

Phosphor-NMR-Spektroskopie als vielseitiges Werkzeug für das Screening von Substanzbibliotheken**

Florian Manzenrieder, Andreas O. Frank und Horst Kessler*

Professor Wolfgang A. Herrmann zum 60. Geburtstag gewidmet

Die NMR-Spektroskopie ist eine etablierte Technik für das Screening von Substanzbibliotheken.^[1] Zu den größten Vorteilen der NMR-Spektroskopie gegenüber anderen Methoden zählt die direkte Detektion selbst schwacher, intermolekularer Wechselwirkungen. Daher kann sie effizient für das fragmentbasierte Ligandendesign eingesetzt werden. Ein weiterer Vorzug der NMR-Spektroskopie ist die deutliche Verringerung der Zahl an falsch-positiven „Treffern“, die oftmals in biologischen Screening-Verfahren auftreten.^[2,3] Unter der Vielzahl an NMR-Screening-Methoden haben sich solche als die effektivsten erwiesen, die auf der Detektion von Ligandensignalen basieren.^[4] Herausragende Beispiele dieser Nachweistechnik sind die Standard- und gruppenselektive Sättigungstransfer-Differenz(STD)-Spektroskopie sowie das Fluor-NMR-Screening.^[1,5-8] In Verbindung mit Hochdurchsatzverfahren wie TINS (target immobilized NMR screening)^[9] ist das ligandenbasierte NMR-Screening von Substanzbibliotheken eine besonders effiziente Methode in der Wirkstoff-Forschung.^[10-12]

Wir stellen hier ein neues Screening-Konzept für die Erweiterung des Anwendungsbereichs der NMR-Spektroskopie in biologischer und pharmazeutischer Forschung vor, das auf der Detektion von Phosphor (³¹P) als NMR-aktivem Kern beruht. Phosphor, ein Spin- $\frac{1}{2}$ -Kern mit einem gyromagnetischen Verhältnis von 17.24 MHz T⁻¹, weist eine natürliche Häufigkeit von 100% auf und wird daher oft in der NMR-Spektroskopie, darunter auch in In-vivo-Untersuchungen, verwendet. Demgegenüber ist uns kein Beispiel für einen Einsatz von ³¹P-NMR-Spektroskopie zum Screening von Substanzbibliotheken bekannt. Phosphor hat jedoch mehrere physikalische und chemische Eigenschaften, die ihn für das Screening prädestinieren. Beispielsweise wird das Problem überlappender Signale, das besonders in ¹H-NMR-Spektren von

Substanzmischungen auftritt, reduziert, da die Liganden in den meisten Fällen nur ein Phosphoratom tragen. Je nach ³¹P-Oxidationszustand und der Natur direkt an das Phosphorzentrum gebundener Atome sind die Signale gebräuchlicher organischer Phosphorverbindungen auf einen Spektralbereich von ungefähr 100 ppm verteilt, was eine Untersuchung von großen Substanzmischungen ermöglicht.

Phosphor weist eine große Anisotropie der chemischen Verschiebung (CSA) auf. Aufgrund der hierdurch bedingten, von der T2-Relaxationszeit abhängigen Linienverbreiterung proteingebundener Liganden sind selbst schwache Wechselwirkungen detektierbar. Verbindungen, die das tetraedrische Intermediat der Peptidbindungshydrolyse („Übergangszustandsanaloga“, siehe hierzu Abbildung 1) nachahmen, z. B.

