

Naturstoffgetriebene Kombinatorische Chemie

Herbert Waldmann, Rolf Breinbauer, Marcus A. Koch, Max-Planck-Institut

für molekulare Physiologie und Institut für Organische Chemie, Universität Dortmund

► Nicht die Größe, sondern die Qualität einer Substanzbibliothek entscheidet über die Trefferquote bei der Suche nach Leitstrukturen zur Wirkstoffentwicklung. Warum also nicht gleich mit den Kandidaten starten, die uns die Natur bereits in der Evolution vorselektiert hat? Zur kombinatorischen Variation bieten sich die Grundgerüste von Naturstoffen an, die an Proteindomänen mit wichtigen biologischen Funktionen binden.

Grundlegende Ziele der modernen chemisch-biologischen und medizinisch-chemischen Forschung sind, die zellulären Prozesse auf molekularer Ebene vollständig zu verstehen und die Funktion aller Proteine durch kleine Moleküle zu beeinflussen. Der traditionelle Weg der Organischen Synthese, bei dem solche kleine Moleküle einzeln, dafür aber in großer Substanzmenge synthetisiert wurden, erwies sich als zu ineffizient und zu langsam, um die Kapazitäten von Hochdurchsatz-Screening-Systemen zu füllen. Die Entwicklung neuer Techniken, insbesondere der Festphasensynthese und der automatisierten Parallelisierung von Syntheseschritten, vereint mit kombinatorischen Methoden, erbrachte den erwünschten Effizienzgewinn. Schon bald wurden die ersten Substanzbibliotheken mit mehr als einer Million Verbindungen um einfache chemische Strukturen synthetisiert, von denen man erwartete, dass sie das schwierige Problem der Leitstruktursuche bei der Wirkstofffindung lösen werden. Doch deren Trefferrate beim Hochdurchsatz-Screening war enttäuschend. Offensichtlich waren die den einzelnen Verbindungen aus den Bibliotheken zu Grunde liegenden Strukturen biologisch nicht relevant. Für das Design von Bibliotheken der zweiten Generation gilt es daher, Konzepte zur Identifizierung im Strukturraum schon biologisch validierter Strukturklassen zu entwickeln, die synthetisch zugänglich sind und kombinatorisch modifiziert werden können. Hierfür kommen die Gerüste von biologisch aktiven Naturstoffen in Frage.

Über Millionen von Jahren hat die Natur kleine Moleküle entwickelt (Naturstoffe), die von Organismen für bestimmte biologische Vorgänge genutzt werden, z. B. für die Verteidigung gegen andere Organismen oder die Kommunikation zwischen Zellen und Organen. Einige dieser aus Pflanzen, Pilzen oder Tieren isolierten Naturstoffe (z. B. Cyclosporin, Taxol, Morphin) zeigen neben ihrer ursprünglichen Funktion zusätzlich ei-

ne nicht verwandte Wirkung in Menschen, die u. a. für die Behandlung von Herz-Kreislauf-Krankheiten, Krebs oder zur Linderung von Schmerz ausgenutzt wird. Dabei dienen diese Naturstoffe also nicht nur als Liganden für ihre ursprünglichen Zielproteine, sondern binden auch an menschliche Proteine, um ihre pharmakologische Wirkung auszuüben. Diese alte, aber trotzdem erstaunliche Beobachtung kann durch aktuelle Ergebnisse der Sequenzier-Projekte und aus der Strukturbioogie verstanden werden.^[1]

Proteine können als modular aufgebaute Biomoleküle betrachtet werden, die aus individuellen Domänen zusammengesetzt sind. Domänen sind strukturell konservierte Einheiten, die aber genetisch mobil sein können. Heute herrscht Einigkeit darüber, dass die Zahl der Domänenfamilien und – noch ausgeprägter – die der topologisch unterschiedlichen Faltungstypen viel kleiner sein wird als die Gesamtzahl aller Proteine.

