

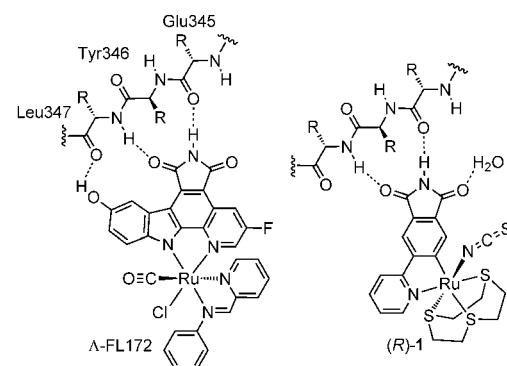
# Effizientes Ausfüllen von Proteintaschen mit oktaedrischen Metallkomplexen\*\*

Sebastian Blanck, Jasna Maksimoska, Julia Baumeister, Klaus Harms, Ronen Marmorstein\* und Eric Meggers\*

Komplizierte Naturstoffe haben ihre Strukturen und Eigenschaften im Laufe von Millionen von Jahren entwickelt und zeigen häufig spezifische biologische Wirkmechanismen, die oft auf ihre vororganisierten dreidimensionalen Gerüste einhergehend mit einer perfekten Komplementierung der Zielprotein-Bindungstaschen zurückzuführen sind.<sup>[1]</sup> Eine kürzlich veröffentlichte Studie über die Proteinbindungseigenschaften verschiedener Naturstoffe und synthetischer Verbindungen kam zu dem Ergebnis, dass die Proteinbindungsselektivität mit der Kompliziertheit der dreidimensionalen Form (definiert als relativer Anteil der  $sp^3$ -Kohlenstoffzentren) und der stereochemischen Kompliziertheit (definiert als relativer Anteil der stereogenen Kohlenstoffzentren) korreliert.<sup>[2]</sup> Oktaedrische Metallkomplexe bieten hierbei möglicherweise eine interessante Alternative zum Aufbau globaler und starrer Strukturen. Durch die Orientierung maßgeschneiderter Liganden um das zentrale Metallstereozentrum wird die konformative Flexibilität des Gerüsts eingeschränkt und der Aufbau neuartiger räumlicher Geometrien mit zum Teil naturstoffähnlicher Komplexität erreicht. Die dabei erreichbaren, auffallend hohen Selektivitäten bezüglich des Zielproteins konnten von uns bereits in vorherigen Arbeiten gezeigt werden.<sup>[3-6]</sup>

Ein wichtiger Aspekt bezüglich des Designs solcher Verbindungen, der bisher nicht ausdrücklich angesprochen wurde, ist der erforderliche hohe räumliche Platzbedarf eines oktaedrischen Stereozentrums. Dieser Raumanspruch erschwert die Designanforderungen, da das Metallzentrum an einer ganz bestimmten Position innerhalb der aktiven Tasche positioniert werden muss, um seine gewünschte Strukturfunktion maximal erfüllen zu können. Befindet es sich beispielsweise zu tief innerhalb der Proteintasche oder zu nahe am Proteintrückgrat, so ist nicht ausreichend Platz verfügbar, um die Liganden oktaedrisch um das Metallatom anzuordnen. Ragt es hingegen zu weit aus der Proteintasche Richtung

Wasser heraus, so kann es keine entscheidende Rolle für die Bindungsaffinität und Selektivität spielen. Ein eindeutiger Hinweis auf eine vorteilhafte Positionierung des Metallzentrums innerhalb der Proteinbindungstasche ist der starke Einfluss der Koordinationssphäre auf Bindungsaffinität und Selektivität. Tatsächlich haben wir in der Vergangenheit eine solche bevorzugte Position des Metallatoms innerhalb der ATP-Bindungstasche von Proteinkinasen durch Verwendung von Metallo-Pyridocarbazolen identifiziert.<sup>[3-7]</sup> Auf diesem vom Naturstoff Staurosporin abgeleiteten Design beruht z. B. der oktaedrische Organorutheniumkomplex A-FL172, ein selektiver Inhibitor der p21-aktivierten Kinase 1 (PAK1; Abbildung 1).<sup>[8]</sup> Wir konnten zeigen, dass in diesem Design der zweizähnige Pyridocarbazolligand die Adeninbindungsstasche besetzt und durch die Wechselwirkung mit der so genannten Scharnierregion das Rutheniumzentrum in eine vorteilhafte Position innerhalb der Ribosetasche positioniert, sodass der zusätzliche CO-, Chlorid- und zweizähnige Imidopyridinligand weitere wichtige Bindungen mit anderen Bereichen der aktiven Tasche bilden und auf diese Weise einen wichtigen Beitrag zur Affinität und Selektivität leisten.<sup>[4,6]</sup>



Synthese: aufwendig, >15 Stufen  
stereochemische Komplexität: hoch (20 Stereoisomere)

effizient, nur 6 Stufen  
niedrig (2 Stereoisomere)

Abbildung 1. Vergleich zweier Strategien zum Design metallhaltiger Inhibitoren der Proteinkinase PAK1.

