

BMBF-Förderprogramm „Molekulare Naturstoffforschung“

Verbundprojekt „Steuerung des Immunsystems durch spezifische Modulatoren geringer Molekülmasse“ (Förderkennzeichen 0312231)

ASTA Medica AG/Zentaris GmbH, Weismüllerstr.45, 60314 Frankfurt/Main und
Arzneimittelwerk Dresden/elbion AG, Meißner Str. 35; 01445 Radebeul (Projektleiter: Prof.
Dr. J. Engel) in Kooperation mit den Arbeitsgruppen:

Prof. Dr. G. Quinkert, Prof. Dr. H. Schwalbe, Prof. Dr. J. Engels, Johann Wolfgang Goethe-
Universität, Institut für Organische Chemie, Marie Curie-Str. 11, 60439 Frankfurt .

Prof. Dr. K. Brune, PD Dr. A. Pahl, Universität Erlangen, Lehrstuhl für Pharmakologie und
Toxikologie, Universitätsstr. 22, 91054 Erlangen.

Prof. Dr. G. Fischer, Dr. H. Bang, MPG Halle, Forschungsstelle "Enzymologie der
Proteinfaltung", Weinbergweg 22, 06120 Halle/Saale

Prof. Dr. W. Sebald, Biozentrum der Universität Würzburg, Lehrstuhl für Physiologische
Chemie II, Am Hubland, 97074 Würzburg.

Prof. Dr. C. Griesinger, Max Planck Institut für Biophysikalische Chemie, Abteilung 030, Am
Fassberg 11, 37077 Göttingen

Prof. Dr. A Duschl, Universität Salzburg, Institut für Chemie und Biochemie, Hellbrunner Str.
34, 5020 Salzburg, Österreich

1. Inhaltsverzeichnis

	Seite
1. Inhaltsverzeichnis	3
2. Einleitung	7
3. Aufgabenstellung und Zielsetzung Gesamtprojekt	10
4. Organisation des Projektes	11
5. Darstellung Teilprojekt Zentaris AG und Kooperationspartner	13
5.1 Aufgabenstellung und Zielsetzung Teilprojekt Zentaris AG	13
5.1.1 Aufgabenstellung und Zielsetzung Zentaris AG	13
5.1.2 Aufgabenstellung und Zielsetzung der Kooperationspartner an der Universität Frankfurt	13
5.2 Material und Methoden	14
5.2.1 Tubulin als Zielprotein	14
5.2.2 Screening Hierarchie	15
5.2.3 Aufbau und Durchführung der Proliferationstestung	17
5.2.4 Tubulin-Polymerisations Assay	19
5.2.5 Verdrängungsexperimente mit Taxol und Colchicine	20
5.2.6 Analyse des Zellzyklus mittels FACS	21
5.2.7 NMR-Methoden	22
5.2.7.1 Einführung in die Methode	22
5.2.7.2 NMR-Methoden für unmarkierte Proteine	22
5.2.7.3 NMR-Methoden für isotoopenmarkierte Proteine	24
5.2.8 Verwendete Referenzverbindungen	26
5.3 Bearbeitung der ausgewählten Leitstrukturen	28
5.3.1 Einführung	28
5.3.2 Die Leitstruktur 1	28
5.3.3 Die Leitstruktur D-24203	32
5.3.3.1 Einführung und Zielsetzung	32
5.3.3.2 Entwicklung einer synthetischen Methode	33
5.3.3.3 Virtuelles Design der Bibliothek	36
5.3.3.4 Auswahl und Bereitstellung der Edukte	39
5.3.3.5 Automatisierte Synthese der Bibliothek	42
5.3.3.6 Ergebnisse der biologischen Testung	44
5.3.3.7 Zusammenfassung und Schlußfolgerungen	44
5.3.4 Die Leitstruktur D-24241	45
5.3.4.1 Einführung und Zielsetzung	45
5.3.4.2 Planung und Durchführung der Synthese	45
5.3.4.3 Synthese spezieller Derivate auf Basis 117	48
5.3.4.4 Ergebnisse der biologischen Testung	50
5.3.5 Die Leitstruktur 124	50
5.3.5.1 Zielsetzung und Planung der Festphasensynthese	50
5.3.5.2 Optimierung der Synthese in Lösung – Herstellung weiterer Derivate	52
5.3.5.3 Ergebnisse der biologischen Testung	53
5.3.6 Die Zielstruktur 155	54
5.3.6.1 Einführung und Zielsetzung	54
5.3.6.2 Planung der Synthese	55
5.3.6.3 Optimierung der Synthese in Lösung	55
5.3.6.4 Festphasensynthese einer Bibliothek von Benzylindazolharnstoffen	59
5.4 NMR-spektroskopische Untersuchungen	63
5.4.1 Zielsetzung	63
5.4.2 NMR Untersuchungen der Bindung der Liganden an das Tubulin	63
5.4.3 Verdrängungsexperimente mit Colchicine	67
5.4.4 Bestimmung der möglichen Bindungs epitope der Liganden	69

5.4.5	Zusammenfassung der NMR-Experimente	70
5.5	Versuche zur Expression von Tubulin-Varianten	71
5.5.1	Einführung und Problemstellung	71
5.5.2	Lösungsansätze	71
5.5.3	Versuche zur Expression von β 5-Maustubulin	72
5.5.4	Expression von Tubulin aus <i>Retikulomyxa filosa</i>	72
5.5.5	Versuche zur Renaturierung und Bindungsstudien	74
5.5.6	Zusammenfassung der Tubulin-Expressionsversuche	76
5.6	Zusammenfassung der Ergebnisse Teilprojekt Zentaris AG	77
6.	Darstellung Teilprojekt AWD GmbH und Kooperationspartner	79
6.1	Aufgabenstellung und Zielsetzung Teilprojekt	79
6.2	Arbeiten bei der AWD GmbH	80
6.2.1	Synthese und Bereitstellung von Testsubstanzen	80
6.2.2	Pharmakologische Charakterisierung von AWD 43-787	80
6.2.2.1	In vitro Untersuchungen	80
6.2.2.2	In vivo Untersuchungen	83
6.2.3	Untersuchungen zur inhibitorischen Wirkung von D-43787	89
6.2.4	Arbeiten zur Strukturaufklärung des IL5-Rezeptorkomplexes	92
6.2.5	Überblick über computergestützte Arbeiten zum Finden von IL-4-Antagonisten	94
6.2.5.1	Zielsetzung	94
6.2.5.2	Methoden	94
6.2.5.3	Ergebnisse aus Pharmakophorsuchen	95
6.2.5.4	Zusammenfassung und Ausblick	99
6.3	Projektteil der Universität Erlangen, AK Prof. Brune und PD Dr. Pahl	101
6.3.1	Aufgabenstellung und Zielsetzung	101
6.3.2	Wissenschaftliche Ergebnisse	101
6.3.2.1	Untersuchung der Wirkung der Diastereoisomere und Metaboliten von D-43787 auf die Produktion von Zytokinen in CD4+ T-Zellen	106
6.3.2.2	Konstruktion eines humanen CypB Expressionssystems	107
6.3.2.3	Analyse des Wirkmechanismus von Prüfsubstanzen mittels Proteomanalyse	107
6.4	Projektteil der Max-Planck-Forschungsstelle für Enzymologie der Proteinfaltung Halle a.d. Saale, AK Prof. Fischer	113
6.4.1	Aufgabenstellung und Zielsetzung	113
6.4.2	Wissenschaftliche Ergebnisse	113
6.4.2.1	Untersuchungen zur Hemmwirkung von A-05600 und D-43787 auf die Prolyl cis/trans-Isomerase Aktivität von hCypB	113
6.4.2.2	Klonierung, Überexpression und Reinigung von rekombinanten humanen ^{15}N - und $^{15}\text{N}/^{13}\text{C}$ -markierten Cyp18	117
6.4.2.3	Niedermolekulare Liganden inhibieren stereospezifisch die PPIase-Aktivität von rhCyp18	118
6.4.2.4	Nichtpeptidische CypB-Binder interagieren nicht mit humanem Calcineurin	119
6.4.2.5	Nichtpeptidische Inhibitoren für rhCyp18 und rhFKBP12, identifiziert durch ein Random-Substanzscreening mittels PPIase-Test	121
6.4.2.6	Identifikation von mit D-43787 interagierenden Proteinen	122
6.4.2.7	Die proteolytische Sensitivität von rhCyp18 in Gegenwart von D43787	126
6.4.3	Zusammenfassung	127
6.5	Projektteil der Universität Würzburg, AK Prof. Sebald	128
6.5.1	Aufgabenstellung und Zielsetzung	128
6.5.2	Wissenschaftliche Ergebnisse	128
6.5.3	Identification of small molecule Interleukin-4 antagonist using a pharmacophore-based <i>in silico</i> screening and molecular docking	129
6.6	Projektteil der Universität Würzburg, AK Prof. Duschl	148

6.6.1	Aufgabenstellung und Zielsetzung	148
6.6.2	Wissenschaftliche Ergebnisse	148
6.6.2.1	STAT6 regulierte Promotorelemente	148
6.6.2.2	IL-4 und INF- γ Promotoren	149
6.6.2.3	Weitere Promotoren	150
6.6.2.4	Weitere Arbeiten	151
6.6.3	Zusammenfassung der Ergebnisse	151
6.7	Projektteil der Universität Frankfurt, AK Prof. Engels	153
6.7.1	Aufgabenstellung und Zielsetzung	153
6.7.2	Wissenschaftliche Ergebnisse	153
6.7.2.1	Expression und Aufreinigung von rekombinantem hSTAT6	153
6.7.2.2	Entwicklung von hSTAT6-Hochdurchsatz-Assays	154
6.7.2.3	Protokoll zur Expression, Reinigung und Rückfaltung von rSTAT6 Konstrukten	155
6.7.2.4	Study of the binding between the different Stat6 derivatives and the IL4-R derived peptides	158
6.8	Projektteil der Universität Frankfurt, AK Prof. Griesinger und AK Prof. Schwalbe	161
6.8.1	Aufgabenstellung und Zielsetzung	161
6.8.2	Bestimmung der Parameter Bindung und Löslichkeit	161
6.8.3	NMR-Untersuchungen zur Struktur des CypA-Ligand Komplexes	162
6.8.4	Zusammenfassung der Ergebnisse	168
6.9	Zusammenfassung der Ergebnisse Teilprojekt AWD GmbH	169
7.	Zusammenfassung der Ergebnisse und Ausblick Gesamtprojekt	171

2. Einleitung

Die industrielle Arzneimittelforschung befindet sich in einer Umbruchphase, die durch dramatische methodische Fortschritte in den beteiligten Disziplinen, aber auch durch Rationalisierungszwänge und hohen Kostendruck geprägt ist. Die Entwicklungskosten für ein neues Medikament betragen inzwischen über 800 Mio US-\$¹. Trotz enormer Investitionen in die Forschung, so gab allein die Deutsche Pharmaindustrie 3.400 Mio € im Jahr 2001 für R&D aus ², ist es noch nicht zum grundlegenden Durchbruch beim Design und der Entwicklung neuer Medikamente gekommen. Der Ausstoß der pharmazeutischen Industrie an neuen Produkten hat in den vergangenen 10 Jahren eher abgenommen. Hinzu kommt, daß der therapeutische Fortschritt und der meßbare Nutzen für den Patienten bei vielen Erkrankungen nur zögerlich vorankommt. Spürbare Fortschritte erhofft sich die Forschung aus der Anwendung der Erkenntnisse aus der Sequenzierung des menschlichen Genoms und anderer Organismen. Die funktionale Genomforschung wird in unmittelbarer Zukunft viele hunderte neuer molekulare Targets für die Drug Discovery bereitstellen ³. Es entsteht ein großer Bedarf an neuen Leitstrukturen, um diese Targets für die Therapie zugänglich zu machen und auf ihrer Basis innovative Medikamente zu entwickeln.

USA, FDA ⁴	2000	2001	2002
new drugs approved	94	66	78
new drug applications filed	138	111	109
new NCEs approved	27	24	17

Tab. 1: In den USA eingereichte und zugelassene Arzneimittel im Vergleich der Jahre 2000 - 2002

Tumore, Asthma und Allergien sind weitverbreitete Zivilisationskrankheiten, die auch heute noch nicht befriedigend therapiert werden können.

Für die nächsten 25 Jahre wird ein dramatischer Anstieg der Tumorerkrankungen und der Tumor bedingten Todesfälle erwartet⁵. In 2001 waren weltweit etwa 10 Mio Menschen an Krebs erkrankt und über 6 Mio Menschen sind an dieser Erkrankung gestorben. Insbesondere in den entwickelten Industriestaaten hat sich Krebs, nicht zuletzt Dank der gestiegenen Lebenserwartung, zu einer Volkskrankheit entwickelt ⁶. Hinter dem Begriff Krebs oder Tumor verbirgt sich ein Krankheitsbild mit mehr als 200 verschiedenen Einzelerkrankungen. Die wichtigsten Tumoren sind die der Lunge, der Brust, des Magens, des Gebärmutterhalses, der Prostata, des Kopfes und Halses, des Dick- und Enddarmes, der Leber und des Blutsystems. Hinsichtlich Verlauf, Prognose und Therapieverhalten gibt es große Unterschiede. Mehr als 90% der erkannten Fälle betreffen solide Tumoren, die insbesondere in fortgeschrittenem Stadium bzw. bei Metastasierung schwer oder nicht behandelbar sind.

¹ The Pink Sheet, p. 7, December 10, **2001**

² VFA, Fakten & Grafiken, www.vfa.de

³ G. S. Ginsburg u. J. J. McCarthy, Personalized medicine: revolutionizing drug discovery and patient care, Trends in Biotechnology **2001**, *19*, 491-496

⁴ FDA database, www.fda.gov

⁵ K. Sikora, S. Advani, V. Korolchouk, I. Magrath, L. Levy, H. Pinedo, G. Schwartzmann, M. Tattersall and S. Yan, Essential drugs for cancer therapy: A World Health Organization consultation, Annals of Oncology **1999**, *10*, 385-390

⁶ D. M. Parkin, F. I. Bray and S. S. Devesa, Cancer burden in the year 2000. The global picture, Eur. J. Cancer **2001**, *37*, S4-S66

Major Cancers in the US - 1998

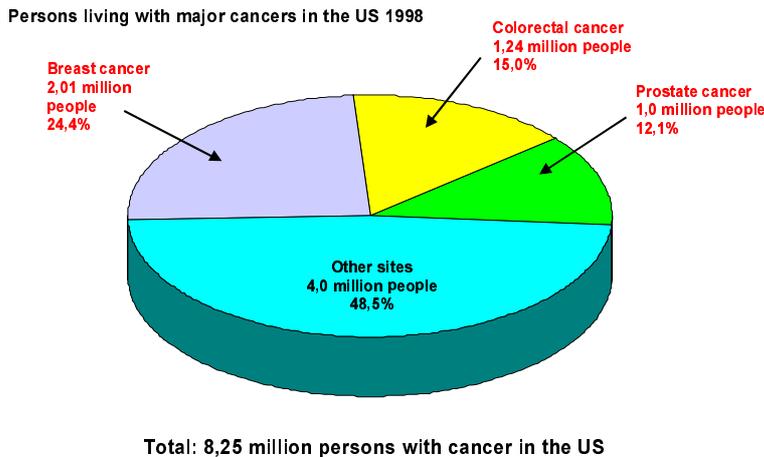


Abb. 1: Die wichtigsten Tumorerkrankungen am Beispiel der USA – Stand 1998

Die drei Säulen der Krebsbekämpfung sind nach wie vor operative Entfernung, Bestrahlung und Chemotherapie. Trotz aller Fortschritte ist es nicht gelungen, Medikamente bereitzustellen, die bei den wichtigen soliden Tumoren deutliche Überlebenszeitverlängerungen oder gar komplette Heilung bewirken. Es ist deshalb sinnvoll, neue Arzneimittel zur Bekämpfung der Krebserkrankungen zu entwickeln.

Seit einigen Jahren läßt sich weltweit ein Zuwachs an Allergien und Asthmaerkrankungen feststellen. Allergische Erkrankungen zeigen sich am häufigsten in Form von Hautentzündungen, Ekzemen, Bindehautentzündungen, Nasenschleimhautentzündungen und allergischem Asthma bronchiale. In Deutschland gibt es über 4 Millionen Menschen die an Asthma leiden, darunter zunehmend viele junge Menschen, etwa 6.000 Menschen sterben an Asthma. In den USA sind über 15 Millionen Menschen betroffen. Die Prävalenz von Asthma beträgt in den entwickelten Ländern etwa 5% der erwachsenen Bevölkerung. Etwa 5% der Fälle sind als schweres Asthma einzustufen. Bei einem vorwiegend chronisch verlaufenden Krankheitsbild ist mit den heutigen Therapiemöglichkeiten eine lebenslange Behandlung erforderlich.

Asthma ist eine entzündliche Erkrankung der Atemwege mit bronchialer Hyperreaktivität, die zu einer Verengung der Atemwege führt verbunden mit variabler Atemwegsobstruktion. Die bronchiale Kontraktion auf die Überempfindlichkeit der Atemwege kann durch verschiedene Faktoren wie inhalierte Allergene, Stäube und Rauch, kalte Luft oder auch Belastungen und Emotionen ausgelöst werden. Die Ursachen der Hyperreaktivität sind noch nicht vollständig bekannt. Die medikamentöse Asthmatherapie besteht im wesentlichen aus der Einnahme von Bronchodilatoren zur Erweiterung der Luftwege und von Antihistaminika sowie Steroiden zur Bekämpfung der Entzündung. Eine ursächliche Behandlung gibt es bisher nicht.

Asthma und Allergie lassen sich als komplexe zelluläre und humorale Veränderungen verstehen^{7,8}. Die dabei ablaufenden unspezifischen als auch spezifischen immunologischen Effektormechanismen zur Sicherung und Wiederherstellung der individuellen Integrität oder Homöostase sind mit denen der schützenden Immunantworten identisch, sie erscheinen

⁷ T. E. Van Metre. u. N. F. Adkinson in Allergy: Principles and Practices. Edn. 4. C.V. Mosby Co., St. Louis **1993**, 1489-1510

⁸ G. Vogel, G. New clues to asthma therapies. Science **1997**, 276, 1643-1646

jedoch durch den wiederholte Kontakt mit dem Allergen andersartig^{9,10}. Niedermolekulare Wirkstoffe die selektiv asthma-relevante Transkriptionsfaktoren modulieren, sind bisher nur wenige bekannt^{11,12}.

Die im vorliegenden BMBF-Projekt als Ziel bearbeiteten medizinischen Indikationen Krebs und Asthma/Allergie sind von großer gesellschaftlicher Relevanz. Der volkswirtschaftliche Schaden alleine von Asthma ist immens, so betragen die Gesamtkosten bereits 1992 in Deutschland über 5 Milliarden DM¹³. Beiträge zur Verbesserung der Behandlung dieser Erkrankungen können zur Linderung des Leids vieler Betroffener führen und letztlich einen positiven sozialen und ökonomischen Effekt ausüben.

⁹ P. J. Barnes, K. F. Chung und C. P. Page C.P: Inflammatory mediators and asthma, *Pharmacol. Rev.* **1988**, *40*, 49-84

¹⁰ J. M. Drazen, J. Evans, R. L. Stevens und M. A. Shipp: Inflammatory effector mechanisms in asthma, *Am. J. Respir. Crit. Care. Med.* **1995**, *152*, 403-407

¹¹ A. K. Abbas, M. M. Kenneth und A. Sher: Functional diversity of helper T lymphocytes, *Nature* **1996**, *383*, 787-793

¹² R. A. Seder und W. E. Paul: Acquisition of lymphokine-producing phenotype by CD4+ T cells, In *Annual Review of Immunology*, **1994**, Volume 12, W.E. Paul, C.G. Fathman and H. Metzger, eds.: Annual Reviews Inc., Palo Alto, 635-673

¹³ R. Wettengel u. T. Volmer: ASTHMA, Medizinische und ökonomische Bedeutung einer Volkskrankheit, **1994**

3. Aufgabenstellung und Zielsetzung Gesamtprojekt

Das durchgeführte Verbundprojekt ordnet sich in die Schwerpunktförderung „Molekulare Naturstoffforschung“ des BMBF aus dem Jahre 1995 ein¹⁴.

Das ursprüngliche Gesamtziel des Vorhabens war es, Modulatoren mit geringer Molekülmasse aus systematisch zusammengesetzten Verbindungsbibliotheken zu finden und mit Hilfe eines struktur- und funktionsbiologischen Screeningnetzwerkes im Hinblick auf die Steuerung des Immunsystems zu untersuchen. Potentielle Leitstrukturen sollten unter Verwendung isotopenmarkierter Rezeptoren NMR-spektroskopisch auf Komplexbildung untersucht und ihre Affinität optimiert werden. Liganden, die als Cytokin-Freisetzung- bzw. Synthesehemmer, als Interleukin-4/5-Rezeptorantagonisten bzw. Immunophilinhibitoren wirken, sollten als immunologisch relevante, Signaltransduktionswege modulierende Wirkstoffe als Antiasthmatikum / Antiallergikum bzw. Zytostatikum außerhalb des BMBF-Projekts vom Industriepartner entwickelt werden.

Dafür war ein entsprechendes Methodenarsenal zu entwickeln und zielgerichtete Screening-Hierarchien aufzubauen. Ziel der synthetischen Bemühungen war es, auf Basis definierter oder neuer Leitstrukturen, Verbindungen für die Testung bereitzustellen und ggf. weiter zu charakterisieren.

Die im Vorläuferprojekt FKZ 0310792 aufgefundene immunmodulatorisch wirksame Substanzklasse der Indolin-2-carbonsäuren sollte hinsichtlich ihres Potentials weiter untersucht und speziell der Entwicklungskandidat D-43787 weiter charakterisiert werden.

Zum Zeitpunkt der Antragstellung und für den Anfangszeitraum des Projekts lag der Schwerpunkt auf dem Indikationsgebiet Asthma / Allergie, dies entsprach einem wichtigen Forschungsschwerpunkt der damaligen ASTA Medica AG als Zuwendungsempfänger. Mit der Umstrukturierung der ASTA Medica AG und der Ausgründung verschiedener Firmen wurde das Projekt in zwei Teilprojekte aufgeteilt und die Indikation Krebs als Schwerpunkt neu aufgenommen.

Die Indikationen sind wie folgt zugeordnet:

AWD GmbH / elbion AG:	Asthma, Allergie
Zentaris AG:	Krebs (benigne und maligne Erkrankungen)

Das Verbundprojekt trug in hohem Maße dem Förderziel der schnellen Überführung von Grundlagenforschung in die industrielle Anwendung Rechnung. Es hat sich bestätigt, daß im Verbund das Forschungsvorhaben zielorientiert und synergistisch durchgeführt werden konnte.

Folgende grundlegende Aufgabenstellungen wurden bearbeitet:

- Planung und Synthese von kombinatorischen Substanzbibliotheken
- Entwicklung und Optimierung der dafür notwendigen Synthesereaktionen
- Entwicklung und Anwendung von Selektionsmethoden zum Auffinden von niedermolekularen Modulatoren aus kombinatorisch hergestellten Substanzbibliotheken
- Aufbau unabhängiger Screening-Hierarchien zur zielgerichteten Profilierung der potentiellen Wirkstoffe in den jeweiligen Anwendungsgebieten
- Anwendung spezieller NMR-Methoden zur Charakterisierung von Ligand-Protein-Wechselwirkungen
- Anwendung von Molecular Modelling Methoden zur Auffindung und Optimierung von neuen Leitstrukturen

¹⁴ Programm, Schwerpunktförderung BMBF, Forschungszentrum Jülich GmbH

Die einzelnen Ziele und Aufgaben werden bei den Teilprojekten und Unterauftragnehmern besprochen.

4. Organisation des Projektes

Das Projekt baut auf dem 1999 erfolgreich abgeschlossenen Forschungsvorhaben: „Kombinatorische Synthesestrategien zur Entwicklung neuer biologischer Wirkstoffe, FKZ 0310792“ auf. Dies betrifft sowohl die Beteiligung der universitärer Partner als auch Weiterentwicklung bestimmter Teile der Aufgabenstellung. Die im Projekt 0310792 aufgefundenen Substanzen wurden im jetzigen Vorhaben weiter charakterisiert und die entwickelten Methoden wurden weiter angewendet.

Das neue Projekt 0312231 war als Verbundprojekt von universitären und institutionellen Arbeitsgruppen mit industriellen Forschungsabteilungen angelegt. Ursprünglicher Industriepartner und Antragsteller im Projekt war die Firma ASTA Medica AG in Frankfurt. Im Zuge einer grundlegenden Umstrukturierung hat ASTA Medica AG das Projekt auf ihre Tochterfirmen AWD GmbH und Zentaris AG, mit Zustimmung des Projektträgers rückwirkend zum 01.01.2001 übertragen. Die AWD GmbH hat wiederum Rechte und Pflichten aus dem Projekt an die elbion AG übertragen. Zuwendungsempfänger und Ansprechpartner für das BMBF blieb die ASTA Medica AG. Insgesamt sind 6 akademische Kooperationspartner in das Projekt eingebunden.

Prof. Dr. G. Quinkert	TP 1	Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt	Institut für Organische Chemie
Prof. Dr. Engels	TP 2	Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt	Institut für Organische Chemie
Prof. Dr. Griesinger / Prof. Dr. Schwalbe	TP 3	Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt	Institut für Organische Chemie
Prof. Dr. Sebald/ Prof. Dr. Duschl	TP 4	Biozentrum der Universität Würzburg	Lehrstuhl für Physiologische Chemie II
Prof. Dr. Brune/ PD Dr. Pahl	TP 5	Universität Erlangen-Nürnberg	Lehrstuhl für Pharmakologie und Toxikologie
Prof. Dr. Fischer	TP 6	MPG Halle/Saale	Arbeitsgruppe Enzymologie der Peptidfaltung

Tab. 2: Auflistung der Projektpartner

Alle für die Durchführung des Projekts notwendigen Funktionen, wie die Kombinatorische Chemie, NMR-basiertes Screening, Bereitstellung der Targetproteine, Entwicklung von Pharmakophor-Modellen und die breite biologische Testung mittels von in-vitro und in-vivo Modellen waren über die Arbeitskreise oder den Industriepartner verfügbar.

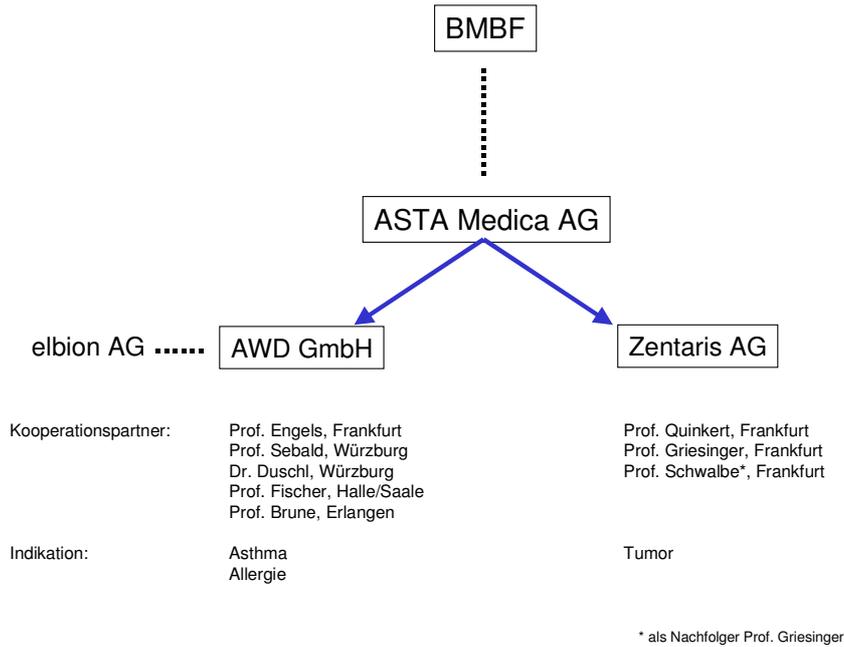


Abb. 2: Der Aufbau des Projekts und die beteiligten Arbeitsgruppen

Im Erfolgsfall wird die wirtschaftliche Verwertung der Ergebnisse aus dem Projekt durch die AWD GmbH bzw. die jetzige elbion AG und die Zentaris GmbH erfolgen. Auch nach formalem Abschluß des Projekts werden die synthetisierten Verbindungen in zukünftigen Tests weiter auf biologische Wirkungen untersucht. So ist gewährleistet, daß das Potential der bereitgestellten Proben optimal genutzt wird. Die Projektpartner werden über eventuelle Folgeergebnisse zu ihren Substanzen informiert.

5. Darstellung Teilprojekt Zentaris AG und Kooperationspartner

5.1 Aufgabenstellung und Zielsetzung Teilprojekt

Da sich Zentaris auf das Indikationsgebiet Tumor konzentriert, war eine Verschiebung der ursprünglich vereinbarten Ziele erforderlich. Der Bezug auf die immunologisch relevanten Proteine wurde auf Tumor relevante Proteine präzisiert und speziell auf Proteine des Zytoskeletts, wie das Tubulin-System reduziert.

Nach der Neuordnung des Projekts arbeitete die Zentaris mit den Arbeitskreisen Prof. Quinkert und Prof. Griesinger von der Universität Frankfurt zusammen.

Die Hauptaufgabe im Teilprojekt der Zentaris AG bestand danach in der Bereitstellung von niedermolekularen Tubulineffektoren, die als potentielle Wirkstoffe für die Entwicklung von neuen Krebsmedikamenten geeignet sind. Daneben wurden wissenschaftliche und technologische Fragestellungen bearbeitet.

5.1.1 Aufgabenstellung und Zielsetzung Zentaris AG

Im Einzelnen durchzuführende Arbeiten:

- Festlegung und Aufbau der erforderlichen Screening-Hierarchie zur Auffindung und Entwicklung eines niedermolekularen Tubulin-Binders
- Testung der synthetisierten Verbindungen auf antiproliferative Wirkung
- Testung der bereitgestellten Verbindungen auf Hemmung der Tubulin-Polymerisation
- biophysikalische Charakterisierung ausgewählter Verbindungen
- Unterstützung der Synthesearbeiten mittels computer-chemischer Methoden
- Design, Synthese und Aufreinigung von Substanzbibliotheken mittels automatisierter Methoden
- Docking Experimente ausgewählter Verbindungen an Tubulin
- Synthese von gezielten Einzelverbindungen und Referenzverbindungen

Im Erfolgsfall wird Zentaris die potentiellen Wirkstoffe in die präklinische und klinische Entwicklung übernehmen.

5.1.2 Aufgabenstellung und Zielsetzung der Kooperationspartner an der Universität Frankfurt

Die Aufgaben der Kooperationspartner an der Universität Frankfurt teilten sich in chemisch-präparative Leistungen und NMR-Spektroskopische Arbeiten. In einigen Teilen insbesondere in der Anwendung bestimmter Methoden, konnten die Arbeiten auf den Erfahrungen aus dem BMBF-Projekt 0310792 aufbauen. Im AK Prof. Griesinger später im Arbeitskreis des Nachfolgers Prof. Schwalbe wurden schwerpunktmäßig die NMR-spektroskopischen Arbeiten ausgeführt. Neben der Bestimmung von Ligand -Target-Wechselwirkungen wurden hier die Versuche zur Bereitstellung entsprechender Proteine durchgeführt. Im AK Prof. Quinkert wurden im wesentlichen synthetische Arbeiten zum Aufbau der Verbindungsbibliotheken aber auch die gezielte Synthese von Einzelverbindungen realisiert.

Im Einzelnen durchzuführende Arbeiten:

- Etablierung neuer NMR-spektroskopischer Verfahren zur Untersuchung von Protein - Ligand Wechselwirkungen
- Untersuchung ausgewählter Verbindungen auf Wechselwirkung mit Targetproteinen mittels NMR-spektroskopischer Methoden

- Design, Synthese und Aufreinigung kombinatorischen Substanzbibliotheken auf Basis vorgegebener Leitstrukturen
- Synthese von Einzelverbindungen
- Durchführung von SAR Betrachtungen
- Molekularbiologische Bereitstellung der Proteine für die NMR-spektroskopischen Untersuchungen
- Untersuchungen zur Expression und Rückfaltung von Tubulinen

5.2 Material und Methoden

5.2.1 Tubulin als Zielprotein

In diesem Teilprojekt sollen vor allem mit dem Tumorwachstum verbundene Proteine näher untersucht werden. Ein bekanntes Zielprotein für die Hemmung des Tumorwachstums ist das Tubulin, ein heterodimerer Komplex mit einer α - und β -Untereinheit¹⁵ mit einem Gesamtgewicht von etwa 110 kDa. Tubulin spielt eine wesentliche Rolle bei der Zellteilung. Da ein Tumor durch Zellteilung wächst und sich durch eine deutlich höhere Teilungsrate auszeichnet als normales Gewebe, gilt Tubulin seit langem als wichtiger Ansatzpunkt für die Entwicklung von Wirkstoffen in der Chemotherapie.

Tubulin bildet durch Polymerisation Microtubuli genannte Zellstrukturen. Microtubuli sind ein wesentlicher Bestandteil des Zellskelettes, spielen darüber hinaus aber auch eine wichtige Rolle bei der Aufteilung der Chromosomen (Mitose) im Verlauf der Zellteilung, Bewegungen der Zelle (Cilien und Flagellaten) und bilden "Wege" für Bewegungen von Organellen und Centriolen in tierischen Zellen (siehe folgende Abbildung).

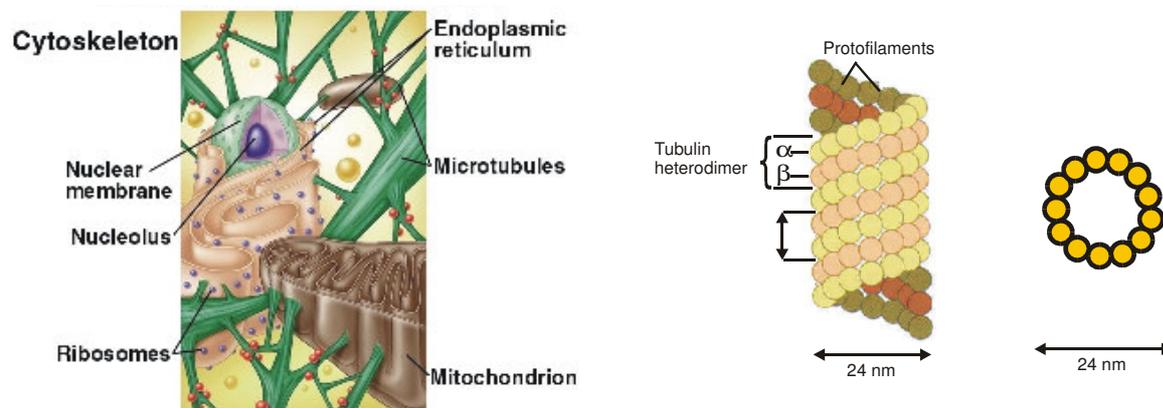


Abb. 3: Zytoskelett (links) und Microtubuli aus Tubulineinheiten (rechts)

Während der Vorbereitung der Zellteilung (s. Abbildung unten) bilden die Microtubuli die mitotische Spindel aus. Diese Spindel ist an der Aufteilung der Chromosomensätze in die entstehenden neuen Zellen beteiligt. Sobald die tatsächliche Zellteilung eintritt (Beginn der M-Phase) depolymerisieren die Microtubuli. Tubulin-bindende Substanzen stören die Polymerisation und Depolymerisation des Tubulin und damit die Microtubulidynamik. Die daraus resultierende Störung der Separation der Chromosomen während der Mitose bewirkt die Unterbrechung der Zellteilung.

¹⁵ Übersichtsartikel: A. Jordan, J.A. Hadfield, N.J. Lawrence, A.T. McGown *Inc. Med. Res. Rev.*, **1998**, *18*, 259.

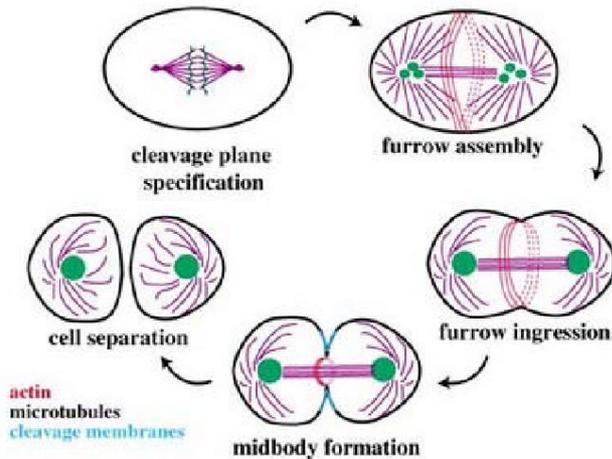


Abb. 4: Mitose

Taxolartige Substanzen stabilisieren die Microtubuli und verhindern die Depolymerisierung. Dadurch kann sich die Zelle nicht teilen und wird in die Apoptose getrieben. Ebenfalls apoptotisch wirken solche Substanzen, die die Microtubuli destabilisieren (Vinblastin, Colchicin). Zellen, die sich nicht teilen, sind sehr widerstandsfähig gegenüber den beschriebenen Agentien. Dagegen sind sich unkontrolliert teilende Zellen (Tumorzellen) gegenüber Substanzen, die den Zellzyklus arretieren äusserst empfindlich. Diese Zellen werden durch tubulin-bindende Substanzen in die Apoptose getrieben.

Es gibt zahlreiche bekannte Substanzen die durch Wechselwirkung mit Tubulin das Zellwachstum hindern. Als bekannteste Beispiele seien die Naturstoffe Taxol, Colchicin, Vincristin oder Epothilon genannt. Einige dieser Stoffe sind z.T. sehr erfolgreich am Markt eingeführt (der Jahresumsatz für Taxolderivate erreichte im Jahr 2000 ca. 2 Milliarden US-\$¹⁶). Der klinische Einsatz dieser Arzneimittel ist aber mit erheblichen Nebenwirkungen verbunden, die Darreichungsformen sind für den Patienten nicht optimal und die Wirksamkeit ist bei einer Reihe wichtiger Tumore nach wie vor limitiert. Es besteht deshalb Bedarf für neue tubulinaktive Verbindungen. Zusätzlich basieren die zur Zeit verfügbaren Wirkstoffe auf Naturstoffen, die in der Synthese bzw. Isolierung aus Pflanzen extrem teuer sind. Ein neuer, einfach synthetisierbarer tubulinaktiver Ligand ist daher Ziel vielfacher Anstrengungen in der pharmazeutischen Industrie.

5.2.2 Screening Hierarchie

Ziel des Teilprojekts ist die Auffindung und Charakterisierung potentieller niedermolekularer Tubulin-Binder. Um diesen Zweck zu erreichen wurde eine spezielle Test-Hierarchie entwickelt. Kernstück ist ein automatisierter XTT-Proliferationsassay mit ausgewählten humanen Zelllinien. Mittels einer speziellen Zelllinie läßt sich die Zellzyklus Abhängigkeit der proliferativen Hemmwirkung feststellen. Substanzen die Zellzyklus-abhängig wirken werden dann im Tubulin-Polymerisationsassay und an weiteren Krebszelllinien untersucht. Daneben spielt die Erfassung biophysikalischer Daten und die Anwendung von in-silico Methoden eine wichtige Rolle bei der weiteren Charakterisierung. Im Einzelnen stellt sich der Ablauf wie folgt dar:

¹⁶ www.protarga.com/prod.htm

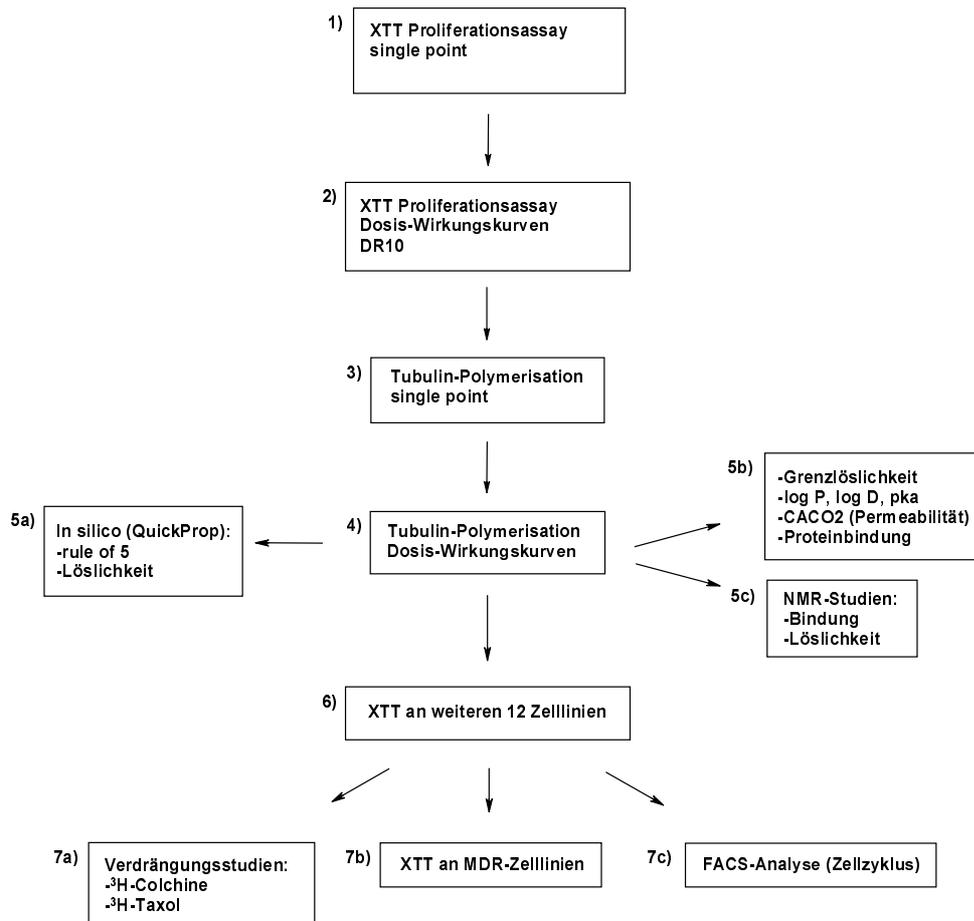


Abb. 5: Screening Hierarchie zur Auffindung und Profilierung von potentiellen niedermolekularen Tubulinbindern

Im Single Point (SP) XTT Proliferationstest werden die potentiellen zytotoxischen Verbindungen in der Konzentration von 3.16 $\mu\text{g}/\text{ml}$ an fünf ausgewählten humanen Tumorzelllinien untersucht. Bei Substanzen die hier eine Inhibition von $>50\%$ zeigen, werden anschließend durch Wiederholung des XTT Proliferationsassay bei 10 verschiedenen Konzentrationen die IC_{50} -Werte bestimmt. Substanzen, die an dem RKOp27 System eine Zellzyklusabhängigkeit der Wirkung zeigen und die an mindestens einer Zelllinie mit einem IC_{50} -Wert $<1.0\ \mu\text{M}$ aufgefallen sind, werden in einem Single Point Tubulin-Polymerisationsassay untersucht. Bei Substanzen mit einer Inhibition von $>70\%$ werden dann analog zum XTT Proliferationstest IC_{50} -Werte bestimmt.

Parallel dazu erfolgen in-silico Betrachtungen verschiedener Parameter, die Bestimmung physikochemischer Eigenschaften (Löslichkeit, log P, pka etc.) und Permeabilitäts- und Proteinbindungsuntersuchungen. Geeignete Verbindungen werden in NMR-Bindungsstudien auf Wechselwirkung mit den Targetproteinen untersucht.

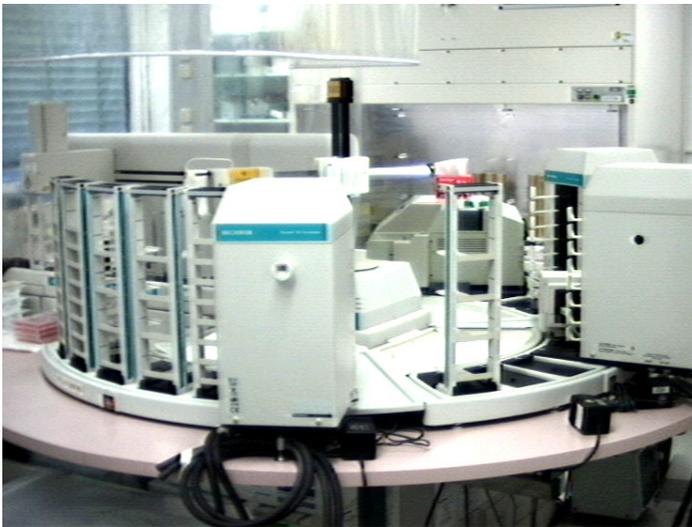
Substanzen, deren IC_{50} -Wert unter $2.0\ \mu\text{M}$ im Tubulin Polymerisationsassay liegt, werden anschließend in einem weiteren XTT Proliferationsassay an zusätzlichen 12 humanen Krebszelllinien und an ausgewählten resistenten Zelllinien profiliert. Begleitend erfolgen Verdrängungsstudien mit ^3H -markierten Colchicin bzw. Taxol um einen ersten Eindruck über die Tubulinbindungsstelle der Substanzen zu bekommen. Untersuchungen zur Analyse der Wirkung der Substanzen auf den Zellzyklus runden das Bild ab.

5.2.3 Aufbau und Durchführung der Proliferationstestung

Die Testung auf allgemeine Zytotoxizität erfolgt unter Verwendung des sogenannten XTT-Assays¹⁷. Der XTT-Test auf zelluläre Dehydrogenase-Aktivität wird in Anlehnung an die Herstellerangaben mittels eines optimierten Protokolls semi-automatisiert durchgeführt¹⁸.

Zur Untersuchung der Zellzyklus-spezifischen Wirkung der Substanzen wird ein spezielles RKO Zellsystem verwendet¹⁹. Eine unspezifisch wirkende Substanz hemmt die Proliferation unabhängig davon, ob die RKO Zelle in G1 oder G2 arretiert ist oder nicht. Durch Vergleich der Wirksamkeit auf induzierte und nicht induzierte Zellen lassen sich Rückschlüsse auf den Wirkmechanismus (Zellzyklus-Spezifität) der Substanz ziehen. Auf diese Weise können gezielt Zellzyklus-spezifische Substanzen, wie beispielsweise Tubulininhibitoren, selektiert werden. Dieses Assay wird in 96-Well Mikrotiterplatten semi-automatisch durchgeführt.

Die eigentliche automatisierte Testung wird auf einer Biomek[®] 2000 Anlage die u.a. aus den Teilen dilution station, sideloader, MTP-carrousel, reader sowie incubator besteht, durchgeführt.



Biomek[®] 2000 with Sideloader
(Beckman/Coulter)

Abb. 6: Biomek[®] 2000 Anlage für die Durchführung der XTT-Testung

Die Testung der synthetisierten Verbindungen erfolgte als Aliquots aus einer DMSO-Stammlösung, die auf die Testkonzentration mittels Pipettierroboter runter verdünnt wurde, in einem single-point Versuch auf 96 well MTP. Die Zellen werden dabei 48h mit der Testprobe inkubiert. Dies gewährleistet, daß die Zellen mindestens einen kompletten Zellzyklus durchlaufen. Da es sich um einen zellulären Assay handelt, kann davon ausgegangen werden, daß aktive Substanzen eine ausreichende Zellgängigkeit besitzen. Alle Proben, die eine Proliferationshemmung von $\geq 50\%$ an mindestens einer der getesteteten Zelllinien aufweisen, werden als verfolgenswert eingestuft.

Für das Standardscreening werden Zelllinien verwendet, die sich in der automatisierten Testung bewährt haben und die bereits erste Aussagen über das Aktivitätsspektrum der untersuchten Probe ermöglichen.

¹⁷ D. A. Scudiero et al., Cancer Res. **1988**, *48*, 4827-4833

¹⁸ Boehringer Mannheim, Cell Proliferation Kit II, Cat.-No. 1465015

¹⁹ M.Schmidt et al. Oncogene **2000**, *19*, 2423-2429

Zelllinie	Katalog	Beschreibung
SKOV-3	ATCC HTB-77	Adenokarzinom des Ovars
NCI-H460	NCI 503473	Non-Small Cell Lung Cancer der Lunge
SF-268	NCI 503138	CNS Cancer, Glioma
KB/HeLa	ATCC CCL17	humanes Cervix Karzinom

Tab. 3: Die im Standard-XTT Versuch verwendeten Zelllinien

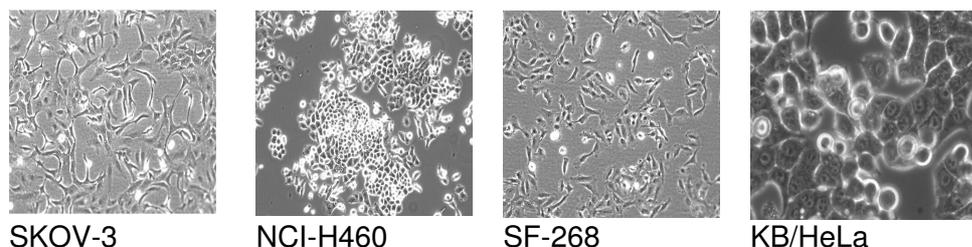


Abb. 7: Mikroskopisches Bild der im HTS verwendeten Zelllinien

Die Zelllinien SF-268 und NCI-H460 werden seit 1988 auch vom NCI für das Primärscreening verwendet.

Um Referenzdaten zu generieren und das System zu validieren, wurden die benutzten Standard-Zelllinien gegen ausgewählte bekannte Antitumorverbindungen untersucht und dabei folgende Hemmwerte bestimmt:

Zelllinie	IC50 [$\mu\text{g/ml}$]				
	Mitoxantron	Vinblastine	Taxol	Doxorubicine	5-FU
KB/HeLa	0.375	0.0017	0.006	0.556	>3.16
SKOV-3	0.178	0.0009	0.006	0.548	>3.16
SF-268	0.599	0.0051	0.011	0.592	>3.16
NCI-H460	0.109	0.0023	0.013	0.091	0.433
RKO	0.091	0.0013	0.066	0.081	0.078
RKO IND	>3.16	>3.16	>3.16	0.192	>3.16

Tab. 4: Empfindlichkeit der eingesetzten Zelllinien gegen Referenzverbindungen

Es zeigte sich dabei, daß Mitoxantron, Vinblastine, Taxol und 5-FU, wie erwartet Zellzyklus-abhängig ihre Wirkung entfallten.

Für im single point XTT-Versuch positiv aufgefallene Substanzen ($\geq 50\%$ INH) wurden zur weiteren zielgerichteten Bearbeitung die Dosis-Wirkungskurven bei 10 Konzentrationen und daraus die IC_{50} -Werte bestimmt.

5.2.4 Tubulin-Polymerisationsassay

Auf der Suche nach Verbindungen mit Tubulin polymerisationshemmenden Eigenschaften werden nach der zytotoxischen Eingangstestung mittels XTT die ausgewählten Verbindungen in einem auf Mikrotiterplatte basierendem Tubulinpolymerisationstest in einer Konzentration von 10µg/ml eingesetzt.

Der Test wird basierend auf der Methode von Bollag et al.²⁰ durchgeführt. Lyophilisiertes Rindertubulin (Cytoskeleton, *ML113* Tubulin 30% MAPs, *TL238* Tubulin MAP frei) wird in einer Konzentration von 2mg/ml (*ML113*) bzw. 5mg/ml (*TL238*) in entsprechender Pufferlösung gelöst. Die Testsubstanzen werden aus einer 1mg/ml Stammlösung in DMSO in 10% DMSO (v:v) verdünnt. 5µl der Verdünnungen werden auf eine 96 well Mikrotiterplatte transferiert. Nach Zugabe von 45µl der Tubulinlösung wird die Polymerisation bei 340nm in einem Spectramax 190 Mikrotiterplattenreader mittels Kinetik Programm in 30sec Intervallen über einen Zeitraum von 20min bestimmt.

Die resultierenden *area under curve* Werte werden zur Berechnung der Inhibition in Bezug auf die unbehandelte Kontrolle verwendet. Verbindungen mit einer signifikanten Hemmung der Tubulinpolymerisation von $\geq 70\%$ werden zur nachfolgenden Bestimmung der IC_{50} in einer halblogarithmischen Konzentrationsreihe von $\leq 10\mu\text{g/ml}$ eingesetzt.

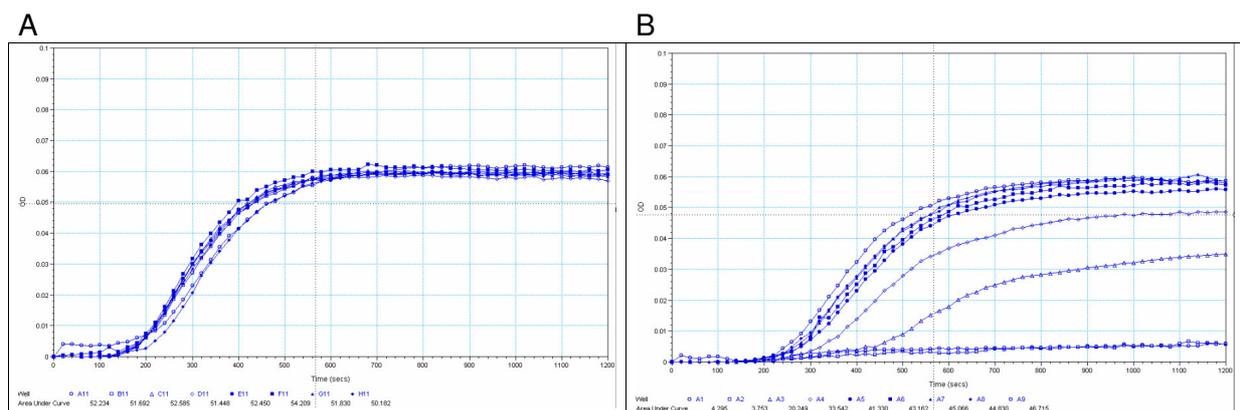


Abb. 8: Test zur Bestimmung der Hemmwirkung von Substanzen auf die Tubulinpolymerisation.
 (A) zeigt die Polymerisationskurven von 8 Kontrollen
 (B) zeigt die konzentrationsabhängige Hemmung der Polymerisation durch Testsubstanzen in 9 Konzentrationen ($\leq 10\mu\text{g/ml}$)

5.2.4 Verdrängungsexperimente mit Taxol und Colchicine

Substanzen wie Colchicine und Taxol destabilisieren bzw. stabilisieren die Mikrotubuli durch Bindung an Tubulin. Zur Untersuchung von Testsubstanzen werden Colchicine bzw. Taxol als ^3H markierte Liganden eingesetzt, deren Bindung an Tubulin durch die Testsubstanzen kompetitiv verdrängt werden kann. Eine solche Verdrängung kann einen ersten Hinweis auf die Bindung der Testsubstanzen an die bekannten Bindungsstellen von Colchicine und Taxol an Tubulin liefern.

Der Tubulinbindungstest wird nach der Methode von Tahir et al.²¹ durchgeführt. ^3H markiertes Colchicine bzw. ^3H markiertes Taxol wird in Assay Puffer verdünnt. 20µg

²⁰ Bollag, D. M. et al. *Cancer Res.* **1995**, *55*, 2325–2333

²¹ S. K. Tahir et al. *BioTechniques* **2000**, *29*, 156–160

biotinyliertes Tubulin wird auf Eis in Assay Puffer mit 1mM GTP in einer Konzentration von 0.44µg Tubulin im Transfervolumen von 20µl pro Well gelöst. In Assay Puffer verdünnte Testsubstanzen in Konzentrationen von $\leq 100\mu\text{M}$ und der ^3H markierte Ligand werden in eine 96 well Mikrotiterplatte transferiert und nachfolgend das gelöste Tubulin zugegeben. Die Platten werden unter leichtem Schütteln bei 37°C für 2h inkubiert. Nach der Inkubation werden 80µg Streptavidin beschichtete *Yttrium SPA beads* im Volumen von 40µl zugegeben und die gebundene Radioaktivität im Vergleich zur Kontrolle ohne Testsubstanz im Scintillationscounter bestimmt.

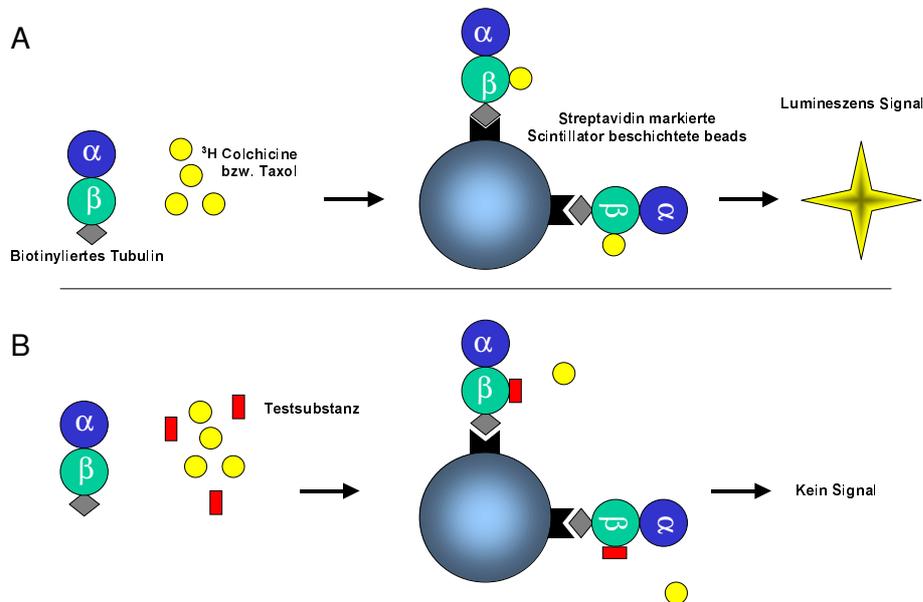


Abb. 9: Tubulinbindungstest mit ^3H markierten Liganden. (A) Zeigt die Bindung von ^3H markiertem Liganden an biot. Tubulin und die damit verbundene Anregung der SPA beads. (B) Zeigt die Verdrängung des ^3H markiertem Liganden durch an der gleichen Bindungsstelle bindende Testsubstanz

Die IC_{50} Werte werden durch nichtlineare Regression ermittelt und grafisch dargestellt.

5.2.5 Analyse des Zellzyklus mittels FACS

Zur Analyse des Zellzyklus werden KB/HeLa Zellen (ATCC CCL17) mit 15000 Zellen pro well in 96 well Mikrotiterplatten ausgesetzt. Nach 24h erfolgt die Zugabe von Testsubstanz in einer Endkonzentration von $\leq 1000\text{nM}$ und eine weitere Inkubation für 24h. Die Präparation erfolgt mittels des *cycle test plus*[®] Kit (BD Bioscience). Die Mikrotiterplatte wird zentrifugiert, der Überstand abgesaugt, 1x mit Waschpuffer gewaschen, die Zellen nachfolgend in der Platte abgelöst und mit Propidiumjodidlösung (PI) gefärbt. Die Messung der präparierten Zellen erfolgt in der Mikrotiterplatte am mit MAS (*multi auto sampler*) ausgestatteten FACS Calibur Cytometer[®] (BD Bioscience). Durch die stöchiometrische Bindung des Propidiumjodid (PI) an die DNA haben Zellen die sich in der G2/M Phase des Zellzyklus befinden, und damit einen verdoppelten DNA Gehalt aufweisen, eine 2x stärkere Fluoreszenz und können von den Zellen in der G1 bzw. S Phase getrennt werden. Mit Hilfe der Mod Fit LT[™] Zellzyklus Analysesoftware wird der Anteil an Zellen in der G2/M Phase bestimmt.

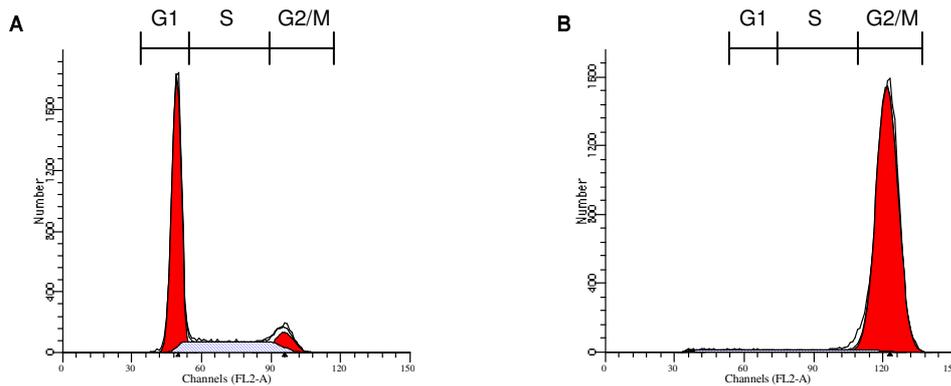


Abb. 10: Zellzyklusanalyse von unbehandelten (A) und behandelten KB/HeLa Zellen (B). Nach Behandlung mit einer Testsubstanz die einen Zellzyklusarrest in der G2/M Phase des Zellzyklus induziert, resultiert eine Verdopplung des PI Signals (X-Achse)

5.2.7 NMR Methoden

5.2.7.1 Einführung in die Methode

Ein kritischer Aspekt in der Wirkstofffindung ist das eindeutige Identifizieren der Bindung eines kleinen Moleküls an ein makromolekulares Zielmolekül. Hierbei haben sich biochemische oder zelluläre Hochdurchsatz-Testsysteme als effektive Methode zur Findung von Leitstrukturen herausgestellt. Jedoch kann es vorkommen, dass die identifizierten Moleküle nicht an das gewünschte Target binden, sondern mit einer anderen Komponente des Assays wechselwirken oder durch ein Artefakt der Detektionsmethode fälschlicherweise als Hit identifiziert werden. Daher sind auch Methoden von Interesse, welche die direkte Wechselwirkung mit dem Target aufzeigen.

Diese Möglichkeit bietet die NMR-Spektroskopie mit einem einfachen Assay, der in der Regel nur das Zielmolekül (z.B. ein Protein) und den potentiellen Wirkstoff enthält. Die Bindung an dieses Zielmolekül wird dann über eine Änderung verschiedenster NMR-spektroskopischen Eigenschaften entweder des Targets oder des Liganden detektiert^{22, 23, 24}, wie z.B. Änderungen der chemischen Verschiebungen, der Linienbreiten und des Diffusionskoeffizienten^{25, 26}.

Alle NMR-Experimente wurden an einem 600 MHz AVANCE 600 NMR-Spektrometer der Firma Bruker durchgeführt. Dieses ist zusätzlich mit einer Kryo-Plattform ausgerüstet, die eine 2-4fache Steigerung der Empfindlichkeit ermöglicht, was eine Verkürzung der Messzeit um den Faktor 4-16 entspricht. Ein Großteil der durchgeführten Messungen ist erst mit dieser Zusatzausstattung möglich geworden, da die Löslichkeit vieler der untersuchten Substanzen im Grenzbereich liegt, der für die eingesetzten NMR-Methoden noch sinnvoll ist.

²² G. C. K. Roberts: NMR spectroscopy in structure-based drug design, *Curr. Opin. Biotech.* **1999**, *10*, 42-47

²³ J. M. Moore: NMR screening in drug discovery, *Curr. Opin. Biotech.* **1999**, *10*, 54-58

²⁴ G. C. K. Roberts: Applications of NMR in drug discovery, *Drug Discovery Today* **2000**, *5*, 230-240

²⁵ S. B. Shuker, P. J. Hajduk, R. P. Meadows, S. W. Fesik: Discovering high-affinity ligands for proteins: SAR by NMR, *Science* **1996**, *274*, 1531-1534

²⁶ P. J. Hajduk, E. T. Olejniczak, S. W. Fesik: One-dimensional relaxation- and diffusion-edited NMR methods for screening compounds that bind to macromolecules, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 12257-12261

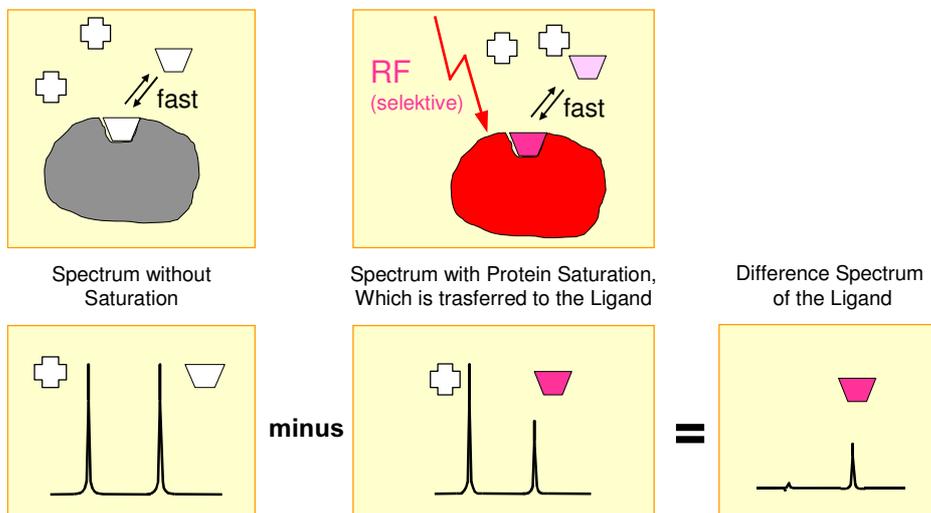


Abb. 11: NMR-Spektrometer AVANCE 600 der Firma Bruker

5.2.7.2 NMR-Methoden für unmarkierte Proteine

Eine gut geeignete Methode für das Tubulin sollte die Sättigungs-Transfer Methode STD (Saturation Transfer Difference)^{27, 28, 29} sein. Neben der Möglichkeit zur Einzelmessung, um eine Bindung nachzuweisen, kann die Methode auch zu einem Hochdurchsatz-Screening von Mischungen erweitert werden. Daher sollte das nachfolgend schematisch dargestellte Verfahren am Tubulin implementiert und getestet werden.

Saturation Transfer Method (STD) NMR



(Mayer and Meyer, *Angew. Chem.* **1999**, *111*, 1902)

Abb. 12: Schematische Darstellung der Sättigungstransfer-Methode (saturation transfer difference / STD)

²⁷ K. Akasaka.: Intermolecular spin diffusion as a method for studying macromolecule-ligand interactions, *J. Magn. Reson.* **1979**, *36*, 135-140

²⁸ K. Umemoto, S. Oikawa, M. Aida, Y. Sugawara: Intermolecular nuclear Overhauser effect and atomic pair potential approaches to wheat germ agglutinin-sugar binding, *J. Biomol. Struct. Dyn.* **1988**, *6*, 593-608

²⁹ M. Mayer, B. Meyer: Characterization of ligand binding by saturation transfer difference NMR spectra, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1999**, *35*, 1784-1788

Mittels einer längeren selektiven Einstrahlung werden zunächst die Signale des Proteins gesättigt, sie sind im Spektrum ausgelöscht. Steht nun ein Ligand im Kontakt mit dem Protein, so überträgt sich ein Teil der Sättigung auf diesen, die Signale des Liganden werden abgeschwächt oder gar ebenfalls gelöscht, wobei der Umfang der Sättigung von der Bindungsstärke des Liganden abhängt. Um eine Abnahme der Signalintensität eindeutig feststellen zu können und gleichzeitig die Signale der nicht-bindenden Liganden herauszufiltern, wird die Differenz der Spektren mit und ohne Sättigung gebildet, so dass ausschließlich die Signale des bindenden Liganden im Spektrum zu sehen sind. Hierüber ist dann auch eine Identifizierung der entsprechenden Komponente in eine Mischung von 10 bis zu 100 Substanzen möglich. Vorteil der Methode ist, dass bereits Affinitäten im millimolaren Bereich beobachtet werden können.

Über das reine Detektieren einer bindenden Wechselwirkung hinaus können aus den STD-Spektren durch eine mehr quantitative Analyse erste strukturelle Informationen über die Orientierung von Protein und Ligand zueinander gewonnen werden. Die Effizienz des Transfers der Sättigung vom Protein zum Ligand hängt vom Abstand ab; sie nimmt mit zunehmender Distanz ab ($1/r^6$). Molekülteile in näherem Kontakt zum Protein werden daher stärker gesättigt als entfernter liegende, so dass sie im Differenzspektrum als Signale stärkerer Intensität zu beobachten sind. Ein Vergleich der Signalintensitäten im einfachen ^1H -Spektrum mit denen im STD-NMR-Spektrum gibt daher Informationen über das Bindungssepitop des Liganden.

Jedoch können mit oben beschriebener Methoden keine strukturellen Informationen über das Protein im Komplex gewonnen werden, d.h. über Lage und Topologie der Bindungsstelle. Hierzu ist eine direkte Beobachtung des Proteins erforderlich, was bei der Größenordnung der meisten Proteine und der damit verbundenen Vielzahl an ^1H -Resonanzen eine Markierung mit den magnetisch aktiven Isotopen ^{15}N und ^{13}C erforderlich macht, um durch Korrelation der stark überlagerten Protonensignale mit diesen Kerne eine erhöhte Auflösung und somit eindeutige Unterscheidung der Resonanzen zu gewährleisten. Hierauf wird später noch eingegangen.

Durch zusätzliche Zugabe eines Kompetitors, dessen Bindungsstelle bekannt ist, ist es allerdings im STD-Experiment möglich, den Liganden aus der Bindungstasche zu verdrängen und somit Information über die Bindungsstelle zu erlangen. Eine quantitative Auswertung der Signalintensitäten im STD-Spektrum ermöglicht dann auch die Bestimmung der Komplexdissoziationskonstante des Protein-Ligand-Komplexes K_d , wenn die Inhibitionskonstante K_i des Kompetitors bekannt ist, mittels der Cheng-Prusoff-Beziehung³⁰:

$$K_i = \frac{IC_{50}}{1 + \frac{[Ligand]}{K_d}} \quad [\text{Gl. 1}]$$

Der IC_{50} -Wert gibt hierbei die Konzentration an, bei der die Aktivität des Liganden durch Verdrängung auf 50% abgesunken ist. Durch Umformung lässt sich bei bekanntem K_i -Wert des Kompetitors der K_d -Wert des vorgelegten Liganden bestimmen:

$$K_d = \frac{[Ligand] \times K_i}{IC_{50} - K_i} \quad [\text{Gl. 2}]$$

Der IC_{50} -Wert ergibt sich aus dem Verdrängungsexperiment:

³⁰ Y. Cheng, W. H. Prusoff: Relationship between the inhibition constant (K_i) and the concentration of inhibitor which causes 50 per cent inhibition (IC_{50}) of an enzymatic reaction, *Biochem. Pharmacol.* **1973**, 22, 3099-3108

$$STD - Int = STD - Int_{\min} + \frac{(STD - Int_{\max} - STD - Int_{\min})}{1 + 10^{\log[Inhibitor] - \log IC_{50}}} \quad [Gl.3]$$

mit $STD - Int$ = Intensität des Signals im jeweiligen STD-Spektrum, $STD - Int_{\min}$ = minimales Signal, $STD - Int_{\max}$ = maximales Signal.

Normiert man die maximale Intensität der STD-Signale in Abwesenheit des Inhibitors auf 1 ($STD - Int_{\max} = 1$), und wird ferner angenommen, dass keine unspezifische Bindung des Liganden an das Protein stattfindet, d.h. eine vollständige Verdrängung durch großen Überschuss des Inhibitors erreicht werden kann ($STD - Int_{\min} = 0$), ergibt sich folgender einfacher Zusammenhang:

$$STD - Int = \frac{1}{1 + \frac{[Inhibitor]}{IC_{50}}} \quad [Gl. 4]$$

Mit $STD - Int$ = relative Intensität des Signals im STD-Spektrum (normiert auf 1 für maximales Signal ohne Inhibitor).

5.2.7.2 NMR-Methodiken für isotoopenmarkierte Proteine

NMR-spektroskopische Untersuchungen haben den gegenüber anderen Methoden Vorteil, orts aufgelöste Informationen zur Protein-Ligand-Wechselwirkung zu liefern. Es kann bei der NMR-Spektroskopie auf verschiedene Möglichkeiten zugegriffen werden, um die Wechselwirkung in Komplexen zu untersuchen. Welche hierbei Anwendung finden, hängt von der Stabilität des Komplexes und den gewünschten Informationen ab. Soll zunächst nur untersucht werden, ob eine Bindung eines Liganden an ein Protein, auftritt, ist dies über Änderungen in den chemischen Verschiebungen möglich. Bindet ein Ligand an ein Protein, so ergibt sich eine Änderung in der Elektronendichte der einzelnen Atome der an der Bindung beteiligten Aminosäuren, die durch eine kleine strukturelle Änderungen an der Bindungsstelle oder durch die zusätzliche Elektronendichte von Teilen des Liganden, z.B. Aromaten, hervorgerufen werden können. Hierdurch sind in der Nähe der Bindungsstelle die Resonanzen in der gebundenen Form ν_b von denen der freien Form ν_f verschieden, was als eine Verschiebung der betreffenden Signale des Proteins im NMR-Spektrum zu beobachten ist. Ein geeignetes Experiment hierfür ist beispielsweise ein 1H - ^{15}N -Korrelationspektrum, das ^{15}N , 1H -HSQC, welches auch für die folgenden Untersuchungen eingesetzt wurde (siehe Kap. NMR-Untersuchungen am Cyclophilin). Das ^{15}N , 1H -HSQC liefert, mit Ausnahme der Proline (kein Signal) und der Amidprotonen in den Seitenketten (2 Signale), je Aminosäure ein Signal und besitzt damit eine gute Auflösung der einzelnen Resonanzen. Der Betrag der Änderung der Resonanzfrequenzen $\Delta\nu = |\nu_b - \nu_f|$ ist dabei unabhängig von der Stärke der Bindung des Liganden.

In der nachfolgende Abbildung ist beispielhaft am Cyclophilin – AWD-43603 - Komplex das Prinzip gezeigt.

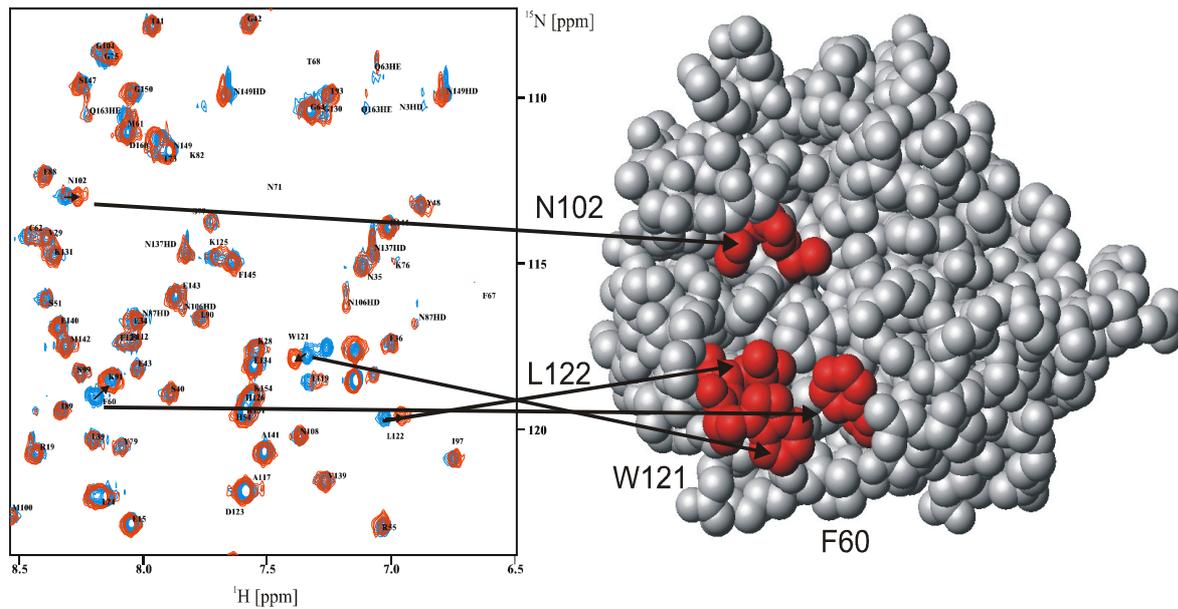


Abb. 13: Überlagerung der ^{15}N , ^1H -HSQC-Spektren von freiem Cyclophilin (blau) und Cyclophilin im Komplex mit AWD-43603 A (rot) sowie Korrelation der Signale zu den entsprechenden Aminosäuren im Protein (rechte Seite, rote Markierung)

Zu unterscheiden sind zwei Grenzfälle: Bei einer starken Bindung des Liganden an das Protein, d.h. bei einer Dissoziationskonstante des Komplexes K_d im Bereich 10^{-8} mol/l und kleiner ist der Austausch zwischen freier und gebundener Form langsam auf der NMR-Zeitskala. Liegen Ligand und Protein im gleichen Verhältnis vor oder der Ligand im Überschuss, so ist im Spektrum ein Signal bei ν_b zu sehen. Läge das Protein im Überschuss vor, so wären zwei Signale, nämlich die der gebundenen und der freien Form, bei ν_b und ν_f zu sehen.

