

Synthese und Evaluierung neuartiger bi- und monofunktionaler Inhibitoren für Cyclophiline und FK506-bindende Proteine

Dissertation

zur Erlangung des
Doktorgrades der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

der

Naturwissenschaftlichen Fakultät I – Biowissenschaften –

der Martin-Luther-Universität
Halle-Wittenberg,

vorgelegt

von Herrn
Dipl. Chem. Martin Theuerkorn

geb. am 08.12.1981 in Halle/Saale

Gutachter:

1. Prof. Dr. Gunter Fischer
2. Prof. Dr. Mike Schutkowski
3. Prof. Dr. Reinhard Wetzker

Halle, den 02.12.2015

Inhalt

| | | |
|------------|---|-----------|
| 1 | Einleitung | 1 |
| 1.1 | Peptidyl-Prolyl-<i>cis/trans</i>-Isomerasen | 1 |
| 1.1.1 | Biochemische Funktion der Peptidyl-Prolyl- <i>cis/trans</i> -Isomerasen | 1 |
| 1.1.2 | PPlasen und Immunsuppression | 3 |
| 1.2 | Physiologische Funktion der PPlasen | 4 |
| 1.3 | Nicht-immunsuppressive PPlase-Inhibitoren | 4 |
| 1.4 | Bifunktionelle Moleküle | 7 |
| 1.5 | Zielstellung | 8 |
| 2 | Ergebnisse | 10 |
| 2.1 | Die dualen Inhibitoren FK506-C₄₀-CO-NH(CH)_nNH-[OCCH₂-D-Ser]⁸-CsA | 10 |
| 2.1.1 | Synthese der FK506-C ₄₀ -carbonsäure 1 | 10 |
| 2.1.2 | Biochemische Untersuchung der FK506-C ₄₀ -carbonsäure 1 | 10 |
| 2.1.3 | Synthese des [O-(Carboxymethyl)-D-Ser] ⁸ -CsA 2 | 13 |
| 2.1.4 | Biochemische Untersuchung des [O-(Carboxymethyl)-D-Ser] ⁸ -CsA 2 | 13 |
| 2.1.5 | Auswahl der Linker | 16 |
| 2.1.6 | Synthese der FK506-C ₄₀ -CO-NH(CH) _n NH ₂ -Derivate 3-6 | 16 |
| 2.1.6 | Biochemische Untersuchung der FK506-C ₄₀ -CO-NH(CH) _n NH ₂ -Derivate 3-6 | 17 |
| 2.1.7 | Synthese der dualen Inhibitoren FK506-C ₄₀ -CO-NH(CH) _n NH-[OCCH ₂ -D-Ser] ⁸ -CsA 7-10 | 19 |
| 2.1.8 | Untersuchung der Inhibition der PPlase Aktivität von <i>h</i> FKBP12 und <i>h</i> CypA der Verbindungen 7-10 | 20 |
| 2.1.9 | Untersuchung der <i>h</i> FKBP12-Inhibition durch die <i>h</i> CypA*[7-10]-Komplexe | 23 |
| 2.1.10 | Bestimmung der <i>h</i> CypA-Inhibition durch die <i>h</i> FKBP12*[7-10]-Komplexe | 24 |
| 2.1.11 | Untersuchung der Inhibition der CaN-Aktivität..... | 25 |
| 2.2 | Die dualen Inhibitoren CHX-CH₂CO-NH(CH)_nNH-[OCCH₂-D-Ser]⁸-CsA 16-19 | 28 |
| 2.2.1 | Synthese von <i>N</i> -(Carboxymethyl)-Cycloheximid 11 | 28 |
| 2.2.2 | Biochemische Eigenschaften des <i>N</i> -(Carboxymethyl)-Cycloheximid 11 | 29 |
| 2.2.3 | Synthese der [D-Ser-CO-NH(CH) _n NH ₂] ⁸ -CsA-Derivate 12-15 | 30 |
| 2.2.4 | Untersuchung der Inhibition der <i>h</i> CypA-PPlase-Aktivität der [D-Ser-CO-NH(CH) _n NH ₂] ⁸ -CsA-Derivate 12-15 | 30 |
| 2.2.5 | Synthese der dualen Inhibitoren CHX-CH ₂ CO-NH(CH) _n NH-[OCCH ₂ -D-Ser] ⁸ -CsA 16-19 | 31 |
| 2.2.6 | Untersuchung der Inhibition der <i>h</i> FKBP12 und <i>h</i> CypA-PPlase-Aktivität durch Verbindungen 16-19 | 32 |
| 2.2.7 | Synthese des CHX-CH ₂ CO-NH(CH ₂) ₂ O(CH ₂) ₂ O(CH ₂) ₂ NH-[OCCH ₂ -D-Ser] ⁸ -CsA-Derivates 20 | 33 |
| 2.2.8 | Untersuchung der Inhibition der PPlase-Aktivität von <i>h</i> FKBP12 und <i>h</i> CypA durch Verbindung 20 . | 34 |

| | | |
|------------|--|-----------|
| 2.2.9 | Bestimmung der Inhibition der CaN-Aktivität der Verbindungen 16-20 | 35 |
| 2.3 | Synthese und biochemische Eigenschaften des FK506-C₄₀-CONHC(CH₃)₃-Derivates 21 und FK506-C₉-COOMe-Derivates 22..... | 36 |
| 2.3.1 | Synthese des FK506-C ₄₀ -CONHC(CH ₃) ₃ -Derivates 21 | 37 |
| 2.3.2 | Synthese des FK506-C ₉ -COOMe-Derivates 22 | 38 |
| 2.3.3 | Bestimmung der Inhibition der hFKBP12-PPlase-Aktivität der Verbindung 21 und 22 | 38 |
| 2.3.4 | Bestimmung der Inhibition der CaN-Aktivität der Verbindungen 21 und 22 | 39 |
| 2.4 | Synthese und biochemische Eigenschaften neuartiger Cycloheximid-Derivate..... | 41 |
| 2.4.1 | Synthese und biochemische Eigenschaften von <i>N</i> -(<i>N</i> '-Alkylcarboxamidomethyl)-cycloheximid-Derivaten..... | 42 |
| 2.4.2 | Synthese und biochemischer Eigenschaften von <i>N</i> -(<i>N</i> '-Adamantylcarboxamidomethyl)-cycloheximid-Derivaten | 44 |
| 2.4.3 | FKBP-Bindestellen-modifizierte Derivate der Verbindung 30 | 48 |
| 2.4.4 | Biochemische Eigenschaften der modifizierten Verbindungen 38-42 | 50 |
| 2.4.5 | Synthese und biochemische Eigenschaften zyklischer <i>N</i> -(<i>N</i> '-Alkylcarboxamidomethyl)-cycloheximid-Derivate verschieden zu Adamantan | 51 |
| 3 | Diskussion der Ergebnisse der Synthese und biochemischen Untersuchung | 55 |
| 3.1 | Die dualen Inhibitoren FK506-C₄₀-CO-NH(CH)_nNH-[OCCH₂-D-Ser]⁸-CsA 7-10..... | 56 |
| 3.1.1 | Synthese der FK506-C ₄₀ -carbonsäure 1 | 56 |
| 3.1.2 | Biochemische Eigenschaften der dualen Inhibitoren FK506-C ₄₀ -CO-NH(CH) _n NH-[OCCH ₂ -D-Ser] ⁸ -CsA 7-10 | 63 |
| 3.2 | Die dualen Inhibitoren CHX-CH₂CO-NH(CH)_nNH-[OCCH₂-D-Ser]⁸-CsA 16-20..... | 67 |
| 3.3 | Synthese und biochemische Eigenschaften des FK506-C₄₀-CONHC(CH₃)₃-Derivates 21 und FK506-C₉-COOMe-Derivates 22..... | 69 |
| 3.4 | Synthese und biochemische Eigenschaften neuartiger Cycloheximid-Derivate..... | 70 |
| 3.4.1 | Verbindungen mit modifizierten FKBP-Bindestellen | 73 |
| 4 | Biologische Untersuchung der Substanzen 7, 20, 21 und 22 im Tiermodell der Multiplen Sklerose und dem Morbus Parkinson | 78 |
| 4.1 | Die Experimentelle Autoimmune Enzephalomyelitis als Tiermodell der Multiplen Sklerose | 78 |
| 4.2 | Das 6-Hydroxydopamin-Modell als Tiermodell des Morbus Parkinson..... | 80 |
| 4.3 | Ergebnisse der Verbindungen 7, 20, 21, 22 in den EAE- und 6-OHDA-Tiermodellen..... | 81 |
| 4.3.1 | Die Verbindung 7 im EAE-Tiermodell der Multiplen Sklerose..... | 81 |
| 4.3.2 | Die Verbindungen 7, 20, 21 und 22 im 6-OHDA-Tiermodell des Morbus Parkinson | 87 |
| 5 | Diskussion der Ergebnisse der Tiermodelle | 90 |
| 6 | Zusammenfassung | 97 |

| | | |
|------------|--|------------|
| 7 | Experimenteller Teil | 100 |
| 7.1 | Materialien und Instrumente | 100 |
| 7.2 | Synthese der Verbindungen | 103 |
| 8 | Literaturverzeichnis | 132 |
| | Lebenslauf..... | 142 |
| | Selbstständigkeitserklärung..... | 144 |

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|---------------------------|--|
| [D-Ser] ⁸ -CsA | [D-Serin] ⁸ -Cyclosporin A |
| ANT | Adenine Nucleotide Translocator |
| AS | Aminosäure |
| ATP | Adenosintriphosphat |
| Bad | Bcl-2-Antagonist of cell death |
| Bak | Bcl-2 homologous antagonist killer |
| Bax | Bcl-2 associated X protein |
| Bcl-2 | B-cell lymphoma 2 |
| Bcl-xl | B-cell lymphoma-extra large |
| CaM | Calmodulin |
| CaN | Calcineurin |
| CHX | Cycloheximid |
| COMT | Catechol-O-Methyltransferase |
| CsA A | Cyclosporin A |
| Cyp | Cyclophilin |
| DAT | Dopamintransporter |
| 1,2-DCB | 1,2-Dichlorbenzol |
| DIPEA | Diisopropylethylamin |
| DM-CHX | <i>N</i> -(<i>N</i> ', <i>N</i> '-Dimethylaminocarboxylmethyl) |
| DMF | Dimethylformatid |
| EDO | 2,2'-(Ethylendioxy)-diethylamin |
| EDTA | Ethylendiamintetraessigsäure |
| ER | Endoplasmatisches Retikulum |
| FKBP | FK506-bindendes Protein |
| FKS | fötale Kälberserum |
| GSH | Glutathion |
| HATU | 1-[Bis(dimethylamino)methylene]-1H-1,2,3-triazolo[4,5-b]-pyridinium-3-oxid hexafluorophosphate |
| Hsp90 | Heat shock protein 90 |
| IC ₅₀ | halbmaximale inhibitorische Konzentration |
| I-Effekt | induktiver Effekt |
| iNO | inducible-Nitric Oxide-Synthetase |
| IP ₃ | Inositol-1,4,5-triphosphat |
| k.-o. | knock-out |

| | |
|----------------|---|
| L-DOPA | Levodopamin |
| MAO | Monoaminoxidase |
| MDR | Multi Drug Resistence |
| Me-CBS | 2-Methyl-CBS-oxazaborolidine |
| MLR | Mixed Lymphocyte Reaction |
| MPTP | Mitochondrial Permeability Transition Pore |
| MS | Multiples Sklerose |
| mTor | mammalian Target of Rapamycin |
| MW | Mikrowelle |
| NFAT | Nuclear Factor of Activated T-cells |
| NGF | Neurite Growth Factor |
| NO | Stickstoffmonoxid |
| 6-OHDA | 6-Hydroxydopamin |
| PD | Parkinson Disease (Morbus Parkinson) |
| Pfmdr1 | Plasmodium falciparum multidrug resistance protein 1 |
| Pgh1 | P-Glykoprotein Homologe 1 |
| Pgp | P-Glykoprotein |
| PMA | Phorbol 12-myristate 13-acetate |
| pNA | para-Nitroanilin |
| PPIase | Peptidyl-Prolyl- <i>cis/trans</i> -Isomerase |
| PyBOP | benzotriazol-1-yl- oxytripyrrolidinophosphonium hexafluorophosphate |
| RNS | Reactive Nitrogen Species |
| ROS | Reactive Oxygen Species |
| RP-HPLC | Reverse Phase High Performance Liquid Chromatography |
| R _t | Retentionszeit |
| SNpc | Substantia nigra pars compacta |
| SOD | Superoxiddismutase |
| succ | succinyl |
| α -Syn | α -Synuclein |
| TFA | Trifluoressigsäure |
| TH | Thyrosinhydroxylase |
| TPR | Tetratricopeptide Repeat-Domäne |
| VDAC | Voltage-Dependent Anion Channel |

VMAT2

WHO

ZNS



vesikulären Monoamintransporter 2

World Health Organization

Zentrales Nervensystem

sterische Abschirmung

Danksagung

Zuallererst möchte ich Prof. Dr. Gunter Fischer danken, für die Möglichkeit meine Promotionsarbeit in seiner Arbeitsgruppe durchzuführen und für die Ausgabe des interessanten sowie anspruchsvollen Themas. Mein Dank gilt insbesondere Dr. Matthias Weiwad für die Betreuung meiner Arbeit, die fachliche Unterstützung und die ständige Diskussionsbereitschaft. Des Weiteren danke ich Ihm und Frau Helga Ungar für die unzähligen Messungen des PPlase-Assays. Dr. Erik Prell und Frau Martina Heidler danke ich für die Messungen direkten Calcineurin-Inhibitionsassay und des NFAT-Reporter-Gen-Assays. Frau Christina Gersching und Frau Dr. Angelika Schierhorn gilt mein Dank für die zahlreichen massenspektrometrischen Analysen. Frau Ilona Kunze möchte ich für den Spaß und die tatkräftige Unterstützung im Labor danken. Bedanken möchte ich mich weiterhin bei allen Mitarbeitern der Max-Planck-Forschungsstelle für das angenehme Arbeitsklima und die ständige Hilfsbereitschaft.

Mein besonderer Dank gilt PD Dr. Günther Jahreis, Dr. Christian Beyer und Dr. Erik Prell für ausgiebige Gespräche und Diskussionen, auch nicht fachlicher Natur, sowie für Kekse am Morgen und Bier am Abend.

Dank gebührt auch Dr. Werner Schmidt und Dr. Frank Striggow aus der Arbeitsgruppe Neurodegeneration und Interventionsstrategien am Deutschen Zentrum für Neurodegenerative Erkrankungen e.V. (DZNE) für die Untersuchung der Substanzen in den Tiermodellen der Multiplen Sklerose und des Morbus Parkinson.

Großer Dank gilt besonders meinen Eltern und meiner Familie für die finanzielle und mentale Unterstützung während meines Studiums.

trans-Peptidbindungen in entfalteten Polypeptiden. Eine Ausnahme bildet die Peptidyl-Prolyl-Bindung. Bedingt durch die strukturellen Besonderheiten der α -Iminosäure Prolin beträgt der Anteil an Peptidyl-Prolylbindungen, die in globulären Proteinen in der *cis*-Konformation vorliegen, ungefähr 4,8 %^{[5],[6],[7],[8]}.

Die *cis/trans*-Isomerisierung von Peptidyl-Prolylbindungen stellt als Folge einer hohen Rotationsbarriere (ca. 80 kJmol⁻¹) eine langsame Reaktion dar^{[9],[10]}, die für konformationelle Restrukturierungsprozesse von Proteinen geschwindigkeitsbestimmend sein kann. Spezifische Enzyme, die die *cis/trans*-Isomerisierung von Peptidyl-Prolylbindungen beschleunigen, sind die Peptidyl-Prolyl-*cis/trans*-Isomerasen (PPlasen, EC 5.2.1.8), deren Existenz erstmals 1984 von FISCHER *et al.* nachgewiesen werden konnte^[11] (Abb.2).

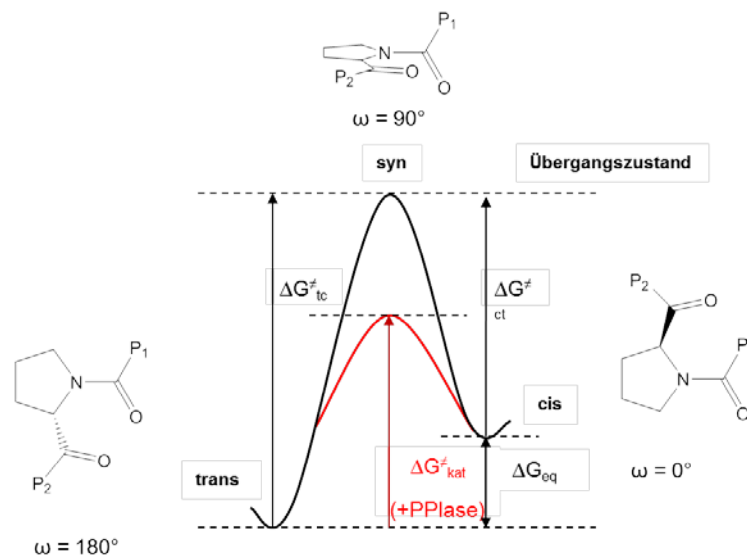


Abbildung 2: Energiediagramm der Peptidyl-Prolyl-*cis/trans*-Isomerisierung. Die Konformationsänderung verläuft über den energetisch höher liegenden *syn*-Übergangszustand der intrinsischen (schwarze Kurve) oder PPlase-katalysierten (rote Kurve) Reaktion.

Die Enzymklasse der PPlasen unterteilt sich in drei Familien: Cyclophiline (Cyp)^[11], FK506-bindende Proteine (FKBP)^{[7],[12],[13]} und Parvuline^[14]. Diese unterscheiden sich in Primärstruktur, Substratspezifität und Sensitivität gegenüber Inhibitoren. Die PPlase-Aktivität der Cyclophiline wird spezifisch durch CsA^{[15],[16]} und die der FKBP durch FK506 und Rapamycin^{[17],[18]} kompetitiv gehemmt. Die PPlasen der Parvulin-Familie sind durch diese Inhibitoren nicht inhibierbar.

CsA tritt über den Sequenzbereich von *N*-Methyl-Leucin in Position 10 bis L- α -Aminobuttersäure in Position 2^{[19],[20]} mit dem aktiven Zentrum von Cyclophilinen in

Wechselwirkung (Abb.3 Cyp-Bindestelle). FK506 und das Rapamycin interagieren über die Region des Pyranoseringfragments bis zur Cyclohexylgruppe mit FKBP, wobei dem einer Prolylpeptidbindung verwandten α -Keto-pipecolinsäureamid eine besondere Rolle bei der Bindung an das aktive Zentrum der FKBP zuerkannt wird (Abb.3 FKBP-Bindestelle).

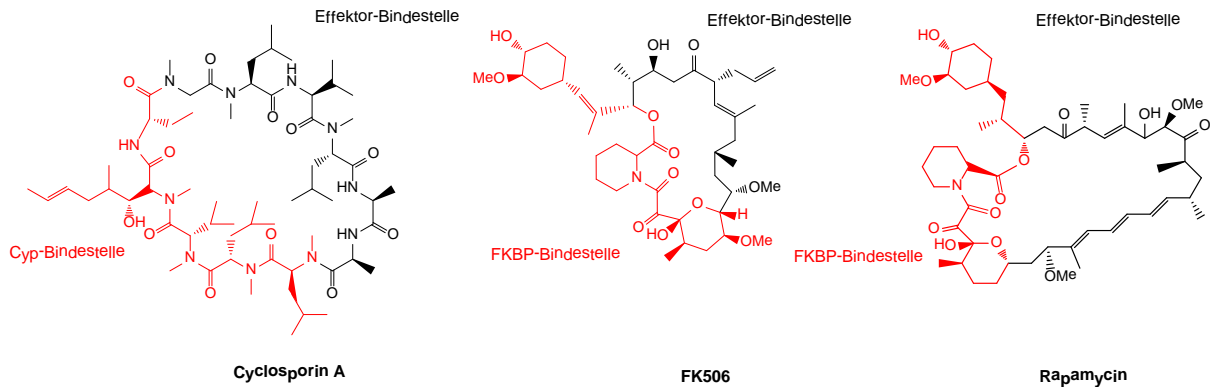


Abbildung 3: Darstellung der PPLase- und Effektorbindestellen von CsA, FK506 und Rapamycin. Die PPLase-Bindestelle ist für die Interaktion mit dem aktiven Zentrum der PPLasen verantwortlich. Über die Effektorbindestelle wird die Ausbildung der ternären Komplexe mit Calcineurin bzw. mTor vermittelt.

1.1.2 PPLasen und Immunsuppression

Inhärente Eigenschaften von FK506, CsA und Rapamycin sind die kompetitive Hemmung der Aktivität von PPLasen sowie die Ausprägung einer *gain-of-function* der Komplexe FKBP12*[FK506], FKBP12*[Rapamycin] sowie CypA*[CsA] über die Effektor-Bindestelle der Inhibitoren (Abb.3). So sind die binären Komplexe FKBP12*[FK506] und CypA*[CsA] in der Lage, die Ca^{2+} /Calmodulin-abhängige Ser/Thr-Phosphatase Calcineurin zu inhibieren^{[21],[22],[23]}. Dadurch wird die Dephosphorylierung des zytosolischen Transkriptionsfaktors NFAT (*nuclear factor of activated T-cells*) verhindert und seine Translokation in den Zellkern kann nicht erfolgen. Dies verhindert die Transkription und Expression von NFAT-regulierenden Genen, die für die T-Zell-Aktivierung essentiell sind^[24]. Der binäre Komplex FKBP12*[Rapamycin]-Komplex bindet an mTor (*mammalian Target of Rapamycin*) und greift so in verschiedene Signalwege ein^[25]. Die immunsuppressiven Eigenschaften aller drei Verbindungen beruhen also auf der Unterbrechung der T-Zellgekoppelten Signaltransduktionskaskade, die durch die *gain-of-function* inhibitorische Wirkung der Immunophilin*[Wirkstoff]-Komplexe hervorgerufen wird.

1.2 Physiologische Funktion der PPlasen

Die ubiquitäre Verbreitung, die phylogenetische Konservierung und die Lokalisation in unterschiedlichen Zellkompartimenten lassen für PPlasen Schlüsselfunktionen im zellulären Geschehen vermuten^{[26],[8],[27]}. *In vitro* konnte in einer Vielzahl von Modellproteinen eine Beteiligung von Cyclophilinen und FKBP an Protein-Faltungseignissen gezeigt werden^[28]. Obwohl die molekularen Details nur in wenigen Fällen geklärt sind, deuten Ergebnisse von Mutageneseexperimenten und Inhibitionsstudien auf eine entsprechende Funktion auch *in vivo* hin^{[29],[30],[31],[32]}. Physiologische Bedeutung besitzen die PPlasen neben der Proteinfaltung in einer Vielzahl weiterer wichtiger zellulärer Prozesse. So wurde für *hFKBP12* und seine Isoform *hFKBP12.6* Interaktionen mit intrazellulären Calciumkanälen des sarkoplastischen Retikulums von Skelettmuskel- bzw. Herzmuskelzellen nachgewiesen^{[33],[34],[35]}. Weiterhin binden die TPR-Domänen enthaltenden PPlasen FKBP51, FKBP52 und Cyp40 an Hitzeschockprotein 90^[36]. Dabei wurden sie als Bestandteil von nichtaktivierten heterooligomeren Steroidhormon-Rezeptorkomplexen identifiziert, wie sie im Progesteron^[37]-, Glucocorticoid^[38]- sowie dem Östrogenrezeptor^[39]-Komplex vorliegen.

Sowohl für FKBP als auch für Cyclophiline wurde eine Beteiligung an regulatorischen Mechanismen der Neuronenregeneration und -protektion gezeigt. Für die Inhibition von FKBP durch FK506 konnte anhand von Studien an neuronalen Zellkulturen^{[40],[41]} und in Tiermodellen^[42], in Anwesenheit von NGF, ein induziertes Nervenwachstum bzw. eine beschleunigte Regeneration verzeichnet werden^{[43],[44]}.

Weiterhin wurden bis jetzt vier Proteine beschrieben die eine FKBP -sowie eine Cyp-Domäne enthalten (*FK506-and cyclophilin-binding proteins* (FCBPs)). Eines dieser FCBPs wird in dem Parasiten *Toxoplasma gondii* gebildet, zwei in dem Bakterium *Flavobacterium johnsonii* und eins in dem Bakterium *Treponema denticola*.

1.3 Nicht-immunsuppressive PPlase-Inhibitoren

FK506, Rapamycin und CsA zeigten Wirksamkeit gegenüber neurodegenerativen^[12], viralen^{[45],[46]} und bakteriellen^{[47],[48],[49]} Erkrankungen. Sie sind aufgrund ihrer immunsuppressiven und toxischen Eigenschaften für die Behandlung von diesen Erkrankungen jedoch nicht unmittelbar geeignet. Deshalb wurde bereits eine Vielzahl von Anstrengungen unternommen, nicht-immunsuppressive und nicht toxische Derivate von FK506, Rapamycin und CsA herzustellen. Durch gezielte Modifikation der Effektor-Bindestelle unter Beibehaltung der Strukturelemente der PPlase-Bindestelle wurden potente PPlase-Inhibitoren wie FK506-C₄₀-carbonsäuremethylester^[50], ILS-920^[51] und NIM-811^[52] synthetisiert, die weder immunsuppressive noch toxische Eigenschaften besitzen

[53],[54],[55]. Diese Substanzen erlauben, zwischen immunsuppressiven und direkt durch die Inhibition der PPIase-Aktivität entstehenden biologischen Effekten zu unterscheiden (Abb.4).

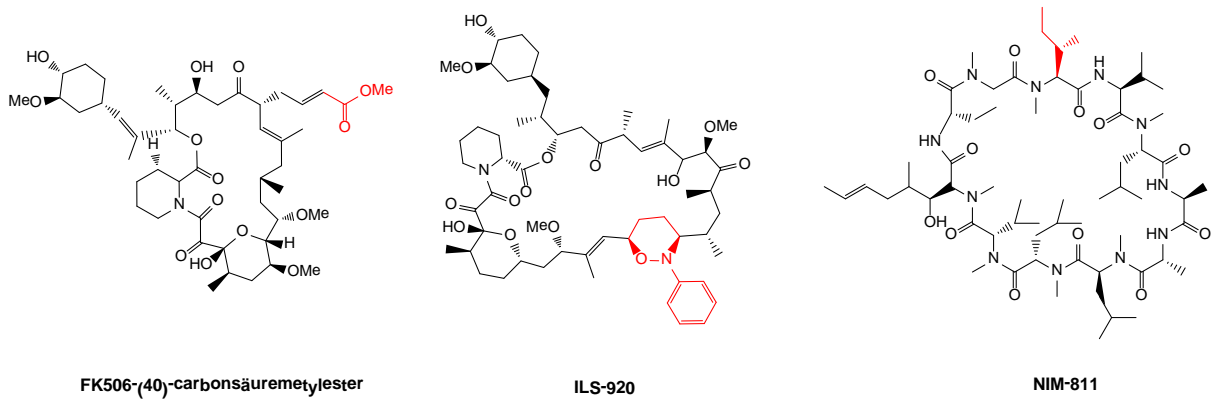


Abbildung 4: Modifikationen der Immunsuppressiva FK506, Rapamycin und Cyclosporin A, die zu einem Verlust der immunsuppressiven Eigenschaften führen (rot).

Neben den Bemühungen, die Immunsuppressivität von FK506, Rapamycin und CsA durch Modifikationen zu unterbinden, wurden synthetische Inhibitoren von PPIasen dargestellt, die nur noch eine entfernte strukturelle Ähnlichkeit zu FK506, Rapamycin und CsA aufweisen, bzw. nicht mit diesen strukturell verwandt sind (Abb.5) [56],[44],[57].

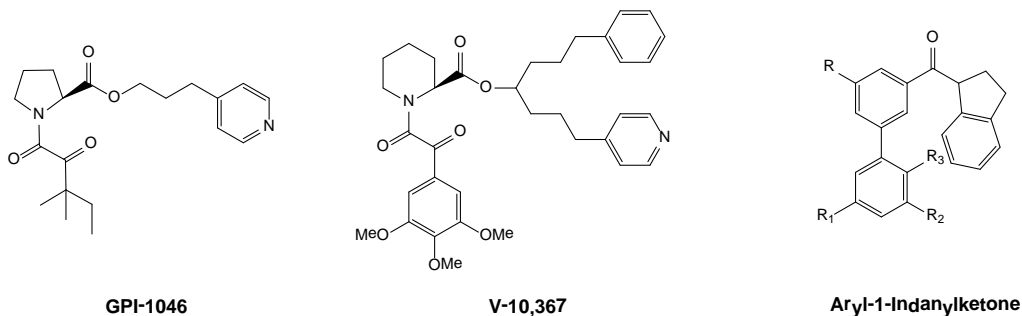


Abbildung 5: Darstellung der FKBP-Inhibitoren GPI-1046 und V-10,367 sowie der CypA-inhibierenden Aryl-1-Indanylketone.

So entstanden mit GPI-1046 und V-10,367 potente FKBP-Inhibitoren [58],[59], die im Komplex mit FKBP12 keine immunsuppressiven Eigenschaften besitzen. Mit den Aryl-1-Indanylketonen erhielt man Cyclophilin-Inhibitoren, welche zwar nicht die hohe Affinität des CsA erreichten, dafür jedoch die Möglichkeit einer Isoform-spezifischen Inhibierung der Cyclophiline geben [57]. In einem Screening wurde Cycloheximid (CHX) als potenter FKBP-Inhibitor entdeckt [60].

Cycloheximid (CHX) ist der potenteste Vertreter der Gruppe der Glutarimid-Antibiotika^[61]. Es besteht aus einem Dimethylcyclohexanon- und einem Glutarimidteil, welche über eine 1-Hydroxyethylbrücke miteinander verknüpft sind (Abb.6A). Es wurde 1946 von WHYTEN in Kulturen des Bakteriums *Streptomyces griseus* entdeckt^[62]. Cycloheximid besitzt, genau wie die anderen Antibiotika dieser Familie, ein breites Wirkungsspektrum. So wurde es unter anderem als sehr wirkungsvolles Fungizid oder auch als Nagetier Repellent eingesetzt. Weiterhin besitzt es eine toxische Wirkung gegenüber Algen, Protozoen, höheren Pflanzen und Tieren^{[63],[64]}. Ebenso verfügt es über eine hochpotente anti-Tumor-Aktivität, die allerdings durch die hohe Toxizität limitiert wird^[63]. CHX unterbindet bei Eukaryoten die Proteinbiosynthese am Ribosomen und führt zu einer Wachstumshemmung, welche zum Absterben der eukaryotischen Zellen führt^{[65],[66]}. Beim Menschen wird es auf Grund seiner Toxizität nicht mehr als Antibiotikum eingesetzt. Allerdings kann durch gezielte chemische Manipulation am Glutarimid-Stickstoff die Toxizität drastisch gesenkt werden^{[60],[67],[63],[68],[69]}. Im Jahr 1999 wurden die PPIase-hemmenden Eigenschaften des Cycloheximid identifiziert. Durch die NMR-Struktur des CHX-Derivates Cycloheximid-*N*-ethylethanoats im Komplex mit dem FKBP *Burkholderia pseudomallei* Mip-Like Protein 1 (BpML 1), konnte der Bereich des CHX identifiziert werden, der mit FKBP interagiert. Er umfasst die Carbonylgruppe des Cyclohexylringes, die Hydroxylgruppe der Ethylbrücke und Teile des Glutarimidylrestes^[70] (Abb.6B).

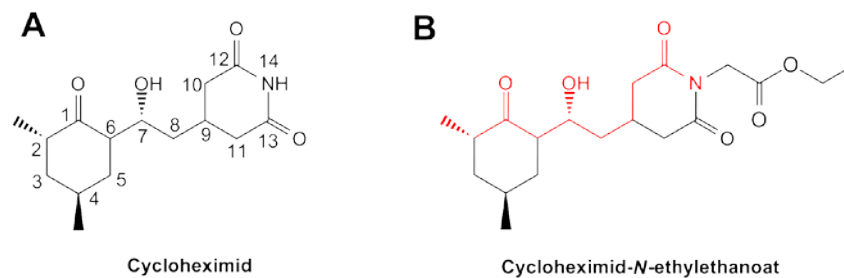


Abbildung 6: Die Strukturen von Cycloheximid und Cycloheximid-*N*-ethylethanoat. In B) ist in Rot der Bereich des Cycloheximids, der am FKBP bindet, dargestellt.

Die NMR-Struktur zeigt für das Cycloheximid-*N*-ethylethanoat einen anderen Bindemechanismus als für FK506^[70]. Es kommt zu hydrophoben Wechselwirkungen der Substanz mit den konservierten Aminosäureresten Ala⁹⁴ und Ile⁹⁸ am Rande des aktiven Zentrums^{[71],[72],[73]}. Damit ahmt das Cycloheximid-*N*-ethylethanoat nicht wie FK506 und Rapamycin die Bindung eines Prolylrestes an FKBP nach, sondern interagiert ähnlich zu TGF β R1, der auch an *h*FKBP12 und BpML 1 binden kann^{[74],[75],[70]}. Damit stellen Cycloheximid und seine Derivate neuartige FKBP-Liganden dar. Mit einem IC₅₀-Wert von

3,6 μM ist es zwar ein vergleichsweise schlechter FKBP12-Inhibitor, aber sein von FK506 verschiedener Bindungsmodus^[70] und seine kleine Molmasse machte es für weitere Untersuchungen interessant.

1.4 Bifunktionelle Moleküle

Früher galt in der Medikamentenentwicklung der Grundsatz: Eine Krankheit - eine Ursache, eine Ursache - ein Medikament. Dieser Grundsatz hat sich in den letzten Jahren jedoch gewandelt, da Erkrankungen, wie z.B. HIV-Infektionen, Krebs, neurologische Erkrankungen oder Infektionen mit multiresistenten Keimen sehr komplexe Vorgänge im menschlichen Körper auslösen. Zu ihrer Behandlung werden Wirkstoffkombinationen eingesetzt, welche verschiedene Mechanismen der Krankheit oder ihrer Auslöser gleichzeitig blockieren. Im Moment werden vor allem Multikomponenten-Wirkstoffe eingesetzt, die aus verschiedenen Einzelkomponenten bestehen, so z.B. Trastuzumab-Emtansin gegen Brustkrebs oder Tenofovir, Emtricitabin und Efavirenz als Theapeutika gegen HIV.

Eine alternative Strategie zur gleichzeitigen Gabe mehrerer Wirkstoffe besteht in der Verwendung von bi- und multifunktionalen Wirkstoffen. Dabei werden bereits für eine Krankheit zugelassene Medikamente so mit anderen Wirkstoffen verknüpft oder modifiziert, dass sie in komplexen Krankheiten mehr als nur einem Zielmolekül entgegenwirken. So wurde für die Behandlung neurologischer Erkrankungen beispielsweise ein Monoaminoxidase-Hemmer mit einem Eisenchelator kovalent verknüpft^[76]. Gegen Tumore wurde ein Molekül gerichtet, bei dem Taxoid und Camptothecin miteinander konjugiert vorliegen. Auch von den PPLase-Inhibitoren gibt es bereits duale Inhibitoren, bei denen FK506 und CsA kovalent über einen chemischen Linker verknüpft vorliegen. Allerdings werden sie nicht in der medizinischen Therapie sondern in der biologischen Forschung zur chemischen Induzierung von Dimerisierungen artifizierender Fusionsproteine (*chemical inducers of dimerization*, (CID)) eingesetzt^[77]. Sie dienen der Untersuchung der Auswirkung von Protein-Protein-Wechselwirkungen auf die Regulierung von Signaltransduktionsvorgängen oder postrationalen Modifikationen, indem sie die Wechselwirkung zweier Proteine vermitteln. Die Wirkung solcher Inhibitoren bei Krankheiten, an deren Pathogenese FKBP und Cyclophiline beteiligt sind, wurde jedoch bislang noch nicht untersucht.

1.5 Zielstellung

FKBP und Cyclophiline sind zwei Familien der PPlasen deren Mitglieder an einer Vielzahl physiologischer Prozesse beteiligt sind. In zahlreichen Studien an neuronalen Zellkulturen und in Tiermodellen wurde gezeigt, dass Inhibitoren der PPlase-Aktivität von FKBP und Cyclophilinen Verbindungen mit potenziell hoher Wirksamkeit für die Behandlung von neurodegenerativen Erkrankungen, wie Morbus Alzheimer, Morbus Parkinson, Multiples Sklerose, sowie von Wirbelsäulen- und traumatischen Hirnverletzungen darstellen. Aus diesem Grund besteht ein wachsendes wissenschaftliches Interesse an der Entwicklung neuer differentiell wirksamer PPlase-Inhibitoren.

Vor diesem Hintergrund sollten im Rahmen dieser Arbeit spezifische Inhibitoren mit nicht-immunsuppressiver und antiapoptotischer Wirkung entwickelt und in relevanten Tiermodellen der Multiplen Sklerose und des Morbus Parkinson *in vivo* getestet und validiert werden. Da für die bisher bekannten Inhibitoren der Cyclophiline und der FKBP starke neuroprotektive und neuroregenerative Effekte beschrieben wurden, sollten in Anlehnung an diese Inhibitoren neue Isoenzym-spezifische Hemmstoffe entwickelt werden.

Ein besonderer Focus dieser Arbeit lag auf der Synthese von dualen Immunophilin-Liganden, die durch eine kovalente Verknüpfung von FKBP- und Cyclophilin-Inhibitoren dargestellt werden sollten. Duale Inhibitoren sind solche Inhibitoren, die mehrere Wirkstoffgruppen aufweisen und die spezifisch für jeweils eine PPlase-Familie sind. Beide Wirkstoffgruppen sind durch chemische Verbindungselemente unterschiedlicher Länge kovalent miteinander verknüpft.

In dieser Arbeit sollten zur Inhibition von FKBP, FK506 bzw. Cycloheximid zum Einsatz kommen, die kovalent mit dem zur Cyclophilin-Inhibition fähigen CsA-Derivat [D-Ser]⁸-CsA synthetisch verbunden waren. Von physikalischen Gemischen beider Inhibitoren unterscheiden sich die dualen Inhibitoren grundsätzlich. Die kovalent verknüpften Wirkstoffe können mit ihren Targetproteinen sowohl frei (Abb.7A) als auch im Komplex mit je einem Targetprotein (Abb.7B) und als ternärer Komplex mit zwei Targetproteinen (Abb.7C) vorliegen. Daher sollte untersucht werden, ob sich die inhibitorischen Eigenschaften der freien und der mit einem Targetprotein komplexierten dualen Inhibitoren unterscheiden.



Abbildung 7: Das mögliche Vorliegen dualer Inhibitoren in Zellen. In der Zelle können sowohl die A) freien Moleküle als auch die Moleküle vorliegen die B) schon ein spezifisches Enzym an einer Seite des dualen Inhibitors tragen oder C) zwei spezifische Enzyme tragen

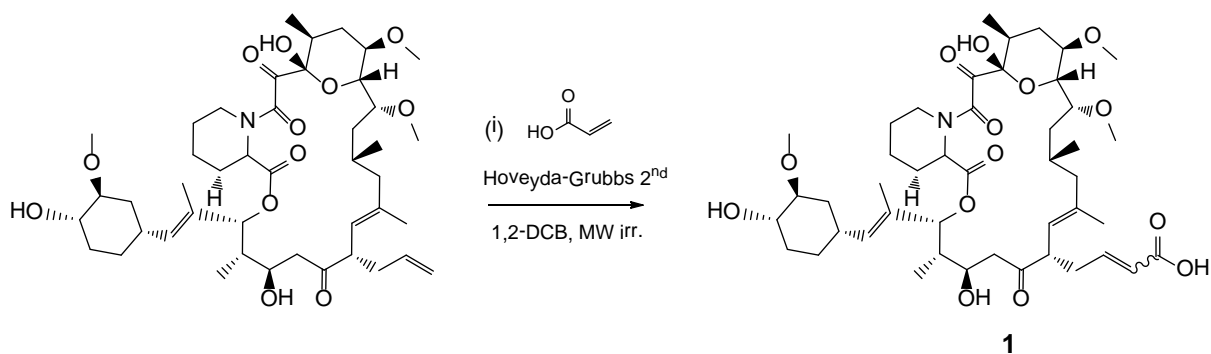
Außerdem sollte analysiert werden, ob sich durch unterschiedliche, targetspezifische Wirkmechanismen der FKBP- und Cyclophilin-Inhibitoren die synthetisierten dualen Inhibitoren besonders als neuroprotektive Agenzien eignen.

2 Ergebnisse

2.1 Die dualen Inhibitoren FK506-C₄₀-CO-NH(CH)_nNH-[OCCH₂-D-Ser]⁸-CsA

2.1.1 Synthese der FK506-C₄₀-carbonsäure 1

Die Reaktanden FK506 und Acrylsäure wurden in einer gekreuzten Olefin-Metathese mit dem HOVEYDA-GRUBBS-Katalysator der zweiten Generation unter Mikrowellen-Bedingungen zur FK506-C₄₀-carbonsäure (1) umgesetzt (Schema 1).



Schema 1: Synthese der FK506-C₄₀-carbonsäure (1) ausgehend vom FK506. Unter den Bedingungen der gekreuzten Olefinmetathese gelang im Mikrowellenofen die Umsetzung des ungeschützten FK506 mit Acrylsäure unter Verwendung des Hoveyda-Grubbs Katalysator der 2. Generation.

Das Produkt wurde als weißer Feststoff in einer Ausbeute von 79,0 mg (75,2 %) erhalten.

2.1.2 Biochemische Untersuchung der FK506-C₄₀-carbonsäure 1

Im Anschluss an die Synthese der Verbindung 1 erfolgte die Untersuchung der inhibitorischen Eigenschaften der Verbindung 1 gegenüber *hFKBP12*. Zur weiteren Charakterisierung der Bindung wurde die Bildung des Komplexes *hFKBP12**[1] fluoreszenzspektroskopisch untersucht.

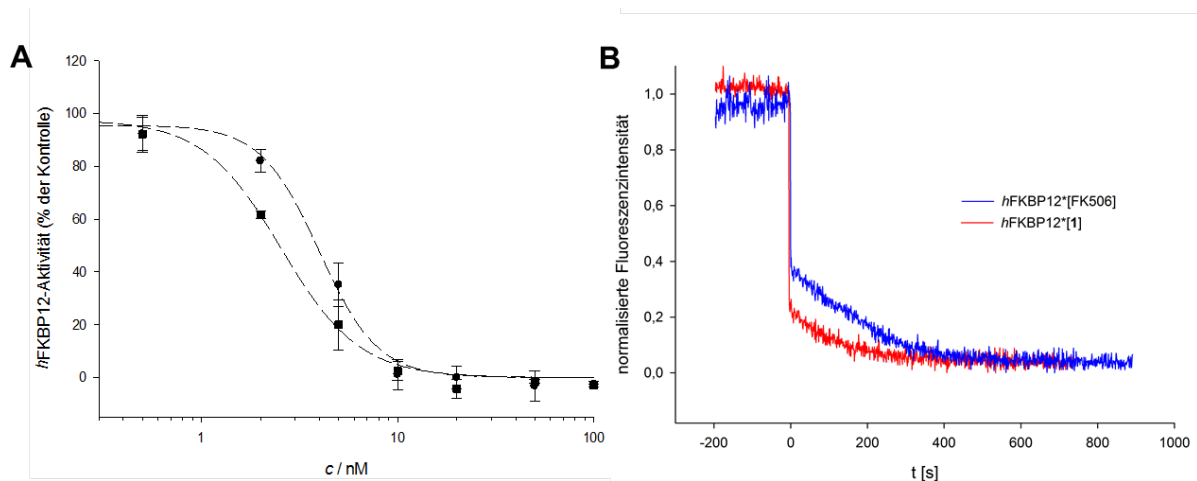


Abbildung 8: Inhibition von *hFKBP12* durch FK506 und Verbindung 1. A) Die IC_{50} -Werte wurden in einem Proteasegekoppelten PPlase-Assay, mit einer Konzentration von 15 nM *hFKBP12* gemessen. Als Substrat für das *hFKBP12* wurde suc-Ala-Phe-Pro-Phe-pNA (45 μ M) verwendet. Die Verbindungen wurden in einem Konzentrationsbereich von 0,5-100 nM eingesetzt. B) Zeitverlauf der Fluoreszenz von *hFKBP12* bei Bindung von Verbindung 1 und FK506. Die intrinsische Fluoreszenz von *hFKBP12* wurde bei 20 °C in 35 nM HEPES-Puffer (pH 7,5) aufgenommen. Im Meßansatz waren 4 μ M *hFKBP12* und 5 μ M Inhibitor. Die Anregung erfolgte bei 295 nm, die Emission wurde bei 340 nm detektiert.

In Abbildung 8A ist die konzentrationsabhängige Inhibition der PPlase-Aktivität von *hFKBP12* durch Verbindung 1 und FK506 dargestellt. Mit einem IC_{50} -Wert von $3,8 \pm 0,3$ nM zeigt Verbindung 1 eine 1,5-fach schwächere Inhibition der PPlase-Aktivität von *hFKBP12* als FK506 ($IC_{50} = 2,5 \pm 0,2$ nM, Lit. 2,5 nM^[78]). Da dies nur eine geringfügige Differenz darstellt, kann Verbindung 1 hinsichtlich ihrer PPlase-Hemmung als äquipotent zu FK506 betrachtet werden.

Der Zeitverlauf der Bindung von FK506 und seines Derivates wurde durch die Abnahme des Fluoreszenzsignales von *hFKBP12* als Funktion der Zeit nach Zugabe der FKBP12-Liganden FK506 bzw. Verbindung 1 zu einer *hFKBP12*-Lösung beobachtet. Das Absinken der Fluoreszenzemission des Trp⁵⁹ des *hFKBP12* wird durch Lageveränderung und Abschirmung dieses Restes am Boden der hydrophoben Tasche im aktiven Zentrum von *hFKBP12* nach Bindung des Liganden verursacht^{[79],[80],[71]}.

Misst man den zeitlichen Verlauf der Bindung des FK506 an *hFKBP12* über die intrinsische Fluoreszenz des Trp⁵⁹ sind zwei klar getrennte kinetische Phasen zu erkennen^[87]. Die erste schnelle Phase ist innerhalb der Totzeit beendet. Die zweite Phase ist durch die langsame Bindung des FK506 an das *hFKBP12* charakterisiert und war bei 20 °C nach zirka 10 min beendet (Abb.8B). Diese biphasische Inhibition ist auf die *cis/trans*-Isomerisierung der α -Keto-Pipecolinyll-Bindung des ungebundenen FK506 zurückzuführen^[87]. Während in diesem ungebundenen Zustand des FK506 die Imidbindung in *cis*-Konformation vorliegt, findet man im *hFKBP12**[FK506]-Komplex ausschließlich das *trans*-Konformer^{[3],[88]}. Auch bei Verbindung 1 war, ähnlich wie bei FK506 selbst, die 2. Phase nach ca. 10 min beendet. Mit

einem Wert von k_{obs} von $7,8 \cdot 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ bindet Verbindung **1** etwas schneller an das *hFKBP12* als es FK506 mit einem Wert für k_{obs} von $5,1 \cdot 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ vermochte.

Die Immunsuppression durch FK506 beruht auf der Inhibition der Phosphataseaktivität von CaN durch den Komplex *hFKBP12**[FK506]. Deshalb wurde der Einfluss von Verbindung **1** auf die CaN-katalysierte Dephosphorylierung des RII-Phosphopeptids vergleichend zu FK506 untersucht (Abb.9A). Während FK506 im Komplex mit *hFKBP12* mit einem IC_{50} -Wert von $36,9 \pm 1,7 \text{ nM}$, der dem in der Literatur angegebenen Wert von $\text{IC}_{50} = 45,0 \pm 4,0 \text{ nM}$ ^[89] entspricht, eine starke Inhibition von CaN zeigte, war Verbindung **1** bis zu einer Konzentration von $10 \mu\text{M}$ inaktiv.

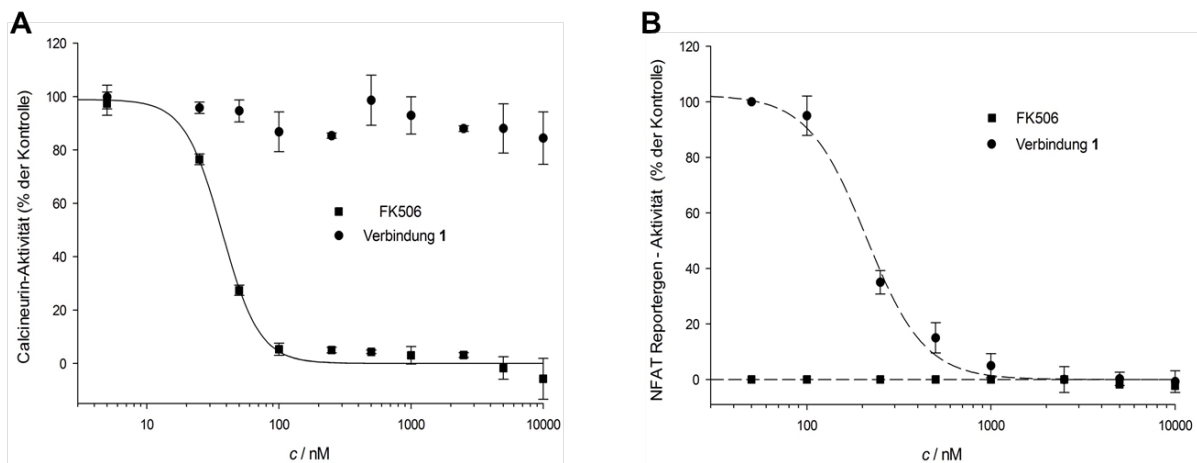


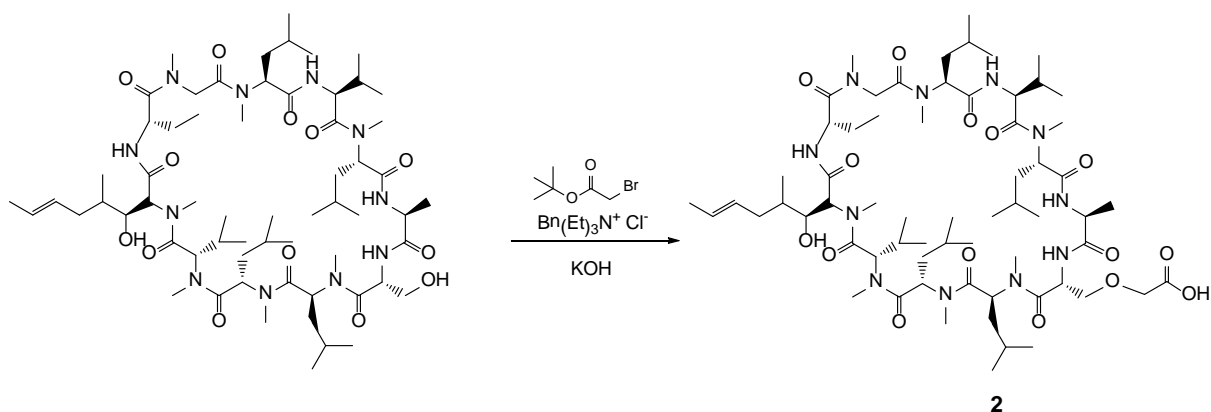
Abbildung 9: Untersuchung der Inhibition von CaN durch FK506 und Verbindung **1**. A) Die Bestimmung des IC_{50} -Wertes der CaN-Inhibition der Komplexe *hFKBP12**[**1**] und *hFKBP12**[FK506] erfolgte auf Basis eines *in vitro* RII-Phosphopeptid-Dephosphorylierungs-Assay. Es wurde $15 \mu\text{M}$ *hFKBP12* sowie FK506- bzw. Verbindung **1** in einem Konzentrationsbereich von 5 nM - $10 \mu\text{M}$ eingesetzt. B) Bestimmung des IC_{50} -Wertes der Inhibition der NFAT-Reportergen-Aktivität durch Verbindung **1** und FK506. Jurkat-Zellen wurden mit dem NFAT-Luciferase-Reportergen-Plasmid ($1 - 1.5 \mu\text{g}$) durch Elektroporation transfiziert. Die Zellen wurden mit Inhibitor für 30 min vorinkubiert und mit 10 ng/mL PMA und $1 \mu\text{g/mL}$ Ionomycin für 5 h stimuliert. Nach der Zellyse wurde die Menge an Luciferase durch Messung der Biolumineszenz bestimmt.

Zur weiteren Charakterisierung der immunsuppressiven Eigenschaften von Verbindung **1** wurde zusätzlich die NFAT-abhängige Expression des Reportergens Luciferase vom Luciferase-Reportergen-Plasmid in Jurkat-Zellen untersucht. Durch Inhibition von CaN wird die Funktion des Transkriptionsfaktors NFAT blockiert und die als Reporter dienende Luciferase wird vermindert exprimiert^[173]. Anders als im CaN-Assay, wies Verbindung **1** eine deutliche Inhibition der NFAT-Reportergen-Aktivität auf, was auf eine reduzierte, aber noch vorhandene CaN-Bindung an den binären Komplex *hFKBP12**[**1**] hinweist. Mit einem IC_{50} -Wert von $210 \pm 16,2 \text{ nM}$ war Verbindung **1** jedoch im Vergleich zu FK506 ($0,26 \pm 0,05 \text{ nM}$) 800-mal weniger effektiv (Abb.9B). Während bei der *in vitro* beobachteten Inhibition von CaN (Abb.9A) 10 nM CaN zugegeben wurden, ist die Konzentration von CaN in Jurkat-Zellen

wesentlich geringer^[90]. Daher ist der NFAT-Reporter-Gen-Assay zur Detektion der CaN-Inhibition wesentlich sensitiver als der direkte Bindungsassay.

2.1.3 Synthese des [O-(Carboxymethyl)-D-Ser]⁸-CsA 2

Die Synthese des [O-(Carboxymethyl)-D-Ser]⁸-CsA erfolgte nach EBERLE *et al.*^[91]. Im ersten Schritt der Synthese erfolgte die Alkylierung der primären Hydroxylgruppe des D-Serin mittels *tert*-Butylbromoacetat und 30 %iger Natronlauge. Um die Nebenreaktion der Alkylierung der sekundären Hydroxylgruppe der MeBmt¹-Aminosäure so gering wie möglich zu halten, wurde unter den Bedingungen der Phasen-Transfer-Katalyse gearbeitet. Als Phasen-Transfer-Katalysator wurde Benzyltriethylammoniumchlorid verwendet. Im anschließenden Schritt wurde [O-[(*tert*-Butoxycarbonyl)methyl]-D-Ser]⁸-CsA mittels methanolischer Natronlauge zu [O-(Carboxymethyl)-D-Ser]⁸-CsA verseift (Schema 2).



Schema 2: Synthese von [O-(Carboxymethyl)-D-Ser]⁸-CsA (**2**) aus [D-Ser]⁸-CsA unter Phasen-Transfer-Katalyse. Im ersten Schritt erfolgt die Veretherung der Hydroxylgruppe von D-Serin mit *tert*-Butylbromoacetat. Im zweiten Schritt kommt es zur Abspaltung der *tert*-Butylgruppe und zum Erhalt von Verbindung **2**.

Nach der erfolgten Reinigung wurde das Produkt als weißer Feststoff mit einer Ausbeute von 750 mg (72,1 %) erhalten.

2.1.4 Biochemische Untersuchung des [O-(Carboxymethyl)-D-Ser]⁸-CsA 2

Die Verbindung **2** wurde auf ihre Fähigkeit untersucht, *h*CypA zu inhibieren. Dazu wurde ihre konzentrationsabhängige Fähigkeit zur Inhibition der PPlase-Aktivität von *h*CypA im Vergleich zu der der Ausgangsverbindung [D-Ser]⁸-CsA untersucht.

Verglichen mit [D-Ser]⁸-CsA weist Verbindung **2** eine ähnlich gute *h*CypA-Inhibition auf (Abb.10A). Der IC₅₀-Werte von Verbindung **2** war mit 3,1 ± 0,2 nM (Lit.: 0,9 nM^[91]) nur 1,3-fach höher, als der von [D-Ser]⁸-CsA mit 2,3 ± 0,3 nM (Lit.: 2,3 nM^[91]). Somit konnte eine

funktionelle Gruppe in das Molekül eingeführt werden, ohne die PPLase-hemmenden Eigenschaften des [D-Ser]⁸-CsA zu verlieren.

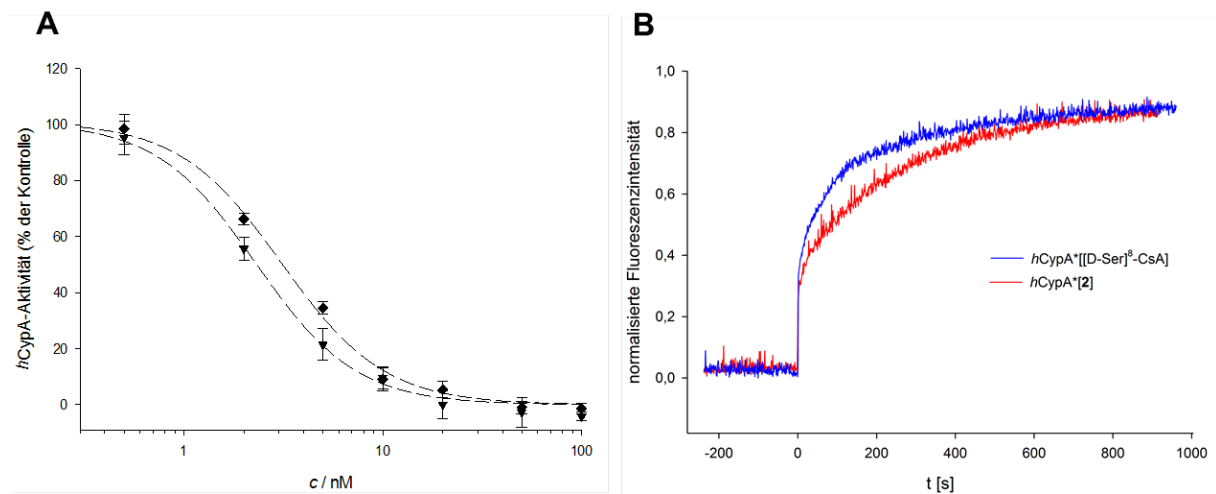


Abbildung 10: Inhibition von *hCypA* durch [D-Ser]⁸-CsA und Verbindung **2**. A) Die IC₅₀-Werte wurden in einem Proteasegekoppelten PPLase-Assay mit einer Konzentration von 5 nM *hCypA* gemessen. Als Substrat für *hCypA* wurde suc-Ala-Ala-Pro-Phe-pNA (45 μM) verwendet. Die Verbindungen wurden in einem Konzentrationsbereich von 0,5-100 nM eingesetzt. B) Zeitverlauf der Fluoreszenz von *hCypA* bei Bindung von Verbindung **2** und [D-Ser]⁸-CsA. Die intrinsische Fluoreszenz wurde bei 20 °C in 35 nM HEPES-Puffer (pH 7,5) aufgenommen. Im Meßansatz waren 4 μM *hCypA* und 5 μM Inhibitor. Die Anregung erfolgte bei 295 nm, die Emission wurde bei 340 nm detektiert.

Die Bildung des binären Komplexes *hCypA**[**2**] wurde über die intrinsische Fluoreszenz des Trp¹²¹ des *hCypA* zeitabhängig bestimmt. Trp¹²¹ ist das einzige Tryptophan im Protein und maßgeblich an der Bindung von CsA beteiligt^[92]. Wie bereits von ZHANG *et al.* beschrieben, nimmt die Fluoreszenzemission des Trp¹²¹ des *hCypA* nach Bindung des Wirkstoffes zu. Für die Bildung des *hCypA**[CsA]-Komplexes ergaben sich nach ZHANG *et al.* drei kinetische Phasen^[92]. Neben einer finalen sehr langsamen Phase (Phase 3) gibt es eine schnelle Phase, die innerhalb der Totzeit beendet ist und einem in Lösung vorliegenden *hCypA*-aktiven Isomer zuzuordnen ist (Phase 1). Die zweite, langsamere Phase (Phase 2) entspricht der *cis/trans*-Isomerisierung der MeLeu⁹-MeLeu¹⁰-Bindung. Im ungebundenen Zustand befindet sich die Amidbindung zwischen MeLeu⁹ und MeLeu¹⁰ von CsA in der *cis*-Konformation. Im Komplex *hCypA**[CsA] liegt ausschließlich das *trans*-Konformer vor^[92]. Es wurde gezeigt, dass diese zweite Phase die langsame Isomerisierungskinetik von *hCypA* durch CsA repräsentiert^[92]. Der ähnliche zeitliche Verlauf der Zunahme der intrinsischen Fluoreszenz des Trp¹²¹ von *hCypA* bei der Ausbildung der Komplexe *hCypA**[[D-Ser]⁸-CsA] und *hCypA**[**2**] zeigt, dass trotz der Modifikation in Position 8 in beiden Substanzen eine ähnliche Menge *hCypA*-aktives Isomer vorliegt und sie beide Substanzen *hCypA* langsam inhibieren (Abb.10B). [D-Ser]⁸-CsA bindet an *hCypA* mit einem k_{obs}-Wert von 3,5·10⁻³ s⁻¹, wohingegen Verbindung **2** mit einem k_{obs}-Wert von 2,8·10⁻³ s⁻¹ nur etwas langsamer an *hCypA* bindet.

