

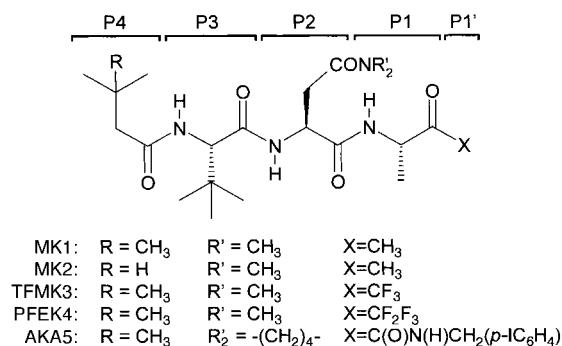
Die Konformation eines an die humane Cytomegalievirus-Protease gebundenen Peptidylmethylketon-Inhibitors**

Steven R. LaPlante, Dale R. Cameron, Norman Aubry, Pierre R. Bonneau, Robert Déziel, Chantal Grand-Maître, William W. Ogilvie und Stephen H. Kawai*

Transfer-Kern-Overhauser-Effekt(TRNOE)-Experimente sind eine leistungsfähige NMR-Methode zur Untersuchung von Protein-Ligand-Wechselwirkungen.^[1] Unterstützt von der Computerchemie kann diese Methode brauchbare Strukturinformationen über die Konformation eines an ein Makromolekül gebundenen Liganden liefern. Eine Grundvoraussetzung für die TRNOE-Methode ist jedoch, daß der Austausch zwischen den freien und den komplexierten Formen des zu untersuchenden Moleküls schnell erfolgt (schneller als seine Spin-Gitter-Relaxationsgeschwindigkeit) und reversibel ist. Im folgenden berichten wir über die erste Strukturaufklärung eines Peptidyl-Inhibitors, der an sein Zielenzym, die humane Cytomegalievirus(HCMV)-Protease,^[2] gebunden ist. Die Verwendung der Peptidylmethylketone MK1 und MK2 ist ein neuer Ansatz zur Aufklärung der Struktur von Serinprotease-Inhibitoren vom Typ klassischer aktiver Carbonylverbindungen, die mit der TRNOE-Methode nicht erfassbar sind (Schema 1). Bis heute wurden für solche

Gegenwärtig besteht ein erhebliches Interesse an der HCMV-Protease als Ziel für therapeutische Wirkstoffe gegen eine HCMV-Infektion, die noch immer ein ernstes klinisches Problem ist.^[4] Außerdem hat der neuartige Strukturtyp dieser Serin-Protease, der kürzlich durch eine Röntgenstrukturanalyse^[5] aufgeklärt wurde, ihre Untersuchung ebenfalls beschleunigt. Unsere Forschungen auf dem Gebiet der medizinischen Chemie^[6] haben zur Synthese einer Reihe von aktivierte Peptidyl-Carbonylverbindungen wie des Trifluormethylketons TFMK3 und des Pentafluorethylketons PFEK4 geführt. Solche Moleküle sind klassische Serinprotease-Inhibitoren, die reversibel stabile kovalente Addukte mit dem Serinrest im aktiven Zentrum bilden.^[7] Aber die Möglichkeit, durch TRNOE-Techniken die Konformation der an die Protease gebundenen Inhibitoren aufzuklären, ist wegen ihrer sehr langsamen Austauschgeschwindigkeiten ausgeschlossen. Um dieses Problem zu umgehen, wurden die Methylketone MK1 und MK2 entworfen und hergestellt. Obwohl diese ihren wirksamen, aktivierte Carbonylanaloga sehr ähnlich sind, verläuft der Austausch zwischen der freien und der gebundenen Form sehr schnell, da sie keine kovalenten Hemiacetal-Addukte mit der Protease bilden können.^[8] Eine andere Schlüsseleigenschaft von MK1 und MK2 ist das Vorhandensein der Keton-CH₃-Gruppe, die eine äquivalente Position einnimmt wie eine P1'-Amid-NH-Gruppe^[10] und deren NMR-Signale Informationen über die Konformation gebundener Peptide in der P1-P1'-Region liefern kann.

