

# Von konventionellen zu ungewöhnlichen Gerüsten für Enzyminhibitoren: das Streben nach Spezifität

Eric Meggers\*

Chemische Biologie · Enzyminhibitoren · Medizinische Chemie · Selektivität · Wirkstoffentwicklung

**D**ie enorme Herausforderung der spezifischen molekularen Erkennung einzelner biomakromolekularer Ziele innerhalb komplexer biologischer Systeme erfordert neuartige und kreative Strategien. Dieser Kurzaufsatz beschäftigt sich sowohl mit einigen konventionellen als auch mit ungewöhnlichen Herangehensweisen an die Entwicklung von selektiven Enzyminhibitoren mit besonderem Augenmerk auf die dazu verwendeten chemischen Grundgerüste. Diese beinhalten zum Beispiel komplizierte naturproduktähnliche organische Moleküle, stabile oktaedrische Metallkomplexe, Fullerene, Carborane, polymetallische Cluster und sogar Polymere. Somit ist das ganze Repertoire der organischen, anorganischen und makromolekularen Chemie verfügbar, um die Herausforderung der zielspezifischen Enzyminhibition anzugehen.

## 1. Einleitung

Chemische Verbindungen, die wirkungsvolle und selektive Regler von biomakromolekularen Funktionen darstellen, werden in der biologischen und medizinischen Forschung als Reagentien hochgeschätzt und oft als „chemische Sonden“ oder „molekulare Sonden“ bezeichnet.<sup>[1–3]</sup> Solche Verbindungen haben eine eigenständige Bedeutung, selbst wenn sie wegen unerwünschter pharmakokinetischer oder pharmakodynamischer Eigenschaften nicht als Wirkstoffkandidaten in Erwägung gezogen werden. Ein Schlüsselkriterium für die Qualität und den Nutzen solcher synthetischer Verbindungen ist die Selektivität bezüglich einer bestimmten Zielstruktur („target“),<sup>[4]</sup> die unter anderem ein bestimmtes Enzym sein kann, ein Rezeptor an der Zelloberfläche, ein nuklearer Hormonrezeptor, Ionenkanal, Transporter oder eine Nukleinsäure. Berücksichtigt man die große Zahl verschiedener Proteine in einer Zelle – das menschliche Genom enthält ungefähr 20 000–25 000 proteinkodierende Gene<sup>[5]</sup> – zuzüglich der vorhandenen Nukleinsäuren, Kohlenhydrate, Membranen, Cofaktoren und anderer kleiner Moleküle, so ist es eine

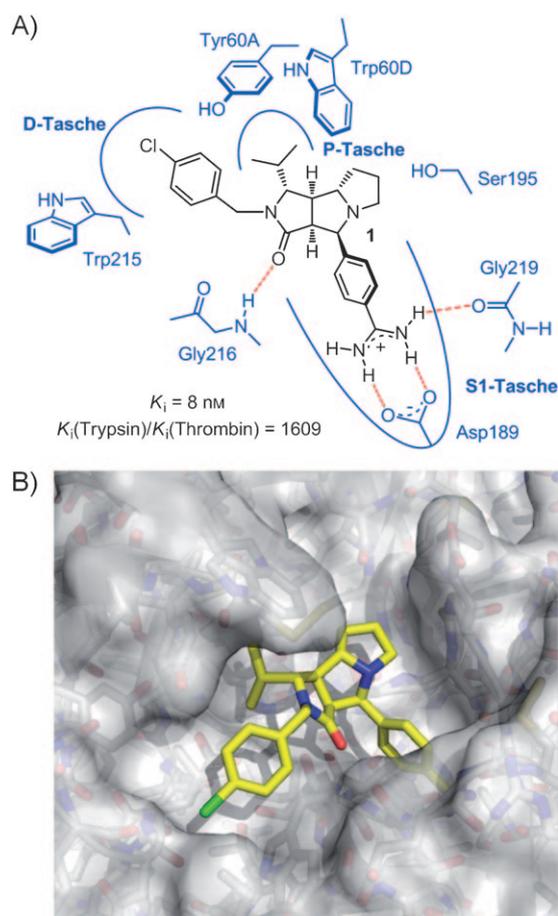
wirklich außergewöhnliche Herausforderung der molekularen Erkennung, Verbindungen zu entwickeln, die eine ausschließliche Zielselektivität („Zielspezifität“) für gewünschte Proteine erreichen.<sup>[6]</sup> Dies stellt ein umso größeres Dilemma bei solchen Zielproteinen dar, die Mitglieder von großen und homologen Proteinfamilien sind, etwa bei Proteinkinasen, Lipidkinasen und Proteasen.<sup>[7,8]</sup> Es kann daher bezweifelt werden, dass das herkömmliche kleine und strukturell eher einfache organische Molekül theoretisch überhaupt in der Lage ist, eine völlige Spezifität zu erreichen, da es nur eine begrenzte Zahl an möglichen Wechselwirkungen mit seiner Zielstruktur eingehen kann, kombiniert mit einer hohen konformativen Flexibilität, die typischerweise eine unerwünschte Bindungspromiskuität zur Folge hat.

Daher sind neue und kreative Strategien zur Entwicklung von zielspezifischen biologisch aktiven Verbindungen gefragt, um eine präzise Kontrolle über die Manipulation biologischer Prozesse zu erreichen. In diesem Kurzaufsatz werden einige neuere Ansätze in der Entwicklung von selektiven Enzymhemmern vorgestellt. Besondere Betonung erfahren die dazu verwendeten chemischen Grundgerüste, einschließlich naturstoffartiger, stark vororganisierter organischer und metallhaltiger Gerüste, Polymere, inerte oder reaktiver Cluster und strukturell sehr einfacher Moleküle, die kovalente oder koordinative Bindungen an das aktive Zentrum nutzen, um eine hohe Selektivität zu erreichen.