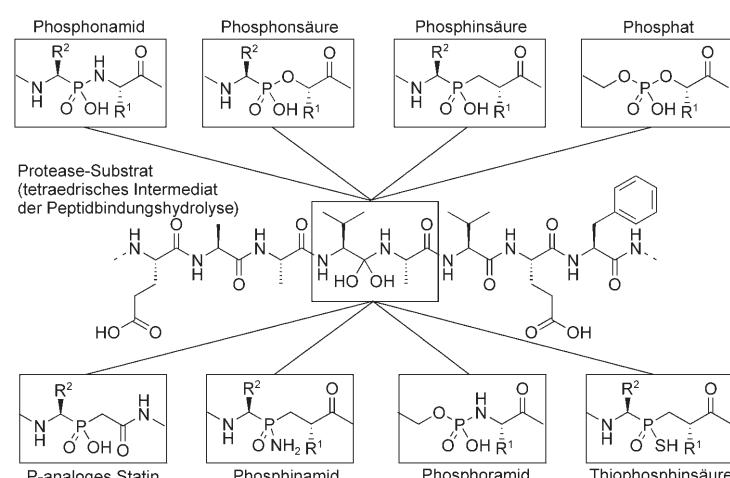


Abbildung 1. Mögliche ³¹P-haltige Isostere für die hydrolysierbare Peptidbindung zum rationalen Design von Protease-Inhibitoren.

Protease-Inhibitoren,^[13-17] enthalten häufig ein Phosphoratom. Daher ist die Detektion von Wechselwirkungen zwischen Proteasen und Liganden ohne zusätzliche Markierung möglich,^[7] wie sie beim Fluor-Screening in den meisten Fällen notwendig ist.

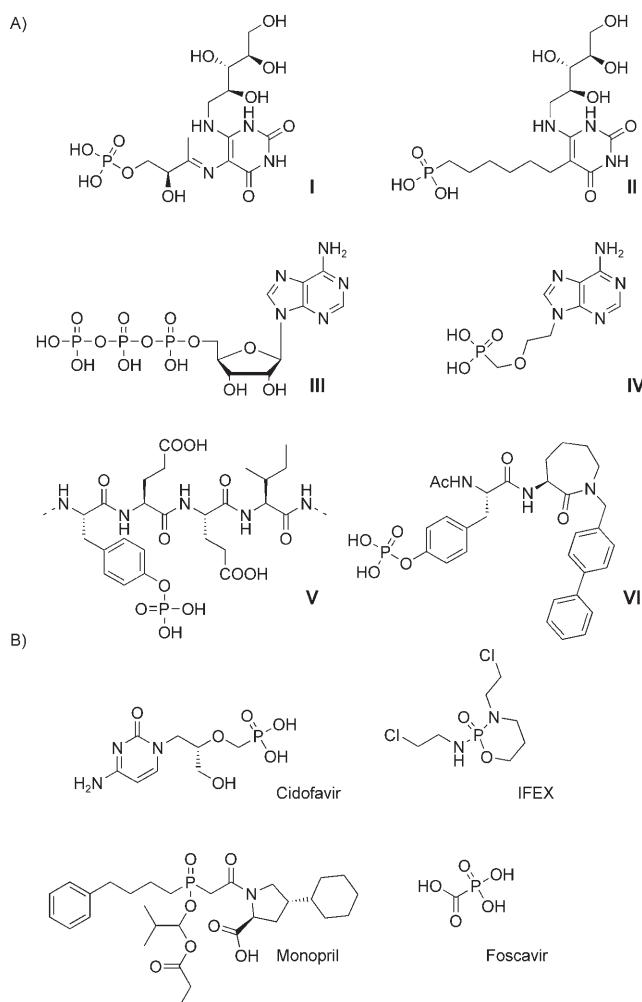
Phosphortragende Moleküle spielen jedoch nicht nur eine wichtige Rolle für Proteasen, sondern auch bei biochemischen Prozessen, z. B. bei Phosphoryltransferreaktionen. Somit kann nach der Identifizierung eines natürlichen, phosphorylierten Substrates dieser Ligand oder ein stabileres Derivat als Reportermolekül für das Screening nach neuen Inhibitoren fungieren. In Schema 1A sind einige Beispiele für dieses Konzept zu finden.^[18-21] Schema 1B zeigt phosphor-

[*] F. Manzenrieder,^[+] A. O. Frank,^[+] Prof. Dr. H. Kessler
Center of Integrated Protein Science an der
Technischen Universität München
Lichtenbergstraße 4, 85747 Garching (Deutschland)
Fax: (+49) 89–289–13210
E-Mail: kessler@ch.tum.de

[+] Diese Autoren haben zu gleichen Teilen zu dieser Arbeit beigetragen.