In ersten 1D-NMR-Experimenten^[11] wurde eine durch HCMV-Protease induzierte Linienvielfalt der Protonensignale von MK1 erhalten. Im Einklang mit einer spezifischen Komplexierung durch das Enzym weist das ¹H-NMR-Spektrum des Inhibitors nach der Titration mit dem Enzym eine fast gleichmäßige Verbreiterung auf, verglichen mit den Signalen des nicht enzymgebundenen Liganden. Die in Abbildung 1 A dargestellten enzymabhängigen Änderungen



Untersuchungen an Inhibitoren dieser Enzyme fast ausschließlich Spaltungsprodukte von Peptiden oder Substraten eingesetzt, die nur langsam gespalten werden.^[3]

[*] Dr. S. H. Kawai, Dr. S. R. LaPlante, Dr. D. R. Cameron, N. Aubry, Dr. P. R. Bonneau, Dr. R. Déziel, C. Grand-Maître, Dr. W. W. Ogilvie
Departments of Chemistry and Biological Sciences
Bio-Méga Research Division
Boehringer Ingelheim (Canada) Ltd.
2100 Cunard St., Laval, PQ, H7S 2G5 (Kanada)
Fax: (+1) 514-682-8434

[**] Wir danken Dr. L. Lagacé und M.-J. Massariol für die Überlassung des hier verwendeten Enzyms, G. Fazal, J. A. O'Meara und C. Chabot für die Synthese von aktivierte Carbonyl-Inhibitoren, Prof. L. Tong für die Daten der Röntgenstrukturanalyse sowie Drs. F. Ni, Z. Chen und P. Xu für hilfreiche Diskussionen und technische Unterstützung.

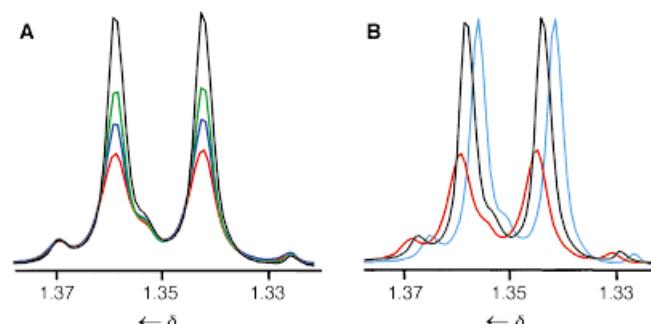


Abb. 1. A) Durch HCMV-Protease induzierte Änderungen des ¹H-NMR-Signals der P1- α -Methylgruppe von MK1: MK1 allein (schwarz) und in Gegenwart des Enzyms bei 30fachem (grün), 15fachem (blau) und 7fachem molarem Inhibitorüberschuss (rot). B) Die Auswirkung von PFEK4 auf die Protease-induzierten Veränderungen des P1- α -Methylsignals von MK1: MK1 allein (schwarz), 7facher Überschuss von MK1 in Gegenwart von HCMV-Protease (rot) und nach Zugabe von PFEK4 (cyanblau). (Die Signale sind der Übersichtlichkeit wegen versetzt dargestellt.)

des Methylensignals der Alanineinheit an Position P1 sind repräsentativ für die insgesamt beobachteten Veränderungen im Spektrum. Nach Zugabe von PFEK4 zur Probe wurden wieder die Peakhöhen der Protonensignale von freiem MK1

erreicht, eine Folge der Verdrängung von MK1 aus dem aktiven Zentrum durch sein sehr viel wirksameres, aktiviertes Carbonylanalogon (Abb. 1B).

Um ausführliche Strukturinformationen über die Bindung dieser Inhibitoren zu erhalten, wurden TRNOE-Studien durchgeführt. Wegen der ungünstigen Überlagerung der *tert*-Butyl-Signale an den Positionen P3 und P4 von MK1 bei 1D-Untersuchungen wurde für die TRNOE-Experimente das Isopropylanalagon MK2 eingesetzt, dessen Seitenketten-Signale gut getrennt waren. Das ^1H -NOESY-NMR-Spektrum von MK2 in Gegenwart von HCMV-Protease (ausgewählte Bereiche sind in Abb. 2 gezeigt) lässt negative NOE-Kreuzsignale erkennen, die aus der Kreuzrelaxation zwischen Protonen des enzymgebundenen Inhibitors resultieren. Abbildung 2A,

