

# Reversible und kovalente Inhibition eines Zielproteins

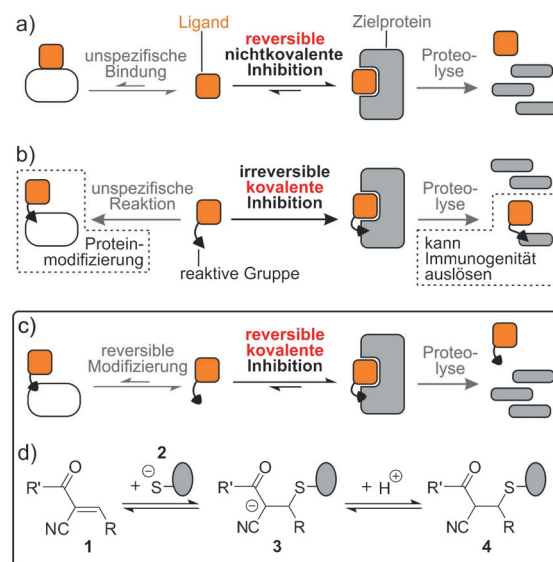
Chang-Uk Lee und Tom N. Grossmann\*

Cystein · Inhibitoren · Michael-Additionen ·  
Reversibilität · Wirkstoff-Design

**K**lassische Ansätze in der Wirkstoffentwicklung, wie die reversible Inhibition von Zielproteinen mit kleinen inerten Molekülen, eignen sich nur mit Einschränkungen für die Manipulation einer Reihe von krankheitsrelevanten biologischen Aktivitäten. So gestaltet sich unter anderem die Entwicklung von Ribonukleinsäure bindenden kleinen Molekülen und von Inhibitoren einer Protein-Protein-Wechselwirkung äußerst schwierig. Auch die selektive Inhibition eines bestimmten Mitgliedes einer großen Proteinfamilie kann sehr kompliziert sein. Derartige Probleme initiierten die Suche nach neuen Wirkstoffklassen. Eine Vorgehensweise beruht dabei auf der Modifizierung von Liganden mit reaktiven Gruppen, um eine kovalente Bindung des Zielproteins zu ermöglichen. Potenzielle Vorteile dieser Strategie sind die resultierende hohe Affinität des Liganden zum Zielprotein und eine verlängerte Wirkdauer.<sup>[1]</sup> Bisher wurden die meisten zugelassenen Medikamente, die über eine irreversible Bildung kovalent verknüpfter Addukte mit dem Zielprotein wirken, zufällig entdeckt (z.B. Acetylsalicylsäure, Penicillin und Omeprazol). Die mögliche Toxizität kovalent modifizierter Proteine führte jedoch zu Vorbehalten gegenüber der gezielten Einführung von reaktiven Gruppen bei der Entwicklung von Wirkstoffen.<sup>[2]</sup> Aufgrund der möglichen Vorteile kovalent bindender Inhibitoren gegenüber inerten wurde nach reaktiven Gruppen mit geringeren toxikologischen Risiken gesucht.<sup>[1]</sup> In diesem Zusammenhang wird beispielsweise die Entwicklung von kovalent bindenden Inhibitoren diskutiert, die reversibel an das Zielprotein binden.<sup>[2b]</sup> Diesem Ansatz folgend haben Taunton und Mitarbeiter eine schnelle und reversible Addition von Thiolen an elektronenarme Olefine genutzt, um Liganden zu entwerfen, die den Rezeptor unter physiologischen Bedingungen kovalent und reversibel binden und somit die Risiken einer irreversiblen Proteinmodifizierung minimieren könnten.<sup>[3]</sup>

Kinasen sind für die Wirkstoffentwicklung wichtige Zielproteine. Die selektive Inhibition einer bestimmten Kinase ohne die Beeinflussung strukturell verwandter Kinasen kann sich jedoch problematisch gestalten.<sup>[4]</sup> In einem klassischen Ansatz zur Proteininhibition werden Liganden für die verbesserte Bildung nichtkovalenter Wechselwirkungen mit dem aktiven Zentrum des Zielenzym optimiert (Schema 1a).

