

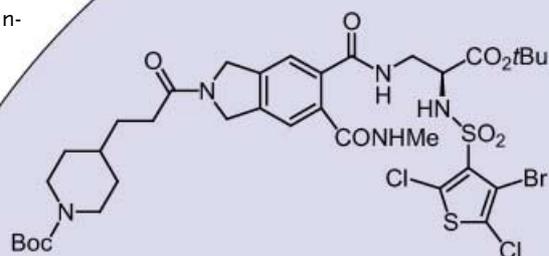
Screening von Bibliotheken

Kombinatorische Flüssigphasensynthese von Bibliotheken: auf der Suche nach Modulatoren für Protein-Protein- und Protein-DNA-Wechselwirkungen in der zellulären Signaltransduktion

Dale L. Boger,* Joel Desharnais und Kevin Capps

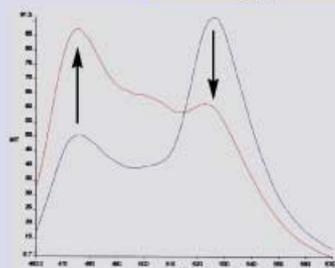
Stichwörter:

Hochdurchsatz-Screening ·
Kombinatorische Chemie ·
Protein-DNA-
Wechselwirkungen ·
Protein-Protein-
Wechselwirkungen



Thrombin-spaltbarer Linker

bHLHLZ Myc	Cyan fluoreszierendes Protein
bHLHLZ Max	Gelb fluoreszierendes Protein
CFP	YFP
bHLHLZ Myc	CFP
	YFP



Onkogenprodukt



niedermolekularer Inhibitor, ermittelt durch neuen FRET-Test

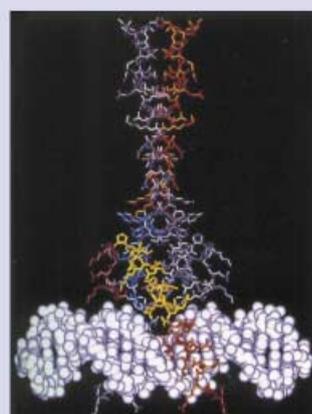
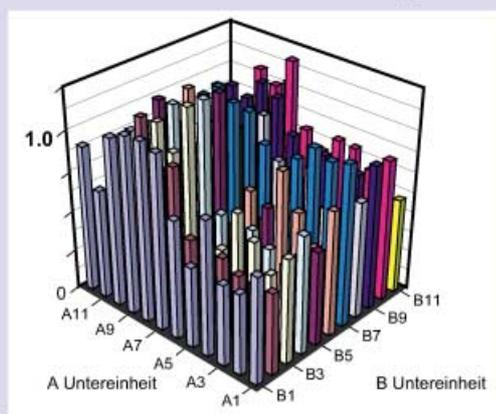


Myc/Max Dimerisierung

DNA-Bindung



Responsives Promoter-Element



Hochdurchsatzsynthese und -screening von Verbindungsbibliotheken haben große Erwartungen für die Wirkstoffsuche geweckt. Für die Herstellung solcher Bibliotheken an der Festphase und in Lösung sind leistungsfähige Methoden entwickelt worden. Die Synthesestrategie wird schon lange nicht mehr nach allgemeinen Erwägungen ausgewählt, sondern mit Blick auf die spezielle Fragestellung. In diesem Aufsatz beschreiben wir Unterschiede zwischen den beiden Methoden, die bei der Entwicklung neuer Programme helfen sollen. Als Beispiel beschreiben wir unsere Versuche, mithilfe von Lösungstechniken Modulatoren für zelluläre Signale durch Beeinflussung von Protein-Protein- oder Protein-DNA-Wechselwirkungen zu identifizieren. Das Vorurteil, niedermolekulare Substanzen seien für therapeutische Intervention an solchen Zielstrukturen ungeeignet, konnten wir beim Screening unserer Bibliotheken gegen eine repräsentative Auswahl extrazellulärer und intrazellulärer Targets widerlegen: Mithilfe zahlreicher Testmethoden identifizierten wir die ersten niedermolekularen Modulatoren für Protein-Protein-Wechselwirkungen und erarbeiteten ein allgemeines Verfahren für derartige Untersuchungen.

1. Einleitung

Die Kombinatorische Chemie hat sich schnell zu einer wichtigen Grundlage für Targetvalidierung und Entdeckung neuer Wirkstoffe entwickelt. Die Methode entstammt der Peptid- und Oligonucleotidsynthese; daher wurden in den meisten Fällen Festphasenstrategien verfolgt.^[1–16] Ergänzend zur Anpassung der Flüssigphasenchemie an die polymergestützte kombinatorische Synthese wurden auch Methoden für kombinatorische Flüssigphasensynthesen entwickelt.^[17–31] Zu diesem Zweck wurden Methoden wie die dynamische kombinatorische Chemie,^[32,33] die polymergestützte kombinatorische Synthese in Flüssigphase (zuerst vorgestellt von Janda et al.^[34–38]), die fluorige Synthese (FPS)^[39,40] und andere Markierungsstrategien^[41] sowie Fällungstechniken^[42–45] eingeführt. Auch harzgebundene,^[46–52] lösliche polymergebundene^[53] und fluorphasengebundene^[30,40] Katalysatoren, Reagentien oder Spülreagentien^[46–52] wurden verwendet.

In ersten Arbeiten führten wir ein einfaches Verfahren zur mehrstufigen Flüssigphasensynthese von chemischen Bibliotheken ein: Durch Flüssig-flüssig- und Flüssig-fest-Extraktionen (mit Ionenaustauscherharz) werden nicht umgesetzte Ausgangsverbindungen und Reagentien sowie Nebenprodukte entfernt. Unabhängig von der Effizienz der Reaktionen wurden auf diese Weise Produkte mit > 95 % Reinheit erhalten.^[57–70] Das Verfahren fand Anwendung bei der Parallelsynthese einzelner Verbindungen^[62,68] (Bibliotheken mit 1000 Elementen), in Bibliotheken mittlerer Größe aus kleinen Gemischen (1000–10000 Elemente, 10–50 Einzelkomponenten pro Gemisch), darunter Positionsanalyse-Bibliotheken und Deletionssynthese-Bibliotheken,^[63–65] und beim kombinatorischen Aufbau großer Bibliotheken

Aus dem Inhalt

1. Einleitung	4271
2. Kombinatorische Chemie in der Flüssigphase und an der Festphase	4272
3. Flüssigphasensynthese von Bibliotheken: cyclische Anhydride als Template	4275
4. Target Protein-Protein-Wechselwirkungen	4277
5. Target Protein-DNA-Wechselwirkungen	4290
6. Naturstoff-Bibliotheken	4296
7. Zusammenfassung und Ausblick	4301

(25000–1000000 Elemente, 10000–28000 Einzelkomponenten pro Gemisch).^[65] Die Vorgehensweise kann an ein Format angepasst werden, sodass sie mit jeder Screeningmethode kompatibel ist. Die Methode ist technisch unproblematisch und bequem für die Suche und Optimierung von Leitstrukturen. Ein weiterer großer Vorteil ist, dass man die Elemente der Bibliothek in Ausbeuten erhält, die für mehrere Screeningdurchläufe ausreichen. So wurden Bibliotheken hergestellt, deren Elemente extrazelluläre oder intrazelluläre Protein-Protein-Wechselwirkungen nachahmen (Agonisten) oder behindern (Antagonisten), intrazelluläre Enzyme inhibieren oder Protein-DNA-Wechselwirkungen im Zellkern modulieren. Die Synthesestrategie ist auf Naturstoffstrukturen und auf cyclische (Depsi)peptide anwendbar. Ihr Potenzial übertrifft die ursprünglichen Erwartungen an eine so einfache Methode.^[57–99]

Diese Strategie ist ein wesentlicher Bestandteil der Versuche, zelluläre Signaltransduktion durch Hemmung, Verstärkung oder Nachahmung von Protein-Protein- oder Protein-DNA-Wechselwirkungen zu modulieren. Besonders interessant sind hierbei Targets, für die weder niedermolekulare Leitstrukturen noch Strukturinformationen bekannt sind. Trotz der vorherrschenden Meinung, dass solche Targets nicht durch niedermolekulare Substanzen beeinflusst werden könnten,^[100,101] identifizierten wir durch Screening unserer Bibliotheken die ersten derartigen Modulatoren für die

[*] Prof. D. L. Boger, J. Desharnais, K. Capps
Department of Chemistry and
The Skaggs Institute for Chemical Biology
The Scripps Research Institute
10550 North Torrey Pines Road, La Jolla, CA 92037 (USA)
Fax: (+1) 858-784-7550
E-mail: boger@scripps.edu

untersuchten Protein-Protein-Wechselwirkungen, validierten die Targets für die therapeutische Anwendung und entwickelten eine allgemeine Strategie für solche Untersuchungen.^[102] In diesem Aufsatz fassen wir diese Untersuchungen zusammen. Zunächst beschreiben wir die Flüssigphasensynthese chemischer Bibliotheken, dann geben wir einen Einblick in die Techniken, derer wir uns bei der Validierung neuer Targets für Therapieversuche bedienen.

2. Kombinatorische Chemie in der Flüssigphase und an der Festphase

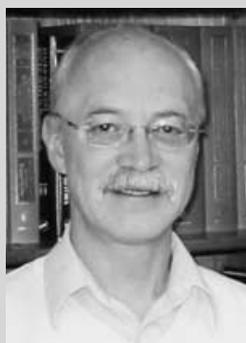
2.1. Hauptmerkmale kombinatorischer Methoden in der Flüssigphase

Festphasengestützte kombinatorische Chemie wurde bereits vielfach zur Leitstruktursuche und -optimierung eingesetzt, weil die festphasengebundenen Verbindungen sehr leicht isoliert werden können. Beispiele für Fortschritte, die der Festphasensynthese von Bibliotheken zu allgemeiner Anerkennung verhalfen, sind die räumlich auflösende Multipin-Peptidsynthese nach Geysen et al.,^[103,104] die „Teebeutel“-Methode von Houghten et al.,^[105] das Phagendisplay von Smith et al.^[106,107] sowie die Spot- oder Disc-Synthese von Frank et al.^[108,109] Besondere Erwähnung verdienen auch die von Furka et al.^[110–112] eingeführte Split-und-Mix-Festphasensynthese auf Harzkügelchen („portion-mixing“), an deren Entwicklung auch Houghten et al. („divide, couple, and recombine“)^[113] sowie Lam et al. („split synthesis“)^[114–116] teilhatten, und die bei Affymax entwickelte lichtgesteuerte, räumlich adressierbare, immobilisierte Parallelsynthese.^[117] Neue Analysemethoden trugen zur breiten Annahme der Split-und-Mix-Festphasensynthese bei: die iterative^[110,118,119] und die rekursive^[120] Dekonvolution, außerdem nucleotid-,^[121,122] peptid-,^[123–125] chemische,^[126–128] radiofrequenz-,^[129,130] farb-^[131] und formcodierte^[132] festphasengebundene Bibliotheken. Durch Fortschritte bei der Microarray-Herstellung konnte die räumlich auflösende Parallelsynthese im großen Maßstab an verschiedenen Festphasen verbessert werden.^[133–136]

Da bei der Festphasensynthese die Isolierung des immobilisierten Produktes durch einfache Filtration möglich ist, können durch große Reagensüberschüsse in jeder Stufe hohe

Umsätze erzielt werden (Tabelle 1). Der Maßstab ist allerdings durch die Beladungskapazität der Festphase begrenzt; die Herstellung der erforderlichen Mengen aller Einzelkomponenten kann bei großen Bibliotheken mühsam und teuer sein. Zusätzlich zu den funktionalisierten Substraten und feste Trägermaterialien werden kompatible Verbindungsgruppen und Abstandshalter benötigt. Orthogonale Strategien zum Binden und Abspalten, oft verbunden mit der Freisetzung von Reportergruppen, müssen entwickelt werden, sowie spezifische Verfahren, um die einzelnen Schritte einer vielstufigen Synthese zu verfolgen, und orthogonale Strategien zur Blockierung nicht umgesetzter Substrate. Darüber hinaus ist die Reinigung harzgebundener Zwischenprodukte nicht möglich, das Produkt einer vielstufigen Synthese wird also in verunreinigter Form erhalten. Daher muss jeder Reaktionsschritt mit hoher Effizienz ablaufen. Fortschritte in allen Punkten erleichtern die Anwendung von Festphasensynthesen. Zu den wichtigsten Neuerungen gehören spurlose Linker,^[137–139] Methoden, bei denen ausschließlich das Produkt vom Harz abgespalten wird^[140,141] oder umgekehrt nur die gewünschten Reaktionsprodukte ans Harz gebunden bleiben,^[142] Safety-Catch-Linker,^[143–145] Amidrückgrat-Linker,^[146,147] multidirektionale Methoden zur Abspaltung des Produkts vom Harz^[148,149] und Verbesserungen der Harzeigenschaften und der Beladungskapazitäten.^[34–38] Einige systematische Nachteile wie die Unverträglichkeit mit heterogenen Katalysatoren und Reagentien oder die zwingend vorgeschriebene lineare Synthesestrategie bleiben jedoch. Die Synthese von Gemischbibliotheken ist kaum, eine Selektion oder ein dynamisches Bibliotheksscreening^[4] mit targetgestützter Synthese^[150–154] sind gar nicht möglich.

Als wir mit unseren Untersuchungen begannen, waren noch keine Synthesen chemischer Bibliotheken in flüssiger Phase beschrieben worden. Eine Reihe vergleichbarer Untersuchungen, einschließlich derer von Smith et al.,^[155] Rebek et al.,^[156–159] Pirrung et al.^[160] und Nielsen et al.,^[161] und die Entwicklung von Mehrkomponentenreaktionen in Lösung durch Ugi et al.^[162] und Armstrong et al.^[163] fanden etwa zur selben Zeit statt. Unsere Arbeit zeichnete sich dadurch aus, dass wir für die Synthese chemischer Bibliotheken in flüssiger Phase eine vielstufige anstelle einer einstufigen Strategie etablierten.



Dale L. Boger erhielt seinen BSc von der University of Kansas (1975) und promovierte 1980 an der Harvard University in Chemie. 1979 kehrte er an die University of Kansas zurück (Department of Medicinal Chemistry) und wechselte 1985 zur Purdue University (Department of Chemistry). Seit 1991 ist er Richard and Alice Cramer Professor of Chemistry am Scripps Research Institute. Zu seinen Forschungsinteressen zählen Synthesemethoden, Totalsynthesen von Naturstoffen, Heterocyclen, bioorganische, medizinische und kombinatorische Chemie, DNA-Wirkstoff- und Protein-Liganden-Wechselwirkungen und Tumortheraeutika.



Joel Desharnais erhielt 1995 seinen BSc in Chemie und promovierte 2000 bei Professor James D. Wuest an der University of Montreal mit Untersuchungen zu einem Thema der supramolekularen Chemie. Danach war er Postdoc bei Professor Boger am Scripps Research Institute. Hier befasste er sich mit der kombinatorischen Flüssigphasensynthese von Agonisten und Antagonisten von Protein-Protein-Wechselwirkungen und der Synthese neuer Enzyminhibitoren. Seit 2003 arbeitet er bei Acidophil (San Diego).

Tabelle 1: Vorteile (+) und Nachteile (–) der kombinatorischen Synthese in Fest- und Flüssigphase.

Festphase	Flüssigphase
+ Einfache Entfernung von Reagentien- und Reaktantenüberschüssen	– Entfernung von Reagentien- und Reaktantenüberschüssen begrenzt die Ansatzgröße
+ einfache Automatisierung	+ Automatisierung durch Flüssig-flüssig-Techniken
+ Split-und-Mix-Synthese vereinfacht die Herstellung großer Bibliotheken	+ Mischungssynthese vereinfacht die Herstellung großer Bibliotheken
+ Pseudo-Verdünnungseffekte	+ Reaktionen werden nicht durch Festphase beeinträchtigt
– Anpassung der Reaktionsvorschriften an die Festphase und Entwicklung von Bindungs- und Abspaltungsstrategien	+ keine zusätzlichen Stufen für Bindung und Abspaltung
– Verfolgung der Reaktion ist schwierig	+ Bewährte Techniken zur Verfolgung der Reaktion
– Keine Reinigung möglich	+ Reinigung nach jedem Schritt möglich
– Lineare Synthese, keine konvergente Strategie möglich	+ Konvergente oder lineare Synthese
– Begrenzte Ansatzgröße	+ In unbegrenztem Maßstab durchführbar
– Keine Mischungssynthese	+ Mischungs- oder Parallelsynthese

Wenn die Probenhandhabung in fester und flüssiger Phase einfach automatisiert werden kann, besteht das Hauptproblem der Flüssigphasensynthese chemischer Bibliotheken in der Isolierung oder Reinigung^[164] der Einzelkomponenten. Könnten die Vorteile der Probenisolierung von der Festphasensynthese übernommen werden, so wäre die Flüssigphasensynthese von Bibliotheken durch die einfachere Maßstabsvergrößerung, das größere Repertoire an chemischen Reaktionen, die direkte Herstellung löslicher Zwischen- und Endprodukte zu Reinigung oder Test und den Verzicht auf Linker, Bindung, Abspaltung und Blockierungsreaktionen besonders attraktiv (Tabelle 1). Konvergente Synthesestrategien und die Synthese von Gemisch- oder dynamischen Bibliotheken sind nur in flüssiger Phase einfach durchführbar. Bei der Vereinfachung der Probenisolierung aus der Lösung konzentrierten wir uns auf eines der attraktivsten Verfahren: Isolierung *und* Reinigung durch Säure-Base-flüssig-flüssig-

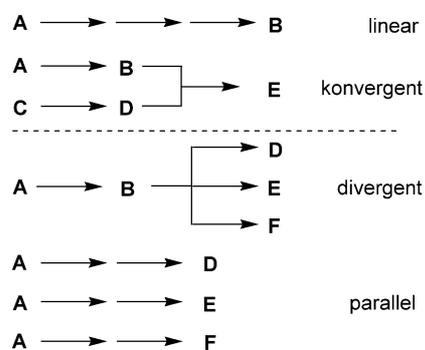


Kevin Capps erhielt 2000 seinen BSc in Chemie an der University of Maryland, wo er als wissenschaftliche Hilfskraft bei Professor Jeffery Davis arbeitete. Derzeit ist er Doktorand am Scripps Research Institute.

oder -fest-flüssig-Extraktionen, letztere mit Ionenaustauscherharzen. Die ursprünglich erzeugten Bibliotheken und die späteren Erweiterungen sind ausführlich beschrieben worden, darunter die Einführung von trägergebundenen Reagentien^[57–63] und Aufarbeitungsreagentien, z. B. Abfangreagentien^[165] und Ionenaustauscherharze,^[57–59] einschließlich immobilisierter Abfangreagentien und Reagentien in Zusammenarbeit mit Caporale (CombiChem),^[165] der Reinigung der Produkte durch Größenausschluss-Chromatographie^[62,63] und der Herstellung von nicht über Amidbindungen verknüpften Bibliotheken.^[71]

2.2. Strategien: lineare, konvergente und divergente Synthese

Bei der Reaktionsplanung organischer Synthesen unterscheidet man traditionell zwei Strategien: lineare und konvergente Synthese (Schema 1). Vorteile der konvergenten



Schema 1. Vergleich von linearen und konvergenten sowie divergenten und parallelen Synthesestrategien.

Synthese sind eine geringere Zahl von Stufen, größere Effizienz (höhere Gesamtausbeute und größere Reaktionsansätze) und eine technisch einfachere Durchführung. Da die Festphasensynthese auf eine lineare Synthesestrategie festgelegt ist, konnte sie sich in der traditionellen organischen Synthese erwartungsgemäß nicht durchsetzen. Vor der Entwicklung der Kombinatorischen Chemie (Festphasensynthese von Peptiden und Oligonucleotiden) fanden lediglich Strategien breite Anwendung, die durch die Wiederholung einer einzelnen hoch optimierten Reaktion für eine lineare Synthese ideal geeignet waren. Eine dritte, weniger bekannte Strategie ist die divergente Synthese: Hier wird eine Palette von Verbindungen aus einem einzigen Zwischenprodukt hergestellt. Diese Strategie, die heutzutage allgemein eingesetzt wird, wurde erstmals bei der divergenten aromatischen Anellierung systematisch angewandt.^[166–168] Heute beruht die Einführung von Diversität in der Kombinatorischen Chemie in den meisten Fällen auf divergenten Strategien.^[169] Die Vorteile einer Synthese einer Serie verwandter Verbindungen mit einem divergenten Schritt im späten Stadium gegenüber einer parallelen Synthese entsprechen denen einer konvergenten gegenüber einer linearen Synthese. Die Strategien schließen einander in diversitätsorientierten Synthesen nicht aus: Sowohl lineare als auch konvergente

Strategien können angewandt werden (Abbildung 1). Während Festphasensynthesen linear sind, können Flüssigphasensynthesen an lineare oder konvergente Synthesestrategien angepasst werden. Für Flüssigphasensynthesen eignet sich die konvergente Synthese besonders gut; für Festphasensynthesen ist sie jedoch unbrauchbar, da die zu verbindenden Komponenten auf unterschiedlichen Trägern gebunden sind.

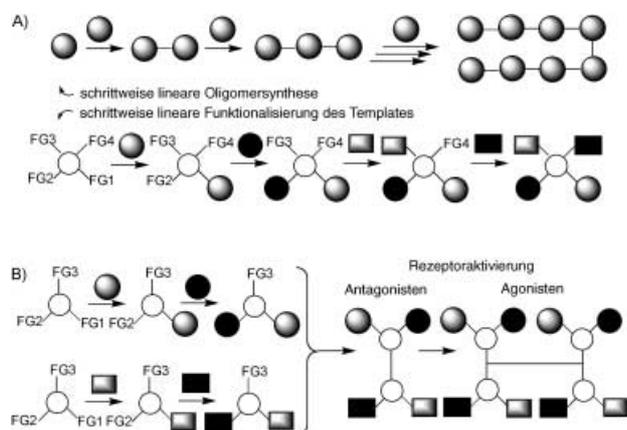
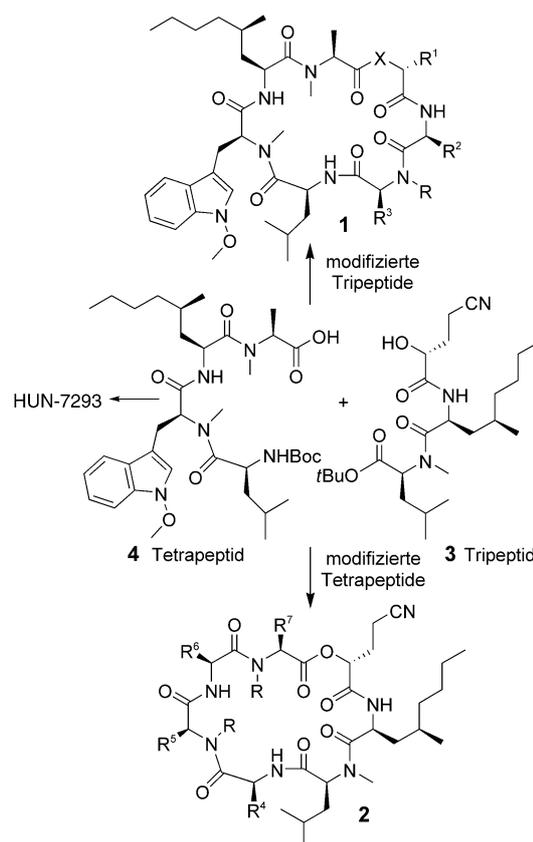


Abbildung 1. Konvergente und lineare Synthese im Vergleich. A) Lineare, divergente Synthese zur Einführung von Diversität (Fest- oder Flüssigphase). B) Konvergente Synthese zur Einführung von Diversität (nur in Flüssigphase).

Wir wollten im Rahmen unserer Untersuchungen zu Protein-Protein- oder Protein-DNA-Wechselwirkungen von Anfang an auch nach Liganden für jede einzelne makromolekulare Verbindung suchen (Screening nach Antagonisten). Durch Kupplungsprodukte aus zwei so gefundenen Liganden sollten die Protein-Protein- oder Protein-DNA-Wechselwirkungen auch in Abwesenheit des endogenen Liganden möglich werden (z. B. Wirkung als Agonisten für die Homo- oder Heterodimerisierung von Rezeptoren) (Abbildung 1). Hierbei wurde erstmals das Iminodiacetat-Templat bei der Synthese von Bibliotheken eingesetzt; so wurde die erste allgemeine Methode für die Entwicklung von Agonisten aus Antagonisten gefunden.^[61,63,67,73,170,171] Durch konvergentes Mischen und Anpassen konnten Liganden für die Verknüpfung von Makromolekülen entwickelt werden. Techniken wie die Diamidbildung, die Olefinmetathese,^[60,61,64] die Palladium-katalysierte Biarylkupplung^[62] und die Acetylen-Arylkupplung nach Stille^[63] ermöglichten die erforderliche Dimerisierung. Die Methodik eignet sich ausschließlich für Flüssigphasen-Anwendungen.

Ein weiteres Beispiel für die Überlagerung einer divergenten, diversitätsorientierten Synthese und einer konvergenten Synthesestrategie liefert die detaillierte Strukturklärung des Naturstoffs HUN-7293 mithilfe einer Bibliothek von HUN-7293-Analoga (**1** und **2**, Schema 2).^[76] Bei einer Festphasenstrategie wäre die parallele lineare Synthese jedes Analogons erforderlich – bei einer konvergenten Synthese in flüssiger Phase genügt die einmalige Synthese der entscheidenden Tri- und Tetrapeptideinheiten des Naturstoffs (**3** und



Schema 2. Konvergente Synthesestrategie beim Aufbau einer Bibliothek von HUN-7293-Analoga. Boc = *tert*-Butoxycarbonyl. X = O, NH.

4) und ihre Kombination mit diversifizierten Tetra- bzw. Tripeptiden mit einzelnen Unterschieden zur HUN-7293-Struktur (Schema 2). So wurden bei der Herstellung eng verwandter Strukturen die Vorteile der konvergenten Synthese mit denen der divergenten Synthese kombiniert.

2.3. Split-und-Mix-Synthese an der Festphase oder Flüssigphasen-Mischungssynthese und Dekonvolution?

Kleine Bibliotheken können einfach durch parallele Festphasen- oder Flüssigphasensynthese hergestellt werden, wobei man die einzelnen Verbindungen erhält. Durch verbesserte Festphasensynthesen nach dem Split-und-Mix-Prinzip oder dem ähnlichen „Teebeutel“-Verfahren wurden großen Bibliotheken mit einer Verbindung pro Trägerkügelchen verfügbar. Die Einführung von Analyse- und Markierungsmethoden^[121–132] steigerte den Wert solcher Strategien erheblich, da beim Screening erfolgreiche Verbindungen direkt identifiziert werden können. Am wertvollsten sind Codierungstechniken, welche die Bibliothekssynthese nicht erschweren (Tabelle 2).

Dem Split-und-Mix-Verfahren an der Festphase entspricht in der Flüssigphasensynthese die Synthese von Gemischen (Tabelle 2).^[172] Anders als bei der Festphasensynthese, die durch das polymergebundene Substrat stöchiometrisch limitiert wird, können bei Flüssigphasenreaktionen Substrat

Tabelle 2: Vergleich von Bibliothekstechniken.

Technik	Einzelverbindung oder Mischung	Geschwindigkeit der Synthese	SAR ^[a] -Suche	Anwendung
Parallelsynthese	Verbindung	langsam	schnell	Leitstrukturoptimierung
Mischungssynthese (Scanning/Deletionsdekonvolution)	Mischung	schnell	schnell (langsam)	Leitstruktursuche
Parallele räumlicher Anordnung	Verbindung	mäßig	schnell	Leitstruktursuche und -optimierung
Split-und-Mix	Mischung (eine Verbindung pro Kugel)	mäßig	langsam	Leitstruktursuche und -optimierung
Kodiertes Split-und-Mix	Mischung (eine Verbindung pro Kugel)	mäßig	mäßig	Leitstruktursuche und -optimierung
Sortieren und Mischen	Verbindung	mäßig	schnell	Leitstruktursuche und -optimierung

[a] Struktur-Aktivitäts-Beziehung.

oder Reagentien limitierend sein. Wegen der verschiedenen Reaktionsgeschwindigkeiten müssen bei Festphasensynthesen Split-und-Mix-Techniken angewendet werden.^[173] Dagegen können bei der Synthese von Gemischen einfach die Reagentien zur Anlagerung an das Produkt in limitierender Menge eingesetzt werden. So wird sichergestellt, dass alle Elemente der Bibliothek in gleichen Mengen entstehen. Bei der Festphasensynthese von Gemischen werden die löslichen Reagentien in genau eingestellten Konzentrationen eingesetzt, um die Unterschiede in den Reaktionsgeschwindigkeiten auszugleichen; Informationen hierzu müssen jedoch vor Beginn der Synthese vorliegen. Bei Flüssigphasensynthesen von Gemischen muss man dagegen nur das nicht umgesetzte Ausgangsmaterial entfernen können. Dies gelang uns durch einfache Säure-Base-flüssig-flüssig- oder -flüssig-fest-Extraktion.

Ähnlich wie die Codierungsstrategien der Split-und-Mix-Synthese von großen Bibliotheken ermöglichen die sich gegenseitig ergänzenden Techniken Positionsanalyse^[173] und Deletionssynthese^[64,65] die direkte Identifizierung aktiver Leitstrukturen aus großen Gemischbibliotheken (Abbildung 2). Weil Positionsanalyse- und Deletionssynthese-Bibliotheken durch Synthese von Gemischen erzeugt werden, können sie nur schwer an Festphasentechniken angepasst werden. Positionsanalyse-Bibliotheken liefern gewöhnlich umfassendere Informationen und geben Aufschluss über Leitstrukturen mit definierten Eigenschaften, jedoch nicht unbedingt über die aktivste Verbindung.^[79,86,175] Dekonvolution mit Positionsanalyse-Bibliotheken ist empfindlicher, weil eine Aktivitätszunahme gemessen wird; daher ist auf diesem Wege auch die Identifizierung weniger aktiver Leitstrukturen möglich. Die Deletionssynthese, bei der nach Verlust von Aktivität gesucht wird, ist weniger empfindlich, dafür aber effizienter bei der Identifizierung einer einzigen potenten Verbindung.^[64,65,174] Eine Kombination beider Methoden ist aussagekräftiger als jede Methode für sich genommen.^[64] Darüber hinaus kann die Leitstruktur aus einem einzigen Screening-Durchlauf abgeleitet werden. Positionsanalyse- oder Deletionssynthese-Bibliotheken sind daher viel zeitsparender als die Parallelsynthese einzelner Verbindungen oder kleiner Gemische und technisch weniger aufwändig als die Synthese räumlich adressierbarer oder

codierter Split-und-Mix-Bibliotheken; außerdem genügen die Substanzmengen dieser Bibliotheken für mehrere Screeningläufe aus einer einzigen Testrunde und direkter Dekonvolution aus. Die konvergente Synthese von Dimerbibliotheken für symmetrische und asymmetrische Kombinationen kann nicht mit Positionsanalyse-Bibliotheken durchgeführt werden; zur Identifizierung aktiver asymmetrischer Dimere ist daher eine Deletionssynthese erforderlich.^[64] Im Unterschied zur Untersuchung einzelner Verbindungen oder kleiner Gemische werden beim Screening einer Bibliothek

die versteckten Informationen über Struktur-Wirkungs-Beziehungen nicht erfasst. Dieser Nachteil wird allerdings durch die einfache Synthese der Vorgänger-Bibliotheken ausgeglichen; auch müssen die Ziele des Screeningprozesses (Identifizierung oder Optimierung einer Leitstruktur) sowie die Natur und Komplexität der Zielstruktur bei der Beurteilung einbezogen werden.

Bei der Analyse und Identifizierung von Leitstrukturen in komplexen Gemischen haben sich Techniken wie Massenspektrometrie,^[176] NMR-Spektroskopie^[177,178] und Kapillarelektrophorese^[179,180] zu wertvollen allgemeinen Methoden entwickelt. So konnten Nutzen und Aussagekraft des Screenings von Gemischbibliotheken enorm gesteigert werden.

3. Flüssigphasensynthese von Bibliotheken: cyclische Anhydride als Template

Zu Flüssigphasen-Bibliotheken gibt es bereits einige Übersichtsartikel.^[17-31] Daher beschreiben wir hier die Prinzipien und die einzelnen Schritte unserer Bibliothekssynthesen sowie ihre Rolle bei der Untersuchung biologischer Targets. Das hoch funktionalisierte cyclische Anhydrid **5** (Schema 3) hat wenige strukturelle oder konformative Besonderheiten, die seinen Einsatz als Template einschränken könnten.^[57,58] Eine interessante Alternative bietet das Template **8** mit einem steifen bicyclischen Kerngerüst und Symmetrieebene, das als Basis für Dipeptidmimetika (Gly-Asp-, oder allgemeiner Gly-X-Mimetika) dient.^[57,59] Sowohl **8** als auch **5** verfügen über drei schrittweise funktionalisierbare Positionen: Bibliotheken auf der Basis dieser Template können Verbindungen mit bis zu drei unterschiedlichen Gruppen enthalten. Isoindolin-5,6-dicarbonsäure (**11**) und ein starrer Gly-X-Mimetikum (**14**) wurden ebenfalls untersucht.^[69] Mit einer Auswahl von Templaten wie **5-7** kann Diversität in konformativ eingeschränkten oder räumlich unterschiedlich angeordneten Positionen eingeführt werden. Dadurch erfährt man in einem einzigen Testdurchgang viel über die Struktur-Wirkungs-Beziehungen des Targets.