[**] Wir danken B. Cordes und Dr. R. Haeßner für technische Hilfestellungen.

WWW Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://www.angewandte.de> zu finden oder können beim Autor angefordert werden.

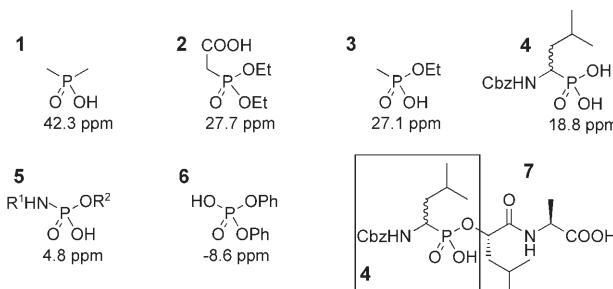


Schema 1. A) Natürliche phosphorylierte Substrate (PS) und ihre ^{31}P -haltigen Analoga (PA) als mögliche Reportermoleküle für das Screening von Ligandenbibliotheken: PS von Lumazin-Synthase (**I**) und PA (**II**) als deren Inhibitor. ATP (Adenosin-5'-triphosphat; **III**) und seine Nucleotid-Analoga wie AMP-PNP (Adenosin-5'-(β,γ -imido)triphosphat; hier nicht gezeigt) oder Hepsera (**IV**), das ein bioverfügbares Medikament zur Behandlung von Hepatitis B durch Inhibierung der Reversen Transkriptase ist. PS des Src-Proteins (**V**) und PA (**VI**) als Inhibitor der Src-SH2-Kinasedomäne. B) Beispiele zugelassener ^{31}P -haltiger Medikamente. Cidofovir ist ein injizierbares, antivirales Mittel gegen *Cytomegalovirus retinitis*. IFEX ist ein alkylierendes Medikament auf Basis des Stickstoff-analogen Senfgases, das bei der Krebstherapie eingesetzt wird. Monopril ist ein Angiotensin-Converting-Enzym-Inhibitor für die Behandlung von Bluthochdruck und chronischen Herzfehlern. Foscavir wirkt gegen Herpes-Viren.

haltige Wirkstoffe, die in den letzten Jahren von der US-amerikanischen Food and Drug Administration (FDA) genehmigt wurden. Das Problem der oftmals geringen Bioverfügbarkeit bei oraler Verabreichung kann durch die Entwicklung von Propharmaka („Prodrugs“) der oben genannten Verbindungen überwunden werden (z.B. Monopril).

Die generelle Anwendbarkeit der hier präsentierten Methode wurde anhand einer Serie von NMR-Experimenten demonstriert. Dafür wählten wir das ausführlich untersuchte Thermolysin-Phosphoramidon-System.^[22] Bei Thermolysin

(ca. 35 kDa) handelt es sich um eine hitzebeständige, Calcium-bindende Zink-Endopeptidase, die aus *Bacillus thermoproteolyticus* isoliert wurde. Phosphoramidon, ein Naturprodukt, das zuerst aus *Streptomyces tanashiensis* isoliert wurde,^[23] enthält eine Phosphoramidoeinheit als Isoster der hydrolysierbaren Peptidbindung und bindet an Thermolysin mit einem K_i -Wert von 28 nm.^[24] Um unsere kleine, repräsentative Molekülbibliothek zu vervollständigen, wurden fünf Substanzen ausgewählt (Schema 2), die einige der in Abbildung 1 gezeigten Isostere enthalten.