Darüber hinaus kann der Ligand mit elektrophilen Gruppen modifiziert werden, um die Reaktion mit nichtkonservierten Cysteinresten in räumlicher Nähe des aktiven Zentrums zu ermöglichen (Schema 1b). Diese kovalente und irreversible Bindung des Inhibitors erhöht zum einen die Affinität zum Zielprotein und kann zum anderen als sekundärer Selektivitätsfilter fungieren.<sup>[5]</sup> Ein Nachteil von reaktiven Gruppen, beispielsweise von Acrylamiden und Halogenacetamiden, ist ihre mögliche Toxizität, die durch ihre irreversible Reaktion mit zellulären Nukleophilen, wie Glutathion und Proteinen mit hyperaktiven Cysteinresten, hervorgerufen wird. Zusätzlich besteht die Gefahr, dass durch die resultierenden, kovalent modifizierten Proteine eine Immunantwort ausgelöst wird (Schema 1b).<sup>[2a]</sup> Vorhersagen über die Auswirkungen irreversibler Proteinmodifizierungen in vivo sind sehr schwierig, wobei davon auszugehen ist, dass besonders die Langzeitbehandlung chronischer Erkrankungen das höchste Risiko birgt. Die Wirkstoffentwicklung würde daher von kovalenten Inhibitoren mit verminderter Tendenz zur Bildung irreversibler Proteinmodifizierungen profitieren. Bisherige Strategien konzentrierten sich hauptsächlich auf die



**Schema 1.** Inhibitorische Strategien: a) reversible Inhibition mithilfe inerten Binders, b) irreversible Inhibition über reaktive Liganden und c) reversible und kovalente Inhibition mithilfe reaktiver Liganden. d) Mechanismus für die Addition eines Thiols **2** an einen elektronenarmen Michael-Akzeptor **1** sowie die entsprechende Rück(Eliminierungs)-Reaktion (R = aromatischer Ring, R' = O-Alkyl/NH-Alkyl).

[\*] M. Sc. C.-U. Lee, Dr. T. N. Grossmann  
Chemical Genomics Centre der Max-Planck-Gesellschaft  
Otto-Hahn-Straße 15, 44227 Dortmund (Deutschland)  
E-Mail: tom.grossmann@cgc.mpg.de  
Homepage: <http://www.cgc.mpg.de>

Verringerung der Reaktivität verwendeter elektrophiler Reste, um so Nebenreaktionen zu minimieren. Inspiriert von früheren Beispielen, die die prinzipielle Anwendbarkeit von kovalent, aber dennoch reversibel bindenden Inhibitoren belegen (Schema 1c),<sup>[2b,6]</sup> verwenden Taunton und Mitarbeiter hochreaktive Elektrophile, die von einem Thiol reversibel angegriffen werden können (Schema 1d).<sup>[3]</sup> Dabei wurden die vorgestellten Kinaseinhibitoren so mit elektronenarmen Olefinen modifiziert, dass eine Reaktion mit einer dem aktiven Zentrum benachbarten nichtkonservierten Cysteinseitenkette möglich wird.

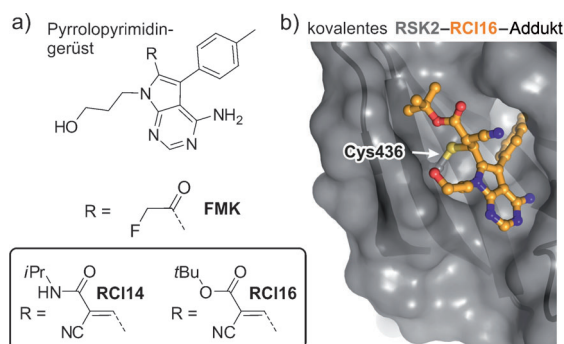
Basierend auf der früheren Beobachtung schneller und reversibler Reaktionen von Thiolen mit 2-Cyanacrylaten bei neutralem pH-Wert<sup>[7]</sup> wurden Olefine mit verschiedenen elektronenziehenden Gruppen entworfen.<sup>[3]</sup> Bei der Umsetzung von doppelt aktivierten Michael-Akzeptoren **1** mit Thiolen wurde tatsächlich ein sich schnell einstellendes Gleichgewicht zwischen Addition und Eliminierung beobachtet (Schema 1d). Die Autoren argumentieren, dass die elektronenziehenden Substituenten sowohl die Elektrophilie des  $\beta$ -Kohlenstoffatoms in der Ausgangsverbindung **1** als auch die Stabilität des resultierenden Carbanions **3** erhöhen und somit eine Beschleunigung der Additionsreaktion bewirken. Außerdem fördern die elektronenziehenden Gruppen in Produkt **4** dessen  $C_{\alpha}$ -H-Acidität und damit eine schnelle Rückreaktion (Eliminierung). Diese aktivierten Michael-Akzeptoren wurden anschließend für die Modifizierung von Pyrrolopyrimidinen verwendet, die von einem bekannten irreversibel bindenden Inhibitor (FMK; Abbildung 1a)<sup>[8]</sup> der p90-ribosomalen Protein-S6-Kinase (RSK) abgeleitet wurden. Das aktive Zentrum der RSK wird von einem Cysteinrest (Cys436) flankiert. Auf Grundlage der prognostizierten Bindungsorientierung wurde der Pyrrolopyrimidin-Baustein so mit dem doppelt aktivierten Michael-Akzeptor modifiziert, dass sich die reaktive Gruppe in räumlicher Nähe zu Cys436 befindet. Es wurden verschiedene reversibel kovalent bindende Inhibitoren (RCI) synthetisiert (unter anderem RCI14 und RCI16), die die erwartete inhibitorische Wirkung auf die Kinase RSK2 zeigen. Eine Kristallstruktur von RCI16 in Komplex mit der C-terminalen Kinasedomäne von RSK2 bestätigt den erwarteten Bin-

dungsmodus und die Bildung einer kovalenten Bindung zwischen Cys436 und dem Elektrophil (Abbildung 1b).<sup>[3]</sup>

