

Gesteigerte Wirksamkeit durch Synergismus: Verknüpfung unabhängiger Wirkstoffklassen zu Hybridsubstanzen**

Andreas Müller-Schiffmann, Julia März-Berberich, Aksana Andreyeva, Raik Rönicke, Dirk Bartnik, Oleksandr Brener, Janine Kutzsche, Anselm H. C. Horn, Marco Hellmert, Jolanta Polkowska, Kurt Gottmann, Klaus G. Reymann, S. Aileen Funke, Luitgart Nagel-Steger, Christine Moriscot, Guy Schoehn, Heinrich Sticht, Dieter Willbold, Thomas Schrader und Carsten Korth*

Die Wirksamkeit von Pharmazeutika lässt sich klassischerweise nur durch einen schrittweisen Prozess verbessern: durch das systematische Modifizieren des chemischen Grundgerüsts der Ausgangssubstanz. Bisher nahm man an, dass die maximale pharmakologische Wirkung zweier unterschiedlicher Wirkstoffklassen nur durch gleichzeitige Verabreichung der optimierten Einzelsubstanzen zu erreichen sei. Für den besonderen Fall, dass zwei unabhängige Substanzklassen auf dasselbe Molekül abzielen, bestand unsere Idee nun darin, durch ihre chemische Verknüpfung zu einer Hy-

bridsubstanz einen synergistischen Effekt zu erzielen: Die resultierende Wirksamkeit sollte die Summe der Wirkungen der Ausgangssubstanzen deutlich übertreffen. Solche multifunktionellen Hybridsubstanzen, in denen unterschiedliche Hybridsubstansteile unterschiedliche Funktionen ausüben, um einen synergistischen pharmakodynamischen Effekt zu erzielen, haben bekannte Vorbilder in der Natur: So wurde z. B. Bleomycin als natürliche Substanz mit drei Substansteilen beschrieben, die im Zusammenspiel DNA spalten.^[1]

Wir beschreiben hier eine neue, rational entworfene Klasse von Hybridsubstanzen, die die Auflösung neurotoxischer Amyloid-beta(A β)-Oligomere bewirken. Ausgedehnte β -Faltblattstrukturen in A β -Oligomeren oder Amyloid sind ein Kennzeichen des Morbus Alzheimer. Die Fehlprozessierung des amyloidogenen Fragments A β , das aus der proteolytischen Prozessierung des Amyloid-Precursor-Proteins (APP) entsteht, ist der Ausgangspunkt einer Abfolge molekularer Reaktionen, die mit der Oligomerisierung von A β beginnen und mit massivem Absterben der Neuronen im Gehirn enden.^[2] Rational entworfene, kleine organische Moleküle, die an β -Faltblattstrukturen binden und diese auflösen (β -Faltblattbrecher, „ β -sheet breaker“), sind in zellfreien In-vitro-Systemen sehr effizient, waren aber wegen ihrer stark unspezifischen Bindung bislang in vivo nicht sehr wirkungsvoll.

Unsere Überlegung war daher, die Wirksamkeit kleiner organischer β -Faltblattbrecher durch Hinzufügen einer molekularen Erkennungsdomäne zu verbessern, den β -Faltblattbrecher also als Bestandteil einer neuen Hybridsubstanz zum Zielmolekül zu lotsen. Molekulare Erkennung ist eine Grundeigenschaft von Polypeptiden, die durch die Verwendung von evolutionären Algorithmen (z. B. Phagen-Display) iterativ identifiziert und optimiert werden kann. Auf diese Weise fanden wir in einem Spiegelbild-Phagen-Display^[3,4] das D3-Peptid, ein D-enantiomeres Dodecapeptid, das über seine spezifische Wechselwirkung die A β -Aggregation, Plaquebildung und neuroinflammatorische Prozesse in Hirnen von transgenen (APP^{sw}/PSDE9)-Mäusen modulieren kann.^[3,5]