Schema 2. Verwendete Substanzen (**1–6**) sowie $\text{CbzL}^{\text{P}}(\text{O})\text{LA}$ (**7**), das **4** als Fragment enthält, mit den chemischen Verschiebungen der Phosphoratome. R^1 : L-Leucyl-L-tryptophan, R^2 : L-Rhamnopyranosyloxy(hydroxyphosphinyl).

Anschließend wurde ein protonenentkoppeltes ^{31}P -1D-Spektrum einer äquimolaren Mischung von **1–4** und **6** (jede Verbindung 0.5 mM) aufgenommen (Abbildung 2A). Als Puffer und interne pH-Kontrolle wurde Hydrogenphosphat verwendet. Da die Signale im Spektrum weit verteilt sind und

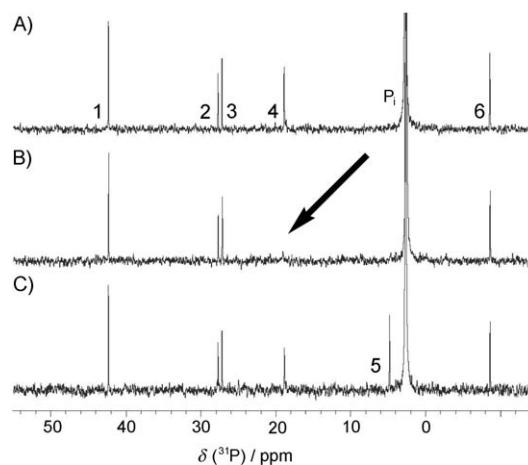


Abbildung 2. ^{31}P -NMR-Spektren einer kleinen Ligandenbibliothek (jede Verbindung 0.5 mM) in Phosphatpuffer (pH 7.5) und 3 mM KBr, um Thermolysin in Lösung zu halten. A) Vor und B) nach Zugabe von Thermolysin (0.25 mM). Das Signal von **4** verschwindet in Gegenwart von Thermolysin (siehe Pfeil). C) Wiederherstellung des verschwundenen Signals durch Zugabe des stark bindenden Phosphoramidons (0.5 mM). Effekte auf die Signalliniendicke zur Identifizierung von Bindern sind bereits bei weniger als 1% der hier verwendeten Protein-Konzentration sichtbar (vgl. Abbildung 3).

jede Substanz durch nur ein Signal repräsentiert wird, ist das Spektrum der Bibliothek einfach, und jedes Signal kann leicht zugeordnet werden. Nach Zugabe von Thermolysin bis zu einer Konzentration von 0.25 mM verschwindet das Signal von **4** fast vollständig, wohingegen alle weiteren Signale unbeeinflusst bleiben (Abbildung 2B). Damit wurde ein neuer Ligand für Thermolysin identifiziert. Aufgrund der Ligand-Rezeptor-Wechselwirkung nimmt das kleine Molekül die schnelle T2-Relaxationszeit des Proteins an, was eine starke Signallinienvbreiterung verursacht und schließlich zum Verschwinden des Ligandensignals führt. Der identifizierte Binder stellte sich als ein Fragment des Moleküls CbzL^P(O)LA (**7**; Cbz = Benzylloxycarbonyl) heraus, das von Bartlett und Marlowe als Thermolysin-Inhibitor entwickelt wurde (Schema 2).^[25] Demzufolge ist die beschriebene Screening-Technik in der Lage, kleine Binder zu finden und eignet sich somit ideal für fragmentbasiertes Wirkstoff-Design (FBDD).^[26,27]

