

Hydroxyharnstoffe als nichtkovalente Proteasom-Inhibitoren**

Nerea Gallastegui, Philipp Beck, Marcelino Arciniega, Robert Huber, Stefan Hillebrand und Michael Groll*

Das Ubiquitin-Proteasom-System (UPS)^[1] wird mit vielen verschiedenen Krankheiten in Verbindung gebracht, darunter auch das Multiple Myelom. Diese Krebserkrankung des Knochenmarks wird durch die Inhibition des 20S-Proteasoms (CP) als Kernenzym des UPS bereits erfolgreich mit dem „Blockbuster“-Medikament Velcade (Bortezomib) behandelt.^[2] Die Notwendigkeit der Entwicklung von CP-Inhibitoren der zweiten Generation und der Entdeckung von Liganden mit neuartigen Wirkmechanismen ist hingegen groß. Sowohl das breite therapeutische Potenzial von Proteasom-Inhibitoren als auch Resistenzerscheinungen und Unwirksamkeit von derzeit vermarkten Arzneien gegen einige solide Tumortypen belegen den Bedarf an neuen Leitstrukturen.

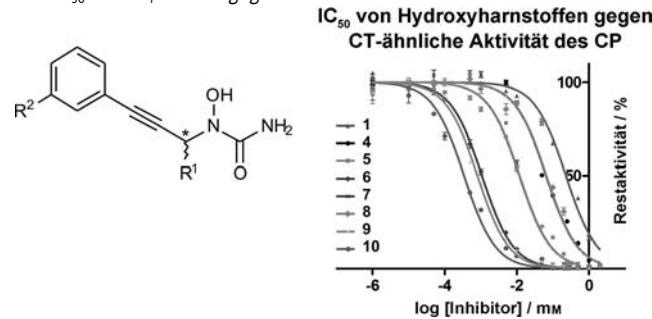
Das eukaryotische CP setzt sich aus vier gestapelten heptameren Ringen zusammen, bestehend aus α - und β -Untereinheiten mit $\alpha_{1-7}\beta_{1-7}\beta_{1-7}\alpha_{1-7}$ -Stöchiometrie.^[3] In diesen β -Untereinheiten befinden sich drei katalytische Zentren mit unterschiedlicher Substratspezifität, die Caspase(C)-, Trypsin(T)- und Chymotrypsin(CT)-ähnliche Aktivität aufweisen. Zwar ist das reaktive Nukleophil Thr10 γ in den Untereinheiten $\beta 1$, $\beta 2$ und $\beta 5$ (C-, T- und CT-ähnliche Aktivitäten) vorhanden; jedoch wird die Spaltpräferenz erst durch das Zusammenspiel von aktiven und umgebenden Untereinheiten der jeweiligen Substratbindetasche festgelegt.^[4]

Alle bisher bekannten CP-Inhibitoren haben entweder eine peptidähnliche Struktur, die ein antiparalleles β -Faltblatt mit dem Substratbindekanal der aktiven Untereinheit bildet, und/oder eine reaktive Kopfgruppe, die kovalent an das terminale Threonin Thr10 γ bindet.^[5] Diese Charakteristika sind jedoch für übermäßige Reaktivität, Unspezifität und Instabilität bisheriger Proteasom-Inhibitoren verantwortlich. Zudem gibt es bisher keine Liganden, die gezielt nur eine der drei Aktivitäten des CP inhibieren. In Studien konnte jedoch gezeigt werden, dass allein die Inaktivierung der $\beta 5$ -Untereinheit ausreicht, um therapeutische Effekte zu erzielen.^[6,7]

Um nichtpeptidische Inhibitoren der CT-ähnlichen Aktivität der $\beta 5$ -Untereinheit mit reversiblem Bindungsmodus zu identifizieren, wurde ein Screening-Experiment mit fluoreszenen peptidischen Substraten durchgeführt. Dieses Screening nutzte eine Ligandenbibliothek der Firma Bayer CropScience.