In unserer Hybridsubstanz (Abbildung 1) würden wir somit zwei völlig unterschiedliche Strategien der Substanzentwicklung miteinander vereinen: einerseits die evolutionär geleitete Selektion aus Bibliotheken und andererseits die Verwendung rational entworfener niedermolekularer organischer Substanzen. Als β -Faltblattbrecher wählten wir die Aminopyrazole, die eine spezifische Donor-Akzeptor-Donor-

[*] Dr. A. Müller-Schiffmann,^[1] Dr. J. Kutzsche, Prof. Dr. C. Korth
Institut für Neuropathologie
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
40225 Düsseldorf (Deutschland)
Fax: (+49) 211-811-7804
E-Mail: ckorth@uni-duesseldorf.de

Dr. J. März-Berberich,^[1] Dipl.-Chem. M. Hellmert, Dr. J. Polkowska,
Prof. Dr. T. Schrader
Institut für Organische Chemie
Universität Essen-Duisburg (Deutschland)

Dr. A. Andreyeva, Prof. Dr. K. Gottmann
Institut für Neuro- und Sinnesphysiologie
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf (Deutschland)

Dr. R. Rönicke, Prof. Dr. K. G. Reymann
Deutsches Zentrum für Neurodegenerative Erkrankungen
Standort Magdeburg (Deutschland)

Dr. D. Bartnik, Dr. S. A. Funke
Institut für Strukturbiologie und Biophysik
FZ Jülich (Deutschland)

Dr. O. Brener, Dr. L. Nagel-Steger, Prof. Dr. D. Willbold
Institut für Physikalische Biologie
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf (Deutschland)

Dr. C. Moriscot, Prof. Dr. G. Schoehn
Institute for Structural Biology Jean-Pierre Ebel
Université Joseph Fourier, Grenoble (Frankreich)

Dr. A. H. C. Horn, Prof. Dr. H. Sticht
Institut für Biochemie
Universität Erlangen-Nürnberg (Deutschland)

[†] Beide Autoren haben gleichermaßen zu dieser Arbeit beigetragen.

[**] Diese Arbeit wurde finanziell von der Volkswagen-Stiftung (C.K., T.S., D.W. und H.S.; I/82 649), der EU (C.K.; EU-FP6 (cNEUPRO), EU-FP7 (PRIORITY)) und der DFG (J.K., C.K.; GRK1033) unterstützt.



Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag (vollständige experimentelle Details) sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.201004437> zu finden.

