

Jetzt wird es ernst: strukturbasiertes Design von Mdm2/Mdmx-p53-Inhibitoren

Grzegorz M. Popowicz, Alexander Dömling und Tad A. Holak*

Inhibitoren · Proteine · Struktur-Aktivitäts-Beziehungen · Tumorthapeutika · Wirkstoff-Forschung

Das zelluläre p53-Protein ist das Bollwerk im Kampf gegen Tumor-assoziierte DNA-Schäden. Allgemein auch als „Beschützer des Genoms“ bekannt, ist p53 für das Schicksal der Zelle verantwortlich, wenn eine substanzielle DNA-Schädigung vorliegt. Tumoren können sich nur entwickeln, wenn diese Verteidigungslinie durchbrochen wird. Alle bekannten Tumorzellen mutieren das p53-Gen oder nutzen interne p53-Modulatoren, wie die beiden Proteine Mdm2 und Mdmx, um p53 zu deaktivieren. Das Freisetzen von p53 aus den Komplexen mit Mdm2 oder Mdmx sollte daher eine effiziente und nicht gentoxische Krebstherapie ermöglichen. Dank mehrerer Kristallstrukturen von Mdm2/x im Komplex mit p53-imitierenden Molekülen, sowohl Peptiden als auch niedermolekularen Verbindungen, gab es in den letzten Jahren fundamentale Fortschritte bei der Entwicklung neuer p53-aktivierender Moleküle. Das Verständnis der Bindungseigenschaften des Liganden ermöglicht die Entwicklung neuer, hoch aktiver und selektiver Wirkstoff-Kandidaten. Zwei niedermolekulare Verbindungen werden seit Kurzem in klinischen Studien untersucht.

1. Einleitung

Das vor 30 Jahren entdeckte p53-Protein bildet einen Schwerpunkt der biologisch-medizinischen Forschung. So wurden 2009 mehr als 4200 Artikel über p53 veröffentlicht,^[1–5] nicht nur wegen seiner Schlüsselrolle bei DNA-Reparatur-Mechanismen und der Zellzykluskontrolle, sondern auch wegen seiner bedeutenden Rolle bei der Krebsentstehung.^[6,7] Aus diesem Grund wurde p53 in den letzten Jahren zu einem der wichtigsten therapeutischen Ziele in der Krebsforschung und Wirkstoff-Entwicklung.^[6–9] Alle Krebsarten haben entweder ein mutiertes p53-Gen oder entstehen durch Fehler in der Signaltransduktionskaskade von p53.^[1,8,9] In Krebszellen, die kein mutiertes p53-Gen enthalten, wird

die Funktion von p53 durch die Überexpression der beiden negativen Regulatoren Mdm2 und Mdmx inhibiert.^[6,10] Mdm2 und Mdmx binden an die N-terminale Transaktivierungsdomäne des p53-Proteins,^[9] wodurch dessen Funktion als Transkriptionsfaktor deaktiviert wird. Zusätzlich zeigt Mdm2 eine E3-Ubiquitin-Ligase-Aktivität und ist in der Lage, p53 für den Abbau durch das Proteasom zu aktivieren.^[11,12] Das Mdm2/x-p53-System ist eine negative Rückkopplungsschleife, die die p53-Konzentration und -Aktivität kontrolliert.^[6,13,14]

Die Wiederherstellung der beeinträchtigten Funktion des p53-Proteins durch Aufbrechen der Mdm2-p53- oder Mdmx-p53-Wechselwirkungen ist ein grundlegend neuer Weg für die Therapie eines breiten Spektrums von Krebsarten.^[1–6,15] Krebszellen sprechen positiv auf die Wiederherstellung der p53-Funktion an, was die Effizienz dieses neuen Therapieansatzes unterstreicht.^[15] Viele momentan eingesetzte gentoxische Chemotherapeutika basieren auf einer p53-Aktivierung durch DNA-Schädigung, um letztlich eine Apoptose zu induzieren. Allerdings können hohe Dosen eines gentoxischen Wirkstoffes p53-unabhängige Signaltransduktionswege aktivieren und so zu toxischen Wirkungen in normalem Gewebe führen, die eventuell zu sekundären bösartigen Tu-

[*] Dr. G. M. Popowicz, Dr. T. A. Holak
Max-Planck-Institut für Biochemie
Am Klopferspitz 18, 82152 Martinsried (Deutschland)
E-Mail: holak@biochem.mpg.de
Prof. A. Dömling
Departments of Pharmaceutical Sciences and Chemistry
University of Pittsburgh
Pittsburgh, PA 15261 (USA)

moren führen. Aus diesem Grund ist die selektive, nicht genotoxische Aktivierung von p53 durch die gezielte Störung der Mdm2/x-p53-Wechselwirkung eine wichtige Alternative zur gängigen zytotoxischen Chemotherapie. Zusätzlich kann eine Kombination von Wirkstoffen, die an verschiedenen Punkten des p53-Signaltransduktionsweges eingreifen, zu Synergismen führen.

Weiterhin zeigen Mdm2/x-Antagonisten protektive Wirkung auf normal wachsende Zellen während der antimitotischen Chemotherapie von Tumoren mit mutiertem p53. Normale Zellen exprimieren das funktionelle Wildtyp-p53-Protein. Eine Vorbehandlung mit Mdm2/x-Antagonisten stoppt die Proliferation dieser Zellen, sodass sie während der Chemotherapie geschützt sind. Nach Absetzen der Chemotherapie und des begleitenden Mdm2/x-Antagonisten können diese normalen Zellen wieder ihr Wachstum fortsetzen. Krebszellen mit mutiertem p53 hingegen sind unempfindlich für Mdm2/x-Antagonisten, reagieren aber empfindlich auf das Mitosegift.^[1,16]

Die Suche nach effizienten Mdm2-p53-Inhibitoren führte zu mehreren niedermolekularen Liganden. Der bestuntersuchte Ligand ist Nutlin-3,^[16,17] das an die p53-Bindungsdomäne von Mdm2 mit einer Affinität von 30 nM bindet. In-vivo-Experimente mit Nutlin-3 und anderen Inhibitoren liefern den prinzipiellen Nachweis, dass niedermolekulare Inhibitoren der Mdm2-p53-Wechselwirkung zum einen zum Zellzyklusarrest und/oder zur Induktion der Apoptose in Tumorzellen führen und zum anderen gesunde Zellen nicht schädigen.^[18–22]

Das Mdmx-Protein wurde erst kürzlich als ein wichtiger p53-Regulator und damit Antitumor-Target erkannt.^[23,24] Überexpression von Mdmx verhindert die Antitumoraktivität von Nutlin-3.^[25] Bis heute ist kein Mdmx-p53-Antagonist mit hoher Affinität bekannt, während schon mehrere effiziente Inhibitoren für die Mdm2-p53-Wechselwirkung entwickelt wurden.^[21,26–28] Für Mdmx wurden bisher nur einige wenige Peptide und Peptidmimetika publiziert, die nanomolare Affinitäten zur p53-Bindungsstelle von Mdmx aufweisen.^[29–32] Erst kürzlich wurde mit WW298 der erste effektive, nicht kovalent bindende Mdmx-p53-Antagonist beschrieben.^[33] Peptid- und Knock-out-Studien bestätigen, dass ein Mdmx-p53-Inhibitor einen hohen therapeutischen Nutzen haben sollte.^[10,24]

In diesem Kurzaufsatz werden alle niedermolekularen Mdm2- und Mdmx-bindenden Inhibitoren mit bekannter Kristallstruktur diskutiert. Das durch kristallographische Analyse erworbene Wissen um die exakte Ligand-bindende Wechselwirkung ist eine gute Quelle für SAR-Daten (SAR: Struktur-Wirkungs-Beziehung). Aus diesem Grund sind die Strukturen von großem Wert für die Entwicklung neuer Liganden-Verbindungsklassen, die eine optimierte Bindung und bessere pharmakologische Eigenschaften aufweisen. Darüber hinaus werden die kürzlich publizierten Strukturen der beiden Mdm2/x-Proteine im Komplex mit p53-abgeleiteten Peptiden besprochen, die eine 10–100-mal bessere Affinität zu Mdm2/x haben als das native p53-Protein.



Grzegorz Popowicz studierte medizinische Physik an der AGH Universität für Wissenschaft und Technologie in Krakau (Polen) und erhielt 2002 seinen Mastertitel. Er promovierte 2006 am MPI für Biochemie in Martinsried. Gegenwärtig hat er die Position eines assoziierten Forschungswissenschaftlers an diesem Institut inne. Sein Hauptforschungsthema ist die Steuerung von Protein-Protein-Wechselwirkungen für medizinische Zwecke. Mithilfe von NMR-Spektroskopie und Röntgenkristallographie untersucht er kleine Moleküle und peptidische Inhibitoren für Proteine, die an der Tumorgenese beteiligt sind.