[\*] Prof. Dr. E. Meggers  
Fachbereich Chemie, Philipps-Universität Marburg  
Hans-Meerwein-Straße, 35043 Marburg (Deutschland)  
Fax: (+49) 6421-282-2189  
E-Mail: meggers@chemie.uni-marburg.de

## 2. Perfekte Passform mit stark vororganisierten Strukturen: von naturstoffähnlichen Molekülen zu oktaedrisch koordinierten Metallkomplexen

Komplizierte Naturstoffe zeigen oft ausgezeichnete Ziel-selektivitäten, was sie zu einer wertvollen Quelle für die Entwicklung neuer therapeutischer Wirkstoffe macht,<sup>[9]</sup> aber auch zu idealen Hilfsmitteln für die Untersuchung biologischer Systeme.<sup>[10]</sup> Diese hohe Selektivität kann oft auf ihre vororganisierten dreidimensionalen Gerüste zurückgeführt werden, die die Bindungstaschen der Zielproteine in Form und Präsentation von funktionellen Gruppen perfekt komplementieren. In Anlehnung an die Vorgehensweise der Natur berichteten Diederich und Mitarbeiter über ein beeindruckendes Beispiel der Verwendung eines komplizierten, naturstoffähnlichen Molekülgerüsts zur Entwicklung selektiver Inhibitoren von Thrombin, einem wichtigen Enzym der Blutgerinnung. Diederichs Gruppe entwickelte dabei eine Klasse starrer tricyclischer Lactamstrukturen, die in stark vororganisierter Weise an das aktive Zentrum des Thrombins binden, wie in Abbildung 1 für den Komplex aus Thrombin und der Verbindung **1** dargestellt ist.<sup>[11,12]</sup> Die starre tricyclische Kernstruktur gestattet es, die Substituenten präzise in drei verschiedene Untertaschen am aktiven Zentrum auszurichten. Entsprechend ist die hydrophobe Selektivitätstasche (S1-Tasche) mit einem Phenylamidiniumrest gefüllt, der eine zweizählige Salzbrücke mit der Seitenkette von Asp189 am Boden der Tasche bildet, ist die große hydrophobe D-Tasche (distale Tasche) von einem *para*-Chlorbenzyl-Substituent besetzt, während die enge P-Tasche (proximale Tasche) mit einem Isopropylrest gefüllt ist. Der Tricyclus **1** ist ein Thrombinhemmer im niedrigen nanomolaren Bereich ( $K_i = 8 \text{ nM}$ ) mit einer bemerkenswerten Selektivität um den Faktor 1609 gegenüber der verwandten Serinprotease Trypsin. Diese Selektivität kann mit der Position der Isopropylgruppe erklärt werden, die die P-Tasche des Thrombins besetzt. Diese P-Tasche findet sich ausschließlich in Thrombin, wird durch eine Einschubschleife in der Struktur gebildet und fehlt bei anderen verwandten Serinproteasen wie Trypsin. Man muss jedoch die Bedeutung des starren tricyclischen Kerns hervorheben, der die Voraussetzung dafür ist, diese P-Tasche mit einem geeigneten Substituenten präzise ausfüllen zu können.



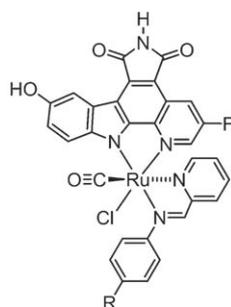
**Abbildung 1.** Der Thrombininhibitor **1** mit tricyclischem Lactamgerüst: A) Bindungsweise von **1** am aktiven Zentrum von Thrombin. Die aktive Tasche wird durch das katalytische Zentrum mit dem Nucleophil Ser195, der Selektivitäts(S1)-Tasche, einer großen hydrophoben D-Tasche und einer kleinen P-Tasche definiert. Nach Lit. [12]. B) Die Röntgenstruktur des Komplexes zwischen Thrombin und **1** (PDB-Kode 2CF8) veranschaulicht, wie sich die Formen perfekt ergänzen.

Wie Diederichs Proteasehemmer **1**, ein Tricyclus mit fünf asymmetrischen Kohlenstoffzentren, veranschaulicht, beruhen solche globulären und vororganisierten Strukturen üblicherweise auf hochentwickelten Gerüsten mit mehreren Stereozentren, sodass ihre Synthese oft mühsam ist. Dieser Nachteil kann auf die intrinsische Beschränkung des Kohlenstoffs auf lineare, trigonal-planare und tetraedrische Bindungsgeometrien zurückgeführt werden. Es ist daher sehr wünschenswert, alternative Strategien für den Aufbau globulärer Verbindungen mit definierten Formen zu entwickeln. Ein solcher Ansatz verwendet Metallkomplexe, insbesondere mit oktaedrisch koordinierten Metallzentren, in denen das Zentralmetall mit seiner vielfältigen Stereochemie in Verbindung mit maßgeschneiderten koordinierten Liganden die räumliche Struktur der Verbindungen festlegt.<sup>[13–15]</sup>

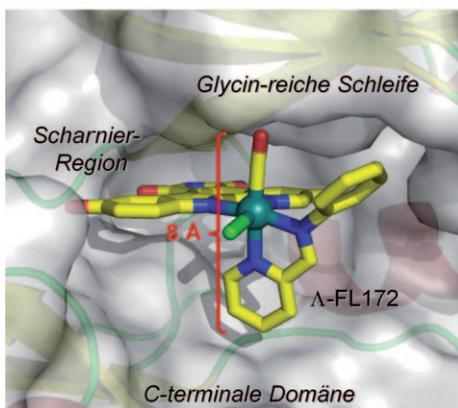
Unsere Gruppe hat vor kurzem den oktaedrischen Organorutheniumkomplex  $\Lambda$ -FL172 als selektiven Inhibitor für die p21-aktivierte Kinase 1 (PAK-1) entwickelt (Abbildung 2).<sup>[16,17]</sup> PAK-1 besitzt eine besonders offene ATP-Bindungstasche, die das Binden von üblichen kleinen organischen Gerüsten erschwert, sich aber besonders gut mit sper-



Eric Meggers promovierte 1999 an der Universität Basel unter der Anleitung von Prof. Bernd Giese mit einer Arbeit über den Mechanismus des weitreichenden Elektronentransports durch DNA. Nach einem Aufenthalt als Postdoktorand bei Prof. Peter G. Schultz am Scripps Research Institute in La Jolla (USA), während dessen er künstliche metallvermittelte Basenpaare in der DNA erforschte, wurde er 2002 Assistenzprofessor im Department Chemie an der Universität Pennsylvania (USA). Seit 2007 ist er Professor für Chemische Biologie im Fachbereich Chemie der Philipps-Universität Marburg. Seine gegenwärtigen Forschungsschwerpunkte sind die Entwicklung von biologisch aktiven inerten Metallkomplexen und ihre stereoselektive Synthese.



