutionär eng verwandten Enzyms GSK-3β sind.^[119] Unter den potentesten Indirubinderivaten zeigten einige Analoga, wie das 5-Iodindirubinmonoxim **34**, sogar eine höhere Affinität für die GSK-3β.

Das Oxindol **35** wurde in einem Hochdurchsatz-Screening neben dem Diarylketon **36** und den Harnstoffderivaten

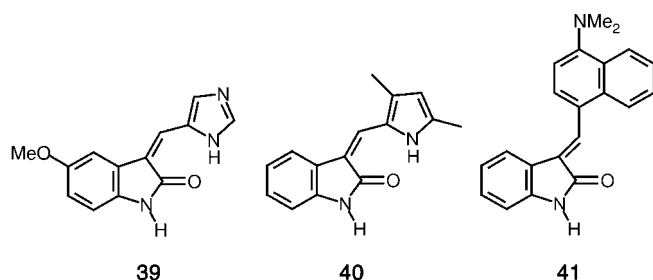


37 und **38** als moderater Inhibitor von CDK4/D1 identifiziert (Tabelle 6).^[155] **35** war anders als die selektiveren CDK4-Inhibitoren **36–38** in der Lage, die Proliferation menschlicher Mammakarzinom-Zellen in submikromolarer Konzentration

Tabelle 6: Aktivitätsprofil der Verbindungen **35–38** (IC₅₀-Werte in µM).

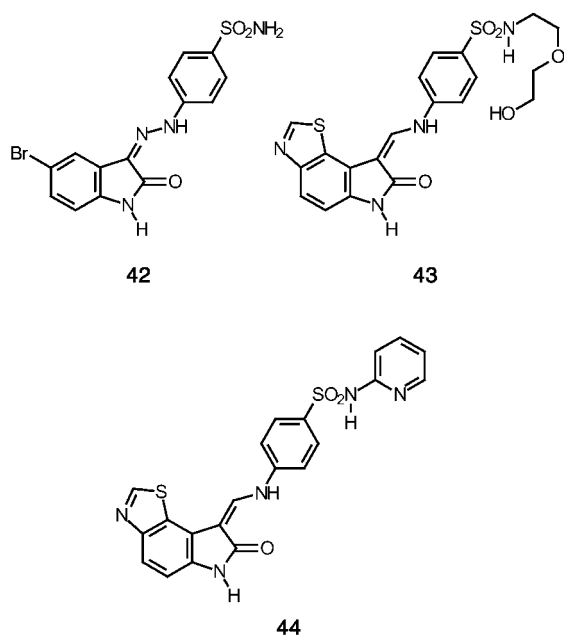
Inhibitor	CDK1/B	CDK2/E	CDK4/D1
35	10.2	10.0	4.9
36	> 30	> 30	6.7
37	> 30	> 30	1.9
38	> 30	> 30	1.2

zu inhibieren (MCF-7: IC₅₀ = 0.42 µM und ZR-75-1: IC₅₀ = 0.1 µM), zudem war **35** deutlich weniger aktiv gegenüber der pRb(–)-Zelllinie BT-549 (IC₅₀ = 13.9 µM). Diese Beobachtung stimmt mit dem postulierten Wirkmechanismus überein (Inhibierung von CDK1, 2 und 4). Allerdings werfen die Daten die Frage auf, ob ein selektiver Inhibitor von CDK4 und 6 überhaupt in der Lage ist, die Zellproliferation zu blockieren.



Das 3,5-disubstituierte Oxindolderivat SU9516 (**39**) zeigt ein ähnliches Selektivitätsprofil wie **32** und blockiert vorzugsweise CDK2 ($IC_{50} = 0.022 \mu M$) neben CDK1 ($IC_{50} = 0.04 \mu M$) und CDK4 ($IC_{50} = 0.2 \mu M$).^[156] Andere Proteinkinasen, wie PKC, p38, PDGFR und EGFR, werden von **39** erst bei deutlich höheren Konzentration inhibiert ($IC_{50} > 10 \mu M$). Leider wurden interessante Rezeptor-Tyrosin-Kinasen wie die VEGF-Rezeptoren nicht berücksichtigt, obwohl Oxindolderivate als potente Inhibitoren dieser Rezeptorfamilie bekannt sind. SU5416 (**40**) befindet sich zurzeit in der klinischen Prüfung als selektiver Inhibitor des VEGFR-2.^[157–159] MAZ51 (**41**), ein weiteres Oxindolderivat, inhibiert den VEGFR-3 bereits im submikromolaren Bereich und wurde als erster niedermolekularer Inhibitor der Lymphangiogenese identifiziert.^[160]

Weitere Anstrengungen wurden unternommen, um auf der Basis des Oxindol-Pharmakophors neue, selektive Proteinkinase-Inhibitoren zu entwickeln.^[161] Das Hydrazone **42**,

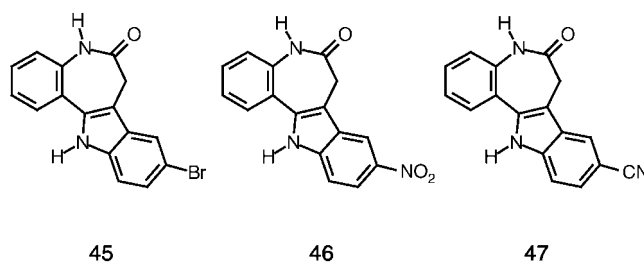


welches in einem Syntheseschritt aus kommerziell erhältlichen Substanzen zugänglich ist, inhibiert CDK2 schon bei einer Konzentration von 60 nM ($c(ATP) = 1.4 \mu M$) und wurde als Leitstruktur bei der Suche nach potenteren Analoga herangezogen. Die Struktur von **42** im Komplex mit CDK2 im

Kristall lieferte wertvolle Erkenntnisse über die Wechselwirkungen des Inhibitors mit dem Enzym und war Voraussetzung für die Entwicklung einer zweiten Generation von Derivaten. Das 4,5-anellierte Derivat **43** zählte im Kinase-Assay zu den potentesten Verbindungen (CDK2: $IC_{50} = 0.54 \text{ nM}$) und war um den Faktor 10 aktiver gegenüber CDK1 ($IC_{50} = 12 \text{ nM}$). Die Selektivität gegenüber anderen Kinasen wurde für Verbindung **44** gezeigt, deren Affinität für CDK1, CDK4, GSK-3 und VEGFR-2 ($IC_{50} = 100, 130, 56$ bzw. 22 nM) geringer war als die für CDK2 ($IC_{50} = 9.7 \text{ nM}$).

2.8. Paullone

Das Benzazepin-Derivat Kenpaullon (**45**) ließ in einer COMPARE-Suche ein ähnliches Aktivitätsprofil gegenüber den 60 menschlichen Krebszelllinien des NCI wie der Natur-



stoff Flavopiridol (**4**) erkennen und wurde in nachfolgenden Kinase-Assays als selektiver Inhibitor von CDK1, 2 und 5 identifiziert (Tabelle 7).^[162] Allerdings war **45** in den zellulären Assays weit weniger aktiv als das Flavon. Zur weiteren Optimierung und zur Erstellung von Struktur-Wirkungs-Beziehungen wurden Analoga der Leitstruktur synthetisiert und auf ihre inhibitorische Wirkung gegenüber Cyclin B/

Tabelle 7: Aktivitätsprofil der Paullone **45–47** (IC_{50} -Werte in μM).