Alexander Dömling studierte Chemie und Biologie an der TU München. Nach Abschluss seiner Doktorarbeit bei Ivar Ugi verbrachte er sein Postdoktorat als Feodor-Lynen-Stipendiat bei Barry Sharpless am Scripps Research Institute. Er ist Gründer verschiedener Biotechnologiefirmen. 2004 habilitierte er in Chemie an der TU München. Seit 2006 ist er Associate Professor an der University of Pittsburgh am Lehrstuhl für Pharmazie, mit sekundären Berufungen an den Departments of Chemistry und Computational Biology. Sein Forschungsgebiet sind Mehrkomponentenreaktionen und deren Anwendung zum Design von Antagonisten für Protein-Protein-Wechselwirkungen.



Tad A. Holak ist Leiter der NMR-Spektroskopie-Gruppe am MPI für Biochemie in Martinsried. Seine Forschung konzentriert sich auf die Entdeckung dreidimensionaler Strukturen und Struktur/Funktions-Eigenschaften von Proteinen mithilfe einer Kombination aus Mehrkern-NMR-Spektroskopie, Biochemie und Röntgenkristallographie. 1998–2009 war er Mitglied des Herausbergremiums des European Journal of Biochemistry und des FEBS Journal.

2. Strukturen von Mdm2 und Mdmx mit p53-Peptidfragmenten

Die erste Struktur der p53-Bindungsdomäne von *Xenopus*- und humanem Mdm2 im Komplex mit einem 15 Aminosäuren langen menschlichen p53-Peptid wurde 1996 von Kussie et al. veröffentlicht (Abbildungen 1a, 2a und 3a).^[34] Zu jener Zeit wurde Mdmx für die p53-Regulation und Krebskontrolle noch nicht als wichtig erkannt. Erst kürzlich wurde die Struktur von Mdmx im Komplex mit p53 veröffentlicht (Abbildungen 2g und 3g).^[35,36] Sowohl Mdm2 als auch Mdmx binden p53 vornehmlich über hydrophobe Wechselwirkungen, wobei p53 über eine kurze Helix in die Mdm2/x-Bindungstasche bindet. Die drei wichtigsten Aminosäuren, die zu dieser Bindung beitragen, sind Phe19, Trp23 und Leu26. Diese Aminosäuren befinden sich auf der hydrophoben Seite der amphipathischen p53-Helix, und ihre Seitenketten sind tief im Bindungsraum von Mdm2/x positioniert. Das Trp23-ε-Stickstoffatom bildet eine Wasserstoffbrücke zu Leu54 in Mdm2 (Met53 in Mdmx), die wegen der

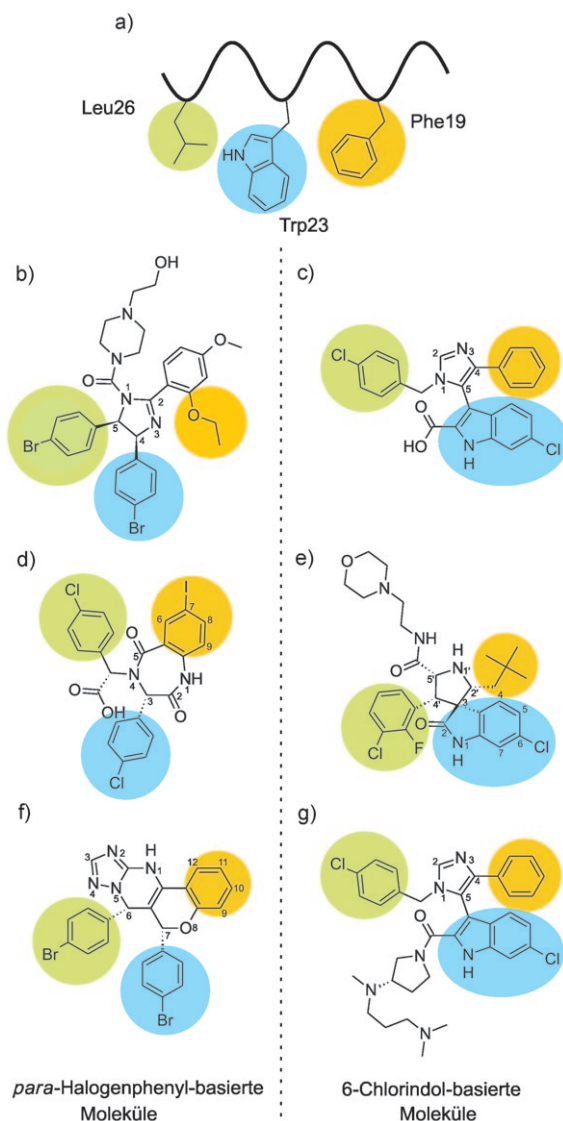


Abbildung 1. Niedermolekulare Mdm2/x-Inhibitoren. a) Das p53-Protein bindet Mdm2/x über eine kurze Helix mit drei hydrophoben Resten (Phe19, Trp23 und Leu26), die die Bindungstaschen füllen. Leu26, Trp23 und Phe19 sind grün, blau bzw. orange dargestellt. b) Nutlin-2, ein eng verwandtes Derivat des bestuntersuchten Mdm2-Inhibitors Nutlin-3. c) Imidazol-Indol-Verbindung WK23 in Komplex mit Mdm2. WK23 enthält eine 6-Chlorindoleinheit, die wie die Trp23-Seitenkette von p53 an Mdm2 gebunden ist. d) Benzodiazepindion mit zwei *para*-halogenierten Phenylringen, ähnlich den Nutlinen. Die Phe19-Bindungstasche ist mit dem 7-Iodobenzolring gefüllt. e) Ein Diastereomer von MI-63 mit einer 6-Chlorindoleinheit, die in der Trp23-Bindungstasche lokalisiert ist. Die Phe19-Bindungstasche wechselwirkt mit der Neopentylgruppe des Inhibitors, und das 2-Fluor-3-chlorphenyl-Ringfragment befindet sich in der Leu26-Bindungstasche. f) Die Chromenotriazolopyrimidin-Verbindung enthält ebenfalls zwei halogenierte Phenylringe, die die Trp23- und Leu26-Bindungstaschen in einer Nutlin-ähnlichen Weise füllen. g) Imidazol-Indol-Verbindung WW298 im Komplex mit Mdmx. Die 6-Chlorindoleinheit bindet Mdmx in derselben Weise wie die Trp23-Seitenkette von p53. Während (c), (e) und (g) die Trp-Bindungstasche mit 6-Chlorindoleinheiten füllen, nutzen (b), (d) und (f) hierfür eine 4-Halogenphenyl-Seitengruppe.

benachbarten Aminosäuren für Wasser unzugänglich ist. Der Mdm2-p53- und der Mdmx-p53-Komplex zeigen sehr ähnli-

che Bindungseigenschaften (Abbildungen 2a,g und 3a,g). Der Hauptunterschied ist die Form der Leu26-Bindungstasche. Durch die Korrelation der Met53-Seitenkette in Mdmx mit der Leu54-Seitenkette in Mdm2 ist die Leu26-Bindungstasche im Mdm2-Protein größer und schmäler als in Mdmx; darüber hinaus hat sie eine unterschiedliche Form in der Pro95-Tyr99-Region.^[36,37] Ein anderer wichtiger Unterschied zwischen der Mdm2-p53- und der Mdmx-p53-Bindung ist das Auftreten einer zusätzlichen hydrophoben Zone neben Leu26 in der letzteren. Diese Zone wird durch Leu33, Val52 und Leu106 gebildet und durch die Met53- und Leu102-Seitenketten von der Leu26-Bindestelle abgegrenzt. Das p53-Protein bindet nicht an dieser Stelle.^[36] Adressierung dieser eher flachen und ca. 10 Å langen Bindungstasche könnte sich für das Design hoch affiner Mdmx-Liganden als essenziell erweisen.

3. Niedermolekulare Inhibitoren der Mdm2-p53- und Mdmx-p53-Wechselwirkungen

Niedermolekulare Inhibitoren von Enzymen, Rezeptoren oder Protein-Protein-Komplexen sind in der pharmazeutischen Industrie als Wirkstoff-Kandidaten sehr populär. Aus diesem Grund ist es nicht verwunderlich, dass alle größeren pharmazeutischen Firmen und auch mehrere kleinere Biotechnologiefirmen Mdm2-p53-Inhibitor-Projekte verfolgen. Die am weitesten fortgeschrittenen Inhibitoren der Mdm2-p53-Wechselwirkung sind Nutlin und MI. In den folgenden Unterabschnitten werden alle Substanzen mit hoch aufgelösten Röntgenkristallstrukturen beschrieben, beginnend mit Roches Nutlin. Alle veröffentlichten und potenten Inhibitoren haben entweder einen Ligandensatz aus *para*-halogenierten Phenylresten oder einen aus 6-Chlor(ox)indol, das die Trp23-Bindungstasche füllt, zusammen mit verschiedenen voluminösen, hydrophoben Resten (aliphatischer oder aromatischer Natur), die die Phe19- und Leu26-Bindungstasche füllen (Abbildung 1).