Der andere Grenzfall ist ein schneller Austausch des Liganden auf der NMR-Zeitskala bei K_d 's größer als 10^{-6} mol/l. In diesem Falle ergibt sich die im Spektrum zu beobachtende Resonanz ν als Mittelung der Frequenzen der freien und der gebundenen Form entsprechend ihrer Anteile:

$$\nu = p_b \nu_b + p_f \nu_f$$

mit p_b als Anteil der gebundenen Form und p_f als Anteil der freien Form des Proteins, wobei $p_b + p_f = 1$ gilt.

Über das qualitative Detektieren einer Bindung hinaus kann damit auch die Stärke der Wechselwirkung bestimmt werden. Die Messung der Konzentrationsabhängigkeit der Änderungen der chemischen Verschiebung bei Komplexbildung liefert die Bindungskonstante³¹:

$$\nu = p_b \nu_b + p_f \nu_f \quad [\text{Gl. 5a}]$$

mit p_b als Anteil der gebundenen Form und p_f als Anteil der freien Form des Proteins und

³¹ W. Harrington, A. R. Peakocke, Hrsg. R. A. Dwek,.: Nuclear Magnetic Resonance (NMR) in Biochemistry, Application to Enzyme Systems, Clarendon Press, Oxford, 1973, 136

$$p_b + p_f = 1 \quad [\text{Gl. 5b}]$$

Durch Einsetzen von Gl.5b in Gl.5a und umstellen der Gleichung erhält man:

$$p_b = (v - v_f) / (v_b - v_f) \quad [\text{Gl. 6}]$$

Die Komplexdissoziationskonstante ist gegeben durch

$$K_d = [E] \cdot [L] / [EL] \quad [\text{Gl. 7}]$$

mit

[E] = Konzentration des Enzyms, [L] = Konzentration des Liganden und
[EL] = Konzentration des Enzym/Ligand-Komplexes.

Weiterhin gilt:

$$[E] = [E]^0 - [EL] \quad [\text{Gl. 8a}] \text{ und}$$

$$[L] = [L]^0 - [EL] \approx [L]^0 \quad [\text{Gl. 8b}]$$

mit

[E]⁰ = Ausgangskonzentration des Enzyms, [L]⁰ = Ausgangskonzentration des Liganden.

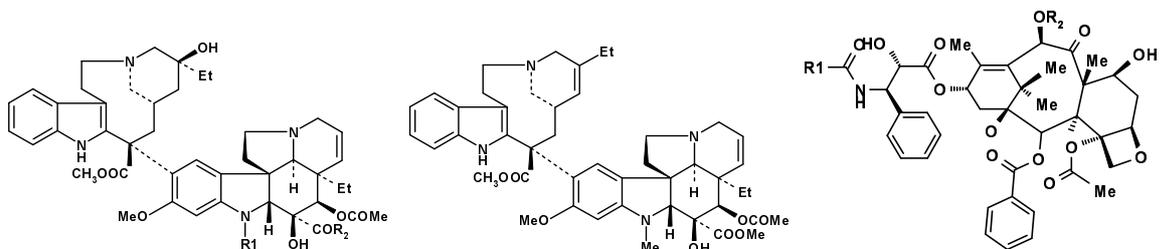
Mit $p_b = [EL] / [E]^0$, dem Einsetzen von Gl.8 in Gl.7 und unter Verwendung von Gl. 6 ergibt sich folgender Zusammenhang für die Änderung der chemischen Verschiebungen in Abhängigkeit der Konzentration des Liganden:

$$\Delta v = (v - v_f) = (v_b - v_f) \times \frac{[L]^p}{K_d + [L]^p} \quad [\text{Gl. 9}]$$

Durch Messung der Änderung der chemischen Verschiebung ($v - v_f$) in Abhängigkeit von der Ligandkonzentration $[L]^0$ lässt sich K_d ermitteln.

5.2.8 Verwendete Referenzverbindungen

Zur Validierung der eingesetzten Testsysteme und zur Profilierung und Bewertung der eigenen Substanzen erfolgte der Einsatz von niedermolekularen Tubulinbindern aus der Literatur, sowie der bekannten Naturstoffe aus der klinischen Anwendung.



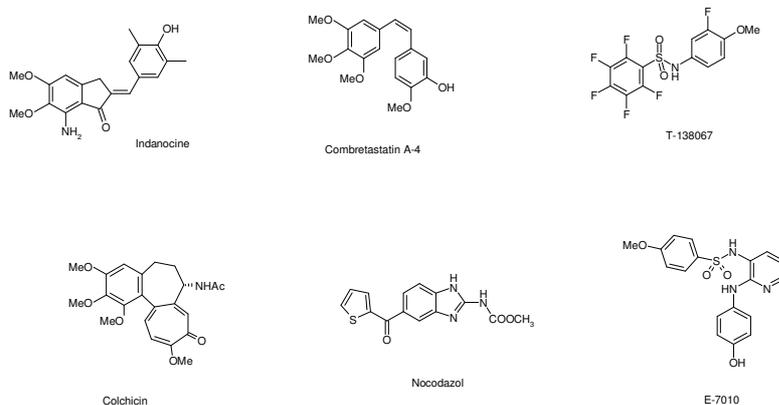
	R ₁	R ₂
Vincristine	CHO	OMe
Vindesine	Me	NH ₂
Vinblastine	Me	OMe

Vinorelbine

	R ₁	R ₂
Taxol / Paclitaxel	Phenyl	COMe
Taxotere / Docetaxel	OBu	H

Formelschema 1: Die in der klinischen Anwendung befindlichen Tubulin-Binder

Bisher sind nur die Taxane und Vincaalkaloide für die Therapie zugelassen. Es handelt sich vielfach um Standardtherapeutika bei der Behandlung von metastasierendem Brustkrebs, Eierstockkrebs oder Nicht-Kleinzelligem Lungentumor sowie für Sarkome und Lymphome. Bisher gibt es keinen zugelassenen niedermolekularen Tubulin-Binder auf dem Markt, es befinden sich aber eine Anzahl von Projekten verschiedener Firmen in der klinischen Entwicklung.



Formelschema 2: Strukturformeln der verwendeten niedermolekularen Referenzverbindungen

Soweit die Referenzverbindungen nicht käuflich zu erwerben waren, wurden sie nach den bekannten Vorschriften synthetisiert.

Die Referenzverbindungen zeigten im Tubulin-Polymerisations-Assay und im Standard XTT Proliferationstest reproduzierbare Aktivitäten, die in guter Übereinstimmung mit den Literatur-Werten sind.

Referenzen	Hemmung Tub.-Polym. 30% MAPs	Hemmung der Proliferation im XTT Assay, IC ₅₀ in µM			
		KB/HeLa	NCI-H460	SF-268	SK-OV-3
Paclitaxel	-	0.007	0.008	0.012	0.005
Vindesine	0.47	0.002	0.007	0.005	0.004
Vincristine	0.38	0.002	0.008	0.008	0.007
Colchicine	2.6	0.027	0.067	0.048	0.051
Nocodazole		0.042	0.044	0.089	0.050
Combretastatin A4	2.58	0.013	0.013	0.011	0.015
Indanocine		0.047	0.048	0.033	0.035
T-138067	1.05	0.157	0.148	0.124	0.142
E-7010	1.55	1.249	>50	1.452	0.916

Tab. 5: Ausgewählte IC₅₀-Werte der Referenzverbindungen im XTT-Proliferationsassay und im Tubulin-Polymerisationsassay in µM

Insbesondere die Vincaalkaloide und Paclitaxel zeigen im angewendeten XTT-Assay eine außerordentlich hohe Zytotoxizität und sind damit als ein Maßstab für die Wirksamkeit anzusehen.

5.3 Bearbeitung der ausgewählten Leitstrukturen

5.3.1 Einführung

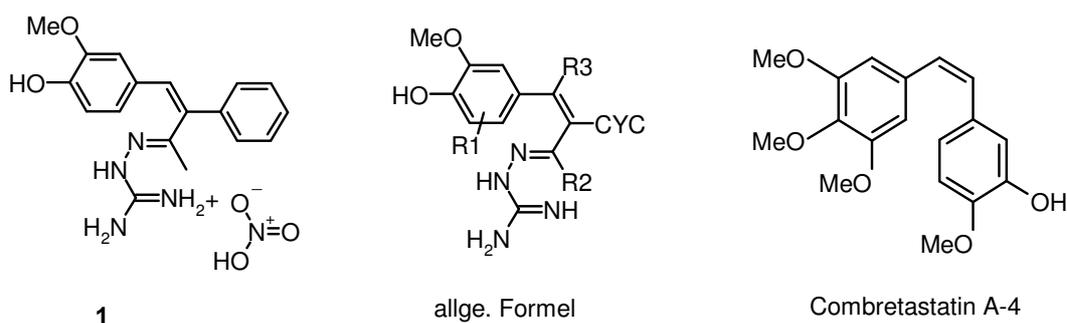
Im vorliegenden Projekt wurden Leitstrukturen aus der Pharmaforschung Onkologie der ehemaligen ASTA Medica AG eingesetzt. Diese Leitstrukturen resultieren aus einem im HTS-Format durchgeführten Proliferationsassay über Teile der Substanzbank in der beschriebenen Art und Weise. Unter einer Leitstruktur wird hier eine Verbindung verstanden, die die folgende Qualifikation aufweist:

- Die Proliferation wird an mindestens einer Zelllinie mit einer $IC_{50} < 1 \mu\text{M}$ gehemmt.
- Der biologische Effekt gegen das gewünschte Target liegt im unteren mikromolaren Bereich ($IC_{50} < 10 \mu\text{M}$).
- Eine bestimmte Selektivität der Verbindung gegenüber anderen Targets ist gegeben.
- Die Struktur verfügt über Positionen, an denen chemische Modifikationen durchgeführt werden können.
- Die Verbindung hat ein mittleres Molekulargewicht von 200–600 g/mol.
- Das Ausgangsmaterial ist für chemische Synthesen gut zugänglich.
- Ein Patentschutz für die neuen Derivate ist nach gegenwärtigem Kenntnisstand gegeben.

Neben den biologischen Aktivitäten ist für die Qualität einer Leitstruktur, vor allem die chemisch-präparative Zugänglichkeit und die Patentsituation von Bedeutung.

5.3.2 Die Leitstruktur 1

In der angewendeten Screening-Hierarchie zur Identifizierung von neuen Tubulin-Bindern fiel bei einem HTS-Lauf die Substanz **1** auf, welche schon 1969 bei den ehemaligen ASTA Werken synthetisiert worden war. Sie zeigt eine Inhibition der Polymerisation von Tubulin im einstelligen mikromolaren Bereich ($IC_{50} = 5.6 \mu\text{M}$) und eine beachtliche zytotoxische in-vitro Aktivität an ausgewählten Tumorzelllinien. Mit diesen Eigenschaften und unter Berücksichtigung der Patentlage ist die Verbindung **1** als Leitstruktur geeignet.



Formelschema 3: Die potentielle Leitstruktur **1** mit allgemeiner Formel im Vergleich zu Combretastatin A-4

XTT Assay, IC ₅₀ [µM]	Zelllinie	Organ	1	Combretastatin A-4
	KB/HeLa	Cervix	1.2	0.013
	SKOV-3	Eierstöcke	1.0	0.015
	SF-268	ZNS	0.8	0.011
	NCI-H460	Lunge	11	0.013
	RKOp27	Darm	2.4	0.008

Tab. 6: Hemmwirkung von **1** und Combretastatin A-4 auf die Proliferation von ausgewählten Krebszelllinien

Die Verbindung **1** ähnelt in der Struktur dem Naturstoff Combretastatin A-4. Combretastatin diente bisher schon in vielfältiger Weise als Leitstruktur für neue Tubulin Binder^{32, 33}. Mit CS-A4P befindet sich ein Phosphat-Prodrug auf Basis Combretastatin der Firma OXiGENE in der klinischen Entwicklung der Phase II³⁴, Aventis entwickelt mit AVE8062 ein Combretastatin-Derivat in Phase I³⁵. Aufgrund dieser ermutigenden Datenlage wurde beschlossen, diese Strukturklasse **1** chemisch weiter zu verfolgen. Es sollte eine Substanzbibliothek von Derivaten in einer vierstufigen Synthesesequenz an fester Phase aufgebaut werden. Dazu sollte die folgende Synthesestrategie zum Einsatz kommen:

1. Verknüpfung von 4-Hydroxybenzaldehyd- bzw. eines 4-Hydroxyphenylketonderivat über einen Silylspacer an ein Tentagelharz
2. Eine Claisen-Schmidt-Kondensation mit einem Aldehyd bzw. Keton zur Herstellung der entsprechenden Stilbenzwischenstufe
3. Umsetzung mit Aminoguanidiniumnitrat zum Guanylhydrazon
4. Abspaltung des Produktes vom Harz

Modellhaft sollte zunächst die Darstellung von **1** in Lösung realisiert werden. Die erarbeiteten Reaktionsbedingungen sollten anschließend für die Synthese an der festen Phase adaptiert werden.

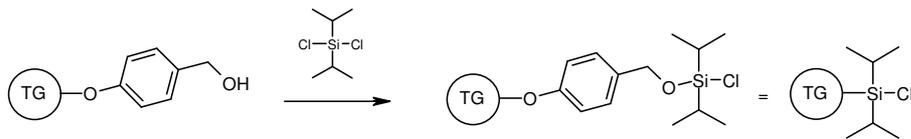
³² C. M. Lin, H. H. Ho, G. R. Pettit, E. Hamel, *Biochemistry* **1989**, *28*, 6984-6991

³³ G. R. Pettit, S. B. Singh, M. R. Boyd, E. Hamel, R. K. Pettit, J. M. Schmidt, F. Hogan, *J. Med. Chem.* **1995**, *38*, 1666-1672

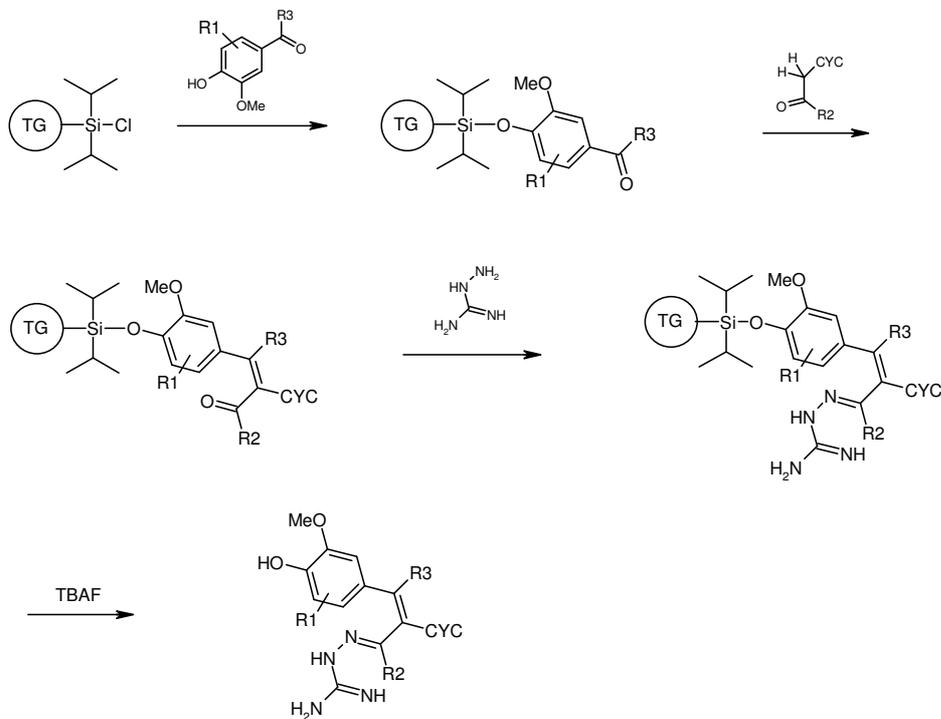
³⁴ G. R. Pettit, C. Temple, V. L. Narayanan, R. Varma, M. J. Simpson, M. R. Boyd, G. A. Rener, N. Bansal, *Anti-Cancer Drug Des.* **1995**, *10*, 299-309

³⁵ Poster 779, 93rd AACR Annual Meeting **2002**, San Francisco, USA

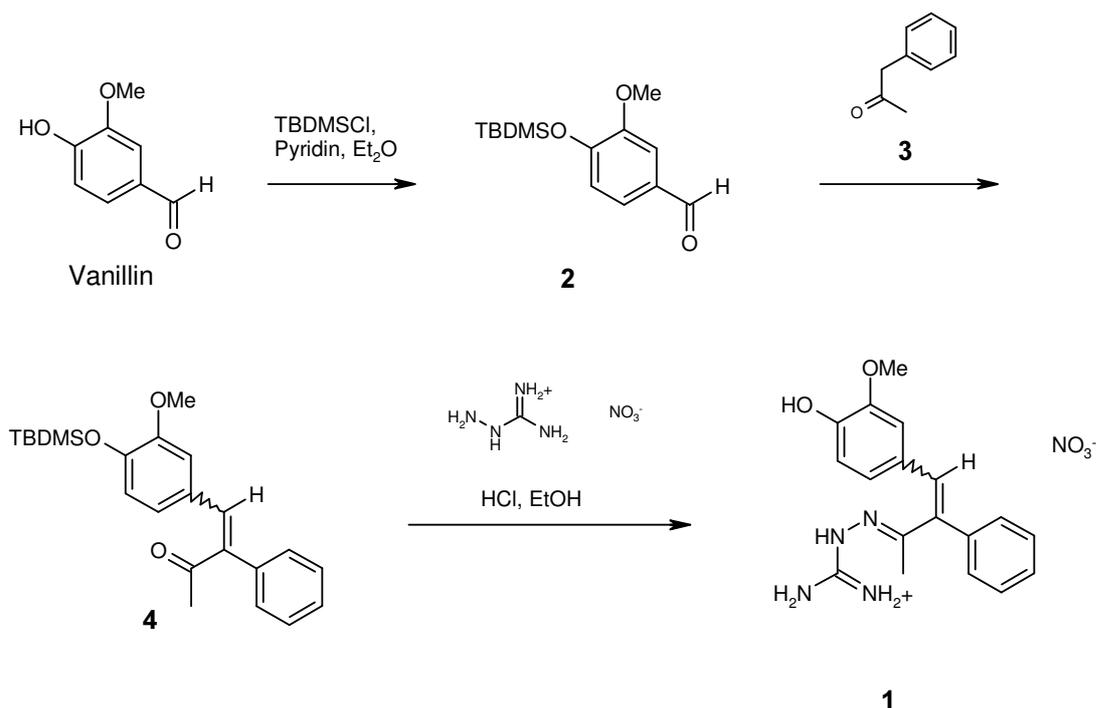
Harz:



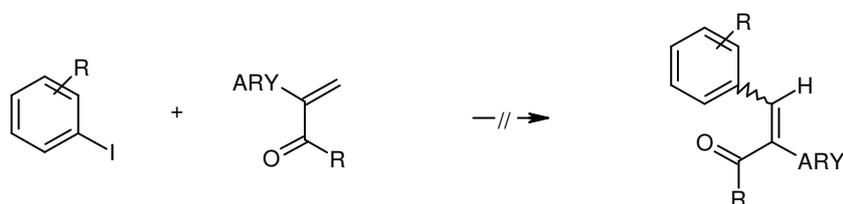
Sequenz:

Formelschema 4: Synthesestrategie für die Optimierung der Leitstruktur **1** an fester Phase

Als erster Schritt für die Synthese von **1** in Lösung wurde der phenolische Hydroxylrest von Vanillin unter Standardbedingungen in guten Ausbeuten als TBDMS-Ether geschützt. Die anschließende Umsetzung mit Phenylacetonderivaten in einer Claisen-Schmidt-Kondensation brachte allerdings unter den verschiedensten Reaktionsbedingungen (basisch, sauer) nicht die gewünschte Umsetzung. Die Zwischenstufe **4** konnte entweder gar nicht oder nur in geringer Ausbeute und schlechter Reinheit erhalten werden.

Formelschema 5: Synthese der Leitstruktur **1** in Lösung

Alternativ wurde deshalb eine Heck-Kupplung eines Aryliodides mit einem Acroleinderivat zur Bildung des korrespondierenden Stilbenderivates herangezogen. Auch diese Versuche führten nicht zu einer besseren Zugänglichkeit der gewünschten Stilbenzwischenstufe.



Formelschema 6: Versuch zum Aufbau der Stilbenzwischenstufe durch Heck-Reaktion.

Trotz der Schwierigkeiten bei der Synthese der Zwischenstufe **4** wurde ein erster Versuch zur Bildung des Guanylhydrazons unternommen. Hierzu wurde Stilben **4** mit Aminoguanidininnitrat in literaturbekannter Weise umgesetzt³⁶. In Gegenwart von konzentrierter HCl in Ethanol unter Rückfluß konnte die Verbindung **1** allerdings nur in 3%iger Ausbeute isoliert werden.

Die geringen Ausbeuten bei der Claisen-Schmidt-Kondensation sowie bei der Bildung des Guanylhydrazons ließen den erfolgreichen Aufbau einer Substanzbibliothek an fester Phase unwahrscheinlich erscheinen. Es wurde deshalb beschlossen, die Leitstrukturentwicklung von **1** nicht weiter zu verfolgen.

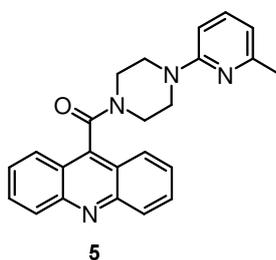
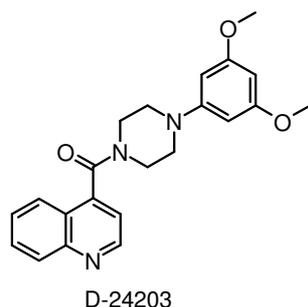
³⁶ A. Cerani, P. Ulrich, J. Med. Chem. **1984**, 27, 35-40

5.3.3 Die Leitstruktur D-24203

5.3.3.1 Einführung und Zielsetzung

Ausgehend von der Leitstruktur D-24203 wird die Strukturklasse der Aryl-4-piperazinyldicarbonylverbindungen als potentielle niedermolekulare Tubulinbinder bei Zentaris eingehend untersucht³⁷. Als Folge der Hemmung der Tubulinpolymerisation werden die Krebszellen in der G2M-Phase arretiert und die Zellen in die Apoptose getrieben. Die bisherige Optimierung bei Zentaris hat zu interessanten Derivaten geführt, die sich durch exzellente in-vitro Ergebnisse auszeichnen, beispielhaft sei die Verbindung D-82318 genannt³⁸. Diese Verbindung wurde bereits vielversprechend an humanen Tumoren in Xenograft-Tiermodellen getestet. Gegenwärtig werden neue galenische Formulierungen für eine orale und i.v.-Applikation entwickelt. Die Substanzklasse zeichnet sich ansonsten durch leichte Zugänglichkeit, gute Stabilität und geringes Nebenwirkungspotential aus.

Als ein Vertreter der Optimierung dieser Substanzklasse mittels Medizinischer Chemie fiel die Verbindung **5** aus der Zentaris Forschung auf. In der **5** ist der Phenylrest der Leitstruktur durch einen Heterocyclus ersetzt. Die Verbindung hemmt im biochemischen Assay mit einem IC₅₀-Wert von 1.57 µM die Tubulinpolymerisation, dies ist vielversprechend. Zudem weist **5** eine starke zytotoxische Aktivität in den zellulären Proliferations-Assays auf. Neben den biologischen Eigenschaften sind bestimmte physikochemische Parameter wichtig für die Bewertung des Potentials einer Substanz. Mittels des Programmes QikProp³⁹ wurden einige physikochemischen Eigenschaften berechnet, wobei die Ergebnisse einen schlechten clogP-Wert und eine geringe Wasserlöslichkeit zeigen. Die schlechte Wasserlöslichkeit bestätigte sich experimentell mit einem Wert um 1 µg/ml.



		D-24203	5
TUB Pol Inh., 30% MAPs	IC ₅₀ , µM	1.60	1.57
NCI-H460, XTT Assay	IC ₅₀ , µM	0.059	0.029
SF-268, XTT Assay	IC ₅₀ , µM	0.042	0.040
SKOV-3, XTT Assay	IC ₅₀ , µM	0.026	0.025
KB/HeLa, XTT Assay	IC ₅₀ , µM	0.076	0.013
M.W.		377.44	382.64
clogP ber.		2.4	4.5
Wasserlöslichkeit ber.	µg/ml		0.113
Wasserlöslichkeit best.	µg/ml	13.3	1.07

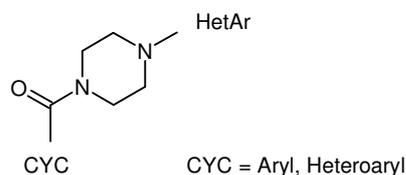
Tab. 7: Vergleich der Strukturen und biologischen sowie physikochemischen Daten der Leitstruktur D-24203 mit **5**

³⁷ Poster 3654, 93rd AACR Annual Meeting **2002**, San Francisco, USA

³⁸ Poster 112, EORTC-NCI-AACR Annual Meeting **2002**, Frankfurt, Germany

³⁹ QikProp 1.6, Schrödinger Inc., 1500SW First Ave., Suite 1180, Portland, Oregon 97201, USA.

Basierend auf diesen Erkenntnissen sollte der Aufbau einer Bibliothek neuer Analoga von **5** mit verbesserten physikochemischen Eigenschaften bei vergleichbarer biologischer Aktivität mittels Parallelsynthese hergestellt werden. Die allgemeine Struktur dieser Derivate ist in Schema 7 abgebildet.



Formelschema 7: Allgemeine Formel der geplanten Bibliothek

Folgende Vorgehensweise war für die Realisierung der Parallelsynthese geplant:

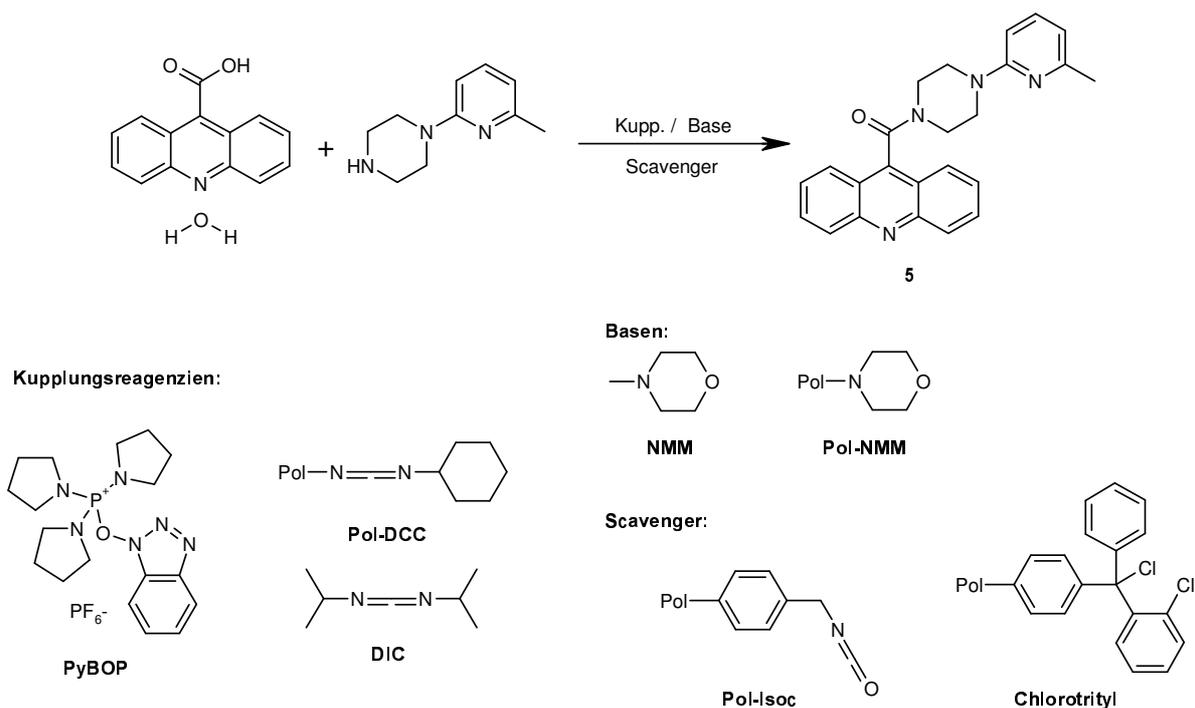
1. Entwicklung einer neuen synthetischen Methode
2. Virtuelles Design der Bibliothek
3. Herstellung der benötigten Bausteine
4. Generierung der Bibliothek mittels automatisierter Synthese am ChemSpeed ASW2000
5. Prüfung auf Identität und Reinheit
6. Aufreinigung
7. Biologische Testung

5.3.3.2 Entwicklung einer neuen synthetischen Methode

Als Modellreaktion wurde die Synthese der Verbindung **5** mittels polymer-gebundener Reagenzien und/oder Scavenger (Polymere zum Abfangen überschüssiger Reagenzien) bearbeitet. Bisher wurde diese Reaktion im Labor in *N,N'*-Dimethylformamid als Lösungsmittel unter Verwendung von PyBOP als Kupplungsreagenz und *N*-Methylmorpholin als Base über Nacht bei Raumtemperatur durchgeführt.

Zur Ermittlung der optimalen Reaktionsbedingungen wurden 24 Versuche im Bohdan Miniblock System angesetzt⁴⁰. Die in Schema 8 gezeigten Kupplungsreagenzien, Basen und Scavenger wurden in unterschiedlichen Verhältnissen kombiniert.

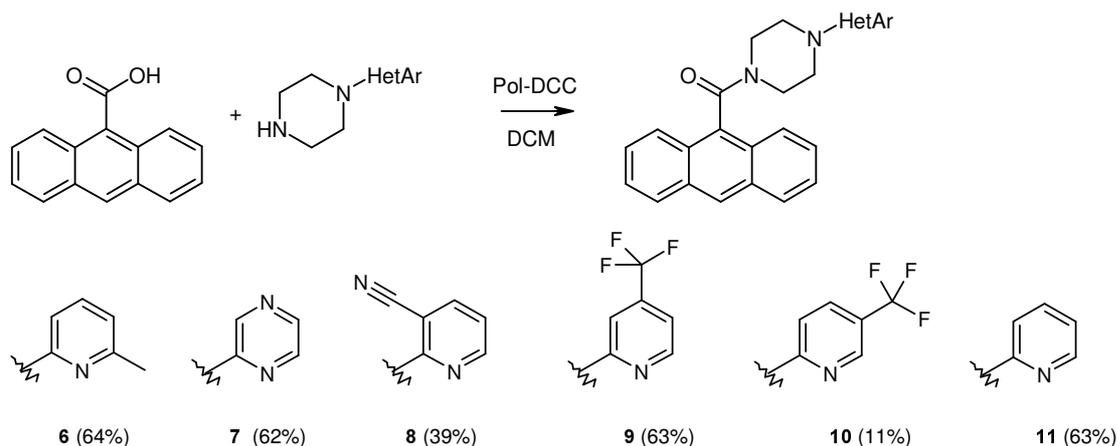
⁴⁰ Mettler-Toledo Bohdan Inc., 562 Bunker Court, Vermon Hills, IL 60610, USA; www.bohdan.com

Formelschema 8: Optimierung der Synthese von **5** am Bohdan Miniblock

Laut DC-Kontrollen und LC-MS Messungen erfolgte die Umsetzung bei Verwendung von *N*-Cyclohexylcarbodiimid, *N'*-methylpolystyrol HL von der Firma Novabiochem (als Pol-DCC in Schema 8 bezeichnet) mit den besten Ausbeuten und weniger Nebenprodukten. Ein leichter Überschuss an Carbonsäure wurde benutzt, um die Bildung von Nebenprodukten zu minimieren. Das Lösungsmittel DMF ließ sich durch Dichlormethan ohne deutliche Verschlechterung der Ausbeuten ersetzen. Die Arbeit mit Dichlormethan-Stammlösungen erleichterte nicht nur die Aufarbeitung der Versuche, sondern verkürzte auch die Reaktionszeiten. Dieses Verhalten ist wahrscheinlich auf die Quelleigenschaften des verwendeten Harzes zurückzuführen.

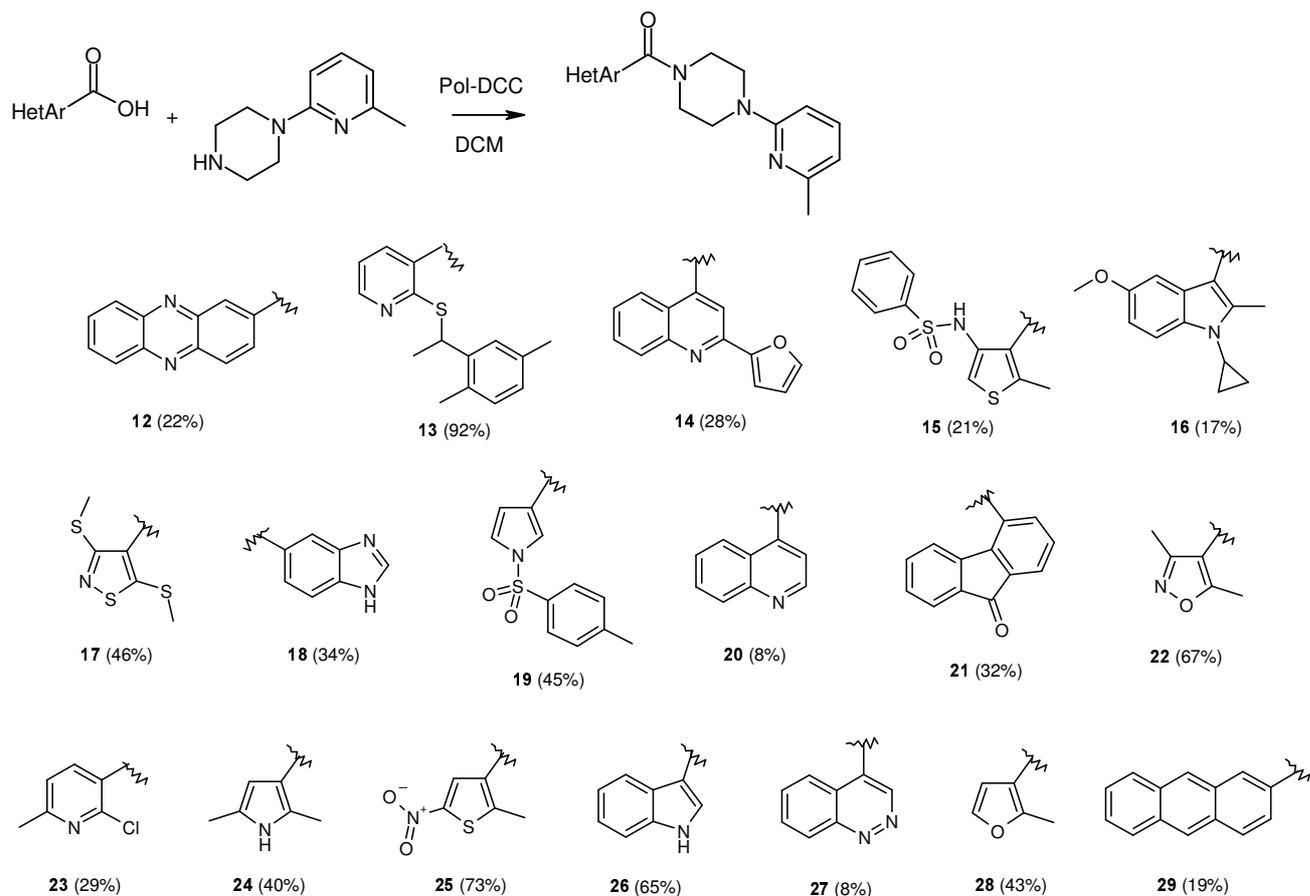
Zum Abfangen überschüssiger Säure wurde das in Schema 8 „Chlorotriyl“ genannte Harz und für das überschüssige Amin polymergebundenes Isocyanat verwendet. In beiden Fällen zeigten DC-Kontrollen eine geringfügige polare Verunreinigung. Die endgültige Aufreinigung der Reaktionsgemische erfolgte durch chromatographische Trennung mittels ISOLUTE Flash SI Columns.

Um feststellen zu können, ob die Methode auf unterschiedliche Piperazinderivate, sowie auf verschiedene Heteroarylcarbonsäuren übertragbar ist, wurden weitere repräsentative Derivate synthetisiert. Hierzu wurde versucht, Anthracen-9-carbonsäure mit verschiedenen Heteroarylpiperazinen umzusetzen. Wie in Schema 9 gezeigt wird, gelangen die Reaktionen in vergleichbaren Ausbeuten.



Formelschema 9: Umsetzung von Anthracen-9-carbonsäure mit verschiedenen Heteroarylpiperazinen

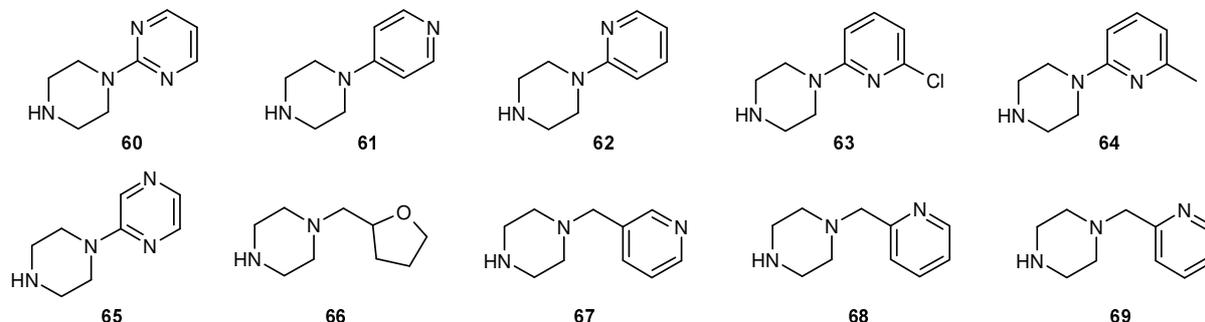
Die gleichen Reaktionsbedingungen wurden auf die Reaktion von 21 ausgewählten Heteroarylcarbonsäuren mit 1-(6-Methylpyrid-2-yl)piperazin im Bohdan Miniblock System bzw. in Robotergläsern angewendet. In 18 Fällen wurden die gewünschten Produkte sauber isoliert, wobei die Ausbeuten sehr unterschiedlich waren (8%-73%).



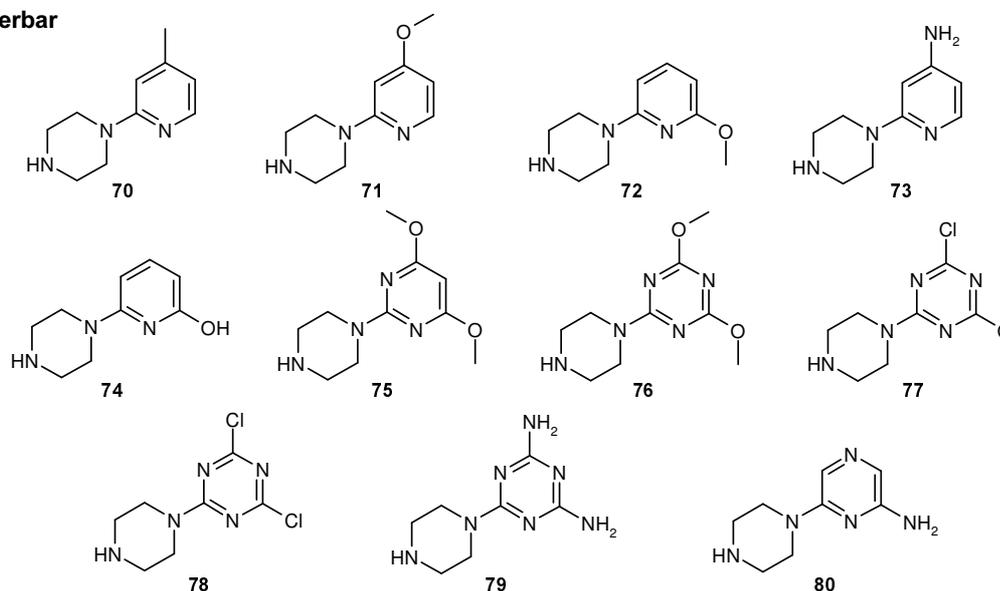
Formelschema 10: Parallelsynthese einer Auswahl von Hetarylketopiperazinen im Bohdan Miniblock

Da im Gegenzug nur 10 *N*-Heteroarylpiperazine (60-69) kommerziell verfügbar waren, wurden weitere 11 *N*-Heteroarylpiperazine (70-80) für eine synthetische Bereitstellung ausgesucht.

kommerziell verfügbar



synthetisierbar



Formelschema 12: Übersicht über die kommerziell verfügbaren oder synthetisch einfach zugänglichen *N*-Heteroarylpiperazine

Zur endgültigen Auswahl der Edukte wurden die geplanten Zielverbindungen mittels in-silico Methoden untersucht. Die geplanten Endprodukte wurden mit dem Programm GOLD⁴¹ an eine Tubulin-Struktur angedockt, um festzustellen, wie sie in die Bindungstasche von Tubulin passen. Als Basis für die Tubulin-Struktur wurden die von Lowe und Downing publizierten Daten verwendet⁴².

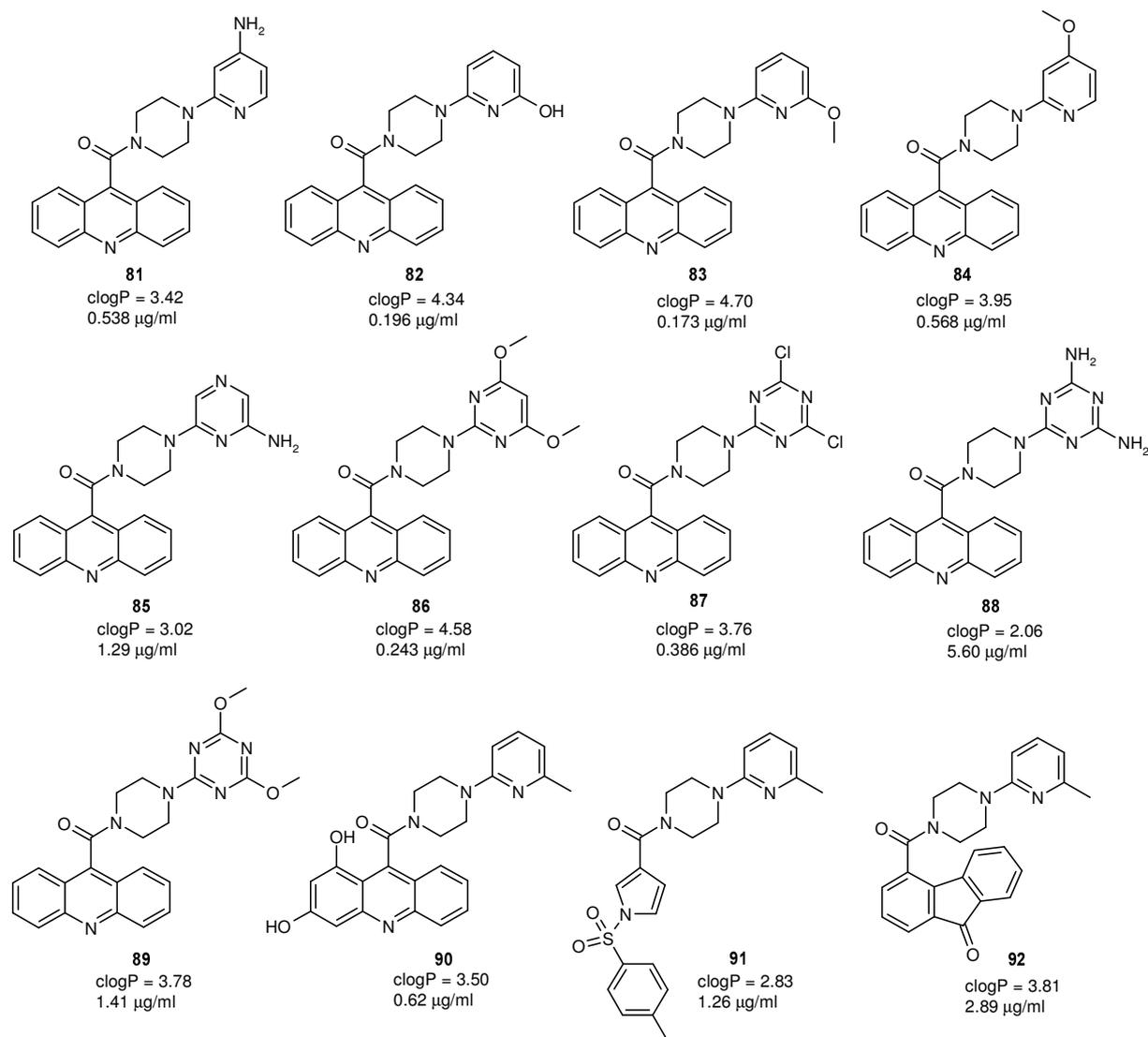
Die daraus resultierenden Ergebnisse zeigten, daß die Größe des Heteroarylcarbonylrestes wichtig für die Konformation des Piperazinrings ist. Generell gilt, je größer der Heterocyclus desto größer die Wahrscheinlichkeit, daß der Piperazinring keine Sesselkonformation annimmt. Diese Eigenschaft zeigte sich auch als essentiell für die Tubulinbindung einer

⁴¹ (a) Cambridge Crystallographic Data Centre, 12 Union Road, Cambridge, CB2 1EZ, UK; (b) G. Jones, P. Willett, R.C. Glen: Molecular recognition of receptor sites using a genetic algorithm with a description of desolvation, *J. Mol. Biol.* **1995**, *254*, 43-53; (c) G. Jones, P. Willett, R.C. Glen, A.R. Leach, R.Taylor: Development and Validation of a Genetic Algorithm for Flexibel Docking, *J. Mol. Biol.* **1997**, *267*, 727-748

⁴² J. Lowe, H. Li and K. H. Downing, *J. Mol. Biol.* **2001**, *313*, 1045-1057

Reihe bereits getesteter Verbindungen. Außerdem sind größere Substituenten am Heteroarylpiperazin nicht erwünscht, da die adressierte Bildungstasche wenig Raum für Substituenten bietet. Die 2- und 4-Positionen sollten an diesem aromatischen Rest zur Erhaltung der Wirkung frei bleiben.

Wie schon in der Einleitung angedeutet, besteht die Zielsetzung darin eine Bibliothek von Ketopiperazinen mit verbesserten physikochemischen Parameter (clogP, Wasserlöslichkeit) herzustellen. Zur Abschätzung dieser Parameter wurden die physikochemische Eigenschaften einiger Verbindungen mit Hilfe des QikProp-Programms berechnet. Die Verbindungen mit den interessantesten clogP-Werte und Wasserlöslichkeiten sind im folgenden Schema dargestellt.



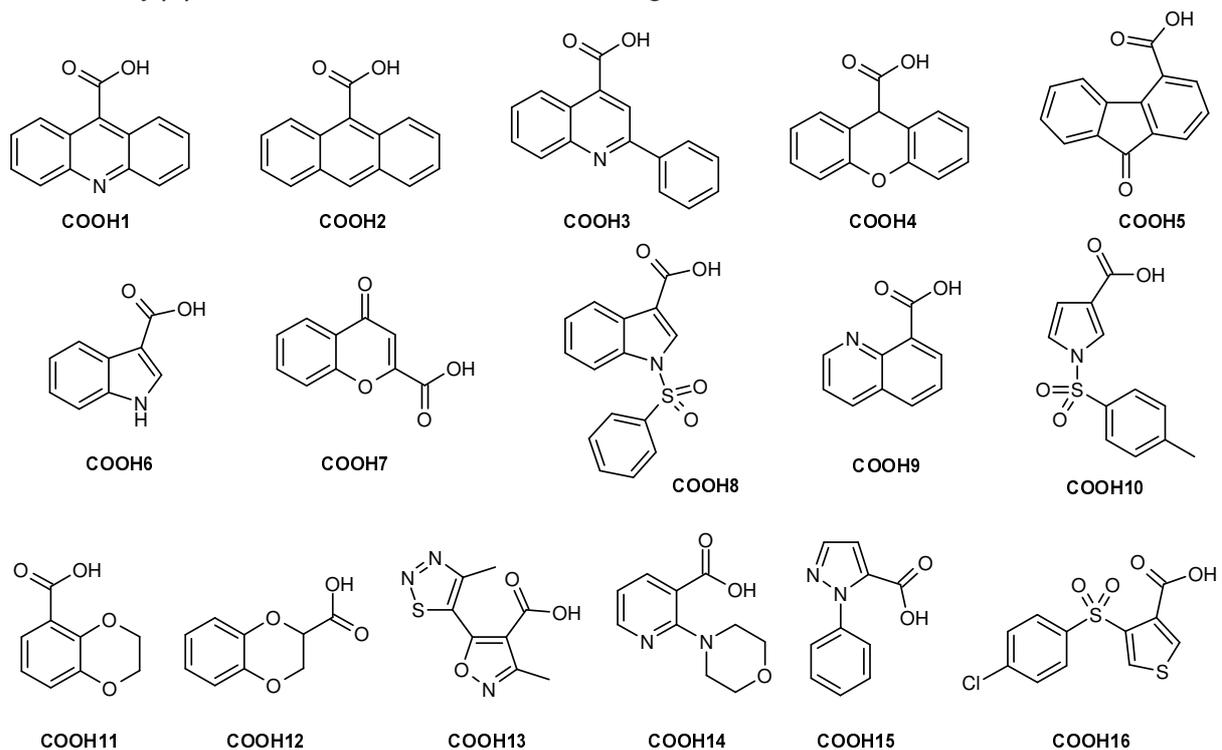
Formelschema 13: Ausgewählte Zielprodukte und die mit QikProp berechneten Parameter clogP und Wasserlöslichkeit

Insbesondere die Verbindungen **85**, **88**, **89**, **91** und **92** zeigen nach der Berechnung interessante physikochemische Eigenschaften, die Vorteile in der Löslichkeit gegenüber der Leitstruktur aufweisen sollten. Damit konnte gezeigt werden, dass der Ersatz des Pyridins

durch andere Heterocyclen, bzw. der Ersatz des Acridin-Rings durch andere Reste zum gewünschten Erfolg führt.

5.3.3.4 Auswahl und Bereitstellung der Edukte

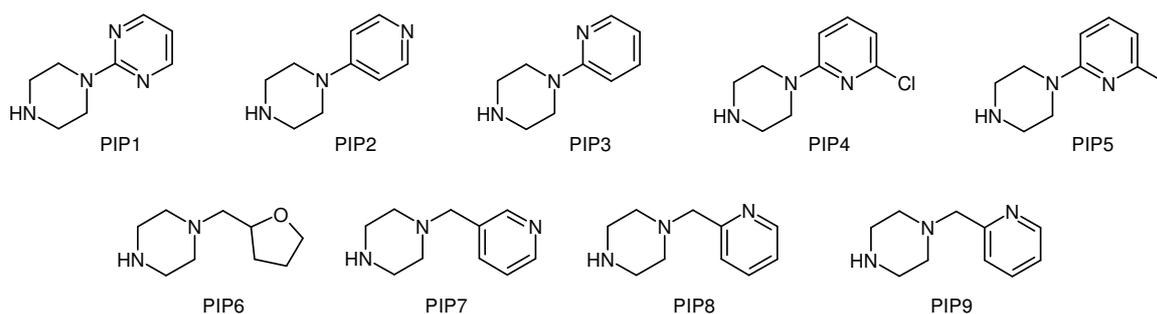
Aufgrund der gesicherten Verfügbarkeit, der erwarteten biologischen Aktivitäten und ihrer berechneten physikochemischen Eigenschaften wurden 16 Heteroarylcarbonsäuren und 20 N-Heteroarylpiperazine für den Parallelansatz ausgewählt.



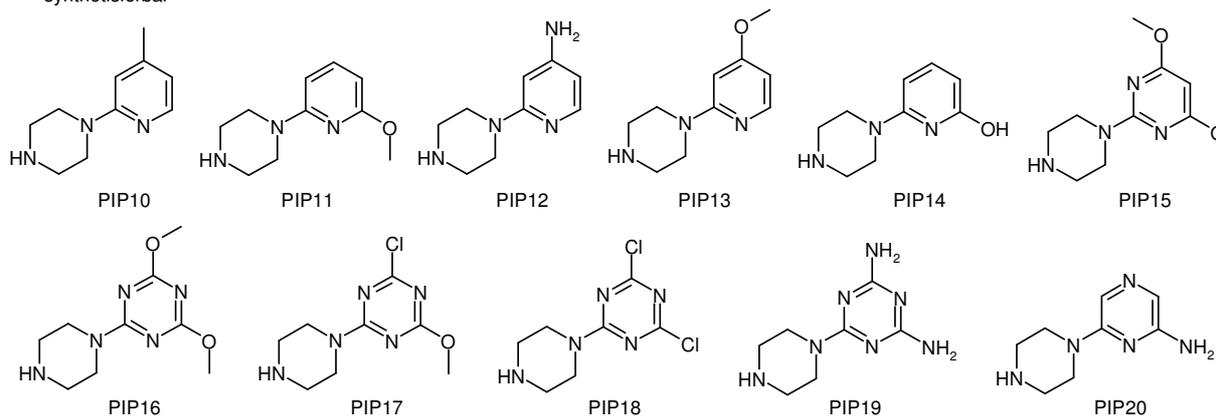
Formelschema 14: Aufstellung Heteroarylcarbonsäuren für die Bibliothekssynthese

Da nur 9 der gewünschten Piperazin-Derivate kommerziell verfügbar waren, sollten weitere 11 Ausgangsstoffe hergestellt werden.

kommerziell verfügbar



synthetisierbar



Formelschema 15: Aufstellung der Piperazin-Derivate für die Bibliothekssynthese

Die Synthese der Piperazin-Derivate sollte in Literatur-bekannter Weise mittels direkter Substitution der entsprechenden 2-Chlor-Heterocarylderivaten erfolgen. Zunächst wurde die Umsetzung von 2-Chlorpyridin mit Piperazin unter verschiedensten Reaktionsbedingungen untersucht:

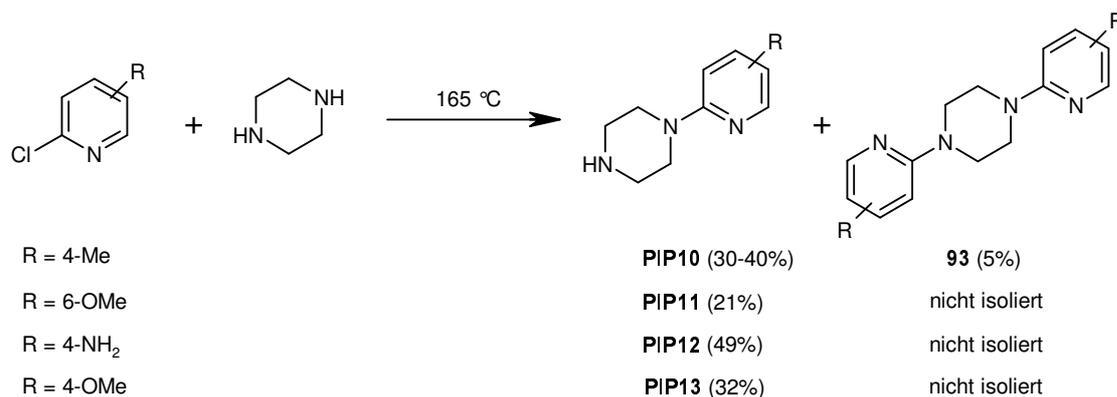
- 2-Chlorpyridin und Piperazin (2 Äq.) in *n*-Butanol 48 Stunden bei Rückfluß⁴³
- 2-Chlorpyridin und Piperazin (5 Äq.) über Nacht bei 165 °C⁴⁴
- in Pyridin bei 155 °C⁴⁵

Für die ersten Versuche wurde 2-Chlor-4-methylpyridin oder 2-Chlor-6-methoxypyridin jeweils mit 2 Äq. Piperazin in *n*-Butanol umgesetzt oder alternativ mit 5 Äq. Piperazin ohne Zugabe von Lösungsmittel erhitzt. Die Reaktionen in *n*-Butanol brauchten in der Regel länger als 24 Stunden Erhitzen unter Rückfluß, während die ohne Lösungsmittel in 2 bis 5 Stunden vollständig umgesetzt waren. Im folgenden Schema sind die Reaktionen mit der jeweiligen Ausbeute für die isolierten Produkte dargestellt.

⁴³ F. M. Hershenson, S. J. Lobbstaël, M. R. Pavia, C. P. Taylor, J. Med. Chem. **1987**, *30*, 1210-1214

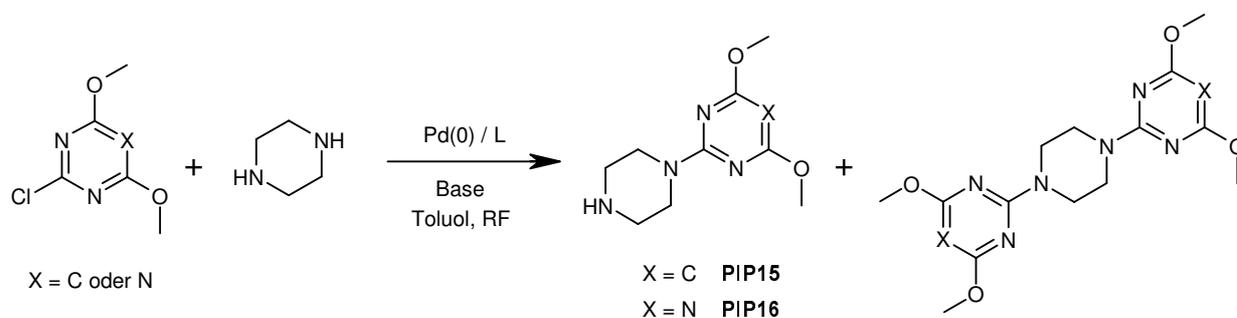
⁴⁴ J. S. New et al., J. Med. Chem. **1988**, *31*, 618-624

⁴⁵ Bach et al., J. Amer. Chem. Soc. **1957**, *79*, 2221-2222



Formelschema 16: Synthese von substituierten 2-Piperazinylpyridinen

Die restlichen *N*-Heteroaryl-piperazine mit PIP14 - PIP20 konnten unter diesen Bedingungen allerdings nicht erhalten werden. Deshalb wurde eine alternative Synthesemethode entwickelt.



Formelschema 17: Versuch zur Synthese ausgewählter *N*-Heteroaryl-piperazine mittels Pd(0) katalysierter Reaktion

Wie in der Literatur von Buchwald et al. beschrieben, können Arylbromide mittels Pd(0)-katalysierter Reaktionen aminiert werden⁴⁶. Die Anwendung dieser Reaktion auf die Synthese der gewünschten *N*-Heteroaryl-piperazine war wenig erfolgreich. Folgende Versuchsbedingungen wurden ausprobiert:

Katalysator: Pd(dba)₂, PdCl₂dppf, Pd(OAc)₂
 Ligand: (S)-BINAP, dppf
 Base: Triethylamin, K₂CO₃, NaO^tBu

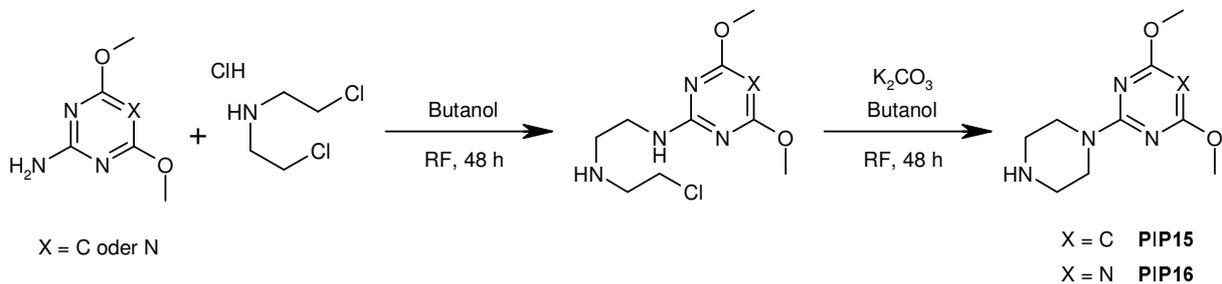
In fast allen Fällen wurden disubstituierte Piperazine isoliert oder Edukte wiedergewonnen.

Gemäß Literaturvorschriften können einige *N*-substituierten Piperazine aus Aminoaromaten und Bis(2-chlorethyl)amin-Hydrochlorid in einer zweistufigen Sequenz synthetisiert werden⁴⁷. Die Reaktionen aus 2-Amin-4,6-Dimethoxypyrimidin und 2-Amin-4,6-Dimethoxytriazin wurden wie unten gezeigt durchgeführt, wobei die gewünschten Produkte nicht isoliert

⁴⁶ z.B. S. L. Buchwald, J. P. Wolfe, J. Org. Chem. **2000**, 65, 1144-1157

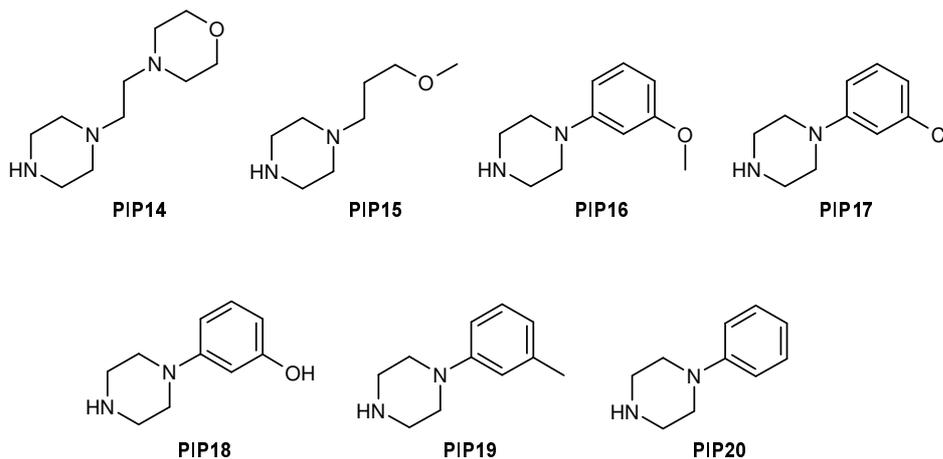
⁴⁷ z.B. Gregory E. Martin et al., J. Med. Chem. **1989**, 32, 1052-1056; A. Fravolini et al., J. Med. Chem. **1993**, 36, 157-161

werden konnten. Einige Versuche wurden in der Mikrowelle wiederholt, um die Reaktionszeiten zu verkürzen. Auch in diesen Fällen zerfielen die Edukte. Weder die Edukte noch die gewünschten Produkte konnten detektiert werden.



Formelschema 18: Versuche zur Synthese von ausgewählten N-Heteroaryl piperazine mittels Bis(2-chlorethyl)amin-Hydrochlorid

Nachdem die Synthese der Piperazin-Derivate PIP14 - PIP20 nicht erfolgreich war, wurden andere kommerziell verfügbare Edukte als Ersatz ausgewählt, die entweder interessante physikochemische Eigenschaften aufweisen oder bereits bei Acridin-Derivaten zytotoxische Aktivität gezeigt haben.



Formelschema 19: Auswahl spezieller Piperazin-Derivate für die Bibliothekssynthese

5.3.3.5 Automatisierte Synthese der Bibliothek

Da die Reaktionsmatrix aus 16 Carbonsäuren mal 20 Piperazine gebildet wird, wurden vier Läufe zu 8 Carbonsäuren mal 10 Piperazine festgelegt. Die Tabelle dient der besseren Darstellung über die geplanten Läufe und die Kombination der Edukte. Vor Beginn der Synthese wurden die benötigten Datenbanken sowohl für die Datenverarbeitung als auch für die Abgabe von analytischen Proben erstellt.

		COOH															
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
PIP	1	1. Lauf								2. Lauf							
	2																
	3																
	4																
	5																
	6																
	7																
	8																
	9	3. Lauf								4. Lauf							
	10																
	11																
	12																
	13																
	14																
	15																
	16																
	17																
	18																
	19																
	20																

Abb. 14: Matrix der geplanten Bibliothekssynthese

Die technische Umsetzung der Synthese wurde in folgender Weise realisiert:

Für die Reaktionen wurden 2.5 ml einer 0.25 mmol Lösung der Carbonsäure (2.5 ml 0.1 M; DCM/ DMF= 4:1) sowie 1.0 ml einer 0.2 mmol Piperazin Lösung (1.0 ml 0.2 M, DCM) zu 0.4 mmol N-Cyclohexylcarbodiimid auf N'-methyl polystyrol HL (200-400 mesh, 2% DVB) pipettiert und über Nacht bei Raumtemperatur geschüttelt. Zur Aufarbeitung wurde die Reaktionslösung filtriert, wobei der Rückstand mit Dichlormethan nachgewaschen wurde. Die vereinte Lösung wurde unter Vakuum zur Trockne eingeeengt.

Nach der Aufarbeitung erfolgte zunächst eine Analytik und Reinheitsbestimmung per Dünnschichtchromatographie bzw. LC-MS. Von theoretisch 320 Verbindungen konnten 60 Verbindungen mit >85% UV-Reinheit ohne weitere Aufreinigung für die Testung freigegeben werden. Weitere 205 Verbindungen lagen mit einer Reinheit von 20% - 85% UV-Reinheit vor, sie wurden unter Verwendung eines ISCO Optix10 Systems chromatographisch aufgereinigt, wobei ein Gemisch aus DCM / MeOH (100 / 0 bis 90 / 10) als Laufmittel verwendet wurde⁴⁸. Hierdurch konnten weitere 155 Verbindungen mit einer UV-Reinheit über 85% erhalten werden. Eine Anzahl von 41 Verbindungen, deren Bildung mit 1%-20% UV-Reinheit massenspektroskopisch belegt werden konnte und 11 Verbindungen, deren Bildung massenspektroskopisch nicht nachgewiesen werden konnte, wurden verworfen.

Insgesamt konnten so 215 Verbindungen synthetisiert und aufgereinigt werden, von denen 15 bereits bekannt waren. 200 Verbindungen wurden erstmals synthetisiert und dem Substanzlager der Zentaris zugeführt.

⁴⁸ Isco Inc., 4700 Superior St., PO Box 82531 Lincoln, NE 68504, USA; www.isco.com

5.3.3.6 Ergebnisse der biologischen Testung

Die durch die Parallelsynthese erhaltenen 215 Verbindungen wurden in die biologische Testung eingeschleust und nach der festgelegten Testhierarchie untersucht. Nachfolgend sind die IC₅₀-Werte für ausgewählter Beispiele aufgeführt. Wenn keine IC₅₀-Werte aufgeführt sind, lag die zytotoxische Aktivität bei der Single-Point-Bestimmung unter 50% und damit außerhalb der Eingangskriterien für die Bestimmung der IC₅₀-Werte.

Verbindung	XTT Assay, IC ₅₀ in µM					ITP IC ₅₀ in µM
	KB / HeLa	L1210	NCI-H460	SF-268	SKOV3	
D-24203	0,07	0,05	0,055	0,038	0,023	2,5
94	-	-	-	-	-	-
95	>7,9	3,75	2,47	2,3	1,4	22
96	0,72	0,68	0,53	0,63	0,43	5,0
97	-	-	-	-	-	-
98	-	-	-	-	-	-
99	-	-	-	-	-	-
100	0,28	0,28	0,25	0,13	0,11	16,75
101	-	-	-	-	-	-
102	1,7	3,33	2,1	1,23	1,1	-
103	-	-	>7,9	-	-	-
104	0,77	0,92	0,77	0,72	0,95	9,5
105	-	-	-	-	-	-
106	0,78	0,78	0,7	0,47	0,43	-
107	-	-	-	-	-	-
108	0,78	0,7	0,63	0,37	0,32	7,8

Tab. 8: Hemmung der Proliferation im XTT Assay und Hemmung der Tubulin-Polymerisation (ITP) für Beispiele aus der Bibliothek. Die IC₅₀-Werte sind in µM angegeben, die mit – gekennzeichnete Felder bedeuten, dass die Substanzen keine Hemmung über 50% im Standard-XTT erreichten

Die Verbindungen **96**, **104**, **106** und **108** zeigten im Standard XTT Assay eine Hemmung der Zell Proliferation mit einer IC₅₀ unter 1 µM. Damit ist die Wirkung als interessant einzustufen, die Aktivität der Leitstruktur D-24203 wird damit aber nicht übertroffen. Die Hemmung der Tubulin Polymerisation ist bei allen untersuchten Verbindungen aus der Bibliothek nur als mäßig zu bezeichnen.

Ein weiteres Ziel war die Verbesserung bestimmter physikochemischer Eigenschaften. Mit der Verbindung **108** gelang es, eine deutliche Verbesserung der Löslichkeit in wässrigem Medium zu erreichen. Während die Leitstruktur D-24203 nur mit ca. 13 µg/ml in Wasser löslich ist, lösen sich von **108** ca. 65 µg/ml.

5.3.3.7 Zusammenfassung und Schlußfolgerungen

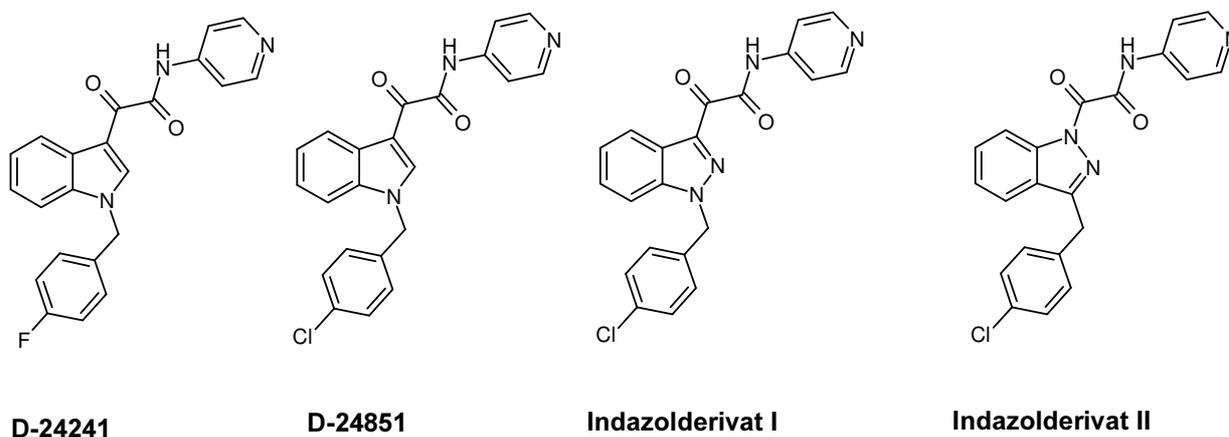
Ausgehend von der bewährten Leitstruktur D-24203 konnte vor dem Projekt die vielversprechende Verbindung **5** gefunden werden. Basierend auf dieser Kenntnis wurde eine Bibliothek von neuen Derivaten entworfen, um insbesondere die biophysikalischen Eigenschaften zu verbessern. Die für die Synthese benötigten Edukte konnten beschafft

bzw. synthetisiert werden. Die notwendige Reaktionssequenz wurde erfolgreich optimiert. Etwa 200 Verbindungen konnten mit ausreichender Reinheit bereitgestellt werden und in die biologische Testung übernommen werden. Einige Verbindungen zeigten durchaus interessante Aktivitäten und eine Verbesserung der Löslichkeit in wässrigem Medium. Leider überzeugte keine der Verbindungen in dem Maße, dass die Aufnahme der präklinischen Entwicklung gerechtfertigt wäre.

5.3.4 Die Leitstruktur D-24241

5.3.4.1 Einführung und Zielsetzung

Eine Leitstruktur für potentielle Zytostatika der ehemaligen Asta Medica AG war das leicht zugängliche Indolglyoxylamid D-24241, welche aus der Asthma-Forschung hervorging. Nach der Erkenntnis, dass die Verbindung das Proliferationsverhalten von entzündlichen Zellen beeinflusst, wurde die Struktur hinsichtlich der proliferativen Hemmwirkung zur Verbindung D-24851 weiter optimiert. Diese Substanz zeigt gute orale in-vivo Wirkung an verschiedenen Tumormodellen und wird gegenwärtig von der Firma Baxter Oncology in der Phase I klinisch entwickelt. Als Wirkmechanismus wird eine Inhibierung der Tubulinpolymerisation diskutiert.

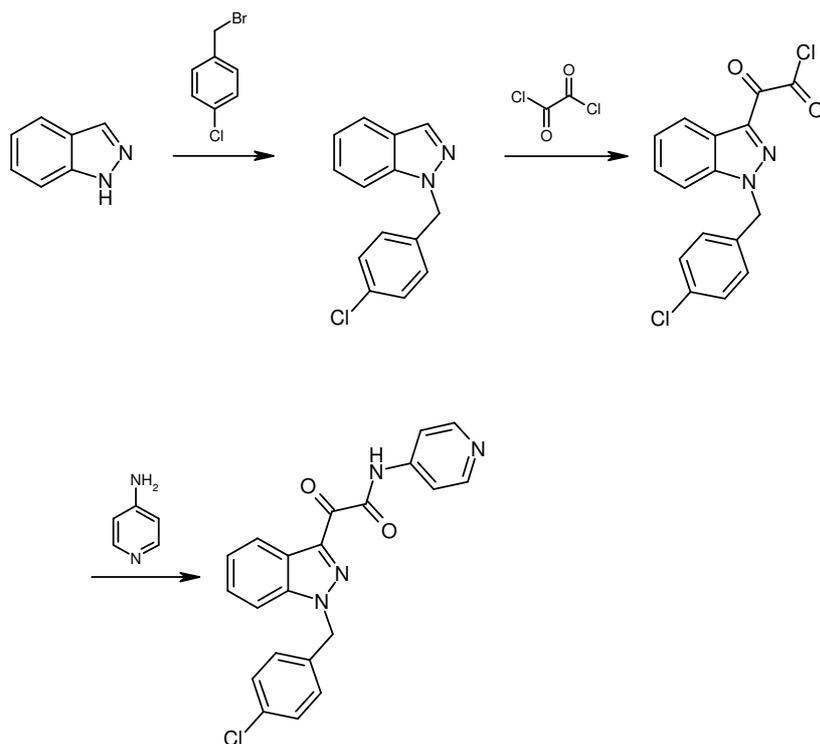


Formelschema 20: Strukturformeln der Leitstruktur D-24241, für den Entwicklungskandidaten D-24851 und für die entsprechenden Aza – analogen Indazolderivate

Es ist bekannt, dass D-24851 aufgrund der extrem schlechten Wasserlöslichkeit Probleme bei der galenischen Bearbeitung bereitet. Um diese Nachteile zu überwinden, sollte im Rahmen dieses Projektes geprüft werden, ob durch Ersatz des Indolgrundkörpers in der D-24851 durch andere Heterocyclen, eine Verbesserung der physikochemischen Eigenschaften bei gleichen oder verbesserten biologischen Aktivitäten zu erzielen ist. Als eine Variante sollten durch Einbau eines weiteren Stickstoffatoms in den Fünfring verschiedene Indazolanaloge synthetisiert werden.