Man schätzt, dass bei bis zu 450,000 menschlichen Proteinen die Natur nur 600–8,000 verschiedene Faltungstypen und 4,000–60,000 Sequenzfamilien verwirklicht hat, wobei die weit überwiegende Mehrzahl der Proteinfamilien nur ca. 1000 Faltungstypen aufweist. Viele Beispiele belegen, dass Proteinfamilien, obwohl sie auf den ersten Blick vollkommen verschiedene Sequenzen haben und/oder ganz verschiedene chemische Reaktionen katalysieren, trotzdem ähnlichen Faltungstypen angehören können, da sie aus denselben Vorläufern hervorgegangen sind und noch immer ähnliche Liganden binden können. Dabei können die Reste im aktiven Zentrum unterschiedlich angeordnet sein. Ein eindrucksvolles Beispiel für dieses Prinzip ist die Leukotrien- A_4 -Hydrolase, die zum einen die vinyloge Hydrolyse des Leukotrienepoxids LTA₄ zu LTB₄ katalysiert und an inflammatorischen Prozessen beteiligt ist, und zum anderen zusätzlich Aminopeptidase-Aktivität zeigt. Der LTA₄H-Faltungstyp ist evolutiv und strukturell zu dem der M1-Metalloproteasen (u.a. Thermolysin) verwandt, obwohl die Sequenzidentität nur 7 % beträgt.^[2] Diese Verwandtschaft wurde für die Inhibitorsuche ausgenutzt.^[3] In der Tat inhibieren der natürliche Aminopeptidase-Inhibitor Besta-

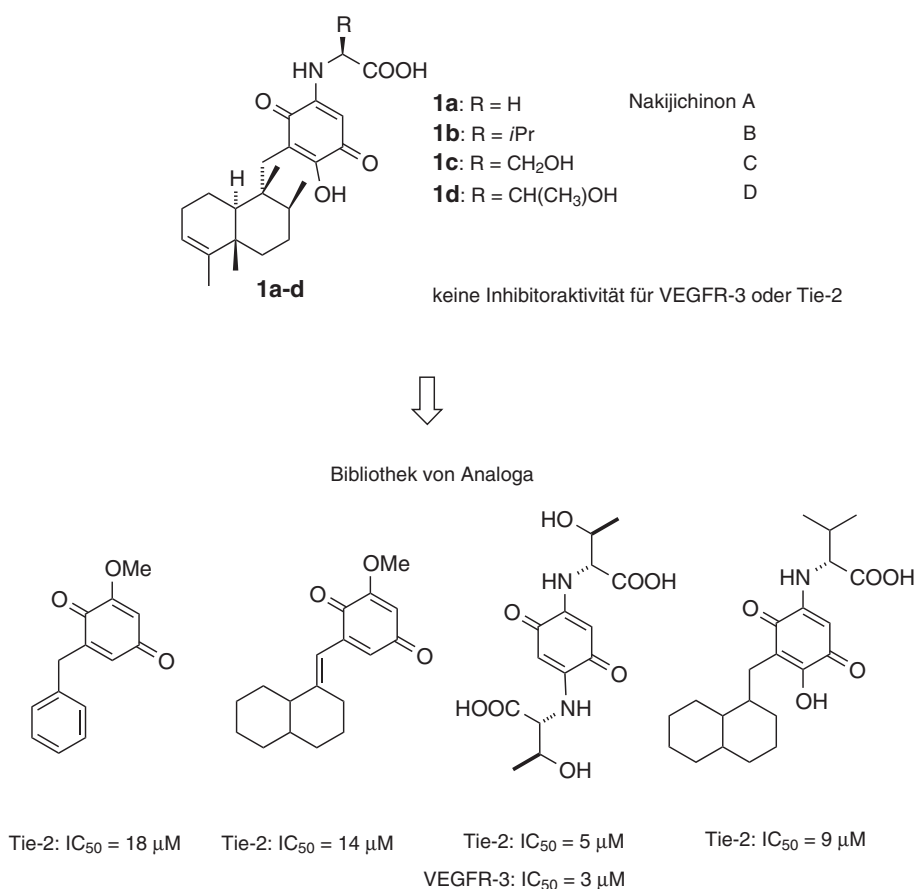


Abb. 1: Biologisch wirksame Verbindungen einer Nakijichinon-Analoga-Bibliothek

tin und Captopril, ein Inhibitor der Metallopeptidase Angiotensin-Converting-Enzym, die LTA4H-Hydrolase.