R = H:  $\Lambda$ -FL172:  $IC_{50} = 130$  nM  
 R = CH<sub>3</sub>: *rac*-FL224: 4% Inhibierung bei 100 nM  
 R = F: *rac*-FL252: Keine Inhibierung bei 100 nM

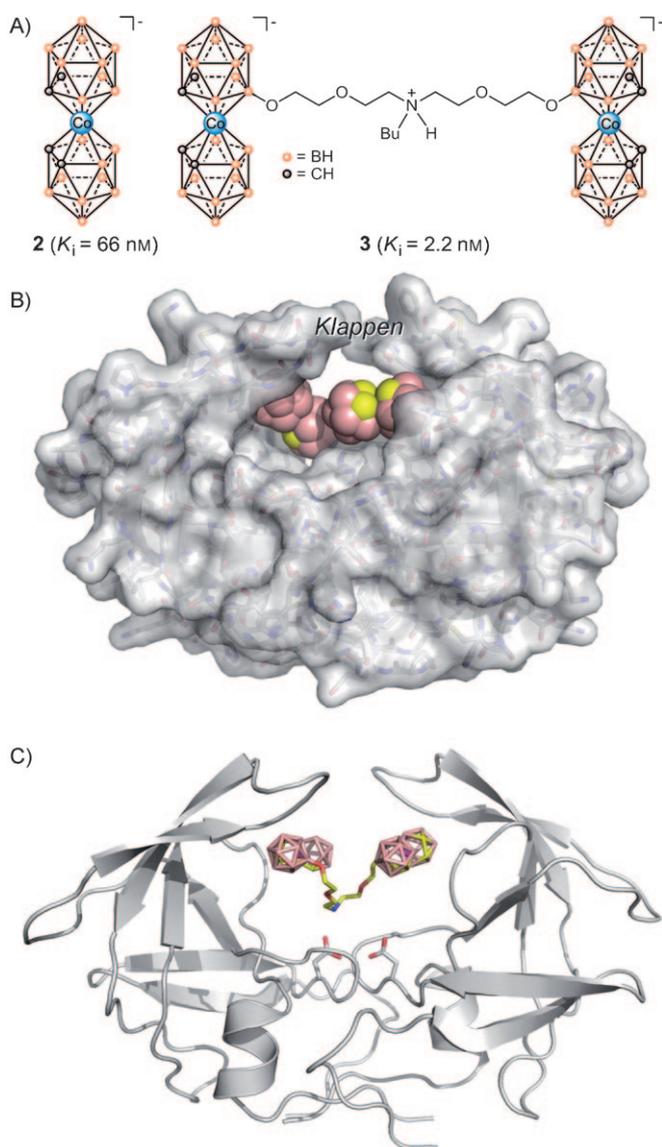


**Abbildung 2.** Cokristallstruktur des großen und starren oktaedrischen Ruthenium-Komplexes  $\Lambda$ -FL172 gebunden an die offene ATP-Bindungstasche der Proteinkinase PAK-1.  $IC_{50}$ -Werte und Aktivitäten bei einer Konzentration von 100 nM wurden in Gegenwart von 1  $\mu$ M ATP gemessen.

rigen und starren oktaedrischen Komplexen füllen lässt. Die Cokristallstruktur von PAK-1 mit  $\Lambda$ -FL172 in Abbildung 2 verdeutlicht, dass ein zweizähliger Pyridocarbazol-Ligand des Rutheniumkomplexes die Adenin-Bindungsstelle der ATP-Tasche besetzt und mit der Scharnier-Region wechselwirkt, während der Abstand zwischen dem CO- und dem *trans*-ständigen Pyridin-Liganden den Raum zwischen der flexiblen Glycin-reichen Schleife und der Oberfläche der C-terminalen Domäne überbrückt und so als eine starre Messlatte von ungefähr 8 Å dient, die zwischen verschiedenen großen Proteinkinase-ATP-Bindungstaschen differenzieren kann. Als Warnhinweis sollte allerdings erwähnt werden, dass, obwohl ein derartig passgenaues Ausfüllen mit starren Strukturen höchst erwünscht ist, um Wirksamkeit und Selektivität zu erhalten, es gleichzeitig ein besonders sorgfältiges Design erfordert, bei dem sich bereits geringfügige Abweichungen drastisch auf die Bindungsaffinitäten auswirken können. Wenn man beispielsweise dem Gerüst von FL172 nur eine einzige Methylgruppe oder ein Fluoratom an der *para*-Position des Phenylsubstituenten hinzufügt, wird seine Bindungsaffinität wegen einer unvermeidlichen Kollision mit der Glycin-reichen Schleife fast komplett aufgehoben (Abbildung 2).

### 3. Größer und selektiver: Carborane, Kohlenstoffkäfige und Polyoxometallate

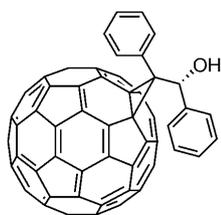
Viele Elemente des Periodensystems zeigen eine reichhaltige Clusterchemie, die für die Entwicklung von Enzym-inhibitoren genutzt werden kann. Aufgrund ihrer ungewöhnlichen Strukturen populieren solche Cluster vermutlich Bereiche des chemischen Raums,<sup>[18]</sup> die nicht mit rein organischen Verbindungen erreicht werden können. Damit empfehlen sie sich als neuartige und potenziell nützliche Gerüste zur Hemmung bestimmter Enzyme, indem sie auf einzigartige Weise besonders große, flexible oder offene aktive Taschen ausfüllen. Cluster aus Kohlenstoff und Bor (Carborane) und ihre Metallderivate (Metallacarborane) sind deshalb solch eine interessante Verbindungsklasse, weil sie nicht nur ungewöhnliche Strukturen haben, sondern auch thermisch und metabolisch stabil sowie stark lipophil sind. Darüber hinaus können sie ungewöhnliche Proton-Hydrid-Bindungen („dihydrogen bonds“) unter Einbeziehung von B-H-Gruppen bilden.<sup>[19]</sup> Beispielsweise wurden einige Metallacarborane, insbesondere Cobaltbis(dicarbollid)-Verbindungen, in denen zwei ikosaederförmige Käfige an einem gemeinsamen Eckpunkt verbunden sind, vor kurzem als vielversprechende neuartige Gerüste für nichtpeptidische Inhibitoren der HIV-1-Protease beschrieben, die wegen ihrer wesentlichen Rolle bei der HIV-Replikation einen Hauptangriffspunkt der HIV-Therapie darstellt.<sup>[20–22]</sup> Es wurde festgestellt, dass das 3-Cobaltbis(1,2-dicarbollid)-Anion (**2**) die HIV-1-Protease mit einem  $K_i$ -Wert von 66 nM hemmt. Die Kristallstruktur dieses Metallacarbollids im Komplex mit HIV-1-Protease ist in Abbildung 3 dargestellt.<sup>[20]</sup> HIV-1-Protease ist eine Aspartatprotease, bei der das aktive Zentrum an der Schnittstelle zweier identischer Untereinheiten liegt. Eine Kristallstrukturanalyse ergab, dass zwei Carbollid-Anionen an das symmetrische aktive Zentrum in der Klappen-Region („flap region“) der hydrophoben S3- und S3'-Bindungstaschen binden und diese Region so in halboffener Stellung halten. Eine offene Stellung der Klappen-Region ist typisch für nicht ligandengebundene Strukturen, während inhibitor-gebundene Strukturen üblicherweise geschlossene Klappenstellungen zeigen. Inspiriert durch diese Kristallstruktur, in der gleichzeitig zwei Metallacarbollide am aktiven Zentrum gebunden sind, wurden daraufhin Derivate entwickelt, bei denen zwei Metallacarbollide durch flexible hydrophile Linker miteinander verbunden sind. Dies führte zu der Bis(metallacarbollid)-Verbindung **3**, die sich als ein Hemmer von HIV-1-Protease mit einem  $K_i$ -Wert im niedrigen nanomolaren Bereich (2.2 nM) erwies. Darüber hinaus wurden für **3** submikromolare  $EC_{50}$ -Werte in antiviralen Tests, keine Toxizität in Gewebekulturuntersuchungen und nur schwache oder gar keine Hemmung durch andere Proteasen wie Cathepsin D, Pepsin, Trypsin, Papain und Amylase erhalten.<sup>[21,22]</sup> Interessanterweise zeigt diese Verbindungsklasse auch eine starke Bindung an einige klinisch relevante HIV-Protease-Mutanten. Dies wurde mit einem neuartigen Bindungsmodus der Metallacarborane in der HIV-Protease-Bindetasche über ungewöhnliche Proton-Hydrid-Wasserstoffbrücken, B-H...H-X (X = N, O, C), erklärt sowie mit der Fähigkeit, die Position



