(19) **Bundesrepublik Deutschland**
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 696 36 902 T2** 2007.11.22

(12) # Übersetzung der europäischen Patentschrift

(97) **EP 0 820 283 B1**
(21) Deutsches Aktenzeichen: **696 36 902.8**
(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/US96/05072**
(96) Europäisches Aktenzeichen: **96 912 710.9**
(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 1996/032105**
(86) PCT-Anmeldetag: **12.04.1996**
(87) Veröffentlichungstag der PCT-Anmeldung: **17.10.1996**
(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **28.01.1998**
(97) Veröffentlichungstag der Patenterteilung beim EPA: **14.02.2007**
(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **22.11.2007**

(51) Int Cl.[8]: ***A61K 31/395*** (2006.01)
A61K 38/00 (2006.01)

(30) Unionspriorität:
421583 **12.04.1995** **US**

(84) Benannte Vertragsstaaten:
AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LI, LU, MC, NL, PT, SE

(73) Patentinhaber:
The President and Fellows of Harvard College, Cambridge, Mass., US

(74) Vertreter:
Hössle Kudlek & Partner, Patentanwälte, 70173 Stuttgart

(72) Erfinder:
SCHREIBER, L., Stuart, Boston, MA 02115, US; STANDAERT, F., Robert, College Station, TX 77840, US; FENTEANY, Gabriel, Cambridge, MA 02138, US; JAMISON, F., Timothy, Cambridge, MA 02140, US

(54) Bezeichnung: **LACTACYSTIN-ANALOGE**

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelegt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patent- und Markenamt inhaltlich nicht geprüft.

Beschreibung

Hintergrund der Erfindung

[0001] Die Erfindung bezieht sich allgemein auf Lactacystin und Analoga davon.

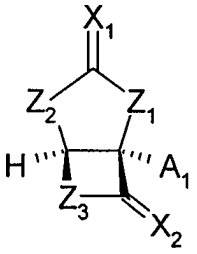
[0002] Eukaryotische Zellen enthalten multiple proteolytische Systeme, die lysosomale Proteasen, Calpaine, einen von ATP-Ubiquitin-Proteasom abhängigen Stoffwechselweg und einen von ATP unabhängigen nicht-lysosomalen Prozess einschließen. Die hauptsächliche neutrale proteolytische Tätigkeit im Zytosol und im Zellkern ist das Proteasom, ein 20S (700 kDa) Partikel mit multiplen Peptidaseaktivitäten. Der 20S Komplex ist der proteolytische Kern eines 26S (1500 kDa) Komplexes, der Ubiquitin-konjugierte Proteine abbaut oder verarbeitet. Ubiquitinierung markiert ein Protein für die Hydrolyse durch den 26S Proteasomkomplex. Viele abnorme oder kurzlebige normale Polypeptide werden durch den von Ubiquitin-Proteasom abhängigen Stoffwechselweg abgebaut. Abnorme Peptide umfassen von Oxidantien geschädigte Proteine (z.B. solche, die oxidierte Disulfidbrücken aufweisen), Produkte einer vorzeitigen Beendigung der Translation (z.B. solche, die ungeschützte hydrophobe Gruppen aufweisen, die von dem Proteasom erkannt werden), und stress-induziert denaturierte oder beschädigte Proteine (wobei der Stress z. B. durch Veränderungen des pH-Werts oder der Temperatur, oder durch Belastung mit Metallen induziert ist). Hinzu kommt, dass manche Proteine, wie beispielsweise Casein, keine Ubiquitinierung benötigen, um von dem Proteasom hydrolysiert zu werden.

[0003] Das Proteasom hat chymotrytische, tryptische und Peptidyl-Glutamylpeptid hydrolysierende Aktivitäten, d. h. das Proteasom kann Peptide auf der Carboxylseite von hydrophoben, basischen oder sauren Resten spalten.

Zusammenfassung der Erfindung

[0004] Die Erfindung betrifft neuartige Verbindungen, die strukturell mit Lactacystin und Lactacystin-β-lacton verwandt sind. Die Erfindung betrifft auch pharmazeutische Zusammensetzungen, die Lactacystin und Lactacystin-Analoga enthalten.

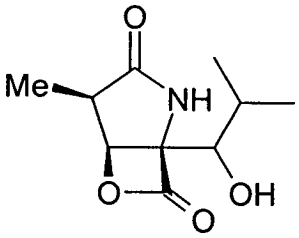
Ein Aspekt der Erfindung ist eine Verbindung der Formel II



(II)

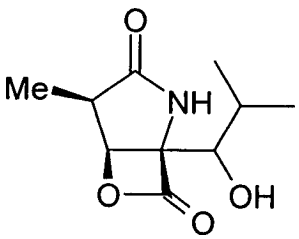
worin:
Z^1 O, S, SO_2, NH oder NR_a ist;
R_a C_{1-6}-Alkyl ist;
X^1 O, S, CH_2, zwei einfach gebundene H, CH (R_b) oder
C (Rb) (R_c) in der E- oder Z-Konfiguration ist; R_b und R_c jeweils unabhängig voneinander C_{1-6}-Alkyl, C_{6-12}-Aryl, C_{3-8}-Cycloalkyl, C_{3-8}-Heteroaryl, ein C_{3-8}-Heterozyklus oder ein Halogen sind, mit der Einschränkung, dass wenn Z^1 SO_2 ist, X^1 zwei einfach gebundene H ist;
Z^2 CHR^1 in der (R)- oder (S)-Konfiguration ist;
R^1 H; C_{1-6}-Alkyl, C_{1-6}-Haloalkyl, C_{2-6}-Alkenyl, C_{2-6}-Alkinyl, Hydroxyl, Halogen, eine Seitenkette einer natürlich vorkommenden α-Aminosäure, OR_d, SR_d, oder NR_dR_e ist;
R_d und R_e jeweils unabhängig voneinander H, C_{1-6}-Alkyl, C_{1-6}-Haloalkyl, C_{2-6}-Alkenyl, oder C_{2-5}-Alkinyl sind;
Z^3 O, S, NH oder NR_j ist;
R_j C_{1-6}-Alkyl ist;
X^2 O oder S ist;
A^1 H oder die Seitenkette irgendeiner natürlich vorkommenden α-Aminosäure ist oder der Formel $-(CH_2)_m$-Y-$(CH_2)_n$-R^3X^3 entspricht, worin
Y O, S, C=O, C=S, -(CH=CH)-, Vinyliden, -C=NOR_h, -C=NNR_iR_i, Sulfonyl, Methylen, CHX^4 in der (R) – oder (S)-Konfiguration oder eine Bindung ist;
X^4 Halogen, Methyl, Halomethyl, OR_h, SR_h, NR_iR_i, -$NR_i(OR_h)$ oder -$NR_i(NR_iR_i)$ ist;
R_h H, C_{1-6}-Alkyl, C_{1-6}-Haloalkyl, C_{2-6}-Alkenyl, oder C_{2-6}-Alkinyl ist;

R_i und R_i, jeweils unabhängig voneinander ausgewählt sind aus H, C_{1-6}-Alkyl, C_{1-6}-Haloalkyl, C_{2-6}-Alkenyl, C_{2-6}-Alkinyl und C_{1-10}-Acyl sind;
m 0, 1, 2, oder 3 ist;
n 0, 1, 2, oder 3 ist;
R^3 unverzweigtes oder verzweigtes C_{1-8}-Alkyliden, unverzweigtes oder verzweigtes C_{1-8}-Alkylen, C_{3-10}-Cycloalkyliden, C_{3-10}-Cycloalkylen, Phenylen, C_{6-14}-Aralkyliden, C_{6-14}-Aralkylen oder eine Bindung ist;
X^3 H, Hydroxyl, Thiol, Carboxyl, Amino, Halogen, (C_{1-6}-Alkyl)oxycarbonyl, (C_{7-14}-Aralkyl)oxycarbonyl oder C_{6-14}-Aryl ist; oder R^3 und X^3 zusammen genommen die Seitenkette irgendeiner natürlich vorkommenden α-Aminosäure bilden; und
und worin jede Alkylgruppe unsubstituiert oder durch ein, zwei, drei oder mehr Substituenten substituiert sein kann, die gleich oder verschieden sein können, ausgewählt aus Halogen, Hydroxyl, geschütztes Hydroxyl, Amino, geschütztes Amino, Carboxy, geschütztes Carboxy, Cyano, Methylsulfonylamino, Alkoxy, Acyloxy, Nitro oder niederes Haloalkyl; oder ein pharmazeutisch annehmbares Salz davon mit der Einschränkung, dass die Verbindung nicht der Formel



entspricht.

[0005] Unter einem anderen Gesichtspunkt gesehen stellt die Erfindung eine pharmazeutische Zusammensetzung bereit enthaltend eine Verbindung der Formel (II) oder eine Verbindung der Formel



und pharmazeutisch annehmbare ungiftige Vehikel und Träger.

[0006] Unter einem anderen Gesichtspunkt gesehen stellt die Erfindung die Verwendung einer Verbindung, wie sie in einem der Ansprüche 1 bis 14 beansprucht wird, zur Herstellung eines Medikaments zur Verwendung in einem Verfahren zur Behandlung eines durch Proteasom-abhängige Proteolyse vermittelten Zustands bereit.

[0007] Die beschriebenen Verbindungen sind nützlich in Behandlungen gegen Krebs, Entzündungen (z. B. mit Allergien, Transplantationen von Knochenmark oder festen Organen oder Krankheitszuständen verbundene Entzündungsreaktionen), Psoriasis und Restenose.

[0008] Die hierin offenbarten Verbindungen sind hochselektiv für das Proteasom und inhibieren andere Proteasen wie beispielsweise Trypsin, α-Chymotrypsin, Calpain I, Calpain II, Papain und Kathepsin B nicht.

[0009] Andere Merkmale oder Vorteile der vorliegenden Erfindung werden aus der nachfolgenden detaillierten Beschreibung deutlich, und ebenfalls aus den anhängenden Ansprüchen.

Detaillierte Beschreibung der Erfindung

Begriffe

[0010] Der Begriff „natürlich vorkommende Aminosäure" soll die 20 gewöhnlichen α-Aminosäuren (Gly, Ala, Val, Leu, Ile, Ser, Thr, Asp, Asn, Lys, Glu, Gln, Arg, His, Phe, Cys, Trp, Tyr, Met und Pro) einschließen, und andere Aminosäuren, die Naturprodukte sind, wie beispielsweise Norleucin, Ethylglycin, Ornithin, Methylbutenylmethylthreonin und Phenylglycin. Beispiele von Aminosäure-Seitenketten umfassen H (Glycin), Methyl (Ala-

nin), -(CH_2-(C=O)-NH_2 (Asparagin), -CH_2-SH (Cystein) und -CH(OH)CH_3 (Threonin).

[0011] Der Begriff „Inhibitor" soll eine Verbindung beschreiben, die die Aktivität eines Enzyms (z. B. des Proteasoms, oder der X/MB1 Untereinheit oder der α-Kette des 20S Proteasoms) blockiert oder verringert. Ein Inhibitor kann durch kompetitive, unkompetitive oder nicht kompetitive Inhibierung wirken. Ein Inhibitor kann reversibel oder irreversibel binden, und daher umfasst der Begriff auch Verbindungen, die Suizidsubstrate eines Enzyms sind. Ein Inhibitor kann eine oder mehrere Stellen am oder in der Nähe des aktiven Zentrums des Enzyms verändern, oder er kann eine Konformationsänderung an einer anderen Stelle auf dem Enzym bewirken. Daher reagieren einige der hierin offenbarten Verbindungen (z. B. solche, in denen L° eine Oxiranyl- oder Aldehydgruppe ist) mit dem Enzym, indem sie an das Kohlenstoffatom binden, das zu C4 von Lactacystin korrespondiert (z. B. durch Bildung eines C4 mit einer Hydroxyl- oder Thiolgruppe), während andere Verbindungen mit dem Enzym reagieren, indem sie eine Abgangsgruppe abspalten (z. B. L^1), was einer Acylierung entspricht.

[0012] Eine Alkylgruppe kann verzweigt oder unverzweigt sein, substituiert oder unsubstituiert. Beispiele von verzweigten Alkylgruppen umfassen Isopropyl, sec.-Butyl, Isobutyl, tert.-Butyl, sec.-Pentyl, Isopentyl, tert.-Pentyl, Isohexyl. Substituierte Alkylgruppen können einen, zwei, drei oder mehr Substituenten aufweisen, die gleichartig oder verschieden sein können, von denen jeder ein Wasserstoffatom ersetzt. Substituenten sind Halogene (z. B. F, Cl, Br und I), Hydroxyl, geschütztes Hydroxyl, Amino, geschütztes Amino, Carboxy, geschütztes Carboxy, Cyano, Methylsulfonylamino, Alkoxy, Acyloxy, Nitro, Fluormethyl, Dichlormethyl, Trifluormethyl, 1,1-Difluorethyl und 2,2-Dibromethyl. In gleicher Weise können Cycloalkyl-, Aryl-, Arylalkyl-, Alkylaryl-, Heteroaryl- und heterozyklische Reste mit einer oder mehreren der obigen substituierenden Gruppen substituiert sein. Beispiele von Cycloalkylgruppen sind Cyclopropyl, Cyclobutyl, Cyclopentyl, Cyclohexyl, Cycloheptyl und Cyclooctyl. Eine Arylgruppe ist ein aromatischer Ring mit 6–20 Kohlenstoffatomen, wobei der Ring aus Kohlenstoffatomen aufgebaut ist (z. B. C_{6-14}-, C_{6-10}-Arylgruppen, wobei C_8-Aryl ein Alkylaryl sein kann wie beispielsweise 2,3-Dimethylphenyl oder ein Arylalkyl wie beispielsweise Phenylethyl oder ein Alkylarylalkyl wie beispielsweise o-Methylbenzyl).

[0013] Ein heterozyklischer Rest enthält mindestens eine Ringstruktur, die Kohlenstoffatome enthält und mindestens ein Heteroatam (z. B. N, O, S oder P). Ein Heteroaryl ist ein aromatischer heterozyklischer Rest. Beispiele von heterozyklischen Resten und Heteroarylgruppen umfassen: Thiazolyl, Thienyl, Furyl, 1-Isobenzofuranyl, 2H-Chromen-3-yl, 2H-Pyrrolyl, N-Pyrrolyl, Imidazolyl, Pyrazolyl, Isothiazolyl, Isooxazolyl, Pyridyl, Pyrazinyl, Pyrimidinyl, Pyradazinyl, Indolizinyl, Isoindolyl, Indolyl, Indazolyl, Purinyl, Phthalazinyl, Cinnolinyl und Pteridinyl. Ein heterozyklischer Rest kann mit einer anderen Baueinheit über ein Kohlenstoffatom oder ein Heteroatom des heterozyklischen Rests verknüpft sein.

[0014] Eine (C_n-Alkyl)oxycarbonylgruppe hat die Formel R-O-(C=O)-. (C_{1-6}-Alkyl)oxycarbonyl schließt daher Methoxycarbonyl und Hexyloxycarbonyl ein. Eine C_{1-10}-Acylgruppe, so wie der Begriff hierin verwendet wird, hat die Formel -(C=O)-L_3 und enthält 1 bis 10 Kohlenstoffatome (z. B. C_{1-6}) und 1–5 Heteroatome (mindestens ein Sauerstoffatom). Beispiele solcher Acylgruppen umfassen Formyl, Acetyl, Benzyloxycarbonyl, tert.-Butoxycarbonyl, Trifluorethyloxycarbonyl, Thiobenzoyl, Phenylamidocarbonyl und 4-Nitrophenoxycarbonyl.

[0015] Eine Alkylengruppe ist ein zweiwertiger Rest, der sich von Alkanen durch Entfernung zweier Wasserstoffatome von zwei verschiedenen Kohlenstoffatomen ableitet. Beispiele von Alkylengruppen umfassen -CH_2-CH(R)-CH_2 und 1,4-Cyclohexylen. Ein Alkyliden ist ein zweiwertiger Rest, der sich von Alkenen durch Entfernung zweier Wasserstoffatome von demselben Kohlenstoffatom ableitet, wie beispielsweise 1-Propanyl-3-yliden (=CH-CH_2-CH_2-).

[0016] Ein aromatisches Kohlenstoffatom, so wie der Begriff hierin verwendet wird, ist ein Kohlenstoffatom innerhalb eines aromatischen Systems wie beispielsweise Benzol oder Naphthalin oder eines heteroaromatischen Systems wie beispielsweise Chinolin. Beispiele von nichtaromatischen Kohlenstoffatomen umfassen die Kohlenstoffatome in R-(C=O)-R, -CH_2Cl, -CH_2- und R-(C=O)-O-R. Die Formelmasse eines Fragments ist die Summe der Masse der Atome des angegebenen Fragments oder der Baueinheit. Zum Beispiel ist die Fragment-Formelmasse von Methyl 15 und die Fragment-Formelmasse von Hydroxyl ist 17.

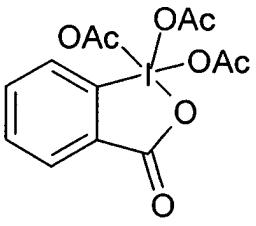
[0017] Eine Abgangsgruppe verlässt ein. Substrat mitsamt dem Elektronenpaar der kovalenten Bindung zwischen der Abgangsgruppe und dem Substrat; bevorzugte Abgangsgruppen stabilisieren diese Elektronen über die Gegenwart von elektronenziehenden Gruppen, Aromatizität, Resonanzstrukturen oder einer Kombination davon. Beispiele umfassen Halogenid (I und Br sind bevorzugt), Mesylat, Trifluormethansulfonat, p-Toluol-sulfonat, p-Nitrobenzolsulfonat, Benzoat, p-Nitrobenzoat, p-Nitrobenzyl und C_{2-5}-Halogenalkylcarbonyloxy wie beispielsweise Trifluoracetat.

[0018] Zahlreiche Thiol-, Amino-, Hydroxy- und Carboxy-Schutzgruppen sind dem Fachmann wohlbekannt. Im Allgemeinen ist die Art der Schutzgruppe nicht kritisch, vorausgesetzt, dass sie unter den Bedingungen jeglicher nachfolgender Reaktion (en) an anderen Stellen der Verbindung stabil ist und zum geeigneten Zeitpunkt abgespalten werden kann, ohne den Rest des Moleküls nachteilig zu beeinflussen. Außerdem kann eine Schutzgruppe durch eine andere substituiert werden, nachdem wesentliche synthetische Umwandlungen vollständig erfolgt sind. Es ist klar, dass, wenn eine Verbindung sich von einer hierin offenbarten Verbindung lediglich dadurch unterscheidet, dass eine oder mehrere Schutzgruppen der offenbarten Verbindung durch eine andere Schutzgruppe ersetzt worden ist bzw. sind, diese Verbindung innerhalb des Bereichs der Erfindung liegt. Zum Beispiel, wenn eine Verbindung sich von einer hierin offenbarten Verbindung nur dadurch unterscheidet, dass ein oder mehrere Wasserstoffatome einer Thiol-, Amino- oder Hydroxylgruppe (oder ein Wasserstoffatom oder eine Hydroxylgruppe einer Carboxylgruppe) durch eine Schutzgruppe ersetzt worden ist, um einen Carbonsäure- oder Sulfonsäureester zu bilden, so liegt diese geschützte Verbindung im Bereich der Erfindung. Sulfonsäureester schließen Alkylsulfonsäureester (z. B. Methylsulfonsäureester oder Mesyl) und Arylsulfonsäureester (z. B. Tosyl) ein. Weitere Beispiele und Bedingungen finden sich in T. W. Greene Protective Groups in Organic Chemistry (Schutzgruppen in der organischen Chemie) (1. Ed., 1981; 2. Ed., 1991, T. W. Greene und P. G. M. Wuts).

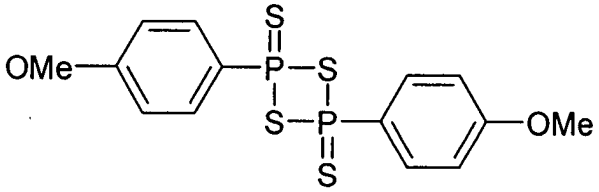
[0019] Die Erfindung umfasst ebenfalls isotopenmarkierte Gegenstücke von hierin offenbarten Verbindungen. In einer erfindungsgemäßen isotopenmarkierten Verbindung sind ein oder mehrere Atome durch ein Isotop ersetzt, das einen detektierbare Partikel oder Röntgenstrahlung aussendenden (radioaktiven) Kern oder einen gyromagnetischen Kern aufweist. Beispiele solcher Kerne umfassen ^{2}H, ^{3}H, ^{13}C, ^{15}N, ^{19}F, ^{29}Si, ^{31}P, ^{32}P und ^{125}I. Erfindungsgemäße isotopenmarkierte Verbindungen sind besonders nützlich als Sonden oder Forschungswerkzeuge für spektrometrische Analysen, Radioimmunoassays, auf γ- oder β-Szintillation basierende Bindungsassays, Fluorographie, Autoradiographie und kinetische Studien wie beispielsweise Inhibierungsstudien oder die Bestimmung von primären und sekundären Isotopeneffekten.

[0020] Die folgenden Abkürzungen werden in der Beschreibung der Syntheseverfahren verwendet:
AIBN, 2,2'-Azobis(isobutyronitril); Bn, Benzyl; BOP-Cl, Bis(2-oxo-3-oxazolinidyl)phosphinsäurechlorid; Bu_2BOTf, Dibutylbortriflat; CDI, N,N'-Carbonyldiimidazol; Cp, Cyclopentadienyl; DBU, 1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-en; DCC, Dicyclohexylcarbodiimid; DDQ, 2,3-Dichlor-5,6-dicyano-1,4-benzochinon; DEAD, Diethylazodicarboxylat; DIBAL-H, Diisobutylaluminiumhydrid; DMF, Dimethylformamid; Gilbert-Reagenz, Dimethyldiazomethylphosphonat; LDA, Lithiumdiisopropylamid; LiHDMS, Lithiumhexamethyldisilazamid; Mesylat, Methansulfonsäureester; Mitsunobu-Reagenzien, (DEAD, PPh_3 und Nucleophil); NMO, N-Methylmorpholin-N-oxid; Ph, Phenyl; PhFl, 9-Phenyl-9-fluorenyl; Ph_2NTf, N-Phenyltrifluormethansulfonsäureimid; Swern-Oxidationsreagenzien ($(COCl)_2$, DMSO, Et_3N); TBAF, Tetrabutylammoniumfluorid; TBS, tert.-Butyldimethylsilyl; TCDI, Thiono-N,N'-carbonyldiimidazol; Tf_2O, Trifluormethansulfonsäureanhydrid; TMS, Trimethylsilyl; Triflat, Trifluormethansulfonsäureester; und TsCl, p-Toluolsulfonsäurechlorid.