Im Komplex mit *hCypA* inhibierte Verbindung **2** die Phosphataseaktivität von CaN mit einem IC_{50} -Wert von 344 ± 26 nM (Lit.: 220 nM)^[91]. Damit ist die Inhibition der CaN-Aktivität nur um das 2,5-fache schlechter als im Fall von $[D-Ser]^8$ -CsA mit einem IC_{50} -Wert von 142 ± 16 (Lit.: 40 nM)^[91]. Trotzdem muss Verbindung **2** weiterhin als immunsuppressiv angesehen werden (Abb.11A).

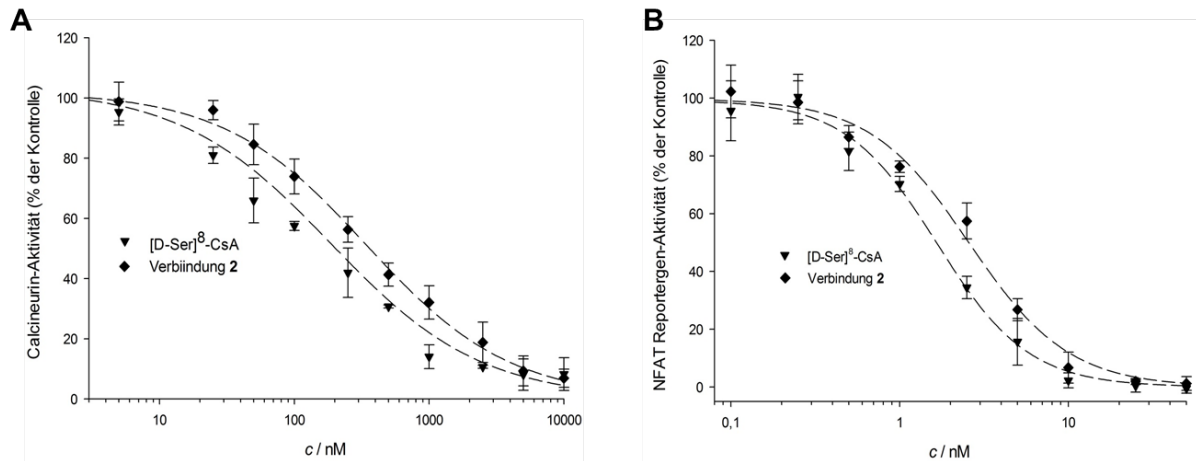


Abbildung 11: Untersuchung der Inhibition von CaN durch $[D-Ser]^8$ -CsA und Verbindung **2**. A) Bestimmung der IC_{50} -Werte der CaN-Inhibition der Komplexe $hCypA^*[[D-Ser]^8-CsA]$ und $hCypA^*[2]$. B) Bestimmung des IC_{50} -Wertes der Inhibition der NFAT-Reportergen-Aktivität durch Verbindung **2** und $[D-Ser]^8$ -CsA. Für die experimentellen Details siehe Abb.9.

Die Abbildung 11B zeigt den Einfluss von $[D-Ser]^8$ -CsA und Verbindung **2** auf die NFAT-Reportergen-Aktivität. Mit IC_{50} -Werten von $1,66 \pm 0,13$ bzw. $2,57 \pm 0,24$ nM unterscheiden sich die beiden Verbindungen nur unerheblich und weisen daher auf eine nahezu unveränderte Immunsuppressivität von Verbindung **2** hin. Somit bestätigt der NFAT-Reportergen-Assay die Ergebnisse des zuvor durchgeführten CaN-Assays.

Fasst man die Ergebnisse der Bausteinsynthese für die geplanten dualen Inhibitoren zusammen ergeben sich folgende Merkmale:

- (1) Die beiden Verbindungen **1** und **2** zeigten trotz der beschriebenen Modifikationen im Vergleich mit den Ausgangsverbindungen FK506 bzw. $[D-Ser]^8$ -CsA eine ähnlich potente Inhibition der PPLase-Aktivität von *hFKBP12* bzw. *hCypA*.
- (2) Die Einführung der Carboxylgruppe am C_{40} -Atom des FK506 erbrachte eine Verbindung (**1**) mit stark reduzierter Immunsuppressivität im Vergleich zu FK506.
- (3) Die immunsuppressiven Eigenschaften der Verbindung **2** blieben trotz der Einführung der Carboxymethyl-Gruppe am Sauerstoffatom der Hydroxylgruppe des $D-Ser^8$ von $[D-Ser]^8$ -CsA erhalten.

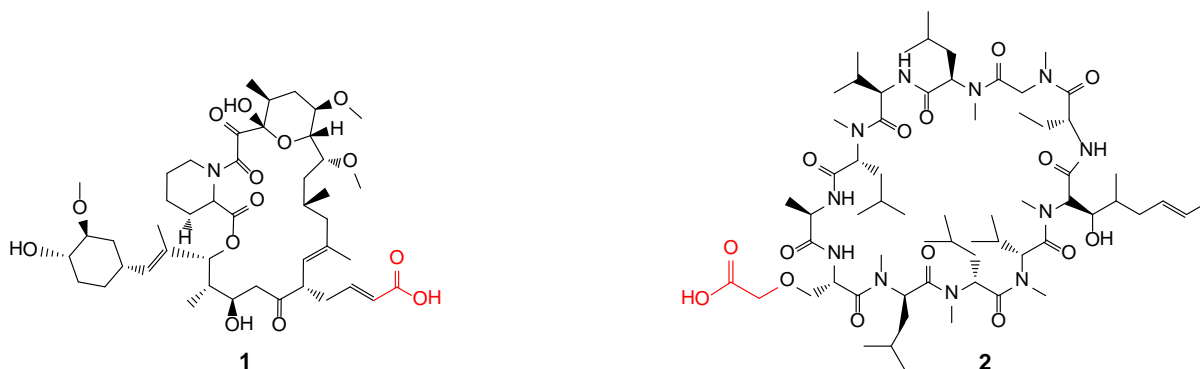


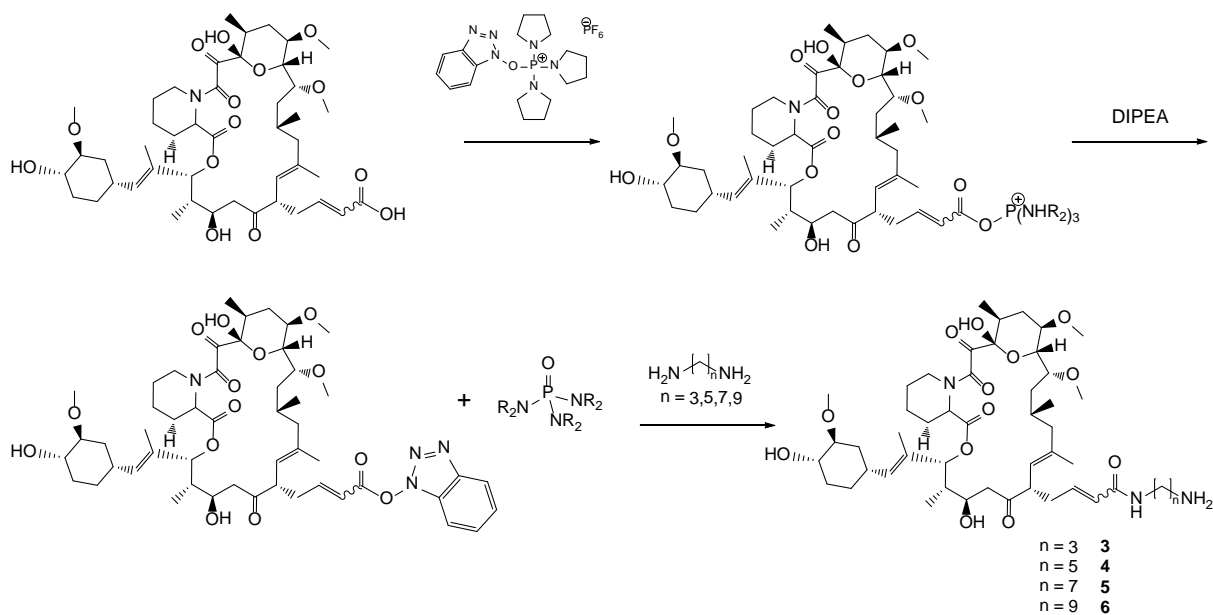
Abbildung 12: Darstellung der beiden modifizierten Wirkstoffe FK506 und [D-Ser]⁸-CsA. In rot sind die für die kovalente Verknüpfung notwendigen Carbonsäurefunktionen dargestellt.

2.1.5 Auswahl der Linker

Nach Erhalt der beiden Bausteine für die kovalente Verknüpfung galt es, den geeignetsten Linkertyp zu finden. Die Carboxylgruppen der Verbindungen **1** und **2** bieten einfache Möglichkeiten der Verknüpfung beider Moleküle über Ester- oder Amidbindungen. Allerdings sind die sauren Reaktionsbedingungen der Veresterung mit der Säurelabilität des FK506 nicht verträglich. Ein weiterer Nachteil der Verknüpfung über Esterbindungen ist, dass Ester unter zellulären Bedingungen weniger stabil sind als Amide. Des Weiteren können Amide unter leicht basischen Bedingungen mit Methoden der Peptidchemie dargestellt werden. Zu Gunsten der Flexibilität und einer geringen Hydrophobizität wurde auf Doppelbindungen und Ringsysteme innerhalb des Linkers verzichtet, sodass unverzweigte Diaminoalkylketten oder Diamino-PEG-Ketten zur Wahl standen. Bezüglich der Hydrophobizität wären PEG-Linker vorzuziehen, allerdings sind diese immer nur um eine monomere Einheit (-CH₂-CH₂-O-) variabel. Deshalb wurden Diaminoalkyllinker unterschiedlicher Länge (3, 5, 7 und 9 Kohlenstoffatome) für die Synthese herangezogen. Linker mit weniger als drei Methylengruppen wurden nicht verwendet, da erst Linker mit einer Länge >6 Å die simultane Bindung zweier Proteine sterisch gestatten sollten^[81]. Linker mit mehr als neun C-Atomen wurden nicht verwendet, da sie zu hydrophob sind.

2.1.6 Synthese der FK506-C₄₀-CO-NH(CH)_nNH₂-Derivate 3-6

Für die Synthese der Verbindungen **3-6** wurde Verbindung **1** mit Benzotriazol-1-yl-oxytripyrrolidinophosphonium-hexafluorophosphat (PyBOP) und Diisopropylethylamin (DIPEA) in DMF für fünf Minuten vorinkubiert, damit sich der Aktivester bilden konnte. Anschließend wurden mit 1,3-Diaminopropan, 1,5-Diaminopentan, 1,7-Diaminoheptan, 1,9-Diaminononan umgesetzt (Schema 3).



Schema 3: Synthese der Verbindungen **3-6**. Verbindung **1** und die entsprechenden Amine wurden mit PyBOP bei Raumtemperatur zur Reaktion gebracht, um die um die Linker verlängerten FK506-Derivate zu erhalten.

Nach der säulenchromatographischen Reinigung wurden die Verbindungen **3-6** in Ausbeuten von ca. 50 % erhalten (Tab.1).

Tabelle 1: Chemische Daten der FK506-Derivate **3-6**

| Verbindung | Ausbeute (%) | Molmasse (g mol ⁻¹) | | Retentionszeit R _t (min) |
|------------|--------------|------------------------------------|------------------------------------|-------------------------------------|
| | | [M+H] ⁺ _{ber.} | [M+H] ⁺ _{gef.} | |
| 3 | 55,1 | 904,5 | 904,3 | 8,4 |
| 4 | 49,5 | 932,6 | 932,4 | 8,6 |
| 5 | 54,8 | 960,6 | 960,5 | 8,9 |
| 6 | 57,7 | 988,6 | 988,6 | 9,2 |

2.1.6 Biochemische Untersuchung der FK506-C₄₀-CO-NH(CH₂)_nNH₂-Derivate **3-6**

Im Protease-gekoppelten PPIase-Assay wurden für die Verbindungen **3-6** für die Inhibition von *hFKBP12* IC₅₀-Werte im Bereich von 2,7 bis 3,9 nM ermittelt (Abb.13A). Die Inhibition war dabei unabhängig von der Länge der Diaminoalkylketten und lag im gleichen Bereich wie Verbindung **1** (IC₅₀ = 3,8 ± 0,32 nM).

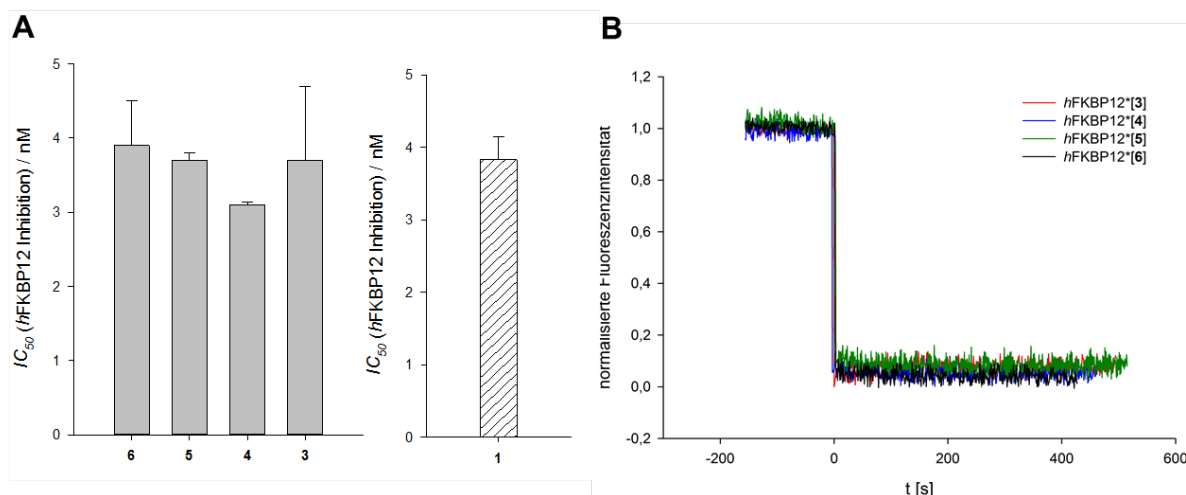


Abbildung 13: Inhibition von *hFKBP12* durch die Verbindungen **3-6**. A) Die IC_{50} -Werte wurden in einem Protease-gekoppelten PPIase-Assay mit einer Konzentration von 15 nM *hFKBP12* gemessen. Als Substrat für *hFKBP12* wurde Suc-Ala-Phe-Pro-Phe-pNA (45 μ M) verwendet. Die Verbindungen **3-6** wurden in einem Konzentrationsbereich von 2-200 nM eingesetzt. B) Zeitverlauf der Fluoreszenz von *hFKBP12* bei Bindung der Verbindungen **3-6**. Für experimentelle Details siehe Abbildung 8.

Um die Interaktionen näher zu charakterisieren wurde analog Verbindung **1** der zeitliche Verlauf der Bildung der Komplexe *hFKBP12**[**3-6**] fluoreszenzspektroskopisch untersucht. Die Bildung der *hFKBP12**[**3-6**]-Komplexe verlief, anders als bei FK506 oder Verbindung **1** sehr schnell, eine zweite, langsame Phase war nicht detektierbar. Das lässt auf eine Strukturänderung zu Gunsten der *trans*-Konformation der α -Keto-Pipicolinyl-Bindung der ungebundenen FKBP-Derivate **3-6** schließen (Abb.13B).

Beim Vergleich der Verbindungen **3-6** mit Verbindung **1** zeigte sich keine Veränderung des inhibitorischen Potentials im Komplex mit *hFKBP12* gegenüber der Phosphatase-Aktivität von CaN (Abb.14A). Keine der untersuchten Verbindungen war in der Lage, CaN zu inhibieren. Allerdings zeigte sich im NFAT-Reporter-Gen-Assay eine Veränderung. Während Verbindung **1** die NFAT-Reporter-Gen-Aktivität noch im nanomolaren Bereich hemmte (210 ± 16 nM), zeigten die Verbindungen **3-6** bis 10 μ M keine Inhibition der Reporter-Gen-Aktivität (Abb.14B).

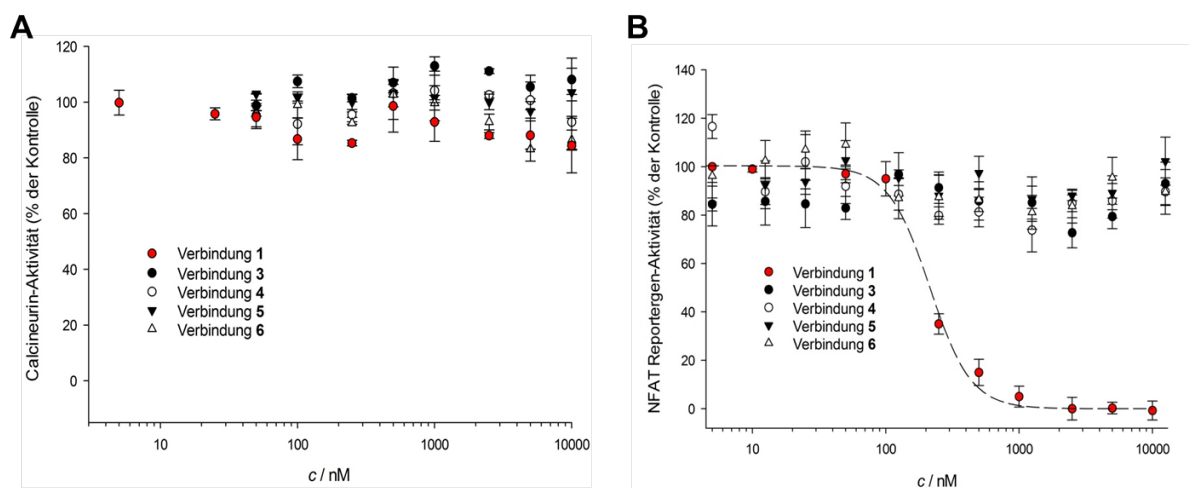
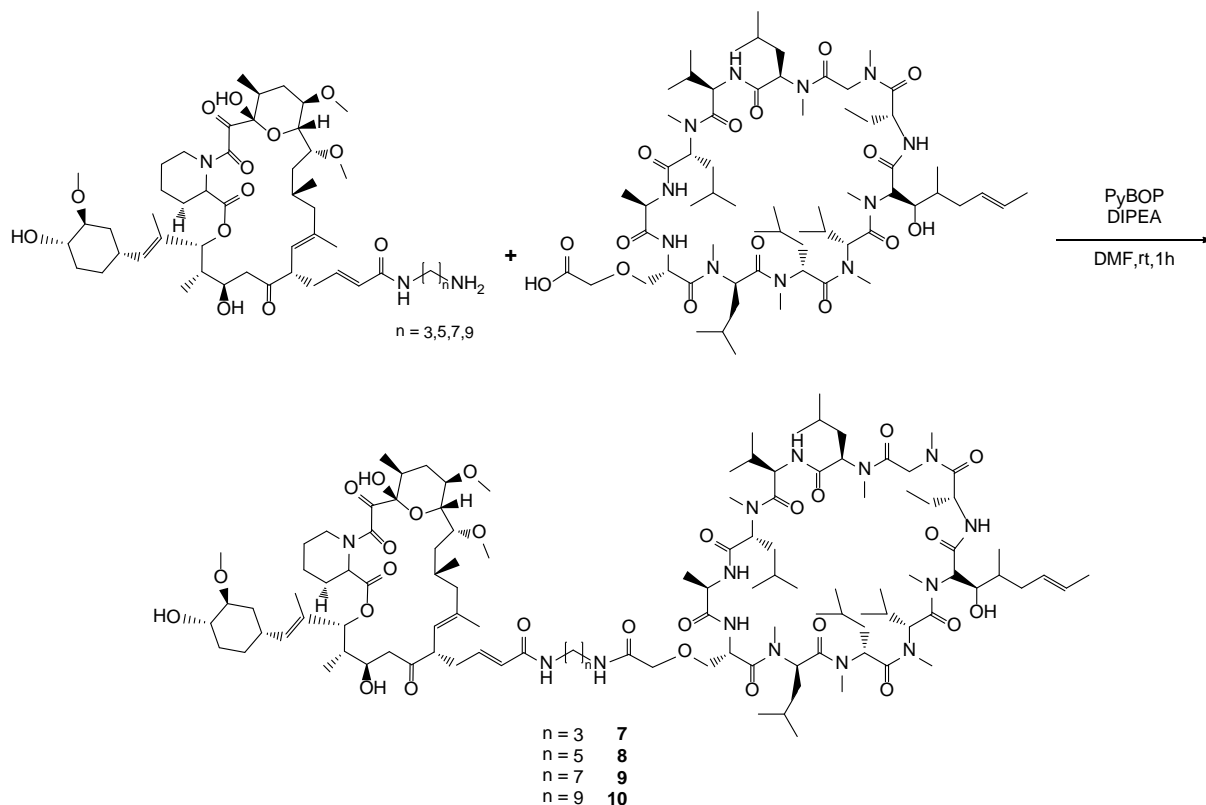


Abbildung 14: Untersuchung der Inhibition von CaN durch die Verbindungen **3-6**. A) Bestimmung der CaN-Inhibition der Komplexe *hFKBP12**[**3-6**] B) Bestimmung der IC_{50} -Werte der Inhibition der NFAT-Reporter-Gen-Aktivität der Verbindungen **3-6**. Für die experimentellen Details siehe Abb.9.

2.1.7 Synthese der dualen Inhibitoren $FK506-C_{40}-CO-NH(CH)_nNH-[OCCH_2-D-Ser]^8-CsA$ **7-10**

Die Synthesen der dualen Inhibitoren **7-10** wurden analog zu denen der Verbindungen **3-6** geführt. Zunächst wurde Verbindung **2** mit PyBOP und DIPEA vorinkubiert, um den entsprechenden Aktivester zu bilden. Danach wurde mit den Verbindungen **3-6** umgesetzt und 1 h bei Raumtemperatur gerührt (Schema 4). Die Ausgangsstoffe wurden äquimolar eingesetzt, da es an dieser Stelle der Synthese nicht mehr zu einer Dimerisierung kommen kann.



Schema 4: Synthese der dualen Inhibitoren **7-10**

Tabelle 2: Chemische Daten der dualen Inhibitoren **7-10**

| Verbindung | Ausbeute (%) | Molmasse (g mol ⁻¹) | | Retentionszeit R _t (min) |
|------------|--------------|------------------------------------|------------------------------------|-------------------------------------|
| | | [M+H] ⁺ _{ber.} | [M+H] ⁺ _{gef.} | |
| 7 | 51,2 | 2163,4 | 2163,6 | 14,1 |
| 8 | 76,6 | 2190,4 | 2190,2 | 14,3 |
| 9 | 64,2 | 2218,5 | 2218,2 | 14,6 |
| 10 | 56,8 | 2246,9 | 2246,8 | 14,9 |

2.1.8 Untersuchung der Inhibition der PPLase Aktivität von *hFKBP12* und *hCypA* der Verbindungen **7-10**

Für die Verbindungen **7-10** wurde die Inhibition der PPLase-Aktivität von *hFKBP12* als auch von *hCypA* im Protease-gekoppelten PPLase-Assay untersucht. Es zeigte sich, dass alle vier dualen Inhibitoren sowohl *hFKBP12* sowie *hCypA* im unteren nanomolaren Bereich inhibieren (Abb.15).

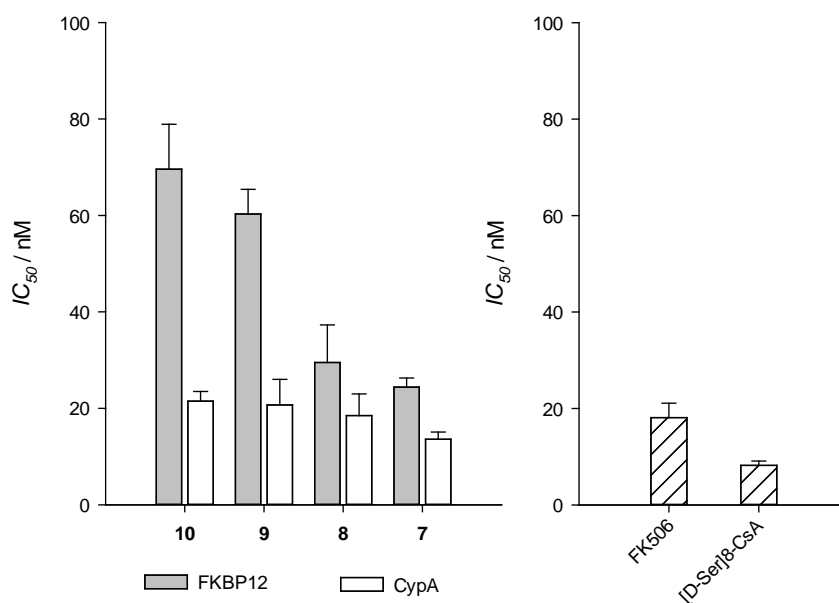


Abbildung 15: Inhibition von *hFKBP12* und *hCypA* durch die Verbindungen **7-10**. Die IC_{50} -Werte wurden in einem Proteasegekoppelten PPIase-Assay mit *hFKBP12* (100 nM) und *hCypA* (8 nM) gemessen. *suc-Ala-Lys-Pro-Phe-pNA* (45 μ M) bzw. *suc-Ala-Gly-Pro-Phe-pNA* (45 μ M) wurden als Substrat für *hFKBP12* bzw. *hCypA* verwendet. Die Verbindungen **7-10** wurden in Konzentrationen von 2-200 nM eingesetzt.

Zu erkennen ist eine Abnahme des IC_{50} -Wertes gegenüber *hFKBP12* mit abnehmender Linkerlänge. Die Verbindungen **7** und **8** zeigten unter den verwendeten Assay-Bedingungen mit IC_{50} -Werten von $24,4 \pm 1,9$ nM und $29,5 \pm 7,8$ nM ein annähernd so gutes Inhibitionspotential wie FK506 (IC_{50} -Wert von $18,1 \pm 3,0$ nM). Demgegenüber stehen die Verbindungen **9** und **10**, welche mit IC_{50} -Werten von $60,3 \pm 5,1$ bzw. $69,6 \pm 9,3$ nM die Aktivität von *hFKBP12* um das drei- bis vier-fache schlechter inhibierten als FK506. Im Vergleich dazu ließ das Inhibitionsverhalten der Verbindungen **7-10** gegenüber *hCypA* nur eine geringe Abhängigkeit von der Linkerlänge erkennen. Verbindung **7** zeigte mit einem IC_{50} -Wert von $13,6 \pm 1,4$ nM eine dem $[D-Ser]^8$ -CsA ($IC_{50} = 8,3 \pm 0,9$ nM) ähnliche Inhibition. Mit zunehmender Linkerlänge nahm die Inhibition leicht ab mit IC_{50} -Werten zwischen 18,5 nM für Verbindung **7** und 21,5 nM für Verbindung **10**. Die IC_{50} -Werte für FK506 und $[D-Ser]^8$ -CsA sind höher als die literaturbekannten Werte, da zu ihrer Bestimmung höhere Konzentrationen an PPIasen verwendet wurden. Das war erforderlich, da als Substrate hier die Pentapeptide *suc-Ala-Lys-Pro-Phe-pNA* bzw. *suc-Ala-Gly-Pro-Phe-pNA* eingesetzt wurden, die nicht die optimalen Substrate der vermessenen PPIasen darstellen und deshalb höher Konzentrationen an Protein benötigt wurden. Es wurden die oben genannten Pentapeptide verwendet, um die IC_{50} -Werte der unkomplexierten Inhibitoren später mit den IC_{50} -Werten der vorinkubierten Komplexe vergleichen zu können. Die Pentapeptide wurden

in den PPIase-Messungen der vorinkubierten Komplexe verwendet, da ihre Isomerisierung ausschließlich von FKBP12 bzw. CypA katalysiert wird.

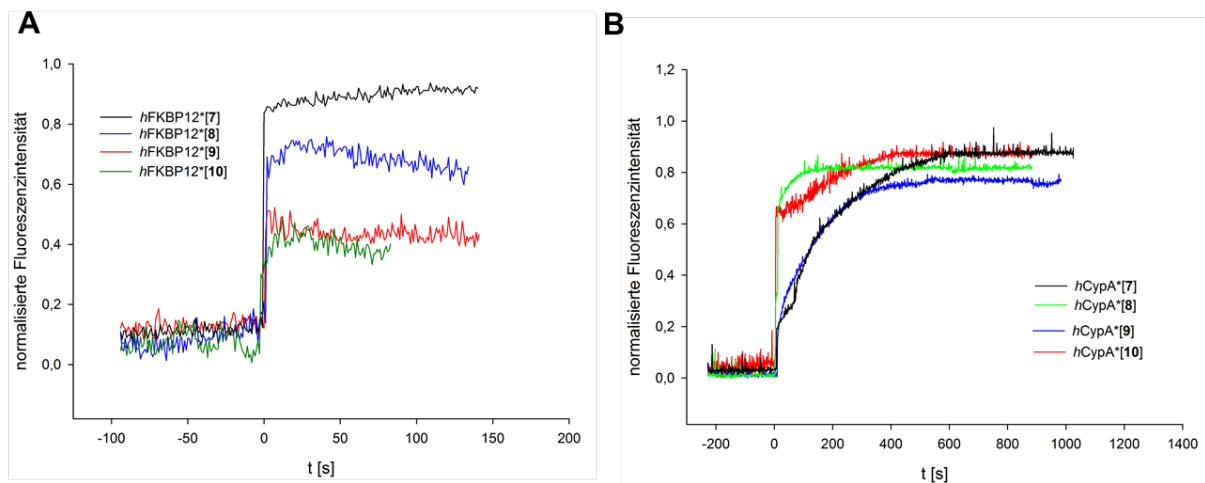


Abbildung 16: Zeitverlauf der Fluoreszenz der Verbindungen **7-10** im Komplex mit A) *hFKBP12* und B) *hCypA*. Für experimentelle Details siehe Abb.8 und Abb.10.

Bei der Messung der IC_{50} -Werte der *hFKBP12*-Inhibition der dualen Inhibitoren **7-10** traten unerwartete Ergebnisse auf. Die IC_{50} -Werte sollten mit zunehmender Linkerlänge abnehmen, da die Entfernung der beiden Wirkstoffgruppen steigt und die Möglichkeit sterischer Wechselwirkungen so minimiert wird. Tatsächlich stiegen die IC_{50} -Werte der *hFKBP12*-Inhibition mit zunehmender Linkerlänge jedoch an (Abb.16A). Zur Analyse des Zeitverlaufs der Bindung der Verbindungen **7-10** an *hFKBP12* wurde die intrinsische Fluoreszenz des Trp⁵⁹ des *hFKBP12* herangezogen. Auch hier verhielten sich die Verbindungen anders, als nach den Untersuchungen der Verbindung **1** und **3-6** erwartet wurde. Anstatt dass die Fluoreszenzemission nach Bildung der *hFKBP12**[**7-10**]-Komplexe wie bisher abnahm, stieg sie an. In Abbildung 16A ist zu erkennen, dass die vier Komplexe unterschiedliche Intensitäten des Fluoreszenzsignals aufweisen. Der Komplex *hFKBP12**[**10**] zeigte die geringste Fluoreszenzemission. Mit abnehmender Linkerlänge stieg die Fluoreszenzemission an. Interessanterweise zeigten die Messung des zeitlichen Verlaufs der Bildung der *hCypA**[**7-10**]-Komplexe über die intrinsische Fluoreszenz des Trp¹²¹ des *hCypA* auch eine Abhängigkeit von der Länge des Linkers. Die Verbindungen zeigten einen unterschiedlichen Verlauf der Bindung an *hCypA* (Abb.16B). Bei Verbindung **7** und **8** wies die schnelle erste Phase eine gegenüber der Ausgangsverbindung deutlich reduzierte Amplitude auf, während Verbindung **9** und **10** eine deutlich vergrößerte Amplitude der schnellen Phase zeigten. Bei Verbindung **9** und **10** scheint also ein höherer Anteil der Moleküle bereits in der CypA-aktiven Form vorzuliegen.

Tabelle 3: k_{obs} -Werte der Bindung der dualen Inhibitoren an hCypA.

| Verbindung | k_{obs} (hCypA) | % schnelle Phase |
|------------|------------------------------------|------------------|
| 7 | $5,2 \cdot 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ | 83,1 % |
| 8 | $1,7 \cdot 10^{-2} \text{ s}^{-1}$ | 19,7 % |
| 9 | $7,5 \cdot 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ | 80 % |
| 10 | $5,3 \cdot 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ | 31,8 % |

2.1.9 Untersuchung der hFKBP12-Inhibition durch die hCypA*[7-10]-Komplexe

Als nächstes wurden die Verbindungen **7-10** zunächst mit hCypA inkubiert, bevor die inhibierende Wirkung des hCypA*[7-10]-Komplexes auf die PPIase hFKBP12 untersucht wurde (Abb.17).

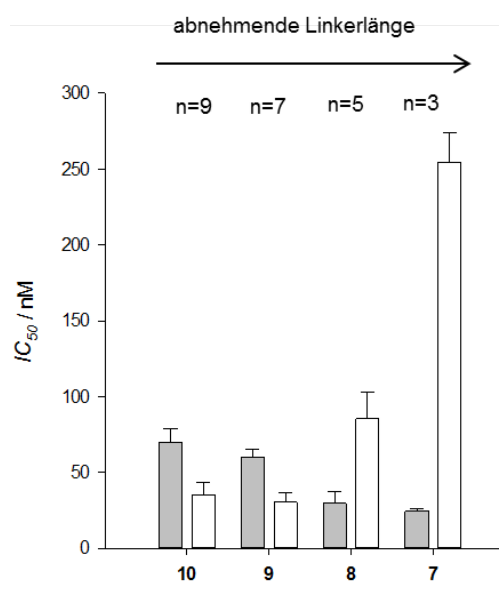


Abbildung 17: Inhibition von hFKBP12 durch die hCypA*[7-10]-Komplexe (weiß). In grau sind die IC₅₀-Werte der unkomplexierten Verbindungen dargestellt. hCypA wurde mit einem Überschuss der Verbindungen (1 μM) inkubiert um die Komplexe hCypA*[7-10] zu bilden. Anschließend wurden die überschüssigen Verbindungen mittels Amicon Zentrifugenfilter mit einem Ausschlussvolumen von 10 kDa entfernt. Nach der Zentrifugation wurden die binären Komplexe hCypA*[7-10] zur Bestimmung der IC₅₀-Werte der hFKBP12-Inhibition eingesetzt. Die Bestimmung erfolgte mittels Protease-gekoppelten PPIase-Assay in dem 15 nM hFKBP12 und suc-Ala-Lys-Pro-Phe-pNA (45 μM) als Substrat verwendet wurde.

Die Reihenfolge der hFKBP12-Inhibition durch die hCypA*[7-10]-Komplexe ist entgegengesetzt der hFKBP12-Inhibition durch die unkomplexierten Verbindungen **7-10** (Abb.17).

Der binäre Komplex hCypA*[7] inhibierte die hFKBP12-PPIase-Aktivität mit einem zehnfach schlechteren IC₅₀-Wert als die unkomplexierte Verbindung **7** ($254,7 \pm 19,6 \text{ nM}$ vs. $24,4 \pm 1,9$

nM). Überraschend war die Verdopplung der Effektivität der Verbindungen **9** und **10**. Die Komplexe $hCypA^*[8-9]$ inhibierten die Enzymaktivität von $hFKBP12$ mit IC_{50} -Werten von $30,3 \pm 6,3$ nM für **9** bzw. $35,0 \pm 8,6$ nM für **10**, wohingegen die unkomplexierten Verbindungen $hFKBP12$ nur mit IC_{50} -Werten von $60,3 \pm 5,1$ bzw. $69,6 \pm 9,3$ nM inhibierten.

2.1.10 Bestimmung der $hCypA$ -Inhibition durch die $hFKBP12^*[7-10]$ -Komplexe

Es wurde ebenfalls die $hCypA$ -Inhibition durch die binären Komplexe $hFKBP12^*[7-10]$ untersucht (Abb.18). Anders als im vorhergehenden Experiment, konnte durchweg eine Steigerung der Effizienz der $hCypA$ -Inhibition durch den binären Komplex $hFKBP12^*[7-10]$ beobachtet werden.

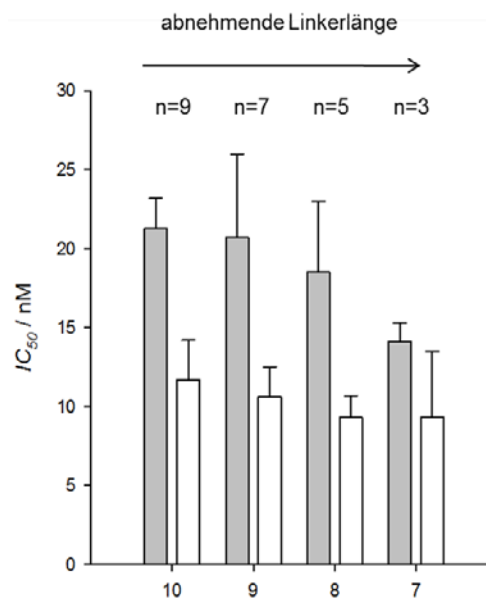


Abbildung 18: Inhibition von $hCypA$ durch die $hFKBP12^*[7-10]$ -Komplexe. Die Verbindungen **7-10** wurden mit einem Überschuss an $hFKBP12$ (500 nM) vorinkubiert. Die so entstandenen binären Komplexe $hFKBP12^*[7-10]$ werden zur Bestimmung der IC_{50} -Werte der $hCypA$ -Inhibition eingesetzt. Die Bestimmung erfolgte mittels Protease-gekoppelten PPIase-Assay in dem 6 nM $hCypA$ und suc-Ala-Gly-Pro-Phe-pNA (45 μ M) als Substrat verwendet wurde.

Im Mittel inhibierten die unkomplexierten Verbindungen **7-10** mit einem IC_{50} -Wert von 20 nM, wohingegen die $hFKBP12^*[7-10]$ -Komplex die IC_{50} -Werte auf zirka 10 nM senkten. Das $hFKBP12$ hatte keinen signifikanten Effekt auf die Inhibition von $hCypA$ durch $[D-Ser]^8$ -CsA.

2.1.11 Untersuchung der Inhibition der CaN-Aktivität

Eines der Ziele der kovalenten Fusion von FK506 und [D-Ser]⁸-CsA war, neben der gleichzeitigen Inhibition der PPLase-Aktivität von FKBP und Cyclophilinen, die Beeinflussung der immunsuppressiven Eigenschaften der beiden Stammverbindungen. Für die Analyse der Calcineurin-Inhibition der dualen Inhibitoren sollten drei verschiedene Aspekte untersucht werden.

1. Inhibition der CaN-Aktivität durch *hFKBP12*[7-10]*
2. Inhibition der CaN-Aktivität durch *hCypA*[7-10]*
3. Inhibition der CaN-Aktivität durch *hFKBP12*[7-10]*hCypA*

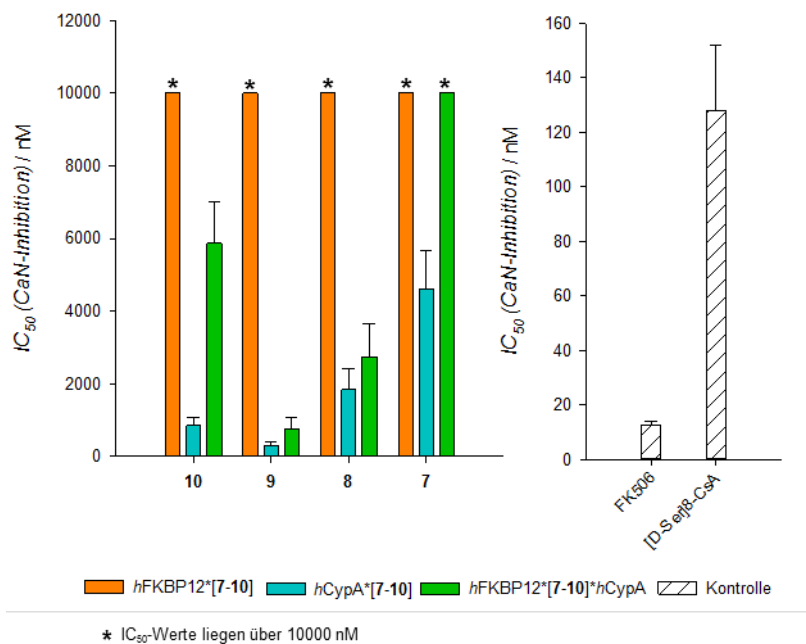


Abbildung 19: Untersuchung der Inhibition von CaN durch die Verbindungen **7-10**. Es wurden die binären Komplexe aus *hFKBP12*[7-10]* (orange) und *hCypA*[7-10]* (cyan) sowie der ternäre Komplex aus *hFKBP12*[7-10]*hCypA* (grün) untersucht. Die Bestimmung der IC₅₀-Werte erfolgte mittels eines *in vitro* CaN-Assays mit dem RII-Phosphopeptid als Substrat. Es wurden jeweils 15 μM *hFKBP12* und *hCypA*, sowie die Verbindungen **7-10** in einem Konzentrationsbereich von 25 nM-10 μM eingesetzt.

In Abbildung 19 sind die drei Experimente zusammengefasst. Die Komplexe *hFKBP12*[7-10]* inhibierten die enzymatische Aktivität von CaN bis zu einer InhibitorKonzentration von 10 μM nicht. Anders verhält es sich mit der CaN-Inhibition durch die Komplexe *hCypA*[7-10]*. Mit

zunehmender Länge des Diaminoalkyllinkers nahm die Effizienz der Hemmung des CaN von **7** zu **9** stetig zu.

Vergleicht man die CaN-Inhibition der Verbindung **7** mit der von [D-Ser]⁸-CsA, so ließ sich eine um das 36-fache verminderte Fähigkeit zur Inhibition der Phosphatase-Aktivität des CaN feststellen. Verbindung **8** inhibierte die Phosphatase-Aktivität des CaN nur mit einem IC₅₀-Wert von 1,8 ± 0,5 µM, während Verbindung **9** mit 0,3 ± 0,09 µM inhibierte. Das heißt, dass eine Verlängerung um vier Kohlenstoffatome eine Effektivitätssteigerung um das 15-fache ergab. Die Effektivität der Inhibition nimmt von **9** zu **10** wieder ab. So inhibierte der Komplex *hCypA**[**10**] die Phosphatase-Aktivität des CaN mit einem IC₅₀-Wert von 0,8 ± 0,2 µM und war daher zirka drei-fach weniger effektiv, als Verbindung **9**. Die Betrachtung der CaN-Inhibition der einzelnen binären Komplexe zeigte, dass die Inhibition des CaN ausschließlich über die Komplexe *hCypA**[**7-10**] vermittelt wurde. Im letzten Experiment wurden die ternären Komplexe *hFKBP12**[**7-10**]**hCypA* untersucht. Es wurden auf Grund von sterischen Hinderungen zwischen den Enzymen höhere IC₅₀-Werte und eine daraus resultierende verminderte CaN-Inhibition erwartet. Die Effektivität der ternären *hFKBP12**[**7-10**]**hCypA*-Komplexe folgte dem gleichen Verlauf wie die CaN-Inhibition der binären Komplexe *hCypA**[**7-10**]. Die Verbindung **7** zeigte im ternären Komplex bis zu einer Inhibitorkonzentration von 10 µM keinerlei inhibitorische Aktivität gegenüber CaN. Dahingegen zeigten die Komplexe *hFKBP12**[**8-9**]**hCypA* eine gesteigerte inhibitorische Aktivität gegenüber dem CaN. Die beiden Verbindungen inhibierten die Phosphatase-Aktivität mit IC₅₀-Werten von 2,7 ± 0,9 µM respektive 0,7 ± 0,3 µM. Die Effektivität der CaN-Inhibition nahm von Verbindung **9** zu **10** drastisch ab. So inhibierte *hFKBP12**[**10**]**hCypA* die CaN-Aktivität nur noch mit einem Achtel der Effektivität von *hFKBP12**[**9**]**hCypA*. Vergleicht man die Inhibition der *hFKBP12**[**7-10**]**hCypA*-Komplexe mit dem Inhibitionsvermögen der binären Komplexe *hFKBP12**[FK506] und *hCypA**[[D-Ser]⁸-CsA], so zeigte sich, dass die Verbindungen **7-10** Verbindungen mit stark reduzierter Immunsuppressivität darstellen.

Weiterhin wurde zur Bestimmung der immunsuppressiven Eigenschaften der Verbindungen ein NFAT-Reportergen-Assay durchgeführt. Mittels des Assays lassen sich die immunsuppressiven Eigenschaften der Verbindungen innerhalb lebender Zellen untersuchen (Abb.20).

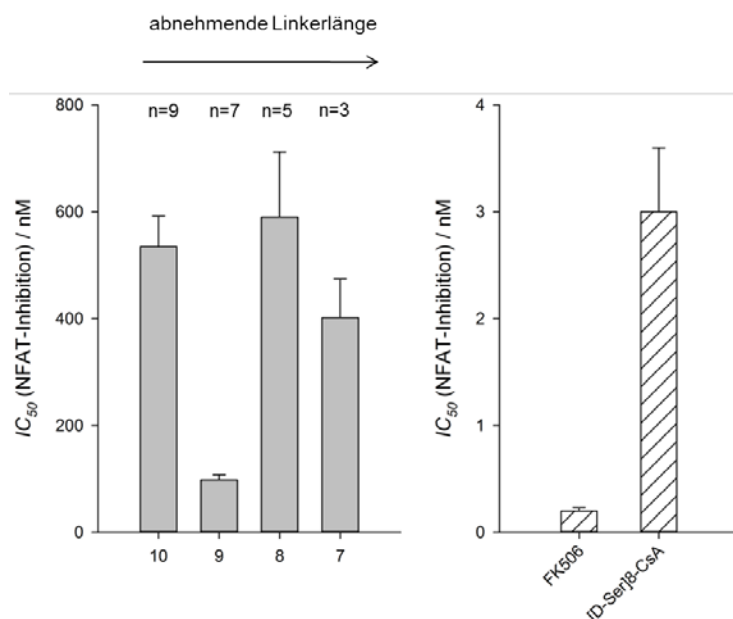


Abbildung 20: Bestimmung der IC₅₀-Werte der Inhibition der NFAT-Reporter-gen-Aktivität durch die Verbindungen **7-10**. Für experimentelle Details siehe Abbildung 9.

Bei Betrachtung der Ergebnisse des NFAT-Reporter-gen-Assays in Abb. 20 ist zu erkennen, dass die vier Verbindungen sehr unterschiedliche Inhibitionsvermögen aufwiesen. Überraschend war das unterschiedliche Inhibitionsverhalten der Verbindung **7** im NFAT- und CaN-Assay. Während Verbindung **7** im CaN-Assay bis zu einer Inhibitorkonzentration von 10 µM keine Inhibition zeigte, zeigte sie mit einem IC₅₀-Wert von 402 ± 72 nM im NFAT-Reporter-gen-Assay deutliche immunsuppressive Eigenschaften. Die Verbindung **8** besaß mit einem IC₅₀-Wert von 590 ± 122 nM eine anderthalb-fach schlechtere Inhibition der NFAT-Reporter-gen-Aktivität als Verbindung **7**. Wird der Linker um weitere zwei C-Atome verlängert, so erfolgte eine drastische Verbesserung der Inhibition der NFAT-Reporter-gen-Aktivität. Die Verbindung **9** inhibierte mit einem IC₅₀-Wert von 98 ± 10 nM die NFAT-Reporter-gen-Aktivität um das sechs-fach besser als Verbindung **8**. Sie ist somit die Verbindung mit den stärksten immunsuppressiven Eigenschaften. Eine nochmalige Verlängerung des Linkers auf neun Kohlenstoffatome bewirkte eine Verschlechterung der Inhibition der NFAT-Reporter-gen-Aktivität. Der IC₅₀-Wert von Verbindung **10** ähnelte mit 535 ± 57 nM dem von Verbindung **8** mit 590 ± 122 nM.

Tabelle 4: Zusammenfassung der Enzyminhibition durch die dualen Inhibitoren **7-10**

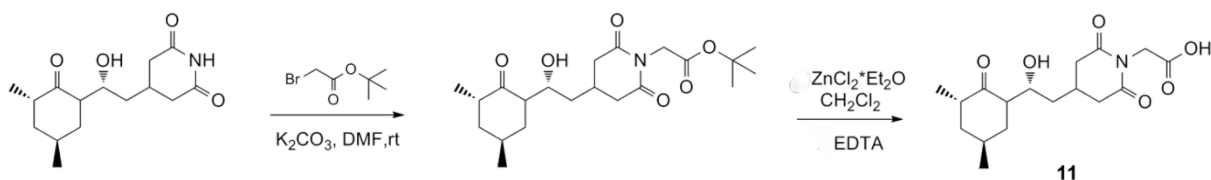
| Verbindung | <i>hFKBP12</i> (IC ₅₀ /nM) | <i>hFKBP12</i> (IC ₅₀ /nM) <i>hCypA*</i> [7-10] | <i>hCypA</i> (IC ₅₀ /nM) | <i>hCypA</i> (IC ₅₀ /nM) <i>hFKBP12*</i> [7-10] | CaN (IC ₅₀ /nM) | | | NFAT (IC ₅₀ /nM) |
|--------------------------------|--|---|--|---|-------------------------------|--------------|---|--------------------------------|
| | | | | | <i>hFKBP12</i> | <i>hCypA</i> | <i>hFKBP12*</i> [7-10]* <i>hCypA</i> | |
| 7 | 24,4 ± 1,9 | 254 ± 19,6 | 13,6 ± 1,5 | 9,3 ± 4,2 | >10000 | 4600 ± 1027 | >10000 | 402 ± 72 |
| 8 | 29,5 ± 7,8 | 85,4 ± 17,4 | 18,5 ± 4,5 | 9,3 ± 1,4 | >10000 | 1840 ± 567 | 2740 ± 907 | 590 ± 122 |
| 9 | 60,3 ± 5,1 | 30,3 ± 6,3 | 20,7 ± 5,3 | 10,6 ± 1,9 | >10000 | 306 ± 87 | 758 ± 312 | 98 ± 10 |
| 10 | 64,6 ± 9,3 | 35,0 ± 8,6 | 21,5 ± 2,0 | 11,7 ± 2,5 | >10000 | 841 ± 230 | 5860 ± 1127 | 535 ± 57 |
| FK506 | 18,1 ± 3,0 | -- | -- | -- | 12,6 ± 1,2 | -- | -- | 0,2 ± 0,03 |
| [D-Ser]⁸-CsA | -- | -- | 8,2 ± 0,9 | -- | -- | 128, ± 24 | -- | 3,0 ± 0,6 |

2.2 Die dualen Inhibitoren CHX-CH₂CO-NH(CH)_nNH-[OCCH₂-D-Ser]⁸-CsA 16-19

Nachdem die Verbindungen bestehend aus einer FK506- und einer [D-Ser]⁸-CsA-Komponente, sich als gute PPlase-Inhibitoren bei verminderter CaN-Inhibition erwiesen, sollten weitere duale Inhibitoren dargestellt werden. In diesen Derivaten sollten die bisherigen Wirkstoffe gegen andere PPlase-Inhibitoren ersetzt werden, um mögliche Selektivitäten innerhalb der FKBP- bzw. Cyclophilin-Familie zu erzielen. In der folgenden Synthese wurde FK506 durch Cycloheximid (CHX) ersetzt^[60].

2.2.1 Synthese von *N*-(Carboxymethyl)-Cycloheximid **11**

Bevor das Cycloheximid mit dem [D-Ser]⁸-CsA verknüpft werden konnte, musste zunächst eine Funktionalität für die Anknüpfung des Linkers geschaffen werden. Dazu erfolgte eine Substitution des Wasserstoffatoms am Glutarimidylstickstoff durch eine Carboxymethylgruppe. Für die Darstellung von Verbindung **11** wurde Cycloheximid im ersten Schritt mit *tert*-Butylbromoacetat und K₂CO₃ in DMF umgesetzt und man erhielt den *tert*-Butylester am Stickstoffatom des Glutarimidyl-Ringes. Im zweiten Schritt erfolgte die Verseifung des Esters mittels ZnCl₂*Etherat in Methylenchlorid.



Schema 5: Synthese von Verbindung **11** ausgehend von Cycloheximid. Im ersten Schritt erfolgte die Alkylierung mit *tert*-Butylbromoacetat gefolgt von der Abspaltung der *tert*-butyl-Schutzgruppe im zweiten Schritt.

Nach Extraktion mit einer gesättigten EDTA-Lösung und folgender säulenchromatographischer Reinigung wurde die Verbindung *N*-(Carboxymethyl)-Cycloheximid (**11**) erhalten und im Folgenden hinsichtlich ihrer Inhibition der PPlase-Aktivität von *h*FKBP12 und ihres immunsuppressiven Potentials untersucht (Schema 5). Das Rohprodukt wurde ohne weitere Reinigung für die anschließenden Synthesen weiterverwendet. Es wurde in einer Ausbeute von 479 mg (79,0 % bezogen auf Cycloheximid) erhalten.

2.2.2 Biochemische Eigenschaften des *N*-(Carboxymethyl)-Cycloheximid **11**

Im Protease-gekoppelten PPlase-Assay inhibierte Verbindung **11** die PPlase-Aktivität von *h*FKBP12 mit einem IC_{50} -Wert von $9,7 \pm 0,6 \mu\text{M}$. Dieser lag über dem IC_{50} -Wert von CHX mit $4,2 \pm 0,5 \mu\text{M}$ (Abb.21A).

Im NFAT-Reportergen-Assay zeigte Verbindung **11** sowie die Ausgangsverbindung CHX keine inhibitorische Wirkung. Als Positivkontrolle wurde FK506 mitgeführt, welches wie erwartet die NFAT-Reportergen-Aktivität mit einem IC_{50} -Wert von $0,20 \pm 0,03 \text{ nM}$ inhibierte (Abb.21B).

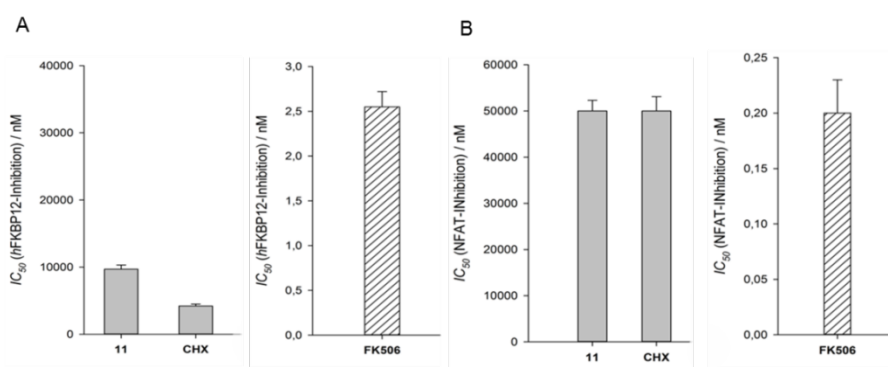
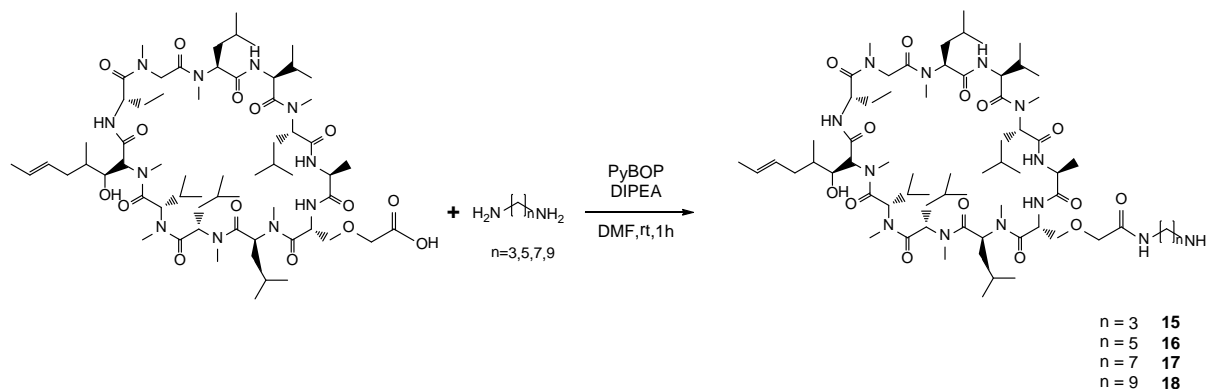


Abbildung 21: Inhibition von *h*FKBP12- und NFAT-Reportergen-Aktivität durch Verbindung **11**, CHX und DM-CHX. A) Die IC_{50} -Werte der *h*FKBP12-Inhibition wurden in einem Protease-gekoppelten PPlase-Assay mit 10 nM *h*FKBP12 bestimmt. Als Substrat für das *h*FKBP12 wurde suc-Ala-Leu-Pro-Phe-pNA (45 μM) verwendet. Die Verbindungen wurden in einem Konzentrationsbereich von 1-50 μM eingesetzt. B) Für die Bestimmung der IC_{50} -Werte der NFAT-Reportergen-Inhibition siehe Abbildung 9. Die Verbindungen wurden in einem Konzentrationsbereich von 0,1-50 μM eingesetzt.

2.2.3 Synthese der [D-Ser-CO-NH(CH)_nNH₂]⁸-CsA-Derivate 12-15

Durch kovalente Verknüpfung von 1,3-Diaminopropan, 1,5-Diaminopentan, 1,7-Diaminoheptan und 1,9-Diaminononan an Verbindung **2** wurden die Moleküle **12-15** dargestellt. Die Verknüpfung erfolgte analog den Synthesen der Verbindungen **3-6**. Dazu wurde Verbindung **2** zunächst mit PyBOP und DIPEA in DMF voraktiviert, um anschließend mit einem Überschuss des jeweiligen Diaminoalkyllinkers zu den Verbindungen **12-15** umgesetzt zu werden (Schema 6).



Schema 6: Synthese der Verbindungen **12-15** ausgehend von Verbindung **2**. Dazu erfolgt die Kupplung von **2** mit den entsprechenden Diaminoalkylverbindungen mittels PyBOP und DIPEA als Kupplungsreagenzien.

Tabelle 5: Chemische Daten der [D-Ser]⁸-CsA-Derivate **12-15**

| Verbindung | Ausbeute (%) | Molmasse (g mol ⁻¹) | | Retentionszeit R _t (min) |
|------------|--------------|------------------------------------|------------------------------------|-------------------------------------|
| | | [M+H] ⁺ _{ber.} | [M+H] ⁺ _{gef.} | |
| 12 | 72,1 | 1333,9 | 1333,7 | 10,3 |
| 13 | 62,7 | 1360,9 | 1360,8 | 10,4 |
| 14 | 72,9 | 1389,8 | 1389,8 | 10,8 |
| 15 | 64,5 | 1417,7 | 1417,8 | 11,1 |

2.2.4 Untersuchung der Inhibition der *hCypA*-PPIase-Aktivität der [D-Ser-CO-NH(CH)_nNH₂]⁸-CsA-Derivate 12-15

Nach erfolgreicher Synthese wurde die Inhibition der Verbindungen **12-15** auf die PPIase-Aktivität von *hCypA* untersucht. Mit IC₅₀-Werten zwischen 3,5 - 4,5 nM sind die Moleküle ähnlich gute *hCypA*-Inhibitoren wie die Ausgangsverbindung **2**, unabhängig von der Länge der Alkylkette, die in Position 8 angeknüpft wurde (Abb.22).