Die erste Funktionalisierung erfolgt durch nucleophile Addition an die aktivierte Anhydridfunktion. Dabei entsteht

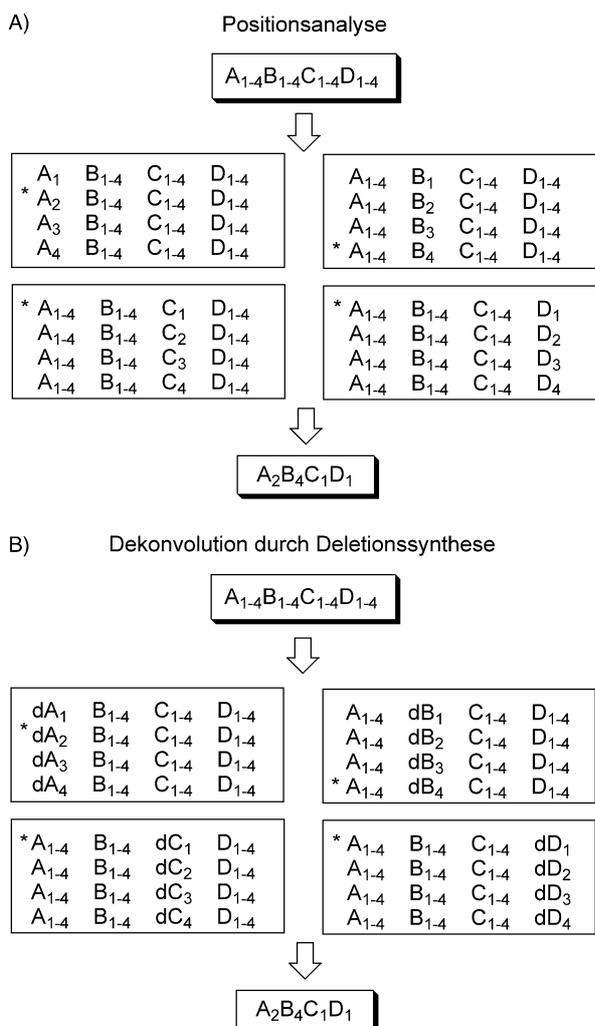
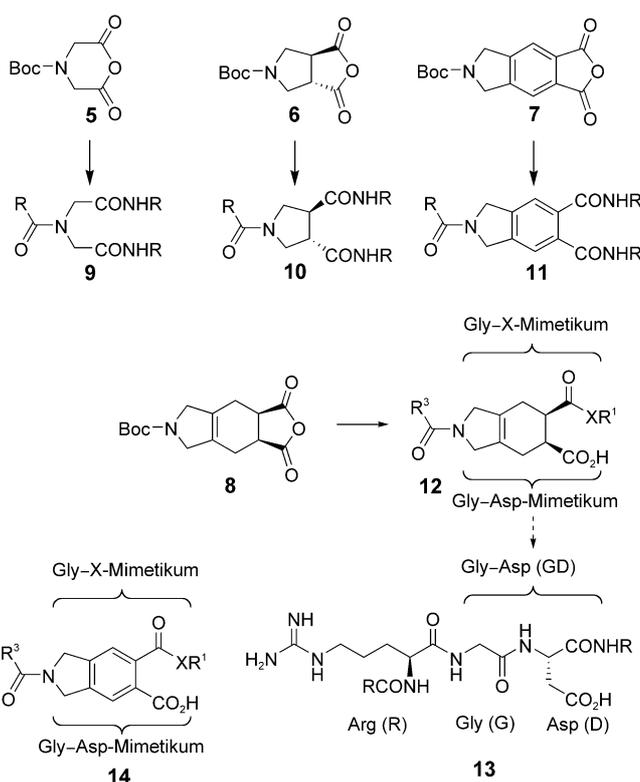
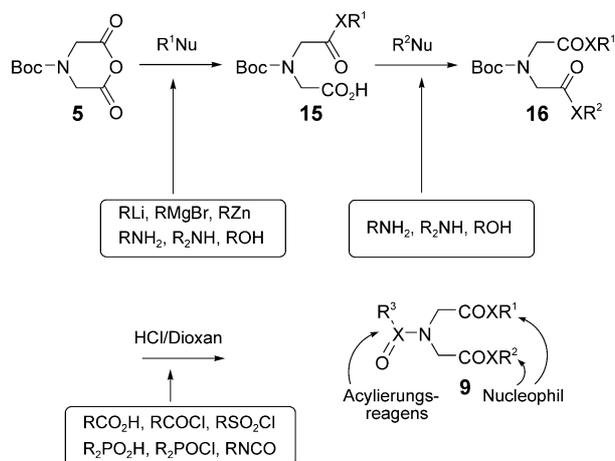


Abbildung 2. Positionsanalyse und Deletionssynthese-Dekonvolution am Beispiel einer Bibliothek mit vier variablen Positionen. A) Bei der Positionsanalyse wird jede Position mit einer bestimmten Komponente besetzt, während an den anderen Positionen Mischungen vorliegen. Die aktivste Unterbibliothek jeder Gruppe (*) zeigt die jeweils aktivste Komponente an. B) Bei der Deletionssynthese fehlt in jeder Unterbibliothek eine Komponente an einer Position (dA_2 enthält alle Komponenten außer A_2), während an den anderen Positionen Mischungen aller Komponenten vorliegen. Hier zeigt die am wenigsten aktive Unterbibliothek jeder Gruppe (*) das Fehlen der jeweils aktivsten Komponente an.

auch die Carboxygruppe für die nächste Funktionalisierung (Schema 4). Die Freisetzung der zweiten Derivatisierungsfunktion beim ersten Diversifizierungsschritt vereinfacht Isolierung und Reinigung; außerdem wird eine separate Schutzgruppenabspaltung umgangen. Als Folge der Symmetrie des Anhydrids entsteht nur ein Regioisomer, sodass die Komplexität der Bibliothek begrenzt bleibt. Im letzten Diversifizierungsschritt wird die sekundäre Aminofunktion als dritte Kupplungsposition entschützt. Bei jedem Schritt unterstützt die freigesetzte funktionelle Gruppe nicht nur die Isolierung, sondern auch die Reinigung des Produktes von Ausgangsmaterial, Reaktanten, Reagentien und Nebenprodukten durch einfache Säure-Base-flüssig-flüssig- oder -flüssig-fest-Extraktion, die unabhängig von der Effizienz der



Schema 3. Beispiele für Template.

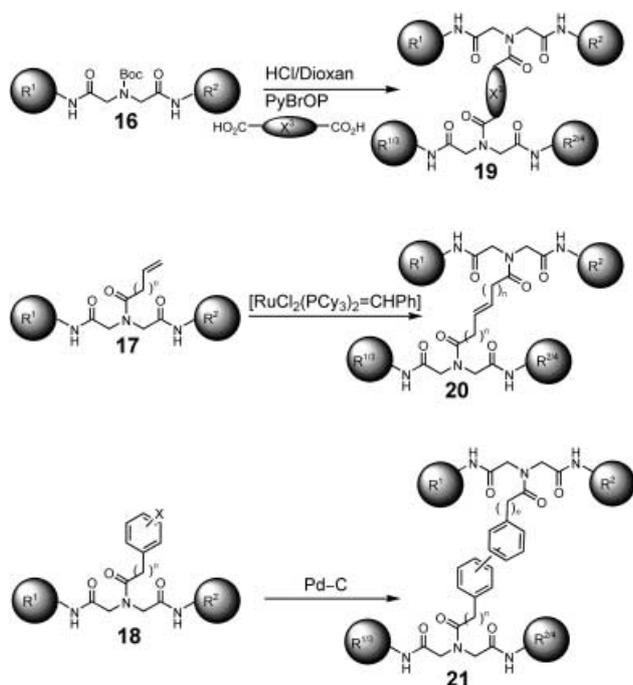


Schema 4. Dreistufige Flüssigphasensynthese von chemischen Imino-diacetat-Bibliotheken. **15** wird durch Waschen mit Säure, **16** und **9** werden durch Waschen mit Säure und Base gereinigt. X bezeichnet die entsprechende verbindende Gruppe.

Reaktion typischerweise Produkte mit bis >95 % Reinheit liefert. Die Template können mit verschiedenen nucleophilen und elektrophilen Reagentien funktionalisiert werden (Schema 4).^[71]

Auf diesem Weg wurden Bibliotheken in verschiedenen Formaten für Leitstruktursuche und -optimierung hergestellt: einzelne Verbindungen, kleine Mischungen, große Mischungen sowie Positionsanalyse- und Deletionssynthese-Bibliotheken. Letztere wurden dabei erstmals erhalten^[64] und mit

anderen Bibliotheksformaten einschließlich Positionsanalyse-Bibliotheken verglichen.^[65,79,86] Obwohl diese Arbeit meistens als Beispiel für Isolierung und Reinigung durch Säure-Base-flüssig-flüssig-Extraktion angeführt wird, wurden bereits davor^[57–59,68] erste Anwendungen von polymergebundenen Reagentien (z.B. PS-EDCI) in der Flüssigphasen-Bibliothekssynthese und die erstmalige Verwendung von Ionenaustauscherharzen in Flüssig-fest-Extraktions-Verfahren beschrieben.^[58] Nach diesem Verfahren können zuverlässig 5–150 mg der Verbindungen mit Reinheiten > 95 % hergestellt werden; bis heute sind auf diese Weise zahlreiche Bibliotheken mit mehr als 40000 Verbindungen aufgebaut worden. Auf diesem Weg werden die Nachteile von Festphasensynthesen vermieden. Spezielle Methoden zur Kontrolle der einzelnen Schritte sind nicht nötig; die Reinigung der Zwischenstufen ist möglich, und die Produkte sind ausreichend rein für Bindungs- oder Funktionstests. Weitere Untersuchungen zur Synthese symmetrischer und unsymmetrischer Bibliotheken für Rezeptor- und Protein homo- und -heterodimerisierungstests zeigt Schema 5. Die Dimerisierung wurde nicht nur durch eine Amidbindung mit Dicarbonsäuren erreicht, sondern auch durch Stille-Kupplung^[63] und die erste intermolekulare Olefinmetathesereaktion beim Aufbau



Schema 5. Aufbau von Bibliotheken zur Protein-Protein-Dimerisierung durch Homo- oder Heterodimerisierung. Die Dekonvolution unsymmetrischer Dimerisierungsprodukte erfolgt durch Scannen oder Deletions-synthese. Cy = Cyclohexyl, PyBrOP = Brom-tris(pyrrolidino)phosphonium-hexafluorophosphat.

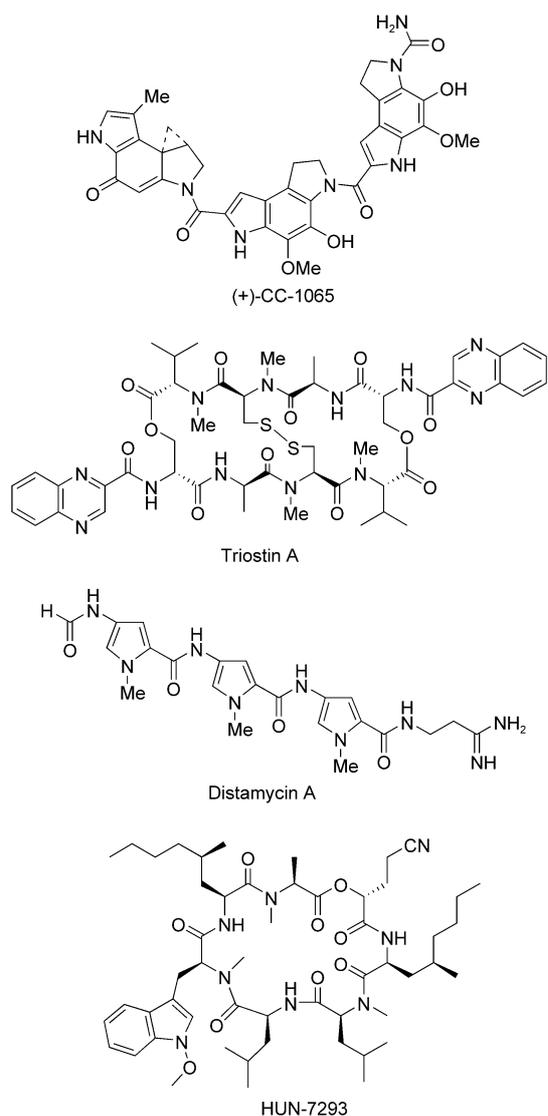
chemischer Bibliotheken.^[60,61,64] Eine der ersten Anwendungen eines trägergebundenen Katalysators (eine Biarylkupplung mit Pd-C, siehe Schema 5) bei der Flüssigphasen-Bibliothekssynthese wurde ebenfalls beschrieben.^[62] Die schnelle Reinigung solcher Dimer- oder Oligomer-Bibliotheken gelang durch Größenausschluss-Chromatographie.^[62]

Für die Vorbereitung und die Dimerenbildung bedarf es mit der Iminodiacetyldiamid-Methode nur dreier Reaktionsschritte. Die Flüssigphasensynthese ermöglicht die Vervielfältigung der Diversität durch kombinatorische Dimerisierung der Iminodiacetyldiamide sowie eine direkte Kupplung der Zwischenstufen; das wäre bei einer Festphasensynthese ausgeschlossen. Die modulare konvergente Synthese ist also für diese Dimerisierungsstrategien mit begrenzter Stufenzahl besonders gut geeignet, z.B. zur Erzeugung von Bibliotheken mit prospektiven Agonisten oder Antagonisten für die Homo- oder Heterodimerisierung von Rezeptoren und Proteinen. Einfache Liganden wie **16–18** (Schema 5) können als Antagonisten der ligandeninduzierten Dimerisierung von Rezeptoren oder Proteinen dienen. Kovalent verknüpfte symmetrische Dimere wie **19–21** fördern die Homodimerisierung von Rezeptoren oder Proteinen, unsymmetrische Dimere begünstigen die Heterodimerisierung. Je nach therapeutischem Bedarf können mit dieser Strategie also Agonisten oder Antagonisten entwickelt werden. Anforderungen an Größe oder spezielle Eigenschaften wie die Zellpermeabilität können die Bibliothekszusammensetzung einschränken, wenn nach Liganden für intrazelluläre Makromoleküle gesucht wird. Verbindungen, die gegen extrazelluläre Targets wie Zelloberflächenrezeptoren und -proteine wirken, sind von solchen Einschränkungen nicht betroffen.

Man könnte vermuten, dass mit Anhydrid-Templaten nur Bibliotheken von begrenztem Nutzen zugänglich sind, da die strukturelle Komplexität, die verfügbare Diversität, die wirkstoffähnlichen Eigenschaften der Bibliothekselemente oder die Anwendbarkeit der Methode beschränkt sind. Mithilfe der vorliegenden Bibliothek mit 40000 Verbindungen konnte dennoch bisher für praktisch jedes Target eine Leitstruktur gefunden werden. Während derzeit der Trend zu Bibliotheken aus Verbindungen mit zunehmender Starrheit und Komplexität vorherrscht, könnte der Erfolg unserer Bibliothek auf einen Kompromiss zwischen Komplexität und Diversität zurückzuführen sein. Dadurch dass jede Verbindung mehrere Pharmakophore enthält, ist die Identifizierung einer Leitstruktur wahrscheinlicher.^[180] Es gibt jedoch für die ersten Generationen von Bibliotheken bereits Alternativen zur Amidkupplung.^[71] Dass auch komplexe Naturstoffbibliotheken (Schema 6, siehe auch Abschnitte 5 und 6) aufgebaut werden konnten, deutet auf das große Potenzial der Methode hin.

4. Target Protein-Protein-Wechselwirkungen

So attraktiv das Potenzial für eine Beeinflussung anomaler zellulärer Signaltransduktion^[181–190] durch Hemmung, Förderung oder Nachahmung von Protein-Protein-^[100,101,181,182] oder Protein-DNA-Wechselwirkungen auch war – der allgemeinen Einschätzung nach galten diese Targets als kaum zugänglich für die therapeutische Beeinflussung durch niedermolekulare Substanzen. Bei diesen Targets besteht die Herausforderung in der großen Oberfläche wechselwirkender Proteine (etwa 800 Å² pro Protein), der relativ flachen Berührungsfläche zwischen bindenden Proteinen und großen, von der physiologischen Funktion abhängigen,



Schema 6. Naturstoffe, die als Leitstrukturen für den Aufbau von Analooga-Bibliotheken mittels kombinatorischer Flüssigphasensynthese dienten.

Unterschieden in den Affinitäten zwischen Proteinen.^[181] Es gibt zwar viele Beispiele, in denen Antikörper, dominant negative Proteine oder mittelgroße Peptide Protein-Protein-Wechselwirkungen hemmen, die Suche nach niedermolekularen Inhibitoren war jedoch wenig erfolgreich. Manche Protein-Protein-Wechselwirkungen sind besser therapeutisch beeinflussbar als andere: Die Mechanismen von Protein-Protein-Wechselwirkungen können sehr unterschiedlich sein (hydrophob oder hydrophil), die Oberflächen können flach sein oder mit tiefen Höhlungen versehen, die Affinitäten variieren enorm ($K_d = 10^{-6}$ – 10^{-12} M), und das Verhalten bei einer Hemmung fällt sehr unterschiedlich aus: Manchmal genügt es, ein Gleichgewicht zu verschieben, in anderen Fällen ist eine völlige Hemmung notwendig.

Tabelle 3^[191–225] fasst die vielversprechenden Ergebnisse von Untersuchungen an einer Reihe von Targets zusammen, Schema 7 zeigt wichtige niedermolekulare Modulatoren. Die Vorurteile gegenüber Protein-Protein-Wechselwirkungen als Targets bedürfen also einer Überprüfung.^[100–102, 171, 181, 182] Bei

weitem nicht alle Beispiele entstammen dem Screening kombinatorischer Bibliotheken, und die meisten von diesen waren auf Phagen-Display-Experimente zur Erzeugung der anfänglichen Peptid-Leitstrukturen angewiesen. Die Beispiele aus Tabelle 3 stehen für eine Vielzahl von Strategien mit dem gemeinsamen Ziel, eine Protein-Protein-Wechselwirkung zu stören. Ein Enzym kann auf verschiedene Arten gehemmt werden, z.B. indem die Lokalisierung (MMP-2, CaM) oder die Homo- (HIV-Protease) bzw. Heterodimerisierung (Ribonucleotid-Reduktase) direkt oder indirekt über einen Konfigurationswechsel (iNOS) verhindert werden. Der Substratzugang kann blockiert (Transpeptidase, Transglycosylase), ein intermediärer ternärer Komplex stabilisiert (Topoisomerase) oder ein inhibierender ternärer Komplex mit zusätzlichen Proteinen gefördert werden (Calcineurin (Cn)). Schema 7 zeigt weder Enzyminhibitoren, die ein aktives Zentrum für ein Peptid- oder Proteinsubstrat blockieren, noch niedermolekulare Agonisten oder Antagonisten G-Protein-gekoppelter Rezeptoren und auch keine Beispiele für Zelloberflächen-Integrinhibitoren mit RGD-Erkennungsmotiv.

G-Protein-gekoppelte Rezeptor-Antagonisten binden meist an die Transmembrandomäne des Rezeptors und stören eine Rezeptor-Ligand-Wechselwirkung nicht direkt, sondern allenfalls allosterisch. Anders die Integrinhibitoren.^[240–252] Sie sind ein schönes Beispiel dafür, wie die Entdeckung eines einfachen, kleinen und allgemeinen Protein-Protein-Wechselwirkungsmotives unmittelbar zur Entwicklung eines Antagonisten führte. Auch die Src-Homologie-Domäne 2 (SH2), SH3-, WW- und PDZ-Domänen haben gemeinsame Protein-Protein-Bindestellen mit kleinen markanten Schnittstellen für die Proteinlokalisierung oder Signaltransduktion; für diese Targets wird durch Screening oder Entwicklung nach niedermolekularen Wirkstoffen gesucht.^[101, 181, 225] Einige historisch bedeutsame Protein-Protein-Wechselwirkungsmodulatoren haben aktuelle therapeutische Ziele durch Störung von Protein-Protein- oder Protein-DNA-Wechselwirkungen effizient erreicht werden können. Je nachdem, ob ein Antagonist oder ein Agonist einer Protein-Protein-Wechselwirkung gesucht wurde, unterscheiden sich diese Untersuchungen stark im Entwurf der Bibliotheken, den Screening-Verfahren und den Hauptschwierigkeiten. Heute ist man sich einig, dass es viel einfacher ist, einen Antagonisten zu entdecken als einen Agonisten.^[73, 170, 171] Insofern sind bei der Suche nach Agonisten (Mimetika) von EPO, TPO und GCSF bemerkenswerte Erfolge erzielt worden (Tabelle 3). Eine allgemeine Methode für die Suche nach selektiven Antagonisten oder Agonisten wurde noch nicht entwickelt. Dies ist möglicherweise der Hauptgrund für die Zurückhaltung, mit der Protein-Protein-Wechselwirkungen als therapeutische Targets untersucht werden.

Einige sehr geschickte Strategien versuchten, ein biologisches Ziel durch Proteindimerisierung mithilfe synthetischer bifunktionaler Liganden zu erreichen.^[191] Diese chemischen Proteindimerisierungs-Induktoren (CIDs) wurden von Schreiber und Crabtree et al. verwendet, um die Signalübertragung über die Zellmembran zu modulieren,^[192] die

Tabelle 3: Niedermolekulare Modulatoren für Protein-Protein-Wechselwirkungen.

Protein-Protein-Wechselwirkung	Quelle der Verbindung	Screeningverfahren	Leitstruktur ^[a]	Aktivität	Lit.
Ribonucleotid-Reduktase (Dimerisierung)	Peptidanalagon	Kompetitiver Bindungstest	BILD 1263	Antagonist IC ₅₀ = 0.3 nM	[197]
iNOS (Dimerisierung)	Kodierte Festphasenbibliothek	Funktioneller Test	iNOS-Inhibitor	IC ₅₀ = 0.6 nM	[198]
HIV-Protease (Dimerisierung)	Entwickelter Inhibitor	Enzymhemmung	HIV-1-Proteaseinhibitor	K _i = 310 nM	[199a]
HIV-Protease (Dimerisierung)	Naturstoff	Enzymhemmung	Didemnaketal A	IC ₅₀ = 2 μM	[199b]
HIV-1-Integrase (Dimerisierung)	Peptide aus der Kontaktfläche	Enzymhemmung	–	IC ₅₀ = 2–4 μM	[200]
CaM/sMMLCK	α-Helixmimetikum	Enzymhemmung	CaM-Antagonist	IC ₅₀ = 9 nM	[201]
MMP-2/α _v β ₃	Flüssigphasen-Bibliothek	radioaktiver Bindungstest	27 (Abbildung 3)	Angiogenese-Hemmstoff	[77, 78]
Paxillin/α ₄	Positionsscanning	ELISA	A7B7C7 (Abbildung 5)	Antagonist IC ₅₀ = 300 nM	[79]
Bax/Bcl-x _L	Bibliothek mit 16 320 Verbindungen	Fluoreszenz-Polarisationsstest	BH31-1 BH31-1' BH31-2	Antagonist IC ₅₀ = 8–16 μM	[202]
Bax/Bcl-x _L	Naturstoff	Funktioneller Test	Antimycin	Antagonist	[203]
Bax/Bcl-x _L	Virtuelles Screening von 193 383 Verbindungen	Fluoreszenz-Polarisationsstest	HA14-1	Antagonist IC ₅₀ = 9 μM	[204]
Bax/Bcl-x _L	entwickeltes α-Helixmimetikum	Fluoreszenz-Polarisationsstest	Bax-Antagonist-1	K _D = 114 nM	[205a]
Bax/Bcl-x _L	entwickeltes α-Helixmimetikum	Fluoreszenz-Polarisationsstest	Bax-Antagonist-2	K _i = 1.6 μM	[205b]
MDM2/p53	Naturstoff	ELISA	Chlorofusin	Antagonist IC ₅₀ = 4.6 μM	[206a]
MDM2/p53	Unbekannt	ELISA, NMR	Chalcon-B-Antagonist	IC ₅₀ = 49 μM K _D = 90 μM	[206b]
HDM2/p53	Entwickelter Inhibitor	ELISA	HDM2-Antagonist	IC ₅₀ = 5 nM	[207]
Myc/Max	Flüssigphasenbibliothek	FRET	28 (Abbildung 9)	Antagonist IC ₅₀ = 20 μM	[80]
LEF-1/β-Catenin	Flüssigphasenbibliothek	Reportertest	A1B2C8 (Abbildung 10)	Antagonist	[71]
NGF/p75 NGF/TrkA	Kommerzielle Bibliotheken	Radioaktiver Bindungstest	ALE-0540	IC ₅₀ = 6 μM IC ₅₀ = 4 μM	[208]
HIV-1 (RANTES)/CCR5	Unternehmens-eigene Bibliothek	Radioaktiver Bindungstest (RANTES)	TAK-779	Antagonist IC ₅₀ = 1.4 nM	[209]
IL-2/IL-2R	Entwickelter Inhibitor	Radioaktiver Bindungstest	Ro26-4550	Antagonist IC ₅₀ = 3 μM	[210a]
IL-2/IL-2R	Strukturba-sierte Entwicklung, Aufbau aus Fragmenten	Kompetitive Bindung	IL-2-Antagonist	IC ₅₀ = 60 nM K _D = 100 nM	[210b]
IL-1/IL-1R	Entwickelter Inhibitor	Szintillations-Nachbarschaftstest	IL-1-Antagonist	IC ₅₀ < 10 μM	[211]
EPO/EPOR	Phagen-Display	Radioaktiver Bindungstest	EMP1 (Abbildung 12)	EPO-Agonist IC ₅₀ = 0.2 μM	[319–321]
EPO/EPOR	Unternehmens-eigene Bibliothek	Radioaktiver Bindungstest	EPO-Antagonist	IC ₅₀ = 60 μM	[330]

Genexpression zu kontrollieren,^[192c,193] zellulären Vorgängen selektiv entgegenzuwirken^[194] und Protein-Ligand-Paare zu identifizieren.^[195] Sie adressierten sogar Proteinheterodimere, deren Liganden nicht bekannt waren.^[196]

Zellwachstum, Differenzierung, Migration und Apoptose werden zum Teil durch Wachstumsfaktoren oder Cytokine reguliert. Diese Verbindungen können die Zellmembran nicht durchdringen, sondern wirken durch Bindung an Rezeptoren auf der Zelloberfläche. Viele dieser Rezeptoren werden durch ligandeninduzierte Dimerisierung oder Oligomerisierung aktiviert.^[183–186] Auch verschiedene Komponenten der intrazellulären Signalübertragung werden durch Dimerisierung reguliert. Beispielsweise dimerisieren einige cytoplasmatische Signalmoleküle nach Aktivierung; auch bei der aktiven Form von Transkriptionsfaktoren handelt es sich oftmals um Dimere.^[187–190] Die Proteindimerisierung wurde als allgemeiner Mechanismus für die Aktivierung und Regulierung der Signaltransduktion bestätigt. Wir wählten unsere Targets nicht nur nach ihrer therapeutischen Bedeutung aus, sondern auch, weil sie bestimmte Phasen repräsentieren, in denen die zelluläre Signalübertragung durch Manipulation von Protein-Protein- oder Protein-DNA-Wechselwirkungen moduliert werden kann:

- Aktivierung durch Förderung der Homodimerisierung eines Zelloberflächen-Rezeptors (EPO-Agonist).
- Hemmung einer extrazellulären Zelloberflächenintegrin-Protein-Wechselwirkung (MMP-2/α_vβ₃).
- Hemmung einer intrazellulären Zelloberflächenintegrin-Protein-Wechselwirkung (Paxillin/α₄β₁).
- Hemmung der intrazellulären Heterodimerisierung eines Transkriptionsfaktors (Myc/Max, LEF-1/β-Catenin).
- Hemmung der Protein-DNA-Wechselwirkung eines Trans-

Tabelle 3: (Fortsetzung)

Protein-Protein-Wechselwirkung	Quelle der Verbindung	Screeningverfahren	Leitstruktur ^[a]	Aktivität	Lit.
	Modifiziert	Radioaktiver Bindungstest	EPO-Agonist	EPO-Agonist IC ₅₀ = 4.4 μM	[330]
EPO/EPOR	Flüssigphasenbibliothek	Radioaktiver Bindungstest	30 (Abbildung 11)	EPO-Agonist EC ₅₀ = 8 μM	[82]
TPO/TPOR	Phagen-Display	ELISA	TPO-Agonist	EC ₅₀ = 400 nM	[212]
	Modifiziert	ELISA	AF13948 (Dimer)	EC ₅₀ = 100 pM	[212]
TPO/TPOR	Unternehmens-eigene Bibliothek	Radioaktiver Bindungstest	TM41	TPO-Agonist	[213]
GCSF/GCSFR	Unternehmens-eigene Bibliothek	Funktions-test	SB247464	Agonist	[214]
C5a/C5aR	Entwickelter Inhibitor	Radioaktiver Bindungstest	C5a-Antagonist	IC ₅₀ = 300 nM	[215]
FKBP/Cn	Naturstoff	–	FK506	Cn-Inhibitor	[216]
Cyclophilin/Cn	Naturstoff	–	Cyclosporin A	Cn-Inhibitor	[216, 217]
FKBP/FRAP	Naturstoff	–	Rapamycin	Immunsup-pressor	[218]
Chemische Dimerisierungs-induktoren (CIDs)	Synthetische Verbindungen	Verschiedene	Repräsentative CID	Verschiedene	[192–196]
Ribosom(RNA)/Protein	Naturstoffe	Verschiedene	Macrolide Tetracycline Oxazolidinone Streptogramin Chloramphenicol TAN 1057 Pestalon Cycloheximid Hygromycin Blasticidin Virginamycin Sparsomycin Puromycin Clindamycin	Antibiotika	[219]
Hsp90/Client-Protein	Naturstoffe	Verschiedene	Geldanamycin Herbimycin Radidicol 17-AAG	Tumorthera-peutika	[220a]
Hsp90/Client-Protein	Entwickelter Ligand	Kompetitive Bindung	PU3	EC ₅₀ = 15–20 μM	[220b]
α/β-Tubulin	Naturstoffe	Verschiedene	Colchicin Vincristin Taxol Epothilon	Mitosehemmer	[221a]
α/β-Tubulin	Kommerzielle Bibliothek	Zelltest	Synstab A	Mitosehemmer	[221b]
Topoisomerase/DNA	Naturstoff	Verschiedene	Camptothecin	Tumorthera-peutikum	[222]
PG/Transpeptidase	Naturstoff	Verschiedene	Vancomycin	Antibiotikum	[223a]
LI II/Trans-glycosylase	Naturstoff	Verschiedene	Ramoplanin	Antibiotikum	[223b]
Kernständige Hormonrezeptoren	Verschiedene	Verschiedene	Verschiedene	Agonisten und Antagonisten	[224]
RGD-Mimetika	Verschiedene	Verschiedene	Verschiedene	Antagonisten	[240–252]
SH2-Domänen	–	–	–	–	[181, 225a]
SH3-Domänen	–	–	–	–	[225b]
WW-Domänen	–	–	–	–	[225c]
PDZ-Domänen	–	–	–	–	[225d]

[a] Wenn keine Angabe gemacht wird, ist die Leitstruktur in Schema 7 gezeigt.

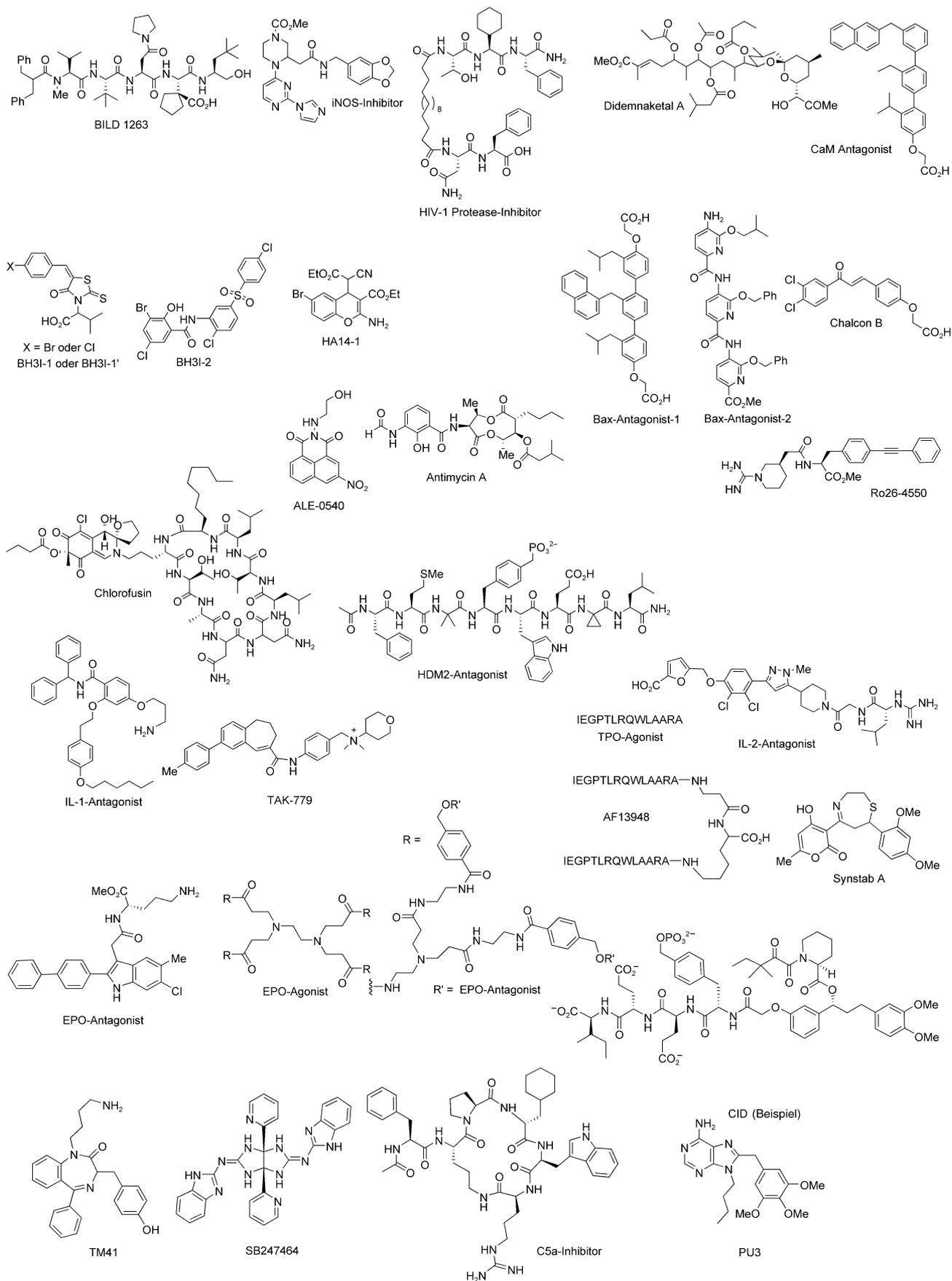
kriptionsfaktors (LEF-1/β-Catenin, Androgenrezeptor).

In der folgenden Schilderung unserer Untersuchungen erläutern wir einige wichtige Aspekte der Targetauswahl, der Screening-Methode und des Bibliotheksaufbaus.