Inhibitor	CDK1/B	CDK2/A	CDK2/E	CDK4/D	CDK5/p5	GSK-3
45	0.4	0.68	7.5	> 100	0.85	0.023
46	0.035	0.015	0.2	> 10	0.04	0.004
47	0.024	–	–	–	0.044	0.01

CDK1 (Seestern p34^{cdc2}/Cyclin B^{cdc13}) getestet.^[163] Tatsächlich fand man durch Austausch des Bromsubstituenten potentere Substanzen, wie Alsterpaullon (**46**) und das Cyanid **47**. Das Einführen weiterer Substituenten oder der Austausch der Lactamstruktur lieferte keine aktiveren Verbindungen, obwohl insbesondere in 2-Position des Benzazepingerüsts Substituenten toleriert werden.^[164] Enzymkinetik und Molecular-Modeling-Studien lassen vermuten, dass auch die Paullone mit der ATP-Bindetasche interagieren. In nachfolgenden Studien wurden weitere Targets dieser Substanzklasse identifiziert. Man stellte fest, dass nicht nur CDKs, sondern auch GSK3 α und β schon mit nanomolaren Mengen der Paullone inhibiert werden.^[165]

2.9. Fascaplysin

Ein weiterer Inhibitor mit deutlicher Präferenz für CDK4 und 6 ist der marine Naturstoff Fascaplysin (**48**). Dieser rote Pigmentfarbstoff wurde ursprünglich aus dem Schwamm *Fascaplysinopsis* Berquist isoliert und als antibiotisch aktiver Wirkstoff identifiziert.^[166] In neuerer Zeit konnte gezeigt werden, dass dieses Diindol CDK4/D1 und CDK6/D1 in hoher nanomolarer Konzentration hemmt.^[167] Erstaunlicherweise ist die inhibitorische Aktivität gegenüber diesen Kinasen stark vom gebundenen Cyclinpartner abhängig (Tabelle 8). So wird eine 50-proz. Inhibierung für CDK4/D2 und CDK4/D3 erst oberhalb von 100 μM beob-

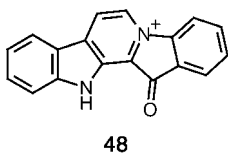


Tabelle 8: Aktivitätsprofil von Fascaplysin (**48**) (IC_{50} -Werte in μM).

CDK-Cyclin-Komplex	IC_{50}	CDK-Cyclin-Komplex	IC_{50}
CDK1/B	> 100	CDK4/D3	> 100
CDK2/A	> 50	CDK6/D1	3.4
CDK2/E	> 50	CDK6/D2	> 50
CDK4/D1	0.35	CDK5/p35	> 20
CDK4/D2	> 100		

achtet. Zudem werden nicht-Cyclin-abhängige Kinasen wie v-abl, c-met, IGF-1R und Insulin-R erst mit einem IC_{50} -Wert größer 10 μM gehemmt.

Konsistent mit der Inhibierung von CDK4,6/D1 durch Fascaplysin (**48**) ist die Arretierung von asynchron wachsenden MRC-5- und U2OS-Zellen in der G1-Phase. Wie jedoch kürzlich gezeigt werden konnte, interkaliert **48** in doppelsträngige DNA;^[168] eine Eigenschaft, die eine therapeutische Verwendung eher unwahrscheinlich macht. Dennoch ist **48** eine wertvolle Leitstruktur für die Entwicklung neuer CDK4,6-Inhibitoren.

2.10. Hymenialdisin

Zu den erst in neuerer Zeit entdeckten Inhibitoren für Cyclin-abhängige Kinasen gehört das Pyrroloazepin-Alkaloid Hymenialdisin (**49**).^[169] **49** konnte als Inhaltsstoff vieler Schwämme nachgewiesen werden und zählt zur Naturstoffklasse der Aldisine. Wie Meijer et al. zeigten, ist **49** ein potenter Inhibitor für CDKs, die eng verwandte GSK-3 β sowie auch für die Casein-Kinase 1 (CK1). **49** ist dabei moderat selektiv für Cyclin B/CDK1, Cyclin E/CDK2, CDK5/p25, GSK-3 β und CK1 (Tabelle 9).

Hymenialdisin (**49**) hemmt die untersuchten Kinasen ATP-kompetitiv. Einen Einblick in die Art der Bindung auf molekularer Ebene liefert die Struktur von CDK2 im Komplex mit dem Naturstoff im Kristall.^[169] **49** wird wie erwartet in der ATP-Bindetasche des

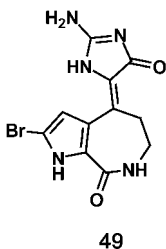


Tabelle 9: Aktivitätsprofil von Hymenialdisin (**49**) (IC_{50} -Werte in μM).

CDK-Cyclin-Komplex	IC_{50}	CDK-Cyclin-Komplex	IC_{50}
CDK1/B	22	CDK5/p25	28
CDK2/A	70	CDK6/D2	700
CDK2/E	40	GSK-3 β	10
CDK3/E	100	CK1	35
CDK4/D1	600		

Enzyms gebunden, wobei das Pyrroloazepin den Platz von Adenin einnimmt. Interessant ist hierbei, dass Hymenialdisin, ähnlich wie Indirubin (**31**), im Unterschied zu ATP eine dritte Wasserstoffbrückenbindung zum Peptidrückgrat bildet (Abbildung 3g). Die Guanidinfunktion kann zudem mit der Seitenkette von Asp145 eine ionische Wechselwirkung eingehen und dadurch die Affinität zum Enzym weiter steigern. Die Van-der-Waals-Wechselwirkungen zwischen Inhibitor und Enzym sind im Wesentlichen dieselben, die auch bei ATP beobachtet werden, wobei vor allem das bicyclische System zur Bindung beiträgt.

Kürzlich wurden (*E*)- und (*Z*)-Hymenialdisin auch als potente Inhibitoren der Ras/Raf/MEK-1/MAPK-Signaltransduktionskaskade identifiziert.^[170] Hymenialdisin hemmt die Phosphorylierung von MAPK durch MEK-1 im einstelligen nanomolaren Bereich und blockiert so die Signalweiterleitung (IC_{50} = 3–9 nM). Da die onkogene Form von Ras mit über 30 % aller Krebsformen assoziiert ist, könnte Hymenialdisin somit auf doppelte Weise regulierend in den Zellzyklus eingreifen.

2.11. Acridone und Benzothiadiazine

Der Verlust der Funktion von p16^{INK4}, einem endogenen Inhibitor von Cyclin D1/CDK4, wird bei einer Vielzahl von Tumoren beobachtet. Auch 47 der 60 Krebszelllinien des NCI zeigen Veränderungen in der Aktivität von p16^{INK4}. Kelley et al. stellten die Hypothese auf, dass unter den Verbindungen, die bevorzugt diese p16-defekte Zelllinien am Wachstum hindern, selektive Inhibitoren der CDK4 zu finden sein sollten.^[171] Mithilfe des Algorithmus COMPARE wurden zwei neue Leitstrukturen mit dem gewünschten Profil gefunden. In der Tat zeigten beide Verbindungen eine deutliche Selektivität für CDK4 gegenüber anderen CDKs, allerdings sind Wechselwirkungen mit anderen Proteinkinasen noch nicht untersucht und weitere Wirkmechanismen wie DNA-Interkalation wahrscheinlich.^[172] NSC625987 (**50**) und NSC645787 (**51**) sind die bisher potentesten Substanzen und eignen sich als Basis zur Weiterentwicklung dieser Substanzklassen (Tabelle 10).