3.1. Nutline

Das Nutlingrundgerüst mit seinem tetrasubstituierten Imidazolidinkern wurde mit einem Hochdurchsatz-Screening (HTS) entdeckt; die Nutline sind mit bis jetzt über 900 Literaturstellen die bestcharakterisierte Substanzklasse.^[16,21,38] Nutlin-2 war auch der erste Inhibitor, dessen Kristallstruktur im Komplex mit Mdm2 publiziert wurde (PDB-Code: 1V1).^[38] Von den drei publizierten Nutlinen ist Nutlin-3 mit einem K_i -Wert von 36 nM das wirksamste und bestuntersuchte.^[39] Nutlin-1 und Nutlin-2 zeigen eine drei- bzw. zweifach geringere Affinität zu Mdm2. Nutlin-3 bindet auch Mdmx, jedoch mit einer ca. 1000-fach geringeren Affinität von 25 μ M.^[35] Nutlin-3 basiert auf einem *cis*-4,5-Dihydroimidazol-Grundkörper (Abbildung 1b), an dem vier Substituenten befestigt sind. Die Details der Bindungsanordnung in Nutlin-2 sind in den Abbildungen 2b und 3b dargestellt. Die beiden *para*-Bromphenyl-Substituenten ragen direkt in die beiden Taschen der Mdm2-Bindungsstelle (Trp23 und

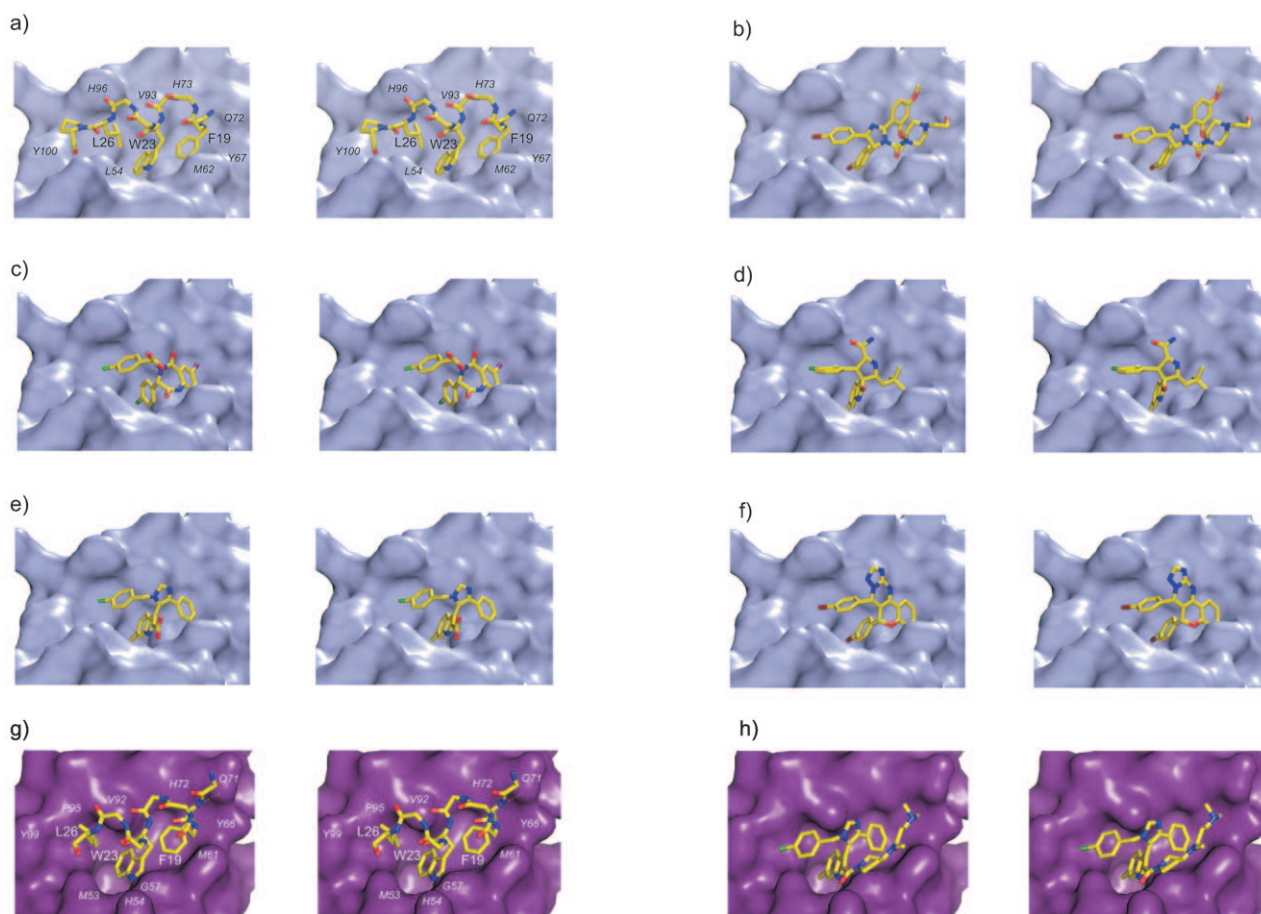


Abbildung 2. Als Stereogramm dargestellte Strukturdetails der Mdm2/x-p53-Bindungsinhibitoren. p53-Reste sind fett und Mdm2/x-Reste kursiv markiert. Wasserstoffbrücken sind als gelb gestrichelte Linien dargestellt. Farbschema: gelb C, dunkelrot Br, grün Cl, hellblau F, violett I, blau N, rot O. a) p53 bildet eine kurze Helix, die die Phe19-, Trp23- und Leu26-Reste in der Bindungstasche von Mdm2 positioniert. b) Nutlin-2. c) Benzo-diazepindion. d) MI-63-Diastereomer (es wird keine Elektronendichte für den Morpholinoethylteil beobachtet). e) WK23. f) Chromenotriazolopyrimidin. g) Die Struktur des menschlichen Mdmx im Komplex mit p53. Der generelle Wechselwirkungsmechanismus von p53 ist fast identisch zu dem in Mdm2 (a). h) WW298 bindet Mdmx in einer ähnlichen Weise wie WK23; außerdem faltet sich der *N,N*-Dimethylpropylaminrest über die Phe19-Bindungstasche und erweitert dadurch die hydrophoben Wechselwirkungen.

Leu26), während der dritte Phenylsubstituent die dritte Tasche (Phe19) nur indirekt über einen *ortho*-Isopropoxy-substituenten erreicht. Der *para*-Bromphenylring der Imidazolidin-5-Position taucht tief in die Trp23 Tasche, während derjenige in 4-Position die Leu26-Bindungstasche ausfüllt. Das *para*-Bromatom, das sich am Ende der Trp23-Bindungstasche befindet, füllt eine kleine hydrophobe Subtasche, die zwar auf der molekularen Oberfläche von Mdm2 vorhanden ist, aber durch den Indolring von Trp23 nicht gefüllt wird. Das Füllen dieses Raumes durch ein hydrophobes Atom, gewöhnlich ein Halogenatom (Cl oder Br), scheint eine wesentliche Eigenschaft potenter Mdm2-Inhibitoren zu sein und wurde schon während früher Peptidstudien erkannt.^[40] Die Phe19-Bindungstasche ist mit dem *ortho*-Isopropoxyrest gefüllt. In Analogie zum Peptidliganden könnte man annehmen, dass die Phe19-Bindungstasche am besten mit einem aromatischen Pharmakophor gefüllt sein sollte; dies ist aber bei den Nutlin- und MI-Molekülen (siehe Abschnitt 3.3) nicht der Fall. Der vierte Imidazolsubstituent, der *N*-2-Hydroxyethylpiperazinring, dringt nicht direkt in die

p53-Spalte ein, sondern bedeckt die Phe19-Bindungstasche in der Nähe der Met62-Seitenkette von Mdm2. Es ist anzunehmen, dass dieses heterocyclische Motiv, mit zwei Stickstoffatomen und einer Hydroxygruppe, die Wasserlöslichkeit beträchtlich erhöht; zusätzlich ermöglichen seine drei Ethyleneinheiten weitere hydrophobe Kontakte, wogegen die Hydroxygruppe polare Kontakte zu den Seitenketten von Gln72 eingeht. Insgesamt bilden diese Gruppen eine gleichmäßige hydrophile Oberfläche des Komplexes und damit einen Übergang zum Lösungsmittel.