4.1. MMP-2/α_vβ₃

MMP-2 (Gelatinase A) gehört zur Familie der Matrix-Metalloproteinase-Proteine. Es wird von vaskulären endothelialen Zellen sezerniert und spielt eine entscheidende Rolle beim Abbau der extrazellulären Matrix bei der tumorinduzierten Angiogenese.^[226] MMP-2-Inhibitoren wurden intensiv untersucht und entwickelt, da sie Tumorwachstum und Metastasierung verringern.^[226–231] Eine weitere Schlüsselkomponente bei der Angiogenese ist das Integrin α_vβ₃,^[232] das die Wechselwirkungen der Zelle mit der extrazellulären Matrix vermittelt.^[231, 233–239] Dieser heterodimere Zelloberflächen-Rezeptor erkennt bestimmte Matrixproteine, die das RGD(Arg-Gly-Asp)-Sequenzmotiv enthalten, vermittelt die Integrin-Aggregation und unterstützt letztlich Migration und Überleben endothelialer Zellen. Lösliche RGD-Peptide, nicht-peptidische RGD-Mimetika und Antikörper, die die α_vβ₃-Bindung aufbrechen, hemmen Angiogenese und Tumorwachstum.^[240–252] Gegenwärtig entwickeln mindestens 40 pharmazeutische Unternehmen Angiogenese-Inhibitoren, die gegen diese beiden Targets gerichtet sind; mindestens 27 Wirkstoffe sind in klinischen Studien.^[231, 253–258]

Vor kurzem wurde von Cheresh et al. eine neue Wechselwirkung zwischen MMP-2 und dem Integrin α_vβ₃ entdeckt: Beide Proteine befinden sich in vivo auf der Oberfläche durch tumorinduzierte Angiogenese gebildeter Blutgefäße.^[259] Durch Bindung an das Integrin α_vβ₃ kann das Enzym MMP-2 auf der Oberfläche der invasiven endothelialen Zellen seine Wirkung entfalten.^[260] PEX, ein katalytisch unwirksames C-terminales MMP-2-Fragment mit einer Länge von 193 Aminosäureeinheiten, hemmt die MMP-2-Bindung an α_vβ₃ und blockiert auf diese Weise indirekt dessen proteolytische Aktivität an der Zelloberfläche.^[261] Außerdem unterbricht PEX die Angiogenese und das Tumorwachstum in der Chorioallantois-Membran des Hühnerembryos (CAM). Eine natürliche Form von PEX kann in vivo an Zellen nachge-



Schema 7. Einige niedermolekulare Modulatoren für Protein-Protein-Wechselwirkungen (siehe auch Tabelle 3).

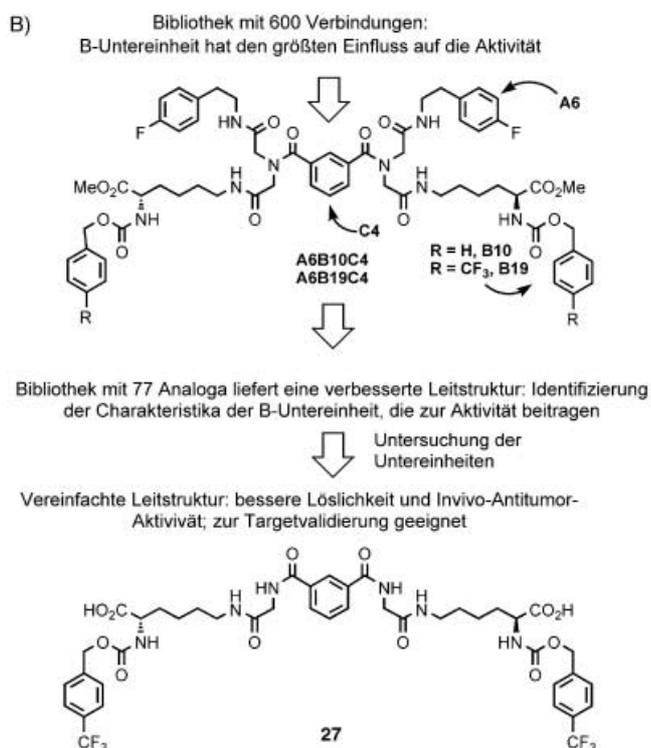
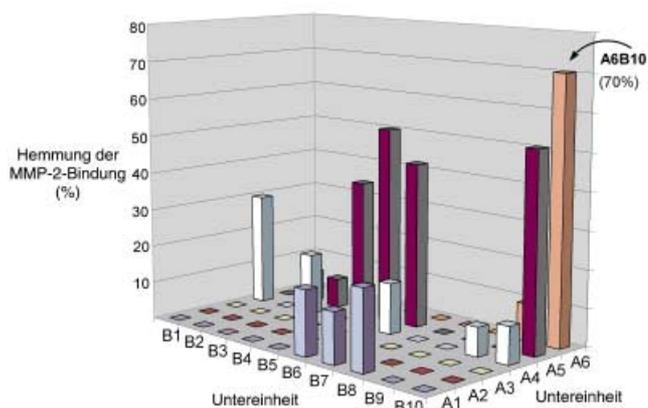
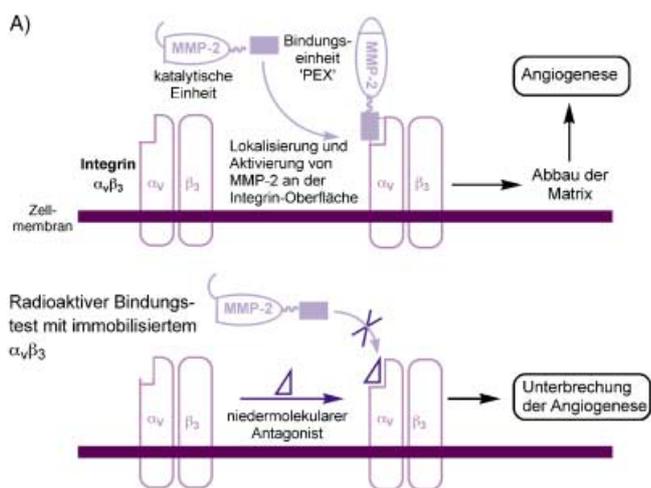


Abbildung 3. A) Unterbrechung der Angiogenese durch Blockierung der Matrix-Metalloprotease-2(MMP-2)-Bindung an Integrin $\alpha_v\beta_3$. B) Entwicklung eines Angiogenese-Inhibitors.

wiesen werden, die $\alpha_v\beta_3$ exprimieren, was auf eine Funktion als endogener Angiogenese-Regulator hinweist. Die Störung der extrazellulären Bindung von MMP-2 an das Integrin $\alpha_v\beta_3$ erscheint daher als vielversprechend für die Kontrolle der Angiogenese und könnte zu einer neuen Therapiestrategie für Angiogenese-bedingte Erkrankungen einschließlich Krebs weiterentwickelt werden (Abbildung 3).

Strukturdetails der Wechselwirkung zwischen MMP-2 und $\alpha_v\beta_3$ sind nicht bekannt; fest steht nur, dass das Integrin an anderer Stelle bindet als die RGD-Sequenz in traditionellen hochaffinen Liganden (z.B. Vitronectin).^[260] Mithilfe einer kombinatorischen Strategie wurde versucht, niedermolekulare MMP-2- $\alpha_v\beta_3$ -Antagonisten ohne genaue Kennt-

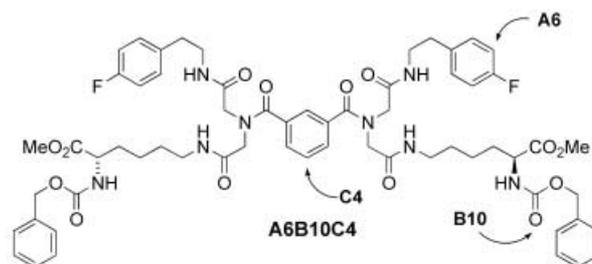
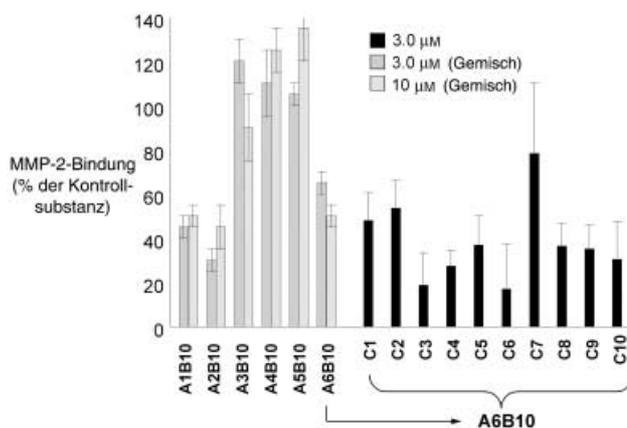
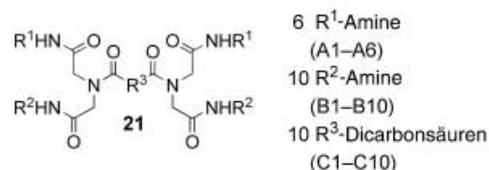


Abbildung 4. Entdeckung der ursprünglichen Leitstruktur A6B10C4 für die Hemmung der MMP-2-Bindung an $\alpha_v\beta_3$ durch Screening einer Bibliothek mit 600 Elementen.

nis der Targetstruktur zu identifizieren. So wurden neue antiangiogenetische Verbindungen entdeckt, die diese Protein-Protein-Wechselwirkung hemmen. Gleichzeitig wurde das extrazelluläre Target für die therapeutische Intervention validiert.^[77,78] Die erste Leitstruktur stammte aus einer Bibliothek aus 60 Gemischen von je 10 Verbindungen (Abbildung 4). Die effektivsten Inhibitoren enthielten die Untereinheit B10. Zur Identifizierung der aktivsten Bestandteile wurde jede Verbindung aus den verschiedenen Gemischen einzeln synthetisiert. Weil die 10-Komponenten-

Mischung erst im letzten Schritt der Bibliothekssynthese erzeugt wurde, musste lediglich der letzte Syntheseschritt mit einzelnen anstelle gemischter C-Untereinheiten aus der Rückstellprobe der vorigen Stufe wiederholt werden.

Das Screening der Verbindungsbibliotheken in einem Radiomarkierungs-Bindungstest mit immobilisiertem Integrin führte zur Einstiegsstruktur **A6B10C4**, die Verfeinerung der Suche ergab **A6B19C4**, und die anschließende Vereinfachung der Struktur lieferte den Inhibitor **27** mit verbesserter Löslichkeit und In-vivo-Aktivität (Abbildung 3). **27** bindet $\alpha_4\beta_3$ und verdrängt MMP-2, nicht aber den Integrin-Liganden Vitronectin. Der Inhibitor hemmt außerdem den Abbau der Kollagenmatrix, ohne direkt auf die Enzymaktivität von MMP-2 einzuwirken, erwies sich in einem Hühnerembryo-CAM-Modell als potenter Angiogenese-Hemmer und führt im gleichen Modell in vivo zu fast vollständiger Wachstumshinderung von CS-1-Melanomen. Ein inaktives Analogon von **27** mit einer Carbamat- anstelle der Benzamideinheit diente als Kontrolle.^[77,78]

4.2. Paxillin/ α_4 : ein Erfolg der Positionsanalyse

Integrin $\alpha_4\beta_1$ (auch Very Late Antigen 4, VLA4) ist ein Zelloberflächenrezeptor, der eine wichtige Rolle bei Embryogenese, Hämatopoese und Immunantwort spielt.^[262-267] Zu seinen natürlichen Liganden zählen das

vaskuläre Zelladhäsionsmolekül 1 (VCAM-1) und ein alternativ gespleißtes Verbindungssegment (connecting segment CS-1) des extrazellulären Matrixproteins Fibronectin. VLA-4 vermittelt zelluläre Adhäsion und Aktivierung durch eine Vielzahl von Zell-Zell- und Zell-Matrix-Wechselwirkungen, die die Leukocytenmigration im Gewebe im Verlauf entzündlicher Prozesse ebenso regulieren wie die Freisetzung von Lymphocyten.^[262-267] Vermutlich unterscheidet sich der Mechanismus der Regulierung zellulärer Funktionen durch dieses Integrin von demjenigen anderer Integrine, denn das cytoplasmatische Ende von α_4 bindet über ein kurzes konserviertes Sequenzmotiv, das von Glu 983 und Tyr 991 dominiert wird, eng an das Signaladapterprotein Paxillin.^[268] Die α_4 -Paxillin-Bindung erhöht die Geschwindigkeit der Zellmigration und verlangsamt die Zellausbreitung auf der Unterlage, die focale Adhäsion und die Stressfaserbildung (Abbildung 5).^[269,270] Diese biologischen Antworten auf die integrinvermittelte Zelladhäsion tragen zur Leukocytenmigration bei und führen zu Änderungen der Genexpression, die eine wichtige Rolle bei chronischen Entzündungsprozessen spielt. Extrazelluläre Inhibitoren gegen diese Integrin-Klasse werden für die Behandlung von Asthma und multipler Sklerose entwickelt.^[271-273] Hemmstoffe, die die einzigartige Wechselwirkung von Paxillin und α_4 im Cytoplasma beeinflussen, sind hingegen noch nicht untersucht worden.

Auch für diese Protein-Protein-Wechselwirkung als Target waren weder Strukturinformationen noch Inhibitoren

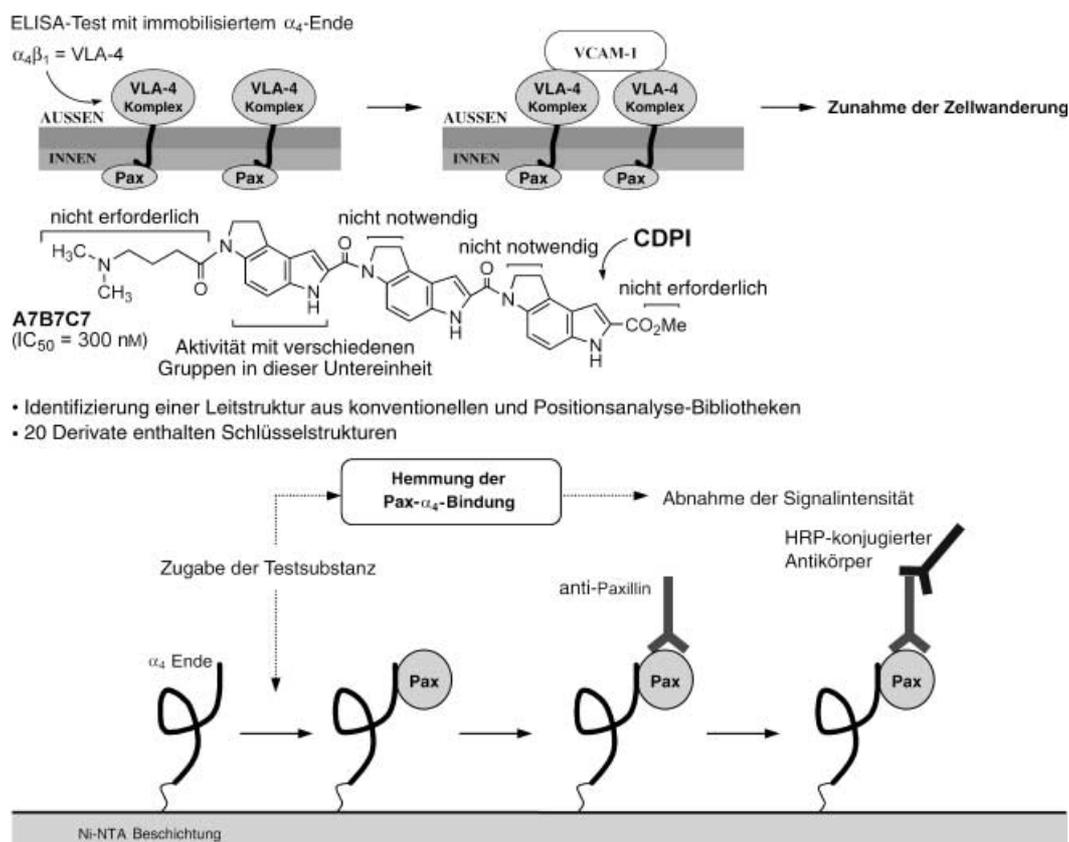


Abbildung 5. Hemmung der Zellwanderung durch Blockierung der intrazellulären Paxillin- α_4 -Bindung. Die Leitstruktur **A7B7C7** wurde durch Hochdurchsatz-Screening mit einem ELISA-Test entdeckt. HRP = Meerrettich-Peroxidase, Pax = Paxillin, VLA-4 = Very Late Antigen 4, VCAM-1 = Zelladhäsionsmolekül 1.

bekannt. Die Untersuchung unserer Bibliotheken (ca. 40000 Verbindungen) in einem ELISA-Test mit dem immobilisierten cytoplasmatischen Ende von α_4 und das Screening auf Hemmung der Paxillin-Bindung führte zur Identifizierung der ersten wirksamen Inhibitoren (Abbildung 5). Durch Synthese von Substrukturanaloga von **A7B7C7** wurde ermittelt, welche Strukturelemente für die Aktivität notwendig sind, welche weiter modifiziert werden können und welche ohne Aktivitätsverlust verändert oder entfernt werden können. Mit der wirksamsten Leitstruktur konnte die $\alpha_4\beta_1$ -vermittelte Migration menschlicher Jurkat-T-Zellen dosisabhängig gehemmt werden, was die Zugänglichkeit der intrazellulären Paxillin- α_4 -Wechselwirkung für eine therapeutische Beeinflussung bestätigte. Eine solche Targetvalidierung erfolgt meist zuerst mit biologischen Methoden, monoklonalen Antikörpern oder Peptid-Konsensussequenzen, die vom Rezeptor oder seinen Liganden abgeleitet wurden. Es ist beachtlich, dass sogar die anfängliche Targetvalidierung und der Eignungsnachweis für eine Therapie mit niedermolekularen Substanzen in einem Screening von Bibliotheken mit kleinen Molekülen erfolgte.

Die Leitstruktur stammte aus Bibliotheken mit 1000 Verbindungen in zwei Formaten: 1) im traditionellen kleinen Mischungsformat mit 100 Mischungen zu je 10 Verbindungen und 2) als Positionsanalyse-Bibliothek. Beim parallelen Test der beiden Bibliotheken konnten die Resultate der beiden Ansätzen direkt verglichen werden.^[79] In der Positionsanalyse-Bibliothek ist jede Verbindung aus der traditionellen Bibliothek ebenfalls vorhanden, die Verbindungen sind jedoch so angeordnet, dass eine sofortige Dekonvolution möglich ist. Die Suche nach der besten Komponente in Position A durch Screening der Unterbibliothek **AxBC** ergab die beste Hemmung für die Mischung **A7BC**; CDPI ist also die beste Gruppe in Position A (Abbildung 6). Nach dem gleichen Verfahren wurde CDPI auch als effizienteste Unter-einheit für die Positionen B und C identifiziert. Die direkte Dekonvolution der Ergebnisse wies die Kombination **A7B7C7** als potenten Antagonisten der Paxillin- α_4 -Bindung aus. **A7B7C7** wurde gleichzeitig auch im traditionellen Bibliotheks-Screening als Leitstruktur gefunden. Dieser Erfolg beim ungerichteten Screening muss allerdings insofern relativiert werden, als im Screening der Positionsanalyse-Bibliothek mit direkter Dekonvolution nicht alle potenziellen Hemmstoffe gefunden wurden, die in den traditionellen Bibliotheken entdeckt wurden. Da große 100-Komponenten-Mischungen getestet wurden, sagt die Untersuchung relativ wenig aus über den Beitrag der einzelnen, unabhängig wirkenden Bestandteile des Gemisches. Mit der Positionsanalyse-Bibliothek wurden die wichtigsten Beobachtungen gemacht, und eine wertvolle Leitstruktur mit definierten Eigenschaften wurde identifiziert.^[79] Weniger stark wirkende Substanzen wurden hingegen nicht gefunden. Die Nachteile, die mit dem Informationsverlust verbunden sind, müssen also gegen die Vorteile der einfachen Synthese der Vorgänger-Bibliotheken abgewogen werden; welcher Weg beschritten wird, hängt dann vom Ziel des Screenings ab. Wie in diesem Beispiel sind Positionsanalyse-Bibliotheken meist effizient zur Identifizierung einer Leitstruktur, jedoch weniger geeignet für deren Optimierung.

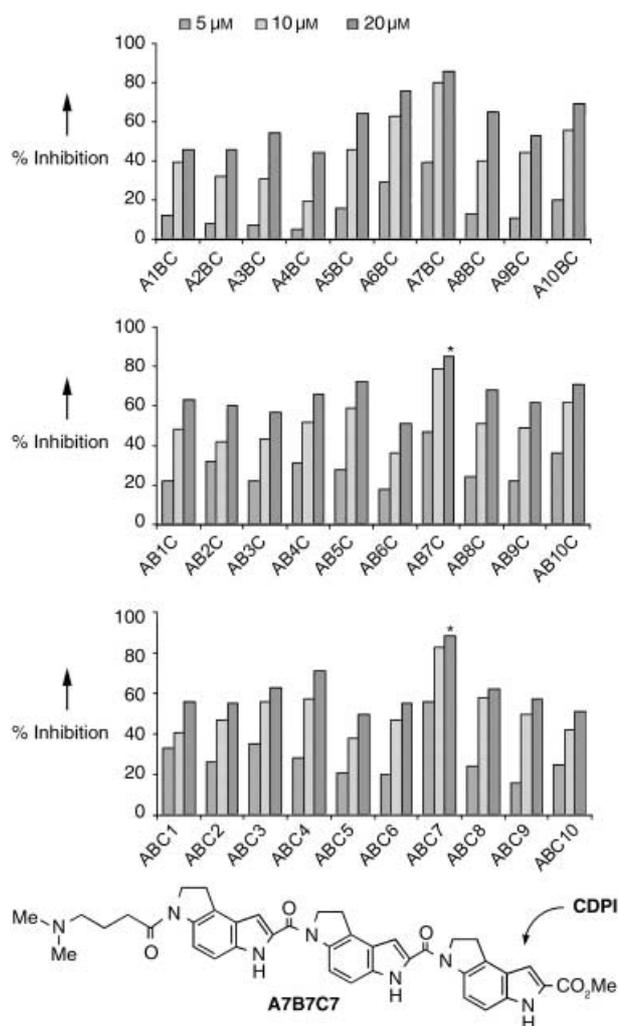


Abbildung 6. Hemmung der Paxillin- α_4 -Bindung durch die Positionsanalyse-Bibliotheken. Oben: A-Scan mit AxBC-Mischungen, mitte: B-Scan mit ABxC-Mischungen, unten: C-Scan mit ABCx-Mischungen. Jede Mischung aus 100 Verbindungen wurde in Dreifachbestimmung mit 5, 10 und 20 μM Gesamtmenge getestet.

4.3. Myc-Max-Heterodimerisierung

Das *c-myc*-Proto-Onkogen ist an der Entstehung zahlreicher Tumoren im menschlichen Körper beteiligt.^[274–284] Eng mit Myc verwandte Proteine sind wichtige Regulatoren von Zellwachstum und -differenzierung. Aktivierung und Transformation werden meist durch erhöhte Expression des Genprodukts Myc ausgelöst; Myc ist ein kurzlebiges Kernprotein und ein wichtiger Vertreter der basischen Helix-Loop-Helix-Leucin-Reißverschluss-Transkriptionsfaktoren (bHLHLZ) (Abbildung 7).^[285,286] Das onkogene Potenzial von *c-myc* wurde in transgenen Tieren, rekonstituierten Organen und Zellkulturen gezeigt; typischerweise ist die Mitwirkung mindestens eines weiteren Onkogens wie *ras* oder *bcl-2* (hemmt die Apoptose) erforderlich.^[274–284] In normalen Zellen induziert Myc die Zellproliferation und unterdrückt die Differenzierung. Es wird als Antwort auf mitogene Reize exprimiert und hat eine kurze Halbwertszeit $t_{1/2} = 20\text{--}30$ min. Die abnormale Expression in Abwesenheit

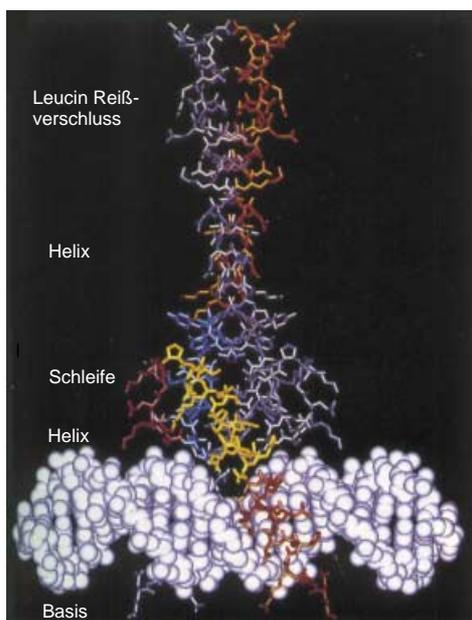
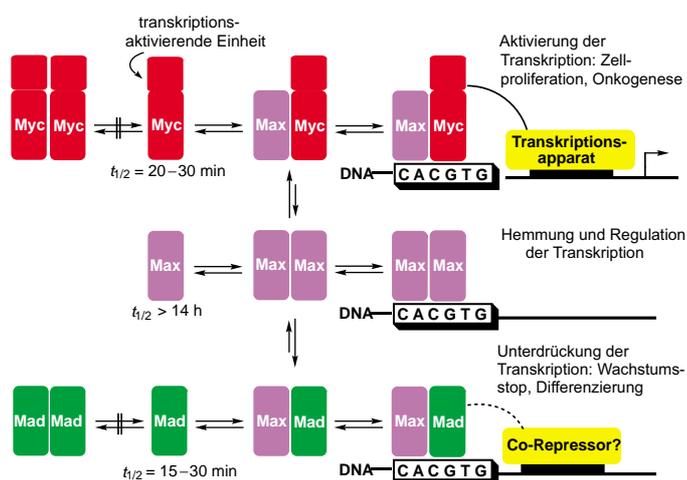


Abbildung 7. Oben: Myc-Max-Mad-Zusammenspiel bei der Kontrolle der Transkription: Zellproliferation und Differenzierung. Unten: Komplex des Max(22-113)-Dimers mit DNA. Max = Myc-assoziiierter Faktor X. Wiedergabe mit freundlicher Genehmigung von *Nature*, Lit. [285].

von Wachstumsfaktoren lenkt die Zellen in den Teilungszyklus, induziert aber gleichzeitig auch Apoptose – es sei denn, onkogene Mechanismen wie Hemmung durch konstitutive Überexpression von *bcl-2* wirken entgegengesetzt.

Alle bekannten Aktivitäten von Myc erfordern eine Heterodimerisierung mit Max,^[285–293] einem konstitutiv exprimierten bHLHLZ-Protein, das stabil ($t_{1/2} > 14$ h) und ständig vorhanden ist. Das Myc/Max-Heterodimer bindet an die DNA-Sequenz CACGTG, ein E-Box-Element, und aktiviert die Transkription über die Transaktivierungsdomäne von Myc. Die DNA-Bindung wird durch die basische Region vermittelt, während HLH und der Leucin-Reißverschluss die Kontaktfläche für die Dimerisierung bilden.^[285,286] Im Unterschied zu Myc bildet Max auch Homodimere, die an die gleiche DNA-Stelle binden und die Transkription hemmen. Dies ist eine Folge der Konkurrenz um Max und die gemeinsame DNA-Stelle. Außerdem heterodimerisiert Max

auch mit bHLHLZ-Proteinen einer anderen Familie, darunter Mad (Mad-1), Mxi-1, Mad-3 und Mad-4. Diese Proteine werden transient exprimiert ($t_{1/2} = 15–30$ min) und lösen Wachstumsstopp und Zelldifferenzierung aus.^[296,297] Ihr Dimerisierungsverhalten ähnelt insofern dem von Myc, als sie nicht homodimerisieren oder mit Proteinen der Myc-Familie wechselwirken, aber bereitwillig Heterodimere mit Max bilden, die an die Kernkonsensussequenz CACGTG binden. Mad und Myc konkurrieren um Max mit etwa gleicher Affinität, Heterodimere werden gegenüber dem Max-Homodimer bevorzugt gebildet. Mad/Max-Heterodimere reprimieren oder antagonisieren die Myc/Max-Transkriptionsaktivierung. In gesunden Zellen wird die Expression von Mad durch Differenzierungssignale induziert, während die Myc-Expression reprimiert wird.^[274–283] So induzieren Myc/Max-Dimere in nichttransformierten Zellen Proliferation und Apoptose, während Max/Max und Mad/Max an Wachstumsstopp, Differenzierung und Überleben der Zelle beteiligt sind. Im Zentrum dieses Zusammenspiels steht Max, das gegen Abbau stabil ist und konstitutiv exprimiert wird. Seine Heterodimerisierungspartner Myc und Mad werden schnell abgebaut und genau reguliert. Stimulierung durch Mitogene löst einen schnellen Anstieg des Myc-Niveaus und eine Verschiebung des Gleichgewichts zu Myc/Max-Dimeren mit Aktivierung der Transkription aus. In transformierten Zellen, in denen gleichzeitig onkogene Prozesse ablaufen, die die Apoptose hemmen, hält die konstitutive Myc-Expression den Proliferationsstatus der Zelle aufrecht und verhindert Wachstumsstopp und Differenzierung.^[274–283] Die Funktion des Myc-Max-Mad-Zusammenspiels hängt also von vier wesentlichen Punkten ab:

- 1) Max ist als Dimerisierungspartner für Myc und Mad zur DNA-Bindung und Entfaltung ihrer biologischen Funktionen notwendig.
- 2) Myc/Max- und Mad/Max-Heterodimere bilden sich bevorzugt gegenüber dem Max/Max-Homodimer.
- 3) Die streng regulierten Expressionsniveaus von Myc und Mad induzieren schnelle Wechsel im Gleichgewicht der Dimere. Das Myc/Max-Heterodimer aktiviert die Transkription während aller Stadien des Zellzyklus und hält die Zelle in einem Status von Zellwachstum und Proliferation, während das Mad/Max-Heterodimer das Signal für das Verlassen des Zellzyklus, den Wachstumsstopp und die Einleitung der Differenzierung gibt.
- 4) Alle Dimere konkurrieren um gemeinsame DNA-Bindungsstellen. Die Transkriptionsaktivierung durch Myc/Max wird durch die anderen Dimere antagonisiert. Die abnormale Expression von Myc, die zur Zelltransformation führt, kann durch eine Hemmung der Myc/Max-Heterodimerisierung und der nachfolgenden Transkriptionsaktivierung neutralisiert werden. Dieser Vorgang ist von zentraler Bedeutung für das Krankheitsgeschehen und somit ein attraktives Target für die Krebstherapie.

Ein neues FRET-Assay zur Detektion der Myc/Max-Dimerisierung wurde speziell für diese Untersuchungen entwickelt (Abbildung 8). Dazu wurden die Fusionsproteine MycCFP und MaxYFP aus der bHLHLZ-Domäne von humanem *c-myc* und dem N-Terminus des cyan fluoreszierenden Proteins CFP bzw. aus der bHLHLZ-Domäne von Max und dem N-

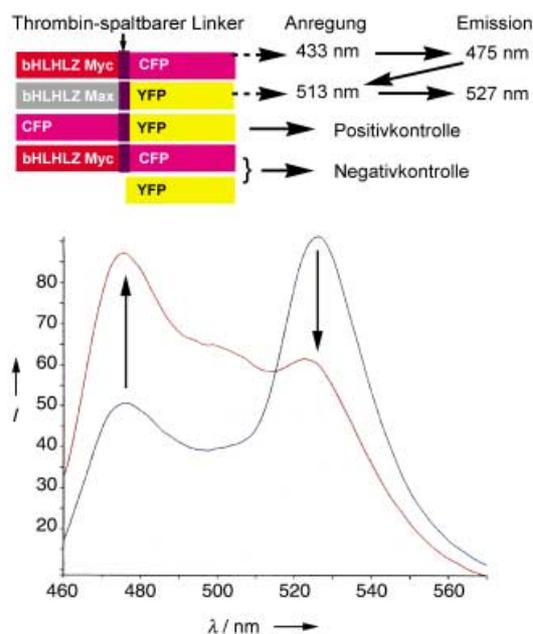


Abbildung 8. Fluoreszenz-Resonanzenergie-Transfer (FRET)-Test: Dimerisierungsinhibitoren bedingen eine Intensitätsverringering bei 527 nm (Dimer) und einen Intensitätsanstieg bei 475 nm (Monomer). Verbindungen mit großem Verhältnis I_{475}/I_{527} werden selektiert. bHLHLZ = basischer Helix-Loop-Helix-Leucin-Reissverschluss-Transkriptionsfaktor, CFP = cyan fluoreszierendes Protein, YFP = gelb fluoreszierendes Protein.

Terminus des gelb fluoreszierenden Proteins YFP hergestellt, kloniert, exprimiert und gereinigt. Die Hemmung der Dimerisierung wird als Funktion der Abnahme der FRET-Signalemission bei 527 nm (YFP) nach Anregung von CFP bei 433 nm bestimmt. Beim Screening unserer Bibliothek aus 40 000 Verbindungen wurden in einer Isoindolin-Bibliothek mit 240 Verbindungen zwei sehr ähnliche Leitstrukturen gefunden (Abbildung 9). Die Blockierung der Myc/Max-Bindung (38% FRET-Hemmung bei $25 \mu\text{M}$ für **28**) durch diese bemerkenswert kleinen Inhibitoren wurde anschließend in einem konventionellen ELISA-Test nachgewiesen; durch ein Gel-Shift-Experiment wurde die Blockade der Myc/Max-DNA-Bindung bestätigt, die bereits im FRET-Test beobachtet worden war. Die beiden wirksamsten Leitstrukturen hemmten die Myc-induzierte Transformation von Hühnerembryo-Fibroblasten ($\text{IC}_{90} = 20 \mu\text{M}$) und demonstrierten so die Aktivität der Verbindungen in einem Zelltest.^[80]

4.4. LEF-1/ β -Catenin

Die Mehrzahl der colorektalen Tumoren enthalten Mutationen im Tumorsuppressor-Protein (APC, adenomatöse Polyposis des Colons). Dadurch wird β -Catenin freigesetzt und im Zellkern akkumuliert. β -Catenin bindet an Transkriptionsfaktoren, darunter LEF-1 (Lymphoid Enhancers Binding Factor 1), und aktiviert sie.^[298–301] Dadurch kommt es zu verstärkter und abnormaler Genexpression, die ein Schlüsselschritt bei der Entstehung von Dickdarmkrebs ist (Abbildung 10). Die LEF-1-Transkriptionsfaktoren (TCF), die mit β -Catenin wechselwirken, haben eine identische

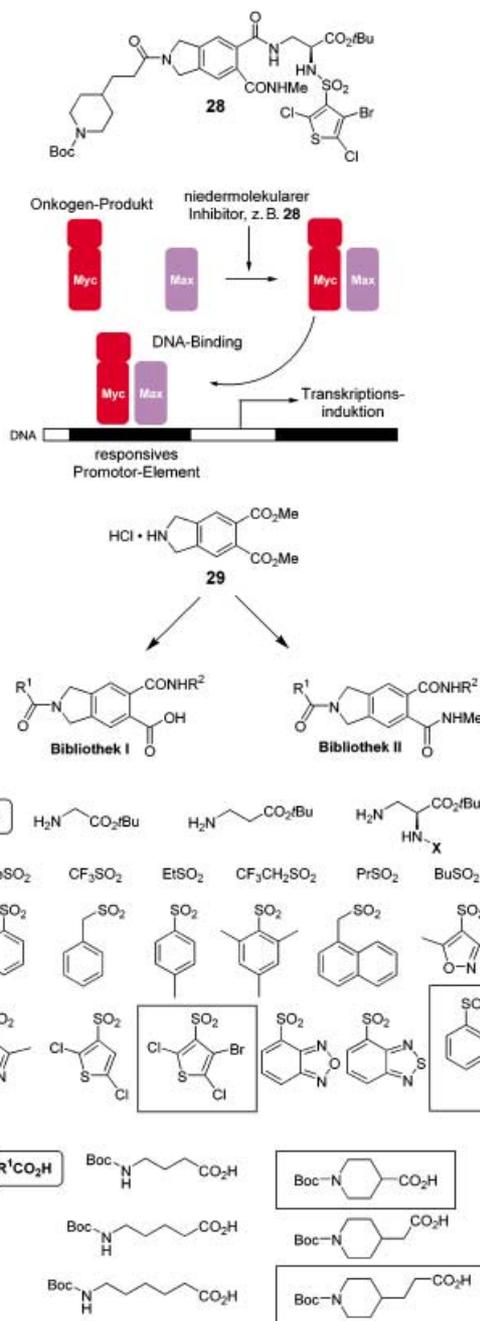


Abbildung 9. Hemmung von Myc/Max-Heterodimer-Bildung und abnormaler Gentranskription: Targetvalidierung zur Tumorbekämpfung.