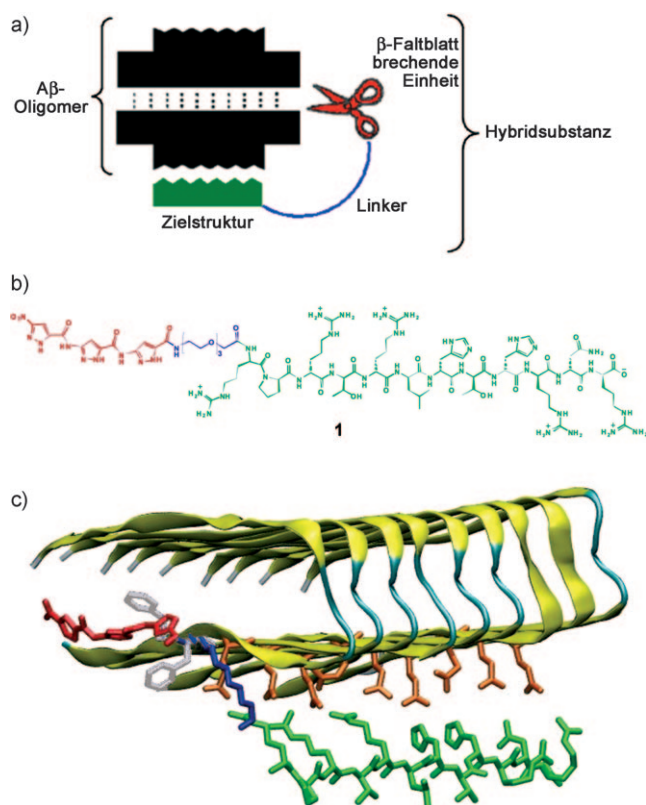


Abbildung 1. Design, Funktion und Modellierung der Hybridsubstanzen. a) Schema der Hybridsubstanz, bestehend aus einem molekularen Erkennungsteil, der die Bindung an das Zielmolekül bewirkt (hier: Aβ-Oligomere), und einem funktionellen Teil, der mit der intermolekularen β-Faltblattstrukturbindung wechselwirkt. Die Hybridsubstanzteile sind über einen flexiblen Linker verbunden. b) Chemische Struktur der Leit-Hybridsubstanz Trimer-TEG-D3 (1). c) Modellierung des Aβ-1-Komplexes. Die Seitengruppen der Glutamatreste (orange) an Position 22 in nebeneinander liegenden Aβ-Monomeren (gelb) sind in räumlicher Nähe angeordnet und binden an die basischen Aminosäureseitenketten des D3-Peptids (grün). Das Aminopyrazol-Trimer (rot) bindet an Aβ durch Wechselwirkung mit den beiden Phenylalaninresten an den Positionen 19 und 20 (in Grau). Die Farbkodierung der unterschiedlichen Teile von 1 entspricht jener von (a) und (b).

Sequenz von Wasserstoffbrückendonoren und -akzeptoren aufweisen, die zu der von peptidischen β-Faltblattstrukturen gebildeten perfekt komplementär ist,^[6] somit selektiv an das Grundgerüst fehlgefalteter Peptide in β-Faltblatt-Konformation binden^[7] und auch bereits gebildete Aβ-Fibrillen in vitro auflösen kann.^[8]

Mit Molecular Modeling und Moleküldynamiksimulationen untersuchten wir die Wechselwirkung von Aβ^[9] mit den Aminopyrazol-Einheiten, die mit dem D3-Peptid über Linker verschiedener Länge verbunden sind. In gleicher Weise wurde ein Pentalysinpeptid (KKKKKG) als Ladungskontrollpeptid für D3 modelliert. Auf Grundlage unserer experimentellen Befunde (Abbildung 1 in den Hintergrundinformationen) wurde eine Wechselwirkung des Aminopyrazol-teils der Hybridsubstanz mit dem diaromatischen Motiv F19/F20 modelliert, wobei der D3-Teil in räumlicher Nähe zur negativ geladenen Oberfläche der Aβ-Protofibrille positioniert wurde, um die elektrostatische Komplementarität zu maximieren (siehe auch Hintergrundinformationen). Diese

Simulationen ergaben, dass nach 10 ns die mehrfachen Wechselwirkungen zwischen dem D3-Peptid und den E22-Aminosäureresten von Aβ stabil bleiben (Abbildung 1c; Abbildung 2 in den Hintergrundinformationen), wogegen zwischen dem Pentalysinteil und der Aβ-Protofibrille nur eine Salzbrücke erhalten bleibt (Abbildung 2D in den Hintergrundinformationen). Dies erklärt, warum D3 aktiver ist als andere Substanzen (Abbildung 2a; Abbildung 4B in den Hintergrundinformationen).