Zum Erlangen eines besseren Einblicks in das Design von metallbasierten Enzyminhibitoren stellten wir uns nun die Frage, ob dieses Metallo-Pyridocarbazoldesign einzigartig ist oder ob das Metallzentrum vielleicht auch in anderen Regionen der aktiven Tasche mit ähnlichem oder vielleicht sogar besserem Ergebnis positioniert sein könnte. Um diese Frage zu beantworten, haben wir neulich mit der Entwicklung

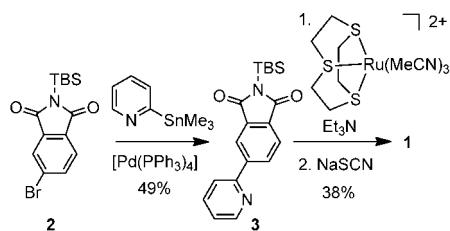
[\*] S. Blanck, J. Baumeister, Dr. K. Harms, Prof. Dr. E. Meggers  
Fachbereich Chemie, Philipps-Universität Marburg  
Hans-Meerwein-Straße, 35043 Marburg (Deutschland)  
E-Mail: meggers@chemie.uni-marburg.de  
Dr. J. Maksimoska, Prof. R. Marmorstein  
The Wistar Institute  
3601 Spruce Street, Philadelphia, PA, 19104 (USA)  
E-Mail: marmor@wistar.org

[\*\*] Diese Arbeit wurde von der Deutschen Forschungsgemeinschaft und den US National Institutes of Health (CA114046) unterstützt. S.B. dankt dem Fonds der Chemischen Industrie für ein Stipendium.

Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.201108865> zu finden.

neuartiger Inhibitorgerüste<sup>[9]</sup> begonnen und entdeckten dabei den einfach zu synthetisierenden Rutheniumkomplex (*R*)-**1**, der das Metallatom an einer wohldefinierten Stelle innerhalb der ATP-Bindungstasche positioniert, einen komplett anderen Satz von koordinierenden Liganden verwendet, aber gleichzeitig eine höhere Affinität für PAK1 als der deutlich kompliziertere Pyridocarbazolkomplex  $\Lambda$ -FL172 aufweist.

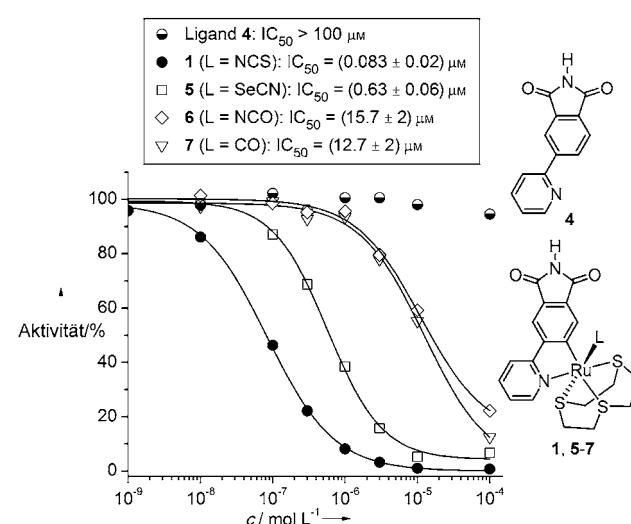
Der Rutheniumkomplex **1** basiert auf einem einfachem Pyridylphthalimidgerüst, das in wenigen Stufen synthetisiert werden kann (Schema 1). Eine Suzuki-Kreuzkupplung des