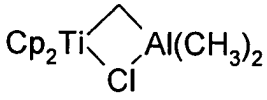
[0021] Die folgenden Reagenzien werden ebenfalls eingesetzt:



Dess-Martin Periodinan



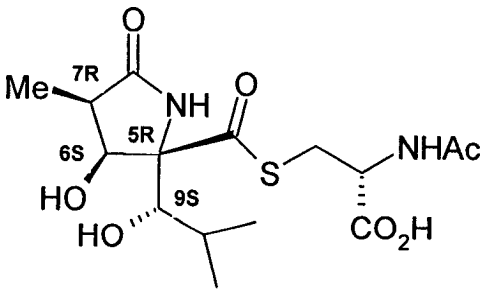
Lawessons Reagenz



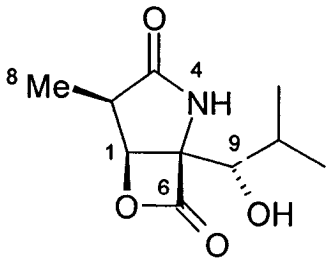
Tebbe-Reagenz

[0022] Die Erfindung basiert teilweise auf der hierin offenbarten Struktur-Wirkungs-Information, die die folgenden stereochemischen Beziehungen nahelegt. Man beachte, dass eine bevorzugte Verbindung ein, zwei, drei oder mehr Stereozentren mit der angegebenen aufwärts-abwärts- (oder β-α, wobei β wie hierin gezeichnet, oberhalb der Zeichenebene liegt) oder (R)-(S)-Beziehung aufweisen kann. In manchen Ausführungsformen

sind bevorzugte Konfigurationen 7(R), 9(S), 6(S) oder Kombinationen davon. In Lactacystin-Analoga weisen R^2 und L^0 bevorzugt eine syn-Beziehung auf, um die Bildung eines Zwischenprodukts vom Lacton- oder Lactamtyp zu ermöglichen, von dem man glaubt, dass es in Beziehung zu der Wirkung der hierin offenbarten Verbindungen als Proteasom-Inhibitoren steht. Jedoch ist es nicht erforderlich, dass jedes Stereozentrum den unten aufgeführten Strukturen entspricht.



Lactacystin



Lactacystin-β-lacton

[0023] Ein Fachmann wird erkennen, dass die hierin beschriebenen Verbindungen gewisse stereochemische und elektronische Eigenschaften bewahren, die entweder in Lactacystin oder in Lactacystin-β-lacton gefunden werden. Zum Beispiel wird vermutet, dass die Hydroxyisobutylgruppe und die Konfiguration der Hydroxylgruppe an C9 wichtig für die Erkennung der Zielsubstanz sind, genauso wie die Konfiguration der C6 Hydroxylgruppe und der C7 Methylgruppe des γ-Lactamrings. Jedoch ist die N-Acetylcysteineinheit nicht erforderlich für die Wirksamkeit. Einheiten wie beispielsweise R^2, R^1 und insbesondere A^1 (z. B. wenn A^1 eine Seitenkette einer natürlich vorkommenden α-Aminosäure wie beispielsweise Val, Leu, Lys und Phe ist) kann modifiziert werden, um die Selektivität für das Proteasom zu modifizieren, und die Selektivität für eine bestimmte Peptidaseaktivität des Proteasoms. In Kombination simulieren diese Baueinheiten bestimmte Peptide oder Proteine, die von dem Proteasom verarbeitet oder abgebaut werden (d.h. sie sind Peptidomimetika).

[0024] Die Erfindung basiert auch teilweise auf der Erkenntnis, dass Lactacystin und Lactacystin-β-lacton hochselektiv für die X/MB1 Untereinheit und die α-Kette des Proteasoms sind und die Aktivität von Proteasen wie beispielsweise Trypsin, α-Chymotrypsin, Calpain I, Calpain II, Kathepsin und Papain nicht inhibieren. Eine solche Selektivität ist nützlich, um eine pharmazeutische Zusammensetzung mit weniger Nebenwirkungen zu formulieren und grundlegende Forschungsergebnisse zu evaluieren, die irgendeine Untereinheit des Proteasoms in Verbindung mit der selektiven Inhibierung der X/MB1 Untereinheit und der α-Kette betreffen.

[0025] Indem wir uns nun den neuartigen Verbindungen, die durch die Formeln von Verbindungen, die Bestandteil der pharmazeutischen Zubereitungen sind, beschrieben sind, zuwenden, werden als Nächstes verschiedene Ausführungsformen betrachtet.

[0026] Die Ausführungsformen schließen Verbindungen ein, in denen CHX^4 in der (S)-Konfiguration vorliegt, wenn X^4 Hydroxyl ist und $-(CH_2)n-R^3X^3$ Isopropyl ist; in denen die Einheit $-(CH_2)n-R^3X^3$ zwischen 5 und 20 Kohlenstoffatome aufweist, wenn X^4 Hydroxyl ist, m den Wert 0 annimmt und Z^1 NH ist; in denen Z^1 NH oder NR_a ist; in denen Z^1 O, S, oder SO_2 ist; in denen Z^1 NR_a ist; in denen X^1 CH_2, $CH(R_b)$ oder $C(R_b)$ (R_c) ist; in denen Z^2 in der beta-Konfiguration (oberhalb der Zeichenebene) vorliegt; in denen CHX^4 in der alpha-Konfiguration (unterhalb der Zeichenebene) vorliegt; in denen R^1 H, C_{1-6}-Alkyl, C_{1-6}-Halogenalkyl, C_{2-6}-Alkenyl, C_{2-6}-Alkinyl oder Halogen ist; in denen R^1 eine Seitenkette einer natürlich vorkommenden α-Aminosäure, OR_d, SR_d oder NR_dR_e ist; oder Kombinationen der obengenannten.

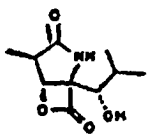
[0027] Eine andere Ausführungsform des zweiten Aspekts umfasst Verbindungen, in denen Z^1 NH oder NR_a ist; X^1 O oder S ist; Z^2 CHR^1 in der (R)- oder (S)-Konfiguration ist, wobei R^1 H, C_{1-6}-Alkyl, C_{1-6}-Halogenalkyl, C_{2-6}-Alkenyl, C_{2-6}-Alkinyl, Hydroxyl, Halogen, eine Seitenkette einer natürlich vorkommenden Aminosäure, OR_d, SR_d oder NR_dR_e ist (wobei R_d und R_e jeweils unabhängig voneinander H, C_{1-6}-Alkyl, C_{1-6}-Halogenalkyl, C_{2-6}-Alkenyl oder C_{2-5}-Alkinyl sind); Z^3 O oder NH ist; X^2 O oder S ist; und A^1 die Seitenkette irgendeiner natürlich vorkommenden α-Aminosäure ist oder der folgenden Formel entspricht, $-Y-(CH_2)_n-R^3X^3$ worin Y C=O oder CHX^4 in der (R)- oder (S)-Konfiguration ist oder fehlt, X^4 Halogen, Methyl, Halogenmethyl oder OR_h ist, worin R_h, ausgewählt ist aus H, C_{1-6}-Alkyl, C_{1-6}-Halogenalkyl, C_{2-6}-Alkenyl, C_{2-6}-Alkinyl, C_{1-10}-Acyl, C_{1-6}-Alkylsulfonyl und C_{6-10}-Arylsulfonyl; n 0, 1, 2 oder 3 ist; und R^3 unverzweigtes oder verzweigtes C_{1-8}-Alkylen, C_{3-10}-Cycloalkylen, Phenylen, C_{6-14}-Arylalkylen ist oder fehlt; und X^3 H, Hydroxyl, Thiol, Carboxyl, Amino, Halogen oder

C_{6-10}-Aryl ist; oder R^3 und X^3 zusammen genommen die Seitenkette irgendeiner natürlich vorkommenden α-Aminosäure bilden.

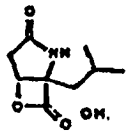
[0028] Die Erfindung stellt ebenfalls eine Verbindung bereit, in der Z^1 NH ist und Z^3 O ist; oder eine Verbindung worin Z^1 und Z^3 beide NH sind; oder eine Verbindung, in der mindestens vier (z. B. mindestens 5, oder alle) der folgenden Einschränkungen gelten: Z^1 ist NH oder NR_a; X^1 ist O oder S; Z^2 ist CHR^1 in der (R) – oder (S) -Konfiguration, worin R^1 H, C_{1-6}-Alkyl, C_{1-6}-Halogenalkyl, Hydroxyl oder OR_d ist, wobei R_d C_{1-6}-Alkyl ist; Z^3 ist O oder NH; X^2 ist O; Z^3 ist O oder NH; und A^1 ist die Seitenkette irgendeiner natürlich vorkommenden α-Aminosäure oder CHX^4, wobei X^4 Halogen, Methyl, Halogenmethyl oder OR_h ist, wobei R_h ausgewählt ist aus H, C_{1-6}-Alkyl, C_{1-6}-Halogenalkyl, C_{1-10}-Acyl, C_{1-6}-Alkylsulfonyl und C_{6-10}-Arylsulfonyl; R^3 ist unverzweigtes oder verzweigtes C_{1-8}-Alkylen, C_{3-10}-Cycloalkylen, Phenylen, C_{6-14}-Arylalkylen oder fehlt; m ist 0, 1, oder 2 und n ist 0 oder 1; und X^3 ist H.

[0029] Die Erfindung stellt ebenfalls eine pharmazeutische Zusammensetzung zur Verfügung, in der Z^1 NH oder NR_a ist; X^1 O oder S ist; Z^2 CHR^1 in der (R) – oder (S) -Konfiguration ist, wobei R^1 H, C_{1-6}-Alkyl, C_{1-6}-Halogenalkyl, C_{2-6}-Alkenyl, C_{2-6}-Alkinyl, Hydroxyl, Halogen, eine Seitenkette einer natürlich vorkommenden α-Aminosäure, OR_d, SR_d oder NR_dR_e ist (wobei R_d und R_e jeweils unabhängig voneinander H, C_{1-6}-Alkyl, C_{1-6}-Halogenalkyl, C_{2-6}-Alkenyl oder C_{2-5}-Alkinyl sind); Z^3 O oder NH ist; X^2 O oder S ist; und A^1 die Seitenkette irgendeiner natürlich vorkommenden α-Aminosäure ist, oder der folgenden Formel entspricht, $-Y-(CH_2)_n-R^3X^3$ worin Y C=O oder CHX^4 in der (R)- oder (S)-Konfiguration ist oder fehlt, wobei X^4 Halogen, Methyl, Halogenmethyl oder OR_h ist, worin R_h ausgewählt ist aus H, C_{1-6}-Alkyl, C_{1-6}-Halogenalkyl, C_{2-6}-Alkenyl, C_{2-6}-Alkinyl, C_{1-10}-Acyl, C_{1-6}-Alkylsulfonyl und C_{6-10}-Arylsulfonyl; n 0, 1, 2 oder 3 ist; und R^3 unverzweigtes oder verzweigtes C_{1-8}-Alkylen, C_{6-10}-Cycloalkylen, Phenylen, C_{6-14}-Arylalkylen ist oder fehlt; und X^3 H, Hydroxyl, Thiol, Carboxyl, Amino, Halogen oder C_{6-10}-Aryl ist; oder R^3 und X^3 zusammen genommen die Seitenkette irgendeiner natürlich vorkommenden α-Aminosäure bilden.

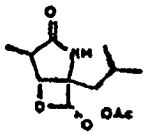
[0030] Eine andere Ausführungsform umfasst eine Verbindung, in der X^2 O ist und A^1 die Seitenkette irgendeiner natürlich vorkommenden α-Aminosäure ist, oder X^4 Halogen, Methyl, Halogenmethyl oder OR_h ist, worin R_h ausgewählt ist aus H, C_{1-6}-Alkyl, C_{1-6}-Halogenalkyl, C_{1-10}-Acy1, C_{1-6}-Alkylsulfonyl und C_{6-10}-Arylsulfonyl; und R^3 unverzweigtes oder verzweigtes C_{1-8}-Alkylen, C_{3-10}-Cycloalkylen, Phenylen, C_{6-14}-Arylalkylen ist oder fehlt; m 0, 1 oder 2 ist und n 0 oder 1 ist; und X^3 H ist. Einzelne Lactonanaloga umfassen clasto-Lactacystin-β-lacton.



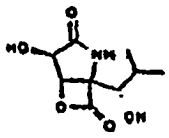
P-1



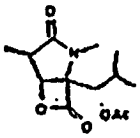
P-2.



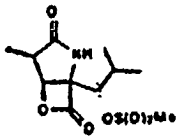
P-3



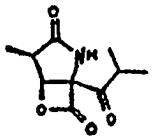
P-4



P-5

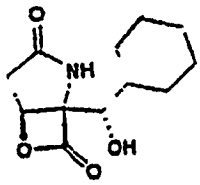


P-6

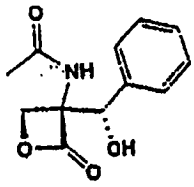


P-7

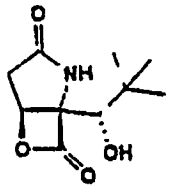
Tabelle B



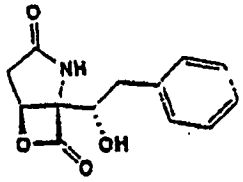
J-1



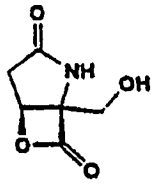
J-2



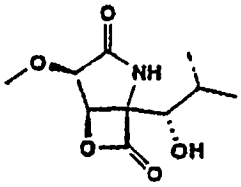
J-3



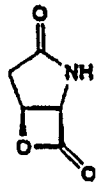
J-4



J-5



J-6

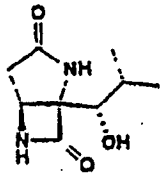


J-7

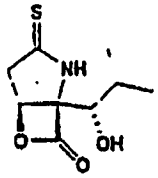


J-8

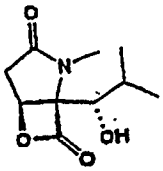
Tabelle C



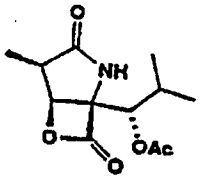
J-9



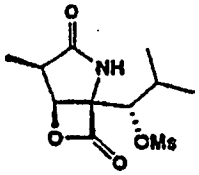
J-10



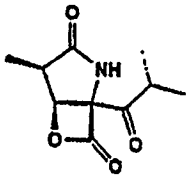
J-11



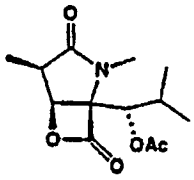
J-12



J-13



J-14

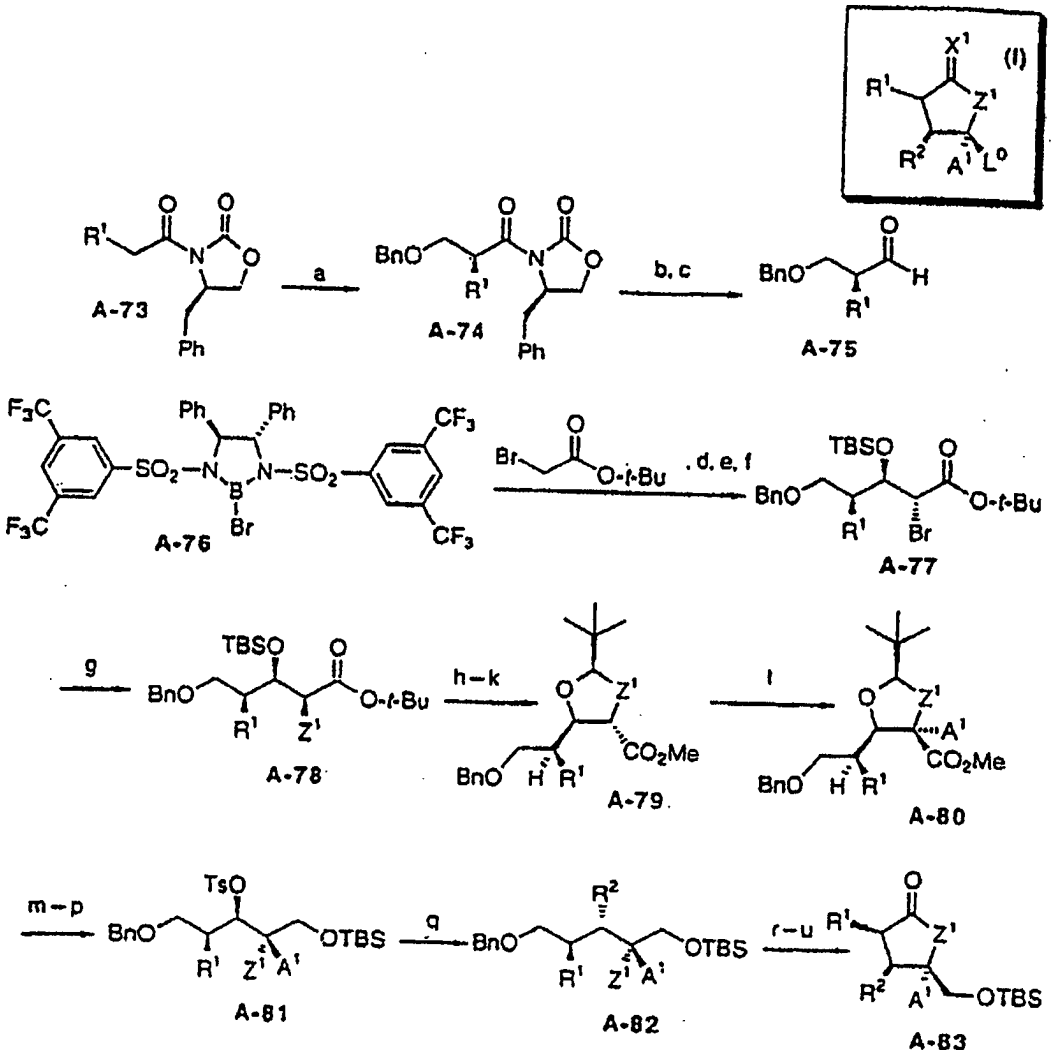


J-15

Synthese

[0031] Die Herstellung der von Anspruch 1 umfassten Verbindungen stützt sich in erster Linie auf die Methoden von Evans und von Corey. So werden, wie in Schema 12 gezeigt, chirale Oxazolidine vom Typ A-73 enolisiert und mit Benzyloxybrommethan alkyliert, wodurch R^1 eingeführt wird. [Evans, D. A. et al., J. Am. Chem. Soc., (1982) 104: 1737]. (Nur eine Konfiguration von R^1 wird durch die Reaktion erhalten. Die andere Konfiguration von R^1 wird erhalten, wenn man das entgegegesetzte Enantiomer des chiralen Oxazolidinons verwendet). Die Umwandlung von A-74 in Aldehyde vom Typ A-75 und chirale, durch Bor vermittelte (unter Verwendung von A-76) Aldolkondensation mit tert.-Butylbromacetat ergibt [Corey, E. J. et al., (1992b)] einen sekundären Alkohol der in Form des tert.-Butyldimethylsilyl(TBS)ethers geschützt wird, um Verbindungen des Typs A-77 zu erzeugen. Ersatz des Bromatoms durch ein Z^1 entsprechendes Nucleophil [Corey, E. J. et al. (1992b)] ergibt A-78, das in Verbindungen des Typs A-79 überführt werden kann. Wie oben in Bezug auf Anspruch 4 besprochen, können solche Verbindungen enolisiert und mit A^1 entsprechenden Elektrophilen stereospezifisch alkyliert werden, wodurch A-80 erhalten wird. Übliche Umwandlungen funktioneller Gruppen führen zu Tosylaten vom Typ A-81. Ersatz des Tosylats durch ein R^2 entsprechendes Nucleophil [Hanessian, S. et al., J. Org. Chem. (1989) 54: 5831] ergibt Verbindungen des Typs A-82, deren primäre Hydroxylgruppe beispielsweise über katalytische Hydrogenolyse entschützt wird und nach Oxidation des primären Alkohols zur Carbonsäure zu den Verbindungen A-83 zyklisiert wird.

Schema 12



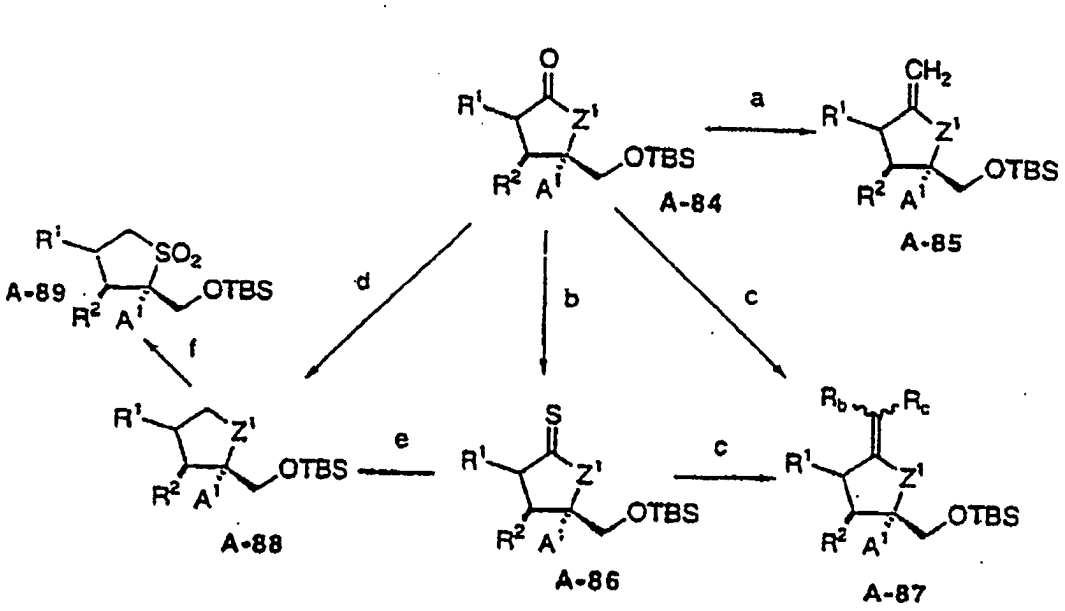
a) LDA; $BnOCH_2Br$ b) $LiAlH_4$ c) Swern-Oxidation d) Et_3N, Toluol e) A-75 f) TBS-Cl, Imidazol, DMF g) Z^1 entsprechendes Nucleophil h) $MeSO_3H$ i) CH_2N_2 j) TBAF, THF k) $(CH_3)_3CCHO$, saurer Katalysator 1) LiHMDS, A^i entsprechendes Elektrophil m) $LiAlH_4$ n) TBS-Cl, Imidazol, DMF o) Entschützung p) TsCl, Pyridin q) R^2 entsprechendes Nucleophil r) H_2, Pd/C s) Oxidation t) Z^1 entschützen, wenn nötig u) Cyclisierung (zum Beispiel mit DCC)

[0032] Wie in Schema 13 gezeigt, werden Verbindungen des Typs A-84, in denen R^1 entweder in der (R)- oder in der (S)-Konfiguration vorliegt, in eine Vielzahl von X^1-Varianten umgewandelt. Verbindungen des Typs A-85 werden aus A-84 unter Tebbe-Olefinierungsbedingungen hergestellt. [Pine et al., (1985)]. Verbindungen des Typs A-86 werden hergestellt durch Behandlung von A-84 mit Bis(tricyclohexylzinn)sulfid und Bortrichlorid. [Stelios, K. et al., (1982)]. Verbindungen des Typs A-87 werden hergestellt durch Zugabe des geeigneten Grignard-Reagenzes oder von Alkyllithium zu A-84 oder A-86, gefolgt von saurer Hydrolyse und Trennung der E- und Z-Isomere der Olefine. [Aguerro, A. et al., (1986), Schrock, R. R., (1976) und Hansen, D. et al., (1973)]. Verbindungen des Typs A-88 werden hergestellt durch Reduktion von A-84 mit Lithiumaluminiumhydrid [March, J., (1992), und Gaylord, J. (1956)] oder alternativ durch Reduktion von A-86 mit Raney-Nickel [Belen'kii, W., (1990)]. Wenn in A-88 Z^1 S ist, wird die Oxidation zu den cyclischen Sulfonvarianten beispielsweise mit $KHSO_5$ durchgeführt. [Trost, B.M. et al., Tetr. Lett. (1981) 22: 1287].