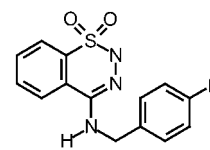
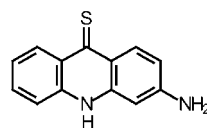


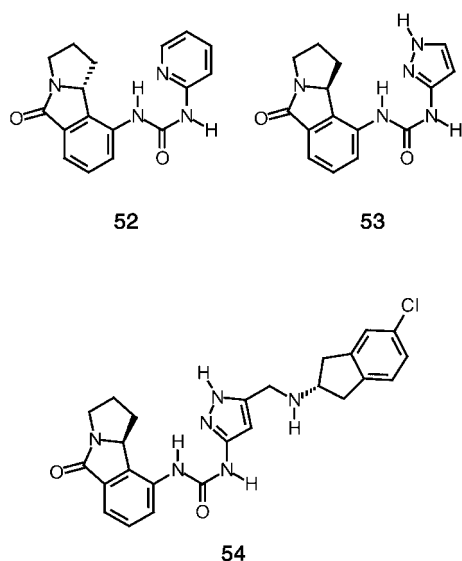
Tabelle 10: Aktivitätsprofil von **50** und **51** (IC_{50} -Werte in μM).

Inhibitor	CDK1/A	CDK2/A	CDK2/E	CDK4/D
50	88	> 100	> 100	3.1
51	> 100	> 100	> 100	0.33

2.12. Diarylharnstoffderivate

Beim Design selektiver und potenter Inhibitoren für CDK4 und 6 stand man zunächst vor dem Problem, dass lediglich die Struktur von CDK6 mit dem endogenen Inhibitor p16 im Kristall bekannt war. Kristallstrukturdaten von CDK4 und 6 mit niedermolekularen ATP-kompetitiven Verbindungen, die eine Beschreibung der ATP-Bindetasche ermöglichen, existieren bis heute nicht.

Honma et al. entwickelten ein Modell für das CDK4-Protein, indem sie sich die Sequenzhomologie zwischen CDK4 und CDK2 (in der ATP-Bindetasche 72 %) zunutze machten.^[173,174] Basierend auf der aktivierten Form der CDK2 war dieses Modell zunächst Ideen-Generator zur Konzeption neuer Leitstrukturen. Demnach kamen vier Grundgerüste zur Weiterentwicklung in Frage und die Autoren entschieden sich für die Diarylharnstoffderivate, sicherlich nicht zuletzt weil hier ein schneller Zugang zu strukturell diversen Substanzbibliotheken möglich war und möglicherweise auch wegen der bekannten Präferenz der Arylharnstoffderivate **37** und **38** (siehe Abschnitt 2.7). Durch Variation der beiden Arylsubstituenten gelangte man schließlich zu potenten CDK-Inhibitoren. Verbindung **52** inhibiert CDK4 schon bei



einer Konzentration von 42 nM und ließ erste Selektivität gegenüber Nicht-CDKs erkennen (inkl. PKA, PKC, MEK1, Src und EGFR). Das Pyrazolylharnstoffderivat **53** war im Kinase-Assay noch etwas aktiver (Tabelle 11).

Zur Validierung des CDK4-Modells synthetisierte man ein CDK2-Protein, bei dem die ATP-Bindetasche von CDK2 durch die von CDK4 ersetzt war. Sowohl dieses „CDK4/

Tabelle 11: Aktivitätsprofil der Harnstoffderivate **52–54** (IC_{50} -Werte in μM).

Inhibitor	CDK1/B	CDK2/A	CDK4/D
52	0.120	0.078	0.042
53	–	–	0.029
54	1.8	0.44	0.002

CDK2“-Protein als auch die Wildtyp-CDK2 konnten im Komplex mit dem Inhibitor **52** kristallisiert werden (Abbildung 3 h).^[175] Der Vergleich der Kristallstrukturdaten ermöglichte die Identifizierung CDK4-spezifischer Aminosäurereste rund um die ATP-Tasche und bestätigte die Gültigkeit des CDK4-Homologie-Modells. Nun konnten Strukturmerkmale ermittelt werden, die weitere Modifikationen der Leitstruktur **52** im Hinblick auf die Erhöhung der Selektivität für CDK4 ermöglichten. Dabei machte man sich die Existenz des selektiven Inhibitors p16 zunutze. Man erkannte, dass der Pyridinring von Verbindung **52** in Richtung der p16-Binderegion des Enzyms zeigte. Durch das Einführen weiterer Substituenten, die mit den Aminosäuren der p16-Bindetasche wechselwirken (Gln 98, Asp 99 und Thr 102), gelangte man zu sehr potenten und höchst selektiven CDK4-Inhibitoren, wie dem 5-substituierten Pyrazolylharnstoffderivat **54**.^[174] Im Zell-Assay konnte Verbindung **54** die Proliferation der pRB(+)-Krebszelllinie Molt-4 bei Konzentrationen zwischen 0.1 und 0.5 μM in der G1-Phase stoppen.

3. Zusammenfassung und Ausblick

In den letzten Jahren wurden nicht nur neuartige und potente ATP-kompetitive CDK-Inhibitoren entdeckt, sondern auch bekannte Wirkstoffe durch rationales Design weiter verbessert. So steht heute eine Vielzahl strukturell diverser Verbindungen zur Verfügung mit zum Teil beachtlicher Aktivität und Selektivität für einzelne CDK-Familien.

Leider wurde der Selektivität für CDKs, die nicht unmittelbar am Fortgang des Zellzyklus beteiligt sind, bisher nur wenig Beachtung geschenkt. Hierzu zählen neben CDK5, die unter anderem für die neuronale Entwicklung von Bedeutung ist und deren Fehlregulation mit der Alzheimer-Erkrankung in Verbindung gebracht wird,^[17–19,176] insbesondere CDK7, 8 und 9, die indirekt am Zellzyklus beteiligt sind, aber vor allem durch die Beeinflussung der Transkriptionskontrolle so genannte „Housekeeping“-Funktionen erfüllen. Dabei lässt gerade die hohe Homologie der ATP-Bindetasche, wie man sie z. B. bei CDK1 und CDK2 im Vergleich mit CDK9 findet, vermuten, dass es nur schwer möglich sein wird, mit entsprechenden Inhibitoren selektiv die Maschinerie des Zellzyklus zu blockieren.^[177] Zudem beobachtet man in vielen Fällen in vitro und in vivo auch Effekte, die nicht auf eine alleinige Inhibierung von CDKs zurückgeführt werden können, wie die Beispiele Flavopiridol (**4**) und Idirubin (**31**) belegen (siehe Abschnitte 2.2 bzw. 2.7).

Des Weiteren stellt sich die Frage, ob die bisher bekannten CDK-Inhibitoren für den Einsatz als Medikamente, mit dem Ziel in entarteten Zellen die Kontrolle des Zellzyklus

wieder herzustellen, geeignet sind und ob sie unterstützend in Kombinationstherapien eingesetzt werden können. So ist eine Verwendung von Inhibitoren zum Schutz von gesunden Zellen bei Rb-negativen Tumoren möglich. Durch die Gabe von Inhibitoren werden gesunde Zellen in der G1-Phase arretiert und dadurch unempfindlicher gegenüber Chemotherapeutika, die ihre Wirkung während der S-Phase entfalten, wohingegen die Tumorzellen ihre Sensitivität beibehalten.^[178] So lässt sich durch die Gabe von CDK2-Inhibitoren z.B. auch der Chemotherapie-bedingte Haarverlust vermindern.^[179] Zusätzlich scheint ein Einsatz von CDK-Inhibitoren in anderen Bereichen der Medizin denkbar. Entsprechende Inhibitoren werden gegenwärtig auf ihre Verwendbarkeit zur Behandlung von kardiovaskulären Krankheiten, Virusinfektionen und neurodegenerativen Erkrankungen untersucht.^[180,181] Zweifellos jedoch eignen sich die bekannten Wirkstoffe zur weiteren Aufklärung der komplexen Mechanismen des Zellzyklus und zur eingehenderen Untersuchung der Transkriptionssteuerung durch CDKs.