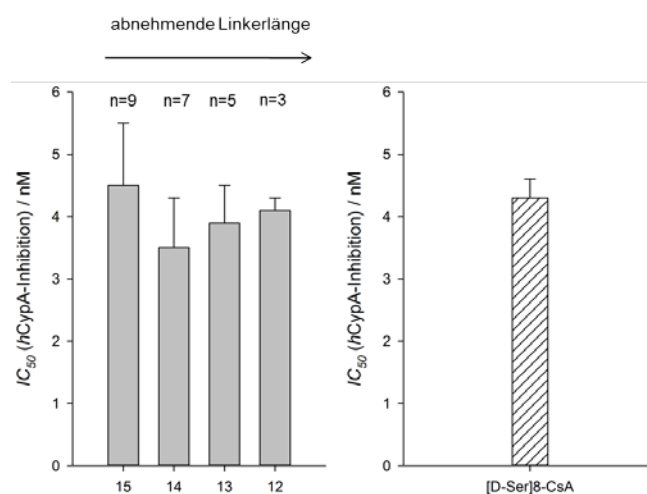
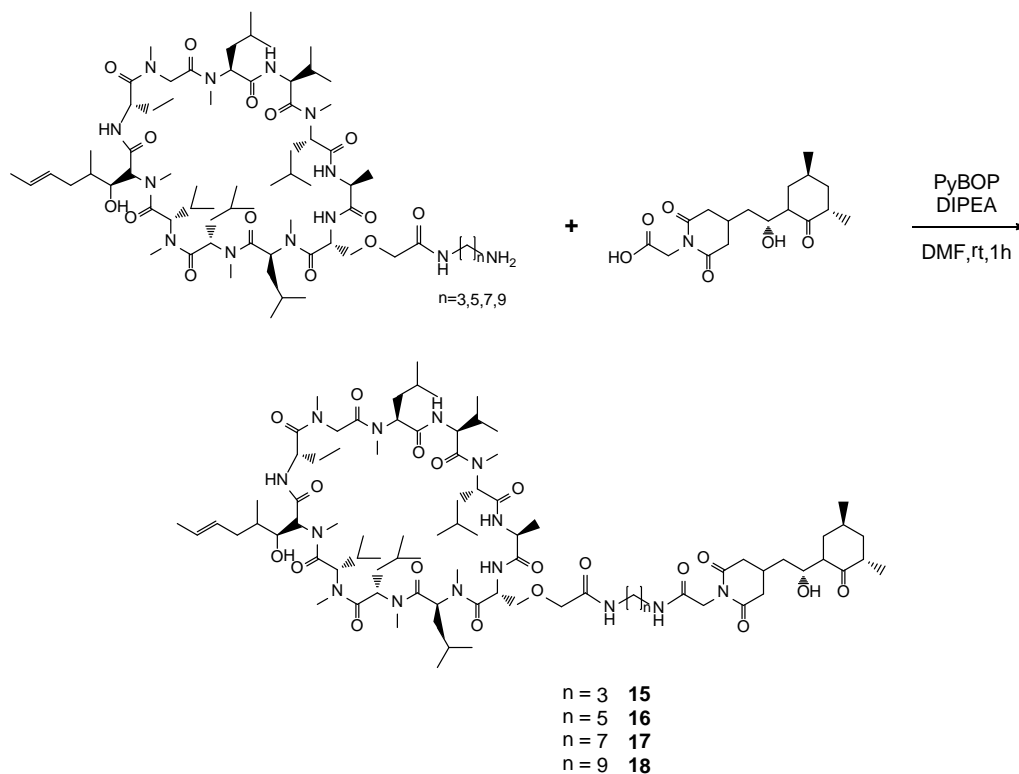


Abbildung 22: Inhibition von *hCypA* durch die Verbindungen **12-15**. Die IC₅₀-Werte der *hCypA*-Inhibition wurden in einem Protease-gekoppelten PPIase-Assay mit 5 nM *hCypA* bestimmt. Als Substrat für *hCypA* wurde suc-Ala-Ala-Pro-Phe-pNA (45 μM) verwendet. Die Verbindungen wurden in einem Konzentrationsbereich von 0,5-25 nM eingesetzt.

Die Bestimmung der Inhibition von CaN erfolgte für die Verbindungen **12-15** nicht. Nur die Verbindungen **16-19** bei denen CHX und [D-Ser]⁸-CsA über die Linker miteinander verknüpft sind wurden auf ihre Fähigkeit zur Inhibition von CaN untersucht, da CHX keinen Einfluss auf die CaN-Aktivität besitzt und auch nicht-immunsuppressiv wirkt. Aus diesem Grund kann davon ausgegangen werden, dass die CaN-Inhibition durch die dualen Inhibitoren **16-19** ausschließlich durch den [D-Ser]⁸-CsA-Teil der Inhibitoren hervorgerufen wird.

2.2.5 Synthese der dualen Inhibitoren CHX-CH₂CO-NH(CH)_nNH-[OCCH₂-D-Ser]⁸-CsA **16-19**

Die kovalente Verknüpfung der Verbindungen **12-15** mit Verbindung **11** zu den neuen dualen Inhibitoren **16-19** geschah unter den bisher verwendeten Kupplungsbedingungen. Zuerst wurde mit PyBOP und DIPEA der Aktivester der Verbindungen **12-15** gebildet und im Anschluss mit Verbindung **11** zu den neuen dualen Inhibitoren umgesetzt (Schema 7).



Schema 7: Synthese der Verbindungen **16-19**, durch Umsetzung der Verbindungen **12-15** mit **11**.

Tabelle 6: Chemische Daten der dualen Inhibitoren **16-19**

| Verbindung | Ausbeute (%) | Molmasse (g mol ⁻¹) | | Retentionszeit R _t (min) |
|------------|--------------|------------------------------------|------------------------------------|-------------------------------------|
| | | [M+H] ⁺ _{ber.} | [M+H] ⁺ _{gef.} | |
| 16 | 76,5 | 1654,1 | 1654,3 | 12,1 |
| 17 | 69,1 | 1689,1 | 1689,2 | 12,2 |
| 18 | 68,1 | 1710,2 | 1710,2 | 12,6 |
| 19 | 64,1 | 1738,1 | 1738,2 | 13,1 |

2.2.6 Untersuchung der Inhibition der *hFKBP12* und *hCypA*-PPIase-Aktivität durch Verbindungen **16-19**

Die neuen dualen Inhibitoren wurden ebenfalls auf ihre Fähigkeit untersucht, die PPIase-Aktivität von *hFKBP12* und *hCypA* inhibieren zu können. In Abbildung 23 sind die IC₅₀-Werte der *hCypA*-Inhibition der Verbindungen **16-20** dargestellt.

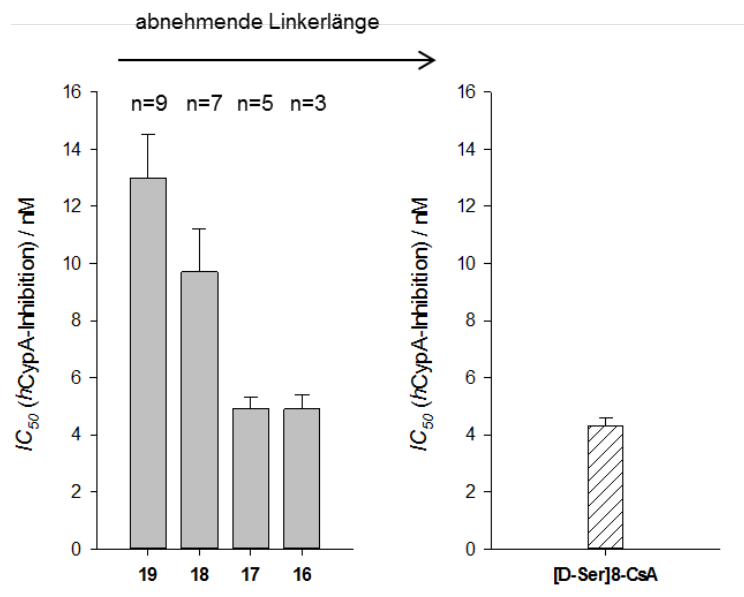


Abbildung 23: Inhibition von *hCypA* durch die Verbindungen **16-19**. Die IC₅₀-Werte der *hCypA*-Inhibition wurden in einem Protease-gekoppelten PPlase-Assay mit 5 nM *hCypA* bestimmt. Als Substrat für *hCypA* wurde suc-Ala-Ala-Pro-Phe-pNA (45 µM) verwendet. Die Verbindungen wurden in einem Konzentrationsbereich von 0,5-25 nM eingesetzt.

Mit IC₅₀-Werten von $4,7 \pm 0,5$ nM und $4,9 \pm 0,4$ nM inhibierten die Verbindungen **16** bzw. **17** die PPlase-Aktivität von *hCypA* mit der gleichen Effektivität wie die Ausgangsverbindung **2**. Bei **18** und **19** kam es zu einer Erhöhung des IC₅₀-Wertes. Die IC₅₀-Werte betragen für Verbindung **18** $9,7 \pm 1,5$ nM bzw. $13,0 \pm 1,5$ nM für Verbindung **19**.

Die IC₅₀-Werte der Inhibition der PPlase-Aktivität von *hFKBP12* konnten nicht bestimmt werden. Auf Grund des mikromolaren Inhibitionsbereiches der CHX-Komponente mussten im Protease-gekoppelten PPlase-Assay hohe Inhibitorkonzentrationen eingesetzt werden. In diesen hohen Konzentrationen waren die Verbindungen **16-19** in wässrigen Lösungen nicht löslich.

2.2.7 Synthese des CHX-CH₂CO-NH(CH₂)₂O(CH₂)₂O(CH₂)₂NH-[OCCH₂-D-Ser]⁸-CsA-Derivates **20**

Um die Löslichkeit der dualen CHX/[D-Ser]⁸-CsA Inhibitoren **16-19** zu erhöhen, wurde eine Verbindung mit einem 2,2'-(Ethyldioxy)-diethylamin (EDO)-Linker synthetisiert (Abb.24).

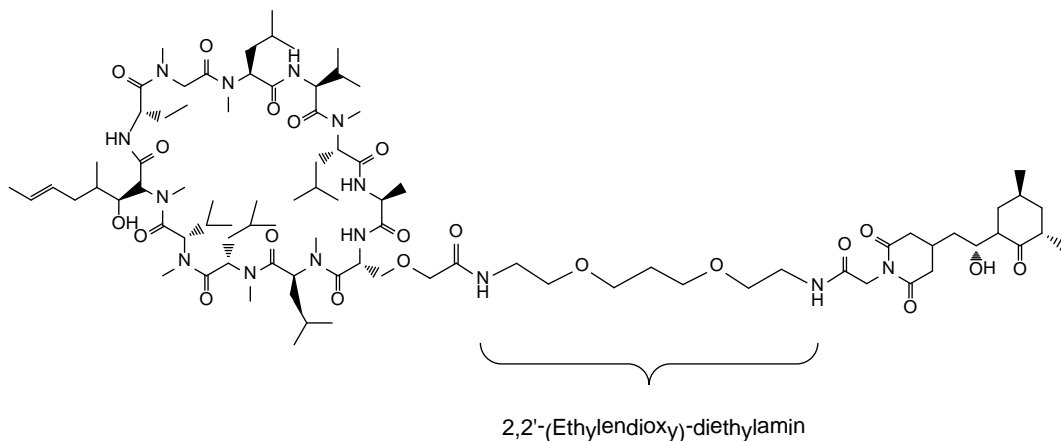


Abbildung 24: Darstellung der Verbindung **20**. Im Unterschied zu den Verbindungen **16-19** erfolgte die Verknüpfung mittels eines Ethylenglykol-Linkers.

Die kovalente Verknüpfung des Polyethylenglykol-Linkers mit Verbindung **2** erfolgte analog den Synthesen der Verbindungen **12-15**. Die so erhaltene Verbindung wurde anschließend mit PyBOP und DIPEA zu dem neuen dualen Inhibitor **20** umgesetzt.

2.2.8 Untersuchung der Inhibition der PPLase-Aktivität von *hFKBP12* und *hCypA* durch Verbindung **20**

Als erstes wurde der IC_{50} -Wert der *hCypA*-Inhibition bestimmt, damit er mit den anderen dualen Inhibitoren verglichen werden konnte (Abb. 25).

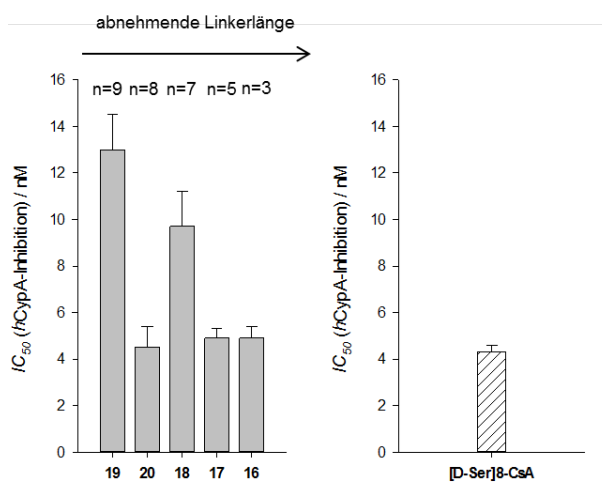


Abbildung 25: Inhibition der *hCypA*-PPLase-Aktivität durch Verbindungen **16-20**. Die IC_{50} -Werte der *hCypA*-Inhibition wurden in einem Protease-gekoppelten PPLase-Assay mit 5 nM *hCypA* bestimmt. Als Substrat für *hCypA* wurde suc-Ala-Ala-Pro-Phe-pNA (45 μ M) verwendet. Die Verbindungen wurden in einem Konzentrationsbereich von 0,5-25 nM eingesetzt.

Der IC_{50} -Wert der *hCypA*-Inhibition war mit einem IC_{50} -Wert von $4,5 \pm 0,9$ nM sehr ähnlich zu dem der Ausgangsverbindung **2**, welche einen IC_{50} -Wert von $4,3 \pm 0,3$ nM besitzt. Die

Untersuchung der Inhibition von *hFKBP12* war mit Verbindung **20** möglich, während der Analyse wurde kein Ausfallen der Substanz beobachtet. Es zeigte sich, dass Verbindung **20** *hFKBP12* mit einem IC_{50} -Wert $6,9 \pm 0,7 \mu\text{M}$ hemmt. Sie bildet damit ein ähnlich potenten Inhibitor wie die Ausgangsverbindung CHX, die *hFKBP12* mit einem IC_{50} -Wert von $4,2 \pm 0,5 \mu\text{M}$ inhibiert (Abb.26).

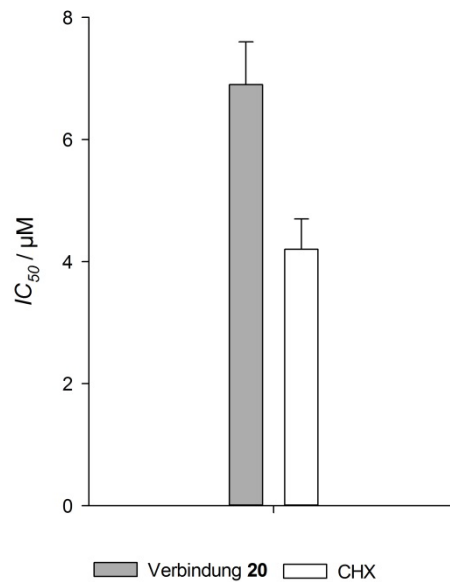


Abbildung 26: Inhibition von *hFKBP12* durch Verbindung **20** und DM-CHX. Die IC_{50} -Werte wurden in einem Protease-gekoppelten PPIase-Assay mit 10 nM *hFKBP12* gemessen. Als Substrat wurde suc-Ala-Leu-Pro-Phe-pNA (45 μM) verwendet. Die Verbindungen wurden in einem Konzentrationsbereich von 0,2-100 μM eingesetzt.

2.2.9 Bestimmung der Inhibition der CaN-Aktivität der Verbindungen 16-20

Die potentielle Immunsuppressivität der Verbindungen wurde an Hand des NFAT-Reporter-Gen-Assays ermittelt. Im Gegensatz zu den Derivaten **7-10** wies die Fähigkeit zur Inhibition der NFAT-Reporter-Gen-Expression für die Verbindungen **16-19** eine direkte Abhängigkeit von der Linkerlänge auf. Es zeigte sich, dass das inhibitorische Potential der dualen Inhibitoren mit steigender Länge des Linkers zunimmt (Abb.27A).

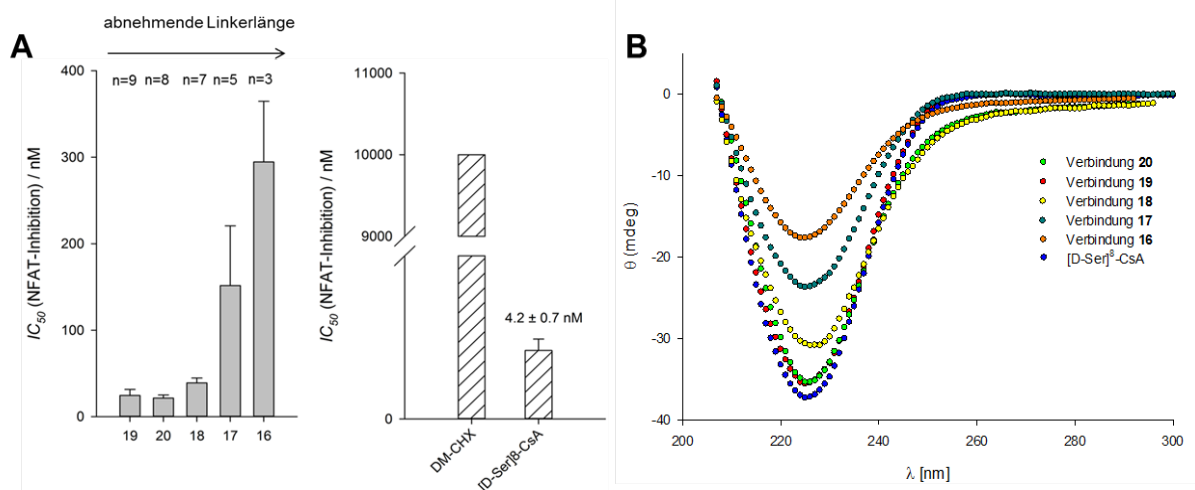


Abbildung 27: A) Inhibition der NFAT-Reportergen-Aktivität der Verbindungen **16-20**. Für experimentelle Details siehe Abbildung 9. Die Verbindungen wurden in Konzentrationen von 0,1-25 μ M eingesetzt. B) CD-Spektren der Verbindungen **16-20**. Die Spektren wurden bei 37 °C in 5 nM Natriumphosphatpuffer (pH 7,0) und einer Inhibitorkonzentration von 100 μ M aufgenommen.

Verbindung **16** besitzt einen IC_{50} -Wert von 294 ± 70 nM. Damit weist sie im Vergleich zu Verbindung **2**, eine um das 71-fache geringere Inhibition der NFAT-Reportergen-Aktivität auf. Mit zunehmender Länge des Alkyllinkers nahmen die immunsuppressiven Eigenschaften zu. Die Verbindung **19** und **20** inhibierten mit IC_{50} -Werten von $24,5 \pm 6,9$ nM bzw. $21,5 \pm 3,6$ nM die NFAT-Reportergen-Aktivität nur noch um das fünf-fache schlechter als Verbindung **2**. Zur weiteren Charakterisierung dieser Ergebnisse wurden die Verbindungen **16-20** mittels des Circular dichroismus (CD) untersucht, um einen etwaigen Zusammenhang zwischen Inhibition und strukturellen Veränderungen festzustellen (Abb.27B). Als Referenzsubstanz diente das [D-Ser]⁸-CsA. Die Sekundärstruktur des [D-Ser]⁸-CsA beinhaltet, analog CsA, eine β -Schleife der Aminosäuren Abu²-Val⁵ [93],[92], die im CD-Spektrum durch eine Bande mit einem Minimum bei zirka 226 nm charakterisiert^[94] wird. Vergleicht man die CD-Spektren der Verbindungen **16-20** mit dem des [D-Ser]⁸-CsA, so ist zu erkennen, dass sich Verbindung **16** und **17** signifikant von [D-Ser]⁸-CsA unterscheiden. Sie zeigten eine Abnahme der Bande bei 226 nm von bis zu 40 % für Verbindung **16**. Verbindung **19** und **20** besitzen ein CD-Spektrum, das sehr ähnlich zu [D-Ser]⁸-CsA ist.

2.3 Synthese und biochemische Eigenschaften des FK506-C₄₀-CONHC(CH₃)₃-Derivates **21** und FK506-C₉-COOMe-Derivates **22**

Die FK506-Derivate **21** und **22** wurden synthetisiert, um die Möglichkeit zu erhalten zu differenzieren, ob die *in vivo* gefundenen biologischen Aktivitäten der eingesetzten Substanzen auf der Inhibition der PPIase-Aktivität von FKBP beruhen oder ihre Ursache in

der Inhibition von CaN besitzen. Zu diesem Zweck wurde zur Erzeugung von Verbindung **21** FK506 in der CaN-Bindestelle modifiziert, um die CaN-inhibitorischen Eigenschaften zu reduzieren wobei die Fähigkeit zur Inhibition von FKBP erhalten werden sollte. Die Modifikation der FKBP-Bindestelle von FK506 in Verbindung **22** sollte dem gegenüber einen vollständigen Verlust der FKBP-Bindung, und damit verbunden auch den Verlust der CaN-inhibitorischen Eigenschaften zur Folge haben.

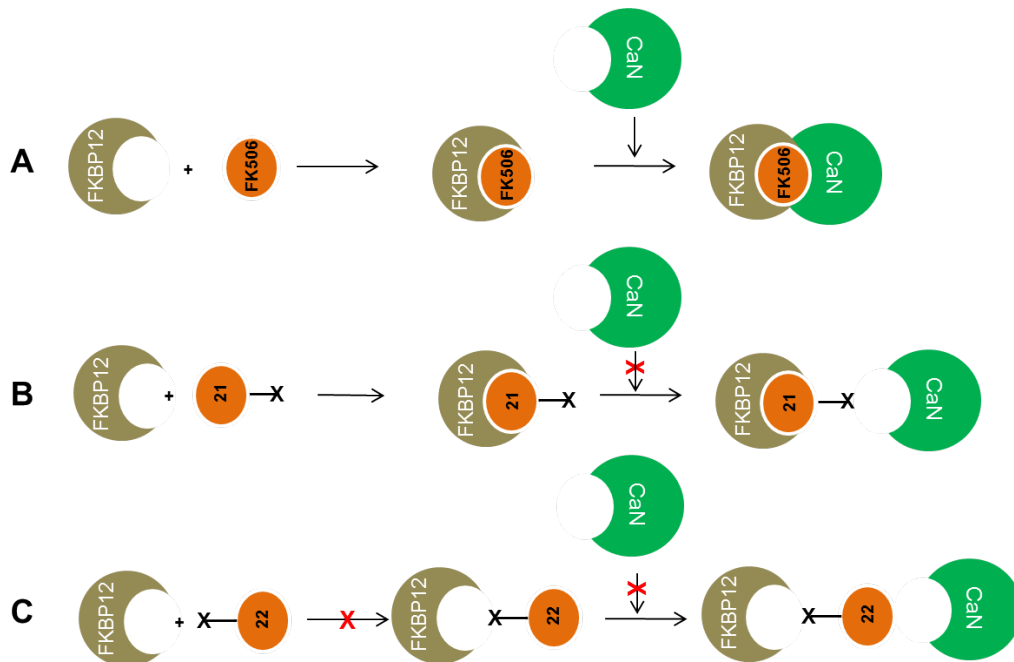
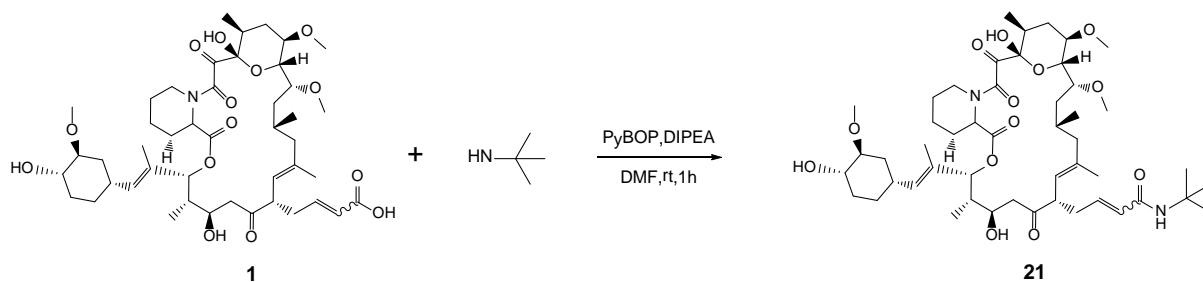


Abbildung 28: Schematische Darstellung des Verlustes der CaN-inhibitorischen Eigenschaften der Verbindungen **21** und **22**. A) FK506 bindet zunächst mit der PPIase-Bindestelle an das aktive Zentrum von FKBP12. Der FKBP12*FK506-Komplex bindet seinerseits an CaN und bewirkt die immunsuppressiven Eigenschaften von FK506. B) Verbindung **21** bindet analog FK506 mit der PPIase-Bindestelle an das aktive Zentrum von FKBP12. Aufgrund der Modifikation der CaN-Bindestelle ist es dem FKBP12*[**21**]-Komplex nicht möglich, CaN zu binden. Daraus resultieren die nicht-immunsuppressiven Eigenschaften von Verbindung **21**. C) Die Modifikation der PPIase-Bindestelle im FK506-Derivat **22** verhindert die Ausbildung des FKBP12*[**22**]-Komplexes. Ohne den FKBP12*[**22**]-Komplex ist Verbindung **22** nicht in der Lage, an CaN zu binden, woraus die nicht-immunsuppressiven Eigenschaften resultieren.

2.3.1 Synthese des FK506-C₄₀-CONHC(CH₃)₃-Derivates **21**

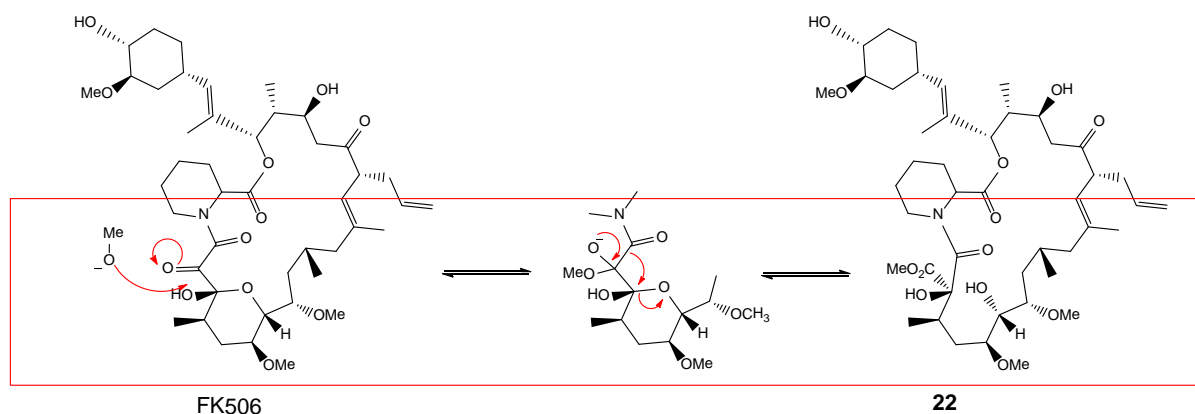
Die Synthese von **21** erfolgte unter den bisher verwendeten Kupplungsbedingungen. Zuerst wurde Verbindung **1** mit PyBOP und DIPEA voraktiviert und im Anschluss mit *tert*-Butylamin zu dem gewünschten Produkt **21** umgesetzt (Schema 8). Nach der erfolgten Reinigung wurde das Produkt als weißer Feststoff mit einer Ausbeute von 7,2 mg (67,9 %) erhalten.



Schema 8: Synthese der Verbindungen **21**. Sie wird erhalten durch Umsetzung der Verbindungen **1** mit *tert*-Butylamin.

2.3.2 Synthese des FK506-C₉-COOMe-Derivates **22**

Mit dem FK506-Analogon **22** wurde eine Verbindung synthetisiert, deren Grundgerüst sich von dem des FK506 nur in der modifizierten FKBP-Bindungstelle unterschied. Durch eine BENZILSÄURE-UMLAGERUNG wurde das 1,2-Diketon zu einem α -Hydroxycarbonsäureester umgelagert (Schema 9). Nach der erfolgten Reinigung wurde das Produkt als weiße Feststoffe mit einer Ausbeute von 24,0 mg (46,2 %) erhalten.



Schema 9: Mechanismus der BENZILSÄURE-UMLAGERUNG. Unter basischen Bedingungen lagert sich das 1,2-Diketon der PPIase-Bindestelle zu einem α -Hydroxycarbonsäureester um. Dies bedingt einen völligen Verlust der FKBP-bindenden Eigenschaften.

2.3.3 Bestimmung der Inhibition der *h*FKBP12-PPIase-Aktivität der Verbindungen **21** und **22**

In Anschluss an die Synthese wurde die Inhibition der *h*FKBP12-PPIase-Aktivität durch die Verbindungen untersucht. Abbildung 29A zeigt die konzentrationsabhängige Inhibition der *h*FKBP12-PPIase-Aktivität durch Verbindung **21**, **22** und FK506. Mit einem IC₅₀-Wert von 2,55 ± 0,17 nM inhibierte FK506 die *h*FKBP12-PPIase-Aktivität nur geringfügig besser als

Verbindung **21** ($IC_{50} = 2,75 \pm 0,13$ nM). Somit stellt Verbindung **21** einen äquipotenten Inhibitor zu FK506 dar. Im Vergleich dazu vermochte Verbindung **22** die *hFKBP12*-PPIase-Aktivität bis zu einer InhibitorKonzentration von 100 nM nicht zu inhibieren.

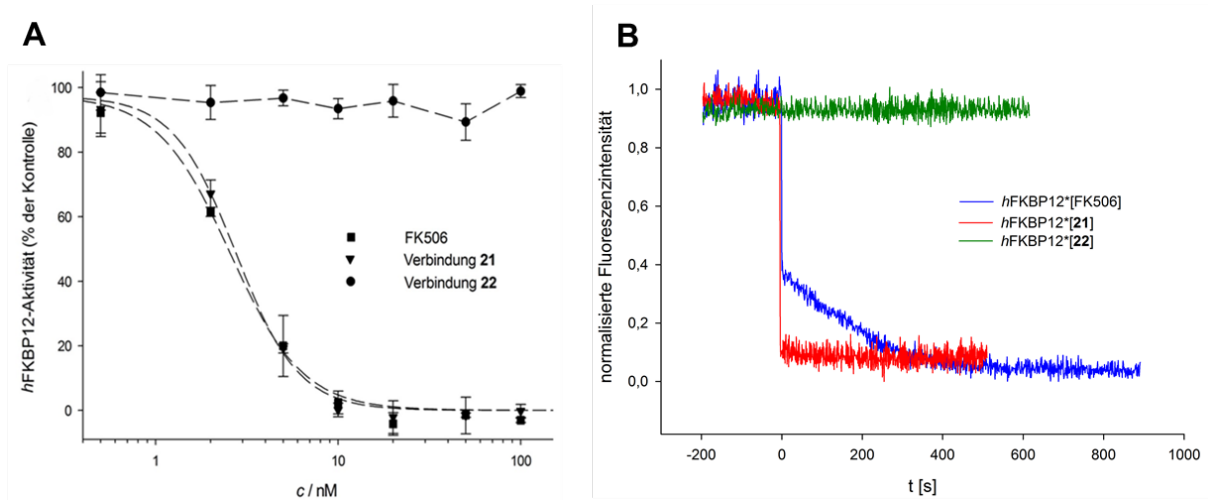


Abbildung 29: Inhibition von *hFKBP12* durch Verbindungen **21**, **22** und FK506. Die IC_{50} -Werte wurden in einem Proteasegekoppelten PPIase-Assay mit einer Konzentration von 15 nM *hFKBP12* gemessen. Als Substrat für *hFKBP12* wurde suc-Ala-Phe-Pro-Phe-pNA (45 μ M) verwendet. Die Verbindungen wurden in einem Konzentrationsbereich von 0,5-100 nM eingesetzt. B) Zeitverlauf der Fluoreszenz der Verbindungen **21**, **22** und FK506. Für Details siehe Abbildung 8.

Da die Modifikation nicht innerhalb der PPIase-Bindestelle des FK506 stattfand, hat sie keinen Einfluss auf die *hFKBP12*-inhibitorischen Eigenschaften der Verbindung **21**. Dies zeigte auch die fluoreszenzspektroskopische Untersuchung der intrinsischen Fluoreszenz des Trp⁵⁹ des *hFKBP12* (Abb.29B). Die Verbindung **21** zeigte wie FK506 eine Abnahme des Fluoreszenzsignals jedoch war keine langsame *cis/trans*-Isomerisierung zu beobachten. Demgegenüber steht Verbindung **22**. Durch ihre modifizierte FKBP-Bindestelle war sie nicht in der Lage, die intrinsische Fluoreszenz des *hFKBP12* zu senken.

2.3.4 Bestimmung der Inhibition der CaN-Aktivität der Verbindungen **21** und **22**

Zur Bestimmung der Immunsuppressivität wurde der Einfluß der Verbindungen auf die CaN-Phosphatase-Aktivität sowie auf die NFAT-Reporter-Expression untersucht. Die konzentrationsabhängige CaN-Inhibition zeigte, dass der Komplex *hFKBP12**[**21**], genau wie der *hFKBP12**[**1**]-Komplex die Aktivität des CaN bis zu einer InhibitorKonzentration von 10 μ M nicht zu hemmen vermochte. Als Kontrolle diente der *hFKBP12**[FK506]-Komplex der mit einem IC_{50} -Wert von $36,9 \pm 1,7$ nM einen ausgesprochen guten Inhibitor der CaN-Phosphatase-Aktivität darstellt (Abb.30A). Im Gegensatz zu Verbindung **1** zeigte Verbindung **21** auch im NFAT-Reporter-Gen-Assay bis zu einer InhibitorKonzentration von 10 μ M keine Inhibition (Abb.30B). Das heißt, für Verbindung **21**, in der die CaN-Bindestelle modifiziert vorliegt, ist unter den verwendeten Bedingungen keine Immunsuppression nachweisbar.

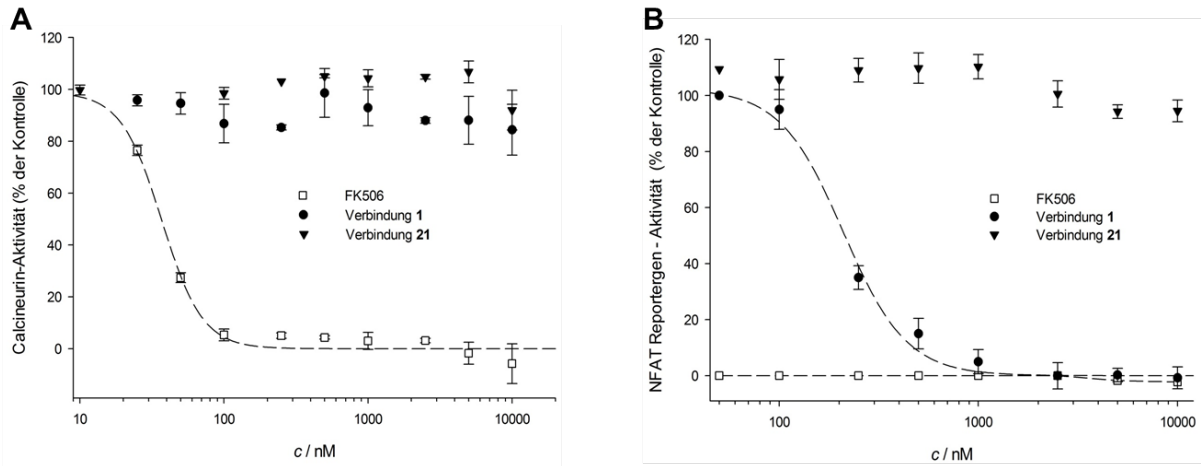


Abbildung 30: CaN-Inhibitorische Eigenschaften der Verbindungen **1**, **21** und FK506 im CaN- und NFAT-Assay. A) Bestimmung der CaN-inhibitorischen Aktivität. Die Verbindungen wurden in einem Konzentrationsbereich von 5 nM-10 μ M eingesetzt. B) Bestimmung der IC_{50} -Werte der Inhibition der NFAT-Reportergen-Aktivität durch die Verbindungen **1**, **21** und FK506. Die Verbindungen wurden in einem Konzentrationsbereich von 0,5 nM-25 μ M eingesetzt. Für experimentelle Details siehe Abbildung 9.

Die Abbildungen 31A und 31B zeigen, dass Verbindung **22** ebenfalls keine immunsuppressive Aktivität mehr besitzt.

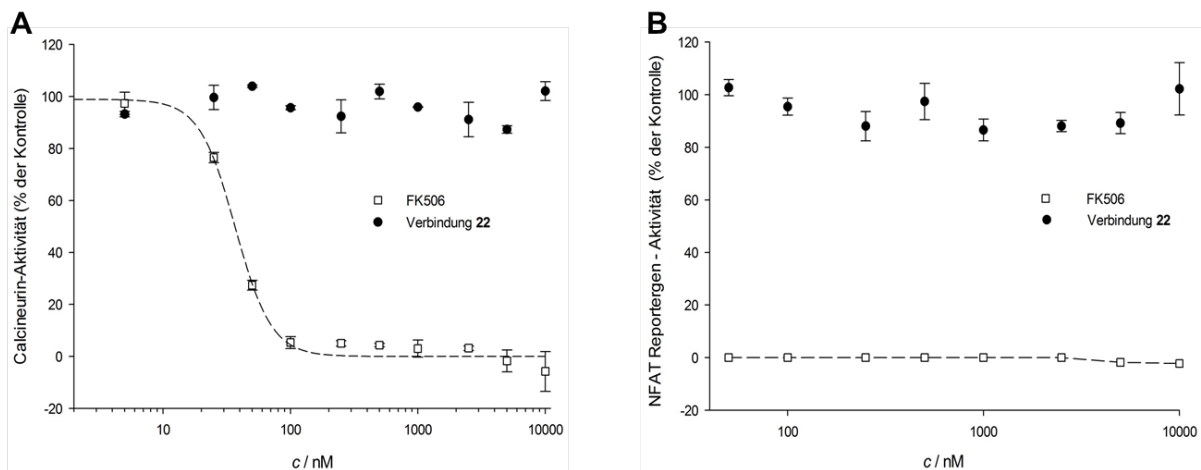


Abbildung 31: CaN-Inhibitorische Eigenschaften der Verbindung **22** und FK506 im CaN- und NFAT-Assay. A) Bestimmung der CaN-inhibitorischen Aktivität. Die Verbindungen wurden in einem Konzentrationsbereich von 5 nM-10 μ M eingesetzt. B) Bestimmung der IC_{50} -Werte der Inhibition der NFAT-Reportergen-Aktivität durch die Verbindungen **22** und FK506. Die Verbindungen wurden in einem Konzentrationsbereich von 0,5 nM-25 μ M eingesetzt. Für experimentelle Details siehe Abbildung 9.

2.4 Synthese und biochemische Eigenschaften neuartiger Cycloheximid-Derivate

Wie bereits im vorangegangenen Kapitel erläutert wurde, ist Cycloheximid ein Inhibitor der PPlase-Aktivität der FKBP und besitzt eine Spezifität gegenüber humanen FKBP38, einer FKBP-Isoform, die an der Apoptose beteiligt ist. Aus diesem Grund wurden von CHRISTNER *et al.* eine Vielzahl von Derivaten synthetisiert, um weitere Spezifitäten innerhalb der FKBP-Familie durch gezielte Modifikationen herauszuarbeiten^[60] (Abb.32).

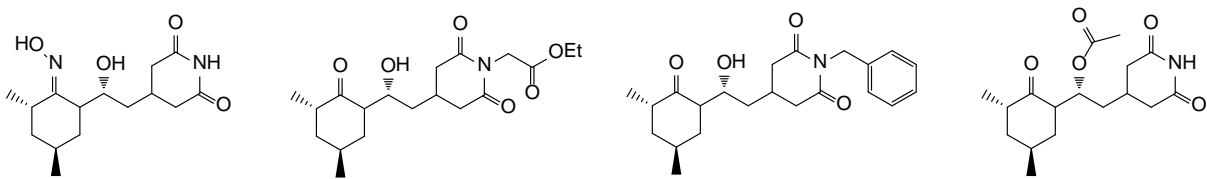


Abbildung 32: Ausgewählte Beispiele der von CHRISTNER *et al.* synthetisierten Derivate Cycloheximid-1-oxim, Cycloheximid-*N*-ethanoat, *N*-Benzylcycloheximid, und das 7-Acetylcycloheximid (v.l.n.r.).

Dabei zeigte sich, dass die *h*FKBP12-inhibierenden, wie auch die antibiotischen Eigenschaften des Moleküls durch die Modifikation der Carbonylgruppe des Cyclohexanons, sowie der Hydroxylgruppe der verbrückenden Ethyleneinheit, vermindert wurden. Dahingegen erbrachten die Substitutionen am Glutarimidylstickstoff sowohl eine Verbesserung der

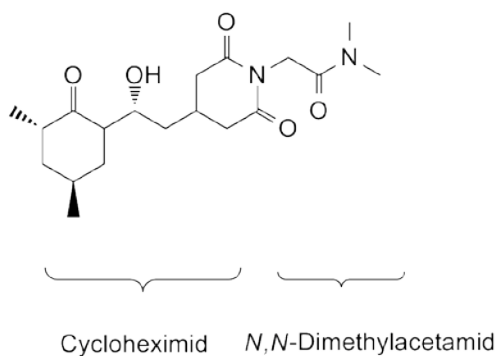


Abbildung 33: Darstellung des DM-CHX bestehend aus der Grundstruktur und dem *N,N*-Dimethylacetamid-Substituenten am Glutarimid-Stickstoff

FKBP12-Bindung als auch eine Senkung der Zytotoxizität^[60]. Allerdings gelang es bisher nicht, Inhibitionskonstanten von unter 1,0 μ M zu erhalten. Deshalb sollte in der vorliegenden Arbeit versucht werden, eine Verbesserung der Effektivität der FKBP-Inhibition der CHX-Derivate durch Substitution am Glutarimidylrest zu erreichen. Bisher wurde nur eine sehr begrenzte Anzahl von Carbamidomethyl-Derivaten untersucht. DM-CHX (Abb.33) besitzt mit 29,3 μ M einen weitaus höheren IC_{50} -Wert der *h*FKBP12-Inhibition als CHX, allerdings ist seine Zytotoxizität 1000-fach geringer^[65].

2.4.1 Synthese und biochemische Eigenschaften von *N*-(*N*'-Alkylcarboxamidomethyl)-cycloheximid-Derivaten

Um den Einfluss der beiden Methylgruppen am Stickstoffatom des DM-CHX auf die Inhibitionswirkung der CHX-Derivate zu untersuchen, wurden die Anzahl, die Länge und die Verzweigung der Alkylgruppen variiert. Es wurden Verbindungen mit einer Methyl-(**24**), einer *tert*-Butyl-(**25**), einer Diethyl-(**26**), einer Piperidyl-(**27**), einer Diisopropyl-(**28**) und einer *tert*-Butylmethylacetamidgruppe (**29**) synthetisiert (Abb.34).

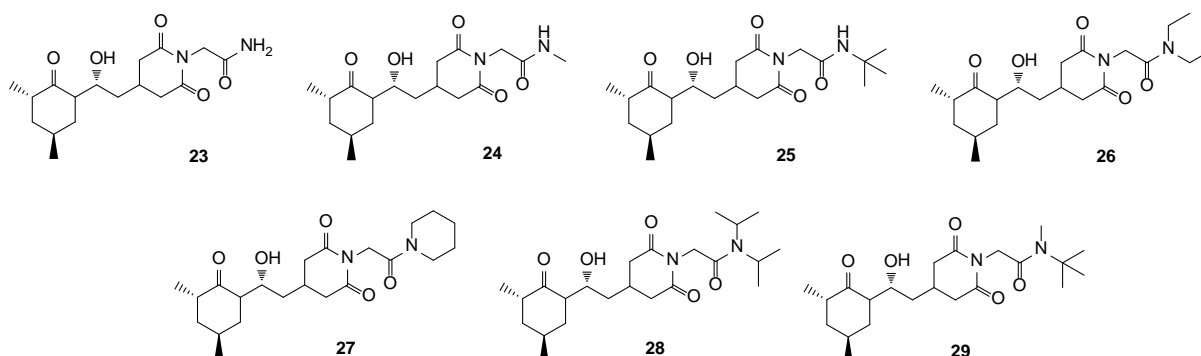
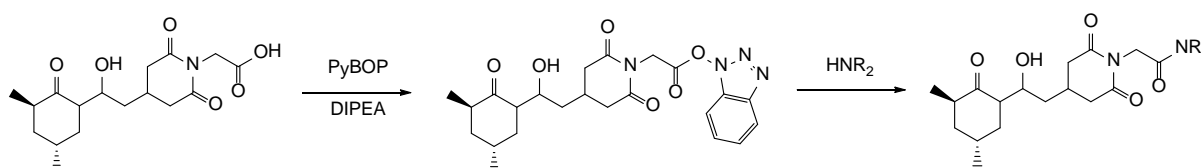


Abbildung 34: Darstellung der *N*-alkylsubstituierten Cycloheximid-Derivate **23-29**

Die Synthese der Verbindungen **23-29** erfolgte durch Umsetzung der Verbindung **11** mit den entsprechenden substituierten Aminen, PyBOP und DIPEA (Schema 10). Bei der Synthese und bei der anschließenden Reinigung musste darauf geachtet werden, dass neutrale oder basische pH-Bedingungen eingehalten wurden, da es ansonsten zu einer Eliminierung der Hydroxylgruppe kommt.



Schema 10: Allgemeine Synthese der Cycloheximid-Derivate. Verbindung **11** wird mittels PyBOP/DIPEA und den entsprechenden Aminen zu den CHX-Derivaten umgesetzt.

Tabelle 7: Chemische Daten der Cycloheximid-Derivate **23-29**

| Verbindung | Ausbeute (%) | Molmasse (g mol ⁻¹) | | Retentionszeit R _t (min) |
|------------|--------------|------------------------------------|------------------------------------|-------------------------------------|
| | | [M+H] ⁺ _{ber.} | [M+H] ⁺ _{gef.} | |
| 23 | 62,5 | 339,4 | 339,8 | 5,5 |
| 24 | 52,4 | 353,2 | 353,4 | 5,6 |
| 25 | 45,7 | 395,2 | 395,3 | 7,5 |
| 26 | 63,8 | 395,3 | 395,5 | 7,1 |
| 27 | 53,8 | 407,2 | 407,1 | 7,3 |
| 28 | 63,8 | 423,5 | 423,8 | 8,3 |
| 29 | 46,7 | 409,3 | 409,3 | 7,8 |

Im Anschluss an die Synthese wurden die Verbindungen hinsichtlich ihrer inhibitorischen Eigenschaften gegenüber verschiedenen FKBP-Isoformen untersucht. Dabei wurden die humanen Isoformen *hFKBP12*, *hFKBP12.6*, *hFKBP13*, *hFKBP25*, *hFKBP51* und *hFKBP52* untersucht. Außerdem wurde das *Legionella pneumophila* Mip-Protein *lpFKBP25* und das *Plasmodium falciparum* *pfFKBP35* in die Untersuchung einbezogen.

Tabelle 8: IC₅₀-Werte der Inhibition verschiedener FKBP durch die Cycloheximid-Derivate **23-29**

| | IC ₅₀ / μM | | | | | | | |
|------------------|-----------------------|-------------|---------------|------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| | 23 | 24 | DM-CHX | 25 | 26 | 27 | 28 | 29 |
| <i>hFKBP12</i> | 10,7 ± 0,6 | 14,3 ± 1,1 | 29,3 ± 6,3 | 2,0 ± 0,1 | 13,8 ± 2,0 | 3,4 ± 0,4 | 4,3 ± 0,8 | 36,1 ± 4,1 |
| <i>hFKBP12.6</i> | 28,1 ± 2,1 | 31,2 ± 2,6 | 37,9 ± 2,6 | 20,1 ± 1,1 | 25,2 ± 2,7 | 25,9 ± 4,5 | 23,3 ± 3,2 | 20,1 ± 3,2 |
| <i>hFKBP13</i> | 37,8 ± 6,6 | 46,8 ± 5,5 | 54,4 ± 6,1 | 15,8 ± 1,6 | 45,4 ± 14,7 | 26,8 ± 13,7 | 28,1 ± 7,4 | 66,9 ± 17,1 |
| <i>hFKBP25</i> | >100 | >100 | >100 | >100 | >100 | >100 | >100 | >100 |
| <i>hFKBP51</i> | 73,3 ± 8,1 | >100 | 58,0 ± 13,3 | 35,6 ± 6,8 | 100,0 ± 0,0 | 49,1 ± 6,9 | 65,5 ± 17,1 | >100 |
| <i>hFKBP52</i> | 61,4 ± 4,8 | >100 | >100 | 22,3 ± 1,7 | 81,4 ± 11,6 | 28,6 ± 4,0 | 56,3 ± 5,3 | >100 |
| <i>pfFKBP35</i> | 21,9 ± 4,3 | 76,5 ± 15,4 | 64,9 ± 5,2 | 19,1 ± 2,7 | 71,4 ± 10,9 | 32,6 ± 5,0 | 34,2 ± 4,5 | 57,0 ± 11,7 |
| <i>lpFKBP25</i> | 44,6 ± 7,1 | 26,3 ± 13,8 | 45,2 ± 4,1 | 33,8 ± 8,6 | 27,7 ± 7,0 | 48,6 ± 6,7 | 25,7 ± 6,1 | 31,7 ± 7,4 |

Beim Vergleich der Inhibitionskonstanten der Derivate ist auffällig, dass bis auf wenige Ausnahmen die FKBP von den neuen Verbindungen **23-29** effektiver gehemmt wurden, als von DM-CHX (Tab.8). Das *N-tert*-butylacetamid-Derivat **25** war in dieser Reihe die

effizienteste Verbindung gegenüber allen humanen Isoformen. Verbindung **29** inhibiert dagegen die Mehrzahl der humanen FKBP deutlich schlechter. Weiterhin ist zu erkennen, dass alle Verbindungen das *hFKBP25* bis zu einer Inhibitorkonzentration von 100 μM nicht zu inhibieren vermochten. Die PPIase-Aktivität des *pFKBP35* wird durch Verbindung **25** mit einem IC_{50} -Wert von $19,1 \pm 2,7 \mu\text{M}$ am effektivsten gehemmt, wohingegen die PPIase-Aktivität des *lpFKBP25* durch Verbindung **28** mit einem IC_{50} -Wert von $25,7 \pm 6,1 \mu\text{M}$ am besten inhibiert wird. Die synthetisierten Verbindungen **23-29** zeigten, dass sterisch anspruchsvolle Gruppierungen in α -Position zum Acetamid-Stickstoff eine signifikante Senkung des IC_{50} -Wertes herbeiführen können.

2.4.2 Synthese und biochemischer Eigenschaften von *N*-(*N'*-Adamantylcarboxamidomethyl)-cycloheximid-Derivaten

Aufbauend auf den vorhergehenden Ergebnissen wurden im Folgenden Verbindungen mit einem größeren sterischen Anspruch dargestellt. Die Wahl fiel unter anderem auf das 1-Aminoadamantan, da es große Ähnlichkeit mit Verbindung **25** aufweist, aber zusätzliche mögliche Interaktionsstellen mit dem Protein besitzt (Abb.35). Die Synthese der Verbindungen **30-35** erfolgte durch Umsetzung der Verbindung **11** mit den entsprechenden substituierten Aminen, PyBOP und DIPEA.

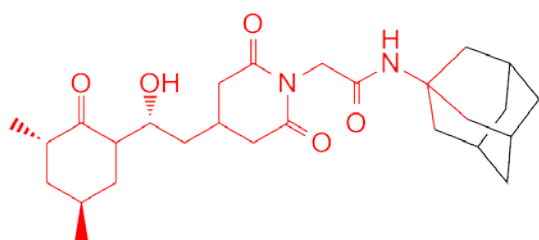


Abbildung 35: Vergleich der Strukturen des *N*-*tert*-butyl-Derivates **25** (rot) und des *N*-Adamantyl-Derivates **30** (rot/schwarz).

Der Adamantylrest in Verbindung **30** führte zu einer Effektivitätssteigerung der *hFKBP12*-Inhibition um das 40-fache im Vergleich zu DM-CHX und um das 5-fache im Vergleich zu Verbindung **25**. Der IC_{50} -Wert der Verbindung **30** lag mit $400 \pm 40 \text{ nM}$ für ein Cycloheximid-Derivat erstmals im nanomolaren Bereich (Tabelle 9). Jedoch wurde nicht nur die

hFKBP12-Inhibition verbessert, auch alle anderen FKBP, ausgenommen *hFKBP25*, wurden besser inhibiert. Im Gegensatz zu allen bisher synthetisierten Verbindungen vermochte Verbindung **30** *hFKBP52* mit einem IC_{50} -Wert im unteren mikromolaren Bereich zu hemmen. Außerdem besitzt die Verbindung noch eine weitere interessante Eigenschaft. Zur weiteren Charakterisierung der Bindung von Verbindung **30** an *hFKBP12* wurde untersucht, ob die Bindung von Verbindung **30** am *hFKBP12* die intrinsische Fluoreszenz des Trp⁵⁹ des *hFKBP12* beeinflussen kann und ob man ähnlich wie für FK506 einen zeitlichen Verlauf der Bindung messen kann.

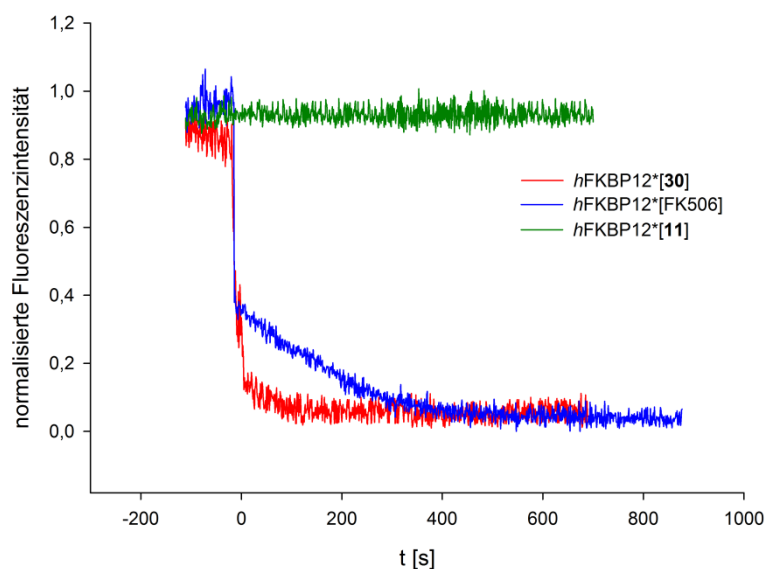


Abbildung 36: Zeitverlauf der Fluoreszenz der Verbindungen **11**, **30** und FK506 im Komplex mit *hFKBP12*. Für Details siehe Abbildung 8.

Wie in Abbildung 36 zu sehen ist, nahm die Fluoreszenzemission des Trp⁵⁹ nach Zugabe von FK506 und Verbindung **30** ab, während das *N*-(Carboxymethyl)-Cycloheximid **11** dagegen keine Abnahme verursachte. Wahrscheinlich bewirkt also die Modifikation des CHX die Beeinflussung der Fluoreszenzeigenschaften des Trp⁵⁹ von *hFKBP12*. Im Gegensatz zu FK506 erfolgt jedoch die Fluoreszenzverringerng schnell, sodass nach der Mischzeit keine Veränderung des Fluoreszenzsignals mehr zu beobachten war.

Um die Effektivität des unsubstituierten Adamantylrestes zu steigern, wurden substituierte Adamantan-Derivate synthetisiert. So entstanden Substanzen mit einem 3,5-Dimethyl-(**31**), einem 3-Hydroxy-(**32**), einem 3-Ethyl-(**33**), einem 3,7-Dimethyl-(**34**) und einem 3,7-Dimethyl-5-Hydroxy-1-Aminoadamantyl-(**35**) Rest (Abb.37).

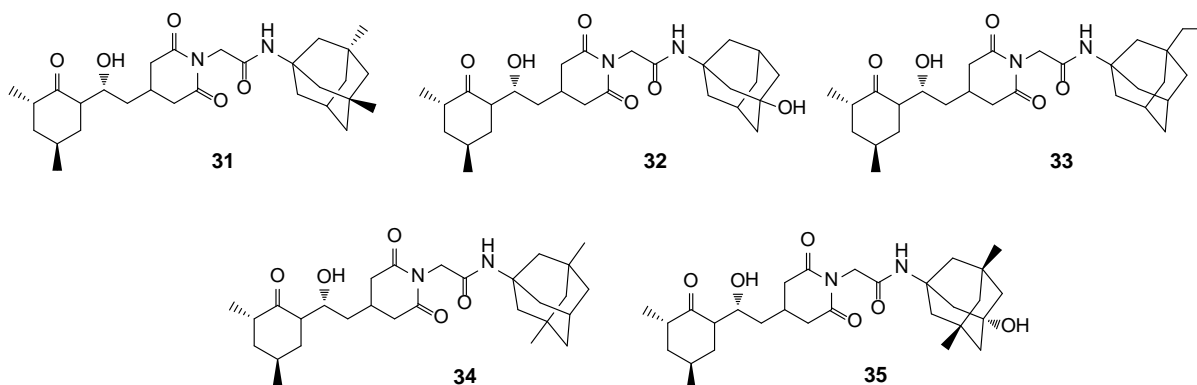


Abbildung 37: Darstellung der *N*-alkylsubstituierten Cycloheximid-Derivate **31-35**

Die Synthese der Derivate **30-35** erfolgte analog zu den Verbindungen **23-29**

Tabelle 9: Chemische Daten der Cycloheximid-Derivate **30-35**

| Verbindung | Ausbeute (%) | Molmassen (g mol ⁻¹) | | Retentionszeit R _t (min) |
|------------|--------------|------------------------------------|------------------------------------|-------------------------------------|
| | | [M+H] ⁺ _{ber.} | [M+H] ⁺ _{gef.} | |
| 30 | 53,9 | 473,3 | 473,3 | 9,4 |
| 31 | 55,8 | 501,3 | 501,1 | 10,8 |
| 32 | 62,9 | 489,3 | 489,5 | 6,8 |
| 33 | 62,6 | 501,4 | 501,3 | 10,7 |
| 34 | 58,5 | 501,7 | 501,9 | 10,8 |
| 35 | 61,8 | 517,7 | 517,6 | 8,0 |

Die Verbindungen wurden im Anschluss an die Synthese auf ihre inhibitorischen Eigenschaften gegenüber verschiedenen Isoformen von FKBP untersucht.

Tabelle 10: IC₅₀-Werte der Inhibition verschiedener FKBP durch die Cycloheximid-Derivate **30-35**

| | IC ₅₀ / μM | | | | | | |
|-------------------|-----------------------|-------------|------------|-------------|-------------|-------------|---------------|
| | 30 | 31 | 32 | 33 | 34 | 35 | DM-CHX |
| <i>h</i> FKBP12 | 0,4 ± 0,04 | 0,17 ± 0,04 | 1,2 ± 0,1 | 0,19 ± 0,06 | 0,17 ± 0,01 | 0,23 ± 0,01 | 29,3 ± 6,3 |
| <i>h</i> FKBP12.6 | 12,7 ± 3,3 | 6,8 ± 2,1 | 18,8 ± 1,4 | 10,0 ± 0,2 | 5,1 ± 1,5 | 13,9 ± 2,1 | 37,9 ± 2,6 |
| <i>h</i> FKBP13 | 3,0 ± 0,9 | 0,6 ± 0,05 | 7,9 ± 0,7 | 1,7 ± 0,3 | 0,19 ± 0,06 | 1,4 ± 0,2 | 54,4 ± 6,1 |
| <i>h</i> FKBP25 | >100 | >100 | >100 | >100 | >100 | >100 | >100 |
| <i>h</i> FKBP51 | 6,6 ± 3,5 | 0,43 ± 0,12 | 8,5 ± 1,4 | 1,1 ± 0,48 | 0,9 ± 0,08 | 1,3 ± 0,1 | 58,0 ± 13,3 |
| <i>h</i> FKBP52 | 1,6 ± 0,12 | 0,45 ± 0,04 | 4,5 ± 0,6 | 1,3 ± 0,1 | 0,7 ± 0,05 | 0,6 ± 0,04 | >100 |
| <i>p</i> FKBP35 | 3,3 ± 1,6 | 0,5 ± 0,17 | 5,9 ± 1,1 | 1,4 ± 0,17 | 0,8 ± 0,09 | 0,7 ± 0,1 | 64,9 ± 5,2 |
| <i>l</i> pFKBP25 | 8,5 ± 2,1 | 1,7 ± 0,7 | 21,8 ± 3,3 | 5,6 ± 1,1 | 2,2 ± 0,5 | 4,9 ± 0,9 | 45,2 ± 4,1 |

Durch Substitution der Wasserstoff-Atome an Position 3 und 5 (**31**) bzw. 3 und 7 (**34**) durch Methylgruppen am Adamantylring konnte der IC₅₀-Wert der *h*FKBP12-Inhibition auf 170 nM gesenkt werden. Verglichen mit DM-CHX sind sie um das zirka 160-fache effektivere *h*FKBP12-Inhibitoren. Der Ersatz des H-Atoms an Position 3 am Adamantylrest durch eine Ethylgruppe (**33**) beeinflusst die Inhibition der *h*FKBP12-PP1ase-Aktivität nur sehr gering. Die

anderen untersuchten FKBP-Isoformen wurden von den Verbindungen in ihrer Aktivität deutlich schlechter gehemmt. Im Allgemeinen schien das *h*FKBP12 eine Verlängerung oder eine Verlagerung der Methylgruppen besser zu tolerieren als die anderen FKBP. Im Fazit sind Alkylgruppen besonders geeignete Substituenten am Adamantangerüst, wobei sich die Lage am Ring als unerheblich erwies.

Als nächstes sollte untersucht werden, wie sich eine Vergrößerung des Abstandes durch Einführung einer Methylengruppe zwischen dem Acetamid-Stickstoff und dem Adamantanring auf die Inhibitionskonstanten auswirkte (Abb.38). Insbesondere interessierte, inwieweit die Selektivität der Inhibition unter den FKBP-Isoformen beeinflusst wird.