**Abbildung 3.** Cobaltbis(1,2-dicarbollid)-Cluster als HIV-1-Protease-Hemmer: A) Monomere und dimere Metallacarboran-Hemmer. B) Kristallstruktur eines HIV-1-Protease-Dimers mit zwei gebundenen Cobaltbis(1,2-dicarbollid)-Anionen **2** (PDB-Kode 1ZTZ). Die Komplexe **2** sind mit ihren Van-der-Waals-Oberflächen dargestellt. C) Ein Derivat des Bimetallacarborid-Komplexes **3** gebunden an HIV-1-Protease mit einer modellierten Konformation des ungeordneten Linkers (PDB-Kode 318W). Die zwei katalytischen Aspartatreste befinden sich in unmittelbarer Nähe zum protonierten Amin des Linkers.

des Metallacarboran-Käfigs innerhalb der Bindungstasche anzupassen.<sup>[22]</sup>

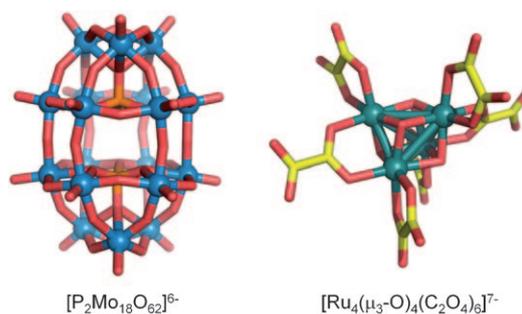
Über Carborane hinaus sind auch Kohlenstoffkäfige wie Fullere und Diamantoider reizvolle Gerüste für große aktive Zentren, weil sie über ungewöhnliche Größen und Formen verfügen, und weil sich Substituenten an genau definierten Stellen ihrer Peripherie platzieren lassen.<sup>[23–25]</sup> So ist beispielsweise der in Abbildung 4



**Abbildung 4.** C<sub>60</sub>-basierender HIV-1-Protease-inhibitor.

gezeigte Diphenyl-C<sub>60</sub>-Alkohol ein Hemmer der HIV-1-Protease mit einem beachtlichen  $K_i$ -Wert im nanomolaren Bereich (103 nM).<sup>[26]</sup> Moleküldesign- („molecular modeling“) und Moleküldynamik-Untersuchungen ergaben, dass dieses Fullerenderivat den großen hydrophoben Hohlraum der HIV-1-Protease gut ausfüllt, wobei sich die flexiblen Klappen eng um den C<sub>60</sub>-Hemmer legen und auf diese Weise Wasser aus dem Hohlraum drängen, was zu einer günstigen Bindungsenergie führt.<sup>[26,27]</sup> Diese Ergebnisse zeigen, dass eine durch computergestütztes und/oder strukturbasiertes Design begründete gezielte Derivatisierung von C<sub>60</sub> noch deutlich wirksamere HIV-1-Protease-Hemmer und andere wirksame Enzyminhibitoren auf der Basis von C<sub>60</sub> zugänglich machen sollte.<sup>[28]</sup>

Komplett anorganische Cluster wie Polyoxometallate (POM) können antivirale, Antitumor- und antibiotische Aktivitäten ausüben.<sup>[29,30]</sup> Polyoxometallate sind polyanionische Cluster, die aus Metalloxyanionen bestehen, welche über gemeinsame Sauerstoffatome eckenverknüpft sind. Daraus ergeben sich geschlossene dreidimensionale Gerüste, die ihrerseits ein oder mehrere Heteroatome umschließen können. Das Phosphomolybdat-Hexaanion  $[P_2Mo_{18}O_{62}]^{6-}$  bildet z. B. eine Dawson-Struktur; in diesem Gerüst schließen 18 MoO<sub>6</sub>-Oktaeder, die über Sauerstoffatome verbunden sind, zwei zentrale PO<sub>4</sub>-Tetraeder ein. Die Verbindung  $K_6[P_2Mo_{18}O_{62}]$  (**4**) wurde in einer neueren Untersuchung als selektiver Hemmer der Proteinkinase CK2 (Abbildung 5) beschrieben.



**Abbildung 5.** Mehrkernige Metall-Oxo-Verbindungen als Enzyminhibitoren.  $K_6[P_2Mo_{18}O_{62}]$  (**4**) und  $Na_7[Ru_4(\mu_3-O)_4(C_2O_4)_6]$  (**5**) sind Hemmer der Proteinkinase CK2 bzw. der reversen Transkriptase von HIV-1 im niedrigen nanomolaren Bereich.

ben.<sup>[31,32]</sup> Es wurde nachgewiesen, dass  $K_6[P_2Mo_{18}O_{62}]$  eine bemerkenswerte Wirksamkeit bezüglich der Proteinkinase CK2 zeigt, mit einem IC<sub>50</sub>-Wert von 1.4 nM in Gegenwart von 100 μM ATP und gleichzeitig einer hohen Selektivität innerhalb einer Gruppe von 29 Kinasen. Da das POM **4** die Kinase CK2 schon in subäquimolaren Konzentrationen hemmt und weil POM-Strukturen je nach Konzentration, pH-Wert und Zusammensetzung der Lösung in multiplen Gleichgewichten vorliegen, konstatieren die Autoren, dass die starke CK2-Hemmung durch Fragmente von **4** erfolgt. Kinetische Untersuchungen, Affinitätschromatographie und Trypsin-Proteolyse, verbunden mit ortsspezifischer Mutagenese, führten zu der Schlussfolgerung, dass Fragmente der POM-Verbindung außerhalb der ATP- und Peptidsubstrat-Bindestelle al-

losterisch am Aktivierungssegment binden. Dieses Segment wird in CK2 durch Kontakte zum N-Terminus stabilisiert und hält CK2 dadurch in einem aktiven Zustand. Die Koordination der POM an das Aktivierungssegment kann diese Kontakte unterbrechen und damit CK2 in einen inaktiven Zustand versetzen. Man kann daher hoffen, dass die einzigartige Wirkungsweise dieses nichtklassischen Kinaseinhibitors zur Entwicklung weiterer neuartiger CK2-Hemmer genutzt werden kann, indem z.B. POMs mit organischen Substituenten funktionalisiert werden.