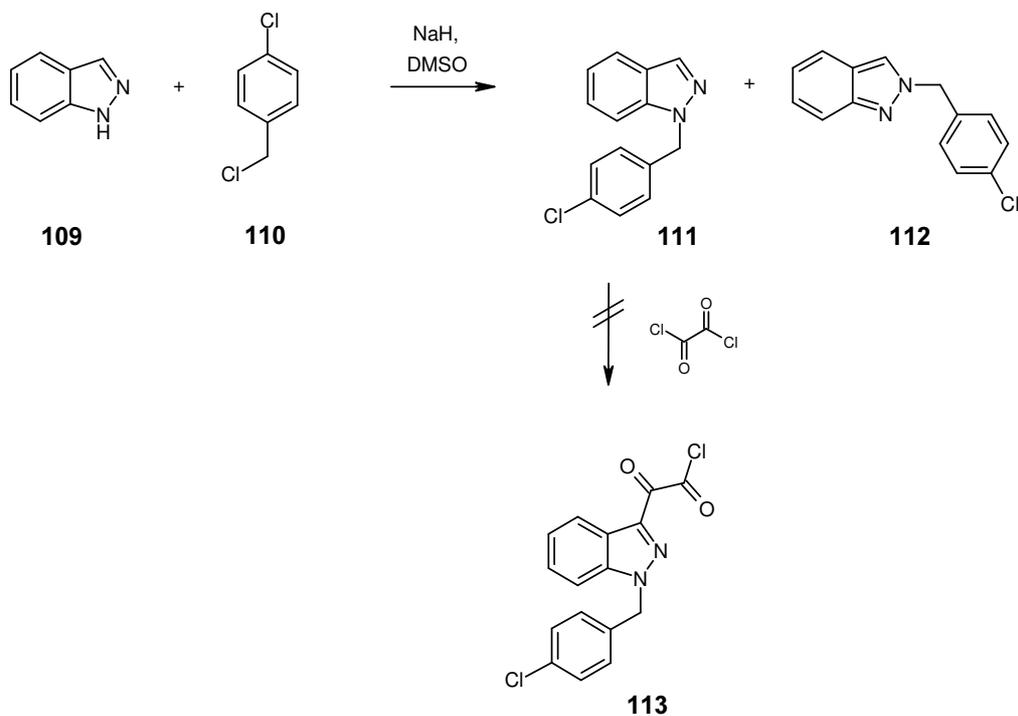
5.3.4.2 Planung und Durchführung der Synthese

Die Synthese wurde in Anlehnung an die Herstellung der Leitstruktur D-24241 in drei Stufen geplant.



Formelschema 21: Geplante Synthese des Indazolanalogons der Verbindung D-24851

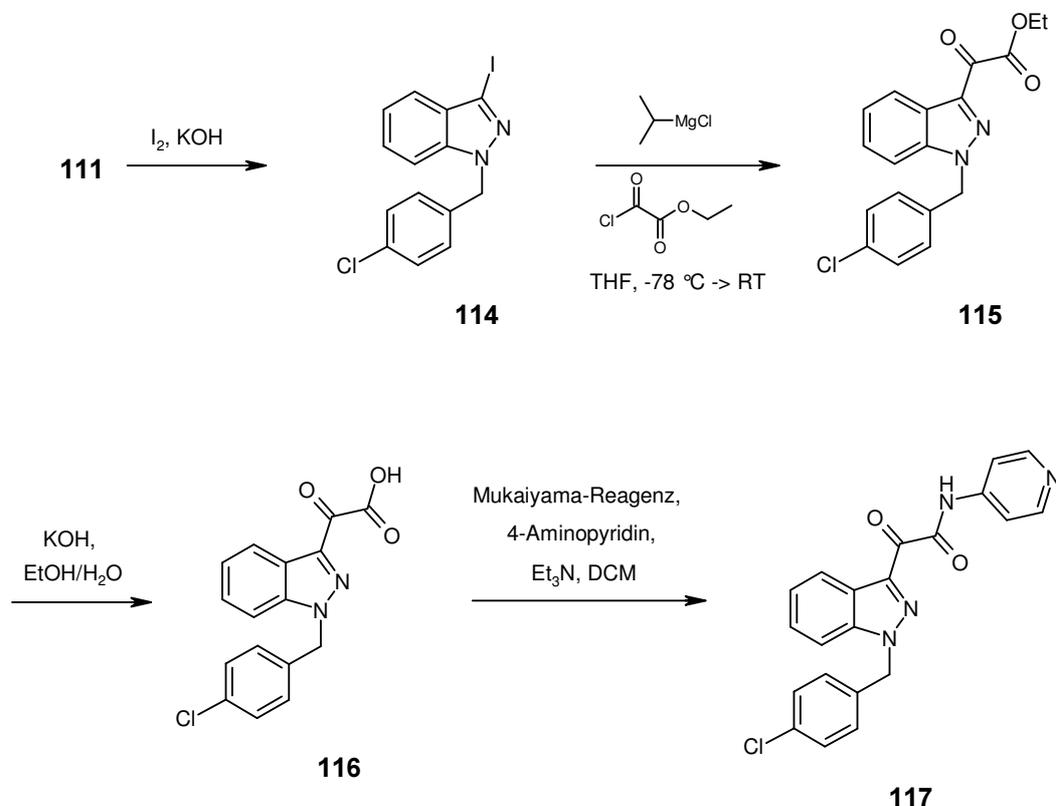
Im ersten Reaktionsschritt sollte die Einführung des Chlorbenzylrestes an der N1-Position des Indazols erfolgen. Anschließend war die Umsetzung mit Oxalsäurechlorid zum entsprechenden Glyoxalsäurechlorid geplant, welches abschließend durch Reaktion mit 4-Aminopyridin in Gegenwart einer Base die Synthese des Indazolanalogons von D-24851 beenden sollte.



Formelschema 22: Einführung des p-Chlorbenzylrestes an das Indazol

Die Einführung des Chlorbenzylrestes in Gegenwart von NaH führte allerdings nicht nur zu dem gewünschten N1-alkylierten Indazol, sondern es konnte ebenso die Bildung des N2-alkylierten Regioisomeren beobachtet werden. Die beiden Regioisomeren konnten durch Säulenchromatographie getrennt werden. Man erhielt dabei das gewünschte N1-Isomer **111** in 27 % Ausbeute, sowie die N2-alkylierte Verbindung **112** in 14 %. Die anschließend geplante direkte Einführung des Glyoxylsäurerestes in der 3-Position gelang nicht, vermutlich auf Grund der Reaktionsträgheit des Indazols an dieser Stelle. Erfolgreich war schließlich der Versuch der Einführung über den Umweg des Iodindazoles **114** welches sich leicht aus dem Benzylindazol **111** herstellen ließ. Dabei wurde das Indazol **114** mit Isopropylmagnesiumchlorid und Oxalsäureethylesterchlorid zum Ester **115** umgesetzt, der in einer Ausbeute von 65 % erhalten werden konnte. Dieser Ester wurde mit KOH zur Säure **116** hydrolysiert.

Im letzten Schritt der Synthesesequenz erfolgte die Umsetzung mit 4-Aminopyridin und Mukaiyama-Reagenz (2-Chlor-1-methylpyridiniumiodid) zum Glyoxylamid **117**. Die Ausbeute der letzten beiden Stufen zum Analogon von D-24851 betragen 79 %.

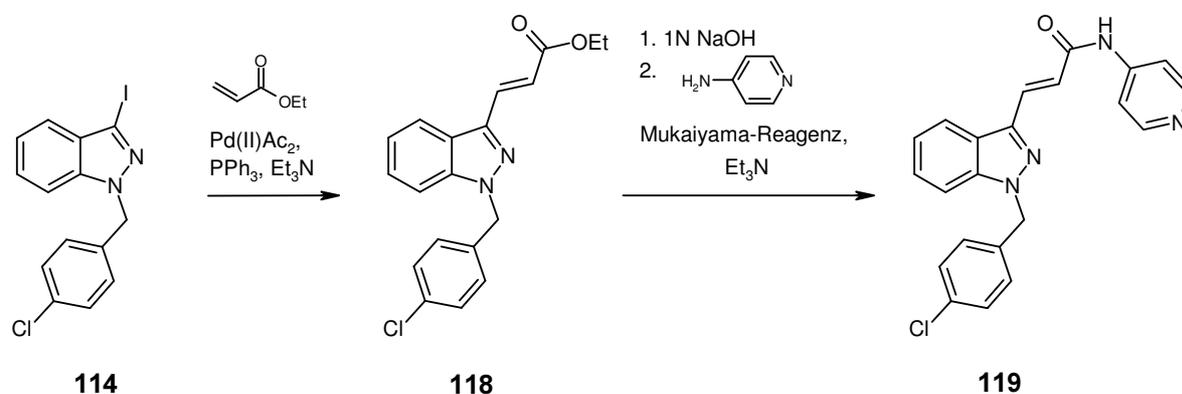


Formelschema 23: Verwirklichte Synthese des Indazolanalogs **117**

Die anschließende XTT-Testung an den fünf Standard-Tumorzelllinien war allerdings ernüchternd. So zeigte die Verbindung **117** im Single Point XTT nur bei der NCI-H460 Zelllinie eine Inhibition von >50 %. Für diese Zelllinie konnte im Dosis-Wirkungsversuch ein IC₅₀-Wert von 1.72 µg/ml bestimmt werden. Die Planung und Synthese einer größeren Substanzbibliothek zur Variation der Reste im Benzylteil und im Aminoheterocyclus wurde daher nicht ausgeführt.

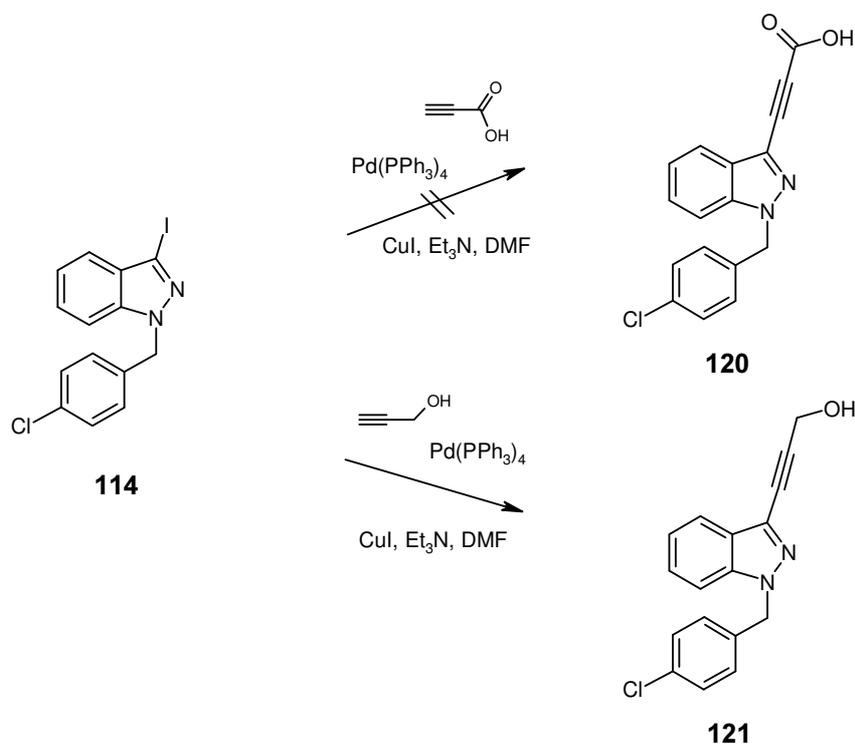
5.3.4.3 Synthese spezieller Derivate auf Basis von 117

Aufgrund der biologischen Ergebnisse wurde begonnen, die Verknüpfung des Aminopyridins mit dem Benzylindazolgrundgerüst zu variieren. Durch diese größere strukturelle Variation sollte versucht werden, das Potential dieser Verbindungskasse abzugreifen.



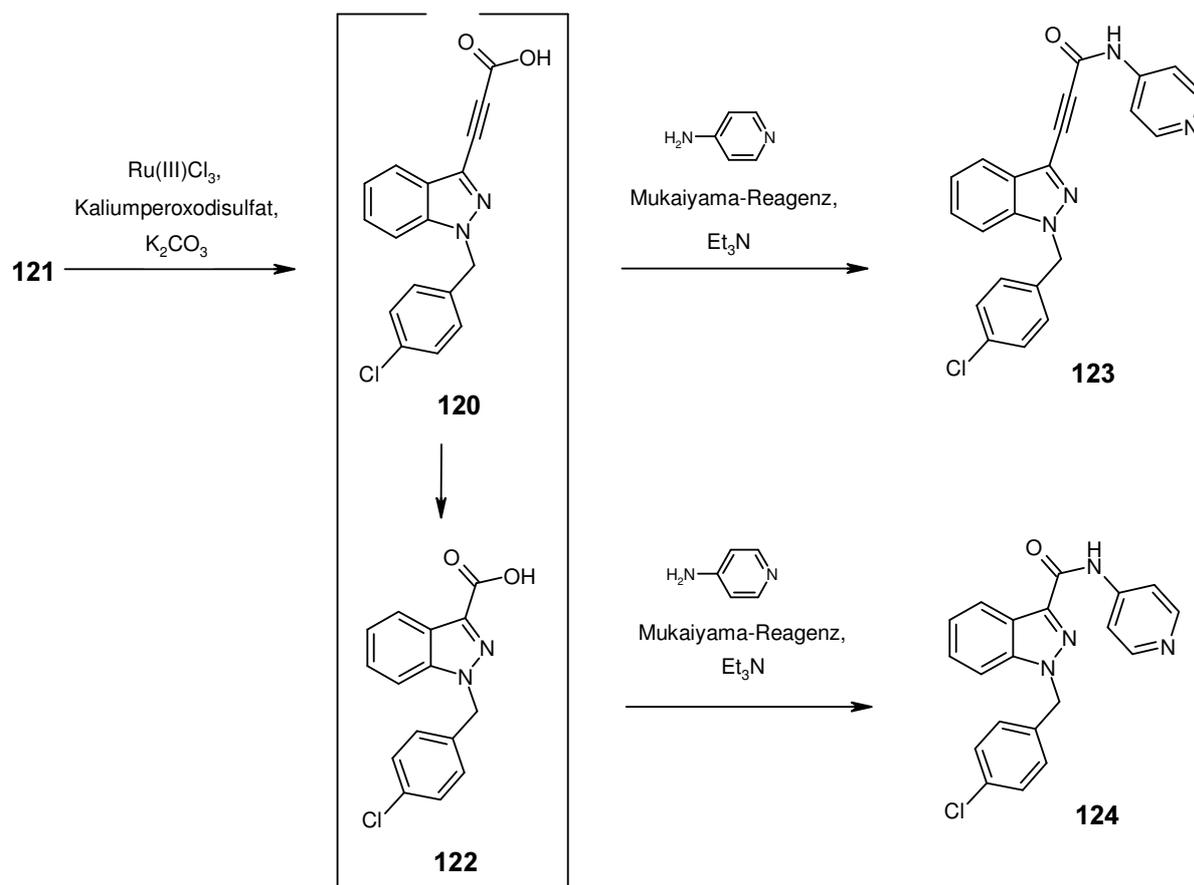
Formelschema 24: Herstellung des 3-Alkenindazolderivates **119**

Als erste Verbindung wurde das 3-Alkenindazolderivat **119** hergestellt. Dazu wurde das chlorbenzylsubstituierte Iodindazol **114** unter Bedingungen der Heck-Reaktion mit Acrylsäureethylester zum entsprechenden *E*-konfigurierten Alken **118** umgesetzt. Die anschließende Verseifung des Esters und Reaktion der Carbonsäure mit 4-Aminopyridin in Gegenwart von Mukaiyama-Reagenz führte zu dem 3-Alkenylindazol **119**.



Formelschema 25: Herstellung des Akinindazols **121**

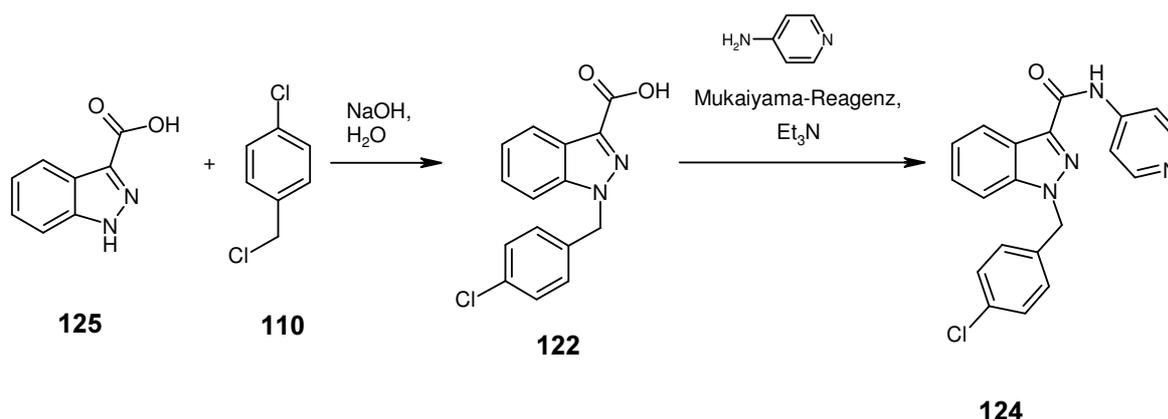
Als weiteres Derivat wurde das 3-Alkinindazolderivat **123** synthetisiert. Das notwendige Alkincarbonsäure **120** ließ sich allerdings nicht direkt durch Sonogahira-Kupplung mit Propiolsäure herstellen. Die Reaktion mit Propargylalkohol hingegen führt unter Standardbedingungen in 83 % Ausbeute zum gewünschten Alkohol **121**. Die anschließende Oxidation mit katalytischen Mengen Rutheniumtetroxid lieferte nicht nur die Alkincarbonsäure **120**, sondern auch durch Überoxidation der gewünschten Carbonsäure **120** die Indazolcarbonsäure **122**. Durch Umsetzen mit 4-Aminopyridin in Gegenwart von Mukaiyama-Reagenz konnten die beiden Amide **123** und **124** erhalten werden.



Formelschema 26: Herstellung des 3-Alkinindazolderivates **123** und des 3-Indazolcarbonsäureamides **124**

Um die Struktur der Verbindung **124** definitiv abzusichern wurde eine Synthese ausgehend von 3-Indazolcarbonsäure (**125**) durchgeführt. In literaturbekannter Weise⁴⁹ wurde 3-Indazolcarbonsäure selektiv am Indazolstickstoff benzyliert. Die Amidbildung lieferte dann unter den oben beschriebenen Bedingungen in guten Ausbeuten die Verbindung **124**.

⁴⁹ G. Corsi et al., J. Med. Chem. **1976**, *19*, 778-783

Formelschema 27: Alternative Synthese von **124** aus Indazol-3-carbonsäure (**125**)

5.3.4.4 Ergebnisse der biologischen Testung

Die neuen Indazolderivate **119**, **123** und **124** wurden entsprechend der Screening Hierarchie im XTT Standard-Assay an den fünf humanen Tumorzelllinien getestet. Während das Alkenderivat **119** vollkommen inaktiv war und das Alkinderivat **123** nur an der SF-268 Zelllinie Wirkung zeigte, waren die *in vitro* Ergebnisse des Indazolamides **124** ermutigend. So zeigte sie an vier der fünf Zelllinien eine beachtliche zytotoxische Aktivität. Auch eine starke Hemmung der Tubulinpolymerisation konnte mit der Verbindung **124** beobachtet werden.

Verbindung	Tub.- Polym. IC ₅₀ [µg/ml]	KB / HeLa IC ₅₀ [µg/ml]	NCI-H460 IC ₅₀ [µg/ml]	RKOP27 IC ₅₀ [µg/ml]	SF-268 IC ₅₀ [µg/ml]	SKOV3 IC ₅₀ [µg/ml]
119	-	> 3.16	> 3.16	> 3.16	> 3.16	> 3.16
123	-	> 3.16	> 3.16	> 3.16	1.422	> 3.16
124	1.866	0.543	0.802	0.445	> 3.16	0.779

Tab. 9: IC₅₀-Werte der Verbindungen **119**, **123** und **124**

Die Verbindung **124** wurde auf ihre Eignung als potentielle Leitstruktur geprüft. Dabei ergab sich, dass die Literatur- und Patentlage Synthespielräume ermöglichte. Es fanden sich bisher keine Hinweise auf eine potentielle Tubulin-Bindung bei derartigen Strukturen. Mit der Verbindung **124** wird das Grundmotiv der Indolxyl-3-glyoxylamide ausgehend von der Leitstruktur D-24241 verlassen.

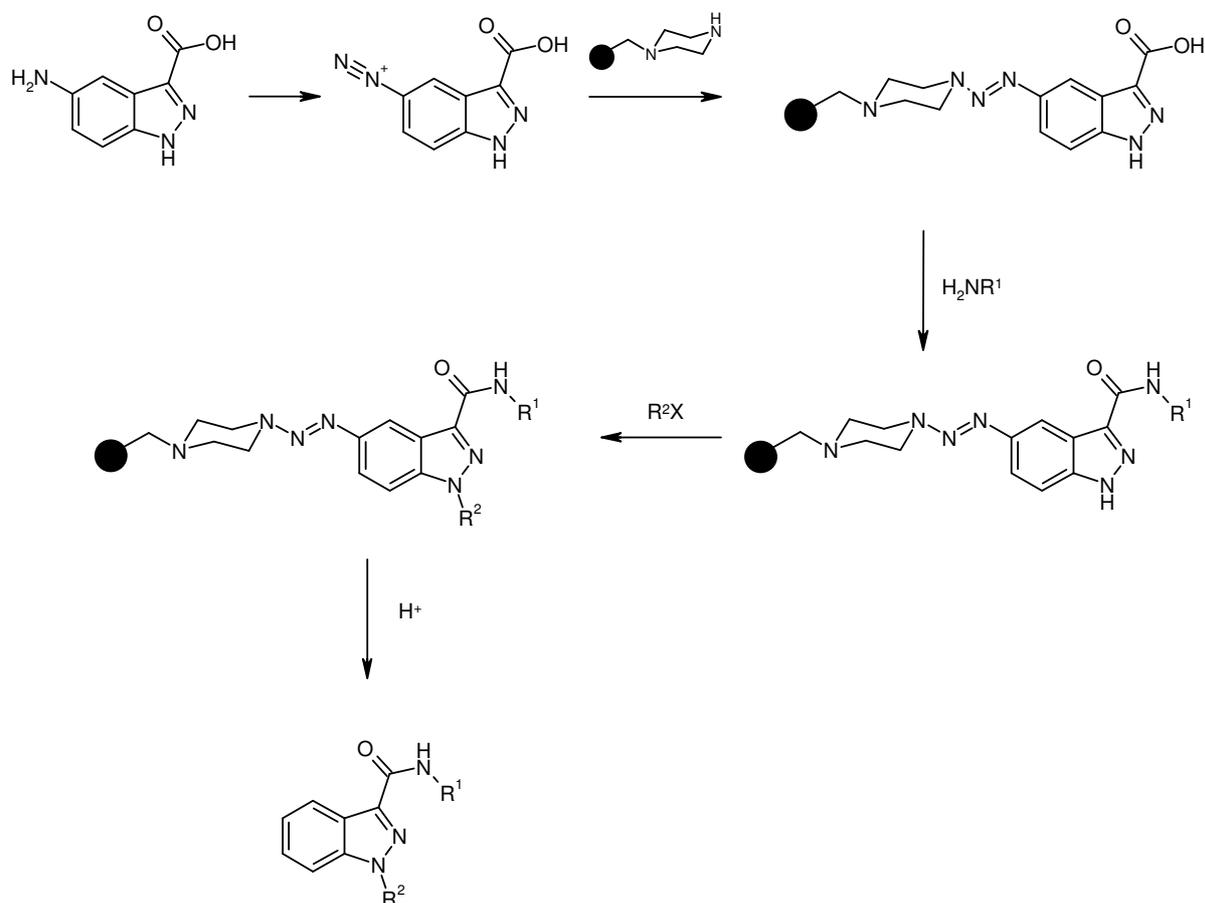
5.3.5 Die Leitstruktur 124

5.3.5.1 Zielsetzung und Planung der Festphasensynthese

Aufbauend auf den vielversprechenden Testergebnissen des 3-Indazolcarbonsäureamides **124** war geplant, diese neue Leitstruktur mittels Festphasensynthese unter Einsatz des IRORI™-Accutag-Systems⁵⁰ durch Aufbau einer Split- und Mix-Bibliothek weiter zu

⁵⁰ Discovery Partners International, 9640 Town Centre Drive, San Diego, CA 92121, USA; www.irori.com

optimieren⁵¹. Dabei sollten die Amidreste (R^1) durch Umsetzung mit verschiedenen Aminen, sowie die Reste an der 1-Position (R^2) des Indazols durch Einsatz unterschiedlicher Benzyl-, Ethylphenyl- und Propylphenylhalogenide variiert werden.



Formelschema 28: Strategie für die Festphasensynthese zur Herstellung einer Bibliothek von Indazol-3-carbonsäureamiden

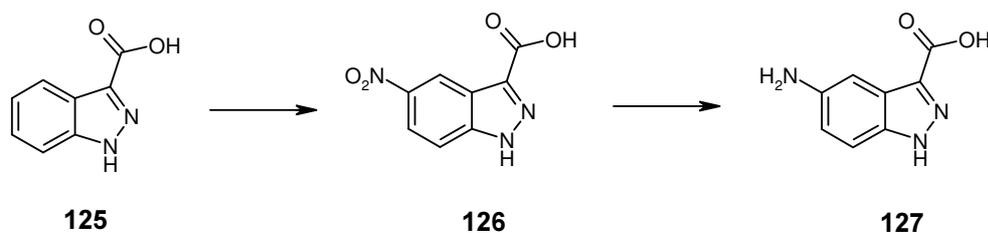
Die Verknüpfung des Indazols an das Harz sollte durch einen 'Traceless-Linker' erfolgen. Hierbei wird ein Diazoniumsalz (hergestellt aus einem Anilinderivat) mit einem Piperazinomethyl- oder *N*-Benzylaminomethylharz zu einem Triazen umgesetzt. Die Abspaltung erfolgt nach Beendigung der Synthese im Säuren unter Freisetzung des entsprechenden Arens⁵².

Der zentrale Buildingblock 5-Aminoindazol-3-carbonsäure sollte sich nach einer literaturbekannten Vorschrift in zwei Stufen aus 3-Indazolcarbonsäure herstellen lassen⁵³.

⁵¹ (a) A. Furka, M. Sebestyen, M. Asgedom, G. Dibo, *Int. J. Pept. Protein Res.* **1991**, *37*, 487-493; (b) K.S. Lam, S.E. Salmon, E.M. Hersh, V.J. Hruby, W.M. Kazmierski, R.J. Knapp, *Nature (London)* **1991**, *354*, 82-84; (c) R.N. Zuckermann, J.M. Kerr, M.A. Siani, S.C. Banville, *Int. J. Pept. Protein Res.* **1992**, *40*, 498-507; (d) F. Sebestyen, G. Dibo, A. Kovacs, A. Furka, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1993**, *3*, 413-418; (e) K.S. Lam, V.J. Hruby, M. Lebl, R.J. Knapp, W.M. Kazmierski, E.M. Hersh, S.E. Salmon, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1993**, *3*, 419-424

⁵² S. Bräse et al., *Angew. Chem.* **1998**, *110*, 3614-3616

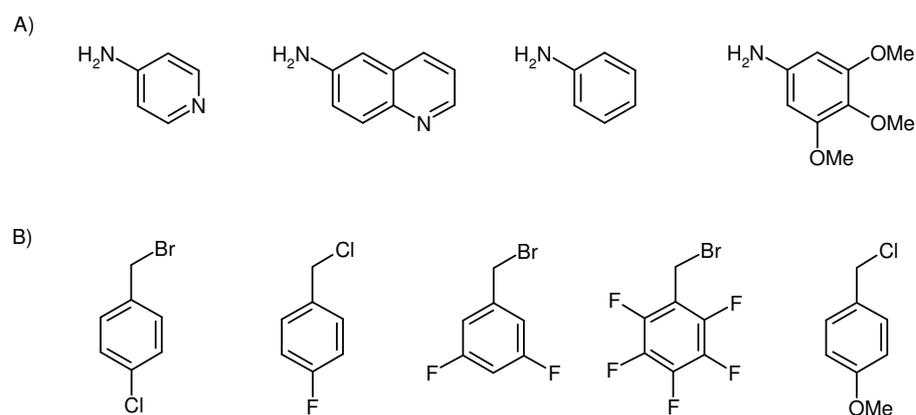
⁵³ A. Bistocchi et al., *Il Farmaco Ed. Sc.* **1981**, *36*, 315-333



Formelschema 29: Synthese des zentralen 5-Aminoindazol-3-carbonsäure Buildingblocks

5.3.5.2 Optimierung der Synthese in Lösung – Herstellung weiterer Derivate

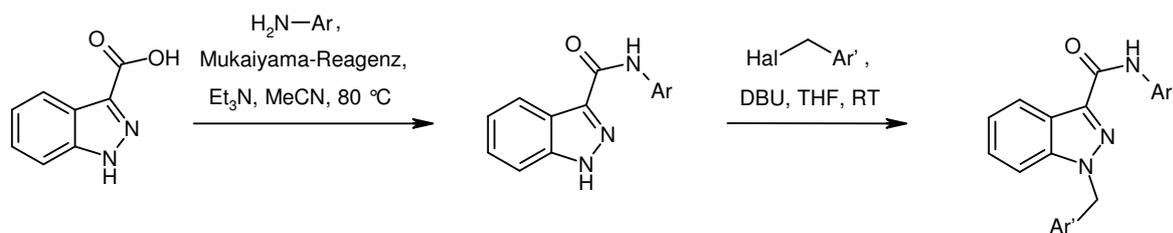
Als erstes wurde begonnen, die Synthese des Indazolcarbonsäureamides **124** im Hinblick auf die geplante Herstellung einer Bibliothek auf Reaktionsbedingungen umzustellen, die eine Synthese an fester Phase erlauben. Um diese Bedingungen testen zu können, wurde ein Set von Derivaten der Verbindung **124** synthetisiert unter Einsatz von vier Arylaminen und sechs Benzyl- bzw. Ethylphenylhalogeniden.



Formelschema 30: Für die Optimierung der Synthese eingesetzte Arylamine und Benzyl- bzw. Ethylphenylhalogeniden

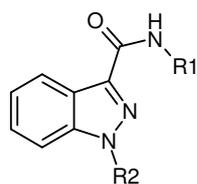
Die Herstellung von Indazol-3-carbonsäureamiden unter Verwendung von Anilinderivaten gelang mittels des klassischen Kupplungsreagenzes PyBOP und *N*-Methylmorpholin als Base bei Raumtemperatur. Diese Bedingungen versagten allerdings beim Einsatz von Heteroarylaminderivaten wie z. B. 4-Aminopyridin oder 6-Aminochinolin. Die Reaktion gelang erst mit Mukaiyama-Reagenz und Triethylamin bei höheren Temperaturen.

Für die anschließende Einführung des Benzyl- bzw. Ethylphenylrestes am Indazolstickstoffes zeigte es sich, daß dies auch problemlos in Gegenwart von organischen Basen wie DBU möglich ist und somit auf die Verwendung von NaH verzichtet werden kann.



Formelschema 31: Optimierte Reaktionsbedingungen für die Synthese von Indazol-3-carbonsäureamid-Derivaten

Nach dem oben dargestellten Schema wurden im Rahmen der Syntheseoptimierung folgende Indazolcarbonsäureamidderivate hergestellt:



R1 \ R2	H						
	128	124	129	130	131	132	133
	134	135	136	137	138	139	140
	141	142	143	144	145	146	147
	148	149	150	151	152	153	154

Tab. 10: Synthetisierte Indazol-3-carbonsäureamide

Insgesamt wurden 27 neue Verbindungen mit der erforderlichen Reinheit erhalten und in die Substanzbank aufgenommen.

5.3.5.3 Ergebnisse der biologischen Testung

Die auf diese Weise hergestellten 27 Verbindungen wurden in die *in vitro*-Testung eingeschleust und nach der üblichen Testkaskade untersucht. Bei der Single-Point-XTT Bestimmung zeigten die beiden Verbindungen **129** und **132** eine zytotoxische Aktivität von über 50 %. Die anschließend durchgeführte Bestimmung der EC_{50} -Werte zeigten allerdings keine deutliche Verbesserung der zytotoxischen Eigenschaften gegenüber der

Muttersubstanz **124**. Aufgrund dieser Datenlage wurde beschlossen, auf die geplante Herstellung einer Bibliothek von **124**-Derivaten zu verzichten.

Verbindung	Tub.- Polym. IC ₅₀ [µg/ml]	KB / HeLa IC ₅₀ [µg/ml]	NCI-H460 IC ₅₀ [µg/ml]	RKOP27 IC ₅₀ [µg/ml]	SF-268 IC ₅₀ [µg/ml]	SKOV3 IC ₅₀ [µg/ml]
124	1.866	0.543	0.802	0.445	> 3.16	0.779
129	> 3.16	> 3.16	> 3.16	2.347	n.d.	2.120
132	> 3.16	> 3.16	> 3.16	> 3.16	n.d.	> 3.16

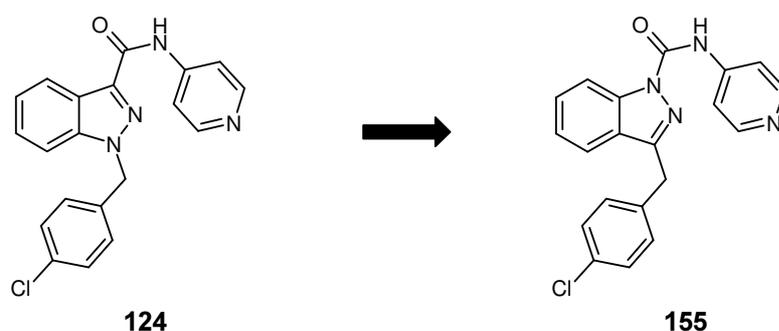
Tab. 11: Hemmung der Proliferation im Standard-XTT Assay. IC₅₀-Werte der Verbindungen **124**, **129** und **132**

Ob durch stärkere Variation der Molekülteile in der Verbindung **124** die biologische Wirksamkeit verbessert werden kann, ist nicht abschließend zu bewerten.

5.3.6 Die Zielstruktur 155

5.3.6.1 Einführung und Zielsetzung

Angesichts der guten zytotoxischen Eigenschaften des Indazol-3-carbonsäureamides **124** stellte sich die Frage, ob eine Veränderung des zentralen Indazolrings eine Verbesserung der biologischen Aktivität ermöglicht. Deswegen sollte eine Bibliothek von Verbindungen erstellt werden, bei denen im Gegensatz zu **124** der Indazolring gespiegelt als zentraler Baustein verwendet wird.

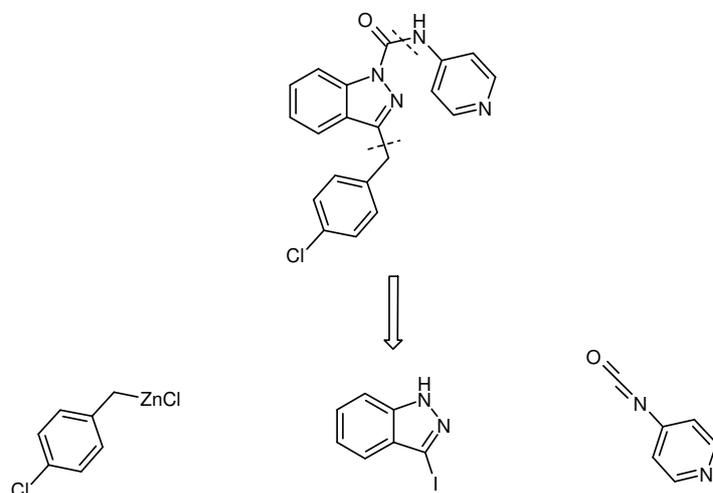


Formelschema 32: Die von der Verbindung **124** abgeleitete Zielstruktur **155**

Wie im Schema gezeigt wird, entsteht dadurch ein Grundgerüst mit einem substituierten Harnstoff am N1, sowie einem substituierten Phenylrest an der C3-Position. Der Prototyp dieser Verbindungen ist die Struktur **155**.

5.3.6.2 Planung der Synthese

Die retrosynthetische Betrachtung der Zielstruktur **155** ergibt 2 Schnittpunkte. Der Pyridylrest kann durch eine Harnstoffkupplung verknüpft werden. Die Anlagerung des Phenylrests an C3 ist durch eine Negishi-Kreuzkupplung des zuvor hergestellten 3-Iodindazols möglich.

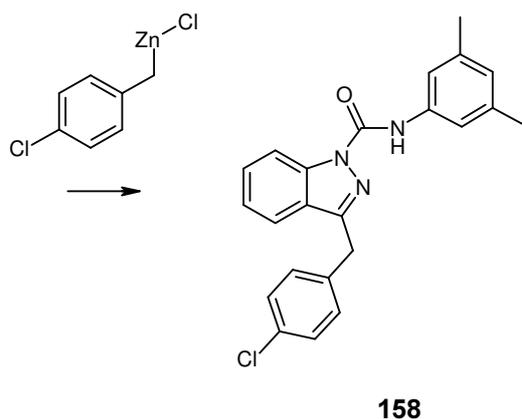
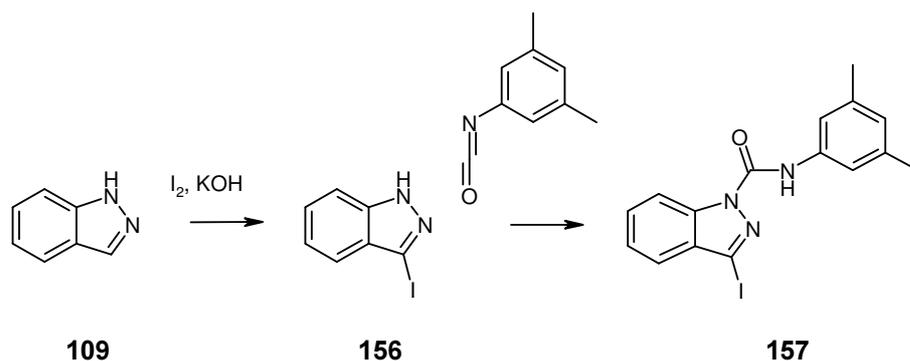


Formelschema 33: Retrosynthetische Betrachtung der Zielstruktur **155**

Diese Synthese wurde zunächst in Lösung untersucht, um anhand der XTT-Testung der so erhaltenen Derivate, erste biologische Ergebnisse für eine Bewertung der Verbindungsklasse zu erhalten. Nachdem hierbei ermutigende Aktivitäten auftraten, wurde in der 2. Phase des Projekts die Festphasensynthese dieser Verbindungen untersucht.

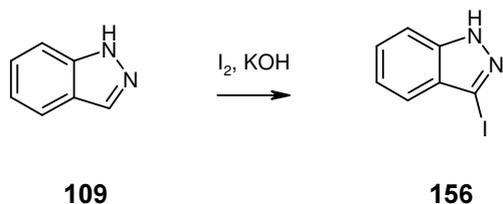
5.3.6.3 Optimierung der Synthese in Lösung

Die ursprüngliche Syntheseplanung sah eine dreistufige Synthese ausgehend von Indazol **109** vor. Zunächst sollte in bekannter Weise unter Basenkatalyse mit Iod in DMF die 3-Position iodiert werden. In der zweiten Stufe sollte das Iodindazol **156** mit dem entsprechenden Isocyanat zum Harnstoff **157** gekoppelt werden, worauf im letzten Schritt die Kreuzkupplung an der 3-Position erfolgen sollte.



Formelschema 34: Übersicht der ursprünglich geplante Synthese ausgehend von Indazol am Beispiel der Verbindung **158**

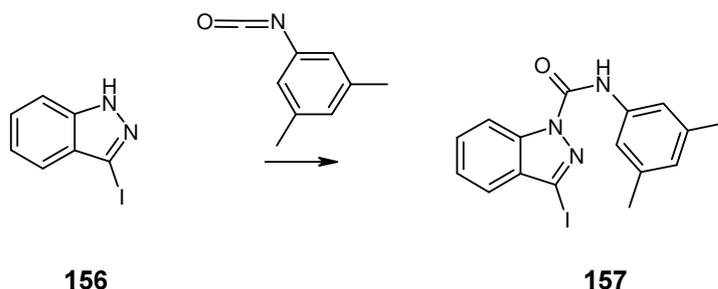
Erster Schritt der Reaktionssequenz ist die Iodierung der C3-Position.



Formelschema 35: Iodierung des C3 am Indazol zu 3-Iodindazol

Die Iodierung des C3 konnte unter Verwendung der etablierten Vorschrift quantitativ vollzogen werden. Die Reaktion wird ausgehend von Indazol bei Raumtemperatur mit Iod und KOH durchgeführt. Als Lösungsmittel dient DMF. Das bei der Reaktion erhaltene Rohprodukt war von ausreichender Reinheit für die nachfolgenden Syntheseschritte, so daß auf eine Aufreinigung verzichtet werden konnte.

Im zweiten Schritt erfolgt die Harnstoffkupplung mit Isocyanaten.

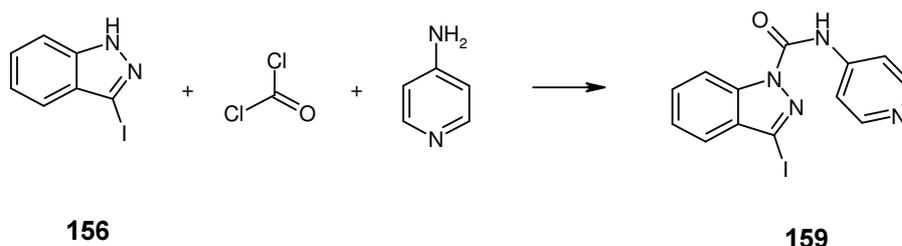


Formelschema 36: Synthese des Harnstoffs **157** ausgehend von 3-Iodindazol (**156**) mit einem Isocyanat.

Die Harnstoffkupplung wurde zunächst unter Verwendung des kommerziell erhältlichen 3,5-Dimethylphenylisocyanats ausgearbeitet. Dabei konnten von Beginn an gute Ergebnisse erzielt werden. Die Reaktion wird in Dichlormethan durchgeführt. Das bei der Reaktion erhaltene Rohprodukt **157** ist bereits von ausreichender Reinheit. Die Ausbeuten sind quantitativ.

Die zunächst herzustellende Zielstruktur **155** sieht für den Harnstoff einen Pyridylrest vor. Das entsprechende Isocyanat ist nicht kommerziell erhältlich. Isocyanate können z. B. durch einen Curtius-Abbau des entsprechenden Azids hergestellt werden⁵⁴. Allerdings geht der Curtius-Abbau bei Pyridinaziden bekanntermaßen nur schlecht. Auch die Isocyanate von substituierten Pyridinen sind nicht kommerziell erhältlich und müssen hergestellt werden. Die Anzahl der notwendigen Synthesen wird hierdurch deutlich erhöht.

Wegen der zuvor aufgeführten Nachteile der Harnstoffkupplung mit Isocyanaten wurde nach einer geeigneteren Methode zur Harnstoffsynthese gesucht. Eine Möglichkeit bietet sich mit der Harnstoffkupplung mittels Phosgen^{55,56}.



Formelschema 37: Harnstoffkupplung mit Phosgen ausgehend von 3-Iodindazol

Hierbei wird zunächst das Iodindazol **156** mit Phosgen zum Carbamoylchlorid funktionalisiert, worauf in der 2. Stufe der Eintopfreaktion die Kupplung mit 4-Aminopyridin zum Harnstoff **159** erfolgen kann. Das Phosgen wird als Phosgen-Lösung in Toluol eingesetzt. Als Säurefänger wird zusätzlich Triethylamin zugegeben. Die Reaktion wurde zunächst in Dichlormethan durchgeführt, wobei das 4-Aminopyridin wegen der schlechten Löslichkeit in THF gelöst, zu der Reaktionslösung gegeben wird. Deswegen wurde die Reaktion später in THF durchgeführt, das sich als wesentlich geeigneteres Lösungsmittel erwiesen hat. Während das 4-Aminopyridin bei der ursprünglichen Reaktionsvorschrift im

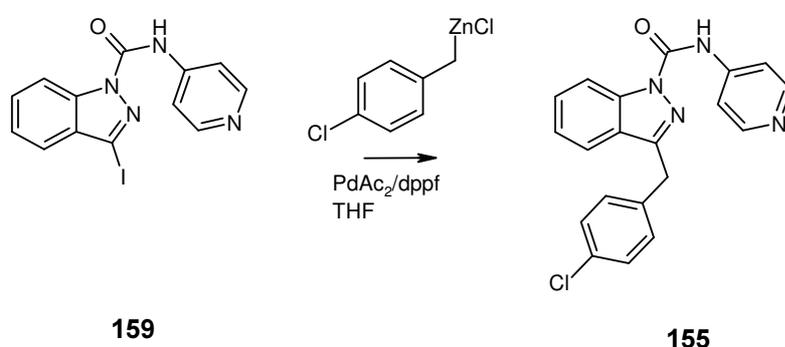
⁵⁴ M. T. Migawa, E. E. Swayze, Org. Lett. **2000**, 2, 3309-3311

⁵⁵ PCT/US97/08782

⁵⁶ G. T. Wang, Y. Chen, Tetrahedron Lett. **1997**, 38, 1895-1898

sechsfachen Überschuß eingesetzt wurde, reichte daraufhin auch ein doppelter Überschuß aus. Die Ausbeuten der Reaktion liegen bei 70%.

Die Anlagerung des Phenylrestes an C3 erfolgt mittels Negishi-Kreuzkupplung. Diese Kreuzkupplung erwies sich zunächst als schwierig zu etablieren^{57,58,59}. Bei der Reaktion wird das Indazolidiodid unter Pd-Katalyse mit dem Aryl-Zinkchlorid gekuppelt. Als Edukt wurde das 3-Iodindazol-1-kohlensäure(3,5-dimethyl-phenyl)amid (**157**) eingesetzt. Das Lösungsmittel war zunächst Dichlorethan, später THF. Weiterhin wurde die Reaktion zu Beginn bei Raumtemperatur und später unter Rückfluß durchgeführt. Als Katalysator wurde zunächst Tetrakis(triphenylphosphin)palladium eingesetzt. Allerdings konnte hiermit keine zufriedenstellende Umsetzung erzielt werden. Die weiteren Versuche wurden deshalb mit PdAc₂/dppf durchgeführt. Der Katalysator wird dabei zu Beginn der Reaktion aus PdAc₂ und Bis(diphenylphosphino)ferrocen (dppf) frisch hergestellt. Die Kreuzkupplung zum Produkt **158** konnte hiermit durch 14-stündiges Refluxieren in THF in einer Ausbeute von 70% durchgeführt werden.



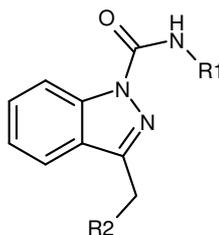
Formelschema 38: Kreuzkupplung zur Zielverbindung **155**

Nachdem sowohl die Harnstoffsynthese, als auch die Kreuzkupplung etabliert war, konnte die Synthese der Zielstruktur **155** bzw. der Analogen begonnen werden. Die Substanz **155** wurde ausgehend von Indazol über 3 Stufen in einer Gesamtausbeute von 40 % erhalten. Außerdem wurden 6 weitere Abkömmlinge hergestellt, bei denen sowohl der Phenylrest, wie auch der Aromat am Harnstoff variiert wurde. Die Verbindungen wurden im XTT-Screening an HeLa/KB Tumorzellen auf ihre antiproliferative Aktivität getestet. Die Zielverbindung **155** zeigte mit einer IC₅₀ von 1.66 µM eine interessante Aktivität. Aufgrund der ermutigenden Testergebnisse der Verbindungen erschien die Ausarbeitung und Durchführung einer Festphasensynthese sinnvoll.

⁵⁷ L. Zhu, R. M. Wehmeyer, R. D. Rieke, J. Org. Chem. **1991**, *56*, 1445-1453

⁵⁸ J. Y. Legros et al., Tetrahedron **2001**, *57*, 2507-2514

⁵⁹ F. Toudic et al., Tetrahedron **2002**, *58*, 283-293



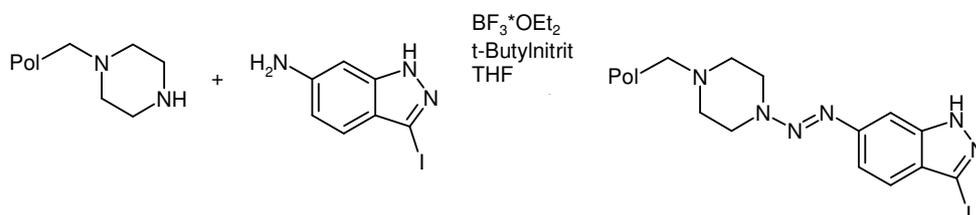
Verbindung	R1	R2	KB XTT, IC50 [µg/ml]
155	4- Pyridyl	4-Chlorphenyl	1.66
160	4- Pyridyl	4-Fluorphenyl	>3.16
161	4- Pyridyl	4-Methoxyphenyl	>3.16
162	2-Methyl-6-chinoly	4-Chlorphenyl	2.2
158	3,5-Dimethylphenyl	4-Chlorphenyl	
163	3,5-Dimethylphenyl	4-Fluorphenyl	
164	3,5-Dimethylphenyl	4-Methoxyphenyl	

Tab. 12: Übersicht über die hergestellten Variationen des Grundgerüsts mit den entsprechenden IC₅₀ Werten (µg/ml) der zytotoxischen Aktivität

5.3.6.4 Festphasensynthese der Bibliothek von Benzylindazolharnstoffen

Zur Vorbereitung der Festphasensynthese der Bibliothek mußten zunächst die Reaktionsbedingungen der Synthese in Lösung an die Anforderungen der Synthese an der festen Phase angepasst werden. Zusätzlich mußte die Anlagerung von Iodindazol an die feste Phase untersucht werden.

Als erster Schritt erfolgte die Beladung des Trägerharzes nach einer Vorschrift von Bräse⁶⁰, welche eine Aminofunktion am Aromaten voraussetzt.

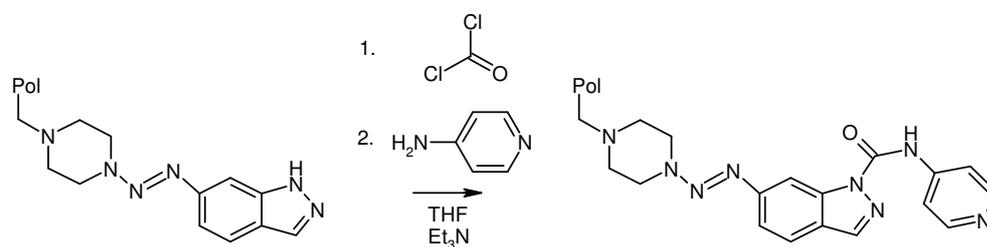


Formelschema 39: Beladung des Harzes mit 3-Iod-6-Aminoindazol

Deswegen geht die Festphasensynthese der Bibliothek von Aminoindazol aus, das zunächst analog Indazol iodiert wird. Für die Beladung des Trägerharzes wird zunächst aus dem 3-Iod-6-Aminoindazol mit t-Butylnitrit und Bortrifluoridetherat in THF ein Diazoniumsalz gebildet, das in der 2. Stufe unter Bildung des Triazenlinkers an das Piperazinomethylolystyrolharz gebunden wird.

⁶⁰ pers. Mitteilung

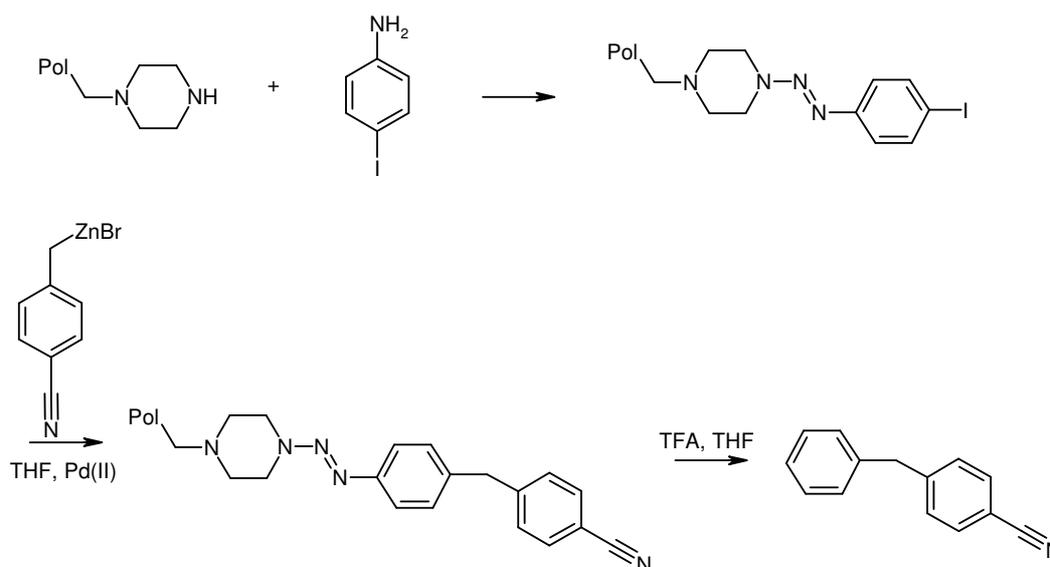
Bei der Synthese der Harnstoffe mit Phosgen konnte die Reaktionsvorschrift aus der vorhergehenden Synthese in Lösung weitgehend übernommen werden. Geändert wurde der Überschuss der Reagenzien im Verhältnis zum Indazolharz, die um den Faktor 3 erhöht wurden. Weiterhin wurde die eingesetzte Lösungsmittelmenge verdreifacht.



Formelschema 40: Synthese der Indazolharnstoffe an der festen Phase mit Phosgen

Die Reaktion wurde durch Messung des IR-Spektrums der harzgebundenen Produkte kontrolliert. Allerdings konnten keine Ausbeuten bestimmt werden, da die Abspaltung des Produkts vom Harz wieder Erwarten nicht gelang.

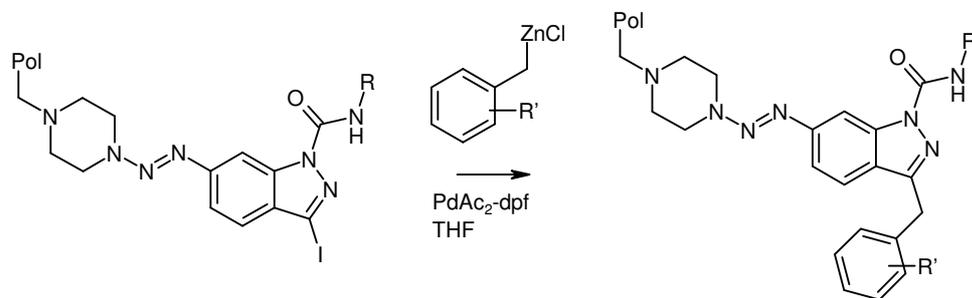
Die Negishi-Kreuzkupplung an der festen Phase wurde an der Modellsubstanz 4-Iodanilin, welche über den Triazenlinker⁶¹ an ein Polystyrolharz gebunden war, untersucht. An die harzgebundene Iodverbindung wurde ein Cyanobenzylrest angefügt. Die Reaktion wurde unter Verwendung des Bohdan-Miniblocks in THF unter Palladium-Katalyse mit 4-Cyanobenzylzinkchlorid durchgeführt. Zur Reaktionsoptimierung wurde die Reaktion mit verschiedenen Pd-Katalysatoren durchgeführt. Nachdem sich PdAc₂(dppf) als am besten geeigneter Katalysator erwiesen hat, wurde durch Parallelansätze das optimale Verhältnis von Katalysator und Rieke-Reagenz zum Edukt untersucht. Die Reaktion wurde dabei durch IR-Spektroskopie verfolgt, wobei die CN-Bande bei 2220 cm⁻¹ ausgenutzt wurde. Hierdurch konnten gute Reaktionsbedingungen gefunden werden, die bei der geplanten Synthese der Bibliothek verwendet werden können. Die Abspaltung der Zielverbindung 4-Benzylbenzonitril von der festen Phase wurde ebenfalls untersucht, konnte aber nicht zufriedenstellend gelöst werden. Deswegen konnten keine Ausbeuten bestimmt werden.



Formelschema 41: Für die Optimierung der Negishi-Kreuzkupplung wurde festphasengebundenes Phenyljodid als Modellverbindung verwendet

⁶¹ S. Bräse et al., Tetrahedron Lett. **1999**, *40*, 6201-6203

Die Ergebnisse der Vorversuche wurden später auf die Synthese der Indazolharnstoffe übertragen. Hierbei wurden die harzgebundenen 3-Iodindazolharnstoffe mit 4-Cyanobenzylzinkchlorid bzw. 4-Chlorbenzylzinkchlorid sowie PdAc₂(dppf) als Katalysator und THF als Lösungsmittel umgesetzt.



Formelschema 42: Kreuzkupplung der Indazolharnstoffe mit Riekerreagenz unter Palladium-Katalyse an der festen Phase

Die Abspaltung der Zielverbindungen vom Trägerharz erwies sich als schwierig und wurde deshalb intensiv untersucht. Bei der Abspaltung der Zielverbindung von der festen Phase wird der Triazenlinker zunächst gespalten, wobei das Diazoniumsalz der Zielverbindung entsteht. Dieses muß im 2. Schritt zu der Zielverbindung reduziert werden. Getestet wurde die Abspaltung mit TFA in THF, wobei THF auch als Reduktionsmittel dient. Hierbei konnte aber nur bei Indazol eine Reduktion des Diazoniumsalzes beobachtet werden. Bei den Indazolharnstoffen, wie auch bei den Zielverbindungen scheiterte die Reduktion der Diazoniumsalze. Auch die Zugabe von bekannten Reduktionsmitteln, wie Triethylsilan blieb erfolglos.

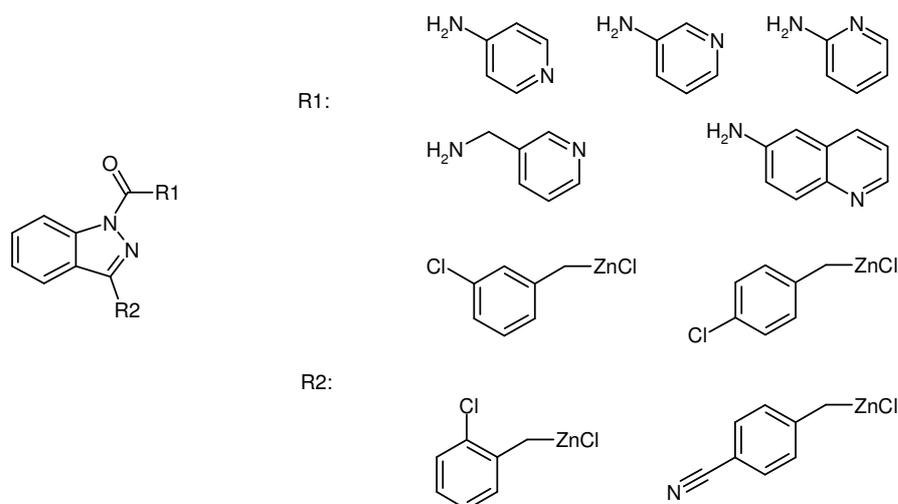
Eine weitere Literaturbekannte Methode zur Spaltung des Triazenlinkers ist die Abspaltung und Reduktion mit Trichlorsilan⁵⁹. Allerdings konnte bei der Anwendung dieser Methode auf unser Problem keine Abspaltung beobachtet werden.

Unter Verwendung von Arbeiten von Enders et al.⁶² wurde nach Rücksprache mit Prof. Bräse außerdem eine zweistufige Abspaltung untersucht, bei der zunächst die Abspaltung des Aromaten mit 5% TFA in Dichlormethan erfolgt. Das dabei erhaltene Diazoniumsalz wird nach dem Einengen der Reaktionslösung unter Vakuum mit THF/DMF 5/2 bei 60 °C reduziert. Hierbei konnten positive Trends erkannt werden. In der DC-Kontrolle konnte dabei auch eine Umsetzung des Diazoniumsalzes beobachtet werden. Für eine NMR-Untersuchung des entstanden Produkts reichte die eingesetzte Menge an Harz aber nicht aus.

Nachdem mit Ausnahme der Abspaltung die einzelnen Reaktionsschritte ausreichend optimiert waren, wurde mit der Synthese der Bibliothek begonnen. Ziel der Synthese war eine Bibliothek mit insgesamt 20 Verbindungen. Dazu sollten 4 Benzylreste mit 5 verschiedenen Aminen kombiniert werden. Bei den 4 Benzylresten sollten verschieden substituierte Chlorbenzyl- und 4-Cyanobenzylreste verwendet werden. Als Amine sollten neben 4-Amino-Pyridin die Regioisomeren 2- und 3-Aminopyridin, 4-Picolylamin zur Untersuchung des Einflusses einer Kettenverlängerung sowie 6-Aminochinolin eingesetzt werden. Für die Synthese wurde das IRORI-System eingesetzt, um die Vorteile der Radiotag-markierten Synthese ausnützen zu können. Für jede Zielverbindung wurden ein IRORI-Minican mit 150mg mit Iodindazol beladenem Harz sowie ein Radiotag befüllt. Die

⁶² S. Schunk, D. Enders, Org. Letters **2000**, 2, 907-910

Harnstoffsynthesen wurden in 5 Ansätzen nach der zuvor erarbeiteten Vorschrift durchgeführt.



Formelschema 43: Übersicht der ausgewählten Reste, die in der Bibliothek kombiniert werden

Für die Kreuzkupplungen mit den verschiedenen Riecke-Reagenzien unter Palladium-Katalyse wurden die Irori-Cans an der Lesestation sortiert und auf die verschiedenen Kolben verteilt. Die Reaktionen wurden nach der zuvor ausgearbeiteten Vorschrift in abs. THF durchgeführt.

Die Abspaltung der 20 Zielverbindungen vom Harz wurde entsprechend der zuvor erprobten Bedingungen mit 5%iger TFA/DCM-Lösung durchgeführt und anschließender Reduktion des dabei entstehenden Diazoniumsalzes mit THF/DMF bei 60°C durchgeführt. Allerdings traten durch die entsprechend größeren Mengen an Abspaltung Probleme beim Einengen der Lösung auf. Nachdem durch DC-Kontrollen keine klaren Aussagen getroffen werden konnten, mußte in der LC-MS-Analyse festgestellt werden, daß die Zielverbindungen nicht im Rohprodukt enthalten waren. Die Synthese der Bibliothek von Benzylindazolharnstoffen konnte damit nicht erfolgreich zum Abschluß gebracht werden.

5.4 NMR-Spektroskopische Untersuchungen

5.4.1 Zielsetzung

Mittels NMR-Spektroskopischer Untersuchungen sollten vertiefte Informationen zur Bindung ausgewählter Liganden an Tubulin erhalten werden, die einen besseren Einblick in die Art der Bindung, der Bindungsstelle und der Wechselwirkung geben. Es wurden daher vornehmlich Substanzen, die sich im Tubulin-Polymerisationsassay bereits als gute Tubulinbinder gezeigt haben, oder Derivate dieser Substanzen ausgewählt.

Optimiert man Substanzen auf ihre Fähigkeit hin, die Tubulinpolymerisation zu hemmen, so zeigt sich, dass die Substanzen immer lipophiler werden und sich damit nur noch in geringem Maße in Wasser lösen. Die Löslichkeiten einer größeren Zahl an Tubulinbindern, die sich von den Leitstrukturen D-24203, **1**, **124** und **155** ableiten, wurde experimentell bestimmt. In den meisten Fällen lagen die Löslichkeiten unter 10 µMol/l, meist sogar unter 1 µMol/l. Dies ist ein Konzentrationsbereich, der für vertiefende NMR-Untersuchungen nicht zugänglich ist. Lediglich die Klasse der Substanzen, die sich von D-24203 ableiten verfügen über Löslichkeiten im Bereich von 25-100 µMol/l. Derivate hierzu mit phenolischen OH-Gruppen sind sogar noch um den Faktor 5-10 besser löslich. Daher wurden die NMR-Untersuchungen auf die Klasse der D-24203-Derivate mit dem Vertreter **165** beschränkt.

5.4.2 NMR-Untersuchungen der Bindung der Liganden an das Tubulin

Bereits im Tubulin-Polymerisations-Assay zeigten die nachfolgend untersuchten Substanzen eine starke Hemmung der Ausbildung der Mikrotubuli mit IC₅₀-Werten im µM-Bereich und darunter. Dies lässt auf eine starke Bindung an das Tubulin schließen. Jedoch waren im Assay neben Tubulin auch ca. 30% MAPs (Mircotubuli assoziierte Proteine) vorhanden, wichtige Helfer bei der Aggregation der Tubulin-Dimere zu Mikrotubuli. Eine Hemmung der Ausbildung von Mikrotubuli könnte daher auch auf einer Inhibition der MAPs zurückzuführen sein. Um dies auszuschließen, ist eine Beobachtung der direkten Wechselwirkung zwischen Ligand und Tubulin erforderlich, wie es beispielsweise mit der Sättigungs-Transfer-NMR-Methode möglich ist.

Für die NMR-Untersuchungen wurde daher lyophilisiertes, MAP-freies Tubulin aus Rinderhirn (Firma Cytoskeleton⁶³, Tubulin TL-238) in wässrigem Phosphat-Puffer (50mM, H₂O:D₂O 10:1) bei neutralem pH-Wert (pH=7) gelöst und mit dem zu untersuchenden Liganden versetzt. Während üblicherweise für Tubulin-Polymerisationsexperimente das Tubulin in G-PEM-Puffer vorliegt, wurde für die NMR-Untersuchungen davon abgewichen, da der G-PEM-Puffer organische Verbindungen in weit größerer Konzentration als die eingesetzten Liganden erhält und somit deren Signale überdeckt hätte. Das Tubulin blieb unter Phosphatpuffer-Bedingungen für mehr als 24h aktiv in Lösung, so dass die NMR-Messungen durchgeführt werden konnten. Ein Vergleich der Bindung ausgewählter Liganden an Tubulin in beiden Puffersystemem zeigte keine Unterschiede in der Stärke der Bindung. Optimale Bedingungen für den Sättigungstransfer ergeben sich bei einem Ligand:Protein Verhältnis von 20:1 bis 200:1. Je nach Löslichkeit der Liganden wurde daher mit Tubulinkonzentrationen im Bereich von 0.5-4 µM und Ligandkonzentrationen im Bereich von 25-1000 µM gearbeitet.

Die STD-Methode wurde zunächst mit Epothilon A und B sowie Colchicin etabliert, da diese als Tubulinbinder bekannt sind. Als Negativkontrolle wurde D-62451 eingesetzt, ein Cyclophilinbinder, der jedoch keine Affinität zu Tubulin besitzt. Danach wurden eine Reihe ausgewählter Substanzen untersucht (siehe Tab.13 und Abb. 18).

⁶³ Cytoskeleton, 1830 S. Acoma St., Denver, CO 80223, USA; www.cytoskeleton.com

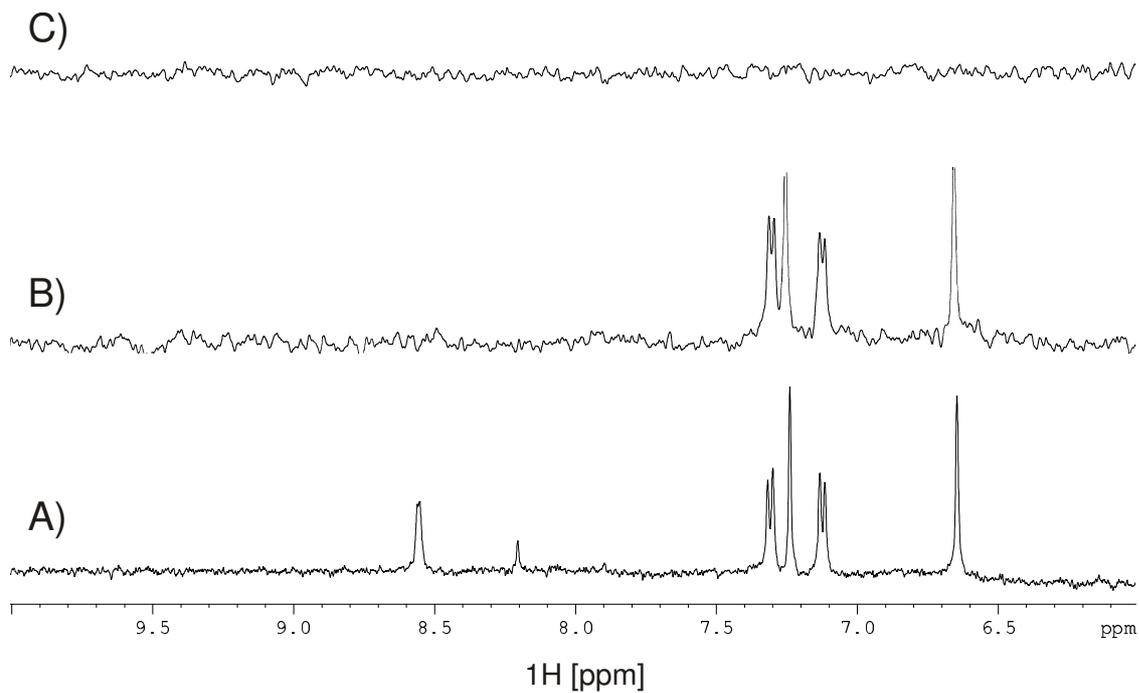


Abb. 15: Evaluierung der STD-Methode an Colchicin mit Tubulin: a) ^1H -Spektrum von Colchicin in Gegenwart von Tubulin b) STD-Spektrum Colchicin mit Tubulin c) STD-Spektrum von Colchicin ohne Tubulin

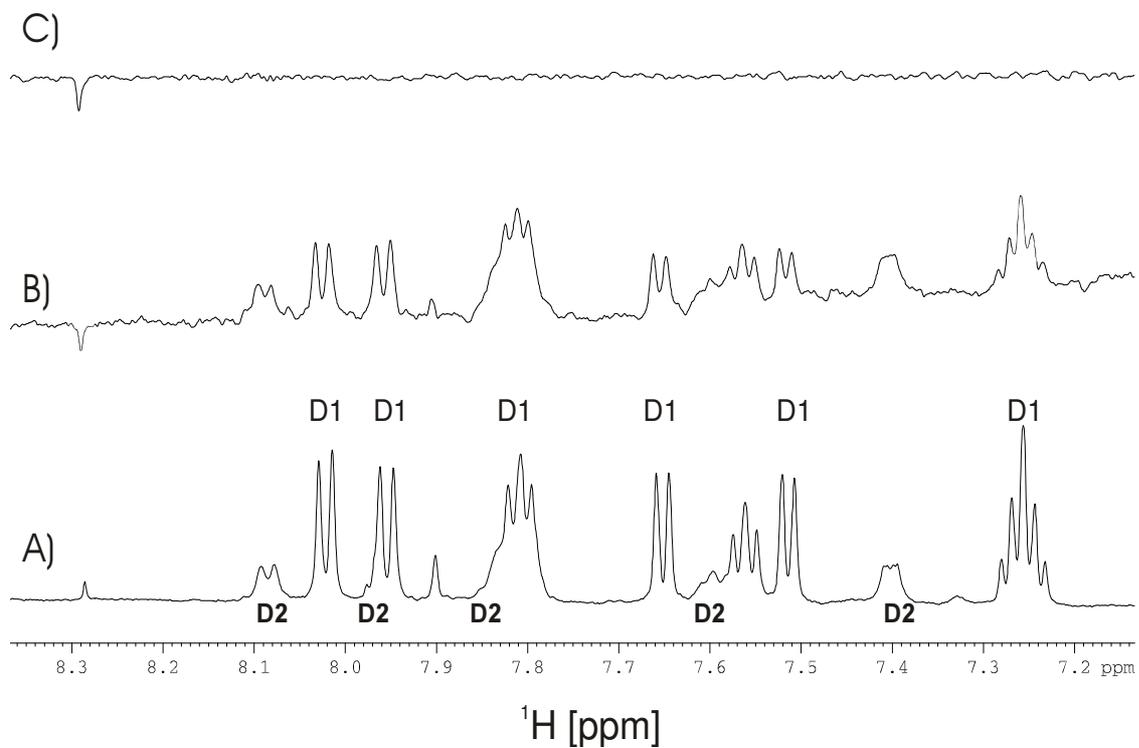


Abb. 16: NMR-Bindungsstudien an **165** mit Tubulin: a) ^1H -Spektrum von **165** in Gegenwart von Tubulin b) STD-Spektrum **165** mit Tubulin c) STD-Spektrum von **165** ohne Tubulin

Exemplarisch zeigen die vorhergehenden Abbildungen die Spektren für Colchicin und **165**. Aufgenommen wurde jeweils ein einfaches ^1H -Spektrum des Liganden mit (a) und ohne Tubulin (nicht gezeigt), sowie das STD-Spektrum mit (b) und ohne (c) Protein. Bindet der Ligand an das Protein, sind seine Signale im Spektrum (b) zu sehen. Im Kontrollspektrum (c) dürfen keine Signale zu sehen sein. Dies stellt sicher, dass bei der Sättigung des Proteins durch selektive Einstrahlung nicht ebenso eine Resonanz des Liganden gesättigt wurde, so dass es hierdurch zu einer falsch positiven Aussage käme. Für **165** ist neben der Hauptkonformation (D1) eine weitere Nebenkonformation (D2) im Protonenspektrum (a) zu erkennen. Beide zeigen im STD-Spektrum (b) Signale, binden also an Tubulin. Zur Kontrolle der Messung wurde das STD-Spektrum jeweils in Abwesenheit von Tubulin aufgenommen (c). Erwartungsgemäß sind hier keine Signale zu sehen.