In weiteren Experimenten wurde die Reversibilität der Bindungsbildung zwischen Inhibitor und Kinase genauer untersucht.<sup>[3]</sup> Dabei konnte gezeigt werden, dass nach der Bindung des Inhibitors sowohl die Entfaltung des Proteins als auch dessen proteolytischer Abbau die Rückreaktion und damit die Eliminierung des Inhibitors unterstützen. Dies belegt die Bedeutung der intakten Proteintertiärstruktur für die Bildung einer kovalenten Bindung. Obwohl die Kinasedomäne eine Reihe von zugänglichen Cysteinresten enthält, reagieren die RCI-Derivate auch in mikromolaren Konzentrationen nur mit Cys436. Interessanterweise wird die inhibitorische Wirkung der Verbindungen durch wasserlösliche Thiole, wie Glutathion, selbst bei millimolaren Konzentrationen nicht gestört. Eine Mutation von Cys436 hebt dagegen die Wirkung der RCI-Derivate auf. Diese Beobachtungen belegen die Reversibilität der Reaktion und demonstrieren die Wichtigkeit der Ligandbindung für eine schnelle und selektive Addition des Thiols (Templateffekt). In-vitro-Assays zeigten eine hohe Selektivität von RCI14 für die Inhibition von RSK (in einem Test mit 442 Kinasen). Die inhibitorische Wirkung übertrifft dabei die des analogen irreversibel bindenden Inhibitors FMK (Abbildung 1a). In zellbasierten Assays wurde die Wirkung von RCI14 auf die RAF-induzierte Migration und Invasion von Epithelzellen untersucht,<sup>[3]</sup> Prozesse, an denen auch RSK-Proteine beteiligt sind. Wie erwartet und konsistent mit einer Inhibition von RSK, verringerte RCI14 dabei analog zu FMK die Zellmobilität. Die reversible Bindung der RCI-Derivate an RSK-Proteine konnte auch bei der Analyse von Zelllysaten beobachtet werden. Dafür wurden die Zellen vor der Analyse mit einem fluoreszenzmarkierten Analogon von RCI14 behandelt. RCI14 und FMK zeigten ähnliche zelluläre Aufenthaltsdauern und waren bis etwa zwei Tage nach der Inkubation nachweisbar.

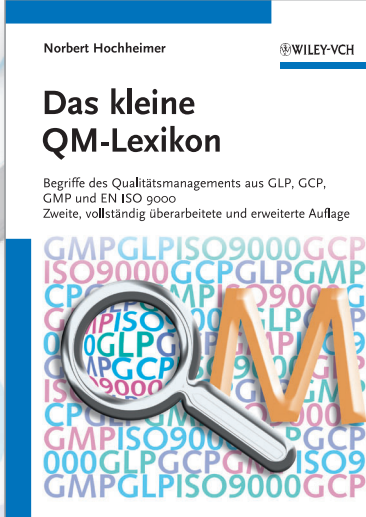
Taunton und Mitarbeiter beschreiben die Verwendung elektronenarmer Michael-Akzeptoren in reversiblen Additions-/Eliminierungsreaktionen mit Thiolen unter physiologischen Bedingungen.<sup>[3]</sup> Sie verwenden 2-Cyanacrylate oder -acrylamide für die Umwandlung eines bekannten irreversibel bindenden Kinaseinhibitors in einen reversibel kovalent bindenden Inhibitor. Ein derartiger Ansatz könnte die Entwicklung von reversibel bindenden Inhibitoren ermöglichen, die von der erhöhten Affinität und Selektivität einer kovalenten Bindung nichtkonservierter Cysteinreste profitieren, dabei aber die toxikologischen Risiken, die sonst mit einer irreversiblen Proteinmodifizierung verbunden sind, umgehen. Im Prinzip sollte diese Strategie für zahlreiche krankheitsrelevante Zielproteine einsetzbar sein. So wurde beispielweise abgeschätzt, dass etwa 20 % aller Kinasen für eine kovalente Inhibition über Cysteinreste zugänglich sind.<sup>[5]</sup> Im Hinblick auf das Potenzial reversibel kovalent bindender Inhibitoren in der Wirkstoffentwicklung wird es in Zukunft wichtig sein, die Anwendbarkeit und Toxizität dieser Pharmakophore genauer zu untersuchen.