Die große CSA von Phosphor, die eine starke Linienvbreiterung von Signalen bindender Moleküle bedingt, kann beim Vorhandensein unspezifischer Wechselwirkungen zwischen Zielmolekül und Liganden zu einer Identifizierung falsch-positiver „Treffer“ führen. Um fehlerhafte Resultate zu vermeiden und gleichzeitig die Bindung eines Liganden an eine unbekannte aktive Tasche ausschließen zu können, muss die Zugabe eines bekannten, hochaffinen Liganden zur Bibliothek in einer Wiederherstellung des Signals von **4** resultieren. Zur Verdrängung von **4** verwendeten wir den starken Thermolysin-Binder Phosphoramidon (**5**). Wie Abbildung 2C entnommen werden kann, ist das Signal von **4** nach Zugabe von 0.5 mM Phosphoramidon wieder vollständig detektierbar; zudem erscheint der Phosphoramidon-NMR-Peak bei $\delta = 4.8$ ppm. Dies verdeutlicht, dass **4** ausschließlich in der bekannten aktiven Tasche von Thermolysin gebunden wird und beide Verbindungen um die spezifische Wechselwirkung mit dem Protein konkurrieren. Die beschriebene Vorgehensweise kann somit auch für das reporterbasierte Screening eingesetzt werden. Hierbei wird das Signal eines phosphorhaltigen Liganden (siehe Schema 1), der eine schwache Affinität zu einem Zielmolekül aufweist, NMR-spektroskopisch detektiert, während Substanzmischungen jeglicher Art auf ihr Verdrängungspotenzial hin untersucht werden. Kommt es zu einer Wiederherstellung des durch Proteinbindung verbreiterten Reportersignals, ist ein Ligand mit mindestens gleicher oder höherer Bindungsstärke identifiziert.

Um die Empfindlichkeit der neu entwickelten Methode zu testen, wurde die Abhängigkeit der Signalhöhe des Liganden **4** von der Thermolysinkonzentration ermittelt (Abbildung 3). Obwohl **4** zu Beginn der Messung in großem Überschuss gegenüber dem Protein vorlag (die Anfangskonzentration betrug 0.5 mM), verschwand das Ligandensignal bereits bei Zugabe geringer Mengen an Thermolysin fast vollständig (Abbildung 3). Präzise ausgedrückt führte eine Konzentration von 6 μ M Thermolysin zu einer Halbierung der ursprünglichen ^{31}P -Signalhöhe des Binders. Infolge der großen CSA von Phosphor resultiert die Protein-Ligand-Komplexierung in einer deutlich sichtbaren Linienvbreiterung des detektierten Signals. Somit sind lediglich mikromolare oder sogar submikromolare Konzentrationen an Protein

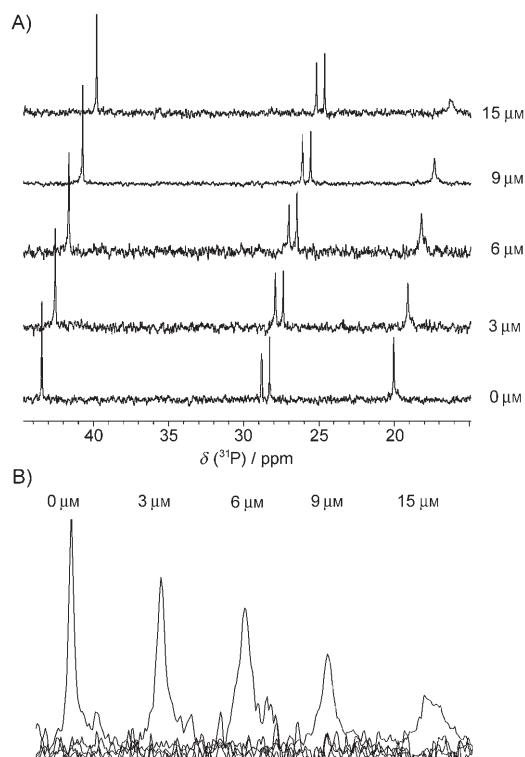


Abbildung 3. A) Ausschnitt gestaffelter eindimensionaler ^{31}P -NMR-Spektren. Substanzbibliothek (**1–4**, 0.5 mM) ohne Protein sowie mit 3, 6, 9 und 15 μM Thermolysin. B) Bei Erhöhung der Proteinkonzentration beobachtet man eine starke Linienvbreiterung des betroffenen Signals von **4**.