Es ist auch erwähnenswert, dass im Unterschied zu labilen POM, anionische Oxo-Cluster mit integrierten organischen Liganden, wie der Ruthenium-Oxo-Oxalato-Cluster  $\text{Na}_7[\text{Ru}_4(\mu_3\text{-O})_4(\text{C}_2\text{O}_4)_6]$  (**5**), unter physiologischen Bedingungen ziemlich stabil sind. Die Arbeitsgruppe um Che konnte in dieser Hinsicht demonstrieren, dass der Komplex **5** mit einem  $\text{IC}_{50}$ -Wert von 1.9 nM ein hochwirksamer Hemmer der reversen Transkriptase von HIV-1 ist.<sup>[33]</sup> Die stärkere Funktionalisierung dieser Verbindung an einem oder mehreren Carboxylat-Resten könnte organisch-anorganische Hybridstrukturen mit geeigneten pharmakologischen Eigenschaften zugänglich machen.

#### 4. Plastik-Hemmer: molekular geprägte Polymere

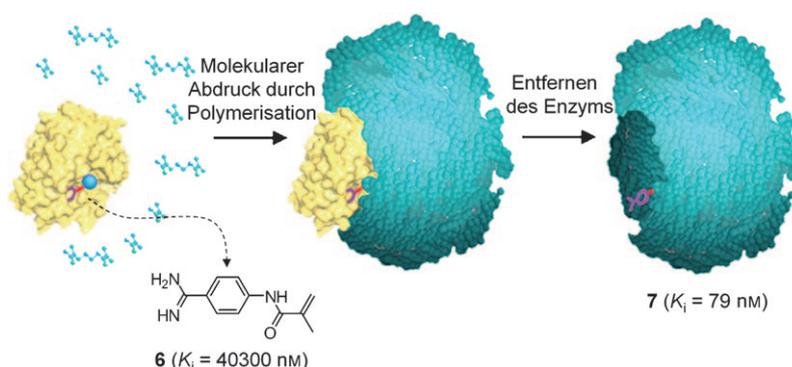
Molekular geprägte Polymere (molecularly imprinted polymers, MIP) werden oft zur selektiven molekularen Erkennung in der analytischen Chemie und zur Katalyse verwendet.<sup>[34,35]</sup> Haupt und Mitarbeiter wiesen vor kurzem nach, dass MIP auch vielversprechende Materialien zur Herstellung von selektiven Enzyminhibitoren sind.<sup>[36]</sup> Durch geschickte Vorgehensweise wurde ein Polymer-Mikrogel um das aktive Zentrum von Trypsin polymerisiert, wobei Methacryloylaminobenzamidin **6** als monomerer Ankerpunkt verwendet wurde, in dem der Benzamidinium-Rest einen bekannten Binder der S1-Tasche des Trypsins darstellt (Abbildung 6). Das Monomer **6** wurde mit Hydroxyethylmethacrylat und dem Vernetzer Ethylenbisacrylamid copolymerisiert und bildete dabei stark solvatisierte kleine Polymerteilchen (Mikrogele) mit kontrollierten Größen unter 1  $\mu\text{m}$ , die um Trypsin geformt wurden. Nach dem Entfernen von Trypsin

wurde das Polymer-Mikrogel **7** erhalten, das Trypsin mit einem nanomolaren  $K_i$ -Wert (79 nM) hemmt. Dieser Wert, der nahezu drei Größenordnungen niedriger ist als der entsprechende Wert für das ursprüngliche Phenylbenzamidin-Monomer, demonstriert somit, dass das geformte Polymer maßgeblich zur Bindungsaffinität beiträgt. Für die verwandten Proteasen Chymotrypsin und Kallikrein wurde lediglich eine schwache oder gar keine Hemmung beobachtet.

Diese Technik ist möglicherweise vielversprechend zur Herstellung von Hemmern für eine Vielzahl von Enzymen, ähnlich der Erzeugung von Antikörpern für bestimmte Epitope. In Zukunft könnten im Sinne einer modularen Vorgehensweise zusätzliche Substituenten auf der Oberfläche des Polymer-Mikrogels dazu verwendet werden, weitere spezifische Kontakte zu erzeugen oder das Polymer bestimmte Rezeptoren an der Zelloberfläche angreifen zu lassen.

#### 5. Reaktive Enzyminhibitoren: einfach, reaktiv und selektiv

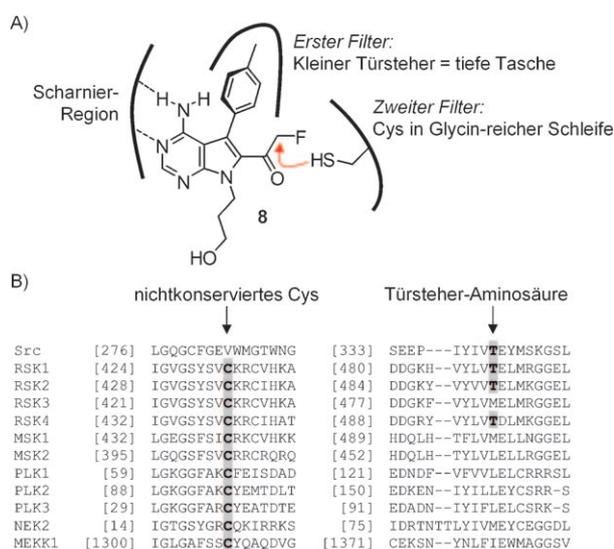
Besonders kleine und einfache molekulare Gerüste sind aus ökonomischen Erwägungen sehr attraktiv, haben aber den immanenten Nachteil, dass sie oft nicht ausreichend viele Wechselwirkungen mit dem Zielprotein eingehen können, um eine hohe Affinität und Selektivität zu erreichen. Jedoch kann die Strategie der Bildung kovalenter Inhibitor-Enzym-Komplexe diese Einschränkung überwinden, weil ein erheblicher Anteil der Bindungsenergie aus der eingegangenen kovalenten oder koordinativen Bindung zwischen dem kleinen Molekül und dem Enzym gewonnen wird. Man kann also erwarten, dass in solchen Fällen eine verringerte Zahl an zusätzlichen nichtkovalenten Wechselwirkungen ausreicht, um trotzdem eine hohe Wirksamkeit und Selektivität zu gewährleisten. Tatsächlich desaktiviert eine bedeutende Zahl an auf dem Markt befindlichen Medikamenten, z.B. der ein Serin im aktiven Zentrum acetylierende Cyclooxygenase-Hemmer Aspirin, ihre Zielenzyme durch irreversible kovalente Bindungsknüpfung innerhalb des aktiven Zentrums.<sup>[37,38]</sup> Ein systematischer Überblick der bekannten Zielstrukturen und ihrer Funktionsmechanismen zeigt, dass Cofaktor-vermittelte Enzyme und Enzyme, die Cysteine oder