[0033] Zusammen genommen gehören die Verbindungen des Typs A-84, A-85, A-86, A-87, A-88 und A-89 zu der allgemeinen Verbindungsklasse A-90, die in Analoga A-91 umgewandelt werden können, beispielsweise indem dem Verfahren von Uno et al. gefolgt wird [Uno, H. et al., (1994)] (Schema 13b). Die Verbindungen A-91 werden in Analoga A-92 umgewandelt über die Oxidation zur Säure und Kopplung mit L^1 (die alle mit Standardmethoden hergestellt werden können) unter den von Corey und Reichard verwendeten Bedingungen [Corey, E. J. et al., (1992a)]. Sulfurierung dieser Verbindungen mit Lawessons Reagenz ergibt die Thionana-

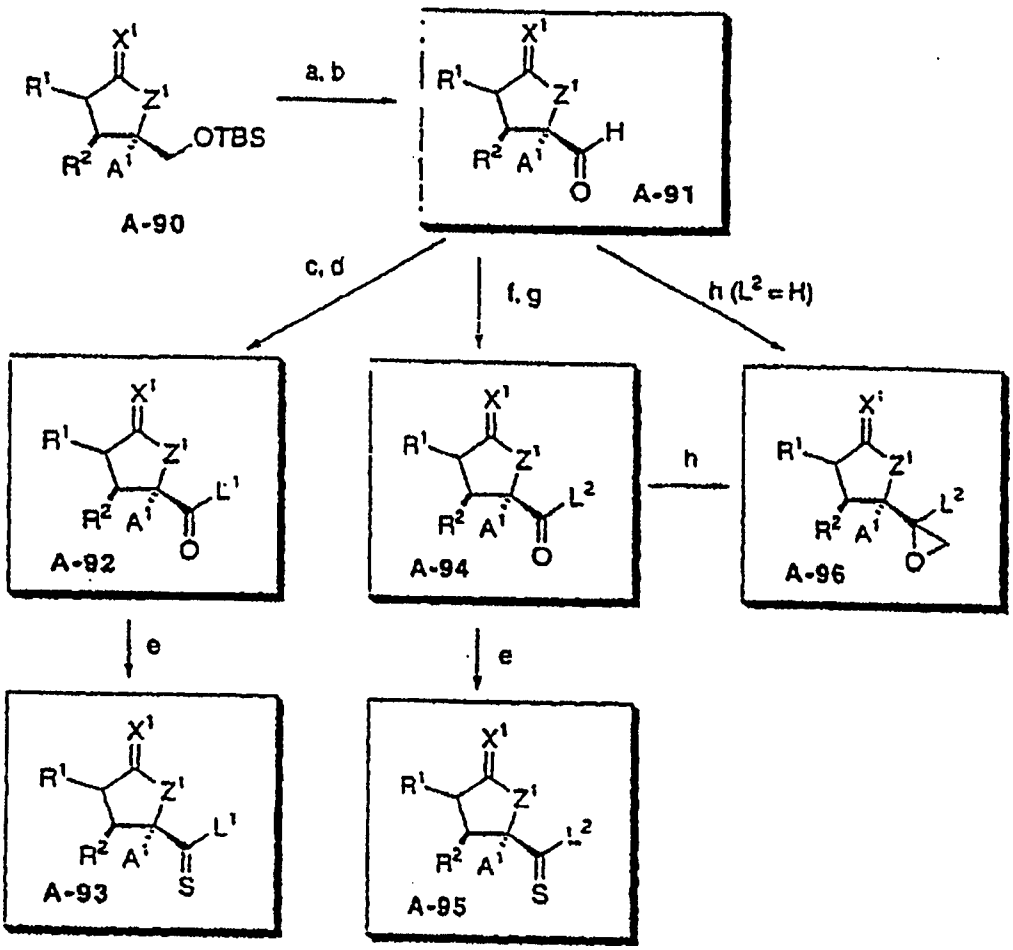
loga A-93. Verbindungen A-94 werden hergestellt über die Zugabe eines L^2 entsprechenden Nucleophils (z. B. CF_3) [Francese, C. et al., (1987)] zu den Aldehyden A-91, gefolgt von der Oxidation des Alkohols mit Dess-Martin-Periodinan. Sulfurierung dieser Verbindungen mit Lawessons Reagenz ergibt die Thionanaloga A-95. Epoxide des Typs A-96 werden aus A-91 oder A-94 nach der Methode von Johnson hergestellt, womit die Synthese aller in diesem Abschnitt detailliert beschriebenen Analoga vollständig beschrieben ist. Anmerkung: Wie oben, wenn eine durchgezogene Linie benutzt wird, um A^2 (oder irgendetwas, das A^2 entspricht) mit dem Rest des Moleküls zu verbinden, sollte dies als eine gestrichelte Linie aufgefasst werden. Die durchgezogene Linie wird lediglich aus Gründen der Klarheit verwendet. Alle A^2 sind mit dem Rest des Moleküls auf der „alpha"-Seite (d. h. der Unterseite) verbunden.

Schema 13a



a) Tebbe Olefinierung b) $((Cyclohexyl)_3Sn)_2S$, BCl_3 c) $R_bR_cC(H)(MgBr)$; H^- d) $LiAlH_4$, Et_2O e) Raney Ni f) $KHSO_5$ g) TBAF, THF h) Swern-Oxidation i) $NaClO_2$, NaH_2PO_4 j) L^i-H, BOP-Cl k) Lawessons Reagenz

Schema 13b



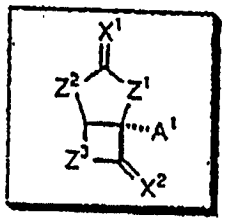
a) TBAF, THF oder HF, CH_3CN oder 1% HCl, MeOH b) $(COCl)_2$, DMSO, Et_3N, CH_2Cl_2 c) $NaClO_2$, pH 7, THF d) L^1-H, BOP-Cl e) Lawessons Reagenz f) L^2 entsprechendes Nucleophil g) Dess-Martin Periodinan h) $Mez(S^-)(O)CH_2^-$

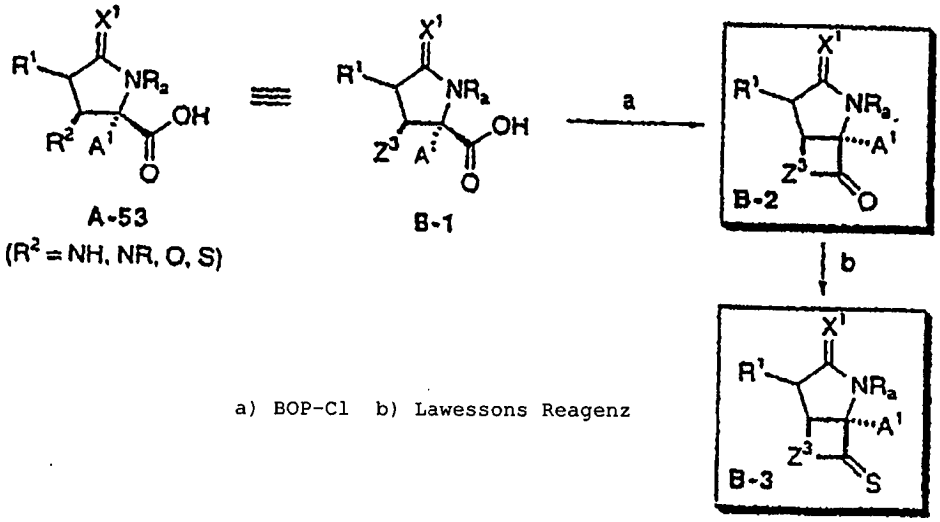
[0034] Die vorgeschlagenen Synthesen einiger weiterer Verbindungen beruhen auf einem Schlüssel-Zwischenprodukt aus Schema 9 der WO96/32105. Wie in Schema 14 gezeigt, sind Verbindungen des Typs B-1 analog zu einer Unterklasse der Verbindungen A-53, deren verschiedene Herstellverfahren in Schemata 1, 2 und 5–8 beschrieben wurden und in WO 96/32105 beschrieben wurden.

[0035] Um das Analogon B-2 herzustellen, wird die Methode von Corey et al. angewandt. [Corey, E. J. et al., Tetr. Lett. (1973) 34: 6977]. Sulfurierung von B-2 zum Beispiel mit Lawessons Reagenz [Cava, M. P. et al., (1985)] führt zu den Analoga B-3.

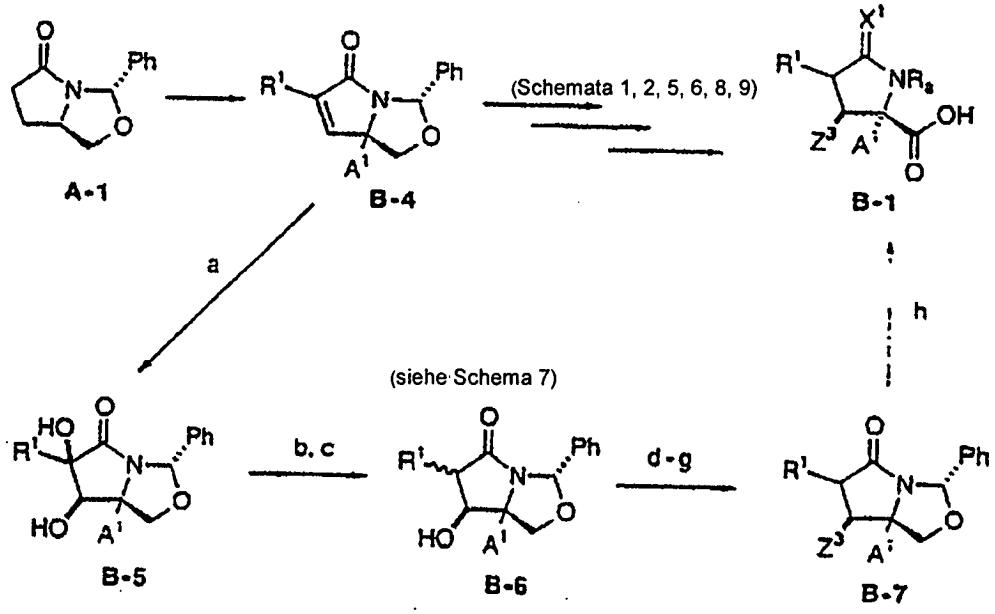
[0036] Die Herstellung von Verbindungen des Typs B-1 ist in Schema 15 zusammengefasst. So wird dieselbe Ausgangsverbindung (A-1), die in Schema 1 verwendet wird, durch die gleichen Methoden wie in Schemata 1, 2, 5, 6 und 8 der WO 96/32105 verwendet, zu allen Verbindungen B-2 weiterverarbeitet. Dann gibt es zwei mögliche allgemeine Strategien zur Umwandlung dieser Zwischenprodukte zu B-2. Die erste ist analog zu der in Schemata 1, 2, 5, 6, 8 und 9 von WO 96/32105 detailliert beschriebenen Strategie, in der Z^5 (in geeigneter Weise aktiviert oder geschützt) in den relevanten Reaktionen als Nucleophil dient.

Schema 14





Schema 15



a) OsO_4, NMO, Wasser, Aceton b) TCDI c) Bu_3SnH, AIBN d) einzelne Diastereomere e) DEAD, PPh_3, Essigsäure f) Umwandlung von Acetat in eine Abgangsgruppe g) Z^3 entsprechendes Nucleophil h) siehe Schemata 8 und 9

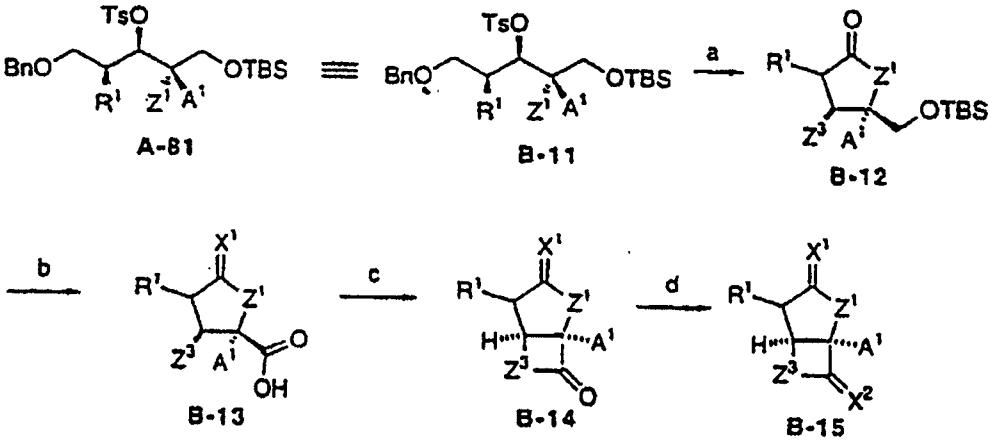
[0037] Die andere Strategie, basierend auf der in Schema 7 der WO 96/32105 gezeigten, ist auch in Schema 15 dargestellt. So führt Dihydroxylierung von B-4 zu B-5, welches dann wie zuvor desoxidiert wird, um B-6 zu ergeben. Diastereomerentrennung, Mitsunobu-Inversion der sekundären Hydroxylgruppe und Abspaltung einer aus dem Mitsunobu-Produkt abgeleiteten Abgangsgruppe ergibt Verbindungen des Typs B-7, die dann wie

in Schemata 8 und 9 von WO 96/32105 beschrieben zu B-1 weiterverarbeitet wurden.

[0038] Die vorgeschlagenen Synthesen dieser Verbindungen beruhen auf Zwischenprodukt A-81 aus Schema 12. Wie in Schema 16 gezeigt, sind Verbindungen des Typs B-11 analog zu einer Unterklasse der Verbindungen A-81, deren verschiedene Herstellmethoden in Schema 12 verdeutlicht und in dem begleitenden Text beschrieben sind. Umwandlung der Verbindungen des Typs B-11 zu B-12 wird in Analogie zu Schema 12 durchgeführt. Verbindungen des Typs B-13 werden aus B-12 hergestellt, indem den wesentlichen Schritten der Schemata 13a und 13b gefolgt wird.

[0039] Um die Analoga B-14 herzustellen, wird die Methode von Corey et al. benutzt [Corey, E. J. et al., (1993)]. Sulfurierung von B-14 zum Beispiel mit Lawessons Reagenz [Cava, M. P. et al., (1985)] ergibt die Analoga B-15.

Schema 16



a) siehe Schema 12 b) siehe Schema 13b c) BOP-Cl d) Lawessons Reagenz

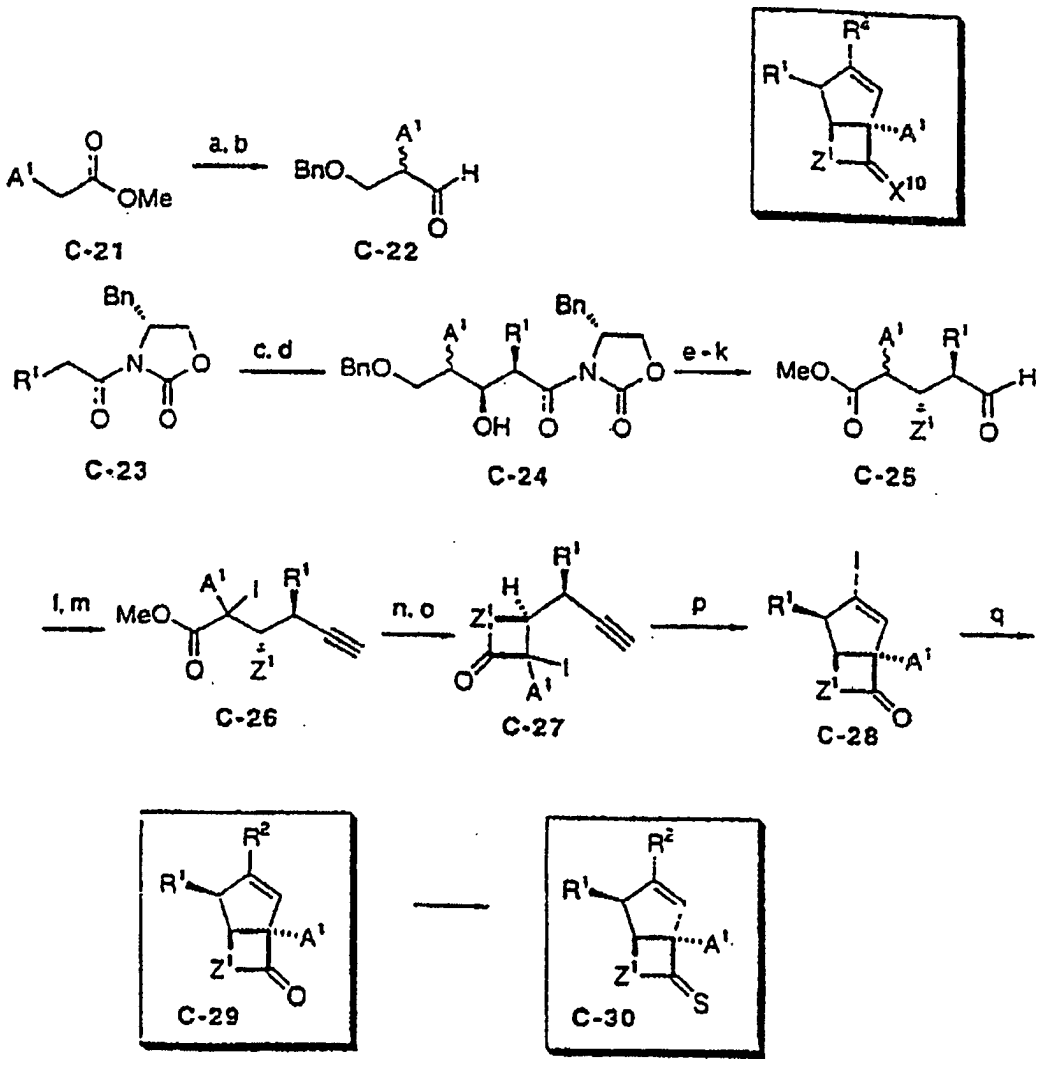
[0040] Die Herstellung einiger Verbindungen beruht in erster Linie auf den durch Bor-Enolat vermittelten asymmetrischen Aldolverfahren von Evans [Evans, D. A. et al., J. Am. Chem. Soc., (1981) 103: 2127] und auf den Resultaten von Studien radikalischer intramolekularer Zyklisierungsreakionen [Curran, D. P., Comprehensive Organic Synthesis (1991) 4: 779–831].

[0041] Die Ester C-21 (Schema 19), die durch Standardmethoden hergestellt wurden, werden deprotoniert und dann mit Benzyloxobrommethan alkyliert und mit DIBAL-H reduziert, um die Aldehyde C-22 als racemische Mischung zu erhalten. Addition von C-22 an ein Bor-Enolat, das von den chiralen Oxazolidinonimiden C-23 [Evans, D. A. et al., (1981)] abgeleitet ist, ergibt C-24 in Form einer Mischung von A^3 Diastereomeren. Die Identität der Konfiguration der anderen beiden neuen Stereozentren wird durch diese Reaktion festgelegt und wird durch die Konfiguration von A^3 nicht beeinflusst.

[0042] Die Umwandlung zu den Aldehyden C-25 in einem sechsstufigen Verfahren (zum Beispiel Tosylierung der sekundären Hydroxylgruppe, Ersatz durch ein Z^7 entsprechendes Nucleophil, katalytische Hydrogenolyse der Benzylgruppe, Oxidation des Alkohols zur Carbonsäure und Veresterung) ermöglicht die Herstellung des Substrats für die radikalische intramolekulare Cycloaddition. So führt die Behandlung des Aldehyds mit dem Gilbert-Reagenz [Gilbert, J. C. et al., J. Org. Chem. (1982 47: 1837] und Ersatz des enolisierbaren Wasserstoffatoms durch Iod zu einem Acetylen C-26, das nach Entschützen von Z^7, sofern dies erforderlich ist, und Zyklisierung, zum Beispiel mit BOP-Cl, C-27 ergibt.

[0043] Unterzieht man C-27 intramolekularen Zyklisierungsreaktionen mit Atomtransfer [Curran, D. P. et al., Tetr. Lett. (1987) 28: 2477 und Curran, D. P. et al., J. Org. Chem. (1989) 54: 3140], so werden die Verbindungen C-28 erhalten. Diese Reaktion verdient weitere Kommentierung. Die Stereochemie von A^1 und des Iodatoms ist ohne Bedeutung, da das aus dem Iod generierte Radikal unter den Reaktionsbedingungen isomerisieren kann. Außerdem ist nur eines der Radikaldiastereomere in der Lage zum Ringschluss – dasjenige, das das dargestellte cis-4,5-Ringsystem ergibt, da das trans-4,5-Ringsystem unter viel größerer Ringspannung leidet.