Eingegangen am 1. Mai 2012  
Online veröffentlicht am 13. Juli 2012



**Abbildung 1.** a) Irreversibel (FMK) und reversibel (RCI14, RCI16) kovalent bindende Inhibitoren für die C-terminale Kinasedomäne von RSK2. b) Kristallstruktur von RCI16, kovalent gebunden an RSK2 (Blick in das aktive Zentrum der C-terminalen Kinasedomäne von RSK2, PDB 4D9U).<sup>[3]</sup>

- [1] J. Singh, R. C. Petter, T. A. Baillie, A. Whitty, *Nat. Rev. Drug Discovery* **2011**, 10, 307–317.
- [2] a) B. K. Park, A. Boobis, S. Clarke, C. E. P. Goldring, D. Jones, J. G. Kenna, C. Lambert, H. G. Laverty, D. J. Naisbitt, S. Nelson, D. A. Nicoll-Griffith, R. S. Obach, P. Routledge, D. A. Smith, D. J. Tweedie, N. Vermeulen, D. P. Williams, I. D. Wilson, T. A. Baillie, *Nat. Rev. Drug Discovery* **2011**, 10, 292–306; b) A. J. T. Smith, X. Y. Zhang, A. G. Leach, K. N. Houk, *J. Med. Chem.* **2009**, 52, 225–233.
- [3] I. M. Serafimova, M. A. Pufall, S. Krishnan, K. Duda, M. S. Cohen, R. L. Maglathlin, J. M. McFarland, R. M. Miller, M. Frödin, J. Taunton, *Nat. Chem. Biol.* **2012**, 8, 471–476.
- [4] J. M. Zhang, P. L. Yang, N. S. Gray, *Nat. Rev. Cancer* **2009**, 9, 28–39.
- [5] J. Singh, R. C. Petter, A. F. Kluge, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2010**, 14, 475–480.
- [6] a) G. Lee, D. E. Piper, Z. L. Wang, J. Anzola, J. Powers, N. Walker, Y. Li, *J. Mol. Biol.* **2006**, 357, 1051–1057; b) R. J. Patch, L. L. Searle, A. J. Kim, D. Y. D. De, X. Z. Zhu, H. B. Askari, J. C. O'Neill, M. C. Abad, D. Rentzeperis, J. Y. Liu, M. Kemmerer, L. Lin, J. Kasturi, J. G. Geisler, J. M. Lenhard, M. R. Player, M. D. Gaul, *J. Med. Chem.* **2011**, 54, 788–808.
- [7] R. B. Pritchard, C. E. Lough, D. J. Currie, H. L. Holmes, *Can. J. Chem.* **1968**, 46, 775–781.
- [8] M. S. Cohen, C. Zhang, K. M. Shokat, J. Taunton, *Science* **2005**, 308, 1318–1321.



ISBN: 978-3-527-33076-8  
2011 342 S. Broschur  
€ 69,-

## Durchblick im Qualitätsmanagement

NORBERT HOCHHEIMER

# Das kleine QM-Lexikon

**Begriffe des Qualitätsmanagements aus GLP, GCP, GMP und EN ISO 9000**


**2., vollständig überarbeitete und erweiterte Auflage**

Das Qualitätsmanagement mit seinen verschiedenen Ausprägungen wie GLP, GCP, GMP oder ISO 9000ff ist heute aus Industrie und Labor nicht mehr wegzudenken. Jeder, der in der Praxis damit zu tun hat, muß sich mit der genauen Bedeutung der QM-Fachbegriffe auseinandersetzen. Obendrein wird er mit zahlreichen Abkürzungen konfrontiert. Das kompakte Lexikon hilft hier jedem weiter, der sich schnell und präzise

informieren möchte. Der Autor, der selbst über praktische QM-Erfahrung in der Industrie verfügt, hat die 1500 wichtigsten Begriffe und Abkürzungen erklärt und erläutert.

**Zur Voraufgabe:**  
„Alles in allem ein sehr empfehlenswertes Nachschlagewerk, das sich alsbald einen bevorzugten Platz - eine Armlänge vom Schreibtisch entfernt - erobern sollte.“  
*Materials and Corrosion*

Wiley-VCH • Postfach 10 11 61 • D-69451 Weinheim  
Tel. +49 (0) 62 01-60 64 00 • Fax +49 (0) 62 01-60 61 84 • E-mail: service@wiley-vch.de  
**Besuchen Sie uns unter [www.wiley-vch.de](http://www.wiley-vch.de)**  
Irrtum und Preisänderungen vorbehalten. Stand der Daten: Januar 2012


**WILEY-VCH**