Einer der dabei identifizierten „Hits“ war eine Verbindung mit einem *N*-Hydroxyharnstoff(HU)-Strukturmotiv (1, Tabelle 1). Interessanterweise ist diese Substanzklasse bereits als Inhibitor der 5-Lipoxygenase bekannt (U.S.-Patent Nr. 5,714,633) und strukturell verwandt mit ZyfloCR (Zileuton),

Tabelle 1: Inhibitorisches Profil von *N*-Hydroxyharnstoff(HU)-Derivaten mit IC_{50} - und K_i -Werten gegen CT-ähnliche Aktivität.^[a]



Verbindung	R ²	R ¹	IC ₅₀ [μM]	K _i [μM]
0	H	H	keine Inhibition	
1	tBuCH ₂ CH ₂ O	Me	229 ± 22	23.1 ± 2.2
2	CF ₃ O	Me	> 1000	—
3	nPentO	Me	> 1000	—
4	tBuMe ₂ SiO	Me	48 ± 2	4.8 ± 0.2
5	(1-Ad)O	H	12.0 ± 1.3	1.02 ± 0.13
6	(1-Ad)O	Et	1.07 ± 0.06	0.107 ± 0.006
7	(1-Ad)O	iPr	10.6 ± 3.7	1.06 ± 0.37
8	(1-Ad)O	Me	0.78 ± 0.16	0.078 ± 0.016
9	(1-Ad)O	Me (S) ^[b]	57 ± 2.5	5.75 ± 0.25
10	(1-Ad)O	Me (R) ^[c]	0.34 ± 0.04	0.034 ± 0.004

[a] Inhibition von T- und C-ähnlicher Aktivität wurde bei einer Konzentration von 200 μ M nicht beobachtet (Abbildung S2). [b] C* mit S-Konfiguration. [c] C* mit R-Konfiguration.

[*] M. Chem. N. Gallastegui, M. Sc. P. Beck, M. Sc. M. Arciniega, Prof. Dr. R. Huber, Prof. Dr. M. Groll
Technische Universität München
Lichtenbergstraße 4, 85747 Garching (Deutschland)
E-Mail: michael.groll@ch.tum.de

Prof. Dr. R. Huber
Zentrum für Medizinische Biotechnologie
Universität Duisburg-Essen (Deutschland)
und
Max-Planck-Institut Biochemie, Martinsried (Deutschland)
S. Hillebrand

Bayer CropScience AG, Monheim (Deutschland)

[**] Wir danken für die hilfreichen Beiträge und Diskussionen mit den Mitarbeitern von Bayer CropScience GmbH: Dr. J. Vidal, Dr. A. Tuch und Dr. P. Schreier. Wir danken R. Feicht für die Aufreinigung von Hefe-20S-Proteasom, O. Ackermann für die Durchführung von HPLC an chiraler Phase und den Mitarbeitern des PXI-Strahlengangs am Paul Scherrer Institut, Swiss Light Source, Villigen, Schweiz, für die Unterstützung bei der Datenaufnahme. Ebenfalls möchten wir den Studenten Martina Müller und Christian Dubiella für die Hilfe bei den Laborarbeiten danken. Diese Arbeit wurde unterstützt durch den SFB 594 – A 11 (M.G.) und das DAAD-CO-NACYT-Stipendium (M.A.).

 Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.201106010> zu finden.

Abbildung S1), einem weltweit verschriebenen Medikament für die Behandlung von Asthma.^[8] Überraschenderweise zeigte **1** nur eine Inhibition der CT-ähnlichen Aktivität mit $IC_{50} = 230 \mu\text{M}$ ($K_i = 23 \mu\text{M}$; Tabelle 1), ohne dabei Einfluss auf die C- und T-ähnliche Aktivität zu nehmen, selbst bei Konzentrationen von $200 \mu\text{M}$ (Abbildung S2).

Darüber hinaus hat **1** keine strukturellen Ähnlichkeiten zu bekannten CP-Inhibitoren und erfüllt die im Vorhinein gestellten Bedingungen bezüglich Spezifität und Reversibilität (Abbildung S2a und b). Besonders im Hinblick auf Zellgängigkeit und Clearance-Rate weisen bereits durchgeführte klinische Studien auf die Eignung von **1** als potenzielle Leitstruktur hin (Abbildung S3a).^[9]

Im Zuge dieser vielversprechenden Ergebnisse wurde eine Kristallstruktur des CP:**1**-Komplexes bestimmt ($R_{\text{frei}} = 0.256$; Tabelle ST1). Die $2F_O - F_C$ -Elektronendichte zeigt **1** in unmittelbarer Nähe zum aktiven Zentrum der $\beta 5$ -Untereinheit mit CT-ähnlicher Aktivität und offenbart einen neuartigen, nichtkovalenten Bindungsmodus (Abbildung S3a).