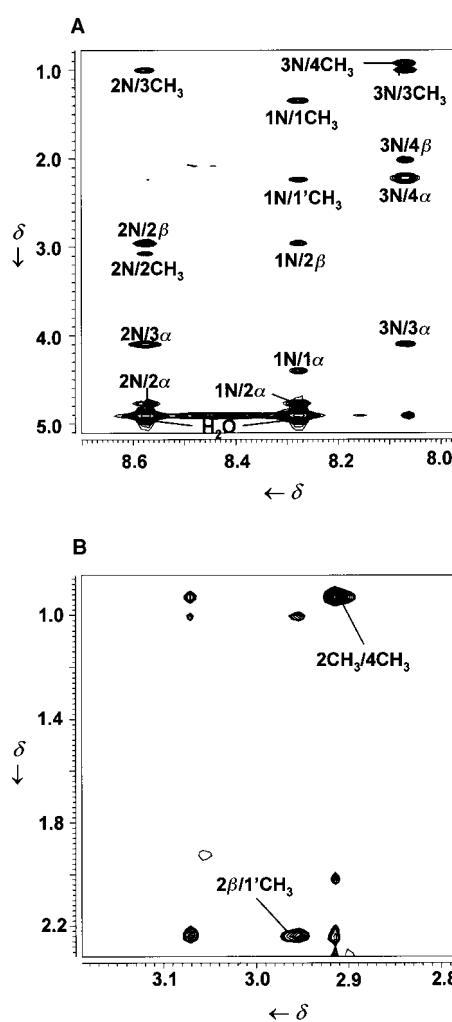


Abbildung 2. Ausgewählte Bereiche des 2D-NOESY-NMR-Spektrums von MK2 (3.1 mM) in Gegenwart von HCMV-Protease (0.26 mM), aufgenommen mit einer Mischzeit von 150 ms. A) Der NH-aliphatische Bereich. B) Der aliphatische Bereich mit wichtigen Korrelationen zwischen Seitenkettenresten.

die den NH/aliphatischen Bereich des Spektrums wiedergibt, liefert ein Muster von Amid- C_αH -Korrelationen zwischen $\text{C}_\alpha\text{H}(i)$ und $\text{NH}(i+1)$ von starker Intensität im Wechsel mit schwachen Kreuzsignalen zwischen $\text{C}_\alpha\text{H}(i)$ und $\text{NH}(i)$ innerhalb eines Restes, was charakteristisch für eine gestreckte Peptidkonformation ist.^[12] Dies wird durch andere prominenten

te NOE-Signale bestätigt, die in Abbildung 2B angegeben sind und zu denen auch das zwischen der Methylgruppe an Position P2 und der an P4 gehört. Von Bedeutung ist auch ein Kreuzsignal zwischen einer der Seitenketten-Methylgruppen an Position P2 und der Keton-Methylgruppe, das auf das Vorhandensein eines „Knicks“ am C-terminalen Kettenende hindeutet.

Die Volumina der NOE-Kreuzsignale wurden anschließend skaliert und in Interproton-Abstandsbeschränkungen (distance restraints) umgerechnet,^[13] um die Konformation von enzymgebundenem MK2 durch Molecular Modeling mit der Methode des eingeschränkten simulierten Temperns (restrained simulated annealing) zu berechnen. Diese Rechnungen^[14] lieferten ein einziges Ensemble von Strukturen, für die ein repräsentatives, mit den NMR-Daten übereinstimmendes Beispiel in Abbildung 3 dargestellt ist. Sowohl die gestreckte

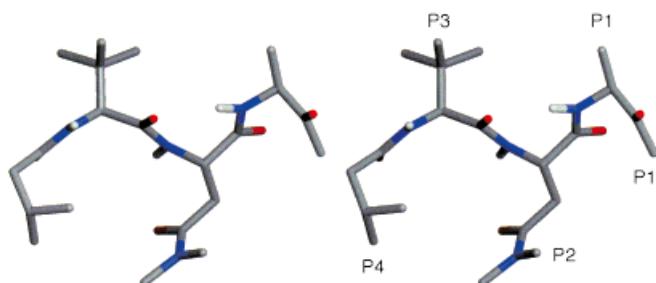


Abbildung 3. Stereoansicht einer repräsentativen, aus NMR-Daten abgeleiteten Struktur von an HCMV-Protease gebundenem MK2, erhalten durch eingeschränktes simuliertes Tempern.

Rückgratkonformation als auch der Knick zwischen den Positionen P1 und P1' sind klar ersichtlich.