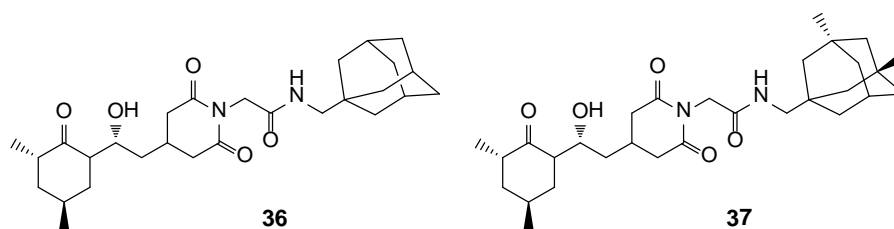


Abbildung 38: Die Substanzen **36** und **37** sind analoge Verbindungen zu **30** und **31** und unterscheiden sich nur durch eine zusätzliche eingeführte Methylengruppe zwischen dem Acetamid-Stickstoff und dem Adamantan- bzw. dem 3,5-Dimethyladamantanring.

Auch hier wurde Verbindung **11** mit PyBOP und DIPEA vorinkubiert und mit den entsprechenden Aminen umgesetzt, um die Verbindungen **36** und **37** zu erhalten.

Tabelle 11: Chemische Daten der Cycloheximid-Derivate **36** und **37**

| Verbindung | Ausbeute (%) | Molmassen (g mol ⁻¹) | | Retentionszeit R _t (min) |
|------------|--------------|------------------------------------|------------------------------------|-------------------------------------|
| | | [M+H] ⁺ _{ber.} | [M+H] ⁺ _{gef.} | |
| 36 | 56,6 | 487,3 | 487,1 | 9,9 |
| 37 | 54,3 | 515,4 | 515,7 | 11,1 |

Im Anschluss erfolgte die Untersuchung der Inhibition der PPIase-Aktivität der FKBP-Isoformen.

Tabelle 12: IC₅₀-Werte der Inhibition verschiedener FKBP durch die Cycloheximid-Derivate **36** und **37** im Vergleich zu **30** und **31**

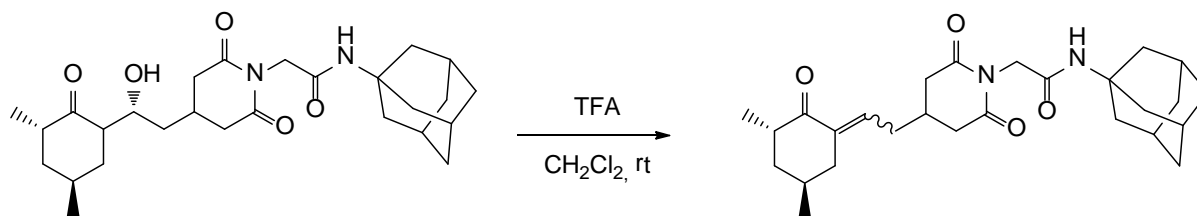
| | IC ₅₀ / μM | | | |
|-------------------|-----------------------|------------|------------|-------------|
| | 36 | 30 | 37 | 31 |
| <i>h</i> FKBP12 | 0,9 ± 0,09 | 0,4 ± 0,04 | 6,1 ± 0,8 | 0,17 ± 0,04 |
| <i>h</i> FKBP12.6 | 14,4 ± 1,2 | 12,7 ± 3,3 | 2,1 ± 1,2 | 6,8 ± 2,1 |
| <i>h</i> FKBP13 | 7,5 ± 0,7 | 3,0 ± 0,9 | 31,1 ± 6,8 | 0,6 ± 0,05 |
| <i>h</i> FKBP25 | n.d | n.d | n.d | n.d |
| <i>h</i> FKBP51 | 12,6 ± 1,5 | 6,6 ± 3,5 | 21,5 ± 6,0 | 0,43 ± 0,12 |
| <i>h</i> FKBP52 | 11,1 ± 1,5 | 1,6 ± 0,12 | 39,5 ± 5,9 | 0,45 ± 0,04 |
| <i>pf</i> FKBP35 | 4,6 ± 0,6 | 3,3 ± 1,6 | 22,9 ± 4,8 | 0,5 ± 0,17 |
| <i>lp</i> FKBP25 | 20,7 ± 3,1 | 8,5 ± 2,1 | 30,7 ± 4,3 | 1,7 ± 0,7 |

Es zeigte sich, dass die Einführung einer Methylengruppe zwischen dem Acetamid-Stickstoff und dem Adamantylring eine Verschlechterung nicht nur der *h*FKBP12-Inhibition erbrachte, sondern auch bei den anderen untersuchten FKBP-Isoformen auftrat.

2.4.3 FKBP-Bindestellen-modifizierte Derivate der Verbindung **30**

Es wurde bereits beschrieben, dass Variationen der Carbonylgruppe am C₁ und der Hydroxylgruppe am C₇ des CHX zu einem veränderten Bindevverhalten gegenüber den FKBP^[60] führten. Mit diesen Modifikationen sollte versucht werden, die Selektivität der Verbindung **30** gegenüber den FKBP-Isoformen zu erhöhen.

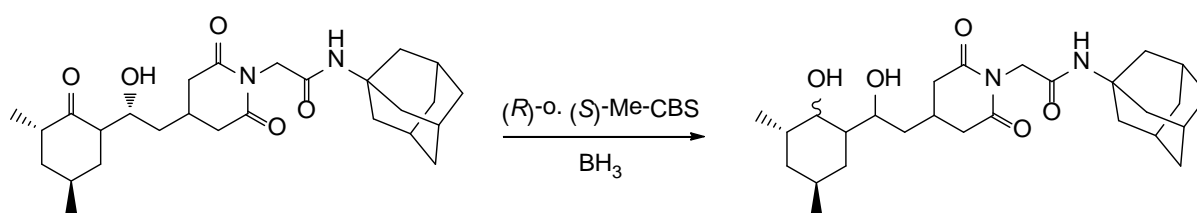
Synthese der *N*-(*N'*-Adamantylcarboxamidomethyl)-Anhydrocycloheximid-Derivate **38** (*E*) und **39** (*Z*)



Schema 11: Synthese der Anhydrocycloheximid-Derivate durch Behandlung von **30** mit TFA in Dichlormethan bei Raumtemperatur. Das Produkt entsteht als *E/Z*-Diastereomengemisch.

Für die Synthese der Verbindungen **38(E)** und **39(Z)** wurde Verbindung **30** mit Trifluoressigsäure in Methylenchlorid bei Raumtemperatur gerührt (Schema 11). Das Rohprodukt wurde als Isomerengemisch aus *E*- und *Z*-*N*-(Adamant-1-yl)-2-(Anhydrocycloheximid-14-yl)-acetamid erhalten. Durch säulenchromatographische Reinigung mittels einer präparativen HPLC konnten die Isomere getrennt werden. Nach der erfolgten Reinigung werden die Produkte als weiße Feststoffe mit einer Ausbeute von 28,4 % (*E*-Isomer) und von 49,6 % (*Z*-Isomer) erhalten.

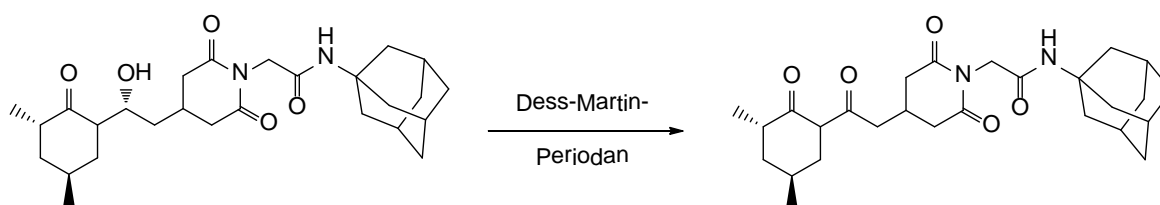
Synthese der *N*-(*N*'-Adamantylcarboxamidomethyl)-Dihydrocycloheximid-Derivate **40(R)** und **41(S)**



Schema 12: Synthese der Dihydrocycloheximid-Derivate **40** und **41** durch Reduktion von **30** mittels Borhydrid und den chiralen Auxilliaren (*R*)- bzw. (*S*)-2-Methyl-CBS-oxazaborolidin zu den enantiomerenreinen Verbindungen.

Für die enantioselective Hydrierung der Verbindung **30** wurde sie mit Borhydrid und dem chiralen Auxilliar (*R*)-2-Methyl-CBS-oxazaborolidin in THF zum (*R*)-*N*-(Adamant-1-yl)-2-(Dihydrocycloheximid-14-yl)-acetamid umgesetzt (Schema 12). Für die Synthese des (*S*)-*N*-(Adamant-1-yl)-2-(Dihydrocycloheximid-14-yl)-acetamid wurde das (*S*)-2-Methyl-CBS-oxazaborolidin verwendet. Nach der erfolgten Reinigung wurden die Verbindung **40(R)** und **41(S)** als weiße Feststoffe mit einer Ausbeute von 58,3 % bzw. 69,1 % erhalten.

Synthese des *N*-(*N*'-Adamantylcarboxamidomethyl)-Dehydrocycloheximid-Derivates **42**



Schema 13: Synthese des Dehydrocycloheximid-Derivates **42** ausgehend von Verbindung **30** mittels des DESS-MARTIN-Periodans.

Die Oxidation der Hydroxylgruppe der Verbindung **30** erfolgte mittels des DESS-MARTIN-Periodinan in Methylenchlorid bei Raumtemperatur in (Schema13). Nach der erfolgten Reinigung wird das Produkt als weißer Feststoff mit einer Ausbeute von 89.9 % erhalten.

2.4.4 Biochemische Eigenschaften der modifizierten Verbindungen 38-42

Die auf diesen unterschiedlichen Wegen erhaltenen Verbindungen **38(E)**, **39(Z)**, **40(R)**, **41(S)** und **42** wurden im Folgenden hinsichtlich ihrer FKBP-inhibitorischen Eigenschaften untersucht (Tab.4). Vergleicht man die Effizienz der Inhibition der modifizierten Derivate mit ihrer Ursprungsverbindung **30**, so führten die Modifikationen generell zu einer Erhöhung der IC_{50} -Werte gegenüber den FKBP-Isoformen. Die durch das Entfernen der Hydroxylgruppe entstandenen Stereoisomere **38(E)** und **39(Z)** unterscheiden sich nur gering in ihrer inhibitorischen Effizienz gegenüber den verschiedenen FKBP-Isoformen. Nur das *h*FKBP13 wurde durch das *Z*-Isomere etwas besser als durch das *E*-Isomer gehemmt. Die Oxidation der Hydroxylgruppe am C₇ in Verbindung **42** erwiesen ein Ausbleiben der Inhibition der *h*FKBP13, *h*FKBP 51 und *h*FKBP 52 bis zu einer Inhibitorkonzentration von 100 μ M. Einzig die Verbindungen **40(R)** und **41(S)** erbrachten ähnlich gute IC_{50} -Werte auf wie die Ausgangsverbindung **30**. So zeigte sowohl das (1*R*)-als auch das (1*S*)-Dihydrocycloheximid-Derivat eine nur um den Faktor zwei bis drei schlechtere Inhibition als die Ausgangsverbindung **30**.

Tabelle 13: IC_{50} -Werte der Inhibition verschiedener FKBP durch die Cycloheximid-Derivate **38-42**

| | IC_{50} / μ M | | | | | |
|-------------------|-------------------|--------------|--------------|--------------|-------------|------------|
| | 38(E) | 39(Z) | 40(R) | 41(S) | 42 | 30 |
| <i>h</i> FKBP12 | 19,2 ± 2,4 | 16,9 ± 3,4 | 1,0 ± 0,1 | 0,9 ± 0,05 | 7,3 ± 1,0 | 0,4 ± 0,04 |
| <i>h</i> FKBP12.6 | 19,8 ± 2,0 | 12,2 ± 1,9 | 21,7 ± 4,6 | 16,6 ± 4,2 | 21,3 ± 2,8 | 12,7 ± 3,3 |
| <i>h</i> FKBP13 | 71,6 ± 10,5 | 35,7 ± 7,2 | 5,0 ± 0,5 | 6,9 ± 1,0 | 100,0 ± 0,0 | 3,0 ± 0,9 |
| <i>h</i> FKBP25 | >100 | >100 | >100 | >100 | >100 | >100 |
| <i>h</i> FKBP51 | 34,8 ± 5,6 | 29,3 ± 2,8 | 10,6 ± 1,5 | 8,8 ± 1,5 | >100 | 6,6 ± 3,5 |
| <i>h</i> FKBP52 | 57,3 ± 22,3 | 41,1 ± 8,0 | 6,9 ± 0,5 | 8,2 ± 1,6 | >100 | 1,6 ± 0,12 |
| <i>pf</i> FKBP35 | 10,1 ± 4,3 | 15,1 ± 2,3 | 8,8 ± 1,4 | 3,3 ± 0,7 | 24,3 ± 3,8 | 3,3 ± 1,6 |
| <i>lp</i> FKBP25 | 10,4 ± 1,9 | 13,4 ± 1,6 | 12,6 ± 1,4 | 16,3 ± 2,6 | 37,5 ± 4,6 | 8,5 ± 2,1 |

Somit waren die vorgenommenen Modifikationen der FKBP-Bindestelle der Substanz **30** nicht dafür geeignet, eine verbesserte oder spezifischere Inhibition zu erzielen. Die Modifikationen führten zu einer deutlichen Verschlechterung der FKBP-bindenden Eigenschaften der untersuchten Verbindungen.

2.4.5 Synthese und biochemische Eigenschaften zyklischer *N*-(*N'*-Alkylcarboxamidomethyl)-cycloheximid-Derivate verschieden zu Adamantan

Als Folge der guten inhibitorischen Eigenschaften der Verbindungen **30-35** gegenüber FKBP wurden weitere, von Adamantan verschiedene, zyklische Reste mit Verbindung **11** verknüpft. Dadurch sollte überprüft werden, ob die Verbesserung der FKBP-Inhibition nur auf das Adamantangerüst beschränkt ist. Die neuen Substituenten unterschieden sich hinsichtlich ihrer Verzweigungen, Art und Anzahl der funktionellen Gruppen sowie in ihrer Größe. In den ersten vier vorliegenden Verbindungen wurden als zyklische Komponenten das (-)-*cis*-Myrtanylamin (**43**), das (+)-(*R*)-Bornylamin (**44**), (+)-(*R*)-3-Aminoquinucleidin (**45**), sowie das (-)-(*S*)-3-Aminoquinucleidin (**46**) eingesetzt (Abb.39).

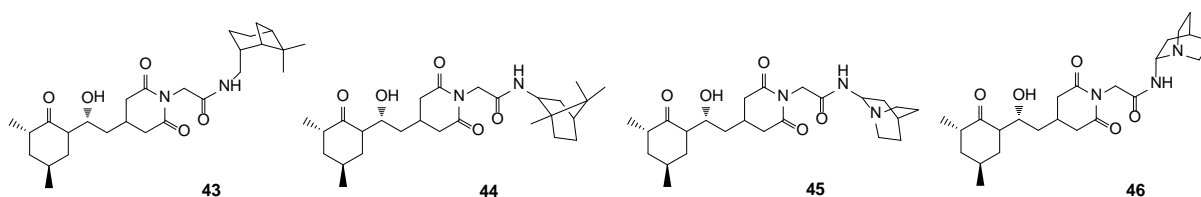


Abbildung 39: Darstellung der *N*-alkylsubstituierten Cycloheximid-Derivate **43-46**

Die Kupplung der Amine und Verbindung **11** erfolgte ebenfalls mit PyBOP und DIPEA. Die chemischen Daten sind in Tabelle 13 zusammengefasst.

Tabelle 14: Chemische Daten der Cycloheximid-Derivate **43-46**

| Verbindung | Ausbeute (%) | Molmassen (g mol ⁻¹) | | Retentionszeit R _t (min) |
|------------|--------------|------------------------------------|------------------------------------|-------------------------------------|
| | | [M+H] ⁺ _{ber.} | [M+H] ⁺ _{gef.} | |
| 43 | 56,1 | 475,3 | 475,2 | 9,9 |
| 44 | 67,9 | 475,3 | 475,5 | 9,6 |
| 45 | 67,9 | 448,3 | 448,4 | 5,3 |
| 46 | 58,0 | 448,3 | 448,4 | 4,2 |

Anschließend wurde die Fähigkeit der Substanzen **43-46** untersucht, die PPlase-Aktivität verschiedener Isoformen der FKBP zu inhibieren.

Tabelle 15: IC₅₀-Werte der Inhibition verschiedener FKBP durch die Cycloheximid-Derivate **43-46**

| | IC ₅₀ / μ M | | | | |
|------------------|----------------------------|-----------------|----------------|----------------|-----------------|
| | 43 | 44 | 45 | 46 | 31 |
| <i>hFKBP12</i> | 0,4 \pm 0,05 | 0,15 \pm 0,04 | 5,6 \pm 0,8 | 1,4 \pm 0,1 | 0,17 \pm 0,04 |
| <i>hFKBP12.6</i> | 1,7 \pm 0,1 | 8,7 \pm 1,1 | 45,7 \pm 5,8 | 9,6 \pm 2,9 | 6,8 \pm 2,1 |
| <i>hFKBP13</i> | 0,75 \pm 0,07 | 1,8 \pm 0,3 | 32,3 \pm 4,9 | 16,9 \pm 1,2 | 0,6 \pm 0,05 |
| <i>hFKBP25</i> | >100 | >100 | >100 | >100 | >100 |
| <i>pfFKBP35</i> | 0,69 \pm 0,09 | 1,7 \pm 0,1 | 3,3 \pm 0,4 | 8,6 \pm 1,7 | 0,5 \pm 0,17 |
| <i>hFKBP51</i> | 0,76 \pm 0,1 | 3,4 \pm 0,1 | 18,8 \pm 3,6 | >100 | 0,43 \pm 0,12 |
| <i>hFKBP52</i> | 0,61 \pm 0,1 | 1,8 \pm 0,3 | 6,0 \pm 0,6 | 15,1 \pm 1,2 | 0,45 \pm 0,04 |
| <i>pfFKBP35</i> | 0,69 \pm 0,09 | 1,7 \pm 0,1 | 3,3 \pm 0,4 | 8,6 \pm 1,7 | 0,5 \pm 0,17 |
| <i>lpFKBP25</i> | 0,97 \pm 0,08 | 5,9 \pm 0,6 | >100 | >100 | 1,7 \pm 0,7 |

Die Substanz **43** zeigte mit zwei Ausnahmen ein ähnliches Inhibitionsverhalten wie die Verbindung **31** (Tab.15). Im Gegensatz zu Verbindung **31** inhibierte Verbindung **43** die PPlase-Aktivität von *hFKBP12* nicht mit 170 \pm 40 nM sondern zirka 2,5-mal schlechter mit 400 \pm 50 nM. Die *hFKBP12.6*-PPlase-Aktivität wurde von Verbindung **43** mit 1,7 \pm 0,1 μ M um den Faktor vier besser hemmt. Verbindung **44** inhibierte die *hFKBP12*-PPlase-Aktivität mit 150 \pm 40 nm. Allerdings wurden die anderen FKBP von Verbindung **44** nur im unteren mikromolaren Bereich inhibiert, genau wie bei Verbindung **30**. Damit stellt Verbindung **44** einen relativ spezifischen Inhibitor für *hFKBP12* dar, der *hFKBP12* mit einer mehr als 10-fach höheren Affinität als die anderen untersuchten FKBP-Isoformen hemmt. Mit der Einführung des (+)-(*R*)-3-Aminoquinucleidin (**46**) sank die Effizienz der PPlase-Aktivitätshemmung erheblich. Neben *hFKBP12* war eine deutliche Bevorzugung von *pfFKBP35* und *hFKBP51* zu erkennen. Diese drei FKBP wurden als einzige von Verbindung **45** im einstelligen mikromolaren Bereich gehemmt. *LpFKBP25* blieb in seiner PPlase-Aktivität bis 100 μ M von **45** und **46** unbeeinflusst. Durch die Verknüpfung der Verbindung **11** mit dem (-)-(*S*)-3-Aminoquinucleidin sanken der IC₅₀-Werte der Inhibition von *hFKBP12*, 12.6 und 13, währenddessen der IC₅₀-Wert der *pfFKBP35*- und der *hFKBP52*-Inhibition stieg. Im

Unterschied zu Verbindung **45** zeigte Verbindung **46** keine Beeinflussung der *hFKBP51* Isomerase-Aktivität bis zu einer Inhibitorkonzentration von 100 μM .

Für die folgenden Derivate **47-50** wurde Verbindung **11** mit Diphenylamin, 7-*N*-(*N'*-(2-aminoethyl)-acetamidyl)-Theophylin, *N*-(2-aminoethyl)-(1*S*)-10,2-Camphersultam und *N*-(2-aminoethyl)-(1*R*)-10,2-Camphersultam umgesetzt (Abb.40)

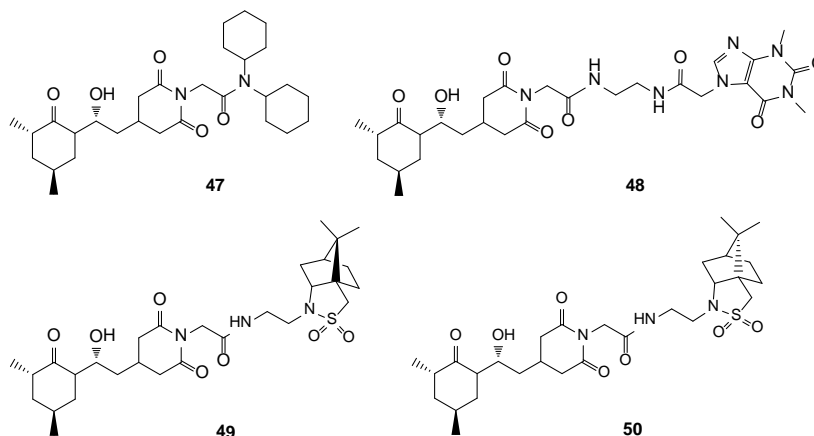


Abbildung 40: Darstellung der *N*-alkylsubstituierten Cycloheximid-Derivate **47-50**

Tabelle 16: Chemische Daten der Cycloheximid-Derivate **47-50**

| Verbindung | Ausbeute (%) | Molmassen (g mol^{-1}) | | Retentionszeit R_t (min) |
|------------|--------------|---------------------------------------|---------------------------------------|----------------------------|
| | | $[\text{M}+\text{H}]^+_{\text{ber.}}$ | $[\text{M}+\text{H}]^+_{\text{gef.}}$ | |
| 47 | 57,0 | 503,3 | 503,4 | 7,8 |
| 48 | 74,0 | 602,3 | 602,8 | 5,8 |
| 49 | 52,9 | 580,7 | 580,8 | 8,6 |
| 50 | 62,3 | 580,7 | 580,8 | 8,5 |

Die Analyse der inhibitorischen Eigenschaften der Verbindungen gegenüber den FKBP ergab, dass mit Verbindung **47** erstmals ein CHX-Derivat synthetisiert wurde, welches *hFKBP12.6* und *pfFKBP35* gegenüber *hFKBP12* bevorzugte (Tab.16). Im Gegensatz dazu inhibierte Verbindung **48** *hFKBP12* am effektivsten. Es war zirka 9-mal effektiver als Verbindung **47**. Allerdings waren alle IC_{50} -Werte deutlich höher als bei den initial untersuchten Adamantyl-Derivaten.

Tabelle 17: IC₅₀-Werte der Inhibition verschiedener FKBP durch die Cycloheximid-Derivate **47-50**

| | IC ₅₀ / μ M | | | |
|-------------------|----------------------------|----------------|----------------|----------------|
| | 47 | 48 | 49 | 50 |
| <i>h</i> FKBP12 | 44,7 \pm 7,0 | 5,2 \pm 0,5 | 2,4 \pm 0,2 | 1,8 \pm 0,15 |
| <i>h</i> FKBP12.6 | 26,6 \pm 1,1 | 20,1 \pm 2,5 | 21,7 \pm 3,3 | 14,0 \pm 2,0 |
| <i>h</i> FKBP13 | 29,9 \pm 6,6 | 31,1 \pm 4,8 | 18,1 \pm 3,8 | 14,4 \pm 1,7 |
| <i>h</i> FKBP25 | >100 | >100 | >100 | >100 |
| <i>h</i> FKBP51 | 91,1 \pm 24,6 | n.d | 28,7 \pm 7,0 | 35,1 \pm 5,6 |
| <i>h</i> FKBP52 | 80,6 \pm 10,8 | 30,1 \pm 4,0 | 27,2 \pm 3,2 | 38,2 \pm 1,9 |
| <i>p</i> FKBP35 | 10,8 \pm 3,1 | 8,8 \pm 0,9 | 9,8 \pm 2,3 | 10,5 \pm 3,6 |
| <i>l</i> pFKBP25 | 33,6 \pm 4,1 | 28,1 \pm 5,3 | 15,7 \pm 4,7 | 17,6 \pm 3,6 |

Auch hier war eine deutliche Präferenz der Verbindung **48** gegenüber dem *p*FKBP35, im Vergleich zu den anderen FKBP zu erkennen. Auffällig war die verloren gegangene inhibitorische Aktivität der Verbindung **48** gegenüber *h*FKBP51, die schon bei Verbindung **46** beobachtet wurde. Die Verbindungen **49** und **50** unterschieden sich nur durch ihre Stereochemie (Abb.40). Sie weisen, anders als die Stereoisomere der Verbindungen **45** und **46**, annähernd identische IC₅₀-Werte gegenüber den untersuchten FKBP auf. Wie schon bei Verbindung **48** zu sehen war, ist *p*FKBP35 nach *h*FKBP12 das bevorzugte FKBP. In diesem Punkt stimmen sie mit den Stereoisomeren **45** und **46** überein. Mit diesen vier Verbindungen konnten die IC₅₀-Werte zwar nicht weiter gesenkt werden, jedoch war eine deutlichere Differenzierung zwischen bestimmten FKBP erkennbar.

3 Diskussion der Ergebnisse der Synthese und biochemischen Untersuchungen

Synthetische duale Inhibitoren der FKBP und Cyclophiline sind bereits in der Literatur bekannt (Abb.41). Sie werden in der Forschung jedoch nicht als Inhibitoren der PPIase-Aktivität endogener FKBP und Cyclophiline eingesetzt. Sie dienen zur chemischen Induzierung der Dimerisierung (CID) von rekombinant exprimierten Fusionsproteinen aus dem jeweiligen Untersuchungsobjekt und FKBP12 bzw CypA. Der erste synthetisierte CID war das 1993 entwickelte FK1012^{[95],[96]}, ein Dimer des FK506, welches zur Homodimerisierung des FKBP12 dient. Neben dem FK1012, wurde ebenfalls ein Homodimer des CsA, das $(CsA)_2$ ^[97], sowie ein Heterodimer aus FK506 und CsA, das FKCsA^[97], hergestellt und für die Untersuchung von Protein-Protein-Wechselwirkungen verwendet.

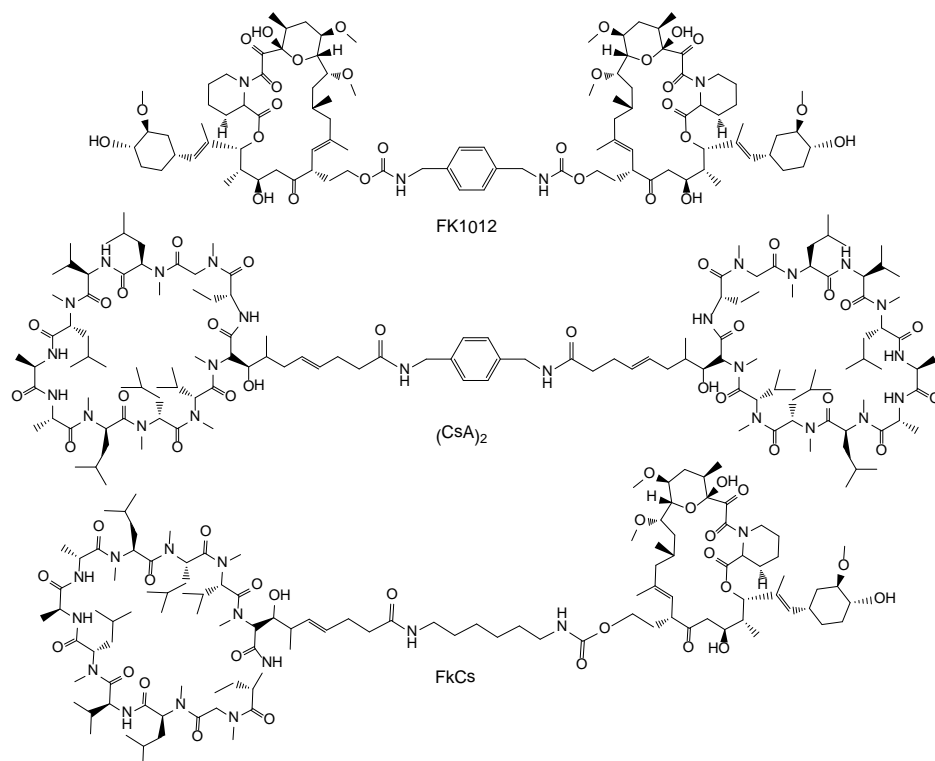


Abbildung 41: Strukturen der bifunktionellen Moleküle FK1012, $(CsA)_2$ und FKCsA.

Allerdings sind die synthetischen Vorarbeiten am FK506 und am CsA für die CID-Synthese sehr aufwendig. So müssen am FK506 u.a. Schutzgruppen eingeführt, eine asymmetrische Dihydroxylierung mit OsO_4 durchgeführt und die Schutzgruppen mit Fluorwasserstoff^{[95],[96]}

entfernt werden. Bei der Modifikation des CsA sind vier Stufen zur Einführung der Carboxylgruppe an der MeBmt-Seitenkette notwendig^[97]. Die kovalente Verknüpfung der Wirkstoffgruppen mit den Linkern über Carbamate und Ester sind innerhalb von zellulären Systemen nicht sehr stabil. Aus diesen Gründen wurde nach alternativen Reaktionen gesucht um duale Inhibitoren zu synthetisieren.

3.1 Die dualen Inhibitoren FK506-C₄₀-CO-NH(CH)_nNH-[OCCH₂-D-Ser]⁸-CsA 7-10

3.1.1 Synthese der FK506-C₄₀-carbonsäure 1

Um stabile duale Inhibitoren der PPlase-Aktivität von FKBP und Cyclophilinen mit einem variablen Abstand der beiden Wirkstoffgruppen zu erzeugen, wurden FK506 und CsA über flexible Alkyllinker kovalent verbunden. Für die Verknüpfung sollten Positionen in den beiden Molekülen verwendet werden, die die Bindung zu den aktiven Zentren der FKBP bzw. Cyclophiline nicht behindern. Eine Unterbindung der Interaktion der Substanzen mit dem *gain-of-function*-Ziel CaN war jedoch erwünscht.

FK506 tritt mit CaN über drei Regionen innerhalb der Effektor-Bindestelle direkt in Wechselwirkung. Das ist zum einen der Cyclohexylrest von C₂₉-C₃₄, zum anderen die Region der Allylseitenkette am C₃₈-C₄₀ sowie die Region von C₁₅-C₁₈. Modifikationen innerhalb der Cyclohexylregion sind bekannt dafür, dass sie weiterhin potente CaN-Inhibitoren generieren. Zudem verursachen sterisch anspruchsvolle Substituenten in dieser Region eine verringerte Aktivität zu FKBP12, was durch die Nähe dieser Region zur FKBP-Bindestelle des FK506 erklärt wird^{[98],[99]}. Daher wurde diese Region nicht zur Modifikation herangezogen. Der C₁₅-C₁₈ Bereich der Effektor-Bindestelle wurde für das FK520-Derivat L-685,818^[100] herangezogen. Diese Synthesestrategie musste ebenfalls verworfen werden, da die Allylseitenkette des FK506 die Bedingungen der Synthese des L-685,818 nicht toleriert. Daher bildet die vielversprechendste Position für eine Modifikation die außerhalb des Makrozyklus gelegene Allylseitenkette am C₂₁. FK520 und FK523, die anstelle der Allylseitenkette eine Ethyl- bzw. eine Methylseitenkette aufweisen, zeigten im T-Zell-Proliferations-Assay eine deutlich abgeschwächte Aktivität im Vergleich zu FK506^[101] (Abb.42). Dies deutet darauf hin, dass diese Position sensibel für die CaN-Inhibition und die damit verbundene Immunsuppressivität ist.

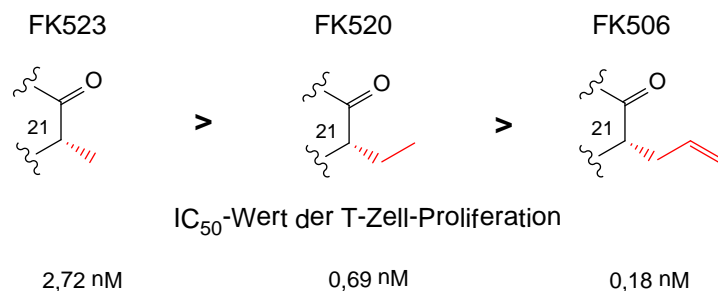
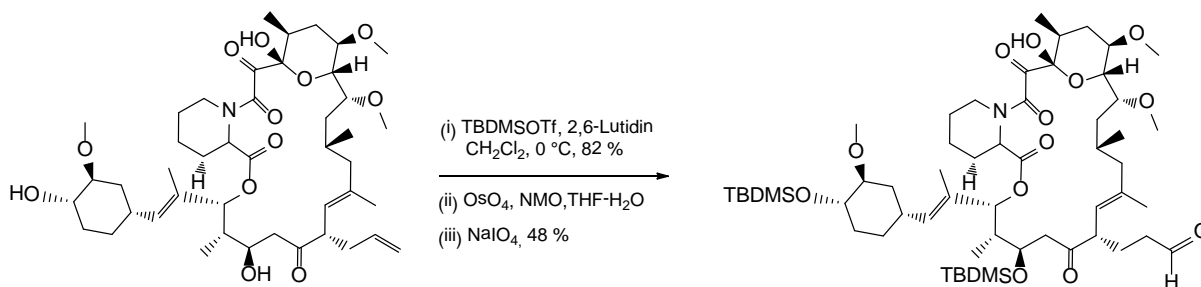


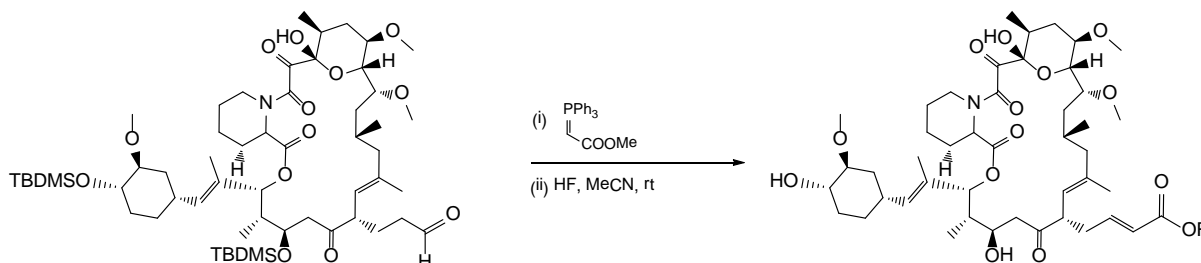
Abbildung 42: Darstellung der Alkylseitenketten der Fermentationsprodukte von *Streptomyces tsukubaensis*. Es ist zu erkennen, dass mit zunehmender Kettenlänge die Effektivität der Inhibition der T-Zell-Proliferation und damit die immunsuppressiven Eigenschaften ansteigen. Dies ist zurückzuführen auf die zunehmenden hydrophoben Wechselwirkungen mit dem CaN.

Mit der Oxidation der Doppelbindung der Allylgruppe zum Aldehyd via JOHNSON-LEMIEUX erhielten ORGAN *et al.* eine Basis für weiterführende Modifikationen des FK506 an der Allylseitenkette^[50] (Schema 14).



Schema 14: Synthese des von ORGAN *et al.* dargestellten FK506-Aldehyds nach JOHNSON-LEMIEUX^[52]. Im ersten Schritt erfolgt die Schützung der freien Hydroxylgruppen mit anschließender Dihydroxylierung der Doppelbindung. Im dritten Schritt wird das Diol zum Aldehyd oxidiert.

Ausgehend von dem Aldehyd synthetisierten ORGAN *et al.* eine Reihe von C_{21} -modifizierten Derivaten des FK506, welche reduzierte immunsuppressive Eigenschaften aufwiesen^[50]. Die Verbindungen mit der geringsten Immunsuppressivität sind die Vinylester.



Schema 15: Synthese des FK506- C_{40} -carbonsäuremethylesters ausgehend von dem FK506-Aldehyd via WITTIG-Reaktion^[52].

Die Synthese erfolgte bei ORGAN *et al.* aus dem Aldehyd und den entsprechenden Phosphor-Yliden (Schema 15).

Für die in der vorliegenden Arbeit geplante Kupplung wurde jedoch die freie Säure und nicht der Ester benötigt. Da es bei der alkalischen Esterspaltung zu einer Benzilsäure-Umlagerung an der Diketo-Gruppe kommt, konnte die WITTIG-Reaktion nicht angewendet werden. Eine Alternativroute eröffnet die gekreuzte Olefin-Metathese.

Die Olefin-Metathese ist eine Kohlenstoff-Kohlenstoff-Verknüpfungsreaktion, in der die Alkylidengruppen zweier Olefine mittels Katalysator des GRUBBS- oder SCHROCK-Typs verknüpft werden^[102]. Im Gegensatz zu klassischen C-C-Verknüpfungsreaktionen wie beispielsweise die HECK,- STILLE,- oder SUZUKI-Kupplung, ist die Olefin-Metathese nicht auf polarisierte Heteroatom-Kohlenstoffbindungen angewiesen. Sie verläuft mit nichtaktivierten, ungesättigten Kohlenstoff-Doppelbindungen, die sich unter einer großen Zahl von Reaktionsbedingungen inert verhalten^[103]. Infolge dessen müssen keine Schutzgruppen eingeführt werden, da die Kohlenstoff-Doppelbindungen gezielt an der gewünschten Stelle der Reaktion Übergangsmetall-katalysiert aktiviert werden können.

Dass das FK506 die Reaktionsbedingungen der Kreuzmetathese toleriert, zeigen die Arbeiten von SCHREIBER *et al.*, die sowohl ein Dimer des FK506 mittels Metathese herstellten^[104], als auch unter den Bedingungen der Olefin-Metathese Styrol mit FK506 verknüpften^[105]. Mit der Olefin-Methathese kann nun direkt Acrylsäure eingesetzt werden, um die Allylseitenkette um eine Carbonsäurefunktion zu verlängern.

Produkt- und Stereoselektivitäten können durch gezielte Kombination zweier Olefine unterschiedlicher Typisierung erhalten werden. Die Einteilung der Olefine erfolgt nach ihrer Fähigkeit zur Homodimerenbildung^[106] (Abb.43).

| | | | |
|---------------------|---------|---------------------------------|--|
| Olefinreaktivität ↑ | Typ I | schnelle Homodimerisierung | (z.B. terminale Olefine, Allylverbindungen) |
| | Typ II | langsame Homodimerisierung | (z.B. Styrene, Vinylverbindungen) |
| | Typ III | keine Homodimerisierung | (z.B. 1,1-disubstituierte Olefine, trisubstituierte, nicht sterisch gehinderte Olefine) |
| | Typ IV | Olefine inert in Kreuzmetathese | (z.B. trisubstituierte, sterisch gehinderte Olefine, Nitro-vinyl-Verbindungen) |

Abbildung 43: Einteilung der Olefine nach ihrer Reaktivität. (nach GRUBBS *et al.*^[106])

Nach dieser Einteilung übernimmt das FK506 mit seiner terminalen Doppelbindung die Rolle des Typ-I-Olefins und die Acrylsäure dementsprechend die des elektronenarmen Typ-II-Olefins.

Der verwendete Katalysator muss in der Lage sein, Doppelbindungen mit einem Elektronendefizit zur Reaktion zu bringen. Des Weiteren muss er eine hohe Diastereomereenselektivität aufweisen und am Ende der Reaktion leicht wieder entfernt werden können. Zudem sollte er eine hohe Verträglichkeit gegenüber Luft und Feuchtigkeit aufweisen. Die Ruthenium-Katalysatoren des GRUBBS-Typs wurden den Molybdän-Katalysatoren des SCHROCK-Typs vorgezogen, da erstere luft- und feuchtigkeitsstabil sind und eine Vielzahl funktioneller Gruppen tolerieren^[107]. Die GRUBBS-Katalysatoren der ersten und zweiten Generation waren für das Vorhaben ungeeignet, da eine gekreuzte Metathese mit α,β -ungesättigten Carbonylverbindungen nicht katalysiert wird und es zur Bildung des FK506-Dimers als Hauptprodukt kommt. Als geeignet erwiesen sich die von HOVEYDA^{[108],[109],[110]} entwickelten GRUBBS-Katalysatoren (Abb.44).

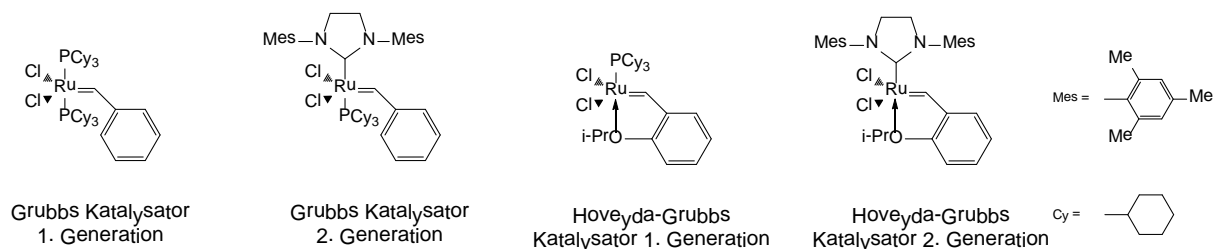


Abbildung 44: Gegenüberstellung der GRUBBS und HOVEDA-GRUBBS Katalysatoren. Sie unterscheiden sich in dem Tricyclohexylphosphin-Liganden, welcher in den Hoveyda-Katalysatoren durch eine Isopropoxy-Gruppe in *ortho*-Stellung am Phenylring ersetzt wurde.

Diese Katalysatoren sind in der Lage, α,β -ungesättigte Carbonylverbindungen umzusetzen^[111] und können nach erfolgter Reaktion durch einfache säulenchromatoraphische Reinigung aus dem Reaktionsgemisch entfernt werden^{[112],[113]}. Ein weiterer Vorteil der HOVEYDA-GRUBBS-Katalysatoren der 2. Generation ist die bevorzugte Bildung des thermodynamisch stabileren *E*-Isomers^{[114],[115],[116]} des Produktes. Die physikalischen Bedingungen wie Temperatur, Lösungsmittel und Dauer der Reaktion wurden nach GESTWICKI *et al.* optimiert^[117]. Auf diese Weise wurde Verbindung **1** erzeugt, bei der eine Carbonsäurefunktion an die Doppelbindung der Allylseitenkette angeknüpft ist. Um zu analysieren, inwieweit diese Verbindung in der Lage ist, mit dem aktiven Zentrum von *h*FKBP12 zu interagieren, wurde die Inhibition der PPLase-Aktivität dieses Enzyms durch die Verbindung **1** untersucht (Abb.8A). Eine nur um das 1,5-fache schwächere Inhibition von *h*FKBP12 im Vergleich zu FK506 zeigt, dass die Modifikation am C₄₀-Atom bei der Bindung der Substanz an *h*FKBP12 toleriert wird.

FK506 bildet mit *hFKBP12* einen reversiblen und stöchiometrischen Komplex in einem Verhältnis von 1:1^[81]. Dazu binden der Pipecolinyring, die Diketo-Gruppe sowie Teile des Pyranoseringes des FK506 in eine hydrophobe Tasche, welche hauptsächlich von den aromatischen Aminosäuren Tyr²⁶, Phe⁴⁶, Trp⁵⁹ und Phe⁹⁹ gebildet wird^[82]. Das Trp⁵⁹ ist das einzige Tryptophan im *hFKBP12* und eine Vielzahl an Studien belegen, dass die Indolseitenkette maßgeblich an der Bindung des FK506 beteiligt ist^{[83],[84],[85]}, kann seine intrinsische Fluoreszenz zur Charakterisierung der Bindung von FK506 an FKBP12 herangezogen werden^[86]. Durch die Bindung des FK506 kommt es zur Lageveränderung und Abschirmung des Tryptophans am Boden der hydrophoben Tasche und zu einem Absinken der Fluoreszenzemission^{[79],[80],[71]}.

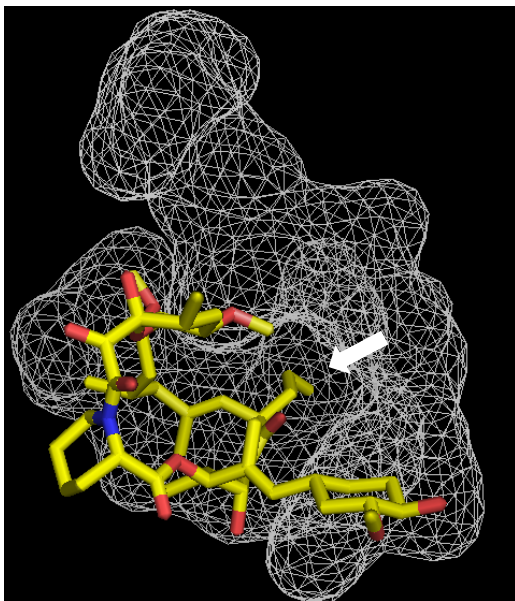


Abbildung 45: Darstellung der Bindung der C₂₁-Allylseitenkette in die hydrophobe Tasche der FK506-Binderegion (weißes Netz) des CaN (weißer Pfeil). FK506 wird als sticks die Oberfläche des CaN als weißes Netz dargestellt. (PDB ID: 1TCO)

Das Absinken der intrinsischen Fluoreszenz des Trp⁵⁹ im *hFKBP12**[1]-Komplex zeigte, dass die Einführung der Carbonsäure an der C₂₁-Allylkette keinen großen Einfluss auf den Verlauf der Bindung ausübte (Abb.8B). Verbindung 1 weist wie FK506 einen biphasischen Verlauf der Bindung auf. Die zweite Phase besitzt eine etwas geringere Amplitude als im Fall des FK506, was darauf hindeutet, dass das Derivat 1 einen größeren Anteil einer Konformation ähnlich dem gebundenen FK506 besitzt oder über eine flexiblere Struktur verfügt, die sich im schnellen Gleichgewicht zwischen den verschiedenen Konformeren befindet. Die Verbindung 1 war in der Lage, ein Komplex mit *hFKBP12* einzugehen, dieser Komplex erwies sich aber als nicht inhibitorisch gegenüber der

Phosphatase-Aktivität von CaN. Eine mögliche Erklärung für die geringe CaN-Inhibition der Verbindung 1 ergibt sich aus der Kristallstruktur des ternären Komplexes *hFKBP12**[FK506]*CaN (PDB ID: 1TCO)^[118]. Der Hauptkontakt zwischen dem *hFKBP12**[FK506]-Komplex und CaN erfolgt über eine hydrophobe Region am CaN. Diese Region umfasst die Aminosäuren Leu¹¹⁵, Met¹¹⁸, Val¹¹⁹, Leu¹²³, Leu³⁴³, Pro³⁴⁴, Trp³²⁵, Ser³⁵³ und Phe³⁵⁶ des CaN. Die Mehrzahl der Wechselwirkungen von FK506 mit dieser Region kommt durch die Atome C₁₅-C₁₇ und die C₂₁-Allylgruppe zustande. Die Allylgruppe ragt in eine zirka 5 Å tiefe Tasche der hydrophoben Region des CaN (Abb.45). Es ist daher wahrscheinlich, dass die Tiefe dieser Tasche die Verlängerung um die Carbonsäurefunktion

nicht toleriert, sodass keine Inhibierung der Phosphatase-Aktivität von CaN bis zu einer Inhibitorkonzentration von 10 μM beobachtet werden konnte. Allerdings zeigte die Analyse der NFAT-Funktion im NFAT-Reporter-Gen-Assay für Verbindung **1** eine immunsuppressive Wirkung. Da dieser Assay aufgrund der geringeren zellulären CaN-Konzentration sensitiver als der *in vitro* CaN-Assay ist^[173], zeigen diese Daten, dass der *hFKBP12*[1]*-Komplex CaN prinzipiell zu inhibieren vermag. Die Reaktion der Acrylsäure mit der Doppelbindung an der C₄₀-Position des FK506 mittels Olefin Metathese war nicht ausreichend um eine nicht-immunsuppressive Substanz zu erhalten.

Zur Etablierung der zweiten Kopfgruppe der dualen PPIase-Inhibitoren wurde die OH-Seitenkette von Ser⁸ des [D-Ser]⁸-CsA carboxymethyliert, um Verbindung **2** zu erhalten. Das mikrobiell gewonnene [D-Ser]⁸-CsA, bei dem das D-Alanin durch D-Serin ersetzt ist, bietet einen hervorragenden Ausgangsstoff für Modifikationen am CsA-Grundgerüst, die zu nicht-immunsuppressiven CsA-Derivaten führen^{[119],[120]}. D-Ser⁸ liegt in einer Position, die sich in der mit CaN in Wechselwirkung tretenden Region der Aminosäuren 3-9^[19] von CsA befindet. Für [D-Serin]⁸-CsA sind ähnliche immunsuppressive und Cyp-inhibitorische Eigenschaften wie für CsA beschrieben^{[121],[91]}. Auf Grund der hohen Stabilität des CsA-Ringes gegenüber verschiedenen Reaktionsbedingungen, bietet die Hydroxylgruppe des D-Serin eine ideale Basis für eine kovalente Verknüpfung mit dem FK506. Die Analyse der inhibitorischen Eigenschaften zeigte, dass Verbindung **2** *hCypA* nur um 1,3-fach schwächer inhibiert als [D-Ser]⁸-CsA.

Die Ausbildung der Komplexe *hCypA*[[D-Ser]⁸-CsA]* und *hCypA*[2]* verlief sehr ähnlich. Die Ähnlichkeiten in der Amplitude der schnellen Phase und der zweiten Phase sowie der Geschwindigkeit der zweiten Phase, die die *cis/trans*-Isomerisierung der MeLeu⁹-MeLeu¹⁰-Bindung des CsA repräsentiert, weisen darauf hin, dass die Modifikation die Konformation und die Flexibilität des [D-Ser]⁸-CsA nicht wesentlich verändert (Abb.10B).

Sowohl der CaN-Assay als auch der NFAT-Reporter-Gen-Assay bestätigten, dass Verbindung **2** weiterhin immunsuppressive Eigenschaften aufweist. Eine mögliche Erklärung dafür wird aus Kristallstruktur (PDB ID:1MF8)^[20] des humanen CaN im Komplex mit CsA und *hCypA* ersichtlich. Die Aminosäuren MeGly³ bis Ala⁷ des CsA wechselwirken ähnlich wie FK506 mit der hydrophoben Region des CaN, die aus den Aminosäuren Leu¹¹⁵, Met¹¹⁸, Val¹¹⁹, Leu¹²³, Leu³⁴³, Pro³⁴⁴, Trp³⁵², Ser³⁵³ und Phe³⁵⁶ des CaN besteht. Zusätzlich interagiert CsA mit der Region MeGly³ bis Ala⁷ mit der Aminosäure Asn¹²² des CaN. Dabei bindet die Seitenkette des MeLeu⁴ des CsA in dieselbe Tasche der hydrophoben Region, wie die C₂₁-Allgruppe des FK506 (Abb.46, weißer Pfeil).

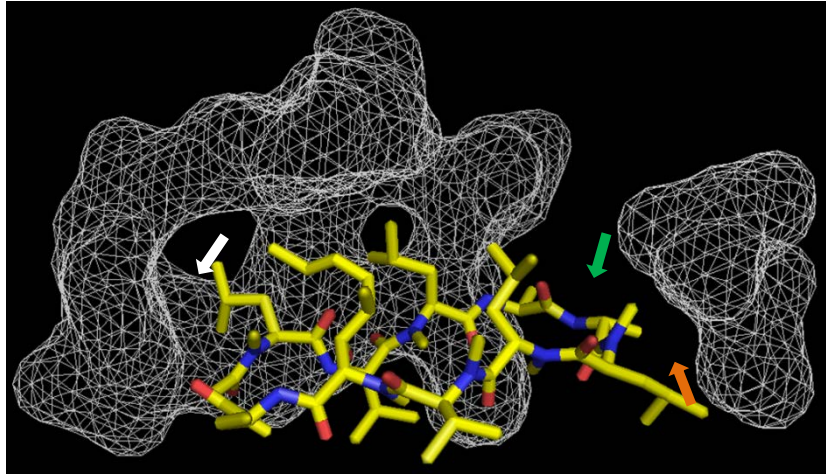


Abbildung 46: Darstellung der Interaktion des CsA mit den Aminosäuren Leu¹¹⁵, Met¹¹⁸, Val¹¹⁹, Asn¹²², Leu¹²³, Leu³⁴³, Pro³⁴⁴, Trp³⁵², Ser³⁵³ und Phe³⁵⁶ des CaN (weißes Netz). Der weiße Pfeil zeigt die Wechselwirkung des MeLeu⁴ des CsA mit den Aminosäuren des CaN Met¹¹⁸, Val¹¹⁹, Trp³⁵², Ser³⁵³ und Phe³⁵⁶ des CaN. Es sind die gleichen Aminosäure, welche mit der C₂₁-Allylkette des FK506 wechselwirkt. Der orangene Pfeil zeigt die Interaktion der Aminosäuren Leu³¹² und Val³¹⁴ des CaN mit MeLeu⁹ des CsA. Zwischen diesen beiden Interaktionsstellen befindet sich ein Hohlraum, in dem die Ala⁸ des CsA liegt (grüner Pfeil). PDB ID: 1MF8 (Kristallstruktur von CaN im Komplex mit CsA und *hCypA*). CsA wird als sticks, die Oberfläche des CaN als weißes Netz dargestellt.

Weiterhin kommt es zu van-der-Waals-Wechselwirkungen des MeLeu⁹ des CsA mit den Aminosäuren Leu³¹² und Val³¹⁴ des CaN (Abb.46, orangener Pfeil)^[20]. Zwischen den beiden Interaktionsstellen MeGly³ bis Ala⁷ und MeLeu⁹ des CsA ist ein Hohlraum in der Kristallstruktur zu erkennen (Abb.46, grüner Pfeil). In diesem Hohlraum befindet sich beim CsA die Aminosäure D-Ala⁸ und im [D-Ser]⁸-CsA die Aminosäure D-Ser⁸ ^[20]. Dies macht verständlich, weshalb die bisher untersuchten Modifikationen an dieser Position weder einen Einfluss auf die *hCypA*-noch auf die CaN-inhibitorischen Eigenschaften der CsA-Derivate haben.

Um die beiden Wirkstoffgruppen zu dualen Inhibitoren zusammenfügen zu können, wurde das FK506-Derivat **1** mit Linkern verschiedener Länge versehen. Dazu wurden 1,3-Diaminopropan, 1,5-Diaminopentan, 1,7-Diaminoheptan und 1,9-Diaminononan zunächst mit Verbindung **1** unter den Bedingungen der Peptidsynthese gekuppelt, um die Verbindungen **3-6** zu erhalten. Die Diaminoalkylverbindungen wurden im doppelten Überschuss eingesetzt, um damit der Homodimerisierung vorzubeugen. Als Kupplungsreagenz wurde PyBOP verwendet, da der sich bildende Aktivester langsam mit dem Amin zum Amid reagiert und so die Tendenz zur Homodimerisierung mindert.

Der IC₅₀-Wert der Verbindungen **3-6** sinkt nicht unter den von FK506 (Abb.13A), sodass davon ausgegangen werden kann, dass Modifikationen an der Allylgruppe am C₂₁-Atoms des FK506 keinen Einfluss auf die Ausbildung der *hFKBP12**[**3-6**]-Komplexe besitzt. Trotz der Ausbildung hochaffiner binärer *hFKBP12**[**3-6**]-Komplexe zeigten die Verbindungen **3-6** sowohl im CaN- als auch im NFAT-Reporter-Gen-Assay keinerlei CaN-inhibitorische Aktivität

bis zu einer InhibitorKonzentration von 10 μM . Möglicherweise verhindern die Linker die Bildung der ternären Komplexe $h\text{FKBP}12^*[\mathbf{3-6}]^*\text{CaN}$, da die um die Linker verlängerte Seitenkette am C_{21} sich nicht mehr in die 5 Å tiefe Tasche der hydrophoben Region erstrecken kann. Dadurch wären keine Wechselwirkungen zwischen der Effektor-Bindestelle am FK506 und CaN mehr möglich, sodass Verbindungen mit stark reduzierten immunsuppressiven Eigenschaften entstehen.

3.1.2 Biochemische Eigenschaften der dualen Inhibitoren $\text{FK506-C}_{40}\text{-CO-NH(CH)}_n\text{NH-}[\text{OCCH}_2\text{-D-Ser}]^8\text{-CsA 7-10}$

Inhibition der $h\text{FKBP}12$ - und $h\text{CypA}$ -PPIase-Aktivität durch die Verbindungen 7-10

Die Verbindungen **3-6**, die FK506 mit einem zusätzlichen Linker repräsentieren, konnten nun zur Erzeugung der dualen Inhibitoren **7-10** mit Verbindung **2** umgesetzt werden. Interessanterweise wies die Affinität der Verbindungen **7-10** zu $h\text{FKBP}12$ eine deutliche Abhängigkeit von der Länge des Linkers zwischen den Wirkstoffgruppen auf, wobei die Abnahme der Affinität mit der Zunahme der Länge des Linkers einhergeht. Da solche Abhängigkeiten für die Verbindungen **3-6** nicht beobachtet wurden, kann man davon ausgehen, dass die Anknüpfung des relativ großen $[\text{D-Ser}]^8\text{-CsA}$ -Moleküls entscheidend zur Veränderung der inhibitorischen Eigenschaften beiträgt. Möglicherweise erlaubt eine größere Länge des Linkers zwischen den beiden Wirkstoffgruppen eine stärkere sterische Abschirmung des FKBP-bindenden Bereichs von Fk506 durch das angeknüpfte $[\text{D-Ser}]^8\text{-CsA}$ -Molekül.

Zusätzlich zu der Inhibition der PPIase-Aktivität der einzelnen PPIasen durch die dualen Inhibitoren wurde untersucht, ob die Ausbildung des PPIase-Inhibitor-Komplexes an einer Seite des dualen Inhibitors die Bindung der zweiten Ziel-PPIase beeinflusst. Dazu wurde die Inhibition der $h\text{FKBP}12$ -PPIase-Aktivität durch die $h\text{CypA}^*[\mathbf{7-10}]$ -Komplexe bzw. die Inhibition der $h\text{CypA}$ -PPIase-Aktivität durch die $h\text{FKBP}12^*[\mathbf{7-10}]$ -Komplexe untersucht.

Interessanterweise zeigte die Inhibition der $h\text{FKBP}12$ -PPIase-Aktivität durch die $h\text{CypA}^*[\mathbf{7-10}]$ -Komplexe ein vollkommen entgegengesetztes Inhibitionsverhalten zu den unkomplexierten Verbindungen **7-10** (Abb.17). Mit steigender Länge des Linkers stieg auch die Affinität der $h\text{CypA}^*[\mathbf{7-10}]$ -Komplexe zu $h\text{FKBP}12$. Die Komplexe $h\text{CypA}^*[\mathbf{7-8}]$ zeigten einen um das 3-bzw. 10-fache erhöhten IC_{50} -Wert der $h\text{FKBP}12$ -Inhibition im Vergleich zu den unkomplexierten Verbindungen **7** und **8**. Diese Verschlechterung kann auf eine sterische Hinderung der $h\text{FKBP}12$ -Bindung durch das bereits gebundene $h\text{CypA}$ auf Grund des

kleinen Abstandes der beiden Wirkstoffe in Folge der kurzen Linker basieren. Unerwartet waren die Ergebnisse der *hFKBP12*-Inhibition durch die *hCypA**[9-10]-Komplexe. Die IC_{50} -Werte der Komplexe *hCypA**[9-10] sanken unter die der unkomplexierten Verbindungen. Möglicherweise wird hier eine Abschirmung der FKBP-Bindestelle der FK506-Wirkstoffgruppe durch den [D-Ser]⁸-CsA-Teil der dualen Inhibitoren **8** und **9** durch die *hCypA*-Bindung verringert.

Die IC_{50} -Werte der *hCypA*-Inhibition durch die *hFKBP12**[7-10]-Komplexe sind durchweg niedriger als die der unkomplexierten Verbindungen (Abb.18). Auch hier lässt sich nur vermuten, dass es intramolekulare Wechselwirkungen sind, welche die niedrigen IC_{50} -Werte der *hFKBP12**[7-10]-Komplexe bedingen.

Inhibition der CaN-Aktivität durch die Verbindungen 7-10

Analog zu den Verbindungen **3-6** zeigten die *hFKBP12**[7-10]-Komplexe bis zu einer Inhibitorkonzentration von 10 μ M keine CaN-inhibitorischen Eigenschaften. Die Modifikation des FK506 mit den Linkern in Position 40, die sich innerhalb der CaN-Bindestelle des FK506 befindet, war zur Verhinderung der Immunsuppressivität ausreichend. Die über FKBP12 vermittelte Immunsuppression konnte auch durch die Anknüpfung der zweiten Wirkstoffgruppe nicht wiederhergestellt werden.