Die Zugabe der Hybridsubstanz mit einem Triethylen-glycol(TEG)-Linker, Trimer-TEG-D3 (1) genannt, zu konstant Aβ-Oligomere sezernierenden Zellen (7PA2-Zellen^[10]) ergab eine dosisabhängige Inhibition der Aβ-Oligomerisierung (Abbildung 2a,b). Die getrennte Zugabe der Einzelsubstanzen oder die gleichzeitige Gabe beider Einzelsubstanzen in jeweils den gleichen Konzentrationen hatte in diesem Assay keine Wirkung – damit konnten wir die starke synergistische Wirkung der beiden kovalent verbundenen Komponenten dieser multifunktionellen Hybridsubstanz sowie die Entstehung einer neuen Funktion demonstrieren (Abbildung 2a). Nach Zugabe von 1 verringerte sich nur die Aβ-Oligomerfraktion signifikant, während die Aβ-Monomere unverändert blieben; es kam auch zu keinem Anstieg C-terminaler APP-Fragmente, was darauf schließen lässt, dass 1 weder die Aβ-Monomerproduktion noch die γ-Sekretase inhibiert (Abbildung 2a). Auch sehr hohe Konzentrationen von jeder der Einzelsubstanzen oder deren Kombination führten nicht zu einer Verringerung von Aβ-Oligomeren (Abbildung 3 in den Hintergrundinformationen); 1 war nur in einem Konzentrationsbereich > 100 μM toxisch (Abbildung 4 in den Hintergrundinformationen).

Eine Hybridsubstanz mit einem D-Peptid „D1“, das Aβ an einem anderen Epitop bindet, wurde hergestellt, um die Spezifität des D3-Anteils in der Erkennung des Zielmoleküls zu prüfen.^[4] Mit dieser Substanz konnte lediglich eine schwache Inhibition der Aβ-Oligomerisierung beobachtet werden (Abbildung 2a). Weiterhin – und wie auf Grundlage der Moleküldynamiksimulation vorhergesagt – hatte das AP-Pentalysinhybrid keine Auswirkungen auf die Bildung von Aβ-Oligomeren (Abbildung 5B in den Hintergrundinformationen).

Nach unserem Konzept der synergistisch wirkenden Hybridsubstanzen sollte der Länge des Linkers zwischen den beiden Komponenten eine entscheidende Bedeutung zukommen. Überlegungen zu den strukturellen und energetischen Eigenschaften der Hybridsubstanz legten den Schluss nahe, dass ein kürzerer Linker wegen eines kleineren entropischen Verlustes bei der Bindung eine stärkere Affinität haben sollte, während längere Linker unvorteilhaft sein sollten. Durch die Synthese von Hybridsubstanzen ohne Linker sowie mit einer kürzeren γ-Aminobuttersäure(GABA)-Brücke oder einer längeren (TEG)₂-Brücke (Abbildung 5A in den Hintergrundinformationen) wurde diese Vorhersage bestätigt, da sich die Hybride ohne Linker oder mit der fünfatomigen GABA-Brücke durch eine deutlich stärkere Inhibition der Aβ-Oligomerisierung auszeichneten (Abbildung 5B,C in den Hintergrundinformationen).

Synaptische Pathologie ist eine wesentliche biologische Wirkung von Aβ-Oligomeren, die von 1 revertiert werden