DNA-Bindungsdomäne, die auch als High-Mobility-Group(HMG)-Domäne bekannt ist und die Sequenz 5'-CTTTGWW-3' (W = A oder T) erkennt. LEF-1 bindet in der kleinen Furche der DNA über die HMG-Domäne und kann daher ideal mit Bibliotheken aus Liganden, die in der kleinen Furche binden, adressiert werden.^[302] Bei der Bindung an den Aminoterminus von LEF-1 aktiviert β -Catenin die Transkription. In Abwesenheit von β -Catenin reprimiert LEF-1 die Transkription aktiv. Man vermutet, dass LEF-1-gebundenes β -Catenin Corepressoren verdrängt und dass β -Catenin an eine andere Bindungsdomäne von LEF-1 bindet

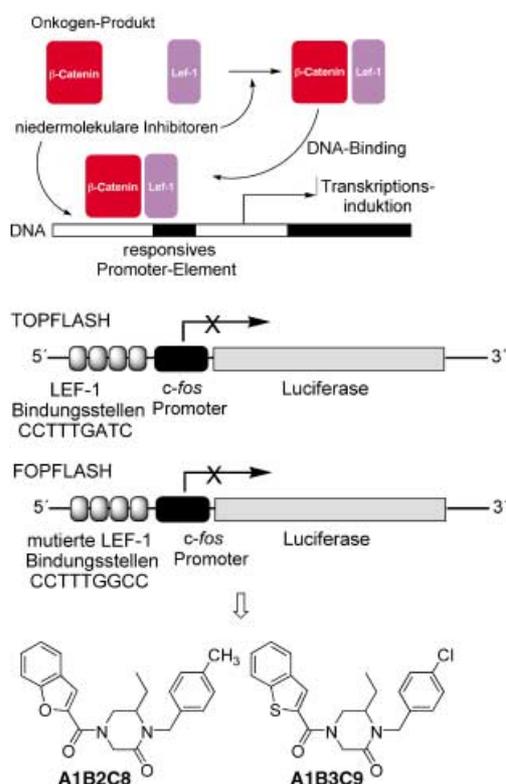


Abbildung 10. Hemmung der LEF-1- β -Catenin-vermittelten Gentranskription: Kontrolle anormaler Gentranskription und Targetvalidierung zur Tumorbekämpfung. Mehr als 40 000 Verbindungen wurden im TOPFLASH-Luciferase Reporterassay untersucht. Die beiden Leitstrukturen **A1B2C8** und **A1B3C9** aus einer 150 Elemente umfassenden Iminodiacetat-Bibliothek mit Piperazinonen zeigten TOPFLASH-Selektivität.

als der Corepressor. Vogt et al. beschrieben das durch die Wechselwirkung mit LEF-1 vermittelte onkogene Potenzial von β -Catenin.^[303]

Das erste Screening unserer Bibliothek führten wir mit einem TOPFLASH/FOPFLASH-Zellen-Reporter-Assay^[298] in einer transient transfizierten Darmkrebs-Zelllinie (SW480) mit APC-Mutation durch. Mit einem Luciferase-Reporterassay konnten Leitstrukturen entdeckt werden, die die LEF-1- β -Catenin-Bindung aufbrechen oder die LEF-1-DNA-Bindung hemmen. Auf diesem Wege wurden zwei Klassen niedermolekularer Verbindungen identifiziert, die die LEF-1- β -Catenin-vermittelte Gentranskription hemmen. Für die erste sind **A1B2C8** (3.7fache Hemmung bei 10 μ M) und **A1B3C9** (4.8fache Hemmung bei 10 μ M) repräsentativ; diese ungewöhnliche Klasse niedermolekularer Verbindungen hemmt wahrscheinlich nicht die LEF-1-DNA-Bindung, sondern die LEF-1- β -Catenin-Bindung (Abbildung 10). Die Überprüfung in einem funktionalen Zelltest ergab, dass die Verbindungen die β -Catenin-induzierte Tumorzelltransformation der Colon-Zelllinie SW480 inhibieren. Die ursprüngliche Bibliothek aus 150 Elementen, aus der die Leitstrukturen stammten, wurde auf über 350 Elemente erweitert, um die Strukturmerkmale, die für die Aktivität im Reporter- und Funktionstest verantwortlich sind, zu identifizieren.^[71] Diese Untersuchungen werden auf umfangreichere Bibliotheken auf der Basis von **A1B2C8** und **A1B3C9** ausgedehnt. Dazu

wird ein FRET-Test entwickelt, mit dem ein direktes Screening auf die Spaltung der LEF-1- β -Catenin-Bindung durchgeführt werden kann. Mit dieser Methode soll der Wirkort **A1B2C8**-verwandter Leitstrukturen bestimmt werden. Durch das Screening weiterer Bibliotheken sollten neue Kandidatenstrukturen verfügbar werden. Die zweite Klasse selektiver TOPFLASH-Inhibitoren stammt aus einer Bibliothek von Liganden der kleinen DNA-Furche (siehe Abschnitt 5.3).

4.5. EPO/EPOR: Agonisten aus Antagonisten

Erythropoietin (EPO) ist ein monomeres 34 kDa-Glycoprotein, das aus 165 Aminosäuren und ungefähr derselben Masse an Kohlenhydratbestandteilen besteht. EPO ist der Hauptregulator der Erythrocytenproduktion:^[304–311] Es kontrolliert die Proliferation, Differenzierung und Reifung von Erythrocyten-Vorläuferzellen. Das EPO-Gen zeigt keine Homologie zu anderen bekannten Genen; es ist ein Einzelkopie-Gen und in verschiedenen Arten sehr ähnlich. Rekombinantes humanes EPO wird klinisch zur Behandlung von Anämien eingesetzt, vor allem, wenn diese durch Nierenerkrankungen einschließlich Zerstörungen der Niere durch maligne Tumoren oder AIDS (bzw. AIDS-Therapie) ausgelöst wurden oder mit myelodysplastischen Syndromen verbunden sind.^[308–311] EPO ist gegenwärtig mit einem Marktvolumen von über 7 Milliarden \$ pro Jahr das wichtigste biotechnologische Produkt; seine Anwendung erfordert intravenöse oder subcutane Injektion. So erklärt sich das Interesse an der Entwicklung eines niedermolekularen EPO-Mimetikums, um das rekombinante humane Protein zu ersetzen. Dem Protein selbst werden auch mögliche Antitumoreigenschaften zugeschrieben,^[312] wenngleich der Wirkmechanismus noch unbekannt ist. Der Beobachtung, dass EPO-behandelte Tumorpatienten länger überlebten und bessere Remissionen zeigten als andere Patienten, folgte eine In-vivo-Evaluierung, in der die Antitumorstärke von EPO nachgewiesen werden konnte.^[312] EPO wirkt durch die Bindung und Homodimerisierung seines Rezeptors EPOR,^[313–316] eines Klasse-I-Cytokinrezeptors (Tabelle 4).^[183–185] Diese Cytokinrezeptoren verfügen über eine oder zwei konservierte, 200 Aminosäuren lange Fibronectin-III-ähnliche Domänen, vier konservierte Cysteineinheiten und das konservierte Motiv Trp-Ser-Xaa-Trp-Ser (WSXWS) im extrazellulären Teil. Die intrazellulären Domänen der Cytokinrezeptoren haben im Unterschied zu den Rezeptor-Tyrosinkinase keine intrinsische enzymatische Aktivität. Die Ligandenbindung induziert eine Dimerisierung oder Oligomerisierung, und dies ermöglicht die Wechselwirkung (Dimerisierung) und Aktivierung (Kreuzphosphorylierung) nichtkovalent assoziierter Tyrosinkinase (Januskinase, JAKs, Abbildung 11).^[47,71,188,318] Im Gegenzug phosphorylieren die aktivierten JAKs Tyrosinreste cytoplasmatischer Domänen des Rezeptors, die dann Signalproteine wie die STATs (Signal Transducers and Activators of Transcription) aktivieren.^[187,188] Dies geschieht durch Phosphorylierung, Homo- oder Heterodimerisierung und anschließende Translokation in den Kern, wo sie direkt die Gentranskription aktivieren. Anhand dieses direkten Signaltransduktionswegs

Tabelle 4: Cytokin-Rezeptoren der Klasse I und therapeutische Anwendungen von Cytokin-Agonisten und -Antagonisten.

A. Cytokin-Rezeptoren der Klasse I.		
Familie	Beispiele	Aktivierungsmechanismus
GH-Rezeptor	GHR, EPOR, TPOR, PRLR, G-CSFR	Homodimere
IL-3-Rezeptor	IL-3R, GM-CSFR, IL-5R	Heterodimerisierung mit β_c
IL-6-Rezeptor	IL-6R, LIFR, CNTFR, IL-11R	Heterodimerisierung mit gp130
IL-2-Rezeptor	IL-2R α , IL-2R β , IL-4R, IL-7R	Heterodimerisierung mit IL-2R γ
B. Therapeutische Anwendungen von Cytokin-Agonisten und -Antagonisten.		
Cytokin	Agonist	Antagonist
EPO	Anämie, selektive Blutspende, Krebs	
TPO	Thrombocytopenie	
IL-2	Krebs	Gewebsunverträglichkeit
IL-3	Leukopenie, Myelin-Rekonstitution	Leukämie
IL-4	Entzündungen, Krebs	Allergie
IL-6	Thrombocytopenie	Krebs, Osteoporose, Entzündungen
IL-11	Thrombocytopenie	
IL-12	Krebs, Infektionen	Gewebsunverträglichkeit, Autoimmunerkrankungen
G-CSF	Neutropenie, Myelin-Rekonstitution	Leukämie
GM-CSF	Leukopenie, Myelin-Rekonstitution	Leukämie
IFN α/β	Krebs, Virusinfektionen, Autoimmunerkrankungen	Entzündungen
IFN γ	chronisch granulomatöse Erkrankung, Infektionen	Entzündungen, Autoimmunerkrankungen

lässt sich sehr schön zeigen, wie das einleitende Dimerisierungsereignis an den Rezeptoren durch die koordinierte Protein-Protein-Homo- oder Heterodimerisierung von Signalmolekülen direkt mit der Gentranskription gekoppelt ist. Die Homodimerisierung von Rezeptoren wird bei JAK und STAT (JAK2/JAK2 und STAT5/STAT5 bei EPOR) beobachtet: Die Homodimere binden an eine spezifische DNA-Sequenz und regulieren die Zielgene. Bei JAK und STAT-Proteinen erfolgt auch Heterodimerisierung (z. B. STAT4/STAT5): Die Komplexe binden an eine andere DNA-Sequenz und aktivieren eine andere Gruppe von Zielgenen. Diese kombinatorische Dimerisierungsstrategie wird in der natürlichen Signalkaskade verwendet, um bei einer begrenzten Zahl von Proteinen die Diversität der Signale zu maximieren.

Unsere Vorgehensweise ist auf alle Cytokinrezeptoren anwendbar. Dank des Maßstabs, in dem die Synthese durchgeführt wird, können die Bibliotheken gegen mehrere Rezeptoren auf Agonisten oder Antagonisten durchsucht werden; auch für künftige Arbeiten sind die Bibliotheken noch verfügbar. Wie man die Homo- oder Heterodimerisierung von Antagonisten der Ligandenbindung zur Entwicklung von Agonisten verwenden kann, wurde bereits beschrieben.^[170] Mögliche Anwendungen solcher Untersuchungen an den Cytokinrezeptoren sind in Tabelle 4 zusammengestellt.

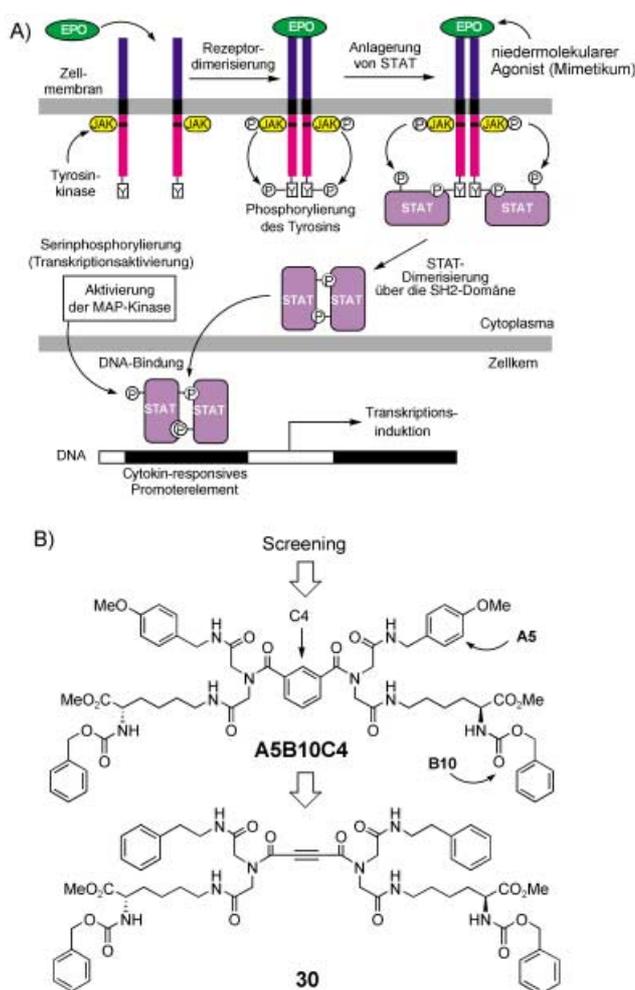


Abbildung 11. EPO-Agonisten (Mimetika), die durch die Förderung der EPOR-Dimerisierung wirken. A) Wirkungsweise. B) Entwicklung des EPO-Antagonisten **30**, der im funktionellen Zelltest aktiv ist. Schritt 1: Mehr als 100 000 Kandidaten werden auf EPOR-Bindung untersucht. Hierbei ist die Untereinheit B entscheidend. Schritt 2: Eine Bibliothek von 115 A-Analoga liefert eine verbesserte Leitstruktur. Identifizierung der aktivitätsrelevanten Charakteristika der B-Untereinheit (77 Analoga). Verbesserte Leitstruktur aus einer Bibliothek mit 70 C-Analoga. Untersuchung von drei Bibliotheken mit 1000 Elementen mit anderen Templaten. Untersuchung von IDAs höherer Ordnung: Funktionstest mit bindenden Molekülen.

In einer Phagenbibliothek wurde das 20 Aminosäuren lange cyclische Peptid 61233 (EMP1) identifiziert, das an EPOR bindet ($K_D = 200$ nM gegenüber $K_D = 200$ pM für EPO) und den Rezeptor aktiviert.^[319,320] Durch Röntgenstrukturanalyse des Peptid-Rezeptor-Komplexes^[321] konnte im Detail geklärt werden, wie zwei Moleküle des Peptids das EBP (EPO-bindendes Protein, die extrazelluläre Domäne von EPOR) dimerisieren (Abbildung 12 und 13).^[322] Der Komplex besteht aus einem Peptiddimer, das von zwei Molekülen EBP flankiert ist; es weist eine verblüffende Strukturhomologie mit dem Wachstumshormon- und dem Prolactinrezeptor auf.^[323,324] Interessanterweise haben Stammregionen der beiden EBP-Moleküle kaum Kontaktfläche (ca. 75 Å²), und das WSXWS-Motiv ist anders als erwartet weder an der Ligandenbindung beteiligt, noch befindet es sich an oder nahe

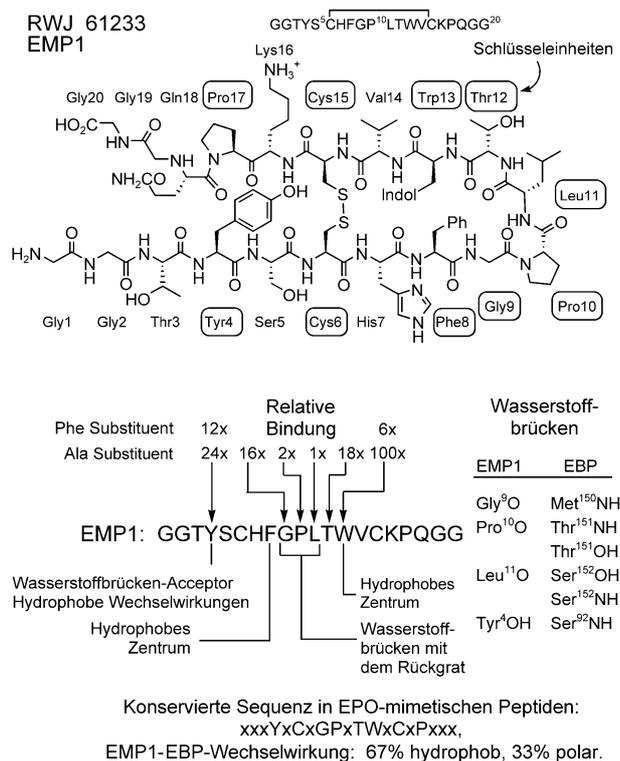


Abbildung 12. Struktur des EPO-mimetischen Peptids EMP1. Relative EPOR-Bindungsbeiträge und der Hauptkontaktstellen, die aus der Röntgenstrukturanalyse des Komplexes mit EBP (EPOR) abgeleitet wurden.

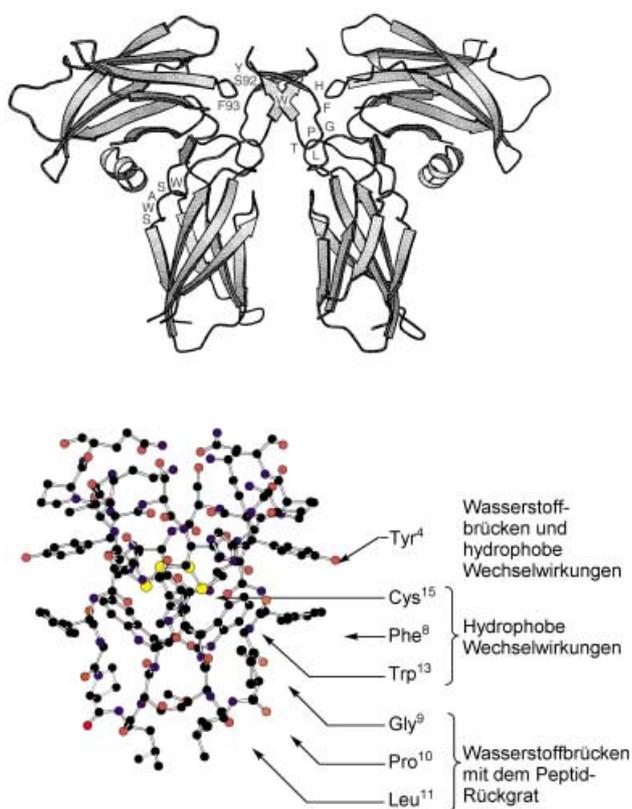


Abbildung 13. Oben: Struktur des EBP-EMP1-Komplexes. Unten: Bindung im EBP-EMP1-Komplex.

der Ligandenbindungsstelle oder der Dimerisierungs-Kontaktfläche. Mutationsstudien am Wachstumshormon und seinem Rezeptor^[325–328] ergaben, dass die intermolekulare Bindung hauptsächlich durch wenige Gruppen in der Kontaktfläche stabilisiert wird. In ähnlicher Weise bindet und dimerisiert auch das dimere Peptid die EBP-Moleküle nur über eine begrenzte Zahl von Kontakten. Weitere Informationen über die entscheidenden Kontaktstellen wurden durch Modifizierung des cyclischen Peptids gewonnen (Abbildung 12).^[319,320] Danach sollten auch relativ kleine Liganden als EPO-Agonisten fungieren können, obwohl das Dimer des cyclischen Peptids selbst groß ist. Die einzige Disulfidbrücke des cyclischen Peptids, Cys6-Cys15, verbindet zwei kurze β -Stränge (Aminosäuren 4–7 und 13–16), die durch eine β -Schleife vom Typ I (Gly9-Pro10-Leu11-Thr12) verbrückt sind.^[329]

Das Dimer des cyclischen Peptids bildet eine hydrophobe Klammer, die in die Kontaktfläche für die Rezeptordimerisierung gleitet und mit beiden Rezeptormolekülen wechselwirkt. Von zentraler Bedeutung für diese Bindung ist eine hydrophobe Kontaktfläche, Pro149–His153, deren Seitenketten Wasserstoffbrücken zum Rückgrat und den Seitenketten von Gly9–Thr12/Trp13 des Peptids bilden. Phe93 ist wichtig für die Dimerisierung des Rezeptors, da es mit Trp13 und Tyr4 wechselwirkt und die benachbarte Ser92/Tyr4-OH \cdots H-Wasserstoffbrücke ergänzt. In ähnlicher Weise überspannt Phe8 die Bindungsstellen von Leu33, Met150 und Phe205 und trägt damit wesentlich zur Stabilisierung des Dimer-Komplexes bei. Die Agonisten-Kandidaten wurden anhand dieser kritischen Wechselwirkungen aus unserer Bibliothek ausgewählt. Ohne detailliert die Modellierungen zu beschreiben, die in unsere erste Bibliothek eingingen, genügt die Feststellung, dass bereits hier effiziente EPOR-bindende Liganden gefunden wurden und die nachfolgende Suche noch bessere Liganden hervorbrachte.

Ausgehend von Bibliotheken, die aus *N*-Boc-Iminodiacet-anhydrid in drei- oder vierstufigen Flüssigphasen-Verfahren mit Reinigung durch Säure-Base-Extraktion hergestellt worden waren, konnten zahlreiche Bibliotheken mit etwa 100 000 Verbindungen aufgebaut und auf EPOR-Bindung getestet werden. Einige Komponenten hemmten die Bindung von ¹²⁵I-EPO an EPOR (IC₅₀ = 1–80 μ M). Diese EPO-Bindungs-Antagonisten wurden untereinander kovalent zu C₂-symmetrischen Dimeren verbunden, die zur Dimerisierung und Aktivierung des Rezeptors in der Lage sind. Mehrere der aktivsten Verbindungen waren hierbei schwache Agonisten und induzierten die konzentrationsabhängige Proliferation einer EPO-abhängigen Zelllinie (UT-7/EPO) mit charakteristischer, glockenförmiger Dosis-Wirkungs-Kurve, während sie auf eine ähnliche Zelllinie (FDC-P1), die EPOR1 nicht exprimiert, keine Wirkung hatten (Abbildung 11 und 14).^[82]

Bis heute sind erst drei Untersuchungen zu EPO-Agonisten veröffentlicht worden.^[82,319,330] Die Agonisten sind weniger wirksam als EMP1^[319] (IC₅₀ = 5–10 gegenüber 0.5 μ M). Sie sind jedoch wesentlich effizienter als ein neuer Agonist von Merck^[330] (15–20% gegenüber 4% der Aktivität von EPO), deutlich kleiner als EMP1 (*M_r* \approx 2100; aktive Form: Dimere, *M_r* \approx 4200) und der Merck-Agonist (*M_r* \approx 6400) und erheblich leichter herstellbar. Weil die Verbindungen am extrazellulä-

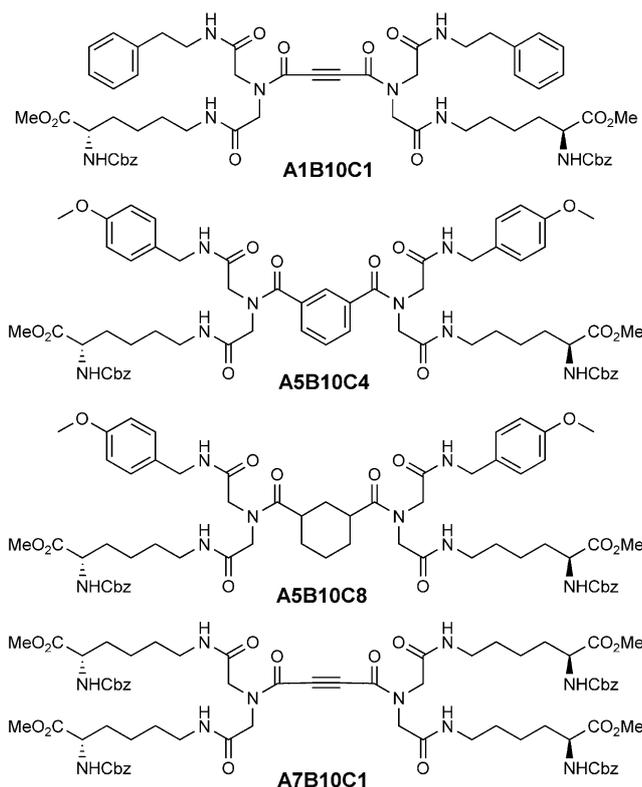
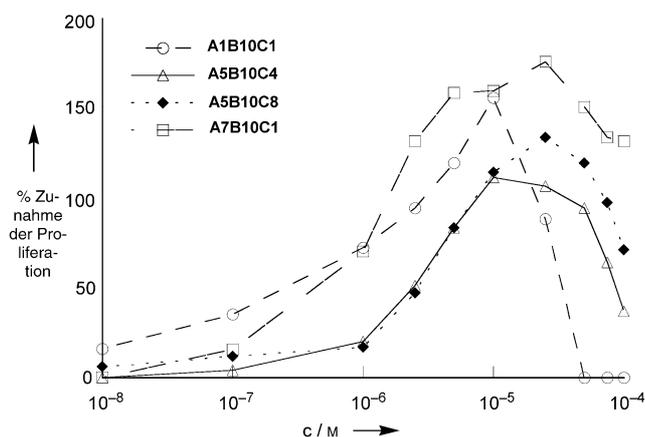


Abbildung 14. Dosis-Wirkungs-Kurven: Proliferationsaktivität einer EPO-abhängigen Zelllinie in Abhängigkeit von der Konzentration von EPO-Bindungs-Antagonisten **AxByCz**.

ren Teil angreifen, müssen sie nicht membrangängig sein; daher muss auch die relative Größe der Agonistenstruktur nicht in dem Maße berücksichtigt werden wie bei Agonisten für intrazelluläre Targets. Außerdem sollte die Amidbindung aus der existierenden Leitstruktur entferbar sein (Abbildung 14). Schließlich sollte sich mithilfe der Röntgenstrukturanalysen von Komplexen mit EBP auch die Größe des Agonisten verringern und die Affinität vergrößern lassen. Durch diese Ergebnisse ist man auch in der Lage, zusätzliche Elemente für Wechselwirkungen in die Leitstrukturen einzuführen und unproduktive Elemente zu entfernen. Auch der Entwurf einer starren, der EBP-gebundenen Konformation ähnlichen Struktur scheint möglich. Inzwischen ist auch sicher, dass einfache Dimerisierung des EPO-Rezeptors für

die Aktivierung nicht ausreicht.^[170,316,331–334] Die Dimerisierung oder Reorganisation der Konformation eines Zelloberflächen-Rezeptordimers muss die cytoplasmatischen Domänen des Rezeptors in enge Nachbarschaft zueinander bringen, damit die JAK-Kreuzphosphorylierung und die Initiierung der Signalkaskade ausgelöst werden können. Starre Varianten der Leitstrukturen, die nicht nur anstelle der Liganden binden und die Rezeptor-Dimerisierung stabilisieren, sondern auch effizienter eine aktive Konformation des Rezeptordimers induzieren, könnten helfen, aus einem partiellen einen vollwertigen Agonisten zu entwickeln.

5. Target Protein-DNA-Wechselwirkungen

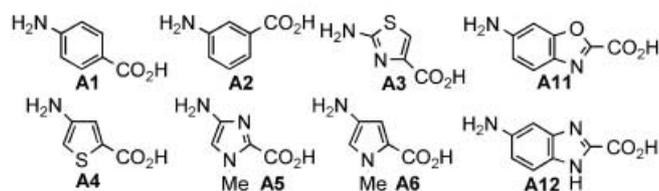
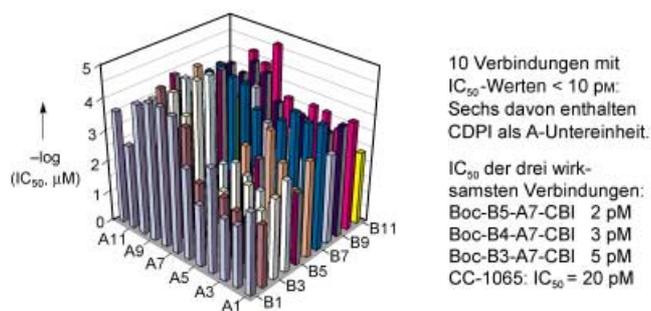
Auch Hochdurchsatz-Synthese und -Screening DNA-bindender Substanzen^[72,84–88] wurden durchgeführt, um die Eigenschaften dieser Verbindungen weiter aufzuklären.^[89–96] Unser Verfahren verbindet die Flüssigphasensynthese von Bibliotheken mit einer Methode, die wir für das schnelle Hochdurchsatz-Screening auf DNA-Affinität und Sequenzselektivität eingeführt haben.^[87,97,98] Die Strukturmerkmale, die für die Sequenzselektivität verantwortlich sind, können so schnell aufgeklärt werden, um neue Regeln für die DNA-Erkennung (neue Basenpaar(bp)-Codierungen) durch niedermolekulare Stoffe aufzustellen und um nach Komponenten zu suchen, die selektiv Konsensussequenzen für Transkriptionsfaktoren erkennen und abweichende Gentranskription kontrollieren können (z. B. LEF-1/β-Catenin, Androgenrezeptor).

Die Regulation der Genexpression beruht auf der sequenzspezifischen Erkennung von Nucleinsäuren durch Repressor-, Aktivator- und Verstärkerproteine; daher wird die selektive Kontrolle solcher Prozesse schon lange angestrebt. Niedermolekulare Verbindungen, die DNA selektiv binden und die Expression aktivieren (durch Blockade eines Repressors) oder inhibieren (durch Blockade eines Aktivators), haben ein großes therapeutisches Potenzial.^[335–356] Die Untersuchungen werden dadurch kompliziert, dass oft nicht eine einzelne Sequenz adressiert wird, sondern eine Gruppe verwandter Stellen, die die Konsensus-Bindungssequenz eines Kernrezeptors oder eines Transkriptionsfaktors bilden. Die Entdeckung von Wirkstoffen verläuft wegen der Komplexität der Wechselwirkung zwischen niedermolekularen Substanzen und DNA schleppend. Der iterative Prozess des Entwurfs und der Synthese einzelner Verbindungen, die gegen spezifische DNA-Sequenzen gerichtet sind, ist aufwändig, genauso wie die Analysemethoden, die zur Bestimmung der Bindungsaffinität gegenüber jeder Einzelsequenz, weniger zur Erfassung einer Gruppe verwandter Sequenzen geeignet sind.

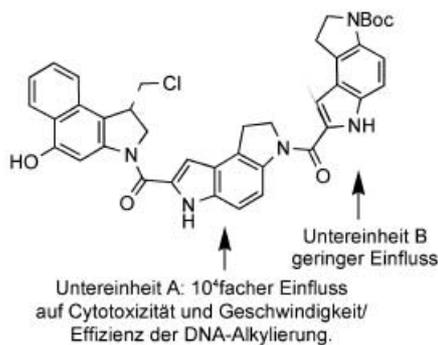
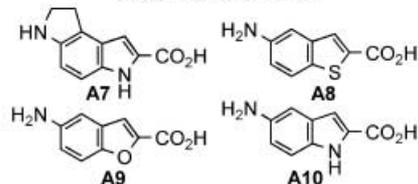
5.1. Flüssigphasen-Hochdurchsatz-Synthese von Bibliotheken DNA-bindender Substanzen

5.1.1. Distamycin – eine Bibliothek mit 2640 Analoga

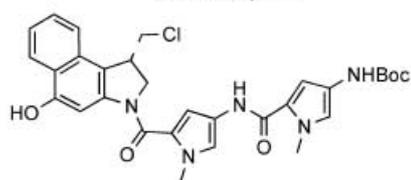
Eine schnelle Parallelsynthese von Distamycin-A-Analoga beruht auf einfacher Säure-Base-flüssig-flüssig-Extraktion zur Reinigung und Isolierung von Zwischen- und Endprodukten (Schema 8). Der Nutzen der Methode wurde



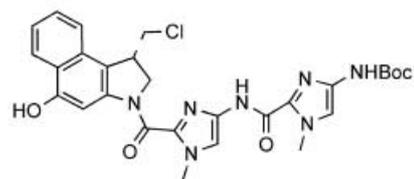
Beste A-Untereinheiten



37 L1210-IC₅₀ = 5 pM
rel. DNA-Alkyl. = 1



38 L1210-IC₅₀ = 1 nM
rel. DNA-Alkyl. < 0.001



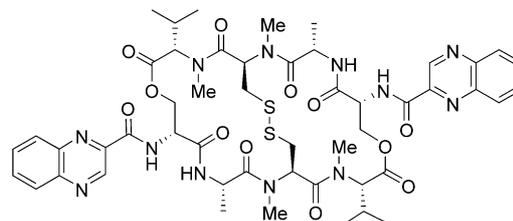
39 L1210-IC₅₀ > 10 nM
rel. DNA-Alkyl. < 0.0001

Abbildung 15. Cytotoxizität der CC-1065-Analoga gegen L1210-Zellen.

ten (Abbildung 15). Cytotoxische Wirkung und relative Effizienz der DNA-Alkylierung verlaufen parallel. Wir glauben, dass diese Trends auf zwei unterschiedlichen Beiträgen beruhen: 1) einer Steigerung der DNA-Bindungsselektivität und Affinität um das 10–100-fache in der monocyclischen Serie und 2) einer Katalyse der DNA-Alkylierungsreaktion mit einer 100–1000-fachen Aktivierung, die vermutlich auf den bi- und tricyclischen heteroaromatischen Untereinheiten zurückzuführen ist. Insgesamt ergibt sich eine mehr als 25000-fache Steigerung. Diese Beobachtungen haben nicht nur Bedeutung für den Entwurf künftiger CC-1065/Duocarmycin-Analoga, sondern auch für die Entwicklung von Hybridstrukturen mit der CC-1065/Duocarmycin-Alkylierungsuntereinheit. Duocarmycin-Distamycin-Hybride ohne bi- oder tricyclische A-Untereinheit sollten intrinsisch schlechte oder langsame DNA-Alkylierungsreagentien sein.