**Abbildung 6.** Mikrogel-Enzyminhibitor durch molekulares Prägen: Mit Methacryloylaminobenzamidin **6** als Monomer, das einen Benzamidinrest als Trypsin-Ankerpunkt enthält (violett, rot und blau), wird ein Polymer-Mikrogel (türkis) um das Enzym Trypsin (gelb) geformt. Nach dem Entfernen von Trypsin wird ein wirksamer Trypsin-Hemmer **7** erhalten. Wiedergabe nach Lit. [36] mit Erlaubnis der American Chemical Society.

aktivierte Serine im aktiven Zentrum tragen, am häufigsten kovalent modifiziert werden.<sup>[38]</sup>

In einem aktuellen Beispiel entwickelten Taunton, Shokat und Mitarbeiter mithilfe eines strukturbasierten Bioinformatik-Ansatzes eine einfache Verbindung, die auf die selektive Hemmung der p90-ribosomalen Proteinkinasen RSK1 und RSK2 abzielt.<sup>[39]</sup> Weil die ATP-Bindungs tasche der rund 500 menschlichen Proteinkinasen, die wichtigste Zielstruktur bei der Entwicklung von Proteinkinase-Inhibitoren, stark konserviert ist, stellt die Entwicklung von selektiven Inhibitoren eine große Herausforderung dar. Ein Sequenzabgleich von 491 menschlichen Proteinkinasen führte zur Identifizierung von elf Proteinkinasen, die ein reaktives Cystein in der flexiblen Glycin-reichen Schleife enthalten und zwar an einer Stelle, die gewöhnlich durch ein Valin besetzt wird. Taunton und Shokat adressierten dieses Cystein mit der Pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidin-Verbindung **8**, in der ein Fluormethylketon-Rest so gestaltet wurde, dass er eine nukleophile Substitution mit der Seitenkette des Cysteins in der Glycin-reichen Schleife eingeht und dadurch eine kovalente Bindung bildet (Abbildung 7). Eine ausgezeichnete Selektivität ausschließlich bezüglich der Proteinkinasen RSK1 und RSK2 wurde dann mit einem zusätzlichen Toluyl-Substituenten am Pyrrolopyrimidin-Gerüst erreicht, der in eine tiefe hydrophobe Tasche reichen kann, die bei RSK1 und RSK2 vorhanden ist, nicht aber in den meisten anderen der elf Proteinkinasen, die einen Cystein-Rest in der Glycin-reichen Schleife enthalten. Diese hydrophobe Tasche ist bei ungefähr 20% aller Proteinkinasen verfügbar, da sie eine kleine Türsteher-Aminosäure („gate-

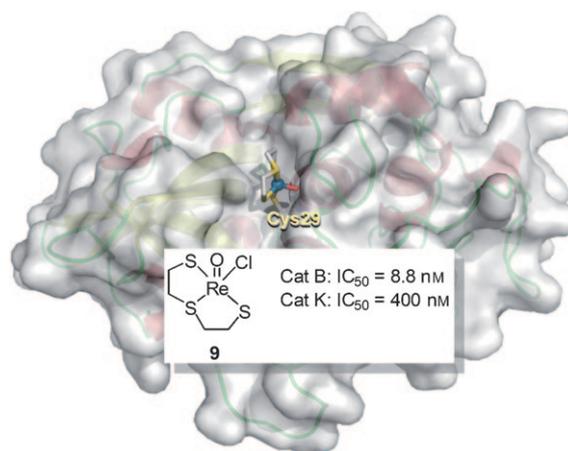


**Abbildung 7.** Entwicklung von Proteinkinase-Hemmern gelenkt durch strukturbasierte Bioinformatik unter Anwendung eines doppelten Selektivitätsfilters. A) Der Fluormethylketon-Pyrrolopyrimidin-Hemmer **8** ist ein klassischer ATP-kompetitiver Scharnierbinder, der jedoch nur an ATP-Bindestellen bindet, die zwei Kriterien gleichzeitig erfüllen: eine kleine Türsteher-Aminosäure und ein Cystein in der Glycin-reichen Schleife. RSK2:  $IC_{50} = 15$  nM (100  $\mu$ M ATP) mit mehr als 600- und 200-facher Selektivität bezüglich der C436V- bzw. T493M-Mutanten. B) Sequenzabgleich der 11 menschlichen Kinasen mit einem Cystein in der Glycin-reichen Schleife nach Lit. [39]. Von diesen Kinasen enthalten nur RSK1, RSK2 und RSK4 eine kleine Türsteher-Aminosäure. Die Sequenz von Src ist als Bezugspunkt abgebildet.

keeper“) am Eingang dieser Tasche tragen. Durch die Entwicklung einer Verbindung, die sowohl die tiefe Tasche (kleine Türsteher-Aminosäure) als auch die Reaktivität des Cysteins in der Glycin-reichen Schleife nutzt, erreichten Taunton und Shokat ausgezeichnete Selektivitäten bezüglich RSK1 und RSK2. Diese hohe Selektivität wurde mit einem Biotin-markierten Inhibitor in ganzen Zell-Lysaten getestet und bestätigt, wobei unter tausenden von cysteinhaltigen Proteinen nur RSK1 und RSK2 mit dem reaktiven Pyrrolopyrimidin reagierten. So wurde in diesem faszinierenden Beispiel ein einfaches organisches Molekül so gestaltet, dass es selektiv nur an zwei Proteinkinasen bindet, und zwar lediglich basierend auf zwei Aminosäuren, die RSK von anderen Proteinkinasen unterscheiden. Diese Ergebnisse sind umso bemerkenswerter angesichts einer aktuellen Untersuchung, in der ein Zusammenhang zwischen der Bindungsselektivität von organischen Verbindungen und deren struktureller Komplexität aufgezeigt wurde. Strukturelle Komplexität wurde dabei durch den relativen Anteil von  $sp^3$ -hybridisierten (Formkomplexität) und stereogenen Kohlenstoffatomen (stereochemische Komplexität) ausgedrückt.<sup>[40]</sup>

Auch andere Cysteine innerhalb der ATP-Bindestelle von Proteinkinasen wurden erfolgreich zur Knüpfung kovalenter Bindungen herangezogen, und dies konnte zur Entwicklung von wirksamen und selektiven Hemmern des Rezeptors des epidermalen Wachstumsfaktors (EGFR), der Türsteher-Mutante EGFR-T790M, Her2 und Brutons Tyrosinkinase (Btk) genutzt werden. Bisher befinden sich fünf irreversible Kinaseinhibitoren in klinischen Studien.<sup>[41]</sup> In diesen Verbindungen reagieren Acrylamid-Michael-Akzeptoren als Elektrophile mit lösungsmittel-exponierten Cysteinen.