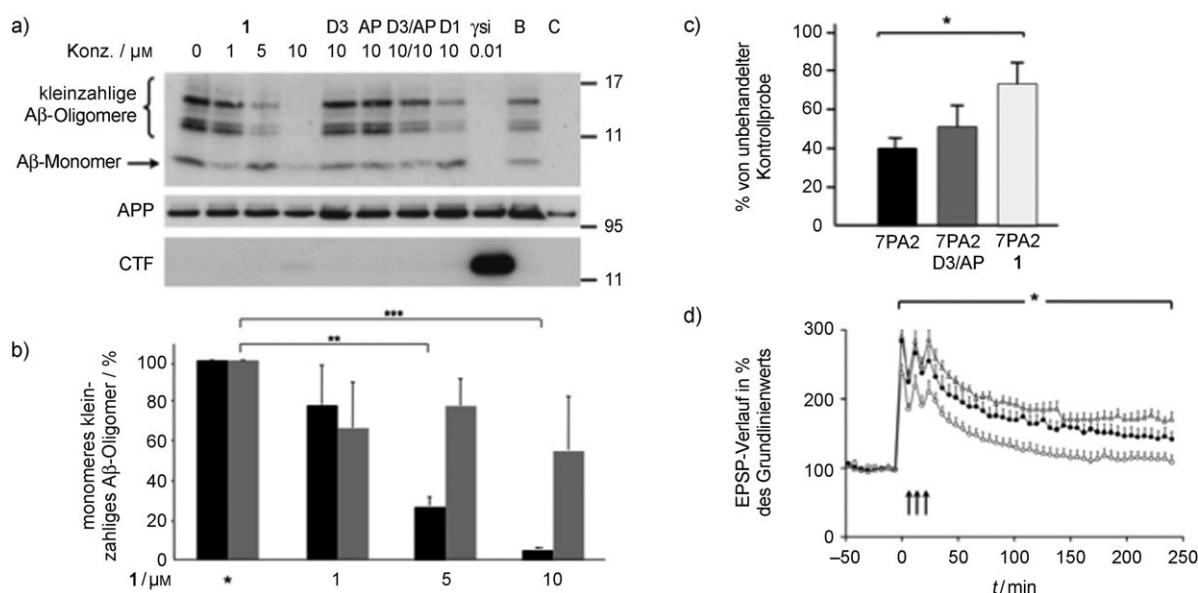


Abbildung 2. Biochemische und biologische Effekte der Hybridsubstanzen. a) Western Blot der immunpräzipitierten Aβ-Oligomere und -Monomere von 7PA2-Zellen, die mit verschiedenen Substanzen behandelt wurden. Die Zugabe von **1** führte zu einer dosisabhängigen Reduzierung von Aβ-Oligomeren. Behandlung mit D-Peptid (D3), Aminopyrazol-Trimer (AP), jeweils alleine oder zusammen (D3/AP) verabreicht, ergab hingegen keine Verringerung der Menge an Aβ-Oligomer. Weitere Kontrollexperimente umfassten die Gabe einer Hybridsubstanz mit einem anderen D-Peptid (10 μM; D1), die Gabe des γ-Sekretase-Inhibitors (γsi) LY411575 (10 nM), 7PA2-Zellen, die mit der AP lösenden Substanz DMSO in gleichen Konzentrationen behandelt wurden (B), sowie untransfizierte CHO-Zellen, die keine Aβ-Oligomere sezernieren (C). Die Expression von APP und die Abwesenheit von C-terminalen APP-Fragmenten (CTF) nach Gabe der Substanzen werden in den unteren Bildern gezeigt. b) Vergleich fünf unabhängiger Experimente von 7PA2-Zellen, die mit **1** in Konzentrationen von 1, 5 und 10 μM behandelt wurden und die eindeutige Wirkungen auf Aβ-Oligomere zeigten (*** $p=0.0007$, ** $p=0.0082$), wogegen monomeres Aβ nicht signifikant verändert war (oligomeres Aβ schwarze Balken, monomeres Aβ graue Balken). c) 10 μM **1**, nicht aber die Kombination beider Einzelsubstanzen mit 10 μM, reversionierte die Wirkung von 7PA2-Zellkulturüberstand auf die mEPSC-Frequenz in primären neuronalen Zellkulturen der Maus. Eine signifikante Reversion der mEPSC-Suppression war sichtbar (* $p<0.025$ gemäß studentischem t-Test nach Bonferroni-Korrektur). Die Balken repräsentieren den Durchschnittswert \pm Standardfehler (Hintergrundinformationen für Details). d) **1** verhinderte die Aβ-vermittelte Verminderung der LTP in akuten organotypischen Hippokampusschnitten; EPSP = excitatorische postsynaptische Potentiale. Verglichen mit dem Leerkontrollexperiment (●) reduzierte oligomeres Aβ signifikant die Aβ-vermittelte Verminderung von LTP (○); diese Verminderung konnte durch gleichzeitige Gabe von 10 μM **1** verhindert werden (△; * $p<0.05$ gemäß Varianzanalyse (ANOVA) mit wiederholten Messungen; statistische Signifikanz zwischen dem Kontrollexperiment und Aβ sowie zwischen Aβ und Aβ/1).