Die *N*-Hydroxyharnstoff-Kopfgruppe wechselwirkt hierbei nicht mit dem reaktiven $\beta 5$ -Thr1O^γ-Nukleophil, was bisher als grundlegendes mechanistisches Prinzip von CP-Inhibitoren angesehen wurde. Stattdessen stabilisieren Wasserstoffbrücken mit den Hauptkettenatomen $\beta 5$ -Thr21NH/CO und $\beta 5$ -Gly47CO die Kopfgruppe in ähnlicher Weise wie die antiparallelen β -Faltblattstrukturen von Substraten oder peptidischen Inhibitoren, z.B. Calpain-Inhibitor 1 (CAL I; Abbildung 2).

Die Methylgruppe als R^1 in **1** wird durch hydrophobe Wechselwirkungen mit den $\beta 5$ -Seitenketten Met45 und Ala46 stabilisiert, während die Propinylphenyl-Teilstruktur zu einer bisher nicht beobachteten *sub*-Bindetasche der CT-ähnlichen S1-Spezifitätstasche (S1-*sub*-Bindetasche) zeigt, woraus eine Fülle von Van-der-Waals-Wechselwirkungen mit Ser26, Val31, Met45 und Ala49 resultieren (Abbildung S3a). Ferner ist die Bindung an das CP durch die starre Propinylphenyl-Struktur entropisch begünstigt. Die 3,3-Methylbutoxy-Seitenkette in R^2 tritt mit den hydrophoben Seitenkettenatomen von His98, Ser112, Glu122 und Arg125 der $\beta 6$ -Untereinheit in Wechselwirkung, die zusammen eine weitere bisher unentdeckte *sub*-Bindetasche nahe der S3-Tasche bilden (S3-*sub*-Bindetasche; Abbildung S3a). Interessanterweise wird bei Liganden ohne *meta*-Substituent (**0**) keine inhibitorische Wirkung festgestellt, was die Bedeutung der oben genannten Wechselwirkungen für die CP:**HU**-Bindung unterstreicht. Die erhaltenen Strukturdaten bestätigen somit sowohl die Unentbehrlichkeit dieser besonderen Bindestelle bezüglich der Spezifität zur Untereinheit als auch ihre Notwendigkeit zur enthalpischen Stabilisierung des Liganden.

Anschließend wurde eine konvergente Synthesestrategie der **HU**-Verbindungen entworfen, die unter Beibehaltung des

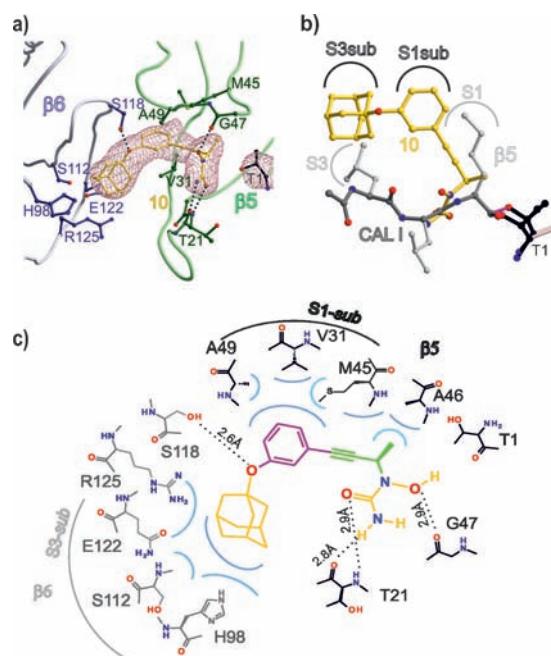


Abbildung 1. Kristallstruktur von CP im Komplex mit dem aktivsten Inhibitor **10** (CP:**10**; PDB-Zugangsnummer: 3SHJ). a) Die *N*-Hydroxyharnstoff-Kopfgruppe bildet ein Netzwerk von Wasserstoffbrücken zu $\beta 5$ -Thr21NH/CO und $\beta 5$ -Gly47CO (schwarze gestrichelte Linien). Reste, welche die S1-*sub*-Bindetasche bilden, sind dunkelgrün dargestellt und umklammern das starre Propinylbenzol-Gerüst, wobei die S3-*sub*-Bindetasche (blau) mit R^2 wechselwirkt. b) Eine Überlagerung von Calpain-Inhibitor I (CAL I) und **10** veranschaulicht den neuartigen Bindungsmodus von **1** und den *sub*-Bindetaschen. c) Schematische Darstellung von (a) mit den Spezifitätstaschen S1-*sub* und S3-*sub* des CT-Substratbindekanals und den entsprechenden Aminosäuren in schwarz bzw. grau.