Kleine Strukturänderungen von Nutlin-1 hin zu Nutlin-3, im Grunde genommen die Feinabstimmung der hydrophilen Seite des Moleküls, führen zu einer fast dreifach besseren Bindung von Nutlin-3; Modifikationen dieser Seitengruppe können sowohl zur Verbesserung der Affinität als auch anderer, Target-unabhängiger Eigenschaften, wie Löslichkeit und Lipophilie, herangezogen werden (Tabelle 1, Schema 1).

Offensichtlich wechselwirken die hydrophilen Fragmente von Nutlin nicht direkt mit Mdm2, sondern nur über eine Lösungsmittel-exponierte Substruktur an der Bindungs-

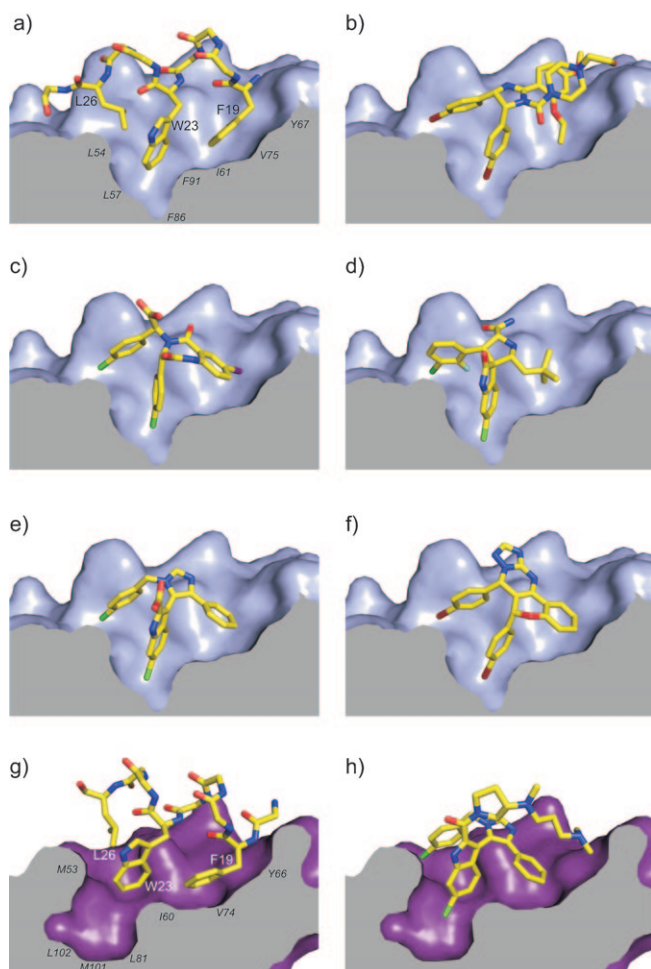


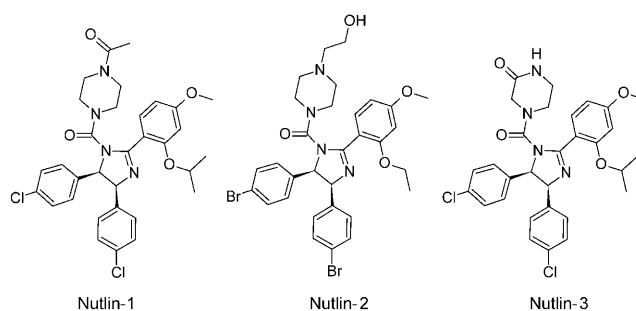
Abbildung 3. Ansicht der verschiedenen Komplexe (Farbschema siehe Abbildung 2): a) Mdm2 im Komplex mit dem p53-Protein (Seitenketten, bei denen es sich nicht um Phe19, Trp23 und Leu26 handelt, sind nicht dargestellt). P53-Reste sind fett markiert und Mdm2/x-Reste kursiv. Andere Komplexe mit p53: b) Nutlin-2, c) Benzodiazepindion, d) MI-63-Diastereomer, e) WK23, f) Chromenotriazolopyrimidin, g) Mdmx (die Form der Leu26-Bindungstaschen von Mdm2 und Mdmx ist ein wesentlicher Unterschied), h) WW298.

schnittstelle. So wird verhindert, dass Wasser in die hydrophobe Schnittstelle eindringen kann, was sich positiv auf die Bindungsenergie auswirkt. Für die Optimierung des Ligan-

Tabelle 1: Bindungskonstanten von Mdm2/x-p53-Inhibitoren mit bekannten Komplexstrukturen.

Inhibitor	Mdm2 K_i [μM]	Mdmx K_i [μM]	Lit.
p53	0.89	0.21	[35]
Nutlin-1	0.26 (IC50)	–	[38]
Nutlin-2	0.14 (IC50)	–	[38]
Nutlin-3 ^[a]	0.036, 0.09 (IC50)	9.38	[38, 39]
WK23	0.916	36	[33]
Benzodiazepindion	0.080	–	[41]
MI-63 (Analogon)	0.005 (0.036)	55	[33, 39]
Chromenotriazolopyrimidin	1.23 (IC50)	–	[51]
WW298	0.109	11	[33]

[a] Keine Kristallstruktur wurde veröffentlicht, aber es kann angenommen werden, dass die Struktur jener von Nutlin-2 sehr ähnlich ist.



Schema 1. Vergleich von Nutlin-1, Nutlin-2 und Nutlin-3.

den zu einem Wirkstoff-ähnlichen Molekül müssen seine hydrophilen und hydrophoben Eigenschaften berücksichtigt werden, die untrennbar miteinander verbunden sind.

Der Mdm2-Nutlin-2-Komplex weist im Vergleich zu der Mdm2-p53- oder der Apoprotein-Struktur keine durch den Liganden hervorgerufene Strukturänderung („induced fit“) auf (so beträgt die Wurzelquadratabweichung aller Atome zwischen dem Mdm2-Nutlin-2- und dem Mdm2-p53-Komplex nur 0.85 Å). Der einzig nennenswerte Unterschied ist die Orientierung der Seitenkette von Tyr100: In der Struktur mit Wildtyp-p53 zeigt das Tyr100 aus der Leu26-Bindungstasche hinaus („offene Konformation“),^[33,34] während das Tyr100 in der Nutlin-gebundenen Struktur der Leu26-Bindungstasche zugewendet ist („geschlossene Konformation“).^[33,38]

3.2. Benzodiazepindion

Kurz nach den Nutlinen veröffentlichten Grasberger et al. eine Cokristallstruktur eines Benzodiazepindions (PDB-Code: 1T4E; Abbildung 1d).^[41] Die Verbindungsklasse der Benzodiazepindione wurde durch ein HTS nach dem „Thermo Fluor“-Prinzip entdeckt.^[42] Dazu wurden über 300 000 Substanzen getestet. Der ursprüngliche Treffer wurde zu einer Leitsubstanz mit dem Akronym TDP222669 optimiert.^[43,44] TDP222669 zeigt eine Affinität von 80 nM und ist auch aktiv in einem Xenograft-Krebsmodell (Tabelle 1). Allerdings weist die Substanz eine geringe Bioverfügbarkeit auf und wird schnell abgebaut, weswegen sie auf Kosten ihrer Affinität dahingehend optimiert wurde.^[42,43] Die Struktur von TDP222669-gebundenem Mdm2 lässt erkennen, dass die *para*-Chlorphenyleinheit, ähnlich wie bei Nutlin, an Position 3 eines zentralen, gesättigten 1,4-Diazepindionrings gebunden ist. Der *para*-Chlorphenylglycin-Substituent, gebunden über das Stickstoffatom in 4-Position des Benzodiazepindionrings, füllt die Leu26-Bindungstasche, wobei das *para*-Chloratom an der tiefsten Stelle der Leu26-Bindungstasche positioniert ist. Die beiden *para*-Chlorphenylringe können mit den entsprechenden Phenylringen der Nutlinstruktur zur Deckung gebracht werden (Abbildungen 2c und 3c). Wenn beide Komplexe übereinander gelegt werden, unterscheiden sich die zwei Chloratome in der Trp23- und Leu26-Bindungstasche um nur 0.32 bzw. 0.44 Å. Die mit dem Diazepindionring anellierte 7-Iodphenylgruppe ist in der Phe19-Bindungstasche lokalisiert. Diese Gruppe dringt zwar nicht ganz so tief in die Tasche ein wie der Phe19-Ring, offenbar aber immer noch tief

genug für eine hoch affine Wechselwirkung. Das Iodatome an Position 7 geht einen engen Kontakt zum Carbonylgerüst von Gln72 ein, der kürzer als die Summe der Van-der-Waals-Radien ist.^[45] Der isomorphe Austausch des Iodatoms in Position 7 gegen andere Substituenten (H, Halogene, Acetylene, Me, CN usw.) zeigt, dass eine Halogenbindung (d.h. eine C–I...O-Bindung) eine ähnliche Bindungsstärke wie eine schwache Wasserstoffbindung hat und damit substantiell zur beobachteten Affinität beiträgt.