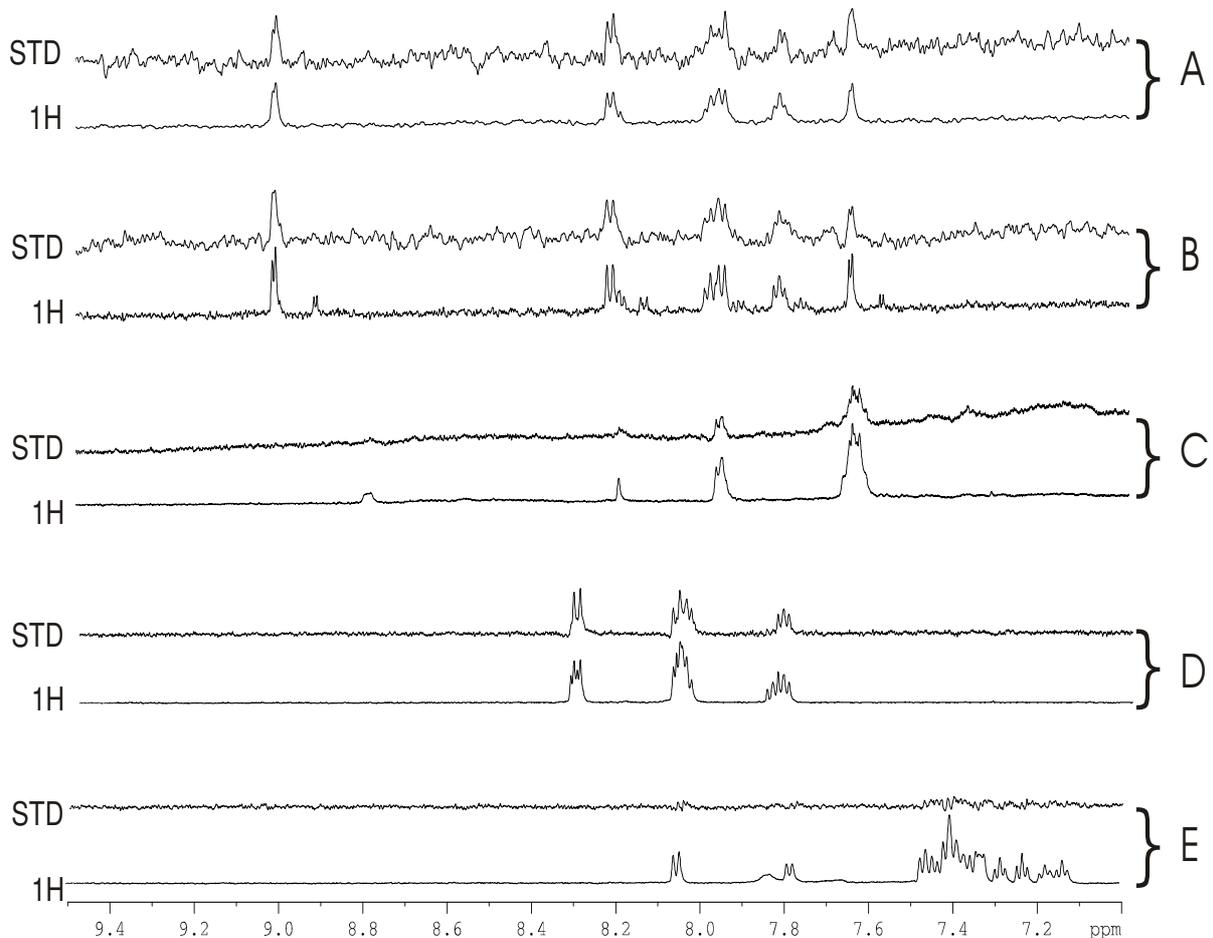
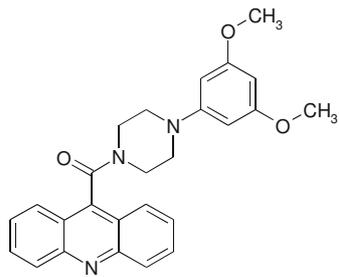
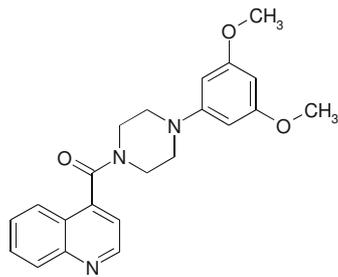


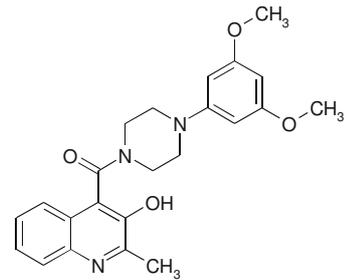
Abb. 17: STD- und ^1H -Spektren verschiedener Liganden: a) D-24203, b) Hydrochlorid von D-24203, c) **166**, d) **167**, e) D-62451. Alle Liganden außer D-62451 zeigen Signale im STD-Spektrum, welcher als Negativkontrolle eingesetzt wurde



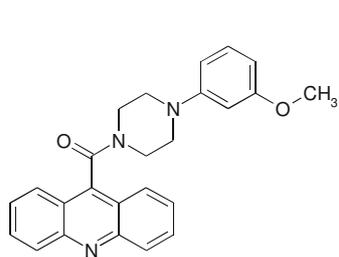
165



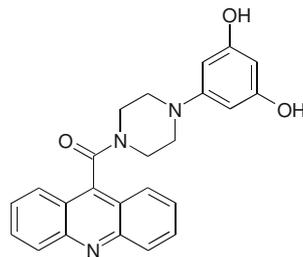
D-24203



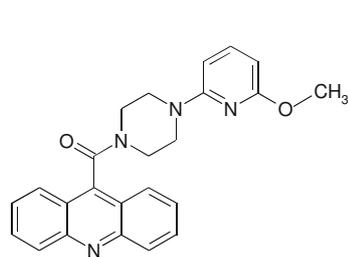
166



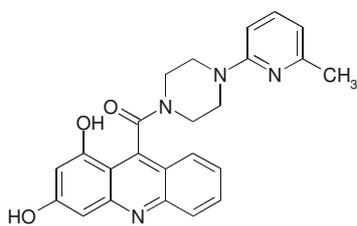
D-82318



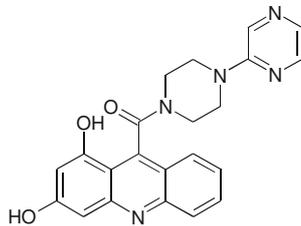
167



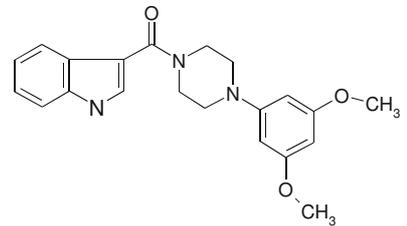
168



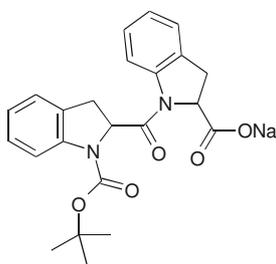
169



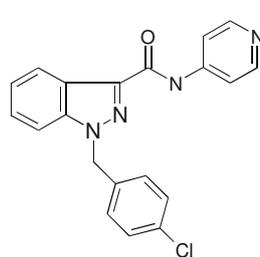
170



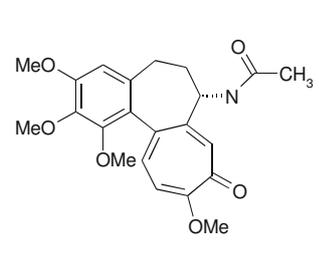
171



D-62451



124



Colchicin

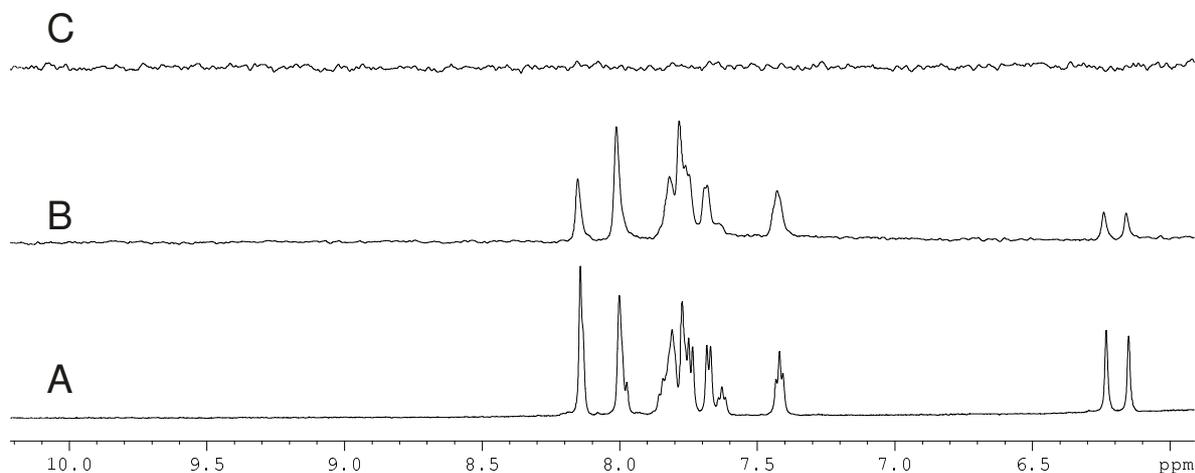
Abb. 18: Strukturen der untersuchten Substanzen

In der folgenden Tabelle sind die mittels STD untersuchten Substanzen und die eingesetzten Konzentrationen aufgelistet

Substanz	Konzentration [μM]	Konz. Tubulin [μM]	Bindung
D-24203	400	10	Ja
D-24203 x HCl	400	10	Ja
166	1000	10	Ja
165 x HCl	50	1	Ja
165	50	1	Ja
167	1000	10	Ja
171	50	1	Nein
170	50	1	Ja
168	50	1	Ja
169	50	1	Ja
D-62451	1000	10	Ja
124	10	0.5	Nicht detektierbar
D-82318	25	0.5	Ja

Tabelle 13: Mittels STD untersuchte Substanzen und der eingesetzte Konzentrationsbereich

Zur Verbesserung der Löslichkeit wurden Substanzen mit guten Tubulinbindungseigenschaften gezielt weiter derivatisiert. Insbesondere wurden zusätzliche Hydroxygruppen in die aromatischen Ringsysteme eingeführt. Vertreter dieser Verbindungsklasse sind **169** und **170**, die jeweils 2 Hydroxygruppen am Acridinring besitzen. Die Löslichkeit dieser Substanzen konnte um einen Faktor 10-100 gesteigert werden. Wie nachfolgende Abbildung zeigt, erhält man auch für diese Substanzen Signale im STD-Spektrum die auf Bindung an das Tubulin hindeuten.

Abb. 19: STD an **170**: a) **170** mit Tubulin, 1H-1D, b) STD-NMR am Komplex c) STD an reinem **170**

5.4.3 Verdrängungsexperimente mit Colchicine

Da eine direkte Beobachtung des Targetproteins mittels NMR im vorliegenden System nicht möglich war, wurde versucht, durch Verdrängung mit bekannten Tubulinbindern wie Colchicin, die Bindungsstelle der Liganden zu lokalisieren. Hierzu wurde eine Lösung von Tubulin mit Ligand im Verhältnis von 1:30 - 1:50 vorgelegt (siehe Bedingungen für STD-Experimente in den vorangegangenen Abschnitten). Zu dieser Lösung wurde dann

schrittweise Colchicin zugesetzt und jeweils ein STD-NMR-Spektrum aufgenommen. Die STD-Signale der Liganden im Spektrum ohne Colchicin wurden jeweils auf 1 normiert, die relativen Intensitäten des Liganden in Gegenwart von Colchicin sind dann ein Maß für den Anteil an Ligand, der noch gebunden ist. Sind 50% des Liganden verdrängt worden, so sinkt auch die Signalstärke auf 50% ab. Die Konzentration an Inhibitor (Colchicin), bei der diese 50%ige Reduktion der Aktivität des Liganden beobachtet wird, wird IC_{50} genannt. Aus ihr lässt sich dann bei bekanntem K_i des Colchicins die Komplexdissoziationskonstante K_d für den Liganden berechnen.

Zur NMR-Messung wurden Tubulin (0.8 μ M) und beispielhaft D-82318 (25 μ M) in wässrigem Phosphatpuffer (50mM, pH=7) vorgelegt und 2h inkubiert. Dann wurde schrittweise Colchicin bis zu einem 32fachen Überschuss zugesetzt und nach jeweils 1h Inkubationszeit das Spektrum gemessen.

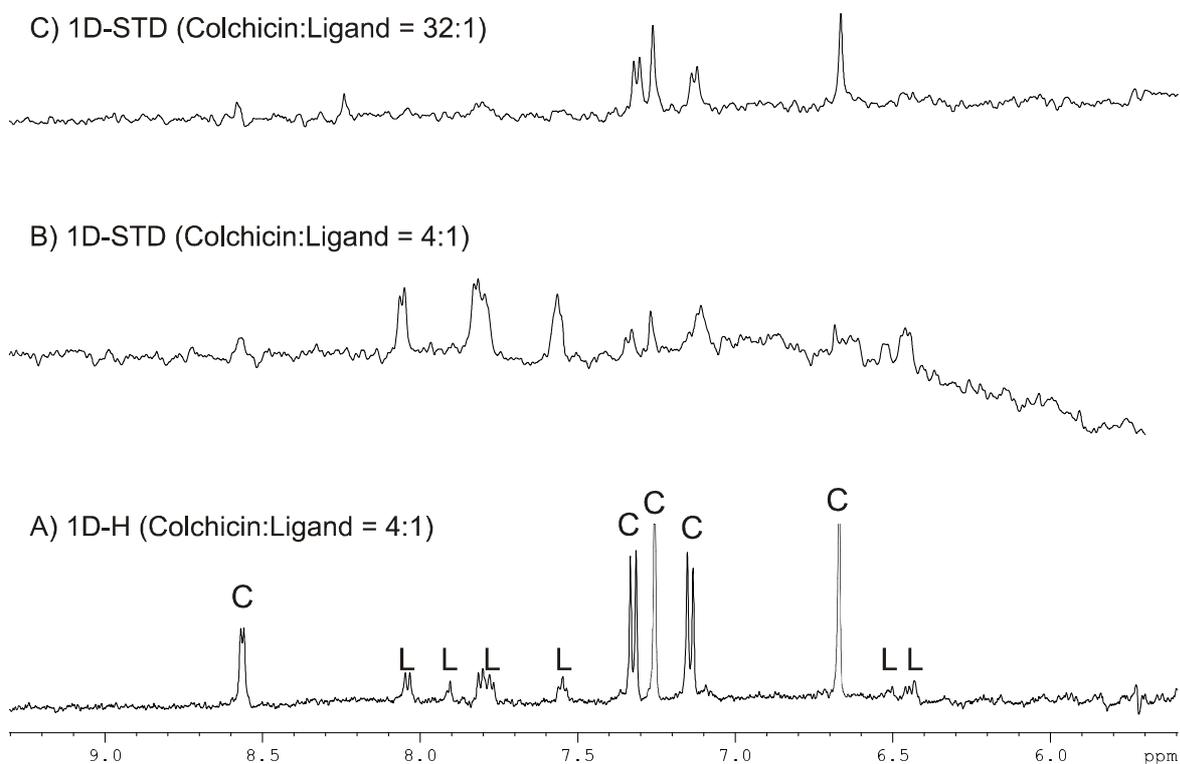


Abb. 20: Verdrängung von D-82318 durch Colchicin: A) 1H-Spektrum von Colchicin:Ligand 4:1 in Gegenwart von Tubulin. B) STD Spektrum bei einem Colchicin:Ligand Verhältnis 4:1, C) STD bei einem Verhältnis von 32:1. Es sind keine Signale des Liganden zu sehen, eine vollständige Verdrängung ist erfolgt

Abbildung 20 zeigt das STD-Spektrum bei einem vierfachen Überschuss von Colchicin gegenüber D-82318. Dennoch sind die Signale des Liganden intensiver als die des Colchicins, der größere Teil des Liganden ist also noch an Tubulin gebunden, was einer höheren Affinität gegenüber Tubulin entspricht. Eine quantitative Auswertung führt zu einer Abschätzung des K_d -Wertes für D-82318; im Falle eines 4fachen Überschusses von Colchicin hat das Signal des Liganden D-82318 sich auf ca. 65% verringert.

Mit $STD-Int = 1 / \{1 + ([Inhibitor] / IC_{50})\}$ (Gl. 3, Kap 5.2.6) ergibt sich als IC_{50} -Wert 180 μ M.

Mittels der umgeformten Cheng-Prusoff Gleichung $K_d = [\text{Ligand}] * K_i / (IC_{50} - K_i)$ (Gl.2, Kap NMR Methodik) und einem bekannten K_i -Wert für Colchicin von etwa 83.3 nM⁶⁴ erhält man den K_d -Wert für den Liganden D-82318: $K_d \approx 11$ nM

Analog wurde auch für **168** ein Verdrängungsexperiment durchgeführt (Konzentrationen: **168** 50µM, Tubulin 1.6 µM). Auch hier konnte eine Verdrängung des Liganden durch Colchicin beobachtet werden. Der ermittelte K_d -Wert lag bei etwa 40 nM, die Bindung an Tubulin ist also durch die Modifikation diesen Teils des Tubulinbinders schwächer geworden.

Hingegen konnte für **169** auch bei 100fachem Überschuss von Colchicin keine Verdrängung erzielt werden. Die Signale des Liganden im STD-Spektrum zeigten unverändert ihre volle Intensität. Für das Colchicin war ein Anwachsen der Intensität der Signale im STD-Spektrum zu beobachten, so dass eine Bindung des Colchicins an das Tubulin erwiesen ist. Daher muss angenommen werden, dass **169** nicht an die Colchicin-Bindungsstelle bindet. Dies steht im Einklang mit den später erhobenen Daten zur Inhibition der Tubulinpolymerisation. **169** zeigte hier keine nennenswerte Aktivität.

In Molecular-Modelling-Experimenten wurde festgestellt, daß die 1-Hydroxylgruppe einen wichtigen Einfluß auf die Konformation des Piperazinringes hat und dessen Sessel-Konformation eventuell verhindert. Vergleicht man **169** mit **170** so spielt das zweite Stickstoffatom im Pyrazinring offensichtlich auch eine gewisse Rolle, denn bisher waren alle synthetisierten Pyrazin-Derivate vom Typ D-24203 unwirksam. Möglich wäre auch, daß die Hydroxysubstituenten der Derivate **169** und **170** in der Zellen phosphoryliert oder weiter funktionalisiert werden und dadurch das Tubulin nicht mehr oder nicht mehr an einer relevanten Stelle erreichen.

5.4.4 Bestimmung von möglichen Bindungsepitopen der Liganden

Wie im Kapitel NMR-Methoden beschrieben, ist die Effizienz des Sättigungstransfers vom Protein zum jeweiligen Proton des Liganden vom Abstand abhängig. Während im konventionellen 1H-Spektrum die relative Intensität der Signale nur von der Anzahl der Protonen abhängt, ist im STD-Spektrum die Intensität auch von der Effizienz des Transfers abhängig. Sollten alle Protonen des Liganden in etwa gleich engem Kontakt zum Protein stehen, so wäre das Verhältnis zwischen dem jeweiligen Signal im 1H- und im STD-Spektrum für alle Resonanzen gleich. Sind jedoch nur Teile des Liganden im engen Kontakt zum Protein, so ergeben sich Unterschiede im Verhältnis der Signalintensitäten des jeweiligen Protons zwischen 1H- und STD-Spektrum.

Für die Liganden **165**, D-24203 und D-82318 wurde dies näher untersucht. Es konnten jedoch keine signifikanten Abweichungen in den Signalintensitäten festgestellt werden. Daher ist anzunehmen, dass das gesamte Molekül in engem Kontakt mit dem Protein steht. Dies wird auch durch Docking-Studien mittels Molecular Modelling belegt, die zeigen, dass der größte Teil des Moleküls tief in die Colchicinbindungstasche hineingeht, während sich der Rest (Acridinrest) direkt an der Oberfläche des Proteins befindet, quasi wie ein Deckel die Bindungstasche zudeckt.

⁶⁴ A. Lambeir, Y. Engelborghs, J. Biol. Chem **1981**; 256: 3279-3282

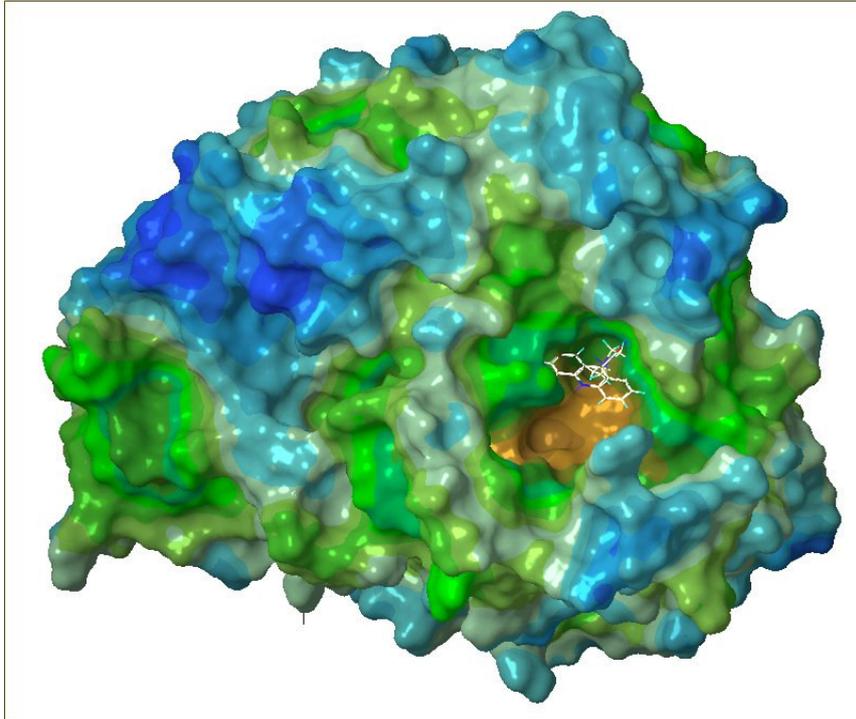


Abb. 21: Modell des Tubulin-**165**-Komplexes nach Docking an die Colchicin-Bindungsstelle

5.4.5 Zusammenfassung der NMR-Experimente

Für eine Serie ausgewählter Substanzen um die Leitstruktur D-24203 konnte mittels Sättigungstransfer-NMR eine direkte Bindung dieser Liganden an das Tubulin nachgewiesen werden. Eine inhibitorische Wirkung im Tubulin-Polymerisationsassay durch Wechselwirkung mit den MAPs im Assay kann damit ausgeschlossen werden. Durch eine mehr quantitative Auswertung der STD-Effekte konnte gezeigt werden, dass die Liganden in sehr engem Kontakt mit dem Tubulin stehen, was auch mit den Ergebnissen aus Docking Experimenten mittels Molecular Modelling in Übereinstimmung ist. Durch Verdrängungsstudien mit Colchicin konnte für eine Reihe von Liganden die Bindung an die Colchicinbindungsstelle bestätigt werden. Lediglich für die 1,3-Dihydroxy-Acrindinderivate konnte keine Verdrängung mit Colchicin beobachtet werden, obwohl sie ebenso an Tubulin zu binden scheinen. Da auch im Polymerisations-Assay keine nennenswerte Aktivität gemessen werden konnte, ist anzunehmen, dass diese Liganden an einer Stelle binden, die nicht für die Tubulin-Polymerisation relevant ist.

5.5 Versuche zur Expression von Tubulin-Varianten

5.5.1 Einführung und Problemstellung

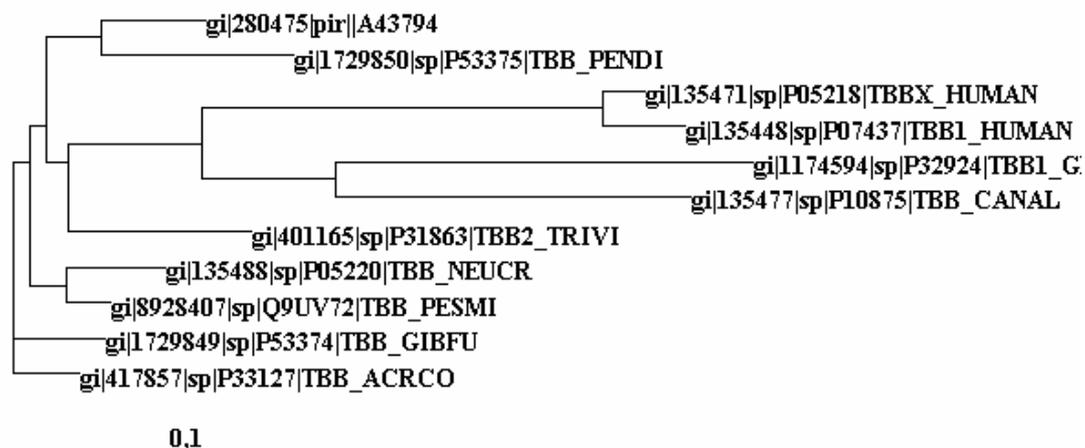
Eine Struktur von Rindertubulin (alpha und beta) mittels Elektronenmikroskopie liegt mit einer Auflösung von 3,5 Å vor⁶⁵. Dies ist nicht ausreichend, um die Bindung von Liganden mit ausreichender Sicherheit modellieren zu können. Für Protein-NMR Untersuchungen zur sicheren strukturellen Charakterisierung ist unbedingt ¹³C- und ¹⁵N-isotopen-markiertes Tubulin notwendig, welches durch Expression in verschiedenen Wirtsorganismen (E. coli, Pichia pastoris etc.) und mit entsprechend markierter Fütterung erhalten werden kann.

Die heterologe Expression von Tubulin aus verschiedenen Organismen in verschiedenen Expressionssystemen scheiterte bisher in der Regel an der Unlöslichkeit des Produktes bzw. fehlender Funktionalität im Polymerisationstest. Nach Auskunft von R. Melki (Gif-sur-Yvette, Frankreich), einem ausgewiesenen Tubulin Experten, sind alle Untersuchungen in Frage zu stellen, die eine heterologe Expression von funktionalem Tubulin beschreiben^{66, 67}.

5.5.2 Lösungsansätze

Eine verkürzte Sequenz von β -Tubulin der Maus (beta-5, 444 Aminosäuren) mit hoher Homologie zu menschlichem und Rinder- β -Tubulin könnte Löslichkeitsprobleme umgehen. Da der C-Terminus für die zelluläre Interaktion verantwortlich zu sein scheint (u.a. mit Mikrotubuli-assoziierten Proteinen, MAP), wurde an zwei verschiedenen Stellen der Maus Sequenz ein Stop Codon eingefügt, so dass sich im Prinzip zwei verschieden lange Fragmente exprimieren lassen, vom N- Terminus beginnend Teilstück 1-85 sowie 1-234.

Alternativ könnte modellhaft die Überexpression eines dem humanen Tubulin entfernt verwandten Tubulins in E.coli als einem Standard Organismus in löslicher Form gelingen. Ein multiples Alignment mit dem Programm ClustalW zeigt die hohe Homologie der β -Tubuline aus verschiedenen Organismen.



⁶⁵ J. Löwe, H. Li, K. H. Downing, E. Nogales: Refined Structure of alpha beta Tubulin at 3.5 Å Resolution, J. Mol. Biol, **2001**, 313, 1045-1057

⁶⁶ M. E. Oxberry, T. G. Geary, C. A. Winterrowd, R. K. Prichard: Individual Expression of recombinant alpha and beta tubulin from Haemonchus contortus: polymerisation and drug effects, Protein Expr. Purif. **2001**, 21, 30-39

⁶⁷ C. Shah, C. Zhi-Qi Xu, J. Vickers, R. Williams: Properties of microtubules assembled from mammalian tubulin synthesized in E. coli, Biochemistry 2001, 40, 4844-4852

Code	Herkunft
A43794	Aspergillus niger
P53375	Penicillium digitatum
P05218	Maus
P07437	Human
P32924	Geotrichum candidum
P10875	Candida albicans
P31863	Trichoderma viride
P05220	Neurospora crassa
Q9UV72	Pestalotiopsis microspora
P53374	Fusarium moniliforme (Gibberella fujikuroi)
P33127	Neotyphodium sp.

Abb. 22: Multiples Alignment von β -Tubulin Aminosäuresequenzen

Jedoch zeigt sich der Übergang in eine andere taxonomische Klasse auch an den Tubulin Sequenzen. In der Literatur wird eine Tubulin Expression für *Retikulomyxa filosa* (eine Amöbe) in *E. coli* beschrieben^{68, 69}. Trotz der oben erwähnten prinzipiellen Skepsis erschienen bei Nachfrage valide Untersuchungen vorzuliegen.

Sollte nur eine Expression unlöslichen Tubulins, eventuell als inclusion bodies, gelingen, könnte nach Denaturierung in Harnstoff eine Renaturierung versucht werden. Die Bindung von Liganden ist dann mittels STD Experimente zu ermitteln. Signale im STD Spektrum würden zumindest auf strukturierte Bereiche schließen lassen und somit Verdrängungsstudien ermöglichen.

5.5.3 Expression von β 5-Maustubulin

Die Stop Codons wurden mittels PCR Methode (QuickChange Mutagenesis von Stratagene) und den entsprechenden Primern in das β 5-Tubulin-Gen der Maus im pETd3 Vektor eingefügt. Die anschließende Sequenzierung des Abschnittes bewies den korrekten Austausch. Nach Transformation in *E. coli* BL21 Stämme wurde jedoch keine Überexpression festgestellt, weder unter langsamer noch schneller Induktion (0,1 mM IPTG, 4h bzw. 1,0 mM IPTG, 2h, jeweils bei 37 °C). Dies gilt für alle drei gewählten künstlichen Konstrukte (Aminosäuresequenzen 1-444, 1-238 sowie 1-84). Der Ansatz wurde nicht weiter verfolgt.

5.5.4 Expression von Tubulin aus *Retikulomyxa filosa*

Das β 1-Tubulin von *Retikulomyxa filosa* im Expressionsvektor pQE30 in *E. coli* JM 101 wurde von Dr. Linder (München) zur Verfügung gestellt. Nach Literaturangaben wurde die Expression bei 30 °C über 6 Stunden nach Induktion mit 1 mM IPTG durchgeführt. Es wurde mittels SDS-PAGE eine Überexpression eines ca. 50-55 kD großen Proteins festgestellt (nachfolgende Abbildungen), jedoch ungelöst in Form von inclusion bodies (siehe Bild unten).

⁶⁸ S. Linder, M. Schliwa, E. Kube-Granderath: Expression of *Retikulomyxa filosa* alpha and beta tubulins in *E. coli* yields soluble and partially correctly folded material, *Gene* **1998**, 212, 87-94

⁶⁹ S. Linder, M. Schliwa, E. Kube-Granderath: Expression of *Retikulomyxa filosa* tubulins in *Pichia pastoris*: regulation of tubulin pools, *FEBS Lett.* **1997**, 417, 33-37

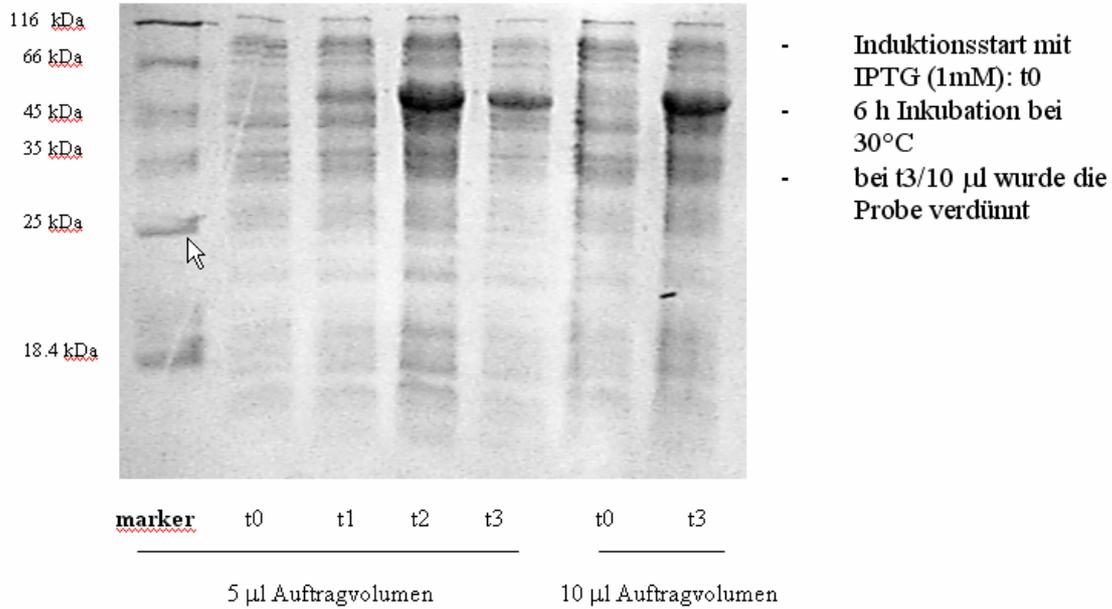


Abb. 23: SDS-PAGE von exprimiertem β 1-Tubulin (*R. filosa*)

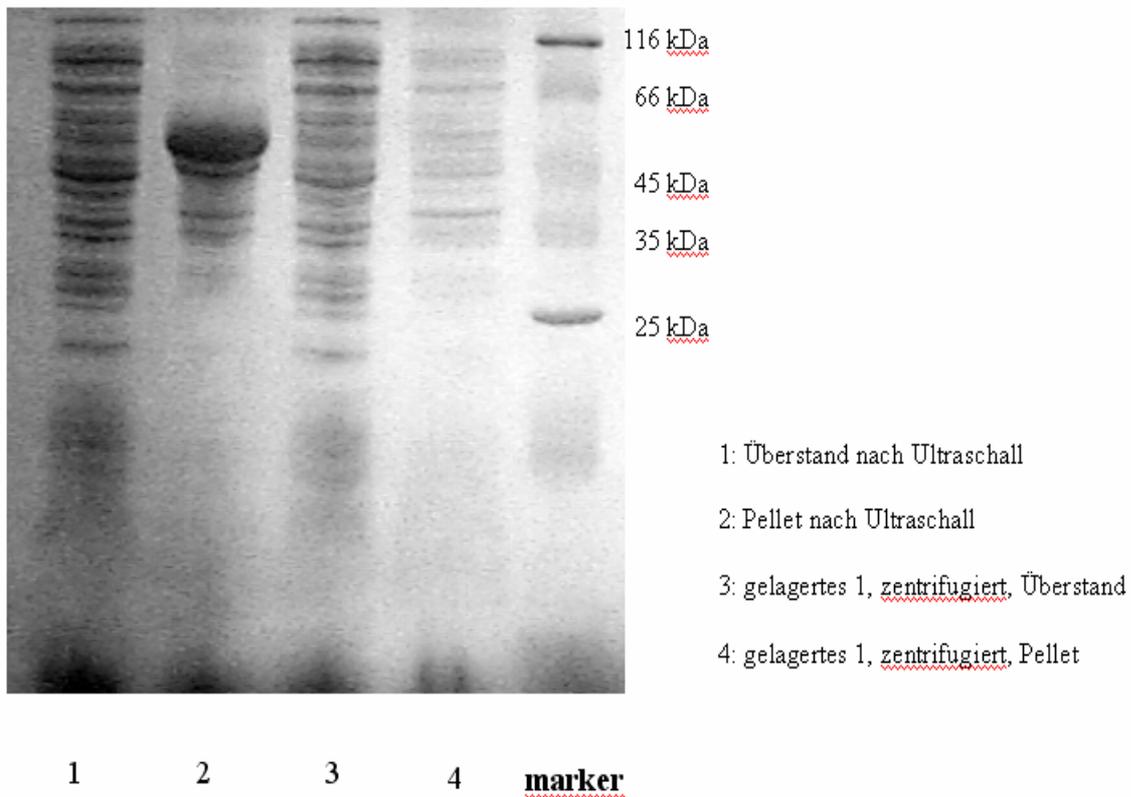


Abb. 24: β 1-Tubulin (*R. filosa*) wird als inclusion bodies exprimiert

Nach Auflösen in 8 M Harnstoff, konnte durch das eingefügte His-Tag über eine Nickel-Säule eine Reinigung erzielt werden. Durch Verwendung von ^{15}N markiertem Ammoniumchlorid in M9 Medium konnte auf diese Weise markiertes, denaturiertes Amöben β 1-Tubulin hergestellt

werden. Ein zweidimensionales Korrelations-Spektrum (^{15}N - ^1H -TROSY-HSQC, siehe Abbildung unten) von 0,01 mM Amöben β 1-Tubulin zeigt die charakteristische geringe Dispersion der Signale als ein Indiz für einen entfalteten Zustand. Während für Proteine im gefalteten Zustand Resonanzen der Amidprotonen im Bereich von 7-11 ppm (im Einzelfall auch darüber hinaus) zu beobachten sind, konzentrieren sich die Signale der Amidprotonen für das Proteinrückgrat im entfalteten Zustand auf den Bereich von ca 7.5-8.5 ppm, die Resonanzen der NH-Protonen der Seitenketten erscheinen bei etwa 6.5-7 ppm. Für ein Protein in der Größenordnung von 55 kDa wären zudem auch mehrere Hundert Signale der Amidprotonen zu erwarten, jedoch sind weniger als 100 Signale im Spektrum zu sehen. Dies ist ein weiteres Indiz für einen entfalteten Zustand, da hier ein schneller Austausch der Amidprotonen mit dem Wasser stattfinden kann. Durch die notwendige Unterdrückung des Wassersignals bei der Aufnahme des NMR-Spektrums werden auch die rasch austauschenden Protonen ebenfalls unterdrückt.

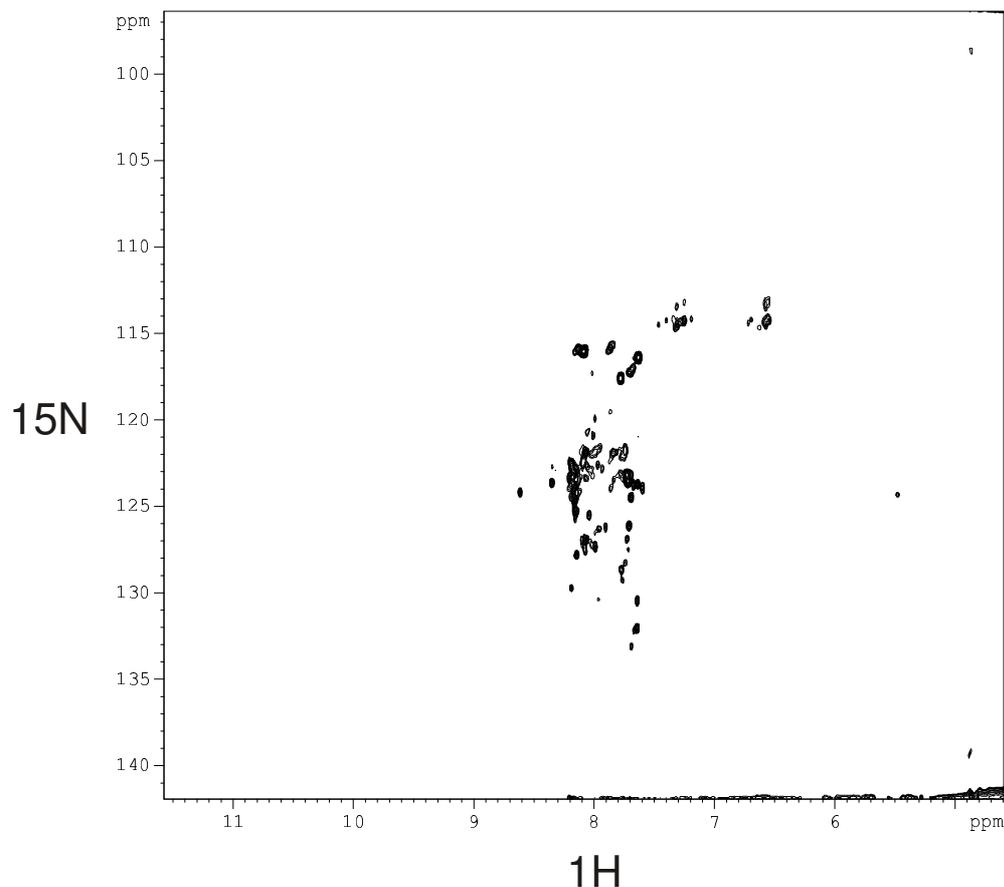


Abb. 25: ^{15}N , ^1H -TROSY-HSQC von rekombinantem Amöben β 1-Tubulin aus *R. filosa*

5.5.5 Versuche zur Renaturierung und Bindungsstudien

Versuche zur Renaturierung durch Verdünnung in Puffer ohne Harnstoff führten zur Ausfällung des Proteins. Eine gelöste Präparation von Amöben β 1-Tubulin gelang jedoch mit einer Endkonzentration von 2 M Harnstoff. Sollte die Renaturierung bzw. Denaturierung des Proteins bei dieser Harnstoff-Konzentration im Millisekunden-Bereich liegen, d.h. ein schneller Austausch zwischen nativem und entfaltetem Zustand gegeben sein, könnten mit diesem System Untersuchungen zur Bindung von Liganden auch an partiell gefaltetem Tubulin durchgeführt werden. Die NMR-Signale des Proteins ergäben sich als Mittelwerte der Resonanzen des gefalteten und des entfalteten Zustands. Bindet ein Ligand an den

gefalteten Zustand, würden sich dessen NMR-Resonanzen verschieben, und somit sich auch die gemittelten Signallagen im NMR-Spektrum verändern. Es könnten so Informationen über die Bindungsstelle des Liganden am Protein erhalten werden.

Zur Kontrolle wurden zunächst Experimente mit käuflichem, unmarkiertem Rindertubulin und Colchicin durchgeführt. Hierbei zeigten sich STD Signale mit 0,8 mM Colchicin in 2 M Harnstoff und 0,004 mM Tubulin, es liegt damit eine Bindung des Colchicins an das Tubulin vor.

Das markierte Amöben β 1-Tubulin von *Retikulomyxa filosa* zeigt ebenso Signale des Colchicins. Dies deutet auf eine Bindung des Liganden an das exprimierte Tubulin hin.

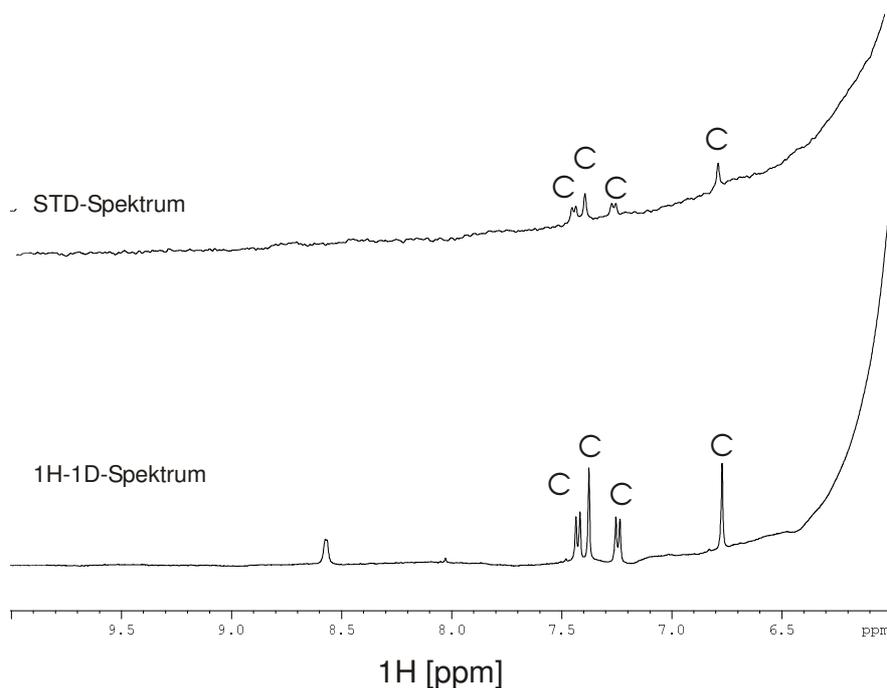


Abb. 26: STD-NMR von Colchicin an Tubulin in Gegenwart von 2M Harnstoff. Das untere Spektrum zeigt ein konventionelles ^1H -Spektrum des Colchicins. Das Tubulin ist nur als breiter Untergrund wahrzunehmen. Am rechten Rand ist die Schulter des Harnstoff-Signals zu sehen. Das obere Spektrum zeigt das STD-Spektrum, die Signale des Colchicins sind mit C gekennzeichnet.

Im nächsten Schritt wurden dann D-24203 und **165** untersucht. Hier konnte jedoch im Gegensatz zum Colchicin keinerlei Bindung an das exprimierte Tubulin festgestellt werden, so dass dieses System nicht als Modell zur strukturellen Charakterisierung der bindenden Wechselwirkung der Liganden geeignet ist.

Ein ^{15}N , ^1H -HSQC-Spektrum des Tubulins bei 2M Harnstoff zeigt keine Zunahme der Dispersion der chemischen Verschiebungen der Amidprotonen, so dass nach wie vor von einem überwiegend ungefalteten Zustand ausgegangen werden muss. Auch konnten keine Änderungen der Signallagen bei Bindung von Colchicin festgestellt werden, so dass eine unspezifische Wechselwirkung des Colchicins mit Tubulin im entfalteten Zustand angenommen werden kann.

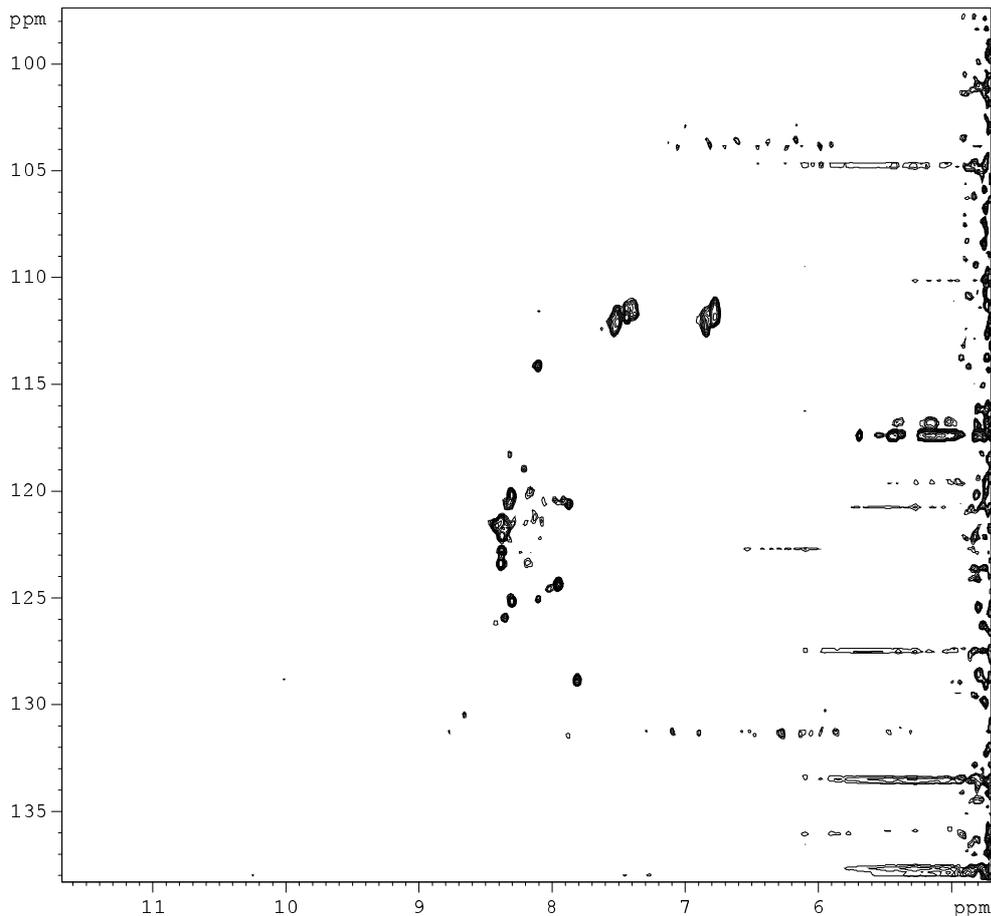


Abb. 27: $^{15}\text{N}, ^1\text{H}$ -HSQC an ^{15}N -markiertem Tubulin in Gegenwart von 2M Harnstoff und 0.8m Colchicin. Die geringe Dispersion und die geringe Anzahl von Signalen deutet auf einen weiterhin entfaltenen Zustand hin. Eine Änderung der chemischen Verschiebungen bei Bindung von Colchicin konnte nicht eindeutig festgestellt werden.

5.5.6 Zusammenfassung der Tubulin-Expressionsversuche

Zur strukturellen Charakterisierung der bindenden Wechselwirkung zwischen Tubulin und ausgewählten Liganden sollte ^{15}N -markiertes Tubulin für NMR-Untersuchungen bereitgestellt werden. Da kein Konstrukt für humanes Tubulin existierte, wurde auf Tubuline anderer Spezies mit hoher Sequenzhomologie ausgewichen.

Die Überexpression verschiedener funktioneller Konstrukte von isotonenmarkiertem β -Tubulin der Maus gelang nicht. Jedoch konnte eine Überexpression von ^{15}N -markiertem Amöben $\beta 1$ -Tubulin ungelöst in Form von inclusion bodies erhalten werden. Das exprimierte Tubulin konnte zwar in denaturiertem Zustand in Gegenwart von 8M Harnstoff wieder in Lösung gebracht werden, blieb jedoch nicht stabil bei der Rückführung in den nativen Zustand in harnstofffreiem Medium. Ein stabiles System partiell gefalteten Tubulins wurde bei einer reduzierten Harnstoff-Konzentration von 2M erhalten. Dieses zeigte zwar Bindung von Colchicin an Tubulin, jedoch konnte dies für die synthetischen Tubulinbinder D-24203 und **165** nicht reproduziert werden. Ob es sich im Falle des Colchicins um eine unspezifische Wechselwirkung handelt, oder ob kleine Modifikationen in der noch intakten Bindungstasche im partiell gefalteten Zustand eine Bindung von D-24203 und **165** verhindern, ist im Rahmen dieses Projektes nicht weiter untersucht worden. Dies kann Gegenstand zukünftiger Untersuchungen sein.

5.6 Zusammenfassung Teilprojekt Zentaris AG

Es wurde erfolgreich eine Screening-Hierarchie zu Auffindung und Charakterisierung von potentiellen Tubulin-Bindern neu aufgebaut bzw. bestehende Elemente eingepaßt. Die benötigten biologischen Testsysteme wurden mit bekannten Tubulin-Bindern validiert. Die für Design, Synthese und biologische Testung nicht vorhandenen Methoden wurden etabliert bzw. zugänglich gemacht. Die eingesetzten NMR-Methoden zur Charakterisierung von Ligand-Protein-Wechselwirkungen konnten z.T. aus dem Vorläuferprojekt übernommen und weiter verfeinert werden. Zur NMR-Messung von schwerlöslichen Substanzen wurde Entwicklungsarbeit geleistet. Große Aufmerksamkeit wurde der Modellierung der Zielstrukturen gewidmet.

Es hat sich bestätigt, dass es möglich ist, neue niedermolekulare Tubulineffektoren ausgehend von heterocyclischen Leitstrukturen zu synthetisieren. Die im Projekt eingesetzten Leitstrukturen stammten aus der Forschung des Zuwendungsempfängers. In einigen Fällen ist es gelungen, die biologische Aktivität oder die physikochemischen Eigenschaften von Verbindungen, durch gezielte Synthese von Substanzbibliotheken im Vergleich zur Ausgangslage zu optimieren.

Sehr erfolgreich verlief die Optimierung der Leitstruktur D-24203. Im einzelnen wurden folgende Ergebnisse erzielt:

- Virtuelles Design einer Verbindungsbibliothek zur Verbesserung der biophysikalischen Eigenschaften.
- Optimierung der synthetische Methode für die Parallelsynthese von Ketopiperaziden auf Basis der Synthese von D-24203 mittels Bohdan Miniblock™ System.
- Synthese, analytische Bewertung und Aufreinigung der geplanten Bibliothek und Bereitstellung von ca. 200 neuen Testverbindungen.
- Erhebung von zum Teil interessanten biologischen und physikochemischen Eigenschaften zu ausgewählten Verbindungen.

Erfolgreich verlief auch die Synthese von Indazolderivaten als strukturelle Weiterentwicklung der Leitstruktur D-24241. Allerdings enttäuschte die bereitgestellte Modellverbindung **117** hinsichtlich ihrer biologischen Wirkung. Auf die Synthese einer entsprechenden Substanzbibliothek wurde daher verzichtet. Ein interessantes Derivat wurde mit **124** erhalten. Dieses Indazol-3-carbonsäureamid zeigte beachtliche zytotoxische Aktivität. Eine kleine Substanzbibliothek auf Basis **124** wurde geplant und realisiert, leider konnte die biologische Wirkung mit anderen Derivaten nicht bestätigt werden.

Die Synthese einer Bibliothek von Benzylindazolharnstoffen um die potentielle Leitstruktur **155** konnte nicht erfolgreich abgeschlossen werden. Zwar gelang die Ausarbeitung einer Reaktionsfolge und die Bereitstellung von Modellverbindungen, die Übertragung an die feste Phase war aber mit unerwarteten Schwierigkeiten verbunden. Die Abspaltung vom Harz konnte trotz verschiedener Varianten nicht etabliert werden.

Ausgehend von der Leitstruktur **1** konnte zwar eine Synthesestrategie ausgearbeitet werden, diese aber aufgrund der schlechten Ausbeute der letzten Stufe nicht für den Aufbau der gewünschten Verbindungsbibliothek umgesetzt werden. Eine Optimierung dieser Stufe gelang nicht.

Die Methode der Parallelsynthese mittels Semiautomaten ist zur Optimierung von Leitstrukturen geeignet. Allerdings sind einige Voraussetzungen zu beachten:

- Die Reaktionsbedingungen wie Temperatur, Lösungsmittel oder Hilfsbase müssen sich verallgemeinern lassen.
- Eine ausreichende Anzahl Edukte muß in der benötigten Reinheit und Menge vorliegen.
- Das Lösungsverhalten der Edukte muß im gewählten Lösemittel halbwegs vergleichbar sein.
- Nur eine Stufe der Reaktionssequenz sollte automatisiert werden.
- Die Optimierung der Reaktionsstufe muß sehr sorgfältig erfolgen.

Es hat sich gezeigt, dass geplante Bibliotheken eine bestimmte Mindestanzahl an Verbindungen umfassen müssen, um den Aufwand zu rechtfertigen. Im Zuge der Umsetzung können aus verschiedenen Gründen zahlreiche Vertreter nicht realisiert werden, so dass die Diversität leidet und ggf. eine zu kleine Bibliothek keine sinnvolle Aussage mehr zuläßt. Es ist davon auszugehen, dass etwa ein Drittel der geplanten Substanzen nicht in der nötigen Qualität erhalten werden können.

Die im Projekt durchgeführten NMR-Arbeiten ergaben eine Reihe von Ergebnissen. Die Sättigungs-Transfer-NMR-Methode konnte auf die Untersuchung von Tubulin-Protein und die Wechselwirkung mit niedermolekularen Tubulin-Binder angewendet werden. Nach Überprüfung der Methode mit bekannten Tubulin-Bindern konnte für ausgewählte Substanzen aus dem Projekt eine direkte Bindung an das Tubulin nachgewiesen werden. Da kein markiertes Tubulin zur Verfügung stand, konnte keine Beobachtung des genauen Bindungsortes vorgenommen werden. Um dennoch Aussagen über die mögliche Bindungsstelle zu erhalten, wurden Verdrängungsexperimente mit Colchicin durchgeführt. Bei einigen Substanzen konnte eine Verdrängung nachgewiesen werden, für die 1,3-Dihydroxyacridinderivate nicht.

Um die Bindung der niedermolekularen Verbindungen mit dem Tubulin besser untersuchen zu können, wäre z.B. ^{15}N -markiertes Tubulin wünschenswert. Alle bisherigen Experimente zur Expression von recombinantem β -Tubulin und einer Überführung in den aktiven Zustand gelangen nicht. Zur Lösung des Problems wurden im Rahmen des Projekts verschiedene Alternativen vorgeschlagen und geprüft. Dabei konnte als Modellprotein markiertes Amöben $\beta 1$ -Tubulin in Lösung erhalten werden. Mit Colchicin als Referenz nicht aber mit den synthetischen Molekülen konnte Bindung gezeigt werden. Die Arbeiten konnten leider aus Zeitgründen im Rahmen des Projekts nicht fortgeführt werden.

Auch wenn bis Projektende keine neue Verbindung mit dem Potential für eine weitere präklinische Entwicklung als neues Krebsmedikament aufgefunden werden konnte, sind die Ergebnisse insgesamt als positiv zu bewerten.

6. Darstellung Teilprojekt AWD GmbH

6.1 Aufgabenstellung und Zielsetzung

Ziel des Teilprojektes ist es, in einer strategischen Allianz zwischen der ASTA Medica AG, den Kooperationspartnern der Universitäten Erlangen, Würzburg und der MPG Halle/Saale neuartige und spezifische, das Immunsystem beeinflussende Modulatoren geringer Molekülmasse durch geeignete Selektion aus Substanzbibliotheken zu erschliessen und durch ein struktur- und funktionsbiologisches Screeningnetzwerk zu charakterisieren. Potentielle Leitstrukturen sollen unter Verwendung isotonenmarkierter Rezeptoren NMR-spektroskopisch auf Komplexbildung untersucht und in ihrer Affinität optimiert werden. Liganden, die als Cytokin-Freisetzungs- bzw. Synthesehemmer, als Interleukin-4/5-Rezeptor-Antagonisten, bzw. Immunophilinhibitoren wirken, werden für die Verwendung als Antiallergikum oder Antiasthmatikum geprüft.

Aus der Zielsetzung leitet sich folgendes Arbeitsprogramm ab:

- Festlegung einer Screening-Hierarchie, die für IL-4-Rezeptor-Antagonisten und Immunophilin-Liganden jeweils zu einem Antiallergikum oder Antiasthmatikum führt,
- Bereitstellung von isotonenmarkierten Rezeptoren (Cyp, IL-4R) für NMR-spektroskopische Untersuchungen,
- Bereitstellung ausgewählter Substanzen,
- NMR-Untersuchungen zur Komplexbildung zwischen ¹⁵N-Cyp und ausgewählten Substanzen,
- Entwicklung eines IL-4-Rezeptor-Pharmakophormodells anhand der Röntgenstrukturdaten,
- Dockingexperimente von ausgewählten Substanzen am IL-4-Rezeptor-Modell,
- Screening ausgewählter Substanzen im IL-4R-Assay,
- vertiefte biologische Charakterisierung der potentiellen Immunmodulatoren *in vitro* und *in vivo* , Optimierung potentieller Leitstrukturen.

Ziel und Aufgabenstellung der Arzneimittelwerk Dresden GmbH

Die Arzneimittelwerk Dresden GmbH stellt einen Wissenschaftler für die biologische Koordination des Teilprojektes zu den Interleukinrezeptoren zur Verfügung. Für die Projektlaufzeit ist eine enge Zusammenarbeit und ein häufiger wissenschaftlicher Informationsaustausch zwischen den Abteilungen der ASTA Medica AG, dem AWD und den Kooperationspartnern vorgesehen. Das Arzneimittelwerk Dresden überprüft für immunmodulatorisch wirksame Substanzen mit Hilfe der etablierten *in vitro*-Modelle die Spezifität, Cytotoxizität und anhand der etablierten Tiermodelle die anti-asthmatische *in-vivo*-Aktivität auf dem Indikationsgebiet Atemwege / Allergie. Hochaffine Liganden, die in den Projektteilen der Kooperationspartner identifiziert werden, sollen in Untersuchungen zur Spezifität und metabolischen Stabilität bei der AWD GmbH untersucht und nötigenfall chemisch modifiziert werden.

In vivo-aktive, den Signaltransduktionsweg modulierende Wirkstoffe werden außerhalb des BMBF-Projektes vom Industriepartner präklinisch und ggf. klinisch entwickelt werden.

6.2 Arbeiten bei der AWD GmbH

6.2.1 Synthese und Bereitstellung von Substanzen

Von der Chemischen Forschung wurden für die *in vitro*- und *in vivo* Testung auf anti-inflammatorische Wirkung die folgenden Syntheseprogramme realisiert:

- AWD 43-787 und deren Diastereomere, potentielle Metabolite, Fragmente als pharmakologisch wertvolle Substrukturen sowie Derivate von AWD 43-787 mit verbesserten metabolischen Eigenschaften.

Die Leitstruktur AWD 43-787 ist ein Tripeptid-Derivat mit 3 optisch aktiven Zentren, für das interessante immunmodulierende Eigenschaften gefunden wurden. Durch ein umfassendes Programm stereoselektiver Synthesen konnten alle theoretisch möglichen Diastereomeren der Stammsubstanz in isolierter Form synthetisiert und für das Screening bereitgestellt werden. Dadurch war die Gewinnung von Daten zur Abhängigkeit der biologischen Wirkungen von der absoluten Konfiguration der Substanz möglich.

Im Verlauf der breiten pharmakologischen Charakterisierung von AWD 43-787 wurde festgestellt, dass die Substanz im Organismus extrem schnell abgebaut wird. Der durch eine Esterspaltung entstehende Primärmetabolit wurde identifiziert und durch gezielte Synthese als Vergleichssubstanz bereitgestellt.

Es wurden verschiedene analoge Derivate mit dem Ziel hergestellt, die metabolische Stabilität zu verbessern. Dabei stand vor allem der Neopentyl-Ester AWD 69484 im Mittelpunkt.

Auf der Basis der in Untersuchungen zum Metabolismus gewonnenen Informationen zum Abbau der Verbindungen wurden Synthesearbeiten zu Strukturfragmenten von AWD 43-787 durchgeführt, die ebenfalls in das Screening eingeflossen sind.

Für *in vivo*-Untersuchungen nach topischer Applikation wurde eine mikronisierte Charge von AWD 43-787 hergestellt.

- Umfangreiche Arbeiten zur Synthese von Referenzsubstanzen und weiterer immunmodulatorischer Substanzen. Aus einer Vielzahl von Derivaten wurde die Verbindung als diejenige mit einem interessanten Wirkprofil ausgewählt und vertieft untersucht. Für A5600 wurde ein optimiertes Herstellungsverfahren entwickelt, wodurch ein Substanzbedarf bis in den 100 Gramm Maßstab gedeckt werden konnte. Die Sicherung des Bedarfs an Cyclosporin-A (CsA) wurde für alle Partner gewährleistet.

6.2.2 Pharmakologische Charakterisierung von AWD 43-787, Diastereomere, Metabolite, Fragmente und Neopentylester

6.2.2.1 *in vitro* Untersuchungen

Im Berichtszeitraum stand die vertiefte Prüfung der mikronisierten Form von AWD 43-787, ihrer Diastereomere, möglicher Metabolite, Fragmente sowie des Neopentylesters im Mittelpunkt der Arbeiten.

Neben anderen Mediatoren besitzen der Tumornekrosefaktor α (TNF α), ein pro-inflammatorisches Cytokin, und der Granulozyten/Makrophagen-kolonie-stimulierende Faktor (GM-CSF) eine Schlüsselrolle bei der Aktivierung und Proliferation inflammatorischer Zellen. Eine Hemmung der Cytokin-Freisetzung ist somit ein Weg zum Nachweis des anti-inflammatorischen Potentials von Substanzen. In vorangegangenen Untersuchungen konnte die gute Eignung der nachstehend aufgeführten Modelle für die vergleichenden *in vitro*-Charakterisierungen gezeigt werden.

LPS-induzierte TNF α -Freisetzung im 1:5 verdünnten Humanblut

Für die Untersuchung der TNF α -Freisetzung wurde Blut von verschiedenen Spendern gewonnen (Gerinnungshemmung mittels Zitrat) und mit Zellkulturmedium RPMI 1640 1:5 verdünnt. Die Testsubstanzen wurden den Proben in einer Konzentration von 20 bzw. 60 $\mu\text{mol/l}$ vor der LPS-Challenge zugegeben. Die Stimulation der Leukozyten erfolgte 30 min später mit Lipopolysaccharid (LPS) von *Salmonella abortus equi* in einer Endkonzentration von 10 $\mu\text{g/ml}$. Anschließend wurden die Testansätze für 24 Stunden bei 37 °C und 5 % CO₂ im Brutschrank inkubiert. Im Anschluß an den Versuch wird das verdünnte Blut zentrifugiert und im zellfreien Überstand die TNF α -Konzentration mittels ELISA gemessen.

TNF α - und GM-CSF - Freisetzung aus Zellen von nasalen Polypen

Das Ausgangsmaterial bilden nasale Polypen (OP-Material) von Patienten der HNO-Klinik der Universitätskliniken Dresden. Das Gewebe wird mit Protease, Collagenase, Hyaluronidase und DNase aufgeschlossen und die Zellen in Nährlösung suspendiert. In dieser Zellsuspension sind bereits aktivierte Epithelzellen, Makrophagen, neutrophile und eosinophile Granulozyten, Mastzellen sowie Lymphozyten enthalten. Um eine „allergisch“-vermittelte Zytokinfreisetzung auslösen zu können, werden die Zellen passiv mit humanen IgE sensibilisiert und die Zellsuspension auf eine Konzentration von 2 Mio Zellen/ml eingestellt. Die Zellen werden mit der Prüfsubstanz (3, 10 bzw. 30 $\mu\text{mol/l}$) 30 min vorinkubiert und anschließend durch Zugabe von Anti-IgE stimuliert. 18 - 24 Stunden nach der Challenge wird der Überstand zellfrei abzentrifugiert. Die Bestimmung von TNF α und GM-CSF erfolgt mittels ELISA-Technik.

Substanzen	TNF α -Freisetzung Humanblut	TNF α -Freisetzung Nasenpolyp	GM-CSF-Freisetzung Nasenpolyp
AWD 43-787 (mikronisiert) S-S-S	6	10 μ mol: 45 %	10 μ mol: 50 %
AWD 49900 (ungeschützte Substanz)	20 μ mol: 34 %	30 μ mol: 26 %	30 μ mol: 27 %
AWD 63442 (Metabolit), mikronis.	20 μ mol: 5 %	30 μ mol: 39 %	30 μ mol: 27 %
AWD 69484 (Neopentylester)	20 μ mol: 45 %	-	-
Diastereomere:			
AWD 51369 (S-S-R)	20 μ mol: 26 % 10 μ mol: 3 %	10 μ mol: 0 %	- 10 μ mol: 7 %
AWD 48302 (S-R-S)	20 μ mol: 43 % 10 μ mol: 17 %	10 μ mol: 18 %	10 μ mol: 22 %
AWD 51372 (S-R-R)	20 μ mol: 39 % 10 μ mol: 18 %	10 μ mol: 0 %	10 μ mol: 9 %
AWD 48363 (R-S-S)	20 μ mol: 88 % 10 μ mol: 58 %	10 μ mol: 95 %	10 μ mol: 74 %
AWD 51370 (R-S-R)	20 μ mol: 51 % 10 μ mol: 20 %	10 μ mol: 0 %	10 μ mol: 9 %
AWD 48356 (R-R-S)	20 μ mol: 75 % 10 μ mol: 34 %	10 μ mol: 39 %	10 μ mol: 31 %
AWD 51471 (R-R-R)	-	10 μ mol: 6 %	10 μ mol: 13 %
Fragmente:			
AWD 62436	20 μ mol: 17 %	10 μ mol: 28 %	10 μ mol: 30 %
AWD 62451	20 μ mol: 26 %	3 μ mol: 47 %	3 μ mol: 48 %
AWD 62528	20 μ mol: 18 %	10 μ mol: 35 %	10 μ mol: 37 %
AWD 62546	20 μ mol: 32 %	30 μ mol: 35 %	30 μ mol: 47 %
AWD 43603	20 μ mol: 20 %	-	-
AWD 63474	20 μ mol: 48 %	30 μ mol: 36 %	30 μ mol: 37 %
AWD 12-011	20 μ mol: 17 %	30 μ mol: 39 %	30 μ mol: 34 %
Cyclosporin A	20 μ mol: 21 % 10 μ mol: 5 %	10 μ mol: 22 %	10 μ mol: 18 %

Tab. 14 Hemmung der Cytokinfreisetzung im verdünnten Humanblut und in humanen Nasenpolypzellen

Die mikronisierte Substanz AWD 43-787 hemmte sowohl die LPS-induzierte TNF α -Freisetzung (IC₅₀: 6 μ mol/l) als auch die TNF α - und GM-CSF-Freisetzung (10 μ mol/l: 45 % bzw. 50 %) aus humanen, nasalen Polypen nach allergischer Stimulation konzentrationsabhängig und im Vergleich zu Cyclosporin (CsA) in stärkerem Maße.

Im Gegensatz dazu war die mikronisierte Form des möglichen Metaboliten AWD 63442 nahezu wirkungslos.

Für die Diastereomere AWD 48363 (R-S-S), AWD 48356 (R-R-S), AWD 51370 (R-S-R) und das Fragment AWD 63474 konnte in den Untersuchungen eine konzentrationsabhängige Hemmung der LPS-induzierten TNF α - Freisetzung im verdünnten Humanblut nachgewiesen werden. Dabei zeigten AWD 48363 und AWD 48356 eine etwa mit AWD 43-787 (mikronisierte Substanz: 84 % Hemmung bei 20 μ mol/l) vergleichbare Wirkung.

Das Fragment AWD 63474 sowie der Neopentylester AWD 69484 hemmten die LPS-induzierte TNF α -Freisetzung um 48 % bzw. 45 %. Die weiteren untersuchten sowie vertieft geprüften Fragmente AWD 43603 und AWD 12-011 waren deutlich schwächer wirksam als die Muttersubstanz.

In Übereinstimmung mit den Untersuchungen im Humanblut fallen die Verbindungen AWD 43-787 sowie AWD 48363 und AWD 48356 (Diastereomere) und die Fragmente AWD 12-011 und AWD 62546 (GM-CSF) durch eine vergleichsweise hohe Hemmung der Cytokinfreisetzung (TNF α und GM-CSF) auf. Die weiteren untersuchten Fragmente und der Metabolit von AWD 43-787 waren deutlich schwächer wirksam als die Muttersubstanz.

Insgesamt ist die Hemmwirkung der Substanzen im Vollblut in der vergleichbaren Konzentration von 10 μ mol/l etwas stärker als bei den Zellen der nasalen Polypen. Diese Beobachtung ist möglicherweise mit der deutlich höheren metabolischen Aktivität der Polypzellen (besonders der Epithelzellen) zu erklären.

AWD 43-787 hatte keinen Einfluß auf die Interleukin (IL)-2, IL-4 bzw. IL-5-Freisetzung. Die Hemmung der Histamin-Freisetzung aus peritonealen Mastzellen der Ratte durch AWD 43-787 (IC₅₀: 1 μ mol/l) war etwa mit der von Cyclosporin A (IC₅₀: 2,1 μ mol/l) vergleichbar.

6.2.2.2. in vivo Untersuchungen

a) Spätphasen-Eosinophilie

Spätphasen-Eosinophilie am Meerschweinchen

Eine Lungen-Eosinophilie kann bei aktiv sensibilisierten Meerschweinchen leicht induziert werden, wenn sie einem Allergen-Aerosol ausgesetzt werden. In der Spätphase der allergischen Reaktion, 24 Stunden nach der Allergen-Challenge, entwickelt sich eine massive Eosinophilie in der Lunge. Um die Zahl der eingewanderten Eosinophilen messen zu können, wird in Narkose eine broncho-alveoläre Lavage (BAL) durchgeführt. Die Gesamtzellzahl und Anzahl der eosinophilen Granulozyten wird in der Lavageflüssigkeit mittels automatischem Zellzählgerät bestimmt.

Spätphasen-Eosinophilie an der Brown Norway Ratte

Die Brown Norway Ratten werden durch mehrfache s.c. Injektionen einer Suspension aus Ovalbumin (OVA) und Al(OH)₃ und i.p. Injektion von *Bordetella pertussis* vaccine aktiv sensibilisiert. Nach 21 Tagen können die Tiere für die Versuche verwendet werden. Die Inhalation eines Aerosol aus Ovalbuminlösung in Kopf-Nasen-Exposition über 1 Stunde führt zu einer massiven Einwanderung der eosinophilen Granulozyten in die Lunge. Das Maximum der Eosinophilie wird etwa 48 Stunden nach Allergen-Kontakt erreicht. Um die Zahl der eingewanderten Eosinophilen messen zu können, wird in Narkose eine bronchoalveoläre Lavage (Spülung der Lunge) durchgeführt und die Eosinophilen in der Spülflüssigkeit gezählt. Die prozentuale Hemmung der Eosinophilie durch Testsubstanzen wird bestimmt, indem die Anzahl der Eosinophilen der mit Testsubstanz behandelten Tiergruppe mit denen von unbehandelten aber mit Allergen gechallengekten Kontrolltieren (Challenge-Kontrollgruppe) verglichen werden.

Substanzen	Meerschweinchen <i>intraperitoneale Applikation</i>	Brown Norway Ratte <i>intraperitoneale Applikation</i>	Brown Norway Ratte <i>orale Applikation</i>
AWD 43-787 (mikronisiert) (S-S-S)	10 mg/kg: 59 %	10 mg/kg: 24 % 30 mg/kg: 44 %	- -
AWD 49900 (ungeschützte Substanz)	10 mg/kg: 46 %	10 mg/kg: 44 % 30 mg/kg: 51 %	- -
AWD 63442 (Metabolit), mikronis.	10 mg/kg: 64 %	10 mg/kg: 13 % 30 mg/kg: 20 % 60 mg/kg: 44 %	- 30 mg/kg: 29 % -
AWD 69484 (Neopentylester)	-	10 mg/kg: 8 % 30 mg/kg: 57 % -	- 30 mg/kg: 30 % 60 mg/kg: 24 %
<i>Diastereomere:</i>			
AWD 51369 (S-S-R)	10 mg/kg: 0 %	30 mg/kg: 31 %	-
AWD 48302 (S-R-S)	10 mg/kg: 0 %	-	-
AWD 51372 (S-R-R)	10 mg/kg: 0 %	-	-
AWD 48363 (R-S-S)	10 mg/kg: 10 %	-	-
AWD 51370 (R-S-R)	10 mg/kg: 26 %	-	-
AWD 48356 (R-R-S)	10 mg/kg: 26 %	10 mg/kg: 31 % 30 mg/kg: 21 %	- -
AWD 51471 (R-R-R)	10 mg/kg: 68 %	30 mg/kg: 5 % 60 mg/kg: 15 %	- -
<i>Fragmente:</i>			
AWD 62528	10 mg/kg: 24 %	1 mg/kg: 24 % 10 mg/kg: 75 % 30 mg/kg: 74 %	- - 30 mg/kg: 46 %
AWD 12-011	10 mg/kg: 24 %	1 mg/kg: 16 % 10 mg/kg: 61 % 30 mg/kg: 68 %	- 10 mg/kg: 26 % -
<i>Indolincarbonsäure-Deriv.</i>			
AWD 80787 (R-Form)	-	30 mg/kg: 25 %	-
AWD 80791	-	30 mg/kg: 32 %	-
Cyclosporin A	5 mg/kg: 74 % -	1 mg/kg: 63 % - -	1 mg/kg: 37 % 5 mg/kg: 51 % 10 mg/kg: 83 %

Tab. 15 Hemmung der Spätphasen-Eosinophilie in der BAL von Meerschweinchen und Brown Norway Ratten 24 h bzw. 48 h nach Challenge

Die Testsubstanzen wurden in der Dosierung 30 mg/kg als Verreibung in 10 % PEG300 und 0,5 %iger Tylose prophylaktisch 2 Stunden vor der OVA-Challenge intraperitoneal appliziert. Die Wirkungsprüfung der mikronisierten Chargen von AWD 43-787 und AWD 63442 wurde in den Dosen 10 und 30 mg/kg i.p. (-2h) durchgeführt.

AWD 43-787 unterdrückte die Spätphasen-Eosinophilie der Ratte um 24 % bzw. 44 %. Untersuchungen bei Meerschweinchen (nicht mikronisierte Substanz) wiesen eine vergleichbar starke Hemmung der Spätphasen-Eosinophilie (59 %) auf. AWD 63442, der 1. Metabolit von AWD 43-787, war nach oraler und intraperitonealer Gabe an der Spätphasen-Eosinophilie der Ratte in Dosen bis 30 mg/kg (29 % bzw. 20 %) nur schwach wirksam. In der Dosierung von 60 mg/kg i.p. verstärkt sich der inhibitorische Effekt (44 %). Beide mikronisierten Substanzen entsprachen in ihrer Wirkung der von nicht mikronisierter Substanz (Untersuchungen am Meerschweinchen). Die Verbindung AWD 49900 (AWD 43-787 ohne Schutzgruppen) zeigte eine mit AWD 43-787 vergleichbare Hemmung der Eosinophilie an der Brown Norway Ratte (44 % bzw. 51 %). Der Neopentylester AWD 69484 hemmt bei 30 mg/kg i.p. die Eosinophilie um 57 %. Nach oraler Gabe ist AWD 69484 in den Dosen 30 und 60 mg/kg nur schwach wirksam. In Übereinstimmung mit den Untersuchungen an der Spätphasen-Eosinophilie des Meerschweinchens konnte gezeigt werden, dass die Fragmente AWD 12-011 (5-Hydroxyindol-2-carbonsäure) und AWD 62528 (Indol-2-carbonsäure) eine mittel-starke (oral 26 % bzw. 46 %) bis starke (75 % bzw. 61 % i.p.) Hemmung der Eosinophilie in Brown Norway Ratten bewirken. Die weiteren untersuchten Fragmente und die geprüften Diastereomere von AWD 43-787 waren deutlich schwächer wirksam als die Muttersubstanz. Im Gegensatz dazu zeigten das BOC-geschützte Indolincarbonsäure-Derivat AWD 80787 und die N-BOC-2-Octahydro-Indolcarbonsäure D-80791 in der Dosis 30 mg/kg i.p. nur eine schwache Hemmung der Eosinophilie (25 % bzw. 32 %). Cyclosporin A wurde im Dosisbereich von 1 bis 10 mg/kg p.o. sowie bei 5 mg/kg i.p. geprüft. Die Hemmung der Eosinophilie war dosisabhängig. Bei 10 mg/kg p.o. wird eine Hemmung von maximal 83 % erreicht. In ersten Untersuchungen konnte gezeigt werden, daß AWD 43-787 und sein 1. Metabolit AWD 63442 an der Spätphasen-Eosinophilie der BN Ratte bei intrapulmonaler Gabe in Dosen ab 0,01 bis 0,1 mg/kg wirksam sind. Die Wirkstärke dieser Substanzen liegt im Bereich von Dexamethason.

b) Bronchiale Hyperreaktivität an sensibilisierten BP-2 Mäusen

Ein wesentliches Merkmal des Asthma bronchiale ist die bronchiale Hyperreaktivität (BHR), d.h. die Überempfindlichkeit der Bronchialschleimhaut gegenüber äußeren Reizen. In unserer Abteilung wurde ein Tiermodell etabliert, in dem sowohl die BHR gegenüber spasmogenen Mediatoren (Methacholin) als auch die Einwanderung von Entzündungszellen in die Atemwege nach Allergenkontakt charakterisiert werden kann. BP-2 Mäuse werden aktiv gegen Ovalbumin sensibilisiert. Dieser Stamm bildet einen hohen IgE-Titer gegen das Allergen und reagiert nach Allergenkontakt mit einer Eosinophilie der Lungen. Nach der Sensibilisierung der Tiere werden diese an 2 aufeinanderfolgenden Tagen durch intranasale Instillation von Ovalbuminlösung provoziert. Parallel zu dieser Prozedur erhalten die Tiere die Prüfsubstanz. Am Tag nach Abschluß der Behandlung werden die Tiere narkotisiert und an eine Apparatur zur Bestimmung der Lungenfunktionsparameter angeschlossen. Durch steigende Dosen von Methacholin (5-160 µg/kg i.v.) werden Bronchokonstriktionen ausgelöst. Als Parameter für die Beurteilung der Hyperreaktivität werden die Methacholindosen berechnet, die zu einem Anstieg des Atemwegswiderstandes (Resistance, Bronchokonstriktion) um 90, 150 und 200 % (sogenannte PD₉₀, PD₁₅₀ und PD₂₀₀-Werte) führen. Bei schein-sensibilisierten Tieren benötigt man deutlich höhere Methacholindosen, um den entsprechenden Anstieg des Atemwegswiderstandes auszulösen als bei sensibilisierten Tieren. In der Lavageflüssigkeit der Lungen (BAL) findet man bei sensibilisierten Tieren sehr viele Zellen (Gesamtzellzahl), von denen ein hoher Prozentsatz eosinophile Granulozyten sind.