sollte. **1** blockierte die Aβ-Oligomer-induzierte Verringerung der mEPSC-Frequenz (mEPSC = spontaner excitatorischer postsynaptischer Miniaturstrom), die durch AMPA-Rezeptoren vermittelt wird,^[11] in primären kortikalen Neuronen, änderte aber nicht die durchschnittliche mEPSC-Amplitude. Diese Wirkung wurde ausschließlich durch Applikation von 10 μM **1** erreicht, aber nicht durch Applikation der Einzelsubstanzen oder eine Kombination beider Einzelsubstanzen (Abbildung 2c). Ebenso konnte die Aβ-Oligomer-induzierte Verringerung der Langzeit-Potenzierung (Long Term Potentiation, LTP),^[12] einer Form der synaptischen Plastizität, in organotypischen hippokampalen Hirnschnittkulturen durch Gabe von 10 μM **1** reversioniert werden (Abbildung 2d). Diese Resultate zeigten in zwei unabhängigen Modellen, dass **1** die Aβ-induzierte Synaptotoxizität verhindern kann.

Die verbesserte Bindung der beiden Komponenten von **1** an Aβ-Oligomere sollte deren weitere Multimerisierung zu Amyloidfibrillen verhindern. In der analytischen Ultrazentrifugation von synthetischem Aβ^[13] zeigte sich eine gleichmäßige Verteilung von Aβ durch alle multimeren Fraktionen in vitro (Abbildung 3a, oben). Nach Vorinkubation von Aβ mit **1** verschob sich Aβ von den oligomeren Fraktionen zu den

hochmolekularen Fraktionen (Abbildung 3a, Mitte), als Hinweis auf eine direkte Wechselwirkung von **1** mit Aβ-Oligomeren mit Folgen für die Aβ-Aggregation. Da die Thioflavin-T(ThT)-Fluoreszenz von Aβ als Indikator für die Gegenwart von Amyloidfibrillen aber nach Gabe von **1** abnahm (Abbildung 3b), können diese hochmolekularen Fraktionen keine Aβ-Fibrillen sein, sondern sind eher als irregulär strukturierte, hochmolekulare Komplexe zu sehen. Dementsprechend konnten bei der Untersuchung dieser Aβ/1-Mischturen mit der Transmissionselektronenmikroskopie auch keine fibrillären Strukturen gefunden werden (Abbildung 6 in den Hintergrundinformationen). Dies ist ein weiterer Hinweis darauf, dass **1** die Aβ-Oligomer-Bildung hin zu ungiftigen, nichtamyloiden Komplexen verschiebt. Ähnlich wie für die Inhibierung der Bildung der nativen Aβ-Oligomere aus 7PA2-Zellen (Abbildung 5C in den Hintergrundinformationen) konnten wir auch im zellfreien ThT-Assay eine Struktur-Aktivitäts-Beziehung der Hybridsubstanzen sehen (Abbildung 3b), mit der Substanz ohne Linker als aktivstem Wirkstoff. Unsere biophysikalische Analyse mit drei unabhängigen Methoden sowie die Tatsache, dass die Konzentration des monomeren Aβ bei Verringerung der Aβ-Oligomer-Kon-