TDP222669 enthält auch eine zum Wasser hin gerichtete, polare Carbonsäure als Seitenkette. Diese Gruppe hat zwei Funktionen: die Substanz etwas hydrophiler zu machen und die Affinität zur Bindungstasche zu erhöhen. Umfassende SAR-Studien bestätigten die Bedeutung dieser auf der Oberfläche exponierten Gruppe. Außerdem fand man heraus, dass die solubilisierende Seitenkette der Substanz einen starken Einfluss auf die zelluläre Aktivität hat, indem sie wahrscheinlich das Durchdringen der Zellmembran ermöglicht.^[42,43]

Anders als beim Mdm2-p53-Komplex bewirkt die Bindung des Benzodiazepin-Inhibitors keine nennenswerten Liganden-induzierten Strukturänderungen („induced fit“). Die Position des Tyr100 ist ähnlich zu jener im Mdm2-Nutlin-Komplex, wenngleich eine Wechselwirkung der zusätzlichen Gln16–Gln24-Sequenz des von Grasberger et al. kristallisierten Mdm2-Konstrukts nicht auszuschließen ist.^[41] Diese Sequenz ist in dem Mdm2-Konstrukt, das für die Kristallisation mit Nutlin verwendet worden ist, nicht vorhanden.

3.3. Die MI-219-Familie

MI-219 und das diastereomere MI-63 sind die ersten Inhibitoren der Mdm2-p53-Wechselwirkung, bei denen eine 6-Chloroxindoleinheit als Trp23-Mimetikum verwendet wird (Abbildung 1e).^[39,46] Sie sind nach Nutlin die am besten charakterisierten Inhibitoren.^[21] Ihr Grundgerüst wurde de novo durch Erweiterung der Oxindoleinheit konstruiert. Das Konstrukt wurde auf Grundlage von Naturstoffen, die diese Substruktur enthalten, synthetisiert.^[46] Die Affinitäten zu Mdm2 betragen 5 (MI-219) und 3 nM (MI-63). Diese Familie von Verbindungen bindet Mdmx mit einer über 10000-mal geringeren Affinität, mit einem K_i -Wert von über 50 μ M (Tabelle 1). Das Grundgerüst dieser Klasse von Molekülen ist ein Spirooxindol-3,3'-pyrrolidin, das 1) die Trp23-Bindungstasche füllt, 2) als Gerüst für die Positionierung weiterer Substituenten dient, die die Leu26- und Phe19-Bindungstaschen füllen, und 3) für eine gute Wasserlöslichkeit sorgt. Gemäß dem Docking-Modell von Ding et al.^[46] füllt der Neopentylsubstituent an Position 2 des Pyrrolidinrings die Leu26-Bindungstasche und der Halogen-substituierte Phenylring an Position 4' die Phe19-Bindungstasche. Diese Konformation wird durch ein 2'R,3S,4'R,5'R-Diastereomer verwirklicht. Interessanterweise wurde in der kürzlich veröffentlichten Struktur ein 2'R,3R,4'S,5'R-Diastereomer kristallisiert, das ähnliche Affinitäten wie das erstgenannte Diastereomer hat (PdB-Code: 3LBL).^[33] Die Bindungsdetails sind in den Abbildungen 2d und 3d dargestellt. Jacoby et al.^[47] erhielten die Struktur des ersten Diastereomers, die jedoch

wegen nicht hinterlegter Koordinaten nicht analysiert werden konnte. Da die Mdm2-p53-Bindungstasche pseudosymmetrisch entlang der Trp23-Indolfläche ist, ist es möglich, dass beide Diastereomere mit ähnlich hoher Affinität an Mdm2 binden. In der veröffentlichten Kristallstruktur ist die 6-Chloroxindolgruppe in der Trp23-Bindungstasche lokalisiert und bildet eine Wasserstoffbrücke zum Leu54-Carbonylsauerstoffatom des Mdm2-Proteins. Diese Wechselwirkung wurde von Ding et al. vorhergesagt.^[46] In der Kristallstruktur ist der 2-Fluor-3-chlorphenylring in ähnlicher Weise in der Leu26-Bindungstasche positioniert wie der *para*-Chlorphenylring von Nutlin. Die Konfigurationen des 2-Fluor-3-chlorphenyl-Substituenten wie auch der Neopentylgruppe sind in dieser Struktur ein exaktes Spiegelbild zum Modell von Ding et al.^[46]

Die hohe Symmetrie der p53-Bindungstasche entlang der Indolebene von Mdm2 ermöglicht es dem Molekül, auf zwei Arten zu binden. Jede davon kann mit einem anderen Enantiomer oder Diastereomer realisiert werden. Bis jetzt gibt es noch keine systematische Studie, die die Bindungseigenschaften verschiedener Isomere eines Moleküls hinsichtlich der Bindung zu Mdm2 untersucht. Dieser ungewöhnliche Aspekt erfordert noch weitere Untersuchungen. Die meisten Experimente werden normalerweise mit racemischen Mischungen von Inhibitoren der Mdm2-p53-Wechselwirkung durchgeführt. Aus diesem Grund muss man die Bindungsdaten mit Vorsicht betrachten, da es möglich ist, dass mehr als ein Stereoisomer wechselwirkt.

Der Tyr100-Rest bleibt in der „offenen Konformation“, wodurch genug Platz für das *para*-Halogenatom bleibt.^[33] Die Phe19-Bindungstasche wird durch eine Neopentylgruppe gefüllt. Hier kann eine wichtige, Liganden-induzierte Strukturänderung („induced fit“) beobachtet werden: Die Tyr67-Seitenkette von Mdm2 faltet sich in das Innere der Tasche und verdrängt somit den His73-Rest. Zusätzlich erstreckt sich der Pyrrolidinring des Inhibitors über Val93. Die Amidgruppe an der Pyrrolidin-5-Position bildet eine Wasserstoffbrücke zwischen dem Carbonylsauerstoffatom und der His96-Seitenkette.

Die MI-63-Derivate enthalten eine Morpholinoethylamidseitenkette, die in der Kristallstruktur – womöglich wegen ihrer Flexibilität – nicht sichtbar ist. Basierend auf der Pyrrolidinamidposition muss angenommen werden, dass sich die Seitenkette entlang der Phe19-Bindungstasche erstreckt, während der Morpholinring sich in der Region zwischen Gln72 und Lys94 befindet. Auch hier sorgt die Seitenkette für die Wasserlöslichkeit und gleichzeitig für zusätzliche bindende Wechselwirkungen.

Die Röntgenkristallstruktur erklärt auch, warum MI-Moleküle schlechte Mdmx-Inhibitoren sind: Die konformative Starrheit des Spirooxindolgrundgerüsts ermöglicht keine Anpassung an die kleinen Rezeptorunterschiede zwischen Mdmx und Mdm2 (wegen der Unfähigkeit von Mdmx zu Liganden-induzierten Veränderungen an der Phe19-Bindungstasche, wegen der starren, „geschlossenen Konformation“ von Tyr99 und der Unbeweglichkeit des Rückgrats, das nur für MI-Serie genutzt wird). Basierend auf diesen Struktureigenschaften können neuartige Verbindungsklassen mit erweiterten dualen Bindungseigenschaften konstruiert und optimiert werden.