5.1.3. Flüssigphasensynthese von Triostin-A-Analoga

Einer Flüssigphasensynthese von Azatriostin A, einem Schlüsselanalogon des DNA-Bisintercalators Triostin A (Schema 11), folgend konnten Bibliotheken von Triostin-A-Analoga hergestellt werden.^[72] Diese Arbeit und die Bibliotheken mit Distamycin-A- und CC-1065-Analoga verdeutlichen, wie leicht durch Flüssigphasensynthese Naturstoffanaloga-Bibliotheken zugänglich sind, mit deren Hilfe die für den Angriff an der DNA entscheidenden Strukturelemente eines Naturstoffs schnell identifiziert und neue Therapeutika entwickelt werden können.



Schema 11. Triostin A, ein natürlicher DNA-Bisintercalator, der bevorzugt in der kleinen Furche der DNA bindet.

5.2. Der FID-Test: ein hochauflösender Hochdurchsatz-Test zur Bestimmung der DNA-Bindungsaffinität und -selektivität

Die meisten Methoden, die üblicherweise bei der Bestimmung der DNA-bindenden Eigenschaften niedermolekularer Substanzen^[357] angewandt werden, sind technisch aufwändig, erfordern vertiefte biochemische Kenntnisse und lassen sich nur mit viel Erfahrung reproduzierbar durchführen.^[358,359] Als wir begannen, gab es im Hochdurchsatz-Screening keine Möglichkeit, eine Bibliothek von Einzelverbindungen gegen Teile oder eine vollständige Bibliothek von DNA-Sequenzen zu testen. Am häufigsten werden Footprinting und Affinitätsspaltung angewandt; beide Methoden sind für die qualitative und quantitative Bestimmung der Selektivität oder Affinität der DNA-Bindung herangezogen worden. Mit diesen destruktiven Tests wird in einem 100–200 bp langen DNA-Segment die Stelle mit der höchsten Affinität identifiziert. Mäßig oder wenig affine Stellen werden hingegen nur selten gefunden. Folglich lässt sich mit diesen Methoden das

vollständige DNA-Bindungsprofil von Ligandenkandidaten nur schwer beurteilen oder vergleichen.

Mit dem nichtdestruktiven Fluoreszenz-Intercalator-Verdrängungstest (fluorescent intercalator displacement, FID) können diese Informationen einfach gewonnen werden. Der Test basiert auf der Verdrängung von Ethidiumbromid oder Thiazolorange aus Haarnadel-Desoxyoligonucleotiden (Abbildung 16).^[72,87] Die Proben-DNA-Sequenzen, ein Haarna-

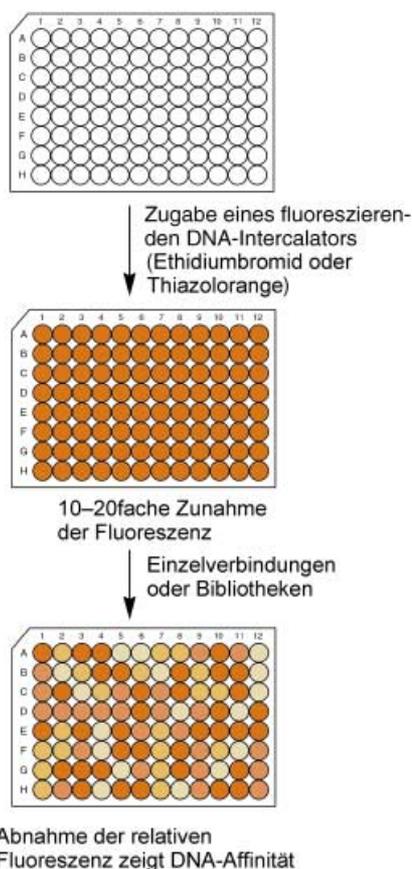


Abbildung 16. FID-Test: Die Methode eignet sich für das Screening einer Bibliothek auf Affinität gegen einen bestimmten DNA-Abschnitt oder zur Bestimmung der Sequenzselektivität einer DNA-bindenden Substanz.

del-Desoxyoligonucleotid mit der zu untersuchenden Sequenz oder Desoxyoligonucleotid-Bibliotheken mit allen 136 Haarnadelmotiven aus 4 Basenpaaren oder 512 Haarnadelmotiven aus 5 Basenpaaren, werden in Mikrotiterplatten verteilt und mit dem Intercalator behandelt, dessen Fluoreszenz durch die Bindung an DNA zunimmt.^[360] Bei Zugabe einer DNA-bindenden Substanz wird der Intercalator aus der Bindung verdrängt, und die Fluoreszenz nimmt ab. Diese Abnahme ist direkt mit dem Ausmaß der DNA-Bindung korreliert, sodass die relativen DNA-Bindungsaffinitäten bestimmt werden können. Mithilfe dieses Bindungsprofils können aus einer Verbindungs-Bibliothek die besten Liganden für eine Sequenz ermittelt werden. Umgekehrt kann man auch eine einzelne Verbindung gegen eine Bibliothek aller Haarnadel-DNA-Sequenzen testen, um so ein Selektivitätsprofil der DNA-Bindung zu erstellen.

5.2.1. Test von Verbindungsbibliotheken gegen eine Zielsequenz: Inhibitoren der Androgenrezeptor-vermittelten Gentranskription

Der FID-Test ermöglicht das schnelle Screening einer Verbindungsbibliothek gegen eine Zielsequenz oder eine Gruppe von Sequenzen. So wurden wirksame und selektive Inhibitoren der Androgenrezeptor-vermittelten Gentranskription entdeckt (Abbildung 17). Hormonunabhängige, kon-

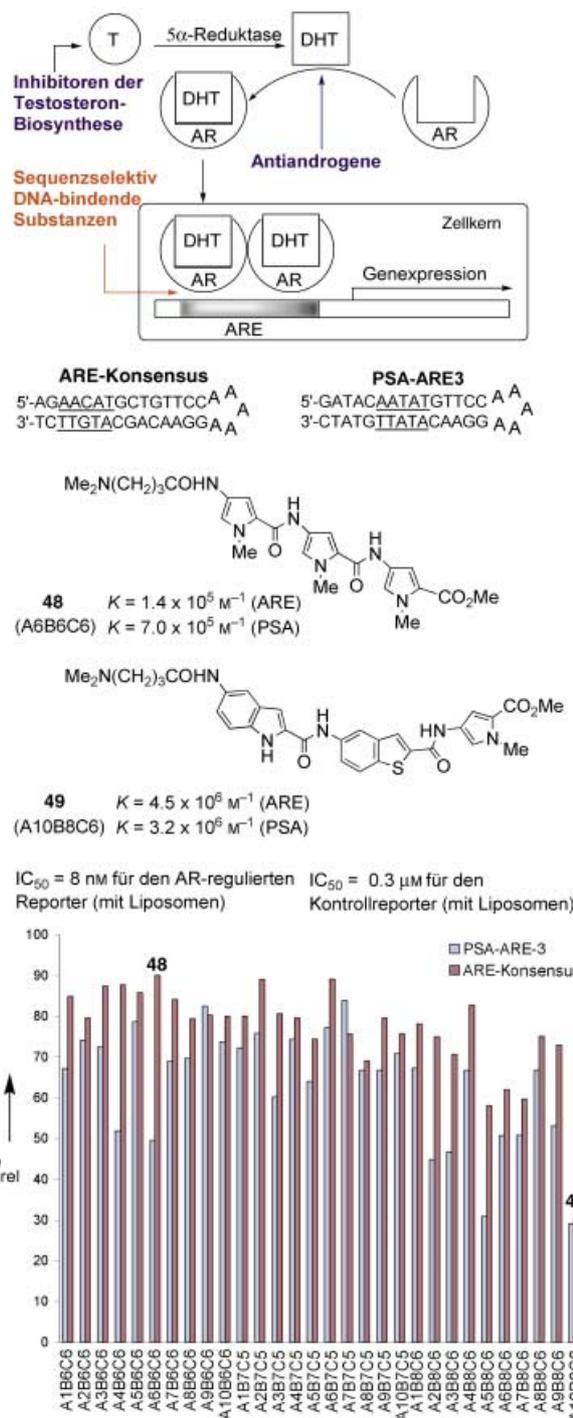


Abbildung 17. FID-Test: Screening auf Inhibitoren der Androgenrezeptor(AR)-vermittelten Gentranskription durch Evaluierung der Affinität zur PSA-ARE3-Sequenz und zur ARE-Konsensussequenz.

stitutiv aktive Androgenrezeptor-Dimere, die nicht auf eine kompetitive Antagonistenbehandlung reagieren, führen bei Prostatakrebs zu einem Rückfall, der chemotherapeutisch nicht behandelt werden kann. Eine erfolgversprechende Behandlung könnte mit einem DNA-bindenden Wirkstoff gelingen, der selektiv an die ARE-Konsensussequenzen des Androgen-Response-Elements (ARE) bindet. Ein solcher Wirkstoff würde die DNA-Bindung des konstitutiv aktiven Androgenrezeptors kompetitiv hemmen, sodass es nicht zu einer Transkriptionsaktivierung kommt.

Wir untersuchten mit dem FID-Test zwei Haarnadel-Desoxyoligonucleotide mit zwei verwandten Sequenzen von ARE: der ARE-Konsensussequenz (14 bp) und der PSA-ARE-3-Sequenz. Letztere enthält eine 5 bp lange AT-reiche Sequenz, an die vermutlich Distamycin-ähnliche Strukturen binden können, während erstere eine ähnliche Sequenz enthält, die allerdings durch ein GC-Basengpaar unterbrochen ist. Beim Screening unserer Bibliothek konnten wir mehrere Kandidaten identifizieren, die an die AT-reiche Region der PSA-ARE-3-Sequenz binden. Ein Analogon (**49**, Abbildung 17) zeigte auch gegenüber der ARE-Konsensussequenz eine hohe Affinität. **49** erscheint daher geeignet als Inhibitor der durch hormoninsensitive Androgenrezeptor-Dimerisierung und DNA-Bindung eingeleiteten Gentranskription.^[87] In einem zellulären Reporter-test bewirkte **49** eine starke ($IC_{50} = 8 \text{ nm}$) und selektive (ca. 40-fach) Inhibition der Androgenrezeptor-vermittelten Gentranskription. Für die Penetration in die Zelle, die zur Entfaltung von Aktivität erforderlich ist, muss die Verbindung allerdings in Liposomen verpackt werden.

5.2.2. Hochauflösende Bestimmung der Sequenzselektivität

Dieser FID-Test ist besonders aussagekräftig zur Bestimmung der vollständigen Sequenzselektivität einer DNA-bindenden Substanz. Dabei wird die Abnahme der Fluoreszenz durch Verdrängung von Ethidiumbromid aus Desoxyoligonucleotiden mit allen Haarnadelkonformationen aus vier oder fünf Basenpaaren (136 bzw. 512 Haarnadelschleifen) bestimmt (Abbildung 18). In manchen Fällen kann die Änderung der Fluoreszenz für die DNA-bindende Komponente selbst verfolgt werden. Auch mäßig oder nicht bindende Sequenzen werden gefunden, die mit anderen Methoden wie Footprinting nicht erkannt werden. Die so gewonnenen Bindungsprofile helfen bei der Identifizierung möglicher Liganden für die Konsensussequenzen von Transkriptionsfaktoren. Die Anwendbarkeit der Methode wurde durch einen Vergleich der DNA-Bindung von Distamycin A, Netropsin, DAPI, Hoechst 33258 und Berenil überprüft.^[97] Der Satz aus 512 DNA-Haarnadelschleifen kostet ca. 100 \$ (Ethidiumbromid) oder weniger (die Hälfte bis ein Viertel mit Thiazolorange).^[98] Die Methode ist nicht destruktiv: Die DNA kann auf Chips, Harz oder Glasplättchen immobilisiert werden und steht nach Waschen für weitere Tests zur Verfügung. Durch Immobilisierung und Wiederverwendung könnten Bibliotheken mit längeren Sequenzen (> 5 bp) untersucht werden, sodass die Methode auch auf Sequenzen angewandt werden könnte, deren Größe für Bindungsstellen von Proteinen typisch ist.

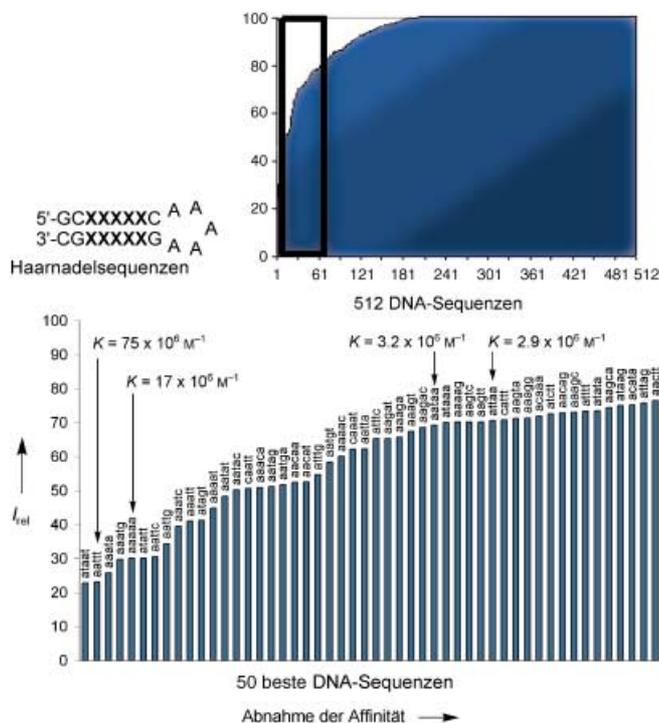


Abbildung 18. FID-Test: Bestimmung der Sequenzselektivität von Distamycin A. Die relative Affinität zu einer DNA-Sequenz ist proportional zur Abnahme der Fluoreszenz. Im Beispiel steigt die Affinität mit zunehmendem AT-Gehalt der DNA-Sequenz. Auch absolute Bindungskonstanten können auf diese Weise erhalten werden. Unten: Ausschnitt mit den 50 DNA-Sequenzen, die am besten binden.

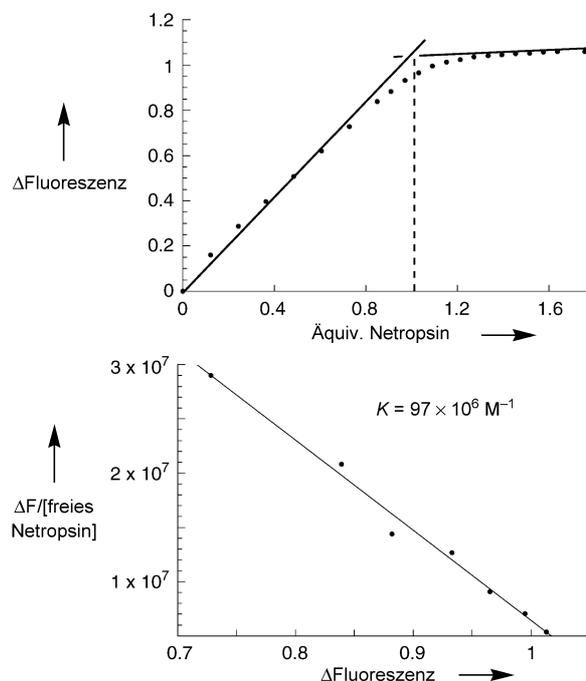


Abbildung 19. Oben: Titration von Netropsin gegen die Haarnadelsequenz 5'-AATTT-3' (Konzentration: $1.1 \mu\text{M} \hat{=} 8.8 \mu\text{M/bp}$). Der Schnittpunkt der Linien bei 1.05 Äquivalenten Netropsin zeigt 1:1-Bindung an. Unten: Scatchard-Plot (Steigung = $-K$).

5.2.3. Scatchard-Analyse von Titrationskurven: absolute Bindungskonstanten und die Bindungsstöchiometrie

Mit dem FID-Test gelingt auch die Bestimmung von Bindungskonstanten für jede beliebige Sequenz durch quantitative Titration. Die verlässlichsten Ergebnisse lieferte eine Scatchard-Analyse der Titrationsbindungskurve, aus der auch die Stöchiometrie des Adduktes hervorgeht (Abbildung 19).^[97] Direkt gemessene Bindungskonstanten fluoreszierender DNA-bindenden Reagentien (DAPI, Hoechst 33258) sind gut vergleichbar mit solchen, die indirekt durch Verdrängung von Ethidiumbromid und Thiazolorange bestimmt wurden (Tabelle 5). Um die Aussagekraft der

Tabelle 5: Bindungskonstanten von DAPI und Hoechst 33258.

A. Ethidiumbromid- und Thiazolorange					
Haarnadelsequenz	$K_{EB} [\times 10^6 \text{ M}^{-1}]^{[a]}$		$K_{TO} [\times 10^6 \text{ M}^{-1}]^{[a]}$		
5'-AAAAA-3'	0.27	(4.5) ^[b]	1.2	(3.5) ^[b]	
5'-AATTT-3'	0.42	(3.6)	1.3	(3.3)	
5'-ATTAA-3'	0.87	(3.3)	1.0	(3.3)	
5'-AATAA-3'	0.73	(3.3)	1.1	(3.3)	
B. DAPI					
DNA-Sequenz	$K [\times 10^6 \text{ M}^{-1}]^{[c]}$		$K [\times 10^6 \text{ M}^{-1}]^{[d]}$		$K [\times 10^6 \text{ M}^{-1}]^{[e]}$
5'-AATTT-3'	58	(0.91)	110	(0.94)	120 (1.1)
5'-AATAA-3'	26	(0.83)	59	(0.98)	87 (0.94)
5'-ATTAA-3'	24	(0.83)	52	(0.88)	77 (1.0)
5'-AAAAA-3'	n.b. ^[f]	n.b. ^[f]	50	(0.95)	65 (0.99)
C. Hoechst 33258					
DNA-Sequenz	$K [\times 10^6 \text{ M}^{-1}]^{[c]}$		$K [\times 10^6 \text{ M}^{-1}]^{[d]}$		$K [\times 10^6 \text{ M}^{-1}]^{[e]}$
5'-AATTT-3'	75	(0.90)	88	(0.96)	177 (0.98)
5'-AAAAA-3'	36	(0.86)	72	(0.98)	145 (0.92)
5'-AATAA-3'	28	(0.77)	34	(1.06)	83 (1.01)
5'-ATTAA-3'	13	(0.89)	19	(0.91)	47 (1.05)

[a] Für Haarnadel-Desoxyoligonucleotide mit der angegebenen Sequenz; Bestimmung durch direkte Titration. [b] Experimentell bestimmte Stöchiometrie. [c] Thiazolorange-Verdrängung (experimentelle Bestimmung der Stöchiometrie). [d] Ethidiumbromid-Verdrängung (experimentelle Bestimmung der Stöchiometrie). [e] Direkte Fluoreszenz-Titration (experimentelle Bestimmung der Stöchiometrie). [f] n.b.: nicht bestimmt.

Methode zu belegen, wurden die absoluten Bindungskonstanten von Netropsin für alle AT-Sequenzen mit vier Basenpaare bestimmt und damit die relative und absolute Selektivität vollständig erfasst (Tabelle 6).^[98]

5.2.4. Schnelle Charakterisierung von DNA-Bindungsarten

FID-Tests können verschiedene Bindungsarten und Größen der Bindungsstelle identifizieren und zwischen ihnen unterscheiden. Dies ermöglichte die erste Charakterisierung eines neuen substituierten β -Alanin-Haarnadelpolyamids und der kooperativen 2:1-parallelen bzw. antiparallelen Bindung von Pyrrolpolyamiden auf der Basis eines Iminodiacetat-Templats. Polyamide aus *N*-Methylpyrrol und *N*-Methylimidazol sowie eine zunehmende Zahl von Strukturanaloga binden in der kleinen Furche der DNA mit vor-

Tabelle 6: Vergleich der Bindungskonstanten.

Titrant	DNA-Sequenz	$K [\times 10^6 \text{ M}^{-1}]$	Bindungsstöchiometrie
Ethidiumbromid	5'-AATT	2.7	2.92
Thiazolorange	5'-AATT	15	3.05
Titrant	DNA-Sequenz	Ethidiumbromid $K [\times 10^6 \text{ M}^{-1}]$	Thiazolorange $K [\times 10^6 \text{ M}^{-1}]$
Netropsin	5'-AAAT	127	113
	5'-AAAA	92	71
	5'-AATT	65	54
	5'-AATA	64	44
	5'-ATTA	45	35
	5'-ATAT	41	33
	5'-ATAA	34	18
	5'-TAAA	26	15
	5'-TTAA	11	8
	5'-TATA	11	8

hersagbarer Sequenzselektivität und hoher Affinität.^[350,361–363] Durch Kopf-Schwanz-Verknüpfung solcher Polyamide mit dem fünfatomigen Linker γ -Aminobuttersäure (γ) erhält man Haarnadelpolyamide, die sich bei ihrer 2:1-antiparallelen Bindung wie nicht miteinander verbundene Polyamide verhalten (Abbildung 20); gleichzeitig steigt bei verbesserter Selektivität die Affinität um das 100–10000fache.^[364] Im Unterschied dazu binden Polyamide mit um ein Kohlenstoffatom kürzerem β -Alanin-Linker (β) bevorzugt in gestreckter

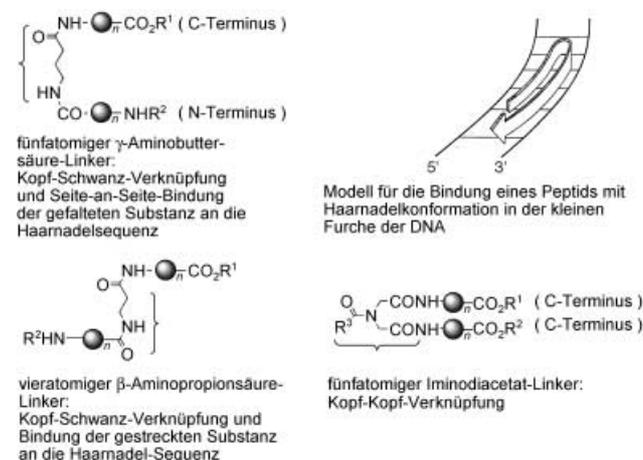
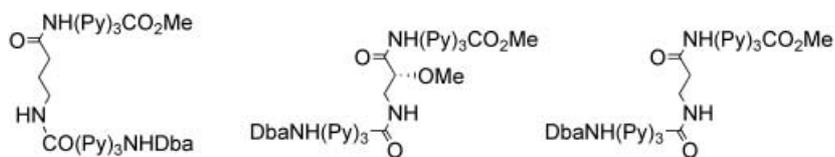


Abbildung 20. Polyamide für die Bindung an DNA.

Konformation und bilden 1:1- oder antiparallele 2:1-Komplexe.^[364,365] In einem FID-Test mit DNA-Haarnadelmotiven, die systematisch variierte AT-reiche Bindestellen enthalten, können die Stöchiometrie (1:1 oder 2:1) und der Bindungsmodus (Haarnadel oder gestreckt) der Komplexe mit von Distamycin abgeleiteten Polyamiden schnell und einfach bestimmt werden (Abbildung 20).^[83,84] Auf diesem Wege wurde ein substituiertes β -Alanin-Linker gefunden, der anstelle der gestreckten Konformation eine Haarnadelkonformation induzierte und somit eine Alternative zum γ -

Systematische Verlängerung der AT-reichen Bindungssequenz



γ -Haarnadel-Konformation verknüpfte antiparallele Seite-an-Seite-Bindung
1:1-Stöchiometrie
5–6 bp lange Bindungssequenz

β -Haarnadel- oder β -gestreckte Konformation,
2:1-antiparallele Seite-an-Seite-Bindung
5–6 oder \geq 8–9 bp lange Bindungssequenz

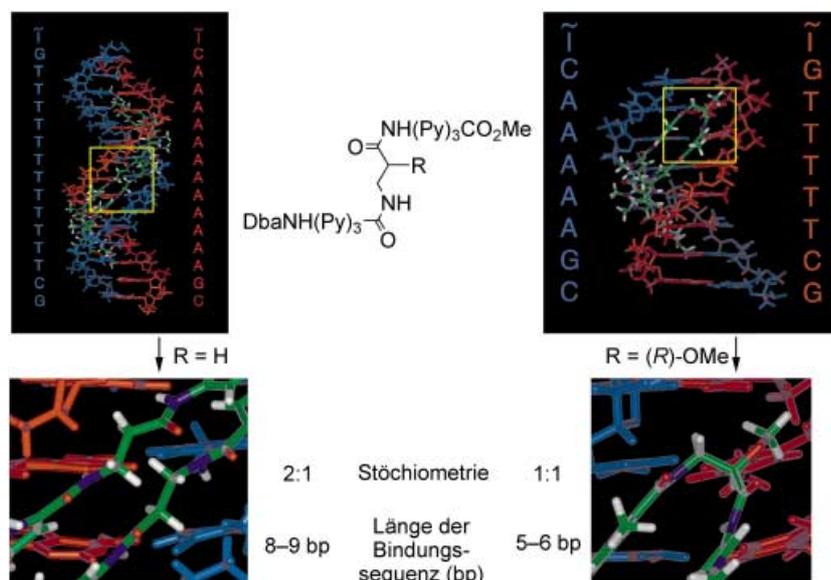
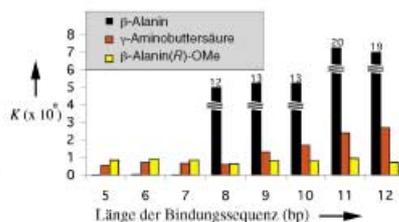
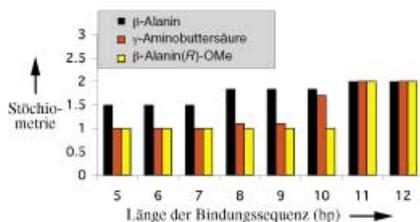


Abbildung 21. Bindung zwischen einer Haarnadelsequenz und einem substituierten β -Alanin-gebundenen Polyamid. Unten links: β -Alanin: gestreckte antiparallele 2:1-Seite-an-Seite-Bindung. Unten rechts: $\beta^{(R)\text{-OMe}}$ -Alanin: antiparallele 1:1-Seite-an-Seite-Bindung an die Haarnadelsequenz.

Linker bildet (Abbildung 21).^[83,84] Die Polyamidanaloga für die Untersuchung wurden mit einem parallelen Flüssigphasen-Syntheseverfahren in einer Reihe EDCI-vermittelter Kupplungsreaktionen hergestellt (Schema 12).

Eine nahe liegende Erweiterung bestand in der Untersuchungen des Verhaltens von Kopf-Kopf-Iminodiacetat-(IDA)-verknüpften Polyamiden. Das IDA-Templat (siehe Abschnitt 3) wurde gewählt, weil der fünfatomige Linker am zentralen Stickstoffatom zusätzlich funktionalisierbar ist. Kopf-Kopf-verknüpfte Produkte sind ungewöhnlich, da bei Polyamiden üblicherweise Kopf-Schwanz-Verknüpfung vor-

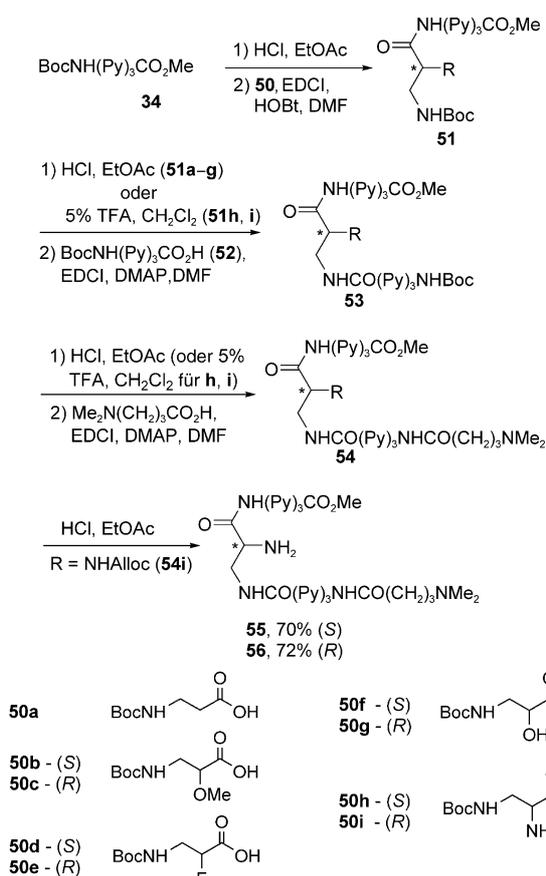
liegt. Die IDA-verknüpften Pyrrolpolyamide wurden durch Flüssigphasensynthese hergestellt (Schema 13). Sie binden in der ungewöhnlichen gestreckter Konformation über eine Länge von 9–10 bp kooperativ in einem 2:1-Modus. Dies ist das wohl erste gut dokumentierte Beispiel für eine parallele Bindung derartiger Polyamide (Abbildung 22).^[84]

5.3. LEF-1/ β -Catenin

Eine zweite Klasse von Inhibitoren der LEF-1- β -Catenin-vermittelten Gentranskription (Abschnitt 4.4) wurde aus den Bibliotheken mit Liganden für die kleine Furche der DNA abgeleitet.^[87] Abbildung 23 zeigt die Ergebnisse des Screenings einer solchen Bibliothek. Die beiden eng verwandten Leitstrukturen **69** und **70** hemmen die TOPFLASH-Transkription um 90%, weisen eine \geq 3fache TOPFLASH-FOPFLASH-Selektivität auf, hemmen die DNA-Bindung von LEF-1 im Gel-Shift-Experiment und die β -Catenin-induzierte Transformation der Dickdarmkrebs-Zelllinie SW480. Auch die Selektivität der DNA-Bindung wurde mit unserem FID-Test bestimmt.^[87] Nach einem Polyamid von Dervan et al.^[366,367] ist dies erst das zweite Beispiel eines niedermolekularen Inhibitors der LEF-1-DNA-Bindung (einer Protein-DNA-Wechselwirkung), der eine Inhibition der Gentranskription verursacht.

6. Naturstoff-Bibliotheken

Oft erweisen sich Naturstoff-Leitstrukturen als vorzügliche Ausgangspunkte für die Entwicklung von Wirkstoffen gegen bestehende oder neue Targets. In vielen Übersichtsartikeln und Monographien^[368] sind Erfolge beschrieben worden, die auf die Entdeckung solcher Leitstrukturen beruhen. Diese Erfolge können verschiedenen Faktoren zugeschrieben werden: Am wichtigsten ist, dass Naturstoffe aus einer biologischen Umgebung stammen und dadurch bereits über viele Eigenschaften eines Wirkstoffs verfügen. Zweifelsohne ist es die Integration vieler Funktionen in einer einzigen kompakten Struktur, die Leitstrukturen aus Naturstoffen von solchen unterscheidet, die synthetisch erzeugt werden. Da die Erforschung der Eigenschaften komplexer Naturstoffe dank der Fortschritte bei Screening und Bewertung immer weiter verfeinert wird und Strukturdaten der Wechselwirkungen mit dem biologischen Target immer leichter zugänglich werden, sind Bedeutung

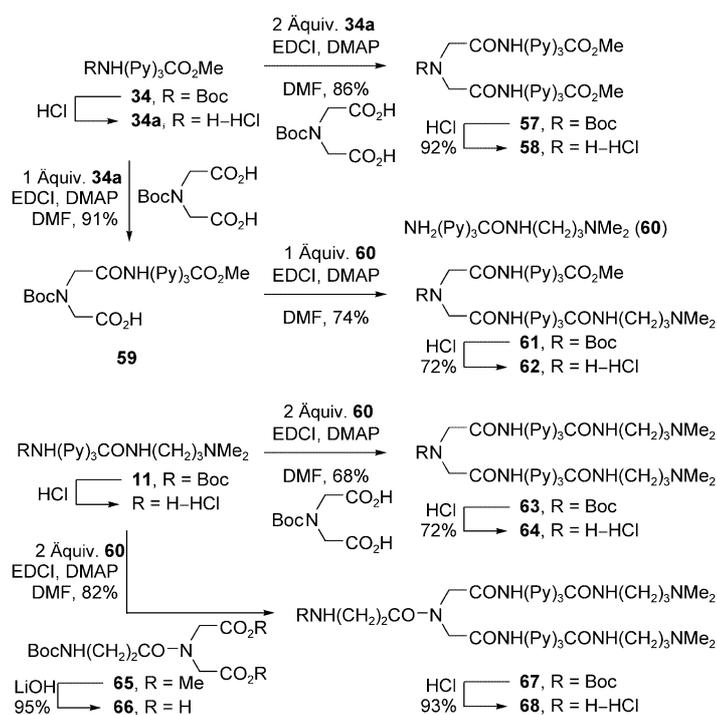


Schema 12. Die Parallelsynthese β -Alanin-verknüpfter Pyrrolpolyamide. Py = *N*-Methylpyrrol, Im = *N*-Methylimidazol, HOBT = 1-Hydroxybenzotriazol, TFA = Trifluoressigsäure, Alloc = Allyloxycarbonyl.

und Chancen von maßgeschneiderten Lösungen für komplexe biologische Fragestellungen gewachsen.

Eine wichtige Ergänzung zur Untersuchung der Naturstoffe selbst und ihrer Derivate ist die Synthese und Charakterisierung von entscheidenden Teilstrukturen und von Verbindungen mit grundlegenden strukturellen Modifikationen. Sind solche Modifikationen gut konzipiert, so kann damit die strukturelle Grundlage der Wechselwirkung zwischen Naturstoff und biologischem Target aufgeklärt werden, was zum Verständnis der fundamentalen Beziehung zwischen Struktur, Reaktivität und weiteren Eigenschaften führt. Die Herausforderung bei diesen Untersuchungen liegt im Verständnis der eleganten Lösungen und subtilen Strukturelemente, mit denen die Natur einen Naturstoff ausgestattet hat. Mit diesem Wissen können die Strukturelemente durch rationales Design so weiterentwickelt werden, dass selektivere, effizientere oder wirksamere Reagentien entstehen, die speziell auf ein Problem oder ein Target zugeschnitten sind.

Noch heute leiten sich neun der zwanzig umsatzstärksten Wirkstoffe (1999 zusammen mehr als 16 Milliarden \$) von Naturstoffen ab.^[407] Folglich gehören Naturstoffe zu den erfolgreichsten Quellen in der modernen Wirkstoffsuche und es ist nicht überraschend, dass kombinatorische Methoden entwickelt wurden, um solche Leitstrukturen zu nutzen



Schema 13. Synthese von Pyrrolpolyamiden mit verbrückendem IDA-Templat.