Behandlung	Methacholin-	Reagibilität	Gesamtzellzahl [n*1000]	Eosinophile Granulozyten [%]
	PD ₉₀ [µg/kg i.v.]	PD ₁₅₀ [µg/kg i.v.]		
naive Kontrollen	15,3 ± 3,3*	25,7 ± 5,5*	601 ± 102*	4,9 ± 4,4*
sensibilisierte Kontrollen	8,5 ± 2,4	16,3 ± 3,2	1592 ± 408	53 ± 11
AWD 43-787 30 mg/kg i.p.	10,9 ± 4,2	19,6 ± 4,9*	760 ± 173	33 ± 12
AWD 69484 30 mg/kg i.p.	8,8 ± 3,5	15,7 ± 4,2	730 ± 261*	31 ± 10*
30 mg/kg p.o.	7,6 ± 1,3	14,5 ± 2,8	2533 ± 771*	36 ± 21*
AWD 63442 30 mg/kg p.o.	9,4 ± 3,2	15,0 ± 4,6	1900 ± 1053	32 ± 17*

Tab. 16: Beeinflussung der bronchialen Hyperreaktivität, der Gesamtzellzahl und des Anteils eosinophiler Granulozyten in der bronchioalveolären Lavageflüssigkeit (BAL) von aktiv sensibilisierten BP-2 Mäusen durch verschiedene Immunmodulatoren. (5malige Applikation), *p < 0,05 gegenüber sensibilisierter Kontrollgruppe

AWD 43-787 hatte an diesem Modell nach intraperitonealer Applikation von 30 mg/kg nur eine schwache Wirkung auf die BHR, verminderte jedoch deutlich die Gesamtzellzahl und die Anzahl der Eosinophilen in der BAL (43 % Hemmung).

AWD 63442, der 1. Metabolit von *AWD 43-787*, hatte nach oraler Applikation von 30 mg/kg keine Wirkung auf die BHR, verminderte jedoch die Anzahl der Eosinophilen in der BAL (39 % Hemmung) bei einem leichten Anstieg der Gesamtzellzahl.

AWD 69484, der Neopentylester von *AWD 43-787*, hatte weder nach intraperitonealer noch nach oraler Applikation von jeweils 30 mg/kg einen Einfluss auf die BHR. In der BAL der Tiere, die 30 mg/kg p.o. *D-69484* erhielten, stieg die Gesamtzellzahl deutlich an (signifikant) und der Anteil der Eosinophilen wurde um 32 % vermindert, die absolute Anzahl der Eosinophilen in der BAL blieb somit unverändert.

c) Lipopolysaccharid (LPS)-induzierte Neutrophilie am Frettchen

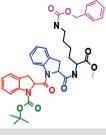
Neutrophile Granulozyten sind ein Prototyp von Entzündungszellen, die in den Luftwegen von Patienten mit COPD (Chronisch obstruktive Lungenerkrankung) vermehrt gefunden werden. Sie spielen bei der Pathogenese dieser Erkrankung eine wesentliche Rolle. So führt

z.B. beim Raucher der gewohnheitsgemäße Zigarettenkonsum zur ständigen Entzündung der Atemwege. Diese Entzündung geht mit einem Anstieg der neutrophilen Granulozyten im Lungengewebe und im Broncho-Alveolarraum der Lungen einher. Das Fortschreiten und der Schweregrad der Erkrankung kann ermittelt werden, indem zu Diagnosezwecken die Lunge gespült und die Anzahl der Entzündungszellen in der Spülflüssigkeit gezählt werden.

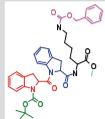
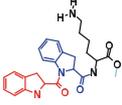
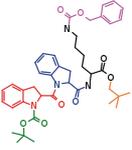
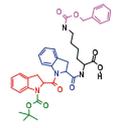
Nach Narkosegabe und Intubation der Trachea werden die Frettchen in einer Vernebelungsbox für 10 min einem Aerosol aus Lipopolysaccharid *E. coli* (Verneblerkonzentration 100 µg/ml) ausgesetzt. Vernebeltes LPS löst sofort eine Entzündung der Atemwege aus, so dass sich eine massive Neutrophilie in der Lunge der Versuchstiere entwickelt. Die Neutrophilie erreicht ihr Maximum 6 Stunden nach der Vernebelung. Um die Anzahl der eingewanderten neutrophilen Granulozyten messen zu können, wird in Narkose eine bronchoalveoläre Lavage (Spülung der Lunge) durchgeführt und die neutrophilen Granulozyten in der Spülflüssigkeit gezählt. Sowohl die Tiere der mit Substanz behandelten Gruppe als auch die Tiere der mit Vehikel behandelten Kontrollgruppe werden einem LPS-Aerosol ausgesetzt. Tiere einer 2. Kontrollgruppe erhalten Vehikel und werden mit einem Aerosol aus physiologischer Kochsalzlösung behandelt. Die prozentuale Hemmung der Neutrophilie durch Testsubstanzen wird bestimmt, indem die Anzahl der neutrophilen Granulozyten der mit Testsubstanz behandelten Tiergruppe mit denen von Vehikel behandelten Kontrolltieren verglichen werden.

AWD 43-787 wurde prophylaktisch 2 h vor und therapeutisch 1 h vor der LPS-Challenge verabreicht. In der Dosierung 2 x 10 mg/kg i.p. unterdrückte AWD 43-787 die LPS-induzierte Neutrophilie in der Lunge um 51 %.

Die Ergebnisse aus der pharmakologischen Charakterisierung ausgewählter Verbindungen sind in nachfolgenden Tabellen zusammengefaßt:

D-43787  und Diastereomere		TNF α Freisetzung	GM-CSF- Freisetzung	TNF α Freisetzung	Asthma - Modell Spätphasen – Eosinophilie in der BAL, 24 bzw. 48 h nach Challenge	
Verbindung	Konfiguration	humane nasale Polypzellen	humane nasale Polypzellen	Humanblut 1 : 5 verdünnt	Meerschweinchen	Brown Norway Ratte
		% Hemmung bei 10 µmol/l	% Hemmung bei 10 µmol/l	% Hemmung bei 10/20 µmol/l	% Hemmung bei 10 mg/kg i.p. (-2h)	% Hemmung bei 30 mg/kg i.p. (-2h)
D-43787	S - S - S	45	50	26 / 59	59	50
D-51369	S - S - R	0	7	3 / 26	0	n.g.
D-48302	S - R - S	18	22	17 / 43	0	n.g.
D-51372	S - R - R	0	9	18 / 39	0	n.g.
D-48363	R - S - S	95	74	58 / 88	10	n.g.
D-51370	R - S - R	0	9	20 / 51	26	n.g.
D-48356	R - R - S	39	31	34 / 75	26	n.g.
D-51471	R - R - R	6	13	n.g.	68	n.g.
Cyclosporin	-	22	18	5 / 21	74 (5 mg/kg)	55 (5 mg/kg)

Tab. 17 D-43787 und Diastereomere

D-43787 		TNF α - Freisetzung	GM-CSF- Freisetzung	TNF α - Freisetzung	Asthma - Modell Spätphasen – Eosinophilie in der BAL, 24 bzw. 48 h nach Challenge	
Metabolite und Fragmente		humane nasale Polypzellen	humane nasale Polypzellen	Humanblut 1 : 5 verdünnt	Meerschweinchen	Brown Norway Ratte
Verbindung	Strukturteil	% Hemmung bei 10 μ mol/l	% Hemmung bei 10 μ mol/l	% Hemmung bei 10 / 20 μ mol/l	% Hemmung bei 10 mg/kg i.p. (-2h)	% Hemmung bei 30 mg/kg i.p. (-2h)
D-43787	Muttersubstanz	45	50	26 / 59	59	50
D-49900 	Muttersubstanz ohne Schutzgruppen	0	1	25 / 34	46	n.g.
D-69484 	S,S,S-Neo- pentylester	n.g.	n.g.	22 / 45	n.g.	57 30 mg/kg p.o. 30
D-63442 	1. Metabolit	6	20	22 / 33	64	35 30 mg/kg p.o. 29

Tab. 18: Metabolite und Fragmente zu D-43787 (I)

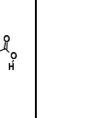
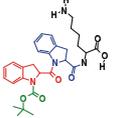
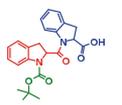
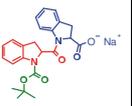
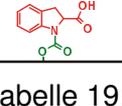
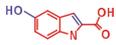
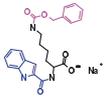
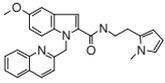
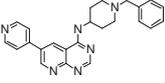
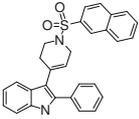
D-43787 		TNF α - Freisetzung	GM-CSF- Freisetzung	TNF α - Freisetzung	Asthma - Modell Spätphasen – Eosinophilie in der BAL, 24 bzw. 48 h nach Challenge	
Metabolite und Fragmente		humane nasale Polypzellen	humane nasale Polypzellen	Humanblut 1 : 5 verdünnt	Meerschweinchen	Brown Norway Ratte
Verbindung	Strukturteil	% Hemmung bei 10 μ mol/l	% Hemmung bei 10 μ mol/l	% Hemmung bei 10 / 20 μ mol/l	% Hemmung bei 10 mg/kg i.p. (-2h)	% Hemmung bei 30 mg/kg i.p. (-2h)
D-43603 	Fragment	n.g.	n.g.	10 / 20	n.g.	33
D-63474 	Fragment	n.g.	n.g.	35 / 48	10	n.g.
D-62451 	Fragment	0	4	18 / 26	20	n.g.
D-62436 	Fragment	0	3	12 / 17	37	69

Tabelle 19: Metabolite und Fragmente zu D-43787 (II)

D-43787		TNF α	GM-CSF-	TNF α	Asthma - Modell	
Metabolite und Fragmente		Freisetzung	Freisetzung	Freisetzung	Spätphasen – Eosinophilie in der BAL, 24 bzw. 48 h nach Challenge	
		humane nasale Polypzellen	humane nasale Polypzellen	Humanblut 1 : 5 verdünnt	Meerschweinchen	Brown Norway Ratte
Verbindung	Strukturteil	% Hemmung bei 10 μ mol/l	% Hemmung bei 10 μ mol/l	% Hemmung bei 10 / 20 μ mol/l	% Hemmung bei 10 mg/kg i.p. (-2h)	% Hemmung bei 30 mg/kg i.p. (-2h)
AWD 12-011 	Fragment	(56)	(48)	12 / 17	n.g.	68
D-62528 	Fragment	n.g.	(55)	14 / 18	0	74
D-62546 	Fragment	n.g.	(60)	11 / 32	0	n.g.

Tab. 20: Metabolite und Fragmente zu D-43787 (III)

Neue Immunmodulatoren		TNF α	GM-CSF-	TNF α	Asthma - Modell	
		Freisetzung	Freisetzung	Freisetzung	Spätphasen – Eosinophilie in der BAL, 48 h nach Challenge	
		humane nasale Polypzellen	humane nasale Polypzellen	Humanblut 1 : 5 verdünnt	Brown Norway Ratte	
Verbindung	Struktur	% Hemmung bei 10 μ mol/l	% Hemmung bei 10 μ mol/l	% Hemmung bei 10 / 20 μ mol/l	% Hemmung bei 10 mg/kg i.p. (-2h)	% Hemmung bei 30 mg/kg i.p. (-2h)
D-43397 		n.g.	n.g.	(33 / 60)	0	43
D-63173 		n.g.	n.g.	(28 / 59)	11	60
D-64362 		n.g.	n.g.	(7 / 10)	n.g.	38

Tab. 21: Neue Immunmodulatoren

6.2.3 Untersuchungen zur inhibitorischen Wirkung von D-43787 und Derivaten sowie A5600 auf die PPLase Aktivität von hCypB

Die Substanz A5600, ein Indazol-Derivat, fiel bei den durchgeführten in vivo Untersuchungen durch eine starke Hemmung der Spätphasen-Eosinophilie auf, die nicht über immunologische Prozesse vermittelt ist. Im Vergleich zu CsA war während der Sensibilisierung (Mehrfachgabe, Adjuvanz-Arthritis) keine IgE-Bildung nachweisbar. Ebenfalls konnte eine Hemmung der epidermalen Proliferation beobachtet werden. A5600 besitzt eine vergleichsweise geringe Wirkung auf die Mediator-Freisetzung in vitro. Erste Untersuchungen deuteten darauf hin, dass die Substanz die enzymatische Aktivität des

humanen CypB im Vergleich zum humanen Cyp18 selektiv hemmt. Derartige Substanzen sind bisher noch nicht beschrieben und hätten als Immunmodulatoren ein hohes therapeutisches Potential; aufgrund der erhöhten Selektivität im Vergleich zum Cyclosporin-A lässt sich möglicherweise eine bessere Verträglichkeit erreichen.

Zur näheren Charakterisierung der Selektivität von A5600 und D-43787 sowie weiterer Derivate war es daher das Ziel, ein geeignetes hCypB Protein für die Testung im PPIase Assay im Teilprojekt von Prof. Fischer (siehe Kapitel „Teilprojekt MPI Halle“) zur Verfügung zu stellen.

Klonierung und Expression von hCypB in E. coli

Für die Überexpression von hCypB wurden zwei unterschiedliche bakterielle Expressionssysteme konstruiert. Hierbei wurde die Sequenz des reifen CypB Proteins jeweils mit bzw. ohne eine 25 Aminosäuren umfassende N-terminale Signalsequenz zugrundegelegt. Die entsprechenden Ausgangsklone wurden im Teilprojekt der Uni Erlangen von Dr. Pahl hergestellt. Beide Konstrukte wurden in verschiedene E. coli-Stämme transfiziert und hinsichtlich einer Induktion der Proteinexpression des Zielproteins überprüft. Dabei konnte eine Proteinexpression des Zielproteins mit dem Expressionsplasmid, das die Signalsequenz enthielt, nicht erzielt werden. Lediglich das Konstrukt ohne Signalsequenz konnte in ausreichenden Mengen in E. coli expremiert werden. Um eine mögliche Interferenz bei späteren Aktivitätsmessungen (PPIase Assay) auszuschließen, wurde der C-terminale His6-Tag durch das gezielte Einführen eines zusätzlichen Stopcodens aus der codierenden Sequenz entfernt. Das so erhaltene CypB Protein konnte in ausreichenden Mengen in E. coli produziert werden. Hierzu wurden optimale Expressionsbedingungen sowie eine Aufreinigungsstrategie für die Zielproteine etabliert. Das expremierte CypB Protein zeigte im PPIase Assay eine mit dem humanen CypA vergleichbare enzymatische Aktivität. Für die weitere Versuchsplanung wurde daher auf dieses Konstrukt zurückgegriffen.

lane 1: MW
 lane 2: Cyp B KI1 183-His Cytosol
 lane 3: Cyp B KI5 183-Stop Cytosol
 lane 4: MW
 Cyp B KI1 183-His Ni-Reinigung
 lane 5: F1+2
 lane 6: F3
 lane 7: V1/F4

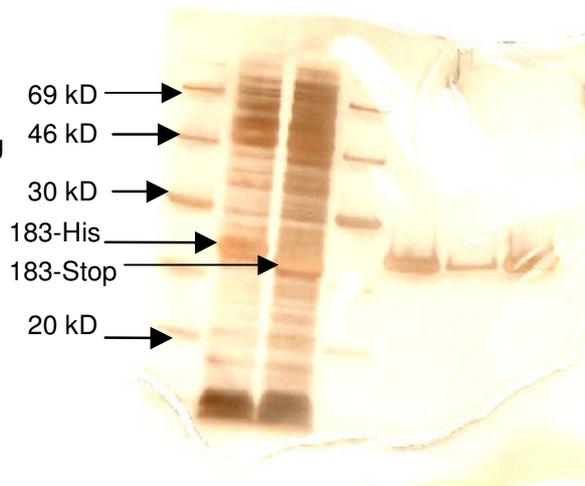


Abb. 28: Nachweis der Induktion der Expression des Zielproteins (Silberfärbung).

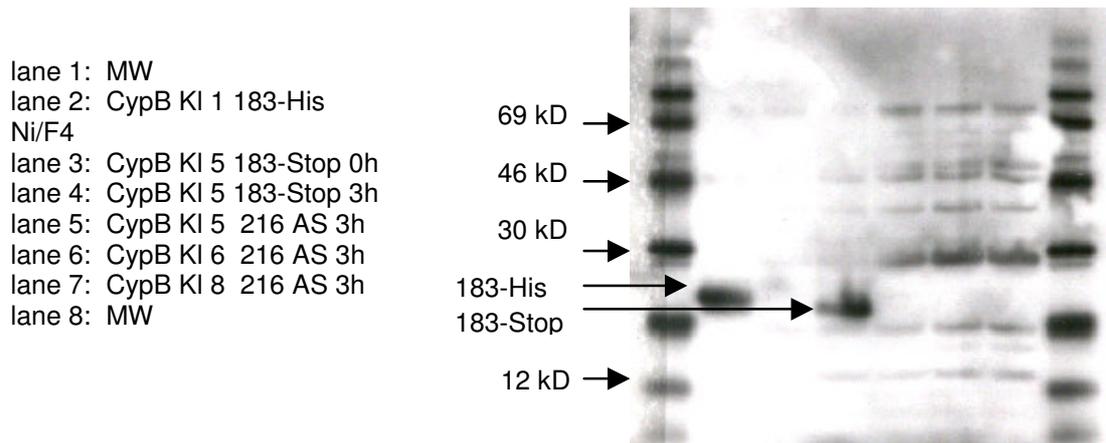


Abb. 29: Nachweis des Cyclophilin B Proteins über spezifische Antikörper mit Westernblot.

Mit den in der Arbeitsgruppe von Prof. Fischer durchgeführten Aktivitätsmessungen konnte die anfangs bestehende Vermutung, dass die enzymatische Aktivität des humanen CypB im Vergleich zum humanen Cyp18 spezifisch durch die Substanz A-05600 inhibiert wird, nicht bestätigt werden. Weitere Untersuchungen am Drosophila-Homologen des Cyclophilin B, bei dem der ER-targeting Bereich des humanen Enzyms verändert ist, zeigen ebenfalls keine Tendenz dafür, dass beide Verbindungen spezifische Inhibitoren für Cyclophilin darstellen könnten. Auch humanes FKBP12, eine PPlase aus der Familie der FK506-bindenden Proteine und ein cytosolischer Rezeptor für das immunsuppressive Peptidomakrolid FK506, wird nicht inhibiert.

6.2.4 Arbeiten zur Strukturaufklärung des IL-5 Rezeptorkomplexes

Ziel dieser Arbeiten war es, mit Hilfe zusätzlicher IL-5 Proteinvarianten die Arbeiten im Projektteil von Prof. Sebald zur Aufklärung der Röntgenstruktur des IL-5 Rezeptorkomplexes zu unterstützen. Um bei einer möglichen Lösung der Kristallstruktur des IL-5 Rezeptorkomplexes mittels MAD (*multiwavelength anomalous diffraction*) eine genügend hohe Signalstärke im Experiment zu erzielen, war es nötig, weitere Methioninreste in die Sequenz des IL-5 einzuführen.

Die Sequenz des reifen humanen IL-5 wurde in den Expressionsvektor pETblue2 (Novagen) kloniert. Hierbei wurde die Proteinsequenz des IL-5 am N-Terminus um das Sequenzmotiv MAI verlängert. Mittels PCR wurden an den geeigneten Positionen (32, 52 und 113) in der Sequenz des IL-5 Austausch der betreffenden Aminosäuren gegen Methionin erzielt. Eine genaue Übersicht ist in Abb. 30 schematisch dargestellt.

Folgende IL-5 Mutanten liegen in Form ihrer Expressionsplasmide vor und können für eine Selenomethioninmarkierung des Proteins zur Verfügung gestellt werden:

- IL-5(T7M,R32M)
- IL-5(T7M,I52M)
- IL-5(T7M,R32M,I113M)

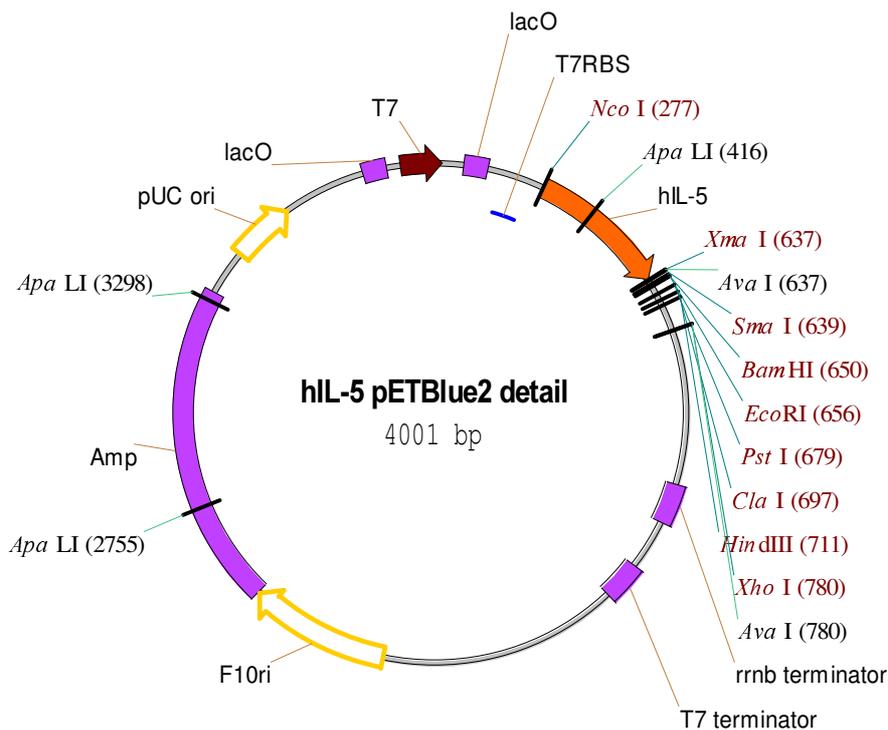


Abb. 30: Vektorkarte des Expressionsplasmides IL5pETblue2

```

                -2   1   7
+2           MetAlaIle IleProThrGlu IleProThr SerAlaLeu
                NcoI
                ~~~~~~
267  GGAGATATAC CATGGCGATC ATCCCCACAG AAATTCCCAC AAGTGCATTG
      CCTCTATATG GTACCGCTAG TAGGGGTGTC TTTAAGGGTG TTCACGTAAC

      ValLysGluThr LeuAlaLeu LeuSerThr HisArgThrLeu LeuIleAla
317  GTGAAAGAGA CCTTGGCACT GCTTTCTACT CATCGAACTC TGCTGATAGC
      CACTTTCTCT GGAACCGTGA CGAAAGATGA GTAGCTTGAG ACGACTATCG
                32
      AsnGluThr LeuArgIlePro ValProVal HisLysAsn HisGlnLeu
                                   ApaLI
                                   ~
367  CAATGAGACT CTGAGGATTC CTGTTCTGT ACATAAAAAAT CACCAACTGT
      GTTACTCTGA GACTCCTAAG GACAAGGACA TGTATTTTTA GTGTTGACA
                52
+2  ysThrGluGlu IlePheGln GlyIleGlyThr LeuGluSer GlnThrVal
      ApaLI
      ~~~~
417  GCACTGAAGA AATCTTTCAG GGAATAGGCA CACTGGAGAG TCAAACCTGTG
      CGTGACTTCT TTAGAAAGTC CCTTATCCGT GTGACCTCTC AGTTTGACAC

+2  GlnGlyGlyThr ValGluArg LeuPheLys AsnLeuSerLeu IleLysLy
467  CAAGGGGGTA CTGTGGAAAG ACTATTCAAA AACTTGTCCT TAATAAAGAA
      GTTCCCCCAT GACACCTTTC TGATAAGTTT TTGAACAGGA ATTATTTCTT

+2  sTyrIleAsp GlyGlnLysLys LysCysGly GluGluArg ArgArgValA
517  ATACATTGAC GGCCAAAAAA AAAAGTGTGG AGAAGAAAGA CGGAGAGTAA
      TATGTAACCTG CCGGTTTTTT TTTTCACACC TCTTCTTCT GCCTCTCATT

+2  snGlnPheLeu AspTyrLeu GlnGluPheLeu GlyValMet AsnThrGlu
567  ACCAATTCTT AGACTACCTG CAAGAGTTTC TTGGTGTAAT GAACACCGAG
      TGGTTAAGGA TCTGATGGAC GTTCTCAAAG AACCACATTA CTTGTGGCTC

                113
+2  TrpIleIleGlu Ser***
                                   XmaI
                                   ~~~~~~
                                   SmaI
                                   ~~~~~~
                                   AvaI           BamHI EcoRI
                                   ~~~~~~           ~~~~~~
617  TGGATAATAG AAAGTTGATC CCGGGAGCTC GTGGATCCGA ATTC
      ACCTATTATC TTTCAACTAG GGCCCTCGAG CACCTAGGCT TAAG

```

Abb. 31: DNA Sequenz von IL-5 Wildtyp im Expressionsplasmid IL5pETblue2. Die Positionen der Mutationen sind in der Proteinsequenz von IL-5 entsprechend hervorgehoben.

6.2.5. Überblick über computergestützte Arbeiten zum Finden von IL-4-Antagonisten

6.2.5.1. Zielstellung

Der vorliegende Bericht soll einen Überblick über prinzipielle theoretische Ansätze für die Suche nach IL-4-Antagonisten geben. Weiter sollen die Ergebnisse der bisherigen Arbeiten - Pharmakophordefinitionen und -suchen sowie *de novo*-Entwürfe - zusammengefasst werden.

6.2.5.2. Methoden

Pharmakophor-Suche: Die Ableitung von Pharmakophor-Modellen ist aufgrund der Kristallstruktur von IL-4BP/IL-4 möglich. Diese Modelle basieren auf den Aminosäuren von IL-4, die für die Affinität zu IL-4BP entscheidend sind (vgl. Hage et al., 1999). Die bisher entwickelten ISIS-Pharmakophor-Modelle werden nachfolgend dargestellt. Diese Modelle wurden in Zusammenarbeit mit dem Projektteil von Prof. Sebald weiter optimiert, um damit Suchen in ISIS- und Unity-Datenbanken sowie der Cambridge-Strukturdatenbank durchzuführen. Dabei stehen folgende Datenbanken zur Verfügung:

- ISIS (AWD GmbH): ASTA/AWD/-Inhaus-DB, MDDR, WDI, ACD, NCI3D;
- Unity (Projektteil Uni Würzburg): NCI3D, Maybridge;
- Cambridge-DB (Projektteil Uni Würzburg).
- sowie Datenbanken weiterer kommerzieller Chemikalienhersteller

De novo Programme: *De novo* Programme ermöglichen die Konstruktion von Liganden, ausgehend von der Struktur der Bindungsstelle am Rezeptor. In Dresden steht zur Zeit das Programm Newlead zur Verfügung. Mit diesem Programm wurden eine Reihe von möglichen Liganden für den IL-4-Rezeptor entworfen: vgl. Abschnitt 4. Das Programm LeapFrog (Zusatzmodul zu SYBYL) könnte für einige Wochen eingesetzt werden (Evaluierung).

Docking: Für Docking-Berechnungen steht in Dresden das Programm AutoDock zur Verfügung. Mit diesem Programm kann eine begrenzte Zahl von Strukturen hinsichtlich Affinität und Bindungsort getestet werden (Abschnitt 4). Das Screenen von größeren Datenbanken ist mit dem Programm FlexX möglich, das in Projektteil von Prof. Sebald, Uni in Würzburg, zur Verfügung steht. Die Rechenzeiten liegen hier bei 2 min pro Struktur (AutoDock: ca. 1 h). Ein aktuell publiziertes Docking-Programm ist das Programm SLIDE (Schnecke et al.). Mit diesem Programm kann im Gegensatz zu AutoDock und FlexX auch die Rezeptorflexibilität berücksichtigt werden.

Ligand-based design: Außer dem natürlichen Liganden und analogen Peptiden sind bisher keine Strukturen mit Affinität zum IL-4-Rezeptor bekannt, dementsprechend sind alle Methoden für das Ableiten neuer Ligand-Strukturen, die auf dem Vergleich von bekannten Strukturen basieren, nicht anwendbar.

6.2.5.3. Ergebnisse aus Pharmakophorsuchen

Ausgehend von den IL-4-Aminosäuren, die für die Affinität von IL-4 zum IL-4BP den größten Beitrag liefern (Hage et al., 1999; Reinemer et al., 2000), wurden auf Basis der Kristallstruktur des IL-4 Rezeptorkomplexes unterschiedliche Pharmakophorenmodelle entwickelt. Die Arg88, Asn89, Lys12 und Glu9 nahmen hierbei eine zentrale Stelle ein. Zehn dieser Pharmakophorenmodelle sind nachfolgend exemplarisch aufgeführt, Abb. 32 enthält einen Überblick über die wichtigen Eigenschaften der Modelle einschließlich der Zahl der Treffer in der Datenbank. Die Pharmakophormodelle stehen für weitergehende Untersuchungen und Modifizierungen als ISIS-skc-Dateien zur Verfügung.

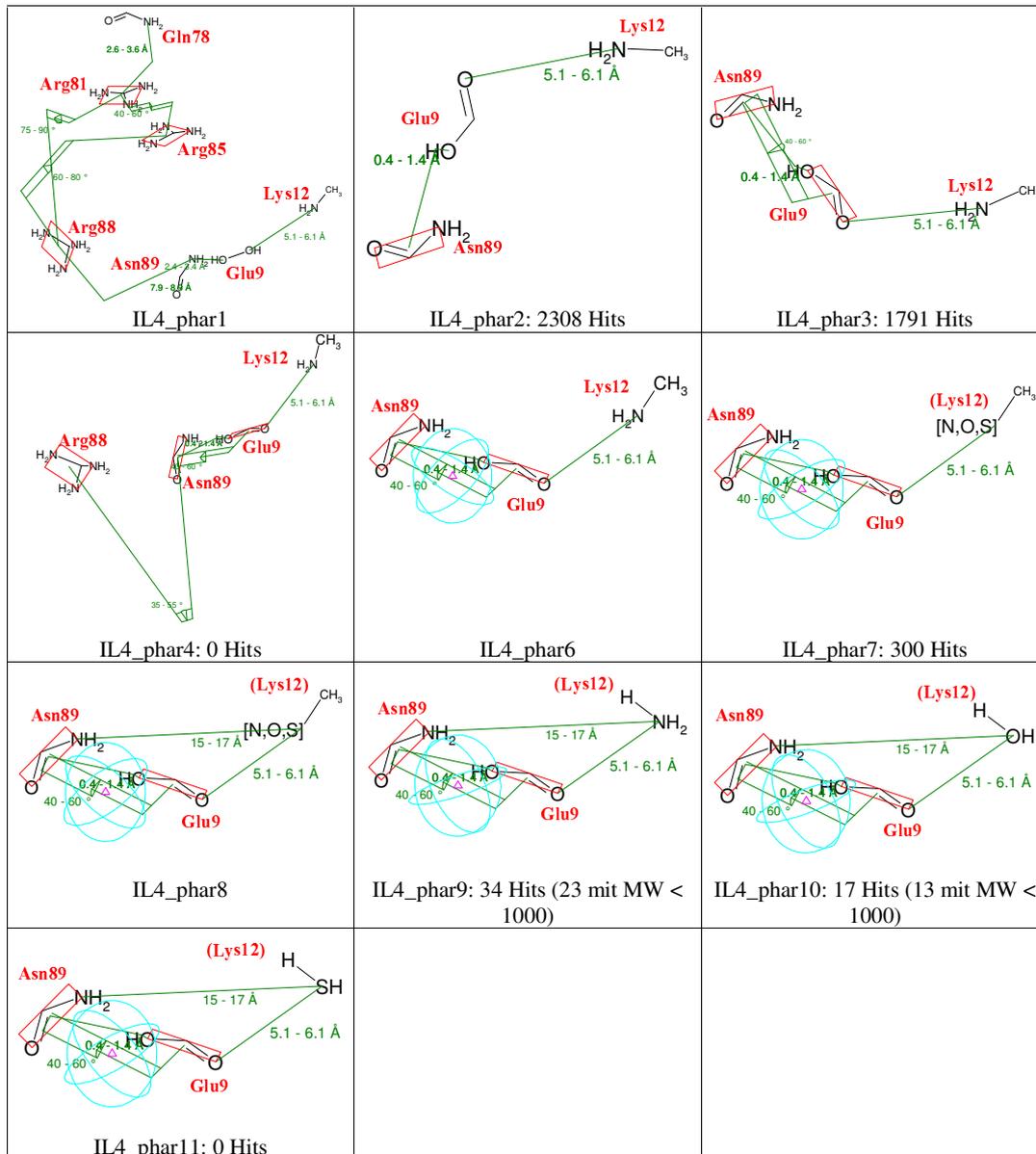


Abb. 32: Pharmakophormodelle IL-4 für Recherchen in der Inhouse-Datenbank. Die kugelförmigen Objekte (Modelle 6 - 11) sind Ausschlussvolumina, in diesem Bereich dürfen Hits keine Strukturen aufweisen.

Für die Pharmakophor-Suche in der Inhouse-Datenbank von ASTA/AWD wurde mit ISIS/Base eine "Konformationell flexible Substruktur-Suche" (Conformationally Flexible Substructure; CFS) durchgeführt.

Die Liste mit den getesteten Verbindungen ist in der Tabelle am Ende dieses Abschnitts enthalten. Von 401 in ISIS ausgewählten Substanzen standen 274 physisch zur Verfügung.

Die Affinität dieser Substanzen zum IL-4-Rezeptor wurde in einem SPA basierendem IL-4 Rezeptorbindungsassay bestimmt (Scintillation-Proximity-Assays in Mikrotiterplatten: sIL-4R α -PVT-Streptavidin Beads; radioaktiver Ligand 100 pM IL-4^[125I]; $\leq 50\mu\text{M}$ Testsubstanz). Bei allen Tests wurden keine affinen Substanzen gefunden. Weiterhin wurden ausgewählte Substanzen, die in der Pharmakophorensuche im Projektteil von Prof. Sebald identifiziert wurden, auf IL-4 Rezeptorbindung getestet. Für keine der untersuchten Substanzen konnte bis zu einer Testkonzentration von 100 μM eine Bindung ermittelt werden.

Ergebnisse aus dem *de novo* Design mit NewLead:

Für die Berechnungen wurde mit den folgenden Parameterkombinationen **a-d** gearbeitet (Tab. 21):

Parameter	a	b	c	d
OH Orientierung	8	8	30	30
NH(2) Orientierung	8	8	30	30
CH(3) Orientierung	12	12	30	30
Skalierungsfaktor Vektorpaar-Dist.	1.2	1.3	1.2	1.3
Max. Winkel im Vektorpaar	120	120	120	120
Max. Fehler bei Vektorpaar-Dist.	1.0	1.0	1.0	1.0
Max. Fehler bei Vektorpaar-Winkeln	15	15	15	15
Max. Superpos. RMS-Abweichung	0.3	0.5	0.3	0.5
Max. Fehler bei der Bindungslänge	0.1	0.2	0.1	0.2
Max. Bewegung von Fragmenten (A)	0.5	0.7	0.5	0.7
Überlapp-Skalierungsfaktor (Spacer)	0.75	0.75	0.75	0.75

Tab. 22: Bei den NewLead-Berechnungen verwendete Parameterkombinationen

Bei den Arbeiten mit dem *de novo* Programm NewLead wurden die funktionellen Gruppen der Aminosäuren Arg88, Asn89 und Glu9 berücksichtigt.

a) Versuchsserie 1

Zunächst wurde versucht, diese drei Gruppen mit Molekülbausteinen (Spacern) A und B aus einer Datenbank entsprechend dem Schema in nachfolgender Abbildung zu verbinden.

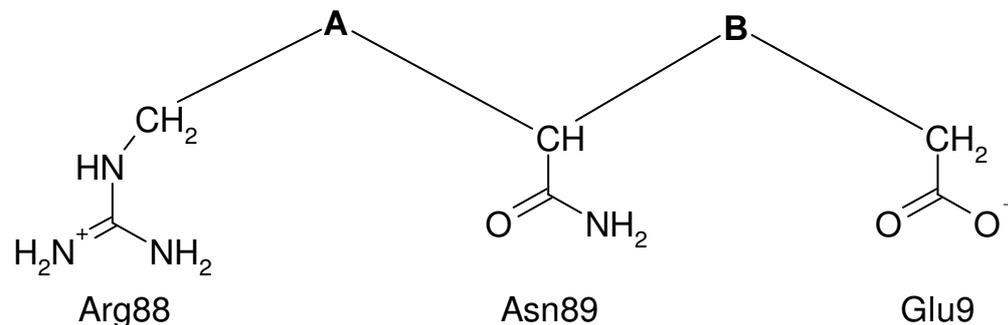


Abb. 33: Schema für die NewLead-Berechnung

Es wurden eine Vielzahl von Spacern A gefunden, mit denen sich die Guanidinogruppe von Arg88 und die Amidgruppe von Asn89 verbinden lassen, aber nur wenige Spacer B für die Verbindung der Amidgruppe mit der Carbonsäuregruppe von Glu9. Die Ergebnisse können der Tabelle 24 am Ende dieses Kapitels entnommen werden.

Autodock-Untersuchungen: Mit dem Programm AutoDock 3.0 können Affinität und Docking-Geometrie von Liganden für eine vorgegebene Rezeptorstruktur berechnet werden. Vier der mit NewLead berechneten Strukturvorschläge wurden mit dem Docking-Programm AutoDock 3.0 untersucht. Eine dieser Strukturen ist in Abb. 34 dargestellt. Für das Docken wurden sämtliche außer den drei in Abb. 34 gekennzeichneten drehbaren Bindungen festgehalten. Es wurden 50 Läufe durchgeführt. Dabei wurden 22 verschiedene Docking-Positionen gefunden, die in Tab. 2 aufgeführt sind - nach Bindungsenergie geordnet. Die Position von Cluster 4 wurde am häufigsten gefunden. Der kleinen RMSD von 1 Å kann entnommen werden, dass die Position der Strukturen dieses Clusters der Lage von IL-4 entspricht.

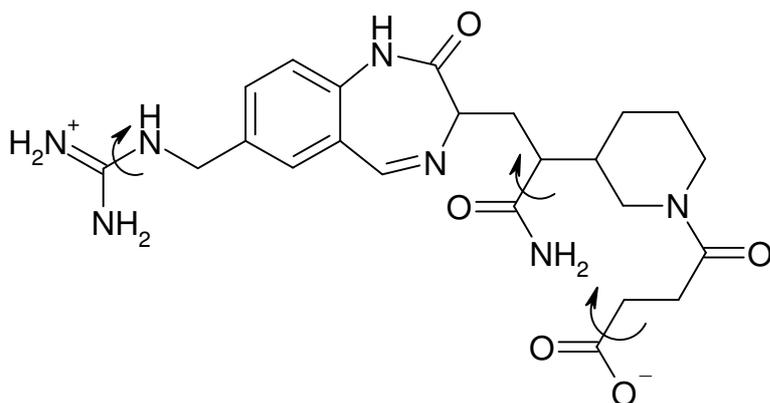


Abb. 34: Struktur nld003 aus NewLead-Berechnungen. Die Pfeile kennzeichnen die Bindungen, die für die AutoDock-Untersuchungen als frei drehbar deklariert wurden.

Cluster Rank	$\Delta G_{\text{bind}}^{\text{a}}$ [kcal/mol]	n ^b	RMSD ^c	Cluster Rank	ΔG_{bind} [kcal/mol]	n	RMSD
1	-10.60	1	23.96	12	-9.22	1	15.45
2	-10.40	7	10.98	13	-9.16	1	7.14
3	-10.34	6	21.74	14	-9.14	1	9.75
4	-10.17	12	1.07	15	-8.89	2	6.52
5	-10.05	2	17.45	16	-8.77	1	11.92
6	-9.76	2	21.93	17	-8.75	1	8.52
7	-9.98	1	5.94	18	-8.73	1	24.6
8	-9.66	1	22.28	19	-8.65	1	27.15
9	-9.43	1	8.72	20	-8.53	1	8.8
10	-9.33	3	12.93	21	-8.28	2	20.16
11	-9.36	1	7.28	22	-8.25	1	14.69

Tab. 23: Ergebnisse AutoDock für nld003. ^a mittlere Bindungsenergie; ^b Anzahl der Konformere im Cluster; ^c RMSD zur Referenzstruktur an der "richtigen" Bindungsstelle

Bei allen vier Strukturen wurde in gleicher Weise vorgegangen und es wurden analoge Ergebnisse erzielt. Nach dem Clustern der Ergebnisse wurden zwischen 16 und 23 Andock-Positionen gefunden. Die "richtige" Position, d. h. die Position analog der IL-4-Bindung, war jeweils energetisch bevorzugt (Cluster Rang 3 - 7) und stark besetzt (9 - 16 Konformere). Das deutet darauf hin, daß eine Affinität der untersuchten Strukturen zur gewünschten Bindungsstelle zu erwarten wäre. Allerdings gilt diese Aussage nur für die starren Liganden,

für die realen flexiblen Strukturen ist aus thermodynamischen Gründen eine wesentlich geringere Affinität zu dieser Bindungsstelle und andererseits die Passfähigkeit zu unzähligen anderen Bindungsstellen am IL-4-BP und anderen Molekülen zu erwarten. Es wurde deshalb mit der Versuchsserie 2 versucht, starrere Strukturen mit einer entsprechenden Anordnung der funktionellen Gruppen zu finden:

b) Versuchsserie 2

Um starrere Strukturen zu erzeugen, wurde anstelle von der Amidgruppe (Abb. 33) vom Benzamid ausgegangen. Mit Hilfe von NewLead wurde versucht, Brücken zwischen dem Benzamid und der Guanidinogruppe von Arg88 bzw. der Carbonsäuregruppe von Glu9 zu finden. Es wurden getrennte NewLead-Läufe zur Berechnung von Brücken zwischen der Guanidinogruppe und dem Benzamid bzw. dem Benzamid und der Säuregruppe durchgeführt.

Für die Berechnung von Strukturen mit einer Guanidino- und einer Benzamid-Gruppe wurden Benzamid mit Substitutionsmöglichkeiten in 2- und 3-Position sowie 2-Methyl- bzw. 2-Aminobenzamid vorgegeben. Bei Vorgabe des Benzamids wurden 27 - 89 Lösungen mit mindestens 5 drehbaren Bindungen (drei drehbaren Bindungen bei gesättigten asymmetrischen Verbindungen) gefunden: vgl. Abb. 35. Bei Vorgabe der Methyl- bzw. Aminogruppen wurden nur wenige Lösungen (4 - 11) mit mindestens 7 drehbaren Bindungen gefunden.

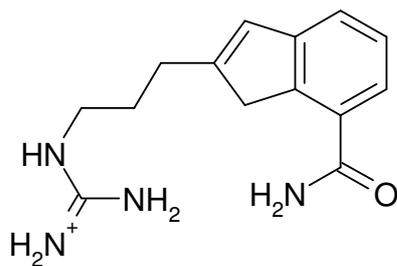


Abb. 35: Beispiel für eine Verbindung mit Amid- und Guanidinogruppe

Für das Verbinden von Benzamid und Carbonsäuregruppe wurden mehrere hundert Möglichkeiten gefunden, die mindestens 4 drehbare Bindungen entsprechend Abb. 35 enthalten (mit Ausnahme von einigen Systemen aus teilweise gesättigten Ringen). Der annellierte Ring kann auch ein gesättigter oder ungesättigter Sechsring sein, der einzelne Ring in Abb. 36 kann auch ein Sechsring oder ein 2-Ringsystem mit variabler Anordnung der Heteroatome sein.

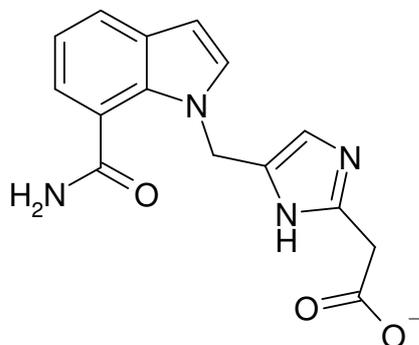


Abb. 36: Eine Möglichkeit für das Verbinden der funktionellen Reste von Asn89 und Glu9

6.2.5.4. Zusammenfassung und Ausblick

Bei der Suche nach IL-4-Rezeptoren können die folgenden Methoden eingesetzt werden: Pharmakophor-Suche, *de novo* Entwürfe aufgrund der bekannten Ligand-Rezeptor-Struktur sowie Docking-Berechnungen für ausgewählte Liganden bzw. Datenbank-Screening. Ein Ligand-basiertes Design ist noch nicht möglich, da bisher außer dem natürlichen Liganden keine Substanzen mit Affinität zur IL-4-Bindungsstelle bekannt sind.

Bisher wurden Pharmakophormodelle aufgrund von Aminosäuren von IL-4 entworfen, die für die Affinität die größte Rolle zu spielen scheinen. Suchen in der Inhouse-Datenbank nach diesen Pharmakophoren ergaben Hunderte von Hits. Für die experimentell getesteten Verbindungen wurde aber keine Affinität zum IL-4-BP gefunden. Aufgrund der gleichen Pharmakophorannahmen wurden mit dem *de novo* Programm NewLead neue Strukturen entworfen. Die Synthese und Testung einiger dieser Substanzen führte ebenfalls zu keiner aktiven Substanz. In allen bisherigen Pharmakophormodellen wurde die Rolle der hydrophoben AS-Reste, die die für die Affinität wichtigen polaren Reste umgeben, noch nicht berücksichtigt.

Tab. 24: Getestete Substanzen auf IL-4 Rezeptorbindung aus Pharmakophorsuchen

Subst.-Nr.	T								
D-07577	X	D-22867		D-30722	X	D-37327	X	D-36762	X
D-09297	X	D-22868	X	D-37060	X	D-37330	X	D-37180	X
D-09494	X	D-23037		D-37100	X	D-37332	X	D-37293	X
D-09632	X	D-23191	X	D-37120	X	D-38609	X	D-41497	X
D-10603	X	D-23192	X	D-37140	X	D-41623	X	D-41667	X
D-12044		D-23532		D-37177	X	D-41730	X	D-41731	X
D-13215	X	D-23533		D-37216	X	D-42635	X	D-41822	X
D-13396	X	D-23535		D-41497		D-43097	X	D-42582	
D-13472	X	D-23980	X	D-41552		D-43098	X	D-42582	
D-14156		D-24788	X	D-42542		D-43099	X	D-43112	
D-14171	X	D-24864	X	D-43195		D-43746	X	D-43970	
D-14225	X	D-24895	X	D-43196		D-43767	X	D-43970	
D-14236	X	D-24896	X	D-43198		D-48392	X	D-48395	X
D-14288	X	D-24897		D-43205		D-48453	X	D-48396	X
D-14291	X	D-24898	X	D-43206		D-48457	X	D-48397	X
D-14508	X	D-24899	X	D-43207		D-48913	X	D-48403	X
D-14512	X	D-24900	X	D-43208		D-48924	X	D-48725	X
D-14793		D-24901	X	D-43209		D-48943	X	D-49109	X
D-14927	X	D-24902	X	D-43210		D-49120	X	D-49115	X
D-14983	X	D-24903	X	D-43211		D-49133	X	D-49116	X
D-15129	X	D-24904	X	D-43227		D-49134	X	D-49124	
D-15216	X	D-24905	X	D-43230		D-61668	X	D-49125	X
D-15260	X	D-25041		D-43742		D-03968	X	D-50347	X
D-15301	X	D-25042		D-43773		D-05932	X	D-51544	X
D-15421	X	D-25352		D-44213	X	D-12013	X	D-51545	X
D-15431	X	D-25461	X	D-44214	X	D-13033		D-51888	X
D-15908	X	D-25473		D-44228	X	D-16992	X	D-52272	X
D-16668	X	D-25522		D-49116		D-17698		D-52821	X
D-16715	X	D-25568		D-50768		D-17846		D-54051	X
D-16789	X	D-25569		D-50769		D-17849		D-54308	X
D-17043	X	D-26268		D-50770		D-17850		D-55773	
D-17130		D-26269		D-51407	X	D-22867		D-56167	
D-17402	X	D-26292		D-61563		D-23527		D-56618	
D-17487	X	D-26334		D-20531	X	D-24064	X	D-57545	

D-17488	X	D-26341		D-21607	X	D-24064		D-62122	X
D-18222	X	D-26515	X	D-24798	X	D-24499		D-62281	X
D-19486	X	D-27449	X	D-25579	X	D-24611	X	D-62344	X
D-19890		D-27450	X	D-25581	X	D-24861	X	D-62345	X
D-19891		D-27582	X	D-25693	X	D-24939		D-62375	X
D-20186	X	D-27585	X	D-26343	X	D-25695		D-63442	
D-20187	X	D-27588		D-27584	X	D-25696		A-00344	X
D-21833		D-29032	X	D-33484	X	D-26348	X	A-00364	X
D-22631	X	D-29185	X	D-36328	X	D-26350	X	A-01584	X
D-22854		D-29186	X	D-37281	X	D-26370	X	A-01596	
D-22858	X	D-29534	X	D-37297	X	D-30299		A-01699	
D-22864	X	D-30568	X	D-37301	X	D-30300		A-01917	
A-02260		D-10690		D-20758	X	D-49309	X	D-22907	
A-02513		D-10693		D-21935	X	D-50720	X	D-23532	
A-02514		D-10694		D-22258	X	D-51621	X	D-24451	X
A-02795	X	D-10786	X	D-22291	X	D-52015	X	D-26267	X
A-03228		D-11155		D-22300		D-52086	X	D-26269	X
A-03768		D-12058	X	D-23102	X	D-52092	X	D-26334	
A-05146	X	D-12112	X	D-23160	X	D-52097	X	D-36556	
A-05245		D-12283	X	D-23299	X	D-63165	X	D-36557	
A-05382		D-12284	X	D-23300	X	D-63180	X	D-37185	
A-05383		D-12403	X	D-23672	X	D-63338	X	D-37196	
A-06032		D-12499	X	D-23984		D-63578	X	D-42672	
A-06457		D-12504	X	D-24047	X	D-66091	X	D-42879	
A-06596	X	D-12577	X	D-24416	X	D-66193	X	D-43101	X
A-06610	X	D-12720	X	D-25059	X	D-66353	X	D-43211	
A-06613	X	D-12791	X	D-25062	X	D-66386	X	D-44096	X
A-06807		D-12881	X	D-25697	X	D-66424	X	D-44214	X
D-03140	X	D-13131		D-26058	X	D-66489	X	D-48364	
D-08898	X	D-13204	X	D-26157	X	D-66531	X	D-48365	X
D-09145	X	D-13252	X	D-26545	X	D-66661	X	D-48945	
D-09326	X	D-13432	X	D-28828	X	D-66907	X	D-49131	
D-09333	X	D-13452	X	D-29036	X	D-66988	X	D-50849	
D-09334	X	D-13949	X	D-29888	X	D-67897	X	D-62328	
D-09424		D-14322	X	D-30528	X	D-69323	X	D-62329	
D-09425		D-14351	X	D-30548	X	D-69324	X	D-62346	
D-09428	X	D-15211	X	D-30550	X	D-69327	X	D-62350	
D-09431	X	D-17316		D-30551	X	D-69401	X	D-62366	
D-09437	X	D-18194		D-31396	X	D-69488	X	D-62371	
D-09513	X	D-18711	X	D-42583		D-69778	X	D-62391	
D-09516	X	D-19207		D-42682	X	D-69780	X	D-63178	
D-09539	X	D-19540	X	D-43953	X	D-69781	X	D-70108	X
D-09608	X	D-19802	X	D-47309	X	D-69782	X	R-00755	
D-09776	X	D-19882		D-48313	X	D-69817	X		
D-10108	X	D-19883		D-48544	X	D-12301	X		
D-10114	X	D-20098	X	D-48809	X	D-22866	X		
D-10116	X	D-20557	X	D-49147	X	D-22906			

X: Substanz stand zur Verfügung und wurde getestet und zeigte keine Bindungsaktivität.

6.3 Projektteil der Universität Erlangen, Prof. Brune, PD Dr. Pahl

6.3.1 Aufgabenstellung und Zielsetzung

Die Vielzahl potentieller Leitstrukturen durch die Einführung der kombinatorischen Chemie und des Hochdurchsatzscreenings führt zu einem Engpass bei deren biologischer Charakterisierung (Wirkungsmechanismen, Wirkungen im komplexen biologischen System). Aus diesem Grund sollten in diesem Projekt Methoden angewandt und weiterentwickelt werden, die zelluläre Veränderungen durch potentielle Wirkstoffe schnell und kostengünstig charakterisieren können. Solche Änderungen können grundsätzlich an zwei Arten von Molekülen in der Zelle gemessen werden: mRNA und Proteinen. Neue Real time PCR Methoden ermöglichen die genaue und schnelle Quantifizierung auch sehr kleiner RNA-Mengen in größerem Durchsatz. Um Wirkstoffe umfassend zu charakterisieren, ist es nötig, den Einfluss auf möglichst viele Proteine einer Zelle zu messen. Mit Hilfe der 2D-Gelelektrophorese ist es möglich, alle Proteine einer Zelle (Proteom) zu erfassen. Beide Methoden können dazu verwendet werden, die biologischen Wirkungen von neuartigen Leitstrukturen auf dem Gebiet der Modulation des Immunsystems schneller und kostengünstiger zu charakterisieren. Damit erreichen Leitstrukturen und optimierte Derivate erheblich schneller als bisher die Präklinik.

Das Institut für Experimentelle und klinische Pharmakologie und Toxikologie der Universität Erlangen wird den Einfluß immunmodulatorisch wirksamer Substanzen auf die Transkription und Translation untersuchen. Dazu sollen biologische Testsysteme auf der Basis von Realtime PCR-Methoden, sowie von proteinanalytischer 2D-Gelelektrophorese-Methoden aufgebaut und angewendet werden.

6.3.2 Wissenschaftliche Ergebnisse

Im Rahmen dieses Projektes sollten niedermolekulare Substanzen identifiziert wurden, die potentiell immunmodulatorisch wirken. Die Aufgabe des Projektpartners Universität Erlangen war es, ausgewählte Substanzen *in vitro* Tests zu unterziehen, um Substanzen für *in vivo* Testung zu selektieren. Als Testsystem wurde ein Zellkultursystem, basierend auf humanen PBMCs, etabliert. Diese haben den Vorteil, primäre und humane Zellen zu sein. Sie sind also der letztendlichen Anwendung am nächsten, und man hat keine Probleme durch Speziesunterschiede oder transformierte Zelllinien. PBMC wurden aus humanem Vollblut mittels Ficoll-Gradienten isoliert, in 24well Platten ausgesät und mitogen mit Phorbol ester und Ionomycin stimuliert. Aus der Literatur ist bekannt, dass dieser Stimulus die Zellen zu einer starken Produktion von T-Zell Zytokinen anregt. Zusätzlich haben wir mittlerweile anti-CD3 / anti-CD28 als Stimulus etabliert. Dieser imitiert eine Aktivierung der T-Zellen über Oberflächenrezeptoren ähnlich wie es eine Antigen präsentierende Zelle tun würde. Vor der Stimulation wurden zu den verschiedenen Wells die zu untersuchenden Substanzen gegeben. Nach der Stimulation wurden die Zellen geerntet und die RNA isoliert. Als Messsystem wurde ein TaqMan RT-PCR System aufgebaut, das es erlaubt, aus einer einzigen Probe eine Reihe von Zytokinen zu messen. Für IL-2, IL-4, IL-5, IL-13 und IFN-gamma wurden solche Systeme etabliert. Dabei zeigte sich für verschiedene Zytokine und verschiedene Zell-Stimuli eine unterschiedlich starke Inhibitionen durch einzelne Substanzen. Dies deutet darauf hin, dass abhängig vom Stimulus und vom Zytokin unterschiedliche Signalkaskaden wirksam sind. Diese Ergebnisse untermauern das im Antrag formulierte Konzept, dass es mit Hilfe der Expressionsanalytik möglich sein sollte, Zytokin-selektive Inhibitoren zu finden. Im folgenden sind die Ergebnisse der Untersuchungen aufgelistet:

Substanz		Guinea Pig	BN	NMR	PPlase	IL-2								IL-4					
		10 mg/kg	30 mg/kg	Abstand in nm	Ki µM	TPA/Iono						TPA/Iono							
unstimuliert						100	100	100	100	100	100	x	81	100	100	100	100	x	100
stimuliert						###	35	-11	-85	31	42	-65	x	6	-2	10	-347	-8	x
DMSO						0	0	0	0	0	0	0	0	0,01	0	0	0	0	0
CsA		74				100	100	100	100	100	100	100	100	96	97	93	98	93	76
43787	43787 SSS	59	50	0	308	-29	57	-30	-139	85	92	73	33	59	55	91	82	58	40
51471	43787 RRR	68		0	368	x	x	x	x	x	-56	5	-37	x	x	x	-13	26	-31
48356	43787 RRS	26		10-20	144	x	73	-107	-8	94	x	38	-26	85	9	85	x	4	-66
51370	43787 RSR	26		0 bzw 10-20	107	x	69	-21	-80	31	x	-6	-39	79	-56	69	x	3	-21
48363	43787 RSS	10		10-20	72	x	84	28	29	55	x	44	58	93	49	76	x	8	45
51372	43787 SRR	0		10-20	91	x	84	-42	-7	28	x	65	-74	82	-1	76	x	-21	10
48302	43787 SRS	0		10-20	50	x	87	40	42	-47	x	70	-5	83	63	89	x	77	44
51369	43787 SSR	0		0	233	x	64	-46	-179	-85	x	###	-148	82	-85	69	x	###	27
69484	43787 SSS ester	ng	57			x	x	x	-11	27	72	43	22	x	-19	49	-79	37	-3
63442	43787 1.Metabolit	64	35	0		x	72	-77	-88	9	38	x	x	80	-199	100	37	x	x
62436	43787 Fragment	37	69	0 bzw 10-20	>500	x	50	30	48	25	-22	-60	-96	31	58	-6	56	-58	-7
62451	43787 Fragment	20	ng	0	>500	x	37	18	12	-56	x	-68	-515	35	34	-68	x	-64	-4
62528	43787 Fragment		74			x	60	13	53	98	x	x	x	68	55	96	x	x	x
62546	43787 Fragment		ng			x	49	-40	27	22	x	33	85	28	22	-5	x	-14	49
63474	43787 Fragment	10	ng	0	>500	x	69	7	26	24	x	-7	-35	63	38	-69	x	0	38
43397	Neu		43	0-3		x	82	9	63	x	x	50	-72	58	60	x	x	32	-68
63173	Neu		60	0 (Csa like)		61	x	51	50	x	-61	42	20	x	82	x	59	63	21
64362	Neu		38			x	56	-19	42	-38	x	66	-130	71	41	21	x	70	-29

Tab. 25: Zusammenstellung der 43787 und Verwandte in vitro und in vivo Ergebnisse

Substanz		Guinea Pig	BN	NMR	PPlase	IL-5					IL-13					IFNg						
		10 mg/kg	30 mg/kg	Abstand in nm	Ki μ M	TPA/Iono					TPA/Iono					TPA/Iono						
unstimul						100	99	99	91	80	100	100	100	100	x	100	100	100	100	x	x	100
DMSO						0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
CsA		74				99	98	98	97	98	97	92	100	97	93	100	99	99	99	99	96	82
43787	43787 SSS	59	50	0	308	26	15	-6	65	19	94	-37	100	92	36	82	-45	-135	57	50	77	63
51471	43787 RRR	68		0	368	x	x	x	x	-61	x	x	x	49	0	72	x	x	x	-148	9	-84
48356	43787 RRS	26		10-20	144	67	-4	14	67	x	75	-166	41	x	24	48	-289	11	20	x	35	-17
51370	43787 RSR	26		0 bzw 10-20	107	38	37	-15	-35	x	67	50	-122	x	-13	-7	-45	-6	-606	x	-123	-498
48363	43787 RSS	10		10-20	72	53	36	46	69	x	76	-45	14	x	-25	52	14	56	-74	x	12	-10
51372	43787 SRR	0		10-20	91	43	19	24	32	x	73	-27	21	x	79	36	18	14	-146	x	14	-12
48302	43787 SRS	0		10-20	50	69	78	74	78	x	82	79	44	x	67	93	16	69	41	x	66	-54
51369	43787 SSR	0		0	233	34	-1	-9	-130	x	69	-49	-248	x	###	40	-494	-77	-717	x	###	-75
69484	43787 SSS ester	ng	57			x	x	26	54	-212	x	x	5	-21	44	5	x	18	-143	-284	38	-195
63442	43787 1.Metabolit	64	35	0		54	-69	-64	31	-42	76	-100	-39	39	x	x	60	-66	-11	-40	x	x
62436	43787 Fragment	37	69	0 bzw 10-20	>500	21	15	59	7	-123	59	45	-20	-35	9	-17	6	58	-27	-185	-62	36
62451	43787 Fragment	20	ng	0	>500	16	52	60	-29	x	43	26	-356	x	-56	-84	63	45	-212	x	-59	-45
62528	43787 Fragment		74			30	32	83	91	x	57	-54	100	x	x	x	75	63	70	x	x	x
62546	43787 Fragment		ng			22	-64	56	-17	x	54	-139	-95	x	50	38	-332	41	-82	x	26	53
63474	43787 Fragment	10	ng	0	>500	56	15	58	-30	x	76	7	-150	x	-35	-21	47	43	-158	x	-38	35
43397	Neu		43	0-3		85	-2	77	x	x	96	20	x	x	43	57	81	81	x	x	55	-19
63173	Neu		60	0		x	76	54	x	22	x	95	x	49	81	-28	85	71	x	-4	49	-3
64362	Neu		38			94	51	48	42	x	74	11	-19	x	64	-27	46	68	-203	x	61	-120

Tab. 26: Zusammenstellung der 43787 und Verwandte in vitro und in vivo Ergebnisse

Probenliste		Guinea Pig	BN	NMR	PPlas e	IL-2					IL-4			IL-5					
		10 mg/kg	30 mg/kg	Abstand in nm	% Hemmung	Ki µM	CD3/28					CD3/28			CD3/28				
unstimuliert						100	###	100	x	100	99	100	96	93	99	67	x	78	
stimuliert						-21	-2	-62	-83	x	-281	-33	-84	9	-148	-168	8	x	
DMSO						0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
CsA		74				86	84	99	100	93	98	95	97	75	92	91	-123	74	
43787	43787 SSS	59	50	0		308	50	87	90	62	39	22	97	72	100	-223	-35	-141	60
51471	43787 RRR	68		0		368	x	x	69	-78	-93	x	x	60	x	x	-56	-83	1
48356	43787 RRS	26		10-20		144	18	-225	x	55	2	30	64	x	-96	-33	x	-60	32
51370	43787 RSR	26		0 bzw 10-20		107	-21	45	x	75	60	1	46	x	-32	-31	x	24	79
48363	43787 RSS	10		10-20		72	10	52	x	43	-38	64	71	x	30	46	x	-9	58
51372	43787 SRR	0		10-20		91	12	28	x	53	38	65	44	x	5	-78	x	-95	52
48302	43787 SRS	0		10-20		50	53	4	x	58	-253	-10	76	x	28	54	x	9	18
51369	43787 SSR	0		0		233	-40	-32	x	74	38	-7	100	x	-27	-95	x	54	77
69484	43787 SSS Neopentylest	ng	57				41	-14	-40	19	7	30	99	-69	13	4	-89	30	31
63442	43787 1. Metabolit	64	35	0			5	-33	12	x	x	54	31	-67	21	-5	-44	x	x
62436	43787 Fragment	37	69	0 bzw 10-20	0	>500	-1	-43	44	10	-169	56	-48	48	7	-135	3	41	26
62451	43787 Fragment	20	ng	0		>500	-26	-65	x	9	29	36	-68	x	-46	5	x	19	77
62528	43787 Fragment		74				-32	95	x	x	x	95	99	x	-14	-99	x	x	x
62546	43787 Fragment		ng				-3	16	x	3	22	9	27	x	-44	54	x	44	70
63474	43787 Fragment	10	ng	0		>500	-18	-36	x	24	-335	38	-59	x	38	-157	x	42	-179
43397	Neu		43	0-3			77	x	x	83	81	65	x	x	64	x	x	20	88
63173	Neu		60	0 (Csa like)			34	x	60	-21	30	-12	x	-15	31	x	-13	-30	61
64362	Neu		38				-89	-1079	x	54	-197	34	-858	x	-11	-136	x	5	-78

Tab. 27: Zusammenstellung der 43787 und Verwandte in vitro und in vivo Ergebnisse

Probenliste		Guinea Pig	BN	NMR	PPlase	PPlase	IL-13					IFNg				
		10 mg/kg	30 mg/kg	Abstand in nm	% Hemmung	Ki µM	CD3/28					CD3/28				
unstimuliert							100	100	100	x	91	100	100	x	x	100
stimuliert							-39	-75	-22	-5	x	31	-22	-9	-120	x
DMSO							0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
CsA		74					26	77	95	-139	99	95	86	98	96	95
43787	43787 SSS	59	50	0		308	100	100	38	100	63	42	69	62	90	53
51471	43787 RRR	68		0		368	x	x	57	-65	-27	x	x	69	-248	-40
48356	43787 RRS	26		10-20		144	-33	-18	x	-13	-13	44	-1	x	16	18
51370	43787 RSR	26		0 bzw 10-20		107	-16	12	x	40	87	28	55	x	41	67
48363	43787 RSS	10		10-20		72	41	56	x	32	17	54	76	x	7	-38
51372	43787 SRR	0		10-20		91	48	-4	x	-54	95	57	59	x	22	40
48302	43787 SRS	0		10-20		50	48	76	x	20	-234	59	79	x	-28	-145
51369	43787 SSR	0		0		233	-44	-9	x	70	-19	-26	47	x	48	52
69484	43787 SSS Neopentylest	ng	57				10	-111	-6	29	65	58	-6	15	-11	44
63442	43787 1. Metabolit	64	35	0			15	49	35	x	x	61	-64	23	x	x
62436	43787 Fragment	37	69	0 bzw 10-20	0	>500	85	49	70	80	-49	17	-103	28	-36	-38
62451	43787 Fragment	20	ng	0		>500	19	76	x	35	33	43	-31	x	-97	52
62528	43787 Fragment		74				71	100	x	x	x	28	97	x	x	x
62546	43787 Fragment		ng				-80	40	x	50	40	13	-82	x	-29	26
63474	43787 Fragment	10	ng	0		>500	37	5	x	48	-646	36	-64	x	6	-225
43397	Neu		43	0-3			99	x	x	43	95	73	x	x	81	78
63173	Neu		60	0 (Csa like)			66	x	52	-21	92	-6	x	37	22	29
64362	Neu		38				-51	-417	x	54	-95	-56	-1982	x	42	-329

Tab. 28: Zusammenstellung der 43787 und Verwandte in vitro und in vivo Ergebnisse

Diese Zusammenstellung zeigt eine auffällige Korrelation zwischen den *in vitro* und den *in vivo* Ergebnissen. Insbesondere scheint die Hemmung der IL-13 mRNA Synthese ein guter Indikator für eine Aktivität *in vivo* zu sein. Die Bedeutung konnte insbesondere bei den Substanzen 43397, 63173 und 64362 bereits gezeigt werden. Diese Substanzen wurden nach den Ergebnissen unserer *in vitro* Tests den *in vivo* Tests zugeführt. Dort zeigten alle drei Substanzen eine signifikante Hemmung.

Ein weiteres Augenmerk lag auf der bereits identifizierten Verbindung 43787. Der Wirkmechanismus dieser *in vivo* aktiven Substanz ist nach wie vor ungeklärt. Deshalb wurde diese Verbindung einem vertieften Screening unterzogen, insbesondere durch den Einsatz seiner Stereoisomere, Bausteine und Metabolite. Auch 43787, das eine starke Wirkung *in vivo* aufweist, zeigt bei den T-Zell Zytokinen die stärkste Hemmung bei IL-13. Eine Korrelation der Diastereoisomere und Bausteine von 43787 zwischen *in vitro* und *in vivo* Ergebnissen ist leider nicht zu beobachten. Dies gilt ebenfalls für die Ergebnisse der PPlase-Messung als auch für die NMR-Untersuchungen.

Auffallend wiederum sind die drei neuen Substanzen 43397, 63173 und 64362, die bei verschiedenen Zytokinen signifikante und reproduzierbare Hemmungen zeigen.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass ein Screeningsystem etabliert wurde, das es erlaubt innerhalb kürzester Zeit für Substanzen ein Genexpressionsprofil zu erstellen. Es konnte gezeigt werden, dass die Inhibition von IL-13 ein guter Indikator für eine Wirkung im Tiermodell darstellt. Darüber hinaus konnten erste Einblicke in den Wirkmechanismus von D-43787 gewonnen werden.

6.3.2.1 Untersuchung der Wirkung der Diastereoisomere und Metaboliten von D-43787 auf die Produktion von Zytokinen in CD4⁺ T-Zellen

Bislang wurde hauptsächlich die Wirkung von D-43787 auf die Produktion von Zytokinen *in vitro* an PBMCs untersucht. Um genaueren Aufschluss über Struktur-Wirkungsbeziehungen und die Aktivität von Metaboliten bzw. Bausteinen zu erhalten, wurden alle Diastereoisomere und verfügbaren Bausteine im *in vitro* System auf ihre Eigenschaft, Zytokine in CD4⁺ T-Zellen zu inhibieren, untersucht.

Mit dem bislang verwendeten Zellsystem der TPA/Ionomycin bzw. CD3/CD28 stimulierten PBMCs erzielten wir sehr variable Ergebnisse. Nun stellen PBMCs ein Gemisch aller mononukleären Zellen des peripheren Blutes dar. Dieses Gemisch enthält vor allem T- und B-Zellen und Monozyten. Wir etablierten in unserem Labor einen weiteren Reinigungsschritt, indem wir aus PBMCs mittels Antikörper konjugierter beads CD4⁺ T-Zellen isolierten. Gemäß FACS-Analyse war diese Population zu mindestens 95% rein. Bei der Stimulation dieser Zellen stellten wir fest, dass die Zugabe von anti-CD3/anti-CD28 Antikörpern im Gegensatz zu den PBMCs nur eine sehr schwache Stimulation erzeugte. Vermutlich fehlt den CD4⁺ T-Zellen der Kontakt zu Antigen präsentierenden Zellen. Durch bead konjugierte anti-CD3/anti-CD28 Antikörper konnte dies imitiert und eine gute Stimulation erzeugt werden.

In den folgenden beiden Abbildungen sind die Ergebnisse eines repräsentativen Versuchs gezeigt.

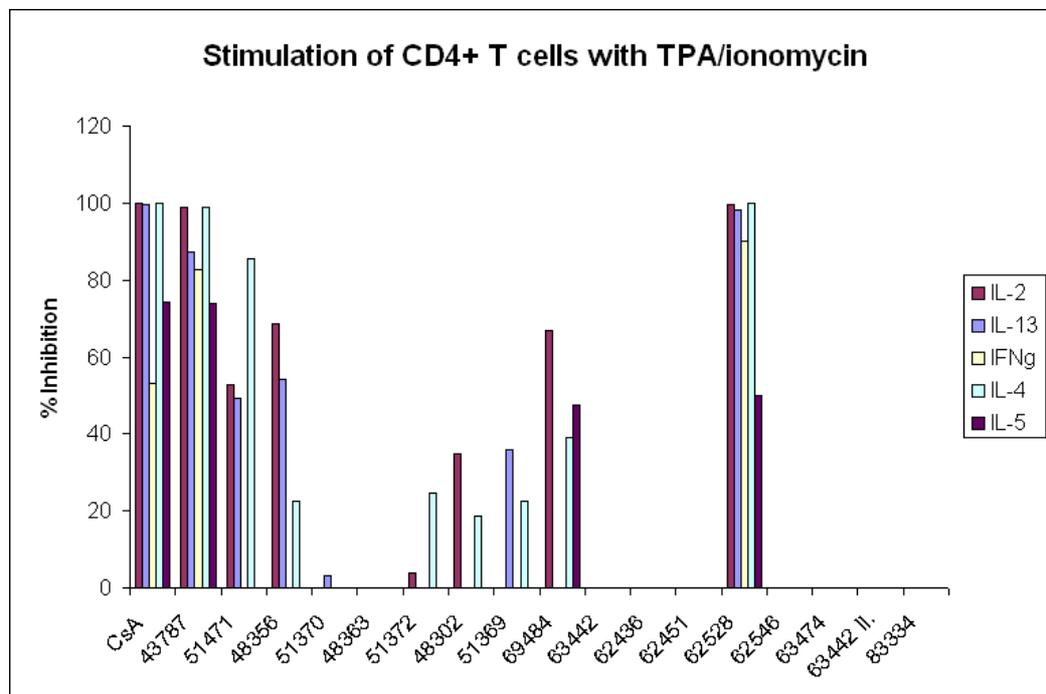


Abb. 37: Stimulation von CD4⁺ T-Zellen mit TPA/Ionomycin

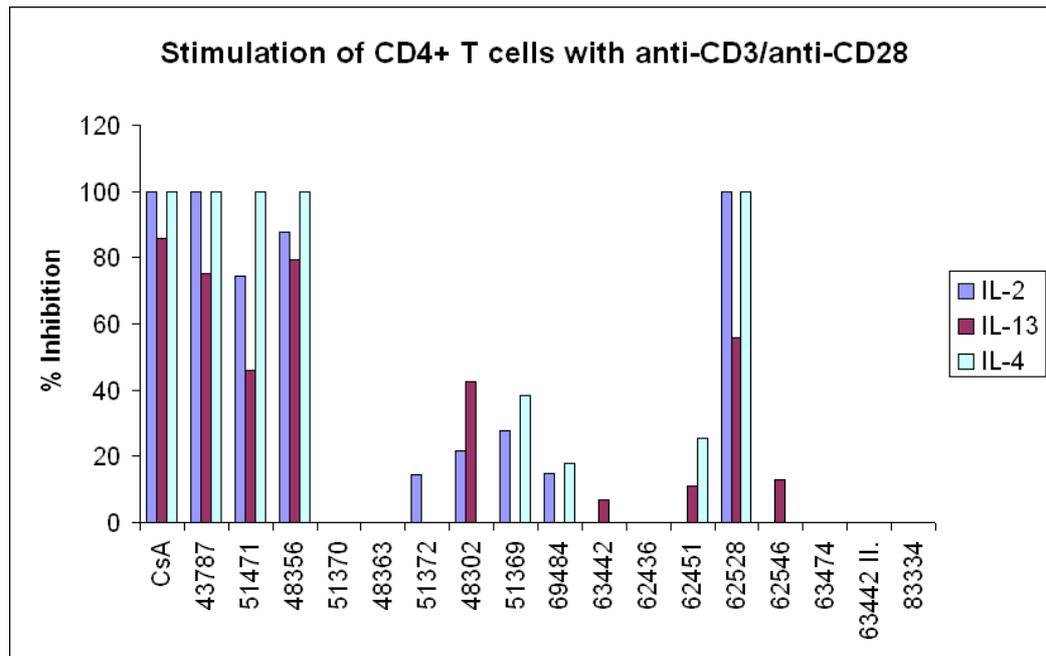


Abb. 38: Stimulation von CD4+ T-Zellen mit Anti-CD3/Anti-CD28

Cyclosporin A (CsA) als bekanntes Immunsuppressivum hemmt vollständig die induzierte Zytokinsynthese. Die gleiche Wirkung weisen lediglich 43787 und 62528 auf. Bei 62528 handelt es sich um einen sehr einfachen Baustein der 43787. Eine partielle Aktivität weisen die Diastereoisomere 51471 und 48356 auf.

6.3.2.2 Konstruktion eines humanen CypB Expressionssystems

Zur Überprüfung und Erweiterung der Ergebnisse der kombinatorischen Substanzen war es nötig geworden, ein Expressionssystem für humanes Cyclophilin B zu konstruieren. Dazu wurde zunächst RNA aus humanen JURKAT-Zellen isoliert. Mittels folgender Primer

```
CAT GCC ATG GTG CGC CTC TCC GAA C
GCG GAT CCC TAC TCC TTG GCG ATG
```

wurde das Gen für humanes Cyclophilin B amplifiziert. Das erhaltene PCR-Produkt wurde mit NcoI/BamHI verdaut und in den Vektor pQE60 der Firma QIAGEN kloniert. Die erfolgreiche Klonierung konnte durch Restriktionsanalyse bestätigt werden.