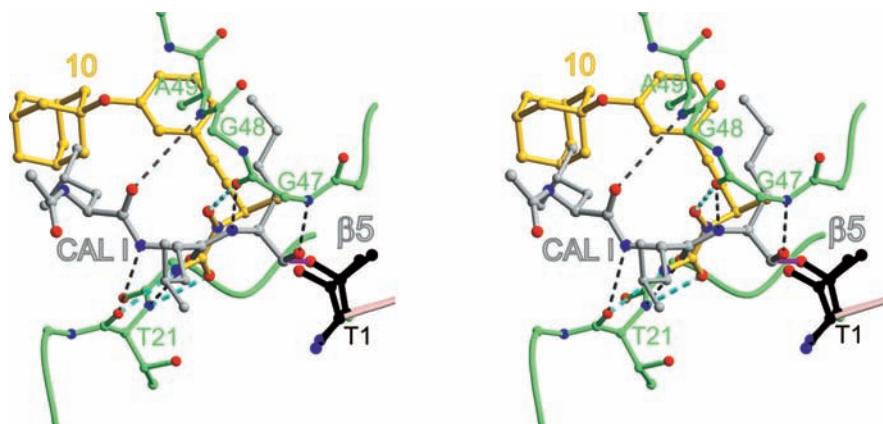


Abbildung 2. Die Stereodarstellung einer Überlagerung von **10** und CAL I gebunden am CT-ähnlichen aktiven Zentrum veranschaulicht den neuartigen Bindungsmodus von **HUs** im Vergleich mit peptidischen Liganden. Peptidrückgrat-Wechselwirkungen zwischen CP und CAL I sind als graue gestrichelte Linien dargestellt, Wechselwirkungen von CP:**10** mit der Proteinhauptkette in cyan.

Propinyl-Hydroxyharnstoff-Gerüsts eine einfache Optimierung von R^1 und R^2 ermöglicht (Abbildung S4). Die *N*-Hydroxyharnstoff-Kopfgruppe wird in drei Schritten synthetisiert, beginnend mit der Methansulfonierung von But-3-yn-2-ol, anschließender nukleophiler Substitution des Mesylats

durch Hydroxylamin und abschließend Reaktion mit Kaliumcyanat. Im abschließenden Syntheseschritt werden verschiedene *meta*-substituierte Iodphenylderivate durch Sonogashira-Kupplung mit der *N*-Hydroxyharnstoff-Kopfgruppe gekoppelt (Pat. WO9530671).^[10]

Derivatisierungen von R^1 unterstreichen die Bedeutung einer kleinen hydrophoben Seitenkette in dieser Position, da größere Reste wie Ethyl- (**6**) oder Isopropylgruppen (**7**) zu einer bis zu 15fachen Erhöhung der IC_{50} auf 1 μM ($K_i = 0.1 \mu\text{M}$) bzw. 10 μM ($K_i = 1.0 \mu\text{M}$) führten (Tabelle 1). Diese Ergebnisse stimmen mit Modellierungsstudien überein, die auf einen sterischen Konflikt zwischen großen Resten in R^1 und dem Peptidrückgrat der β 5-Untereinheit hindeuten und bei der Synthese kleine hydrophobe Reste zur Stabilisierung des Inhibitors nahelegen.