**Schema 1.** Synthese des Pyridylphthalimidkomplexes **1**. TBS = *tert*-Butyldimethylsilyl.

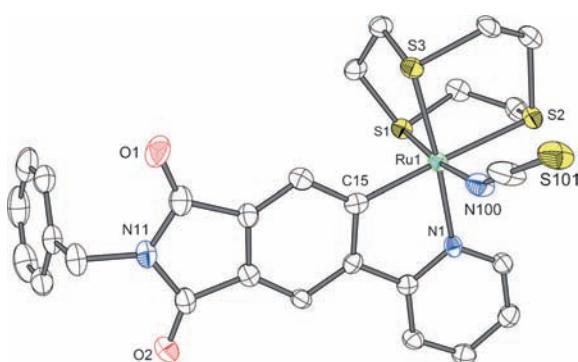
Bromphthalimids **2** mit 2-Pyridyltrimethylstannan lieferte das Pyridylphthalimid **3** (49 %), das anschließend durch Umsetzung mit  $[\text{Ru}(\text{C}_6\text{H}_{12}\text{S}_3)(\text{MeCN})_3](\text{CF}_3\text{SO}_3)_2$  unter basischen Bedingungen, gefolgt von der Reaktion mit NaSCN, in den racemischen Komplex **1** überführt wurde (38 % über zwei Stufen). Eine in Abbildung 2 gezeigte Molekülstruktur des N-benzylierten Derivats von **1** im Kristall bestätigt die Bildung einer C-Ru-Bindung. Diese Cyclometallierung reduziert die Zahl der zur Metallchelatbildung benötigten Heteroatome und ist daher essenziell für ein einfach zu synthetisierendes Strukturdesign.

Der racemische Komplex **1** zeigt einen  $\text{IC}_{50}$ -Wert von  $(83 \pm 20) \text{ nM}$  (1  $\mu\text{M}$  ATP) gegenüber PAK1 (Abbildung 3), was einer leichten Verbesserung gegenüber dem Wert für  $\Lambda$ FL172 ( $\text{IC}_{50} = 130 \text{ nM}$ , 1  $\mu\text{M}$  ATP)<sup>[4]</sup> entspricht. Interessanterweise hat der metallfreie Pyridylphthalimidligand keinerlei Affinität für PAK1 ( $\text{IC}_{50} > 100 \mu\text{M}$ ), was die Wichtigkeit der gesamten Koordinationssphäre für die Bindung an die Proteinkinase verdeutlicht.

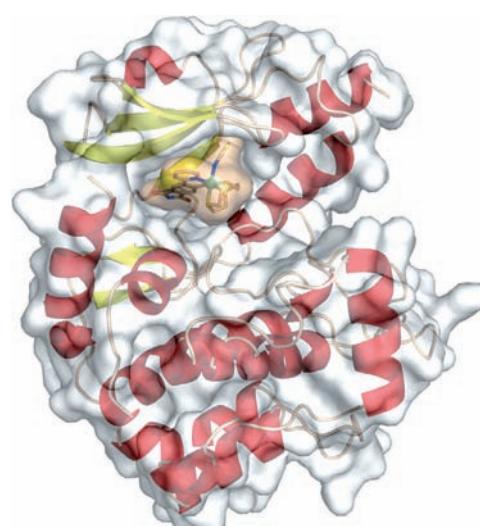


**Abbildung 3.**  $\text{IC}_{50}$ -Kurven des Liganden **4**, des Komplexes **1** und einiger Derivate **5-7** mit PAK1. Die ATP-Konzentration lag bei 1  $\mu\text{M}$ .

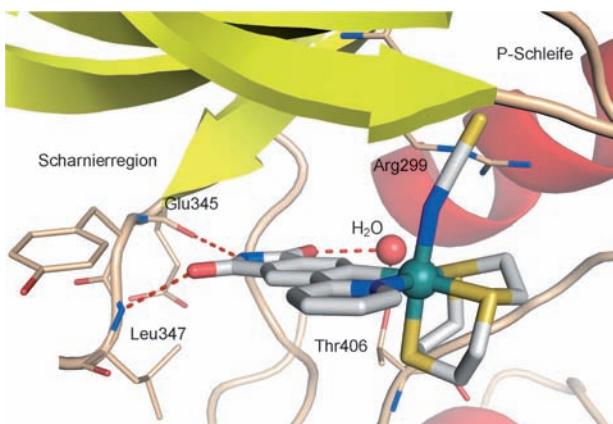
PAK1 hat eine sehr weit geöffnete ATP-Bindungstasche, was vermutlich die Schwierigkeiten bei der Entwicklung von Inhibitoren für diese Kinase erklärt.<sup>[4,8,10]</sup> Eine Cokristallstruktur des *R*-Enantiomers von **1** in der ATP-Bindungstasche von PAK1 (Aminosäuren 249–545 mit Mutation Lys299Arg)<sup>[11]</sup> bei einer Auflösung von 2.0 Å verdeutlicht den Bindungsmodus (Abbildungen 4 und 5). Die Darstellung der Van-der-Waals-Oberflächen in Abbildung 4 zeigt die komplementäre Ausfüllung der Bindungstasche durch (*R*)-**1** unter gleichzeitiger Bildung von Wasserstoffbrücken zwischen dem