6.3.2.3 Analyse des Wirkmechanismus von Prüfsubstanzen mittels Proteomanalysen

Die Vielzahl potentieller Leitstrukturen durch die Einführung der kombinatorischen Chemie und des Hochdurchsatzscreenings führen zu einem Engpass bei deren biologischer Charakterisierung (Wirkungsmechanismen, Wirkungen im komplexen biologischen System). Aus diesem Grund sind in diesem Projekt Methoden angewandt und weiterentwickelt worden, die zelluläre Veränderungen durch potentielle Wirkstoffe schnell und kostengünstig charakterisieren können. Solche Änderungen können grundsätzlich an zwei Arten von Molekülen in der Zelle gemessen werden: mRNA und Proteinen. Mithilfe der 2D-Gelelektrophorese ist es möglich, alle Proteine einer Zelle (Proteom) zu erfassen. Die Methode der 2D-Protein-Gelelektrophorese ist etabliert worden. Dabei sind vor allem Lyse- und Gellaufbedingungen für humane T-Zellen optimiert worden, um eine möglichst große Anzahl von Proteinen bei hoher Auflösung auf einem 2D-Gel darstellen zu können.

Nach Abschluss der Arbeiten zur Charakterisierung von D-43787 wurden in diesem Teilprojekt Arbeiten zur vertieften biologische Charakterisierung der potentiellen Immunmodulatoren AWD 72-011 und AWD 72-039 unternommen. Die Substanzen wurden von AWD aufgrund vorliegender Daten als potentielle Leitstrukturen erachtet. Da ihr Wirkmechanismus unbekannt ist, sollte dieser mittels proteomischer Techniken aufgeklärt werden. Zunächst wurde die Methode der 2D-Gelelektrophorese etabliert und Protokolle entwickelt, um das Proteom humaner T-Zellen im 2D-Gel darzustellen. Zunächst wurden optimale Lysebedingungen für humane Jurkat T-Zellen ermittelt:

- 5 Mill. Zellen
- Zellen zählen, und mit serumfreiem Medium plus Antibiotikum kultivieren, Zellen 1x mit serumfreiem Medium waschen und in entsprechendem Volumen aufnehmen, über Nacht kultivieren
- am nächsten Morgen 4 Stunden stimulieren und anschließend ernten
- 2 x mit PBS waschen
- Lyse: bei 18 cm–Schiffchen mit 450µl Lysispuffer
- Mit 200µl Pipette und gelben Spitzen auf und abpipettieren, bis wieder flüssig
- -18 x 1 sec –Puls (Ultraschall/ Puls 60/Power mittig)
- -zentrifugieren bei 13.000 rpm für 20 min.
- Proben bei –20 °C lagern
- Behandlung mit 2D Clean Up-Kit, Proben in 400 µl IEF Sample loading solution aufnehmen. Proben nochmals zentrifugieren bei 8000 upm 10 min, bei – 80 °C einfrieren.

Der folgende Lysispuffer hat sich dabei als optimal erwiesen:

8 M Urea	4,8 g/10ml
2% Chaps	0,2 g/10ml
2% Triton	0,2ml/10ml
0,5% IPG-Buffer (Pharmacia)	50µl/10ml
30 mg DTT(10ml)	
2mM EDTA (Stock: 0,5M, pH 8.0)	40µl/10ml
1mM Na ₃ VO ₄	100µl/10ml
1mM Natriumfluorid	100µl/10ml

Unter Verwendung dieser entwickelten Protokolle wurde dann die Wirkung von AWD 72-011 und AWD 72-039 auf das Proteom humaner T-Zellen untersucht. In den Abbildungen 39-42 auf den folgenden Seiten sind repräsentative Ergebnisse gezeigt.

Für beide Prüfsubstanzen wurden mehrere Proteomanalysen durchgeführt. Die Abbildungen zeigen repräsentative Beispielgele, denen das jeweilige Gel der mit DMSO behandelten Zellen gegenübergestellt ist. Entsprechend den von uns etablierten und standardisierten Bedingungen zeigen die jeweiligen Gelpaare identische Spotmuster. Bei genauerer Analyse lassen sich jedoch einzelne Unterschiede finden. Exemplarisch sind jeweils zwei Bereiche markiert, in denen Spots jeweils nur in einem Gel zu beobachten sind. Aufgrund der Beendigung des Projektes konnten die Proteine, die diese Spots darstellen, nicht mehr identifiziert werden. Nichtsdestotrotz zeigen diese Ergebnisse, dass man mittels Proteomanalysen bestimmte Proteine identifizieren kann, deren Expression von den Prüfsubstanzen beeinflusst wird. Die Identifikation solcher Proteine lässt frühzeitig Rückschlüsse auf den Wirkmechanismus oder toxische Nebenwirkungen von Prüfsubstanzen zu und ist damit geeignet, einen wesentlichen Beitrag zur schnelleren Wirkstofffindung zu liefern.



Abb. 39: 2D-Gel der AWD-72-039 behandelten JURKAT T-Zellen



Abb. 40: 2D-Gel der DMSO behandelten Kontrolle

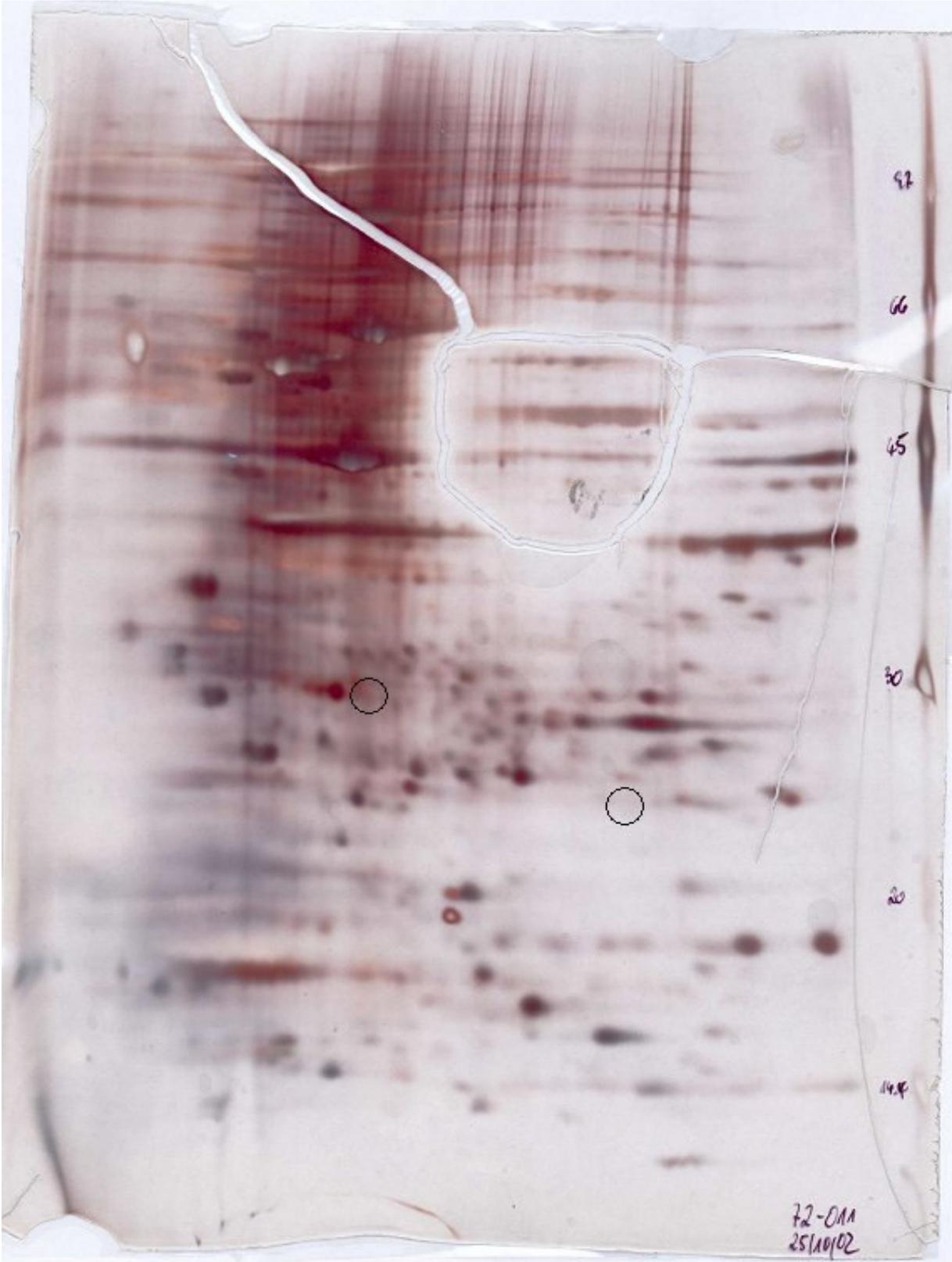


Abb. 41: 2D-Gel der AWD-72-011 behandelten JURKAT T-Zellen

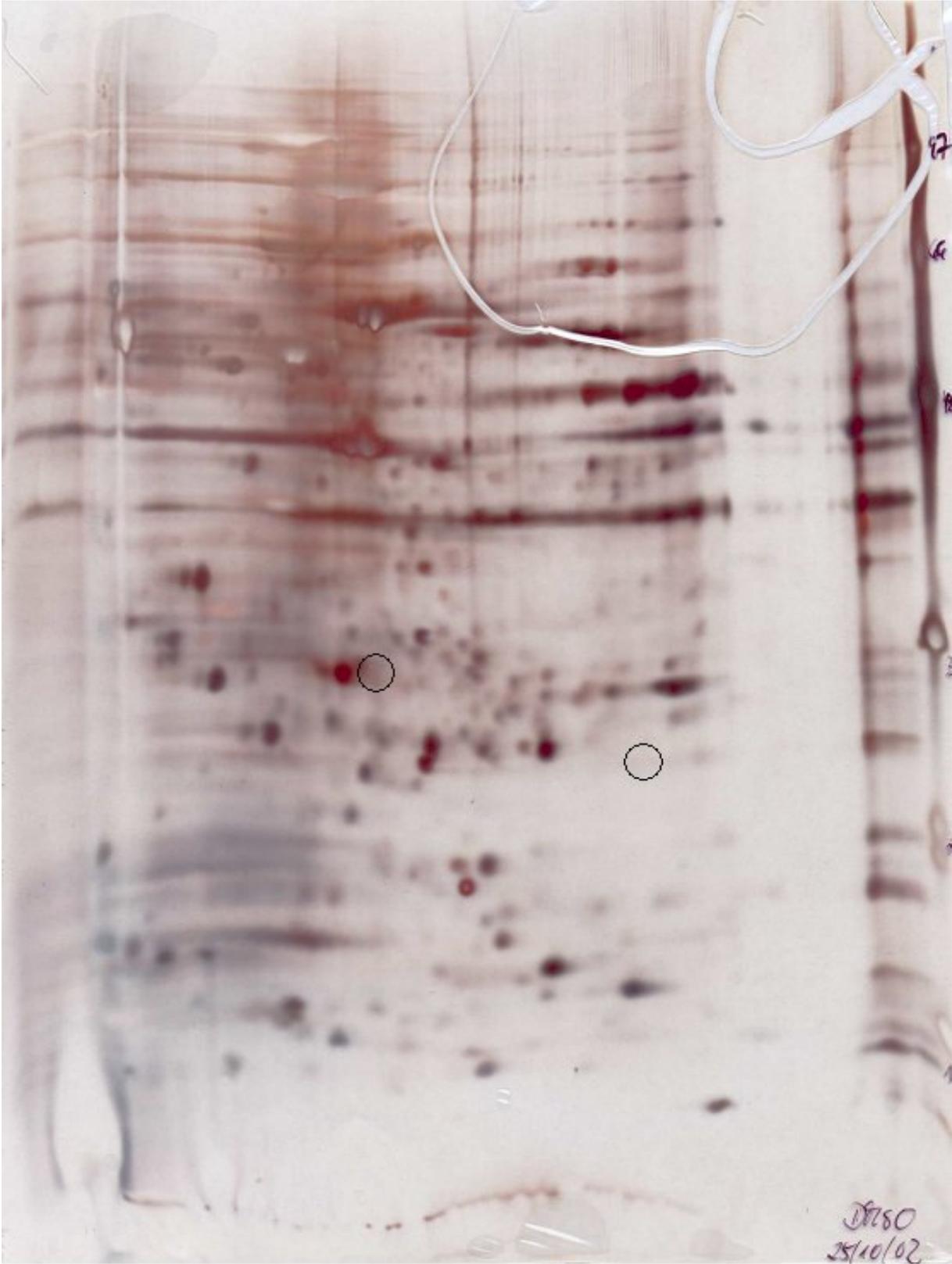


Abb. 42: 2D-Gel der DMSO behandelten Kontrolle

6.4 Projektteil der Max-Planck-Forschungsstelle für Enzymologie der Proteinfaltung Halle/Saale, Prof. Fischer

6.4.1 Aufgabenstellung und Zielsetzung

Den proteinfaltenden Enzymen, den sogenannten Immunophilinen wird molekular- und zellbiologisch eine entscheidende Rolle bei der Steuerung des Immunsystems eingeräumt. Immunophiline bilden mit exogenen, immunodulatorisch wirksamen Liganden wie Cyclosporin A, FK 506 und Repamycin Primär- und mit spezifischen Proteinen aus der Signaltransduktionskaskade Sekundärkomplexe. Im Rahmen des Projektes sollen molekulare Signaltransduktionswege von Cyclophilin-bindenden Liganden aufgeklärt werden. Das Auffinden zellulärer Sekundärproteine, die mit dem Übermolekül aus Cyclophilin und einem exogenen Liganden komplexieren, ist ein neuer Ansatzpunkt zur Formulierung von Pharmaophoren, die zur Herstellung einer Ligandenvielfalt durch kombinatorische Chemie in Betracht kommen.

Die Kooperation mit der Arbeitsgruppe „Enzymologie der Proteinfaltung“ der Max-Planck-Gesellschaft in Halle umfaßt die Aufklärung der zellulären und molekularen Signaltransduktionswege von Immunophilin-bindenden Liganden, Essentielle, an der Signaltransduktion beteiligten Proteine sollen für ausgewählte Immunophilin-Liganden isoliert, sequenziert, charakterisiert und als Target-Protein für kombinatorisch hergestellte Substanzbibliotheken bereitgestellt werden. Außerdem soll die Arbeitsgruppe ¹⁵N-markiertes Cyclophilin für NMR-spektroskopische Untersuchungen zur Verfügung stellen.

Das cyclische Undekapeptid Cyclosporin A hat neben seiner Anwendung in der Transplantationsmedizin zur Unterdrückung der zellulären Immunantwort das Potential für die Behandlung verschiedener, anderweitig schwer therapierbarer Formen von Asthma^{70,71}. Da Cyclosporin A über seine Bindung im aktiven Zentrum von Cyclophilinen wirkt, stellen diese Enzyme vom Typ der Peptidyl Prolyl *cis/trans* Isomerasen (PPlasen) vielversprechende Targets für die Suche nach neuen Leitstrukturen für eine Asthmatherapie dar. Im Rahmen der berichtspflichtigen Arbeiten der Max-Planck-Forschungsstelle sollten solche Leitstrukturen, die in einem Vorgängerprojekt über ein Screening nach niedermolekularen Bindern für Cyclophilin B als Hits identifiziert wurden, in ihren biochemischen Wirkungen auf Proteine bestimmter Signalketten aus T-Zellen untersucht werden. Im Mittelpunkt standen dabei Verbindungen mit einer Indolin-2-carbonamid-Struktur, insbesondere der Stoff D-43787. Neben Versuchen zur Identifizierung eines biochemischen Wirkmechanismus wurden auch Vorarbeiten zur physikochemischen Charakterisierung der Bindestelle von Indolin-2-carbonamiden an humanes Cyclophilin 18 (hCyp18) geleistet. Im Einzelnen wurden mg-Mengen von humanem Cyclophilin18 als ¹⁵N- bzw. ¹⁵N/¹³C-markiertes Protein rekombinant hergestellt, charakterisiert und in biologisch aktiver Form als Bindeprotein für SAR-Untersuchungen im Rahmen von HSQC-Messungen für die ¹H NMR bereitgestellt. Die primären und sekundären Wirkungsebene des neuen Pharmakons D-43787 wurde unter Verwendung humaner T-Zellen und durch u.a. Affinitätschromatographie analysiert.

6.4.2 Wissenschaftliche Ergebnisse

6.4.2.1 Untersuchungen zur inhibitorischen Wirkung von A-05600 und D-43787 auf die Peptidyl-Prolyl *cis/trans*-Isomerase-Aktivität von hCypB

Als Proteintarget beim Screening der kombinatorischen Substanzbibliothek diente die bisher nur unzureichend charakterisierte PPIase Cyclophilin B h(CypB). Um dieses Enzym und dessen Interaktion mit den gefundenen Wirkstoffen näher zu charakterisieren, wurden präparative Mengen dieses Proteins in enzymatisch aktiver Form benötigt.

⁷⁰ J. Morley Cyclosporin-A in Asthma Therapy - A Pharmacological Rationale J. Autoimmunity **1992**, 5, 265-269

⁷¹ D. Faulds, K. L. Goa, P. Benfield Cyclosporin - A Review of Its Pharmacodynamic and Pharmacokinetic Properties, and Therapeutic Use in Immunoregulatory Disorders. Drugs **1993**, 45, 953-1040

Das humane CypB besitzt N-terminal seiner PPlase-Domäne eine, für das endoplasmatische Retikulum spezifische, Signalsequenz, welche die Aminosäurereste 1-25 umfasst. Das unprozessierte Protein besteht aus 208 Aminosäureresten und hat ein Molekulargewicht von 22742 Da. Nach Abspaltung der Signalsequenz beträgt das Molekulargewicht 20289 Da. Die PPlase-Domäne des *hCypB* zeigt deutliche Homologie zur Aminosäuresequenz des *hCyp18* und eine noch höhere Identität zu CypB-Proteinen anderer Organismen (siehe Abb 43).

```

hCypB      MKVLLAAALI AGSVFFLLLP GPSAADEKKK GPKVTVKVYF DLRIGDEDVG RVIFGLFGKT VPKTVDNFVA
DmCypB     MKLFLSVFV V A-----LVA GVVVAD-DSK GPKVTEKVFF DITIGGEPAG RIEIGLFGKT VPKTVENFKE
hCyp18     -----MVNPTVFF DIAVDGEPLG RVSFELFADK VPKTAENFRA

hCypB      LATGEKGFY  KNSKFHRVIK DFMIQGGDFT RGDGTGGKSI YGERFPDENF KKKHYGPGWV SMANAGKDTN
DmCypB     LALKPQGEY  KGSKFHRIIK DFMIQGGDFT KGDGTGGRSI YGERFEDENF KKKHYGAGWL SMANAGKDTN
hCyp18     LSTGEKGFY  KGSCFHRIIP GFMCQGGDFT RHNGTGGKSI YGEKFEDENF ILKHTGPGIL SMANAGPNTN

hCypB      GSQFFITTVK TAWLDGKHVV FGKVLGMEV VRKVESTKTD SRDKPLKDV IADCGKIEVE KPFAIAKE
DmCypB     GSQFFITTKQ TSWLDGRHV V FGKILSGMNV VRQIENSATD ARDRPVKDV IANSGTLPVS EAFSVAKA DATD
hCyp18     GSQFFICTAK TEWLDGKHVV FGKVKEGMNI VEAMERFGS- RNGKTSKKIT IADCGQLE

```

Abb. 43: Aminosäuresequenzalignment des *hCypB*, *DmCypB* und *hCyp18*. Innerhalb der Cyclophilinfamilie der PPlasen konservierte Aminosäurereste sind rot und fett gedruckt dargestellt.

Überexpression, Reinigung und Charakterisierung von *hCypB*

Das Gen des *hCypB* ohne Signalsequenz lag zur Überexpression bisher nur als Fusion mit einem C-terminalen His-Linker und weiteren zusätzlich eingefügten Aminosäureresten vor. Die Untersuchungen zum Einfluss verschiedener Substanzen auf die PPlase-Aktivität von CypB sollten allerdings mit rekombinantem Protein durchgeführt werden, dessen Aminosäuresequenz der des authentischen und prozessierten *hCypB* entspricht. Dieses wurde erreicht, indem von Frau Christin Galetzka (ELBION) ein Stopp-Codon nach der für das prozessierte *hCypB* codierenden und vor der zusätzlichen, für den His-Linker codierenden Sequenz eingefügt wurde.

Zur Überexpression von *hCypB* wurde viermal 1 l 2xYT-Medium unter Zusatz von Ampicillin mit 20 ml einer Übernachtskultur des *hCypB*-Klons angeimpft und diese bei 37°C und 200 rpm bis zu einer $OD_{600\text{ nm}} = 0.6$ geschüttelt. Nach Induktion der Proteinexpression mit 1 mM IPTG wurden die Kulturen für weitere 5 h bei 37°C und 200 rpm geschüttelt. Anschließend wurden die Zellen bei 6000 rpm und 4°C für 10 min pelletiert. Wie im Gel in Abb. 44 deutlich wird, war bereits vor der Induktion mit IPTG eine deutliche Überexpression des Proteins sichtbar.

Das Pellet von 2 l der Überexpressionskultur wurde in 40 ml Auftragspuffer (2 mM Tricin, pH 8.0) resuspendiert und es wurde ein Protease-Inhibitor-Mix (Complete, EDTA-free von ROCHE) zugesetzt. Die resuspendierte Probe wurde dreimal einem *French Press*-Aufschluss (20000 psi) unterzogen. Unlösliche Zellbestandteile wurden anschließend durch eine Ultrazentrifugation (40 min, 70000 xg, 4°C) abgetrennt. Der Überstand wurde auf eine EMD-DEAE-650(M)-Säule, äquilibriert mit Auftragspuffer, aufgetragen. Das sich im Säulendurchlauf befindende *hCypB* wurde danach an Fractogel TSK-AF-Blue-Säulenmaterial gebunden und mit einem linearen Salzgradienten (0-3 M KCl) eluiert. Die erhaltenen, *hCypB*-haltigen Fraktionen wurden anschließend mittels Gelfiltration (Superdex75, 1x30 cm) zur Homogenität gereinigt und in 10 mM Hepes, 150 mM KCl, 1.5 mM $MgCl_2$, 5 mM DTT, pH 7.8 überführt (siehe Abb. Gel und UV-Spektrum).

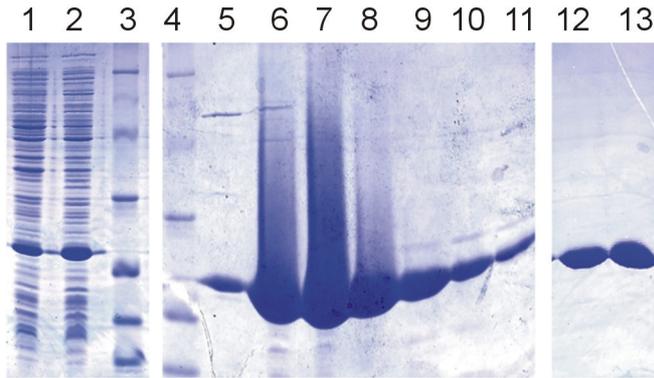


Abb. 44: Reinigung von rekombinantem hCypB aus *E. coli*. 15% SDS-PAGE, Coomassiefärbung, Bahn 1: *E. coli* Zellextrakt vor Induktion, Bahn 2: *E. coli* Zellextrakt 4 h nach Induktion mit 1 mM IPTG, Bahnen 3 u. 4: Molekulargewichtsstandard, Bahnen 5-11: mit KCl-Gradienten eluierte Fraktionen von Fractogel TSK-AF-Blue-Säule, Bahnen 12-13: homogenes hCypB nach Gelfiltration an Superdex75.

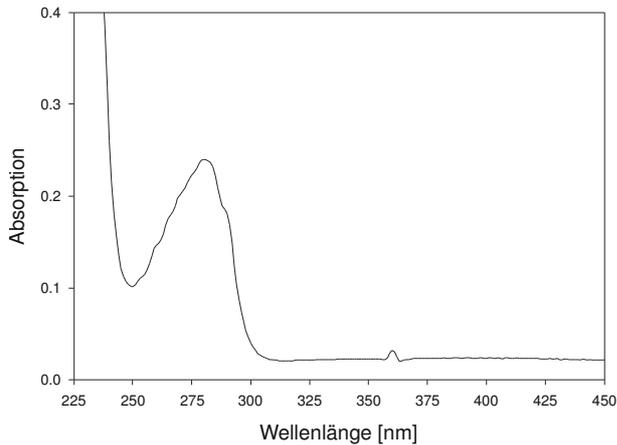


Abb. 45: Absorptionsspektrum des gereinigten hCypB im Bereich von 225-450 nm.

Die Bestimmung der molekularen Masse des erhaltenen Proteins mittels ESI ergab ein Molekulargewicht von 20428.8 Da und zeigt mit der für das hCypB ohne Signalsequenz aber mit N-terminalem Methionin erwarteten molekularen Masse von 20438 Da gute Übereinstimmung (Abb. 46).

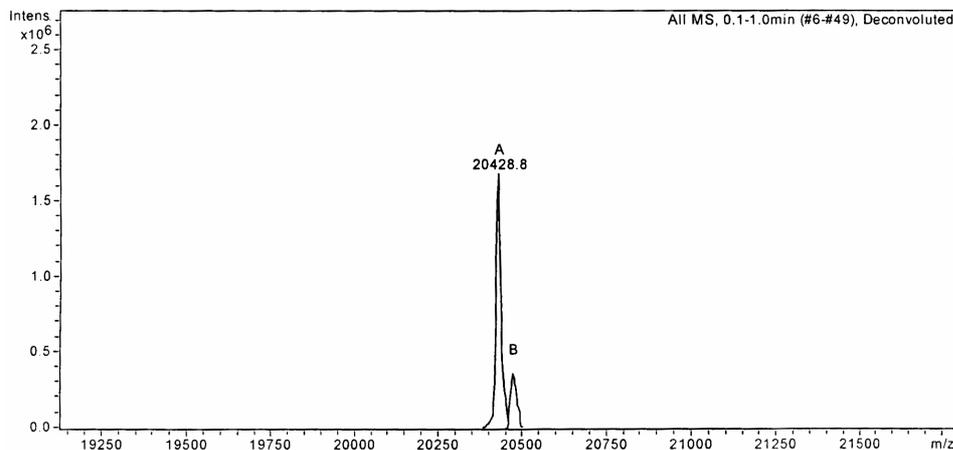


Abb. 46: ESI-Spektrum des rekombinanten humanen CypB.

Die Bestimmung der ersten Aminosäurereste mittels Edman-Abbau im Proteinsequenzer mit Met-Asp-Glu-Lys-Lys bestätigte die Identität des homogenen, gereinigten Proteins als hCypB.

Bestimmung der PPlase-Aktivität des hCypB

Das gereinigte hCypB zeigte PPlase-Aktivität. Diese wurde im Chymotrypsin-gekoppelten PPlase-Assay⁷² mit $k_{\text{cat}}/K_m = 4.5 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ gegenüber dem Substrat Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-4-nitroanilid und mit $k_{\text{cat}}/K_m = 1 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ gegenüber dem Substrat Suc-Ala-Phe-Pro-Phe-4-nitroanilid bestimmt.

Inhibierung der enzymatischen Aktivität des hCypB durch A-05600 und D-43787

Der inhibitorische Einfluss der Substanzen A-05600 und D-43787 auf die PPlase-Aktivität von hCypB wurde im Chymotrypsin-gekoppelten PPlase-Assay bestimmt. Dazu wurden 1 μl 2.5 μM hCypB (Endkonzentration im Ansatz: 2 nM), 1400 μl 35 mM Hepes, pH 7.8 und 1-6 μl einer 50 mM Stammlösung der inhibitorischen Substanz in DMSO für 10 min bei 10 °C in einer Küvette gerührt. Nach Zugabe von 3 μl Chymotrypsin (100 mg/ml) und 1 μl Substrat (20 mg/ml) wurde die enzymatische Reaktion für 240 s verfolgt.

In Abb.47.A u. B sind die Inhibierung der PPlase-Aktivität des hCypB in Abhängigkeit von der vorliegenden Inhibitorkonzentration und die zugehörigen IC_{50} -Werte dargestellt. Die Streuung der erhaltenen Messwerte resultiert vermutlich daraus, dass beide inhibitorischen Substanzen bei Konzentrationen > 100 μM im Messansatz präzipitieren.

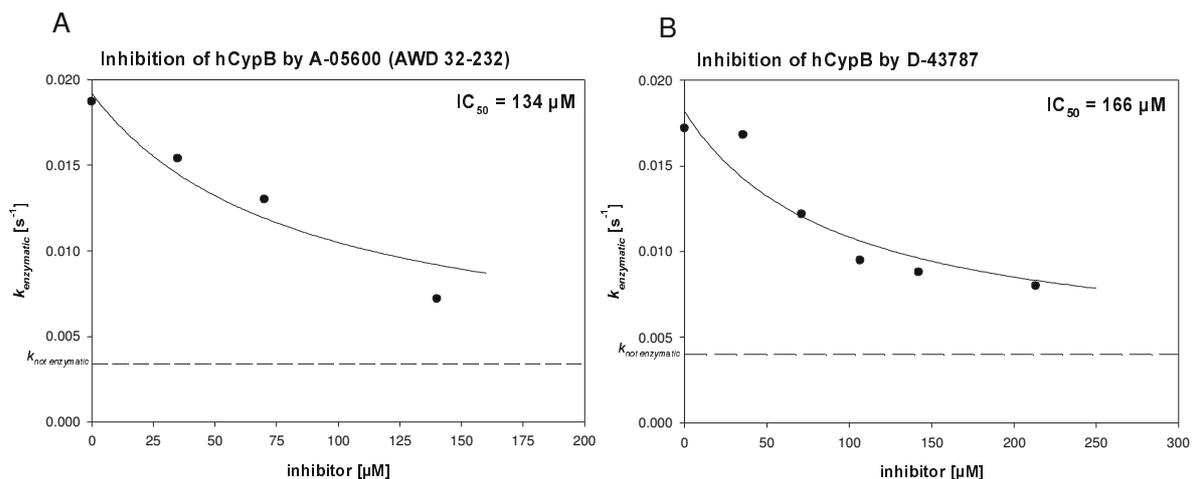


Abb. 47: Inhibierung der PPlase-Aktivität des hCypB durch A-05600 und D-43787

Verbindung	Inhibierung [%]			Inhibierung [%] FKBP12
	hCypA	hCypB	DmCypB	
A-05600				
10 μM	10	7	5	8
1 μM	0	0	0	0

Tab. 29: Inhibierung in % einer Inhibitor-freien Kontrolle der enzymatischen Aktivität von hCyp18, hCypB, DmCypB und hFKBP12.

⁷² G. Fischer, B. Wittmann Liebold, K. Lang, T. Kiefhaber, und F. X. Schmid Cyclophilin and peptidyl-prolyl cis-trans isomerase are probably identical proteins Nature **1989**, 337, 476-478

Mit den durchgeführten Messungen konnte die bestehende Vermutung, dass die enzymatische Aktivität des humanen CypB im Vergleich zum humanen Cyp18 spezifisch durch A-05600 oder durch D-48787 inhibiert wird, nicht bestätigt werden (siehe Tabelle). Weitere Untersuchungen am Drosophila-Homologen des Cyclophilin B, bei dem der ER-targeting Bereich des humanen Enzyms verändert ist, zeigen ebenfalls keine Tendenz dafür, dass beide Verbindungen spezifische Inhibitoren für Cyclophilin darstellen könnten. Auch humanes FKBP12, eine PPLase aus der Familie der FK506-bindenden Proteine und ein cytosolischer Rezeptor für das immunsuppressive Peptidomakrolid FK506, wird nicht inhibiert.

6.4.2.2 Klonierung, Überexpression und Reinigung von rekombinanten humanen ¹⁵N- und ¹⁵N/¹³C-markierten Cyp18

Um immunologisch relevante Signaltransduktionswege mit Hilfe von Substanzen, die aus einer mit Mitteln der kombinatorischen Chemie hergestellten Ligandenvielfalt gewonnen wurden, spezifisch zu blockieren, sind idealerweise die Strukturen der zugehörigen Zielproteine und deren biologischer Funktion bekannt.

Das humane Genom besitzt mehr als 20 Isoformen an Cyclophilinen, die sich in ihrem Molekulargewicht, ihrer katalytischen Effizienz gegenüber kleinen Modellpeptiden, ihrer Affinität gegenüber CsA und ihrer subzellulären Lokalisation unterscheiden. Daher wäre es an sich notwendig, die Frage nach der primären Wirkungsebene der bisherigen Leitstruktur, D-43787, durch eine Interaktionsanalyse mit allen Cyclophilin-Isoformen anzugehen. Im Rahmen dieses Projektes konnten nur ein Bruchteil dieser Isoformen in biologisch aktiver Form isoliert und für biochemische Untersuchungen zur Verfügung gestellt werden. Da in der Literatur als cytosolischer Rezeptor für die immun-relevanten Wirkungen von Cyclosporin A ausschließlich das prototypische Cyclophilin, das Cyp18, angesehen wird, ist dieses Enzym als Objekt für ausgedehntere biochemische Untersuchungen auf NMR-Basis gewählt worden. Deshalb wurde humanes Cyp18 als rekombinantes Protein in *E. coli* unter Verwendung von ¹⁵N- und ¹³C-Nährstoffquellen exprimiert und gereinigt. Für die Realisierung dieser Strategien war es notwendig, das bisherige Expressionssystem bezüglich der Ausbeute zu optimieren und an die Bedingungen eines Mangelmediums zu adaptieren. Limitierend für eine Steigerung der Proteinexpression war das häufige Vorhandensein sogenannter „Condon bias“, d.h. im humanen Cyp18 werden insbesondere die Prolin- und Arginin-Reste mit Codons für seltene tRNA's in *E. coli* codiert (siehe Abbildung 48).

1			40
VNPTVFFDIA	VDGEPLGRVS	FELFADKVPK	TAENFRALST
41			80
GEKGFYKGS	CFHRIIPGFM	CQGGDFTRHN	GTGGKSIYGE
81			120
KFEDENFIL	KHTGPGILSMA	NAGPNTNGSQ	FFICTAKTEW
121			160
LDGKHVVFGK	VKEGMNIVEA	MERFGSRNGK	TSKKITIADC
161			
GQLE			

Abb. 48: Die für die Proteinexpression limitierenden Aminosäurereste von hCyp18.

Dazu wurde die Ribosomen-Bindungsstelle optimiert, und neue *E. coli* Stämme mit erhöhter Expression seltene tRNA's wurden eingesetzt. Im Ergebnis mehrerer Optimierungsrunden kann z.Z. mit der vorhandenen technischen Ausrüstung eine Ausbeute von bis zu 15 mg gereinigtem, ¹⁵N- bzw. ¹⁵N/¹³C-markiertem rhCyp18 je Liter Mangelmedium erzielt werden. Auf dieser Basis wurden in der vergangenen Förderungsperiode für die NMR-Untersuchungen insgesamt 135 mg ¹⁵N-markiertes und 165 mg ¹⁵N/¹³C-markiertes rhCyp18

bereitgestellt. In weiterführenden Experimenten sollte durch Co-expression von Chaperonen versucht werden, die Ausbeute zu steigern und die Faltungsprobleme zu beheben, wobei aber keine befriedigenden Ergebnisse erzielt werden konnten.

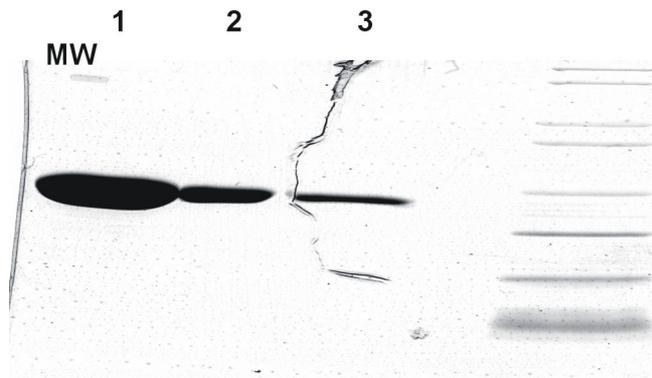


Abb. 49: Vergleich der erhaltenen Expressionsleistungen an rhCyp18 nach differenten Optimierungen. In einem 10-ml Aliquot von entweder BL21-CodonPlus™(DE3)-RP Bakterien (Spur 1), BL21-Gold(DE3) Bakterien (Spur 2) oder M15-Bakterien, wurden in der mittleren-logarithmischen Wachstumsphase die Expression von rhCyp18 mit 1 mM IPTG für 2 Stunden induziert. Die Bakterien wurden homogenisiert, und nach Zentrifugation wurde die cytosolische Proteinfraction mit einer Ni-NTA-Agarose Matrix inkubiert, intensiv gewaschen und das gebundene Protein eluiert. Die im 15% SDS-Acrylamide Gel separierten Proteine wurden mit Coomassie® Blue gefärbt. Der Molekulargewichtsstandard ist in der rechten Spur gezeigt.

6.4.2.3 Niedermolekulare Liganden inhibieren stereospezifisch die PPlase-Aktivität von rhCyp18

Für Modellpeptide konnte in der Vergangenheit gezeigt werden, dass sie stereospezifisch mit Cyp18 interagieren⁷³. Da es sich bei D-43787 um eine Verbindung mit mehreren Chiralitätszentren handelt, sollte geklärt werden: ob die beobachtete Inhibierung der PPlase-Aktivität von rekombinanten hCyp18 (rhCyp18) durch D-43787 stereospezifisch ist.

Inhibitor	Stereochemie	Ki [μM]
D-43787	SSS	308 ± 54
D-51369	SSR	233 ± 24
D-48302	SRS	50 ± 5
D-51372	SRR	91 ± 6
D-48363	RSS	72 ± 14
D-51370	RSR	107 ± 7
D-48356	RRS	144 ± 10
D-51471	RRR	368 ± 46
CsA		0.012

Tab. 30: Konstanten für die Inhibierung der enzymatischen Aktivität von hCyp18

Mittels Chymotrypsin-gekoppelten PPlase-Test konnten für D-43787 und dessen Stereoisomere K_i-Werte für rhCyp18 im μM-Bereich ermittelt werden. Die beobachtete Stereospezifität korreliert interessanterweise mit den *in vitro* Daten zur Beeinflussung der Zytokinfreisetzung in humanen T-Zellen. Zum Beispiel hat D-48302 eine ca. 6-fach höhere

⁷³ C. Schiene, U. Reimer, M. Schutkowski und G. Fischer G Mapping the stereospecificity of peptidyl prolyl cis/trans isomerases. FEBS Lett **1998**, 432, 202-6

Affinität zu rhCyp18 und weist in *in vitro* eine selektivere Inhibierung von IL-4, IL-5 und IL-13 auf als das SSS-Isomere. Damit konnten erstmals Cyclophilin-Inhibitoren identifiziert werden, die nur die Expression von Th2-Zytokine inhibieren, nicht die Interleukin-2 Synthese. Derartige Verbindungen entsprechen dem Projektziel. Trotzdem können die beschriebenen Substanzen infolge der geringen Cyp18 Affinität nicht als entwicklungsfähige hCyp18 Inhibitoren bezeichnet werden.

6.4.2.4 Nichtpeptidische CypB-Binder interagieren nicht mit humanem Calcineurin

Nach der gegenwärtigen Lehrmeinung binden die bekannten PPlasen-Inhibitoren, CsA und FK506, in humanen Zellen an die entsprechenden Bindungsproteine, Cyp18 oder FKBP12, und assoziieren dann als Komplex an Calcineurin, wodurch die Zytokinexpression inhibiert wird⁷⁴. Zur Klärung der Frage, inwieweit die biologischen Effekte von D-43787 und seiner Stereoisomere auch über Calcineurin vermittelt werden, war es notwendig, die Phosphatase zu klonieren und als rekombinantes Protein zu exprimieren und zu reinigen.

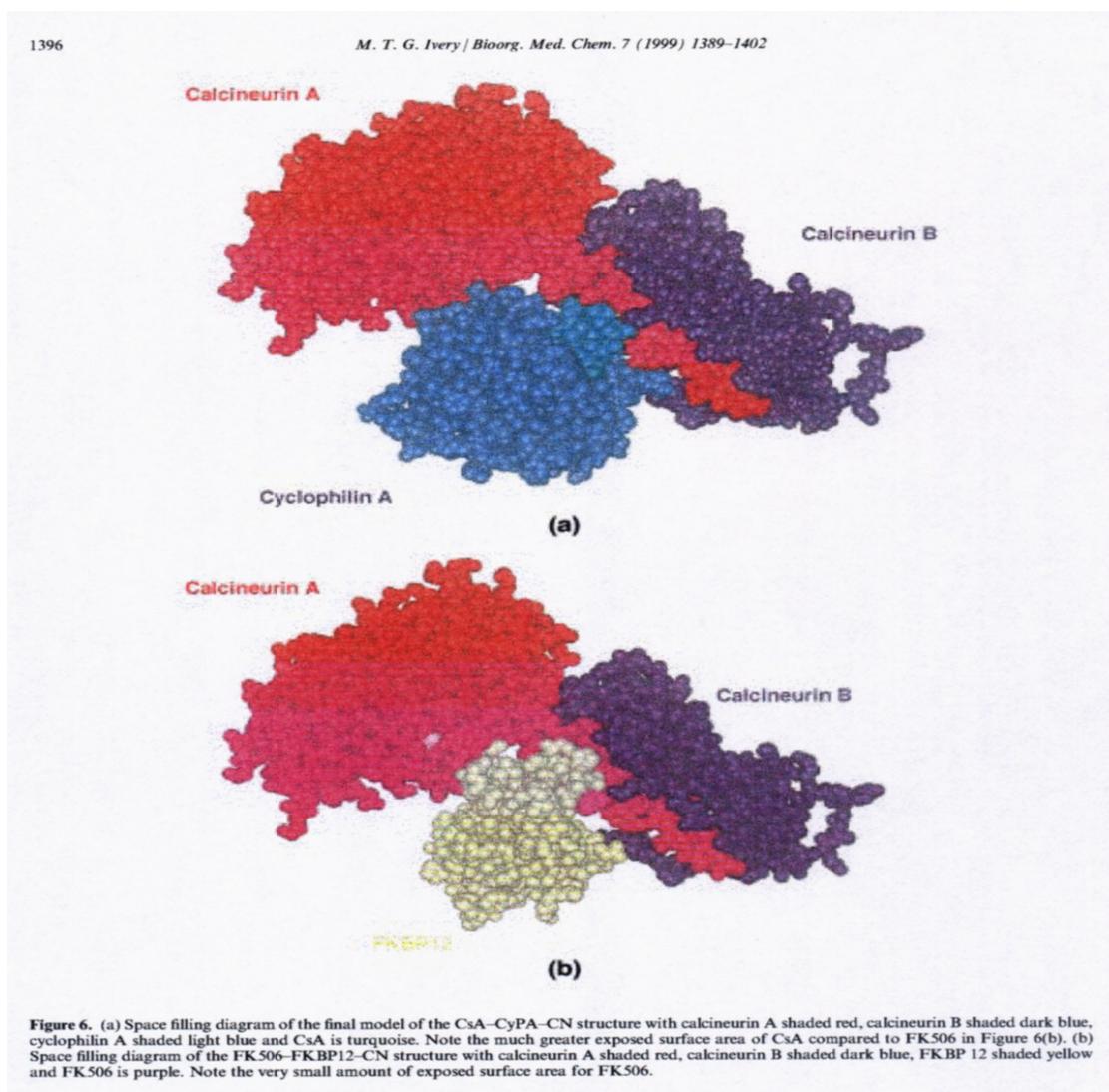


Abb. 50: Modell für den inhibitorischen CsA/Cyp18/CaN Komplex

⁷⁴ S. L. Schreiber Chemistry and biology of the immunophilins and their immunosuppressive ligands. *Science* **1991**, 251: 283-287

Die Expressionskassette wurde mit Hilfe der PCR, von einer Reverse-transkribierten mRNA aus humanen Jurkat-T-Zellen unter Verwendung Calcineurin-spezifischer 5' und 3' Primern amplifiziert.

Um die Phosphatase mittels Affinitätschromatografie reinigen zu können, wurde der pQE30 Vektor von QIAGEN verwendet. In Vorexperimenten konnte nachgewiesen werden, dass die beste Ausbeute an rekombinantem, humanem Calcineurin im BL21-RIL *E. coli* Stamm erzielt werden konnte. Da Calcineurin für seine volle enzymatische Aktivität wahrscheinlich eine posttranslationale Myristoylierung benötigt, wurden die pQECNA *E. coli* Stämme zusätzlich noch mit der Myristoyl-CoA:Protein N-myristoyltransferase aus Hefe transformiert. Das Expressionskonstrukt wurde freundlicherweise von J. O. Liu (Baltimore, USA) zur Verfügung gestellt.

Rekombinantes humanes Calcineurin alpha und Calcineurin beta Ketten wurde für die Gewinnung des enzymatisch aktiven Proteins wie folgt gereinigt: Das *E. coli* Pellet von einer 6 Liter-Kultur wurde homogenisiert, mit 5% Protaminsulfat und 20% Ammoniumsulfat fraktioniert gefällt und der Überstand auf eine Ni-NTA Agarose Matrix aufgelagert. Nach intensivem Waschen der Ni-NTA Agarose konnte His-tag rhCNA α und rhCNA β mit einem linearen Imidazolgradienten eluiert werden. Die abschließende Feinreinigung erfolgte an Calmodulin-Sepharose, im Ergebnis dessen die in der Abbildung gezeigte Reinheit des Proteins erzielt wurde.

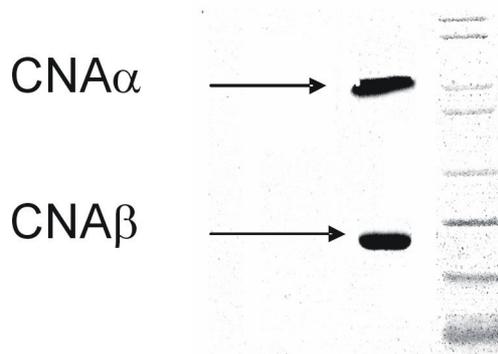


Abb. 51: SDS-Elektrophorese von gereinigtem Calcineurin alpha (CNAalpha) und beta (CNA β)

Ein Aliquot (7 μ g) der gepoolten Eluate nach der Calmodulin-Sepharose wurde im 10% NuPAGE Gel analysiert und mit Coomassie® Blue gefärbt. Der Molekulargewichtsstandard ist in der rechten Spur gezeigt.

Der neu entwickelte Scintillationsassay zur Aktivitätsbestimmung von Calcineurin⁷⁵ wurde eingesetzt, um einerseits den Einfluss der Substanzen direkt auf Calcineurin oder indirekt, via Komplexbildung mit hCyp18, zu analysieren. CsA konnte als Referenzsubstanz für einen indirekten Hemmtyp verwendet werden.

Zur Prüfung, ob die relativ geringe Calcineurininhibierung über einen Effekt auf Calmodulin wirkt, wurden außerdem vier unterschiedliche Calmodulinkonzentrationen bei einer Inhibitorkonzentration von 10 μ M getestet: 25nM, 37.5 nM, 50 nM und 250 nM. Die Inhibierung ist bei allen Derivaten unabhängig von der Calmodulinkonzentration.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass die beobachteten pharmakologischen Effekte von D-43787 und seiner potenten Stereoisomeren nicht durch Calcineurin vermittelt sind. Dies ist nicht überraschend, da bisher für Calcineurin-Inhibitoren eine derartige selektive Zytokinhemmung, wie für D-48302 z.B., noch nicht gezeigt werden konnte.

⁷⁵ R. Baumgrass, M. Weiwad, F. Erdmann, J.O. Liu, D. Wunderlich, S. Grabley und G. Fischer Reversible inhibition of calcineurin by the polyphenolic aldehyde gossypol *J. Biol. Chem.* **2001**, 276, 47914-47921

Inhibitor	Calcineurin-Restaktivität (%)		
	Indirekte Inhibierung RhCyp18 = 5 μ M, Inhibitor (I) = 10 μ M	direkte Inhibierung	
		I = 100 μ M	I = 10 μ M
D-43787 SSS	96	88	87
D-48302 SRS	98	95	93
D-51372 SRR	97	94	85
D-51370 RSR	95	105	80
D-51471 RRR	95	92	83
D-48363 RSS	96	91	82
D-51369 SSR	95	86	85
D-48356 RRS	97	92	92
CsA	3	91	96

Tab. 31: Calcineurin-Restaktivität in Gegenwart der angezeigten Konzentration an Wirkstoff (direkte Inhibierung) bzw. des Wirkstoff/Cyp18 Komplexes (indirekte Inhibierung).

6.4.2.5 Nichtpeptidische Inhibitoren für rhCyp18 und rhFKBP12, identifiziert durch ein Random-Substanzscreening mittels PPlase-Test

Auf der Basis des von uns entwickelten protease-gekoppelten PPlase-Tests wurden in der bisherigen Antragsperiode 112 Verbindungen auf ihren Einfluss gegenüber der PPlase-Aktivität differenter Immunophilinen untersucht. Synthese und Auswahl der Verbindungen erfolgte von Herrn Dr. Reichert vom Projektpartner. Um unspezifische Interaktionen mit beliebigen Enzymen auszuschließen, wurde als Negativ-Kontrolle der Einfluss der Substanzen auf die Aktivität der Lactatdehydrogenase (LDH) analysiert. Keine der Verbindungen hat die Aktivität der LDH bis zu einer Konzentration von 500 μ M beeinflusst. Für das primäre Eingangsscreening wurde die Restaktivität von rhCyp18 in Gegenwart von 20 μ M Substanz bestimmt. Im Einzelnen wurde 1 ml einer rhCyp18-Lösung (10 - 50 nM; 35 mM HEPES pH 7.8) mit der Test-Verbindung (< 2% DMSO) für 15 min. in einer auf 10 °C thermostatisierten Küvette präinkubiert. Dem Ansatz wurde das Testpeptid Suc-Ala-Phe-Pro-Phe-NHNp zugesetzt und die Reaktion durch Zugabe von 200 μ l Chymotrypsin (5 mg/ml) gestartet. Nach Auswertung der cis-trans Isomerisierungskinetik (kobserved = k0 + kenz) wurden die Substanzen in zwei Klassen unterteilt: (A) Substanzen die < 50 % Inhibition der PPlase- Aktivität in Gegenwart von 20 μ M Substanz zeigten (u.a. D-63173, D-64362, D-63364, D-50566, D-64421, für Details siehe Datenblätter) und (B) Substanzen die > 50 % Inhibition der PPlase- Aktivität in Gegenwart von 20 μ M Substanz zeigten (u.a. D-68448, D-63347, D-68861, D-62436, D-51189, D-64367, D-64367, D-64366, D-64365, D-64420, D-64418). Insgesamt konnten 14 potentielle Inhibitoren identifiziert werden, d.h. Verbindungen der Klasse B. Für diese Verbindungen wurden mit Hilfe des Protease-freien Assays die K_i -Werte für rhCyp18 und rhFKBP12 bestimmt (siehe nachfolgende Tabelle).

Inhibitor	Ki [μ M] für	
	rhCyp18	rhFKBP12
D-64321	23.36 \pm 2.8	> 500
D-64362	22.23 \pm 8.3	36.30 \pm 5.6
D-64363	n.d.	n.d.
D-64364	26.64 \pm 3.3	38.24 \pm 14.4
D-64365	28.34 \pm 13.5	70.74 \pm 23.1
D-64366	21.12 \pm 1.73	42.96 \pm 9.1
D-64367	34.07 \pm 6.5	50.79 \pm 7.5
D-64413	> 500	> 500
D-64414	> 500	> 500
D-64415	> 500	> 500
D-64416	> 500	> 500
D-64417	> 500	> 500
D-64418	65.73 \pm 14.1	56.28 \pm 9.2
D-64420	56.72 \pm 17.3	> 500
D-64421	23.36 \pm 2.78	82.56 \pm 16.2
D-68445	> 500	> 500
D-68446	> 500	> 500
D-68447	> 500	> 500
D-68448	70.85 \pm 8.4	> 500
FK506	> 50	0.016
CsA	0.012	> 50

Tab. 32: Konstanten für die Inhibierung der enzymatischen Aktivität von hCyp18

Mittels des Eingangsscreenings, ein spezifischer PPlase-Test, konnten erstmals 7 Substanzen identifiziert werden, die sowohl Cyclophiline als FKBP's inhibieren. Derartige Verbindungen waren in der Literatur bis zu diesem Zeitpunkt nicht beschrieben und sollten daher einer weiteren pharmakologischen Analyse unterzogen werden. Darüber hinaus konnten drei selektive Cyp18-Inhibitoren charakterisiert werden. Von der inhibitorischen Potenz sind diese Verbindungen mit Cyclosporin A nicht vergleichbar, das ca. 10^3 - 10^4 mal besser inhibiert. Trotzdem sind die biologischen Aktivitäten, die durch unsere Kooperationspartner in den verschiedenen zellulären Assays gemessen wurden, beachtlich (siehe dort) und nicht in der Größenordnung dieses Unterschieds in der Inhibitionskraft belastet.

6.4.2.6 Identifikation der mit D-43787 interagierenden Proteinen

Die Analyse des molekularen Wirkungsmechanismus von D-43787 wurde in zwei Abschnitte gegliedert: (1) Zur Identifikation der direkt mit D-43787 interagierender Proteine wurde die trägerfixierte Substanz eingesetzt. (2) Die Bildung von heterooligomeren Protein-Komplexen in Gegenwart von D-43787 wurde mit Hilfe von trägerfixiertem humanem GST-Cyp18 analysiert, um die Eigenschaften von Cyp18 als Presenter-Protein für bioaktive Konformationen von D-43787 zu untersuchen.

Cytosolische Fraktionen von Jurkat-T-Zellen wurden in allen Experimenten als Ausgangsmaterial eingesetzt. ASTA Medica stellte die D-43787-Matrix zur Verfügung.

Lysis-Puffer:	NEB-Puffer:
10 mM Hepes, pH 7.5	25 mM HEPES, pH=7.5
2 mM MgCl ₂	500 mM NaCl
1 mM EGTA	5 mM MgCl ₂
1 mM EDTA	1 mM EDTA
10 mM KCl	10 mM NaF
1 mM DTT	1 mM DTT
1 mM PMSF	10 % Glycerin
10 mM NaF	0.2 % NP 40
0.2 mM Na ₃ VO ₄	
0.1 % NP 40	

Tab. 33: Pufferzusammensetzung zur Auffindung von Interaktionspartnern von D-43787 in Jurkat Cytosol.

Für ein Bindungsexperiment wurden je 5×10^7 Zellen durch Zentrifugation geerntet und mit eiskaltem PBS gewaschen. In Lysis-Puffer resuspendierte Zellen wurden durch Teflon-Homogenisation aufgeschlossen und die zytosolische Fraktion durch Zentrifugation bei 13.000 rpm (4°C) gewonnen. Lösliche Proteine wurden aus den Kernpellets mit NEB-Puffer extrahiert. Die Proteinkonzentration wurde auf 1 mg/ml mit Lysis-Puffer in beiden Fraktionen eingestellt. Matrixgebundene D-43787 (20 µl) wurde mit der zytosolischen bzw. Kern-Fraktion über Nacht bei 4°C inkubiert und die gebundenen Proteine durch Zentrifugation bei 4.000 rpm sedimentiert. Nach intensivem Waschen mit Lysis-Puffer konnten die potentiellen Bindungsproteine eluiert werden durch entweder NEB-Puffer, D-43787, CsA oder durch Zugabe von 0.1 % SDS bei 45°C. Die TCA-gefällten Eluate wurden mittels SDS-PAGE charakterisiert.

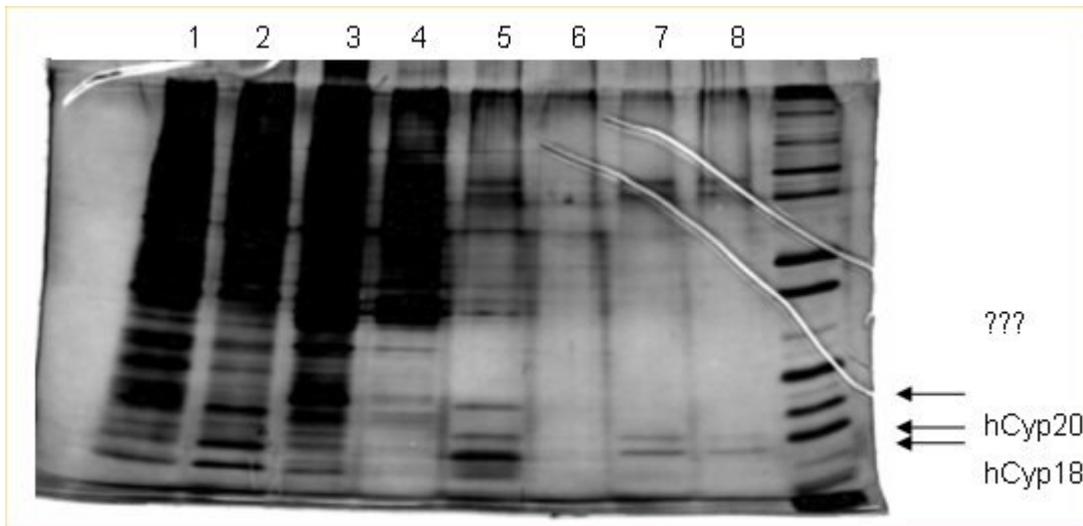


Abb. 52: Identifikation von zytosolischen Proteinen von Jurkat-T-Zellen, die an trägerfixiertes D-43787 binden können

Ungefähr 1.0 mg Gesamtprotein aus dem Zytosol von T-Zellen (Spur 1, Ausgangsmaterial) wurde mit 20 µl trägerfixiertem D-43787 inkubiert und intensiv gewaschen (Spur 2,3). Die gebundenen Proteine wurden durch Zugabe von NEB-Puffer (Spur 4), D-43787 (100 µM) (Spur 5), CsA (10 µM) (Spur 6), CsA (10 µM) (Spur 7) oder 0.1 % SDS (Spur 8) eluiert. Eine TCA Fällung der Eluate wurde im 4-12% NuPAGE Gel separiert und mit Silber angefärbt. In der rechten Spur ist der Molekulargewichtsstandard gezeigt.

In der Kernfraktion von humanen Jurkat-T-Zellen konnten keine spezifischen Bindungsproteine für D-43787 nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu bindet die trägerfixierte Substanz scheinbar bevorzugt hCyp18 aus dem Zytosol (siehe Abbildung 52). Im Vergleich zur CsA-Sepharose beträgt die an D-43787 gebundene Menge an hCyp18 nur ca. 1/3 (nicht gezeigt), ein Befund, der infolge des 10^4 -fachen Affinitätsvorteil für CsA erstaunlich ist. Auch hCypB konnte mittels Westernblot in der mit D-43787 eluierten Fraktion nachgewiesen werden (nicht gezeigt). Bei den darüber hinaus eluierten Proteinen handelt es sich scheinbar nicht um Cyclophline, da keine immunologische Kreuzreaktivität mit einem polyklonalen Antikörper gegen eine Cyclophilin-Konsensussequenz nachweisbar war. Beim Einsatz größerer Zellmengen könnte die Identifizierung dieser anderen Bindeproteine mit Hilfe der Massenspektroskopie und des Edman-Abbaus gelingen.

In den CsA- und D-43787-Experimenten mussten aus Synthesegründen unterschiedliche Matrices verwendet werden. Für die Kopplung von CsA wird in der Literatur Sepharose bevorzugt, eine auf Dextranen-basierende Matrix, während D-43787 an hydrophobere Harze gekoppelt war. Daher sollte ausgeschlossen werden, dass die beobachteten Bindungen von Cyclophilinen nicht nur an die hydrophoben Plastikoberflächen erfolgen, sondern tatsächlich substanzvermittelt sind.

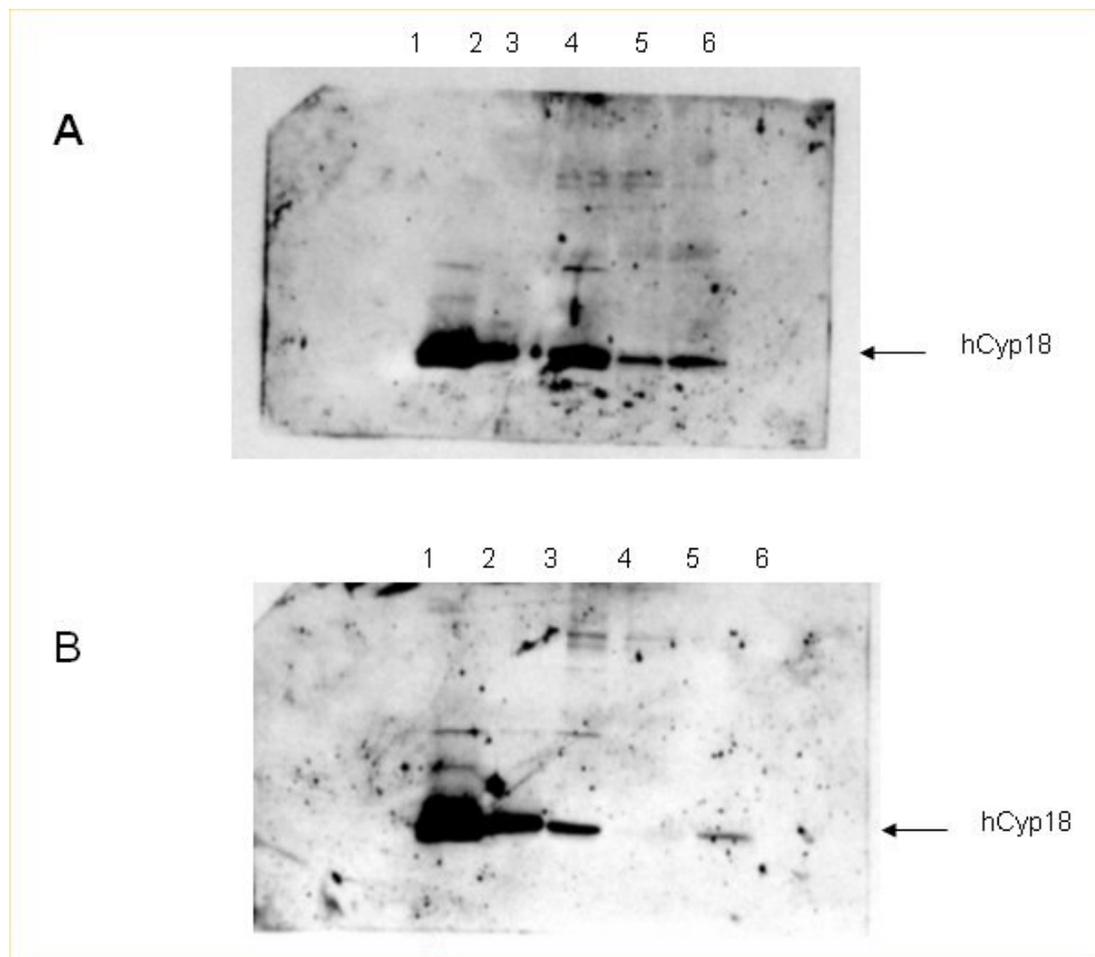


Abb. 53: Konkurrenz der Bindung von hCyp18 an trägerfixiertes D-43787 durch Präinkubation mit der löslichen Substanz (Cytosol von humanen Jurkat-T-Zellen wurde mit DMSO (A) oder $20 \mu\text{M}$ D-43787 (B) für 1 Std bei 4°C präinkubiert und analog obigem Experiment aufgearbeitet. An trägerfixiertes D-43787 gebundene Proteine wurden eluiert mit Lysis-Puffer (Spur 1), NEB-Puffer (Spur 2,3), D-43787 ($100 \mu\text{M}$) (Spur 4), CsA ($10 \mu\text{M}$) (Spur 5) und 0.1% SDS (Spur 6). Die TCA-gefällten Eluate wurden im Westernblot mit einem spezifischen anti-Cyp18 Antikörper unter Verwendung des ECL-Systems analysiert.

Wie in Abbildung 53 zu sehen ist, wird durch eine Präinkubation des Zytosols mit löslichem D-43787 die Menge an gebundenem hCyp18 signifikant reduziert. Damit konnte in unabhängigen Experimenten nachgewiesen werden, dass insbesondere hCyp18 ein potentielles Bindungsprotein für D-43787 ist und dessen Bindung nicht durch die Oberflächenstruktur der Trägermatrix vermittelt wird.

Für die immunsuppressiven Effekte von CsA ist es notwendig, dass sich ein Heterokomplex, bestehend aus Cyp18, CsA, Calcineurin/Calmodulin, bildet. In einem weiteren Experiment wurde rhGST-Cyp18 als Presenterprotein eingesetzt, um zu klären, inwieweit ein Teil der beobachteten biologischen Effekte von D-43787 auch über derartige Protein-Komplexe vermittelt wird. D-43787, präinkubiert mit rhGST-Cyp18, wurde über Nacht bei 4 °C mit dem Zytosol von ruhenden oder phorbol-ester-stimulierten Jurkat-T-Zellen inkubiert. Mögliche Proteinkomplexe sollten sich durch differente Elutionspuffer identifizieren lassen. Als Ergebnis konnten bei Differenzmessungen zwischen ruhenden und stimulierten T-Zellen zwar Unterschiede in der Menge der von der Matrix eluierten Proteine festgestellt werden, das Proteinmusters unterschied sich aber nicht voneinander. Durch Zugabe von D-43787 zum Elutionspuffer konnte insbesondere ein Protein im Molekulargewichtsbereich von ca 38 kDa eluiert werden, dessen Menge zur Identifizierung durch Massenspektroskopie und Edman-Abbau leider nicht ausreicht.

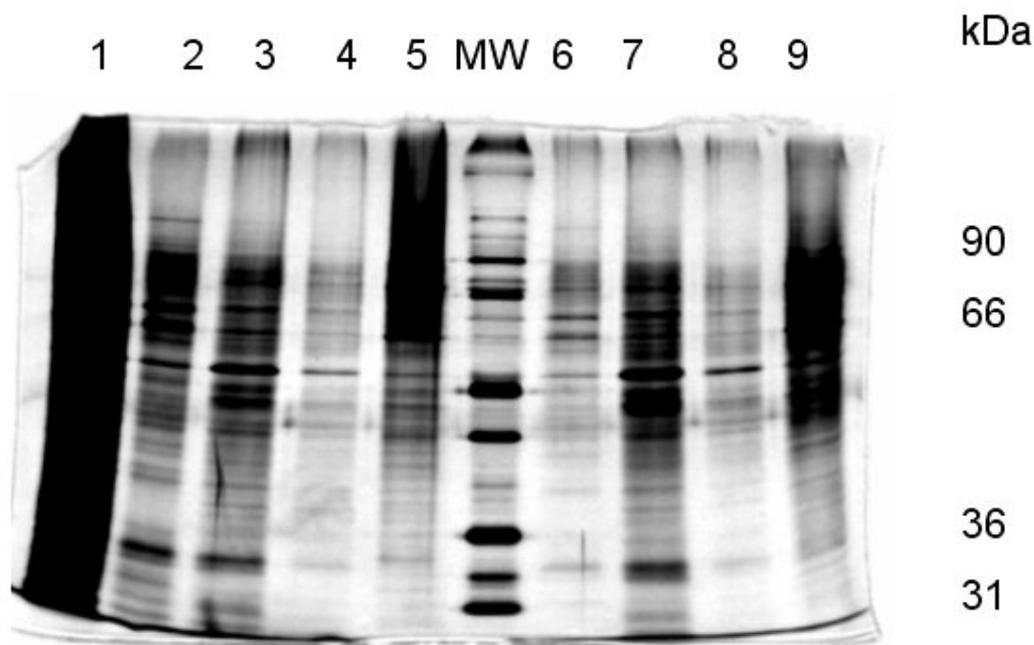


Abb. 54: D-43787 bildet mit rhCyp18 als Presenter-Protein einen Komplex der Proteine aus dem Cytosol von humanen Jurkat-T-Zellen extrahieren kann. Der Komplex D-43787-GST-Cyp18 wurde mit zytosolischem Gesamtprotein (Spur 1, Ausgangsmaterial) von stimulierten (Spur 2-5) bzw. ruhenden T-Zellen inkubiert (Spur 6-9) und intensiv gewaschen. Gebundene Proteine konnten eluiert werden mit NEB-Puffer (Spur 2,6), NEB-Puffer plus 50 μ M D-43787 (Spur 3,7), 2 M Guanidiniumhydrochlorid (Spur 4,8) und 0.5% SDS (Spur 5,9). Die TCA-gefällten Fraktionen wurden im 4-12% NuPAGE Gel separiert und mittels Silberfärbung detektiert.

Die Kontrollexperimente mit rhGST-Cyp18 und CsA zeigten ein anderes Proteinmuster in den eluierten Fraktionen. Im Westernblot konnte bei diesen Experimenten Calcineurin mit den entsprechenden polyklonalen Antikörpern detektiert werden. Die an den Komplex rhGST-Cyp18-D-43787 gebundenen Proteine zeigten keine Kreuzreaktivität mit anti-

Calcineurin-Antikörpern, was in Übereinstimmung mit der fehlenden indirekten Hemmung der Phosphatase-Aktivität durch diese Substanz steht.

6.4.2.7 Die proteolytische Sensitivität von rhCyp18 in Gegenwart von D-43787

Für den Wirkungsmechanismus von Cyclosporin A und unseren Verbindungen in Asthmodellen muss nach den bisherigen Daten eine zur Inhibition von Cyp18 bzw. Calcineurin alternative Möglichkeit existieren:

Verbindungen vom Typ D-43787 inhibieren die Enzymaktivität weiterer T-Zell-eigener Cyclophiline mit weit besserer inhibitorischer Potenz als für Cyp18 gemessen wurde. Verbindungen vom Typ D-43787 binden an Cyp18, allerdings an eine Region außerhalb des aktiven Zentrums und destabilisieren das Enzym gegenüber einem proteolytischen Abbau.

Es konnte bisher gezeigt werden, dass PPlasen durch niedermolekulare Substanzen kovalent und nichtkovalent modifiziert werden, wobei resultierende Konformationsänderungen entweder direkt oder indirekt durch Abbau zum Aktivitätsverlust führen. Solche Reaktionen können sowohl in Zellen als auch im protease-gekoppelten Aktivitätsassay ablaufen. Um die in der Tabelle aufgeführten Inhibitoren (24 Verbindungen) diesbezüglich zu klassifizieren, wurde die proteolytische Sensitivität von rhCyp18 gegenüber den Proteasen Chymotrypsin und Trypsin in Gegenwart dieser Verbindungen analysiert. Unter der Annahme, dass einzelne Inhibitoren die Raumstruktur von rhCyp18 verändern bzw. Modifikationen in das Protein einführen, sollte durch Präinkubation von rhCyp18 mit den Testsubstanzen ein verändertes proteolytisches Spaltungsmuster entstehen, im Vergleich zur Lösungsmittel-behandelten Kontrolle.

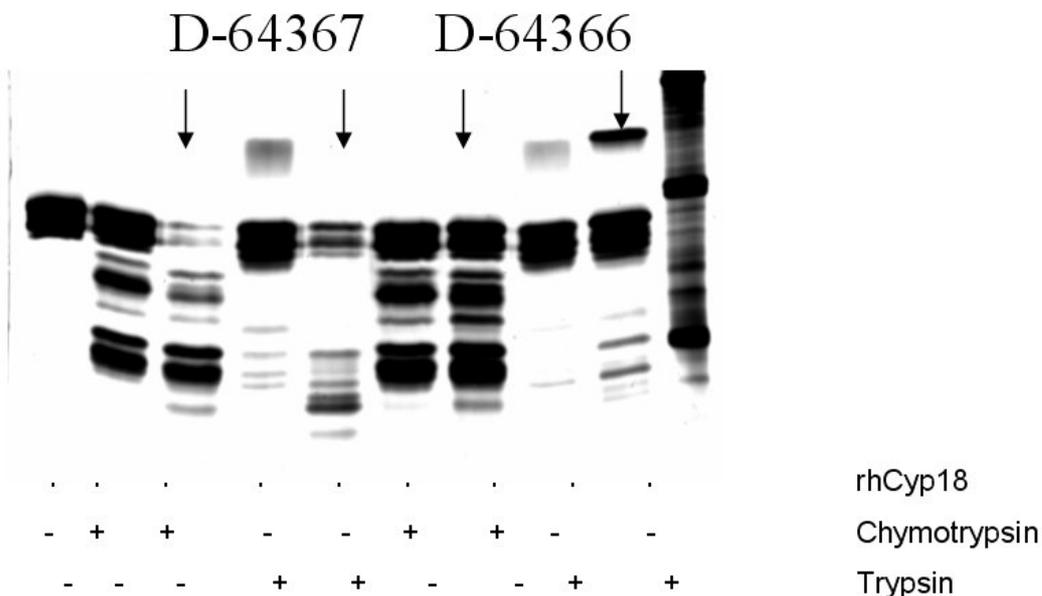


Abb. 55: Beispiel für einen proteolytischen Verdau von rhCyp18 analysiert mit SDS-Gel Elektrophorese in Gegenwart von Wirkstoffen. Rekombinantes hCyp18 (10 µg) wurde mit 20 µM der entsprechenden Verbindungen für 15 min bei 4°C prä-inkubiert. Als Kontrolle diente unbehandeltes rhCyp18 (Spur 1) und das mit DMSO (2%) behandelte Protein (Spur 3, 5, 7, 9). Durch Zugabe von Chymotrypsin (Spur 2,3, 6,7) und Trypsin (Spur 4,5, 8,9) wurde rhCyp18 für 10 min bei 37°C proteolytisch verdaut. Die Reaktion wurde durch Zugabe von Probenpuffer und kochen bei 95°C abgestoppt. Die im 15% SDS-Gel separierten Proben wurden einer Silberfärbung unterzogen. In der rechten Spur ist der Molekulargewichtsstandard.

Aus Vorexperimenten war bekannt, dass rhCyp18 unter den Versuchsbedingungen durch Chymotrypsin teilweise hydrolysiert wird und durch Trypsin nahezu vollständig. Im Ergebnis der Analyse der 24 potentiellen Inhibitoren kann festgestellt werden, dass nur D-64367 und D-68448 das Spaltungsmuster von rhCyp18 verändern. Interessanterweise handelt es sich dabei um Verbindungen, die sowohl die PPlase-Aktivität von rhCyp18 als auch von rhFKBP12 inhibieren. Die Hypothese bezüglich einer möglichen kovalenten Modifikation durch diese Verbindungen konnte in vorläufigen Experimenten bestätigt werden, da eine Reaktivierung von durch D-64367 inaktiviertem rhCyp18 weder durch Verdünnung noch durch Dialyse möglich ist.

6.4.3 Zusammenfassung

Durch Screening einer selektivenkombinatorischen Bibliothek auf Bindung an an die Peptidyl Prolyl *cis/trans* Isomerase CypB konnten einer Reihe von Verbindungen mit Wirkung auf das Immunsystem, speziell auf Asthma, identifiziert werden. Als exemplarische Substanz wurde ein aus der Indolin-2-carbonsäure abgeleitetes Pharmakon, D-43787, eingehender auf eine vom Wirkungsmechanismus des Cyclosporin A abgeleitete biochemische Signalkette untersucht. Dabei kamen zwei rekombinant in aktiver Form hergestellte Cyclophiline zum Einsatz, das prototypische als Cyclosporin A –Rezeptor gehandelte Cyp18 und das im ER lokalisierte CypB. Für Calcineurin wurde ebenfalls ein neuer Assay entwickelt. Im Gegensatz zu Literaturergebnissen zum Cyclosporin A wirkt D-43787 weder direkt noch über einen gain-of-function Mechanismus inhibitorisch auf Calcineurin ein. Ebenfalls ausgeschlossen ist ein Mechanismus, indem D-43787 die PPlase-Aktivität von Cyp18 oder CypB inhibiert. Somit muss für die biologischen Effekte von D-43787 und verwandten Strukturen ein vom Cyclosporin A unterschiedlicher, noch unbekannter Mechanismus angenommen werden. Die Einbindung von Cyclophilinen in die von D-43787 beeinflusste Signalkette wird dadurch evident, dass diese Verbindungsklasse in einem auf die Bindung an CypB basierenden Screen auffällig geworden ist.