Im Unterschied zu den *hFKBP12**[7-10]-Komplexen zeigten die *hCypA**[7-10]-Komplexe eine von der Linkerlänge abhängige CaN-Inhibition.

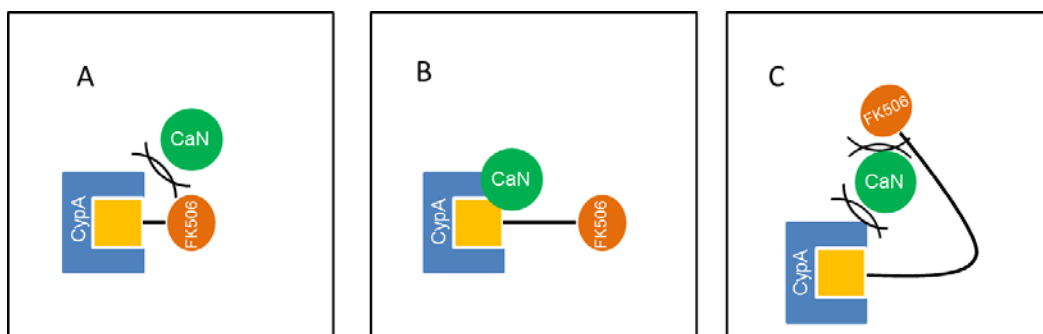


Abbildung 47: Darstellung der möglichen Ursachen für den Einfluss der Linkerlänge auf die CaN-Inhibition des binären Komplexes *hCypA**[7-10]. A) die sterische Abschirmung der CaN-Bindestelle durch FK506 erschwert die Bindung des CaN an den binären Komplex; B) die Verlängerung des Linkers ermöglicht eine ungehinderte Bindung des CaN an den binären Komplex; die fortschreitende Verlängerung C) führt zur Selbstorganisation der Alkylkette und bewirkt so wieder die Abschirmung der CaN-Bindestelle durch FK506.

Die dualen Inhibitoren **7-9** im Komplex mit *hCypA* wiesen mit steigender Linkerlänge eine steigende Affinität zu CaN auf. Die Ausnahme bildet Verbindung **10**. Im Komplex mit *hCypA* wies sie eine deutlich geringere Affinität zu CaN auf als Verbindung **9**. Eine mögliche Ursache für diese Ergebnisse sind die sterischen Gegebenheiten in den *hCypA**[**7-10**]-Komplexen (Abb.47). Im Komplex *hCypA**[**7**] ist eine starke Abschirmung der CaN-Bindestelle des *hCypA**[[D-Ser]⁸-CsA]-Komplexes durch den FK506-Rest und eine damit verbundene Erschwerung der Bindung des CaN wahrscheinlich (Abb.47A). Mit fortschreitender Verlängerung des Linkers stieg die Effektivität der CaN-Bindung der *hCypA**[**8-9**]-Komplexe, was auf eine Abnahme der abschirmenden sterischen Effekte des FK506 mit zunehmender Entfernung hinweist (Abb.47B). Die weiteren Verlängerungen der Alkylketten (Verbindung **10**) kann intramolekulare Wechselwirkungen zwischen den beiden Wirkstoffteilen ermöglichen, wodurch der freie Zugang des CaN abgeschirmt würde und die Effektivität der CaN-Hemmung sinkt (Abb.47C). Die Abschirmung könnte durch eine neue Orientierung der Alkylkette bedingt werden, wodurch sich die beiden Wirkstoffenden annähern. Diese Effekte wurden bereits in der Affinitätschromatographie beschrieben, sobald die Alkylkette eine bestimmte Länge überschreitet^[122].

Die CaN-Inhibition der Komplexe *hFKBP12**[**7-10**]**hCypA* folgte dem Muster der *hCypA**[**7-10**]-Komplexe. Auch hier war eine Zunahme der inhibitorischen Effektivität mit steigender Länge des Linkers bis zu n=9 zu beobachten. Die Verbindung **10** bildete auch wieder eine Ausnahme. Das ist verständlich da die CaN-inhibitorischen Eigenschaften der ternären Komplexe ausschließlich über den *hCypA**[[D-Ser]⁸-CsA]-Komplex erfolgten. Deshalb ist zu vermuten, dass die bereits oben beschriebenen sterischen Effekte die CaN-Inhibition der ternären Komplexe bestimmen (Abb.48A-C).

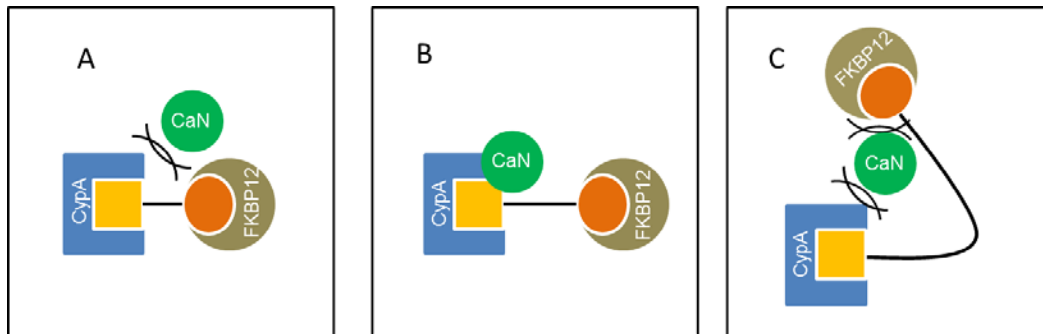


Abbildung 48: Darstellung der möglichen Ursachen für den Einfluss der Linkerlänge auf die CaN-Inhibition des ternären Komplexes $hFKBP12*[7-10]*hCypA$. A) die sterische Abschirmung der CaN-Bindestelle durch $hFKBP12*[7-10]$ ist größer als die von FK506 allein und erschwert die Bindung des CaN an den binären Komplex $hCypA*[[D-Ser]^8-CsA]$; B) die Verlängerung des Linkers ermöglicht eine leichtere Zugänglichkeit des CaN an den binären Komplex; eine weitere Verlängerung C) führt zu einer Wechselwirkung der binären Komplexe und bewirkt so die Abschirmung der CaN-Bindestelle.

Mit diesen drei Experimenten konnte zum einen gezeigt werden, dass die CaN-inhibitorischen Eigenschaften der dualen Inhibitoren nur durch die $hCypA*[[D-Ser]^8-CsA]$ -Komplexe hervorgerufen werden. Des Weiteren wurde gezeigt, dass die Verbindungen in den ternären Komplexen $hFKBP12*[7-10]*hCypA$, obwohl nicht vollkommen inert gegenüber CaN, dennoch als Verbindungen mit reduzierten CaN-inhibitorischen Eigenschaften angesehen werden können. Zur genaueren Charakterisierung der immunsuppressiven Eigenschaften der dualen Inhibitoren **7-10** wurden sie im NFAT-Reportergen-Assay untersucht. Der Einfluss der Länge des Linkers der Verbindungen **7-10** trat bei der Inhibition der Expression des Reportergens Luciferase in ähnlicher Weise zutage, wie bei der *in vitro* Inhibition des CaN. Auch hier war Verbindung **9** der effizienteste Inhibitor. Die Verbindungen **7** und **10** inhibierten die Expression der Luciferase deutlich schlechter als Verbindung **9**. Dieses Verhalten reflektiert die Gegebenheiten im CaN-Inhibitionsassay für die $hFKBP12*[7-10]*hCypA$ -Komplexe. Das spricht dafür, dass sich in den Jurkat-Zellen tatsächlich die $hFKBP12*[7-10]*hCypA$ -Komplexe ausbilden und dann intrazellulär CaN inhibieren können. Verbindung **8** verhielt sich im NFAT-Reportergen-Assay jedoch anders, als die direkte Bestimmung der CaN-Inhibition vermuten lässt. Während Verbindung **8** im Komplex mit $hCypA$ und im Komplex mit $hFKBP12$ und $hCypA$ CaN relativ gut zu inhibieren vermochte, erwies sie sich im NFAT-Reportergen-Assay als die schlechteste inhibitorische Verbindung. Mögliche Ursachen dafür können im komplexem System liegen, das auf der Verwendung von lebenden humanen Zellen im NFAT-Reportergen-Assay beruht. Hier spielen im Gegensatz zu der direkten CaN-Inhibition *in vitro* z.B. auch Transportvorgänge der Substanzen in die Zellen, subzelluläre Lokalisation und Interaktionen der Substanzen mit anderen Proteinen eine Rolle, die so die beobachtete Inhibition der Reportergen Expression beeinflussen können.

Obwohl die Verbindungen *hFKBP12* und *hCypA* im nanomolaren Bereich inhibierten, sind sie verglichen mit FK506 zwischen 500 und 3000 mal weniger immunsuppressiv. Auch der Vergleich mit [D-Ser]⁸-CsA zeigte, dass die Verbindungen **7-10** die Aktivität des NFAT-Reportergens um den Faktor 30-200 schlechter inhibierten. Entsprechend diesen Ergebnissen kann man die Substanzen **7-10** zwar nicht als vollständig nicht-immunsuppressiv, aber dennoch als Substanzen mit reduzierten immunsuppressiven Eigenschaften ansehen.

3.2 Die dualen Inhibitoren CHX-CH₂CO-NH(CH)_nNH-[OCCH₂-D-Ser]⁸-CsA 16-20

Nachdem die Verbindungen, bei denen FK506 und [D-Ser]⁸-CsA kovalent verknüpft vorlagen, sich als gute PPLase-Inhibitoren bei verminderter CaN-Inhibition erwiesen hatten, sollten weitere duale Inhibitoren dargestellt werden. In diesen Derivaten sollte der Wirkstoff FK506 gegen einen anderen FKBP-gerichteten PPLase-Inhibitor ersetzt werden, um mögliche Selektivitäten innerhalb der FKBP-Familie zu erzielen. Die Cyclophilin-Inhibition der so erhaltenen neuen Inhibitoren sollte davon nicht beeinflusst werden. Das FK506 ersetzende Wirkstoffmolekül war das Cycloheximid (CHX)^[60]. Es inhibiert *hFKBP12* mit $4,2 \pm 0,5 \mu\text{M}$. Cycloheximid ist ein Antibiotikum, welches die ribosomale Proteinbiosynthese bei Eukaryoten hemmt^{[65],[66]}. Auf Grund der erheblichen DNS-schädigenden, carcinogenen und teratogenen Nebenwirkungen ist Cycloheximid nicht als Therapeutikum für den Menschen vorgesehen. Jedoch konnten durch gezielte chemische Manipulation am Glutarimidylstickstoff die Toxizität drastisch gesenkt und Spezifitäten für bestimmte Isoformen innerhalb der FKBP-Familie erzielt werden^{[60],[123]}.

Um CHX mittels eines Alkyllinkers mit Verbindung **2** verknüpfen zu können, wurde zuerst eine Carboxymethylgruppe in CHX eingeführt. Die Synthese des *N*-(Carboxymethyl)-Cycloheximid (**11**) erfolgte im ersten Schritt mit *tert*-Butylbromoacetat und K₂CO₃. Die Spaltung des Esters erfolgte mit ZnCl₂*Etherat anstatt mit Säure, da unter diesen milden Bedingungen die Eliminierung der Hydroxylgruppe der 1-Hydroxyethylbrücke vermieden wird. Für diese Hydroxylgruppe wurde bereits gezeigt, dass sie wichtig für die Bindung des CHX an FKBP ist^[130].

Anschließend wurden die [D-Ser]⁸-CsA-Linker-Verbindungen **12-15** mit Verbindung **11** umgesetzt, sodass duale Inhibitoren mit verschiedenen Linkerlängen entstanden, die als Wirkstoffgruppen CHX und [D-Ser]⁸-CsA besaßen. Die IC₅₀-Werte der *hCypA*-Inhibition der Verbindungen **16-19** stiegen mit zunehmender Linkerlänge (Abb.23). Interessanterweise hatten die verschiedenen Linker in den Verbindungen **12-15** alleine nur einen geringen

Einfluss auf die Fähigkeit des [D-Ser]⁸-CsA, *hCypA* zu inhibieren. Eine mögliche Erklärung könnte die hohe Hydrophobizität der dualen Inhibitoren sein. In wässrigem Milieu, wie es im PPlase-Assay vorliegt, könnten sich die Linker so orientieren, dass das CHX in die *hCypA*-Bindestelle des [D-Ser]⁸-CsA hineinreicht und die Bindung von CsA behindert. Die Linker mit drei- und fünf-C-Atomen besitzen eine geringere Hydrophobizität, was die niedrigen IC₅₀-Werte der *hCypA*-Inhibition erklärt. Mit zunehmender Länge der Linker steigt die Hydrophobizität und somit auch die mögliche Interaktion der beiden Wirkstoffgruppen im wässrigen Milieu. Die hohe Hydrophobizität der Verbindungen bewirkte auch, dass sie nicht in den zur *hFKBP12*-Inhibition nötigen Konzentrationen in wässriger Lösung eingesetzt werden konnten, da sie schlecht löslich waren. Somit konnte ihr inhibitorisches Potential gegenüber *hFKBP12* nicht untersucht werden. Wurden die hydrophoben Alkyllinker durch den hydrophileren EDO-Linker in Verbindung **20** ersetzt, stieg die Effektivität der *hCypA*-Inhibition im Vergleich zu Alkyllinkern ähnlicher Länge. Einen ähnlichen Einfluss hydrophober Substituenten am CsA auf die Inhibition von CypA beschrieb bereits ZHANG 2001 in seiner Dissertation^[174]. Die hydrophoben Verbindungen [O-(Bromobutyl)-D-Ser]⁸-CsA und [O-(Boc-NH-(CH₂)₅-C(O)-CH₂-)-D-Ser]⁸-CsA zeigten eine um das 10-fach geringere *hCypA*-Inhibition als die Referenzsubstanz [D-Ser]⁸-CsA. Die Verbindung **20** konnte hinsichtlich ihrer Bindefähigkeit an das aktive Zentrum von *hFKBP12* untersucht werden. Es zeigte sich, dass sie mit einem IC₅₀-Wert von 6,9 µM ähnlich wie CHX aber deutlich besser als DM-CHX *hFKBP12* inhibiert.

Vergleicht man die IC₅₀-Werte der *hCypA*-Inhibition der Verbindungen **16-20** mit der der Inhibition der NFAT-Reporter-Gen-Aktivität, so ist ein gegenläufiges Verhalten erkennbar, mit Ausnahme von Verbindung **20** (Abb.25). Je kürzer der Linker ist, desto besser wurde *hCypA* inhibiert und desto schlechter inhibierte der *hCypA**[**16-19**]-Komplex CaN im NFAT-Reporter-Gen-Assay. Die Stärke der Inhibition der NFAT-Reporter-Gen-Aktivität hing hier also nicht von der Effektivität der *hCypA*-Bindung der Verbindungen ab. Möglicherweise beruht der beobachtete Effekt auf strukturellen Veränderungen des [D-Ser]⁸-CsA-Ringes durch die Modifikationen. Um strukturelle Änderungen zu untersuchen, wurden die Verbindungen **16-20** mittels CD-Spektroskopie analysiert. Typischerweise zeigt das CD-Spektrum von CsA ein Minimum bei 226 nm, das eine β-Turn-Struktur reflektiert, die von den Aminosäuren 3, 4 und 5 gebildet wird^[92]. Änderungen in der Intensität dieser Bande weisen auf Änderungen in der Turn-Struktur hin^[92]. Besonders deutlich war die Abnahme der Bande bei 226 nm in den Verbindungen **16** und **17** zu beobachten. Obwohl sich die Konformation, die CsA im ternären Komplex mit *hCypA* und CaN einnimmt, von der in ungebundener Form unterscheidet, kann aus diesen Daten vermutet werden, dass sich die durch die

Modifikationen induzierten strukturellen Veränderung des β -Turns direkt auf die CaN-Inhibition auswirken. Die an der Ausbildung des β -Turn in CsA beteiligten Aminosäuren Sar³, MeLeu⁴ und Val⁵ sind essentiell für die Bindung des CsA an das CaN^[121]. Dies würde die erhebliche Verschlechterung der Inhibition der NFAT-Reportergen-Aktivität der Verbindung **16** und **17** erklären.

3.3 Synthese und biochemische Eigenschaften des FK506-C₄₀-CONHC(CH₃)₃-Derivates **21** und FK506-C₉-COOMe-Derivates **22**

Um FK506-Derivate zu erzeugen, die entweder FKBP12 nicht inhibieren, oder FKBP12 inhibieren, aber nicht-immunsuppressiv sind, wurde in FK506 die PPIase-Bindestelle (Verbindung **22**) bzw. die CaN-Bindestelle (Verbindung **21**) modifiziert (Abb.28). Um Verbindung **21** zu erzeugen, erfolgte die Reaktion der Carboxylgruppe der FK506-C₄₀-carbonsäure mit dem *tert*-Butylamin. Dadurch erfolgte die Modifikation der CaN-Bindestelle von FK506, nicht aber der PPIase-Bindeseite des FK506. Wie erwartet inhibierte Verbindung **21** *h*FKBP12 vergleichbar zu FK506. Eine Bindung von Verbindung **21** an *h*FKBP12 zeigte auch die fluoreszenzspektroskopische Untersuchung der intrinsischen Fluoreszenz des Trp⁵⁹ des *h*FKBP12. Die Verbindung **21** induzierte ähnlich FK506 eine Abnahme des Fluoreszenzsignals, nur mit dem Unterschied, dass keine langsame *cis/trans*-Isomerisierung nach der Bindung nachweisbar war (Abb.29B). Demgegenüber steht Verbindung **22**. Durch ihre modifizierte PPIase-Bindestelle, ist sie nicht in der Lage *h*FKBP12 bis zu einer Inhibitorkonzentration von 100 nM zu inhibieren (Abb.29B), da keine Bindung an das *h*FKBP12 mehr erfolgen konnte.

Beide Verbindungen vermochten nicht, die Phosphatase-Aktivität von CaN zu inhibieren und die Expression des NFAT-Reportergens zu unterdrücken. Verbindung **21** konnte zwar einen Komplex mit *h*FKBP12 bilden, aber durch die Modifizierung der CaN-Bindestelle des Makrolids war eine effektive Bildung des ternären *h*FKBP12*[**21**]*CaN-Komplexes nicht möglich. Da Verbindung **22** nicht in der Lage war, *h*FKBP12 im aktiven Zentrum zu binden, war dadurch eine Ausbildung des ternären Komplexes *h*FKBP12*[**22**]*CaN unmöglich. Beide Verbindungen sind daher nicht-immunsuppressiv.

3.4 Synthese und biochemische Eigenschaften neuartiger Cycloheximid-Derivate

Cycloheximid und seine Derivate besitzen neben anderen biologischen Aktivitäten die Fähigkeit, die PPIase-Aktivität von FKBP zu inhibieren. Durch verschiedene Substituenten am Acetamid-Stickstoff sollten die FKBP-inhibitorischen Eigenschaften verbessert werden. In der Kristallstruktur des Cycloheximid-*N*-ethanoat (PDB ID:2KO7) im Komplex mit dem MIP-homologen FKBP aus *Burkholderia pseudomallei* (BpML1)^[66], ist zu erkennen, dass das Derivat nicht in gleicher Weise wie FK506 in das aktive Zentrum bindet^[124]. FK506 bindet mit dem Pipecolinyling in die hydrophobe Tasche des aktiven Zentrums des Enzyms, wohingegen das Cycloheximid-*N*-ethanoat außerhalb der hydrophoben Tasche im aktiven Zentrum bindet. Es bildet keine signifikanten Interaktionen mit den Resten des aktiven Zentrums Tyr³³ und Phe⁵⁷ aus, während es mit Ala⁹⁴ und Ile⁹⁸ interagiert. Aus der Kristallstruktur wird ebenfalls ersichtlich, dass der Ethylester über dem Trp⁷⁰ der hydrophoben Tasche des aktiven Zentrums des BpML1 liegt (Abb.49A).

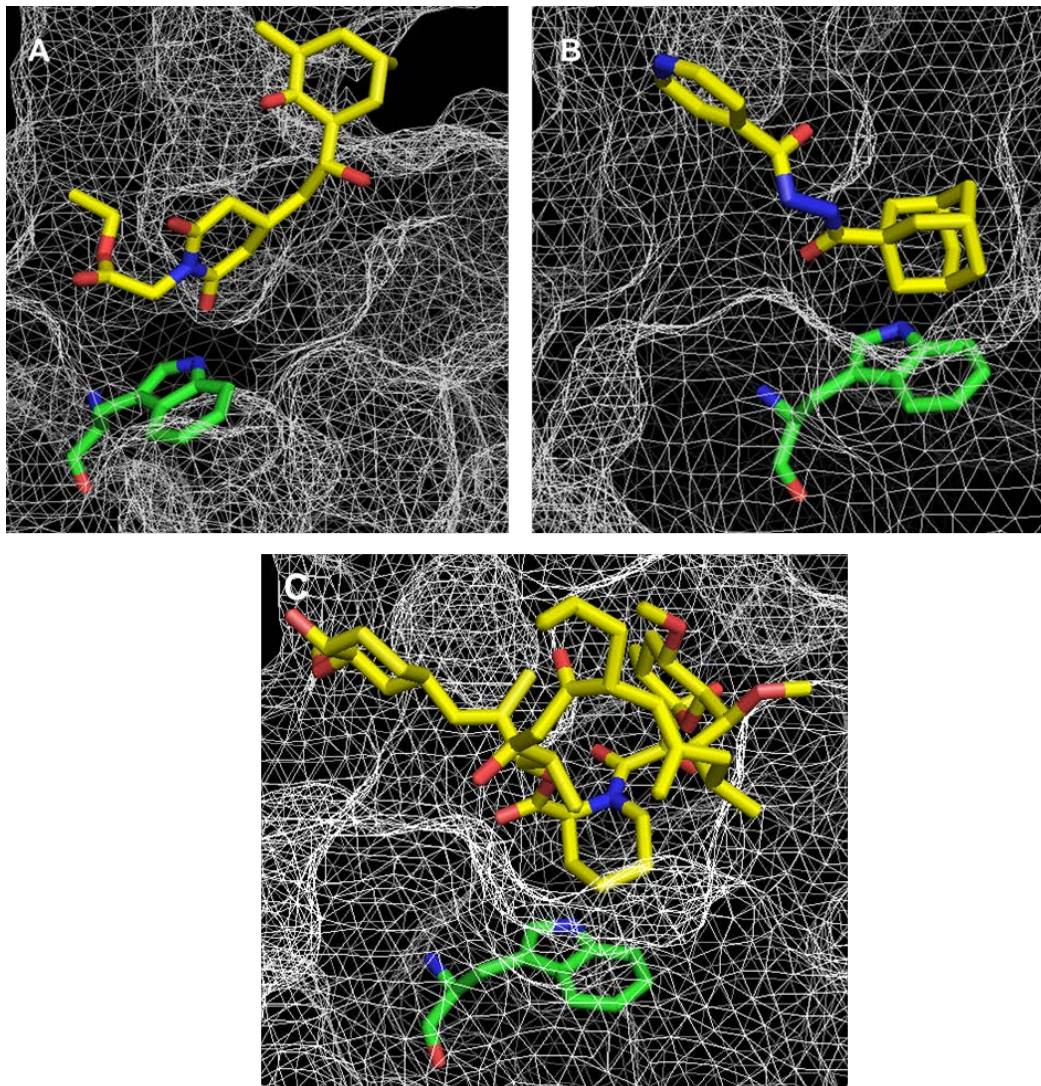


Abbildung 49: A) Kristallstruktur (PDB ID:2KO7) des Cycloheximid-*N*-ethanoat (gelb) im Komplex mit BpML1 (Oberfläche als weißes Netz dargestellt). Der Ethylester des Derivates liegt oberhalb des Trp⁷⁰ (grün) der hydrophoben Tasche des BpML1. B) Kristallstruktur (PDB ID:4MGV) für das Adamantan-Derivat Supradamal (gelb) im Komplex mit dem pvFKBP35 (weißes Netz). Der Adamantylrest wechselwirkt, analog dem Pipecolinyling des FK506 im hFKBP12, mit den Aminosäuren der hydrophobe Tasche des pvFKBP35, unter anderem auch mit dem Trp⁷⁷ (grün) am Boden der hydrophoben Tasche. C) Kristallstruktur des FK506 (gelb) im Komplex mit hFKBP12 (weißes Netz). Der Pipecolinyling des FK506 wechselwirkt mit dem Trp⁵⁹ am Boden der hydrophoben Tasche des aktiven Zentrums.

Vergleicht man die Sequenz des BpML1 mit der des hFKBP12 zeigt sich, dass sich beide Proteine mit einer Identität von 56 % sehr ähnlich sind. Wesentliche Aminosäuren des aktiven Zentrums (Abb.50) sind konserviert. Daraus lässt sich ein ähnlicher Bindungsmodus für das Cycloheximid-Derivat im hFKBP12 vermuten.

```

hFKB12      -----MGVQVETISPGDGRTFPKRGQTCVVHYTGMLEDGKKFDSSRDR 43
BpML1       MTVVTTESGLKYEDLTEGSG-AEARAGQTVSVHYTGWLTDGQKFDSSKDR 49
              *:: * :: * .* : .: *** ***** * **:*****:**

hFKB12      NKPFFKMLGKQEVIRGWEEGVAQMSVQRAKLTISPDIYAGATGHPGITIP 93
BpML1       NDPFAFVLGGMVIKGWDEGVQGMKVGVRRLTIPPQLGYGARGAGGVIP 99
              *.* ** *:** **::**:* *.* ** :***. *: .*** * *:**

hFKB12      PHATLVFDVLELLKLE 108
BpML1       PNATLVFEVLELLDV- 113
              *:*****:*****.:

```

Abbildung 50: Sequenzalignment der PPIasen *hFKBP12* und *BpML1*. In gelb sind die konservierten Aminosäuren der hydrophoben Tasche gekennzeichnet und in grün die restlichen Aminosäuren des aktiven Zentrums des *hFKBP12* und die entsprechenden konservierten Aminosäurereste in *BpML1*.

Es sollte nun untersucht werden, ob die Effektivität der FKBP-Bindung von Cycloheximid-Derivaten erhöht werden kann, wenn man das CHX mit einer Substanz kovalent verknüpft, die in die hydrophobe Tasche des *hFKBP12* bindet. Eine für die Verknüpfung in Frage kommende Substanz war das Adamantan.

Es existiert bereits eine Kristallstruktur für das Adamantan-Derivat Supradamal im Komplex mit dem *pvFKBP35* aus *Plasmodium vivax* (PDB ID:4MGV)^[125] (Abb.49B). Sie zeigt, dass der Adamantylrest analog dem Pipecolinylrest des FK506 in die hydrophobe Tasche des *pvFKBP35* bindet und mit den konservierten Aminosäuren dieser Tasche, u.a. mit dem Trp⁷⁷ (Trp⁵⁹ in *hFKBP12*), hydrophobe Wechselwirkungen eingeht. Weiterhin identifizierten BABINE *et al.* durch Docking-Studien Adamantan und seine Derivate als potenzielle *hFKBP12*-Inhibitoren^[126].

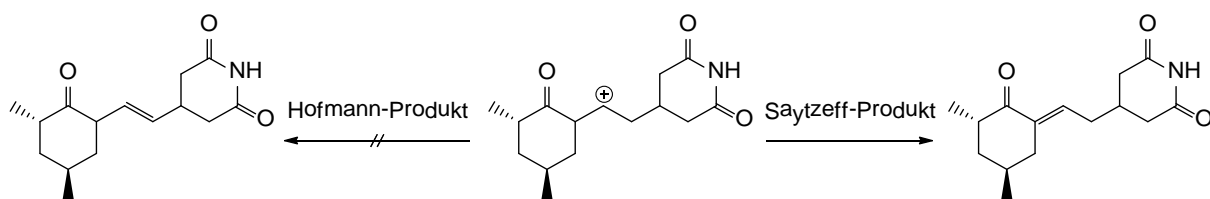
Durch die Verknüpfung des *N*-(Carboxymethyl)-Cycloheximid (**11**) mit dem 1-Aminoadamantan zum *N*-(*N'*-Adamantylcarboxyamidomethyl)-Cycloheximid (**30**) gelang die Synthese eines Cycloheximid-Derivates, welches das *hFKBP12* erstmals im nanomolaren Bereich inhibierte. Mittels Fluoreszenzspektroskopie wurde die Bindung der Verbindung **30** an das *hFKBP12* untersucht. Dazu wurde die intrinsische Fluoreszenz des einzigen Trp⁵⁹ des *hFKBP12* am Boden der hydrophoben Tasche genutzt (Abb.36). Die Abnahme des Signals der Fluoreszenzemission nach Zugabe von Verbindung **30** zu *hFKBP12* weist auf Wechselwirkungen des Adamantylrestes mit den Aminosäuren der hydrophobe Tasche der aktiven Seite des *hFKBP12* hin, die den Grund für die hohe Affinität der Verbindung zu *hFKBP12* darstellen könnte. Hydrophobe Substituenten am Adamantan in den Verbindung **31**, **33** und **34**, führen zu sinkenden IC₅₀-Werten, wohingegen hydrophile Substituenten, wie in Verbindung **32** und **35**, zu steigenden IC₅₀-Werten führten. Das zeigt die große Bedeutung von hydrophoben Wechselwirkungen des Adamantylrestes für die Stärke der Interaktion.

Durch den Austausch des Adamantangerüsts durch kleinere, hydrophobe Ringsysteme in den Verbindungen **43-46** wurde versucht, den IC₅₀-Wert der Inhibition der *hFKBP12*-PPIase-

Aktivität weiter zu senken. Dies gelang nur mit Verbindung **44**, die ein Bornylringsystem trägt. Offensichtlich war diese Gruppierung am besten in der Lage, mit den Aminosäuren der hydrophoben Tasche des *hFKBP12* zu wechselwirken.

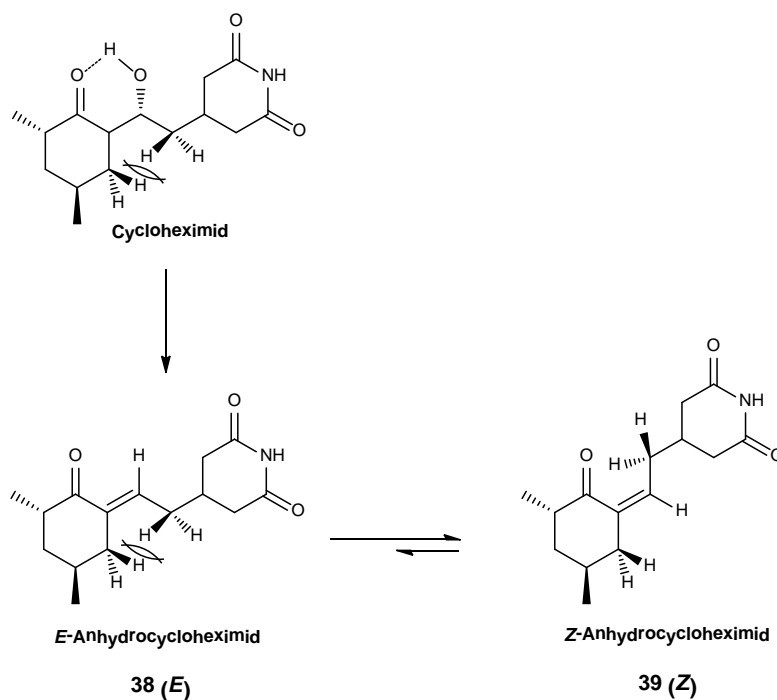
3.4.1 Verbindungen mit modifizierten FKBP-Bindestellen

Neben der Verknüpfung mit Liganden einer alternativen Bindestelle im aktiven Zentrum von *hFKBP12* wurde versucht, direkt den Bereich des CHX, mit dem es mit FKBP interagiert, zu modifizieren. Dazu wurde die Hydroxylgruppe der Ethylbrücke durch Dehydratation entfernt um die Anhydrocycloheximid-Derivate **38 (E)** und **39 (Z)** zu erhalten. Cycloheximid und seine Derivate sind β -Hydroxy-Ketoverbindungen und dehydratisieren im sauren Milieu leicht, unter β -Eliminierung, zu den Anhydrocycloheximid-Derivaten. Die Triebkraft der Reaktion ist die Bildung einer auf Grund von Hyperkonjugation stabilisierten und damit energieärmeren α, β -ungesättigten Carbonylverbindung. Der der Reaktion zugrunde liegende Mechanismus ist der einer Eliminierungsreaktion erster Ordnung (E1). Nach Abspaltung der Hydroxylgruppe und Abstraktion des α -ständig Wasserstoffatoms bildet sich eine Doppelbindung. Welches der beiden α -ständig Protonen abstrahiert wird, kann mit der SAYTZEFF- und HOFMANN-Regel sowie mit elektronischen Effekten vorhergesagt werden. Von einem SAYTZEFF-Produkt spricht man, wenn das Proton an der Alkylgruppe mit der geringsten Anzahl an Wasserstoffatomen abstrahiert wird, im Gegensatz zum HOFMANN-Produkt, bei dem die Deprotonierung an der Alkylgruppe mit der größten Anzahl an Wasserstoffatome erfolgt. Betrachtet man die elektronische Umgebung des Carbeniumions, so befindet sich links in β -Position eine Carbonylgruppe und rechts eine Alkylgruppe. Die Alkylgruppe erhöht auf Grund ihres +I-Effektes die Elektronendichte der rechten α -C-H-Bindung und erschwert die Abstraktion des Protons. Im Gegensatz dazu verringert die Carbonylgruppe durch ihren -I-Effekt, die Elektronendichte am linken α -C-H-Bindung, was zu einer leichteren Deprotonierung führt. Somit ist das sich bevorzugt bildende Regioisomer das SAYTZEFF-Produkt (Schema16).



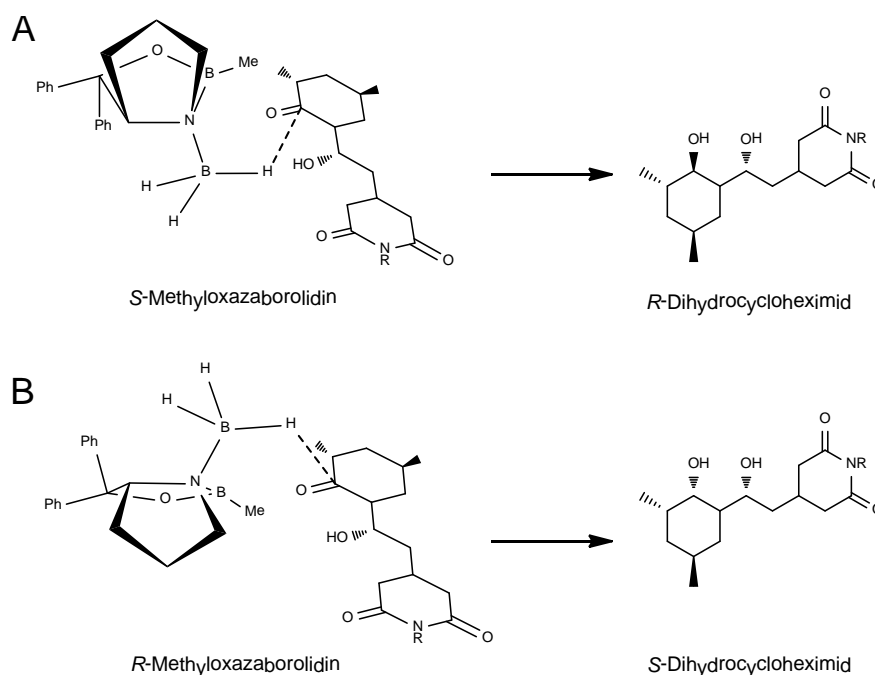
Schema 16: Darstellung des HOFMAN- oder SAYTZEFF-Produktes nach der β -Eliminierung. Nach Entstehen des intermediären Carbenium-Ions können sich zwei Regioisomere bilden, die sich einzig durch die Lage der Doppelbindung unterscheiden.

Das sich nach dem Verlassen der Hydroxylgruppe intermediär bildende, planare Carbeniumion ermöglicht eine freie Rotation um die C–C-Bindungsachse wodurch eine Isomerisierung eintritt. Normalerweise entstehen so *cis*- und *trans*-Isomere (bzw. *Z*- und *E*-Isomere) mit gleicher Wahrscheinlichkeit, es sei denn, sterische- und/oder elektronische Effekte bewirken eine Destabilisierung eines der Diastereomeren. Das Diastereomergleichgewicht des Anhydrocycloheximid liegt auf Seiten des *Z*-Isomers. Beim Betrachten des Cycloheximid ist zu erkennen, dass die verbrückende Alkylkette *trans* zur Carbonylgruppe des Cyclohexanons angeordnet ist. In dieser Konformation kommt es zu sterischen Hinderungen zwischen den Wasserstoffatomen der Kohlenstoffatome C₅ und C₈. Allerdings ist in dieser Konformation die Bildung einer Wasserstoffbrückenbindung zwischen der Carbonylgruppe an C₁ und dem Wasserstoffatom der Hydroxylgruppe an C₇ begünstigt. Der daraus resultierende sechs-gliedrige Ring stabilisiert diese Konformation. Dieser, die *trans*-Konformation stabilisierende, Effekt fehlt nach der Dehydratisierung. Diese nachteilige Wechselwirkung im *E*-Anhydrocycloheximid führt zur Verschiebung des Isomergleichgewichtes zu Gunsten des *Z*-Isomers (Schema17)^[127].



Schema 17: Schematische Darstellung der bevorzugten Stereochemie des Anhydrocycloheximid. Im Cycloheximid kommt es zu einer ungünstigen sterischen Wechselwirkung zwischen den Wasserstoffatomen am C₅ und am C₇, die jedoch durch die begünstigte Wasserstoffbrückenbindung zwischen der Hydroxylgruppe und der Carbonylgruppe toleriert wird (oben). Durch das Fehlen der Hydroxylgruppe in den Anhydrocycloheximid-Derivaten wird der ungünstigen sterischen Wechselwirkung durch die Favorsierung des *Z*-Isomers entgegengewirkt.

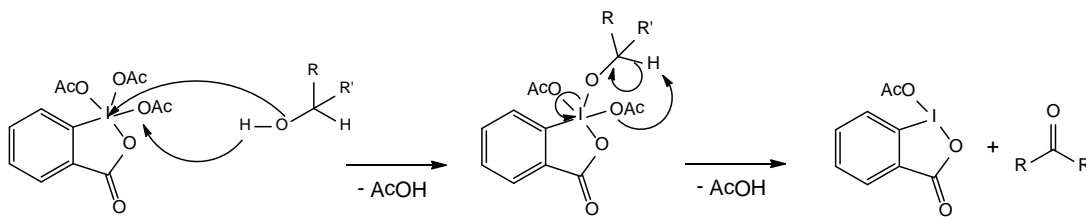
Der einfachste Weg der Synthese von Dihydrocycloheximid-Derivaten ist die Hydrierung mit Wasserstoff unter Palladiumkatalyse. Diese Reaktion birgt allerdings zwei Nachteile. Zum einem ist sie nicht enantioselektiv, sodass immer ein racemisches Gemisch entsteht. Zum anderen läuft sie nur unter Katalyse durch ein Schwermetall ab, welches nach erfolgter Reaktion wieder entfernt werden muss. Es ist wichtig, aber oft sehr umständlich, die Schwermetallkatalysatoren sorgfältig zu entfernen, da sie ansonsten in folgenden biochemischen Untersuchungen falsche Ergebnisse verursachen können. So erfolgte die Synthese der Dihydrocycloheximid-Derivate **40(R)** und **41(S)** auf einer im Jahre 1987 von COREY, BAKSHI und SHIBATA (CBS)^[128] entwickelten und auf Arbeiten von ITSUNO^[129] aufbauende enantioselektive Reduktionsmethode. Diese Reaktion ermöglicht, unter Katalyse eines chiralen Oxazaborolidin, die Reduktion achiraler und prochiraler Carbonylverbindungen in Gegenwart eines Borans (Schema18).



Schema 18: Reaktionsmechanismus der enantiomerenreinen Reduktion mit Boran unter Zuhilfenahme der chiralen Auxilliare (*R*)- bzw. (*S*)-2-Methyl-CBS-oxazaborolidin (Details siehe Text).

Um das Dehydrocycloheximid-Derivat **42** zu erzeugen, erfolgte die Oxidation der Hydroxylgruppe an Position sieben zur Ketogruppe laut Literatur^[130] mittels Chrom(VI)-oxid in Eisessig. Diese Methode führte zwar zu dem gewünschten Produkt, doch birgt sie einige Nachteile. Die hohe Toxizität des Chrom(VI)-oxid, die harten Reaktionsbedingungen, die lange Reaktionszeit, sowie die umständliche Aufarbeitung, bei der immer Spuren des Schwermetalls zurückbleiben, waren der Grund für einen neuen Syntheseansatz. Dieser

fand sich in der DESS-MARTIN-Oxidation. Diese Reaktion verläuft in zwei aufeinanderfolgenden Schritten. Im ersten Schritt greift der Alkohol nucleophil am Iodatom des Periodinans unter Abspaltung eines Moleküls Essigsäure an, wobei sich intermediär ein Diacetoxyalkoxyperiodinan bildet. Im zweiten Schritt kommt es nun zu einer α -H-Eliminierung am Alkohol, wobei dieser oxidiert wird und das Molekül zusammen mit einem weiteren Molekül Essigsäure, verlässt (Schema19). Durch die DESS-MARTIN-Oxidation war es auf einfachen Weg möglich, das Dehydrocycloheximid zu erzeugen.



Schema 19: Reaktionsmechanismus der Oxidation der Hydroxylgruppe des Cycloheximids zum Dehydro-Derivat.

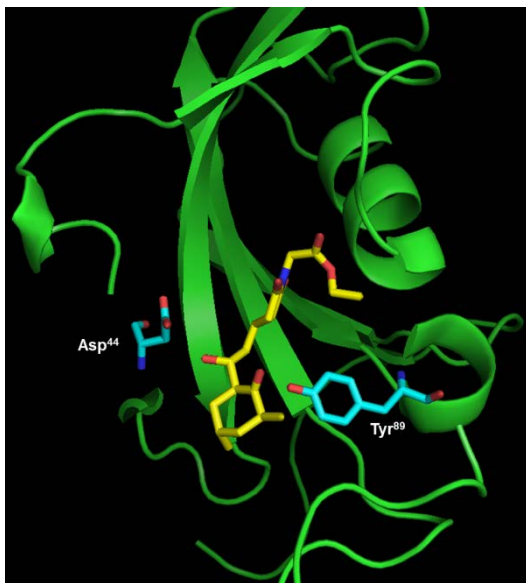


Abbildung 51: Kristallstruktur (PDB ID:2KO7) des Cycloheximid-*N*-ethanoat (gelb) im Komplex mit BpML1 (grün). In Blau sind die Aminosäurereste Asp⁴⁴ und Tyr⁸⁹ des BpML1 dargestellt. Asp⁴⁴ wechselwirkt mit der OH-Gruppe der Ethylbrücke während Tyr⁸⁹ mit der Carbonylgruppe des Cyclohexanonringes interagiert.

Betrachtet man das Cycloheximid-*N*-ethanoat im Komplex mit BpML1, erkennt man Wechselwirkungen zwischen der Carbonylgruppe und dem Asp⁴⁴ sowie zwischen der Hydroxylgruppe der Ethylbrücke und dem Tyr⁸⁹ [70] (Abb.51). Während in allen untersuchten FKBP das Tyr⁸⁹ in BpML1 entsprechende Tyr konserviert vorliegt, ist bei *Ip*FKBP25 an Stelle des Asp⁴⁴ im BpML1 ein Gln-Rest vorhanden (Abb.52). Alle anderen untersuchten FKBP tragen an dieser Stelle ein Asp. Allerdings scheint dieser

Unterschied nicht verantwortlich für die schlechtere Inhibition zu sein. Eher scheint es, dass die FKBP sensibler auf die Modifikation der Hydroxylgruppe, als auf die der Carbonylgruppe reagieren.

```

hFKB12          ETISP-----GDGRTPFKRGQTCVVHYTGMLE-DGKKFDSSR 41
hFKB12.6       ETISP-----GDGRTPFKKGQTCVVHYTGMLQ-NGKKFDSSR 41
hFKB13         AEGKRKLQIG---VKRVDHCPIKSRKGDVLHMHYTGKLE-DGTEFDSSL 70
hFKB25         EETLDEGPPKYTKSVLKKGDKNFPKKGDVVHCWYTGTLQ-DGTVFDTNI 149
hFKB51         EDITSKKDRGVLKIVKRVNGEETPMIGDKVYVHYKGKLS-NGKKFDSSH 71
hFKB52         VDISPKQDEGVLKVIKREGTGTEPMIGDRVVFVHYTGWLL-DGTFKFDSSL 71
pfFKB35        GVIKTILKKG-----DEGEENIPKKGNEVTVHYVGKLESTGKVFDFSSF 59
BpML1          EDLTE-----GSGAEAR-AGQTVSVHYTGWLT-DGQKFDSSK 47
lpFKB25        IDVNP-----EAMAKGMQDAMSGAQLALTEQQMKD-VLNKFKDKL 64
                *                               * : . .

hFKB12          DRNK-----PFKFM LGKQEVIRGWEEGVAQMSVGRAKLTISPDIAYG 84
hFKB12.6       DRNK-----PFKFRIGKQEVIKGFEEGAAQMSLGQRAKLTCTPDVAYG 84
hFKB13         PQNQ-----PFVFSLGTGQVIKGDWQGLLGMCEGEKRLVIPSELGYG 113
hFKB25         QTSAKKKKNAKPLSFKVGVGKVIKGDWDEALLTMSKGEKARLEIEPEWAYG 199
hFKB51         DRNE-----PFVFSLKGQVIKAWDIGVATMKKGEICHLLCKPEYAYG 114
hFKB52         DRKD-----KFSFDLGKGEVIKAWDIAIATMKVGEVCHITCKPEYAYG 114
pfFKB35        DRNV-----PFKFHLEQGEVIKGDICVSSMRKNEKCLVRIESMYGYG 102
BpML1          DRND-----PFAFVLGGGMVIKGDWDEGVQGMKVGVRRLTIPPLGYG 90
lpFKB25        MAKR-----TAEFNK-KADENKVKGEAFLTENKNKPGVVVLPGLQYK 106
                *                               :                               *

```

Abbildung 52: Sequenzalignment der untersuchten PPlasen *hFKBP12*, *hFKBP12.6*, *hFKBP13*, *hFKBP25*, *hFKBP51*, *hFKBP52*, *pfFKBP35*, *lpFKBP25* und BpML1. In gelb sind die Aminosäuren Asp⁴⁴ und Tyr⁸⁹ des BpML1 dargestellt, welche mit der Carbonylgruppe des Cyclohexylringes und der Hydroxylgruppe der Ethylbrücke wechselwirken. Sie sind in den anderen dargestellten FKBP konserviert.

4 Untersuchung der Substanzen 7, 20, 21 und 22 im Tiermodell der Multiplen Sklerose und dem Morbus Parkinson

Eine Vielzahl von Studien sowohl an neuronalen Zellkulturen als auch in Tiermodellen der Multiple Sklerose (MS) und des Morbus Parkinson zeigten, dass Liganden der FK506-bindenden Proteine als auch der Cyclophiline einen neuartigen therapeutischen Ansatz zur Behandlung der Krankheit darstellen könnten, indem sie nicht nur die Symptome lindern, sondern durch Protektion vor dem neuronalen Zelltod direkt in die Pathogenese der Erkrankung eingreifen^{[131],[132],[133],[42], [134],[135]}.

4.1 Die Experimentelle Autoimmune Enzephalomyelitis als Tiermodell der Multiplen Sklerose

Multiple Sklerose ist eine chronisch entzündliche, T-Zell-vermittelte Autoimmunerkrankung^{[136],[137]} des Zentralnervensystems (ZNS)^[138], die mit einer Demyelinisierung (Entmarkung) von Axonen der Nervenzellen im Gehirn und Rückenmark verbunden ist und zu neurologischen Ausfallerscheinungen führt. Fokale, scharf abgegrenzte Entmarkungsherde, die mit Inflammationen, Infiltration und Aktivierung von Immunzellen (Mikroglia/Makrophagen), reaktiver Gliose und Axon- sowie Neurodegeneration assoziiert sind, sind die wesentlichen pathologischen Merkmale der MS.

Die EXPERIMENTELLE AUTOIMMUNE ENZEPHALOMYELITIS (EAE) ist eine der humanen MS ähnelnde Erkrankung des zentralen Nervensystems und wird als Tiermodell der MS verwendet^[139]. In ihr wird durch eine Antigen-induzierte Autoimmunreaktion gegen Oligodendrocyten, die zellulären Bestandteile der axonalen Myelinscheide, durch Injektion verschiedener Proteine ausgelöst. Dies führt zur Entmarkung (Demyelinisierung) der Axone (Abb.53) und zum Verlust von Nervenzellen und Nervenfasern^[136]. Die Antigen-induzierte Entmarkung dominiert das frühe, schubförmige Krankheitsstadium der EAE. Als Reaktion auf die Demyelinisierung kommt es innerhalb der Axone zum starken und langanhaltenden Anstieg des oxidativen Stresses, der die Apoptose der Zellen zur Folge hat. Diese beherrscht den weiteren Krankheitsverlauf und ist verantwortlich für die sekundär chronisch-progrediente Verschlechterung der Erkrankung.

In dem in dieser Arbeit verwendeten EAE-Modell wurde die Antigen-induzierte Autoimmunreaktion durch subkutane Gabe des Proteolipid Protein PLP₁₃₉₋₁₅₁ in weiblichen SJL/J Mäusen ausgelöst. Die Verbindungen (10 mg/kg/d) oder die Vehikel (DMSO/0.1 M PBS, pH 7.2 (30:70 w/w) wurden durch miniosmotische Pumpen kontinuierlich für 28 Tage nach Auslösen der EAE intraperitoneal appliziert. Der klinische EAE-Score der Mäuse wurde täglich über 33 Tage an Hand einer standardisierten EAE-Skala, von unauffällig bis Tod, ausgewertet. Die histopathologischen und immunhistochemischen Analysen von Corona-Gewebsschnitten des zervikalen Rückenmarks erfolgte durch Anfärben unterschiedlicher Zellen und Strukturen, die spezifisch eine Degeneration im Verlauf einer EAE anzeigen. Dazu wurden die axonalen Myelinscheiden einer Black-Gold-Myelin-Färbung unterzogen, hier manifestieren sich MS-Symptome durch Verringerung der intakten Myelinscheiden. Die Perikarya der α -Motoneuronen wurden durch eine Nissl-Färbung sichtbar gemacht, in erkranktem Gewebe sind diese verringert. Für die Färbung der für MS typischen aktivierten Hirn-residierender Mikroglia und Makrophagen wurde der Antikörper Iba1 verwendet, wohingegen die eingewanderten Makrophagen und Leukozyten durch einen CD45-Antikörper gefärbt wurden. Die axonalen Neurofilamente der α -Motoneuronen wurden mit dem Antikörper NF200 und deren axonaler Zellkörper mittels NeuN-Antikörper gefärbt, im erkrankten Gewebe nehmen diese ab.

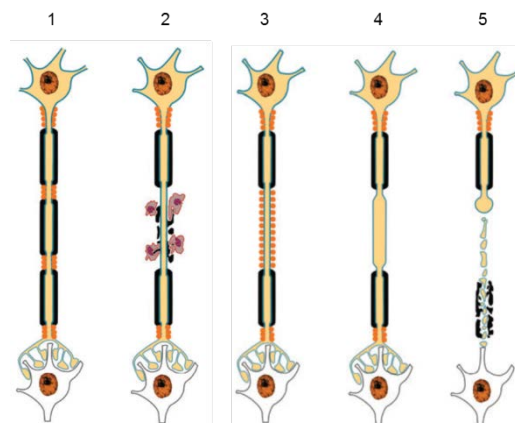


Abbildung 53: Darstellung des Verlaufs des neuronalen Sterbens bei der Multiplen Sklerose. Eine Entzündungsreaktion der intakten Neuronen (Abb.53-1) führt zur Entmarkung (Demyelinisierung), welche in den frühen, schubförmigen Krankheitsstadien dominiert (Abb.53-2). Bereits zu diesem Zeitpunkt tritt durch die Demyelinisierung eine axonale Schädigung auf, der neuronale Zelltod kann jedoch noch kompensiert werden (Abb.53-3). Wird jedoch eine kritische Schwelle überschritten, bei der endogene Kompensationsmechanismen erschöpft sind, kommt es unabhängig von inflammatorischen Ereignissen zu einem Anschwellen des Axons (Abb.53-4) und im weiteren Verlauf zu einer fortschreitenden Neurodegeneration in Form von Apoptose der Neuronen (Abb.53-5). Modifiziert nach TRAPP *et al.*^[140].

4.2 Das 6-Hydroxydopamin-Modell als Tiermodell des Morbus Parkinson

Der Morbus Parkinson ist eine progressive neurodegenerative Erkrankung, welche durch klinische Symptome wie Brady- bzw. Akinese, Rigidität und Tremor gekennzeichnet ist^[141]. Die Mehrheit der motorischen Störungen werden durch den Verlust dopaminerger Neuronen innerhalb der Substantia nigra pars compacta (SNpc) hervorgerufen, welche ein Absinken des Dopaminspiegels im Striatum zur Folge hat^[142]. Zum Zeitpunkt des Auftretens der ersten Symptome sind bereits 80-85 % der Dopamin produzierenden Zellen der SNpc degeneriert sowie nahezu 80 % des striatalen Dopaminlevels verloren^{[143],[144]}.

Als Tiermodell für die Parkinson'sche Erkrankung dient das 6-Hydroxydopamin (6-OHDA)-Modell. In diesem Modell erzeugt eine unilaterale 6-OHDA-Injektion in das mittlere Vorhirnbündel von SPRAGUE-DAWLEY-Ratten eine unilaterale Degeneration dopaminerger Neuronen in der SNpc der ipsilateralen Hemisphäre. Die Degeneration wird ausgelöst durch einen sprunghaften Anstieg des oxidativen Stresses nach Injektion des 6-OHDA. Auf Grund seiner strukturellen Ähnlichkeit zum Dopamin besitzt 6-OHDA eine hohe Affinität zu dem transmembranen Dopamintransporter, welcher es in die dopaminergen Zellen transportiert. Dort wird es zu hochreaktiven und sehr toxischen Sauerstoffspezies abgebaut und wirkt gleichzeitig als Inhibitor der mitochondrialen Komplexe I und IV der Atmungskette^{[145],[146]}. Beide Ereignisse führen zu mitochondrialer Dysfunktion, oxidativem Stress und zu einer Störung der Calcium-Homöostase, in deren Folge die Zelle in Apoptose übergeht. Diese Störungen sind eng mit der Pathogenese der PD assoziiert^{[147],[148]}, weshalb das 6-OHDA-Modell das am weitesten verbreitete Tiermodell für Untersuchungen des Morbus Parkinson darstellt.

Es wurden zwei verschiedene Parameter für die Bestimmung des neuroprotektive Potentials der Verbindungen untersucht: 1) die Anzahl der durch Apomorphin ausgelösten kontralateralen Rotationen innerhalb eines definierten Zeitintervalls und 2) der Verlust andopaminerger neuronaler Zellen in der ipsilateralen SNpc. Die kontinuierliche intraperitoneale Gabe der Wirkstoffe (1 mg/kg/d) oder der Vehikel begann unverzüglich nach Induktion der Läsion und wurde für 10 Tage fortgeführt. Die durch Apomorphin ausgelöste kontralaterale Rotation wurde am Tag 7 und 14 nach Erzeugen der Läsionen ausgewertet. Unmittelbar im Anschluss an den letzten Rotationstest wurde das Ausmaß des Verlustes an dopaminergen Zellen mittels immunhistochemischer Detektion und Quantifizierung der

überlebenden Tyrosinhydroxylase(TH)-positiven dopaminergen Neuronen in der SNpc bestimmt.

Für die Untersuchung der dualen Inhibitoren in dem EAE-Tiermodell der Multiplen Sklerose und dem 6-Hydroxydopamin-Tiermodell des Morbus Parkinson wurden die Verbindungen **7** und **20** ausgewählt. Die Auswahl erfolgte anhand ihrer Fähigkeit zur Inhibition der PPIase-Aktivität. Verbindung **7** repräsentiert dabei den dualen Inhibitor mit FK506 und [D-Ser]⁸-CsA als Wirkstoffgruppen, der unter den untersuchten Derivaten *hCypA* und *hFKBP12* am effizientesten inhibierte. Verbindung **20** repräsentiert den dualen Inhibitor mit den Wirkstoffgruppen CHX und [D-Ser]⁸-CsA, der *hFKBP12* und *hCypA* am effizientesten inhibierte. Verbindung **21** und **22** als nicht-immunsuppressive FK506-Derivate dienen als Kontrollsubstanzen, wobei Verbindung **21** die PPIase-Aktivität von *hFKBP12* gut inhibierte, während Verbindung **22** *hFKBP12* nicht inhibieren konnte.

4.3 Ergebnisse der Verbindungen 7, 20, 21, 22 in den EAE- und 6-OHDA-Tiermodellen

4.3.1 Die Verbindung 7 im EAE-Tiermodell der Multiplen Sklerose

Die Untersuchung hinsichtlich der neuroprotektiven Eigenschaften der dualen Inhibitoren mit FK506 und [D-Ser]⁸-CsA als Wirkstoffgruppen erfolgte für Verbindung **7** in dem Tiermodell EAE.

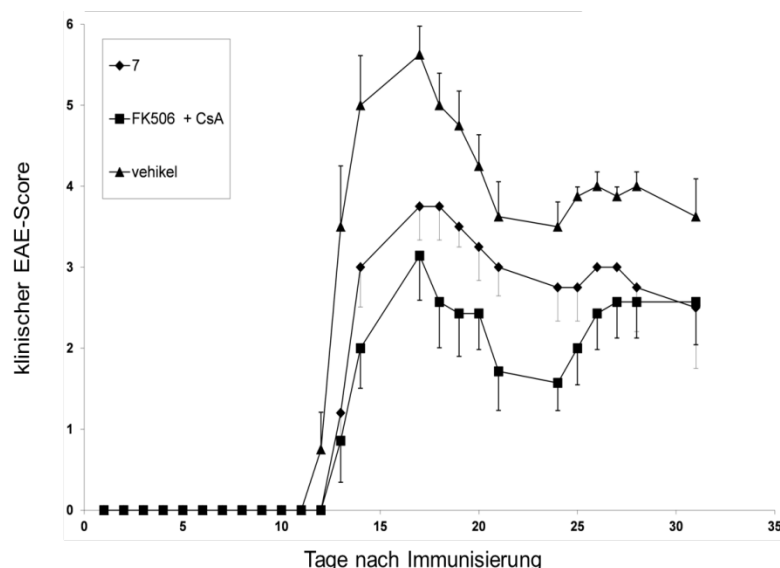


Abbildung 54: Auswirkung der Verbindung **7** auf den klinischen Score im EAE-Modell. Verbindung **7**, oder die kombinierten Gabe von FK506 und [D-Ser]⁸-CsA bewirken einen lang anhaltenden positiven Effekt auf den EAE-Score nach Immunisierung mittels PLP₁₃₉₋₁₅₁. Verbindung **7** (5 mg/kg/d), FK506 + CsA (jeweils 5 mg/kg/d) oder Vehikel wurden mittels implantiertes mini-

osmotischer Pumpen appliziert. Der klinische Score wurde täglich bestimmt und als Durchschnitt \pm SEM dargestellt. n = 10 Tiere pro Gruppe. (Durchführung und Auswertung durch Dr. Werner Schmidt und Dr. Frank Striggow von der Arbeitsgruppe Neurodegeneration und Interventionsstrategien am Deutschen Zentrum für Neurodegenerative Erkrankungen e.V. (DZNE)).

Die Analyse des EAE-Scores ergab, dass die untersuchten Mäuse EAE-Symptome 12-14 Tage nach der Immunisierung mit PLP₁₃₉₋₁₅₁ entwickelten (Abb.54). Die mit Verbindung **7** und der Kombination aus FK506 und CsA behandelten Tiere zeigten eine leichte Verzögerung beim Einsetzen der Symptome. Die klinischen Symptome der EAE sind charakterisiert durch einen scharfen Anfangspeak (Tag 12-20 nach der Immunisierung) und eine Plateauphase (Tag 21-32 nach der Immunisierung). Die intraperitoneale Infusion von Verbindung **7** erbrachte eine Reduktion der EAE-Symptome während der Peak- und Plateauphase. Im Vergleich zur Vehikel-behandelten Kontrollgruppe, wurde der EAE-Score um $40,4 \pm 9,5$ % an Tag 14 und $29,9 \pm 10,9$ % Tag 17 reduziert. Das Plateau zwischen dem Tag 23 und 32 wurde ebenfalls deutlich herabgesetzt. Verbindung **7** zeigte nur eine geringere Verschlechterung im Vergleich zur kombinierten Gabe von FK506 und CsA in ihrem nicht verbundenen und im Gegensatz zu Verbindung **7** vollkommen immunsuppressiven Zustand. Dies wurde durch histopathologische und immunhistochemische Analysen von Corona-Gewebsschnitten des zervikalen Rückenmarks nach dem 32. Tag der Immunisierung bestätigt. Im Gegensatz zur mit Vehikel behandelten Kontrollgruppe bewirkten Verbindung **7** oder die Kombination aus FK506 und CsA intakte axonale Myelinscheiden und schützten die α -Motoneuronen vor axonaler „Waller-ähnlicher Degeneration“ in der weißen und grauen Substanz des Rückenmarks, wie die Back-Gold-Myelin- und die Neurofilamentfärbung zeigten (Abb.55a-d, i-l). Die mit Vehikel behandelten Mäuse wiesen submeningeale Entzündungsherde in der weißen und grauen Substanz des zervikalen Rückenmarks, ausgelöst durch Infiltration peripherer CD45-positiver Leukozyten und Makrophagen (Abb.55f-g, weiße Pfeilköpfe) sowie durch aktivierte, im Hirn residente, Mikrogliazellen und Makrophagen auf (Abb.55f, weiße Pfeile).