Schema 19



a) LDA; $BnOCH_2Br$ b) DIBAL-H c) Bu_2BOTf, Et_3N d) C-22 e) TsCl, Pyridin F) Z^1 entsprechendes Nucleophil q) H_2, Pd/C h) Swern-Oxidation i) $NaClO_2$, NaH_2PO_4 7) CH_2N_2 k) $LiAlH_4$, Swern-Oxidation 1) Base, Gilbert-Reagenz m) LDA; TMS-Cl; I_2 n) LiOH, THF, Wasser o) BOP-Cl p) $(BU_3Sn)_2$ nv q) $(Ph_3P)_4Pd$, R^2-M r) Lawessons Reagenz

[0044] Diese Zyklisierung ist aus zwei weiteren Gründen bevorzugt. Zum einen ist es eine Zyklisierungsreaktion vom 5-endo-dig-Typ und daher gemäß den Baldwinschen Zyklisierungsregeln bevorzugt. [Baldwin, J. E., J. Chem. Soc., Chem. Commun.

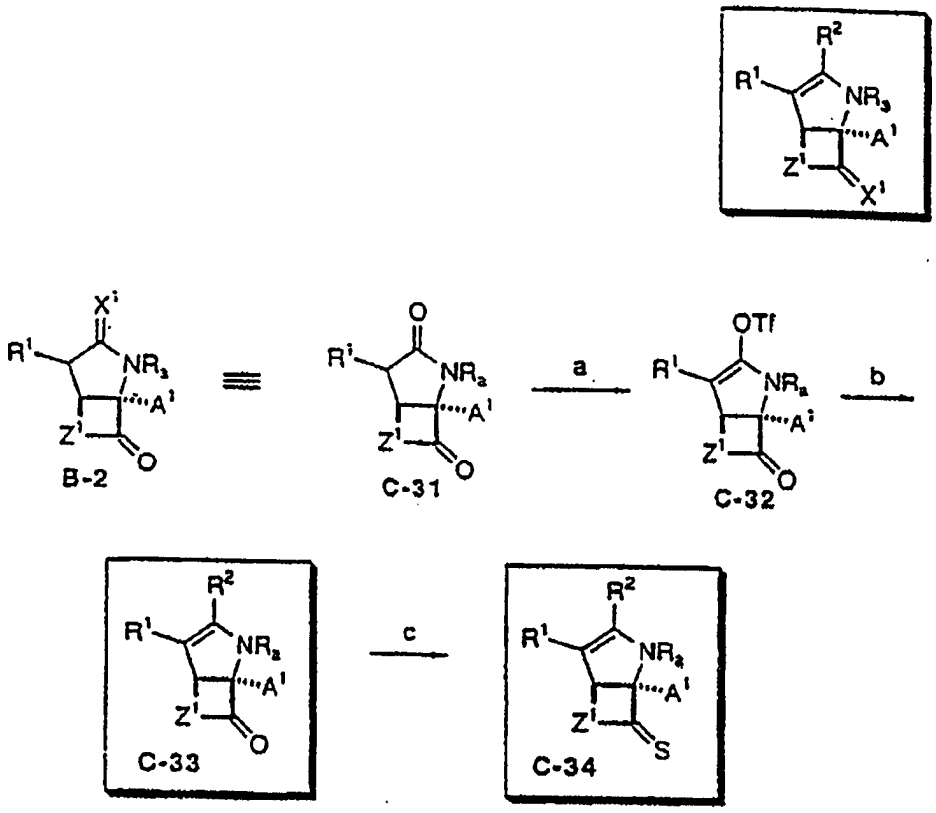
[0045] (1976) 734]. Zum anderen sind die verwendeten Bedingungen für den Atomtransfer ideal, da das resultierende Vinylradikal sehr reaktiv ist und schnell durch das Iodradikal abgefangen wird. [Curran, D. P. et al., J. Am. Chem. Soc., (1986) 108: 2489].

[0046] Die Weiterverarbeitung von C-28 zu C-29 wird zum Beispiel unter gängigen Kopplungsbedingungen, wie den von Stille [Stille, J. K., Angew. Chem., Int. Ed. Engl. (1986) 25: 504] oder Heck [Heck, R. F., Comprehensive Organic Synthesis, (1991) 4: 833–863] beschriebenen, unter Verwendung eines geeigneten Metallderivats (M ist z. B. Tributylstannyl) von R^9 erreicht. Sulfurierung mit Lawessons Reagenz [Cava, M. P. et al., (1985)] ergibt die Verbindungen C-30, womit die Darstellung aller in den Ansprüchen 8 und 39 beanspruchten Verbindungen vollständig beschrieben ist.

[0047] Die Herstellung einiger Verbindungen beruht in erster Linie auf dem Zwischenprodukt B-2, dessen Herstellung in den Schemata 13a, 13b und 14 dargestellt und im begleitenden Text erörtert ist. Wie in Schema 20 gezeigt, wird C-31 mit einer geeigneten Base deprotoniert und das resultierende Enolat wird zum Beispiel

mit der Triflatquelle $PhN(Tf)_2$ umgesetzt [McMurry, J. E. et al., Tetr. Lett. (1983) 24: 979]. Die Vinyltriflate C-32 werden zum Beispiel mit einer katalytischen Menge $(Ph3P)_4Pd$ und einem geeigneten Metallderivat [Stille, J. K. (1986) und Heck, R. F. (1991)] (M ist z. B. Tributylstannyl) von R^9 behandelt, wodurch die Analoga C-33 erhalten werden, die mit Lawessons Reagenz umgesetzt werden können [Cava, M. P. et al., (1985)] zu den Verbindungen C-34, womit die Darstellung aller Verbindungen dieses Abschnitts vollständig beschrieben ist.

Schema 20



a) LiHMDS, $PhN(Tf)_2$ b) $(Ph_3P)_4Pd$, LiCl, R^2-M c) Lawesson's Reagenz

Verwendung

[0048] Die offenbarten Verbindungen werden verwendet zur Herstellung eines Medikaments zur Verwendung in einer Behandlungsmethode für einen Zustand, der durch Proteasom-abhängige Proteolyse vermittelt ist wie beispielsweise Muskelschwund, oder indirekt über Proteine vermittelt wird, die von dem Proteasom verarbeitet werden, wie beispielsweise NF-kB. Das Proteasom nimmt an der schnellen Eliminierung und der posttranslationalen Verarbeitung von Proteinen (z. B. Enzymen) teil, die an der Zellregulierung (z. B. dem Zellzyklus, der Gentranskription und an Stoffwechselwegen), der Kommunikation zwischen Zellen und der Immunantwort (z. B. der Antigenpräsentation) beteiligt sind. Spezielle Beispiele, die im Folgenden diskutiert werden, schließen β-Amyloidprotein und Regelproteine wie beispielsweise Cycline und den Transkriptionsfaktor NF-kB ein. Behandlung, so wie der Begriff hierin gebraucht wird, umfasst die Umkehr, die Verringerung oder das zum Stillstand bringen der Symptome, Krankheitszeichen und des zugrundeliegenden pathologischen Geschehens eines Zustands in einer den Zustand der Person verbessernden oder stabilisierenden Weise.

[0049] Die Alzheimersche Krankheit ist gekennzeichnet durch extrazelluläre Ablagerungen von β-Amyloidprotein (β-AP) in senilen Plaques und Gefäßen des Gehirns. β-AP ist ein Peptidfragment mit 39 bis 42 Aminosäuren, das sich von einem Amyloidproteinvorläufer (Amyloid Protein Precursor, APP) ableitet. Es sind mindestens drei Isoforme von APP bekannnt (mit 695, 751 und 770 Aminosäuren). Unterschiedliches Splicing von mRNA erzeugt die Isoforme; normale Verarbeitung beeinflusst einen Teil der β-AP-Sequenz und verhindert dadurch die Bildung von β-AP. Man glaubt, dass anormale Proteinverarbeitung durch das Proteasom zu dem gehäuften Vorkommen von β-AP im Gehirn bei der Alzheimerschen Krankheit beiträgt. Das APP-verarbeitende Enzym in Ratten enthält etwa zehn verschiedene Untereinheiten (22 kDa–32 kDa). Die 25 kDa-Untereinheit enthält eine N-terminale Sequenz X-Gln-Asn-Pro-Met-X-Thr-Gly-Thr-Ser, die identisch ist mit der β-Unterein-

heit von menschlichem Makropain. Kojima, S. et al., Fed. Eur. Biochem. Soc. (1992) 304: 57–60. Das APP-verarbeitende Enzym spaltet an der Gln^{15}-Lys^{16}-Bindung; in der Gegenwart von Calciumionen spaltet das Enzym auch an der Met^{-1}-Asp^{1}-Bindung und der Asp^{1}-Ala^{2}-Bindung und setzt die extrazelluläre Domäne von β-AP frei.

[0050] Daher ist eine Ausführungsform die Verwendung der offenbarten Verbindungen zur Herstellung eines Medikaments zur Verwendung in einer Methode zur Behandlung der Alzheimerschen Krankheit. Die Methode umfasst die Verabreichung einer wirksamen Menge einer Verbindung (z. B. einer pharmazeutischen Zusammensetzung) die einer der hierin beschriebenen Formeln entspricht, an eine Person. Solch eine Behandlung umfasst die Verringerung der β-AP-Verarbeitungsrate, die Verringerung der Bildungsrate von β-AP-Plague und die Verringerung der β-AP-Bildungsrate, und die Verringerung der klinischen Symptome der Alzheimerschen Krankheit.

[0051] Andere Ausführungsformen der Erfindung beziehen sich auf Kachexie- und Muskelschwund-Krankheiten. Das Proteasom baut viele Proteine in reifenden Retikulozyten und wachsenden Fibroblasten ab. In Zellen, denen Insulin oder Serum entzogen wurde, verdoppelt sich die Proteolysegeschwindigkeit beinahe. Inhibition des Proteasoms verringert die Proteolyse, und verringert dadurch sowohl den Verlust von Muskel-Protein als auch die Stickstoffbelastung von Nieren oder Leber. Proteasominhibitoren sind nützlich zur Behandlung von Zuständen wie beispielsweise Krebs, chronischen Infektionskrankheiten, Fieber, Muskelschwäche (Atrophie) und Denervation, Nervenschäden, Fasten, mit Azidose verbundenem Nierenversagen und Leberversagen. Siehe z. B. Goldberg, US-Patent Nr. 5 340 736 (1994). Ausführungsformen der Erfindungen umfassen daher die Verwendung der offenbarten Verbindungen zur Herstellung von Medikamenten zur Verwendung in Verfahren zur Verringerung der Geschwindigkeit des Muskelproteinabbaus in einer Zelle, der Verringerung der intrazellulären Proteinabbaurate, der Verringerung der Abbaurate von Protein p53 in einer Zelle, und die Hemmung der Ausbreitung von mit p53 in Beziehung stehenden Krebsarten. Jedes dieser Verfahren umfasst einen Schritt, bei dem eine Zelle (in vivo oder in vitro, z. B. ein Muskel in einer Person) mit einer wirksamen Menge einer Verbindung (z. B. einer pharmazeutischen Zusammensetzung) einer der hierin offenbarten Formeln in Kontakt gebracht wird.

[0052] Ein anderes Protein, das von dem Proteasom verarbeitet wird, ist NF-kB, ein Mitglied der Familie der Rel-Proteine. Die Rel-Familie von Transkriptionsaktivatorproteinen kann in zwei Gruppen unterteilt werden. Die erste Gruppe benötigt proteolytische Verarbeitung und umfasst p50 (NF-kB1, 105 kDa) und p52 (NF-k2, 100 kDa). Die zweite Gruppe benötigt keine proteolytische Verarbeitung und umfasst p65 (RelA, Rel(c-Rel) und RelB). Sowohl Homo- als auch Heterodimere können von den Mitgliedern der Rel-Familie gebildet werden; NF-kB, zum Beispiel, ist ein p50-p65 Heterodimer. Nach Phosphorylierung und Ubiquitinierung von IkB und p105 werden die beiden Proteine jeweils abgebaut und verarbeitet, wodurch aktives NF-kB gebildet wird, das aus dem Zytoplasma in den Zellkern wandert. Ubiquiniertes p105 wird ebenfalls durch gereinigte Proteasomen verarbeitet. Palombella et al., Cell (1994) 78: 773–785. Aktives NF-kB bildet mit anderen Transkriptionsaktivatoren und z. B. HMG I(Y) einen stereospezifischen Verstärkerkomplex, der die selektive Expression eines bestimmten Gens induziert.

[0053] NF-kB reguliert Gene, die an der Immun- und Entzündungsantwort sowie an Mitoseereignissen beteiligt sind. Zum Beispiel wird NF-kB benötigt für die Expression des x-Gens der leichten Kette von Immunoglobulin, das Gen für die α-Kette des IL-2 Rezeptors, das Gen für den Klasse I Haupthistokompatibilitätskomplex, und eine Anzahl von Genen für Cytokin, die zum Beispiel IL-2, IL-6, den Granulozytenkolonie-stimulierenden Faktor und IFN-β kodieren. Palombella et al. (1994). Einige Ausführungsformen der Erfindung schließen die Verwendung offenbarter Verbindungen in der Herstellung eines Medikaments zur Verwendung in Verfahren zur Beeinflussung des Ausmaßes der Expression von IL-2, MHC-I, IL-6, IFN-β oder irgendeinem der anderen vorerwähnten Proteine ein, wobei jedes Verfahren das Verabreichen einer wirksamen Menge einer Verbindung einer hierin offenbarten Formel an eine Person einschließt.

[0054] NF-kB ist auch an der Expression der Zelladhäsionsgene beteiligt, die E-Selektin, P-Selektin, ICAm und VCAM-1 kodieren, Collins, T., Lab. Invest. (1993) 68: 499–508. Eine Ausführungsform der Erfindung ist die Verwendung der offenbarten Verbindungen zur Herstellung eines Medikaments zur Verwendung in einem Verfahren zur Inhibierung von Zelladhäsion (z. B. durch E-Selektin, P-Selektin, ICAm oder VCAM-1 vermittelte Zelladhäsion). Das Verfahren umfasst das in Kontakt bringen einer Zelle mit (oder die Verabreichung an eine Person) einer wirksamen Menge einer Verbindung (z. B. einer pharmazeutischen Zusammensetzung), die eine der hierin offenbarten Formeln aufweist.

[0055] NF-kB bindet auch spezifisch an den HIV-Enhancer/Promotor. Wenn man es mit dem Nef von mac239 vergleicht, unterscheidet sich das HIV Regulatorprotein Nef von pbjl4 davon durch zwei Aminosäuren in der

Region, die die Bindung von Proteinkinase kontrolliert. Man glaubt, dass die Proteinkinase die Phosphorylierung von I-kB anzeigt, und dadurch den Abbau von IkB über den Ubiquitin-Proteasom Stoffwechselpfad auslöst. Nach dem Abbau wird NF-kB in den Zellkern freigesetzt und steigert so die Transkription von HIV. Cohen, J., Science (1995) 267: 960. Zwei Ausführungsformen der Erfindung sind die Verwendung der offenbarten Verbindungen in der Herstellung eines Medikaments zur Verwendung in einem Verfahren zur Verhinderung oder Verringerung einer HIV Infektion in einer Person und die Verwendung der offenbarten Verbindungen zur Herstellung eines Medikaments zur Verwendung in einem Verfahren zur Verringerung des Ausmaßes der Expression viraler Gene, wobei jedes Verfahren das Verabreichen einer wirksamen Menge einer Verbindung einer hierin offenbarten Formel an die Person einschließt.

[0056] Komplexe, die p50 enthalten, sind schnelle Vermittler akuter Entzündungs- und Immunreaktionen. Thanos, D. und Maniatis, T., Cell (1995) 80: 529–532. Intrazelluläre Proteolyse erzeugt kleine Peptide für die Präsentation an T-Lymphozyten, um durch MHC Klasse I vermittelte Immunreaktionen zu induzieren. Das Immunsystem sucht nach körpereigenen Zellen, die mit Viren infiziert sind oder eine onkogene Transformation durchlaufen haben. Zwei Ausführungsformen der Erfindung sind die Verwendung der offenbarten Verbindungen in der Herstellung eines Medikaments zur Verwendung in einem Verfahren zur Verhinderung der Antigenpräsentation in einer Zelle, das das in Kontakt bringen einer Zelle mit einer Verbindung einer hierin beschriebenen Formel umfasst, und die Verwendung der offenbarten Verbindungen zur Herstellung eines Medikaments zur Verwendung in einem Verfahren zur Suppression des Immunsystems einer Person (z. B. Verhinderung der Abstoßung von Transplantaten), das das Verabreichen einer wirksamen Menge einer Verbindung einer hierin beschriebenen Formel an die Person einschließt.

[0057] Außerdem stellt die Erfindung die Verwendung der offenbarten Verbindungen zur Herstellung eines Medikaments zur Verwendung in einem Verfahren zur Behandlung von Entzündungen zur Verfügung, wobei das Verfahren das Verabreichen einer wirksamen entzündungshemmenden Menge einer pharmazeutischen Zusammensetzung, die eine Verbindung einer hierin beschriebenen Formel enthält, an eine Person einschließt. Eine Entzündung kann eine primäre oder sekundäre Reaktion sein, die verbunden ist mit (a) einer Verletzung, wie beispielsweise einem Schnitt, einer Läsion, einer Stichwunde, (b) einer Infektion (einschließlich infizierter Ablationen) durch ein oder mehrere Viren, Bakterien, Mykobakterien, Mikroorganismen, Parasiten und Pilze, (c) Allergien, (d) einem Krankheitszustand, (e) Operationen (z. B. einer Transplantation), oder (f) einer Kombination davon.

[0058] Allergien sind primäre Entzündungsreaktionen auf Antigene oder Allergene. Quellen für Allergene umfassen Pflanzen (z. B. Gras- oder Baumpollen), Tiere (z.B. Hautschuppen, Gift, Urin, Ausscheidungen von Hunden, Katzen, Insekten und Schlangen) und Pilze. Zusätzlich zu Allergenen wie beispielsweise Pollen von Secale cereale, Ambrosia artemisiifolia, oder der japanischen Zeder können bestimmte Nahrungsmittel oder Nahrungsmittelbestandteile (z. B. Eier, Milch, Krustentiere, Erdbeeren, Schokolade), Impfstoffe und Medikamente (z. B. Penicillin) allergische Reaktionen bei bestimmten Personen auslösen.

[0059] Krankheitszustände umfassen rheumatoide Arthritis, Sklerodermie, rheumatisches Fieber, entzündliche Unterleibskrankheiten (z. B. Morbus Crohn und ulzerative Kolitis), Diabetes mellitus, Myasthenia gravis, Multiple Sklerose, Guillain-Barre-Syndrom, Konjunktivitis des Auges, systemischen Lupus erythematosus, Enzephalitis, posttraumatische Lungeninsuffizienz, Psoriasis, Emphysem, Alzheimersche Krankheit und Muskeldystrophie.

[0060] Die Erfindung stellt die Verwendung der offenbarten Verbindungen zur Herstellung eines Medikaments zur Verwendung in einem Verfahren zur Behandlung von durch Organ- oder Gewebetransplantation ausgelösten Entzündungen zur Verfügung. Das Verfahren schließt das Verabreichen einer Zusammensetzung, die eine Verbindung einer hierin offenbarten Formel enthält, an eine Person ein, die sich einer Transplantation unterzogen hat oder kurz davor steht. Transplantationen schließen Knochenmark, feste Organe (z. B. Niere, Lungen, Herz, Pankreas, Leber und Haut) oder Gewebe ein.

[0061] Bestimmte Proteasom-Inhibitoren blockieren sowohl den Abbau als auch die Verarbeitung von ubiquiniertem NF-kB in vitro und in vivo. Proteasom-Inhibitoren blockieren ebenfalls den Abbau von IkB-α und die Aktivierung von NF-kB, Palombella et al.; und Traenckner et al., EMBO J. (1994) 13: 5433–5441. Eine Ausführungsform der Erfindung ist die Verwendung der offenbarten Verbindungen zur Herstellung eines Medikaments zur Verwendung in einem Verfahren zur Verhinderung des Abbaus von IkB-α, das das in Kontakt bringen der Zelle mit einer Verbindung einer hierin beschriebenen Formel einschließt. Eine weitere Ausführungsform ist die Verwendung der offenbarten Verbindungen zur Herstellung eines Medikaments zur Verwendung in einem Verfahren zur Verringerung des zellulären Gehalts von NF-kB in einer Zelle, einem Muskel, einem Organ oder ei-

ner Person, welches das in Kontakt bringen der Zelle, des Muskels, des Organs oder der Person mit einer Verbindung einer hierin beschriebenen Formel einschließt.

[0062] Andere eukaryotische Transkriptionsfaktoren, die proteolytische Verarbeitung benötigen, umfassen den allgemeinen Transkriptionsfaktor TFIIA, das akzessorische Protein VP16 des Herpes simplex Virus (Wirtszellfaktor), das viral induzierbare Protein des IFN-Regulatorfaktors 2, und das membrangebundene sterol regulatory element-binding protein-1 (SREBP-1).

[0063] Andere Ausführungsformen der Erfindung sind die Verwendung der offenbarten Verbindungen zur Herstellung eines Medikaments zur Verwendung in Verfahren zur Beeinflussung Cyclinabhängiger Zyklen eukaryotischer Zellen, wobei die Verfahren einschließen, dass eine Zelle (in vitro oder in vivo) einer Verbindung einer hierin offenbarten Formel ausgesetzt wird. Cycline sind Proteine, die an der Kontrolle des Zellzyklus beteiligt sind. Das Proteasom ist am Abbau von Cyclinen beteiligt. Beispiele von Cyclinen umfassen mitotische Cycline, G1 Cycline (Cyclin B). Abbau von Cyclinen erlaubt einer Zelle, ein Stadium des Zellzyklus (z. B. die Mitose) zu verlassen und in ein anderes Stadium (z. B. die Teilung) einzutreten. Man glaubt, dass alle Cycline mit $p34^{cdc2}$ Proteinkinase oder verwandten Kinasen in Verbindung stehen. Das Proteolyse-Targeting-Signal ist auf den Aminosäuren 42-RAALGNISEN-50 (Destruction-Box) lokalisiert. Es gibt Beweise dafür, dass Cyclin in eine durch Ubiquitinligase angreifbare Form umgewandelt wird oder dass während der Mitose eine Cyclin-spezifische Ligase aktiviert wird. Ciechanover, A., Cell, (1994) 79: 13–21. Inhibierung des Proteasoms verhindert den Abbau von Cyclin und inhibiert daher die Zellvermehrung (z. B. mit Cyclin in Verbindung stehende Krebsarten). Kumatori et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1990) 87: 7071–7075. Eine Ausführungsform der Erfindung ist die Verwendung der offenbarten Verbindungen zur Herstellung eines Medikaments zur Verwendung in einem Verfahren zur Behandlung einer sich ausbreitenden Krankheit einer Person (z. B. Krebs, Psoriasis oder Restenose), wobei das Verfahren das Verabreichen einer wirksamen Menge einer Verbindung einer hierin offenbarten Formel an die Person einschließt. Chronische oder akute Entzündungen können hervorgerufen sein durch die Abstoßung von Transplantaten, Arthritis, rheumatoide Arthritis, Infektionen, Dermatose, entzündliche Unterleibskrankheiten, Asthma, Osteoporose und Autoimmunerkrankungen. Abstoßung oder Entzündungen können in transplantierten Geweben oder Organen jeden Typs auftreten, einschließlich Herz, Lunge, Niere, Leber, Hauttransplantaten und Gewebetransplantaten. Die Erfindung umfasst auch die Verwendung der offenbarten Verbindungen zur Herstellung eines Medikaments zur Verwendung in einem Verfahren zur Behandlung von mit Cyclin in Verbindung stehenden Entzündungen in einer Person, wobei das Verfahren das Verabreichen einer wirksamen Menge einer Verbindung einer hierin beschriebenen Formel an eine Person einschließt.