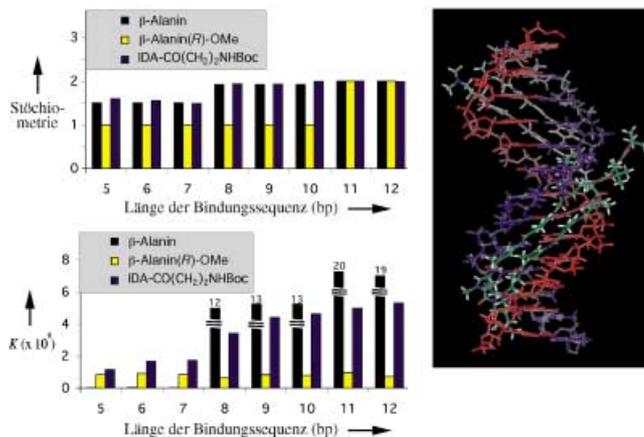
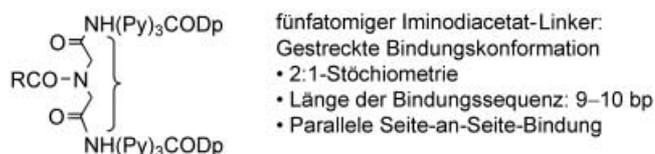


Abbildung 22. Gestreckte 2:1-parallele Bindung IDA-gebundener Polyamiden. R = $(\text{CH}_2)_2\text{NHBoc}$ liefert das beste Ergebnis.

(Tabelle 7).^[369–407] Wir konnten unsere Flüssigphasenmethode erfolgreich bei der Synthese von Bibliotheken ausgewählter Naturstoffe einsetzen. Auf diese Weise stellten wir 2640 Distamycin-Analoga (Abschnitt 5.1.1), 132 CC-1065 und Duocarmycin-Analoga (Abschnitt 5.1.2) sowie ein Muster-Analogon von Triostin A (Abschnitt 5.1.3) her; außerdem bauten wir eine Bibliothek von HUN-7293-Analoga auf, mit

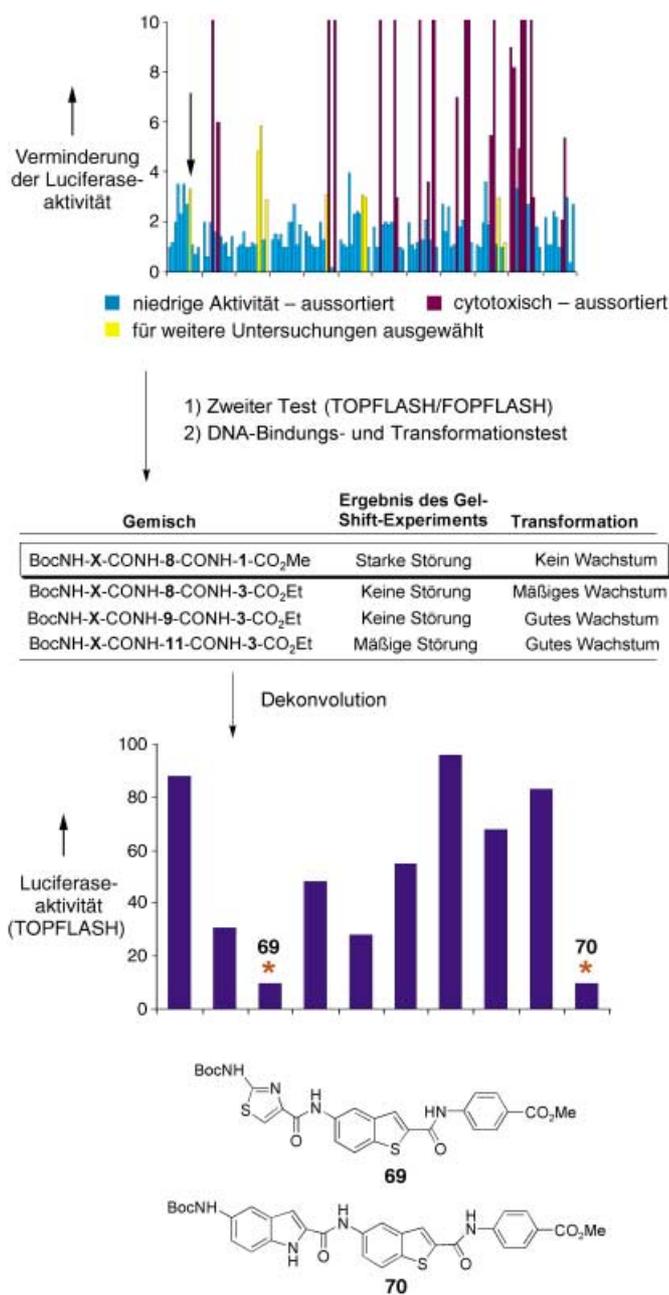


Abbildung 23. Unterbrechung der LEF-1-DNA-Bindung und Hemmung der LEF-1-β-Catenin-vermittelten Gentranskription. Die Leitstrukturen **69** und **70** verfügen über zehnfache Transkriptionsrepression (TOPFLASH) und dreifache Selektivität (TOPFLASH/FOPFLASH).

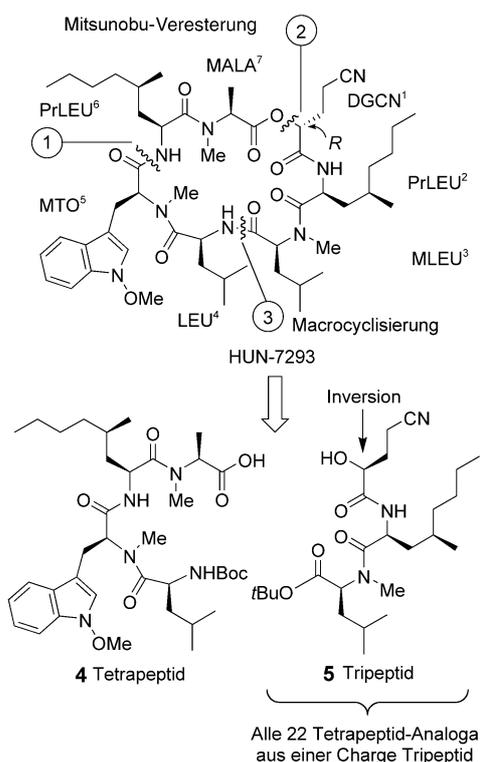
der wir alle Strukturdetails des Naturstoffs erforschten. Obwohl das biologische Target dieses Naturstoffs noch nicht bekannt ist, konnte das Pharmakophor des Naturstoffs durch ein Funktionsscreening und eine Bibliothek von Analoga identifiziert werden.

Tabelle 7: Naturstoff-Bibliotheken.

Naturstoff	Bibliotheksformat	Größe	Lit.
Lavendustin A	Festphase	61	[370]
Balanol	Festphase	32	[371]
Olomoucine	Flüssig- und Festphase	364	[372]
Rauwolfia-Alkaloide	Festphase	792	[373]
Epothilon	Festphase	180	[374]
Prostaglandin E ₂ und F _{2α}	Flüssigphase, polymergebunden	2/16/6	[375]
Taxoide	Festphase	400	[376]
Oscillamid Y	Festphase	4	[377]
(S)-Zearalenon	Festphase	1	[378]
Cycloserin	Festphase	80	[379]
Flavone	Flüssigphase	36	[380]
Muscon	Festphase	12	[381]
Sarcodictyin	Flüssigphase	15/53	[382]
Taxoide	Flüssigphase	26	[383]
Prostaglandin E und F	Festphase	26	[384]
Fumitremorgin C	Festphase	42	[385]
Indolactam V	Festphase	31	[386]
Vitamin D ₃	Festphase	1	[387]
Kramerixin		120	[388]
Vancomycin	Flüssig- und Festphase	39 304	[389]
HUN-7293	Flüssigphase	1/40	[75, 76]
Carpanon	Festphase	6	[390]
Distamycin A	Flüssigphase	2640	[87]
Distamycin A	Positionsscanning	1000	[86]
Triostin A	Flüssigphase	1	[72]
Fumichinazolin	Festphase	27	[391]
Benzopyran	Flüssig- und Festphase	> 10000	[392]
Steroide	Festphase	20	[393]
Curacin A	Flüssigphase	18	[394]
Stipiamid	Flüssigphase	42	[395]
CC-1065	Flüssigphase	132	[88]
Galanthamin	Festphase	2527	[397]
Mappicin	Flüssigphase	112/560	[396]
Tambjamine	Flüssigphase	10	[398]
Vitamin D ₃	Festphase	72	[399]
Vitamin D ₃	Flüssig- und Festphase	5	[400]
Psammaphin A	Flüssigphase	3828	[401]
Hapalysin	Flüssig- und Festphase	6	[402]
Nakijichinone	Flüssigphase	56	[403]
Steroide	Flüssigphase	298	[404]
Ceramide	Festphase	528	[405]
Dysidolid	Festphase	8	[406]
Naturstoff-ähnliche	–	–	[369]

6.1. HUN-7293: ein chemisches „Mutagenese-Verfahren“ zur Bestimmung von Struktur-Wirkungs-Beziehungen

Das natürliche cyclische Heptadepsipeptid HUN-7293 (Schema 14) wurde erstmals 1992 bei der Suche nach Inhibitoren der Expression induzierbarer Zelladhäsionsmoleküle aus einer Pilzfermentationsbrühe isoliert,^[408] seine Struktur wurde durch ¹H-NMR-Spektroskopie bestimmt und durch Röntgenstrukturanalyse bestätigt.^[408] Die gleiche Verbindung wurde unabhängig davon aus einer anderen Pilzart bei einem Test auf Anti-HIV-Wirkstoffe isoliert.^[409] Endo-

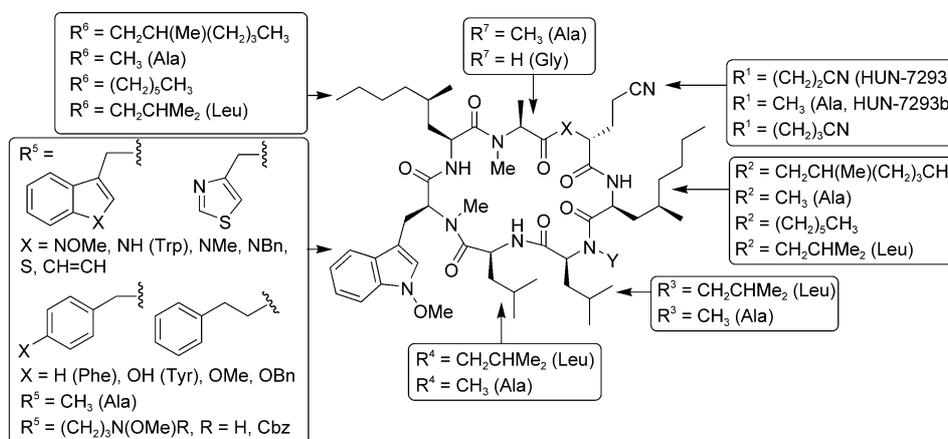


Schema 14. Parallelsynthese einer HUN-7293-Analoga-Bibliothek: Kombination einer konvergenten Totalsynthese mit einer divergenten Bibliothekssynthese. ①–③ sind Verknüpfungsstellen der Synthesestrategie.

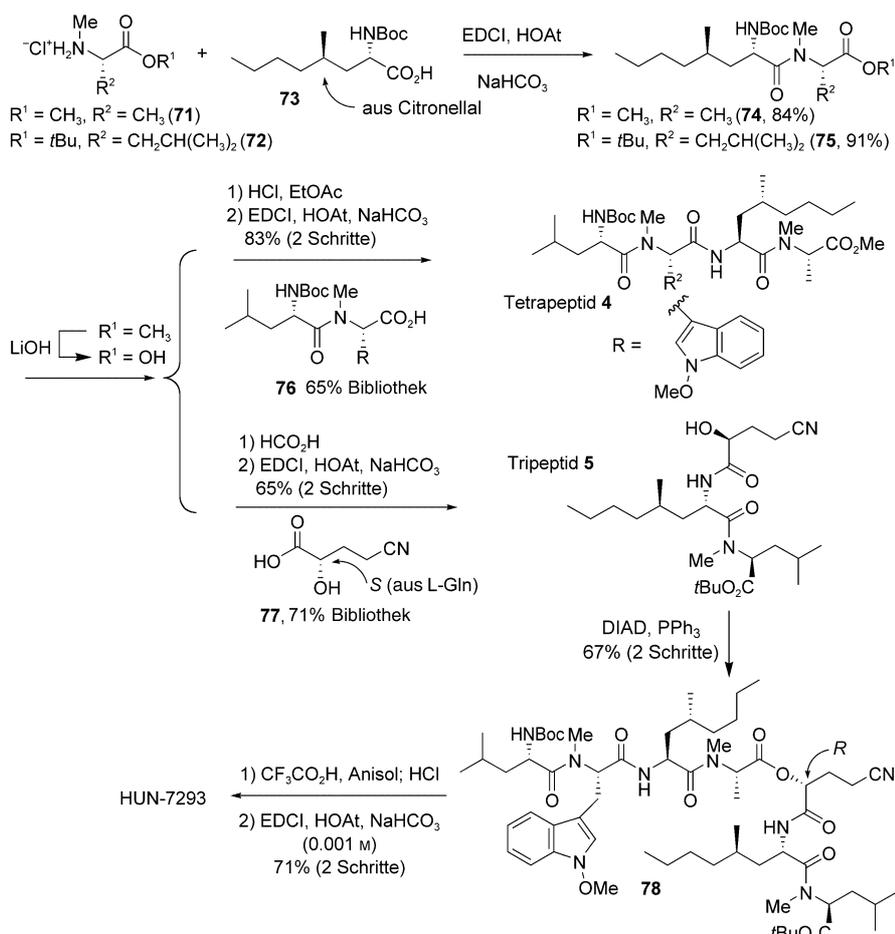
thelialzellen-gebundene Moleküle, darunter das Interzelluläre Adhäsionsmolekül 1 (ICAM-1), das Vaskuläre Zelladhäsionsmolekül 1 (VCAM-1) und E-Selektin spielen eine wichtige Rolle bei der Immunantwort, indem sie die Leukocyten-Migration steuern und Zell-Zell-Wechselwirkungen am Entzündungsherd regulieren. Eine Modulation dieser Wechselwirkungen durch die Hemmung der Expression von Zelladhäsionsmolekülen sollte sich bei der Behandlung einiger chronischer Entzündungen und Autoimmun-Erkrankungen als nützlich erweisen.

Wie in neueren Untersuchungen beschrieben,^[410] wirken verschiedene Signale auf Endothelialzellen und aktivieren Teile des Zellkernfaktors der Transkriptionsfaktor-Familie NF- κ B. Diese cytoplasmatischen homo- oder heterodimeren Proteine werden durch Komplexbildung mit Elementen einer Familie von Inhibitorproteinen, I κ B, inaktiviert. Durch Phosphorylierung von I κ B entsteht das aktive NF- κ B, das dann in den Kern transportiert wird und die Transkription seiner Zielgene einschließlich der Zelladhäsionsmoleküle initiiert. Nur wenige Arbeitsgruppen haben Untersuchungen zu niedermolekularen Hemmstoffen der Expression von Zelladhäsionsmolekülen beschrieben,^[413–415] die nicht auf Antisense-^[411] und Antikörperansätzen^[412] beruhen; mit Ausnahme von HUN-7293 sind alle Strategien gegen den NF- κ B-Signaltransduktionsweg gerichtet.

Die erste Totalsynthese von HUN-7293 erfolgte nach einem konvergenten Ansatz. Hierbei wurden einige wesentliche Reaktionsschritte eingeführt wie eine Mitsunobu-Veresterung im Rückgrat der Verbindung und der effiziente Ringschluss des Makrocyclus an der MLEU³-LEU⁴-Position (Schema 14).^[74] Die konvergente Parallelsynthese einer Bibliothek von HUN-7293-Schlüsselanaloga ermöglichte die detaillierte Aufklärung der Struktur-Wirkungs-Beziehung dieses Naturstoffs (Schema 15).^[75, 76] Die Bibliothek wurde zeitgleich in Flüssigphase synthetisiert, Zwischen- und Endprodukte wurden durch Säure-Base-flüssig-flüssig-Extraktion isoliert und gereinigt (Schema 16). Auch bei der vielstufigen Synthese von HUN-7293 und der anspruchsvollen Strukturen seiner Analoga gelang es auf diese Weise, jedes Zwischen- und Endprodukt in ausreichender Reinheit zu erhalten. In den Verbindungen der Bibliothek wurden alle sieben Aminosauren einzeln durch Alanin ersetzt, die drei *N*-Methylgruppen entfernt und grundlegende Vereinfachungen in den Seitenketten der nichtproteinogenen Aminosäuren vorgenommen. So konnten Schlüsselsubstituenten und strukturelle Charakteristika identifiziert werden, die zu den biologischen Eigenschaften von HUN-7293 beitragen. Die Verwendung vereinfachter Analoga der nichtproteinogenen Aminosäuren gestattete über die Identifizierung essentieller Strukturele-



Schema 15. Aufbau einer HUN-7293-Pharmakophor-Bibliothek durch Flüssigphasen-Parallelsynthese. X = O, NH; Y = H, Me; Bn = Benzyl, Cbz = Benzyloxycarbonyl.



Scheme 16. Synthese von HUN-7293 und seinen Analoga: Die Mitsunobu-Veresterung ermöglicht den Einsatz des von L-Gln abgeleiteten Alkohols **77** und vermeidet die Racemisierung, die bei Aktivierung des NMe-Ala-Terminus beobachtet wurde; die Epimerisierung bei der Makrolactamisierung wird durch DPPA (Diphenylphosphorylazid) eingeschränkt. DIAD = Diisopropylazodicarboxylat. HOAt = 7-Aza-1-hydroxybenzotriazol.

mente hinaus auch die Analyse weniger offensichtlicher Strukturmerkmale.

Die Mutagenese durch Austausch von Aminosäuren gegen Alanin („Alanin-Scan“) ist aufschlussreich, um Epitope in Proteinen festzulegen.^[416] Indem man jede einzelne Aminosäure-Seitenkette durch eine Methylgruppe ersetzt, ohne die Konformation des Peptidrückgrats zu verändern, kann man die Bedeutung der einzelnen Seitenketten erkennen. Obwohl dieser Methode Grenzen gesetzt sind, können so Erkenntnisse über die Struktur-Wirkungs-Beziehungen von Proteinen gewonnen werden, auch wenn die zugrunde liegenden Mechanismen und die dreidimensionalen Strukturen unbekannt sind.^[416]

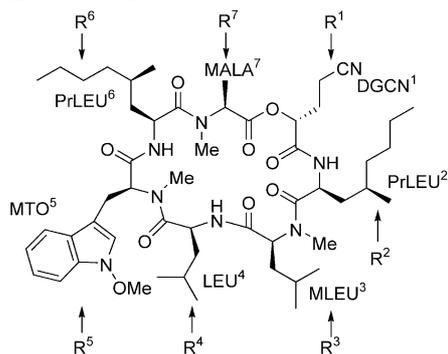
Auch in HUN-7293 kann ohne ein definiertes Target die Bedeutung der einzelnen Aminosäurereste nicht vorhergesehen werden. Zusätzlich zu Modifikationen und Vereinfachungen in jeder der einzelnen Seitenketten wurde ein Alanin-Scan für HUN-7293 vorgenommen. Die Ergebnisse in Tabelle 8 geben einen ersten, überraschend wenig aussagekräftigen Überblick über die relative Bedeutung der Aminosäuren. Der Austausch jeder Seitenketten gegen eine Methyl-

gruppe führte zu einem Wirkungsverlust. Das Ausmaß dieses Aktivitätsverlustes variierte allerdings über drei Größenordnungen: Bei Austausch von R²–R⁴ auf ein Zehntel bis ein Hundertstel und bei Austausch von R⁵ und R⁶ sogar auf weniger als ein Hundertstel bis ein Tausendstel; der Einfluss von R⁵ war bei weitem am größten. Trotz des Aktivitätsverlusts steigerte die Substitution der Seitenketten R¹–R⁴ durch Methylgruppen die Selektivität für VCAM-1 gegenüber ICAM-1. Veränderungen in diesem Molekülteil beeinflussten die Hemmung der ICAM-1-Expression deutlicher, dagegen nahmen bei Austausch der Seitenketten R⁵ und R⁶ gegen Methylgruppen sowohl Aktivität als auch Selektivität ab; wiederum wirkte sich die Substitution von R⁵ besonders nachteilig aus. Aus diesen Ergebnissen allein lässt sich schon ableiten, dass wichtige Änderungen in der Seitenkette von R¹ toleriert werden bei den Versuchen, die Selektivität zu erhöhen oder physikochemische Eigenschaften, Verteilung, Stabilität und Toxizitätsprofil zu ändern, während Änderungen an R²–R⁴ schwieriger zu bewerkstelligen sind. Variationen an R⁵ (Tabelle 9) und R⁶ wirken sich negativ aus. Daher sind die Resultate geringerer Veränderungen der Seitenketten besonders wertvoll, um

Ungenauigkeiten bei der Interpretation des unvollständigen Datensatzes des Alanin-Scans zu erkennen.

Eine Bewertung des Einflusses jeder Aminosäure, jeder Seitenkette und jedes Strukturelements von HUN-7293 wurde durch die Flüssigphasen-Parallelsynthese einer vollständigen Bibliothek von Analoga mit systematischen Variationen an je einer Stelle der Struktur erreicht. Durch Kombination einer konvergenten Totalsynthese mit einer divergenten Synthesestrategie wurden mehr als 40 neue Verbindungen hergestellt. Dieses Vorgehen vermeidet die repetitive unabhängige lineare Synthese eines jeden Analogons, es ist jedoch nur in flüssiger Phase möglich. Die chemische Mutagenese des cyclischen Depsipeptides ermöglicht eine detaillierte Struktur-Wirkungs-Untersuchung und liefert so eine Basis für nachfolgende Optimierungsschritte – der einfache Alanin-Scan resultierte hingegen nur in einem unvollständiger Datensatz. Fundierte Folgerungen aus diesem Ergebnis abzuleiten erwies sich als problematisch: Jede nichtproteinogene Aminosäure und jede Seitenkette einschließlich der in Aminosäure 5 und 6 konnten vereinfacht werden, ohne dass die Wirkung nennenswert beeinflusst

Tabelle 8: Alanin-Scan für HUN-7293: Inhibitionsaktivität (IC_{50} [μM]) gegen VCAM-1- und ICAM-1-Proteinexpression in der humanen mikrovaskulären Zelllinie HMEC-1.^[a]



Verbindung	VCAM-1	ICAM-1	Selektivität	rel. Wirksamkeit
HUN-7293 ^[b]	1	24	24	1
79 , R ¹ = Me	2.3 ± 0.5	178 ± 18	77	0.4
80 , R ² = Me	100 ± 34	6300 ± 370	63	0.01
81 , R ³ = Me	56 ± 11	4100 ± 2500	73	0.02
82 , R ⁴ = Me	16 ± 1.4	700 ± 20	43	0.06
83 , R ⁵ = Me	1800 ± 10	2800 ± 210	1.6	0.0006
84 , R ⁶ = Me	270 ± 40	1400 ± 300	5.2	0.004

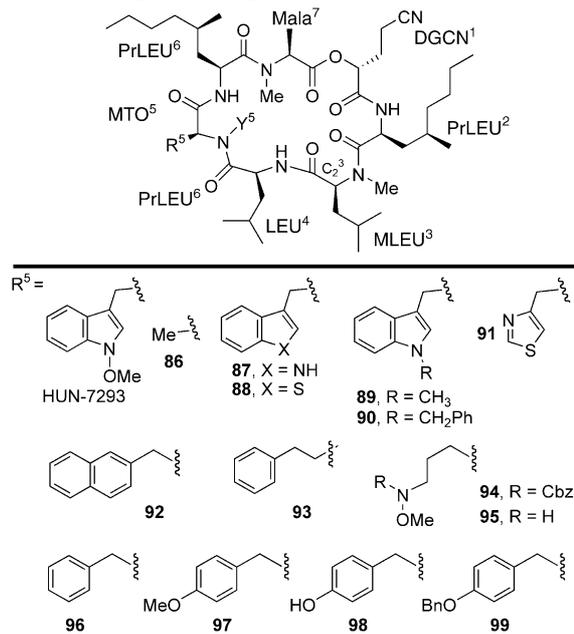
[a] Wenn nicht anders bezeichnet, entsprechen die Substituenten denjenigen von HUN-7293. [b] R⁷ = Me, HUN-7293.

wurde. Ähnliche Methoden wurden zwar bereits angewandt, um eine einzelne Aminosäure in einem natürlichen cyclischen Peptid zu optimieren, doch wir kennen keinen Fall, in dem *alle* Aminosäuren untersucht wurden. Systematische Derivatisierung und Abbau sind weit verbreitete Methoden, um die aktivitätsrelevanten Strukturelemente von Naturstoffen zu identifizieren und Struktur-Wirkungs-Beziehungen zu erkennen. Diese Versuche liefern aber ebenso wie der Alanin-Scan nur unvollständige Datensätze, auf denen die weiteren Untersuchungen aufbauen müssen.

7. Zusammenfassung und Ausblick

Mithilfe kombinatorischer Methoden, die auf Festphasen- und Flüssigphasensynthese beruhen, ist es möglich, schwierige Targets schnell zu untersuchen. Dies gelingt auch, wenn weder niedermolekulare Leitstrukturen noch Strukturinformationen für das Target bekannt sind. Split- und Mix-Festphasensynthese und Flüssigphasenmischungssynthese haben den Durchsatz bei der Herstellung von Bibliotheken erheblich vergrößert. Durch die Entwicklung von Dekonvolutionsverfahren zur schnellen und einfachen Identifizierung von Leitstrukturen aus einem Screening ist die Bedeutung dieser Syntheseverfahren noch gestiegen. Die Flüssigphasensynthese ist darüber hinaus mit einer konvergenten Synthesestrategie kompatibel. Sie ermöglicht die einfache Synthese von Mischungen und kann an dynamische oder Selektions-Screeningverfahren einschließlich der Bindung von Liganden am Target angepasst werden. In Anbetracht der Fortschritte

Tabelle 9: Modifizierung von R⁵ in HUN-7293: Inhibitionsaktivität (IC_{50} [μM]) gegen VCAM-1- und ICAM-1-Proteinexpression in der humanen mikrovaskulären Zelllinie HMEC-1.^[a]



Verbindung	VCAM-1	ICAM-1	Selektivität	rel. Wirksamkeit
HUN-7293	1	24	24	1
85 , Y ⁵ = H	> 10000	> 10000	n.b. ^[b]	< 0.0001
86	1800 ± 10	2800 ± 210	1.6	0.0006
87	44 ± 11	510 ± 140	12	0.02
88	1.7 ± 1.6	19 ± 1.2	11	0.6
89	21 ± 1.6	186 ± 3	9	0.05
90	19 ± 1.2	16 ± 13	0.8	0.05
91	38 ± 5	2100 ± 170	55	0.03
92	11 ± 2.6	71 ± 35	6	0.09
93	29 ± 6	94 ± 13	3	0.03
94	380 ± 120	890 ± 340	2.3	0.003
95	1400 ± 230	> 7000	> 5	0.0007
96	2.3 ± 0.6	43 ± 6	19	0.4
97	63 ± 4	720 ± 90	11	0.02
C ₂ ³ -epi- 97	190 ± 20	9700 ± 3300	51	0.005
98	810 ± 130	8200 ± 120	10	0.001
99	280 ± 7	480 ± 65	1.7	0.004
C ₂ ³ -epi- 99	1100 ± 240	2600 ± 440	2.4	0.0009

[a] Y⁵ = Me (HUN-7293) wenn nicht anders bezeichnet. [b] n.b. = nicht bestimmt.

von polymergestützten Flüssigphasensynthesen und des Erfolgs polymergebundener Reagentien, Abfang- und Aufarbeitungsreagentien zur inversen Festphasensynthese^[165] kann man davon ausgehen, dass die Bedeutung der Flüssigphasen-Bibliothekssynthese noch unterschätzt wird.

Unsere Bibliothek von gegenwärtig etwa 40000 Verbindungen wird gerade auf 1000000 Verbindungen erweitert. Ziele sind hierbei die Identifizierung eines Pharmakophors in einem einzigen Screeningdurchlauf, die Einführung spezifischer Strukturelemente für Protein-Protein-Wechselwirkungen (z.B. RGD-Mimetika, α -Helix- und β -Faltblatt-Mimetika), die Untersuchung neuer Template und die Einführung neuer Flüssigphasen-Techniken wie der Target-gestützten Synthese zur Auswahl möglicher Liganden. Der Bibliotheks-

maßstab ermöglicht mehrfache Verwendung in verschiedenen Testsystemen. In den kommenden Jahren wird der Schwerpunkt auf der Anwendung des Verfahrens liegen. Dadurch werden weitere nützliche Methoden entwickelt werden. Das Ziel der Untersuchungen ist die Identifizierung nicht nur effizienter, sondern auch selektiver Modulatoren von Protein-Protein- oder Protein-DNA-Wechselwirkungen. Mit dem FID-Test steht eine neue Analysetechnik für die gleichzeitige Untersuchung von Protein-DNA-Wechselwirkungen aller möglichen DNA-Sequenzen zur Verfügung. So lässt sich nicht nur die Affinität, sondern auch die Selektivität zwischen allen Targets (Sequenzen) bestimmen. Proteomansätze zur Untersuchung der Wechselwirkung zwischen einem Liganden und allen Proteinen zur Erfassung der Selektivität^[9] werden derzeit entwickelt,^[417] ebenso analoge Methoden für das gleichzeitige oder parallele Screening zur Modulation von Protein-Protein-Wechselwirkungen.^[418]

Die Arbeiten wurden unterstützt von den National Institutes of Health (CA78045, CA41986, CA41101, EY14174), dem Department of Army (DAMD17-02-1-0135), dem Skaggs Institute for Chemical Biology sowie durch ein Promotionsstipendium für K.C. (Thomas and Sharon Baucé Foundation Fellowship). K.C. ist Skaggs-Stipendiat.

Eingegangen am 24. Januar 2003 [A574]

- [1] M. R. Pavia, T. K. Sawyer, W. H. Moos, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1993**, *3*, 387–396.
- [2] M. A. Gallop, R. W. Barrett, W. J. Dower, S. P. A. Fodor, E. M. Gordon, *J. Med. Chem.* **1994**, *37*, 1233–1251.
- [3] E. M. Gordon, R. W. Barrett, W. J. Dower, S. P. A. Fodor, M. A. Gallop, *J. Med. Chem.* **1994**, *37*, 1385–1401.
- [4] N. K. Terrett, M. Gardner, D. W. Gordon, R. J. Kobylecki, J. Steele, *Tetrahedron* **1995**, *51*, 8135–8173.
- [5] J. S. Früchtel, G. Jung, *Angew. Chem.* **1996**, *108*, 19–46; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1996**, *35*, 17–42.
- [6] J. A. Ellman, *Acc. Chem. Res.* **1996**, *29*, 132–143.
- [7] E. M. Gordon, M. A. Gallop, D. V. Patel, *Acc. Chem. Res.* **1996**, *29*, 144–154.
- [8] L. A. Thompson, J. A. Ellman, *Chem. Rev.* **1996**, *96*, 555–600.
- [9] F. Balkenhohl, C. von dem Bussche-Hünnefeld, A. Lansky, C. Zechel, *Angew. Chem.* **1996**, *108*, 2436–2487; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1996**, *35*, 2288–2337.
- [10] I. M. Chaiken, K. D. Janda, *Molecular Diversity and Combinatorial Chemistry: Libraries and Drug Discovery*, American Chemical Society, Washington, DC, **1996**.
- [11] G. Jung, *Combinatorial Peptide and Nonpeptide Libraries: a Handbook*, VCH, Weinheim, **1996**.
- [12] A. W. Czarnik, S. H. DeWitt, *A Practical Guide to Combinatorial Chemistry*, American Chemical Society, Washington, DC, **1997**.
- [13] A. Nefzi, J. M. Ostresh, R. A. Houghten, *Chem. Rev.* **1997**, *97*, 449–472.
- [14] N. K. Terrett, *Combinatorial Chemistry*, Oxford University Press, Oxford, UK, **1998**.
- [15] D. Obrecht, J. M. Villalgorido, *Solid-Supported Combinatorial and Parallel Synthesis of Small-Molecular-Weight Compound Libraries*, Pergamon/Elsevier, Oxford, UK, **1998**.
- [16] B. Agnew, R. F. Sevice, M. Enserink, D. Normile, E. Marshal, C. Sander, M. R. Reich, *Science* **2000**, *287*, 1951–1981.
- [17] R. Storer, *Drug Discovery Today* **1996**, *1*, 248–254.
- [18] A. Chucholowski, T. Masquelin, D. Obrecht, J. Stadlwieser, J. M. Villalgorido, *Chimia* **1996**, *50*, 525–530.
- [19] D. M. Coe, R. Storer, *Annu. Rep. Comb. Chem. Mol. Diversity* **1997**, *1*, 50–58.
- [20] N. Bailey, A. W. J. Cooper, M. J. Deal, A. W. Dean, A. L. Gore, M. C. Hawes, D. B. Judd, A. T. Merritt, R. Storer, S. Travers, S. P. Watson, *Chimia* **1997**, *51*, 832–837.
- [21] L. M. Gayo, *Biotechnol. Bioeng.* **1998**, *61*, 95–106.
- [22] H. An, P. D. Cook, *Recent Res. Dev. Org. Chem.* **1998**, *2*, 473–488.
- [23] R. Ferritto, P. Seneci, *Drugs Future* **1998**, *23*, 643–654.
- [24] D. M. Coe, R. Storer, *Annu. Rep. Comb. Chem. Mol. Diversity* **1999**, *2*, 1–8.
- [25] D. M. Coe, R. Storer, *Mol. Diversity* **1999**, *4*, 31–38.
- [26] V. Austel, *Comb. Chem.* **1999**, *77*–123.
- [27] M. J. Suto, *Curr. Opin. Drug Discovery Dev.* **1999**, *2*, 377–384.
- [28] A. Ganesan, *Drug Discovery Today* **2002**, *7*, 47–55.
- [29] H. An, *Front. Biotechnol. Pharm.* **2000**, *1*, 83–113.
- [30] C. M. Baldino, *J. Comb. Chem.* **2000**, *2*, 89–103.
- [31] H. An, P. D. Cook, *Chem. Rev.* **2000**, *100*, 3311–3340.
- [32] O. Ramström, J.-M. Lehn, *Nat. Rev. Drug Discovery* **2002**, *1*, 26–36.
- [33] S. Otto, R. L. E. Furlan, J. K. M. Sanders, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2002**, *6*, 321–327.
- [34] H. Han, M. M. Wolfe, S. Brenner, K. D. Janda, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1995**, *92*, 6419–6423.
- [35] D. J. Gravert, K. D. Janda, *Chem. Rev.* **1997**, *97*, 489–509.
- [36] P. Wentworth, Jr., K. D. Janda, *Chem. Commun.* **1999**, 1917–1924.
- [37] P. H. Toy, K. D. Janda, *Acc. Chem. Res.* **2000**, *33*, 546–554.
- [38] N. A. Boyle, K. D. Janda, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2002**, *6*, 339–346.
- [39] D. P. Curran, *Angew. Chem.* **1998**, *110*, 1230–1255; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, *37*, 1174–1196, Erratum: D. P. Curran, *Angew. Chem.* **1998**, *110*, 2569; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, *37*, 2292.
- [40] D. P. Curran, *Med. Res. Rev.* **1999**, *19*, 432–438.
- [41] J. Yoshida, K. Itami, *Chem. Rev.* **2002**, *102*, 3693–3716.
- [42] R. A. Fecik, K. E. Frank, E. J. Gentry, L. A. Mitscher, M. Shibata, *Pure Appl. Chem.* **1999**, *71*, 559–564.
- [43] H. Perrier, M. Labelle, *J. Org. Chem.* **1999**, *64*, 2110–2113.
- [44] X. Wang, J. J. Parlow, J. A. Porco, Jr., *Org. Lett.* **2000**, *2*, 3509–3512.
- [45] T. Bosanac, C. S. Wilcox, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 4194–4195.
- [46] S. W. Kaldor, M. G. Siegel, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **1997**, *1*, 101–106.
- [47] R. J. Booth, J. C. Hodges, *Acc. Chem. Res.* **1999**, *32*, 18–26.
- [48] J. J. Parlow, R. V. Devraj, M. S. South, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **1999**, *3*, 320–336.
- [49] S. V. Ley, I. R. Baxendale, R. N. Bream, P. S. Jackson, A. G. Leach, D. A. Longbottom, M. Nesi, J. S. Scott, R. I. Storer, S. J. Taylor, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* **2000**, *23*, 3815–4195.
- [50] S. V. Ley, I. R. Baxendale, *Nat. Rev. Drug Discovery* **2002**, *1*, 573–586.
- [51] C. A. McNamara, M. J. Dixon, M. Bradley, *Chem. Rev.* **2002**, *102*, 3275–3300.
- [52] D. E. Bergbreiter, *Chem. Rev.* **2002**, *102*, 3345–3384.
- [53] T. J. Dickerson, N. N. Reed, K. D. Janda, *Chem. Rev.* **2002**, *102*, 3325–3344.
- [54] D. L. Flynn, R. V. Devraj, J. J. Parlow, *Curr. Opin. Drug Discovery Dev.* **1998**, *1*, 41–50.
- [55] D. L. Flynn, R. V. Devraj, W. Naing, J. J. Parlow, J. J. Weidner, S. Yang, *Med. Chem. Res.* **1998**, *8*, 219–243.
- [56] D. L. Flynn, *Med. Res. Rev.* **1999**, *19*, 408–431.
- [57] D. L. Boger, C. M. Tarby, L. H. Caporale, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 2109–2110.