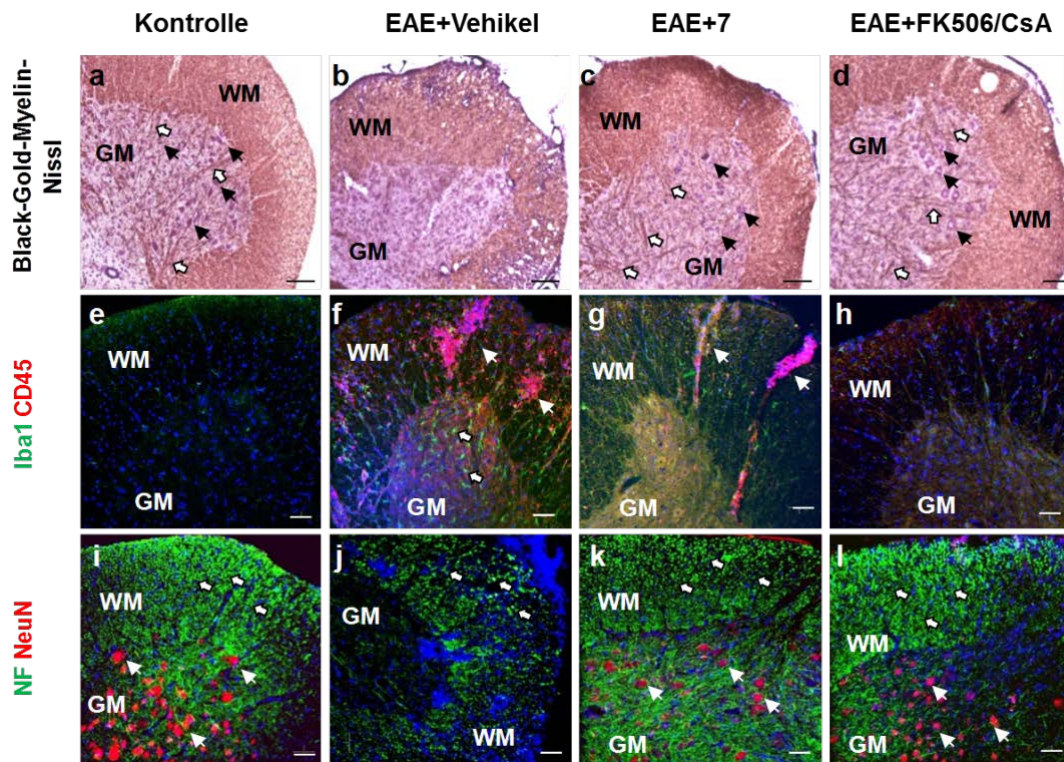


Abbildung 55: Repräsentative Schnitte des zervikalen Rückenmarks von Mäusen im EAE-Modell der Multiplen Sklerose. Repräsentative Schnitte des zervikalen Rückenmarks von nicht-immunisierten Kontrollmäusen (a, e, i) und EAE-Mäusen, welche mit Vehikeln (b, f, j), Verbindung 7 (c, g, k) oder FK506+Csa (d, h, l) behandelt wurden. Die Ansicht des dorsalen Teils des zervikalen Rückenmarks zeigte die weiße Materie (WM) und die graue Materie (GM), welche mit Black-Gold-Myelin-Nissl (a–d) gefärbt wurden. Intakte axonale Myelinscheiden der α -Motoneuronen (weiße Pfeile) fehlten in den mit Vehikeln behandelten Mäusen (b), waren aber beständig in den mit Verbindung 7 (c), oder in den mit FK506 und CsA simultan behandelten Tieren (d). Des Weiteren waren die Perikarya der α -Motoneuronen (schwarze Pfeilköpfe) nach Vehikel-Behandlung nicht mehr detektierbar (b), obwohl noch vorhanden nach Behandlung mit Verbindung 7 oder FK506/Csa (c, d). Zusätzlich wurden die Rückenmarksschnitte auf aktivierte, Hirn-residierende Mikroglia und Makrophagen (Iba1, weiße Pfeile) als auch auf eingewanderte Leukozyten und Makrophagen (CD45, weiße Pfeilköpfe) gefärbt (e-h). Verbindung 7 bewirkte eine starke Verminderung des Iba1 Signales, aber eine starke CD45 Färbung (g). Beide Zellmarker, Iba1 und CD45, wurden bei der Behandlung mit FK506/Csa nicht beobachtet (h). Weiterhin wurden die axonalen Neurofilamente (NF, weiße Pfeile) und die Zellkörper (NeuN, weiße Pfeilköpfe) der α -Motoneuronen angefärbt (i-l). Der Grund der α -Motoneuronen-Degeneration wurde deutlich in denjenigen Rückenmarksschnitten der EAE-Mäuse reduziert, welche mit Verbindung 7 (k) oder FK506/Csa (l) behandelt wurden. Skalierungsbalken: a-d = 100 μ m, e-l = 50 μ m. Durchführung und Auswertung durch Dr. Werner Schmidt und Dr. Frank Striggow von der Arbeitsgruppe Neurodegeneration und Interventionsstrategien am Deutschen Zentrum für Neurodegenerative Erkrankungen e.V. (DZNE)).

Beide die Entzündung auslösenden Prozesse wurden durch die simultane Gabe von FK506 und CsA unterbunden (Abb.55h). Die mit Verbindung 7 behandelten Tiere wiesen eine starke Reduktion aktivierter, Hirn-residenter Mikroglia und Makrophagen auf, wohingegen die Infiltration CD45-positiver Zellen ähnlich wie bei den mit Vehikel behandelten Tieren auftrat. Es zeigte sich, dass das zervikale Rückenmark bei Behandlung mit Verbindung 7 genau wie bei Behandlung mit einem Gemisch aus FK506 und CsA eine ähnliche Anzahl von intakten Neurofilamenten aufwies wie die Kontrolltiere (Abb.55k-l, weiße Pfeile). Im Gegensatz dazu besaß die nur mit Vehikel behandelte Gruppe von Mäusen mit EAE nur noch eine sehr geringe Anzahl intakter Neurofilamente. Eine starke NeuN-Färbung, welche das Vorhandensein intakter neuronaler Zellkörper anzeigt (Abb.55k-l, weiße Pfeilköpfe), deutete

auf eine effiziente neuronale Protektion in mit Verbindung **7** oder FK506/CsA behandelten Mäusen hin.

Auch die Verbindung **20** wurde im EAE-Tiermodell hinsichtlich ihres neuroprotektiven Potentials untersucht (Abb.56). Die mit Vehikel behandelten Tiere entwickelten die schwersten EAE-Symptome. Im Unterschied dazu wiesen die Tiere, welche mit Verbindung **20** oder DM-CHX behandelt wurden, eine klare Verbesserung des EAE-Scores auf. So senkte die Gabe von Verbindung **20** den EAE-Symptome anzeigenden Peak an Tag 17 um $19,9 \pm 3,3 \%$, verglichen mit den mit Vehikel behandelten Tieren.

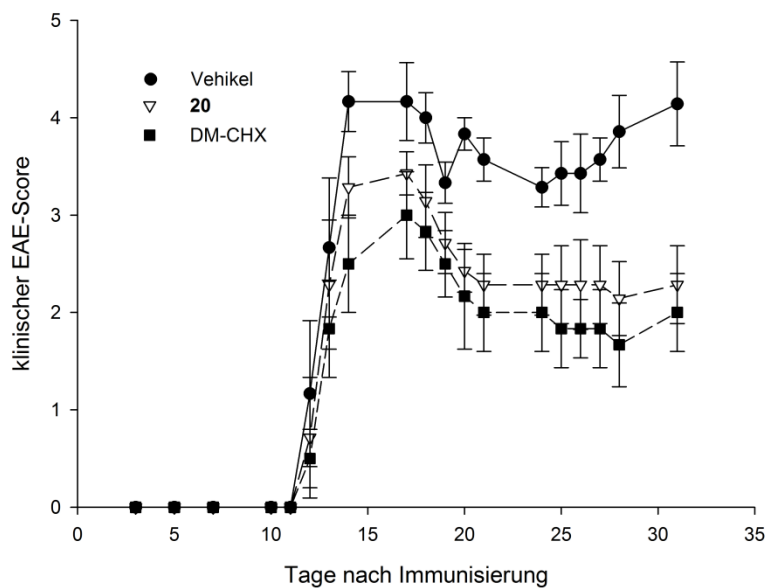


Abbildung 56: Auswirkung der Verbindung **20** auf den klinischen Score im EAE-Modell. Die EAE wurde in SJL/J-Mäusen durch Immunisierung mittels PLP₁₃₉₋₁₅₁ am Tag 0 induziert. Verbindung **20** (5 mg/kg/day) oder Vehikel wurden mittels implantierter miniosmotischer Pumpen appliziert. Verbindung **20** und DM-CHX als Kontrolle senkten den die Schwere der klinischen Symptome anzeigenden EAE-Score, verglichen zu den mit Vehikel behandelten Mäusen. Der klinische Score wurde täglich bestimmt und als Durchschnitt \pm SEM dargestellt. n = 10 Tiere pro Gruppe. (Durchführung und Auswertung durch Dr. Werner Schmidt und Dr. Frank Striggow von der Arbeitsgruppe Neurodegeneration und Interventionsstrategien am Deutschen Zentrum für Neurodegenerative Erkrankungen e.V. (DZNE)).

DM-CHX dagegen erreichte eine Reduktion des EAE-Scores am 17. Tag um $28,6 \pm 6,4 \%$, im Vergleich zur Vehikel behandelten Kontrollgruppe. Eine deutliche Reduktion der EAE-Symptome gelang sowohl mit **20** als auch DM-CHX während der Plateau-Phase von Tag 18-31. Im Mittel senkte **20** die klinischen Symptome um $33,4 \pm 8,1 \%$, DM-CHX sogar um $41,7 \pm 9,4 \%$. Bei allen Tieren setzten die ersten Symptome der EAE nach 12 Tagen nach der Immunisierung mit PLP₁₃₉₋₁₅₁ ein.

Zur Analyse der Rolle der Inhibition der PPIase-Aktivität von FKBP im Vergleich zur Inhibition des CaN bei der Behandlung von EAE durch FK506, wurden je ein FK506-Derivat angewandt, das entweder eine gestörte Inhibition der PPIase-Aktivität und CaN-Inhibition aufwies (**22**), oder bei dem nur die CaN-Inhibition gestört war, das jedoch noch

hFKBP12 inhibieren konnte (**21**). Während die mit Vehikeln-behandelten Tiere eine schwere EAE entwickelten, welche sich 12-14 Tage nach Induktion zeigte (Abb.57), wiesen die Mäuse, die Verbindung **21** erhielten, eine klare Verbesserung hinsichtlich der Schwere der EAE auf.

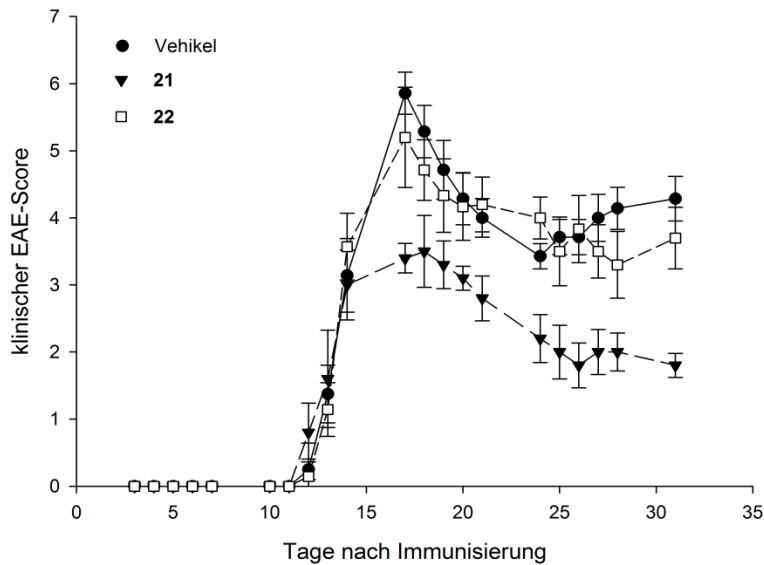


Abbildung 57: Auswirkung der Verbindungen **21** und **22** auf den klinischen Score im EAE-Modell. EAE wurde ausgelöst durch die Applikation von PLP₁₃₉₋₁₅₁ am Tag 0. Die Wirkstoffe (5 mg/kg/d) oder die Vehikel wurden kontinuierlich (*ip*) mittels einer implantierten mini-osmotischen Pumpe verabreicht. Die EAE-Scores wurden täglich aufgenommen. Im Vergleich zu den Vehikeln, zeigte **21** eine Reduktion der Schwere der EAE Symptome, wohingegen Verbindung **22** ineffektiv war. Die Daten sind dargestellt als Durchschnitt \pm SEM. (Durchführung und Auswertung durch Dr. Werner Schmidt und Dr. Frank Striggow von der Arbeitsgruppe Neurodegeneration und Interventionsstrategien am Deutschen Zentrum für Neurodegenerative Erkrankungen e.V. (DZNE)).

Verglichen mit den Vehikeln-behandelten Kontrolltieren wurde der den Beginn der EAE-Symptome anzeigende Peak an Tag 17 nach der Immunisierung durch Verbindung **21** um $42,4 \pm 3,4$ % gesenkt. Ausserdem verbessert Verbindung **21** signifikant den EAE-Score während der Plateauphase ab dem 17ten Tag nach der Immunisierung. Das Ausbleiben eines Rückfalls deutete auf ein Vorhandensein eines neuroregenerativen Potentials der Verbindung **21** hin. Um dieses Vermutung jedoch bestätigen zu können, wäre ein Fortführen des Experimentes für weitere 15 Tage nötig gewesen. Anders als Verbindung **21**, vermochte Verbindung **22** die EAE-Symptome zu keinem Zeitpunkt des Experiments zu beeinflussen. Nach Tag 33 wurde eine zervikale Rückenmarkssektion aller Tiere durchgeführt und detaillierte immunhistochemische und histopathologische Analysen durchgeführt (Abb.58).

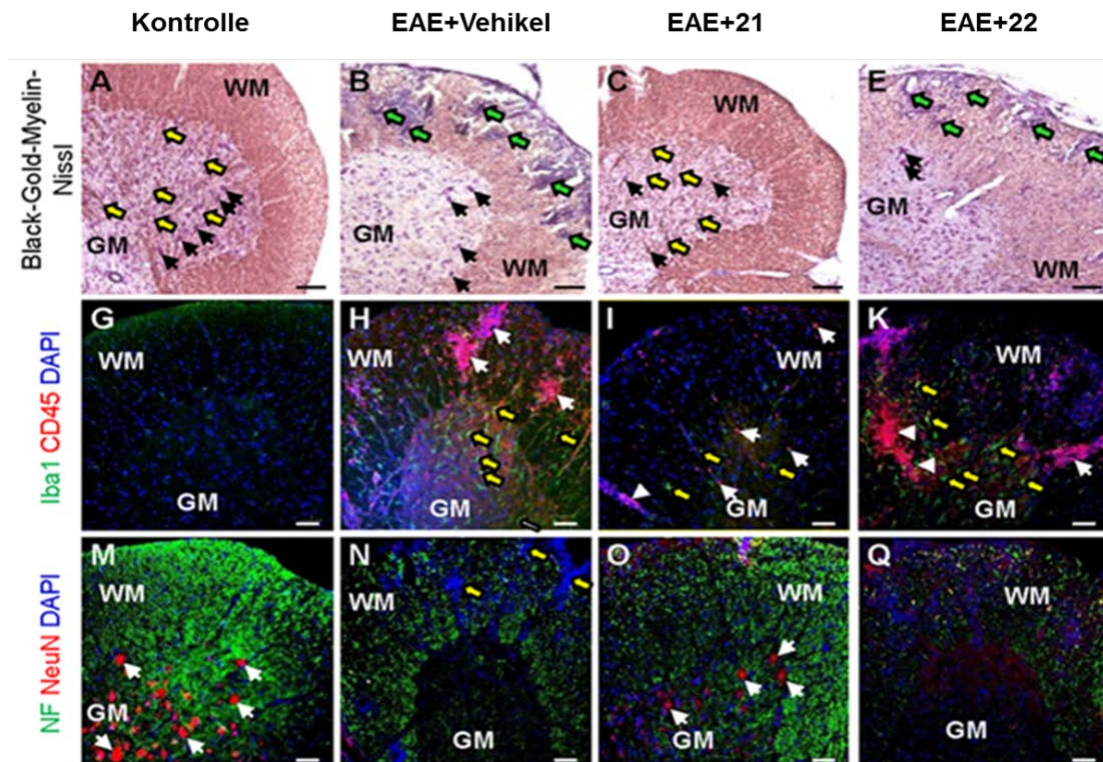


Abbildung 58: Repräsentative Schnitte des zervikalen Rückenmarks von Mäusen im EAE-Modell der Multiplen Sklerose. Repräsentative Schnitte des zervikalen Rückenmarks von nicht-immunisierten Kontrollmäusen (a, g, m) und EAE-Mäusen welche mit Vehikeln (b, h, n), Verbindung **21** (c, i, o) oder Verbindung **22** (e, k, q) behandelt wurden. Die Ansicht des dorsalen Teils des zervikalen Rückenmarks zeigte die weiße Materie (WM) und die graue Materie (GM), welche mit Black-Gold-Myelin-Nissl (a – e) gefärbt wurden. Intakte axonale Myelinscheiden der α -Motoneuronen (gelbe Pfeile) waren in den mit Vehikeln behandelten Mäusen degeneriert (b), waren aber beständig in den mit Verbindung **21** (c) behandelten Tieren. Des Weiteren war die Perikarya der α -Motoneuronen (schwarze Pfeilköpfe) nach Vehikel-Behandlung nur noch in geringer Zahl detektierbar (b), obwohl reichlich vorhanden nach Behandlung mit Verbindung **21** (c) und nur zu einem geringen Maß in den mit Verbindung **22** behandelten Tieren (e). Im Gegensatz zu Verbindung **21** (c) schützte Verbindung **22** nicht vor einer massiven Entzündung in der WM (b, e, grüne Pfeile). Zusätzlich wurden die Rückenmarksschnitte auf aktivierte, Hirn-residierende Mikroglia und Makrophagen (Iba1, gelbe Pfeile) als auch auf eingewanderte Leukozyten und Makrophagen (CD45, weiße Pfeile) gefärbt (g-k). Im Unterschied zu Vehikel und Verbindung **22** behandelten Tieren bewirkte Verbindung **21** eine starke Verminderung des Iba1 und CD45 Signales (g-k). Weiterhin wurden die axonalen Neurofilamente (NF, grüne Fluoreszenz) und die Perikarya (NeuN, weiße Pfeile) der α -Motoneuronen angefärbt (m–q). Das Ausmaß der EAE-abhängigen α -Motoneuronen-Degeneration wurde durch Verbindung **21** deutlich reduziert, wohingegen die mit Verbindung **22** (o) behandelten Tiere eine völlige Degeneration aufwiesen (q). Skalierungsbalken: a-e = 100 μ m, g-q = 50 μ m. (Durchführung und Auswertung durch Dr. Werner Schmidt und Dr. Frank Strigow von der Arbeitsgruppe Neurodegeneration und Interventionsstrategien am Deutschen Zentrum für Neurodegenerative Erkrankungen e.V. (DZNE)).

Im Einklang mit dem Effekt auf den EAE-Score reduzierte Verbindung **21** den Grad der Neurodegeneration innerhalb der grauen Substanz, als auch die Entzündungsherde in grauer und weißer Substanz des zervikalen Rückenmarks (Abb.58a-e). Intakte axonale α -Motoneuronen der grauen Substanz (Abb.58a, gelbe Pfeile) degenerierten nach Induktion der EAE (Abb.58b, e, grüne Pfeile), blieben aber durch Gabe von Verbindung **21** erhalten. Im Vergleich zu Verbindung **22** oder den mit Vehikel behandelten Mäusen, erhöhte Verbindung **21** das Überleben der Perikarya von α -Motoneuronen in der grauen Substanz (Abb.58a-e, schwarze Pfeile). MS ist eine entzündliche Erkrankung des Nervensystems. Dementsprechend findet man schwere perivaskuläre und submningeale Entzündungsherde im zervikalen Rückenmark der grauen und weißen Substanz bei den mit Vehikeln oder

Verbindung **22** behandelten Tieren, ausgelöst durch eingewanderte Leukozyten und Makrophagen (Abb.58h,k, gelbe Pfeile) sowie durch aktivierte, hirneigene Mikroglia (Abb.58h,k, weiße Pfeile). Dem gegenüber stehen die Tiere, welche mit Verbindung **21** behandelt wurden. Sie zeigten nur wenige Entzündungsherde auf der meningealen Oberfläche des Rückenmarks (Abb.58i). Die Neurofilament-Färbung zeigte (Abb.58m-q, grüne Fluoreszenz) ausgeprägte Waller-ähnliche Degeneration in der weißen Substanz, in den mit Verbindung **22** und Vehikel behandelten EAE-Mäusen, sowie das Fehlen intakter Perikarya (Abb.58n,q). Verbindung **21** reduzierte die Degeneration der α -Motoneuronen erheblich (Abb.58o), während Verbindung **22** bzw. Vehikel keine solche Reduktion hervorriefen.

4.3.2 Die Verbindungen 7, 20, 21 und 22 im 6-OHDA-Tiermodell des Morbus Parkinson

Nachdem die neuroprotektive Wirkung der Verbindungen **7**, **20**, **21** und **22** im EAE-Modell der MS gezeigt werden konnte, sollte mit einem weiteren ZNS-Erkrankungsmodell die Wirksamkeit der Verbindungen analysiert werden. Hierzu wurde das 6-OHDA-Modell der Parkinsonschen Krankheit gewählt. Die durch Apomorphin ausgelöste kontralaterale Rotation wurde am Tag 7 und 14 nach erzeugten Läsionen ausgewertet. Für jeden Zeitpunkt wurde die Anzahl der kontralateralen Rotationen der mit Vehikel behandelten Kontrolltiere auf 100 % gesetzt (Abb.59).

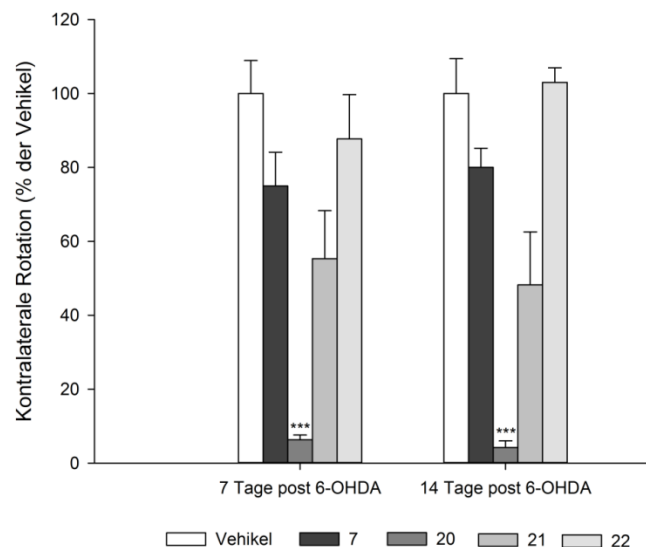


Abbildung 59: Effekt der Verbindungen **7**, **20**, **21** und **22** auf die kontralaterale Rotation 6-OHDA-behandelter Ratten. Die Rotation wurde mittels Apomorphingabe (s.c.) zu verschiedenen Zeitpunkten nach 6-OHDA-Injektion quantifiziert. Dabei entspricht das Ausmaß der Rotation dem Schädigungsgrad dopaminerger Neurone in der Substantia nigra. Die Verbindungen **7**, **20**, **21** bewirken im Gegensatz zu Vehikeln und Verbindung **22** eine Reduzierung Apomorphin-abhängiger Rotationsbewegungen der untersuchten Tiere. (Durchführung und Auswertung durch Dr. Werner Schmidt und Dr. Frank Striggow von der Arbeitsgruppe Neurodegeneration und Interventionsstrategien am Deutschen Zentrum für Neurodegenerative Erkrankungen e.V. (DZNE)).

Die Ratten, welche die Wirkstoffe erhielten, zeigten eine deutliche Reduktion an kontralateralen Rotationen. Sieben Tage nach 6-OHDA-Gabe nahm die kontralaterale Rotation signifikant ab. Verglichen mit den mit Vehikel behandelten Ratten betrug die Abnahme für Verbindung **7** $25,0 \pm 9,1 \%$ und für Verbindung **20** $93,7 \pm 1,3 \%$. Vierzehn Tage nach Induktion der Läsionen (4 Tage nach Ende der Wirkstoffgabe) vermochte Verbindung **7** die kontralaterale Rotation nur noch mit einer Effektivität von $20,0 \pm 5,2 \%$ zu vermindern, wohingegen Verbindung **20** die kontralaterale Rotation unverändert mit $95,8 \pm 1,8 \%$ unterband. Mit einer Effektivität von $44,2 \pm 12,5 \%$ nach sieben Tagen und von $51,6 \pm 13,9 \%$ nach 14 Tagen liegt Verbindung **21** zwischen den Verbindungen **7** und **20**. Im Gegensatz dazu beeinflusst der Wirkstoff Verbindung **22** das kontralaterale Rotationsverhalten der Versuchstiere zu keinem Zeitpunkt der Untersuchung.

Im Anschluss wurde das Ausmaß des durch 6-OHDA-Injektion hervorgerufenen Verlustes an dopaminergen neuronalen Zellen mittels immunhistochemischer Detektion und Quantifizierung der überlebenden Tyrosinhydroxylase(TH)-positiven dopaminergen Neuronen (Abb.60) der SNpc unmittelbar nach dem letzten Rotationstest bestimmt. Unter allen experimentellen Bedingungen korrelierte die Apomorphin-abhängige kontralaterale Rotation mit der Degeneration dopaminergener Neuronen in der ipsilateralen SNpc. Die 6-OHDA-Injektion führt zu einem massiven Absterben dopaminergener Neuronen in der ipsilateralen SNpc in den mit Vehikeln behandelten Ratten.

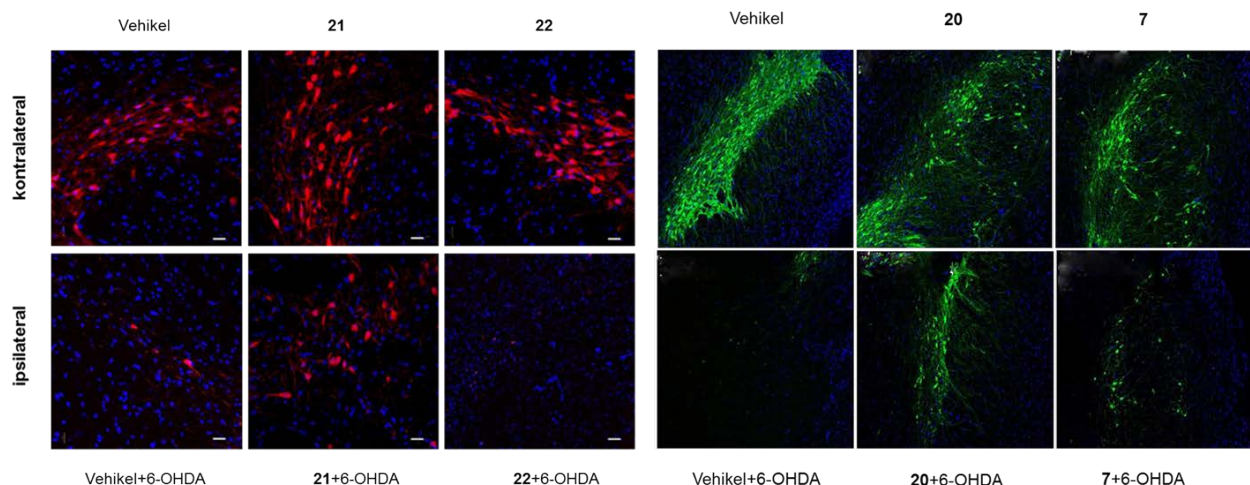


Abbildung 60: Immunhistochemische Markierung dopaminergener Neurone in der Substantia nigra pars compacta 14 Tage nach unilateraler Injektion von 6-OHDA in das mediale Vorderhirnbündel. Tyrosin-Hydroxylase-positiv markierte dopaminerge Neurone (rot für Verbindungen **21** und **22**, grün für **7** und **20**) und Zellkerne (DAPI Fluoreszenz, blau) in der geschädigten (ipsilateral) und der nichtgeschädigten (kontralateral) Hemisphäre sind oben bzw. unten dargestellt. Die Verbindungen **7**, **20** und **21** wirkten im Gegensatz zu Vehikel und Verbindung **22** neuroprotektiv. Dadurch war die Anzahl überlebender dopaminergener Neurone in der Substantia nigra pars compacta erhöht (rote und grüne Fluoreszenz). Die Wirkstoffe (1 mg/kg/24 h) oder Vehikel wurden mittels miniosmotischer Pumpen über 8 Tage kontinuierlich intraperitoneal (i.p.) injiziert. (Durchführung und Auswertung durch Dr. Werner Schmidt und Dr. Frank Strigow von der Arbeitsgruppe Neurodegeneration und Interventionsstrategien am Deutschen Zentrum für Neurodegenerative Erkrankungen e.V. (DZNE)).

Nach 6-OHDA-Injektion und Vehikelbehandlung überlebten nur $14,9 \pm 3,9$ % TH-positiver Perikarya in der ipsilateralen SNpc. Demgegenüber standen 100 % intakter dopaminergere Zellen in der kontralateralen SNpc (Abb.61).

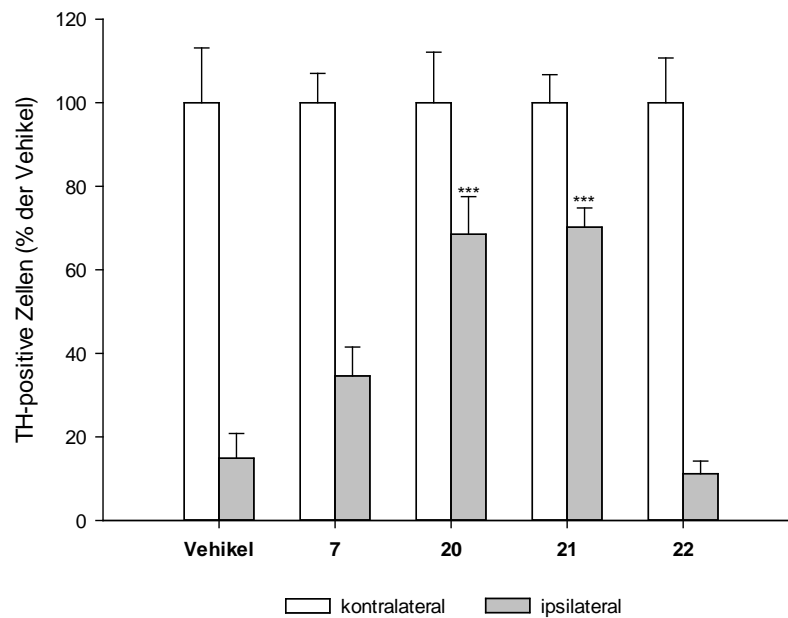


Abbildung 61: Immunomorphometrische Auswertung der in Abb. 58 dargestellten Experimente. Verbindung **20** und **21** bewirkten eine signifikante Erhöhung Tyrosin-Hydroxylase-positiver Neurone in der ipsilateralen Substantia nigra pars compacta. Effekt > 30 %, n ≥ 8 Tiere je Kondition, ***p ≤ 0.01, Student's t-test.

Im Einklang mit dem Ergebnis des Rotationstests führten Verbindung **20** und Verbindung **21** zu einem deutlichen Anstieg an überlebenden dopaminergen Neuronen in der ipsilateralen SNpc, verglichen mit der kontralateralen Seite. Verbindung **20** erhöht die Überlebensrate TH-positiver Zellen auf $68,5 \pm 9,0$ %, Verbindung **21** sogar auf $72,2 \pm 4,6$ % (Abb.61). Nach Behandlung mit Verbindung **7** war die Summe der überlebenden TH-positiver Zellen mit $34,6 \pm 6,9$ % nur doppelt so hoch wie die Summe der überlebenden TH-positiven Zellen bei mit Vehikeln behandelten Tiere. Die Verbindung **22** führte keinerlei Neuroprotektion in der ipsilateralen SNpc herbei, nur $13,4 \pm 3,7$ % überlebende TH-positive Perikarya im Vergleich zu kontralateraler SNpc waren hier feststellbar. Die dopaminergen Neuronen der kontralateralen SNpc wurden durch die Behandlung mit den Wirkstoffen nicht beeinflusst.

5 Diskussion der Ergebnisse der Tiermodelle

In fast allen neurodegenerativen Erkrankungen wird die Progredienz des Verlustes neuronaler Funktionen durch Apoptose von Neuronen herbeigeführt. Dabei spielt die durch ER-Stress ausgelöste mitochondriale Apoptose eine entscheidende Rolle^{[149],[150],[151]}. Im Zusammenhang mit oxidativen Stress als Initiator des neuronalen Zellsterbens stehen FKBP12, FKBP38, FKBP52 und FKBP65 sowie Cyclophilin D^[152]. So ist zum Beispiel FKBP12 mit dem IP₃-Rezeptor assoziiert und steuert die Ca²⁺-Ausschüttung. Diese steigt auf Grund einer erhöhten Konzentration von IP₃ und FKBP12 während der Degeneration an und hat einen Anstieg des oxidativen Stresses zur Folge^{[153],[154]}. Der Komplex aus FKBP12 und IP₃-Rezeptor wird durch FKBP-Liganden wie FK506, Rapamycin, als auch durch das nicht-immunsuppressive GP-1046 gestört^[153]. Für GP-1046 wurde gezeigt, dass es ein dosisabhängiges Absenken der ER-Ca²⁺-Ausschüttung induziert^{[155],[156]}.

Dem gegenüber steht das FKBP38, welches in die mitochondriale Apoptose über die Regulierung anti-apoptotischer Proteine der Bcl-2-Familie eingreift^[157]. Bcl-2-Proteine regulieren die mitochondriale Apoptose über die Kontrolle der Permeabilität der äußeren Mitochondrienmembran. *In vivo*-Studien zeigten, dass die pro-apoptotische Aktivität des FKBP38 durch FKBP-Inhibitoren gehemmt werden kann. Dabei war der FKBP-Ligand GPI-1046 in der Lage, die Co-Lokalisation von Bcl-2/Bad durch die Inhibition der Bildung des FKBP38*[Ca²⁺]*CaM-Komplexes zu fördern^[158]. Somit kann Bcl-2 die pro-apoptotische Wirkung des Bad wieder aufheben. Ebenfalls war es bereits möglich, den spezifischen FKBP38-Inhibitor DM-CHX im Tiermodell der Ischämie zu testen. Hierbei entwickelte DM-CHX ausgeprägte neuroprotektive sowie neuroregenerative Eigenschaften^[67]. Neben der Zunahme des oxidativen Stresses im Verlauf von neurodegenerativen Erkrankungen ist auch ein Rückgang der protektiven Wirkung des antioxidativen Systems, welches unter anderem aus Glutathion (GSH), Superoxiddismutase und Katalase besteht, zu beobachten. TANAKA *et al.* konnten in ihren Arbeiten bereits zeigen, dass sowohl FK506 als auch GPI-1046 den striatale GSH-Gehalt anheben konnte^[159]. Nach Angaben der Autoren geschah dies über eine Aktivierung der Biosynthese des GSH, indem die mRNA-Expression der γ -Glutamylcystein- Synthetase, des Schlüsselenzymes der GSH-Synthese, hochreguliert wurde. Obwohl die FKBP-Liganden FK506 und GPI-1046 den GSH-Gehalt im Striatum erhöhten, hatten sie keinerlei Einfluss auf die anderen Enzyme des antioxidativen Systems^[159].

Das einzige an der mitochondrialen Apoptose beteiligte Cyclophilin ist das innerhalb der mitochondrialen Matrix vorkommende CypD. In Anwesenheit von Ca^{2+} bewirkt CypD, als Komponente der MITOCHONDRIAL PERMEABILITY TRANSITION PORE (MPTP), eine zur Kanalöffnung führende Konformationsänderung. Dieser als mitochondrialer Permeabilitätsübergang bezeichnete Zustand der Pore wird u.a. bei mitochondrialer Überladung mit Ca^{2+} , Mangel an ATP und oxidativem Stress beobachtet, was die Apoptose einleitet^[160]. Mit hinlänglicher Evidenz kann davon ausgegangen werden, dass die Aktivierung über das aktive Zentrum des CypD gesteuert wird, da durch die Hemmung mittels CsA die Pore geschlossen bleibt und sich CypD von der Pore entfernt^{[161],[162]}. So zeigten CypD knock-out Mäuse im EAE-Modell der MS zwar die typischen Symptome, aber anders als bei den Wild-Typ Mäusen rekonvaleszierten einige k.-o. Mäuse^[135]. Zudem sind Neuronen von CypD k.-o. Mäusen weniger anfällig gegenüber ROS und einem erhöhten Ca^{2+} -Spiegel.

Im EAE-Modell der MS zeigten GOLD *et al.*, dass die Immunsuppressiva FK506 und CsA, als auch das nicht-immunsuppressive FK506-Derivat FK1706, dosisabhängig eine Verbesserung des neuronalen Überlebens bewirken^[163]. Während FK506 schon in einer täglichen Dosis von 5 mg/kg eine signifikante Verbesserung des klinischen EAE-Scores sowie eine erhöhte Anzahl an überlebenden Axonen und axonalen Myelinscheiden bewirkte, wurde von CsA die zehnfache Dosis (50 mg/kg/d) benötigt, um annähernde Effekte zu erzielen. Die in dieser Arbeit erhaltenen Daten für die kombinierte Gabe von FK506 und CsA, in ihrem nicht verbundenen und vollkommen immunsuppressiven Zustand, zeigten ebenfalls eine Reduktion des klinischen EAE-Score am Tag der schwersten Symptome (Tag 17) um zirka 50 % im Vergleich zu den Vehikel-behandelten Kontrolltieren. Des Weiteren zeigten die behandelten Tiere einen deutlichen Rückgang verschiedener Entzündungsmarker in der grauen und weißen Substanz des zervikalen Rückenmarkes, sowie eine hohe Anzahl an überlebender Perikarya der α -Motoneuronen, Axonen und axonalen Myelinscheiden. Anders als bei GOLD *et al.*^[163], wo FK506 und CsA einzeln verschiedenen Tieren appliziert wurde, wurden in dieser Arbeit FK506 und CsA in Kombination den gleichen Tieren verabreicht. Es wurde dazu eine Dosis von je 5 mg/kg/d gegeben, die für FK506 der von GOLD *et al.* verabreichten Dosis entsprach, für CsA jedoch 10-mal geringer als die dort gefundene effektive Dosis lag. Demgegenüber steht das nicht-immunsuppressive FK1706. In einer Dosis von 5 mg/kg/d gelang es FK1706 nicht, die klinischen EAE-Symptome der Mäuse zu reduzieren. Allerdings reduziert es die axonalen Schäden. Die Autoren erklären das mit den nicht vorhandenen immunsuppressiven Eigenschaften des FK1706, da es die Entzündungen im Hirn, die nach GOLD *et al.* ein Maß für die Schwere des EAE-Scores sind, nicht reduzieren

konnten^[163]. Im Gegensatz zu den Ergebnissen von GOLD *et al.* für das nicht-immunsuppressive FK506-Derivat FK1706, beeinflussten die in der Arbeit untersuchten nicht-immunsuppressiven Verbindungen **7** und **21** den klinischen EAE-Score positiv.

Dieser wurde nach Behandlung der Tiere mit Verbindung **7** an Tag 17, um zirka 30 % im Vergleich zu der mit Vehikel behandelten Kontrollgruppe gesenkt. Des Weiteren zeigte Verbindung **7** einen weniger stark remittierenden Verlauf in der schubförmigen Phase (ab Tag 19), verglichen mit der Kombination aus FK506/CsA und den mit Vehikeln behandelten Tieren. Die Verbindung **21** zeigte in dieser Arbeit die besten Ergebnisse im EAE-Tiermodell der MS. Sie verbesserte am Tag der schwersten EAE-Symptome (Tag 17) den klinischen EAE-Score um 42 %. Während in der remittierenden/schubförmigen Phase der EAE ein Rückfall bei den mit Vehikeln behandelten Mäusen zu verzeichnen war, ist bei den mit Verbindung **21** behandelten Tieren eine stete Verbesserung der klinischen Symptome zu erkennen gewesen. Dieses Ergebnis deutet auf ein starkes neuroprotektives Potentials der Verbindung **21** hin und konnte bei den mit der Verbindung **7** behandelten Tieren nicht in diesem Umfang beobachtet werden.

Da aktivierte Mikroglia eine Vielzahl an Entzündungsmediatoren wie Zytokine sowie reaktive Sauerstoff und- Stickstoffverbindungen freisetzen, sind sie verantwortlich für die Neurodegeneration und den progressiven Verlauf der EAE. Zugleich schädigen sie durch die ausgelösten Entzündungen die Integrität der Blut-Hirn-Schranke und machen sie permeabel für z.B. periphere Leukozyten, die ihrerseits neue Entzündungsherde im Gehirn entstehen lassen^[164]. Es wurde beschrieben, dass FK506 aktivierte Mikroglia deaktivieren oder vor Aktivierung schützen kann. Dieser Effekt wurde nur von FK506, nicht aber von CsA hervorgerufen, weshalb die Autoren einen CaN-unabhängigen Weg postulierten und die Fähigkeit der Inaktivierung von Mikrogliazellen auf nicht-immunsuppressive FK506-Derivate ausweiteten^[164].

In Analogie zu diesem Effekt wiesen die Gewebeschnitte des zervikalen Rückenmarks der mit den nicht-immunsuppressiven Verbindungen **7** und **21** behandelten Tiere eine starke wirkstoffabhängige Reduktion aktivierter Hirn-residenter Mikroglia und Makrophagen auf. Die Anwesenheit intakter neuronaler Zellkörper und Myelinscheiden und die Abwesenheit aktivierter, Hirn-residenter Mikroglia und Makrophagen bei gleichzeitigem Vorhandensein von Entzündungsherden durch CD45-positive Zellen^[165], zeigte die von der Immunsuppression unabhängigen, neuroprotektiven Eigenschaften der Verbindungen **7** und **21**.

Das die Reduktion des klinischen EAE-Score unabhängig von der Immunsuppressivität der Verbindungen ist, wurde weiterhin durch den Befund der Verbindung **20** gestützt. So senkte Verbindung **20** die Schwere der Symptome am Tag 17 um nur zirka 20 %, obschon die Verbindung deutliche immunsuppressive Eigenschaften aufwies. Nach dem Übergang aus der akuten in die schubförmige Phase der EAE zeigten sich die protektiven Eigenschaften der Verbindung **20**. In der remittierenden/schubförmigen Phase verbesserte Verbindung **20** den klinischen EAE-Score um 33 % im Vergleich zu der mit Vehikeln behandelten Kontrollgruppe. Verbindung **22** wies keine positiven Effekte im EAE-Tiermodell für MS auf. Zusammengenommen weisen diese Ergebnisse daraufhin, dass die hier beobachtete Neuroprotektion durch die Inhibition der PPlase-Aktivität eines FKBP, nicht jedoch durch die Inhibition von CaN verursacht wird.

Die Verbindungen 7,20,21,22 im 6-OHDA-Tiermodell des Morbus Parkinson

Die mit dem dualen Inhibitor **20** behandelten SPRAGUE-DAWLEY-Ratten zeigten nach 14 Tagen einen sehr deutlichen wirkstoffabhängigen Rückgang von $95,8 \pm 1,8$ % der Apomorphin-induzierten kontralateralen Rotation (gemessen 10 min) im 6-OHDA-Tiermodell der Parkinson'schen Erkrankung. Damit konnte erstmalig die Wirksamkeit eines CHX-Derivates gegen Parkinson-Symptome gezeigt werden. Verbindung **20** wirkte effektiver als die in der Literatur beschriebenen nicht-immunsuppressiven FK506-Derivate GPI-1046 (82%) und V-10,367 (72 %) ^{[42],[166]}. Vergleichbar zu diesen wirkte das in dieser Arbeit hergestellte nicht-immunsuppressive FK506-Derivat **21**. Es reduzierte die Apomorphin-induzierten kontralateralen Rotationen um $51,6 \pm 13,9$ %. Verbindung **7** zeigte mit einem 20 %igen Rückgang der ipsilateralen Rotationen nur eine moderate Verbesserung im Apomorphin-induzierten Rotationstest.

Die Apomorphin-induzierte kontralaterale Rotation der Tiere korreliert mit der Degeneration TH-positiver dopaminerger Neuronen in der ipsilateralen SNpc. So entsprach die Zunahme an kontralateralen Rotationen der mit den Verbindungen **20** und **21** behandelten Tiere einer höheren Anzahl an überlebenden dopaminergen Neuronen (Abb.57). Die Verbindung GPI-1046 erhöht die Anzahl an überlebenden TH-positiver Neuronen um 33 % und V-10,367 um 24 % ^{[42],[166]}. Unter Vehikel-Behandlung überleben unter den experimentellen Bedingungen in dieser Arbeit nur $14,9 \pm 3,9$ % der TH-positiver Neuronen. Im Gegensatz dazu erhöhten die Verbindungen **20** und **21** die Überlebensrate der TH-positiver Neuronen um $68,5 \pm 9,0$ % bzw. $72,2 \pm 4,6$ % (Abb.59). In Analogie zu den Ergebnissen des Rotationstests erhöhte Verbindung **7** auch die Überlebensrate der TH-positiver Neuronen nur gering auf $34,6 \pm 6,9$ %. Während von GPI-1046 und V-10,367 10 mg/kg/d bzw. 15 mg/kg/d benötigt wurden, um die beschriebenen Effekte zu erzielen ^{[42],[166]}, entfalteten die

Verbindungen **7**, **20** und **21** mit 1 mg/kg/d ihre Wirksamkeit. Ein wichtiger Unterschied zwischen den bereits publizierten Experimenten und den hier dargestellten Untersuchungen lag in dem Ort der Injektion des 6-OHDA, das die Parkinson-Symptome auslöst. Da das 6-OHDA die Blut-Hirn-Schranke nicht passieren kann, muss es direkt in das Gehirn injiziert werden. Es gibt zwei wichtige unilaterale 6-OHDA-Modelle bei denen das Toxin entweder in das Striatum oder das mediale Vorhirnbündel injiziert wird. Wird das 6-OHDA in das Striatum injiziert, beginnt der Rückgang der dopaminergen Neuronen langsam innerhalb einer Woche und erreicht seinen Höhepunkt nach zirka einem Monat^[166]. Da sich die Läsion fast ausschließlich auf das Striatum beschränkt, spricht man auch von einer partiellen Läsion. Dieser Zustand spiegelt die frühe, progressive Phase der Parkinson'schen Erkrankung wieder und führt zu einem 40-60 %igen Sterben dopaminergen Neuronen in der SNpc^[167]. Durch Injektion des 6-OHDA in das mediale Vorhirnbündel kommt es zu einem massiven Sterben der dopaminergen Neuronen der SNpc, ausgelöst durch oxidativen Stress. Einen Tag nach Induktion der Läsion durch das Toxin sind 85-95 % der Dopamin-produzierenden Zellen in der SNpc abgestorben^{[168],[169]}. Dieses Modell spiegelt die späte Phase der Erkrankung wieder.

In dem für diese Arbeit verwendeten Modell erfolgte die Induktion der Läsion durch Injektion des 6-OHDA in das mediale Vorhirnbündel. Trotz des massiven Absterbens der dopaminergen Zellen vermochten die Verbindungen **20** und **21**, mit nur 1 mg/kg/d eine signifikante Verbesserung herbeizuführen. Verbindung **7** zeigte auch einen protektiven Effekt, war aber nicht so effektiv wie **20** und **21**. Dahingegen zeigten GPI-1046 und V-10,367 Effekte nach striatialer Injektion des 6-OHDA und nur bei einer Konzentration von 10 mg/kg/d und waren vollkommen ineffektiv, wenn der Gehalt an überlebenden Dopamin-produzierenden Neuronen unter 20 % sank^[170].

In jedem in dieser Arbeit untersuchten Tiermodell besaßen die eingesetzten Verbindungen **7**, **20**, **21** einen positiven Einfluss auf den Verlauf der Erkrankung. Dabei war das monofunktionelle FK506-Derivat **21** sowohl im EAE-Modell als auch im 6-OHDA-Modell am effektivsten. Während die Derivate **7** und **20** im EAE-Modell eine annähernd gleiche Verbesserung des neuronalen Überlebens bewirkten, zeigte Verbindung **20** im 6-OHDA-Modell eine deutliche Überlegenheit gegenüber Verbindung **7**. Es zeigte die gleiche Wirksamkeit bezüglich des Überlebens der TH-produzierenden Neuronen wie das monofunktionelle FK506-Derivat **21**. Darüber hinaus sind die Substanzen **20** und **21** im 6-OHDA-Modell wirksamer, als das in der Literatur vielfach beschriebene GPI-1046. Alle untersuchten Substanzen zeigten eine deutlich höhere Effektivität als CsA allein.

Interessanterweise lassen sich jedoch die erhaltenen positiven Effekte auf dem Verlauf der Erkrankungen im Tiermodell nicht mit den inhibitorischen Eigenschaften der untersuchten Verbindungen direkt korrelieren. So erwies sich Verbindung **7**, die sowohl *hFKBP12* als auch *hCypA* mit IC_{50} -Werten von 24,4 nM bzw. 13,6 nM inhibierte, als ineffektiv im 6-OHDA-Modell, aber zeigte eine erhöhte Effektivität im EAE-Modell. Verbindung **21**, welche sehr effektiv *hFKBP12* im nanomolaren Bereich inhibiert, aber nicht *hCypA* hemmt, war die effektivste der in den Tiermodellen untersuchten Verbindungen. Verbindung **20**, die *hFKBP12* mit 6,9 μ M inhibiert, ist trotz ihrer relativ geringen Fähigkeit zur *hFKBP12*-Inhibition im EAE-Modell effektiv und weist im Tiermodell des Morbus Parkinson eine sehr deutlich erhöhte Effektivität gegenüber den anderen Verbindungen auf. Das deutet darauf hin, dass für die Aktivität der Verbindungen in den Tiermodellen neben der Inhibition der untersuchten PPlasen noch weitere Faktoren eine Rolle spielen. Möglicherweise sind neben oder anstatt *FKBP12* andere *FKBP*-Isoformen spezifisch bei der Entstehung verschiedener neurologischer Erkrankungen beteiligt, deren Affinität zu den Inhibitoren unterschiedlich ist. Alternativ dazu kann auch die Lokalisation der Zielproteine der Inhibitoren und ihre Zugänglichkeit durch die analysierten Verbindungen eine Rolle spielen. So wurde bislang nicht untersucht, in welchem Ausmaß die Inhibitoren in das Zytosol von Zellen gelangen können, welche subzellulären Kompartimente sie erreichen und ob sie die Blut-Hirn-Schranke überwinden können. Ein interessanter Aspekt ergibt sich aus der hohen Wirksamkeit von Verbindung **20** im 6-OHDA-Modell des Morbus Parkinson: diese Wirksamkeit deutet darauf hin, dass die Verbindung die Blut-Hirn-Schranke durchdrungen hat, da sie im Hirn vorliegen muss, um wirken zu können. Da Verbindung **20** CsA enthält, wäre es damit gleichzeitig gelungen, dass ein CsA-Derivat die Blut-Hirn-Schranke zu durchdringen vermag. Für CsA ist bekannt, dass es die Blut-Hirn-Schranke nicht durchdringen kann^[171], wobei die Ursache dafür der aktive Efflux des Moleküls durch P-Glykoprotein (P-Gp) ist. Allerdings kann auch die gestörte Integrität der Blut-Hirn-Schranke, wie sie für den Morbus Parkinson und für eine 6-OHDA-Injektion beschrieben ist^[172], dafür verantwortlich sein, dass die Substanz in das Gehirn gelangt ist. Wichtig für die positive Beeinflussung neurologischer Erkrankungen im Tiermodell war jedoch, dass die Substanzen in der Lage waren *FKBP12* zu binden und seine PPlase-Aktivität zu inhibieren.

Während nach COSTANTINI *et al.*^[166] die nicht *FKBP*-bindende Verbindung V-13,661 neuroprotektive Eigenschaften aufwies, zeigte sich in den hier vorgestellten Ergebnissen deutlich, dass Verbindung **22**, die nicht in der Lage ist, in das aktive Zentrum von *FKBP12* zu binden, in den untersuchten Tiermodellen keine signifikante Wirkung besaß. Sie beeinflusste zu keinem Zeitpunkt die kontralateralen Rotationen und zeigte auch keine Zunahme der TH⁺-

produzierenden dopaminergen Neuronen. Dieser Befund bestätigt die Beteiligung von PPlasen in neurologischen Erkrankungen.

Es kann davon ausgegangen werden, dass die untersuchten Verbindungen menschliche PPlasen vergleichbar zu ihren Orthologen aus Ratte bzw. Maus inhibieren, da die Enzyme sehr ähnlich sind. *hFKBP12* besitzt 97 % Identität zu *rattus norvegicus* FKBP12 und ebenfalls 97 % Identität zu *mus musculus* FKBP12. *hCypA* besitzt sowohl zu dem *rattus norvegicus* CypA als auch zu dem *mus musculus* CypA eine Identität von 96 %.

6 Zusammenfassung

Aus zahlreichen Studien gehen die FKBP's und die Cyclophiline als vielversprechende Wirkstofftargets bei bakteriellen und viralen Infektionen, aber auch bei entzündlichen degenerativen Erkrankungen des Menschen hervor. Mit den in dieser Arbeit vorgestellten bifunktionellen Substanzen wird die Möglichkeit geschaffen, gegenüber ihren generischen Ausgangsstoffen FK506 und Cyclosporin A bei reduzierter Immunsuppression beide PPIase-Familien gleichzeitig und am gleichen Wirkort zu hemmen. Diese Verbindungen können dazu dienen, Synergien der von FKBP und Cyclophilin vermittelten Signalwege zu untersuchen und neue therapeutische Anwendungen zu ermöglichen.

- Für die Synthese der dualen Inhibitoren wurden FK506 bzw. das Cycloheximid als Ausgangsstoff für den FKBP-bindenden Teil und [D-Ser]⁸-CsA als Ausgangsstoff für den Cyclophilin-bindenden Teil des Moleküls verwendet.
- Für die Fusion von FK506 und [D-Ser]⁸-CsA bzw. Cycloheximid und [D-Ser]⁸-CsA wurden unverzweigte Diaminoalkyllinker mit einer Kettenlänge von 3, 5, 7, und 9 Kohlenstoffatomen genutzt.
- Um die Einzelkomponenten kovalent zu verknüpfen, wurden an ihren Molekülgerüsten reaktive Funktionalitäten eingeführt, ohne die PPIase-Inhibition im Vergleich zu den Grundstrukturen zu verschlechtern.
- Als geeignetste Gruppierung wurde die Carbonsäure-Funktion angesehen, da sie unter milden chemischen Bedingungen in die bestehenden Moleküle eingeführt und anschließend regioselektiv modifiziert werden konnte.
- Am FK506 wurde sie als Carboxylgruppe durch eine Olefin-Metathese an der allylischen Doppelbindung des Kohlenstoffatoms 40 am FK506 eingeführt.
- Durch eine Alkylierungsreaktion am Glutarimid-Stickstoff wurde ein Carboxymethyl-Rest am Cycloheximid eingeführt.
- Am [D-Ser]⁸-CsA wurde ebenfalls ein Carboxymethyl-Rest durch Alkylierung der Hydroxyl-Seitenkette des D-Serins eingeführt.

Die Ermittlung der biochemischen Daten der dualen Inhibitoren ergaben sowohl eine von der Linkerlänge abhängige Hemmung der PPIase-Aktivität der Zielproteine, als auch ein Linkerlängen-abhängiges immunsuppressives Potential.

- Die dualen Inhibitoren aus FK506 und [D-Ser]⁸-CsA zeigen eine starke Abhängigkeit der *hFKBP12*-Inhibition von der Linkerlänge. Die Effektivität der Inhibition sinkt mit zunehmender Linkerlänge.
- Dagegen zeigt die Hemmung der *hCypA*-Aktivität nur eine geringfügige Abhängigkeit von der Länge des Linkers.
- Die *in vitro*-Calcineurin-Inhibition der ternären Komplexe *hFKBP12**[7-10]**hCypA* ist ebenfalls abhängig von der Linkerlänge. Die Verbindung mit dem kürzesten Linker zeigt im ternären Komplex keine Hemmung der Calcineurin-Phosphatase-Aktivität bis zu einer Konzentration von 10 µM. Damit ist sie um das zirka 800-fache weniger Calcineurin-hemmend als FK506 und 80-mal weniger Calcineurin-hemmend als [D-Ser]⁸-CsA.
- Im *in cellulo*-NFAT-Reporter-Gen-Assay wurde eine von der CaN-Inhibition abweichende Abhängigkeit der Inhibition von der Linkerlänge beobachtet. Die am wenigsten immunsuppressive Verbindung enthält einen Diaminopentan Linker. Sie ist im NFAT-Reporter-Gen-Assay 3000-mal weniger aktiv als FK506 und rund 200-mal weniger aktiv als [D-Ser]⁸-CsA.
- Die dualen Inhibitoren aus Cycloheximid und [D-Ser]⁸-CsA zeigen anders als die aus FK506 und [D-Ser]⁸-CsA eine deutliche Abhängigkeit der *hCypA*-Inhibition von der Länge des Linkers. Die Verbindung mit dem kürzesten Linker ist der effektivste Inhibitor.
- Die Bestimmung des immunsuppressiven Potenzials mittels NFAT-Reporter-Gen-Assay lässt auch hier eine Abhängigkeit von der Länge des Linkers erkennen. Die Verbindung mit dem kürzesten Linker weist die geringsten immunsuppressiven Eigenschaften auf, während die Verbindung mit dem längsten Linker die höchste immunsuppressive Wirkung hervorruft.

Neben den dualen PPIase-Inhibitoren wurden im Verlauf der Arbeit neue monofunktionelle FKBP-Inhibitoren synthetisiert.

- Mit den Substanzen *N*-(X)-2-(Cycloheximid-14-yl)-acetamid (X = Adamant-1-yl (**30**); X = 3,5-Dimethyladamant-1-yl (**31**); X = 5-Hydroxyadamant-14-yl (**32**); X = 3-Ethyladamant-14-yl (**33**); X = 3,7-Dimethyladamant-1-yl (**34**); X = 5-Hydroxy-3,7-dimethyladamant-14-yl (**35**); X = Myrtan-2-yl (**43**); X = Born-1-yl (**44**)) konnten erstmals Cycloheximid-Derivate synthetisiert werden, welche verschiedene FKBP's im Bereich von 150-400 nM hemmen.

- Weiterhin wurden zwei FK506-Derivate synthetisiert, die bis zu einer Inhibitorkonzentration von 10 μ M keine Inhibition der NFAT-Reportergen-Aktivität zeigten. Das FK506-C₄₀-*N-tert*-Butylcarbonsäureamid (**21**) entstand durch Amidierung der Carbonsäurefunktion der FK506-C₄₀-carbonsäure mit *N-tert*-Butylamin. Mit einem IC₅₀-Wert der *hFKBP12*-Inhibition von $2,75 \pm 0,17$ nM ist das Derivat **21** äquipotent zu FK506 mit einem IC₅₀-Wert von $2,55 \pm 0,17$ nM. Das Ausbleiben der Inhibition der NFAT-Reportergen-Aktivität ist auf die fehlende Ausbildung des ternären *hFKBP12**[**21**]*CaN-Komplexes zurückzuführen.
- Der FK506-C₉-carbonsäuremethylester (**22**) wurde durch eine Benzilsäure-Umlagerung in der FKBP-Bindestelle des FK506 hergestellt. Das Derivat **22** vermag nicht die PPlase-Aktivität von *hFKBP12*, bis zu einer Inhibitorkonzentration von 10 μ M zu inhibieren. Somit wird der binäre Komplex *hFKBP12**[**22**] nicht mehr gebildet. Die NFAT-Reportergen-Aktivität bis zu einer Inhibitorkonzentration von 10 μ M nicht inhibiert.
- Mit diesen beiden Derivaten konnte der Einfluss von PPlasen auf die Neuroprotektion bzw. -regeneration in den Tiermodellen, bei gleichzeitigem Ausschluss einer CaN-Beteiligung, nachgewiesen werden.