3.4. Imidazol-Indole

Imidazol-Indole sind die jüngste Entwicklung auf dem Gebiet der Inhibitoren der Mdm2/x-p53-Wechselwirkung. Diese Verbindungen wurden unabhängig voneinander zur selben Zeit von zwei Forschungsgruppen entdeckt (Abbildung 1 c und g).^[48–50] Ein Mitglied dieser Familie, genannt WW298 oder Novartis-101, ist die bisher einzige Verbindung, von der eine Kristallstruktur mit dem Mdmx-Protein veröffentlicht wurde (PDB-Code: 3LBJ).^[33] Die gleiche Publikation zeigt auch die Struktur eines anderen Mitglieds dieser Familie, genannt WK23, gebunden an das Mdm2-Protein (PDB-Code: 3LBK; Abbildungen 2 e und 3 e). Zwar liegt die Affinität von WW298 für Mdmx nur im mikromolaren Bereich (für Mdm2 109 nM; Tabelle 1), allerdings gibt die Mdmx-Inhibitor-Struktur einen ersten und wertvollen Einblick in die Details der Mdmx-Inhibitor-Wechselwirkung (Abbildungen 2 h und 3 h).^[33] Das Grundgerüst dieser Verbindungsklasse besteht aus einem planaren aromatischen Imidazolring mit einem Phenylsubstituenten in 4-Position, einem 2-Carboxy-6-chlorindolsubstituenten in 5-Position und einem *para*-Chlorbenzylsubstituenten in 1-Position. Verbindungen dieser Familie unterscheiden sich durch unterschiedliche Amidsubstituenten der Carboxygruppe der 2-Carboxy-6-chlorindol-Einheit. Der Mechanismus der Bindung von Imidazol-Indolen an Mdm2 gleicht dem der Bindung an Mdmx. Die Indoleinheit ist am Boden der Trp23-Bindungstasche in einer „Tryptophan-imitierenden“ Weise verankert, und ihr Chloratom verursacht im Fall von Mdmx signifikante Veränderungen am Taschenboden, um sein größeres Volumen unterzubringen. In der Mdm2-Struktur gibt es keine Notwendigkeit für eine solche Umstrukturierung, da bereits genügend Platz verfügbar ist. In beiden Strukturen bilden die Indolstickstoffatome Wasserstoffbrücken zur Carbonylgruppe von Met53 (Mdmx) bzw. Leu54 (Mdm2) und ahmen so die p53-Wechselwirkung perfekt nach. Die Phe19-Bindungstasche wird auf ähnliche Weise in beiden Proteinen durch den Phenylring gefüllt, jedoch ist dessen Anordnung senkrecht zu jener, die der Phe19-Ring einnehmen würde. In keiner der beiden Strukturen dringt der Phenylring so tief in die Tasche ein wie der Phe19-Rest von p53. Dies scheint eine generelle Eigenschaft der meisten Mdm2-Inhibitoren zu sein, was jedoch die hohe Affinität dieser Moleküle nicht verringert. Die Leu26-Bindungstasche wird durch die *para*-Chlorbenzylgruppe in einer Nutlin-ähnlichen Weise gefüllt. Diese Wechselwirkungen werden sowohl für den Komplex mit Mdm2 als auch für den mit Mdmx beobachtet. Offensichtlich ermöglicht die größere Flexibilität der Imidazol-Indol-Familie kleine Ligandenanpassungen an unterschiedliche Eigenschaften der Bindungstaschen von Mdmx und Mdm2, im Unterschied zu den konformativ sehr eingeschränkten Spirooxindolen.

In der Mdmx-Struktur sieht man den *N,N*-Dimethylaminopropylteil von WW298 über die Phe19-Bindungstasche gefaltet, sehr ähnlich dem Piperazin als Teil der Nutlinstruktur. Das *N,N*-Dimethylaminopropylpyrrolidin-Fragment ist verantwortlich für die herausragende Wasserlöslichkeit von WW298. Gleichzeitig schützt es die Phe19-Bindungstasche vor Lösungsmittel, indem es die hydrophobe Region, die von Met61 und Tyr66 gebildet wird, abschirmt. Zusätzlich bietet

es hydrophobe und elektrostatische Wechselwirkungen und macht die Oberfläche des Komplexes hydrophil. Das Amid-sauerstoffatom der Indol-2-Position bildet eine Wasserstoffbrücke zur His54-Seitenkette von Mdmx. Trotz der Strukturähnlichkeit der Bindungstasche von Mdm2 und Mdmx sowie der zusätzlichen Wechselwirkungen erreicht WW298 nur eine moderate Affinität zu Mdmx (11 μ M),^[33] während WK23, obwohl es nur dem essenziellen Teil von WW293 entspricht, Mdmx mit einer Affinität von immerhin 36 μ M und Mdm2 mit immer noch nanomolarer Bindungsaffinität bindet.

Berücksichtigt man, dass ein 6-Chlorindol-basiertes Peptid in der Lage ist, nanomolare Affinität zu Mdm2 wie auch zu Mdmx zu erreichen, lässt sich die reduzierte Mdmx-Affinität der Imidazol-Indol-Familie erklären durch die suboptimale Substituentenfüllung der Leu26- oder Phe19-Bindungstasche oder durch einen Mangel an Konformations-Freiheitsgraden des Inhibitors für die energetisch optimale Positionierung dieser Elemente. Zusammenfassend ermöglicht die erste Mdmx-Liganden-Cokristallstruktur (Mdmx-WW298) eine detaillierte Bindungsanalyse und eröffnet den Zugang zu künftigen Optimierungsstrategien mit dem Ziel hoher Mdmx-Affinitäten.^[33]

3.5. Chromenotriazolopyrimidine

Eine weitere kürzlich mit Strukturdaten veröffentlichte Verbindungsklasse basiert auf dem Chromenotriazolopyrimidin-Grundgerüst (PDB-Code: 3JZK).^[51] Diese Verbindungsklasse wurde im Rahmen einer HTS gefunden und anschließend medizinalchemisch optimiert. Die beschriebene Verbindung hat eine proapoptotische Wirkung in verschiedenen Krebszellarten, einhergehend mit einer Erhöhung des p53-Pegels. Die Bindungsaffinität zu Mdm2 liegt im submikromolaren Bereich (Tabelle 1). Die Verbindung beruht auf einem flachen heteroaromatischen Chromenotriazolopyrimidin-Grundgerüst mit zwei *para*-Bromphenylringen an Position 6 und 7 (Abbildung 1 f). Typisch für die meisten bekannten Inhibitoren der Mdm2-p53-Wechselwirkung zeigt nur ein bestimmtes Stereoisomer eine sehr gute Affinität. Beide Phenylringe des Inhibitors besetzen die Trp23- und Leu26-Bindungstaschen in einer Nutlin-ähnlichen Weise, wenngleich sie sich ca 0.5 Å tiefer in den Taschen befinden als im Fall der Nutlin-Struktur. Der Benzolring der Chromenosubstruktur befindet sich in der Phe19-Bindungstasche, ähnlich wie das Benzolfragment in der Benzodiazepindionfamilie. Die Einzelheiten der Bindungen sind in den Abbildungen 2 f und 3 f dargestellt. Das Triazolopyrimidinfragment faltet sich über Val93 und His96 und ergibt so zusätzliche hydrophobe und π - π -Wechselwirkungen.

4. Optimierte Peptide und Peptid-basierte Miniproteine

Phagendisplay-Methoden und strukturbasierte Optimierungsverfahren haben zur Entwicklung einer Vielzahl von p53-ähnlichen Peptiden^[29–32, 41, 52–55] und Miniproteinen^[54, 56]

geführt. Mehrere dieser Peptide binden besser an Mdm2/x als das Wildtyp-p53. Sie alle enthalten, quasi als kleinsten gemeinsamen Nenner, die Hot-Spot-Triade Phe19, Trp23 und Leu26. Der Bindungsmechanismus dieser Peptide ähnelt sehr dem des nativen p53, wie von Kussie et al. beschrieben (Abbildungen 1 a und 3).^[34] Die Peptide bilden eine kurze α -Helix, wobei sie die Phe-Trp-Leu-Triade zur Bindungstasche von Mdm2/x hin ausrichten. Ein Hauptunterschied innerhalb dieser Peptidreihe ist die Substitution von Pro27 mit anderen Aminosäuren. Diese kleine Änderung reicht aus, um die Bindung eines Peptids an Mdm2 von 0.7 μ M beim Wildtyp-p53 auf 4.7 nM zu verbessern.^[31,53] Wir haben herausgefunden, dass Pro27 bei den meisten Wirbeltieren nach UV-Bestrahlung weitestgehend erhalten bleibt; dies ist ein Hinweis darauf, dass Pro27 für die Aufrechterhaltung des physiologischen Pegels von p53 verantwortlich sein könnte. Die Mutation von Pro27 ermöglicht die Verlängerung der p53-Helix, was als Grund für die hoch affine Wechselwirkung dieser Peptide vorgeschlagen wurde.^[57] Die andere wichtige Änderung ist der Austausch von Leu22 gegen Tyr,^[31,41] wodurch die hydrophobe Wechselwirkung mit Mdm2 und Mdmx erweitert wird. Im Unterschied zu niedermolekularen Verbindungen, die starke Bindungen zu Mdm2, aber nur sehr begrenzte zu Mdmx aufweisen, erreichen die modifizierten Peptide leicht niedrige nanomolare Affinitäten für beide Proteine.^[31,52] Es ist deshalb denkbar, dass die Mdm2-optimierten *para*-Chlorphenylsubstituenten, die häufig in niedermolekularen Verbindungen genutzt werden, nicht optimal sind, besonders hinsichtlich der Leu26-Bindungstasche, die die größten Unterschiede zwischen Mdm2 und Mdmx aufweist.