Reaktivität aufgrund von koordinativer Bindung stellt ebenfalls eine höchst geeignete Herangehensweise dar, um starke Beiträge zur gesamten Bindungsenergie bereitzustellen. Beispielsweise beschrieben Fricker und Mitarbeiter vor kurzem den einfachen Oxorhenium(V)-Komplex **9** (Abbildung 8), der über eine beeindruckende Bindungsaffinität zu



**Abbildung 8.** Der Oxorhenium(V)-Komplex **9** als ein selektiver Inhibitor der Protease Cathepsin B im nanomolaren Bereich. Dargestellt ist ein Modell des vermuteten Bindungsmodus des Komplexes im aktiven Zentrum von Cathepsin B, in dem das reaktive Cys29 im aktiven Zentrum unter Austausch des Chloridliganden an das Rhenium koordiniert.

Cathepsin B verfügt ( $IC_{50} = 8.8 \text{ nM}$ ).<sup>[42,43]</sup> Cathepsin B ist eine Cysteinprotease, in der ein Cystein innerhalb einer katalytischen Triade aktiviert wird, woraus eine erhöhte Reaktivität des Cystein-Nukleophils resultiert. Kinetische Studien und Konkurrenzexperimente in Verbindung mit massenspektrometrischen Untersuchungen ergaben, dass der Rheniumkomplex ein am aktiven Zentrum angreifender, zeitabhängiger, langsam umkehrbarer Inhibitor ist. Dies deutet auf eine Koordination des Rheniums an das nukleophile Cystein des aktiven Zentrums unter Substitution des labilen Chloridliganden hin. Diese Wirkungsweise ist analog zu einer Vielzahl von bekannten organischen Cysteinprotease-Inhibitoren, die eine reversible oder irreversible kovalente Bindung mit dem reaktiven Cystein im aktiven Zentrum eingehen. Ein unerwartetes Ergebnis war jedoch, dass diese Verbindung eine 45-fache Selektivität von Cathepsin B gegenüber dem verwandten Cathepsin K und einigen ähnlichen parasitären Cysteinproteasen zeigt. Eine Struktur-Aktivitäts-Beziehung um den dreizähligen 2,2'-Thiodiethanthiolat-Liganden verdeutlichte die Bedeutung einer bestimmten Koordinationssphäre, die wohl durch die Größe und Form des aktiven Zentrums von Cathepsin B vorgegeben wird.

## 6. Schlussfolgerungen

Trotz der Verfügbarkeit von offensichtlich sehr leistungsstarken Technologien, wie kombinatorischer Chemie, Hochdurchsatz-Screening, hochentwickelten Selektionsmethoden, computergestützter Wirkstoffentwicklung und dem virtuellen Screening, stellt die Entdeckung und Entwicklung von vollständig zielspezifischen Verbindungen noch immer ein mehr oder weniger ungelöstes Problem dar. In diesem Überblick haben wir uns auf die Gestalt der zugrundeliegenden chemischen Gerüste konzentriert und interessante Beispiele zur Entwicklung von potenziell sehr selektiven Enzyminhibitoren vorgestellt, die von etablierten bis hin zu höchst unkonventionellen Strukturen reichen. Das Gerüst der Wahl muss selbstverständlich mit der Art des Zielenzym variieren, von der Form und Größe des aktiven Zentrums, der Art der enzymkatalysierten Reaktion und der Verfügbarkeit von geeigneten reaktiven funktionellen Gruppen oder Co-faktoren abhängen. Während die Stärke der herkömmlichen organischen Gerüste in den nahezu unbegrenzten Möglichkeiten zur Strukturvariation liegt, ist nicht klar, ob mithilfe von organischer Chemie allein der gesamte biologisch relevante chemische Raum vollständig abgedeckt werden kann. Es ist daher zu hoffen, dass dieser kurze Überblick weitere Biologen und Chemiker dazu anregen wird, althergebrachte Designpfade zu verlassen und neuartige und ungewöhnliche chemische Gerüste zu erforschen, um die Herausforderung der spezifischen molekularen Erkennung in komplexen biologischen Systemen zu meistern.

*Ich danke Dr. Pavlína Řezáčová (Akademie der Wissenschaften der Republik Tschechien, Prag) für die Überlassung der modellierten Struktur eines dimeren Metallacarborans gebunden an das aktive Zentrum der HIV-1-Protease, welche die Grundlage für die Abbildung 3C darstellt. Prof. Bernold Ha-*

*senknopf (Universität Pierre et Marie Curie, Paris, Frankreich) danke ich für die Bereitstellung der Struktur des Dawson-Clusters, der in Abbildung 5 dargestellt ist, und Prof. Karsten Haupt (Universität de Technologie de Compiègne, Frankreich) danke ich für die Überlassung eines in Abbildung 6 verwendeten Bilds.*