**Abbildung 2.** ORTEP-Abbildung des N-benzylierten Derivats von Komplex **1**. Fehlgeordnete Lösungsmittelmoleküle und eine fehlgeordnete Position von S101 sind nicht gezeigt. Die thermischen Ellipsoide geben eine Aufenthaltswahrscheinlichkeit von 50 % an. Ausgewählte Bindungslängen [Å]: C15-Ru1 = 2.033(4), N1-Ru1 = 2.098(3), N100-Ru1 = 2.084(3), S1-Ru1 = 2.2770(9), S2-Ru1 = 2.3972(9), S3-Ru1 = 2.2923(9).

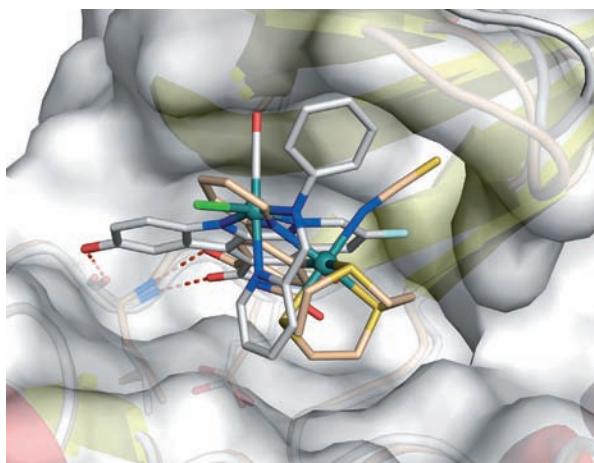


**Abbildung 4.** Cokristallstruktur von PAK1 (Aminosäuren 249–545 mit Mutation Lys299Arg) mit (*R*)-**1** bei einer Auflösung von 2.0 Å. Gezeigt sind die Van-der-Waals-Oberflächen. Die Koordinaten der Struktur sind in der Proteindatenbank hinterlegt (PDB-ID: 4DAW).



**Abbildung 5.** Gebildete Wasserstoffbrücken von (R)-1 innerhalb der ATP-Bindungstasche der Proteinkinase PAK1.

Phthalimidrest und der Scharnierregion (Glu345 und Leu347) sowie einem Wasser-vermittelten Kontakt zu Thr406 (Abbildung 5). Die Überlagerung dieser Struktur mit der kürzlich gelösten Cokristallstruktur von  $\Lambda$ -FL172 und PAK1<sup>[4]</sup> zeigt Unterschiede in den Bindungsmodi (Abbildung 6). Obwohl



**Abbildung 6.** Relative Bindungsposition von (R)-1 und  $\Lambda$ -FL172 (PDB-ID: 3FXZ) in der ATP-Bindungstasche der Proteinkinase PAK1. Überlagerung mit dem Programm PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.3, Schrödinger, LLC.

es sich in beiden Fällen um ATP-kompetitive Inhibitoren handelt, die jeweils die typischen Wasserstoffbrücken zwischen Maleimid und der Scharnierregion der ATP-Bindungstasche bilden, sind die Heterocyclen deutlich um etwa 30° gegeneinander verdreht, was die Flexibilität in der Direktionalität von H-Brücken aufzeigt. Des Weiteren sind die Metallzentren der beiden Inhibitoren 3.0 Å voneinander entfernt und die einzähnigen Liganden in unterschiedlichen Bereichen der aktiven Tasche angeordnet. Während der CO-Ligand von  $\Lambda$ -FL172 in die Mitte der glycinreichen Schleife (P-Schleife) zeigt, weist der NCS-Ligand Richtung Grenzfläche zwischen der glycinreichen Schleife (Verbindungsstränge  $\beta$ 1 und  $\beta$ 2) und der Methylengruppe Arg299 des  $\beta$ -

Faltblattstrangs  $\beta$ 3 und besetzt auf diese Weise eine kleine hydrophobe Tasche, wie aus Abbildung 4 ersichtlich ist. Die Wichtigkeit des NCS-Liganden wird dadurch deutlich, dass die Bindungsaffinität für ähnliche Komplexe mit SeCN- ( $IC_{50} = (0.625 \pm 0.06) \mu\text{M}$ , 7.5fach schlechter), NCO- ( $IC_{50} = (15.7 \pm 2) \mu\text{M}$ , 193fach schlechter) oder CO-Liganden ( $IC_{50} = (12.7 \pm 2) \mu\text{M}$ , 153fach schlechter) stark abnimmt (Abbildung 3). Dieses Beispiel zeigt eindrucksvoll, wie eine Veränderung der Position des Metallzentrums innerhalb einer aktiven Tasche – und sei es nur um gerade einmal 3.0 Å – eine komplett andere Koordinationsphäre benötigt, um die Proteintasche in vergleichbarer Weise auszufüllen.