[0064] Zusätzliche Ausführungsformen sind die Verwendung der offenbarten Verbindungen zur Herstellung eines Medikaments zur Verwendung in Verfahren zur Beeinflussung der Proteasom-abhängigen Regulierung von Onkoproteinen und Verfahren zur Behandlung oder zur Verhinderung von Krebswachstum, wobei jedes Verfahren einschließt, dass eine Zelle (in vivo, z. B. in einer Person oder in vitro) einer Verbindung einer hierin offenbarten Formel ausgesetzt wird. Von HPV-16 und HPV-18 abgeleitete E6-Proteine stimulieren die ATP- und Ubiquitin-abhängige Konjugation und den Abbau von p53 in rohen Retikulozyten-Lysaten. Es ist gezeigt worden, dass sich das rezessive Onkogen p53 bei der nichtpermissiven Temperatur in einer Zellinie mit einem mutierten thermolabilen E1 akkumuliert. Erhöhte Konzentrationen von p53 können zum Zelltod führen. Beispiele von proto-Onkoproteinen, die vom Ubiquitinsystem abgebaut werden umfassen c-Mos, c-Fos und c-Jun. Eine Ausführungsform ist die Verwendung der offenbarten Verbindungen zur Herstellung eines Medikaments zur Verwendung in einem Verfahren zur Behandlung von mit p53 in Verbindung stehendem Zelltod, wobei das Verfahren das Verabreichen einer wirksamen Menge einer Verbindung einer hierin offenbarten Formel an eine Person einschließt.

[0065] Die Behandlung von Krebs verhindert, erleichtert oder verbessert ein oder mehrere primäre oder sekundäre Phänomene, die mit der Entstehung, dem Wachstum und der Metastasenbildung von Tumoren in Verbindung stehen, insbesondere von bösartigen Tumoren, z. B. ein Gewebewachstum, bei dem die Zellvermehrung unkontrolliert abläuft. Bösartige Tumore zeigen ein größeres Maß von Anaplasie als gutartige Tumore. Die Erfindung stellt die Verwendung der offenbarten Verbindungen zur Herstellung eines Medikaments zur Verwendung in einem Verfahren zur Behandlung von Krebs bereit, wobei das Verfahren die Verabreichung einer gegen Krebs wirksamen Menge einer hierin beschriebenen pharmazeutischen Zusammensetzung an eine Person einschließt, worin der Krebs ausgewählt ist aus Karzinomen, Lymphomen, Sarkomen und Myelomen.

[0066] Beispiele von Karzinomen umfassen Adenokarzinom, Azinuszellen-Adenokarzinom, Nebennierenrinden-Karzinom, Alveolarzellkarzinom, anaplastische Karzinom, Basaloidzellkarzinom, Basalzellkarzinom, Bronchiolarkarzinom, Bronchialkarzinom, Nierenadenokarzinome, Embryonalkarzinom, Endometriumkarzinom, fibrolamelläres Leberzellkarzinom, follikuläres Karzinom, Riesenzellkarzinom, Leberzellkarzinom, intrae-

pidermales Karzinom, intraepitheliales Karzinom, Leptomeningenkarzinom, medulläres Karzinom, melanotisches Karzinom, Meningeales Karzinom, mesometonephrisches Karzinom, kleinzelliges Karzinom, Plattenepithelkarzinom, Schweißdrüsenkarzinom, Übergangsepithelkarzinom und Schlauchzellenkarzinom. Beispiele von Sarkomen umfassen amelioblastisches Sarkom, Psammom, Sarcoma botryoides, Stromasarkom des Endometriums, Ewing-Sarkom, Spindelzellsarkom, Riesenzellsarkom, Granulozytäres Sarkom, Immunoblastisches Sarkom, juxtakortikales (engl.: juxaccordial) Osteosarkom, Sarkom der Wurzelzellen, Leukozytensarkom (auch bekannt als Leukämie), lymphatisches Sarkome (auch bekannt als Lymphosarkom), medulläres Sarkom, Myeloidsarkom (auch bekannt als granulozytäres Sarkom), osteogenes Sarkom, Sarkome der Knochenhaut, Retikulumzellensarkom (auch bekannt als histinzytäres Lymphom), Rundzellensarkom, Spindelzellsarkom, Synovialissarkom, und telangiektatisches audiogenes Sarkom. Beipiele von Lymphomen umfassen die Hodgkinsche Krankheit and lymphozytäre Lymphome, wie beispielsweise Burkitt-Tumore, noduläre undifferenzierte lymphozytische (NPDL), noduläre gemischte lymphozytische (NML), NH (nodulär histiozytische) und diffuse Lymphome. Weitere Karzinome umfassen Neuroblastom, Glioblastom, Astrozytom, Melanom, Leiomyosarkom, multiples Myelom und Hämangiom.

[0067] Ein Tripeptidaldehyd-Proteaseinhibitor (Benzyloxycarbonyl(Z)-Leu-Leu-Leucinal) induziert das Wachstum von Neuriten in PC12-Zellen bei einer optimalen Konzentration von 30 nM, Tsubuki et al., Biochem. And Biophys. Res. Comm. (1993) 196: 1195–1201. Es ist gezeigt worden, dass Peptidaldehyde die chymotryptische Aktivität des Proteasoms inhibieren. Vinitsky et al., 1992, Tsubuki et al., 1993. Eine Ausführungsform der Erfindung ist die Verwendung der offenbarten Verbindungen zur Herstellung eines Medikaments zur Verwendung in einem Verfahren zur Förderung des Neuritenwachstums, wobei das Verfahren das Verabreichen einer wirksamen Menge einer Verbindung einer hierin offenbarten Formel an die Person einschließt.

[0068] Schließlich sind die offenbarten Verbindungen auch nützlich als Diagnosemittel (z. B. in Diagnosekits oder für den Einsatz in klinischen Laboratorien) um nach Proteinen zu suchen (z. B. Enzymen, Transkriptionsfaktoren), die von dem Proteasom verarbeitet werden. Die offenbarten Verbindungen sind ebenfalls nützlich als Reagenzien für die Forschung, um spezifisch an die X/MB1-Untereinheit oder die α-Kette zu binden und die damit verbundenen proteolytischen Aktivitäten zu inhibieren. So kann zum Beispiel die Aktivität (und spezifische Inhibitoren dafür) von anderen Untereinheiten des Proteasoms ermittelt werden.

[0069] Die meisten zellulären Proteine sind während der Reifung oder Aktivierung proteolytischer Verarbeitung unterworfen. Lactacystin kann verwendet werden, um zu ermitteln, ob ein zellulärer, Entwicklungs- oder physiologischer Prozess oder ein Ausstoss durch die proteolytische Aktivität des Proteasoms reguliert wird. Ein solches Verfahren schließt es ein, einen Organismus, eine Zubereitung intakter Zellen oder einen Zellextrakt zu beschaffen; den Organismus, die Zubereitung intakter Zellen oder den Zellextrakt einer Verbindung einer hierin offenbarten Formel auszusetzen; den ausgesetzten Organismus, die Zubereitung intakter Zellen oder den Zellextrakt einem Signal auszusetzen, und den Prozess oder den Ausstoss zu beobachten. Die hohe Selektivität der hierin offenbarten Verbindungen erlaubt eine schnelle und genaue Feststellung, ob das Proteasom an einem gegebenen zellulären, Entwicklung- oder physiologischen Prozess beteiligt ist oder nicht.

[0070] Die Verbindungen und Zusammensetzungen der Erfindung sind nützlich zur Herstellung eines Medikaments zur Verwendung in verschiedenen Verfahren einschließlich eines Verfahrens zur Behandlung von Entzündungen, das die Verabreichung einer entzündungshemmend wirkenden Menge einer hierin beschriebenen pharmazeutischen Zusammensetzung (z. B. ein Lactacystinthioester, ein Lacton oder ein Lactam) an eine Person einschließt, wobei die Entzündung in Verbindung steht mit einer Verletzung oder einer Infektion; wobei die Entzündung in Verbindung steht mit einer Allergie oder Asthma; wobei die Entzündung in Verbindung steht mit einem Krankheitszustand ausgewählt aus rheumatoider Arthritis, Sklerodermie, rheumatischem Fieber, entzündlichen Unterleibskrankheiten, Diabetes mellitus, Myasthenia gravis, Multipler Sklerose, Guillain-Barre-Syndrom, Konjunktivitis des Auges, systemischem Lupus erythematosus, Enzephalitis, akutem progressivem Lungenversagen, Emphysem, Alzheimerscher Krankheit und Muskeldystrophie; wobei die Entzündung in Zusammenhang steht mit einer Transplantation von Knochenmark oder einem festen Organ ausgewählt aus Niere, Lunge, Herz, Pankreas, Leber und Haut, und die Zusammensetzung in den genannten Verfahren vor, während oder nach der Transplantation verabreicht wird; wobei die pharmazeutische Zusammensetzung oral verabreicht wird; oder Kombinationen davon.

[0071] Die Erfindung stellt ebenfalls die Verwendung der offenbarten Verbindungen zur Herstellung eines Medikaments zur Verwendung in einem Verfahren zur Behandlung von Krebs bereit, das die Verabreichung einer gegen Krebswachstum wirkenden Menge einer hierin beschriebenen pharmazeutischen Zusammensetzung an eine Person einschließt; die Verwendung der offenbarten Verbindungen zur Herstellung eines Medikaments zur Verwendung in einem Verfahren zur Behandlung von Psoriasis, das die Verabreichung einer wirksamen

Menge einer hierin beschriebenen pharmazeutischen Zusammensetzung an eine Person einschließt; und die Verwendung der offenbarten Verbindungen zur Herstellung eines Medikaments zur Verwendung in einem Verfahren zur Behandlung von Restenose, das die Verabreichung einer wirksamen Menge einer hierin beschriebenen pharmazeutischen Zusammensetzung an eine Person einschließt. Bevorzugte Verbindungen und Zusammensetzungen umfassen verschiedene Lactacystinthioester und Lactacystin-β-lacton-Analoga, einschließlich des β-Lactons selbst.

Formulierung und Verabreichung

[0072] Die Verwendungen der aus den Verbindungen der vorliegenden Erfindung hergestellten Medikamente zieht die Behandlung von Tieren, wie beispielsweise Säugetieren (z. B. höheren Primaten und insbesondere Menschen) in Erwägung. Die Erfindung schließt pharmazeutische Zusammensetzungen ein, die hierin beschriebene neuartige Verbindungen enthalten und pharmazeutische Zusammensetzungen die Verbindungen enthalten, die hierin beschrieben sind und deren Wirkung als Proteasominhibitoren hierin erstmals erkannt wurde, wie beispielsweise Lactacystin.

[0073] Pharmazeutisch annehmbare Salze können zum Beispiel gebildet werden mit 1, 2, 3, oder mehr Äquivalenten Chlorwasserstoff, Bromwasserstoff, Trifluoressigsäure und anderen dem Fachmann auf dem Gebiet der Wirkstoffformulierung bekannten Substanzen. Erfindungsgemäße Verbindungen können zu pharmazeutischen Zusammensetzungen formuliert werden durch Vermischen mit pharmazeutisch annehmbaren ungiftigen Vehikeln und Trägern. Eine erfindungsgemäße pharmazeutische Zusammensetzung kann mehr als eine erfindungsgemäße Verbindung enthalten und/oder kann auch andere therapeutische Verbindungen enthalten, die nicht erfindungsgemäß sind, wie beispielsweise gegen Entzündungen wirksame, gegen Krebs wirksame oder andere Agenzien. Ein Patient kann mehr als eine Art von Entzündung oder mehr als eine Art von Krebs haben, eine Kombination von Allergien oder eine Mischung der obengenannten Zustände, gegen die die offenbarten Verbindungen von Nutzen sind. Eine erfindungsgemäße Verbindung kann in Dosiseinheiten verabreicht werden und kann durch irgendeine der auf dem Gebiet der Pharmazie wohlbekannten Methoden hergestellt werden, zum Beispiel, wie in Remington's Pharmaceutical Sciences (Mack Pub. Co., Easton, PA, 1980) beschrieben. Die Erfindung umfasst auch ein verpacktes Medikament, das eine pharmazeutische Zusammensetzung enthält, die zu einzelnen Dosen formuliert ist, und gedruckte Anweisungen für die Selbstapplikation enthält.

[0074] Verbindungen, die hierin als Proteasominhibitoren offenbart sind, können für die Verwendung zur parenteralen Verabreichung in Form von Lösungen oder flüssigen Suspensionen hergestellt werden; für die orale Verabreichung (bevorzugt) insbesondere in Form von Tabletten oder Kapseln; oder intranasal, insbesondere in Form von Pulvern, Gelen, öligen Lösungen, Nasentropfen, Aerosolen oder Nebeln. Formulierungen für parenterale Verabreichung können als übliche Vehikel steriles Wasser oder sterile physiologische Kochsalzlösung, Polyalkylenglykole wie beispielsweise Polyethylenglykol, Öle pflanzlichen Ursprungs, hydrierte Naphthaline und ähnliches enthalten. Kontrollierte Freisetzung einer erfindungsgemäßen Verbindung kann zum Teil durch die Verwendung von biokompatiblen, biologisch abbaubaren Lactidpolymeren und Copolymeren von Lactid/Glycolid oder Polyoxyethylen/ Polyoxypropylen erreicht werden. Weitere parenterale Verabreichungssysteme umfassen Teilchen aus Ethylvinylacetatcopolymer, osmotische Pumpen, implantierbare Infusionssysteme und Liposomen. Formulierungen zur Verabreichung durch Inhalation enthalten Lactose, Polyoxyethylen-9-laurylether, Glykocholat oder Desoxycholat. Formulierungen für die bukkale Verabreichung können Glykocholat enthalten; Formulierungen für die vaginale Verabreichung können Zitronensäure enthalten.

[0075] Die Konzentration einer offenbarten Verbindung in einer pharmazeutisch annehmbaren Mischung wird abhängig von verschiedenen Faktoren variieren, einschließlich der Dosierung der zu verabreichenden Verbindung, den pharmakokinetischen Charakteristika der verwendeten Verbindung (en) und dem Verabreichungsweg. Im Allgemeinen können die erfindungsgemäßen Verbindungen zur parenteralen Verabreichung in wässriger physiologischer Pufferlösung, die etwa 0,1–10 % (Gewicht pro Volumen) der Verbindung enthält, bereitgestellt werden. Typische Bereiche für Dosierungen betragen von etwa 0,1 bis etwa 50 mg/kg Körpergewicht pro Tag, die in 1–4 Teildosen verabreicht werden. Jede Teildosis kann dieselben oder unterschiedliche erfindungsgemäße Verbindungen enthalten. Die Dosierung wird eine wirksame Menge sein, die von verschiedenen Faktoren abhängt, einschließlich dem Allgemeinzustand des Patienten und der Formulierung und dem Verabreichungsweg der ausgewählten Verbindung(en).

[0076] Die wirksame Menge der aktiven Verbindung, die erfindungsgemäß eingesetzt wird zur Behandlung von Zuständen, die direkt oder indirekt durch das Proteasom vermittelt werden, variiert abhängig von der Art der Verabreichung, dem Alter und dem Körpergewicht des Patienten und dem Zustand der zu behandelnden

Person und wird letztendlich von dem behandelnden Human- oder Veterinärmediziner festgelegt werden. Die Menge der aktiven Verbindung, die durch den behandelnden Human- oder Veterinärmediziner festgelegt wird, wird hierin als „wirksame Menge" bezeichnet.

[0077] Ohne weitere Ausführungen zu machen, wird angenommen, dass der Fachmann auf der Grundlage der vorliegenden Beschreibung in der Lage ist, die vorliegende Erfindung in ihrem vollsten Umfang zu benutzen. Die nachfolgenden speziellen Beispiele sollen daher lediglich als Verdeutlichungen und nicht als Beschränkung der übrigen Beschreibung in irgendeiner wie auch immer gearteten Hinsicht verstanden werden.

Beispiele

Beispiel 1

Synthese von [^{3}H] -Lactacystin

[0078] Lactacystin wurde aus dem β-Lacton hergestellt, das durch eine Sequenz von Oxidation und Reduktion tritiiert wurde. Unmarkiertes β-Lacton wurde an C9 mit dem Dess-Martin Periodinan in Dichlormethan zum Keton oxidiert und dann mit [^{3}H]$NaBH_4$ (NEN, 13,5 Ci/mmol) in 1,2-Dimethoxyethan/1% H_2O reduziert, wodurch tritiiertes β-Lacton zusammen mit dessen C9-Epimer (im Verhältnis 2:3) erhalten wurde. Die isomeren β-Lactone wurden mittels HPLC (Rainin Microsorb SiO_2 Säule, 4,6 × 100 mm, 10% i-PrOH in Hexan) getrennt und einzeln mit N-Acetylcystein (0,5 M) und Et_3N (1,5 M) in CH_3CN umgesetzt, wodurch das Lactacystin (9S) und dessen C9-Epimer (9R) erhalten wurden, die aus ihrem jeweiligen Reaktionsmischungen durch Umkehrphasen-HPLC (TSK ODS-80T_m Säule, 4,6 × 250 mm, 10% CH_3CN/0,1% CF_3CO_2H in H2O) in gereinigter Form erhalten wurden.

Beispiel 2

Fluorographie von rohen Zell- und Gewebeextrakten

[0079] Rohextrakte von Neuro 2A (~11 µg Gesamtprotein/Bande) und Rohextrakte von Rinderhirnzellen (~54 µg Gesamtprotein/ Bande) wurden wie folgt behandelt: (1) 10 µM [^{3}H]-Lactacystin; (2) 10 µM [3H]-Lactacystin und 1mM kaltes Lactacystin; (3) 10 µM [^{3}H]-Lactacystin; (4) 10 µM (^{3}H]-Lactacystin und 1mM kaltes Lactacystin; (5) 10 µM [^{3}H]-Lactacystin und 1mM kaltes β-Lacton; (6) 10 µM [^{3}H]-Lactacystin und 1mM kaltes Phenylacetyl-Lactacystin; (7) 10 µM [^{3}H]-Lactacystin und 1mM kaltes Lactacystinamid; (8) 10 µM [^{3}H]-Lactacystin und 1mM kalte Dihydroxysäure; (9) 10 µM [^{3}H]-Lactacystin und 1mM kaltes 6-Desoxylactacystin; (10) 10 µM [^{3}H]-Lactacystin und 1mM kaltes (6R, 7S)-Lactacystin (6-epi, 7-epi); (11) 10 µM [^{3}H]-Lactacystin und 1mM kaltes Des(hydroxyisobutyl)lactacystin. Rohextrakte aus Neuro 2A Neuroblastomzellen oder Rinderhirn wurden in Gegenwart von 10 µM [^{3}H]-Lactacystin in. Gegenwart oder Abwesenheit von 1mM kaltem Kompetitor (gleichzeitig zugegeben) 24 h lang bei Raumtemperatur inkubiert, gefolgt von Elektrophorese über SDS-Polyacrylamidgel. (0,75 mm dickes 12%iges Polyacrylamidgel). Das Gel wurde angefärbt in 0,1% Coomassie Brillantblau R-250, 12% Essigsäure, 50% MeOH und dann entfärbt in 12% Essigsäure, 50% MEOH, gefolgt von Imprägnierung mit EN^{3}HANCE (NEN) und Ausfällung des Fluors mit Wasser. Das Gel wurde auf Whatman Filterpapier in einem Geltrockner bei 65 °C 30 min lang getrocknet und dann bei –78 °C mit Kodak SB Film in Kontakt gebracht.

Beispiel 3

Abtrennung von gereinigtem Proteinkomplex (20S Proteasom)

[0080] Rinderhirn wurde in flüssigem N_2 eingefroren. Insgesamt zwei kg Hirn wurde in einem Waring-Blender 1 Minute lang trocken homogenisiert. Alle Arbeitsschritte wurden bei 4 °C durchgeführt, sofern nichts anderes angegeben ist. Dann wurde der folgende Puffer (insgesamt 6 Liter) zugegeben (pH 7,7): 18, 25 mM K_2HPO_4, 6,75 mM KH_2PO_4, 0,27 M Saccharose, 2 mM EDTA, 2 mM EGTA, 25 mM NaF, 5 mM Tetranatriumpyrophosphat, jeweils 5 µg/ml Leupeptin und Pepstatin A, und 5 mM β-Mercaptoethanol. Das Gewebe wurde im Waring-Blender zwei Minuten lang nass homogenisiert. Das Homogenisat wurde 15 min lang bei 5000 g und dann 30 min lang bei 12000 g zentrifugiert. Zum Überstand wurde Ammoniumsulfat gegeben, bis 50% der Sättigungskonzentration erreicht waren, und die Probe wurde 20 min lang bei 10000 g zentrifugiert. Die zu 50–60% mit Ammoniumsulfat gesättigte Fraktion, die die Lactacystin-bindende Aktivität enthielt, wie durch SDS-PAGE und Fluorographie von Proben ermittelt worden war, die zuvor mit radioaktiven Verbindungen inkubiert worden waren, wurde dann über Nacht gegen 20 mM MES-NaOH, pH 5,6, 5 mM β-Mercaptoethanol dialysiert, gefolgt

von Chromatographie über SP-Sepharose (Pharmacia SP-Sepharose, fast flow, Säule mit 120 ml Bettvolumen) mit 20 mM MES-NaOH, pH 5,6, 5 mM β-Mercaptoethanol und einem NaCl-Gradienten von 0–0,3 M (500 ml Gradient; Durchflussrate = 2 ml/min).