- [58] S. Cheng, D. D. Comer, J. P. Williams, D. L. Boger, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 2567–2573.
- [59] S. Cheng, C. M. Tarby, D. D. Comer, J. P. Williams, L. H. Caporale, D. L. Boger, *Bioorg. Med. Chem.* **1996**, *4*, 727–737.
- [60] D. L. Boger, W. Chai, R. S. Ozer, C.-M. Andersson, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1997**, *7*, 463–468.
- [61] D. L. Boger, W. Chai, *Tetrahedron* **1998**, *54*, 3955–3970.
- [62] D. L. Boger, J. Goldberg, C.-M. Andersson, *J. Org. Chem.* **1999**, *64*, 2422–2427.
- [63] D. L. Boger, W. Jiang, J. Goldberg, *J. Org. Chem.* **1999**, *64*, 7094–7100.
- [64] D. L. Boger, W. Chai, Q. Jin, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 7220–7225.
- [65] D. L. Boger, J. K. Lee, J. Goldberg, Q. Jin, *J. Org. Chem.* **2000**, *65*, 1467–1474.
- [66] D. L. Boger, R. S. Ozer, C.-M. Andersson, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1997**, *7*, 1903–1908.
- [67] D. L. Boger, P. Ducray, W. Chai, W. Jiang, J. Goldberg, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1998**, *8*, 2339–2344.
- [68] D. L. Boger, J. Goldberg, W. Jiang, W. Chai, P. Ducray, J. K. Lee, R. S. Ozer, C.-M. Andersson, *Bioorg. Med. Chem.* **1998**, *6*, 1347–1378.
- [69] „Multi-Step Solution-Phase Combinatorial Chemistry“: D. L. Boger, J. Goldberg in *Combinatorial Chemistry: A Practical Approach* (Hrsg.: H. Fenniri), Oxford University Press, Oxford, UK, **2000**, S. 303–326.
- [70] D. L. Boger, B. E. Fink, M. P. Hedrick, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2000**, *10*, 1019–1020.
- [71] D. L. Boger, J. Goldberg, S. Satoh, Y. Ambroise, S. B. Cohen, P. K. Vogt, *Helv. Chim. Acta* **2000**, *83*, 1825–1845.
- [72] D. L. Boger, J. K. Lee, *J. Org. Chem.* **2000**, *65*, 5996–6000.
- [73] D. L. Boger, J. Goldberg, *Bioorg. Med. Chem.* **2001**, *9*, 557–562.
- [74] D. L. Boger, H. Keim, B. Oberhauser, E. P. Schreiner, C. A. Foster, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 6197–6205.
- [75] D. L. Boger, Y. Chen, C. A. Foster, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2000**, *10*, 1741–1744.
- [76] Y. Chen, M. Bilban, C. A. Foster, D. L. Boger, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 5431–5440.
- [77] S. Silletti, T. Kessler, J. Goldberg, D. L. Boger, D. A. Cheresch, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2001**, *98*, 119–124.
- [78] D. L. Boger, J. Goldberg, S. Silletti, T. Kessler, D. A. Cheresch, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 1280–1288.
- [79] Y. Ambroise, B. Yaspan, M. H. Ginsberg, D. L. Boger, *Chem. Biol.* **2002**, *9*, 1219–1226.
- [80] T. Berg, S. B. Cohen, J. Desharnais, C. Sonderegger, D. J. Maslyar, J. Goldberg, D. L. Boger, P. K. Vogt, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2002**, *99*, 3830–3835.
- [81] D. L. Boger, M. Searcey, W. C. Tse, Q. Jin, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2000**, *10*, 495–498.
- [82] J. Goldberg, Q. Jin, Y. Ambroise, S. Satoh, J. Desharnais, K. Capps, D. L. Boger, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 544–555.
- [83] C. R. Woods, T. Ishii, B. Wu, K. W. Bair, D. L. Boger, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 2148–2152.
- [84] C. R. Woods, T. Ishii, D. L. Boger, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 10676–10682.
- [85] C. R. Woods, N. Faucher, B. Eschgfäller, K. W. Bair, D. L. Boger, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2002**, *12*, 2647–2650.
- [86] D. L. Boger, M. A. Dechantsreiter, T. Ishii, B. E. Fink, M. P. Hedrick, *Bioorg. Med. Chem.* **2000**, *8*, 2049–2057.
- [87] D. L. Boger, B. E. Fink, M. P. Hedrick, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 6382–6394.
- [88] D. L. Boger, H. W. Schmitt, B. E. Fink, M. P. Hedrick, *J. Org. Chem.* **2001**, *66*, 6654–6661.
- [89] D. L. Boger, *Chemtracts: Org. Chem.* **1991**, *4*, 329–349.
- [90] D. L. Boger, *Acc. Chem. Res.* **1995**, *28*, 20–29.
- [91] D. L. Boger, D. S. Johnson, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1995**, *92*, 3642–3649.
- [92] D. L. Boger, D. S. Johnson, *Angew. Chem.* **1996**, *108*, 1542–1580; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1996**, *35*, 1438–1474.
- [93] D. L. Boger, R. M. Garbaccio, *Bioorg. Med. Chem.* **1997**, *5*, 263–276.
- [94] D. L. Boger, R. M. Garbaccio, *Acc. Chem. Res.* **1999**, *32*, 1043–1052.
- [95] D. L. Boger, H. Cai, *Angew. Chem.* **1999**, *111*, 470–500; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, *38*, 448–476.
- [96] S. E. Wolkenberg, D. L. Boger, *Chem. Rev.* **2002**, *102*, 2477–2495.
- [97] D. L. Boger, B. E. Fink, S. R. Brunette, W. C. Tse, M. P. Hedrick, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 5878–5891.
- [98] D. L. Boger, W. C. Tse, *Bioorg. Med. Chem.* **2001**, *9*, 2511–2518.
- [99] D. Leung, C. Hardouin, D. L. Boger, B. F. Cravatt, *Nat. Biotechnol.* **2003**, *23*, 687–691.
- [100] A. G. Cochran, *Chem. Biol.* **2000**, *7*, R85–R94.
- [101] A. G. Cochran, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2001**, *5*, 654–659.
- [102] D. L. Boger, *Bioorg. Med. Chem.* **2003**, *11*, 1607–1613.
- [103] H. M. Geysen, R. H. Meloen, S. J. Barteling, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1984**, *81*, 3998–4002.
- [104] H. M. Geysen, S. J. Barteling, R. H. Meleon, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1985**, *82*, 178–182.
- [105] R. A. Houghten, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1985**, *82*, 5131–5135.
- [106] J. K. Scott, G. P. Smith, *Science* **1990**, *249*, 386–390.
- [107] G. P. Smith, V. A. Petrenko, *Chem. Rev.* **1997**, *97*, 391–410.
- [108] R. Frank, *Tetrahedron* **1992**, *48*, 9217–9232. See also: R. Frank, *Nucleic Acids Res.* **1983**, *11*, 4365.
- [109] Membrangebundene Synthese durch Schneiden und Mischen: F. Dittrich, W. Tegge, R. Frank, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1998**, *8*, 2351–2356.
- [110] Á. Furka, F. Sebestyén, M. Asgedom, G. Dibó, *Int. J. Peptide Prot. Res.* **1991**, *37*, 487–493; Á. Furka, F. Sebestyén, M. Asgedom, G. Dibó, *Abstr. 10th Intl. Symp. Med. Chem.*, Budapest, Ungarn, **1988**, S. 288.
- [111] F. Sebestyén, G. Dibó, Á. Kovács, Á. Furka, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1993**, *3*, 413–418.
- [112] Á. Furka, *Drug Dev. Res.* **1995**, *36*, 1–12.
- [113] R. A. Houghten, C. Pinilla, S. E. Blondelle, J. R. Appel, C. T. Dooley, J. H. Cuervo, *Nature* **1991**, *354*, 84–86.
- [114] K. S. Lam, S. E. Salmon, E. M. Hersh, V. J. Hruby, W. M. Kazmierski, R. J. Knapp, *Nature* **1991**, *354*, 82–84.
- [115] S. E. Salmon, K. S. Lam, M. Lebl, A. Kandola, P. S. Khattry, S. Wade, M. Pátek, P. Kocis, V. Krchňák, D. Thorpe, S. Felder, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1993**, *90*, 11708–11712.
- [116] K. S. Lam, M. Lebl, V. Krchňák, *Chem. Rev.* **1997**, *97*, 411–448.
- [117] S. P. A. Fodor, L. J. Read, M. C. Pirrung, L. Stryer, A. T. Lu, D. Solas, *Science* **1991**, *251*, 767–773.
- [118] D. J. Ecker, T. A. Vickers, R. Hanecak, V. Driver, K. Anderson, *Nucleic Acids Res.* **1993**, *21*, 1853–1856.
- [119] S. M. Freier, D. A. M. Konings, J. R. Wyatt, D. J. Ecker, *J. Med. Chem.* **1995**, *38*, 344–352.
- [120] E. Erb, K. D. Janda, S. Brenner, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1994**, *91*, 11422–11426.
- [121] S. Brenner, R. A. Lerner, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1992**, *89*, 5381–5383.
- [122] J. Nielsen, S. Brenner, K. D. Janda, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 9812–9813.
- [123] J. M. Kerr, S. C. Banville, R. N. Zuckermann, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 2529–2531.
- [124] V. Nikolaev, A. Stierandova, V. Krchnák, B. Seligmann, K. S. Lam, S. E. Salmon, M. Lebl, *Pept. Res.* **1993**, *6*, 161–170.
- [125] E. R. Felder, G. Heizmann, I. T. Matthews, H. Rink, E. Spieser, *Mol. Diversity* **1996**, *1*, 109–112.

- [126] M. H. J. Ohlmeyer, R. N. Swanson, L. W. Dillard, J. C. Reader, G. Asouline, R. Kobayashi, M. Wigler, W. C. Still, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1993**, *90*, 10922–10926.
- [127] H. P. Nestler, P. A. Bartlett, W. C. Still, *J. Org. Chem.* **1994**, *59*, 4723–4724.
- [128] W. C. Still, *Acc. Chem. Res.* **1996**, *29*, 155–163.
- [129] K. C. Nicolaou, X.-Y. Xiao, Z. Parandoosh, A. Senyei, M. P. Nova, *Angew. Chem.* **1995**, *107*, 2476–2479; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1995**, *34*, 2289–2291.
- [130] E. J. Moran, S. Sarshar, J. F. Cargill, M. M. Shahbaz, A. Lio, A. M. M. Mjallim, R. W. Armstrong, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 10787–10788.
- [131] J. W. Guiles, C. L. Lanter, R. A. Rivero, *Angew. Chem.* **1998**, *110*, 967–970; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, *37*, 926–932.
- [132] A. R. Vaino, K. D. Janda, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2000**, *97*, 7692–7696.
- [133] R. Frank, S. Hoffmann, M. Kiess, H. Lahmann, W. Tegge, C. Behn, H. Gausepohl, *Combinatorial Peptide and Nonpeptide Libraries* (Hrsg.: G. Jung), VCH, Weinheim, **1996**, S. 363–386.
- [134] C. M. Niemeyer, D. Blohm, *Angew. Chem.* **1999**, *111*, 3039–3043; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, *38*, 2865–2869.
- [135] G. MacBeath, A. N. Koehler, S. L. Schreiber, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 7967–7968.
- [136] K. S. Lam, M. Renil, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2002**, *6*, 353–358.
- [137] M. J. Plunkett, J. A. Ellman, *J. Org. Chem.* **1997**, *62*, 2885–2893.
- [138] A. B. Reitz, *Curr. Opin. Drug Discovery Dev.* **1999**, *2*, 358–364.
- [139] P. Blaney, R. Grigg, V. Sridharan, *Chem. Rev.* **2002**, *102*, 2607–2624.
- [140] J. I. Crowley, H. Rapoport, *J. Am. Chem. Soc.* **1970**, *92*, 6363–6365.
- [141] S. H. DeWitt, J. S. Kiely, C. J. Stankovic, M. C. Schroeder, D. M. R. Cody, M. R. Pavia, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1993**, *90*, 6909–6913.
- [142] A. R. Brown, D. C. Rees, Z. Rankovic, J. R. Morphy, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 3288–3295.
- [143] G. W. Kenner, J. R. McDermott, R. C. Sheppard, *J. Chem. Soc. D* **1971**, 636–637.
- [144] L. M. Gayo, M. J. Sato, *Tetrahedron Lett.* **1997**, *38*, 211–214.
- [145] B. J. Backes, J. A. Ellman, *J. Org. Chem.* **1999**, *64*, 2322–2330.
- [146] G. T. Bourne, W. D. F. Meutermans, M. L. Smythe, *Tetrahedron Lett.* **1999**, *40*, 7271–7274.
- [147] K. J. Jensen, J. Alsina, M. F. Songster, J. Vágner, F. Albericio, G. Barany, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 5441–5452.
- [148] T. Masquelin, D. Sprenger, R. Baer, F. Gerber, Y. Mercadal, *Helv. Chim. Acta* **1998**, *81*, 646–660.
- [149] C. O. Kappe, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2000**, *10*, 49–51.
- [150] A. Ganesan, *Angew. Chem.* **1998**, *110*, 2989–2992; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, *37*, 2828–2831.
- [151] J.-M. Lehn, *Chem. Eur. J.* **1999**, *5*, 2455–2463.
- [152] B. Klekota, B. L. Miller, *Trends Biotechnol.* **1999**, *17*, 205–209.
- [153] G. R. L. Cousins, S.-A. Poulsen, J. K. M. Sanders, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2000**, *4*, 270–279.
- [154] J.-M. Lehn, A. V. Eliseev, *Science* **2001**, *291*, 2331–2332.
- [155] P. W. Smith, J. Y. Q. Lai, A. R. Whittington, B. Cox, J. G. Houston, C. H. Stylli, M. N. Banks, P. R. Tiller, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1994**, *4*, 2821–2824.
- [156] T. Carell, E. A. Wintner, A. Bashir-Hashemi, J. Rebek, Jr., *Angew. Chem.* **1994**, *106*, 2159–2162; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1994**, *33*, 2059–2061.
- [157] T. Carell, E. A. Wintner, A. J. Sutherland, J. Rebek, Jr., Y. M. Dunayevskiy, P. Vouros, *Chem. Biol.* **1995**, *2*, 171–183.
- [158] Y. Dunayevskiy, P. Vouros, T. Carell, E. A. Wintner, J. Rebek, Jr., *Anal. Chem.* **1995**, *67*, 2906–2915.
- [159] G. W. Shipps, Jr., U. P. Spitz, J. Rebek, Jr., *Bioorg. Med. Chem.* **1996**, *4*, 655–657.
- [160] M. C. Pirrung, J. Chen, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 1240–1245. M. C. Pirrung, J. H.-L. Chau, J. Chen, *Chem. Biol.* **1995**, *2*, 621–626.
- [161] J. Nielsen, P. H. Rasmussen, *Tetrahedron Lett.* **1996**, *37*, 3351–3354.
- [162] I. Ugi, A. Domling, W. Horl, *Endeavour* **1994**, *18*, 115–122.
- [163] R. W. Armstrong, A. P. Combs, P. A. Tempest, S. D. Brown, T. A. Keating, *Acc. Chem. Res.* **1996**, *29*, 123–131.
- [164] W. C. Ripka, G. Barker, J. Krakover, *Drug Discovery Today* **2001**, *6*, 471–477.
- [165] „Inverse Solid Phase Synthesis“: L. H. Caporale (CombiChem, Inc.), US 5767238, **1998**; [*Chem. Abstr.* **1998**, *129*, 67693], eingereicht am 6.7.1995 (US Anmeldung 95-483143).
- [166] D. L. Boger, C. E. Brotherton, *J. Org. Chem.* **1984**, *49*, 4050–4055.
- [167] D. L. Boger, M. D. Mullican, *J. Org. Chem.* **1984**, *49*, 4033–4044.
- [168] D. L. Boger, M. D. Mullican, *J. Org. Chem.* **1984**, *49*, 4045–4050.
- [169] S. L. Schreiber, *Science* **2000**, *287*, 1964–1969; L. Weber, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2000**, *4*, 295–302.
- [170] B. Seed, *Chem. Biol.* **1994**, *1*, 125–129.
- [171] A. Whitty, C. W. Borysenko, *Chem. Biol.* **1999**, *6*, R107-R118.
- [172] Übersichtsartikel: R. A. Houghten, C. Pinilla, J. R. Appel, S. Blondelle, C. T. Dooley, J. Eichler, A. Nefzi, J. M. Ostresh, *J. Med. Chem.* **1999**, *42*, 3743–3778; C. Pinella, J. R. Appel, E. Borrás, R. A. Houghten, *Nat. Med.* **2003**, *9*, 118–122.
- [173] C. Pinilla, J. R. Appel, P. Blanc, R. A. Houghten, *Biotechniques* **1992**, *13*, 901–905; C. T. Dooley, R. A. Houghten, *Life Sci.* **1993**, *52*, 1509–1517.
- [174] Auslassungsbibliotheken (Omission libraries): E. Câmpian, M. L. Peterson, H. H. Saneii, Á. Furka, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1998**, *8*, 2357–2362; T. Carell, E. A. Wintner, J. Rebek, Jr., *Angew. Chem.* **1994**, *106*, 2162–2164; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1994**, *33*, 2061–2064.
- [175] R. A. Houghten, C. T. Dooley, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1993**, *3*, 405–412.
- [176] Y. M. Dunayevskiy, J.-J. Lai, C. Quinn, F. Talley, P. Vouros, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **1997**, *11*, 1178–1184. Y.-Z. Zhao, R. B. van Breemen, D. Nikolic, C.-R. Huang, C. P. Woodbury, A. Schilling, D. L. Venton, *J. Med. Chem.* **1997**, *40*, 4006–4012.
- [177] P. J. Hajduk, R. P. Meadows, S. W. Fesik, *Q. Rev. Biophys.* **1999**, *32*, 211–240.
- [178] M. Pellicchia, D. S. Sem, K. Wüthrich, *Nat. Rev. Drug Discovery* **2002**, *1*, 211–219.
- [179] Y.-H. Chu, D. P. Kirby, B. L. Karger, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 5419–5420; A. V. Eliseev, *Curr. Opin. Drug Discovery Dev.* **1998**, *1*, 106–115.
- [180] M. M. Hann, A. B. Leach, G. Harper, *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* **2001**, *41*, 856–864.
- [181] P. L. Toogood, *J. Med. Chem.* **2002**, *45*, 1543–1558; M. W. Pecuh, A. D. Hamilton, *Chem. Rev.* **2000**, *100*, 2479–2494.
- [182] R. Zutshi, M. Brickner, J. Chmielewski, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **1998**, *2*, 62–66.
- [183] C.-H. Heldin, *Cell* **1995**, *80*, 213–223.
- [184] J. Schlessinger, *Cell* **2002**, *110*, 669–672.
- [185] N. Stahl, G. D. Yancopoulos, *Cell* **1993**, *74*, 587–590.
- [186] Weitere Übersichtsartikel: H. Ogiso, R. Ishitani, O. Nureki, S. Fukai, M. Yamanaka, J.-H. Kim, K. Saito, A. Sakamoto, M. Inoue, M. Shirouzu, S. Yokoyama, *Cell* **2002**, *110*, 775–787; A. L. F. Mui, A. Miyajima, *Prog. Growth Factor Res.* **1994**, *5*, 15–35; C.-H. Heldin, A. Oestman, *Cytokine Growth Factor Rev.* **1996**, *7*, 3–10; C.-H. Heldin, *Cancer Surv.* **1996**, *27*, 7–24; M. A. Lemmon, J. Schlessinger, *Methods Mol. Biol.* **1998**, *84*, 49–71; K. Schulze-Osthoff, D. Ferrari, M. Los, S. Wesselborg, M. E. Peter, *Eur. J. Biochem.* **1998**, *254*, 439–459; M. Onishi, T.

- Nosaka, T. Kitamura, *Int. Rev. Immunol.* **1998**, *16*, 617–634; F. P. Ottensmeyer, D. R. Beniac, R. Z.-T. Luo, C. C. Yip, *Biochemistry* **2000**, *39*, 12103–12112; B. M. Baker, D. C. Wiley, *Immunity* **2001**, *14*, 681–692; P. T. Daniel, T. Wieder, I. Sturm, K. Schulze-Osthoff, *Leukemia* **2001**, *15*, 1022–1032; S. R. George, B. F. O'Dowd, S. P. Lee, *Nat. Rev. Drug Discovery* **2002**, *1*, 808–820; R. C. Patel, U. Kumar, D. C. Lamb, J. S. Eid, M. Rocheville, M. Grant, A. Rani, T. Hazlett, S. C. Patel, E. Gratton, Y. C. Patel, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2002**, *99*, 3294–3299.
- [187] J. N. Ihle, B. A. Witthuhn, F. W. Quelle, K. Yamamoto, W. E. Thierfelder, B. Kreider, O. Silvennoinen, *Trends Biochem. Sci.* **1994**, *19*, 222–227.
- [188] P. Lamb, H. M. Seidel, R. B. Stein, J. Rosen, *Annu. Rep. Med. Chem.* **1996**, *31*, 269–278; A. H. Brivanlou, J. E. Darnell, Jr., *Science* **2002**, *295*, 813–818.
- [189] D. S. Aaronson, C. M. Horvath, *Science* **2002**, *296*, 1653–1655.
- [190] Weitere Übersichtsartikel: K. Muegge, S. K. Durum, *Cytokine* **1990**, *2*, 1–8; L. A. Neuhold, B. Wold, *Cell* **1993**, *74*, 1033–1042; E. C. B. Jørgensen, H. Atrup, *Carcinogenesis* **1996**, *17*, 435–441; D. S. Latchman, *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **1997**, *29*, 1305–1312; T. Hoey, *Science* **1997**, *278*, 1578–1579; P. A. Clemons, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **1999**, *3*, 112–115; A. Stephanou, D. S. Latchman, *Gene Expression* **1999**, *7*, 311–319; Z. Yu, D. Zhou, G. Cheng, M. P. Mattson, *J. Mol. Neurosci.* **2000**, *15*, 31–44; P. S. Subramaniam, B. A. Torres, H. M. Johnson, *Cytokine* **2001**, *15*, 175–187; H. van Dam, M. Castellazzi, *Oncogene* **2001**, *20*, 2453–2464; T. E. Battle, D. A. Frank, *Curr. Mol. Med.* **2002**, *2*, 381–392.
- [191] Übersichtsartikel: a) J. D. Klemm, S. L. Schreiber, G. R. Crabtree, *Annu. Rev. Immunol.* **1998**, *16*, 569–592; b) S. L. Schreiber, G. R. Crabtree, *Harvey Lect.* **1997**, *91*, 99–114; c) G. R. Crabtree, S. L. Schreiber, *Trends Biochem. Sci.* **1996**, *21*, 418–422; d) D. J. Austin, G. R. Crabtree, S. L. Schreiber, *Chem. Biol.* **1994**, *1*, 131–136.
- [192] a) D. M. Spencer, T. J. Wandless, S. L. Schreiber, G. R. Crabtree, *Science* **1993**, *262*, 1019–1024; b) D. M. Spencer, P. J. Belshaw, L. Chen, S. N. Ho, F. Randazzo, G. R. Crabtree, S. L. Schreiber, *Curr. Biol.* **1996**, *6*, 839–847; c) P. J. Belshaw, S. N. Ho, G. R. Crabtree, S. L. Schreiber, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1996**, *93*, 4604–4607; d) B. R. Stockwell, S. L. Schreiber, *Curr. Biol.* **1998**, *8*, 761–770.
- [193] S. N. Ho, S. R. Biggar, D. M. Spencer, S. L. Schreiber, G. R. Crabtree, *Nature* **1996**, *382*, 822–826.
- [194] R. Briesewitz, G. T. Ray, T. J. Wandless, G. R. Crabtree, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1999**, *96*, 1953–1958.
- [195] J. Huang, S. L. Schreiber, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1997**, *94*, 13396–13401.
- [196] K. Koide, J. M. Finkelstein, Z. Ball, G. L. Verdine, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 398–408.
- [197] M. Liuzzi, R. Deziel, N. Moss, P. Beaulieu, A. M. Bonneau, C. Bousquet, J. G. Chafouleas, M. Garneau, J. Jaramillo, R. L. Krogsrud, *Nature* **1994**, *372*, 695–698.
- [198] K. McMillan, M. Adler, D. S. Auld, J. J. Baldwin, E. Blasko, L. J. Browne, D. Chelsky, D. Davey, R. Dolle, K. A. Eagen, S. Erickson, R. I. Feldman, C. B. Glaser, C. Mallari, M. M. Morrissey, M. H. Ohlmeyer, G. Pan, J. F. Parkinson, G. B. Phillips, M. A. Polokoff, N. H. Sigal, R. Vergona, M. Whitlow, T. A. Young, J. J. Devlin, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2000**, *97*, 1506–1511.
- [199] a) M. D. Shultz, M. J. Bowman, Y.-W. Ham, X. Zhao, G. Tora, J. Chmielewski, *Angew. Chem.* **2000**, *112*, 2822–2825; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000**, *39*, 2710–2713; b) X. Fan, G. R. Flentke, D. H. Rich, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 8893–8894.
- [200] a) L. Zhao, M. K. O'Reilly, M. D. Schultz, J. Chmielewski, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2003**, *13*, 1175–1177; b) R. G. Maroun, S. Gayet, M. S. Benleulmi, H. Porumb, L. Zarian, H. Merad, H. Leh, J.-F. Mouscadet, F. Troalen, S. Femandjian, *Biochemistry* **2001**, *40*, 13840–13848.
- [201] B. P. Orner, J. T. Ernst, A. D. Hamilton, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 5382–5383.
- [202] A. Degterev, A. Lugovsky, M. Cardone, B. Mulley, G. Wagner, T. Mitchison, J. Yuan, *Nat. Cell Biol.* **2001**, *3*, 173–182.
- [203] S.-P. Tzung, K. M. Kim, G. Basañez, C. D. Giedt, J. Simon, J. Simmerberg, K. Y. J. Zhang, D. M. Hockenbery, *Nat. Cell Biol.* **2001**, *3*, 183–191.
- [204] J.-L. Wang, D. Liu, Z.-J. Zhang, S. Shan, X. Han, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2000**, *97*, 7124–7129.
- [205] a) O. Kutzki, H. S. Park, J. T. Ernst, B. P. Orner, H. Yin, A. D. Hamilton, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 11838–11839; b) J. T. Ernst, J. Becerril, H. S. Park, H. Yin, A. D. Hamilton, *Angew. Chem.* **2003**, *115*, 553–557; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42*, 535–539.
- [206] a) S. J. Duncan, S. Gruschow, D. H. Williams, C. McNicholas, R. Purewal, M. Hajek, M. Gerlitz, S. Martin, S. K. Wrigley, M. Moore, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 554–560; b) R. Stoll, C. Renner, S. Hansen, S. Palme, C. Klein, A. Belling, W. Zeslawski, M. Kamionka, T. Rehm, P. Muhlhahn, R. Schumacher, F. Hesse, B. Kaluza, W. Voelter, R. A. Engh, T. A. Holak, *Biochemistry* **2001**, *40*, 336–344.
- [207] C. Garcia-Echeverria, P. Chene, M. J. Blommer, P. Furet, *J. Med. Chem.* **2000**, *43*, 3205–3208.
- [208] J. B. Owolabi, G. Rizkalla, A. Tehim, G. M. Ross, R. J. Riopelle, R. Kamboj, M. Ossipov, D. Bian, S. Wegert, F. Porreca, D. K. H. Lee, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1999**, *289*, 1271–1276.
- [209] M. Baba, O. Nishimura, N. Kanzaki, M. Okamoto, H. Sawada, Y. Iizawa, M. Shiraiishi, Y. Aramaki, K. Okonogi, Y. Ogawa, K. Megurp, M. Fujino, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1999**, *96*, 5698–5702.
- [210] J. W. Tilley, L. Chen, D. C. Fry, S. D. Emerson, G. D. Powers, D. Biondi, T. Varnell, R. Trilles, R. Guthrie, F. Mennona, G. Kaplan, R. A. LeMahieu, M. Carson, R.-J. Han, C.-M. Liu, R. Palermo, G. Ju, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 7589–7590; A. C. Braisted, J. D. Oslob, W. L. Delano, J. Hyde, R. S. McDowell, N. Waal, C. Yu, M. R. Arkin, B. C. Raimundo, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 3714–3715.
- [211] R. Sarabu, J. P. Cooper, C. M. Cook, P. Gillespie, A. V. Perrotta, G. L. Olson, *Drug Des. Discovery* **1998**, *15*, 191–198.
- [212] S. E. Cwirla, P. Balasubramanian, D. J. Duffin, C. R. Wagstrom, C. M. Gates, S. C. Singer, A. M. Davis, R. L. Tansik, L. C. Mattheakis, C. M. Boytos, P. J. Schatz, D. P. Baccanari, N. C. Wrighton, R. W. Barrett, W. J. Dower, *Science* **1997**, *276*, 1696–1699.
- [213] T. Kimura, H. Kaburaki, T. Tsujino, Y. Ikeda, H. Kato, Y. Watanabe, *FEBS Lett.* **1998**, *428*, 250–254.
- [214] S. S. Tian, P. Lamb, A. G. King, S. G. Miller, L. Kessler, J. I. Luengo, L. Averill, R. K. Johnson, J. G. Gleason, L. M. Pelus, S. B. Dillon, J. Rosen, *Science* **1998**, *281*, 257–259.
- [215] a) A. Finch, A. K. Wong, N. J. Paczkowski, S. K. Wadi, D. J. Craik, D. P. Fairlie, S. M. Taylor, *J. Med. Chem.* **1999**, *42*, 1965–1974; b) A. J. Strachen, T. M. Woodruff, G. Haaima, D. P. Fairlie, S. M. Taylor, *J. Immunol.* **2000**, *164*, 6560–6565.
- [216] J. Liu, J. D. Farmer, W. S. Lane, J. Friedman, I. Weissman, S. L. Schreiber, *Cell* **1991**, *66*, 807–815.
- [217] H. M. Ke, L. D. Zydowsky, J. Liu, C. T. Walsh, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1991**, *88*, 9483–9487.
- [218] a) E. J. Brown, M. W. Albers, T. B. Shin, K. Ichikawa, C. T. Keith, W. S. Lane, S. L. Schreiber, *Nature* **1994**, *369*, 756–758; b) J. Choi, J. Chen, S. L. Schreiber, J. Clardy, *Science* **1996**, *273*, 239–242.
- [219] N. Ban, P. Nissen, J. Hansen, P. B. Moore, T. A. Steitz, *Science* **2000**, *289*, 905–920; N. Ban, P. Nissen, J. Hansen, P. B. Moore, T. A. Steitz, *Science* **2000**, *289*, 920–930.