Vorausgesetzt, dass das Selektivitätsproblem gelöst werden kann, bleibt die Frage nach der als Target für die Suche nach Wirkstoffen für therapeutische Zwecke am besten geeigneten CDK vorerst unbeantwortet. Obwohl die Mehrzahl der Mutationen CDK4 und CDK6 sowie deren Regulatoren betreffen, konzentrieren sich zurzeit die meisten Anstrengungen auf die Entwicklung von pan-CDK-Inhibitoren oder selektiven Inhibitoren der CDK2.^[8] Dies ist aus zwei Gründen nicht überraschend: Zum einen werden vom pharmakologischen Standpunkt aus vor allem Verbindungen mit Zelltod-induzierenden Eigenschaften gesucht, zum anderen wurde bisher erst die Struktur von CDK2 im Komplex mit kleinen Molekülen im Kristall gelöst, was das strukturbasierte Design von neuen Wirkstoffen auf diese CDK beschränkt.

Die bisherige Entwicklung gibt begründete Hoffnung, dass es auch in der Zukunft gelingen wird, die verschiedenen Verbindungen weiter zu optimieren oder auf der Basis von neuen Struktur-Aktivitäts-Beziehungen vollkommen neuartige Wirkstoffe mit geeignetem Aktivitätsprofil zu entwickeln. Dabei wird es sicherlich auch vermehrt Anstrengungen geben, nicht-ATP-kompetitive Inhibitoren zu entwickeln, da diese eine ungleich höhere Selektivität für die individuellen Kinasen versprechen. Gerade die CDKs bieten durch die Vielfalt ihrer Regulationsmechanismen interessante Ansätze für das Design entsprechender Inhibitoren.

Eingegangen am 13. Juni 2002 [A540]

- [1] L. H. Hartwell, T. A. Weinert, *Science* **1989**, 246, 629–634.
- [2] A. G. Paulovich, D. P. Toczyski, L. H. Hartwell, *Cell* **1997**, 88, 315–321.
- [3] Y. Gu, J. Rosenblatt, D. O. Morgan, *EMBO J.* **1992**, 11, 3995–4005.
- [4] C. J. Sherr, *Science* **1996**, 274, 1672–1677.
- [5] M. Brandeis, T. Hunt, *EMBO J.* **1996**, 15, 5280–5289.
- [6] J. W. Harper, P. D. Adams, *Chem. Rev.* **2001**, 101, 2511–2526.
- [7] A. M. Senderowicz, E. A. Sausville, *J. Natl. Cancer Inst.* **2000**, 92, 376–387.

- [8] M. Malumbres, M. Barbacid, *Nat. Rev. Cancer* **2001**, 1, 222–231.
- [9] W. G. Kaelin, Jr., *J. Clin. Invest.* **1999**, 104, 1503–1506.
- [10] D. O. Morgan, *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **1997**, 13, 261–291.
- [11] C. J. Hengartner, V. E. Myer, S. M. Liao, C. J. Wilson, S. S. Koh, R. A. Young, *Mol. Cell* **1998**, 2, 43–53.
- [12] H. Serizawa, T. P. Makela, J. W. Conaway, R. C. Conaway, R. A. Weinberg, R. A. Young, *Nature* **1995**, 374, 280–282.
- [13] J. Garriga, J. Peng, M. Parreno, D. H. Price, E. E. Henderson, X. Grana, *Oncogene* **1998**, 17, 3093–3102.
- [14] S. Akoulitchiev, S. Chuikov, D. Reinberg, *Nature* **2000**, 407, 102–106.
- [15] P. Wei, M. E. Garber, S. M. Fang, W. H. Fischer, K. A. Jones, *Cell* **1998**, 92, 451–462.
- [16] J. P. Tassan, M. Jaquenoud, P. Leopold, S. J. Schultz, E. A. Nigg, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1995**, 92, 8871–8875.
- [17] G. Paglini, A. Caceres, *Eur. J. Biochem.* **2001**, 268, 1528–1533.
- [18] M. Nikolic, H. Dudek, Y. T. Kwon, Y. F. Ramos, L. H. Tsai, *Genes Dev.* **1996**, 10, 816–825.
- [19] J. Lew, R. J. Winkfein, H. K. Paudel, J. H. Wang, *J. Biol. Chem.* **1992**, 267, 25922–25926.
- [20] M. Kasten, A. Giordano, *Oncogene* **2001**, 20, 1832–1838.
- [21] M. J. Solomon, M. Glotzer, T. H. Lee, M. Philippe, M. W. Kirschner, *Cell* **1990**, 63, 1013–1024.
- [22] T. K. MacLachlan, N. Sang, A. Giordano, *Crit. Rev. Eukaryotic Gene Expression* **1995**, 5, 127–156.
- [23] J. Peng, Y. Zhu, J. T. Milton, D. H. Price, *Genes Dev.* **1998**, 12, 755–762.
- [24] M. C. Edwards, C. Wong, S. J. Elledge, *Mol. Cell. Biol.* **1998**, 18, 4291–4300.
- [25] A. Udvardy, *Eur. J. Biochem.* **1996**, 240, 307–313.
- [26] J. A. Diehl, F. Zindy, C. J. Sherr, *Genes Dev.* **1997**, 11, 957–972.
- [27] B. E. Clurman, R. J. Sheaff, K. Thress, M. Groudine, J. M. Roberts, *Genes Dev.* **1996**, 10, 1979–1990.
- [28] K. A. Won, S. I. Reed, *EMBO J.* **1996**, 15, 4182–4193.
- [29] V. Sudakin, D. Ganioth, A. Dahan, H. Heller, J. Herskho, F. C. Luca, J. V. Ruderman, A. Herskho, *Mol. Biol. Cell* **1995**, 6, 185–197.
- [30] A. Klotzbucher, E. Stewart, D. Harrison, T. Hunt, *EMBO J.* **1996**, 15, 3053–3064.
- [31] J. A. Diehl, M. Cheng, M. F. Roussel, C. J. Sherr, *Genes Dev.* **1998**, 12, 3499–3511.
- [32] H. Matsushime, M. F. Roussel, R. A. Ashmun, C. J. Sherr, *Cell* **1991**, 65, 701–713.
- [33] K. A. Won, Y. Xiong, D. Beach, M. Z. Gilman, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1992**, 89, 9910–9914.
- [34] C. J. Sherr, *Cell* **1994**, 79, 551–555.
- [35] J. Y. Kato, M. Matsuo, D. K. Strom, C. J. Sherr, *Mol. Cell. Biol.* **1994**, 14, 2713–2721.
- [36] P. Kaldis, *Cell. Mol. Life Sci.* **1999**, 55, 284–296.
- [37] R. P. Fisher, D. O. Morgan, *Cell* **1994**, 78, 713–724.
- [38] J. Kato, H. Matsushime, S. W. Hiebert, M. E. Ewen, C. J. Sherr, *Genes Dev.* **1993**, 7, 331–342.
- [39] S. J. Weintraub, K. N. Chow, R. X. Luo, S. H. Zhang, S. He, D. C. Dean, *Nature* **1995**, 375, 812–815.
- [40] R. Ferreira, I. Naguibneva, M. Mathieu, S. Ait-Si-Ali, P. Robin, L. L. Pritchard, A. Harel-Bellan, *EMBO Rep.* **2001**, 2, 794–799.
- [41] A. Brehm, E. A. Miska, D. J. McCance, J. L. Reid, A. J. Bannister, T. Kouzarides, *Nature* **1998**, 391, 597–601.
- [42] Y. Takahashi, J. B. Rayman, B. D. Dynlacht, *Genes Dev.* **2000**, 14, 804–816.
- [43] H. S. Zhang, M. Gavin, A. Dahiya, A. A. Postigo, D. Ma, R. X. Luo, J. W. Harbour, D. C. Dean, *Cell* **2000**, 101, 79–89.
- [44] H. Zhang, G. J. Hannon, D. Beach, *Genes Dev.* **1994**, 8, 1750–1758.