[0081] Nachdem die relevanten Fraktionen vereinigt und verdünnt worden waren, wurde der pH mit 1 M Tris-HCl, pH 8 auf einen Wert von 8 eingestellt. Chromatographie über Q-Sepharose (Pharmacia Q-Sepharose, fast flow, Säule mit 16 ml Bettvolumen) wurde mit 20 mM Tris-HCl, pH 8, 5 mM β-Mercaptoethahol und einem NaCl-Gradienten von 0–0,5 M (120 ml Gradient; Durchflussrate = 1 ml/min) durchgeführt. Die relevanten Fraktionen wurde vereinigt, eingeengt und dann über eine Gelfiltrationssäule mit Pharmacia Superose 6 (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8, 5 mM β-Mercaptoethanol, Durchflussrate 0,5 ml/min) geleitet, wobei die Lactacystinbindende Aktivität einem einzigen Maximum mit hohem Molekulargewicht entsprach. Dieses Maximum wurde isoliert und 24 h lang bei 25 °C mit 10 μM [^{3}H]-Lactacystin oder 10 μM [^{3}H]-β-Lacton behandelt. Trifluoressigsäure (TFA) wurde bis zu einer Konzentration von 0,1% zugegeben und die Probe wurde 20 min lang bei Raumtemperatur stehen gelassen. Dann wurde bei Raumtemperatur unter Verwendung einer Vydac C4 Säule (300 Å/4,6 × 150 mm) Umkehrphasen-HPLC durchgeführt, 10 min lang mit 20–40% Acetonitril/0,1% TFA und dann 30 min lang mit 40–55% Acetonitril/0,1% TFA (Durchflussrate = 0,8 ml/min). Ein IN/US β-RAM in-line Szintillationsdetektor wurde verwendet, um die Radioaktivität zu beobachten.

[0082] Die Lactacystin-bindenden Proteine wurden aus Rinderhirn in gereinigter Form isoliert und es wurde durch Gelfitrationschromatographie ermittelt, dass beide sich in demselben Proteinkomplex mit hohem Molekulargewicht befinden. Behandlung des Komplexes mit [^{3}H]-Lactacystin führte nicht zu dessen Dissoziation und die Radioaktivität wanderte ausschließlich gemeinsam mit dem Komplex weiter. Das Molekulargewicht des Komplexes wurde zu 700 kDa abgeschätzt, und SDS-PAGE zeigte, dass er aus einer Vielzahl von Proteinen mit Molekularqewichten von ~24-34 kDa bestand. Edman-Abbau von geblottetem Protein ließ die Sequenzen von verschiedenen Proteasom-Untereinheiten im 24 kDa Band erkennen und führte zu einer vorläufigen Identifizierung des Komplexes als das 20S Proteasom. Nachdem der Komplex mit [^{3}H]-Lactacystin behandelt worden war und Umkehrphasen-HPLC unterzogen worden war, um die Proteasom-Untereinheiten aufzutrennen, wurden elf bis zwölf deutliche Maxima aufgelöst. Allerdings war die Radioaktivität ausschließlich mit den ersten beiden Maxima verbunden, und vorwiegend mit dem zweiten Maximum. Aufgrund der Ergebnisse des Anfärbens von SDS-Polyacrylamidgelen mit Coomassie-Blau und der Sequenzierung tryptischer Fragmente wurden diese beiden ersten Fragmente als homogen bewertet, während einige der anschließend eluierenden, größeren Maxima eindeutig nicht homogen waren. Das Verhältnis der im ersten Maximum und im zweiten Maximum enthaltenen Radioaktivität variierte in Abhängigkeit von der Proteincharge, der Dauer der Inkubation und dem Liganden. Das erste Maximum wird langsamer markiert und das Ausmaß der Markierung des ersten Maximums im Verhältnis zum zweiten ist mit [^{3}H]-Lactacystin zu jedem Zeitpunkt größer als mit dem [^{3}H]-β-Lacton. Nach einer ein- oder zweistündigen Reaktion mit dem [^{3}H]-β-Lacton ist das erste Maximum nur in Spuren markiert, während eine 24 stündige Reaktion mit [^{3}H]-β-Lacton oder [^{3}H]-Lactacystin zu signifikanter Markierung dieses Maximums führt. Die Selektivität verhält sich umgekehrt zur relativen chemischen Reaktivität der beiden Verbindungen und dieses Resultat legt nahe, dass die N-Acetylcysteineinheit von Lactacystin die Erkennung durch dieses sekundäre Protein erleichtern könnte. Das zuerst aus der Umkehrphasen-HPLC-Säule eluierende Maximum enthielt nur ein ~32 kDa Protein, das dem früher identifizierten Lactacystin-bindenden 32 kDa Sekundärprotein entsprach.

Beispiel 4

Aminosäurensequenz von gereinigten Lactacystin-bindenden Rinderproteinen

[0083] Gereinigtes 20S Proteasom (gereinigt wie in Beispiel 3 beschrieben) wurde 24 h lang bei Raumtemperatur mit 10 μM Lactacystin in 10 mM Tris-Hcl, 1 mM EDTA (pH 8) inkubiert. Die Lösung wurde dann zehnfach verdünnt mit 20%igem wässrigen Acetonitril, das 0,1% Trifluoressigsäuere (TFA) enthielt und 5 min lang bei Raumtemperatur stehen gelassen. Dann wurde bei Raumtemperatur unter Verwendung einer Vydac C4 Säule (100 Å/4,6 × 150 mm) Umkehrphasen-HPLC durchgeführt, 10 min lang mit 20–40% Acetonitril/0,1% TFA und dann 30 min lang mit 40–55% Acetonitril/0,1% TFA, um die Proteasom-Untereinheiten zu eluieren (Durchflussrate = 0,8 ml/min). Die Maxima wurden auf Basis der Absorption von ultraviolettem Licht bei 210 und 280 nm gesammelt, wobei das primäre Lactacystin-modifizierte Protein als zweites aus der Säule eluiert wurde und das sekundäre Lactacystinmodifizierte Protein als erstes. Die aus wiederholten Einspritzungen stammenden Proteine wurden vereinigt, lipophilisiert und nach tryptischer Digestion und Trennung der tryptischen Fragmente durch Umkehrphasen-HPLC dem Edman-Abbau unterworfen. Der mutmaßlich mit Lactaystin modifizierte

Rückstand wurde dadurch identifiziert, dass zu einer mit unmarkiertem Lactacystin behandelten Probe aus mit [^{3}H]-Lactacystin behandeltem Proteasom isolierte X/MB1-Untereinheit gegeben wurde und dann radioaktive tryptische Fragmente isoliert und sequenziert wurden. In einer Position konnte das Derivat der Phenylthiohydantoin-Aminosäure nicht identifiziert werden, was auf eine mögliche Modifizierung des Rückstands hindeutet.

[0084] Durch direkte N-terminale Sequenzierung und durch Sequenzierung von aus dem primärem Lactacystin-bindenden Rinderprotein gewonnenen tryptischen Fragmenten erhaltene Sequenzen stimmten mit den Sequenzen der menschlichen Proteasom-Untereinheit X (aus dem cDNA Klon vorhergesagt) und des menschlichen LMP7-E2 (aus dem das Exon 2 enthaltenden cDNA Klon vorhergesagt) überein. Sequenz 1 (aus direkter N-terminaler Sequenzierung) stimmt ebenfalls überein mit Sequenzen von Saccharomyces cerevisiae Pre-2 (aus dem Genomklon vorhergesagt) und der β-Untereinheit von Thermoplasma acidophilum (aus dem geklonten Gen vorhergesagt). Das N-terminale Heptapeptid entspricht dem tryptischen Fragment, das einen Lactacystin-modifizierten N-terminalen Threoninrest zu enthalten scheint. Das Threonin an dieser Stelle entspricht auch den vermuteten N-Termini der reifen, verarbeiteten Formen von allen aufgeführten Homologen. Großbuchstaben bezeichnen mit hoher Zuverlässigkeit zugeordnete Sequenzen, während kleine Buchstaben weniger sichere Zuordnungen anzeigen.

Tabelle 1

DIREKTE N-TERMINALE SEQUENZEN

1. Direkte N-terminale Sequenz von primärem Lactacystin-bindendem Rinderprotein TTLAFKFRHggIIA SEQ ID NO: 1

Menschliche Untereinheit X/MB1

5 TTTLAFKFRHGVIVA 19 SEQ ID NO: 2

Menschliches LMP7-E2 74 TTTLAFKFQHGVIAA 88 SEQ ID NO: 3

S. cerevisiae Pre-2 76 TTTLAFRFQGGIIVA 90 SEQ ID NO: 4

T. acidophilum β-Untereinheit

9 TTTVGITLKDAVIMA 23 SEQ ID NO: 5

2. Primäres Lactacystin-bindendes Rinderprotein

DAYSGGSVSLY SEQ ID NO: 6

Menschliche Untereinheit X

171 DAYSGGAVNLYHVR 184 SEQ ID NO: 7

Menschliches LMP7-E2

239 DSYSGGVVNMYHMK 252 SEQ ID NO: 8

3. Primäres Lactacystin-bindendes Rinderprotein

VIEINPYLLGTMAGGAADCSF SEQ ID NO: 9

Menschliche Untereinheit X

38 VIEINPYLLGTLAGGAADCQFWER 61 SEQ ID NO: 10

Menschliches LMP7-E2

106 VIEINPYLLGTMSGCAADCQYWER 129 SEQ ID NO: 11

4. Primäres Lactacystin-bindendes Rinderprotein

GYSYDLEVEEAYDLAR SEQ ID NO: 12

Menschliche Untereinheit X

146 GYSDLEVEQAYDLAR 161 SEQ ID NO: 13

Menschliches LMP7-E2

214 GYRPNLSPEEAYDLGR 229 SEQ ID NO: 14

[0085] Sequenzen von tryptischen Fragmenten, die aus dem sekundären Lactacystin-bindenden Protein gewonnen wurden, stimmten überein mit der Sequenz des N-terminalen Fragments der α-Kette des menschlichen Erythrozyten-Proteasoms und der Kette des Rattenleber-Proteasoms.

Tabelle 2

SEQUENZEN TRYPTISCHER FRAGMENTE

Sekundäre Lactacystin-bindende Aktivität des Rinderproteins
TTIAGVVYK DGIVLGADTR SEQ ID NO: 15
α-Kette des menschlichen Erythrozyten-Proteasoms
1 XXIAGVVYK DGIVLGADTR 19 SEQ ID NO: 16
Kette 1 des Rattenleber-Proteasoms
1 TTIAGVVYK DGI 12 SEQ ID NO: 17

[0086] Sequenzanalyse von aus diesem Protein gewonnenen tryptischen Fragmenten zeigte, dass es homolog ist zu der α-Kette des Proteasoms, einem ~30 kDa Protein, das in gereinigtem menschlichen Erythrozyten-Proteasom und in Rattenleber-Proteasom, für das lediglich die Sequenz eines N-terminalen Fragments existiert, identifiziert wurde. Das zweite eluierte Maximum enthielt lediglich ein ~24 kDa Protein, das primäre Lactacystin-bindende Protein. Die Sequenz des N-Terminus des Proteins und von daraus gewonnenen tryptischen Fragmenten zeigte große Übereinstimmung mit der kürzlich entdeckten Untereinheit X des 20S Proteasoms, auch bekannt als MB1, ein Homologes der vom Haupthistokompatibilitätskomplexes (MHC) kodierten Proteasom-Untereinheit LMP7.

Beispiel 5

Kinetik der Inhibition von Peptidaseaktivitäten des 20S

Proteasoms

[0087] Das Proteasom involvierende Experimente wurden wie folgt durchgeführt: 20S Proteasom (~5 ng/µl) in 10 mM Tris-HCl, pH 7,5, 1 mM EDTA wurde bei 25 °C in Gegenwart von Lactacystin oder Lactacystin-Analoga in DMSO oder MeOH [nicht mehr als 5 Volumenprozent] inkubiert. Teilproben für das Fluoreszenzassay wurden zu verschiedenen Zeitpunkten nach Zugabe der Verbindung entnommen und verdünnt mit 10 mM Tris-HCl, pH 7,5, 1 mM EDTA, das fluorogene Peptidsubstrate enthielt (100 µM Endkonzentration). Suc-LLVY-AMC, Cbz-GGR-βNA und Cbz-LLE-βA (AMC = 7-Amido-4-methylcumarin; βNA = β-Naphthylamid) wurden für die Untersuchung auf chymotrypsinartige, trypsinartige und Peptidylglutamylpeptidhydrolysierende Aktivität eingesetzt.

[0088] Biologische Aktivität einer Verbindung bezieht sich auf die Fähigkeit der Verbindung, Neuritenwachstum in Neuro 2A Neuroblastomzellen zu induzieren und das Fortschreiten des Zellzyklus in MG-63 Osteosarkomzellen zu inhibieren.

Tabelle 3

Kinetik der Inhibition

		$K_{assoc} = K_{obs}/[I]$ $(s^{-1}M^{-1})$		
Verbindung (Konzentration)	Biologische Aktivität der Verbindung	Chymotrypsin-artige Aktivität (Suc-LLVY-AMC)	Trypsinartige Aktivität (Cbz-GGR-βNA)	Peptidylglutamyl-peptidhydrolysierende Aktivität (Cbz-LLE-βNA)
Lactacystin (10 µM)	+	194 ± 15	10,1 ± 1,8	
Lactacystin (100 µM)	+			4,2 ± 0,6
β-Lacton (1 µM)	+	3059 ± 478		
β-Lacton (5 µM)	+		208 ± 21	
β-Lacton (50 µM)	+			59 ± 17
Dihydroxysäure (100 µM)	-	keine Inhibition	Keine Inhibition	keine Inhibition
Lactacystinamid (12,5 µM)	+	306 ± 99		
Phenylacetyllactacystin (12,5 µM)	+	179 ± 19		
6-Desoxylactacystin (12,5 µM)	-	keine Inhibition		
(6R,7S)Lactacystin (6-epi,7epi)(12,5 µM)	-	keine Inhibition		
Des(hydroxyisobutyl)-lactacystin (12,5 µM)	-	keine Inhibition		

Beispiel 6

Selektivität der Proteaseinhibition

[0089] Die anderen Proteasen involvierende Experimente wurden analog zu Beispiel 5 durchgeführt, mit dem Unterschied, dass folgende Puffer für die Inkubation mit Lactacystin verwendet wurden: α-Chymotrypsin: 10 mM Tris-HCl, pH 8, 1 mM EDTA (plus 100 µM Suc-LLVY-AMC für das Fluoreszenzassay); Trypsin: 10 mM Tris-HCl, pH 8, 20 mM $CaCl_2$ (plus 100 µM Cbz-GGR-βNA für das Assay); Calpain I: 20 mM Tris-HCl, pH 8, 1 mM $CaCl_2$, 1 mM DTT (plus 100 µM Suc-LLVY-AMC für das Assay); Calpain II: 20 mM Tris-HCl, pH 8, 10 mM $CaCl_2$, 1 mM DTT (plus 100 µM Suc-LLVY-AMC für das Assay); Papain: 50 mM MES-NaOH, pH 6,4, 1 mM DTT (plus 100 µM Cbz-RR-AMC für das Assay); Kathepsin B: 100 mM KH_2PO_4, pH 5,5, 2 mM EDTA, 1 mM DTT (plus 100 µM Cbz-RR-AMC für das Assay). An AMC enthaltenden Substraten wurde Fluoreszenzemission bei 460 nm mit Anregung bei 380 nm gemessen und für βNA enthaltende Substrate Emission bei 410 nm mit Anregung bei 335 nm. Die Fluoreszenzassays wurden bei 25 °C durchgeführt, jedes Experiment wurde mindestens dreimal durchgeführt und die Werte stellen die mittlere ± Standardabweichung dar.

Tabelle 4

Inhibition anderer Proteasen

Untersuchte Protease	Effekt von Lactacystin (100 µM)
α-Chymotrypsin	keine Inhibition
Trypsin	keine Inhibition
Calpain I	keine Inhibition
Calpain II	keine Inhibition
Papain	keine Inhibition
Kathepsin B	keine Inhibition

[0090] Die Effekte von Lactacystin und des β-Lactons auf Peptidaseaktivitäten des Proteasoms wurden unter Verwendung von fluorogenen Peptidsubstraten untersucht. Alle drei Peptidaseaktivitäten wurden inhibiert, irreversibel im Fall der trypsinartigen und der chymotrypsinartigen Aktivitäten und reversibel im Fall der PGPH-Aktivität. Die scheinbare Geschwindigkeitskonstante zweiter Ordnung für die Assoziation jedes Inhibitors mit dem Enzym, k_{assoc}, wurde für jede der Aktivitäten bestimmt (Tabelle 1A). Lactacystin inhibiert die chymotrypsinartige Aktivität am schnellsten (k_{assoc} = 194 ± 15 $M^{-1}S^{-1}$), die trypsinartige Aktivität 20 Mal langsamer und die PGPH Aktivität 50 Mal langsamer. Die Tatsache, dass die Inhibitionskinetik für die drei Aktivitäten unterschiedlich ist, unterstützt die Vermutung, dass die Aktivitäten auf unterschiedliche aktive Zentren zurückgehen. Das β-Lacton zeigt die gleiche Rangfolge, aber inhibiert jede Aktivität 15–20 Mal schneller als Lactycystin selbst dies tut, in Übereinstimmung mit der erwarteten größeren chemischen Reaktivität des β-Lactons. Es ist auch möglich, dass der Lactacystin-Thioester nach anfänglicher Bindung an das Proteintarget in einem geschwindigkeitsbestimmenden Schritt zum β-Lacton zyklisiert wird, das als ein aktiviertes Zwischenprodukt für den Angriff durch das Nucleophil dient.

[0091] Die Reversibilität der Inhibitorwirkungen wurde untersucht, indem die restliche Peptidaseaktivität nach der Entfernung von überschüssigem Inhibitor durch extensive Verdünnungsreihen und Ultrafiltration gemessen wurde. Die trypsinartigen und chymotrypsinartigen Aktivitäten waren in den mit Lactacystin behandelten Proben nach Verdünnung und Ultrafiltration immer noch vollständig inhibiert, was einen sehr niedrigen k_{off} des Inhibitors vom Enzym impliziert, während Kontrollproben, die nicht mit dem Inhibitor behandelt worden waren, ihre Aktivität beibehielten (Daten sind nicht gezeigt). Im Fall der PGPH-Aktivität wurde die Entfernung des Inhibitors von einer Rückkehr der katalytischen Aktivität begleitet; Inhibition der PGPH-Aktivität könnte auf nichtkovalente Anlagerung von Lactacystin an das PGPH-Zentrum zurückzuführen sein oder auf kovalente Anlagerung mit Turnover.

[0092] Wir hatten früher gezeigt, dass die Fähigkeit von Analoga, Neuritenwachstum in Neuro 2A Zellen zu verursachen, sich widerspiegelte in ihrer Fähigkeit, das Fortschreiten des Zellzyklusses in MG-63 Osteosarkomzellen zu inhibieren, und dass Modifikationen an dem γ-Lactamteil des Moleküls beide Aktivitäten beeinträchtigte, während Modifikationen der N-Acetylcysteineinheit nur geringe Auswirkungen hatten [Fenteany, 1994, 3135]. Wir prüften daher die Fähigkeit der Analoga, das 20S Proteasom zu inhibieren, aber da unser Vorrat an diesen Substanzen unzureichend war, um alle drei Aktivitäten zu untersuchen, konzentrierten wir uns auf die chymotrypsinartige Aktivität, die am schnellsten von Lactacystin inhibiert wird. Es zeigten sich dieselben Trends, die auch in den biologischen Studien gefunden worden waren: die biologisch aktiven Verbindungen inhibierten die chymotrypsinartige Aktivität in etwa so gut wie Lactacystin selbst, und die biologisch inaktiven Verbindungen inhibierten diese Aktivität überhaupt nicht (Tabelle 3). Modifikationen des γ-Lactamkerns von Lactacystin verringern seine Wirkung, aber Modifikationen der N-Acetylcysteineinheit tun dies nicht.

Beispiel 7

Untersuchung der Fähigkeit von Lactacystin (β-Lactonform), den von TNF-α abhängigen Abbau von IkB-α in vivo zu blokkieren.

[0093] HeLa-Zellen wurden in DME plus 10% fötalem Kälberserum auf Platten mit 6 Vertiefungen aufgebracht (3ml/Vertiefung). Die Zellen wurden dann eine Stunde lang mit 0,125% DMSO 40 µM G132 (Carboxybenzoxyl-leucinyl-leucinyl-leucinal-H) (40 µM, Banden 103) oder 5 µM β-Lacton vorbehandelt und anschließend mit

1000 U/ml TNF-α oder phosphatgepufferter physiologischer Kochsalzlösung (PBS) behandelt. Die Zellen wurden nach 0 min, 20 min oder 40 min weiterer Inkubation bei 37 °C geerntet. Die Zellen wurden dann in NP-40 und Proteaseinhibitoren enthaltendem Puffer lysiert und die Proteine wurden auf einem 10% SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt. Die Proteine wurden dann auf Nitrozellulose übertragen und mit Antikörpern gegen die C-terminalen 20 Aminosäuren von menschlichem IkB-α getestet.

[0094] Frühere Berichte haben gezeigt, dass dem induzierbaren Abbau von IkB die Phosphorylierung des Proteins vorausgeht.

[0095] (Beg et al., 1993, Mol. Cell. Biol. 13: 3301; Traenckner et al., 1994, EMBO J. 13: 5433; Miyamoto et al., 1994, PNAS 91: 12740; Lin et al., 1995, PNAS 92: 552; DiDonato et al., 1995, Mol. Cell. Biol. 15: 1302; und Alkalay et al., 1995 Mol. Cell. Biol. 15: 1294). Das phosphorylierte IkB wird dann bevorzugt abgebaut, anscheinend durch das Proteasom (Palombella et al., 1994, Cell 78: 773). Die Phosphorylierung ist ersichtlich aus einer Verschiebung in der elektrophoretischen Beweglichkeit von IkB zu geringfügig schwereren Werten. IkB aus mit TNF induzierten Zellen zeigen das erforderliche Muster von Phosphorylierung und allmählichem Abbau. Zellen, die nur mit PBS behandelt wurden, zeigen keine Änderung der Konzentration oder eine Modifizierung von IkB. Wie früher berichtet wurde (Palombella et al., 1994), blockiert der Peptidaldehyd-Proteasominhibitor MG132 den Abbau von IkB und stabilisiert die phosphorylierte Form. Das β-Lacton blockiert ebenfalls den Abbau und stabilisiert die phosphorylierte Form von IkB. Diese Ergebnisse zeigen, dass Lactacystin nicht den von TNF abhängigen Signalstoff-Stoffwechselweg auslöst, der zur Phosphorylierung von IkB führt, sondern den Abbau des Proteins blockiert. Lactacystin inhibiert den Abbau von IkB nach TNF-Induktion von HeLa-Zellen, höchstwahrscheinlich, indem es spezifisch die Wirkung des Proteasoms blockiert.