Ein solcher auf Sequenz- und Strukturanalyse basierender Ansatz eröffnet eine Möglichkeit, den Prozess von der Genidentifizierung bis zum Auffinden der Leitstruktur signifikant zu verkürzen.^[1] Legt die Analyse eines neu entdeckten Gens mit Hilfe der Bioinformatik nahe, dass das entsprechende Protein ein Multidomänenprotein ist, das sich aus bekannten Domänen zusammensetzt, und stehen für die Domänen schon Liganden zur Verfügung, dann könnten diese als Startpunkte für das Design und die Synthese von Verbindungsbibliotheken dienen. Diese Art der Analyse setzt allerdings voraus, dass die divergente Evolution der betrachteten Proteine nicht zu weit fortgeschritten ist und somit die Ähnlichkeiten in den Bindungstaschen nicht verloren gegangen sind.

Bibliotheken, die um das Grundgerüst von Naturstoffen geplant und synthetisiert werden, sollten bei einer signifikant reduzierten Größe Modulatoren der Proteinaktivität mit einer höheren Trefferquote und von höherer, weil biologisch vorvalidierter Qualität liefern. Innerhalb einer Gruppe von eng verwandten Proteindomänen weisen die Details der Struktur innerhalb der Bindungstasche üblicherweise substantielle Variationen auf, die die Basis für selektive Bindung und Inhibierung bilden (z. B. in der ATP-Bindungstasche von Proteinkinase). Dieser biologischen Diversität ist daher eine synthetisch-chemische gegenüberzustellen, d. h. die Stereochemie und die Ausstattung des Grundgerüsts mit funktionellen Gruppen müssen variiert werden.

Die Tragfähigkeit dieses Ansatzes wurde an Hand der Nakijichinone (1a-d) (Abb. 1) belegt, natürlich vorkommende Inhibitoren der Her-2/Neu-Rezeptor-Tyrosinkinase, die in über 30% aller primären Brust-, Eierstock- und Magenkarzinome überexprimiert wird. Im Hinblick auf den zuvor ausgeführten Ansatz wurde eine Bibliothek von 56 Analoga dieser Leitstruktur synthetisiert und auf inhibitorische Aktivität gegenüber anderen Rezeptor-Tyrosin-Kinasen geprüft, die eine Rolle in der zellulären Signaltransduktion und Proliferation spielen (Abb. 1).^[4] Obwohl keiner der Naturstoffe signifikante inhibitorische Aktivität gegenüber dem neuen Satz an Rezeptorkinasen zeigte, erwiesen sich sechs Verbindungen der Bibliothek als Kinaseinhibitoren im niederen mikromolekularen Bereich. Insbesondere konnten die ersten Inhibitoren für die Tie-2- und VEGFR-3-Rezeptorkinasen identifiziert werden, die eine Regulation der Blut- und Lymphgefäßbildung und damit in der Krebsentwicklung spielen (Abb. 2). Diese Ergebnis-

se unterstreichen die Notwendigkeit, kombinatorische Bibliotheken auf der Basis von Naturstoffen aufzubauen, anstatt nur die Naturstoffe selbst zu nützen. Beim Screening mit den natürlichen Substanzen allein wären diese Inhibitoren nicht gefunden worden.