- [45] A. S. Lundberg, R. A. Weinberg, *Mol. Cell. Biol.* **1998**, *18*, 753–761.
- [46] S. A. Ezhevsky, A. Ho, M. Becker-Hapak, P. K. Davis, S. F. Dowdy, *Mol. Cell. Biol.* **2001**, *21*, 4773–4784.
- [47] M. Xu, K. A. Sheppard, C. Y. Peng, A. S. Yee, H. Piwnica-Worms, *Mol. Cell. Biol.* **1994**, *14*, 8420–8431.
- [48] W. Krek, M. E. Ewen, S. Shirodkar, Z. Arany, W. G. Kaelin, Jr., D. M. Livingston, *Cell* **1994**, *78*, 161–172.
- [49] B. D. Dynlacht, K. Moberg, J. A. Lees, E. Harlow, L. Zhu, *Mol. Cell. Biol.* **1997**, *17*, 3867–3875.
- [50] B. O. Petersen, J. Lukas, C. S. Sorensen, J. Bartek, K. Helin, *EMBO J.* **1999**, *18*, 396–410.
- [51] A. J. Obaya, J. M. Sedivy, *Cell. Mol. Life Sci.* **2002**, *59*, 126–142.
- [52] M. Pagano, R. Pepperkok, F. Verde, W. Ansorge, G. Draetta, *EMBO J.* **1992**, *11*, 961–971.
- [53] J. Pines, T. Hunter, *Nature* **1990**, *346*, 760–763.
- [54] M. Santaguida, Q. Ding, G. Berube, M. Truscott, P. Whyte, A. Nepveu, *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 45780–45790.
- [55] P. Nurse, *Nature* **1990**, *344*, 503–508.
- [56] G. Piaggio, A. Farina, D. Perrotti, I. Manni, P. Fuschi, A. Sacchi, C. Gaetano, *Exp. Cell Res.* **1995**, *216*, 396–402.
- [57] T. Kishimoto, E. Okumura, *Prog. Cell Cycle Res.* **1997**, *3*, 241–249.
- [58] C. H. McGowan, P. Russell, *EMBO J.* **1993**, *12*, 75–85.
- [59] P. R. Mueller, T. R. Coleman, A. Kumagai, W. G. Dunphy, *Science* **1995**, *270*, 86–90.
- [60] L. L. Parker, H. Piwnica-Worms, *Science* **1992**, *257*, 1955–1957.
- [61] F. Liu, J. J. Stanton, Z. Wu, H. Piwnica-Worms, *Mol. Cell. Biol.* **1997**, *17*, 571–583.
- [62] W. G. Dunphy, A. Kumagai, *Cell* **1991**, *67*, 189–196.
- [63] V. A. Smits, R. H. Medema, *Biochim. Biophys. Acta* **2001**, *1519*, 1–12.
- [64] P. J. Papst, H. Sugiyama, M. Nagasawa, J. J. Lucas, J. L. Maller, N. Terada, *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 15077–15084.
- [65] J. J. Long, A. Leresche, R. W. Kriwacki, J. M. Gottesfeld, *Mol. Cell. Biol.* **1998**, *18*, 1467–1476.
- [66] M. Hendrickson, M. Madine, S. Dalton, J. Gautier, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1996**, *93*, 12223–12228.
- [67] J. M. Gottesfeld, V. J. Wolf, T. Dang, D. J. Forbes, P. Hartl, *Science* **1994**, *263*, 81–84.
- [68] L. Cerutti, V. Simanis, *Curr. Opin. Genet. Dev.* **2000**, *10*, 65–69.
- [69] F. M. Townsley, J. V. Ruderman, *Trends Cell Biol.* **1998**, *8*, 238–244.
- [70] N. P. Pavletich, *J. Mol. Biol.* **1999**, *287*, 821–828.
- [71] C. J. Sherr, J. M. Roberts, *Genes Dev.* **1999**, *13*, 1501–1512.
- [72] M. H. Lee, H. Y. Yang, *Cell. Mol. Life Sci.* **2001**, *58*, 1907–1922.
- [73] K. Polyak, J. Y. Kato, M. J. Solomon, C. J. Sherr, J. Massague, J. M. Roberts, A. Koff, *Genes Dev.* **1994**, *8*, 9–22.
- [74] K. Polyak, M. H. Lee, H. Erdjument-Bromage, A. Koff, J. M. Roberts, P. Tempst, J. Massague, *Cell* **1994**, *78*, 59–66.
- [75] M. H. Lee, I. Reynisdottir, J. Massague, *Genes Dev.* **1995**, *9*, 639–649.
- [76] S. Matsuoka, M. C. Edwards, C. Bai, S. Parker, P. Zhang, A. Baldini, J. W. Harper, S. J. Elledge, *Genes Dev.* **1995**, *9*, 650–662.
- [77] H. Toyoshima, T. Hunter, *Cell* **1994**, *78*, 67–74.
- [78] J. W. Harper, G. R. Adami, N. Wei, K. Keyomarsi, S. J. Elledge, *Cell* **1993**, *75*, 805–816.
- [79] W. S. el-Deiry, T. Tokino, V. E. Velculescu, D. B. Levy, R. Parsons, J. M. Trent, D. Lin, W. E. Mercer, K. W. Kinzler, B. Vogelstein, *Cell* **1993**, *75*, 817–825.
- [80] Y. Xiong, G. J. Hannon, H. Zhang, D. Casso, R. Kobayashi, D. Beach, *Nature* **1993**, *366*, 701–704.
- [81] J. LaBaer, M. D. Garrett, L. F. Stevenson, J. M. Slingerland, C. Sandhu, H. S. Chou, A. Fattaey, E. Harlow, *Genes Dev.* **1997**, *11*, 847–862.