Beispiel 8

Untersuchung der Wirkung von Lactacystin (β-Lactonform) auf die von dem Proteasom abhängige Verarbeitung von p105 bis p50 in vivo

[0096] COS-Zellen wurden auf 100 mm-Schalen aufgetragen und dann mit DEAE-Dextran entweder scheintransfiziert oder mit 3 µg eines pcDNA-Plasmids, das die menschliche p105 cDNA enthielt, transfiziert. Achtundvierzig Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen 1 Stunde lang vorbehandelt mit 0,5% DMSO, 50 µM Calpaininhibitor II, 50 µg MG132 oder 10 µM β-Lacton. Die Zellen wurden dann 15 Minuten lang mit 250 µCi/Platte ^{35}S-Methionin/Cystein pulsmarkiert und entweder sofort geerntet oder nach 2 Stunden Chase mit überschüssigem unmarkiertem Methionin und Cystein. Die Zellen wurden dann mit SDS/Tris lysiert und die Proteine wurden mit anti-p50 Antikörpern (erkennen die N-terminale Hälfte des p105 Proteins) immunopräzipitiert. Diese Proteine wurden dann auf einem 10% SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt, das anschließend fixiert, getrocknet, und mit einem autoradiographischen Film in Kontakt gebracht.

[0097] Eine Analyse der unmittelbar nach der Pulsmarkierungsphase isolierten Proteine zeigt signifikante Mengen von markiertem p105 Protein und sehr wenig p50. Nach den 2 Stunden Chase waren die Gehalte an p105 verringert und wie erwartet ist eine neue Bande, die dem p50 Protein entspricht, sichtbar (Fan und Maniatis, 1991, Nature 354: 395 Palombella et al., 1994, Cell 78: 773). Vorbehandlung der Zellen mit Calpaininhibitor II hat keine Wirkung auf die Verarbeitung von p105 zu p50 (Bande 4). Jedoch blockiert Vorbehandlung der Zellen mit dem Peptidaldehyd-Proteasominhibitor MG132 vollständig das Auftreten von p50 (Bande 5), wie schon früher berichtet worden ist (Palombella et al., 1994). Niedrige Konzentrationen von β-Lacton (10 µM) haben nur eine geringe Auswirkung auf die Menge an p50, aber höhere Konzentrationen (50 µM) bewirken vollständige Inhibition der Verarbeitung von p105 zu p50. Lactacystin blockiert effizient die von dem Proteasom abhängige Verarbeitung von p105 zu p50 in vivo.

Beispiel 9

Untersuchung des Neuritenwachstums

[0098] Verbindungen werden in der zum Auflösen erforderlichen minimalen Menge Methanol (MeOH) oder Dimethylsulfoxid (DMSO) gelöst. In keinem Assay ist mehr als 0,1% Lösungsmittel enthalten. Wenn nötig, werden die Lösungen vor der Verwendung zur Trockene eingeengt und in Zellkulturmedium auf ihre Endkonzentrationen resuspendiert.

[0099] Neuro 2A-, IMR-32-, PC12- und MG-63-Zellen werden aus der Amerikanischen Typus-Kultursammlung (American Type Culture Collection) bezogen. Neuro 2A- und IMR-32-Zellen werden in 10 Volumenprozent

fötales Kälberserum (FBS) enthaltendem Eagle-Minimalmedium (MEM) kultiviert. PC12-Zellen werden in 10 Volumenprozent Pferdeserum und 5% FBS enthaltendem RPMI 1640 gezüchtet, und MG-63-Zellen werden in 10% RBS enthaltendem RPMI 1640 kultiviert.

[0100] Neuro 2A Zellen werden in einer Dichte von 1×10^4 Zellen pro 1 ml pro Vertiefung auf Polystyrolplatten mit 12 Vertiefungen (Vertiefungen mit 22 mm Durchmesser und flachem Boden) aufgetragen und man lässt sie 24 h lang in MEM mit 10% FBS wachsen, bevor man sie irgendeiner Behandlung unterzieht. In den einschlägigen Experimenten wird Nocodazol, Cytochalasin B oder Cycloheximid 3 h vor der Zugabe von Lactacystin zugegeben. In den Serumdeprivationsexperimenten werden Zellen 24 h nach dem Auftragen auf die Platte auf serumfreies MEM umgestellt und, wenn dies relevant ist, vor der Zugabe von Lactacystin weitere 24 h lang inkubiert und anschließend unter serumfreien Bedingungen gehalten.

Beispiel 10

Zellzyklusanalyse

[0101] MG-63-Zellen werden in einer Dichte von $7{,}5 \times 10^4$ Zellen pro 3 ml pro 25 cm^2-Flasche aufgetragen und man lässt sie 24 h lang in 10% FBS enthaltendem RPMI wachsen. Diese subkonfluenten MG-63 Kulturen werden durch Wechsel des Mediums auf 0,2% FBS enthaltendem MEM und 64 h dauernde Inkubation in der G_0/G_1-Phase synchronisiert. Es folgt Stimulation mit 2 ml 10% FBS enthaltendem RPMI und Zugabe der Verbindungen. Neuro 2A-Zellen werden in 175 cm^2-Flaschen 10% FBS enthaltendem MEM bis zu $\sim 2 \times 10^7$ gezüchtet. Mitotische Zellen werden durch 5 min langes Schütteln auf einem Drehschüttler bei 100 U/min geerntet. Die abgelösten Zellen werden in einer Dichte von $1{,}5 \times 10^5$ Zellen pro 2 ml pro 25 cm^2-Flasche erneut aufgetragen und 30 min lang inkubiert, um das Wiederanhaften zu ermöglichen, bevor Lactacystin zugegeben wird. Zellen für die Zellzyklusanalyse werden im Fall der MG-63-Zellen 21 h nach der Stimulation und im Fall der Neuro 2A-Zellen 20 h nach dem erneuten Auftragen geerntet und wurden dann für die Flusszytometrie verarbeitet. DNA-Histogramme werden erhalten unter Verwendung eines Becton Dickinson FACScan Flusszytometers.

Beispiel 11

Reinigung von 20S Proteasom und Proteasomaktivator PA28

[0102] 20S Proteasom wurde gereinigt mittels einer Modifikation der Verfahren von Hough et al. [Hough, R. et al., (1987) J. Biol. Chem., 262, 8303–8313] und Ganoth et al. [Ganoth, D. et al., (1988) J. Biol. Chem., 263, 12412–12419). PA28 Aktivator wurde gereinigt mittels einer Modifikation der Verfahren von Chu-Ping et.al. [Chu-Ping et al., (1992) J. Biol. Chem., 267, 10515–10523]. Kaninchen-Retikulozyten wurden von Green Hectares (Oregon, WI) bezogen. Die Retikulozyten wurden dreimal gewaschen, indem sie in eiskaltem PBS suspendiert und bei 2000 × g 15 min lang zentrifugiert wurden. Nach der letzten Wäsche wurden die Zellen lysiert in 1,5 Volumina kaltem destilliertem Wasser, das 1 mM DTT enthielt. Die Mischung wurde dann bei einem Druck von 250 psi durch einen Zerstäuber (Glas-CO Bio-Nebulizer) geschickt, um die vollständige Lyse der Zellen sicherzustellen. Das Lysat wurde dann eine Stunde lang bei 100000 × g zentrifugiert, um Zellbruchstücke zu entfernen. Der Überstand (Extrakt) wurde in 20 mM HEPES pH 7,6, 1 mM DTT (Puffer A) eingebracht, durch ein 0,2 µm Filter filtriert und auf eine in Puffer A equilibrierte DE52 Anionentauschersäule aufgebracht. Die Säule wurde mit 5 Volumina Puffer A gewaschen und die absorbierten Proteine wurden mit 2,5 Volumina 500 mM NaCl enthaltendem Puffer A eluiert. Das Eluat (Fraktion II) wurde mit Ammoniumsulfat versetzt, bis 38% der Sättigungskonzentration erreicht waren und 20 Minuten lang bei 10000 × g zentrifugiert. Der Überstand wurde mit Ammoniumsulfat versetzt, bis 85% der Sättigungskonzentration erreicht waren und 20 Minuten lang bei 10000 × g zentrifugiert. Die resultierenden Pellets wurden in einem minimalen Volumen Puffer A resuspendiert und über Nacht gegen 4 l Puffer A dialysiert. Das Dialysat (Fraktion IIB), das sowohl das 20S Proteasom als auch den PA28 Aktivator enthält, wurde auf eine Mono Q Anionentauschersäule gegeben. Die Elution wurde mit einem 40 Säulen Volumengradienten von 0-500 mM NaCl durchgeführt.

20S Proteasom

[0103] Die von der Säule eluierten Fraktionen wurden auf SDS-stimulierte Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-AMC-Hydrolyseaktivität untersucht. Die aktiven Fraktionen wurden vereinigt, auf 50 mM [NaCl] verdünnt und auf eine 1 ml Heparin Sepharose Hi-Trap Säule gegeben. Die Elution wurde mit einem 20 Säulen Volumengradienten von 50 mM–500 mM NaCl durchgeführt. Aktive Fraktionen wurden vereinigt und mittels eines 30000 MWCO Centricon Zentrifugalkonzentrators auf konzentriert. Das Konzentrat wurde auf eine Superose 6 Ausschlusschro-

matographiesäule gegeben und mit 100 mM NaCl enthaltendem Puffer A eluiert. Die aktiven Fraktionen, die aufgrund von SDS-PAGE-Analyse als rein bewertet wurden, wurden vereinigt und bei –80 °C für eine spätere Verwendung aufbewahrt.

PA28

[0104] Die von der Säule eluierten Fraktionen (siehe oben) wurden auf ihre Fähigkeit zur Stimulation der Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-AMC-Hydrolyseaktivität von exogenem 20S Proteasom untersucht. Die aktiven Fraktionen wurden vereinigt und auf 10 mM NaCl verdünnt. Dieses Material wurde dann weiter gereinigt und konzentriert auf einer 1 ml Resource Q Anionentauschersäule mit einem 40 Säulen Volumengradienten von 10–500 mM NaCl. Aktive Fraktionen wurden vereinigt und mittels eines 10000 MWCO Centricon Zentrifugalkonzentrators aufkonzentriert. Das Konzentrat wurde auf eine Superdex 200 Ausschlusschromatographiesäule gegeben und mit 100 mM NaCl enthaltendem Puffer A eluiert. Die aktiven Fraktionen, die aufgrund von SDS-PAGE-Analyse als rein bewertet wurden, wurden vereinigt und bei –80 °C für eine spätere Verwendung aufbewahrt.

Beispiel 12

Deaktivierung von Proteasomaktivität durch Lactacystin

[0105] 2 ml Assaypuffer (20 mM HEPES, 0,5 mM EDTA, pH 8,0) und Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-AMC in DMSO wurden in eine 3 ml Fluoreszenzküvette gefüllt und die Küvette wurde in den ummantelten Zellenhalter eines Hitachi F-2000 Fluoreszenzspektrometers platziert. Die Temperatur wurde durch ein zirkulierendes Wasserbad bei 37 °C gehalten. 0,34 µg Proteasom und 3,5 µg PA28 wurden zugegeben und der Reaktionsfortschritt wurde beobachtet anhand der Zunahme der Fluoreszenz bei 440 nm (λ_{ex} = 380 nm), die die Bildung von freiem AMC begleitet. Die Kurven des Reaktionsfortschritts zeigten eine 1–2 Minuten andauernde Anlaufphase, die auf die langsame Bildung des 20S-PA28-Komplexes zurückzuführen ist. Nachdem sich ein Fließgleichgewichtszustand der Substrathydrolyse eingestellt hatte, wurde Lactacystin bis zu einer Endkonzentration von 1 µM zugegeben und die Reaktion wurde 1 h lang beobachtet. Die Daten für die Fluoreszenz (F) über die Zeit (t) wurden von einem Mikrocomputer mit der Software LAB CALC (Galactic) gesammelt. Die Werte für k_{inact} wurden abgeschätzt durch eine nichtlineare Anpassung der Daten über kleinste Fehlerquadrate an die Gleichung erster Ordnung: $F = A (1 – e^{-kt}) + C$

[0106] Worin $C = F_{t=0}$ und $A = F_{t=\infty} – F_{t=0}$. Aufgrund der komplexen Kinetik der Lactacystinhydrolyse und ihrem Proteasom-Deaktivierungsmechanismus ist die Kinetik der Proteasomdeaktivierung ebenfalls komplex, und diese Tatsache spiegelt sich in der Kurvenanpassung wider. Es gab eine kleine systematische Abweichung der gemessenen Kurven des Reaktionsfortschritts von den am besten angepassten Kurven, die durch Anpassung der Daten an die oben genannte Gleichung erzeugt wurden. Unter Verwendung dieses einfachen Kinetik-Modells wurden Schätzwerte für k_{inact} erhalten.

Beispiel 13

Inhibition von Proteinabbau in C2C12-Zellen

[0107] C2C12-Zellen (eine Zellinie aus Mäusemyoblasten) wurden 48 h lang mit ^{35}S-Methionin markiert. Die Zellen wurden dann gewaschen und 2 h lang in dem gleichen Medium, dem zusätzlich 2 mM unmarkiertes Methionin zugesetzt wurde, vorinkubiert. Das Medium wurde entfernt und durch ein frisches Aliquot des Vorinkubationsmediums ersetzt, das 50% Serum enthielt und einen Gehalt an zu prüfender Verbindung aufwies. Das Medium wurde dann entfernt, ein Gehalt von 10% TCA wurde eingestellt und dann wurde zentrifugiert. Die in TCA lösliche Radioaktivität wurde gemessen. Inhibition der Proteolyse wurde berechnet als prozentuale Verringerung der in TCA löslichen Radioaktivität. Aus diesen Daten wurde für jede Verbindung ein IC_{50}-Wert berechnet. Die Verbindungen können qualitativ in Gruppen der Kategorien ++, + und 0 eingeteilt werden, wobei ++ eine höhere Aktivität als + anzeigt und 0 für geringe oder keine Aktivität steht, was auf Unlöslichkeit, Instabilität oder andere Ursachen zurückzuführen sein kann. Zum Beispiel befanden sich in der Lactacystingruppe die Verbindungen I-1, I-2 und I-3 in der Kategorie ++, Verbindung I-4 befand sich in der Kategorie +. Wendet man sich der P-Serie von lactonartigen Verbindungen zu, so befanden sich P-1 bis P-4 in der Kategorie ++; Verbindungen P-5 und P-6 befanden sich in der Kategorie +; und Verbindung P-7 befand sich in der Kategorie 0.

Beispiel 17

Synthese der Verbindung P-2

[0108] (3S,7aR)-3-Phenyl-5,6,7,7a-tetrahydro-1H-pyrrolo[1,2-c]oxazol-5-on wurde über ein bekanntes Verfahren in drei Schritten aus D-Pyroglutaminsäure hergestellt (Thottathil, J. K. et al., J. Org. Chem., 1986, 51, 3140) und in zwei Schritten (Selenylierung und oxidative Eliminierung) nach dem von Hamada et al. beschriebenen Verfahren (J. Am. Chem. Soc. 1989, 111, 1524) in (3S,7aR)-3-Phenyl-1H-pyrrolo[1,2-c]oxazol-5-on umgewandelt. (3S,7aR)-3-Phenyl-1H-pyrrolo[1,2-c]oxazol-5-on wurde dann in Analogie zu der von Uno et al. (J. Am. Chem. Soc., 1994, 116, 2139) beschriebenen Sequenz in 6 Schritten in (3S,7S,7aS,1'S)-7a-(1'-Acetoxy-2'-methylpropyl)-7-hydroxy-3-phenyl-5,6,7,7a-tetrahydro-1H-pyrrolo[1,2-c]oxazol-5-on überführt. (3S,7S,7aS,1'S)-7a-(1'-Acetoxy-2'-methylpropyl)-7-hydroxy-3-phenyl-5,6,7,7a-tetrahydro-1H-pyrrolo[1,2-c]oxazol-5-on (70 mg, 0,21 mmol) wurde in 1,0 ml Pyridin gelöst und bei Raumtemperatur mit 32,0 ml Acetanhydrid (0,34 mmol, 1,6 Äquivalente) behandelt. Die Mischung wurde über Nacht bei Raumtemperatur gerührt und das Lösungsmittel wurde am Vakuum entfernt, wodurch 77 mg des gewünschten (3S,7S,7aS,1'S)-7a-(1'-Acetoxy-2'-methylpropyl)-7-acetoxy-3-phenyl-5,6,7,7a-tetrahydro-1H-pyrrolo[1,2-c]oxazol-5-on (97%) erhalten wurden, ein gelbes Öl, das unverändert im folgenden Schritt eingesetzt wurde.

[0109] Das rohe (3S,7S,7aS,1'S)-7a-(1'-Acetoxy-2'-methylpropyl)-7-acetoxy-3-phenyl-5,6,7,7a-tetrahydro-1H-pyrrolo[1,2-c]oxazol-5-on (75 mg, 0,20 mmol) wurde in 5 ml Methanol gelöst und in Gegenwart von 50 mg 20% Palladiumhydroxid auf Kohle unter 1 Atmosphäre Wasserstoff gesetzt. Nachdem durch eine DSC-Analyse (1:1 Hexan/Ethylacetat) festgestellt worden war, dass die Reaktion vollständig abgelaufen war, wurde die Mischung filtriert und am Vakuum eingeengt, wodurch 55 mg (97%) des gewünschten primären Alkohols erhalten wurden, der ohne weitere Reinigung in einer zweistufigen Sequenz (Jones-Oxidation, Verseifung) in Analogie zu der von Uno et al. beschriebenen Sequenz (J. Am. Chem. Soc., 1994, 116, 2139) in (4S,5R,1'S)-4-Hydroxy-5-(1'-hydroxy-2'-methylpropyl)-pyrrolidin-2-on-5-carbonsäure umgewandelt wurde.

[0110] (4S,5R,1'S)-4-Hydroxy-5-(1'-hydroxy-2'-methylpropyl)-pyrrolidin-2-on-5-carbonsäure (7,0 mg, 32 mmol) wurde in 2,0 ml 1:1 Acetonitril/Tetrahydrofuren gelöst und dann bei Raumtemperatur mit 2-(1H-Benzotriazol-l-yl)-1,1,3,3-tetramethyluroniumtetrafluoroborat (11,0 mg, 34 mmol, 1.1 Äquivalente) und anschließend mit Triethylamin (0,36 mmol, 11 Äquivalente) behandelt. Die Mischung wurde bei Raumtemperatur 30 min lang gerührt und am Vakuum eingeengt. Flashchromatographie (230–400 mesh SiO_2, Elution mit Diethylacetat) ergab zuletzt 3 mg des reinen Lactons P-2 (47%), das als weißer Feststoff erhalten wurde. ^{1}H-NMR (d_6-DMSO, 300 MHz) d 8,95 (bs, 1H, NH), 5,64 (d, 1H, ^3J = 6,7 Hz, OH), 5,26 (d, 1H, ^3J = 6,0 Hz, OH), 3,78 (dd, 1H, ^3J = 6,7, 3,5 Hz), 2,81 (dd, 1H, ^2J = 19,2 Hz, ^3J = 6,0 Hz), 2,60 (d, 1H, ^2J = 19,2 Hz), 1,74 (m, 1H), 0,90 (d, 3H, ^3J = 6,9 Hz), 0,68 (d, 3H, ^3J = 6,8 Hz).

Beispiel 18

Synthese der Verbindung P-3

[0111] Clasto-Lactacystin-β-lacton (5,0 mg, 23,4 mmol; hergestellt über die von Corey, E. J., Reichard, G. A., J. Am. Chem. Soc., 1992, 114, 10677 beschriebene Route) wurde in 1,5 ml Pyridin gelöst und bei Raumtemperatur mit Acetanhydrid (40 ml, 0,42 mmol, 18 Äquivalente) behandelt. Nachdem man die Lösung über Nacht bei Raumtemperatur gerührt hatte, wurde das Pyridin unter Zusatz von 2 ml Toluol am Vakuum entfernt, wodurch ein hellbrauner Feststoff erhalten wurde. Der Feststoff wurde mit drei Portionen Hexan gewaschen und dann filtriert, was 5,5 mg des reinen Acetats P-3 (93%) ergab, das als weißer Feststoff erhalten wurde. ^{1}H-NMR (d_6-DMSO, 300 MHz) d 9,11 (bs, 1H, NH), 5,33 (d, 1H, ^3J = 6,1 Hz), 5,21 (d, 1H, ^3J = 5,0 Hz), 2,84 (m, 1H), 2,06 (s, 3H), 1,90 (m, 1H), 1,08 (d, 3H, ^3J = 7,5 Hz), 0,87 (d, 3H, ^3J = 6,9 Hz), 0,78 (d, 3H, ^3J = 6,8 Hz).

Beispiel 19

Synthese der Verbindung P-4

[0112] (3S,7aR)-3-Phenyl-5,6,7,7a-tetrahydro-1H-pyrrolo[1,2-c]oxazol-5-on wurde über ein bekanntes Verfahren in drei Schritten aus D-Pyroglutaminsäure hergestellt (Thottathil, J. K. et al., J. Org. Chem, 1986, 51, 3140) und in zwei Schritten (Selenylierung und oxidative Eliminierung) nach dem von Hamada et al. beschriebenen Verfahren (J. Am. Chem. Soc. 1989, 111, 1524) in (3S,7aR)-3-Phenyl-1H-pyrrolo[1,2-c]oxazol-5-on umgewandelt. (3S,7aR)-3-Phenyl-1H-pyrrolo[1,2-c]oxazol-5-on wurde dann in Analogie zu der von Uno et al. (J.

Am. Chem. Soc., 1994, 116, 2139) beschriebenen Sequenz in 4 Schritten in (3S,6R,7S,7aS,1'S)-7a-(1'-Acetoxy-2'-methylpropyl)-6-hydroxy-7-hydroxy-3-phenyl-5,6,7,7a-tetrahydro-1H-pyrrolo[1,2-c]oxazol-5-on überführt.

[0113]
(3S,6R,7S,7aS,1'S)-7a-(1'-Acetoxy-2'-methylpropyl)-6-hydroxy-7-hydroxy-3-phenyl-5,6,7,7a-tetrahydro-1H-pyrrolo[1,2-c]oxazol-5-on wurde dann in 4 Schritten (Acetylierung, Hydrogenolyse, Oxidation und Verseifung) in der gleichen Weise wie für die Herstellung von P-2 beschrieben zu (3R,4S,5R,1'S)-4-Hydroxy-5-(1'-hydroxy-2'-methylpropyl)-3-hydroxypyrrolidin-2-on-5-carbonsäure umgesetzt.

[0114] (3R,4S,5R,1'S)-4-Hydroxy-5-(1'-hydroxy-2'-methylpropyl)-3-hydroxypyrrolidin-2-on-5-carbonsäure (20 mg, 86 mmol) wurde nach dem für die Herstellung von P-2 beschriebenen Verfahren in das korrespondierende β-Lacton überführt. Es wurden 3 mg des reinen Lactons P-4 (16%) in Form eines weißen Feststoffs erhalten. H-NMR (d_6-DMSO, 300 MHz) d 8,96 (s, 1H, NH), 6,08 (bs, 1H, OH), 5,63 (d, 1H, ^3J = 6,6 Hz, OH), 5,12 (d, 1H, ^3J = 5,7 Hz) 4,31 (d, 1H, ^3J = 5,7 Hz), 3,72 (bt, 1H), 1,70 (m, 1H), 0,88 (d, 3H, ^3J = 6,9 Hz), 0,72 (d, 3H, ^3J = 6,8 Hz).