5. Optimierung Target-unabhängiger Eigenschaften

Eine brauchbare Wirkstoff-ähnliche Verbindung zur Bestimmung des Werts eines biochemischen Targets für die Wirkstoff-Entwicklung muss nicht nur gute Target-abhängige Eigenschaften wie Affinität und Selektivität, sondern auch Target-unabhängige Eigenschaften wie gute Wasserlöslichkeit, niedrige Lipophilie und einen optimalen pK_a -Wert aufweisen.^[58] Die erstgenannten Eigenschaften führen zu guten pharmakologischen Profilen (z. B. Effizienz und Selektivität), ebenso wichtig sind jedoch die letztgenannten, um eine optimale ADME/Tox zu erreichen (z. B. Blut-Hirn-Barrieren-Durchlässigkeit, metabolische Stabilität, Toxizität). In dieser Hinsicht ist die Wasserlöslichkeit eine Schlüsseleigenschaft. Eine ausreichende Wasserlöslichkeit sichert den Transport des Wirkstoffs zum Ort des erkrankten Gewebes und gewährleistet eine genügend hohe Konzentration, dass die entsprechende biologische Aktivität erreicht wird. Dagegen führen ungenügend wasserlösliche Verbindungen zu schlechter Absorption, geringer Bioverfügbarkeit, ungenügender Löslichkeit für die Applizierung, einer komplizierten Entwicklung und zu einer hohen Dosierung. Zusätzlich ergeben schlecht lösliche Substanzen oft falsch-positive Screening-Befunde. Folglich ist die Wasserlöslichkeit eine sehr wichtige Eigenschaft während der Entdeckung und Entwicklung neuer Wirkstoffe und muss vom Medizinalchemiker sorgfältig optimiert werden.

Die Grenzflächen von Protein-Protein-Wechselwirkungen generell und die p53/Mdm2/x-Grenzflächen im Besonderen stellen Medizinalchemiker vor besonders große Hürden, da sie sehr hydrophob sind. Aus diesem Grund müssen Liganden, die dort binden, hoch lipophil sein, was unvermeidlich mit einer geringen Wasserlöslichkeit einhergeht. Zusätzlich müssen die Liganden zum einen eine zum Lösungsmittel gerichtete, hydrophile Seite aufweisen und zum anderen eine hydrophobe Seite, um die Bindung an Mdm2/x energetisch zu optimieren. Die unterschiedlichen Bindungskonstanten von Nutlin-1 und -3 sowie von WK23 und WW298 bestätigen, dass ein optimierter Lösungsmittel-exponierter Bereich des Liganden essenziell für eine gute Bindung ist. Andererseits ist eine gewisse Lipophilie erwünscht, die es den Verbindungen ermöglicht, die Zellmembran zu passieren. Dies ist für bei p53 essenziell, da sich dieses Target innerhalb der Zelle befindet. Dieses wohlbekannte Dilemma der erforderlichen Lipophilie und der zum Transport benötigten Hydrophilie könnte durch das Studium der publizierten Kokristallstrukturen gelöst werden. Offensichtlich enthalten alle Mdm2/x-Kristallstrukturen eine stark hydrophobe Bindungstasche, die durch den Liganden besetzt werden muss, um eine hohe Affinität zu erreichen; allerdings weisen sie auch eine gut wasserzugängliche, konvexe Bindungsfläche auf (Abbildung 3). Die Strukturmodifizierung einer hydrophoben Mdm2-antagonistischen Verbindungsklasse mit dem Ziel einer verbesserten Wasserlöslichkeit wurde z. B. von Srivastava et al. beschrieben.^[28]

6. Zusammenfassung und Ausblick

Hoch aufgelöste Röntgenkristallstrukturdaten sind erfolgreich genutzt worden, um verschiedene Verbindungsklassen zu optimieren, wodurch Wirkstoff-Kandidaten mit hohen Affinitäten, hoher Selektivität und guten physikochemischen Eigenschaften für eine gute Pharmakokinetik und -dynamik (PK/PD) erzielt werden konnten. Seit der Veröffentlichung der ersten Struktur des Mdm2-p53-Komplexes im Jahr 1996 wurden viele Strukturen mit unterschiedlichen Mdm2- oder Mdmx-bindenden Peptiden beschrieben. Die Strukturanalyse der verschiedenen Klassen von Mdm2-bindenden Molekülen führte zu einem einfachen Pharmakophormodell, bekannt als „Daumen-Zeigefinger-Mittelfinger-Modell“, das die Strukturanforderungen für Mdm2-bindende Moleküle bildlich zusammenfasst (Abbildungen 1 a, 2 a und 3 a).^[59]

Bis vor kurzem waren als niedermolekulare Inhibitoren der Mdm2/x-p53-Wechselwirkung nur die Nutline und Benzodiazepindione strukturell charakterisiert. Mit den mittlerweile fünf Inhibitorklassen, die jetzt charakterisiert sind, ist es möglich, bewährte Techniken – wie Grundgerüstwechsel (Scaffold-Hopping) und andere rationale strukturbasierte Optimierungstechniken – zu nutzen, um neue, hochpotente Mdm2/x-Inhibitoren zu entwickeln.

Viele der derzeit bekannten Inhibitoren wurden bewusst für Mdm2 optimiert, weshalb sie nur eine niedrige oder gar keine Affinität zu Mdmx aufweisen; da die Unterschiede zwischen beiden Proteinen jedoch eher gering sind, sollte es

jetzt möglich sein, durch Einblicke in die Struktur und deren systematische chemische Optimierung auch potente Mdmx-Antagonisten zu entwickeln. Es ist auch möglich, dass sich Moleküle, die von der Wirkstoff-Optimierung für Mdm2 ausgeschlossen wurden, als effiziente Mdmx-Kandidaten herausstellen. Aus diesem Grund ist es lohnenswert, vorhandene Mdm2-fokussierte Substanzbibliotheken auf ihre Mdmx-Affinität zu untersuchen. Es wurde postuliert, dass effiziente Inhibitoren der Mdmx-p53-Wechselwirkung auch die Mdm2-p53-Wechselwirkung wirksam hemmen, jedoch nicht umgekehrt.^[35]

Aufbauend auf den hier vorgestellten Arbeiten sollte es möglich sein, p53 effektiv von seinen Bindungsproteinen Mdm2 und Mdmx zu trennen, um so seine Antitumoraktivität wiederherzustellen. Der Fortschritt auf dem Gebiet der Mdm2-Inhibitoren lässt hoffen, dass die Entwicklung wirkungsvoller Mdmx- oder dualer Mdm2/x-Inhibitoren möglich sein sollte. Derartige neue, p53-Signaltransduktionswege beeinflussende Verbindungen könnten damit die Grundlage für die Entwicklung neuartiger Tumortheraeutika bilden.

Diese Arbeit wurde von der Deutschen Krebshilfe (Fördernummer 108354 (T.A.H.)), den NIH (Fördernummern 1R21M087617-01A und 1P41M094055-01), dem NCI-RAND Programm und der University of Pittsburgh (A.D.) unterstützt.