Zusammenfassend verdeutlichen das hier vorgestellte metallbasierte Enzyminhibitordesign und die kristallographische Analyse der Bindungsweise innerhalb der aktiven Taschen die vielfältigen Möglichkeiten von oktaedrischen Metallkomplexen zur effizienten Ausfüllung von Enzymtaschen. Trotz der Kürze der Synthese (insgesamt sechs Stufen) und Einfachheit der Struktur (nur zwei mögliche Stereoisomere) hat der Phthalimidkomplex 1 eine höhere Bindungsaffinität als der deutlich schwieriger zu synthetisierende (>15 Stufen) und stereochemisch kompliziertere (20 Stereoisomere) Komplex FL172. Der hier beschriebene Rutheniumkomplex 1 gehört damit zu den potentesten ATP-kompetitiven Inhibitoren für die Proteinkinase PAK1<sup>[12]</sup> und unterstreicht somit die Vorteile der Ausfüllung großer oder weit geöffneter Enzymtaschen durch globuläre oktaedrische Metallkomplexe.

Eingegangen am 16. November 2011  
Online veröffentlicht am 1. März 2012

**Stichwörter:** Bioorganometallchemie · Enzyminhibitoren · Proteinkinasen · Ruthenium

- [1] E. E. Carlson, *ACS Chem. Biol.* **2010**, *5*, 639–653.
- [2] 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.
- [3] H. Bregman, P. J. Carroll, E. Meggers, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 877–884.
- [4] J. Maksimoska, L. Feng, K. Harms, C. Yi, J. Kissil, R. Marmorstein, E. Meggers, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 15764–15765.
- [5] A. Wilbuer, D. H. Vlecken, D. J. Schmitz, K. Kräling, K. Harms, C. P. Bagowski, E. Meggers, *Angew. Chem.* **2010**, *122*, 3928–3932; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 3839–3842.
- [6] L. Feng, Y. Geisselbrecht, S. Blanck, A. Wilbuer, G. E. Atilla-Gokcumen, P. Filippakopoulos, K. Kräling, M. A. Celik, K. Harms, J. Maksimoska, R. Marmorstein, G. Frenking, S. Knapp, L.-O. Essen, E. Meggers, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 5976–5986.
- [7] E. Meggers, G. E. Atilla-Gokcumen, H. Bregman, J. Maksimoska, S. P. Mulcahy, N. Pagano, D. S. Williams, *Synlett* **2007**, 1177–1189.
- [8] Die p21-aktivierten Proteinkinasen sind wichtige Mediatoren der Signalübertragung zellulärer Prozesse und an der Entstehung von Krebserkrankungen beteiligt. Siehe z. B.: C. Yi, J. Maksimoska, R. Marmorstein, J. L. Kissil, *Biochem. Pharmacol.* **2010**, *80*, 683–689.
- [9] Weitere Designstrategien metallhaltiger Proteinkinaseinhibitoren: a) J. Spencer, A. P. Mendham, A. K. Kotha, S. C. W. Ri-

- chardson, E. A. Hillard, G. Jaouen, L. Male, M. B. Hursthouse, *Dalton Trans.* **2009**, 918–921; b) B. Biersack, M. Zoldakova, K. Effenberger, R. Schobert, *Eur. J. Med. Chem.* **2010**, *45*, 1972–1975; c) S. Blanck, T. Cruchter, A. Vultur, R. Riedel, K. Harms, M. Herlyn, E. Meggers, *Organometallics* **2011**, *30*, 4598–4606.
- [10] a) M. Lei, W. Lu, W. Meng, M.-C. Parrini, M. J. Eck, B. J. Mayer, S. C. Harrison, *Cell* **2000**, *102*, 387–397; b) M. Lei, M. A. Robinson, S. C. Harrison, *Structure* **2005**, *13*, 769–778.
- 
- [11] Die desaktivierende Mutation Lys299Arg hat keinen signifikanten Einfluss auf die Struktur der Proteinkinase, ist aber für die zelluläre Expression von PAK1 zu Kristallisationszwecken zwingend notwendig. Siehe Lit. [10].
- [12] Das gesamte Selektivitätsprofil von **1** findet sich in den Hintergrundinformationen.