Schließlich ermöglicht die Aufklärung der Kristallstruktur des kovalenten Komplexes der HCMV-Protease mit dem Peptidyl- α -ketoamid-Inhibitor AKA5^[15] den Vergleich von Konformationen gebundener Inhibitoren, die unabhängig voneinander durch NMR- und kristallographische Methoden bestimmt wurden. Wie in Abbildung 4 erkennbar ist, stimmen

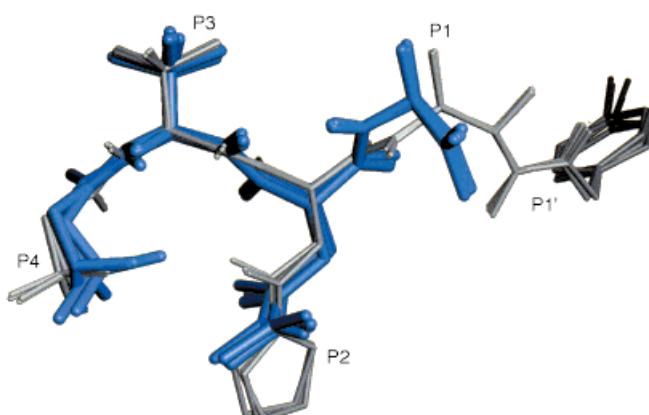


Abbildung 4. Vergleich der Struktur des an HCMV-Protease gebundenen Inhibitors MK2 (blau, 29 niederenergetische Konformere), die aus TRNOE-Methoden bestimmt wurde, mit der des Inhibitors AKA5 (grau, vier kristallographisch unabhängige Konformere), die aus der Kristallstruktur des Enzym-Inhibitor-Komplexes^[15] erhalten wurde.

die vier kristallographisch bestimmten Strukturen und die 29 übereinander gelagerten Strukturen aus NMR-Untersuchungen sehr gut überein.

Die hier beschriebenen Ergebnisse unterstreichen den Nutzen von Peptidylmethylketonen für die Aufklärung der Struktur aktivierter Carbonyl-Inhibitoren einer Serinprotease durch TRNOE-Methoden. Die Konformation von MK2 im enzymgebundenen Zustand wird für den gezielten Entwurf von HCMV-Protease-Inhibitoren und damit möglicherweise auch für die Entwicklung von Wirkstoffen gegen eine HCMV-Infektion ein wichtiges Hilfsmittel sein.

Eingegangen am 8. Mai 1998 [Z11833]

Stichwörter: Konformationsanalyse • Molecular Modeling • NMR-Spektroskopie • Peptidmimetica