- [82] J. W. Harper, S. J. Elledge, K. Keyomarsi, B. Dynlacht, L. H. Tsai, P. Zhang, S. Dobrowski, C. Bai, L. Connell-Crowley, E. Swindell, *Mol. Cell. Biol.* **1995**, *6*, 387–400.
- [83] M. Cheng, P. Olivier, J. A. Diehl, M. Fero, M. F. Roussel, J. M. Roberts, C. J. Sherr, *EMBO J.* **1999**, *18*, 1571–1583.
- [84] A. A. Russo, P. D. Jeffrey, A. K. Patten, J. Massague, N. P. Pavletich, *Nature* **1996**, *382*, 325–331.
- [85] S. W. Blain, E. Montalvo, J. Massague, *J. Biol. Chem.* **1997**, *272*, 25863–25872.
- [86] M. Serrano, G. J. Hannon, D. Beach, *Nature* **1993**, *366*, 704–707.
- [87] G. J. Hannon, D. Beach, *Nature* **1994**, *371*, 257–261.
- [88] K. L. Guan, C. W. Jenkins, Y. Li, M. A. Nichols, X. Wu, C. L. O'Keefe, A. G. Matera, Y. Xiong, *Genes Dev.* **1994**, *8*, 2939–2952.
- [89] H. Hirai, M. F. Roussel, J. Y. Kato, R. A. Ashmun, C. J. Sherr, *Mol. Cell. Biol.* **1995**, *15*, 2672–2681.
- [90] F. K. Chan, J. Zhang, L. Cheng, D. N. Shapiro, A. Winoto, *Mol. Cell. Biol.* **1995**, *15*, 2682–2688.
- [91] M. Adachi, M. F. Roussel, K. Havenith, C. J. Sherr, *Blood* **1997**, *90*, 126–137.
- [92] I. Reynisdottir, J. Massague, *Genes Dev.* **1997**, *11*, 492–503.
- [93] C. J. Sherr, *Genes Dev.* **1998**, *12*, 2984–2991.
- [94] J. M. Nigro, S. J. Baker, A. C. Preisinger, J. M. Jessup, R. Hostetter, K. Cleary, S. H. Bigner, N. Davidson, S. Baylin, P. Devilee, T. Glover, F. S. Collins, A. Weston, R. Modali, C. C. Harris, B. Vogelstein, *Nature* **1989**, *342*, 705–708.
- [95] M. H. Hollstein, D. Sidransky, B. Vogelstein, C. C. Harris, *Science* **1991**, *253*, 49–53.
- [96] S. P. Hussain, C. C. Harris, *Cancer Res.* **1998**, *58*, 4023–4037.
- [97] S. P. Hussain, M. H. Hollstein, C. C. Harris, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **2000**, *919*, 79–85.
- [98] M. B. Kastan, O. Onyekwere, D. Sidransky, B. Vogelstein, R. W. Craig, *Cancer Res.* **1991**, *51*, 6304–6311.
- [99] X. Chen, L. J. Ko, L. Jayaraman, C. Prives, *Genes Dev.* **1996**, *10*, 2438–2451.
- [100] T. M. Gottlieb, M. Oren, *Semin. Cancer Biol.* **1998**, *8*, 359–368.
- [101] C. Sandhu, J. Slingerland, *Cancer Detect. Prev.* **2000**, *24*, 107–118.
- [102] S. Omura, Y. Iwai, A. Hirano, A. Nakagawa, J. Awaya, H. Tsuchiya, Y. Takahashi, R. Masuma, *J. Antibiot.* **1977**, *30*, 275–282.
- [103] V. Riallet, L. Meijer, *Anticancer Res.* **1991**, *11*, 1581–1590.
- [104] L. M. Toledo, N. B. Lydon, *Structure* **1997**, *5*, 1551–1556.
- [105] A. M. Lawrie, M. E. Noble, P. Tunnah, N. R. Brown, L. N. Johnson, J. A. Endicott, *Nat. Struct. Biol.* **1997**, *4*, 796–801.
- [106] L. Prade, R. A. Engh, A. Girod, V. Kinzel, R. Huber, D. Bossemeyer, *Structure* **1997**, *5*, 1627–1637.
- [107] K. Kawakami, H. Futami, J. Takahara, K. Yamaguchi, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1996**, *219*, 778–783.
- [108] M. Begemann, S. A. Kashimawo, Y. A. Choi, S. Kim, K. M. Christiansen, G. Duigou, M. Mueller, I. Schieren, S. Ghosh, D. Fabbro, N. M. Lampen, D. F. Heitjan, P. B. Schiff, J. N. Bruce, I. B. Weinstein, *Clin. Cancer Res.* **1996**, *2*, 1017–1030.
- [109] T. Meyer, U. Regenass, D. Fabbro, E. Alteri, J. Rosel, M. Muller, G. Caravatti, A. Matter, *Int. J. Cancer* **1989**, *43*, 851–856.
- [110] L. Yu, L. Orlandi, P. Wang, M. S. Orr, A. M. Senderowicz, E. A. Sausville, R. Silvestrini, N. Watanabe, H. Piwnica-Worms, P. M. O'Connor, *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 33455–33464.
- [111] A. D. Harmon, U. Weiss, J. V. Silverton, *Tetrahedron Lett.* **1979**, *20*, 721–724.
- [112] F. Arguello, M. Alexander, J. A. Sterry, G. Tudor, E. M. Smith, N. T. Kalavar, J. F. Greene, Jr., W. Koss, C. D. Morgan, S. F. Stinson, T. J. Siford, W. G. Alvord, R. L. Klabansky, E. A. Sausville, *Blood* **1998**, *91*, 2482–2490.