- [220] a) Übersichtsartikel: T. Scheibel, J. Buchner, *Biochem. Pharmacol.* **1998**, *56*, 675–682; J. S. Isaacs, W. Wu, L. Neckers, *Cancer Cell* **2003**, *3*, 213–217; b) G. Chiosis, M. N. Timaul, B. Lucas, P. M. Minster, F. F. Zheng, L. Sepp-Lorenzino, N. Rosen, *Chem. Biol.* **2001**, *8*, 289–299.
- [221] a) Übersichtsartikel: K. H. Downing, *Emerging Ther. Targets* **2000**, *4*, 219–237; J. R. Peterson, T. J. Mitchison, *Chem. Biol.* **2002**, *9*, 1275–1285; b) S. J. Haggarty, T. U. Mayer, D. T. Miyamoto, R. Fathi, R. W. King, T. J. Mitchison, S. L. Schreiber, *Chem. Biol.* **2000**, *7*, 275–286.
- [222] Übersichtsartikel: Y. Pommier, *Biochimie* **1998**, *80*, 255–270.
- [223] a) B. K. Hubbard, C. T. Walsh, *Angew. Chem.* **2003**, *115*, 752–789; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42*, 730–765; b) Übersichtsartikel: D. G. McCafferty, P. Cudic, M. K. Yu, D. C. Behenna, R. Kruger, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **1999**, *3*, 672–680.
- [224] a) J. A. Katzenellenbogen, B. S. Katzenellenbogen, *Chem. Biol. Today* **1994**, *12*, 29–36.
- [225] a) T. K. Sawyer, *Biopolymers* **1998**, *47*, 243–261; b) J. K. Chen, S. L. Schreiber, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1994**, *4*, 1755–1760; c) M. Sudol, T. Hunter, *Cell* **2000**, *103*, 1001–1004; d) A. Y. Hung, M. Sheng, *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 5699–5702; M. Zhang, W. Wang, *Acc. Chem. Res.* **2003**, *36*, 530–538.
- [226] J.-M. Chen, R. T. Aimes, G. R. Ward, G. L. Youngleib, J. P. Quigley, *J. Biol. Chem.* **1991**, *266*, 5113–5121.
- [227] V.-M. Kahari, U. Saarialho-Kere, *Ann. Med.* **1999**, *31*, 34–45.
- [228] M. A. Rudek, J. Venitz, W. D. Figg, *Pharmacotherapy* **2002**, *22*, 705–720.
- [229] M. Lein, K. Jung, B. Ortel, C. Stephan, W. Rothaug, R. Juchem, M. Johannsen, S. Deger, D. Schnorr, S. Loening, H.-W. Krell, *Oncogene* **2002**, *21*, 2089–2096.
- [230] L. M. Coussens, B. Fingleton, L. M. Matrisian, *Science* **2002**, *295*, 2387–2392.
- [231] A. Matter, *Drug Discovery Today* **2001**, *6*, 1005–1024.
- [232] Übersichtsartikel zu Integrinen: R. O. Hynes, *Cell* **2002**, *110*, 673–687.
- [233] P. C. Brooks, R. A. F. Clark, D. A. Cheresh, *Science* **1994**, *264*, 569–571.
- [234] P. C. Brooks, A. M. P. Montgomery, M. Rosenfeld, R. A. Reisfeld, T. Hu, G. Klier, D. A. Cheresh, *Cell* **1994**, *79*, 1157–1164.
- [235] F. Carreiras, B. Thiebot, J. Leroy-Dudal, S. Maubant, M.-F. Breton, H. Darbeida, *Int. J. Cancer* **2002**, *99*, 800–808.
- [236] N. E. Tsopanoglou, P. Andriopoulou, M. E. Maragoudakis, *Am. J. Physiol.* **2002**, *283*, C1501–C1510.
- [237] M. A. Arnaout, *Immunol. Rev.* **2002**, *186*, 125–140.
- [238] J. Takagi, B. M. Petre, T. Walz, T. A. Springer, *Cell* **2002**, *110*, 599–611.
- [239] Übersichtsartikel zur Bindung endogener Liganden an Integrine: E. F. Plow, T. A. Haas, L. Zhang, J. Loftus, J. W. Smith, *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 21785–21788.
- [240] E. Ruoslahti, *Annu. Rev. Cell Biol.* **1996**, *12*, 697–715.
- [241] R. Haubner, R. Grätias, B. Diefenbach, S. L. Goodman, A. Jonczyk, H. Kessler, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 7461–7472.
- [242] R. Bruck, H. Shirin, R. Hershkoviz, O. Lider, G. Kenet, H. Aeed, Z. Matas, L. Zaidel, Z. Halpern, *Gut* **1997**, *40*, 133–138.
- [243] R. Pasqualini, E. Koivunen, E. Ruoslahti, *Nat. Biotechnol.* **1997**, *15*, 542–546.
- [244] A. Giannis, F. Rübsam, *Angew. Chem.* **1997**, *109*, 606–609; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1997**, *36*, 588–590.
- [245] E. Ruoslahti, *Kidney Int.* **1997**, *51*, 1413–1417.
- [246] K. Sunassee, R. Vile, *Curr. Biol.* **1997**, *7*, R282–R285.
- [247] C. D. Eldred, B. D. Judkins, *Prog. Med. Chem.* **1999**, *39*, 29–90.
- [248] C. D. Buckley, D. Pilling, N. V. Henriquez, G. Parsonage, K. Threlfall, D. Scheel-Toellner, D. L. Simmons, A. N. Akbar, J. M. Lord, M. Salmon, *Nature* **1999**, *397*, 534–539.
- [249] K. Kurohane, Y. Namba, N. Oku, *Life Sci.* **2000**, *68*, 273–281.
- [250] C. D. Anuradha, S. Kanno, S. Hirano, *Cell Biol. Toxicol.* **2000**, *16*, 275–283.
- [251] Y. Chen, X. Xu, S. Hong, J. Chen, N. Liu, C. B. Underhill, K. Creswell, L. Zhang, *Cancer Res.* **2001**, *61*, 2434–2438.
- [252] Y. Yamamoto, Y. Tsutsumi, T. Mayumi. *Curr. Drug Targets* **2002**, *3*, 123–130.
- [253] V. Brower, *Nat. Biotechnol.* **1999**, *17*, 963–968.
- [254] W. D. Klohs, J. M. Hamby, *Curr. Opin. Biotechnol.* **1999**, *10*, 544–549.
- [255] S. R. Kerbel, *Carcinogenesis* **2000**, *21*, 505–515.
- [256] R. D. Connell, J. S. Beebe, *Expert Opin. Ther. Pat.* **2001**, *11*, 1919–1945.
- [257] S. Madhusudan, A. L. Harris, *Curr. Opin. Pharmacol.* **2002**, *2*, 403–414.
- [258] W. W. Li, V. W. Li, D. Tsakayannis, *New Angioth.* **2002**, 547–571.
- [259] P. C. Brooks, S. Strömblad, L. C. Sanders, T. L. von Schalscha, R. T. Aimes, W. G. Stetler-Stevenson, J. P. Quigley, D. A. Cheresh, *Cell* **1996**, *85*, 683–693.
- [260] S. Silletti, D. A. Cheresh, *Fibrinolysis Proteolysis* **1999**, *13*, 226–238.
- [261] P. C. Brooks, S. Silletti, T. L. von Schalscha, M. Friedlander, D. A. Cheresh, *Cell* **1998**, *92*, 391–400.
- [262] R. O. Hynes, *Cell* **1992**, *69*, 11–25.
- [263] R. L. Juliano, S. Haskill, *J. Cell Biol.* **1993**, *120*, 577–585.
- [264] T. A. Springer, *Cell* **1994**, *76*, 301–314.
- [265] R. R. Lobb, M. E. Hemler, *J. Clin. Invest.* **1994**, *94*, 1722–1728.
- [266] M. Stewart, M. Thiel, N. Hogg, *Curr. Opin. Cell Biol.* **1995**, *7*, 690–696.
- [267] Y. Shimizu, D. M. Rose, M. H. Ginsberg, *Adv. Immunol.* **1999**, *72*, 325–380.
- [268] S. Liu, M. H. Ginsberg, *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 22736–22742.
- [269] S. Liu, S. M. Thomas, D. G. Woodside, D. M. Rose, W. B. Kiosses, M. Pfaff, M. H. Ginsberg, *Nature* **1999**, *402*, 676–681.
- [270] M. E. Hemler, P. D. Kassner, B. M. C. Chan, *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **1992**, *57*, 213–220.
- [271] K.-C. Lin, A. C. Castro, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **1998**, *2*, 453–457.
- [272] J. W. Tilley, A. Sidduri, *Drugs Future* **2001**, *26*, 985–998.
- [273] H. Yusuf-Makagiansar, M. E. Anderson, T. V. Yakovleva, J. S. Murray, T. J. Siahaan, *Med. Res. Rev.* **2002**, *22*, 146–167.
- [274] B. Amati, H. Land, *Curr. Opin. Genet. Dev.* **1994**, *4*, 102–108.
- [275] B. Amati, S. R. Frank, D. Donjerkovic, S. Taubert, *Biochim. Biophys. Acta* **2001**, *1471*, M135–M145.
- [276] L. Ratner, S. F. Josephs, F. Wong-Staal, *Annu. Rev. Microbiol.* **1985**, *39*, 419–449.
- [277] C. Lavielle, N. Modjtahedi, T. Lamonerie, T. Frebourg, R. M. Landin, N. Fossar, G. Lhomond, R. Cassingena, O. Brison, *Anticancer Res.* **1989**, *9*, 1265–1279.
- [278] J. K. Field, D. A. Spandidos, *Anticancer Res.* **1990**, *10*, 1–22.
- [279] K. B. Marcu, S. A. Bossone, A. J. Patel, *Annu. Rev. Biochem.* **1992**, *61*, 809–860.
- [280] M. Henriksson, B. Lüscher, *Adv. Cancer Res.* **1996**, *68*, 109–182.
- [281] B. Calabretta, T. Skorski, *Anti-Cancer Drug Des.* **1997**, *12*, 373–381.
- [282] R. Eisenman, *Genes Dev.* **2001**, *15*, 2023–2030.
- [283] W. Lutz, J. Leon, M. Eilers, *Biochim. Biophys. Acta* **2002**, *1602*, 61–71.
- [284] S. K. Oster, C. S. W. Ho, E. L. Soucie, L. Z. Penn, *Adv. Cancer Res.* **2002**, *84*, 81–154.
- [285] A. R. Ferré-d'Amaré, G. D. Prendergast, E. B. Ziff, S. K. Burley, *Nature* **1993**, *363*, 38–45.
- [286] P. Brownlie, T. A. Ceska, M. Lamers, C. Romier, G. Stier, H. Teo, D. Suck, *Structure* **1997**, *5*, 509–520.
- [287] G. C. Prendergast, D. Lawe, E. B. Ziff, *Cell* **1991**, *65*, 395–407.

- [288] E. M. Blackwood, R. N. Eisenman, *Science* **1991**, *251*, 1211–1217.
- [289] E. M. Blackwood, B. Lüscher, R. N. Eisenman, *Genes Dev.* **1992**, *6*, 71–80.
- [290] L. Kretzner, E. M. Blackwood, R. N. Eisenman, *Nature* **1992**, *359*, 426–429.
- [291] G. J. Kato, W. M. F. Lee, L. Chen, C. V. Dang, *Genes Dev.* **1992**, *6*, 81–92.
- [292] B. Amati, S. Dalton, M. W. Brooks, T. D. Littlewood, G. I. Evan, H. Land, *Nature* **1992**, *359*, 423–426.
- [293] B. Amati, M. W. Brooks, N. Levy, T. D. Littlewood, G. I. Evan, H. Land, *Cell* **1993**, *72*, 233–245.
- [294] B. Amati, T. D. Littlewood, G. I. Evan, H. Land, *EMBO J.* **1993**, *12*, 5083–5087.
- [295] M. Tsuneoka, F. Nakano, H. Ohgusu, E. Mekada, *Oncogene* **1997**, *14*, 2301–2311.
- [296] D. E. Ayer, L. Kretzner, R. N. Eisenman, *Cell* **1993**, *72*, 211–222.
- [297] A. S. Zervos, J. Gyuris, R. Brent, *Cell* **1993**, *72*, 223–232.
- [298] V. Korinek, N. Barker, P. J. Morin, D. van Wichen, R. de Weger, K. W. Kinzler, B. Vogelstein, H. Clevers, *Science* **1997**, *275*, 1784–1787.
- [299] J. Behrens, *Cancer Metastasis Rev.* **1999**, *18*, 15–30.
- [300] Q. Eastman, R. Grosschedl, *Curr. Opin. Cell Biol.* **1999**, *11*, 233–240.
- [301] A. Novak, S. Dedhar, *Cell. Mol. Life Sci.* **1999**, *56*, 523–537.
- [302] J. J. Love, X. Li, D. A. Case, K. Giese, R. Grosschedl, P. Wright, *Nature* **1995**, *376*, 791–795.
- [303] M. Aoki, A. Hecht, U. Kruse, R. Kemler, P. K. Vogt, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1999**, *96*, 139–144.
- [304] S. B. Krantz, *Blood* **1991**, *77*, 419–434.
- [305] M. J. Koury, M. C. Bondurant, *Eur. J. Biochem.* **1992**, *210*, 649–663.
- [306] H. Youssoufian, G. Longmore, D. Neumann, A. Yoshimura, H. F. Lodish, *Blood* **1993**, *81*, 2223–2236.
- [307] J. E. Damen, G. Krystal, *Exp. Hematol.* **1996**, *24*, 1455–1459.
- [308] P. Foa, *Acta Haematol.* **1991**, *86*, 162–168.
- [309] J. W. Fisher, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **1997**, *216*, 358–369.
- [310] O. Ifudu, *Nephron* **2001**, *88*, 1–5.
- [311] J. Seidenfeld, M. Piper, C. Flamm, V. Hasselblad, J. O. Armitage, C. L. Bennett, M. S. Gordon, A. E. Lichtin, J. L. Wade III, S. Woolf, N. Aronson, *J. Natl. Cancer Inst.* **2001**, *93*, 1204–1214.
- [312] M. Mittelman, D. Neumann, A. Peled, P. Kanter, N. Haran-Ghera, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2001**, *98*, 5181–5186.
- [313] S. S. Watowich, A. Yoshimura, G. D. Longmore, D. J. Hilton, Y. Yoshimura, H. F. Lodish, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1992**, *89*, 2140–2144.
- [314] J. S. Philo, K. H. Aoki, T. Arakawa, L. O. Narhi, J. Wen, *Biochemistry* **1996**, *35*, 1681–1691.
- [315] D. J. Matthews, R. S. Topping, R. T. Cass, L. B. Giebel, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1996**, *93*, 9471–9476.
- [316] S. J. Frank, *Endocrinology* **2002**, *143*, 2–10.
- [317] M. A. Lemmon, J. Schlessinger, *Trends Biochem. Sci.* **1994**, *19*, 459–463.
- [318] B. A. Witthuhn, F. W. Quelle, O. Silvennoinen, T. Yi, B. Tang, O. Miura, J. N. Ihle, *Cell* **1993**, *74*, 227–236.
- [319] N. C. Wrighton, F. X. Farrell, R. Chang, A. K. Kashyap, F. P. Barbone, L. S. Mulcahy, D. L. Johnson, R. W. Barrett, L. K. Jolliffe, W. J. Dower, *Science* **1996**, *273*, 458–463.
- [320] D. L. Johnson, F. X. Farrell, F. P. Barbone, F. J. McMahon, J. Tullai, D. Kroon, J. Freedy, R. A. Zivin, L. S. Mulcahy, L. K. Jolliffe, *Chem. Biol.* **1997**, *4*, 939–950.
- [321] O. Livnah, E. A. Stura, D. L. Johnson, S. A. Middleton, L. S. Mulcahy, N. C. Wrighton, W. J. Dower, L. K. Jolliffe, I. A. Wilson, *Science* **1996**, *273*, 464–471.
- [322] I. a. Wilson, L. K. Jolliffe, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **1999**, *9*, 696–702.
- [323] A. M. de Vos, M. Ultsch, A. A. Kossiakoff, *Science* **1992**, *255*, 306–312.
- [324] W. Somers, M. Ultsch, A. M. de Vos, A. A. Kossiakoff, *Nature* **1994**, *372*, 478–481.
- [325] B. C. Cunningham, M. Ultsch, A. M. de Vos, M. G. Mulkerrin, K. R. Clauser, J. A. Wells, *Science* **1991**, *254*, 821–825.
- [326] G. Fuh, B. C. Cunningham, R. Fukunaga, S. Nagata, D. V. Goeddel, J. A. Wells, *Science* **1992**, *256*, 1677–1680.
- [327] B. C. Cunningham, J. A. Wells, *J. Mol. Biol.* **1993**, *234*, 554–563.
- [328] J. A. Wells, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1996**, *93*, 1–6.
- [329] N. J. Skelton, S. Russell, F. de Sauvage, A. G. Cochran, *J. Mol. Biol.* **2002**, *316*, 1111–1125.
- [330] S. A. Qureshi, R. M. Kim, Z. Konteatis, D. E. Biazzo, H. Motamedi, R. Rodrigues, J. A. Boice, J. R. Calaycay, M. A. Bednarek, P. Griffin, Y.-D. Gao, K. Chapman, D. F. Mark, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1999**, *96*, 12156–12161.
- [331] O. Livnah, D. L. Johnson, E. A. Stura, F. X. Farrell, F. P. Barbone, Y. You, K. D. Liu, M. A. Goldsmith, W. He, C. D. Krause, S. Pestka, L. K. Jolliffe, I. A. Wilson, *Nat. Struct. Biol.* **1998**, *5*, 993–1004.
- [332] O. Livnah, E. A. Stura, S. A. Middleton, D. L. Johnson, L. K. Jolliffe, I. A. Wilson, *Science* **1999**, *283*, 987–990.
- [333] R. S. Syed, S. W. Reid, C. Li, J. C. Cheetham, K. H. Aoki, B. Liu, H. Zhan, T. D. Osslund, A. J. Chirino, J. Zhang, J. Finer-Moore, S. Elliott, K. Sitney, B. A. Katz, D. J. Matthews, J. J. Wendoloski, J. Egrie, R. M. Stroud, *Nature* **1998**, *395*, 511–516.
- [334] I. Remy, I. A. Wilson, S. W. Michnick, *Science* **1999**, *283*, 990–993.
- [335] Y. Choo, I. Sánchez-García, A. Klug, *Nature* **1994**, *372*, 642–645.
- [336] S. Neidle, D. E. Thurston in *New Targets for Cancer Chemotherapy* (Hrsg.: D. J. Kerr, P. Workman), CRC Press, Boca Raton, FL, **1994**.
- [337] S. Neidle, *Anti-Cancer Drug Des.* **1997**, *12*, 433–442.
- [338] M. Mrksich, M. E. Parks, P. B. Dervan, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 7983–7988.
- [339] J. W. Trauger, E. E. Baird, P. B. Dervan, *Nature* **1996**, *382*, 559–561.
- [340] D. Mercola, J. S. Cohen, *Cancer Gene Ther.* **1995**, *2*, 47–59.
- [341] M. J. Browne, P. L. Thurlbey, *Genomes, Molecular Biology and Drug Discovery*, Academic Press, London, **1996**.
- [342] H. Knudsen, P. E. Nielsen, *Nucleic Acids Res.* **1996**, *24*, 494–500.
- [343] L. Good, P. E. Nielsen, *Antisense Nucleic Acid Drug Dev.* **1997**, *7*, 431–437.
- [344] A. J. Gutierrez, M. D. Matteucci, D. Grant, A. Matsumura, R. W. Wagner, B. C. Froehler, *Biochemistry* **1997**, *36*, 743–748.
- [345] G. W. Shipps, Jr., K. E. Pryor, J. Xian, D. A. Skyler, E. H. Davidson, J. Rebek, Jr., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1997**, *94*, 11833–11838.
- [346] B. Klekota, M. H. Hammond, B. L. Miller, *Tetrahedron Lett.* **1997**, *38*, 8639–8642.
- [347] B. Klekoka, B. L. Miller, *Tetrahedron* **1999**, *55*, 11687–11697.
- [348] G. Werstuck, M. R. Green, *Science* **1998**, *282*, 296–298.
- [349] T. Lescrinier, C. Hendrix, L. Kerremans, J. Rozenski, A. Link, B. Samyn, A. Van Aerschot, E. Lescrinier, R. Eritja, J. Van-Beeumen, P. Herdewijn, *Chem. Eur. J.* **1998**, *4*, 425–433.
- [350] C. Bailly, J. B. Chaires, *Bioconjugate Chem.* **1998**, *9*, 513–538.
- [351] S.-Y. Chiang, J. C. Azizkhan, T. A. Beerman, *Biochemistry* **1998**, *37*, 3109–3115.
- [352] D. E. Thurston, *Br. J. Cancer* **1999**, *80*, 65–85 (Suppl. 1).
- [353] A. Simoncsits, M.-L. Tjornhammar, S. Wang, S. Pongor, *Genetica* **1999**, *106*, 85–92.
- [354] C. M. Drain, X. Gong, V. Ruta, C. E. Soll, P. F. Chicoineau, *J. Comb. Chem.* **1999**, *1*, 286–290.

- [355] V. M. Guelev, M. T. Harting, R. S. Lokey, B. L. Iverson, *Chem. Biol.* **2000**, *7*, 1–8.
- [356] Md. R. Alam, M. Maeda, S. Sasaki, *Bioorg. Med. Chem.* **2000**, *8*, 465–473.
- [357] Wechselwirkungen zwischen DNA und Wirkstoffen: *Methods in Molecular Biology*, Vol. 90 (Hrsg.: K. R. Fox), Humana Press, Totowa, NJ, **1997**.
- [358] H. R. Drew, A. A. Travers, *Cell* **1984**, *37*, 491–502.
- [359] P. Hardenbol, J. C. Wang, M. W. Van Dyke, *Bioconjugate Chem.* **1997**, *8*, 616–620.
- [360] J.-B. LePecq, C. Paoletti, *J. Mol. Biol.* **1967**, *27*, 87–106.
- [361] B. S. P. Reddy, S. M. Sondhi, J. W. Lown, *Pharmacol. Ther.* **1999**, *84*, 1–111.
- [362] S. Neidle, *Nat. Prod. Rep.* **2001**, *18*, 291–309.
- [363] P. B. Dervan, *Bioorg. Med. Chem.* **2001**, *9*, 2215–2235.
- [364] J. W. Trauger, E. E. Baird, M. Mrksich, P. B. Dervan, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 6160–6166.
- [365] R. P. Lamamie de Clairac, C. J. Seel, B. H. Geierstanger, M. Mrksich, E. E. Baird, P. B. Dervan, D. E. Wemmer, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 2956–2964.
- [366] J. W. Trauger, E. E. Baird, P. B. Dervan, *Nature* **1996**, *382*, 559–561.
- [367] L. A. Dickinson, R. J. Gulizia, J. W. Trauger, E. E. Baird, D. E. Mosier, J. M. Gottesfeld, P. B. Dervan, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1998**, *95*, 12890–12895.
- [368] Übersichtsartikel: a) L. H. Caporale, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1995**, *92*, 75–82; b) R. P. Borris, *J. Ethnopharmacol.* **1996**, *51*, 29–38; c) D. G. I. Kingston in *The Practice of Medicinal Chemistry* (Hrsg.: C. G. Wermuth), Academic Press, London **1996**, S. 101–116; d) G. M. Cragg, D. J. Newman, K. M. Snader, *J. Nat. Prod.* **1997**, *60*, 52–60; e) D. J. Newman, G. M. Cragg, K. M. Snader, *Nat. Prod. Rep.* **2000**, *17*, 215–234; f) Y.-Z. Shu, *J. Nat. Prod.* **1998**, *61*, 1053–1071; g) C. A. Montanari, V. da S. Bolzani, *Quim. Nova* **2001**, *24*, 105–111; h) A. B. Da Rocha, R. M. Lopes, G. Schwartzmann, *Curr. Opin. Pharmacol.* **2001**, *1*, 364–369; i) J. Mann, *Nat. Rev. Cancer* **2002**, *2*, 143–148.
- [369] P. Arya, R. Joseph, D. T. H. Chou, *Chem. Biol.* **2002**, *9*, 145–156.
- [370] a) J. Green, *J. Org. Chem.* **1995**, *60*, 4287–4290; b) R. Devraj, M. Cushman, *J. Org. Chem.* **1996**, *61*, 9368–9373.
- [371] J. Nielsen, L. O. Lyngso, *Tetrahedron Lett.* **1996**, *37*, 8439–8442.
- [372] a) T. C. Norman, N. S. Gray, J. T. Koh, P. G. Schultz, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 7430–7431; b) N. S. Gray, L. Wodicka, A.-M. W. H. Thunnissen, T. C. Norman, S. Kwon, F. Herman Espinoza, D. O. Morgan, G. Barnes, S. LeClerc, L. Meijer, S.-H. Kim, D. J. Lockhart, P. G. Schultz, *Science* **1998**, *281*, 533–538; c) J. I. Armstrong, A. R. Portley, Y.-T. Chang, D. M. Nierengarten, B. N. Cook, K. G. Bowman, A. Bishop, N. S. Gray, K. M. Shokat, P. G. Schultz, C. R. Bertozzi, *Angew. Chem.* **2000**, *112*, 1359–1362; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000**, *39*, 1303–1306; d) Y.-T. Chang, N. S. Gray, G. R. Rosania, T. C. Kwon, R. Sarohira, M. Leost, L. Meijer, P. G. Schultz, *Chem. Biol.* **1999**, *6*, 361–375; e) G. R. Rosania, Y.-T. Chang, O. Perez, D. Sutherland, H. Dong, D. J. Lockhart, P. G. Schultz, *Nat. Biotechnol.* **2000**, *18*, 304–308.
- [373] A. Atubega, D. Maclean, C. Nguyen, E. M. Gordon, J. W. Jacobs, *Bioorg. Med. Chem.* **1996**, *4*, 1097–1106.
- [374] a) K. C. Nicolaou, N. Winssinger, J. Pastor, S. Ninkovic, F. Sarabia, Y. He, D. Vourloumis, Z. Yang, T. Li, P. Giannakakou, E. Hamel, *Nature* **1997**, *387*, 268–272; b) K. C. Nicolaou, D. Vourloumis, T. Li, J. Pastor, N. Winssinger, Y. He, S. Ninkovic, F. Sarabia, H. Vallberg, F. Roschangar, N. P. King, M. R. V. Finlay, P. Giannakakou, P. Verdier-Pinard, E. Hamel, *Angew. Chem.* **1997**, *109*, 2181–2187; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1997**, *36*, 2097–2103.
- [375] a) S. Chen, K. D. Janda, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 8724–8725; b) S. Chen, K. D. Janda, *Tetrahedron Lett.* **1998**, *39*, 3943–3946; c) K. J. Lee, A. Angulo, P. Ghazal, K. D. Janda, *Org. Lett.* **1999**, *1*, 1859–1862; d) J. A. López-Pelegrín, K. D. Janda, *Chem. Eur. J.* **2000**, *6*, 1917–1922.
- [376] X. Y. Xiao, Z. Parandoosh, M. P. Nova, *J. Org. Chem.* **1997**, *62*, 6029–6033.
- [377] T. R. Marsh, M. Bradley, S. J. Teague, *J. Org. Chem.* **1997**, *62*, 6199–6203.
- [378] K. C. Nicolaou, N. Winssinger, J. Pastor, F. Murphy, *Angew. Chem.* **1998**, *110*, 2677–2680; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, *37*, 2534–2537.
- [379] M. F. Gordeev, G. W. Luehr, H. C. Hui, E. M. Gordon, D. V. Patel, *Tetrahedron* **1998**, *54*, 15879–15890.
- [380] M. Marder, H. Viola, J. A. Bacigaluppo, M. I. Colombo, C. Wasowski, C. Wolfman, J. H. Medina, E. A. Ruveda, A. C. Paladini, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1998**, *249*, 481–485.
- [381] K. C. Nicolaou, J. Pastor, N. Winssinger, F. Murphy, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 5132–5133.
- [382] a) K. C. Nicolaou, N. Winssinger, D. Vourloumis, T. Ohshima, S. Kim, J. Pfefferkorn, J.-Y. Xu, T. Li, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 10814–10826; b) K. C. Nicolaou, S. Kim, J. A. Pfefferkorn, J. Xu, T. Ohshima, S. Hosokawa, D. Vourloumis, T. Li, *Angew. Chem.* **1998**, *110*, 1484–1487; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, *37*, 1418–1421.
- [383] L. Bhat, Y. Liu, S. F. Victory, R. H. Himes, G. I. Georg, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1998**, *8*, 3181–3186.
- [384] a) D. R. Dragoli, L. A. Thompson, J. O'Brien, J. A. Ellman, *J. Comb. Chem.* **1999**, *1*, 534–539; b) L. A. Thompson, F. L. Moore, Y.-C. Moon, J. A. Ellman, *J. Org. Chem.* **1998**, *63*, 2066–2067.
- [385] A. V. Loevezijn, J. H. V. Maarseveen, K. Stegman, G. M. Visser, G.-J. Koomen, *Tetrahedron Lett.* **1998**, *39*, 4737–4740.
- [386] B. Meseguer, D. Alonso-Díaz, N. Griebenow, T. Herget, H. Waldmann, *Angew. Chem.* **1999**, *111*, 3083–3087; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, *38*, 2902–2906.
- [387] H. Doi, I. Hijikuro, T. Takahashi, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 6749–6750.
- [388] R. A. Fecik, K. E. Frank, E. J. Gentry, L. A. Mitscher, M. Shibata, *Pure Appl. Chem.* **1999**, *71*, 559–564.
- [389] R. Xu, G. Greiveldinger, L. E. Marenus, A. Cooper, J. A. Ellman, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 4898–4899.
- [390] C. W. Lindsey, L. K. Chan, B. C. Goess, R. Joseph, M. D. Shair, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 422–423.
- [391] H. Wang, A. Ganesan, *J. Comb. Chem.* **2000**, *2*, 186–194.
- [392] a) K. C. Nicolaou, J. A. Pfefferkorn, A. J. Roecker, G.-Q. Cao, S. Barluenga, H. J. Mitchell, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 9939–9953; b) K. C. Nicolaou, J. A. Pfefferkorn, H. J. Mitchell, A. J. Roecker, S. Barluenga, G.-Q. Cao, R. I. Affleck, J. E. Lillig, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 9954–9967; c) K. C. Nicolaou, J. A. Pfefferkorn, S. Barluenga, H. J. Mitchell, A. J. Roecker, G.-Q. Cao, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 9968–9976.
- [393] R. Maltais, M. R. Tremblay, D. Poirier, *J. Comb. Chem.* **2000**, *2*, 604–614.
- [394] P. Wipf, J. T. Reeves, R. Balachandran, K. A. Giuliano, E. Hamel, B. W. Day, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 9391–9395.
- [395] M. B. Andrus, T. M. Turner, Z. E. Sauna, S. V. Ambudkar, *J. Org. Chem.* **2000**, *65*, 4973–4983.
- [396] a) O. de Frutos, D. P. Curran, *J. Comb. Chem.* **2000**, *2*, 639–649; b) W. Zhang, Z. Luo, C. H. Chen, D. P. Curran, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 10443–10450.
- [397] H. E. Pelish, N. J. Westwood, Y. Feng, T. Kirchhausen, M. D. Shair, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 6740–6741.
- [398] R. A. Davis, A. R. Carroll, R. J. Quinn, *Aust. J. Chem.* **2001**, *54*, 355–359.
- [399] I. Hijikuro, T. Doi, T. Takahashi, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 3716–3722.
- [400] T. Hanazawa, T. Wada, T. Masuda, S. Okamoto, F. Sato, *Org. Lett.* **2001**, *3*, 3975–3977.

- [401] K. C. Nicolaou, R. Hughes, J. A. Pfefferkorn, S. Barluena, A. J. Roecker, *Chem. Eur. J.* **2001**, *7*, 4280–4295.
- [402] C. Herman, C. Giammasi, A. Geyer, M. E. Maier, *Tetrahedron* **2001**, *57*, 8999–9010.
- [403] a) P. Stahl, L. Kissau, R. Mazitschek, A. Huwe, P. Furet, A. Giannis, H. Waldmann, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 11586–11593; b) P. Stahl, L. Kissau, R. Mazitschek, A. Giannis, H. Waldmann, *Angew. Chem.* **2002**, *114*, 1222–1226; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 1174–1178.
- [404] R. Maltais, V. Luu-The, D. Poirier, *J. Med. Chem.* **2002**, *45*, 640–653.
- [405] Y.-T. Chang, J. Choi, S. Ding, E. E. Prieschl, T. Baumruker, J.-M. Lee, S.-K. Chung, P. G. Schultz, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 1856–1857.
- [406] D. Brohm, S. Metzger, A. Bhargava, O. Muller, F. Lieb, H. Waldmann, *Angew. Chem.* **2002**, *114*, 319–323; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 307–311.
- [407] Übersichtsartikel: a) D. G. I. Kingston, D. J. Newman, *Curr. Opin. Drug Discovery Dev.* **2002**, *5*, 304–316; b) J. Nielsen, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2002**, *6*, 297–305; c) S. P. Manly, R. Padmanabha, S. E. Lowe, *Methods Mol. Biol.* **2002**, *190*, 153–168; d) T. Paululat, Y.-Q. Tang, S. Grabley, R. Thiericke, *Chim. Oggi* **1999**, *17*, 52–56; e) S. Bertels, S. Frommann, G. Jas, K. U. Bindseil, *Drug Discovery from Nature*, Springer, Berlin, **1999**, S. 72–105; f) L. A. Wessjohann, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2000**, *4*, 303–309; g) D. G. Hall, S. Manku, F. Wang, *J. Comb. Chem.* **2001**, *3*, 125–150; h) K. C. Nicolaou, J. A. Pfefferkorn, *Biopolymers* **2001**, *60*, 171–193; i) U. Abel, C. Koch, M. Speitling, F. G. Hannske, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2002**, *6*, 453–458.
- [408] a) C. A. Foster, M. Dreyfuss, B. Mandak, J. G. Meingassner, H. U. Naegeli, A. Nussbaumer, L. Oberer, G. Scheel, E.-M. Swoboda, *J. Dermatol.* **1994**, *21*, 847–854; b) U. Hommel, H.-P. Weber, L. Oberer, H. U. Naegeli, B. Oberhauser, C. A. Foster, *FEBS Lett.* **1996**, *379*, 69–73.
- [409] H. Itazaki, T. Fujiwara, A. Sato, Y. Kawamura, K. Matsumoto, JP 07109299, **1995**.
- [410] a) D. Thanos, T. Maniatis, *Cell* **1995**, *80*, 529–532; b) T. Collins, M. A. Read, A. S. Neish, M. Z. Whitley, D. Thanos, T. Maniatis, *FASEB J.* **1995**, *9*, 899–909; c) M. J. May, S. Ghosh, *Immunol. Today* **1998**, *19*, 80–88.
- [411] a) J. M. Glover, J. M. Leeds, T. G. K. Mant, D. Amin, D. L. Kisner, J. E. Zuckerman, R. S. Geary, A. A. Levin, W. R. Shanahan, Jr., *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1997**, *282*, 1173–1180; b) B. R. Yacyshyn, M. B. Bowen-Yacyshyn, L. Jewell, J. A. Tami, C. F. Bennett, D. L. Kisner, W. R. Shanahan, Jr., *Gastroenterology* **1998**, *114*, 1133–1142.
- [412] A. F. Kavanaugh, H. Schulze-Koops, L. S. Davis, P. E. Lipsky, *Arthritis Rheum.* **1997**, *40*, 849–853.
- [413] a) D. H. Boschelli, J. B. Kramer, S. S. Khatana, R. J. Sorenson, D. T. Connor, M. A. Ferin, C. D. Wright, M. E. Lesch, K. Imre, G. C. Okonkwo, D. J. Schrier, M. C. Conroy, E. Ferguson, J. Woelle, U. Saxena, *J. Med. Chem.* **1995**, *38*, 4597–4614; b) D. H. Boschelli, D. T. Connor, M. E. Lesch, D. J. Schrier, *Bioorg. Med. Chem.* **1996**, *4*, 557–562.
- [414] R. W. Sullivan, C. G. Bigam, P. E. Erdman, M. S. S. Palanki, D. W. Anderson, M. E. Goldman, L. J. Ransone, M. J. Suto, *J. Med. Chem.* **1998**, *41*, 413–419.
- [415] A. O. Stewart, P. A. Bhatia, C. M. McCarty, M. V. Patel, M. A. Staeger, D. L. Arendsen, I. W. Gunawardana, L. M. Melcher, G.-D. Zhu, S. A. Boyd, D. G. Fry, B. L. Cool, L. Kifle, K. Lartey, K. C. Marsh, A. J. Kempf-Grote, P. Kilgannon, W. Wisdom, J. Meyer, W. M. Gallatin, G. F. Okasinski, *J. Med. Chem.* **2001**, *44*, 988–1002.
- [416] E. Di Cera, *Adv. Protein Chem.* **1998**, *51*, 59–119, zit. Lit.
- [417] D. D. Ryu, D. H. Nam, *Biotechnol. Prog.* **2000**, *16*, 2–16.
- [418] H. Lin, V. W. Cornish, *Angew. Chem.* **2002**, *114*, 4580–4606; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 4402–4425.