- [1] Übersichtsartikel: F. Ni, *Prog. Nucl. Magn. Res.* **1994**, 26, 517–590.
- [2] Bei allen gegenwärtigen Untersuchungen wird die HCMV-Protease-Mutante Ala143 → Gln verwendet, um das Problem der Selbstspaltung zu umgehen: C. Pinko, S. A. Margosiak, D. Vanderpool, J. C. Gutowski, B. Condon, C.-C. Kan, *J. Biol. Chem.* **1995**, 270, 23634–23640. Eine genaue Beschreibung der Präparation des rekombinanten Enzyms ist in Lit. [9] zu finden.
- [3] a) F. Ni, Y. Zhu, H. A. Scheraga, *J. Mol. Biol.* **1995**, 252, 657–671, zit. Lit.; b) E. F. Meyer, Jr., G. M. Clore, A. M. Gronenborn, H. A. S. Hansen, *Biochemistry* **1988**, 27, 725–730; c) S. R. LaPlante, N. Aubry, P. R. Bonneau, D. R. Cameron, L. Lagacé, M.-J. Massariol, H. Montpetit, C. Plouffe, S. H. Kawai, B. D. Fulton, Z. Chen, F. Ni, *Biochemistry* **1998**, 37, 9793–9801.
- [4] E. S. Mocarski, Jr. in *Virology*, Vol. 2 (Hrsg.: B. N. Fields), Lippincott-Raven, Philadelphia, PA, **1995**, S. 2447–2492; W. J. Britt, C. A. Alford in *Virology*, Vol. 2 (Hrsg.: B. N. Fields), Lippincott-Raven, Philadelphia, PA, **1995**, S. 2493–2525.
- [5] Röntgenstrukturanalyse des Apoenzyms: a) L. Tong, C. Qian, M.-J. Massariol, P. R. Bonneau, M. G. Cordingley, L. Lagacé, *Nature* **1996**, 383, 272–275; b) X. Qiu, J. S. Culp, A. G. DiLella, B. Hellmig, S. S. Hoog, C. A. Janson, W. W. Smith, S. S. Abdel-Meguid, *Nature* **1996**, 383, 275–279; c) H.-S. Shieh, R. G. Kurumball, A. M. Stevens, R. A. Stegeman, E. J. Sturman, J. Y. Pak, A. J. Wittwer, M. O. Palmier, R. C. Wiegand, B. C. Holwerda, W. C. Stallings, *Nature* **1996**, 383, 279–282; d) P. Chen, H. Tsuge, R. J. Almassy, C. L. Gribskov, S. Katoh, D. L. Vanderpool, S. A. Margosiak, C. Pinko, D. A. Matthews, C.-C. Kan, *Cell* **1996**, 86, 835–843.
- [6] W. W. Ogilvie, M. Bailey, M.-A. Poupart, A. Abraham, A. Bhavsar, P. R. Bonneau, J. Bordeleau, Y. Bousquet, C. Chabot, J.-S. Duceppe, G. Fazal, S. Goulet, C. Grand-Maitre, I. Guse, T. Halmos, P. Lavallée, M. Leach, E. Malenfant, J. A. O'Meara, R. Plante, C. Plouffe, M. Poirier, F. Soucy, C. Yoakim, R. Déziel, *J. Med. Chem.* **1997**, 40, 4113–4135. Die dort angegebenen IC_{50} -Werte der verwendeten Inhibitoren wurden nach der in Lit. [9] beschriebenen Methode bestimmt.
- [7] a) B. Imperiali, R. H. Abeles, *Biochemistry* **1986**, 25, 3760–3767; b) T.-C. Liang, R. H. Abeles, *Biochemistry* **1987**, 26, 7603–7608; c) C. V. Xeï, *Biochemistry* **1997**, 36, 1308–1313.
- [8] Die fehlende Reaktivität von MK1 gegenüber einem Angriff durch den Serinrest des aktiven Zentrums ist durch ^{13}C -NMR-Untersuchungen an Carbonyl-markierten Proben von MK1 und PFEK4 belegt.^[9]
- [9] P. R. Bonneau, C. Grand-Maitre, D. J. Greenwood, L. Lagacé, S. R. LaPlante, M.-J. Massariol, W. W. Ogilvie, J. A. O'Meara, S. H. Kawai, *Biochemistry* **1997**, 36, 12644–12652.
- [10] Bezeichnung der Positionen der Aminosäurereste nach I. Schechter, A. Berger, *Philos. Trans. R. Soc. London Ser. B* **1970**, 257, 249–264.
- [11] 1D-NMR-Spektren wurden an einem AMX-500-MHz-Spektrometer von Bruker aufgenommen. Die Proben wurden hergestellt, indem konzentrierte Lösungen von MK1 in $[\text{D}_6]\text{DMSO}$ und von HCMV-Protease in Standardpuffer (wie nachfolgend beschrieben, jedoch mit EDTA und ohne Zusatz von Trimethylsilylpropionsäure) zu einer wäßrigen Pufferlösung gegeben wurden, die aus 500 mM Na_2SO_4 , 50 mM NaCl, 1 mM EDTA, 50 mM $[\text{D}_{11}]\text{Tris}(\text{hydroxymethyl})\text{aminomethan}$ (Tris) und 5 mM $[\text{D}_{10}]\text{Dithiothreitol}$ mit 10% D_2O (versetzt mit [2,2,3,3- D_4]-3-Trimethylsilylpropionsäure) bestand; der pH-Wert wurde anschließend auf einen Wert von 7 eingestellt. Die Stammlösungen wurden sukzessive zugegeben, so daß die Proben Protease:MK1-Verhältnisse von 0:1, 1:30, 1:15 und 1:7 aufwiesen. Die Spektren wurden bei 20°C aufgenommen, die Unterdrückung des Wassersignals wurde durch kontinuierliche niederenergetische Einstrahlung der H_2O -Resonanzfrequenz während der Relaxations-Wartephase erreicht. Die 2D-NOESY-Experimente (J. Jeener, B. H. Meier, P. Bachmann, R. R. Ernst, *J. Chem. Phys.