Kleine Änderungen bezüglich R^2 zeigten bemerkenswerten Einfluss auf die IC_{50} der **HU**-Verbindungen: Die Einführung kurzer halogenierter und langkettiger aliphatischer R^2 -Seitenketten resultierte in gegenüber **1** mindestens fünf- fach erhöhter IC_{50} ($> 1 \text{ mM}$), wie am Beispiel des Trifluormethoxy-Derivats **2** und des *n*-Pentoxy-Derivats **3** gezeigt werden konnte. Interessanterweise führte eine *tert*-Butyldimethylsiloxy-Seitenkette in **4** zu einer erhöhten Affinität und fünf- fach verbesserter IC_{50} (48 μM , $K_i = 4.8 \mu\text{M}$; Tabelle 1). Die Kristallstruktur dieser Verbindung im Komplex mit dem CP bei 3.2 Å Auflösung ($R_{\text{frei}} = 0.228$) zeigt starke Wechselwirkungen der hydrophoben Seitenkette innerhalb der S1-*sub*-Bindetasche mit Met45 und Ala46 (Tabelle ST1, Abbildung S3b). Basierend auf diesen kristallographischen Ergebnissen wurde eine Modellierungsstudie durchgeführt, um geeignete Seitenketten für die R^2 -Position zu finden; hierbei zeigte eine 1-Adamantyloxy-Gruppe die besten Docking-Ergebnisse (-10.7 in GlideScore^[11]) innerhalb einer kleinen Bibliothek von 50 Verbindungen (Abbildung S6). Das entsprechende **HU**-Derivat (**8**) ist mit einer IC_{50} von 700 nm ($K_i = 0.08 \mu\text{M}$) gegenüber der Ausgangsverbindung **1** 320fach verbessert (Tabelle 1). Die experimentellen Daten der Kristallstruktur des CP:**8**-Komplex mit 2.9 Å Auflösung ($R_{\text{frei}} = 0.238$, Tabelle ST1) bestätigten die Modellierungsergebnisse (0.8 Å r.m.s.d. zwischen experimenteller und modellierter Ligandstruktur (Abbildung S3c, S7) und offenbarten zudem die Bedeutung von Ser118 der β 6-Untereinheit; diese bildet eine starke Wasserstoffbrücke zum Ether-Sauerstoffatom von **8** und stabilisiert folglich die Position des Adamantyloxy-Rests in der S3-*sub*-Bindetasche (Abbildung 1c).

Als Folge der Einführung von R^1 können die **HU**-Verbindungen in zwei unterschiedlichen Konfigurationen vorliegen; diesbezüglich wurden weitere Optimierungen vorgenommen. Das *R*-Enantiomer (**10**) zeigte mit einer IC_{50} von 300 nm ($K_i = 34 \text{ nm}$) eine vielfach stärkere Inhibition als das *S*-Enantiomer (**9**, $IC_{50} = 56 \mu\text{M}$, $K_i = 5.8 \mu\text{M}$; Abbildung 1 und Tabelle 1). Die Ergebnisse der Röntgenstrukturanalysen von CP:**9** bei 3.1 Å Auflösung ($R_{\text{frei}} = 0.231$) und CP:**10** bei 2.8 Å Auflösung ($R_{\text{frei}} = 0.262$, Tabelle ST1) zeigen, dass allein die Orientierung des Rests R^1 des *S*-Enantiomers für die Abnahme der Bindungsaffinität durch destabilisierende Wechselwirkungen mit den Hauptkettenatomen des Proteins verantwortlich ist (Abbildung S8b,c). Entsprechend dieser starken Enantioselektivität wurden nach Behandlung der Pro-

teasom-Kristalle mit racemischen **HU**-Verbindungen ausschließlich CP:**HU**-Röntgenstrukturen mit *R*-Enantiomeren erhalten (Abbildung S8a). Strukturüberlagerungen von **9** und **10** zeigen, dass sowohl das *R*- als auch das weniger aktive *S*-Enantiomer hinsichtlich der *N*-Hydroxyharnstoff-Kopfgruppe und der Adamantyloxyphenyl-Struktur fast perfekt überlagern (Abbildung S8b). In Anbetracht des nichtkovalenten Bindungsmodus unterstreicht diese Beobachtung die Stärke des Bindungsmotivs, da der Inhibitor trotz sterisch ungünstiger Orientierung der Methylgruppe (als R^1 in **9**) in seiner Position gehalten wird.

Zusätzlich wurde in den meisten Elektronendichten der CP:**HU**-Komplexstrukturen ein 2-(*N*-Morpholino)ethansulfonsäure(MES)-Molekül beobachtet, das dem Kristallisationspuffer entstammt (Abbildung S5). MES wechseltwirkt mit β 5-Gly47N und besetzt das Oxianion-Loch, das typischerweise von reaktiven Kopfgruppen von Liganden ausgefüllt wird; dieses Phänomen wurde in der Literatur bereits beschrieben.^[12,13] **HU** und MES können somit als unabhängige Fragmente für ein zukünftiges fragmentbasiertes Wirkstoffdesign genutzt werden.