7 Experimenteller Teil

7.1 Materialien und Instrumente

Alle Chemikalien, sofern nicht anders angegeben, wurden von Sigma Aldrich erworben und waren von Analysequalität. Trifluoressigsäure (TFA) wurde von Merk und FK506 und Cyclosporin A von LC Laboratories bezogen. Acetonitril (ACN) wurde als HPLC-Qualität von Roth erworben.

Massenspektrometrie

Das präparative HPLC-System von Sykam enthielt zwei S1021 Pumpen, einen Controller S2001, ein Abimed 118 UV/VIS Detektor und reversed phase (RP)-Säulen vom Typ Phenomenex Gemini-NX, 250 x 21.2 mm C18, Phenomenex Jupiter Proteo 90A AX, 250 x 21.2 mm und Interchrom Modulo-Cart Strategy 5 250 x 10 mm C18. Laufmittel A: H₂O + 0,05 % TFA, Laufmittel B: ACN + 0,05 % TFA. Die Reinheit der Produkte wurde mit einem analytischen Dionex HPLC-System bestimmt. Dieses war ausgestattet mit einem Photodiodenarray-Detektor, einer Vydac RP C18 Säule (4.6 x250mm) und einem Surveyor MSQ Massenspektrometer (Thermo Finnigan). Es wurde das gleiche Laufmittelsystem, wie bei der präparativen HPLC verwandt. Das entionisierte Wasser wurde mittels eines Millipore Wasserreinigungssystem erhalten

Software

Zur Auswertung und graphischen Darstellung der Messwerte wurden Sigmaplot 11.0 und 12.0 verwendet.

Fluoreszenzmessung

Die Messungen erfolgten an einem Fluoreszenz-Spektrophotometer F-3010 der Firma Hitachi. Sie wurden in 35 mM HEPES-Puffer (pH 7.5) bei 20°C in einer Quarz-Küvette mit einer Schichtdicke von 1 cm durchgeführt. Im Meßansatz waren 4 µM *hFKBP12* bzw. *hCypA*, gestartet wurde mit Zugabe von 5 µM Inhibitor. Die Anregung erfolgte bei 295 nm mit einer spektralen Bandweite von 2,5 nm, die Emission wurde bei 340 nm mit einer spektralen Bandweite von 5 nm detektiert.

CD-Spektroskopie

Für die Aufnahme der Fern-UV CD-Spektren wurde ein J-710 Spektropolarimeter der Firma JASCO (Tokyo, Japan) verwendet. Die Messungen wurden in einer temperierten Quarzküvette mit einer Schichtdicke von 0.1 cm in 5 mM Natriumphosphatpuffer (pH 7.0) bei 37 °C durchgeführt. Die Daten wurden in dem Wellenlängenbereich von 185 bis 250 nm 20-mal aufgenommen, gemittelt und mit der vom Hersteller JASCO bereitgestellten Software analysiert.

Protease gekoppelter PPlase-Assay

Der Protease-gekoppelte PPlase-Assay wurde wie von FISCHER *et al.* beschrieben durchgeführt^[13]. Für die Messung der IC₅₀-Werte der Inhibition der PPlase-Aktivität wurde 15 nM *hFKBP12* bzw. 5 nM *hCypA* mit suc-Ala-Phe-Pro-Phe-pNA (45 µM) für *hFKBP12* und suc-Ala-Ala-Pro-Phe-pNA (45 µM) für *CypA* mit verschiedenen Inhibitorkonzentrationen bei 4 °C für 10 min in 35 mM HEPES (pH 7,5) vorinkubiert. Danach wurde die Reaktion durch Zugabe von 100 µg/mL Chymotrypsin gestartet und die Menge an frei gesetzten 4-Nitroanilin bei einer Wellenlänge von 390 nm gemessen.

Für die Bestimmung der IC₅₀-Werte der Inhibition der *hFKBP*-bzw. *hCypA*-PPlase-Aktivität durch die Verbindungen **7-10** wurden 100 nM *hFKBP12* bzw. 8 nM *hCypA* eingesetzt. Als Substrat für *hFKBP12* wurde suc-Ala-Lys-Pro-Phe-pNA (45 µM) und für *hCypA* suc-Ala-Gly-Pro-Phe-pNA verwendet.

Zur Bestimmung der Inhibition der PPlase-Aktivität des FKBP12 durch die Cyp18*[**7-10**]-Komplexe wurde 1 µM **7-10** mit Cyp18-Konzentrationen im Konzentrationsbereich von 0 -200 nM für 15 min inkubiert. Überschüssiger Inhibitor wurde mittels *Amicon Ultra 0.5 mL centrifugal filters MWCO 10 kDa* (Millipore) abgetrennt. Zur vollständigen Abtrennung des Inhibitors wurde dieser Vorgang sieben Mal nach Zugabe von 400 µl HEPES pH 7.8, 0.1 mg/ml BSA wiederholt. Anschließend wird das Volumen der Ansätze auf 520 µl aufgefüllt. Zur Messung der FKBP12-Inhibition wurden 130 µl der gereinigten Cyp18*[**7-10**]-Komplexe in einem Gesamtvolumen von 150 µl eingesetzt. Als Substrat diente suc-Ala-Lys-Pro-Phe-pNA, da dieses Peptid den größten Unterschied der k_{cat}/K_M zwischen FKBP12 und Cyp18 aufwies. Um freies Cyclophilin im Messansatz auszuschließen wurde die Aktivität des Komplexes in Abwesenheit von FKBP12 bestimmt. Zur Bestimmung des nicht-gebundenen Enzyms wurde die Aktivität von 3 nM Cyp18 in Anwesenheit der Cyp18*[**7-10**]-Komplexe bestimmt. Zur Bestimmung der Inhibition der PPlase-Aktivität des Cyp18 durch die FKBP12*[**7-10**]-Komplexe wurde eine analoges Protokoll eingesetzt. Als Substrat diente hier

Suc-Ala-Gly-Pro-Phe-pNA, da FKBP12 gegenüber diesem Substrat keine PPIase-Aktivität im eingesetzten Konzentrationsbereich aufwies.

Calcineurin-Assay

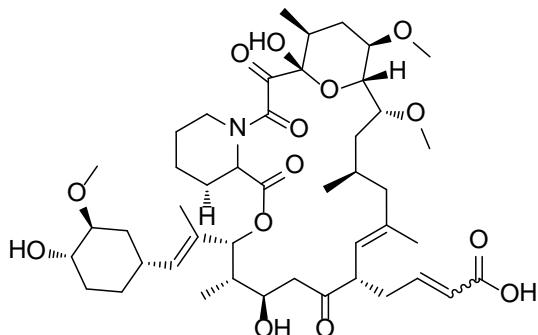
Die Calcineurin-Aktivität wurde mittels eines Malachitgrün-Assays bestimmt. Dazu wird ein phosphoryliertes Peptid, das die Teilsequenz der RII-Untereinheit des bovinen PKA (RII-Phosphopeptid) repräsentiert, als Substrat verwendet. Zur Bestimmung der inhibitorischen Eigenschaften der Verbindungen gegenüber Calcineurin, wurden die Derivate (25 nM-10 µM) entweder mit *hCypA* (15 µM) oder *hFKBP12* (15 µM) oder mit einer 1:1 Mischung aus *hCypA/hFKBP12* (je 7,5 µM), 1 U/µl CaN, 420 nM Calmodulin in einer 384-well Platte bei 30 °C für 15 min vorinkubiert. Die Dephosphorylierung wurde durch Zugabe des RII-Phosphopeptids gestartet und 30 min bei 30 °C gehalten. Anschließend wurde das Malachitgrün Reagenz zugegeben und die Absorption für 15 min mit einem PerkinElmer EnVision 2103 Multilabel reader gemessen. Die Aktivität wurde als Mittelwert einer Dreifachbestimmung ± Standardabweichung angegeben, ausgedrückt als Prozentsatz der Calcineurin-Aktivität gegenüber einer Kontrolle ohne Inhibitor (100%) und einer Calcineurin-freien Kontrolle (0%).

NFAT-Reportergen-Assay

Für die Bestimmung der Inhibition der Expression des NFAT-Reportergens Luciferase wurden Jurkat-Zellen mit dem NFAT-Luciferase Reportergene Plasmid (1–1,5 µg) nach dem Amaxa-Protokoll (Amaxa, Köln, Deutschland) elektroporiert. Die transfizierten Zellen wurden in RPMI 1640 Medium mit 10 % FCS und 2 mM L-Glutamin für 16 h im Brutschrank bei 5 % CO₂ und 37 °C angezogen. Die Zellen wurden mit Inhibitor für 30 min vorinkubiert und mit 10 ng/ml PMA + 1 µg/ml Ionomycin für 5 h stimuliert. Nach der Zellyse wurde die Menge an Luciferase via Biolumineszenz-Messung bestimmt. Die untersuchten Verbindungen wurden in einem Konzentrationsbereich von 0,1-25 µM eingesetzt.

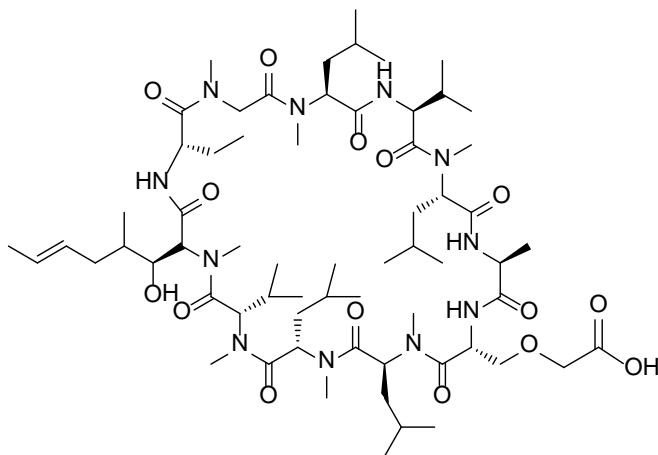
7.2 Synthese der Verbindungen

Synthese der FK506-C₄₀-Carbonsäure 1^[1]



Zu einer Lösung von FK506 (100,0 mg; 124,4 μmol) in 6 ml 1,2-Dichlorbenzol in einem Mikrowellengefäß wurden Acrylsäure (177,0 μl ; 2,6 mmol) und der Hoveyda-Grubbs Katalysator der 2. Generation (7,8 mg, 12,4 μmol) gegeben. Die Lösung wurde bei 200 W und 150 °C für 20 min bestrahlt. Im Anschluss wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck destilliert und das Rohprodukt säulenchromatographisch mittels präparativer HPLC getrennt. Zur Abtrennung des Katalysators waren zwei Reinigungsschritte notwendig. Die erste Reinigung erfolgt über eine RP C8 Säule (Nucleosil 250 x 25 mm) mit einem linearen Gradienten von 20-90 % B in 60 min und einer Flussrate von 17 ml/min. Das Produkt wird lyophilisiert und ein zweites Mal mittels einer RP C18 Säule (Phenomenex Gemini-NX, 250 x 21,2 mm) mit einem linearen Gradienten von 30-80 % B in 40 min und einer Flussrate von 17 ml/min gereinigt. Die Fraktionen wurden vereinigt, lyophilisiert und das Produkt als weißer Feststoff in einer Ausbeute von 79,0 mg (75,2 %) erhalten. $[\text{M}+\text{H}]^+_{\text{berechn.}} = 848,5$, $[\text{M}+\text{H}]^+_{\text{gefund.}} = 848,6$. $R_t=9,5$ min

Synthese des [O-(Carboxymethyl)-D-Ser]⁸-CsA 2



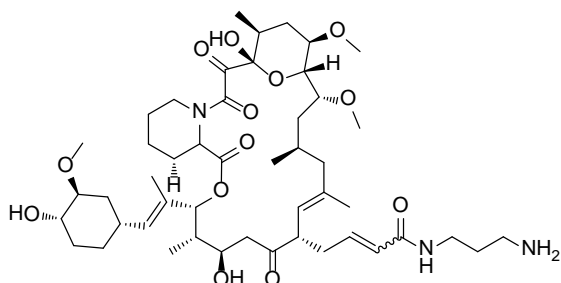
Eine Lösung aus [D-Ser]⁸-CsA (1,0 g; 834 μ mol), *tert*-Butylbromoacetat (500,0 μ l; 3,4 mmol) und Benzyltriethylammoniumchlorid (31,5 μ l; 83 μ mol) wurde mit 3 ml einer 30 %igen wässrigen NaOH-Lösung 2 h bei Raumtemperatur gerührt. Danach wurde mit Wasser (5 ml) verdünnt und mit Diethylether extrahiert. Die organische Phase wurde über Na₂SO₄ getrocknet und anschließend filtriert. Das so erhaltene Rohprodukt, wurde ohne weitere Aufarbeitung im nächsten Schritt eingesetzt.

Eine Lösung des *tert*-Butylesters (800 mg; 600 μ mol) in 5 ml Methanol wurde zu 10 ml einer 1 M methanolischen KOH-Lösung gegeben und 2 h bei Raumtemperatur gerührt. Es wurde mit Essigsäure auf pH 3 angesäuert und $\frac{2}{3}$ des Methanols unter verminderten Druck destilliert. Anschließend wurde Ethylacetat zugegeben und mit Wasser gewaschen. Die organische Phase wurde über Na₂SO₄ getrocknet, filtriert und anschließend im Vakuum destilliert. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch via präparativer HPLC gereinigt. Dazu wurde eine RP C18 Säule (Phenomenex Gemini-NX, 250 x 21,2 mm) mit einem linearen Gradienten von 30-80 % B in 40 min und einer Flussrate von 17 ml/min verwendet. Nach der erfolgten Reinigung wurde das Produkt als weißer Feststoff mit einer Ausbeute von 750 mg (72,1 %, ausgehend von [D-Ser]⁸-CsA) erhalten. $[M+H]^+_{\text{berechn.}} = 1277,6$, $[M+H]^+_{\text{gefund.}} = 1277,8$. $R_t = 9,6$ min

Allgemeine Synthesevorschrift 1: Synthese der FK506-C₄₀-CO-NH(CH)_nNH₂-Derivate 3-6

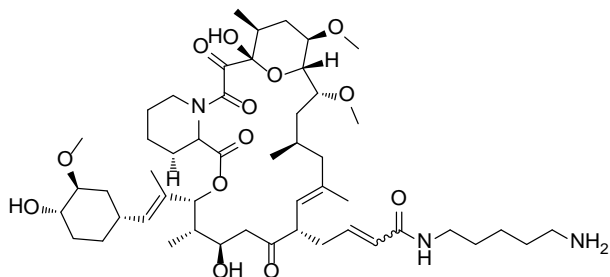
Verbindung **1** (10,0 mg; 11,8 μmol), PyBOP (6,0 mg; 11,8 μmol) und DIPEA (4,21 μl; 23,6 μmol) wurden in 5 ml DMF gelöst und für 5 min gerührt. Das jeweilige Diamin (23,6 μmol) wurde anschließend zugegeben und für 1 h bei Raumtemperatur gerührt. Nach beendeter Reaktion wurde das Lösungsmittel im Vakuum destilliert und das Rohprodukt säulenchromatographisch durch präparativer HPLC gereinigt. Dazu wurde eine RP C18 Säule (Interchrom 250 x 10 mm) mit einem linearen Gradienten von 30-80 % B in 40 min und einer Flussrate von 5 ml/min verwendet.

Synthese des FK506-C₄₀-CO-NH(CH)₃NH₂-Derivates **3**



Für die Synthese der Verbindung **3**, wurde nach der allgemeinen Synthesevorschrift 1 verfahren. Dazu wurde zu dem beschriebenen Reaktionsgemisch 1,3-Diaminopropan (2,0 μl; 23,6 μmol) gegeben. Nach der erfolgten Reinigung wurde das Produkt als weißer Feststoff mit einer Ausbeute von 5,8 mg (55,1 %) erhalten. $[M+H]^+$ _{berechn.} = 904,5, $[M+H]^+$ _{gefunden.} = 904,3. R_t = 8,4 min

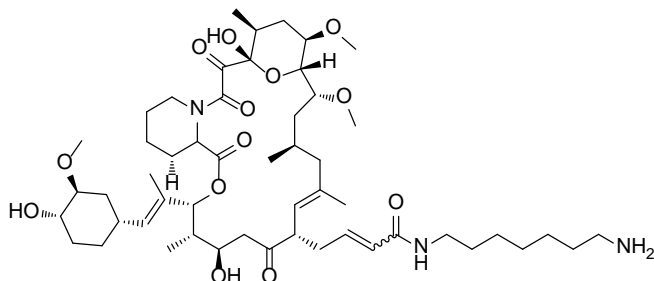
Synthese des FK506-C₄₀-CO-NH(CH)₅NH₂-Derivates **4**



Für die Synthese der Verbindung **4**, wurde nach der allgemeinen Synthesevorschrift 1 verfahren. Dazu wurde zu dem beschriebenen Reaktionsgemisch 1,5-Diaminopentan (2,8 μl; 23,6 μmol) gegeben. Nach der erfolgten Reinigung wird das Produkt als weißer Feststoff mit

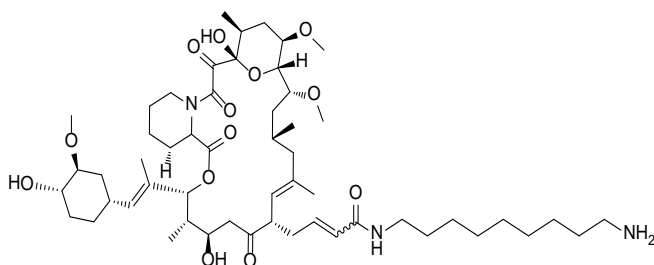
einer Ausbeute von 5,4 mg (49,5 %) erhalten. $[M+H]^+_{\text{berechn.}} = 932,6$, $[M+H]^+_{\text{gefund.}} = 932,4$. $R_t = 8,6$ min

Synthese des FK506-C₄₀-CO-NH(CH)₇NH₂-Derivates 5



Für die Synthese der Verbindung **5**, wurde nach der allgemeinen Synthesevorschrift 1 verfahren. Dazu wurde zu dem beschriebenen Reaktionsgemisch 1,7-Diaminoheptan (3,0 mg; 23,6 μmol) gegeben. Nach der erfolgten Reinigung wurde das Produkt als weißer Feststoff mit einer Ausbeute von 6,2 mg (54,8 %) erhalten. $[M+H]^+_{\text{berechn.}} = 960,6$, $[M+H]^+_{\text{gefund.}} = 960,5$. $R_t = 8,9$ min

Synthese des FK506-C₄₀-CO-NH(CH)₉NH₂-Derivates 6

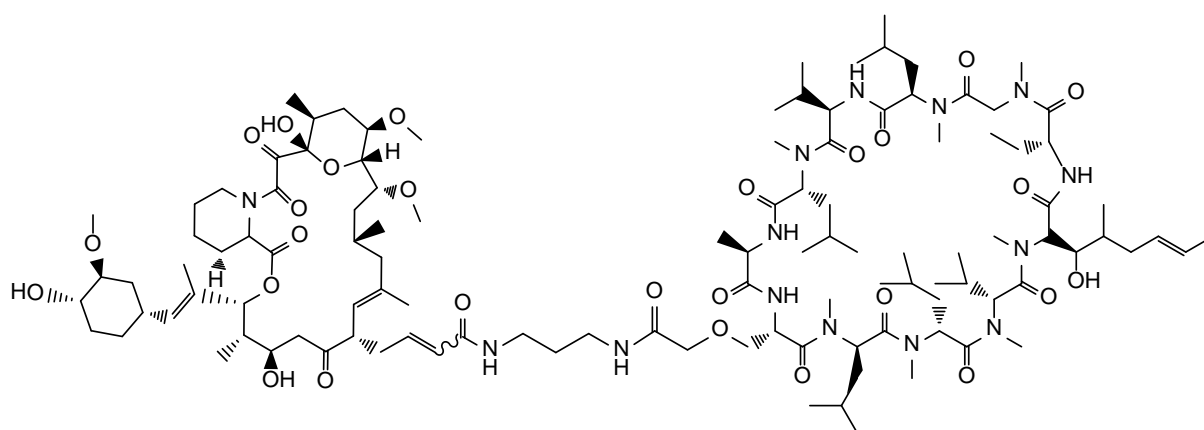


Für die Synthese der Verbindung **6**, wurde nach der allgemeinen Synthesevorschrift 1 verfahren. Dazu wurde zu dem beschriebenen Reaktionsgemisch 1,9-Diaminononan (7,0 mg; 23,6 μmol) gegeben. Nach der erfolgten Reinigung wurde das Produkt als weißer Feststoff mit einer Ausbeute von 7,1 mg (57,7 %) erhalten. $[M+H]^+_{\text{berechn.}} = 988,6$, $[M+H]^+_{\text{gefund.}} = 988,6$. $R_t = 9,2$ min

Allgemeine Synthesevorschrift 2: Synthese der FK506-C₄₀-CO-NH(CH)_nNH-[OCCH₂-D-Ser]⁸-CsA-Derivate 7-10

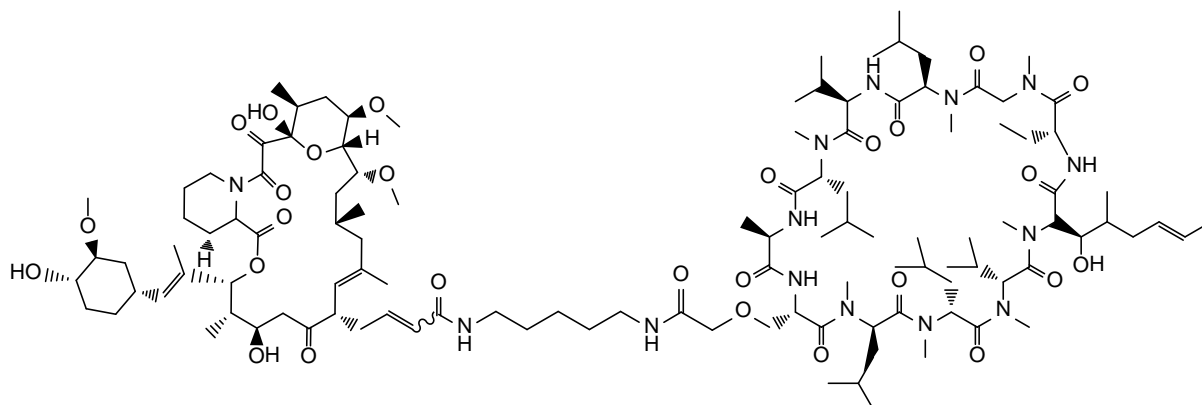
Verbindung **2** (11,6 mg; 9,2 μ mol), PyBOP (4,7 mg; 9,2 μ mol), und DIPEA (5,0 μ l; 28,1 μ mol) wurden in 5 ml DMF gelöst und für 5 min gerührt. Die jeweilige Verbindung **2-6** (11,0 μ mol) wurde anschließend zugegeben und für 1 h bei Raumtemperatur gerührt. Nach beendeter Reaktion wurde das Lösungsmittel im Vakuum destilliert und das Rohprodukt säulenchromatographisch via präparativer HPLC gereinigt. Dazu wurde eine RP C18 Säule (Phenomenex Gemini-NX, 250 x 21,2 mm) mit einem linearen Gradienten von 30-90 % B in 50 min und einer Flussrate von 17 ml/min verwendet.

Synthese des FK506-C₄₀-CO-NH(CH)₃NH-[OCCH₂-D-Ser]⁸-CsA-Derivates **7**



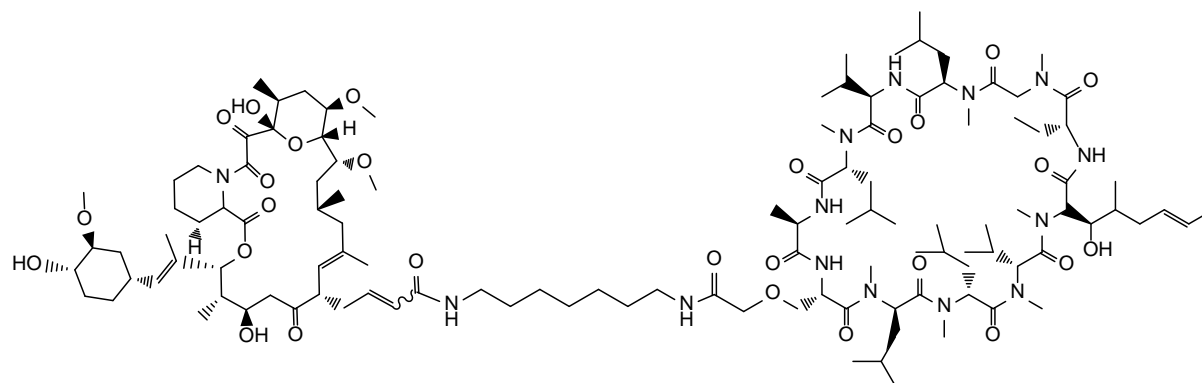
Für die Synthese der Verbindung **7**, wurde nach der allgemeinen Synthesevorschrift 2 verfahren. Dazu wurde zu dem beschriebenen Reaktionsgemisch Verbindung **3** (9,9 mg; 11,0 μ mol) gegeben. Nach der erfolgten Reinigung wurde das Produkt als weißer Feststoff mit einer Ausbeute von 10,2 mg (51,2 %) erhalten. $[M+H]^+$ _{berechn.} = 2163,4 $[M+H]^+$ _{gefund.} = 2163,6. R_t = 14,1 min

Synthese des FK506-C₄₀-CO-NH(CH)₅NH-[OCCH₂-D-Ser]⁸-CsA-Derivates **8**



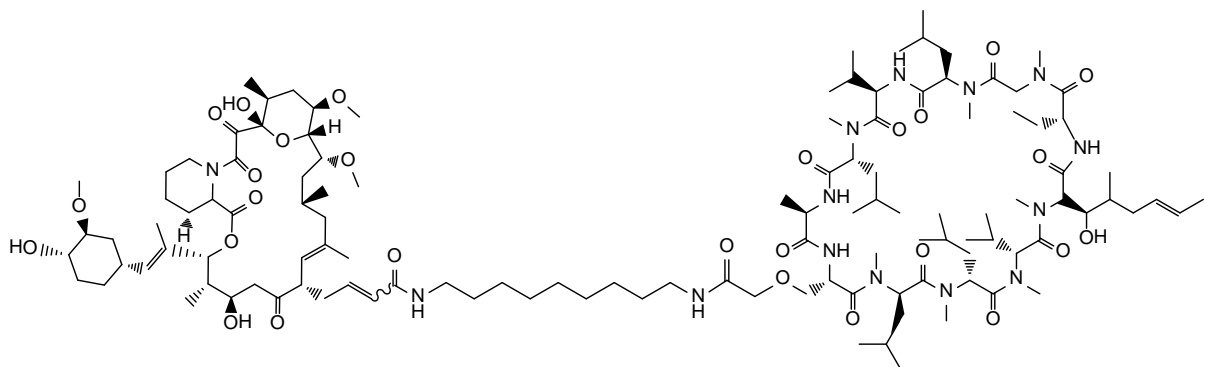
Für die Synthese der Verbindung **8**, wurde nach der allgemeinen Synthesevorschrift 2 verfahren. Dazu wurde zu dem beschriebenen Reaktionsgemisch Verbindung **4** (10,2 mg; 11,0 µmol) gegeben. Nach der erfolgten Reinigung wurde das Produkt als weißer Feststoff mit einer Ausbeute von 15,4 mg (76,6 %) erhalten. $[M+H]^+$ _{berechn.} = 2190,4 $[M+H]^+$ _{gefund.} = 2190,2. R_t = 14,2 min

Synthese des FK506-C₄₀-CO-NH(CH)₇NH-[OCCH₂-D-Ser]₈-CsA-Derivates **9**



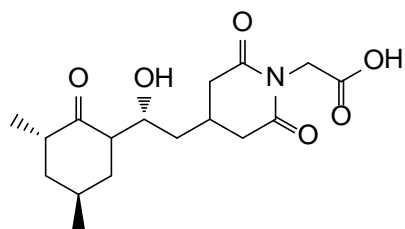
Für die Synthese der Verbindung **9**, wurde nach der allgemeinen Synthesevorschrift 2 verfahren. Dazu wurde zu dem beschriebenen Reaktionsgemisch Verbindung **5** (10,5 mg; 11,0 µmol) gegeben. Nach der erfolgten Reinigung wurde das Produkt als weißer Feststoff mit einer Ausbeute von 13,1 mg (64,2 %) erhalten. $[M+H]^+$ _{berechn.} = 2218,5 $[M+H]^+$ _{gefund.} = 2218,2. R_t = 14,6 min

Synthese des FK506-C₄₀-CO-NH(CH₂)₉NH-[OCCH₂-D-Ser]⁸-CsA-Derivates **10**



Für die Synthese der Verbindung **10**, wurde nach der allgemeinen Synthesevorschrift 2 verfahren. Dazu gibt man zu dem beschriebenen Reaktionsgemisch Verbindung **6** (11,4 mg; 11,0 μ mol) gegeben. Nach der erfolgten Reinigung wurde das Produkt als weißer Feststoff mit einer Ausbeute von 11,7 mg (56,8 %) erhalten. $[M+H]^+$ _{berechn.} = 2246,9 $[M+H]^+$ _{gefund.} = 2246,8. R_t = 14,8 min

Synthese von *N*-(Carboxymethyl)-Cycloheximid **11**



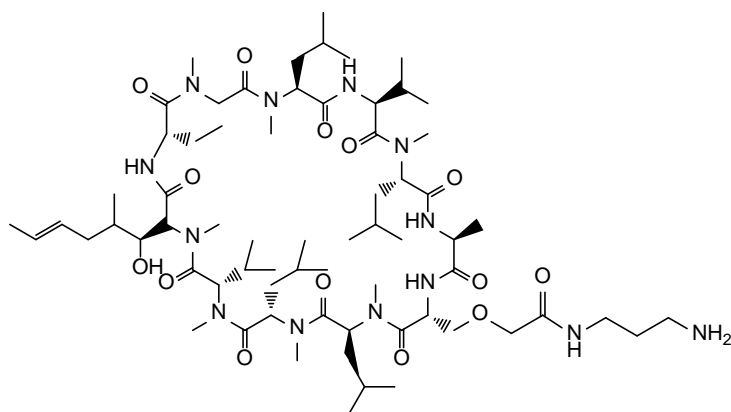
Zu einer Lösung aus Cycloheximid (500 mg; 1,78 mmol) in 15 ml DMF wurde wasserfreies K₂CO₃ (442 mg; 3,2 mmol) und *tert*-Butylbromoacetat (369 μ l; 2,5 mmol) gegeben und über Nacht bei Raumtemperatur rühren gelassen. Anschließend wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck destilliert, der Rückstand in 10 ml Ethylacetat aufgenommen und die Lösung filtriert. Das Ethylacetat wurde im Vakuum destilliert und das Rohprodukt in 10 ml CH₂Cl₂ aufgenommen und 4 ml einer 2,2 M Zink(II)chlorid-diethyletherat Lösung zugegeben. Es wurde bei Raumtemperatur für 4 h gerührt. Die Lösung wurde in einen Scheidetrichter überführt und mit gesättigter EDTA-Lösung (2 x 10 ml) gewaschen. Die Phasen wurden getrennt und die organische Phase wurde nochmals mit 10 ml einer gesättigten NaCl-Lösung gewaschen. Die organische Phase wurde abgetrennt, über Na₂SO₄ getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck destilliert. Das Rohprodukt wurde ohne weitere Reinigung für die anschließenden Synthesen weiterverwendet. Es wurde in einer Ausbeute

von 479 mg (79,0 % bezogen auf das Cycloheximid) erhalten. $[M+H]^+_{\text{berechn.}} = 340.2$, $[M+H]^+_{\text{gefunden.}} = 340.4$.

Allgemeine Synthesevorschrift 3: Synthese der $[D\text{-Ser-CO-NH(CH)}_n\text{NH}_2]^8\text{-CsA-Derivate 12-15}$

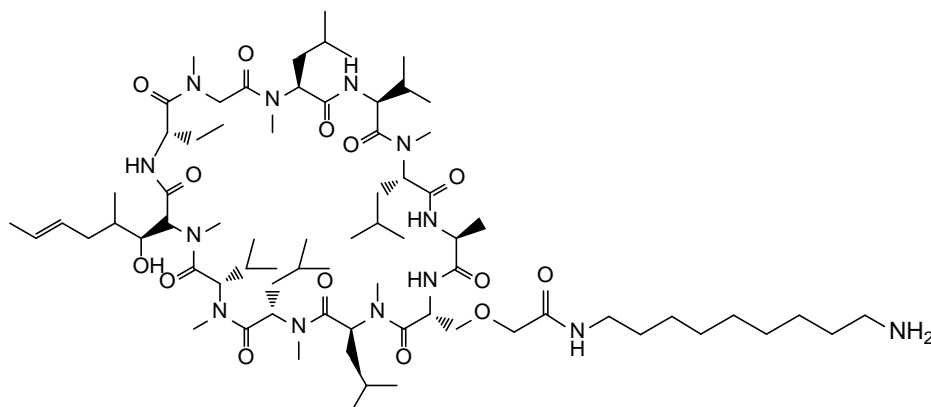
Verbindung **2** (10,0 mg; 7,8 μmol), PyBOP (4,0 mg; 7,8 μmol), und DIPEA (2,8 μl ; 15,6 μmol) wurden in 5 ml DMF gelöst und für 5 min gerührt. Das jeweilige Diamin (15,6 μmol) wurde anschließend zugegeben und für 1 h bei Raumtemperatur gerührt. Nach beendeter Reaktion wurde das Lösungsmittel im Vakuum destilliert und das Rohprodukt säulenchromatographisch via präparativer HPLC gereinigt. Dazu wurde eine RP C18 Säule (Interchrom 250 x 10 mm) mit einem linearen Gradienten von 30-80 % B in 40 min und einer Flussrate von 5 ml/min verwendet.

Synthese des $[D\text{-Ser-CO-NH(CH)}_3\text{NH}_2]^8\text{-CsA-Derivates 12}$



Für die Synthese der Verbindung **12**, wurde nach der allgemeinen Synthesevorschrift 3 verfahren. Dazu wurde zu dem beschriebenen Reaktionsgemisch 1,3-Diaminopropan (1,4 μl ; 15,6 μmol) gegeben. Nach der erfolgten Reinigung wurde das Produkt als weißer Feststoff mit einer Ausbeute von 7,5 mg (72,1 %) erhalten. $[M+H]^+_{\text{berechn.}} = 1333,9$, $[M+H]^+_{\text{gefunden.}} = 1333,7$. $R_t = 10,3$ min

Synthese des [D-Ser-CO-NH(CH)₉NH₂]⁸-CsA-Derivates 15

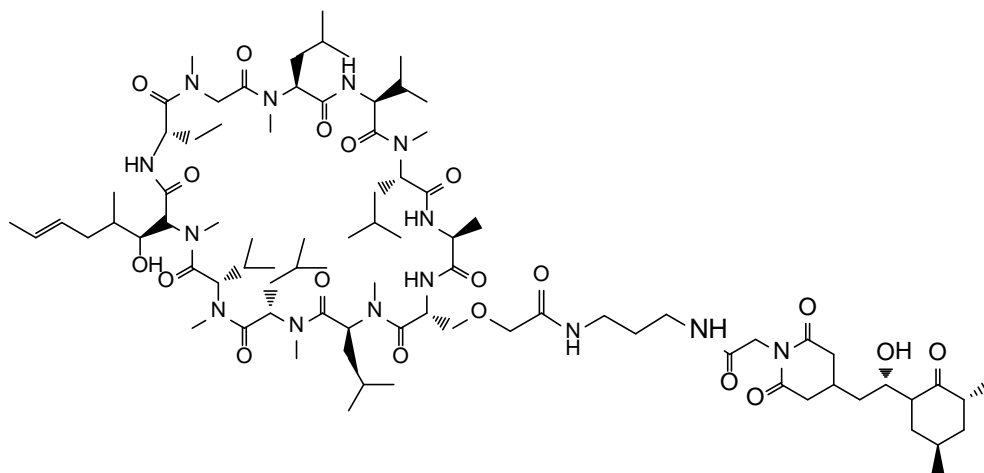


Für die Synthese der Verbindung **15**, wurde nach der allgemeinen Synthesevorschrift 3 verfahren. Dazu wurde zu dem beschriebenen Reaktionsgemisch 1,9-Diaminopentan (2,5 mg; 15,6 μmol) gegeben. Nach der erfolgten Reinigung wurde das Produkt als weißer Feststoff mit einer Ausbeute von 7,1 mg (64,5 %) erhalten. $[\text{M}+\text{H}]^+_{\text{berechn.}} = 1417,7$, $[\text{M}+\text{H}]^+_{\text{gefunden.}} = 1417,8$. $R_t = 11,1$ min

Allgemeine Synthesevorschrift 4: Synthese der CHX-CH₂CO-NH(CH)_nNH-[OCCH₂-D-Ser]⁸-CsA-Derivate 16-19

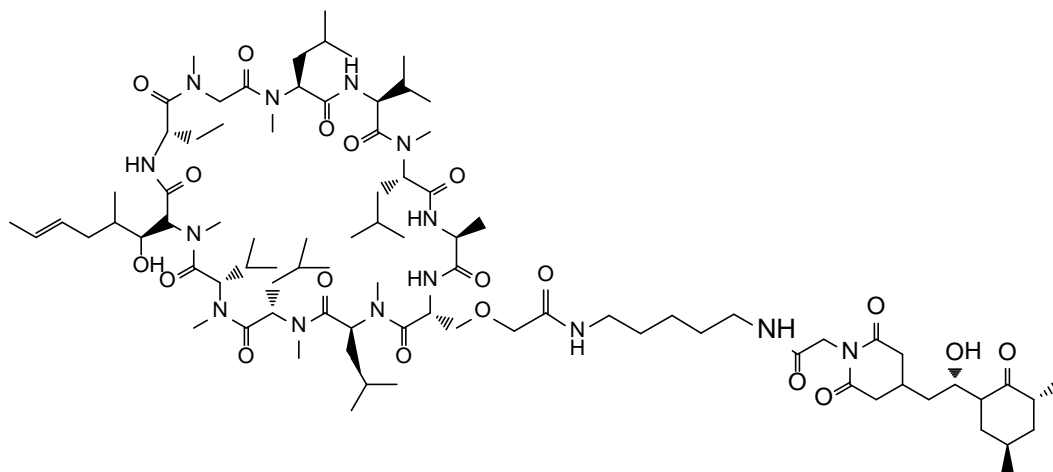
Verbindung **11** (5,0 mg; 14,7 μmol), PyBOP (7,5 mg; 14,7 μmol), und DIPEA (5,4 μl ; 29,4 μmol) wurden in 5 ml DMF gelöst und für 5 min gerührt. Die jeweilige Verbindung **12-15** (14,7 μmol) wurde anschließend zugegeben und für 1 h bei Raumtemperatur gerührt. Nach beendeter Reaktion wurde das Lösungsmittel im Vakuum destilliert und das Rohprodukt säulenchromatographisch via präparativer HPLC gereinigt. Dazu wurde eine RP C18 Säule (Phenomenex Gemini-NX, 250 x 21,2 mm) mit einem linearen Gradienten von 30-80 % B (ohne TFA) in 40 min und einer Flussrate von 17 ml/min verwendet.

Synthese des CHX-CH₂CO-NH(CH)₃NH-[OCCH₂-D-Ser]⁸-CsA-Derivates 16



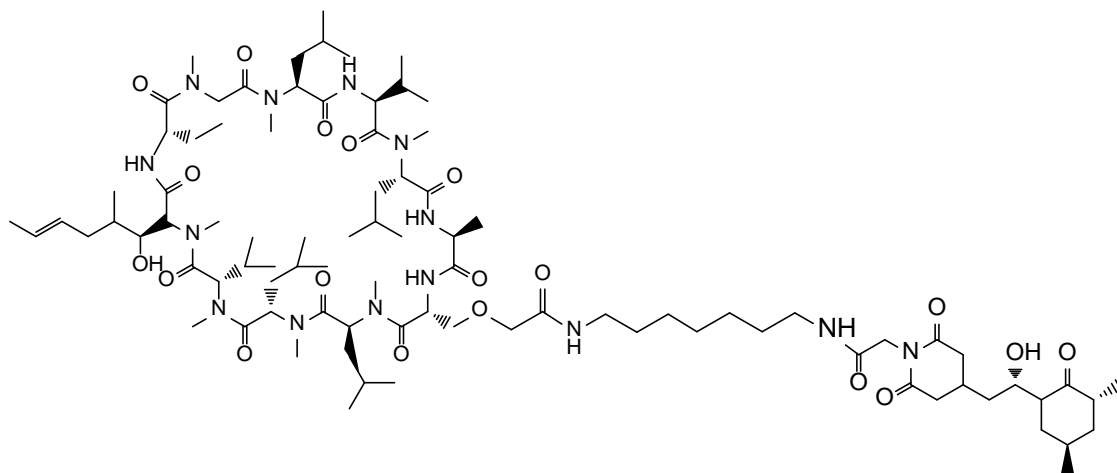
Für die Synthese der Verbindung **16** wurde nach der allgemeinen Synthesevorschrift 4 verfahren. Dazu wurde zu dem beschriebenen Reaktionsgemisch Verbindung **12** (19,6 mg; 14,7 μ mol) gegeben. Nach der erfolgten Reinigung wurde das Produkt als weißer Feststoff mit einer Ausbeute von 18,6 mg (76,5 %) erhalten. $[M+H]^+$ _{berechn.} = 1654,1 $[M+H]^+$ _{gefund.} = 1654,3. R_t = 12,1 min

Synthese des CHX-CH₂CO-NH(CH)₅NH-[OCCH₂-D-Ser]⁸-CsA-Derivates 17



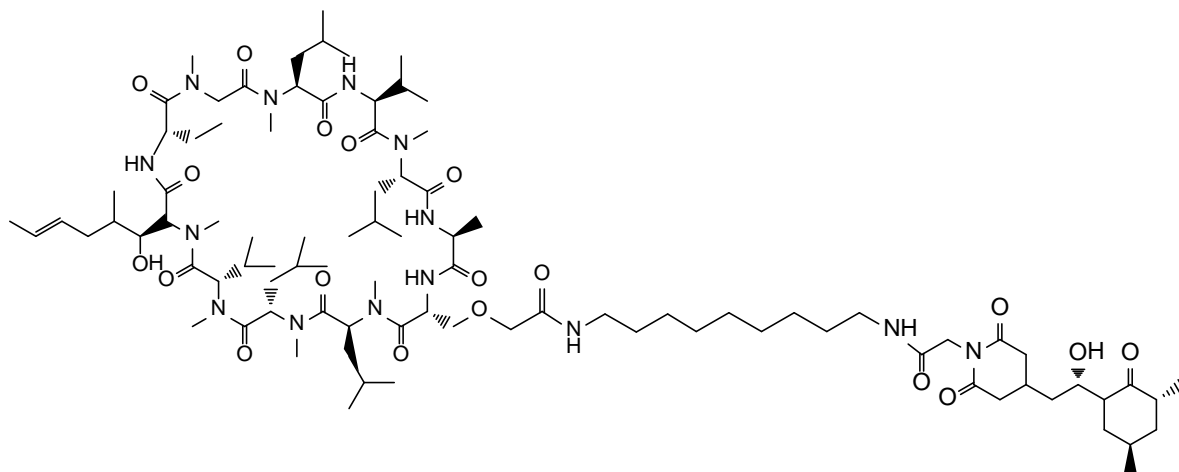
Für die Synthese der Verbindung **17** wurde nach der allgemeinen Synthesevorschrift 4 verfahren. Dazu wurde zu dem beschriebenen Reaktionsgemisch Verbindung **13** (20,0 mg; 14,7 μ mol) gegeben. Nach der erfolgten Reinigung wurde das Produkt als weißer Feststoff mit einer Ausbeute von 14,1 mg (69,1 %) erhalten. $[M+H]^+$ _{berechn.} = 1681,1 $[M+H]^+$ _{gefund.} = 1681,2. R_t = 12,2 min

Synthese des CHX-CH₂CO-NH(CH)₇NH-[OCCH₂-D-Ser]⁸-CsA-Derivates **18**



Für die Synthese der Verbindung **18** wurde nach der allgemeinen Synthesevorschrift 4 verfahren. Dazu wurde zu dem beschriebenen Reaktionsgemisch Verbindung **14** (20,4 mg; 14,7 μ mol) gegeben. Nach der erfolgten Reinigung wurde das Produkt als weißer Feststoff mit einer Ausbeute von 17,3 mg (68,7 %) erhalten. $[M+H]^+$ _{berechn.} = 1710,2 $[M+H]^+$ _{gefund.} = 1710,2. R_t = 12,6 min

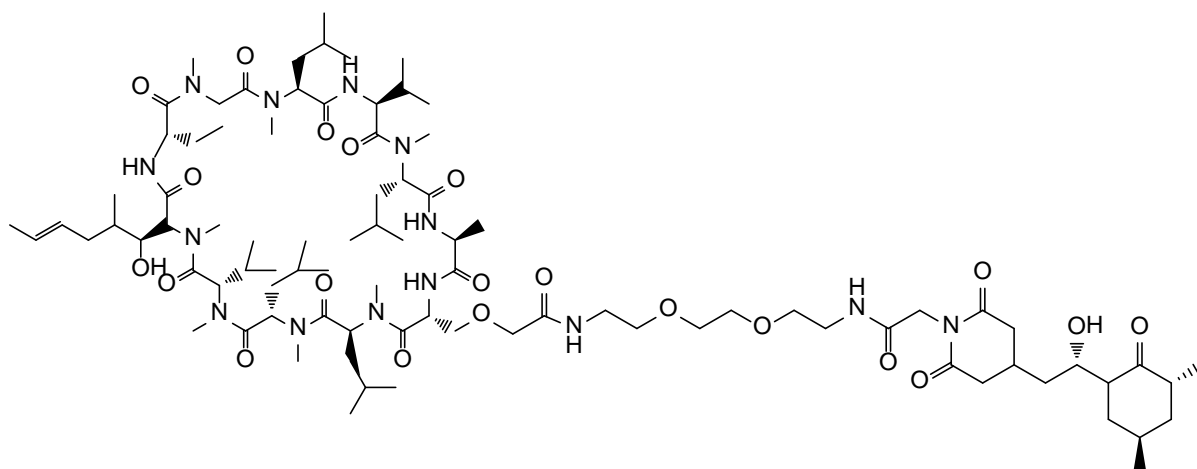
Synthese des CHX-CH₂CO-NH(CH)₉NH-[OCCH₂-D-Ser]⁸-CsA-Derivates **19**



Für die Synthese der Verbindung **19** wurde nach der allgemeinen Synthesevorschrift 4 verfahren. Dazu wurde zu dem beschriebenen Reaktionsgemisch Verbindung **15** (20,8 mg; 14,7 μ mol) gegeben. Nach der erfolgten Reinigung wurde das Produkt als weißer Feststoff mit einer Ausbeute von 16,4 mg (64,1 %) erhalten. $[M+H]^+$ _{berechn.} = 1738,2 $[M+H]^+$ _{gefund.} = 1738,1. R_t = 13,1 min

Synthese des CHX-CH₂CO-NH(CH₂)₂O(CH₂)₂O(CH₂)₂NH-[OCCH₂-D-Ser]⁸-CsA-Derivates

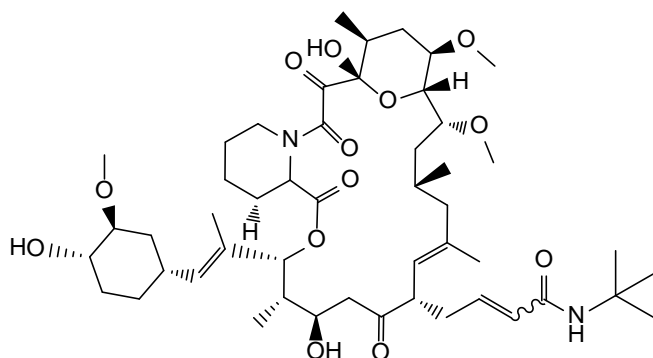
20



Verbindung **2** (10,0 mg; 7,8 μmol), PyBOP (4,0 mg; 7,8 μmol), und DIPEA (2,8 μl ; 15,6 μmol) wurden in 5 ml DMF gelöst und für 5 min gerührt. 2,2'-(Ethyldioxy)-diethylamin (2,3 μl ; 15,6 μmol) wurde anschließend zugegeben und für 2 h bei Raumtemperatur gerührt. Nach beendeter Reaktion wurde das Lösungsmittel im Vakuum destilliert und das Rohprodukt säulenchromatographisch via präparativer HPLC gereinigt. Dazu wurde eine RP C18 Säule (Interchrom 250 x 10 mm) mit einem linearen Gradienten von 30-80 % in 40 min und einer Flussrate von 5 ml/min verwendet.

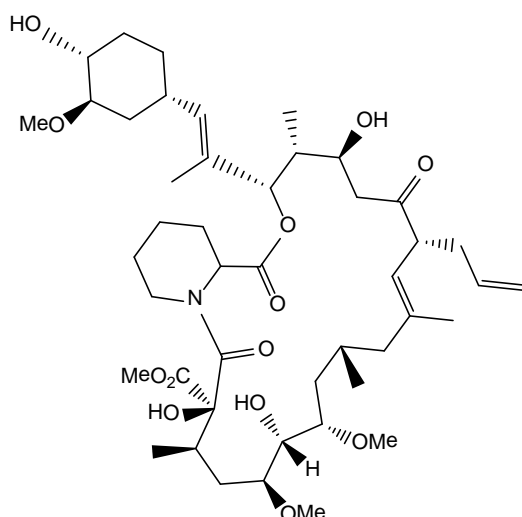
Verbindung **11** (5,0 mg; 14,7 μmol), PyBOP (7,5 mg; 14,7 μmol), und DIPEA (5,4 μl ; 29,4 μmol) wurden in 5 ml DMF gelöst und für 5 min gerührt. Das Rohprodukt (20,7 mg; 14,7 μmol) wurde anschließend zugegeben und für 2 h bei Raumtemperatur gerührt. Nach beendeter Reaktion wurde das Lösungsmittel im Vakuum destilliert und das Rohprodukt säulenchromatographisch via präparativer HPLC gereinigt. Dazu wurde eine RP C18 Säule (Phenomenex Gemini-NX, 250 x 21,2 mm) mit einem linearen Gradienten von 30-80 % in 40 min und einer Flussrate von 17 ml/min verwendet. Nach der erfolgten Reinigung wurde das Produkt als weißer Feststoff mit einer Ausbeute von 15,9 mg (62,6 %) erhalten. $[\text{M}+\text{H}]^+_{\text{berechn.}} = 1727,2$ $[\text{M}+\text{H}]^+_{\text{gefunden.}} = 1727,0$. $R_t = 11,8$ min

Synthese des FK506-C₄₀-CONHC(CH₃)₃-Derivates 21



Verbindung **1** (10,0 mg; 11,8 μmol), HATU (4,5 mg; 11,8 μmol) und DIPEA (4,21 μl ; 23,6 μmol) wurden in 5 ml DMF gelöst und für 5 min gerührt. *tert*-Butylamin (4,9 mg; 23,6 μmol) wurde anschließend zugegeben und für 1 h bei Raumtemperatur gerührt. Nach beendeter Reaktion wurde das Lösungsmittel im Vakuum destilliert und das Rohprodukt säulenchromatographisch via präparativer HPLC gereinigt. Dazu wurde eine RP C18 Säule (Interchrom 250 x 10 mm) mit einem linearen Gradienten von 30-80 % B in 40 min und einer Flussrate von 5 ml/min verwendet. Nach der erfolgten Reinigung wurde das Produkt als weißer Feststoff mit einer Ausbeute von 7,2 mg (67,9 %) erhalten. $[\text{M}+\text{H}]^+_{\text{berechn.}} = 903,6$, $[\text{M}+\text{H}]^+_{\text{gefunden.}} = 903,7$. $R_t = 20,6$ min

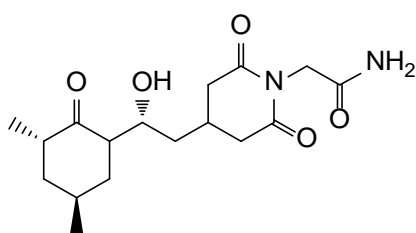
Synthese der FK506-C₉-COOMe-Derivates 22



Zu einer Lösung aus FK506 (50,0 mg, 62,2 μmol) in 6 ml wasserfreiem Methanol wurden 2 ml einer 0,2 M wässrigen LiOH-Lösung gegeben und 4 h unter Rückfluss erhitzt.

Anschließend wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck destilliert und das Rohprodukt säulenchromatographisch mittels präparativer HPLC gereinigt. Dazu wurde eine RP C18 Säule (Phenomenex Gemini-NX, 250 x 21,2 mm) mit einem linearen Gradienten von 30-80 % B in 40 min und einer Flussrate von 17 ml/min verwendet. Nach der erfolgten Reinigung wurde das Produkt als weiße Feststoffe mit einer Ausbeute von 24,0 mg (46,2 %) erhalten. $[M+H]^+_{\text{berechn.}} = 836,1$, $[M+H]^+_{\text{gefunden.}} = 836,4$. $R_t = 10,1$ min

Synthese des *N*-(carboxamidomethyl)-Cycloheximid 23

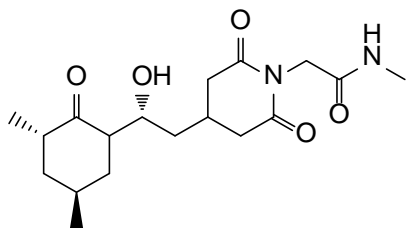


Zu einer Lösung aus Cycloheximid (20 mg; 71,1 μmol) in 5 ml DMF wurde wasserfreies K_2CO_3 (17,6 mg; 127,9 μmol) und 2-Bromoacetamid (13,7 mg; 99,6 μmol) gegeben und über Nacht bei Raumtemperatur rühren gelassen. Anschließend wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck destilliert, der Rückstand in 10 ml Ethylacetat aufgenommen und die Lösung filtriert. Das Ethylacetat wurde entfernt und das Rohprodukt säulenchromatographisch mittels präparativer HPLC gereinigt. Dazu wurde eine RP C18 Säule (Phenomenex Gemini-NX, 250 x 21,2 mm) mit einem linearen Gradienten von 0-40 % B in 30 min und einer Flussrate von 17 ml/min verwendet. Nach der erfolgten Reinigung wurde das Produkt als weiße Feststoffe mit einer Ausbeute von 15,0 mg (62,5 %) erhalten. $[M+H]^+_{\text{berechn.}} = 339,4$, $[M+H]^+_{\text{gefunden.}} = 339,8$. $R_t = 5,5$ min

Allgemeine Synthesevorschrift 5 für die Synthese der *N*-(*N'*-carboxamidomethyl)-Cycloheximid-Derivate

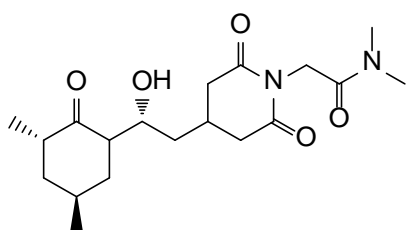
Verbindung **11** (10,0 mg; 29,5 μmol), PyBOP (16,0 mg; 29,5 μmol) und DIPEA (10,4 μl ; 59,0 μmol) wurden in 5 ml DMF gelöst und für 5 min gerührt. Das jeweilige Amin (59,0 μmol) wurde anschließend zugegeben und für 1 h bei Raumtemperatur gerührt. Nach beendeter Reaktion wurde das Lösungsmittel im Vakuum destilliert und das Rohprodukt säulenchromatographisch via präparativer HPLC gereinigt. Dazu wurde eine RP C18 Säule (Phenomenex Gemini-NX, 250 x 21,2 mm) mit einem linearen Gradienten von 30-80 % B (ohne TFA) in 40 min und einer Flussrate von 17 ml/min verwendet.