Eingegangen am 10. September 2010

Online veröffentlicht am 15. Februar 2011

- [1] S. L. Schreiber, *Bioorg. Med. Chem.* **1998**, *6*, 1127–1152; S. L. Schreiber, *Nat. Chem. Biol.* **2005**, *1*, 64–66.
- [2] X. Wu, P. G. Schultz, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 12497–12515.
- [3] T. I. Oprea, C. G. Bologa, S. Boyer, R. F. Curpan, R. C. Glen, A. L. Hopkins, C. A. Lipinski, G. R. Marshall, Y. C. Martin, L. Ostropovici-Halip, G. Rishton, O. Ursu, R. J. Vaz, C. Waller, H. Waldmann, L. A. Sklar, *Nat. Chem. Biol.* **2009**, *5*, 441–447.
- [4] S. V. Frye, *Nat. Chem. Biol.* **2010**, *6*, 159–161.
- [5] International Human Genome Sequencing Consortium, *Nature* **2004**, *431*, 931–945.
- [6] Es ist ebenso eine große Herausforderung, die Wirkungsweise einer Verbindung richtig zu charakterisieren und ihr Spezifitätsprofil zu bestimmen.
- [7] O. Fedorov, B. Marsden, V. Pogacic, P. Rellos, S. Müller, A. N. Bullock, J. Schwaller, M. Sundström, S. Knapp, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2007**, *104*, 20523–20528.
- [8] M. W. Karaman, S. Herrgard, D. K. Treiber, P. Gallant, C. E. Atteridge, B. T. Campbell, K. W. Chan, P. Ciceri, M. I. Davis, P. T. Edeen, R. Faraoni, M. Floyd, J. P. Hunt, D. J. Lockhart, Z. V. Milanov, M. J. Morrison, G. Pallares, H. K. Patel, S. Pritchard, L. M. Wodicka, P. P. Zarrinkar, *Nat. Biotechnol.* **2008**, *26*, 127–132.
- [9] S. Danishefsky, *Nat. Prod. Rep.* **2010**, *27*, 1114–1116.
- [10] E. E. Carlson, *ACS Chem. Biol.* **2010**, *5*, 639–653.
- [11] U. Obst, D. W. Banner, L. Weber, F. Diederich, *Chem. Biol.* **1997**, *4*, 287–295.
- [12] E. Schweizer, A. Hoffmann-Röder, J. A. Olsen, P. Seiler, U. Obst-Sander, B. Wagner, M. Kansy, D. W. Banner, F. Diederich, *Org. Biomol. Chem.* **2006**, *4*, 2364–2375.
- [13] E. Meggers, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2007**, *11*, 287–292.
- [14] E. Meggers, *Chem. Commun.* **2009**, 1001–1010.
- [15] C. L. Davies, E. L. Dux, A.-K. Duhme-Klair, *Dalton Trans.* **2009**, 10141–10154.
- [16] Andere Beispiele von metallhaltigen Proteinkinase-Hemmern: a) E. Meggers, G. E. Atilla-Gokcumen, H. Bregman, J. Maksimoska, S. P. Mulcahy, N. Pagano, D. S. Williams, *Synlett* **2007**, 1177–1189; b) J. Spencer, A. P. Mendham, A. K. Kotha, S. C. W. Richardson, E. A. Hillard, G. Jaouen, L. Male, M. B. Hursthouse, *Dalton Trans.* **2009**, 918–921; c) B. Biersack, M. Zoldakova, K. Effenberger, R. Schobert, *Eur. J. Med. Chem.* **2010**, *45*, 1972–1975.
- [17] J. Maksimoska, L. Feng, K. Harms, C. Yi, J. Kissil, R. Marmorstein, E. Meggers, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 15764–15765.
- [18] C. M. Dobson, *Nature* **2004**, *432*, 824–828.
- [19] Z. J. Lesnikowski, *Collect. Czech. Chem. Commun.* **2007**, *72*, 1646–1658.
- [20] P. Cígler, M. Kožíšek, P. Rezáčová, J. Brynda, Z. Otwinowski, J. Pokorná, J. Plešek, B. Grüner, L. Dolecková-Marešová, M. Máša, J. Sedláček, J. Bodem, H.-G. Kräusslich, V. Král, J. Konvalinka, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2005**, *102*, 15394–15399.
- [21] M. Kožíšek, P. Cígler, M. Lepšík, J. Fanfrlík, P. Rezáčová, J. Brynda, J. Pokorná, J. Plešek, B. Grüner, K. G. Šašková, J. Václavíková, V. Král, J. Konvalinka, *J. Med. Chem.* **2008**, *51*, 4839–4843.

- [22] P. Řezáčová, J. Pokorná, J. Brynda, M. Kožíšek, P. Cígler, M. Lepšík, J. Fanfrlík, J. Řezáč, K. G. Šašková, I. Siegllová, J. Plešek, V. Sícha, B. Grüner, H. Oberwinkler, J. Sedláček', H.-G. Kräusslich, P. Hobza, V. Král, J. Konvalinka, *J. Med. Chem.* **2009**, *52*, 7132–7141.
- [23] T. Da Ros, M. Prato, *Chem. Commun.* **1999**, 663–669.
- [24] E. Nakamura, H. Isobe, *Acc. Chem. Res.* **2003**, *36*, 807–815.
- [25] Zu Diamantoiden als Enzyminhibitoren: P. Hodek, L. Bořek-Dohalská, B. Sopko, M. Šulc, S. Smrček, J. Hudeček, J. Janků, M. Stiborová, *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* **2005**, *20*, 25–33.
- [26] S. H. Friedman, P. S. Ganapathi, Y. Rubin, G. L. Kenyon, *J. Med. Chem.* **1998**, *41*, 2424–2429.
- [27] Z. Zhu, D. I. Schuster, M. E. Tuckerman, *Biochemistry* **2003**, *42*, 1326–1333.
- [28] Zu C<sub>60</sub>-Derivaten als Inhibitoren der Acetylcholinesterase: G. Pastorin, S. Marchesan, J. Hoebeke, T. Da Ros, L. Ehret-Sabattier, J.-P. Briand, M. Prato, A. Bianco, *Org. Biomol. Chem.* **2006**, *4*, 2556–2562.
- [29] J. T. Rhule, C. L. Hill, D. A. Judd, R. F. Schinazi, *Chem. Rev.* **1998**, *98*, 327–357.
- [30] T. Yamase, *J. Mater. Chem.* **2005**, *15*, 4773–4782.
- [31] R. Prudent, V. Moucadet, B. Laudet, C. Barette, L. Lafanechère, B. Hasenknopf, J. Li, S. Bareyt, E. Lacôte, S. Thorimbert, M. Malacria, P. Gouzerh, C. Cochet, *Chem. Biol.* **2008**, *15*, 683–692.
- [32] R. Prudent, C. Cochet, *Chem. Biol.* **2009**, *16*, 112–120.
- [33] E. L.-M. Wong, R. W.-Y. Sun, N. P.-Y. Chung, C.-L. S. Lin, N. Zhu, C.-M. Che, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 4938–4939.
- [34] K. Haupt, *Chem. Commun.* **2003**, 171–178.
- [35] G. Wulff, *Chem. Rev.* **2002**, *102*, 1–28.
- [36] A. Cutivet, C. Schembri, J. Kovensky, K. Haupt, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 14699–14702.
- [37] J. G. Robertson, *Biochemistry* **2005**, *44*, 5561–5571.
- [38] M. H. Potashman, M. E. Duggan, *J. Med. Chem.* **2009**, *52*, 1231–1246.
- [39] M. S. Cohen, C. Zhang, K. M. Shokat, J. Taunton, *Science* **2005**, *308*, 1318–1321.
- [40] P. A. Clemons, N. E. Bodycombe, H. A. Carrinski, J. A. Wilson, A. F. Shamji, B. K. Wagner, A. N. Koehler, S. L. Schreiber, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2010**, *107*, 18787–18792.
- [41] J. Singh, R. C. Petter, A. F. Kluge, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2010**, *14*, 475–480.
- [42] R. Mosi, I. R. Baird, J. Cox, V. Anastassov, B. Cameron, R. T. Skerlj, S. P. Fricker, *J. Med. Chem.* **2006**, *49*, 5262–5272.
- [43] S. P. Fricker, *Metallomics* **2010**, *2*, 366–377.