notwendig, um mithilfe der Phosphor-Screening-Technik unbekannte Binder zu identifizieren. Zusätzlich zu Abbildung 3 untermauert auch die grafische Auswertung der vorgenommenen Titration (zu finden in den Hintergrundinformationen) die hohe Empfindlichkeit der neuen Screening-Methode, mithilfe derer intermolekulare Wechselwirkungen zwischen Proteinen und kleinen oder mittelgroßen Liganden aufgespürt werden können. Das NMR-Screening wird einerseits durch die Verkürzung der spektroskopischen Analysezeit, andererseits durch das Senken der Kosten für die Proteinproduktion aufgewertet.

Trotz der eingangs erwähnten großen Signaldispersion des Phosphors (mehr als $\delta = 100$ ppm) kann es bei der Untersuchung von Bibliotheken chemisch ähnlicher Substanzen zu einer Überlagerung der Signale im ^{31}P -NMR-Spektrum kommen. Um derartige Schwierigkeiten zu umgehen, kann man zweidimensionale, heteronucleare NMR-Spektren aufnehmen. Anhand eines 2D- ^1H , ^{31}P -COLOC-Experiments (COLOC = Korrelation über Weitbereichskopplungen) wollen wir die Vorteile dieser Vorgehensweise aufzeigen.^[28] In Abbildung 4 ist eine Überlagerung zweier Spektren unserer repräsentativen Substanzbibliothek abgebildet, wobei das Spektrum in Rot die Ligandenmischung nach Zugabe von Thermolysin zeigt. Bei der ausschließlichen Betrachtung der Phosphordimension im Spektrum wird deutlich, dass die Signale von **2** und **3** in unmittelbarer Nähe zueinander liegen.

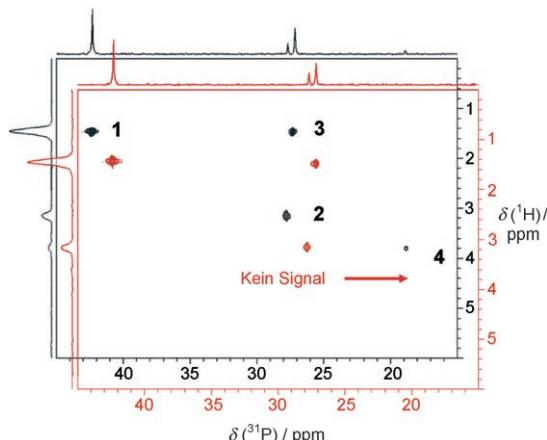


Abbildung 4. Ausschnitt einer Überlagerung von zwei 2D- ^1H - ^{31}P -COLOC-Spektren. Substanzbibliothek (**1–4**, 0.5 mm) ohne (schwarz) und mit 0.25 mm Thermolysin (rot). Die Zugabe des Proteins führt zum Verschwinden des Kreuzsignals von **4**. Die beiden Phosphorsignale, die nahe beieinander bei 27 ppm liegen, sind in der Protonendimension deutlich separiert.

Eine zuverlässige Zuordnung der Signale kann problematisch sein, wenn aufgrund von Wechselwirkungen eine Verschiebung der Ligandenpeaks induziert wird. Die zweidimensionale Aufnahme führt jedoch zu einer klaren Separierung der Kreuzsignale. Eine Identifizierung neuer Liganden ist wie in 1D-Spektren möglich, wie der Verlust des Signals von **4** im rot dargestellten Spektrum zeigt. Zudem sei darauf hingewiesen, dass Signale, die in beiden Dimensionen des 2D-Spektrums ähnliche chemische Verschiebungen aufweisen, anhand der Stärke ihrer Kreuzsignale zugeordnet werden können. Die Möglichkeit, solche Signale zu unterscheiden, fußt auf der nahezu linearen Abhängigkeit der Signalintensität von der Zahl der über zwei Bindungen zum Phosphoratom koppelnden Protonen (siehe hierzu Abbildung 4).