Eingegangen am 24. Juni 2010,

veränderte Fassung am 6. August 2010

Online veröffentlicht am 21. Februar 2011

- [1] C. J. Brown, S. Lain, C. S. Verma, A. R. Fersht, D. P. Lane, *Nat. Rev. Cancer* **2009**, 9, 862.
- [2] Y. Zhang, H. Lu, *Cancer Cell* **2009**, 16, 369.
- [3] D. Menendez, A. Inga, M. A. Resnick, *Nat. Rev. Cancer* **2009**, 9, 724.
- [4] Y. Liu, S. E. Elf, T. Asai, Y. Miyata, Y. Liu, G. Sashida, G. Huang, S. Giandomenico, A. Koff, S. D. Nimer, *Cell Cycle* **2009**, 8, 3120.
- [5] D. W. Meek, *J. Med. Cancer* **2009**, 9, 714.
- [6] M. Wade, Y. V. Wang, G. M. Wahl, *Trends Cell Biol.* **2010**, 20, 299.
- [7] A. Dey, D. P. Lane, C. S. Verma, *Semin. Cancer Biol.* **2010**, 20, 3.
- [8] K. H. Vousden, D. P. Lane, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2007**, 8, 275.
- [9] A. C. Joerger, A. R. Fersht, *Annu. Rev. Biochem.* **2008**, 77, 557.
- [10] J. C. Marine, A. G. Jochemsen, *Cell Cycle* **2004**, 3, 900.
- [11] J. C. Marine, G. Lozano, *Cell Death Differ.* **2010**, 17, 93.
- [12] J. T. Lee, W. Gu, *Cell Death Differ.* **2010**, 17, 86.
- [13] F. Toledo, G. M. Wahl, *Nat. Rev. Cancer* **2006**, 6, 909.
- [14] F. Toledo, G. M. Wahl, *Cell Biol.* **2007**, 39, 1476.
- [15] a) J. Marx, *Science* **2007**, 315, 1211; b) C. P. Martins, L. Brown-Swigart, G. I. Evan, *Cell* **2006**, 127, 1323; c) A. Ventura, D. G. Kirsch, M. E. McLaughlin, D. A. Tuveson, J. Grimm, L. Lintault, J. Newman, E. E. Reczek, R. Weissleder, T. Jacks, *Nature* **2007**, 445, 661; d) W. Xue, L. Zender, C. Miething, R. A. Dickins, E. Hernandez, V. Krizhanovsky, C. Cordon-Cardo, S. W. Lowe, *Nature* **2007**, 445, 656.
- [16] L. T. Vassilev, *J. Med. Chem.* **2005**, 48, 4491.
- [17] L. T. Vassilev, *Trends Mol. Med.* **2007**, 13, 23.
- [18] M. Kitagawa, M. Aonuma, S. H. Lee, S. Fukutake, F. McCormick, *Oncogene* **2008**, 27, 5303.
- [19] S. V. Tokalov, N. D. Abolmaali, *BMC Cancer* **2010**, 23, 57.
- [20] T. Zheng, J. Wang, X. Song, S. Meng, S. Pan, H. Jiang, L. Liu, *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* **2010**, 136, 1597.
- [21] S. Shangary, S. Wang, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **2009**, 49, 223.
- [22] N. A. Laurie, C. S. Shih, M. A. Dyer, *Curr. Cancer Drug Targets* **2007**, 7, 689.
- [23] S. Lam, K. Lodder, A. F. Teunisse, M. J. Rabelink, M. Schutte, A. G. Jochemsen, *Oncogene* **2010**, 29, 2415.
- [24] J. C. Marine, M. A. Dyer, A. G. Jochemsen, *J. Cell Sci.* **2007**, 120, 371.
- [25] B. Hu, D. M. Gilkes, B. Farooqi, S. M. Sebt, J. Chen, *J. Biol. Chem.* **2006**, 281, 33030.
- [26] L. Weber, *Expert Opin. Ther. Pat.* **2010**, 20, 179.
- [27] A. S. Dudkina, C. W. Lindsley, *Curr. Top. Med. Chem.* **2007**, 7, 952.
- [28] S. Srivastava, B. Beck, W. Wang, A. Czarna, T. A. Holak, A. Dömling, *J. Comb. Chem.* **2009**, 11, 631.
- [29] B. Hu, D. M. Gilkes, *J. Chen Cancer Res.* **2007**, 67, 8810.
- [30] J. Kallen, A. Goepfert, A. Blechschmidt, A. Izaac, M. Geiser, G. Tavares, P. Ramage, P. Furet, K. Masuya, J. Lisztwan, *J. Biol. Chem.* **2009**, 284, 8812.
- [31] A. Czarna, G. M. Popowicz, A. Pecak, S. Wolf, G. Dubin, T. A. Holak, *Cell Cycle* **2009**, 8, 1176.
- [32] M. Pazgier, M. Liu, G. Zou, W. Yuan, C. Li, C. Li, J. Li, J. Monbo, D. Zella, S. G. Tarasov, W. Lu, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2009**, 106, 4665.
- [33] G. M. Popowicz, A. Czarna, W. Siglinde, K. Wang, W. Wang, A. Dömling, T. A. Holak, *Cell Cycle* **2010**, 9, 1104.
- [34] P. H. Kussie, S. Gorina, V. Marechal, B. Elenbaas, J. Moreau, A. J. Levine, N. P. Pavletich, *Science* **1996**, 274, 948.
- [35] G. M. Popowicz, A. Czarna, U. Rothweiler, A. Szwagierczak, M. Krajewski, L. Weber, T. A. Holak, *Cell Cycle* **2007**, 6, 2386.
- [36] G. M. Popowicz, A. Czarna, T. A. Holak, *Cell Cycle* **2008**, 7, 2441.
- [37] T. L. Joseph, A. Madhumalar, C. J. Brown, D. P. Lane, C. Verma, *Cell Cycle* **2010**, 9, 1167.
- [38] L. T. Vassilev, B. T. Vu, B. Graves, D. Carvajal, F. Podlaski, Z. Filipovic, N. Kong, U. Kammlott, C. Lukacs, C. Klein, N. Fotouhi, E. A. Liu, *Science* **2004**, 303, 844.
- [39] S. Shangary, D. Qin, D. McEachern, M. Liu, R. S. Miller, S. Qiu, Z. Nikolovska-Coleska, K. Ding, G. Wang, J. Chen, D. Bernard, J. Zhang, Y. Lu, Q. Gu, R. B. Shah, K. J. Pienta, X. Ling, S. Kang, M. Guo, Y. Sun, D. Yang, S. Wang, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2008**, 105, 3933.
- [40] C. García-Echeverría, P. Chene, M. J. Blommers, P. Furet, *J. Med. Chem.* **2000**, 43, 3205.
- [41] B. L. Grasberger, T. Lu, C. Schubert, D. J. Parks, T. E. Carver, H. K. Koblish, M. D. Cummings, L. V. LaFrance, K. L. Milkiewicz, R. R. Calvo, D. Maguire, J. Lattanze, C. F. Franks, S. Zhao, K. Ramachandren, G. R. Bylebyl, M. Zhang, C. L. Manthey, E. C. Petrella, M. W. Pantoliano, I. C. Deckman, J. C. Spurlino, A. C. Maroney, B. E. Tomczuk, C. J. Molloy, R. F. Bone, *J. Med. Chem.* **2005**, 48, 909.
- [42] M. W. Pantoliano, E. C. Petrella, J. D. Kwasnoski, V. S. Lobanov, J. Myslik, E. Graf, T. Carver, E. Asel, B. A. Springer, P. Lane, F. R. Salemme, *J. Biomol. Screening* **2001**, 6, 429.
- [43] H. K. Koblish, S. Zhao, C. F. Franks, R. R. Donatelli, R. M. Tomminovich, L. V. LaFrance, K. A. Leonard, J. M. Gushue, D. J. Parks, R. R. Calvo, K. L. Milkiewicz, J. J. Marugán, P. Raboisson, M. D. Cummings, B. L. Grasberger, D. L. Johnson, T. Lu, C. J. Molloy, A. C. Maroney, *Mol. Cancer Ther.* **2006**, 5, 160.
- [44] D. J. Parks, L. V. LaFrance, R. R. Calvo, K. L. Milkiewicz, J. J. Marugán, P. Raboisson, C. Schubert, H. K. Koblish, S. Zhao, C. F. Franks, J. Lattanze, T. E. Carver, M. D. Cummings, D. Maguire, B. L. Grasberger, A. C. Maroney, T. Lu, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2006**, 16, 3310.
- [45] C. Bissantz, B. Kuhn, M. Stahl, *J. Med. Chem.* **2010**, 53, 5061.

- [46] K. Ding, Y. Lu, Z. Nikolovska-Coleska, S. Qiu, Y. Ding, W. Gao, J. Stuckey, K. Krajewski, P. P. Roller, Y. Tomita, D. A. Parrish, J. R. Deschamps, S. Wang, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 10130.
- [47] E. Jacoby, A. Boettcher, L. M. Mayr, N. Brown, J. L. Jenkins, J. Kallen, C. Engeloch, U. Schopfer, P. Furet, K. Masuya, J. Lisztwan, *Methods Mol. Biol.* **2009**, *575*, 173.
- [48] A. Boettcher, WO 2008119741, **2008**.
- [49] A. Dömling, WO 2008130614, **2008**.
- [50] B. Beck, C. A. Leppert, B. K. Mueller, A. Dömling, *QSAR Comb. Sci.* **2006**, *25*, 527.
- [51] J. G. Allen, M. P. Bourbeau, G. E. Wohlhieter, M. D. Bartberger, K. Michelsen, R. Hungate, R. C. Gadwood, R. D. Gaston, B. Evans, L. W. Mann, M. E. Matison, S. Schneider, X. Huang, D. Yu, P. S. Andrews, A. Reichelt, A. M. Long, P. Yakowec, E. Y. Yang, T. A. Lee, J. D. Oliner, *J. Med. Chem.* **2009**, *52*, 7044.
- [52] J. Phan, Z. Li, A. Kasprzak, B. Li, S. Sebt, W. Guida, E. Schönbrunn, J. Chen, *J. Biol. Chem.* **2010**, *285*, 2174.
- [53] S. C. Zondlo, A. E. Lee, N. J. Zondlo, *Biochemistry* **2006**, *45*, 11945.
- [54] C. Li, M. Pazgier, M. Liu, W. Y. Lu, W. Lu, *Angew. Chem.* **2009**, *121*, 8868; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 8712.
- [55] A. Madhumalar, L. H. Jun, C. J. Brown, D. Lane, C. S. Verma, *Cell Cycle* **2009**, *8*, 137.
- [56] C. Li, M. Liu, J. Monbo, G. Zou, C. Li, W. Yuan, D. Zella, W. Y. Lu, W. Lu, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 13546.
- [57] S. G. Dastidar, D. P. Lane, C. S. Verma, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 13514.
- [58] E. H. Kerns, L. Di, *Drug-like Properties: Concepts, Structure Design and Methods*, Academic, New York, **2008**.
- [59] A. Dömling, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2008**, *12*, 281.
-