Aufgrund der Domänen-Architektur von Proteinen und der evolutionären Beziehungen innerhalb dieser Domänen darf vermutet werden, dass eine Reihe weiterer privilegierter Strukturen gefunden werden wird. Die Natur hat durch einen evolutionären Prozess im chemischen Strukturraum biologisch validierte Startpunkte identifiziert, die als Startpunkt für das Design von kombinatorischen Bibliotheken dienen können. Wenn die Effizienz der Festphasensynthese mit den beträchtlichen Erkenntnissen der Bioinformatik und der Strukturbiologie vereint werden, dann sollten die ursprünglichen Erwartungen der Kombinatorischen Chemie bald Realität werden.

Literatur

- [1] Für einen ausführlichen Übersichtsartikel: **Breinbauer, R.; Vetter, I. R.; Waldmann, H.** *Angew. Chem. Int. Ed.* 41, 2878–2890 (2002).
- [2] **Thunissen, M. G. M.; Nordlung, P.; Haeggström, J. Z.** *Nature Struct. Biol.* 8, 131–135 (2001).
- [3] **Orning, L.; Krivi, G.; Fitzpatrick, R. A.** *J. Biol. Chem.* 266, 1375–1378 (1991).
- [4] a) **Stahl, P.; Kissau, L.; Mazitschek, R.; Huwe, A.; Furet, P.; Giannis, A.; Waldmann, H.** *J. Am. Chem. Soc.* 123, 11586–11593 (2001); b) **Stahl, P.; Kissau, L.; Mazitschek, R.; Giannis, A.; Waldmann, H.** *Angew. Chem. Int. Ed.* 41, 1174–1178 (2002).

Korrespondenzadresse:

Prof. Dr. Herbert Waldmann
 Max-Planck-Institut für molekulare Physiologie
 und Institut für Organische Chemie, Universität
 Dortmund
 Otto-Hahn-Str. 11
 D-44227 Dortmund
 Tel.: 0231-133 2400
 Fax: 0231-133 2499
Herbert.waldmann@mpi-dortmund.mpg.de

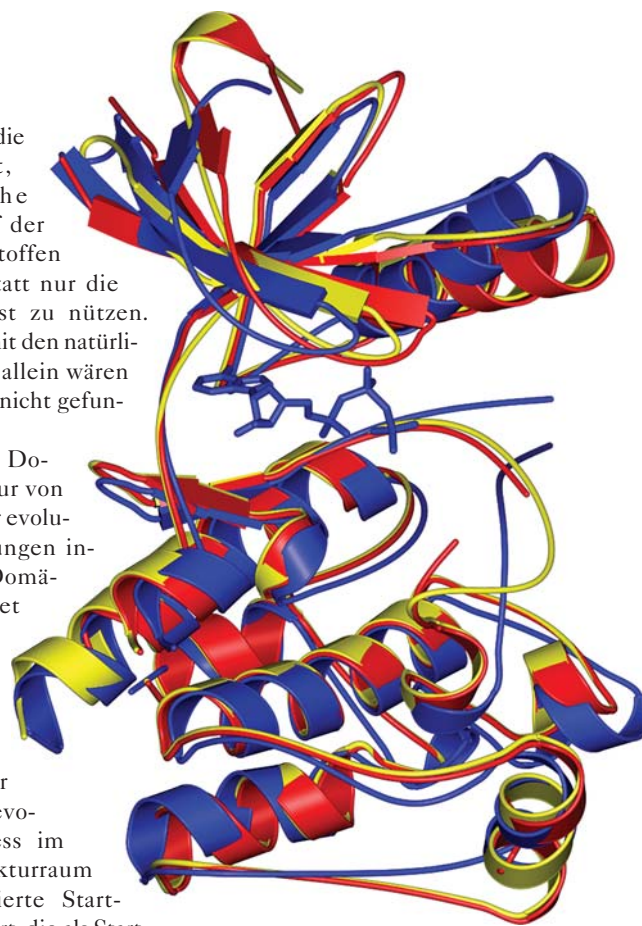


Abb. 2: Überlagerung der Strukturen der Rezeptorkinasen, die durch die Nakijichinon-basierte Bibliothek inhibiert werden.