Beispiel 20

Synthese der Verbindung P-6

[0115] Clasto-Lactacystin-β-lacton (11,8 mg, 55,3 mmol; hergestellt über die von Corey, E. J., Reichard, G. A., J. Am. Chem. Soc., 1992, 114, 10677 beschriebene Route) wurde in 0,4 ml frisch destilliertem Pyridin gelöst und bei Raumtemperatur mit Methansulfonsäurechlorid (6,0 ml, 77,5 mmol, 1,4 Äquivalente) behandelt. Die Lösung wurde 2 h lang bei Raumtemperatur gerührt, mit weiterem Methansulfonsäurechlorid (10,0 ml, 129 mmol, 2,3 Äquivalente) versetzt und über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Die dunkle Lösung wurde dann am Vakuum mit 3 × 2 ml Toluol eingeengt, wodurch ein gelber Feststoff erhalten wurde. Flashchromatographie (230–400 mesh SiO_2, Elution mit 1:1 Hexan/Diethylacetat) ergab zuletzt 12,6 mg des reinen Mesylats P-6 (78%), das als flockiger weißer Feststoff erhalten wurde. ^{1}H-NMR ($CDCl_3$, 300 MHz) d 6,28 (bs, 1H, NH), 5,27 (d, 1H, ^3J = 6,1 Hz), 5,06 (d, 1H, ^3J = 4,0 Hz), 3,11 (s, 3H), 2,80–2,89 (m, 1H), 2,24–2,34 (m, 1H), 1,33 (d, 3H, ^3J = 7,5 Hz), 1,14 (d, 3H, 3^J = 7,0 Hz), 1,05 (d, 3H, 3J = 6,8 Hz).

SEQUENZLISTEN

(1) ALLGEMEINE INFORMATIONEN:

(i) ANMELDER: President and Fellows of Harvard College

(ii) TITEL DER ERFINDUNG: LACTACYSTIN ANALOGE

(iii) ZAHL DER SEQUENZEN: 17

(iv) KORRESPONDENZADRESSE:

(A) ADRESSAT: Fish & Richardson P.C.

(B) STRASSE: 225 Franklin Street

(C) STADT: Boston

(D) STAAT: MA

(E) LAND: USA

(F) POSTLEITZAHL: 02110-2804

(v) COMPUTERLESBARE FORM:

(A) TYP DES MEDIUMS: Floppy disk

(B) COMPUTER: IBM PC kompatibler

(C) BETRIEBSSYSTEM: PC-DOS/MS-DOS

(D) SOFTWARE: PatentIn Release #1.0, Version #1.30

(vi) DERZEITIGE ANMELDEDATEN:

(A) ANMELDUNGSNUMMER: PCT/US96/

(B) ANMELDEDATUM: 12-APR-1996

(C) KLASSIFIZIERUNG:

(vii) FRÜHERE ANMELDEDATEN:

(A) ANMELDUNGSNUMMER: US 08/421,583

(B) ANMELDEDATUM: 12-APR-1995

(viii) INFORMATION ZU ANWALT/VERTRETER:

(A) NAME: Freeman, John W.

(B) REGISTRIERUNGSNUMMER: 29,066

(C) REFERENZ/AKTENZEICHEN: 00246/197W01

(ix) TELEKOMMUNIKATIONSINFORMATION:

(A) TELEFON: 617/542-5070

(B) TELEFAX: 617/542-8906

(C) TELEX: 200154

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NO:1:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

(A) LÄNGE: 15 Aminosäuren

(B) TYP: Aminosäure

(C) STRÄNGIGKEIT: nicht relevant

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:1:

Thr Thr Thr Leu Ala Phe Lys Phe Arg His Gly Gly Ile Ile Ala
1 5 10 15

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NO:2:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

(A) LÄNGE: 15 Aminosäuren

(B) TYP: Aminosäure

(C) STRÄNGIGKEIT: nicht relevant

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:2:

Thr Thr Thr Leu Ala Phe Lys Phe Arg His Gly Val Ile Val Ala
1 5 10 15

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NO:3:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

(A) LÄNGE: 15 Aminosäuren

(B) TYP: Aminosäure

(C) STRÄNGIGKEIT: nicht relevant

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:3:

Thr Thr Thr Leu Ala Phe Lys Phe Gln His Gly Val Ile Ala Ala
1 5 10 15

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NO:4:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

(A) LÄNGE: 15 Aminosäuren

(B) TYP: Aminosäure

(C) STRÄNGIGKEIT: nicht relevant

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:4:

Thr	Thr	Thr	Leu	Ala	Phe	Arg	Phe	Gln	Gly	Gly	Ile	Ile	Val	Ala
1				5				10						15

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NO:5:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

(A) LÄNGE: 15 Aminosäuren

(B) TYP: Aminosäure

(C) STRÄNGIGKEIT: nicht relevant

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:5:

Thr	Thr	Thr	Val	Gly	Ile	Thr	Leu	Lys	Asp	Ala	Val	Ile	Met	Ala
1				5				10						15

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NO:6:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

(A) LÄNGE: 11 Aminosäuren

(B) TYP: Aminosäure

(C) STRÄNGIGKEIT: nicht relevant

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:6:

Asp	Ala	Tyr	Ser	Gly	Gly	Ser	Val	Ser	Leu	Tyr
1				5				10		

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NO:7:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

(A) LÄNGE: 14 Aminosäuren

(B) TYP: Aminosäure

(C) STRÄNGIGKEIT: nicht relevant

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:7:

Asp Ala Tyr Ser Gly Gly Ala Val Asn Leu Tyr His Val Arg
1 5 10

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NO:8:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

(A) LÄNGE: 14 Aminosäuren

(B) TYP: Aminosäure

(C) STRÄNGIGKEIT: nicht relevant

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:8:

Asp Ser Tyr Ser Gly Gly Val Val Asn Met Tyr His Met Lys
1 5 10

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NO:9:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

(A) LÄNGE: 21 Aminosäuren

(B) TYP: Aminosäure

(C) STRÄNGIGKEIT: nicht relevant

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:9:

Val Ile Glu Ile Asn Pro Tyr Leu Leu Gly Thr Met Ala Gly Gly
1 5 10 15
Ala Ala Asp Cys Ser Phe
20

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NO:10:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

(A) LÄNGE: 24 Aminosäuren

(B) TYP: Aminosäure

(C) STRÄNGIGKEIT: nicht relevant

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:10:

Val Ile Glu Ile Asn Pro Tyr Leu Leu Gly Thr Leu Ala Gly Gly
1 5 10 15

Ala Ala Asp Cys Gln Phe Trp Glu Arg
20

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NO:11:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

(A) LÄNGE: 25 Aminosäuren

(B) TYP: Aminosäure

(C) STRÄNGIGKEIT: nicht relevant

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:11:

Val Ile Glu Ile Asn Pro Pro Tyr Leu Leu Gly Thr Met Ser Gly
1 5 10 15

Cys Ala Ala Asp Cys Gln Tyr Trp Glu Arg
20 25

(2) INFORMATION FÜR SEQ IDNO:12:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

(A) LÄNGE: 16 Aminosäuren

(B) TYP: Aminosäure

(C) STRÄNGIGKEIT: nicht relevant

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG:SEQ ID NO:12:

Gly Tyr Ser Tyr Asp Leu Glu Val Glu Glu Ala Tyr Asp Leu Ala
1 5 10 15
Arg

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NO:13:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

(A) LÄNGE: 15 Aminosäuren

(B) TYP: Aminosäure

(C) STRÄNGIGKEIT: nicht relevant

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:13:

Gly Tyr Ser Asp Leu Glu Val Glu Gln Ala Tyr Asp Leu Ala Arg
1 5 10 15

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NO:14:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

(A) LÄNGE: 16 Aminosäuren

(B) TYP: Aminosäure

(C) STRÄNGIGKEIT: nicht relevant

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:14:

Gly Tyr Arg Pro Asn Leu Ser Pro Glu Glu Ala Tyr Asp Leu Gly
1 5 10 15
Arg

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NO:15:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

(A) LÄNGE: 19 Aminosäuren

(B) TYP: Aminosäure

(C) STRÄNGIGKEIT: nicht relevant

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:15:

Thr Thr Ile Ala Gly Val Val Tyr Lys Asp Gly Ile Val Leu Gly
1 5 10 15
Ala Asp Thr Arg

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NO:16:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

(A) LÄNGE: 19 Aminosäuren

(B) TYP: Aminosäure

(C) STRÄNGIGKEIT: nicht relevant

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:16:

Xaa Xaa Ile Ala Gly Val Val Tyr Lys Asp Gly Ile Val Leu Gly
1 5 10 15
Ala Asp Thr Arg

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NO:17:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

(A) LÄNGE: 9 Aminosäuren

(B) TYP: Aminosäure

(C) STRÄNGIGKEIT: nicht relevant

(D) TOPOLOGIE: linear

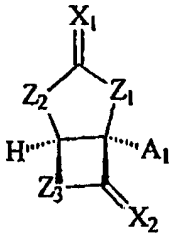
(ii) MOLEKÜLTYP: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:17:

Thr Thr Ile Ala Gly Val Val Tyr Lys
1 5

Patentansprüche

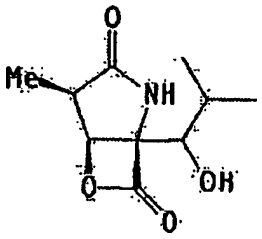
1. Verbindung der Formel II:



(II)

worin:
Z^1 O, S, SO_2, NH oder NR_a ist;
R_a C_{1-6}-Alkyl ist;
X^1 O, S, CH_2, zwei einfach gebundene H, CH (R_b) oder C (Rb) (R_c) in der E- oder Z-Konfiguration ist;

R_b und R_c jeweils unabhängig voneinander C_{1-6}-Alkyl, C_{6-12}-Aryl, C_{3-8}-Cycloalkyl, C_{3-8}-Heteroaryl, ein C_{3-8}-Heterozyklus oder ein Halogen sind, mit der Einschränkung, dass dann, wenn Z^1 SO_2 ist, X^1 zwei einfach gebundene H ist;
Z^2 CHR^1 in der (R)- oder (S)-Konfiguration ist;
R^1 H, C_{1-6}-Alkyl, C_{1-6}-Haloalkyl, C_{2-6}-Alkenyl, C_{2-6}-Alkinyl, Hydroxyl, Halogen, eine Seitenkette einer natürlich vorkommenden Aminosäure, OR_d, SR_d oder NR_dR_e ist;
R_d und R_e jeweils unabhängig voneinander H, C_{1-6}-Alkyl, C_{1-6}-Haloalkyl, C_{2-6}-Alkenyl oder C_{2-6}-Alkynyl sind;
Z^3 O, S, NH oder NR_j ist;
R_j C_{1-6}-Alkyl ist;
X^2 O oder S ist; und
A^1 H oder die Seitenkette von irgendeiner natürlich vorkommenden α-Aminosäure ist oder von folgender Formel ist: $-(CH_2)_m$-Y-$(CH_2)_n$-R^3X^3 (worin:
Y O, S, C=O, C=S, -(CH=CH)-, Vinyliden, -C=N-OR_h, -C=N$NR_iR_{i'}$, Sulfonyl, Methylen, CHX^4 in der (R)- oder (S)-Konfiguration oder eine Bindung ist;
X^4 Halogen, Methyl, Halomethyl, OR_h, SR_h, $NR_iR_{i'}$, -$NR_i(OR_h)$ oder -$NR_i(NR_iR_{i'})$ ist;
R_h H, C_{1-6}-Alkyl, C_{1-6}-Haloalkyl, C_{2-6}-Alkenyl, C_{2-6}-Alkinyl, C_{1-10}-Acyl, C_{1-6}-Alkyl-fulfonyl oder C_{6-10}-Arylsulfonyl ist;
R_i und R_i jeweils unabhängig voneinander H, C_{1-6}-Alkyl, C_{1-6}-Haloalkyl, C_{2-6}-Alkenyl, C_{2-6}-Alkynyl oder C_{1-10}-Acyl ist;
m 0, 1, 2 oder 3 ist;
n 0, 1, 2 oder 3 ist;
R^3 geradkettiges oder verzweigtes C_{1-8} Alkyliden, geradkettiges oder verzweigtes C_{1-8} Alkylen, C_{3-10}-Cycloalkyliden, C_{3-10}-Cycloalkylen, Phenylen, C_{6-14}-Arylalkyliden, C_{6-14}-Arylalkylen oder eine Bindung ist;
X^3 H, Hydroxyl, Thiol, Carboxyl, Amino, Halogen, (C_{1-6}-Alkyl)oxycarbonyl, (C_{7-14}-Arylalkyl)oxycarbonyl oder C_{6-14}-Aryl ist, oder R^3 und X^3 zusammen genommen die Seitenketten irgendeiner natürlich vorkommenden α-Aminosäure sind);
und worin jede Alkylgruppe unsubstituiert oder durch ein, zwei, drei oder mehr Substituenten substituiert sein kann, die gleich oder verschieden sein können, ausgewählt aus Halogen, Hydroxyl, geschütztes Hydroxyl, Amino, geschütztes Amino, Carboxy, geschütztes Carboxy, Cyano, Methylsulfonylamino, Alkoxy, Acyloxy, Nitro, Fluormethyl, Dichlormethyl, Trifluormethyl, 1,1-Difluorethyl oder 2,2-Dibromethyl; oder ein pharmazeutisch annehmbares Salz davon, mit der Einschränkung, dass die Verbindung nicht von folgender Formel ist:



2. Verbindung nach Anspruch 1, worin CHX^4 in der (S)-Konfiguration vorliegt, wenn X^4 Hydroxyl ist und -$(CH_2)_n$-R^3X^3 Isopropyl ist.

3. Verbindung nach Anspruch 1 oder 2, worin Z^1 NH oder NR_a ist.

4. Verbindung nach Anspruch 1 oder 2, worin Z^1 O, S oder SO_2 ist.

5. Verbindung nach Anspruch 1 bis 4, worin A^1 -$(CH_2)_m$-Y-(CH_2)- R_3X_3 ist und Y CHX^4 in der (S)-Konfiguration ist.

6. Verbindung nach Anspruch 1 bis 5, worin Z^2 CHR^1 in der (R)-Konfiguration ist.

7. Verbindung nach Anspruch 1 bis 6, worin R^1 H, C_{1-6}-Alkyl, C_{1-}-$_6$-Haloalkyl, C_{2-6}-Alkenyl, C_{2-6}-Alkynyl oder Halogen ist.

8. Verbindung nach Anspruch 1 bis 7, worin R^1 eine Seitenkette von einer natürlich vorkommenden α-Aminosäure, OR_d, SR_d oder NR_dR_e ist.

9. Verbindung nach Anspruch 1, worin
Z^1 NH oder NR^a ist;
X^1 O oder S ist;
Z^2 CHR^1 in der (R)- oder (S)-Konfiguration ist, worin

R^1 H, C_{1-6}-Alkyl C_{1-6}-Haloalkyl C_{2-6}-Alkenyl C_{2-6}-Alkynyl Hydroxyl, Halogen, eine Seitenkette von einer natürlich vorkommenden α-Aminosäure, OR_d, SR_d oder NR_dR_e ist; wobei jedes von R_d und R_e unabhängig H, C_{1-6}-Alkyl, C_{1-6}-Haloalkyl, C_{2-6}-Alkenyl, C_{2-5}-Alkynyl ist;
Z^3 O oder NH ist;
X^2 O oder S ist;
A^1 die Nicht-Wasserstoff-Seitenkette von irgendeiner natürlich vorkommenden α-Aminosäure ist oder von folgender Formel ist: $-Y-(CH_2)_n-R^3X^3$ worin
Y C=O oder CHX^4 in der (R)- oder (S)-Konfiguration, oder eine Bindung ist
X^4 Halogen, Methyl, Halomethyl oder OR_h, ist,
R_h ausgewählt ist aus H, C_{1-6}-Alkyl, C_{1-6}-Haloalkyl, C_{2-6}-Alkenyl, C_{2-6}-Alkynyl,
C_{1-10}-Acyl, C_{1-6}-Alkylsulfonyl oder C_{6-10}-Arylsulfonyl;
n 0, 1, 2 oder 3 ist;
R^3 geradkettiges oder verzweigtes C_{1-8}-Alkylen, C_{3-10}-Cycloalkylen, Phenylen,
C_{6-14}-Arylalkylen, C_{6-14}-Arylalkylen oder eine Bindung ist;
X^3 H, Hydroxyl, Thiol, Carboxy, Amino, Halogen oder C_{6-14}-Aryl ist; R^3 und X^3 zusammengenommen die Seitenkette von einer natürlich vorkommenden Aminosäure sind.

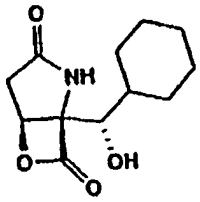
10. Verbindung nach Anspruch 1 mit einer Formel, worin wenigstens vier der folgenden Einschränkungen gelten:
Z^1 ist NH oder NR_a;
X^1 ist O oder S;
Z^2 ist CHR^1 in der (R)- oder (S)-Konfiguration ist, worin
R^1 H, C_{1-6}-Alkyl, C_{1-6}-Haloalkyl, Hydroxyl oder OR_d ist, wobei
R_d C_{1-6}-Alkyl ist;
Z^3 ist O oder NH;
X^2 ist O; und
A^1 ist die Nicht-Wasserstoff-Seitenkette von irgendeiner natürlich vorkommenden α-Aminosäure oder ist von folgender Formel: $-(CH_2)_m-Y-(CH_2)_n-R^3X^3$ worin Y CHX^4 ist, wobei X^4 Halogen, Methyl, Halomethyl oder OR_h ist, wobei
R_h ausgewählt ist aus H, C_{1-6}-Alkyl, C_{1-6}-Haloalkyl, C_{1-10}-Acyl, C_{1-6}-Alkylsulfonyl und C_{6-10}-Arylsulfonyl; R^3 geradkettiges oder verzweigtes C_{1-8}-Alkylen, C_{3-10}-Cycloalkylen, Phenylen, C_{6-14}-Arylalkylen, oder eine Bindung ist; m 0, 1 oder 2 ist und n 0 oder 1 ist; und X^3 H ist.

11. Verbindung nach Anspruch 1, worin Z^1 NH ist und Z^3 O ist.

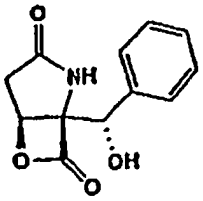
12. Verbindung nach Anspruch 1, worin Z^1 und Z^3 NH sind.

13. Verbindung nach Anspruch 1, worin X^2 0 ist; und A^1 die Seitenkette von irgendeiner natürlich vorkommenden α-Aminosäure ist oder von folgender Formel ist: $-(CH2)_m-Y-(CH_2)_n-R^3X^3$ worin Y CHX^4 ist, wobei X^4 Halogen, Methyl, Halomethyl oder OR_h ist, wobei R_h ausgewählt ist aus H, C_{1-6}-Alkyl, C_{1-6}-Haloalkyl, C_{1-10}-Acyl, C_{1-6}-Alkylsulfonyl und C_{6-10}-Arylsulfonyl; R^3 geradkettiges oder verzweigtes C_{1-8}-Alkylen, C_{3-10}-Cyclo-alkylen, Phenylen, C_{6-14}-Arylalkylen, oder eine Bindung ist; m 0, 1 oder 2 ist und n 0 oder 1 ist; und X^3 H ist.

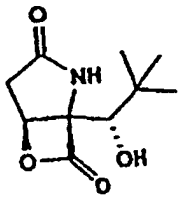
14. Verbindung nach Anspruch 1, ausgewählt aus den folgenden Formeln:



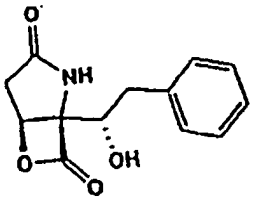
J-1



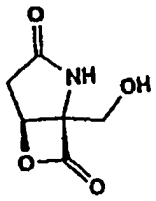
J-2



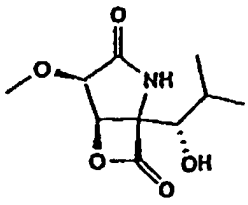
J-3



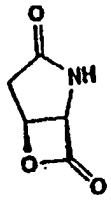
J-4



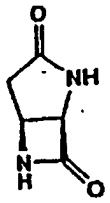
J-5



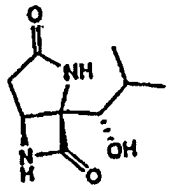
J-6



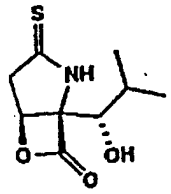
J-7



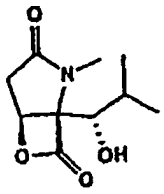
J-8



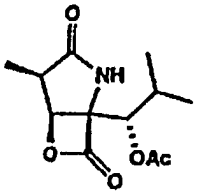
J-9



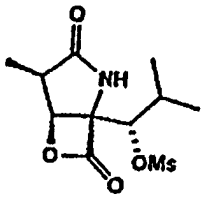
J-10



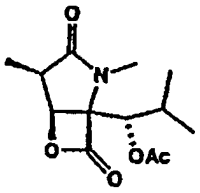
J-11



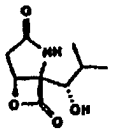
J-12



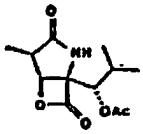
J-13



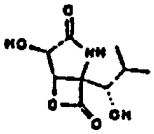
J-15



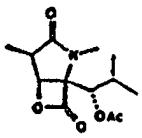
P-2



P-3

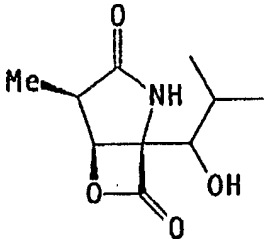


P-4



P-5

15. Pharmazeutische Zusammensetzung, umfassend eine Verbindung der Formel (II) nach einem der Ansprüche 1 bis 14 oder eine Verbindung



und pharmazeutisch geeignete nicht-toxische Exzipienten und Träger.

16. Verwendung einer Verbindung nach einem der Ansprüche 1 bis 14 für die Herstellung eines Medikaments zur Anwendung bei einer Methode für die Behandlung eines durch Proteasomabhängige Proteolyse vermittelten Zustandes.

Es folgt kein Blatt Zeichnungen