Die hier präsentierte Arbeit belegt, dass Phosphor-Screening von Substanzbibliotheken die bestehenden Techniken verbessert und erweitert. Um den breiten Anwendungsbereich der Methode aufzuzeigen, wurden außer der experimentellen Demonstration unseres Konzeptes auch nützliche Erweiterungen wie Verdrängungsexperimente oder heteronukleare 2D-NMR-Messungen vorgestellt. Da viele Mimetika des tetraedrischen Intermediates der Peptidbindungsspaltung Phosphor enthalten (siehe Abbildung 1), könnte das ^{31}P -NMR-Screening zukünftig eine wichtige Rolle bei der Suche nach neuen Protease-Inhibitoren spielen. Des Weiteren sind stabile Analoga natürlicher, phosphorylierter Substrate ideale Ausgangsverbindungen für den Entwurf von Bibliotheken phosphorhaltiger Substanzen (siehe Schema 1 A). Durch den Einsatz eines ^{31}P -haltigen Reportermoleküls können jedoch auch phosphorfreie Ligandenmischungen untersucht werden. Anders als biologische Screening-Methoden, die fast ausschließlich starke Binder identifizieren können, kann die vorgestellte Technik auch schwache oder mittelstarke Wechselwirkungspartner für ein bestimmtes Zielmolekül aufspüren. Um in diesem Prozess die Zahl falsch-positiver „Treffer“ zu verringern, werden Verdrän-

gungsexperimente sowie der Einsatz von NMR-Spektrometern mit niedrigem statischem Magnetfeld empfohlen. Das Auftreten starker, durch die T2-Relaxationszeit bedingter Linienverbreiterungen, die auf unspezifische Wechselwirkungen zurückgeführt werden, kann auf diese Weise deutlich reduziert werden. Somit stellt das Phosphor-NMR-Screening eine interessante Alternative im Bereich der fragmentbasierten Wirkstoffentwicklung dar.

Experimentelles

Alle NMR-Experimente erfolgten an einem Bruker Avance-250-MHz-Spektrometer, ausgestattet mit einem 5-mm-QNP-Probenkopf. Die Probentemperatur betrug bei allen Messungen 300 K. 10% D_2O wurde als Lock-Signal verwendet. Die 1D- ^{31}P -Spektren wurden mithilfe eines Standardpulsprogrammes (Bruker) aufgenommen, wobei 30°-Anregungspulse, 1.5 s lange „Recycle-Delays“ und eine WALTZ-16-„Power-Gated Composite-Pulse“-Protonenentkopplung angewendet wurden. Für die Aufnahme der heteronuklearen 2D-Spektren wurde das COLOC-Pulsprogramm verwendet.^[28] Zur Entwicklung von Weitbereichskopplungen wurde ein „Delay“ von 25 ms eingesetzt. Bei allen NMR-Experimenten betrug die Zahl an aufgenommenen Punkten in der direkten Dimension 4096. Die verwendete spektrale Breite betrug jeweils 70 ppm. Weitere Details können den Hintergrundinformationen entnommen werden.