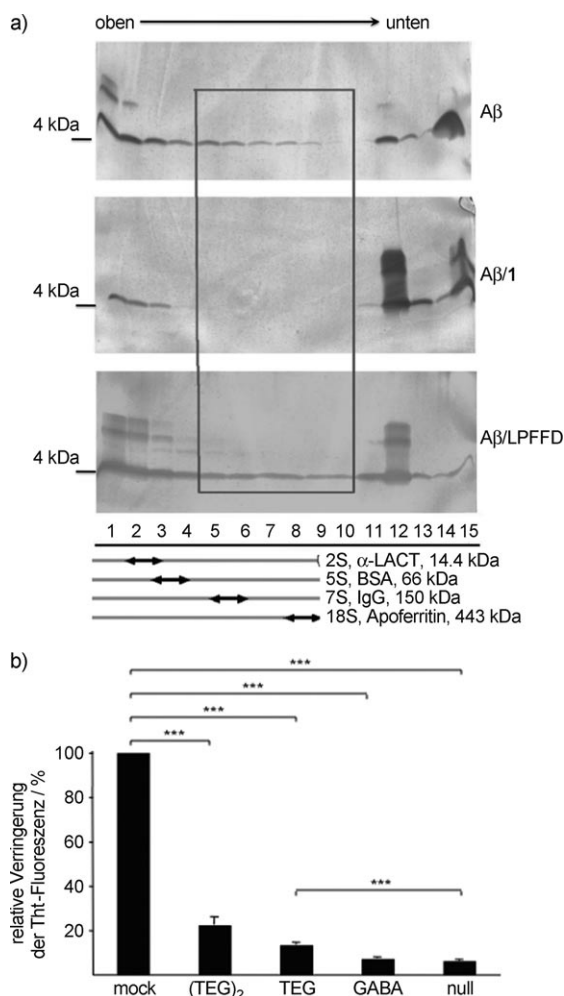


Abbildung 3. Biophysikalische Charakterisierung der Auswirkungen der Hybridspezies auf den Prozess der Aβ-Zusammensetzung. a) Analyse der Auswirkungen von 1 auf die Aβ-Aggregation mithilfe analytischer Ultrazentrifugation und Darstellung durch SDS-PAGE mit Silberfärbung. Kontinuierliche Fraktionen wurden nach Masse von leicht (links) bis schwer (rechts) aufgetragen: monomeres Aβ ist in den leichtesten Fraktionen (Spur 1), oligomeres Aβ in den rot umrandeten Fraktionen (Spuren 5–10), und multimeres, aggregiertes Aβ ab Spur 12 zu sehen. Anders als bei unbehandeltem Aβ [125 μM] (oberes Bild) oder kontrollbehandeltem Aβ (unteres Bild) führte die Zugabe von 1 [62.5 μM] (mittleres Bild) zu einer Verschiebung der oligomeren Fraktionen zu hochmolekularen, nichtamyloiden Fraktionen. Eine Kalibrierung der Fraktionen nach Sedimentationskoeffizienten S (schwarze Doppelpfeile) erfolgte mit α-Lactalbumin (α-LACT), Rinderserumalbumin (BSA), Immunglobulin G (IgG) und Apoferritin. b) Inhibierung der ThT-positiven Aβ-Fibrillogenese durch 1 (TEG) und Hybridspezies mit kürzerem (GABA-) oder längerem (TEG₂-) Linker sowie ohne Linker (null); mock = unbehandelte Kontrolle. Mittelwerte ± Standardabweichungen von vier verschiedenen Läufen mit jeweils drei Wiederholungen: *** $p < 0.001$ gemäß studentschem t-Test. Klare anti-amyloide Wirkungen von allen Hybridspezies, mit der Substanz ohne Linker als stärkstem Wirkstoff.

zentration nicht anstieg (Abbildungen 2b, 3a), lassen uns schlussfolgern, dass die Hybridspezies nicht direkt die Aβ-Oligomer-Bildung hemmen, sondern zu einer inkorrekt-

ten, bioinaktiven und nichtamyloiden Aβ-Fehlzusammensetzung führen, die – möglicherweise – leichter abgebaut werden kann.