6.5 Projektteil der Universität Würzburg, Prof. Sebald

6.5.1 Ziele und Aufgabenstellung

Zum Immunsystem gehören außer diversen Zelltypen mit ihren Rezeptoren auch verschiedene Signalproteine, die sogenannten Cytokine. Immunmodulatorisch wirksame Liganden können die Wirkungen von Cytokinen komplexieren und dadurch die Wechselwirkung zwischen einem zu Diskussion stehenden Cytokin und seinem komplementären Rezeptor beeinflussen. Im Rahmen des Projektes soll auf der Basis hochaufgelösten Kristallstruktur des IL-4 Rezeptorkomplexes (bestehend aus der extrazellulären Domäne der IL-4 Rezeptor α -Kette und dem Liganden IL-4) systematisch zusammengesetzte Verbindungsbibliotheken mit Varianten geringer Molekülmasse durch computergestütztes Modellieren entworfen werden. Hochaffine Liganden sollen durch Proteininteraktions-Analysen auf Bindung und auf Beeinflussung von speziellen Signaltransduktionsstafetten im Immunsystem hin untersucht werden.

Die IL-4R α Kette, die als wesentlicher Rezeptorbestandteil sowohl die Signale des IL-4 als auch die des IL-13 vermittelt, ist ursächlich an der Entstehung und Aufrechterhaltung von Allergien und Asthma beteiligt. Ein "IL-4R α Blocker" verspricht neue Therapieansätze für diese häufigen schwerwiegenden Erkrankungen. Bisher konnten noch keine niedermolekularen Hemmstoffe für IL-4R α gefunden werden. Ein Grund für diesen Misserfolg ist wahrscheinlich das große und komplizierte Bindungssepitop für den Liganden, das nahezu 20 Aminosäurereste umfaßt. Ein möglicher Ausweg ergibt aus strukturellen und funktionellen Untersuchungen, die zeigen, dass das Bindungssepitop aus zwei unabhängigen Bindungsclustern aufgebaut ist. Cluster I ist um Glu 9 und Cluster II um Arg88 des IL-4 aufgebaut. Ziel des Projekts ist eine Struktur-basierte Entwicklung niedermolekularer Wirkstoffe, die an den Rezeptor IL-4R α binden und dadurch die Interaktion mit IL-4 hemmen (IL-4R α Blocker). Dazu sollen die experimentell bestimmten Bindungsdeterminanten für ein Pharmakophor-Design genutzt werden. Der wesentliche neue Ansatz besteht darin, das große gesamte Bindungssepitope in zwei Bindungscluster aufzuteilen, die dann getrennt bearbeitet werden.

Die Kooperation mit dem Institut für Physiologische Chemie II der Universität Würzburg umfaßt den Entwurf von Leitstrukturen auf der Basis hochaufgelöster Raumstrukturen (IL-4R α /IL-4BP und ggf. IL-5R α /IL-5BP), die proteininteraktionsanalytische Untersuchungen dieser Liganden, sowie die funktionale Charakterisierung neuer Hemmstoffe bei der Signalübertragung. Weiterhin war es Ziel des Teilprojekts Reportergentests zu entwickeln, die sich für das Screenen von potentiellen Hemmstoffen und für die Validierung von Kandidatensubstanzen eignen. Die entwickelten Assays sollten in der Lage sein, für interessante Einzelsubstanzen Informationen über molekulare Wirkungsmechanismen zu liefern.

6.5.2. Wissenschaftliche Ergebnisse im Überblick

Zur Findung niedermolekularer Hemmstoffe wurden neue Pharmakophorenmodelle erstellt, die auf der Kristallstruktur des IL-4/IL-4R α -Komplexes basieren. Besondere Berücksichtigung fand hierbei die charakteristische Clusterstruktur des IL-4/IL-4R α -Komplexes. Die Ergebnisse aus umfangreichen Mutagenesestudien wurden in den Modellaufbau einbezogen.

Die Entwicklung der Pharmakophorenmodelle erfolgt in mehreren Schritten. Es wurde ein Pharmakophor sowohl für Cluster I (um Clu 9 des IL-4) als auch für Cluster II (um Arg88 des IL-4) entworfen und optimiert. Die Kriterien waren:

- eine Trefferrate von <0,1% (nach in silicio abzusuchen von Substanz-Datenbanken)
- in Docking Experimenten eine Komplexbildung der gefundenen Substanzen mit IL-4R α Ektodomäne in dem ursprünglich geforderten Bindungsmodus
- eine berechnete Bindungsaffinität dG >20kJoule/mol.

Auf der Basis der Raumstruktur des IL-4/IL4-BP Komplexes und von Mutationsdaten wurden mehrere Pharmakophore sowohl für Cluster I wie für Cluster II entworfen, welche Atomanordnungen der Bindungsdeterminanten des humanen IL-4 wiederspiegeln. Mit jedem der Pharmakophore wurden mehrere Substanzbanken mit im Ganzen 456 407 Verbindungen virtuell abgesucht. Die Verbindungen sind nach Lipinski's "rule-of-5" vorsortiert worden.

Bei der Suche mit dem besten Cluster I Pharmakophor wurden 1526 Treffer erzielt; mit dem Cluster II Pharmakophor 189. Die auffälligen Verbindungen wurden einer Docking Simulation mit dem IL-4 Rezeptor unterzogen. Außer der Geometrie der Rezeptor-gebundenen Verbindung wurde die freie Energie der Bindung berechnet. Nach Durchmusterung der Bindungsmodi jeder Verbindung wurden 20 Cl. I Verbindungen bzw. 76 der Cl. II Verbindungen gekauft. Diese wurden mit der Biacore Technik vermessen. Vier Verbindungen aus der Cl. I Suche und zwei Verbindungen aus der Cl. II Suche waren positiv bei Konzentrationen über 0,1 mM. Allerdings wurde bis 0,75 mM keine Sättigung erreicht. In weiteren Versuchen zeigte sich, dass die beobachtete Bindung nicht spezifisch für den IL-4 Rezeptor war.

Zur Produktion der rekombinanten Proteine IL-5 und IL-5R α wurden entsprechende Expressionsysteme und Aufreinigungsprotokolle etabliert. Allerdings ließen sich im Berichtszeitraum keine Kristalle des IL-5/IL-5R α erhalten, die für eine Röntgenstrukturanalyse geeignet waren.

Folgende Meilensteine wurden erreicht:

- Entwurf von Pharmakophoren für die Bindung an Cluster I und Cluster II des IL-4R α .
- Identifizierung von Verbindungen aus großen Substanzbanken mit den Pharmakophoren als Suchstruktur.
- Verbindungen, die in silicio die erwarteten Interaktionen mit IL-4R α zeigen.

Weitere Einzelheiten zu diesem Thema sind nachfolgend unter dem Titel „Identification of small molecule Interleukin-4 antagonist using a pharmacophore-based *in silico* screening and molecular docking „ausführlich dargelegt.

6.5.3 Identification of small molecule Interleukin-4 antagonist using a pharmacophore-based *in silico* screening and molecular docking

Introduction

Protein-protein interaction (PPI) regulate a large number of important biological functions. Both extracellular and intracellular communications takes advantages of high degree of specificity afforded by these interactions. Cytokine interleukin-4 (IL-4) and its receptor is one such example of important PPI systems. High affinity binding of IL-4 to its cellular receptor⁷⁶ mediated nearly exclusively by the receptor α -chain⁷⁷ is a crucial event for the generation of

⁷⁶ Beckmann, M.P.; Cosman,D.; Fanslow,W.; Maliszewski,C.R.; Lyman, S.D. The interleukin-4 receptor: structure, function, and signal transduction., Chem Immunol. **1992**, *51* :107-34

⁷⁷ Kruse, N.; Shen B.J.; Arnold,S.; Tony,H.P., Muller,T.; Sebald, W. Two distinct functional sites of human interleukin 4 are identified by variants impaired in either receptor binding or receptor activation. *EMBO J* . **1993**, *13*: 5121-9

Th₂ dominated early immune response^{78,79}. The Th₂-type cytokines, IL-4 itself as well as IL-5, and IL-13, recruit and activate IgE producing B cell, eosinophils, and mast cells that tag, attack, and expel parasites in mucosal tissues and in the skin^{80,81}. IL-4 and the same cellular triad exert a pathophysiological role during allergic inflammation associated allergic asthma, rhinitis, conjunctivitis, and dermatitis^{82,83}. IL-4 receptor complex therefore, presents a promising target for immunotherapy of allergic disease.

One important challenge for drug discovery arises from the large surfaces that are characteristics of many of the protein-protein interaction complexes, such as those that are involved in receptor recognition and signal transduction. However, empirical searches for low molecular weight pharmacological inhibitors ($M_r < 500$) have routinely failed. These failure have often been attributed to the large, relatively flat surface areas involved between the interacting proteins. At the face value, the interface between interacting proteins appear too large (1000-2000Å) to be readily disrupted by small pharmacophores that block only a fraction of this interaction surface. However, Wells and co-workers^{84,85} have shown with growth hormone that despite of the large area involved in the structural interface, only a few key functional residues can contribute to the bulk of the binding energy. The failure to empirically find low molecular weight compounds that inhibit PPI highlight the need for a rational approach to the design of antagonists. Several adhoc procedures have shown some success. Sarabu *et al*⁸⁶ have used knowledge of spatial location of residue R4, K93 and F46 in IL-1β to design a small molecule receptor antagonists with IC₅₀ values in the low micromolar range. Some success was obtained by Tien *et al*⁸⁷ who were able to design small molecule mimics of GCSF. Dimeric peptides for erythropoietin and thrombopoietin have been identified from peptide libraries. They comprise approximately 20 amino acid residues, which dimerize by forming disulfide bridge and exhibit intrinsic activity down to nanomolar concentration. The transfer of the IL-4 binding residue to the parallel α helices of a leucine zipper (Gal4) yielded synthetic peptides which bind to the α chain with a micromolar K_d value⁸⁸.

In line with the current pace of X-ray crystallographic technologies as well as advances in the human genome project structural determination of macromolecules are increasing. Structure-based drug design (SBDD) has therefore become more and more important as a rational approach to the discovery of leads and their optimisation^{89,90}. It includes continuously evolving methods such as de novo design, 3D-database mining, and molecular docking. One approach involves defining a three-dimensional pharmacophore model from the direct analysis of the structure of protein/ligand complex and searching a chemical database of

⁷⁸ Seder, R.A.; Paul, W.E. Acquisition of lymphokine-producing phenotype by CD4+ T cells. *Annu Rev Immunol* **1994**, *12*: 635-73

⁷⁹ Mosmann, T.R.; Sad, S. The expanding universe of T-cell subsets: Th1, Th2 and more. *Immunol Today* **1996**, *17*(3) :138-46

⁸⁰ Desreumaux, P.; Capron, M. Eosinophils in allergic reactions. *Curr Opin Immunol*. **1996**, *6* : 790-5

⁸¹ Finkelman, F.D.; Shea-Donohue, T.; Goldhill, J.; Sullivan, C.A.; Morris, S.C.; Madden, K.B.; Gause, W.C.; Urban, J.F. Jr. Cytokine regulation of host defense against parasitic gastrointestinal nematodes: lessons from studies with rodent models. *Annu Rev Immunol*. **1997**, *15*: 505-33

⁸² Romagnani, S. Lymphokine production by human T cells in disease states. *Annu Rev Immunol*. **1994**, *12*: 227-57

⁸³ Drazen, J.M.; Arm, J.P.; Austen, K.F. Sorting out the cytokines of asthma. *J Exp Med*. **1996**, *183* :1-5.

⁸⁴ Wells, J.A. *Biotechnology*. 1995, *13*: 647-652

⁸⁵ Wells, J.A. Binding in the growth hormone receptor complex. *Proc Natl Acad Sci USA*. **1996**, *93*(1) :1-6

⁸⁶ Sarabu, R.; Cooper, J.P.; Cook, C.M.; Gillespie, P.; Perrotta, A.V.; Olson, G.L. Design and synthesis of small molecule interleukin-1 receptor antagonists based on a benzene template. *Drug Des Discov*. **1997**, *15*(3):191-8

⁸⁷ Tian, S.-S.; Lamb, P.; King, A.G.; Miller, S.G.; Kessler, L.; Luengo, J.I.; Averill, L.; Johnson, R.K.; Gleason, J.G.; Pelus, L.M.; Dillon, S.B.; Rosen, J. A. Small, nonpeptidyl mimic of granulocyte-colony-stimulating factor. *Science*. **1998**, *281* (5374) :257-9.

⁸⁸ Domingues, H.; Cregut, D.; Sebald, W.; Oschkinat, H.; Serrano, L. Rational design of a GCN4-derived mimetic of interleukin-4. *Nat Struct Biol*. **1999**, *7*:652-6

⁸⁹ Veerapandian, P., Structure-based drug design. **1997**, *Marcel Dekker Inc.*, New York

⁹⁰ Hicks, S.; Assefa, H.; Sindelar, R. Computer-aided drug design of enzyme inhibitors: recent studies. *Curr. Opin. Drug Discovery Dev*. **1998**, *1*, 223-234

existing compounds for those structures that satisfy the spatial and chemical constraints of the model⁹¹ and may thus elicit desired biological response. Computational tools such as CATALYST⁹² and UNITY3D⁹³ have been utilized successfully to identify novel inhibitors of HIV-integrase⁹⁴, the angiotensin II⁹⁵ and the muscarinic M3 receptor⁹⁶ as well as of many other therapeutically important targets.

In this study we report a rational, stepwise structure-based pharmacophore modeling approach to discover IL-4 antagonists that entails identifying a low molecular weight inhibitors by exploiting the structural knowledge, functional and mutational analysis of the IL-4/IL4- R α interaction. The underlying assumption in this system is that a strong inhibitor interaction involving a few key pharmacophoric groups can antagonize a high-affinity PPI derived from the cumulative affect of a number of low-affinity interaction.

IL-4R α : The target molecule

IL-4R α is a common receptor chain for IL-4 and IL-13 and this is the reason for the large similarity in the effects of these two interleukins. It is known from the binding studies that IL-4 can directly bind to the IL-4 R α ^{97,98,99}. Subsequently, depending on the cell type, a second receptor chain will be recruited to initiate signalling: either γ c^{100,101} or IL-13R α 1^{102,103,104,105}. In contrast, IL-13 binds first to the IL-13R α 1 and subsequently recruits IL-4R α . Despite the

⁹¹ Milne, G.W.; Nicklaus, M.C.; Wang, S. Pharmacophores in drug design and discovery. SAR QSAR Environ Res. 1998, 9(1-2): 23-38

⁹² Insight II, *Accelrys*, San Diego, CA, 1998

⁹³ Legion, *Tripos*, St. Louis, MO, 1998

⁹⁴ Nicklaus, M.C.; Neamati, N.; Hong, H.; Mazumder, A.; Sunder, S.; Chen, J.; Milne, G.W.; Pommier, Y.; HIV-1 integrase pharmacophore: discovery of inhibitors through three-dimensional database searching. *J Med Chem*. 1997, 40(6):920-9

⁹⁵ Kiyama, R.; Honma, T.; Hayashi, K.; Ogawa, M.; Hara, M.; Fujimoto, M.; Fujishita, T. Novel angiotensin II receptor antagonists. Design, synthesis, and in vitro evaluation of dibenzo[a,d]cycloheptene and dibenzo[b,f]oxepin derivatives. Searching for bioisosteres of biphenyltetrazole using a three-dimensional search technique. *J Med Chem*. 1995 38(14):2728-41

⁹⁶ Marriott, D.P.; Dougall, I.G.; Meghani, P.; Liu, Y.J.; Flower, D.R.; Lead generation using pharmacophore mapping and three-dimensional database searching: application to muscarinic M(3) receptor antagonists. *J Med Chem*. 1999, 42: 3210-3216

⁹⁷ Mosley, B.; Beckmann, M.P.; March, C.J.; Idzerda, R.L.; Gimpel, D.; VandenBos, T.; Friend, D.; Alpert, A.; Anderson, D.; Jackson, J.; et al. The murine interleukin-4 receptor: molecular cloning and characterization of secreted and membrane bound forms. *Cell*, 1989, Oct 20;59(2):335-48

⁹⁸ Galizzi JP, Castle B, Djossou O, Harada N, Cabrillat H, Yahia SA, Barrett R, Howard M, Banchereau J. Purification of a 130-kDa T cell glycoprotein that binds human interleukin 4 with high affinity. *J Biol Chem*. 1990, Jan 5;265(1): 439-44

⁹⁹ Idzerda RL, March CJ, Mosley B, Lyman SD, Vanden Bos T, Gimpel SD, Din WS, Grabstein KH, Widmer MB, Park LS, et al. Human interleukin 4 receptor confers biological responsiveness and defines a novel receptor superfamily. *J Exp Med*. 1990, Mar 1;171(3):861-7

¹⁰⁰ Kondo M, Takeshita T, Ishii N, Nakamura M, Watanabe S, Arai K, Sugamura K. Sharing of the interleukin-2 (IL-2) receptor gamma chain between receptors for IL-2 and IL-4. *Science* 1993, Dec 17; 262(5141):1874-7

¹⁰¹ Russell SM, Keegan AD, Harada N, Nakamura Y, Noguchi M, Leland P, Friedmann MC, Miyajima A, Puri RK, Paul WE, et al. Interleukin-2 receptor gamma chain: a functional component of the interleukin-4 receptor. *Science*, 1993, Dec 17;262(5141):1880-3

¹⁰² Hilton DJ, Zhang JG, Metcalf D, Alexander WS, Nicola NA, Willson TA. Cloning and characterization of a binding subunit of the interleukin 13 receptor that is also a component of the interleukin 4 receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996; Jan 9;93(1):497-501

¹⁰³ Aman MJ, Tayebi N, Obiri NI, Puri RK, Modi WS, Leonard WJ. cDNA cloning and characterization of the human interleukin 13 receptor alpha chain. *J Biol Chem*. 1996, Nov 15;271(46):29265-70

¹⁰⁴ Miloux B, Laurent P, Bonnin O, Lupker J, Caput D, Vita N, Ferrara P. Cloning of the human IL-13R alpha1 chain and reconstitution with the IL4R alpha of a functional IL-4/IL-13 receptor complex. *FEBS Lett*. 1997, Jan 20;401(2-3):163-6

¹⁰⁵ Gauchat JF, Schlagenhauf E, Feng NP, Moser R, Yamage M, Jeannin P, Alouani S, Elson G, Notarangelo LD, Wells T, Eugster HP, Bonnefoy JY. A novel 4-kb interleukin-13 receptor alpha mRNA expressed in human B, T, and endothelial cells encoding an alternate type-II interleukin-4/interleukin-13 receptor. *Eur J Immunol*. 1997 Apr;27(4):971-8

differing sequence of association to the receptor chain, IL-4 and IL-13 both use the same IL-4 R α / IL-13R α 1 heterodimeric receptor complex^{106,107}.

A particular suitable target for IL-4/IL-13 inhibition seems to be IL-4R α . The receptor is essential for both the cytokines and as a consequence both cytokines will be inhibited. Inhibiting the ligands directly, however would only affect one of the two cytokines. Also, since the sequences of IL-4 and IL-13 only exhibit 25% sequence homology there is almost no chance of developing bispecific inhibitors. Soluble variants of the receptors merely recognize one of the cytokines: separated IL-4R α solely binds IL-4, separated IL-13R α 1 solely binds IL-13, and separated γ c does not bind to either of the ligand. Moreover, IL-4R α is expressed in the lung¹⁰⁸ and could therefore be targeted locally. There is little evidence that IL-4R α controls important lung immune responses other than those underlying allergy and its blockade might therefore have few negative consequences for the host. Furthermore, cytokine receptors are expressed primarily on the cell surface, they are well suited to blockade using small molecules.

The mechanism of protein/protein interaction : Basis for pharmacophore based modeling

A rational understanding of the inhibition in the IL-4/IL-13 system require a structural understanding of its components. Molecular recognition of the ligand within the IL-4R α chain is solely mediated by its 207 amino acid residues that comprise the extra-cellular domain, so called IL-4 binding protein (IL4-BP). It can be expressed as a separate protein and exhibits the same binding affinity, specificity, and association constant of IL-4 binding as the entire receptor α chain ($K_d \approx 150$ pm, $K_{on} \approx 10^7$ M⁻¹S⁻¹^{109,110}). The X-ray crystal structure of the binary complex of IL4-BP and IL-4 has been determined (Pdb 1IAR). The structural binding epitope comprises of 18 amino acid residues on each of the binding partners and as a whole has a surface area of about 800Å² on each binding partner. The knowledge of the 3-D structure and spatial arrangements of the binding partners and their molecular interactions in the binary complex together with the mutation and quantitative interaction analysis provide a suitable foundation for designing IL-4 antagonist. Below is the description of how the important features for IL-4 binding to the IL4-BP are borne out in the X-ray crystallographic structure¹¹¹ :

- (i) The complex of IL-4/IL4-BP highlights a mosaic like structure comprising of three distinct clusters of interacting residues.
- (ii) Cluster I is arranged around Glu9 of IL-4. Its carboxylate group accepts three bonds from residues Tyr13, Tyr183(hydroxyl group), and Ser70(main chain amide group) of the binding protein. The geometrically perfect arrangement seems to be pre-orientated by an intermolecular bond to IL-4 Asn89 and is further completed by interaction between Thr6, Lys12, Thr13 and Asn89 of IL-4 and Ser70, Tyr183, Tyr127, and Ala 71 of IL4-BP.
- (iii) A single water molecule is locked in the contact area and forms a hydrogen-bonding interaction between IL-4 Asn89 and IL4-BP-Tyr127.

¹⁰⁶ Chomarat P, Banchereau J. Interleukin-4 and interleukin-13: their similarities and discrepancies. *Int Rev Immunol.* 1998, 17(1-4):1-52

¹⁰⁷ Duschl A, Sebald W. Transmembrane and intracellular signalling by interleukin-4: receptor dimerization and beyond. *Eur Cytokine Netw.* 1996, 7(1):37-49

¹⁰⁸ Izuhara K, Umeshita-Suyama R, Akaiwa M, Shirakawa T, Deichmann KA, Arima K, Hamasaki N, Hopkin JM. Recent advances in understanding how interleukin 13 signals are involved in the pathogenesis of bronchial asthma. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 2000, 48(6):505-12

¹⁰⁹ Hoffman RC, Castner BJ, Gerhart M, Gibson MG, Rasmussen BD, March CJ, Weatherbee J, Tsang M, Gustchina A, Schalk-Hihi C, et al. Direct evidence of a heterotrimeric complex of human interleukin-4 with its receptors. *Protein Sci.* 1995; 4(3):382-6

¹¹⁰ Shen BJ, Hage T, Sebald W. Global and local determinants for the kinetics of interleukin-4/interleukin-4 receptor alpha chain interaction. A biosensor study employing recombinant interleukin-4-binding protein. *Eur J Biochem.* 1996;240(1):252-61

¹¹¹ Hage T, Sebald W, Reinemer P. Crystal structure of the interleukin-4/receptor alpha chain complex reveals a mosaic binding interface. *Cell.* 1999;97(2):271-81

(iv) The network of polar interaction is surrounded by aromatic and aliphatic side chains. IL-4 Glu-9 has van der Waals contacts with Ile5, Lys12, and Thr13 of IL-4, packs flat against the side chain of IL4-BP-Tyr127 and its carboxylate group is encased by side chains of Tyr13, Tyr183, Val69 and Ala70 of the binding protein (Figure-56)

(v) Cluster II is assembled around the central salt bridge that links IL-4 Arg88 and IL4-BP-Asp72. The guanidino and carboxylate group are oriented in the same plane and align edge to edge through two hydrogen bonds. Asp72 seem to be completely buried at the base of a cleft in the surface of the binding protein. IL-4 Arg88, however, completely stands out from the surface of IL-4 and is situated between the side chains of Val69 and Phe41 in the complex (Figure-56b)

(vi) Cluster III is dominated by electrostatic interactions and seem to have only minor functional significance in the stabilization of the complex.

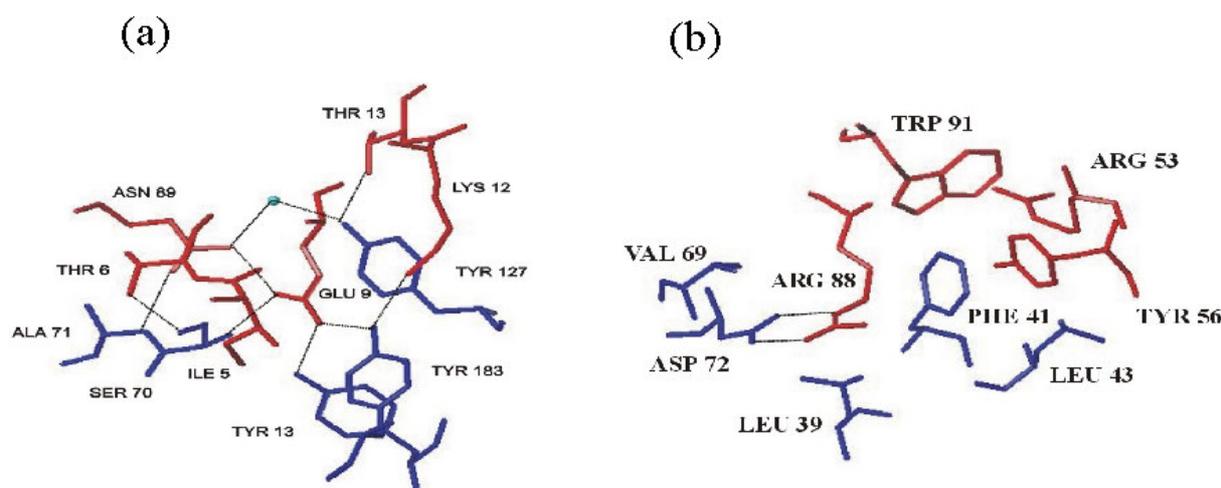


Fig. 56: Details of IL-4/IL4-BP contacts. (a) Cluster I and (b) Cluster II.

The main determinants of the binding affinity of IL-4 are the residue Glu9 and Arg88, which are the central residues embedded in clusters I and II respectively (Figure 56a & b). Both residues are equally important for structure and function and together are responsible for a large portion of the whole binding affinity. Other important residues involved in the binding interaction are IL-4 Ile5, Thr13 and Asn89 (cluster I) and IL-4 Arg53 and Tyr56 (cluster II). Mutations of Glu9 and Arg88 result in a loss of binding affinity of two to three orders of magnitude and mutations of peripheral amino acid residues, however, only lead to a loss of binding affinity of one order of magnitude. All mutations in cluster III of IL-4 show hardly any effect on binding, but influence their rate of association. In regard to the mosaic structure with two important independently binding clusters I and II, it may be possible to find low affinity ligands for each of the two cluster independently and subsequently link them to form a high affinity ligand.

Taken together, the mutational interaction analysis and the 3D-structural features of the IL-4 binding site are exploited in our structure-based pharmacophore model building. Coordinates of atoms that are essential for binding in the IL-4/IL4-BP crystallographic complex were used to construct pharmacophore model for 3-D database searching.

Experimental Procedure: UNITY3D pharmacophore construction and database searching

A pharmacophore model consists of a collection of features necessary for the biological activity of the ligands arranged in 3-D space¹¹². In the present study IL-4 pharmacophore

¹¹² Gund, P.; Three-dimensional pharmacophoric pattern searching. Progress in molecular and subcellular biology, Hahn, F.E., ed.; Springer-Verlag; New York, 1997, Vol5, 117-143

atoms are placed manually, guided by the protein X-ray structure using UNITY3D¹¹³. Two different models each for cluster I and Cluster II were proposed. In cluster I model, important atoms involved in binding from residues Glu9, Ile5 and Thr13 were incorporated in model building, while in cluster II model, important atoms from the residues Arg88, Arg53 and Tyr56 were used in the pharmacophore model. In addition to the pharmacophoric points derived from the IL-4 structure, we also used distance constraints between different pharmacophoric atoms to define the pharmacophore model (Figs. 57a & 57b). These model in turn are used as database queries to search 3D-coordinate database for structurally novel ligand.

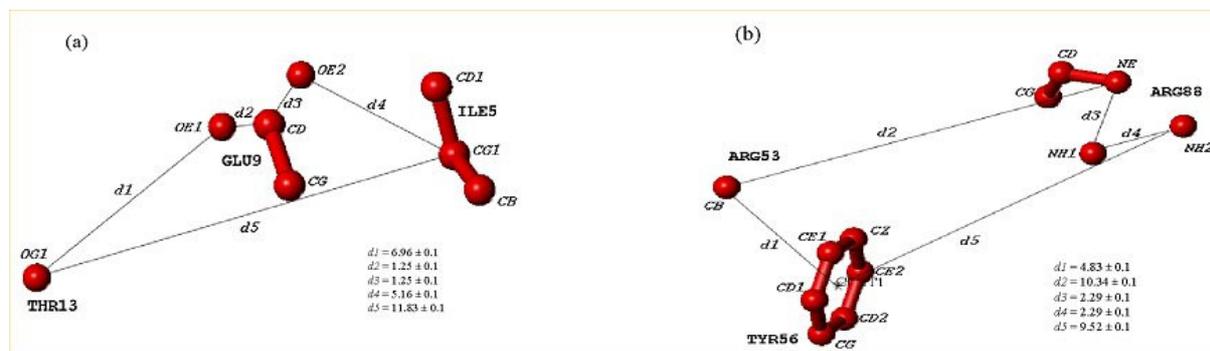


Abb. 57: Pharmacophore model- (a) Cluster I and (b) Cluster II.

Search entries for our analysis were taken from the Maybridge (61184 entries), NCI_2000 (235483 entries) and the Interbioscreen (159740 entries) databases. Maybridge and NCI_2000 3D-coordinate databases were used as supplied by TRIPOS with UNITY3D version 4.3. The 3-D structures of Interbioscreen database were first translated from 2-D database and subsequently imported into the UNITY database system using CONCORD¹¹⁴. To be retrieved as a hit, a candidate ligand must possess appropriate functional atoms/group consistent with the predefined pharmacophore criteria. Databases searching was performed with the UNITY3D flex search method using directed tweak algorithm, which manipulates the conformers so as to minimize the distance between pharmacophore features and mapped atoms in the molecule¹¹⁵. Van der waals bump-checking was used to reject energetically unrealistic conformation during search and “druglikeness” of each retrieved compound was characterized by the application of Lipinski “Rules-of-5”¹¹⁶ filter (molecular weight ≤ 500 , hydrogen bond acceptor ≤ 10 , hydrogen bond donor ≤ 5 , MlogP ≤ 5 , compounds were discarded if not satisfying at least two of the conditions).

Hardware and Softwares

A Silicon Graphics Octane (R10000 195 MHz Processor) computer with the IRIX6.5 operating system was used for running all programs. Sybyl 6.8 software package¹¹⁷ with Biopolymer and Molcad modules was used for visualisation and manipulation of molecular structures. FlexX with an interface to Sybyl was used as a molecular docking program. Unity

¹¹³ UNITY® 4.2.1 Tripos Inc., 1699 South Hanley Rd., St. Louis, Missouri, 63144, USA

¹¹⁴ CONCORD, R.S. Pearlman, "Concord User's Manual," distributed by Tripos Inc., St. Louis, MO

¹¹⁵ UNITY® 4.2.1 Tripos Inc., 1699 South Hanley Rd., St. Louis, Missouri, 63144, USA

¹¹⁶ Lipinski CA, Lombardo F, Dominy BW, Feeney PJ. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Adv Drug Deliv Rev.* **2001**, Mar 1;46(1-3):3-26

¹¹⁷ SYBYL® 6.8 Tripos Inc., 1699 South Hanley Rd., St. Louis, Missouri, 63144, USA

4.3 program was used for pharmacophore model generation and retrieval of compounds and Concord 4.0.6 was used for generation of 3-D coordinates of compounds.

Results and discussion

3D Database search results

The search of NCI_2000, Maybridge and Interbioscreen databases using cluster I pharmacophore query shown in Figure-57a yielded 1526 hits and 189 entries satisfied the cluster II pharmacophore query (Figure-57b) in UNITY3D through a flexible search.

Molecular modeling:

(a) Cluster I

The IL4-BP model for flexible docking was taken from the high resolution X-ray structure of the IL-4/IL4-BP¹¹⁸ without further modifications, i.e, the model neither underwent additional minimization nor were any side chain conformations changed. The set of 1526 molecules retrieved by cluster I pharmacophore model search served as an input to FlexX for flexible docking into a binding site on IL4-BP to identify small molecules which might bind to IL4-BP and thereby aid in blocking the interaction with IL-4. The binding site was defined as set of cluster-I IL4-BP residues involved in binding with IL-4. Sybyl was used to generate an active site file which contains all residues of the IL4-BP cluster-I binding epitope. The small molecule conformations for each compound generated by FlexX using standard FlexX scoring functions were clustered by an rmsd of 2.3Å and each best scoring pose within a cluster was saved as the cluster representative. The final docked binding modes in IL4-BP were ranked for their expected binding affinity by regression-based scoring function implemented in FlexX. The free binding energy of a protein ligand complex is estimated in FlexX as the sum of free energy contributions from hydrogen bonds, ion-pair interactions, hydrophobic and π stacking interactions of aromatic groups, and lipophilic interactions.

Visual inspection of the suggested binding modes of FlexX (using the sybyl program and stereoscopic eyewears), together with the scoring values of FlexX was used to select a small set of compounds for ordering and subsequent biological testing. The following criteria were considered in the visual inspection to further select prospective hits from the list :

(1) presence of carboxylate group functionality in the ligand which we believed might serve as an important carboxylate group mimic of Glu9.

(2) degree of occupancy of the hydrophobic pocket comprised by Y13, Y127 and Y183 at the cluster-I binding interface and formation of important hydrogen bonds as observed in IL-4/IL4-BP complex.

(3) analysis of all the saved conformation of all docked ligands using a distance-based filter defining that ligand must interact with the residue Y13/V69/S70/Y127/Y183.

Our selection resulted in the 28 compounds listed in table-1, of which 2 were purchased from Maybridge¹¹⁹, 6 were ordered from Interbioscreen¹²⁰, and the remaining 20 compounds were requested from NCI¹²¹, however, only 12 samples out of these 20 NCI compounds were available for testing. All these compounds had a molecular weight ranging from 274 to 582 Da, and the number of rotatable bonds varied from 8 to 25. The number of hydrogen bond acceptors and donors varied from 4 to 7 and from 1 to 5 respectively.

Affinity measurements of IL4-BP with the potential cluster-I inhibitors using Biacore revealed no binding for the compounds **1-7**, **9-14** and **18-20** (Table-36). This is not unexpected and is

¹¹⁸ Hage T, Sebald W, Reinemer P. Crystal structure of the interleukin-4/receptor alpha chain complex reveals a mosaic binding interface. *Cell*. **1999**;97(2):271-81

¹¹⁹ Maybridge, Co. Lt., Trevillet, Tintagel, Cornwall PL30HW, U.K.

¹²⁰ Interbioscreen Ltd., 121019 Moscow, P.O. Box 218, Moscow, Russia

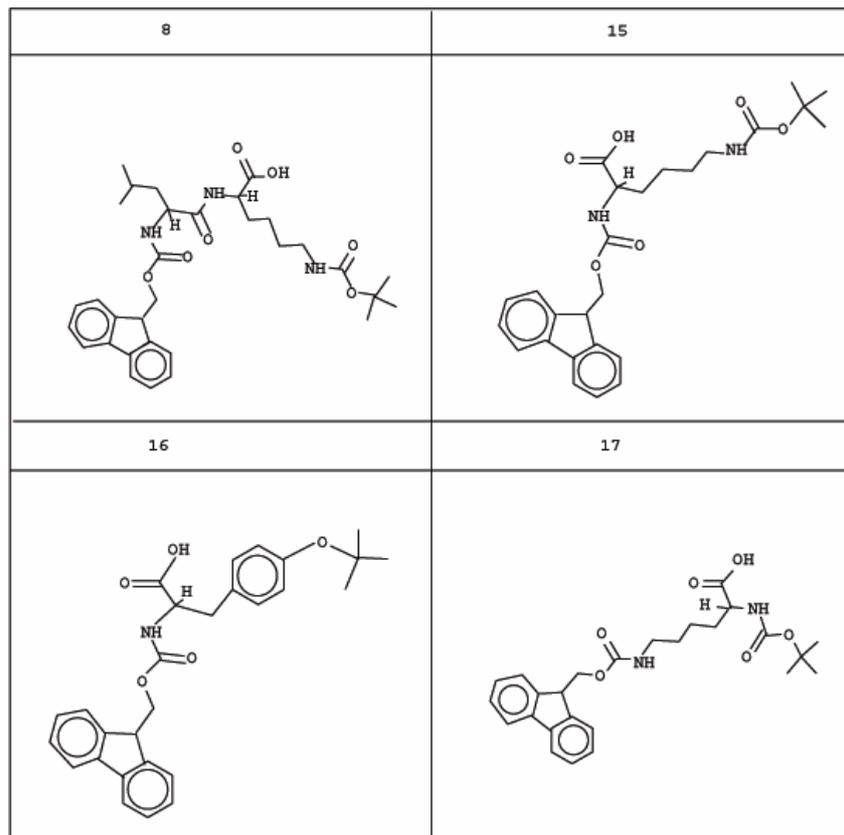
¹²¹ NCI, Developmental therapeutics program NCI/NIH. 6130 Executive Blvd #8032, Rockville, MD 20852

common drawback of in silico screening as the produced possible binding modes do not necessarily reflect real binding. For this reason hits from virtual screening must be verified by other methods. Compounds **8,15,16** and **17** (Table-35 & Figure-58), however, showed responses in the initial assays, indicating binding of these compounds to IL4-BP.

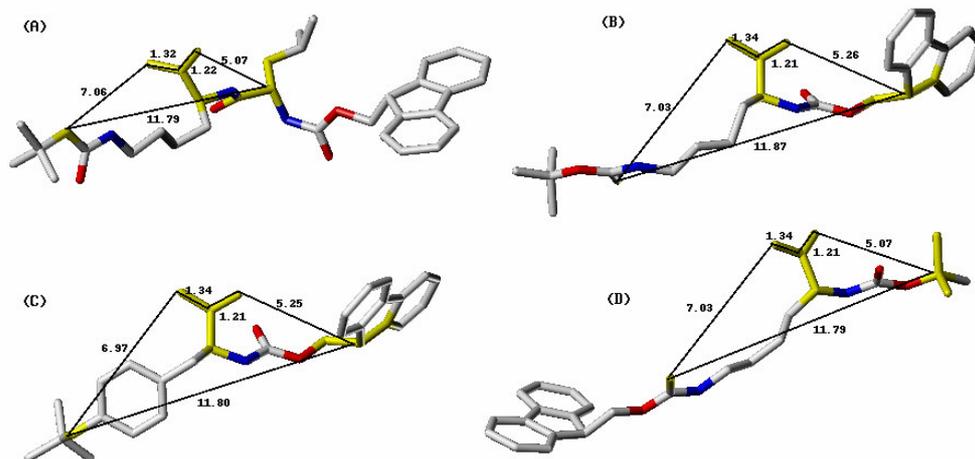
Analyses of the IL4-BP residues involved in the binding of Fmoc compounds **8,15,16** and **17**, as revealed by molecular modeling predictions (Figures-59 & 60), show that they bind in different modes, however, the binding region is in a similar location to that responsible for interaction with IL-4. The carboxylate groups of these docked compounds were able to make almost all the interactions made by the Glu-9 carboxylate moiety in the X-ray structure of IL-4/IL4-BP. They fit well into the large cluster I binding epitope, with good steric complementarity between ligands and receptor surface. The carboxylates were encircled by the side chains of receptor Tyr-13, Tyr-183, Val-69 and Ser-70 and were predicted by molecular docking to be involved in an intricate network of hydrogen bonding interaction accepting three bonds from residues Tyr-13, Tyr-183 (hydroxyl groups) and main chain amide group of Ser-70 (Fig-58 & Table-37). Carbonyl oxygen of the Fmoc group of compound **15** was also involved in a hydrogen bond with the amide nitrogen of Ser70, whereas main chain nitrogen atoms of the compounds **8, 16**, and **17** accepts additional hydrogen bonds from hydroxyl group of Tyr183. Only compound **8** was predicted to be involved in forming a Hydrogen bond with Tyr127 as observed in IL-4/IL4-BP complex. However, the exact interactions corresponding to pharmacophore atoms from the residues Ile-5 and Thr-13 differed from compound to compound. Judging from the docking structures, it appears that the ligand atoms corresponding to these pharmacophore atoms would not have all of the favourable interactions with Ser-70 and Ser-93 in the original conformation registered in the PDB. In compounds **8** and **16**, the regions corresponding to IL-4 Ile-5 (CB,CG,CD), methyl pentanoyl and Fmoc groups respectively were found to be involved in mostly hydrophobic interactions with Tyr-127, His-131 and Tyr-183, whereas the same region in the compound 15 (Fmoc group) was interacting with residues Val-69 , ser-70 and Tyr-127. Ligand oxygen atoms mapping to IL-4 Thr-13 OG1 were found to have similar receptor interactions with Tyr-127, with the exception of compound **17**.

Compound	Database	Molecular weight	Rotable bonds	LogP*	RMS (Å) fit to pharmacophore query	Binding Free Energy (kJ/mol)
1:STOCK1N-05434	Interbioscreen	391.38	14	-	0.07	-24.70
2:STOCK1S-00332	Interbioscreen	398.46	8	-	0.07	-23.10
3:STOCK1N-09796	Interbioscreen	473.48	12	-	0.07	-17.60
4:STOCK1N-09880	Interbioscreen	456.54	19	-	0.08	-16.90
5:STOCK1N-06672	Interbioscreen	347.37	12	-	0.08	-16.40
6:STOCK1N-11058	Interbioscreen	349.43	16	-	0.07	-14.60
7:BTB-15187	Maybridge	414.46	16	-	0.06	-22.80
8:JFD-02953	Maybridge	581.71	25	-	0.06	-21.00
9:NSC-3198	NCI	476.56	17	1.83	0.06	-18.80
10:NSC-691231	NCI	413.43	18	-	0.08	-18.20
11:NSC-356814	NCI	385.44	15	0.26	0.06	-17.50
12:NSC-333757	NCI	428.49	17	3.27	0.07	-16.60
13:NSC-523821	NCI	310.31	13	-0.87	0.07	-15.80
14:NSC-333761	NCI	428.49	17	3.27	0.07	-15.80
15:NSC-334302	NCI	468.55	18	4.90	0.07	-15.60
16:NSC-334301	NCI	459.54	14	6.10	0.06	-14.50
17:NSC-342209	NCI	468.55	18	4.90	0.07	-13.40
18:NSC-164052	NCI	346.42	20	2.95	0.07	-12.20
19:NSC-334941	NCI	380.44	18	3.29	0.07	-12.10
20:NSC-334077	NCI	274.32	15	0.49	0.07	-11.50

Tab. 34: Data of compound selected for cluster-I functional analysis. *Reference Enhanced NCI database browser release 2.



Tab. 35: Chemical structures of active compounds. (Cluster-I)

Abb. 58: Mapping of compounds **8** (A), **15** (B), **16**(C) and **17**(D) on to the pharmacophore model shown in figure 2(a). Atoms shown in yellow corresponds to the IL-4 atoms used in the pharmacophore query.

1	2	3	4
5	6	7	9
10	11	12	13
14	18	19	20

Tab. 36: Chemical structures of inactive compounds (Cluster 1)

Mol ID	Contacts in binding site (Å)					
	S70N	Y13OH	Y127OH	Y183OH	Y127O	A71N
8	3.02 ^a	3.19 ^a	3.01 ^b	2.90 ^a 2.80 ^b 2.89 ^b	-	-
15	3.17 ^a 2.67 ^b	2.71 ^a	-	2.62 ^a	3.07 ^b	2.53 ^b
16	2.82 ^a	2.78 ^a	-	2.41 ^a 2.67 ^b	-	2.29 ^b
17	3.14 ^a	2.96 ^a	-	2.56 ^a 2.62 ^b	-	-

^a Bond distances involving the carboxyl moiety of ligands.

^b Bond distances with the backbone N and O atoms of the ligands.

Tab. 37: Important Protein-small molecule H-bond contact distances (Cluster-I)

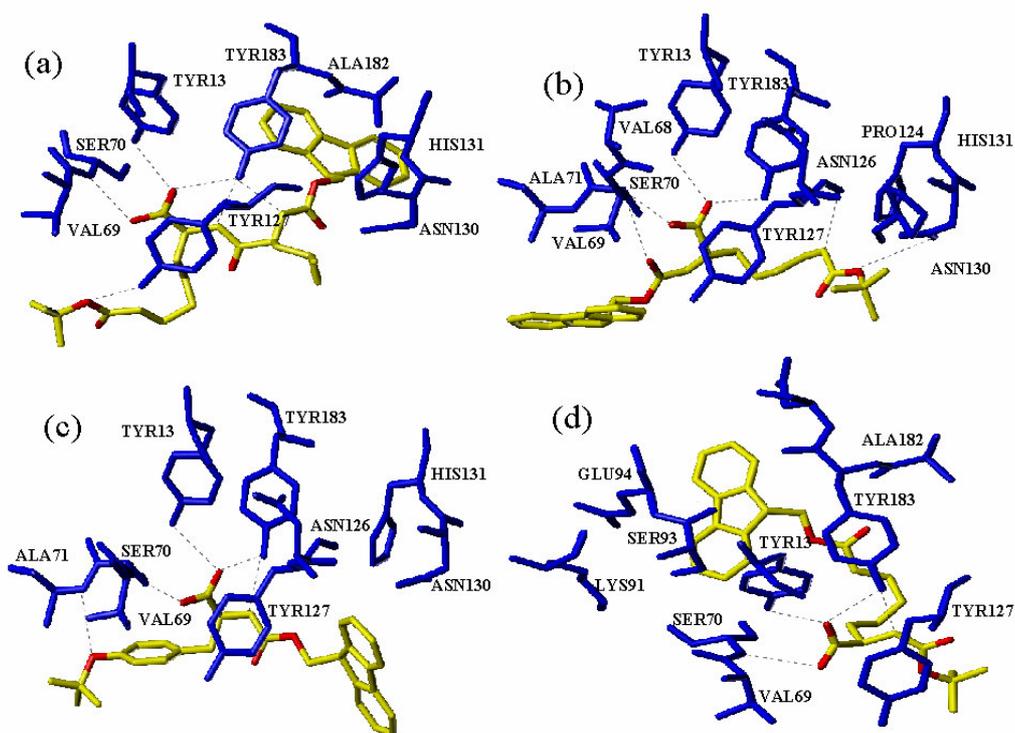
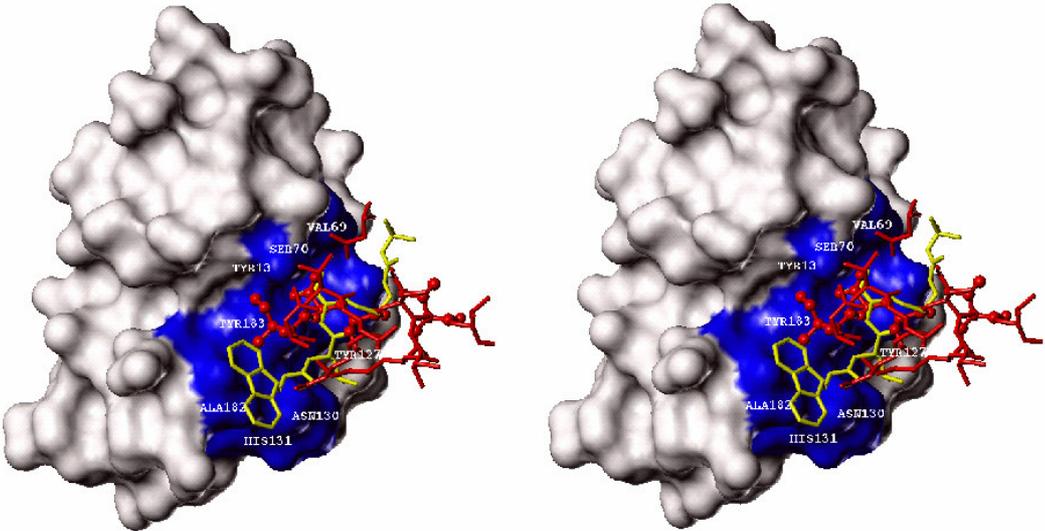
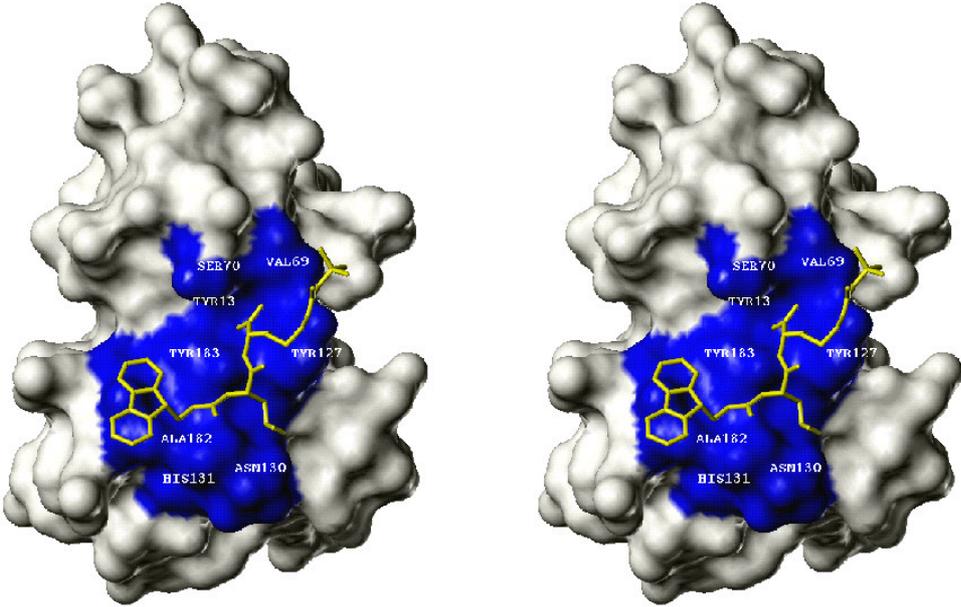


Abb. 59: Docked orientations and details of contacts of (a) **8**, (b) **15**, (c) **16**, and (d) **17**. IL4-BP residues $\leq 4.5\text{\AA}$ distance from the ligand are shown in blue.

(a)



(b)



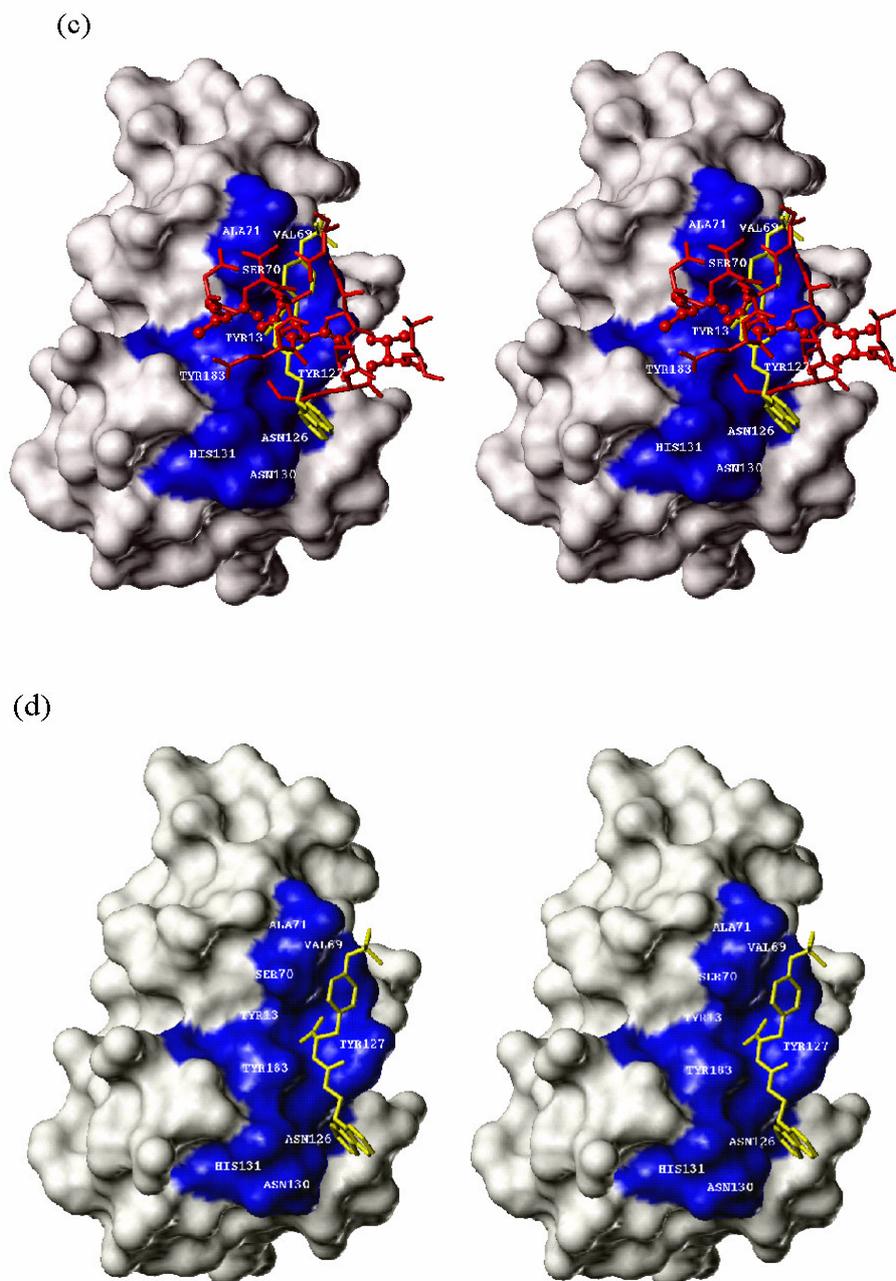


Abb. 60 : Surface plot of IL4-BP (Cluster-I) as resolved by X-ray crystallography³⁶ superimposed with the docking result of Compounds (a) **8** and (c) **16** shown in yellow, with the interface residues of the IL-4/IL4-BP complex. IL-4 is shown in red. Three IL-4 residues (from left to right Ile-5, Glu-9 and Thr-13) most essential for interactions with IL4-BP and used in pharmacophore query are shown as red balls. Residues ≤ 4.5 Å distance from the ligand are coloured blue. (b) & (d) A close up of the IL4-BP and compound **8** and **16** respectively.

(b) Cluster II :

The binding site for cluster-II FlexX flexible docking was generated by Sybyl and contained all residues of the IL4-BP Cluster-II binding epitope. The set of 189 entries identified by 3-D database search of Cluster-II pharmacophore query served as an input for docking. Rest of the docking method was followed as described in cluster-I molecular modeling section. Putative ligand bearing pharmacophoric atoms (corresponding to Arg88 guanidino atoms) and forming important hydrogen bonds as observed in the IL-4/IL4-BP complex were selected for biological assay. Also a distance-based filter was used to select from only those compounds that interacts with residues L39/P41/D67/D72. As a result 7 compounds shown in table-37, were selected for Cluster-II functional analysis, out of which 4 were purchased from Interbioscreen and the rest 3 were provided by the NCI. These compounds had a molecular weight ranging from 330 to 564 Da and the rotatable bonds range from 9 to 21. The number of hydrogen bond acceptors and donors varied from 1 to 6 and 4 to 5 respectively.

Compound	Database	Molecular weight	Rotatable bonds	logP	RMS (Å) fit to pharmacophore query	Binding Free Energy (kJ/mol)
1a: STOCK1S-82266	Interbioscreen	564.00	9	-	0.07	-23.40
2a: STOCK1N-05323	Interbioscreen	466.49	15	-	0.08	-15.60
3a: STOCK1N-71862	Interbioscreen	329.85	12	-	0.07	-15.00
4a: STOCK1N-09865	Interbioscreen	434.54	21	-	0.07	-14.50
5a: NSC-128575	NCI_2000	552.64	12	2.89	0.07	-18.30
6a: NSC-333595	NCI_2000	363.41	16	-	0.07	-17.50
7a: NSC-128573	NCI_2000	510.56	9	1.15 2.94	0.06	-23.60

Tabelle 38: Data of compound selected for cluster II functional analysis.

Analysis of IL4-BP residues involved in binding of compounds **5a**, **6a**, and **7a**, as predicted by molecular modeling (Figures- 61 & 62), show that they occupy nearly the same binding region that is responsible for interaction with IL-4. Because of the high structural similarity of compounds **5a** and **7a** (dihydrotriazine derivatives), they appear to bind similarly to IL4-BP except that their benzenesulfonyl fluoride groups corresponding to IL-4 Tyr-56 aromatic ring are oriented in different directions and therefore, differed in their interactions with IL4-BP. This group in **7a** was surrounded by receptor Leu-39, Leu-43, Ser-44, Glu-45 and His-47 and was closer to its equivalent IL-4 Tyr-56 position as compared to the corresponding group in **5a** which was found to be mostly interacting with receptor Ser-15, Leu-64, Met-65 and Asp-66. The diamino-dimethyl-triazine groups mapping to IL-4 Arg-88 guanidine groups are placed at the equivalent position at IL4-BP interface and appear to mimic their functionality. Two nitrogen atoms of these groups and the carboxylate moieties of Asp-72 were oriented in plane and involved in formation of two hydrogen bonds (Table 41). However, the ligand interactions corresponding to IL-4 Arg-53 with Phe-41 and Leu-43 were not observed in these compounds. For compound **6a**, a completely different pattern of binding mode was suggested by docking. The guanidino group of the compound was not placed at the required position, instead two main chain nitrogen atoms were involved in hydrogen bonds with the Asp-72 carboxylate.

MOL ID	Contacts in binding site (Å)				
	D72OD1 D67N	D72OD2 D67O	D66N		
5a	^{2.47}	2.46	2.36	3.01	-
6a	^{2.90}	2.66	-	-	2.66
7a	2.73	2.46	-	-	3.02

Tab. 41: Important Protein-small molecule H-bond contact distances (Cluster II).

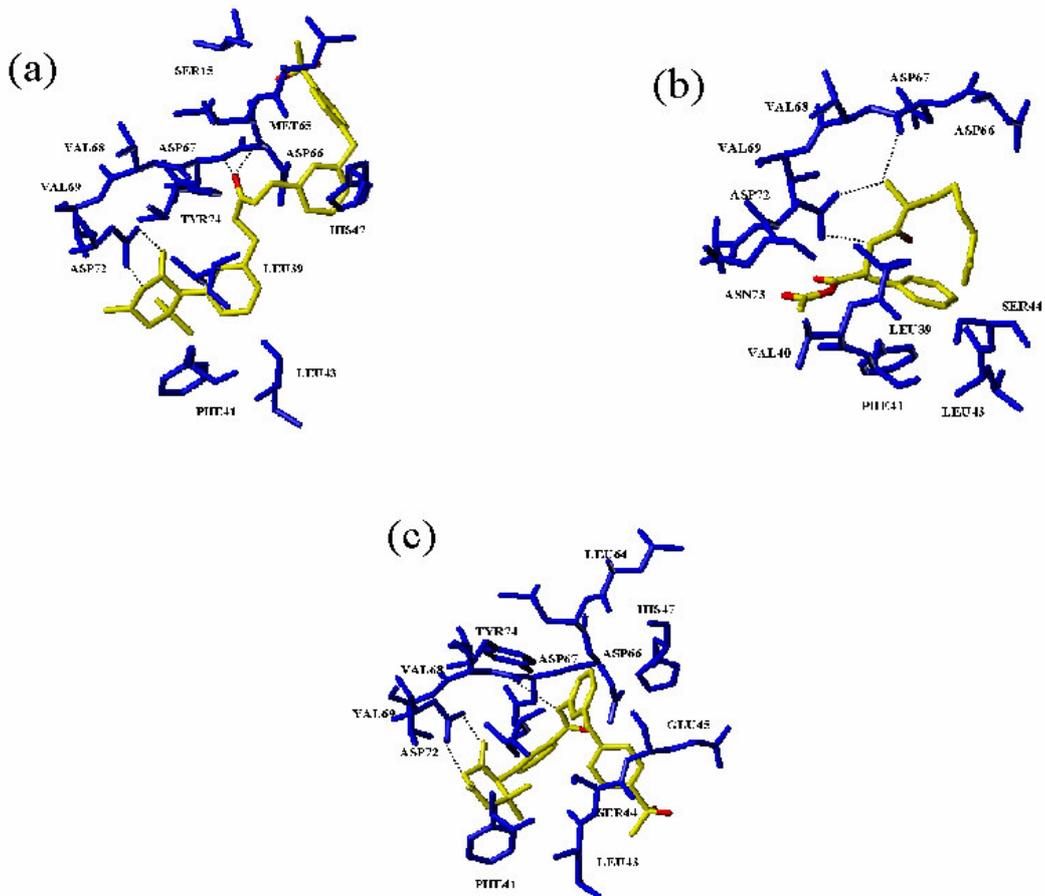


Abb. 61: Docked orientation and details of contacts of (a) **5a**, (b) **6a** and (c) **7a**. IL-4 BP Cluster II residues $\leq 4.5\text{\AA}$ distance from the ligand are shown in blue.

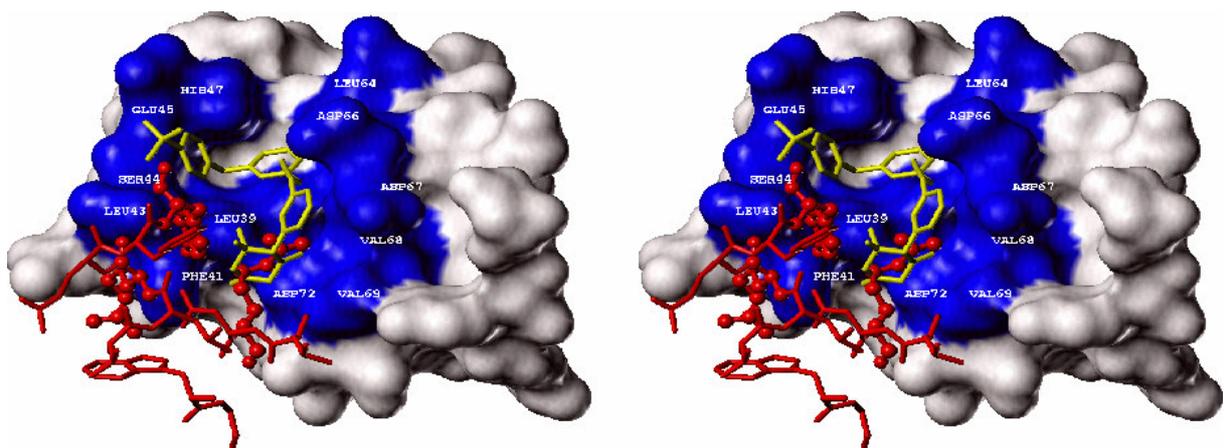


Abb. 62: Surface plot of IL-4-BP (Cluster II) as resolved by X-ray crystallography superimposed with the docking result of Compound **7a**, shown in yellow, with the interface residues of the IL-4/IL-4-BP complex. IL-4 is shown in red. Three IL-4 residues (from right to left Arg-88, Tyr56 and Arg-53) most essential for interactions with IL-4-BP and used in pharmacophore query are shown as red balls. Residues $\leq 4.5\text{\AA}$ distance from the ligand are coloured blue.

Conclusion

In the present study, low affinity chemical lead compounds each for cluster I and II have been identified within the Maybridge and NCI databases. However it will be important to use different means to covalently link the two low affinity ligands of cluster I and II in such a way that the optimal position and orientation of the important functional groups must be largely maintained while the linker must be chemically feasible and quite rigid. More rigid the linker, less rotational entropy is lost upon binding, giving higher affinity to the composite.

The power of pharmacophore method lies in their ability to suggest molecules potentially possessing a desired biological activity but which can have unexpected chemical structure. The main advantage of 3D database searching method is that they are capable of identifying molecules displaying the desired activity and which can be obtained from a corporate compound bank, bought from a chemical supplier, or synthesized using an established protocol. It is our experience, exemplified here by our IL-4 results, that it is possible to identify readily obtainable cluster I and II molecule independently, that fit respective pharmacophore pattern using existing 3D database technology and that this approach has an important role to play alongside other techniques in lead discovery, particularly when resources are limited.

6.6 Projektteil der Universität Würzburg, Prof. Duschl

6.6.1 Aufgabenstellung und Zielsetzung

Ziel des Teilprojekts war die Entwicklung von Reportergerntests, die sich für das Screenen von potentiellen Hemmstoffen und für die Validierung von Kandidatensubstanzen eignen. Die entwickelten Assays sollten in der Lage sein, für interessante Einzelsubstanzen Informationen über molekulare Wirkungsmechanismen zu liefern. Für diesen Zweck wurden transient anwendbare Reporter gene mit relevanten Promotoren und Promotorelementen entwickelt. Um diese Testsysteme auch für die Untersuchung großer Substanzzahlen in High Throughput Screening zugänglich zu machen, sollten außerdem stabil transfizierte Zelllinien hergestellt werden.

6.6.2 Wissenschaftliche Ergebnisse

Im Berichtszeitraum wurden mehrere Testsysteme bearbeitet, die im Folgenden einzeln dargestellt sind.

6.6.2.1 STAT6 regulierte Promotorelemente

Die Rezeptorkette IL-4R α wird von IL-4 und IL-13 verwendet. Die von dieser Rezeptorkette induzierte Signaltransduktion umfasst eine Reihe unterschiedlicher Signalwege, doch gilt im Kontext von Allergietherapie die Aktivierung von Signal Transducer and Activator of Transcription 6 (STAT6) als herausragend wichtig¹²². Diese spezielle Bedeutung erklärt sich daraus, daß STAT6 offensichtlich fast nur von IL-4R α verwendet wird, seine Aktivierung also stark mit den allergieassoziierten Cytokinen IL-4 und IL-13 verbunden ist. Ebenso wichtig ist die Beobachtung dass STAT6 in der Signalübertragung durch IL-4R α die Funktion hat, Genexpressionen zu regulieren, die mit veränderter Zelldifferenzierung zusammenhängen, und nicht z.B. mit Regulation von Proliferation oder Apoptose. Solche zell-differenzierenden Wirkungen umfassen die Induktion von IgE, von proallergischen Cytokinen und Chemokinen, von Mucingenen in der asthmatischen Lunge und von Adhäsionsmolekülen, die eosinophile Immigration fördern. STAT6 knockout Mäuse zeigen entsprechend nur sehr eingeschränkte allergische Reaktivität und STAT6 bzw. STAT6 regulierte Gene gelten daher als wichtige Targets experimenteller Allergietherapie¹²³.

Bereits im Berichtszeitraum 1997-1999 wurde eine stabile Reportergerntlinie hergestellt, in der ein künstlicher Promotor aus 5 Kopien der STAT6 Bindungsstelle im IgE-Klassenwechsel-promotor in Kombination mit einem HSV-TK-Minimalpromotor die Expression von Luciferase in Ba/F3 Zellen induzierbar durch IL-4 und IL-13 erlaubt. Im Berichtszeitraum 1999-2002 wurde diese Zelllinie weiter charakterisiert und noch 1999 an ASTA-Medica in Radebeul übergeben. Frau Dr. Bömmel war dabei einige Tage in Radebeul, um die dort zuständige Mitarbeiterin Frau Egerland einzuarbeiten.

¹²² Foster PS: STAT6: An intracellular target for the inhibition of allergic disease. Clin Exp Allergy **1999**;29, 12-16

¹²³ Foster PS: STAT6: An intracellular target for the inhibition of allergic disease. Clin Exp Allergy **1999**;29, 12-16

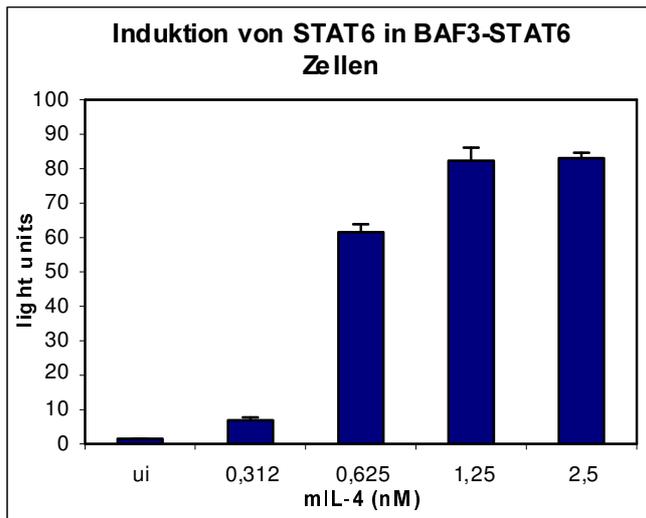


Abb. 63: Induktion von STAT6 in BAF3-STAT6-Zellen

Im weiteren Verlauf stellte sich heraus, dass für diese Zelllinie Kultur in höheren DMSO-Dosen als 0.1% toxisch war und die Zellen abstarben; dies war aufgrund der DMSO-Mengen in der Substanzbibliothek nicht akzeptabel. In unserem Labor wurde daher versucht, die Linie durch permanente Kultur in kleinen aber steigenden Mengen DMSO zu unterwerfen, um dadurch Selektionsdruck auszuüben. Dies gelang auch, so dass die Zellen schließlich 1% DMSO problemlos vertrugen und bis zu 1.75% überlebten, wenn bei diesen extremen Dosen auch das Signal/Rausch-Verhältnis schlechter wurde. Die selektierten Zellen wurden zur weiteren Kultur nach Radebeul übergeben, doch bleibt festzuhalten dass auch die ursprünglichen Zellen tauglich wären, vorausgesetzt sie erhalten DMSO erst nach einer gewissen Eingewöhnungsphase in höheren Mengen. Vermutlich müssen Entgiftungssysteme induziert werden, doch wurde dieser Frage nicht weiter nachgegangen.

6.6.2.2 IL-4 und IFN- γ Promotoren

Ein Vergleich dieser beiden Promotoren ist attraktiv, weil hier die zwei Schlüsselcytokine der T_H2 bzw. T_H1-Immunität erfasst werden. Die gleichzeitige Messung beider Parameter erlaubt eine Abschätzung, welchen Effekt eine Substanz auf die T_H1/T_H2-Balance haben könnte. Selektive T_H1 Inhibition wäre dabei ebenfalls interessant, da hier therapeutische Optionen etwa für Autoimmunität liegen dürften¹²⁴.

Für beide Cytokine wurden unterschiedliche Promotorkonstrukte hergestellt und in transienten Assays getestet. Es war erforderlich, hier Stimuli zu definieren, die für beide Cytokine gleichermaßen verwendbar sind. Neben Signalen, die über den regulären T-Zell-Rezeptor vermittelt werden (z.B. PMA/Ionomycin, PHA, oder anti-CD3), suchten wir auch alternative Stimuli, da ein Pharmakon nicht unbedingt auf den TCR/CD3-Signalweg wirken dürfte. Wir verwandten als Modellsubstanzen polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe, die aus dem Bereich der Umweltschadstoffe her bekannt sind. Diese Verbindungen können Cytokine induzieren, und wir konnten in der Folge auch zeigen, dass bestimmte Verbindungen wie Pyren Wirkungen direkt am IL-4 Promotor vermitteln können¹²⁵. Diese Eigenschaft erlaubt gleichzeitig die Definition von Minimalpromotoren und von potentiellen Regulierungsstellen.

¹²⁴ Romagnani S: T-cell subsets (Th1 versus Th2). *Ann Allergy Asthma Immunol* **2000**, *8*, 9-21

¹²⁵ Bömmel H, Li-Weber M, Serfling E, Duschl A: The environmental pollutant pyrene induces the production of IL-4. *J Allergy Clin Immunol* **2000**, *105*, 796-802.

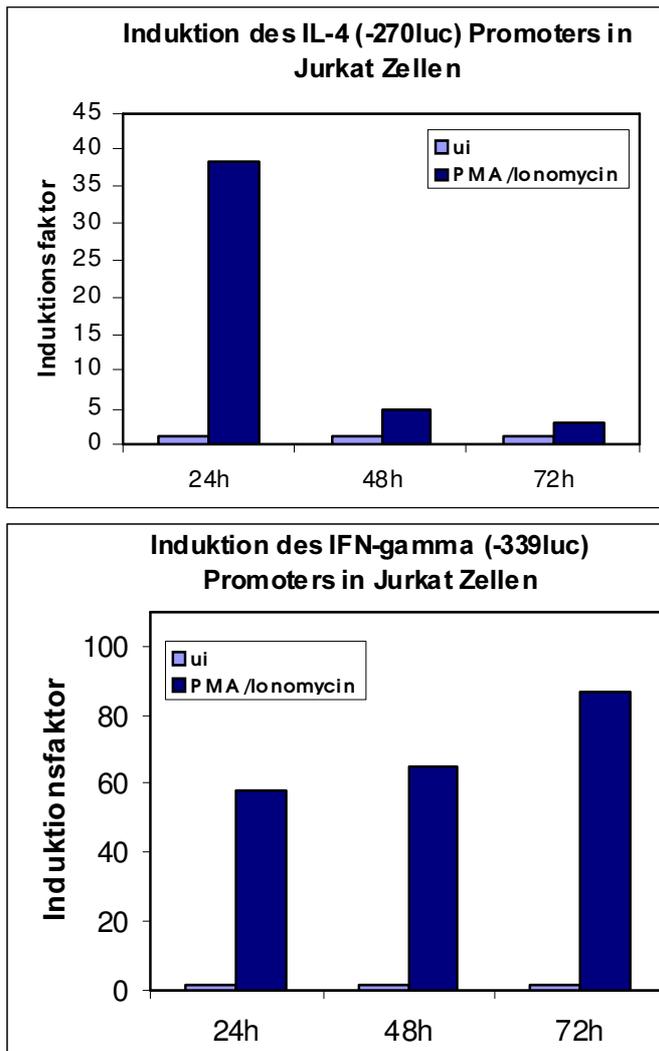


Abb. 64: Induktion des IL-4 und des IFN-gamma-Promoters in Jurkat-Zellen

Für beide Promotoren wurden Konstrukte optimiert, die in der menschlichen T-Zelllinie Jurkat transient gut induzierbar waren. Bei stabilen Transfektionen wurden Klone erhalten, die das Luciferase-Gen stabil enthielten, doch konnten für keinen der Promotoren Klone gefunden werden, die noch induzierbar waren. Die stabilen Linien erwiesen sich daher als unbrauchbar. Lösungsmöglichkeiten für das Problem sind andere Rezipientenzellen, längere Promotorkonstrukte und verbesserte Transfektionsmethoden für höhere Ausbeuten. Diese Ansätze kommen zur Zeit im Rahmen anderer Projekte zum Einsatz, konnten aber für das Projekt "Steuerung des Immunsystems" nicht mehr verwendet werden.

6.6.2.3 Weitere Promotoren

Es wurden weitere Promotoren interessanter Gene kloniert, und zwar für IL-8, Eotaxin-1 und MUC2. IL-8 ist ein Chemokin, das mit Stressreaktionen und allgemeiner Entzündung assoziiert ist, Eotaxin-1 ist Eosinophilen-chemotaktisch, und MUC2 ist ein wichtiges Mucin-Gen in der Lunge. Für alle Promotoren wurden Konstrukte zur transienten Transfektion etabliert. Am weitesten schritten die Arbeiten zum IL-8 Promotor voran, in dem spezifische Regulationselemente charakterisiert werden konnten¹²⁶.

¹²⁶ Bömmel H, Haake M, Luft P, Horejs-Hoek J, Hein H, Bartels J, Schauer C, Pöschl U, Kracht M, Duschl A: The diesel exhaust component pyrene induces expression of IL-8 but not of eotaxin. *Int Immunopharmacol* **2003**;514, in press

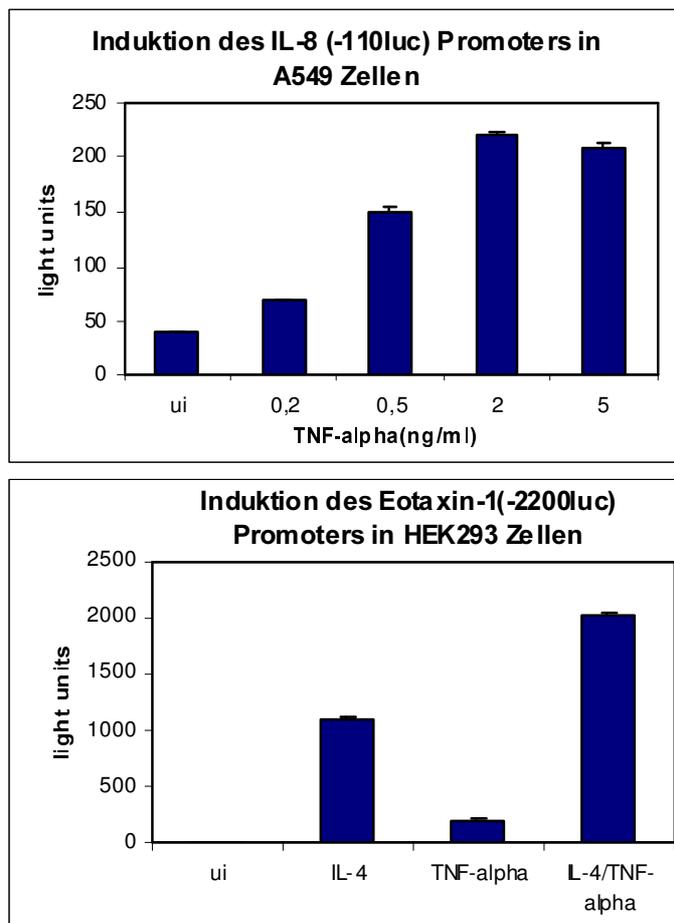


Abb. 65: Induktion weiterer Promotoren (IL-8 und Eotaxin)

6.6.2.4 Weitere Arbeiten

Es gab in der Arbeitsgruppe eine Reihe von Fragestellungen, die zwar nicht aus dem Projekt bezahlt, aber doch vom fachlichen Hintergrund her assoziiert waren. Über diese Arbeitsrichtungen wurden die Partner während der regelmäßigen Projekttreffen jeweils informiert. Bemerkenswert war dabei die Entwicklung eines membranpermeablen Peptids zur Hemmung von STAT6 in intakten Zellen¹²⁷.