Synthese des *N*-(*N'*-Methylcarboxamidomethyl)-Cycloheximid-Derivates **24**



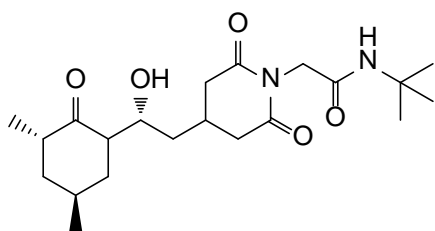
Für die Synthese der Verbindung **24** wurde nach der allgemeinen Synthesevorschrift 5 verfahren. Dazu wurde zu dem beschriebenen Reaktionsgemisch Methylamin Hydrochlorid (4,0 mg; 59,0 μmol) gegeben. Der lineare Gradient beträgt 10-50 % B (ohne TFA) in 30 min. Nach der erfolgten Reinigung wurde das Produkt als weißer Feststoff mit einer Ausbeute von 5,4 mg (52,4 %) erhalten. $[\text{M}+\text{H}]^+_{\text{berechn.}} = 353,2$, $[\text{M}+\text{H}]^+_{\text{gefunden.}} = 353,4$. $R_t = 5,6$ min

Synthese des *N*-(*N',N'*-Dimethylcarboxamidomethyl)-Cycloheximid-Derivates



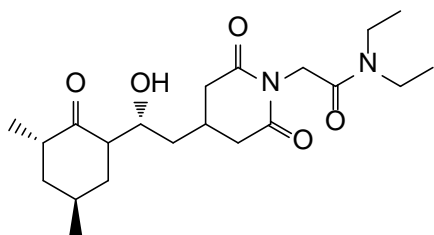
Für die Synthese des DM-CHX wurde nach der allgemeinen Synthesevorschrift 5 verfahren. Dazu wurde zu dem beschriebenen Reaktionsgemisch Dimethylamin Hydrochlorid (5,0 μl ; 59,0 μmol) gegeben. Der lineare Gradient beträgt 10-50 % B (ohne TFA) in 30 min. Nach der erfolgten Reinigung wurde das Produkt als weißer Feststoff mit einer Ausbeute von 6,0 mg (55,6 %) erhalten. $[\text{M}+\text{H}]^+_{\text{berechn.}} = 367,2$, $[\text{M}+\text{H}]^+_{\text{gefunden.}} = 367,5$. $R_t = 6,0$ min

Synthese des *N*-(*N'*-*tert*-Butylcarboxamidomethyl)-Cycloheximid-Derivates **25**



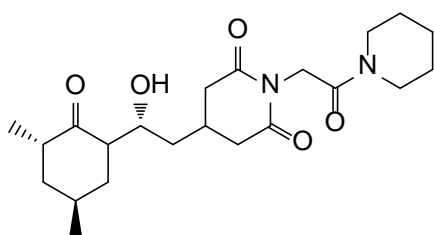
Für die Synthese der Verbindung **25** wurde nach der allgemeinen Synthesevorschrift 5 verfahren. Dazu wurde zu dem beschriebenen Reaktionsgemisch *tert*-Butylamin (6,1 µl mg; 59,0 µmol) gegeben. Nach der erfolgten Reinigung wurde das Produkt als weißer Feststoff mit einer Ausbeute von 5,3 mg (45,7 %) erhalten. $[M+H]^+_{\text{berechn.}} = 395,2$, $[M+H]^+_{\text{gefunden.}} = 395,3$. $R_t = 7,5$ min

Synthese des *N*-(*N*',*N*'-Diethylcarboxamidomethyl)-Cycloheximid-Derivates **26**



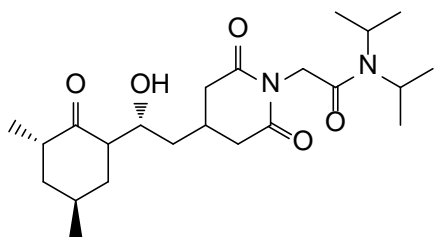
Für die Synthese der Verbindung **26** wurde nach der allgemeinen Synthesevorschrift 5 verfahren. Dazu wurde zu dem beschriebenen Reaktionsgemisch Diethylamin (5,0 µl; 59,0 µmol) gegeben. Der lineare Gradient beträgt 20-60 % B (ohne TFA) in 30 min. Nach der erfolgten Reinigung wurde das Produkt als weißer Feststoff mit einer Ausbeute von 7,4 mg (63,8 %) erhalten. $[M+H]^+_{\text{berechn.}} = 395,3$, $[M+H]^+_{\text{gefunden.}} = 395,5$. $R_t = 7,1$ min

Synthese des *N*-(*N*'-Piperidylcarboxamidomethyl)-Cycloheximid-Derivates **27**



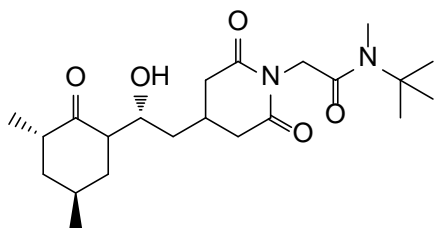
Für die Synthese der Verbindung **27** wurde nach der allgemeinen Synthesevorschrift 5 verfahren. Dazu wurde zu dem beschriebenen Reaktionsgemisch Piperidin (5,8 µl mg; 59,0 µmol) gegeben. Nach der erfolgten Reinigung wurde das Produkt als weißer Feststoff mit einer Ausbeute von 6,4 mg (53,8 %) erhalten. $[M+H]^+_{\text{berechn.}} = 407,2$, $[M+H]^+_{\text{gefunden.}} = 407,1$. $R_t = 7,3$ min

Synthese des *N*-(*N'*,*N'*-Diisopropylcarboxamidomethyl)-Cycloheximid-Derivates **28**



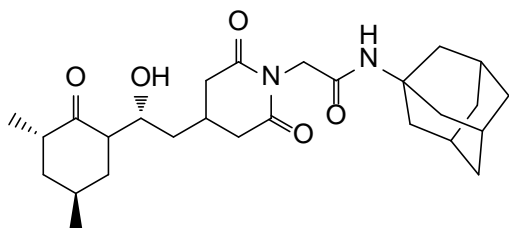
Für die Synthese der Verbindung **28** wurde nach der allgemeinen Synthesevorschrift 5 verfahren. Dazu wurde zu dem beschriebenen Reaktionsgemisch Diisopropylamin (8,3 µl; 59,0 µmol) gegeben. Der lineare Gradient beträgt 20-60 % B (ohne TFA) in 30 min. Nach der erfolgten Reinigung wurde das Produkt als weißer Feststoff mit einer Ausbeute von 7,4 mg (63,8 %) erhalten. $[M+H]^+$ _{berechn.} = 423,5, $[M+H]^+$ _{gefunden.} = 423,8. R_t = 8,3 min

Synthese des *N*-(*N'*-*tert*-Butyl-*N'*-Methylcarboxamidomethyl)-Cycloheximid-Derivates **29**

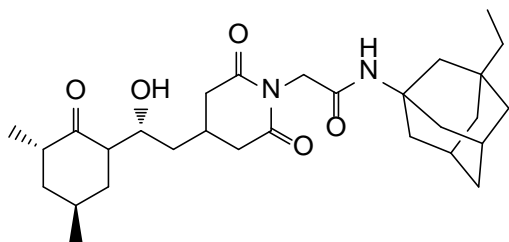


Für die Synthese der Verbindung **29** wurde nach der allgemeinen Synthesevorschrift 5 verfahren. Dazu wurde zu dem beschriebenen Reaktionsgemisch *tert*-Butylmethylamin (7,0 µl mg; 59,0 µmol) gegeben. Nach der erfolgten Reinigung wurde das Produkt als weißer Feststoff mit einer Ausbeute von 5,6 mg (46,7 %) erhalten. $[M+H]^+$ _{berechn.} = 409,3, $[M+H]^+$ _{gefunden.} = 409,3. R_t = 7,8 min

Synthese des *N*-(*N'*-Adamantylcarboxamidomethyl)-Cycloheximid-Derivates **30**

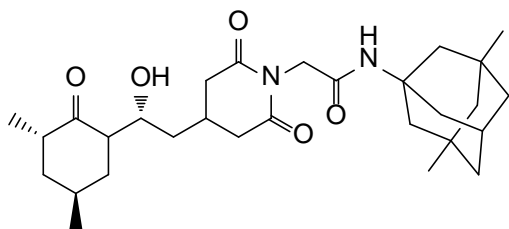


Synthese des *N*-(*N*'-3-Ethyladamantylcarboxamidomethyl)-Cycloheximid-Derivates **33**



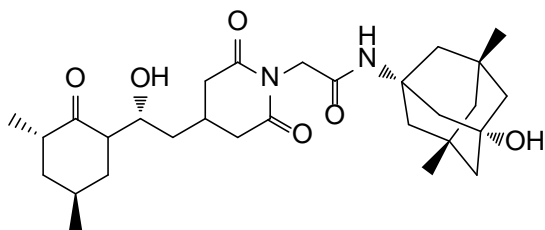
Für die Synthese der Verbindung **33** wurde nach der allgemeinen Synthesevorschrift 5 verfahren. Dazu wurde zu dem beschriebenen Reaktionsgemisch (3-Ethyl-1-adamantyl)amin-Hydrochlorid (12,7 µl mg; 59,0 µmol) gegeben. Nach der erfolgten Reinigung wurde das Produkt als weißer Feststoff mit einer Ausbeute von 9,2 mg (62,6 %) erhalten. $[M+H]^+$ _{berechn.} = 501,4, $[M+H]^+$ _{gefunden.} = 501,3. R_t = 10,7 min

Synthese des *N*-(*N*'-3,7-Dimethyladamantylcarboxamidomethyl)-Cycloheximid-Derivates **34**



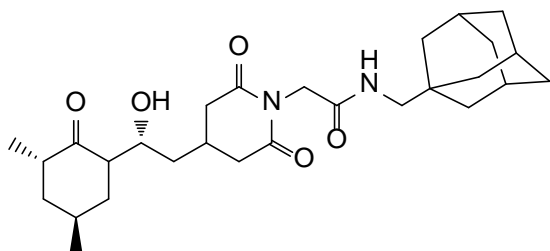
Für die Synthese der Verbindung **34** wurde nach der allgemeinen Synthesevorschrift 5 verfahren. Dazu wurde zu dem beschriebenen Reaktionsgemisch 3,5-Dimethyl-1-aminoadamantan-Hydrochlorid (12,0 mg; 59,0 µmol) gegeben. Nach der erfolgten Reinigung wurde das Produkt als weißer Feststoff mit einer Ausbeute von 8,6 mg (58,5 %) erhalten. $[M+H]^+$ _{berechn.} = 501,7, $[M+H]^+$ _{gefunden.} = 501,9. R_t = 10,8 min

Synthese des *N*-(*N'*-3,7-Dimethyl-5-Hydroxy-adamantylcarboxamidomethyl)-Cycloheximid-Derivates 35



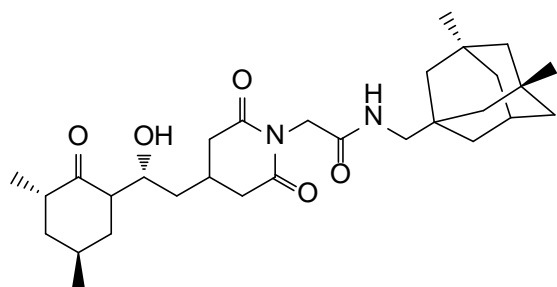
Für die Synthese der Verbindung **35** wurde nach der allgemeinen Synthesevorschrift 5 verfahren. Dazu wurde zu dem beschriebenen Reaktionsgemisch 3-Amino-5,7-dimethyl-adamant-1-ol (11,5 mg; 59,0 μmol) gegeben. Nach der erfolgten Reinigung wurde das Produkt als weißer Feststoff mit einer Ausbeute von 9,4 mg (61,8 %) erhalten. $[\text{M}+\text{H}]^+_{\text{berechn.}} = 517,7$, $[\text{M}+\text{H}]^+_{\text{gefunden.}} = 517,6$. $R_t = 8,0$ min

Synthese des *N*-(*N'*-Adamantanmethylcarboxamidomethyl)-Cycloheximid-Derivates 36



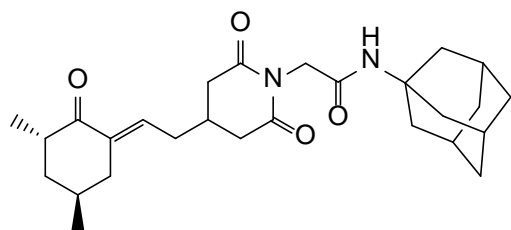
Für die Synthese der Verbindung **36** wurde nach der allgemeinen Synthesevorschrift 5 verfahren. Dazu wurde zu dem beschriebenen Reaktionsgemisch 1-Adamantanmethylamin (9,8 mg; 59,0 μmol) gegeben. Nach der erfolgten Reinigung wurde das Produkt als weißer Feststoff mit einer Ausbeute von 8,1 mg (56,6 %) erhalten. $[\text{M}+\text{H}]^+_{\text{berechn.}} = 487,3$, $[\text{M}+\text{H}]^+_{\text{gefunden.}} = 487,1$. $R_t = 9,9$ min

Synthese des *N*-(*N*'-3,5-Dimethyl-Adamantanmethylcarboxamidomethyl)-Cycloheximid-Derivates **37**



Für die Synthese der Verbindung **37** wurde nach der allgemeinen Synthesevorschrift 5 verfahren. Dazu wurde zu dem beschriebenen Reaktionsgemisch 1-Memantinmethylamin (12,0 mg; 59,0 μmol) gegeben. Nach der erfolgten Reinigung wurde das Produkt als weißer Feststoff mit einer Ausbeute von 8,2 mg (54,3 %) erhalten. $[\text{M}+\text{H}]^+_{\text{berechn.}} = 515,4$, $[\text{M}+\text{H}]^+_{\text{gefunden.}} = 515,7$. $R_t = 11,1$ min

Synthese der *N*-(*N*'-Adamantylcarboxamidomethyl)-Anhydrocycloheximid-Derivate **38 (E)** und **39 (Z)**

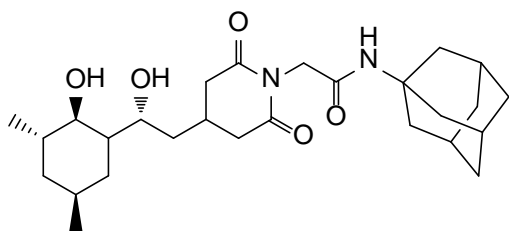


Zu einer Lösung aus Cycloheximid (100 mg; 356,0 μmol) in 5 ml DMF wurde wasserfreies K_2CO_3 (88,4 mg; 640,0 μmol) und *tert*-Butylbromoacetat (73,0 μl ; 500 μmol) gegeben und über Nacht bei Raumtemperatur rühren gelassen. Anschließend wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck destilliert, der Rückstand in 10 ml Ethylacetat aufgenommen und die Lösung filtriert. Das Ethylacetat wurde im Vakuum destilliert und das Rohprodukt in 2 ml CH_2Cl_2 aufgenommen und mit 400 μl versetzt und bei Raumtemperatur 2 h rühren gelassen. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck destilliert und das Rohprodukt säulenchromatographisch via präparativer HPLC gereinigt. Dazu wurde eine RP C18 Säule (Phenomenex Gemini-NX, 250 x 21,2 mm) mit einem linearen Gradienten von 40-70 % B in 30 min und einer Flussrate von 17 ml/min verwendet. Nach der erfolgten Reinigung wurde das Produkt als weißer Feststoff mit einer Ausbeute von 83,7 mg (73,3 %) erhalten.

$[M+H]^+_{\text{berechn.}} = 322,4$, $[M+H]^+_{\text{gefunden.}} = 322,7$. Das *E*- und das *Z*-Isomer wurden nicht separiert. Dies geschah im nächsten Schritt.

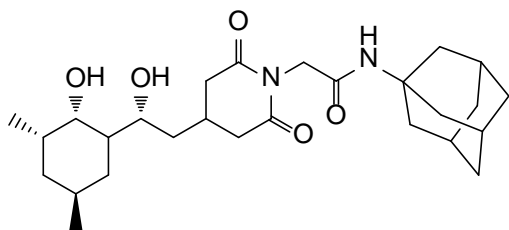
Im Anschluss wurden das erhaltene Produkt (10,0 mg; 31,1 μmol), PyBOP (17,0 mg; 31,1 μmol) und DIPEA (11,0 μl ; 62,2 μmol) in 5 ml DMF gelöst und für 5 min gerührt. 1-Aminoadamantan (9,5 mg; 62,2 μmol) wurde anschließend zugegeben und für 1 h bei Raumtemperatur gerührt. Nach beendeter Reaktion wurde das Lösungsmittel im Vakuum destilliert und das Rohprodukt säulenchromatographisch mittels präparativer HPLC gereinigt. Dazu wurde eine RP C18 Säule (Phenomenex Gemini-NX, 250 x 21,2 mm) mit einem linearen Gradienten von 40-80 % B in 45 min und einer Flussrate von 17 ml/min verwendet. Nach der erfolgten Reinigung wurden die Produkte als weiße Feststoffe mit einer Ausbeute von 4,0 mg (28,4 %) *E* und von 7,0 mg (49,6 %) *Z* erhalten. $E/Z [M+H]^+_{\text{berechn.}} = 455,6$, $E/Z [M+H]^+_{\text{gefunden.}} = 455,9$. $E R_t = 10,6 \text{ min}$, $Z R_t = 10,9 \text{ min}$

Synthese des (*R*)-*N*-(*N'*-Adamantylcarboxamidomethyl)-Dihydrocycloheximid-Derivates **40(R)**



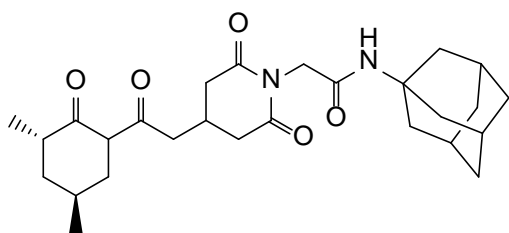
(*R*)-2-Methyl-CBS-oxazaborolidine (1,2 mg; 21,2 μmol) und eine 1M Lösung von BH_3 in THF (22,0 μl ; 21,2 μmol) wurden in 5 ml wasserfreiem THF gelöst und für 15 min gerührt. Diese Lösung wurde langsam zu einer 0 °C kalten Lösung aus **30** (10,0 mg; 21,2 μmol) in 10 ml wasserfreiem THF getropft und für 40 min rühren gelassen. Die Reaktion wurde danach durch Zugabe von 10 ml Methanol beendet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck destilliert. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch mittels präparativer HPLC gereinigt. Dazu wurde eine RP C18 Säule (Phenomenex Gemini-NX, 250 x 21,2 mm) mit einem linearen Gradienten von 30-80 % B in 40 min und einer Flussrate von 17 ml/min verwendet. Nach der erfolgten Reinigung wurde das Produkt als weißer Feststoff mit einer Ausbeute von 5,8 mg (58,3 %) erhalten. $[M+H]^+_{\text{berechn.}} = 475,3$, $[M+H]^+_{\text{gefunden.}} = 475,6$. $R_t = 9,1 \text{ min}$

Synthese des (S)-N-(N'-Adamantylcarboxamidomethyl)-Dihydrocycloheximid-Derivates 41(S)



(S)-2-Methyl-CBS-oxazaborolidine (1,2 mg; 21,2 μmol) und eine 1M Lösung von BH_3 in THF (22,0 μl ; 21,2 μmol) wurden in 5 ml wasserfreiem THF gelöst und für 15 min gerührt. Diese Lösung wurde langsam zu einer 0 °C kalten Lösung aus **30** (10,0 mg; 21,2 μmol) in 10 ml wasserfreiem THF getropft und für 40 min rühren gelassen. Die Reaktion wurde danach durch Zugabe von 10 ml Methanol beendet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck destilliert. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch mittels präparativer HPLC gereinigt. Dazu wurde eine RP C18 Säule (Phenomenex Gemini-NX, 250 x 21,2 mm) mit einem linearen Gradienten von 30-80 % B in 40 min und einer Flussrate von 17 ml/min verwendet. Nach der erfolgten Reinigung wurde das Produkt als weißer Feststoff mit einer Ausbeute von 6,9 mg (69,1 %) erhalten. $[\text{M}+\text{H}]^+_{\text{berechn.}} = 475,3$, $[\text{M}+\text{H}]^+_{\text{gefunden.}} = 475,6$. $R_t = 9,2$ min

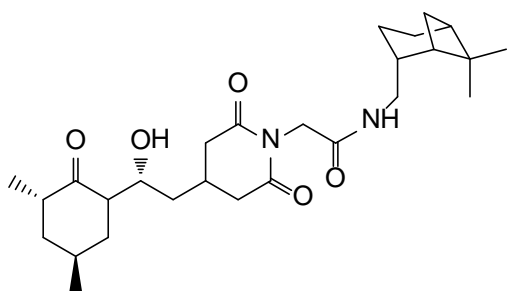
Synthese des N-(N'-Adamantylcarboxamidomethyl)-Dehydrocycloheximid-Derivates 42



Zu einer Lösung aus **30** (16,0 mg; 33,9 μmol) in 1 ml CH_2Cl_2 wurde eine Lösung aus DESS-MARTEN-Reagenz (22,0 mg; 54,22 μmol) in 3 ml CH_2Cl_2 langsam zu getropft und für 1 h bei Raumtemperatur gerührt. Nach Ende der Reaktionszeit wurden 10 ml Diethylether zugegeben und die Lösung mit 10 ml einer 10 % $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_3$ -Lösung gewaschen. Die Phasen wurden getrennt, die organische Phase ein weiteres Mal mit 10 ml einer 10 % NaHCO_3 -Lösung gewaschen. Die organische Phase wurde abgetrennt, über Na_2SO_4

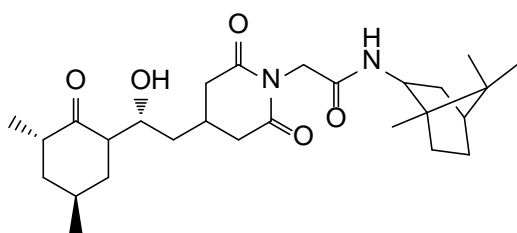
getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck destilliert. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch gereinigt. Dazu wurde eine RP C18 Säule (Phenomenex Gemini-NX, 250 x 21,2 mm) mit einem linearen Gradienten von 30-80 % B (ohne TFA) in 30 min und einer Flussrate von 17 ml/min verwendet. Nach der erfolgten Reinigung wurde das Produkt als weißer Feststoff mit einer Ausbeute von 14,3 mg (89,9 %) erhalten. $[M+H]^+_{\text{berechn.}} = 471,3$ $[M+H]^+_{\text{gefunden.}} = 271,5$. $R_t = 11,7$ min

Synthese des (-)-*cis*-*N*-(*N'*-Myrtanylcarboxamidomethyl)-Cycloheximid-Derivates **43**



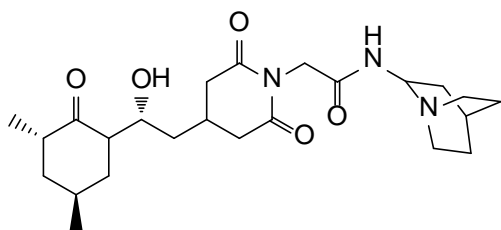
Für die Synthese der Verbindung **43** wurde nach der allgemeinen Synthesevorschrift 5 verfahren. Dazu wurde zu dem beschriebenen Reaktionsgemisch (-)-*cis*-Myrtanylamin (9,9 µl; 59,0 µmol) gegeben. Nach der erfolgten Reinigung wurde das Produkt als weißer Feststoff mit einer Ausbeute von 7,8 mg (56,1 %) erhalten. $[M+H]^+_{\text{berechn.}} = 475,3$, $[M+H]^+_{\text{gefunden.}} = 475,2$. $R_t = 9,9$ min

Synthese des (+)-(*R*)-*N*-(*N'*-Bornylcarboxamidomethyl)-Cycloheximid-Derivates **44**



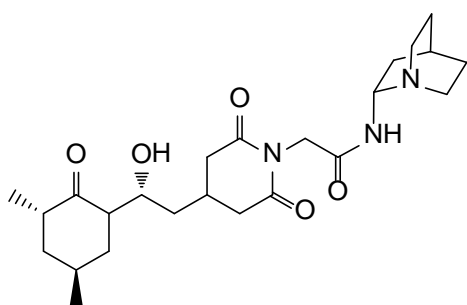
Für die Synthese der Verbindung **44** wurde nach der allgemeinen Synthesevorschrift 5 verfahren. Dazu wurde zu dem beschriebenen Reaktionsgemisch (+)-(*R*)-Bornylamin (9,0 mg; 59,0 µmol) gegeben. Nach der erfolgten Reinigung wurde das Produkt als weißer Feststoff mit einer Ausbeute von 8,9 mg (67,9 %) erhalten. $[M+H]^+_{\text{berechn.}} = 475,3$, $[M+H]^+_{\text{gefunden.}} = 475,5$. $R_t = 9,6$ min

Synthese des (+)-(*R*)-*N*-(*N'*-Quinuclidincarboxamidomethyl)-Cycloheximid-Derivates 45



Für die Synthese der Verbindung **45** wurde nach der allgemeinen Synthesevorschrift 5 verfahren. Dazu wurde zu dem beschriebenen Reaktionsgemisch (+)-(*R*)-3-Aminoquinucleidin Dihydrochlorid (11,7 mg; 59,0 μmol) gegeben. Der lineare Gradient beträgt hier 10-50 % B (ohne TFA) in 30 min. Nach der erfolgten Reinigung wurde das Produkt als weißer Feststoff mit einer Ausbeute von 8,9 mg (67,9 %) erhalten. $[\text{M}+\text{H}]^+_{\text{berechn.}} = 448,3$, $[\text{M}+\text{H}]^+_{\text{gefund.}} = 448,4$. $R_t = 5,3$ min

Synthese des (-)-(*S*)-*N*-(*N'*-Quinuclidincarboxamidomethyl)-Cycloheximid-Derivates 46

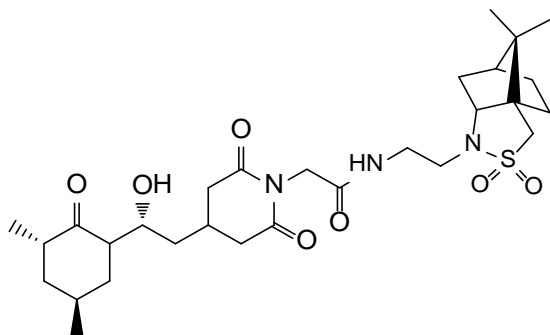


Für die Synthese der Verbindung **46** wurde nach der allgemeinen Synthesevorschrift 5 verfahren. Dazu wurde zu dem beschriebenen Reaktionsgemisch (-)-(*S*)-3-Aminoquinucleidin Dihydrochlorid (11,7 mg; 59,0 μmol) gegeben. Der lineare Gradient beträgt hier 10-50 % B (ohne TFA) in 30 min. Nach der erfolgten Reinigung wurde das Produkt als weißer Feststoff mit einer Ausbeute von 7,6 mg (58,0 %) erhalten. $[\text{M}+\text{H}]^+_{\text{berechn.}} = 448,3$, $[\text{M}+\text{H}]^+_{\text{gefund.}} = 448,4$. $R_t = 4,2$ min

wurde das Lösungsmittel im Vakuum destilliert und das entstandene Zwischenprodukt II ohne weitere Aufarbeitung weiter umgesetzt.

Verbindung **11** (10,0 mg; 29,5 μmol), PyBOP (16,0 mg; 29,5 μmol) und DIPEA (10,4 μl ; 59,0 μmol) wurden in 5 ml DMF gelöst und für 5 min gerührt. Das Zwischenprodukt II (8,0 mg; 59,0 μmol) wurde anschließend zugegeben und für 1 h bei Raumtemperatur gerührt. Nach beendeter Reaktion wurde das Lösungsmittel im Vakuum destilliert und das Rohprodukt säulenchromatographisch via präparativer HPLC gereinigt. Dazu wurde eine RP C18 Säule (Phenomenex Gemini-NX, 250 x 21,2 mm) mit einem linearen Gradienten von 10-50 % B in 30 min und einer Flussrate von 17 ml/min verwendet. Nach der erfolgten Reinigung wurde das Produkt als weißer Feststoff mit einer Ausbeute von 13,1 mg (74,0 %) erhalten. $[\text{M}+\text{H}]^+$ _{berechn.} = 602,3, $[\text{M}+\text{H}]^+$ _{gefunden.} = 602,8. R_t = 5,8 min

Synthese des *N*-{*N'*-[*N''*-(2-aminoethyl)-(1*S*)-10,2-Camphersultam]carboxamidomethyl}-Cycloheximid-Derivates **49**



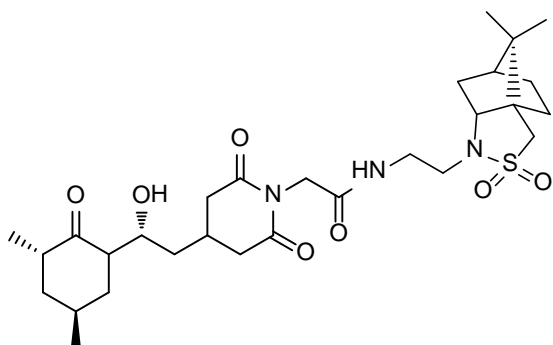
(1*S*)-10,2-Camphersultam (20,0 mg; 93,0 μmol), 60 % Natriumhydrid in Mineralöl (4,5 mg; 186,0 μmol) wurden in 5 ml DMF gelöst und für 30 min gerührt. *N*-Boc-(2-bromoethyl)amin (30,4 μl ; 135,7 μmol) wurde anschließend zugegeben und über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Nach beendeter Reaktion wurde das Lösungsmittel im Vakuum destilliert. Das Zwischenprodukt I wurde ohne weitere Aufarbeitung umgesetzt.

Das Zwischenprodukt I wurde in 5,0 ml CH_2Cl_2 gelöst, 400 μl TFA zugegeben und 30 min bei Raumtemperatur geschüttelt. Nach Ablauf der Reaktionszeit wurde das Lösungsmittel im Vakuum destilliert und das entstandene Zwischenprodukt II weiter umgesetzt.

Verbindung **11** (10,0 mg; 29,5 μmol), PyBOP (16,0 mg; 29,5 μmol) und DIPEA (10,4 μl ; 59,0 μmol) wurden in 5 ml DMF gelöst und für 5 min gerührt. Das Zwischenprodukt II (15,0 mg; 59,0 μmol) wurde anschließend zugegeben und für 1 h bei Raumtemperatur gerührt. Nach beendeter Reaktion wurde das Lösungsmittel im Vakuum destilliert und das

Rohprodukt säulenchromatographisch via präparativer HPLC gereinigt. Dazu wurde eine RP C18 Säule (Phenomenex Gemini-NX, 250 x 21,2 mm) mit einem linearen Gradienten von 30-60 % B in 20 min und einer Flussrate von 17 ml/min verwendet. Nach der erfolgten Reinigung wurde das Produkt als weißer Feststoff mit einer Ausbeute von 9,0 mg (52,9 %) erhalten. $[M+H]^+_{\text{berechn.}} = 580,7$, $[M+H]^+_{\text{gefund.}} = 580,8$. $R_t = 8,6$ min

Synthese des *N*-{*N'*-[*N''*-(2-aminoethyl)-(1*R*)-10,2-Camphersultam]carboxamidomethyl}-Cycloheximid-Derivates 50



(1*R*)-10,2-Camphersultam (20,0 mg; 93,0 μmol), 60 % Natriumhydrid in Mineralöl (4,5 mg; 186,0 μmol) wurden in 5 ml DMF gelöst und für 30 min gerührt. *N*-Boc-(2-bromoethyl)amin (30,4 μl ; 135,7 μmol) wird anschließend zugegeben und über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Nach beendeter Reaktion wurde das Lösungsmittel im Vakuum destilliert. Das Zwischenprodukt I wurde ohne weitere Aufarbeitung umgesetzt.

Das Zwischenprodukt I wurde in 5,0 ml CH_2Cl_2 gelöst, 400 μl TFA zugegeben und 30 min bei Raumtemperatur geschüttelt. Nach Ablauf der Reaktionszeit wurde das Lösungsmittel im Vakuum destilliert und das Zwischenprodukt II weiter umgesetzt.

Verbindung 11 (10,0 mg; 29,5 μmol), PyBOP (16,0 mg; 29,5 μmol) und DIPEA (10,4 μl ; 59,0 μmol) wurden in 5 ml DMF gelöst und für 5 min gerührt. Das Zwischenprodukt II (15,0 mg; 59,0 μmol) wurde anschließend zugegeben und für 1 h bei Raumtemperatur gerührt. Nach beendeter Reaktion wurde das Lösungsmittel im Vakuum destilliert und das Rohprodukt säulenchromatographisch via präparativer HPLC gereinigt. Dazu wurde eine RP C18 Säule (Phenomenex Gemini-NX, 250 x 21,2 mm) mit einem linearen Gradienten von 30-60 % B in 20 min und einer Flussrate von 17 ml/min verwendet. Nach der erfolgten Reinigung wurde das Produkt als weißer Feststoff mit einer Ausbeute von 10,6 mg (62,3 %) erhalten. $[M+H]^+_{\text{berechn.}} = 580,7$, $[M+H]^+_{\text{gefund.}} = 580,8$. $R_t = 8,5$ min

8 Literaturverzeichnis

- (1) Borel, J. F.; Feurer, C.; Gubler, H. U.; Stähelin, H. *Agents Actions* **1976**, *6*, 468–475.
- (2) Rügger, A.; Kuhn, M.; Lichti, H.; Loosli, H. R.; Huguenin, R.; Quiquerez, C.; von Wartburg, A. *Helv. Chim. Acta* **1976**, *59*, 1075–1092.
- (3) Tanaka, H.; Kuroda, A.; Marusawa, H.; Hatanaka, H.; Kino, T.; Goto, T.; Hashimoto, M.; Taga, T. *J. Am. Chem. Soc.* **1987**, *109*, 5031–5033.
- (4) Vézina, C.; Kudelski, A.; Sehgal, S. N. *J. Antibiot. (Tokyo)*. **1975**, *28*, 721–731.
- (5) Stewart, D. E.; Sarkar, A.; Wampler, J. E. *J. Mol. Biol.* **1990**, *214*, 253–260.
- (6) Reimer, U.; Scherer, G.; Drewello, M.; Kruber, S.; Schutkowski, M.; Fischer, G. *J. Mol. Biol.* **1998**, *279*, 449–460.
- (7) Fischer, G. *Angew. Chemie* **1994**, *106*, 1479–1501.
- (8) Galat, A.; Metcalfe, S. M. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* **1995**, *63*, 67–118.
- (9) Kern, D.; Schutkowski, M.; Drakenberg, T. *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 8403–8408.
- (10) Scherer, G.; Kramer, M. L.; Schutkowski, M.; Reimer, U.; Fischer, G. *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 5568–5574.
- (11) G. Fischer, H. Bang, C. M. *Biomed. Biochim. Acta* **1984**, *43*, 1101–1111.
- (12) Hamilton, G. S.; Steiner, J. P. *J. Med. Chem.* **1998**, *41*, 5119–5143.
- (13) Schiene, C.; Fischer, G. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2000**, *10*, 40–45.
- (14) Rahfeld, J. U.; Schierhorn, A.; Mann, K.; Fischer, G. *FEBS Lett.* **1994**, *343*, 65–69.
- (15) Fischer, G.; Wittmann-Liebold, B.; Lang, K.; Kiefhaber, T.; Schmid, F. X. *Nature* **1989**, *337*, 476–478.
- (16) Handschumacher, R.; Harding, M.; Rice, J.; Drugge, R.; Speicher, D. *Science* **1984**, *226*, 544–547.
- (17) Harding, M. W.; Galat, A.; Uehling, D. E.; Schreiber, S. L. *Nature* **1989**, *341*, 758–760.
- (18) Siekierka, J. J.; Hung, S. H.; Poe, M.; Lin, C. S.; Sigal, N. H. *Nature* **1989**, *341*, 755–757.
- (19) Ke, H.; Mayrose, D.; Belshaw, P. J.; Alberg, D. G.; Schreiber, S. L.; Chang, Z. Y.; Etkorn, F. A.; Ho, S.; Walsh, C. T. *Structure* **1994**, *2*, 33–44.

- (20) Jin, L.; Harrison, S. C. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2002**, *99*, 13522–13526.
- (21) Liu, J.; Farmer, J. D.; Lane, W. S.; Friedman, J.; Weissman, I.; Schreiber, S. L. *Cell* **1991**, *66*, 807–815.
- (22) Schreiber, S. *Science* **1991**, *251*, 283–287.
- (23) McCaffrey, P. G.; Perrino, B. a; Soderling, T. R.; Rao, a. *J. Biol. Chem.* **1993**, *268*, 3747–3752.
- (24) Schreiber, S. L.; Crabtree, G. R. *Immunol. Today* **1992**, *13*, 136–142.
- (25) Sabatini, D. M.; Erdjument-Bromage, H.; Lui, M.; Tempst, P.; Snyder, S. H. *Cell* **1994**, *78*, 35–43.
- (26) Trandinh, C. C.; Pao, G. M.; Saier, M. H. *FASEB J.* **1992**, *6*, 3410–3420.
- (27) Galat, A. *Eur. J. Biochem.* **1993**, *216*, 689–707.
- (28) Schmid, F. X.; Mayr, L. M.; Mücke, M.; Schönbrunner, E. R. *Adv. Protein Chem.* **1993**, *44*, 25–66.
- (29) Helekar, S. A.; Patrick, J. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1997**, *94*, 5432–5437.
- (30) Imparl, J. M.; Senshu, T.; Graves, D. J. *Arch. Biochem. Biophys.* **1995**, *318*, 370–377.
- (31) Steinmann, B.; Bruckner, P.; Superti-Furga, a. *J. Biol. Chem.* **1991**, *266*, 1299–1303.
- (32) Lodish, H. F.; Kong, N. *J. Biol. Chem.* **1991**, *266*, 14835–14838.
- (33) Marks, A. R. *Physiol. Rev.* **1996**, *76*, 631–649.
- (34) Jayaraman, T.; Brillantes, A-M.; Timerman, A P.; Fleischer, S.; Erdjument-Bromage, H.; Tempst, P.; Marks, A R. *J. Biol. Chem.* **1992**, *267*, 9474–9477.
- (35) Lam, E.; Martin, M. M.; Timerman, A. P.; Sabers, C.; Fleischer, S.; Lukas, T.; Abraham, R. T.; O’Keefe, S. J.; O’Neill, E. A.; Wiederrecht, G. J. *J. Biol. Chem.* **1995**, *270*, 26511–26522.
- (36) Yem, A. W.; Tomasselli, A. G.; Heinrikson, R. L.; Zurcher-Neely, H.; Ruff, V. A.; Johnson, R. A.; Deibel, M. R. *J. Biol. Chem.* **1992**, *267*, 2868–2871.
- (37) Smith, D. F.; Baggenstoss, B. A; Marion, T. N.; Rimerman, R. A. *J. Biol. Chem.* **1993**, *268*, 18365–18371.
- (38) Hoffmann, K. *J. Biol. Chem.* **1995**, *270*, 20479–20484.
- (39) Ratajczak, T.; Carrello, a; Mark, P. J.; Warner, B. J.; Simpson, R. J.; Moritz, R. L.; House, A. K. *J. Biol. Chem.* **1993**, *268*, 13187–13192.

- (40) Steiner, J. P.; Connolly, M. A.; Valentine, H. L.; Hamilton, G. S.; Dawson, T. M.; Hester, L.; Snyder, S. H. *Nat. Med.* **1997**, *3*, 421–428.
- (41) Muramoto, M.; Yamazaki, T.; Morikawa, N.; Okitsu, O.; Nagashima, T.; Oe, T.; Nishimura, S.; Kita, Y. *Biochem. Pharmacol.* **2005**, *69*, 1473–1481.
- (42) Steiner, J. P.; Hamilton, G. S.; Ross, D. T.; Valentine, H. L.; Guo, H.; Connolly, M. A.; Liang, S.; Ramsey, C.; Li, J. H.; Huang, W.; Howorth, P.; Soni, R.; Fuller, M.; Sauer, H.; Nowotnik, a C.; Suzdak, P. D. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1997**, *94*, 2019–2024.
- (43) Gold, B. G.; Katoh, K.; Storm-Dickerson, T. *J. Neurosci.* **1995**, *15*, 7509–7516.
- (44) Gold, B. G.; Zeleny-Pooley, M.; Wang, M. S.; Chaturvedi, P.; Armistead, D. M. *Exp. Neurol.* **1997**, *147*, 269–278.
- (45) Coelmont, L.; Kaptein, S.; Paeshuyse, J.; Vliegen, I.; Dumont, J.-M.; Vuagniaux, G.; Neyts, J. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2009**, *53*, 967–976.
- (46) Briggs, C. J.; Ott, D. E.; Coren, L. V.; Oroszlan, S.; Tözsér, J. *Arch. Virol.* **1999**, *144*, 2151–2160.
- (47) Brizuela, L.; Chrebet, G.; Bostian, K. a; Parent, S. A. *Mol. Cell. Biol.* **1991**, *11*, 4616–4626.
- (48) Kim, W.-S.; Xu, L.; Souw, D.; Fang, A.; Demain, A. L. *J. Antibiot. (Tokyo)*. **2002**, *55*, 650–654.
- (49) Greenstein, R. J.; Su, L.; Juste, R. A.; Brown, S. T. *PLoS One* **2008**, *3*, e2496.
- (50) Organ, H. M.; Holmes, M. A.; Pisano, J. M.; Staruch, M. J.; Wyvratt, M. J.; Dumont, F. J.; Sinclair, P. J. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1993**, *3*, 657–662.
- (51) Ruan, B.; Pong, K.; Jow, F.; Bowlby, M.; Crozier, R. A; Liu, D.; Liang, S.; Chen, Y.; Mercado, M. L.; Feng, X.; Bennett, F.; von Schack, D.; McDonald, L.; Zaleska, M. M.; Wood, A.; Reinhart, P. H.; Magolda, R. L.; Skotnicki, J.; Pangalos, M. N.; Koehn, F. E.; Carter, G. T.; Abou-Gharbia, M.; Graziani, E. I. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2008**, *105*, 33–38.
- (52) Rosenwirth, B.; Billich, A.; Datema, R.; Donatsch, P.; Hammerschmid, F.; Harrison, R.; Hiestand, P.; Jaksche, H.; Mayer, P.; Peichl, P. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1994**, *38*, 1763–1772.
- (53) Dumont, F. J. *Curr. Med. Chem.* **2000**, *7*, 731–748.
- (54) Dumont, F. J.; Staruch, M. J.; Koprak, S. L.; Siekierka, J. J.; Lin, C. S.; Harrison, R.; Sewell, T.; Kindt, V. M.; Beattie, T. R.; Wyvratt, M. J. *Exp. Med.* **1992**, *176*, 751–760.
- (55) Bechstein, W. O. *Transpl. Int.* **2000**, *13*, 313–326.
- (56) Hamilton, G. S.; Huang, W.; Connolly, M. A.; Ross, D. T.; Guo, H.; Valentine, H. L.; Suzdak, P. D.; Steiner, J. P. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1997**, *7*, 1785–1790.

- (57) Daum, S.; Schumann, M.; Mathea, S.; Aumüller, T.; Balsley, M. A.; Constant, S. L.; de Lacroix, B. F.; Kruska, F.; Braun, M.; Schiene-Fischer, C. *Biochemistry* **2009**, *48*, 6268–6277.
- (58) Gopalakrishnan, R.; Kozany, C.; Gaali, S.; Kress, C.; Hoogeland, B.; Bracher, A.; Hausch, F. *J. Med. Chem.* **2012**, *55*, 4114–4122.
- (59) Bollini, S.; Herbst, J. J.; Gaughan, G. T.; Verdoorn, T. A.; Ditta, J.; Dubowchik, G. M.; Vinitzky, A. *J. Biomol. Screen.* **2002**, *7*, 526–530.
- (60) Christner, C.; Wyrwa, R.; Marsch, S.; Küllertz, G.; Thiericke, R.; Grabley, S.; Schumann, D.; Fischer, G. *J. Med. Chem.* **1999**, *42*, 3615–3622.
- (61) Kominek, L. A. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1975**, *7*, 856–860.
- (62) Whiffen, A. J.; Bohonos, N.; Emerson, R. L. *J. Bacteriol.* **1946**, *52*, 610–611.
- (63) Abou-Zeid, A.-Z.; Abd El Hamid, M. M.; El-Sherbini, S. H. *Zentralblatt für Bakteriologie, Parasitenkunde, Infekt. und Hyg. Zweite Naturwissenschaftliche Abteilung Allg. Landwirtsch. und Tech. Mikrobiol.* **1976**, *131*, 419–487.
- (64) Paoletti, F.; Ainger, K.; Donati, I.; Scardigli, R.; Vetere, A.; Cattaneo, A.; Campa, C. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2010**, *396*, 258–264.
- (65) Leach, B. E.; Ford, J. H.; Whiffen, A. J. *J. Am. Chem. Soc.* **1947**, *69*, 474.
- (66) Siegel, M. R.; Sisler, H. D. *Nature* **1963**, *200*, 675–676.
- (67) Edlich, F.; Weiwad, M.; Wildemann, D.; Jarczowski, F.; Kilka, S.; Moutty, M.-C.; Jahreis, G.; Lücke, C.; Schmidt, W.; Striggow, F.; Fischer, G. *J. Biol. Chem.* **2006**, *281*, 14961–14970.
- (68) Lawes, B. C. *J. Am. Chem. Soc.* **1960**, *82*, 6413–6414.
- (69) Johnson, F.; Starkovsky, N. A.; Paton, A. C.; Carlson, A. A. *J. Am. Chem. Soc.* **1966**, *88*, 149–159.
- (70) Norville, I. H.; O’Shea, K.; Sarkar-Tyson, M.; Zheng, S.; Titball, R. W.; Varani, G.; Harmer, N. J. *Biochem. J.* **2011**, *437*, 413–422.
- (71) Wilson, K. P.; Yamashita, M. M.; Sintchak, M. D.; Rotstein, S. H.; Murcko, M. a; Boger, J.; Thomson, J. a; Fitzgibbon, M. J.; Black, J. R.; Navia, M. a. *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* **1995**, *51*, 511–521.
- (72) Sich, C.; Improta, S.; Cowley, D. J.; Guenet, C.; Merly, J. P.; Teufel, M.; Saudek, V. *Eur. J. Biochem.* **2000**, *267*, 5342–5355.
- (73) Sun, F.; Li, P.; Ding, Y.; Wang, L.; Bartlam, M.; Shu, C.; Shen, B.; Jiang, H.; Li, S.; Rao, Z. *Biophys. J.* **2003**, *85*, 3194–3201.
- (74) Wang, T.; Donahoe, P. K.; Zervos, A. S. *Science* **1994**, *265*, 674–676.

- (75) Huse, M.; Chen, Y.; Massagué, J.; Kuriyan, J. *Cell* **1999**, *96*, 425–436.
- (76) Corson, T. W.; Aberle, N.; Crews, C. M. *ACS Chem. Biol.* **2008**, *3*, 677–692.
- (77) Gestwicki, J. E.; Marinec, P. S. *Comb. Chem. High Throughput Screen.* **2007**, *10*, 667–675.
- (78) Keenan, T.; Yaeger, D. R.; Courage, N. L.; Rollins, C. T.; Pavone, M. E.; Rivera, V. M.; Yang, W.; Guo, T.; Amara, J. F.; Clackson, T.; Gilman, M.; Holt, D. A. *Bioorg. Med. Chem.* **1998**, *6*, 1309–1335.
- (79) Park, S. T.; Aldape, R. A.; Futer, O.; DeCenzo, M. T.; Livingston, D. J. *J. Biol. Chem.* **1992**, *267*, 3316–3324.
- (80) Silva, N. D.; Prendergast, F. G. *Biophys. J.* **1996**, *70*, 1122–1137.
- (81) Harrison, R. K.; Stein, R. L. *Biochemistry* **1990**, *29*, 3813–3816.
- (82) Braun, W.; Kallen, J.; Mikol, V.; Walkinshaw, M. D.; Wüthrich, K. *FASEB J.* **1995**, *9*, 63–72.
- (83) Moore, J. M.; Peattie, D. A.; Fitzgibbon, M. J.; Thomson, J. A. *Nature* **1991**, *351*, 248–250.
- (84) Van Duyne, G. D.; Standaert, R. F.; Karplus, P. A.; Schreiber, S. L.; Clardy, J. *J. Mol. Biol.* **1993**, *229*, 105–124.
- (85) Wandless, T. J.; Michnick, S. W.; Rosen, M. K.; Karplus, M.; Schreiber, S. L. *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 2339–2341.
- (86) Zelinski, J. M.; Sykes, D. E.; Weiser, M. M. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1991**, *179*, 749–755.
- (87) Zarnt, T.; Lang, K.; Burtscher, H.; Fischer, G. *Biochem. J.* **1995**, *305* (Pt 1, 159–164.
- (88) Karuso, P.; Kessler, H.; Mierke, D. F. *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 9434–9436.
- (89) Hersperger, R.; Buchheit, K. H.; Cammisuli, S.; Enz, A.; Lohse, O.; Ponelle, M.; Schuler, W.; Schweitzer, A.; Walker, C.; Zehender, H.; Zenke, G.; Zimmerlin, A. G.; Zollinger, M.; Mazzoni, L.; Fozard, J. R. *J. Med. Chem.* **2004**, *47*, 4950–4957.
- (90) Kilka, S. *Dissertation* **2008**.
- (91) Eberle, M. K.; Hiestand, P.; Jutzi-Eme, A. M.; Nuninger, F.; Zihlmann, H. R. *J. Med. Chem.* **1995**, *38*, 1853–1864.
- (92) Zhang, Y.; Raumgrass, R.; Schutkowski, M.; Fischer, G. *ChemBioChem* **2004**, *5*, 1006–1009.
- (93) Horst K.; Loosli, H-R.; Oschkinat. H. *Helv. Chim. Acta* **1985**, *68*, 661.

- (94) Hasumi, H.; Nishikawa, T.; Ohtani, H. *Biochem. Mol. Biol. Int.* **1994**, *34*, 505–511.
- (95) Spencer, D. M.; Wandless, T. J.; Schreiber, S. L.; Crabtree, G. R. *Science* **1993**, *262*, 1019–1024.
- (96) Pruschy, M. N.; Spencer, D. M.; Kapoor, T. M.; Miyake, H.; Crabtree, G. R.; Schreiber, S. L. *Chem. Biol.* **1994**, *1*, 163–172.
- (97) Belshaw, P. J.; Ho, S. N.; Crabtree, G. R.; Schreiber, S. L. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1996**, *93*, 4604–4607.
- (98) Wagner, R.; Rhoades, T. A.; Or, Y. S.; Lane, B. C.; Hsieh, G.; Mollison, K. W.; Luly, J. R. *J. Med. Chem.* **1998**, *41*, 1764–1776.
- (99) Becker, J. W.; Rotonda, J.; Cryan, J. G.; Martin, M.; Parsons, W. H.; Sinclair, P. J.; Wiederrecht, G.; Wong, F. *J. Med. Chem.* **1999**, *42*, 2798–2804.
- (100) Kawai, M.; Lane, B. C.; Hsieh, G. C.; Mollison, K. W.; Carter, G. W.; Luly, J. R. *FEBS Lett.* **1993**, *316*, 107–113.
- (101) Hatanaka, H.; Kino, T.; Miyata, S.; Inamura, N.; Kuroda, A.; Goto, T.; Tanaka, H.; Okuhara, M. *J. Antibiot. (Tokyo)*. **1988**, *41*, 1592–1601.
- (102) Hoveyda, A. H.; Zhugralin, A. R. *Nature* **2007**, *450*, 243–251.
- (103) Luján, C.; Nolan, S. P. *Catal. Sci. Technol.* **2012**, *2*, 1027.
- (104) Diver, S. T.; Schreiber, S. L. *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 5106–5109.
- (105) Clemons, P. A.; Gladstone, B. G.; Seth, A.; Chao, E. D.; Foley, M. A.; Schreiber, S. L. *Chem. Biol.* **2002**, *9*, 49–61.
- (106) Chatterjee, A. K.; Choi, T.-L.; Sanders, D. P.; Grubbs, R. H. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 11360–11370.
- (107) Connon, S. J.; Blechert, S. *Angew. Chemie* **2003**, *115*, 1944–1968.
- (108) Fürstner, A.; Picquet, M.; Bruneau, C.; Dixneuf, P. H. *Chem. Commun.* **1998**, *95*, 1315–1316.
- (109) Weskamp, T.; Schattenmann, W. C.; Spiegler, M.; Herrmann, W. A. *Angew. Chemie* **1998**, *110*, 2631–2633.
- (110) Huang, J.; Stevens, E. D.; Nolan, S. P.; Petersen, J. L. *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 2674–2678.
- (111) Randl, S.; Gessler, S.; Wakamatsu, H.; Blechert, S. *Synlett* **2001**, *3*, 430–432.
- (112) Gessler, S.; Randl, S.; Blechert, S. *Tetrahedron Lett.* **2000**, *41*, 9973–9976.

- (113) Garber, S. B.; Kingsbury, J. S.; Gray, B. L.; Hoveyda, A. H. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 8168–8179.
- (114) Endo, K.; Grubbs, R. H. *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 8525–8527.
- (115) Ritter, T.; Hejl, A.; Wenzel, A. G.; Funk, T. W.; Grubbs, R. H. *Organometallics* **2006**, *25*, 5740–5745.
- (116) Sanford, M. S.; Ulman, M.; Grubbs, R. H. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 749–750.
- (117) Marinec, P. S.; Evans, C. G.; Gibbons, G. S.; Tarnowski, M. A.; Overbeek, D. L.; Gestwicki, J. E. *Bioorg. Med. Chem.* **2009**, *17*, 5763–5768.
- (118) Griffith, J. P.; Kim, J. L.; Kim, E. E.; Sintchak, M. D.; Thomson, J. a; Fitzgibbon, M. J.; Fleming, M. A.; Caron, P. R.; Hsiao, K.; Navia, M. A. *Cell* **1995**, *82*, 507–522.
- (119) Traber, R.; Hofmann, H.; Kobel, H. *J. Antibiot. (Tokyo)*. **1989**, *42*, 591–597.
- (120) Billich, A.; Zocher, R. *J. Biol. Chem.* **1987**, *262*, 17258–17259.
- (121) Huai, Q.; Kim, H.-Y.; Liu, Y.; Zhao, Y.; Mondragon, A.; Liu, J. O.; Ke, H. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2002**, *99*, 12037–12042.
- (122) Gala, M. A. *Society* **2002**, *41*, 2296–2304.
- (123) Edlich, F.; Weiwad, M.; Wildemann, D.; Jarczowski, F.; Kilka, S.; Moutty, M.-C.; Jahreis, G.; Lücke, C.; Schmidt, W.; Striggow, F.; Fischer, G. *J. Biol. Chem.* **2006**, *281*, 14961–14970.
- (124) Begley, D. W.; Fox, D.; Jenner, D.; Juli, C.; Pierce, P. G.; Abendroth, J.; Muruthi, M.; Safford, K.; Anderson, V.; Atkins, K.; Barnes, S. R.; Moen, S. O.; Raymond, A. C.; Stacy, R.; Myler, P. J.; Staker, B. L.; Harmer, N. J.; Norville, I. H.; Holzgrabe, U.; Sarkar-Tyson, M.; Edwards, T. E.; Lorimer, D. D. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2014**, *58*, 1458–1467.
- (125) Harikishore, A.; Leow, M. L.; Niang, M.; Rajan, S.; Pasunooti, K. K.; Preiser, P. R.; Liu, X.; Yoon, H. S. *ACS Med. Chem. Lett.* **2013**, *4*, 1097–1101.
- (126) Babine, R. E.; Bleckman, T. M.; Kissinger, C. R.; Showalter, R.; Pelletier, L. A.; Lewis, C.; Tucker, K.; Moomaw, E.; Parge, H. E.; Villafranca, J. E. Design, synthesis and X-ray crystallographic studies of novel FKBP-12 ligands. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 1995, *5*, 1719–1724.
- (127) Johnson, F.; Starkovsky, N. A.; Gurowitz, W. D. *J. Am. Chem. Soc.* **1965**, *87*, 3492–3500.
- (128) Corey, E. J.; Bakshi, R. K.; Shibata, S. *J. Am. Chem. Soc.* **1987**, *109*, 5551–5553.
- (129) Hirao, A.; Itsuno, S.; Nakahama, S.; Yamazaki, N. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1981**, *7*, 315.
- (130) Kornfeld, E. C.; Jones, R. G.; Parke, T. V. *J. Am. Chem. Soc.* **1949**, *71*, 150–159.

- (131) Gerard, M.; Deleersnijder, A.; Daniëls, V.; Schreurs, S.; Munck, S.; Reumers, V.; Pottel, H.; Engelborghs, Y.; Van den Haute, C.; Taymans, J.-M.; Debyser, Z.; Baekelandt, V. *J. Neurosci.* **2010**, *30*, 2454–2463.
- (132) Tanaka, K.; Ogawa, N. *Curr. Pharm. Des.* **2004**, *10*, 669–677.
- (133) Guo, X.; Dawson, V. L.; Dawson, T. M. *Eur. J. Neurosci.* **2001**, *13*, 1683–1693.
- (134) Avramut, M.; Achim, C. L. *Curr. Top. Med. Chem.* **2003**, *3*, 1376–1382.
- (135) Forte, M.; Gold, B. G.; Marracci, G.; Chaudhary, P.; Basso, E.; Johnsen, D.; Yu, X.; Fowlkes, J.; Rahder, M.; Stem, K.; Bernardi, P.; Bourdette, D. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2007**, *104*, 7558–7563.
- (136) Martin, R.; McFarland, H. F.; McFarlin, D. E. *Annu. Rev. Immunol.* **1992**, *10*, 153–187.
- (137) Kidd, P. M. *Altern. Med. Rev.* **2001**, *6*, 540–566.
- (138) Kornek, B.; Storch, M. K.; Weissert, R.; Wallstroem, E.; Stefferl, A.; Olsson, T.; Lington, C.; Schmidbauer, M.; Lassmann, H. *Am. J. Pathol.* **2000**, *157*, 267–276.
- (139) Kroenke, M.; Segal, B. *J. Neurosci. Res.* **2007**, *1693*, 1685–1693.
- (140) Trapp, B. D.; Nave, K.-A. *Annu. Rev. Neurosci.* **2008**, *31*, 247–269.
- (141) Duan, W.; Zhang, Z.; Gash, D. M.; Mattson, M. P. *Ann. Neurol.* **1999**, *46*, 587–597.
- (142) Isacson, O. *Brain Res. Bull.* **2002**, *57*, 839–846.
- (143) Hornykiewicz, O. *Prog. Brain Res.* **1982**, *55*, 419–429.
- (144) Jessell, T. M. *Lancet* **1982**, *2*, 1084–1088.
- (145) Glinka, Y.; Gassen, M.; Youdim, M. B. *J. Neural Transm. Suppl.* **1997**, *50*, 55–66.
- (146) Schober, A. *Cell and Tissue Research*, 2004, *318*, 215–224.
- (147) Saner, A.; Thoenen, H. *Mol. Pharmacol.* **1971**, *7*, 147–154.
- (148) Hanrott, K.; Gudmunsen, L.; O'Neill, M. J.; Wonnacott, S. *J. Biol. Chem.* **2006**, *281*, 5373–5382.
- (149) Dean, E. *Eukaryon* **2008**, *4*, 42–47.
- (150) Okouchi, M.; Ekshyyan, O.; Maracine, M.; Aw, T. Y. *Antioxid. Redox Signal.* **2007**, *9*, 1059–1096.
- (151) Mattson, M. P. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2000**, *1*, 120–129.
- (152) Christner, C.; Herdegen, T.; Fischer, G. *Mini Rev. Med. Chem.* **2001**, *1*, 377–397.

- (153) Cameron, A. M.; Steiner, J. P.; Sabatini, D. M.; Kaplin, A. I.; Walensky, L. D.; Snyder, S. H. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1995**, *92*, 1784–1788.
- (154) Bultynck, G.; De Smet, P.; Rossi, D.; Callewaert, G.; Missiaen, L.; Sorrentino, V.; De Smedt, H.; Parys, J. B. *Biochem. J.* **2001**, *354*, 413–422.
- (155) Caporello, E.; Nath, A.; Slevin, J.; Galey, D.; Hamilton, G.; Williams, L.; Steiner, J. P.; Haughey, N. J. *J. Neurochem.* **2006**, *98*, 146–155.
- (156) MacMillan, D.; Currie, S.; Bradley, K. N.; Muir, T. C.; McCarron, J. G. *J. Cell Sci.* **2005**, *118*, 5443–5451.
- (157) Brunelle, J. K.; Letai, A. *J. Cell Sci.* **2009**, *122*, 437–441.
- (158) Edlich, F.; Weiwad, M.; Erdmann, F.; Fanghänel, J.; Jarczowski, F.; Rahfeld, J.-U.; Fischer, G. *EMBO J.* **2005**, *24*, 2688–2699.
- (159) Tanaka, K.; Yoshioka, M.; Miyazaki, I.; Fujita, N.; Ogawa, N. *Neurosci. Lett.* **2002**, *321*, 45–48.
- (160) Halestrap, A. P.; Woodfield, K. Y.; Connern, C. P. *J. Biol. Chem.* **1997**, *272*, 3346–3354.
- (161) Crompton, M.; Ellinger, H.; Costi, A. *Biochem. J.* **1988**, *255*, 357–360.
- (162) Broekemeier, K. M.; Dempsey, M. E.; Pfeiffer, D. R. *J. Biol. Chem.* **1989**, *264*, 7826–7830.
- (163) Kroemer, G.; Galluzzi, L.; Brenner, C. *Physiol. Rev.* **2007**, *87*, 99–163.
- (164) Dheen, S. T.; Kaur, C.; Ling, E.-A. *Curr. Med. Chem.* **2007**, *14*, 1189–1197.
- (165) Almolda, B.; Costa, M.; Montoya, M.; González, B.; Castellano, B. *J. Neuroimmunol.* **2009**, *209*, 65–80.
- (166) Costantini, L. C.; Cole, D.; Chaturvedi, P.; Isacson, O. *Eur. J. Neurosci.* **2001**, *13*, 1085–1092.
- (167) Eduardo M. Torres, S. B. D. *Animal Models of Movement Disorders*; 2012; 267–279.
- (168) Na, S. J.; DiLella, A. G.; Lis, E. V.; Jones, K.; Levine, D. M.; Stone, D. J.; Hess, J. F. In *Neurochemical Research*; 2010; 761–772.
- (169) Carvalho, M. M.; Campos, F. L.; Coimbra, B.; Pêgo, J. M.; Rodrigues, C.; Lima, R.; Rodrigues, A. J.; Sousa, N.; Salgado, A. J. *Mol. Neurodegener.* **2013**, *8*, 14.
- (170) Tanaka, K.; Ogawa, N. *Curr. Pharm. Des.* **2004**, *10*, 669–677.
- (171) Tsuji, A.; Tamai, I.; Sakata, A.; Tenda, Y.; Terasaki, T. *Biochem. Pharmacol.* **1993**, *46*, 1096–1099.

- (172) Carvey, P. M.; Zhao, C. H.; Hendey, B.; Lum, H.; Trachtenberg, J.; Desai, B. S.; Snyder, J.; Zhu, Y. G.; Ling, Z. D. *Eur. J. Neurosci.* **2005**, *22*, 1158–1168.
- (173) Baumgrass, R.; Zhang Y.; Erdmann F.; Thiel A.; Weiwad M.; Radbruch A.; Fischer G. *J.Biol.Chem.* **2004**, *279*, 2470-2479.
- (174) Zhang Y. *Dissertation* **2001**

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Martin Theuerkorn
Geburtsdatum 08.12.1981
Geburtsort Halle/Saale
Familienstand ledig

Beruflicher Werdegang

06/2014-11/2014 wiss. Mitarbeiter – Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Fachbereich Biochemie gFP5
01/2013-04/2014 wiss. Mitarbeiter – Max-Planck Institut für Biophysikalische Chemie Göttingen, BO Halle
08/2009-12-2012 wiss. Mitarbeiter – Max-Planck Forschungsstelle für Enzymologie der Proteinfaltung und Promotion am Institut für Biochemie und Biotechnologie - Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
10/2007- 07/2009 Projektbetreuer für Industrieprojekte-Arbeitskreis Prof. Dr. R. Csuk - Martin Luther Universität Halle-Wittenberg
03/2007-09/2007 Stiftungsfond für die Synthese antiviral-aktiver Substanzen - Martin Luther Universität Halle-Wittenberg
09/2000-06/2001 Grundwehrdienst 6.&3./InstBtl 131 Gotha/Hohenmölsen

Bildungsweg

10/2001-02/2007 Studium der Chemie - Martin Luther Universität Halle-Wittenberg, Abschluss: Diplom
09/1992-07/2000 Hans-Eisler-Gymnasium Halle

Publikationen

M. Theuerkorn, G. Fischer, C. Schiene-Fischer: Prolyl *cis/trans* isomerases signalling pathway in cancer; *Curr.Opin.Pharmacol.*,**2011**,4,281-287.

F. Striggow, W. Schmidt, M. Theuerkorn, G. Fischer, M. Malesevice, M. Weiwad, E. Prell; Compounds for the treatment of neurodegenerative disorders, EU12183510.2-1216

J. Carbajo-Lozoya, Y. Mau-Lauer, M. Malešević, M. Theuerkorn, V. Kahlert, E. Prell, B. von Brunn, D. Muth, T.F. Baumert, C. Drosten, G. Fischer, A. von Brunn: Human coronavirus NL63 replication is Cyclophilin A-dependent and inhibited by non-immunosuppressive Cyclosporine A-derivatives including Alisporivir; *Virus Res.*,**2014**,184,44-53

J.Rasch, M. Theuerkorn, C. Ünal, N. Heinsohn, S.Tran, G. Fischer, M.Weiwad, M. Steinert; Novel Cycloheximid-derivatives targeting the moonlighting protein MIP exhibit specific antimicrobial activity against *Legionella pneumophila*; *Front.Bioeng.Biotechnol.*,**2015**,3,1-8

Cyclophilins and other Foldases: Cell signaling catalysts and drug targets, Halle,
Deutschland, 2013, Posterbeitrag

Selbstständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst habe. Andere als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel wurden nicht benutzt. Die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen habe ich als solche kenntlich gemacht.

Diese Arbeit wurde bisher an keiner anderen Universität oder Hochschule eingereicht.

Halle (Saale), den

Martin Theuerkorn