Die Kombination von kristallographischer Charakterisierung, Molecular-Modelling-Studien, chemischer Synthese und kinetischen Experimenten führte zur Identifizierung eines starken inhibitorischen Bindungsprofils neuer Proteasomliganden, die bisher unentdeckte, wohldefinierte Spezifitätstaschen adressieren.

HUs bilden somit eine neue Klasse von Proteasom-Inhibitoren, die sich durch ihren neuartigen, reversiblen Bindungsmodus auszeichnen. Die Verbindungsklasse repräsentiert die kleinsten reversiblen, nichtkovalent gebundenen und Untereinheit-spezifischen Inhibitoren für das 20S-Proteasom, die keine hochreaktive elektrophile Kopfgruppe tragen. Zudem verfügen die Hydroxyharnstoff-Verbindungen über pharmakokinetisch wichtige molekulare Eigenschaften, die neue Wege zur Entwicklung von Proteasom-Inhibitoren aufzuzeigen.

Eingegangen am 25. August 2011

Online veröffentlicht am 21. November 2011

Stichwörter: Hydroxyharnstoffe · Inhibitoren · Lipoxygenase · Proteasom · Proteinkristallographie

- [1] A. Hershko, A. Ciechanover, *Annu. Rev. Biochem.* **1998**, *67*, 425.
- [2] P. G. Richardson, P. Sonneveld, M. W. Schuster, D. Irwin, E. A. Stadtmauer, T. Facon, J. L. Harousseau, D. Ben-Yehuda, S. Lonial, H. Goldschmidt, D. Reece, J. F. San-Miguel, J. Blade, M. Boccadoro, J. Cavenagh, W. S. Dalton, A. L. Boral, D. L. Essel- tine, J. B. Porter, D. Schenkein, K. C. Anderson, *N. Engl. J. Med.* **2005**, *352*, 2487.
- [3] M. Groll, L. Ditzel, J. Lowe, D. Stock, M. Bochtler, H. D. Bar- tunik, R. Huber, *Nature* **1997**, *386*, 463.
- [4] N. Gallastegui, M. Groll, *Trends Biochem. Sci.* **2010**, *35*, 634.
- [5] L. Borissenko, M. Groll, *Chem. Rev.* **2007**, *107*, 687.
- [6] A. L. Goldberg, T. N. Akopian, A. F. Kisselev, D. H. Lee, *Mol. Biol. Rep.* **1997**, *24*, 69.
- [7] M. Britton, M. M. Lucas, S. L. Downey, M. Screen, A. A. Pletnev, M. Verdoes, R. A. Tokhunts, O. Amir, A. L. Goddard, P. M.

- Pelphrey, D. L. Wright, H. S. Overkleft, A. F. Kisseelev, *Chem. Biol.* **2009**, *16*, 1278.
- [8] S. E. Wenzel, A. K. Kamada, *Ann. Pharmacother.* **1996**, *30*, 858.
- [9] R. L. Bell, P. R. Young, D. Albert, C. Lanni, J. B. Summers, D. W. Brooks, P. Rubin, G. W. Carter, *Int. J. Immunopharmacol.* **1992**, *14*, 505.
- [10] K. T. Sonogashira, Y. Hagihara, *Tetrahedron Lett.* **1975**, *16*, 4467.
- [11] a) R. A. Friesner, J. L. Banks, R. B. Murphy, T. A. Halgren, J. J. Klicic, D. T. Mainz, M. P. Repasky, E. H. Knoll, M. Shelley, J. K. Perry, D. E. Shaw, P. Francis, P. S. Shenkin, *J. Med. Chem.* **2004**, *47*, 1739; b) R. A. Friesner, R. B. Murphy, M. P. Repasky, L. L. Frye, J. R. Greenwood, T. A. Halgren, P. C. Sanschagrin, D. T. Mainz, *J. Med. Chem.* **2006**, *49*, 6177.
- [12] M. Groll, N. Gallastegui, X. Marechal, V. Le Ravalec, N. Basse, N. Richy, E. Genin, R. Huber, L. Moroder, J. Vidal, M. Reboud-Ravaux, *ChemMedChem* **2010**, *5*, 1701.
- [13] C. Blackburn, K. M. Gigstad, P. Hales, K. Garcia, M. Jones, F. J. Buzzese, C. Barrett, J. X. Liu, T. A. Soucy, D. S. Sappal, N. Bump, E. J. Olhava, P. Fleming, L. R. Dick, C. Tsu, M. D. Sintchak, J. L. Blank, *Biochem. J.* **2010**, *430*, 461.