* **1979**, 64, 4546–4553; S. Macura, R. R. Ernst, *Mol. Phys.* **1980**, 41, 95–117) wurden mit einem UNITY-750-MHz-Gerät von Varian durchgeführt, das mit Pulsfeldgradienten-Zubehör ausgestattet war. Die Proben enthielten MK2 (3.1 mm) und Protease (0.26 mm) in Standardpufferlösung bei pH 7. Phasenabhängige Spektren wurden bei 10°C unter Verwendung der Time-proportional-phase-incrementation(TPPI)-Methode erhalten (D. Marion, K. Wüthrich, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1983**, 113, 967–974; A. G. Redfield, S. D. Kuntz, *J. Magn. Res.* **1975**, 19, 250–254). Die Unterdrückung des Wassersignals wurde durch die Einführung eines 3-9-19-WATERGATE-Moduls vor der Aufnahme erzielt (M. Piotto, V. Saudek, V. Sklenar, *J. Biomol. NMR* **1992**, 2, 661–665; V. Sklenar, M. Piotto, R. Lippek, V. Saudek, *J. Magn. Reson. A* **1993**, 102, 241–245). Die NOESY-NMR-Spektren wurden mit Mischzeiten von 50, 100, 150 und 250 ms aufgenommen, und ein selektiver Flip-back-Puls wurde genau vor dem Ablese-Puls eingesetzt, um die Magnetisierung des Wassers entlang der positiven z -Achse während der Aufnahme und der Relaxations-Wartephase aufrechtzuerhalten (G. Lippens, C. Dhalluin, C. Wieruszek, *J. Biomol. NMR* **1995**, 5, 327–331).
- [12] K. Wüthrich, *NMR of Proteins and Nucleic Acids*, Wiley, New York, **1986**, S. 162, zit. Lit.
- [13] J. D. Baleja, J. Moult, B. D. Sykes, *J. Magn. Res.* **1990**, 87, 375–384.
- [14] Für die Modellierung von MK2 wurde das Programm Discover 95.0 mit dem CFF95-Kraftfeld (Molecular Simulations Inc., San Diego, USA) verwendet. Alle Berechnungen wurden ohne Beschränkungen für nichtbindende oder Coulomb-Wechselwirkungen und mit einer Dielektrizitätskonstanten von 1.0 durchgeführt. 25 Abstands-Restraints wurden unter Verwendung einer Methode aus den NMR-Daten abgeleitet, die der von Sykes et al. ähnlich ist.^[13] Die Restraints wurden als starke (1.8–2.7 Å), mittlere (1.8–3.5 Å) oder schwache Potentiale (1.8–5.0 Å) mit flacher Potentialmulde verwendet. Ein einziger, nichteingeschränkter Hochtemperatur-Dynamikschritt wurde bei 1000 K und einem Zeitschritt von 1 fs durchgeführt, wobei 40 Konformationen in Intervallen von 10 ps gesammelt wurden, um einen Ausgangssatz an Konformationen zu erzeugen. Jede Konformation wurde abgekühlt und unter Verwendung der folgenden Bedingungen für simuliertes Temperiern (simulated annealing) energieminiert. Die Temperatur wurde mit einer Geschwindigkeit von 50 K ps^{-1} auf 500 K gesenkt, wobei starke Restraints angewendet wurden. Danach wurde weiter auf 250 K (5 K ps^{-1}) abgekühlt. Die verbleibenden Restraints wurden hinzugefügt, und es wurde auf 50 K (0.5 K ps^{-1}) abgekühlt, gefolgt von eingeschränkter Energieminimierung auf einen endgültigen Gradienten von 0.01 kcal mol $^{-1}$ Å $^{-1}$. 29 niedrigerenergetische Konformationen wurden isoliert (mittlere Gesamtbeschränkungsabweichung: 0.11 kcal mol $^{-1}$; mittlere quadratische Abweichung für alle schweren Atome: 0.241), und eine mit den NMR-Daten übereinstimmende Beispieldkonformation wurde ausgewählt.
- [15] L. Tong, C. Qian, M.-J. Massariol, R. Déziel, C. Yoakim, L. Lagacé, *Nature Struct. Biol.* **1998**, im Druck.