- [113] G. Kaur, M. Stetler-Stevenson, S. Sebers, P. Worland, H. Sedlacek, C. Myers, J. Czech, R. Naik, E. Sausville, *J. Natl. Cancer Inst.* **1992**, *84*, 1736–1740.
- [114] A. M. Senderowicz, *Invest. New Drugs* **1999**, *17*, 313–320.
- [115] M. D. Losiewicz, B. A. Carlson, G. Kaur, E. A. Sausville, P. J. Worland, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1994**, *201*, 589–595.
- [116] H. H. Sedlacek, D. Hoffmann, J. Czech, C. Kolar, G. Seemann, D. Guessow, K. Bosslet, *Chimia* **1991**, *45*, 311–316.
- [117] H. H. Sedlacek, *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* **2001**, *38*, 139–170.
- [118] J. Czech, D. Hoffmann, R. Naik, H.-H. Sedlacek, *Int. J. Oncol.* **1995**, *6*, 31–36.
- [119] S. Leclerc, M. Garnier, R. Hoessel, D. Marko, J. A. Bibb, G. L. Snyder, P. Greengard, J. Biernat, Y. Z. Wu, E. M. Mandelkow, G. Eisenbrand, L. Meijer, *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 251–260.
- [120] H. H. Sedlacek, J. Czech, R. Naik, G. Kaur, P. Worland, M. Losiewicz, B. Parker, B. Carlson, A. Smith, *Int. J. Oncol.* **1996**, *9*, 1143–1168.
- [121] S. H. Chao, K. Fujinaga, J. E. Marion, R. Taube, E. A. Sausville, A. M. Senderowicz, B. M. Peterlin, D. H. Price, *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 28345–28348.
- [122] B. Carlson, T. Lahusen, S. Singh, A. Loaiza-Perez, P. J. Worland, R. Pestell, C. Albanese, E. A. Sausville, A. M. Senderowicz, *Cancer Res.* **1999**, *59*, 4634–4641.
- [123] W. F. De Azevedo, Jr., H. J. Mueller-Dieckmann, U. Schulze-Gahmen, P. J. Worland, E. Sausville, S. H. Kim, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1996**, *93*, 2735–2740.
- [124] K. S. Kim, J. S. Sack, J. S. Tokarski, L. Qian, S. T. Chao, L. Leith, Y. F. Kelly, R. N. Misra, J. T. Hunt, S. D. Kimball, W. G. Humphreys, B. S. Wautlet, J. G. Mulheron, K. R. Webster, *J. Med. Chem.* **2000**, *43*, 4126–4134.
- [125] K. K. Murthi, M. Dubay, C. McClure, L. Brizuela, M. D. Boisclair, P. J. Worland, M. M. Mansuri, K. Pal, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2000**, *10*, 1037–1041.
- [126] L. R. Kelland, *Expert Opin. Invest. Drugs* **2000**, *9*, 2903–2911.
- [127] J. Schoepfer, H. Fretz, B. Chaudhuri, L. Muller, E. Seeber, L. Meijer, O. Lozach, E. Vangrevelinghe, P. Furet, *J. Med. Chem.* **2002**, *45*, 1741–1747.
- [128] M. Kitagawa, T. Okabe, H. Ogino, H. Matsumoto, I. Suzuki-Takahashi, T. Kokubo, H. Higashi, S. Saitoh, Y. Taya, H. Yasuda, *Oncogene* **1993**, *8*, 2425–2432.
- [129] M. Kitagawa, H. Higashi, I. S. Takahashi, T. Okabe, H. Ogino, Y. Taya, S. Hishimura, A. Okuyama, *Oncogene* **1994**, *9*, 2549–2557.
- [130] K. Nishio, T. Ishida, H. Arioka, H. Kurokawa, K. Fukuoka, T. Nomoto, H. Fukumoto, H. Yokote, N. Saijo, *Anticancer Res.* **1996**, *16*, 3387–3395.
- [131] I. Neant, P. Guerrier, *Exp. Cell Res.* **1988**, *176*, 68–79.
- [132] J. Vesely, L. Havlicek, M. Strnad, J. J. Blow, A. Donella-Deana, L. Pinna, D. S. Letham, J. Kato, L. Detivaud, S. Leclerc, *Eur. J. Biochem.* **1994**, *224*, 771–786.
- [133] W. F. De Azevedo, S. Leclerc, L. Meijer, L. Havlicek, M. Strnad, S. H. Kim, *Eur. J. Biochem.* **1997**, *243*, 518–526.
- [134] L. Meijer, A. Borgne, O. Mulner, J. P. Chong, J. J. Blow, N. Inagaki, M. Inagaki, J. G. Delcros, J. P. Moulinoux, *Eur. J. Biochem.* **1997**, *243*, 527–536.
- [135] U. Schulze-Gahmen, J. Brandsen, H. D. Jones, D. O. Morgan, L. Meijer, J. Vesely, S. H. Kim, *Proteins Struct. Funct. Genet.* **1995**, *22*, 378–391.
- [136] N. S. Gray, L. Wodicka, A. M. Thunnissen, T. C. Norman, S. Kwon, F. H. Espinoza, D. O. Morgan, G. Barnes, S. LeClerc, L. Meijer, S. H. Kim, D. J. Lockhart, P. G. Schultz, *Science* **1998**, *281*, 533–538.
- [137] M. Legraverend, O. Ludwig, E. Bisagni, S. Leclerc, L. Meijer, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1998**, *8*, 793–798.
- [138] M. Legraverend, P. Tunnah, M. Noble, P. Ducrot, O. Ludwig, D. S. Grierson, M. Leost, L. Meijer, J. Endicott, *J. Med. Chem.* **2000**, *43*, 1282–1292.
- [139] E. E. Brooks, N. S. Gray, A. Joly, S. S. Kerwar, R. Lum, R. L. Mackman, T. C. Norman, J. Rosete, M. Rowe, S. R. Schow, P. G. Schultz, X. Wang, M. M. Wick, D. Shiffman, *J. Biol. Chem.* **1997**, *272*, 29207–29211.
- [140] P. Imbach, H. G. Capraro, P. Furet, H. Mett, T. Meyer, J. Zimmermann, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1999**, *9*, 91–96.
- [141] C. E. Arris, F. T. Boyle, A. H. Calvert, N. J. Curtin, J. A. Endicott, E. F. Garman, A. E. Gibson, B. T. Golding, S. Grant, R. J. Griffin, P. Jewsbury, L. N. Johnson, A. M. Lawrie, D. R. Newell, M. E. Noble, E. A. Sausville, R. Schultz, W. Yu, *J. Med. Chem.* **2000**, *43*, 2797–2804.
- [142] R. Soni, T. O'Reilly, P. Furet, L. Muller, C. Stephan, S. Zumstein-Mecker, H. Fretz, D. Fabbro, B. Chaudhuri, *J. Natl. Cancer Inst.* **2001**, *93*, 436–446.
- [143] S. R. Klutchko, J. M. Hamby, D. H. Boschelli, Z. Wu, A. J. Kraker, A. M. Amar, B. G. Hartl, C. Shen, W. D. Klohs, R. W. Steinkampf, D. L. Driscoll, J. M. Nelson, W. L. Elliott, B. J. Roberts, C. L. Stoner, P. W. Vincent, D. J. Dykes, R. L. Panek, G. H. Lu, T. C. Major, T. K. Dahring, H. Hallak, L. A. Bradford, H. D. Hollis Showalter, A. M. Doherty, *J. Med. Chem.* **1998**, *41*, 3276–3292.
- [144] S. Trumpp-Kallmeyer, J. R. Rubin, C. Humblet, J. M. Hamby, H. D. Hollis Showalter, *J. Med. Chem.* **1998**, *41*, 1752–1763.
- [145] M. Barvian, D. H. Boschelli, J. Cossrow, E. Dobrusin, A. Fattaey, A. Fritsch, D. Fry, P. Harvey, P. Keller, M. Garrett, F. La, W. Leopold, D. McNamara, M. Quin, S. Trumpp-Kallmeyer, P. Toogood, Z. Wu, E. Zhang, *J. Med. Chem.* **2000**, *43*, 4606–4616.
- [146] G. W. Rewcastle, W. A. Denny, A. J. Bridges, H. Zhou, D. R. Cody, A. McMichael, D. W. Fry, *J. Med. Chem.* **1995**, *38*, 3482–3487.
- [147] A. J. Bridges, H. Zhou, D. R. Cody, G. W. Rewcastle, A. McMichael, H. D. Hollis Showalter, D. W. Fry, A. J. Kraker, W. A. Denny, *J. Med. Chem.* **1996**, *39*, 267–276.
- [148] A. M. Thompson, D. K. Murray, W. L. Elliott, D. W. Fry, J. A. Nelson, H. D. Hollis Showalter, B. J. Roberts, P. W. Vincent, W. A. Denny, *J. Med. Chem.* **1997**, *40*, 3915–3925.
- [149] D. W. Fry, A. J. Kraker, A. McMichael, L. A. Ambroso, J. M. Nelson, W. R. Leopold, R. W. Connors, A. J. Bridges, *Science* **1994**, *265*, 1093–1095.
- [150] L. Shewchuk, A. Hassell, B. Wisely, W. Rocque, W. Holmes, J. Veal, L. F. Kuyper, *J. Med. Chem.* **2000**, *43*, 133–138.
- [151] T. M. Sielecki, T. L. Johnson, J. Liu, J. K. Muckelbauer, R. H. Grafstrom, S. Cox, J. Boylan, C. R. Burton, H. Chen, A. Smallwood, C. H. Chang, M. Boisclair, P. A. Benfield, G. L. Trainor, S. P. Seitz, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2001**, *11*, 1157–1160.
- [152] R. Hoessel, S. Leclerc, J. A. Endicott, M. E. Nobel, A. Lawrie, P. Tunnah, M. Leost, E. Damiens, D. Marie, D. Marko, E. Niederberger, W. Tang, G. Eisenbrand, L. Meijer, *Nat. Cell Biol.* **1999**, *1*, 60–67.
- [153] T. G. Davies, P. Tunnah, L. Meijer, D. Marko, G. Eisenbrand, J. A. Endicott, M. E. Noble, *Structure* **2001**, *9*, 389–397.
- [154] G. Y. Wu, J. Z. Liu, F. D. Fang, J. Zuo, *Sci. Sin. Ser. B (Engl. Ed.)* **1982**, *25*, 1071–1079.
- [155] L. L. Kent, N. E. Hull-Campbell, T. Lau, J. C. Wu, S. A. Thompson, M. Nori, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1999**, *260*, 768–774.
- [156] M. E. Lane, B. Yu, A. Rice, K. E. Lipson, C. Liang, L. Sun, C. Tang, G. McMahon, R. G. Pestell, S. Wadler, *Cancer Res.* **2001**, *61*, 6170–6177.
- [157] L. Sun, N. Tran, F. Tang, H. App, P. Hirth, G. McMahon, C. Tang, *J. Med. Chem.* **1998**, *41*, 2588–2603.