Wir konnten zeigen, dass die chemische Verknüpfung zweier völlig unterschiedlicher, am gleichen Zielmolekül angreifender Substanzklassen unter Bildung einer neuen, kovalent verbundenen Hybridspezies in einer synergistischen oder gar neuen Wirkung resultiert. Am Beispiel der Auflösung von Aβ-Oligomeren konnten wir außerdem demonstrieren, dass zwei grundverschiedene Prinzipien der Substanzentwicklung kombiniert werden können: 1) Polypeptide, identifiziert mithilfe evolutionärer Algorithmen auf molekulare Zielerkennung im Spiegelbild-Phagendisplay-System und 2) rational entworfene, niedermolekulare organische β-Faltblattbrecher. Unsere Untersuchungen lassen darauf schließen, dass ähnliche Vorgehensweisen auch bei anderen Zielmolekülen erfolgreich sein könnten und dass auf diese Weise die Entwicklung effizienter pharmakologischer Substanzen stark beschleunigt werden könnte.

Eingegangen am 20. Juli 2010

Online veröffentlicht am 4. Oktober 2010

Stichwörter: Aggregation · Amyloide β-Peptide · Molekulare Erkennung · Peptide · Wirkstoff-Design

- [1] B. Meunier, *Acc. Chem. Res.* **2008**, *41*, 69–77.
- [2] C. Haass, D. J. Selkoe, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2007**, *8*, 101–112.
- [3] T. van Groen, K. Wiesehan, S. A. Funke, I. Kadish, L. Nagel-Steger, D. Willbold, *ChemMedChem* **2008**, *3*, 1848–1852.
- [4] K. Wiesehan, K. Buder, R. P. Linke, S. Patt, M. Stoldt, E. Unger, B. Schmitt, E. Bucci, D. Willbold, *ChemBioChem* **2003**, *4*, 748–753.
- [5] S. A. Funke, T. van Groen, I. Kadish, D. Bartnik, L. Nagel-Steger, O. Brener, T. Sehl, R. Batra-Safferling, C. Moriscot, G. Schoehn, A. H. C. Horn, A. Müller-Schiffmann, C. Korth, H. Sticht, D. Willbold, *ACS Chem. Neurosci.* **2010**, *1*, 639–648.
- [6] T. Schrader, C. Kirsten, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 12061–12068.
- [7] P. Rzepecki, T. Schrader, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 3016–3025.
- [8] P. Rzepecki, L. Nagel-Steger, S. Feuerstein, U. Linne, O. Molt, R. Zadnarm, K. Aschermann, M. Wehner, T. Schrader, D. Riesner, *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 47497–47505.
- [9] T. Lührs, C. Ritter, M. Adrian, D. Riek-Loher, B. Bohrmann, H. Dobeli, D. Schubert, R. Riek, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2005**, *102*, 17342–17347.
- [10] M. B. Podlisny, B. L. Ostaszewski, S. L. Squazzo, E. H. Koo, R. E. Rydell, D. B. Teplow, D. J. Selkoe, *J. Biol. Chem.* **1995**, *270*, 9564–9570.
- [11] a) G. M. Shankar, B. L. Bloodgood, M. Townsend, D. M. Walsh, D. J. Selkoe, B. L. Sabatini, *J. Neurosci.* **2007**, *27*, 2866–2875; b) G. M. Shankar, S. Li, T. H. Mehta, A. Garcia-Munoz, N. E. et al., *Nat. Med.* **2008**, *14*, 837–842.
- [12] M. J. Rowan, I. Klyubin, Q. Wang, N. W. Hu, R. Anwyl, *Biochem. Soc. Trans.* **2007**, *35*, 1219–1223.
- [13] R. V. Ward, K. H. Jennings, R. Jepras, W. Neville, D. E. Owen, J. Hawkins, G. Christie, J. B. Davis, A. George, E. H. Karran, D. R. Howlett, *Biochem. J.* **2000**, *348*, 137–144.