Eingegangen am 15. November 2007
Online veröffentlicht am 29. Februar 2008

Stichwörter: Inhibitoren · Ligandenbasiertes NMR-Screening · NMR-Spektroskopie · Substanzbibliotheken · Wirkstoff-Design

- [1] J. Klages, M. Coles, H. Kessler, *Analyst* **2007**, *132*, 692–705.
- [2] S. B. Shuker, P. J. Hajduk, R. P. Meadows, S. W. Fesik, *Science* **1996**, *274*, 1531–1534.
- [3] C. Dalvit, P. E. Fagerness, D. T. Hadden, R. W. Sarver, B. J. Stockman, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 7696–7703.
- [4] B. Meyer, T. Peters, *Angew. Chem.* **2003**, *115*, 890–918; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42*, 864–890.
- [5] M. Mayer, B. Meyer, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 6108–6117.
- [6] K. E. Kövér, P. Groves, J. Jimenez-Barbero, G. Batta, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 11579–11582.
- [7] C. Dalvit, M. Flocco, M. Veronesi, B. J. Stockman, *Comb. Chem. High Throughput Screening* **2002**, *5*, 605–611.
- [8] T. Tengel, T. Fex, H. Emtenas, F. Almqvist, I. Sethson, J. Kihlb erg, *Org. Biomol. Chem.* **2004**, *2*, 725–731.
- [9] S. Vanwetswinkel, R. J. Heetebij, J. van Duynhoven, J. G. Hollander, D. V. Filippov, P. J. Hajduk, G. Siegal, *Chem. Biol.* **2005**, *12*, 207–216.
- [10] W. Jahnke, *J. Biomol. NMR* **2007**, *39*, 87–90.
- [11] M. Coles, M. Heller, H. Kessler, *Drug Discovery Today* **2003**, *8*, 803–810.
- [12] B. Luy, A. O. Frank, H. Kessler in *Molecular Drug Properties: Measurement and Prediction* (Hrsg.: R. Mannhold), Wiley-VCH, Weinheim, **2008**, S. 207–254.
- [13] F. Manzenrieder, A. O. Frank, T. Huber, C. Dorner-Ciossek, H. Kessler, *Bioorg. Med. Chem.* **2007**, *15*, 4136–4143.
- [14] B. Turk, *Nat. Rev. Drug Discovery* **2006**, *5*, 785–799.
- [15] P. A. Bartlett, M. A. Giangiordano, *J. Org. Chem.* **1996**, *61*, 3433–3428.
- [16] M. Collinsonova, J. Jiracek, *Curr. Med. Chem.* **2000**, *7*, 629–647.
- [17] G. R. Stark, P. A. Bartlett, *Pharmacol. Ther.* **1983**, *23*, 45–78.
- [18] M. Cushman, J. T. Mihalic, K. Kis, A. Bacher, *J. Org. Chem.* **1999**, *64*, 3838–3845.

- [19] T. Yokota, K. Konno, S. Shigeta, A. Holy, J. Balzarini, E. Declercq, *Antiviral Chem. Chemother.* **1994**, *5*, 57–63.
- [20] L. M. Elphick, S. E. Lee, V. Gouverneur, D. J. Mann, *ACS Chem. Biol.* **2007**, *2*, 299–314.
- [21] D. Lesuisse, G. Lange, P. Deprez, D. Bénard, B. Schoot, G. Delattre, J. Marquette, P. Broto, V. Jean-Baptiste, P. Bichet, E. Sarubbi, E. Mandine, *J. Med. Chem.* **2002**, *45*, 2379–2387.
- [22] P. Gettins, *J. Biol. Chem.* **1988**, *263*, 10208–10211.
- [23] H. Umezawa, *Meth. Enzymol.* **1976**, *45*, 678–695.
- [24] B. W. Matthews, *Acc. Chem. Res.* **1988**, *21*, 333–340.
- [25] P. A. Bartlett, C. K. Marlowe, *Biochemistry* **1987**, *26*, 8553–8561.
- [26] D. A. Erlanson, R. S. McDowell, T. O'Brien, *J. Med. Chem.* **2004**, *47*, 3463–3482.
- [27] R. A. E. Carr, M. Congreve, C. W. Murray, D. C. Rees, *Drug Discovery Today* **2005**, *10*, 987–992.
- [28] H. Kessler, C. Griesinger, J. Zarbock, H. R. Loosli, *J. Magn. Reson.* **1984**, *57*, 331–336.