- [158] L. Sun, N. Tran, C. Liang, S. Hubbard, F. Tang, K. Lipson, R. Schreck, Y. Zhou, G. McMahon, C. Tang, *J. Med. Chem.* **2000**, *43*, 2655–2663.
- [159] T. A. Fong, L. K. Shawver, L. Sun, C. Tang, H. App, T. J. Powell, Y. H. Kim, R. Schreck, X. Wang, W. Risau, A. Ullrich, K. P. Hirth, G. McMahon, *Cancer Res.* **1999**, *59*, 99–106.
- [160] V. Kirkin, R. Mazitschek, J. Krishnan, A. Steffen, J. Waltenberger, M. S. Pepper, A. Giannis, J. P. Sleeman, *Eur. J. Biochem.* **2001**, *268*, 5530–5540.
- [161] H. N. Bramson, J. Corona, S. T. Davis, S. H. Dickerson, M. Edelstein, S. V. Frye, R. T. Gampe, Jr., P. A. Harris, A. Hassell, W. D. Holmes, R. N. Hunter, K. E. Lackey, B. Lovejoy, M. J. Luzzio, V. Montana, W. J. Rocque, D. Rusnak, L. Shewchuk, J. M. Veal, D. H. Walker, L. F. Kuyper, *J. Med. Chem.* **2001**, *44*, 4339–4358.
- [162] D. W. Zaharevitz, R. Gussio, M. Leost, A. M. Senderowicz, T. Lahusen, C. Kunick, L. Meijer, E. A. Sausville, *Cancer Res.* **1999**, *59*, 2566–2569.
- [163] C. Schultz, A. Link, M. Leost, D. W. Zaharevitz, R. Gussio, E. A. Sausville, L. Meijer, C. Kunick, *J. Med. Chem.* **1999**, *42*, 2909–2919.
- [164] C. Kunick, C. Schultz, T. Lemcke, D. W. Zaharevitz, R. Gussio, R. K. Jalluri, E. A. Sausville, M. Leost, L. Meijer, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2000**, *10*, 567–569.
- [165] M. Leost, C. Schultz, A. Link, Y. Z. Wu, J. Biernat, E. M. Mandelkow, J. A. Bibb, G. L. Snyder, P. Greengard, D. W. Zaharevitz, R. Gussio, A. M. Senderowicz, E. A. Sausville, C. Kunick, L. Meijer, *Eur. J. Biochem.* **2000**, *267*, 5983–5994.
- [166] D. M. Roll, C. M. Ireland, H. S. M. Lu, J. Clardy, *J. Org. Chem.* **1988**, *53*, 3276–3278.
- [167] R. Soni, L. Muller, P. Furet, J. Schoepfer, C. Stephan, S. Zumbstein-Mecker, H. Fretz, B. Chaudhuri, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2000**, *275*, 877–884.
- [168] A. Hormann, B. Chaudhuri, H. Fretz, *Bioorg. Med. Chem.* **2001**, *9*, 917–921.
- [169] L. Meijer, A. M. Thunnissen, A. W. White, M. Garnier, M. Nikolic, L. H. Tsai, J. Walter, K. E. Cleverley, P. C. Salinas, Y. Z. Wu, J. Biernat, E. M. Mandelkow, S. H. Kim, G. R. Pettit, *Chem. Biol.* **2000**, *7*, 51–63.
- [170] D. Tasdemir, R. Mallon, M. Greenstein, L. R. Feldberg, S. C. Kim, K. Collins, D. Wojciechowicz, G. C. Mangalindan, G. P. Concepcion, M. K. Harper, C. M. Ireland, *J. Med. Chem.* **2002**, *45*, 529–532.
- [171] A. Kubo, K. Nakagawa, R. K. Varma, N. K. Conrad, J. Q. Cheng, W. C. Lee, J. R. Testa, B. E. Johnson, F. J. Kaye, M. J. Kelley, *Clin. Cancer Res.* **1999**, *5*, 4279–4286.
- [172] I. Antonini, P. Polucci, T. C. Jenkins, L. R. Kelland, E. Menta, N. Pescalli, B. Stefanska, J. Mazerski, S. Martelli, *J. Med. Chem.* **1997**, *40*, 3749–3755.
- [173] T. Honma, K. Hayashi, T. Aoyama, N. Hashimoto, T. Machida, K. Fukasawa, T. Iwama, C. Ikeura, M. Ikuta, I. Suzuki-Takahashi, Y. Iwasawa, T. Hayama, S. Nishimura, H. Morishima, *J. Med. Chem.* **2001**, *44*, 4615–4627.
- [174] T. Honma, T. Yoshizumi, N. Hashimoto, K. Hayashi, N. Kawanishi, K. Fukasawa, T. Takaki, C. Ikeura, M. Ikuta, I. Suzuki-Takahashi, T. Hayama, S. Nishimura, H. Morishima, *J. Med. Chem.* **2001**, *44*, 4628–4640.
- [175] M. Ikuta, K. Kamata, K. Fukasawa, T. Honma, T. Machida, H. Hirai, I. Suzuki-Takahashi, T. Hayama, S. Nishimura, *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 27548–27554.
- [176] L. Lilja, S. N. Yang, D. L. Webb, L. Juntti-Berggren, P. O. Berggren, C. Bark, *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 34199–34205.
- [177] E. A. Sausville, *Trends Mol. Med.* **2002**, *8*, S32–37.
- [178] X. Chen, M. Lowe, T. Herliczek, M. J. Hall, C. Danes, D. A. Lawrence, K. Keyomarsi, *J. Natl. Cancer Inst.* **2000**, *92*, 1999–2008.
- [179] S. T. Davis, B. G. Benson, H. N. Bramson, D. E. Chapman, S. H. Dickerson, K. M. Dold, D. J. Eberwein, M. Edelstein, S. V. Frye, R. T. Gampe, Jr., R. J. Griffin, P. A. Harris, A. M. Hassell, W. D. Holmes, R. N. Hunter, V. B. Knick, K. Lackey, B. Lovejoy, M. J. Luzzio, D. Murray, P. Parker, W. J. Rocque, L. Shewchuk, J. M. Veal, D. H. Walker, L. F. Kuyper, *Science* **2001**, *291*, 134–137.
- [180] L. Meijer, S. Leclerc, M. Leost, *Pharmacol. Ther.* **1999**, *82*, 279–284.
- [181] G. Brooks, N. B. La Thangue, *Drug Discovery Today* **1999**, *4*, 455–464.