6.6.3 Zusammenfassung

Es wurden eine Reihe von menschlichen Promotoren kloniert, charakterisiert und in transienten sowie stabilen Zelltransfektionen eingesetzt. Eine STAT6-sensible Linie wurde an ASTA-Medica übergeben und nach Auftreten von Problemen im praktischen Gebrauch nachträglich an höhere DMSO-Mengen adaptiert. Die weiteren Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle zusammengefasst.

¹²⁷ Stolzenberger S, Haake M, Duschl A: Specific inhibition of interleukin-4 dependent Stat6 activation by an intracellularly delivered peptide. Eur J Biochem **2001**, 268, 4809-4814

Promoter	Funktion	Kloniert	Transiente Transfektion erfolgreich	Stabile Transfektion versucht	Stabile Transfektion erfolgreich
STAT6 aus IgE Promoter	Zelldifferenzierung in Allergie	Ja	Ja	Ja	Ja
IL-4	Induktion und Regulation von Allergie	Ja	Ja	Ja	Nein
IFN- γ	Allergieunterdrückung, TH1 Induktion	Ja	Ja	Ja	Nein
IL-8	Zellulärer Stress, Entzündung	Ja	Ja	Nein	-
Eotaxin-1	Eosinophile Chemotaxis	Ja	Ja	Nein	-
MUC2	Mucus-Protein in der Lunge	Ja	Ja	Nein	-

Tab. 42: Zusammenfassung der Arbeiten an menschlichen Promotoren

6.7 Projektteil der Universität Frankfurt, AK Prof. Engels

6.7.1 Aufgabenstellung und Zielsetzung

Aufreinigung von hSTAT6-Monomer aus dem Cytoplasma von Lymphocyten-Zellkulturen sowie die Aufreinigung von hSTAT6-Dimer aus dem Zellkernextrakt von Lymphocyten-Zellkulturen sowie rekombinante Expression in E.coli und Erstellen von HTS-Assays:

Die Arbeiten sollten die Entwicklung einer Aufreinigungsstrategie sowie deren Etablierung beinhalten. Dazu wurde ebenfalls die Entwicklung und Etablierung einer Analytik gefordert, die in der Lage sein sollte zu jedem Zeitpunkt das Protein und seinen funktionellen Status nachzuweisen und festzulegen. Ausgangspunkt war das folgende Konstrukt:

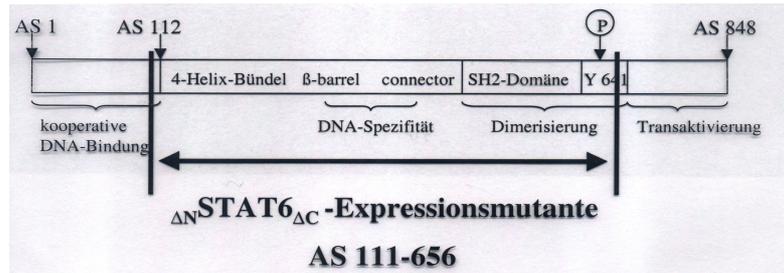


Abb. 66: hSTAT6-Genkonstrukt

Die Aufreinigung des hSTAT6-Monomers sowie des hSTAT6-Dimers erfolgt aus der Lymphocyten-Zelllinie Jurkat. Die Entwicklung der Aufreinigungsstrategie erfolgte auf der Basis der Arbeiten von Dignam et al. und Hou et al.¹²⁸. Um eine für weiterführende Versuche ausreichende Ausbeute an aufgereinigtem Protein zu erzielen, ist eine Menge von etwa 10^{11} Zellen notwendig.

Die Aufreinigung von hSTAT-6-Monomer kann über SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese und anschließender Silberfärbung, sowie über Western-Blotting mit anti-hSTAT6-Antikörper nachgewiesen werden.

6.7.2 Wissenschaftliche Ergebnisse

6.7.2.1 Expression und Aufreinigung von rekombinantem hSTAT6

Es galt das hSTAT6-Protein oder seine Domänen in funktioneller Form für die Assayentwicklung zu stellen.

Die quartäre Struktur von hSTAT6 besteht aus verschiedenen Domänen. Die N-terminale Domäne (AS 1-112) ist für die kooperative Bindung mehrerer STAT-Moleküle an die DNA verantwortlich. Die C-terminale Domäne ist die Transaktivierungsdomäne womit hSTAT6 an andere Kernproteine bindet. Es hat sich bei anderen STAT-Proteinen gezeigt, daß die Expression deutlich erleichtert wird, wenn das Protein am N-Terminus verkürzt wird¹²⁹.

¹²⁸ (a) J. D. Dignam, R. M. Lebovitz and R. G., Nucl. Acids Research **1983**, *11* (5): 1475-1488; (b) J. Hou, U. Schindler, W. J. Hebzal, Z. Z. HO, M. Brasseur and S. L. McKnight, Science, **1995**; *265*, 1701-1706

¹²⁹ Hou et al. 1994

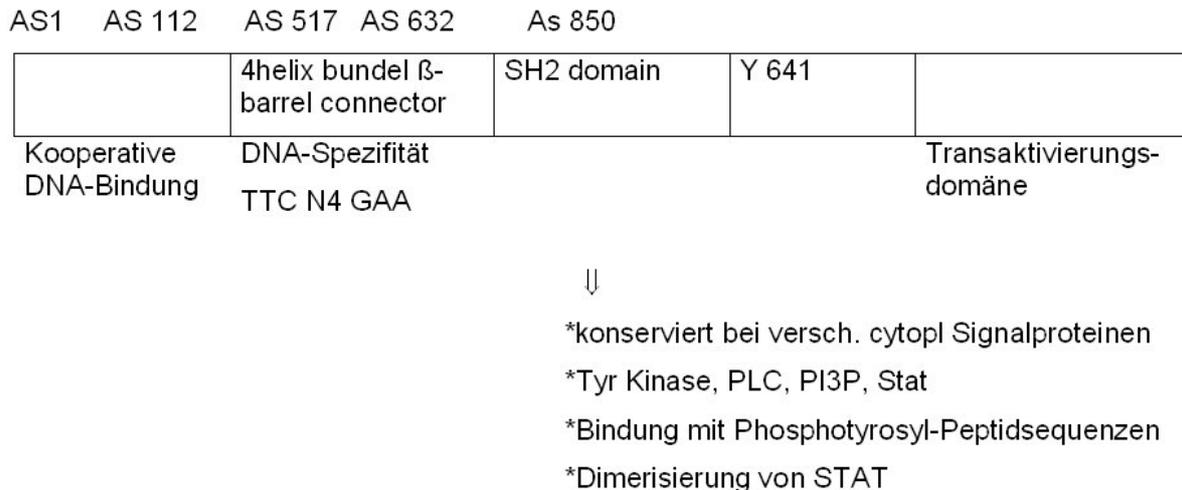


Abb. 67: Schematische Darstellung der quartären Struktur von hSTAT6

Mit Hilfe von PCR wurde eine N- und C-terminal verkürzte hSTAT6-Deletionsmutante generiert¹³⁰ und in den pET-23a(+)-Expressionsvektor einkloniert. Um die Aufreinigung zu erleichtern, wurde ein N-terminaler hexa-Histidine-Tag eingeführt. Als Expressionsstamm wurde BL21-TKB1 verwendet. Dieser Stamm besitzt ein induzierbares plasmidisch kodiertes Tyrosinkinasefragment. Die Induktion dieses Tyrosinkinasefragments ermöglicht die Phosphorylierung und die Aufreinigung von Δ_N hSTAT6 Δ_C Proteindimeren. Sowohl die dimeren, als auch die monomeren Δ_N hSTAT6 Δ_C -Proteine werden denaturierend über eine Nickel-Chelat-Säule aufgereinigt. Die Elution der Proteine erfolgt mit 0,2M Imidazol nach Spülen der Säule mit 0,1M Imidazol.

6.7.2.2 Entwicklung von hSTAT6-Hochdurchsatz-Assays

Sowohl für monomeres als auch dimeres hSTAT6 sollten Assays entwickelt werden, die in der Wirkstoffsuche aus Substanz-Bibliotheken eingesetzt werden können.

Für die Entwicklung eines Hochdurchsatztests wurden verschiedene Systeme getestet: Dr. Martin Schnee entwickelte einen Test, der auf der Immobilisierung einer in der STAT6-Erkennungssequenz biotinylierten doppelsträngigen DNA in 96-well-Mikrotiterplatten beruhte. Nach Inkubation dieser DNA mit verschiedenen Testansätzen erfolgte die Auswertung auf Bindung indirekt durch den Nachweis freien Biotins über Streptavidin-gekoppelte Peroxidasereaktion.

Eine Spezifität dieses Testsystems konnte jedoch bei Einsatz von Kernextrakten vor und nach Ammoniumsulfat-Fraktionierung und Verwendung unterschiedlicher DNA-Kompetitoren nicht nachgewiesen werden.

Das Testsystem beruht auf dem Effekt, dass kleine fluoreszenzmarkierte Moleküle in Lösung stark rotieren und polarisiertes Licht depolarisieren. Findet eine Bindung dieses kleinen Moleküls an ein wesentlich größeres statt, so folgt aus dieser Bindung eine Reduktion der Rotation und damit eine Abnahme der Depolarisation.

Dr. Kircher und Dr. Stadler konnten für unterschiedliche Aufreinigungsstufen sowohl des dimeren als auch des monomeren STAT6-Proteins die grundsätzliche Eignung der Fluoreszenz-Polarisationsspektroskopie für die Entwicklung eines Hochdurchsatz-Testsystems zeigen, Dr. Gastmans arbeitete das folgende Protokoll (in Englisch) aus.

¹³⁰ (a) T. Mikita, D. Campbell, B. Wu, K. Williamson and U. Schindler, *Molecular and Cellular Biology* **1998**; *16* (19), 5811-5820; (b) S. Becker, G. Groner and C. W. Müller, *Nature* **1998**; *394*, 145-151

6.7.2.3 Protokoll zur Expression, Reinigung und Rückfaltung von rSTAT6 SH2 und Δ_n rStat6 $_{\Delta_c}$

a) Cloning of rStat6 into pQE30

Two deletion mutants of recombinant human Stat6 were cloned into pQE30 (Qiagen Inc.) and expressed in M15pREP4 cells. One construct of rStat6 contains only the strongly conserved SH2 domain (rStat6:SH2; nt: 1733 – 2061) and the other construct has a N-terminal and a C-terminal deletion (Δ_n rStat6 $_{\Delta_c}$; nt: 518 – 2148).

The rStat6: SH2 domain is able to bind peptide sequences derived from IL4 receptor. The Δ_n rStat6 $_{\Delta_c}$ construct contains not only the peptide binding site but also the DNA binding site of Stat6. Both constructs were cloned into pQE30 between the unique restriction sites *Sph*I and *Hind*III. At the N-terminus the both constructs contain a hexa-histidine tag. This tag was used for a one-step purification on a Ni-NTA-sepharose column.

b) Expression and purification on FPLC of rStat6:SH2 and Δ_n rStat6 $_{\Delta_c}$

- (i)
 - Inoculate 2L LB medium (5 x 400 ml in 1 L erlenmeyers, 100 µg/mL ampicilline and 25µg/mL kanamycine) 1:50 with the uninduced overnight culture (4 mL cell cultures from a glycerol stock from M15pREP4 cells transformed with pQE30:Stat6:SH2 or transformed with pQE30: Δ_n rStat6 $_{\Delta_c}$).
 - Grow at 37°C until the A_{600} reaches 0.5a 0.7 (-3 hours).
 - Add IPTG to a final concentration of 1 – 2 mM and continue to grow the culture for another 4 hours at 37°C
 - Harvest the cells by centrifugation at 6000 rpm for 10 min.
 - Store the pellet at -70° C if desired or continue.
- (ii)
 - Resuspend the pellet in the following buffer at 5 mL per gram wet weight: Na-phosphate 50 mM, 150 mM NaCl
 - Add Lysozyme to 1 mg/mL and incubate on ice for 30 min
 - Sonicate on ice (7 Min, cycle:80%)
 - Centrifuge at 10 000 g for 30 min and collect the pellet
 - Resuspend the pellet in the following buffer:6 M GuHCl, 25mM Na-phosphate, 150 mM NaCl, pH 7.9
 - Stir for one hour
 - Place in an ultrasonic bath for 15 min
 - Filter the lysate with a 0,45 µm filter
- (iii)
 - Load ½ from lysate (0,5 mL/Min, 1 pump volume lysate (10 mL), 1 pump volume 8% buffer B, 1 pump volume lysate, 1 pump volume 8% B, etc) on a NI-NTA-column (25 mL column volume)previously equilibrated in 8% Buffer B (buffer A: 25mM Na-phosphate, 150 mM NaCl, 6 M urea, pH 7.9, buffer B: idem buffer A + 125 mM imidazole, pH 7.9)
 - Wash with 8% buffer B until the A_{280} is < 0,01 (flow rate: 1mL/min)
 - Wash with 125 mL (5 column volumes) of 28% buffer B (flow rate: 1,5mL/min)
 - Elute the protein with 100% buffer B (150 mL (=6 column volumes), flow rate: 1,5 mL/min)
- (iv)
 - Collect the eluted protein and start the refolding of the protein (based on the refolding kit of Hampton Research)
 - Dialyse the protein against the following refolding buffer (2 times 1 L, overnight and another 4 hours at 4° C): 55 mM Tris, pH 8.2; 10.56mM NaCl; 0.44 mM KCl; 550 mM GuHCl; 2.2 mM MgCl₂; 2.2 mM CaCl₂;550 mM L-Arg

- Dialyse the protein against the following end buffer (2 times 1 L, overnight and another 4 hours at 4° C): 20mM Na-phosphate buffer, 10 mM NaCl, 1mM EDTA, pH 6.4 or use the same buffer with pH7.9

A yield of respectively 8,6 mg and 4 mg or refolded Δ_n Stat6 Δ_c and Stat6: SH2 out of 2 L cell culture can be reached. The proteins should be kept by 4°C, while freezing the protein (-20°C) causes a loss of protein activity.

c) Control and detection of the purified proteins:

The detection of the purified proteins can be done with SDS-page during and after the purification and refolding of the proteins. For the nStat6c construct a gel system with 2 components was used: a stacking gel of 5% and a separation gel of 8%. For the Stat6:SH2 domains the gel system of H. Schägger and G. von Jagow was used which consists of 3 gel components: a stacking gel of 4%, a spacer gel of 10% and a separation gel of 16,5% . The proteins can be visualized with Coomassie Brilliant blue or by Ag. The proteins can also be detected by first transferring the proteins on a Immobilon-P transfer membrane (Millipore) and using an anti-His-antibody (first Ab: His-Probe G18) cat#sc-804, rabbit polyclonal IgG, Santa Cruz Biotechnology; second Ab: HRP-Goat Anti Rabbit IgG (H+L), Zymed) coupled with the ECL-system of Amersham (Western Blot).

d) Determination of the protein concentration:

The protein concentration can be determined with UV spectroscopy ($\lambda = 280 \text{ nm}$). The extinction coefficients were calculated with the method of Gill and von Hippel¹³¹.

$$\epsilon (\Delta_n \text{Stat6}_{\Delta_c}) = 54160 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$$

M.W.: 59730 g/mol

$$\epsilon (\text{Stat6: SH2}) = 10930 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$$

M.W.: 12650 g/mol

e) Re-use of Ni-NTA-column:

- Wash with 2 column volumes (=50 ml) 100% buffer C (= 50 mM NaOAc, pH 4.0, 1 M NaCl) (1mL/min)
- Reload with 1 column volume (=25 mL) 100% buffer D (=50 mM NaOAc, pH4.0, 1 M NaCl and 200 mM NiSO₄. (0.5 mL/min)
- Wash with 2 column volumes (=50 mL) 100 % buffer C (0.75mL/min)
- Equilibrate the column with startbuffer: 8% buffer B (Buffer A: 25mM NaP, 150 mM NaCl, 6 M urea, pH 7.9, Buffer B: buffer A + 125 mM imidazol, pH7.9)

f) Determination of pH dependent dimerization of Stat6: SH2 with size exclusion chromatography

Haan *et al.*¹³² demonstrated that SH2 domains of Stat3 undergo a pH dependent dimerization which is accompanied with a loss of peptide binding activity. Stat3:SH2 is found as a dimer at neutral pH and as a monomer at acidic pH. Whereas the monomeric Stat3: SH2 domain was able to bind to specific phosphotyrosine peptides, no such interaction could be detected by with the dimeric protein.

The pH dependent dimerization of Stat6:SH2 domains was examined with size exclusion chromatography performed on a BioSep-Sec-S 2000 column (Phenomenex, 300 x 7.5 mm).

¹³¹ S. C. Gill and P. H. von Hippel, *Anal. Biochem.* **1989**, *182*, 319-326

¹³² U. Hassiepen, F. Schaper, J. Schneider-Mergener, A. Wollmer, P. C. Heinrich and J. Grötzinger, *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 1342-1348

The column was first calibrated with different marker proteins: chymotrypsine (25 kDa), Lysozyme (14,4 kDa) and tendamistat (7.9 kDa). The column was equilibrated with a Na-P buffer with 150 mM NaCl, pH 7.9 or pH 6.4, loaded with 150 μ l of Stat5:SH2 (10 μ g) and run at a constant flow rate of 0.7 mL/min. Figure 67 shows a plot of the retention times as a function of the molecular masses. The elution times of the Stat6:SH2 domains at pH 7.9 and pH 5.3 correspond to molecular masses of 24 and 12 kDa, respectively, which correlates well with the calculated molecular masses for respectively dimeric and monomeric Stat6:SH2 domains.

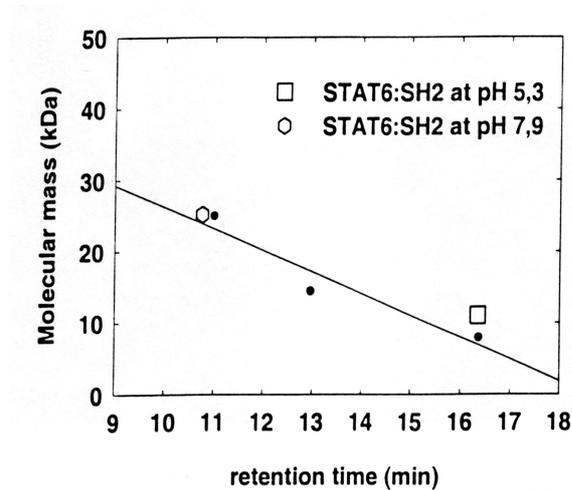


Fig. 68: Molecular masses as a function of retention times.

While size exclusion chromatography could not be done for the Δ_n Stat6 Δ_c : (the BioSep-Sec-S 2000 column is optimized for proteins with molecular masses <50 000kDa), CD measurements were performed to find out if Δ_n Stat6 Δ_c also undergoes a pH dependent dimerization. Figure 68 shows the results of the CD measurements. From these measurements we can conclude that at pH 5.3 the conformation of Δ_n Stat6 Δ_c is different from the conformation at pH 6.4 or pH 7.9. Capillary electrophoresis should be performed to confirm these data and to determine the molecular masses of Δ_n Stat6 Δ_c at these different pH's.

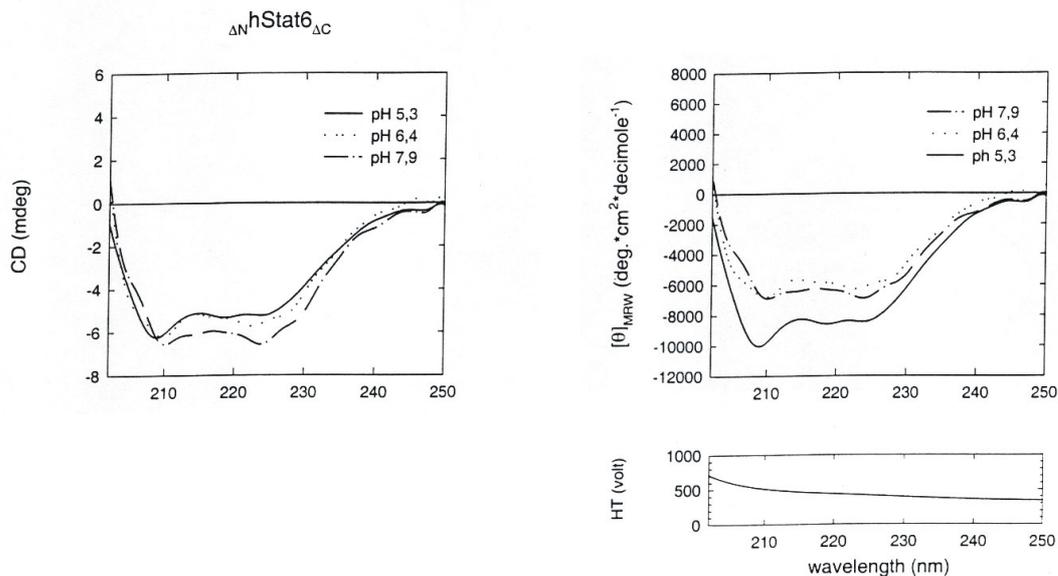


Fig. 69: CD measurements on Δ_n Stat6 Δ_c in far UV.

6.7.2.4 Study of the binding between the different Stat6 derivates and the IL4-R derived peptides

The binding between the different Stat6 constructs and fluorescent labelled peptides was studied with fluoropolarization measurements on a POLARstar* Galaxy. This polarimeter has the great advantage that microtiterplates (non binding surface plates from COSTAR) can be used and that many probes can be measured at once. The IL4-R derived peptides (P1P, P1P-FITC, P2, P2P, and P2P-FITC) were synthesized and purified by PolyPeptid.

P1P: Gly-ProPro-Gly-Glu-Ala-Gly-Tyr (PO₃H₂)-Lys-Ala-Phe-Ser-Ser-Leu-Leu-NH₂

P1P-FITC: FITC-Ahx-Gly-Pro-Pro-Gly-Glu-Ala-Gly-Tyr(PO₃H₂)-Lys-Ala-Phe-Ser-Ser-Leu-Leu-NH₂

P2: H-Ala-Ser-Ser-Gly-GluGlu-Gly-Tyr-Lys-Pro-Phe-Gln-Asp-Leu-Ile-NH₂

P2P: H-Ala-SerSer-Gly-Glu-Glu-Gly-Tyr(PO₃H₂)-Lys-Pro-Phe-Gln-Asp-Leu-Ile-NH₂

P2P-FITC-FITC-Ahx-Ala-Ser-Ser-Gly-Glu-Glu-Gly-Tyr(PO₃H₂)-Lys-Pro-Phe-Gln-Asp-Leu-Ile-NH₂

The following figure shows a binding curve between Stat6:SH2 and P2P-F measured by pH 6.4. Fitting of this curves gives a dissociation constant of 164 nM ± 16 nM.

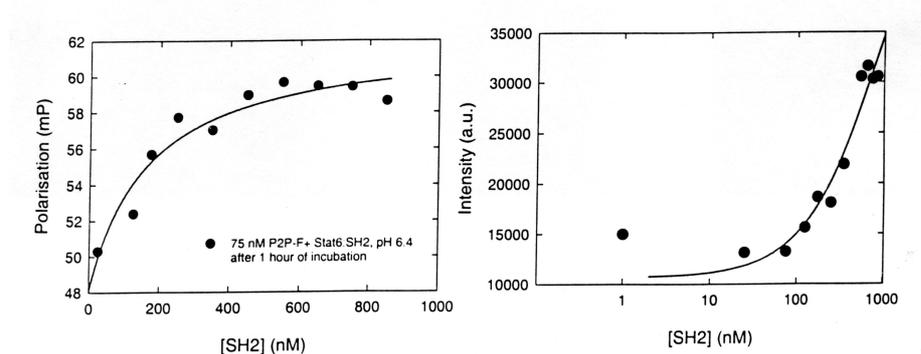


Abb. 70: (left) Polarization and (right) the fluorescence intensity values as a function of the Stat6: SH2 concentration.

The following table gives an overview of dissociation constants for the binding of Stat6 derivatives and IL4-R derived peptides that have been determined by other research groups.

Mikita et al. ¹³³	Fluor.- G(pY)KPFQDLI	$K_{D,WT} = 2.1 \mu\text{M}$ $K_{D, Stat6\Delta c} = 1.6 \mu\text{M}$ $K_{D, \Delta N Stat6} = 2.1 \mu\text{M}$	Polarization: 50→150 50→100
Schindler et al. ¹³⁴	Fluor.- G(pY)KPFQDL	$K_{D,WT} = 300 \text{ NM}$	Polarization: 45→90
Mireille Gastmanns	Fluor.- ASSGEEG(pY)KPFQ DLI (P2P-F)	$K_{DStat6:SH2} = 164 \text{ nM}$	Polarization 50→60

Tab. 43: Overview of dissociation constants

¹³³ T. Mikita, Mol. and Cell. Biol. **1996**, 5811-5820

¹³⁴ U. Schindler, Immunity **1995**, 2,689-697

From this table can be concluded that the dissociation constant found for Stat6:SH2 – P2P-F – complex is comparable with the dissociation constants found for the other Stat6 derivatives and IL4-R derived peptides.

At pH 7.9 no binding between Stat6: SH2 and P2P-F could be observed. At this pH Stat6:SH2 forms dimers (cf. results from size exclusion chromatography) and it seems that the binding capacity of the Stat6:SH2 dimers for the IL4-derived peptides has been lost. These results are in good agreement with the observations obtained by the research group of Haan et al. For the SH2 domains of Stat3. They could not detect any binding between Stat3: SH2 domains. At acidic pH they could observe binding without any problems between the monomers of Stat3:SH2 domains and the IL4-R derived peptides.

In the following figure the binding between Stat5:SH2 and another IL4-R derived peptide (P1P-F) is illustrated. Fitting this curve gives a dissociation constant of 428 nM for the Stat6:SH2 –P1P-F – complex.

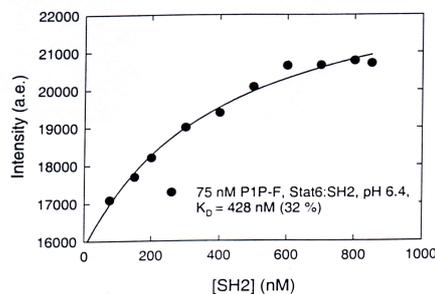


Abb. 71: Fluorescence intensity change of P1P – F by addition of Stat6:SH2, measured at pH 6.4.

At pH=6.4 we could measure an inhibition of the binding between Stat6:SH2 and P2P – F caused by the addition of unlabeled P1P; an IC_{50} -constant of 692 nM was determined.

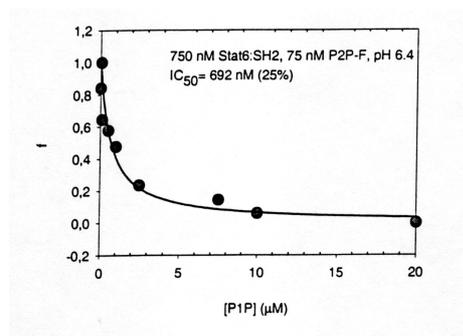


Abb. 72: Inhibition of the binding between Stat6:SH2 and P2P – F through addition of unlabeled P1P.

In the following figure the influence of DMSO concentration on the binding between Stat6:SH2 and P2P – F is illustrated. We can conclude that there is no interference of DMSO up to a concentration of 7,5% on the binding between P2P – F and Stat6:SH2.

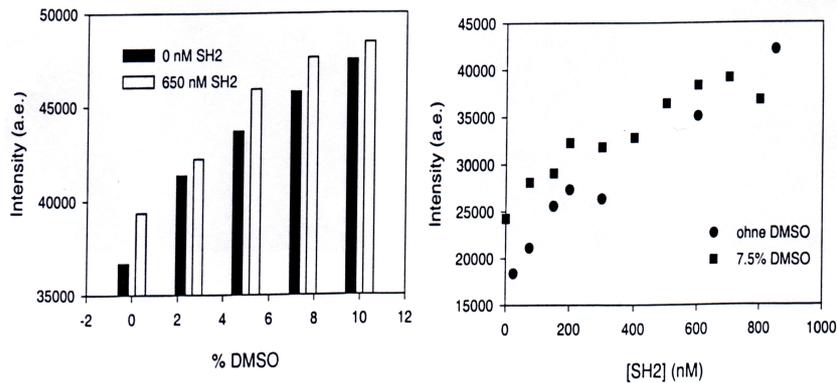


Abb. 73: Influence of the DMSO concentration on the binding between P2P – F and Stat6:SH2.

To check if the fluorescence intensity change upon addition of competitors to the Stat6:SH2 –P2P – F – complex can be used as a test system the Z-factor was measured¹³⁵.

30 samples were prepared from the complex of Stat6:SH2 and P2P – F (= maximum signal, 750 nM Stat6: SH2 + 75 nM P2P – F, 1 hour of incubation by room temperature) and 30 samples were prepared from the following mixture: Stat6:SH2, P2P – F and 20 μ M P1P, 1 hour of incubation by room temperature) as the minimum signal. In the following table the mean values and standard deviations are given.

	I (max)	I (min)
Mean	32246	25353
Std. Dev.	1074	1058
Size	34	31

Tab. 44: Mean values and standard deviations used for the calculation of the Z-factor. I (max) is the fluorescence intensity value for the Stat6:SH2 – P2P – F complex and I (min) is the fluorescence intensity for the mixture of Stat6: SH2, P2P – F and P1P.

From these values a Z-factor of 0,07 can be calculated which means that we have a double assay type or a yes/no type assay.

¹³⁵ J.-H. Zhang, T. D. Y. Chung and K. R. Oldenburg, Journal of Biomolecular Screening 1999, 4 (2), 67-73

6.8 NMR-Arbeiten im AK Prof. Griesinger / AK Prof. Schwalbe Uni Frankfurt

6.8.1 Aufgabenstellung und Zielsetzung

Um zu einem tieferen Verständnis der inhibitorischen Wechselwirkung der Liganden mit Cyclophilin zu erhalten, sollten mittels NMR Strukturen der Komplexe bestimmt werden. Hierzu wurden von der Arbeitsgruppe G. Fischer/MPI Halle entsprechendes ^{15}N - sowie $^{15}\text{N}/^{13}\text{C}$ -isotopen-markiertes Cyclophilin A bereitgestellt. Wegen der für NMR-Messungen zu geringen Löslichkeit der Ester AWD-43787 und AWD-51471 wurden die entsprechenden Carbonsäuren AWD-63442 (SSS-Enantiomer, Carbonsäure zu AWD-43787) und AWD-83334 (RRR-Enantiomer, Carbonsäure zu AWD-51471) eingesetzt.

6.8.2 Bestimmung der Parameter Bindung und Löslichkeit

Zunächst wurde die Löslichkeit der Substanzen im wässrigen Medium (Na-Phosphatpuffer, 50mM, pH = 6.5) bestimmt. Hierzu wurde eine gesättigte Lösung des Liganden angesetzt, indem nach Zugabe der Substanz zu Wasser und Ultraschallbehandlung vom nicht gelösten Rückstand abzentrifugiert wurde. Die Intensitäten der Signale im ^1H -NMR-Spektrum wurden mit denen einer $100\mu\text{M}$ Sucroslösung verglichen. Für beiden Substanzen lagen die Löslichkeiten bei ca. $400\text{-}500\ \mu\text{mol/l}$.

Bindet ein Ligand schwach ($K_d > 1\mu\text{M}$) so werden im NMR gemittelte Signale für den freien und den gebundenen Zustand beobachtet, d.h. die beobachtete chemische Verschiebung ist ein Mittelwert aus den Anteilen der freien und der gebundenen Form des Moleküls. Hält man die Konzentration des Proteins konstant und variiert die Konzentration des Liganden, so kann aus der Konzentrationsabhängigkeit der chemischen Verschiebung der Proteinsignale der K_d -Wert nach folgender Formel berechnet werden (Herleitung siehe Kap. NMR-Methodik):

$$\Delta\nu = \Delta\nu^\circ \cdot [L] / (K_d + [L])$$

mit $\Delta\nu$ = gemessene Änderung der chemischen Verschiebung, $\Delta\nu^\circ$ = maximales $\Delta\nu$, $[L]$ = Ligandkonzentration.

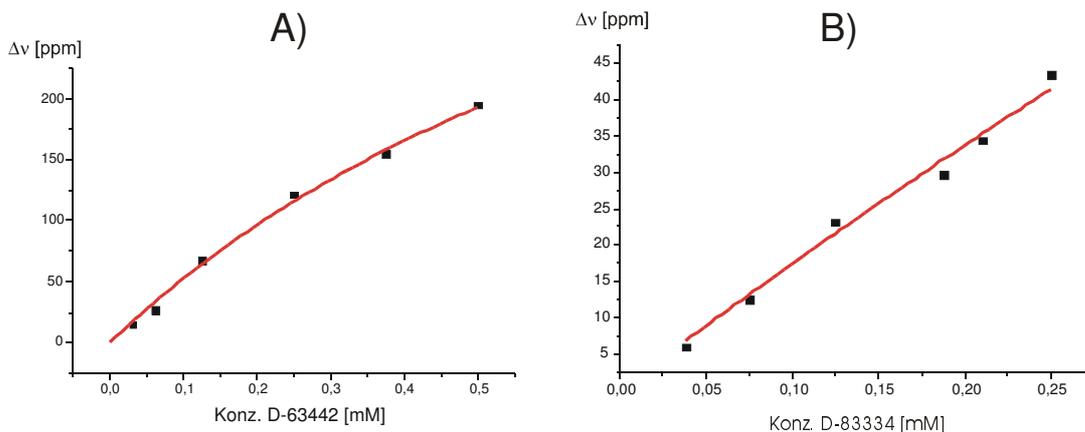


Abb. 74: Titration von Cyclophilin A mit D-63442 (A) und D-83334 zur Bestimmung der Bindungskonstante. Die Kurven wurden mittels einer nichtlinearen Regression mit dem Programm Microcal Origin 6.0 berechnet.

Hiermit wurden folgende K_d -Werte erhalten:

AWD-63442: $K_d \sim 0,85$ mM

AWD-83334: $K_d \sim 2,8$ mM

D.h. es ergibt sich eine um den Faktor 3 schwächere Bindung des RRR-Enantiomers AWD-83334 gegenüber dem SSS-Enantiomer AWD-63442.

6.8.3 NMR-Untersuchung zur Struktur des CypA-Ligand Komplexes

Zur Bestimmung einer dreidimensionalen Struktur des Komplexes ist es notwendig, sowohl die Struktur des Proteins als auch die des Liganden im Komplex zu bestimmen, sowie deren Orientierung zueinander. Hierzu ist es notwendig, eine Vielzahl von Atomabständen als Restraints für eine Strukturrechnung zu messen, sowohl jeweils innerhalb der beiden Molekülen (intramolekulare Restraints) als auch zwischen den Komplexpartnern (intermolekulare Restraints). Bei einem Protein in der Größenordnung des Cyclophilins ist es notwendig, auf isotopenmarkiertes Material zurückzugreifen, um einerseits die Überlagerung der Vielzahl an Resonanzen des Proteins zu reduzieren, als auch, um eine Diskriminierung zwischen intra- und interresidualen NOEs zu ermöglichen. Dies kann über geeignete Filtertechniken erzielt werden, die selektiv zwischen Signalen von ^{13}C oder ^{12}C gebundenen Protonen im Spektrum auswählen. Gleiches gilt für die Diskriminierung zwischen ^{15}N und ^{14}N (häufigstes natürliches Isotop) und daran gebundenen Protonen.

Zur Bestimmung der intermolekularen Bindungsabstände wurden an verschiedenen Komplexen eine Serie von NOESY-HSQC-Spektren aufgenommen, die über entsprechende Filter verfügten, um nur NOEs zwischen Ligand und Protein zu detektieren. Untersucht wurden zunächst CypA-AWD63442 Komplexe mit einer Zusammensetzung von 1:1, 1:2, 1:5 und 1:10. Die Mischzeiten für den NOE wurden im Bereich von 100-500ms variiert. In keinem der untersuchten Fälle konnte ein NOE beobachtet werden. Dies ist auf die kleine Komplexbildungskonstanten und der damit verbundenen kurzen Verweildauer des Liganden am Protein zurückzuführen, es kann sich ein NOE nicht in notwendigem Maße aufbauen.

Daher wurde versucht, über einen Satz von neuen Parametern strukturelle Informationen zu erhalten. Dies ist zum einen die Messung von Dipolaren Kopplungen¹³⁶ in orientierenden (flüssigkristallinen) Medien. Aus diesen Parametern lässt sich die Orientierung des Liganden relativ zum Protein bestimmen. Abbildung 75 zeigt schematisch das Prinzip: Kann sich das Molekül (z.B. Protein) frei in Lösung reorientieren, so mitteln sich Dipolare Kopplungen heraus ($3\cos^2\theta - 1 = 0$). Erzwingt man jedoch eine schwache Ausrichtung des Moleküls, so bleibt ein Restbetrag der Dipolaren Wechselwirkung (D^{res}) übrig, der gemessen werden kann. Eine Ausrichtung lässt sich in orientierenden Medien wie flüssigkristallinen Phasen^{137, 138, 139} oder Lösungen von Phagen^{140, 141, 142, 143, 144}, sowie durch Anbringung paramagnetischer Tags^{145,146} an das Protein erreichen.

¹³⁶ a) Tolman, J. R., Flanagan, J. M., Kennedy, M. A. & Prestegard, J. H., Nuclear magnetic dipole interactions in field-oriented proteins: information for structure determination in solution. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1995**, *92*, 9279-9283; b) Tjandra, N. & Bax, A. Direct Measurement of distances and angles in biomolecules by NMR in a dilute liquid crystalline medium. *Science* **1997**, *278*, 1111-1114; c) Prestegard, J. H. New techniques in structural NMR - anisotropic interactions. *Nat. Struct. Biol.* **1998**, 517-522; d) Tjandra, N. (1999), Establishing a degree of order: obtaining high-resolution NMR structures from molecular alignment. *Structure* **1999**, *7*: R205-R211

¹³⁷ Sanders, C. R., Schwonek, J. P. Characterization of magnetically Orientable Bilayers in mixtures of Dihexanoylphosphatidylcholine and Dimyristoylphosphatidylcholine by Solid-State NMR. *Biochemistry* **1992**, *31*, 8898-8905

¹³⁸ Sanders II, C. R., Hare, B. J., Howard, K. P. & Prestegard, J. H. Magnetically oriented phospholipid micelles as a tool for the study of membrane-associated molecules. *Prog. NMR Spec.* **1994**, *26*, 421-444

¹³⁹ Rückert, M., Otting, G. Alignment of biological macromolecules in novel nonionic liquid crystalline media for NMR experiments. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 7793-7797

Der Wert der Dipolaren Kopplung ist, wie der Gleichung in nachfolgender Abbildung zu entnehmen ist, abhängig von der Orientierung des Vektors (hier Vektor der N-H-Bindung) in Bezug auf das äußere Magnetfeld B_0 . Bestimmt man für eine größere Zahl von Vektoren die Dipolare Kopplung, lässt sich daraus die Orientierung des Moleküls berechnen, bzw. die relative Orientierung zweier Moleküle zueinander, für die Dipolare Kopplungen gemessen wurden. Die Symmetrie des Orientierungstensors bedingt jedoch, dass bis zu vier Ausrichtungen möglich sind.

Residual Dipolar Coupling

Weak alignment through:

- Magnetic Susceptibility
- Liquid Crystalline Phase
- Phage Particle Solution
- Paramagnetic tags

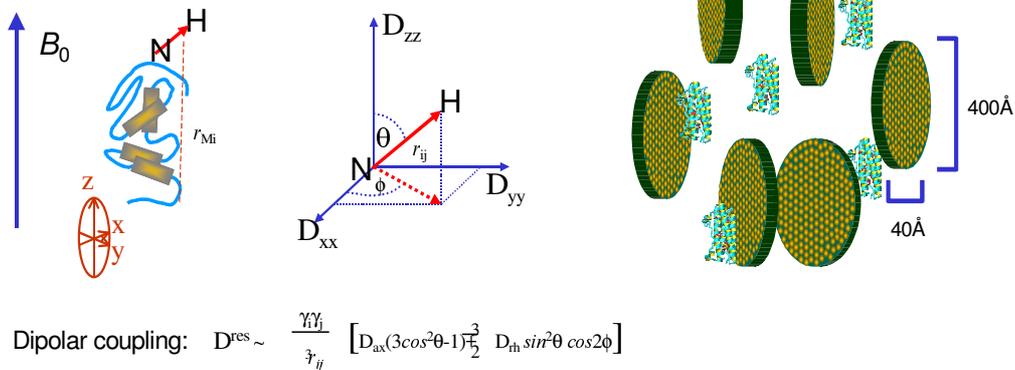


Abb. 75: Schematische Darstellung der Gewinnung von Strukturparametern durch Orientierung in Bicellen und Bestimmung der Dipolaren Kopplung.

Experimentell lässt sich der Wert für die Dipolare Kopplung sich aus der Differenz der Kopplung im isotropen und im anisotropen Fall bestimmen.

¹⁴⁰ Hansen M.R., Mueller L., Pardi A. Tunable alignment of macromolecules by filamentous phage yields dipolar coupling interactions, *Nat. Struct. Biol.* **1998**, *5*(12), 1065-74

¹⁴¹ Markus MA, Gerstner RB, Draper DE, Torchia DA. (1999) Refining the overall structure and subdomain orientation of ribosomal protein S4 delta41 with dipolar couplings measured by NMR in uniaxial liquid crystalline phases, *J. Mol. Biol.* **1999**, *292*(2), 375-87

¹⁴² Hansen M.R., Hanson P, Pardi A. Filamentous bacteriophage for aligning RNA, DNA, and proteins for measurement of nuclear magnetic resonance dipolar coupling interactions, *Methods Enzymol.* **2000**, *317*, 220-40

¹⁴³ Zweckstetter M, Bax A. Characterization of molecular alignment in aqueous suspensions of Pf1 bacteriophage. *J. Biomol. NMR* **2001**, *20*(4), 365-7

¹⁴⁴ Ramirez BE, Voloshin O.N., Camerini-Otero R.D., Bax A. (2000) Solution structure of DinI provides insight into its mode of RecA inactivation. *Protein Sci.* **2000**, *9* (11), 2161-9

¹⁴⁵ Kempe, M. D.; Ray, B. D.; Lipkowitz, K. B.; Prendergast, F. G.; Rao, B. D. N. "The Use of Lanthanides for Solution Structure Determination of Biomolecules by NMR: Evaluation of the Methodology with EDTA Derivatives as Model Systems", *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, *110*, 8275-8287

¹⁴⁶ Beger, R.; Marathias, V. M.; Volkman, B. F.; Bolton, P. H. "Determination of Internuclear Angles of DNA Using Paramagnetic-Assisted Magnetic Alignment", *J. Magn. Res.* **1998**, *135*, 256-259

$$D^{\text{res}} = D^{\text{anisotrop}} - D^{\text{isotrop}}$$

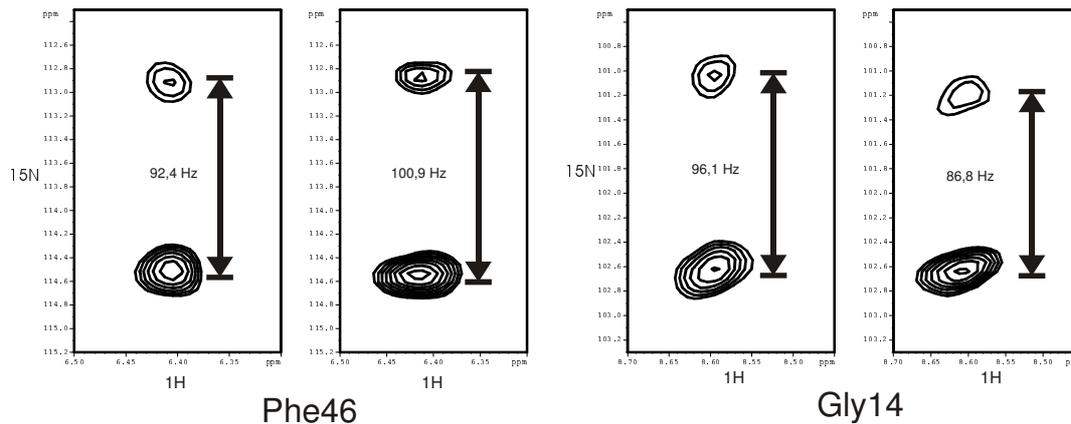


Abb. 76: Experimentelle Bestimmung der Dipolaren Kopplung für die Aminosäuren Phe46 und Gly14 des Cyclophilins. Der Wert ergibt sich aus der Differenz des Referenzspektrums ohne (links) und mit orientierendem Medium (rechts).

Zur Diskriminierung der verschiedenen Orientierungsmöglichkeiten ist ein weiterer Strukturparameter erforderlich. Dieser sollte aus den Messungen der Änderungen der chemischen Verschiebungen der Proteinresonanzen in der Bindungstasche gewonnen werden. Die aromatischen Systeme des Liganden verursachen durch den Ringstromeffekt eine Änderung der chemischen Verschiebungen der Resonanzen von Kernen in der Nähe der aromatischen Systeme. Diese Änderungen können ebenfalls in strukturelle Informationen übersetzt werden:

$$\delta^{\text{induced}} = \frac{\gamma_H \mu_0 \mu}{4\pi r^3} (3 \cos^2 \theta - 1)$$

mit δ = Induzierte Änderung der chemischen Verschiebung, r = Abstand zum aromatischen Ringsystem und θ = Projektionswinkel bezogen auf die Ebene des aromatischen Ringes.

Zur Orientierung wurden zunächst diverse Typen von Bicellen ausprobiert. Zwar konnte jeweils eine Orientierung des Proteins Cyclophilin erreicht werden; Problem war jedoch stets die starke Lipophilie der Liganden. Dies führte dazu, dass die Liganden aus der wässrigen Phase in das wesentlich lipophilere Innere der Bicellen übergegangen sind.

Eine Lösung dieses Problems brachte der Übergang zu wässrigen Lösungen von Pf1 Phagen. Die Phagen wurden von der Firma ASLA Biotech¹⁴⁷ bezogen (Pf1-Phage L11-92). Um die Aggregation des Cyclophilins an die Phagen zu verhindern, wurde schrittweise die Salzkonzentration erhöht. Bei einer 100mM NaCl-Lösung in 50mM Phosphatpuffer war eine stabile Lösung der Phagen und des Proteins zu erhalten. Zur Bestimmung des Grades der Orientierung wurden ¹⁵N,¹H-HSQC aufgenommen, bei denen die ¹J(H,N)-Kopplung nicht unterdrückt wurde. Die gemessenen Kopplungen liegen für reines Cyclophilin in einer Größenordnung von 91-96 Hz, bei steigenden Phagenkonzentrationen waren aufgrund des Beitrages der Dipolaren Kopplungen deutliche Abweichungen davon zu messen. Bei einer Phagenkonzentration von 10mg/ml zeigte sich eine hinreichende Orientierung des Cyclophilins, die im ¹⁵N,¹H-HSQC gemessenen residualen Dipolaren Kopplungen betragen bis zu 15 Hz. Mit einem Satz von 72 Werten konnte der Orientierungstensor für das Protein berechnet werden.

¹⁴⁷ ASLA Ltd. Bauskas 121, Riga, LV-1004 LATVIA; www.asla-biotech.com

Dipolare Kopplungen für den Liganden können durch Messung heteronuklearer Kopplungen (^1H , ^{13}C) oder homonuklearer Kopplungen (^1H , ^1H) gewonnen werden. Zur Unterscheidung zwischen Liganden und Proteinsignalen ist es notwendig, den Liganden in mindestens doppeltem Überschuss zuzugeben. Aufgenommen wurden sowohl E.COSY Spektren ($^3\text{J}(\text{H},\text{H})$ -Kopplungen) wie auch ^{13}C , ^1H -HSQCs ($^1\text{J}(\text{H},\text{C})$ -Kopplungen) an zwei unterschiedlichen Zusammensetzungen von Komplexen: Cyp:Ligand 1:2 und 1:5, jeweils in Gegenwart von 10mg/ml Pf1-Phagen.

Aus den maximalen Löslichkeiten und den Bindungskonstanten lassen sich die Anteile der gebundenen Form, d.h. des Komplexes berechnen. Aufgrund der geringen Löslichkeit des Liganden konnte selbst nach einer Messzeit von 6 Tagen je Spektrum kein befriedigendes Signal/Rausch Verhältnis erzielt werden. Von den zu erwarteten 13 Signalen aromatischer Protonen waren nur 3-5 (je nach Spektrum) zu beobachten. Die gemessenen Kopplungen waren recht klein, sie lagen im Bereich von 1-3 Hz. Eine quantitative Betrachtung der gebundenen Anteile des Liganden zeigt, dass diese bei 15% im Falle von D-63442 und bei 7% für D-83334 liegen, d.h. die gemessenen Kopplungen sind nur 1/7 bzw. 1/14 der zu erwartenden maximalen Kopplung. Aufgrund des schlechten Signal/Rausch-Verhältnisses liegt der Fehler der Messung in vergleichbarer Größenordnung wie die gemessenen Kopplungen, also ca. 1-2 Hz. Die Dipolaren Kopplungen alleine waren daher nicht ausreichend als Restraints zur Bestimmung der Struktur.

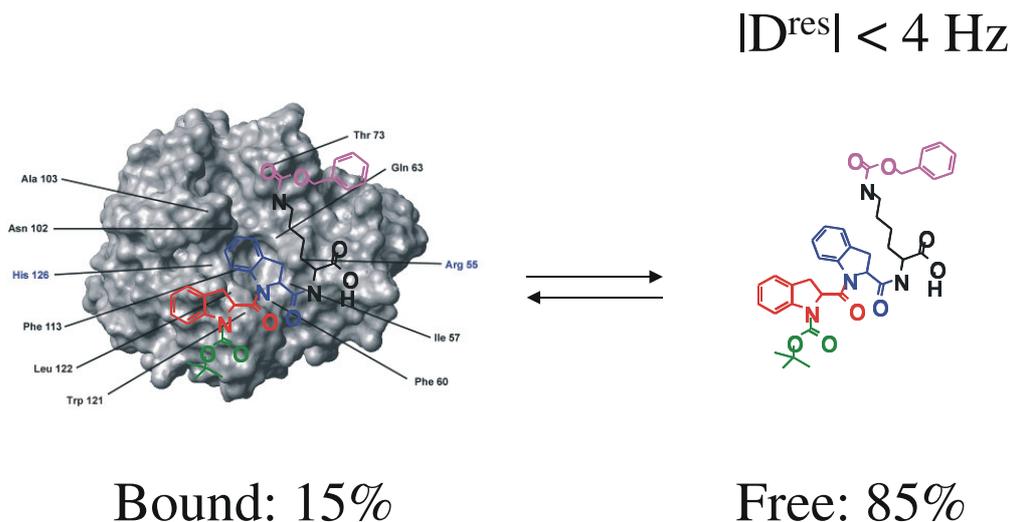


Abb. 77: Bereich des schnellen Austausches für AWD-63442: Durch den schnellen Austausch zwischen freier und gebundener Form werden die Werte gemittelt, d.h. die maximal messbaren residualen Dipolaren Kopplungen (D^{res}) sinken auf Werte von unter 4 Hz.

Daher wurden auch die Änderungen der chemischen Verschiebungen gemessen. Für AWD-63442 ($K_d \sim 1\text{mM}$, Löslichkeit $\sim 0.5\text{mM}$) ergibt sich, dass maximal 33% des Proteins im Komplex vorliegen. Alle am Protein gemessenen Effekte wie z.B. Änderungen der chemischen Verschiebungen skalieren sich somit um den Faktor 3 nach unten. Für AWD-83334 ($K_d \sim 3\text{mM}$, Löslichkeit $\sim 0.5\text{mM}$) liegt der Anteil an komplexiertem Protein sogar nur bei 14%, d.h. eine Skalierung der Effekte um den Faktor 7 nach unten.

Da bisher keine Protokolle zur Einbindung dieser Parameter in Strukturrechnungen existieren, wurde zunächst durch Molecular Modelling ein Satz von Komplexstrukturen erzeugt, der dann mit den gemessenen NMR-Parametern auf Konsistenz überprüft wurde. Für AWD-63442 (SSS-Enantiomer) konnte eine Struktur identifiziert werden, die in relativ

guter Übereinstimmung mit den NMR-Parametern liegt. Die beiden aromatischen Ringe der Indolincarbonsäureeinheiten binden am aktiven Zentrum und induzieren Änderungen der chemischen Verschiebungen der Amidprotonen von Ala101, Asn102, Ala103 und Phe60.

Für AWD-83334 (RRR-Enantiomer) war die Übereinstimmung etwas schwächer, was vor allem an den wesentlich kleineren gemessenen Effekten aufgrund der schwächeren Bindung liegt. Jedoch ließ sich auch hier eine Struktur finden, die in guter Übereinstimmung mit den NMR-Parametern ist. Die Änderungen der chemischen Verschiebungen zeigen für beide Enantiomere das gleiche Muster, so dass ein ähnlicher Bindungsmodus plausibel erscheint. In der Tat kommen in beiden Strukturen die Indolineinheiten in ähnlichen Positionen zu liegen. Die folgenden Abbildungen zeigen jeweils die Struktur des Komplexes sowie eine Überlagerung der beiden Enantiomere in ihrer gebundenen Form. Zur besseren Orientierung wurde Asn102 rot und Phe60 grün eingefärbt; AWD-63442 (SSS) wurde in blau, AWD-83334 (RRR) in magenta dargestellt.

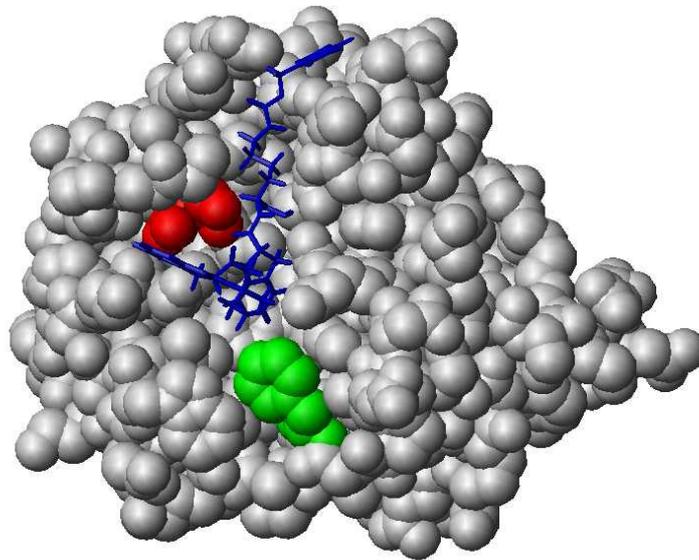


Abb. 78: AWD-63442 (SSS) (in blau dargestellt) gebunden an Cyclophilin A. Struktur aus Molecular Modelling mit bester Übereinstimmung zu NMR-Daten. Asn102 in rot, Phe60 in grün eingefärbt.

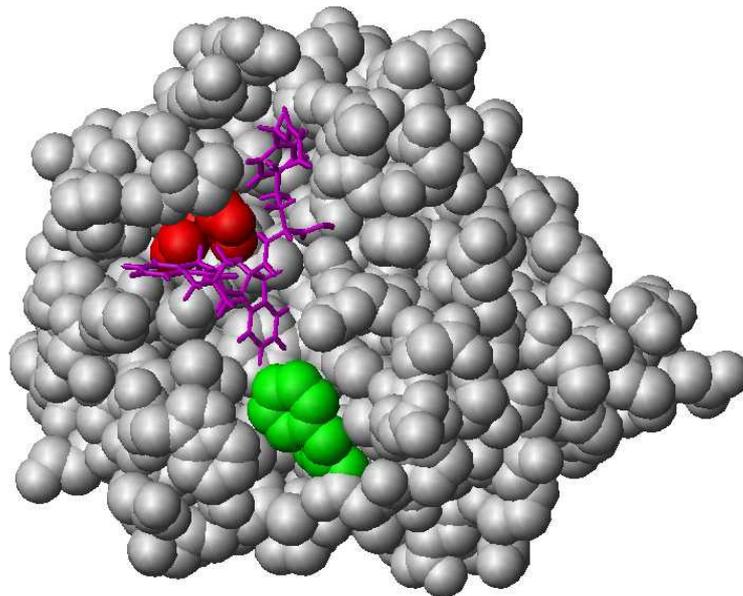


Abb. 79: AWD-83334 (RRR) (in magenta dargestellt) gebunden an Cyclophilin A. Struktur aus Molecular Modelling mit bester Übereinstimmung zu NMR-Daten. Asn102 in rot, Phe60 in grün eingefärbt.

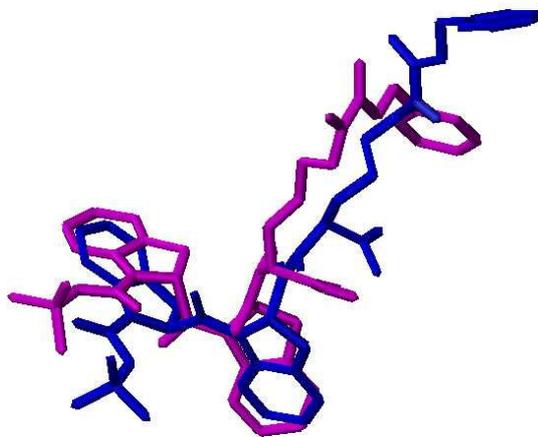


Abb. 80: Überlagerung der gebundenen Strukturen von AWD-63442 (blau) und AWD-83334 (magenta). Zur besseren Übersichtlichkeit wurden die Wasserstoffatome nicht dargestellt.

Ein Vergleich der Strukturen von Cyclophilin A im Komplex mit Cyclosporin A zeigt (Abb. 81), dass die hier untersuchten Liganden nur einen Teil der CsA-Bindungsstelle abdecken, und zwar jenen zwischen Asn102 und Phe60. Jedoch scheint dies für eine effiziente Hemmung des Cyclophilins ausreichend zu sein, da die Bindungsregion der Liganden die katalytisch aktiven Aminosäuren His126 und Arg55 einschließt.

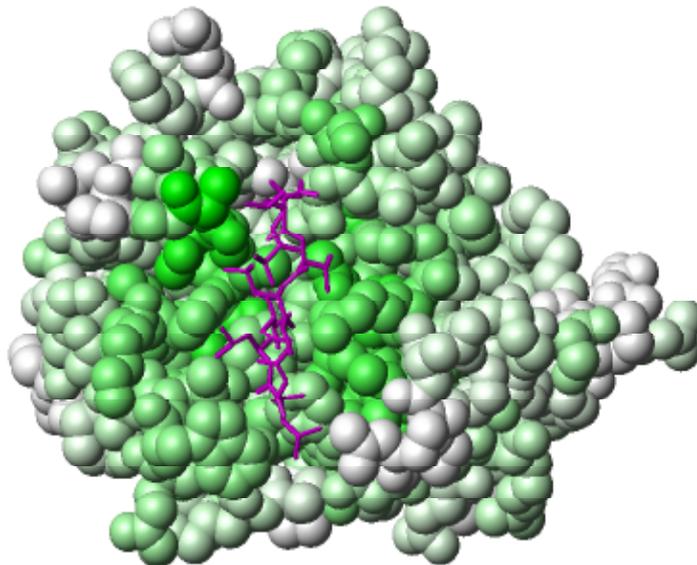


Abb. 81: Cyclophilin A mit Cyclosporin A (magenta), gleiche Orientierung des Cyclophilins wie in oben. Intensiv grün eingefärbt sind Ala101, Asn102 und Phe60, die auch die stärksten Änderungen der chemischen Verschiebung zeigen.

6.8.4 Zusammenfassung der Ergebnisse

Mittels $^{15}\text{N}, ^1\text{H}$ -HSQC-Messungen wurde die Bindungsstelle von AWD-63442 und AWD-83334 an humanem Cyclophilin A bestimmt. Diese spannt sich um das aktive Zentrum des Cyclophilins auf. Durch Messung der Konzentrationsabhängigkeit der chemischen Verschiebungsänderungen am Cyclophilin konnten die K_d -Werte für beide Substanzen ermittelt werden. Sie liegen jeweils im mM-Bereich, was einen schnellen Austausch des Liganden bedeutet.

Versuche, eine Struktur des Komplexes mittels NOEs zu bestimmen sind daher aufgrund des raschen Austausches gescheitert. Es wurde daher nach neuen Strukturparametern gesucht, die Aufschluß über die Orientierung des Liganden in Bezug zum Protein liefern können. Ein derartiger Parameter ist die Dipolare Kopplung. Da sich jedoch aus der Symmetrie des Anisotropie-Tensors bis zu vier mögliche Orientierungen ergeben, wurden zusätzlich die Änderungen der chemischen Verschiebungen quantifiziert, die die aromatischen Ringe durch sogenannte Ringstromeffekte auf Protonen (hier des Proteins) in ihrer unmittelbaren Umgebung haben.

Da in den bisher verfügbaren Strukturrechnungsprogrammen keine Implementation für diese Arten von Restraints gibt, wurde daran gearbeitet. Bis zum Abschluß des Projektes konnte jedoch keine zufriedenstellende Implementierung erreicht werden. Daher wurden Komplexstrukturen durch Docking erzeugt, wobei schon die im NMR charakterisierte Bindungsstelle als Input verwendet wurde. Das Docking lieferte für AWD-63442 und AWD-83334 eine Vielzahl unterschiedlicher Lösungen, die sich im Qualitätsfaktor für das Docking nicht signifikant unterschieden. Mit Hilfe der zusätzlichen Restraints aus chemischen Verschiebungsänderungen konnte jedoch ein Komplex jeweils favorisiert werden.

6.9 Zusammenfassung Teilprojekt AWD GmbH

Durch Screening einer selektiven kombinatorischen Bibliothek auf Bindung an die Peptidyl Prolyl *cis/trans* Isomerase CypB konnten einer Reihe von Verbindungen mit Wirkung auf das Immunsystem, speziell auf Asthma identifiziert werden. Als exemplarische Substanz wurde ein aus der Indolin-2-carbonsäure abgeleitetes Pharmakon, D-43787, eingehender auf eine vom Wirkungsmechanismus des Cyclosporin A abgeleitete biochemische Signalkette untersucht. Dabei kamen zwei rekombinant in aktiver Form hergestellte Cyclophiline zum Einsatz, das prototypische, als Cyclosporin A –Rezeptor gehandelte Cyp18 und das im ER lokalisierte CypB. Für Calcineurin wurde ebenfalls ein neuer Assay entwickelt. Im Gegensatz zu Literaturergebnissen zum Cyclosporin A wirkt D-43787 weder direkt noch über einen gain-of-function Mechanismus inhibitorisch auf Calcineurin ein. Ebenfalls ausgeschlossen ist ein Mechanismus, in dem D-43787 die PPlase-Aktivität von Cyp18 oder CypB inhibiert. Somit muss für die biologischen Effekte von D-43787 und verwandten Strukturen ein vom Cyclosporin A unterschiedlicher, noch unbekannter Mechanismus angenommen werden. Die Einbindung von Cyclophilinen in die von D-43787 beeinflusste Signalkette wird dadurch evident, dass diese Verbindungsklasse in einem auf die Bindung an CypB basierenden Screen auffällig geworden ist.

Zunächst wurde hauptsächlich die Wirkung einer ausgewählten Leitsubstanz auf die Produktion von Zytokinen *in vitro* untersucht. Um genaueren Aufschluß über Struktur-Wirkungsbeziehungen und die Aktivität von Metaboliten bzw. Bausteinen zu erhalten, wurden alle Diastereoisomere und verfügbaren Bausteine im *in vitro* System auf ihre Eigenschaft, Zytokine zu inhibieren, untersucht.

Zur Überprüfung und Erweiterung der Ergebnisse der kombinatorischen Substanzen wurden zwei bakterielle Expressionssysteme für humanes Cyclophilin B konstruiert. Das expremierte CypB Protein zeigte eine mit humanem CypA vergleichbare enzymatische Aktivität. Zwei unterschiedliche Substanzklassen wurden vermessen, wobei der inhibitorische Einfluss der Substanzen auf die PPlase-Aktivität von *hCypB* im Protease-gekoppelten PPlase-Assay bestimmt wurde. Hierbei wurde festgestellt, dass die untersuchten Substanzen keine Liganden mit guten Affinitäten zum aktiven Zentrum von Cyp18 bzw. zu zwei anderen orthologen CypB-Enzymen sind. Der Nachweis einer Bindung außerhalb des aktiven Zentrums von CypB (Cyp23) scheiterte daran, dass keine gut löslichen Derivate mit entsprechender biologischer Aktivität zur Verfügung gestellt werden konnten. Weiterhin wurden in diesem Teilprojekt Arbeiten zur vertieften biologischen Charakterisierung potentieller Immunmodulatoren unternommen. Zunächst wurde die Methode der 2D-Gelelektrophorese etabliert und Protokolle wurden entwickelt, um das Proteom humaner T-Zellen im 2D-Gel darzustellen. Dann wurde die Wirkung der Substanzen auf das Proteom humaner T-Zellen mit dieser Methode untersucht. Dabei wurden einzelne Proteinspots identifiziert, deren Expression durch die Einwirkung dieser Substanzen verändert wird.

Nach der erfolgreichen Fertigstellung einer stabilen Reporterlinie mit Luciferase-Expression unter Kontrolle von Stat6 und deren Optimierung beschäftigen sich die weiteren Arbeiten mit dem Ziel, stabile Reporterlinien unter der Kontrolle von Promotoren anderer Cytokine (z. B. IL-4 oder IFN- γ) herzustellen. Die beiden Promotoren sollen in der gleichen Zell-Linie und in möglichst vergleichbaren Konstrukten getestet werden, um in einem späteren Screening die Expression der zentralen Cytokine einer Th1- bzw. Th2-Antwort parallel untersuchen zu können. Da die bisher verwendeten Promotorkonstrukte nur in einen Luciferase-Vektor inkloniert waren, der keine Resistenz enthält, die man zur Etablierung stabiler Klone heranziehen könnte, mussten die Promotoren neu kloniert werden. Als Background wurde ein Vektor gewählt, der neben dem Luciferase-Gen auch eine Neomycin-Resistenz besitzt. Da die ‚multiple cloning sites‘ des ursprünglichen Luciferase-Vektors und des Neomycin-Luciferase-Vektors völlig unterschiedlich waren, konnten die Promotoren nicht umklont werden, sondern mussten mit entsprechenden Primern neu amplifiziert und anschließend

natürlich auch sequenziert werden. Beide Promotorkonstrukte konnten schließlich erfolgreich in den neuen Transfektionsvektor inkloniert werden. Beide Konstrukte lassen sich transient sehr gut in die humane T-Zell-Linie Jurkat transfizieren und mit TPA / Ionomycin stimulieren. Dabei ergeben sich Induktionsraten von ca. 15-20 facher Induktion gegenüber nicht induzierten Kontrollzellen. Parallel zu diesen Experimenten wurde ausgetestet, ab welcher Konzentration das Selektions-Antibiotikum Geneticin toxisch auf Jurkat-Zellen wirkt. Die Titration ergab eine optimale Konzentration von 1 µg/ml. Parallel zu weiteren transienten Transfektionen wurden transfizierte Einzelklone in Geneticin-hältigem Medium hochgezogen. Die bisher getesteten Klone waren leider nicht wie oben beschrieben induzierbar. Da die Klone wachsen und somit vermutlich das Resistenz-Gen enthalten, sollte eigentlich auch der Promoter im Genom vorhanden sein, da beide Gene auf einem Vektor liegen. Offensichtlich ist jedoch entweder die Promoter-Region, oder das Luciferase-Gen nach der Integration des Vektors nicht mehr zugänglich oder defekt. Bisher ließen sich keine stabilen Klone erhalten, die eine gute Induzierbarkeit zeigen.

Die IL-4R α Kette, die als wesentlicher Rezeptorbestandteil sowohl die Signale des IL-4 als auch die des IL-13 vermittelt, ist ursächlich an der Entstehung und Aufrechterhaltung von Allergien und Asthma beteiligt. Ein "IL-4R α Blocker" verspricht neue Therapieansätze für diese häufigen schwerwiegenden Erkrankungen. Bisher konnten noch keine niedermolekularen Hemmstoffe für IL-4R α gefunden werden. Ein Grund für diesen Misserfolg ist wahrscheinlich das große und komplizierte Bindungsepitop für den Liganden, das nahezu 20 Aminosäurereste umfaßt. Ein möglicher Ausweg ergibt sich aus strukturellen und funktionellen Untersuchungen, die zeigen, dass das Bindungsepitop aus zwei unabhängigen Bindungsclustern aufgebaut ist. Cluster I ist um Glu 9 und Cluster II um Arg88 des IL-4 aufgebaut. Ziel des Projekts ist eine Struktur-basierte Entwicklung niedermolekularer Wirkstoffe, die an den Rezeptor IL-4R α binden und dadurch die Interaktion mit IL-4 hemmen (IL-4R α Blocker). Dazu sollen die experimentell bestimmten Bindungsdeterminanten für ein Pharmakophor-Design genutzt werden. Der wesentliche neue Ansatz bestand darin, das große gesamte Bindungsepitope in zwei Bindungscluster aufzuteilen, die dann getrennt bearbeitet werden. Die Entwicklung erfolgte in mehreren Schritten: Es wurde ein Pharmakophor sowohl für Cluster I (um Glu 9 des IL-4) als ein Cluster II (um Arg88 des IL-4) entworfen und optimiert. Die Kriterien waren (1) eine Trefferrate von $<0,1\%$ nach in silicio abzusuchen von Substanz-Datenbanken, (2) in Docking Experimenten eine Komplexbildung der gefundenen Substanzen mit IL-4R α Ektodomäne in dem ursprünglich geforderten Bindungsmodus, und (3) eine berechnete Bindungsaffinität $dG >20\text{kJoule/mol}$. Auf der Basis der Raumstruktur des IL-4/IL4-BP Komplexes und von Mutationsdaten wurden mehrere Pharmakophore sowohl für Cluster I wie für Cluster II entworfen, welche Atomanordnungen der Bindungsdeterminanten des humanen IL-4 widerspiegeln. Mit jedem der Pharmakophore wurden mehrere Substanzbanken mit im Ganzen 456 407 Verbindungen virtuell abgesucht. Die Verbindungen sind nach Lipinski's "rule-of-5" vorsortiert worden.

Bei der Suche mit dem besten Cluster I Pharmakophor wurden 1526 Treffer erzielt; mit dem Cluster II Pharmakophor 189. Die auffälligen Verbindungen wurden einer Docking Simulation mit dem IL-4 Rezeptor unterzogen. Außer der Geometrie der Rezeptor-gebundenen Verbindung wurde die freie Energie der Bindung berechnet. Nach Durchmusterung der Bindungsmodi jeder Verbindung wurden 20 Cl. I Verbindungen bzw. 76 der Cl. II Verbindungen gekauft. Diese wurden mit der Biacore Technik vermessen. Vier Verbindungen aus der Cl. I Suche und zwei Verbindungen aus der Cl. II Suche waren positiv bei Konzentrationen über 0,1 mM. Allerdings wurde bis 0,75 mM keine Sättigung erreicht. In weiteren Versuchen zeigte sich, dass die beobachtete Bindung nicht spezifisch für den IL-4 Rezeptor war. Alle aus den Pharmakophorsuchen hervorgegangenen chemischen Strukturen zeigten bei der anschließenden in vitro Analyse auf Rezeptorbindung keine Wirkung. Allerdings wurden bei den durchgeführten Berechnungen wichtige methodische Erkenntnisse gewonnen, die bei der Bearbeitung neuer Fragestellungen im Struktur-basierten Drugdesign nützlich sein werden.

7. Zusammenfassung der Ergebnisse und Ausblick Gesamtprojekt

Bedingt durch die Neuausrichtung des Projekts nach etwa 1,5 Jahren Laufzeit, konnten die ursprünglichen Ziele des Projekts nur in Teilen erreicht werden. Bezogen auf die Ziele und Aufgaben nach der Aufteilung kann aber festgestellt werden, dass die wesentlichen Projektziele in den beiden Teilprojekten für den Förderzeitraum erreicht wurden. Durch die stärkere Einbeziehung der Tumorforschung wurden auch auf diesem Gebiet beachtliche zusätzliche Beiträge erarbeitet.

Zusammenfassung der wesentlichen wissenschaftlich-technischen Ergebnisse:

- Aufbau und Validierung neuer biochemischer und zellulärer Screening-Systeme
- Erweiterung und Verfeinerung des Methodenspektrums
- Anwendung der NMR-Methodik auf bestimmte Aufgabenstellungen im Rahmen der Erwartungen
- Erfolgreiche Molecular Modeling Arbeiten zur Definition von Bindungsepitopen und zur Aufstellung von Pharmakophormodellen
- Durchführung von Struktur-Wirkungs-Betrachtungen, davon abgeleitet Erarbeitung von konkreten Synthesevorschlägen zur Optimierung von Leitstrukturen
- Vertiefte biologische Charakterisierung von ausgewählten Verbindungen
- Erfolgreiche Optimierung bekannter und neuer Leitstrukturen mittels Methoden der Medizinischen Chemie
- Bereitstellung von neuen Testsubstanzen mittels Parallelsynthese und Kombinatorische Chemie
- Umfangreiche Literatur- und Patentrecherchen

Darunter wurden u.a. folgende Einzelergebnisse erarbeitet:

- Beiträge zur Aufklärung des Wirkmechanismus von D-43787
- Design von Pharmakophor-Modellen für den IL-4R α Rezeptor und virtuelles Screening von ca. 450.000 Substanzen.
- Testung von ausgewählten Substanzen auf Hemmung der PPlase Aktivität von hCypB.
- Untersuchungen zum Einfluß von Substanzen des Typs Indolin-2-carbonsäure auf das Proteom von T-Zellen.
- Synthese einer Substanzbibliothek um die Leitstruktur D-24203 mittels Parallelsynthese, Identifizierung aktiver und besser löslicher Verbindungen.
- Nachweis der direkten Bindung ausgewählter Ketopiperazide an Tubulin und Untersuchung der Verdrängung von Colchicin mittels NMR.
- Synthese einer Verbindungsbibliothek um eine neu gefundene Leitstruktur mit Indazol-3-carbonsäureamidgrundgerüst.

Insgesamt hat das Projekt interessante und beachtliche Beiträge zum molekularbiologischen Verständnis der Krankheit aber auch zur konkreten Entwicklung neuer Asthma/Allergie- und Krebsmedikamente erarbeitet. Dies betrifft sowohl methodische Aspekte und Komponenten der Grundlagenforschung als auch die konkrete Bereitstellung von neuen Substanzen für die biologische Testung und Profilierung in den obigen Indikationen. Auch wenn bisher kein direkter Entwicklungskandidat resultierte, sind wichtige Schritte in diese Richtung realisiert worden.

Das Projekt hat bestätigt, dass es sinnvoll ist, komplexe Fragestellungen wie die rationale Wirkstofffindung, in einem Verbund von akademischen Einrichtungen und mittelständigen, forschenden Pharmaunternehmen zu bearbeiten.

Die Zusammensetzung des Verbundprojekts war funktional richtig und zahlreiche Synergien haben sich in der Praxis ausbilden können. Aufgrund der Restrukturierung von ASTA Medica und der damit verbundenen Neuausrichtung konnte das Projekt in der ursprünglichen Fassung nicht realisiert werden.

Ausgewählte Ergebnisse aus dem Projekt wurden und werden in Publikationen, Posterveranstaltungen und wiss. Vorträgen durch die Projektpartner vorgestellt.