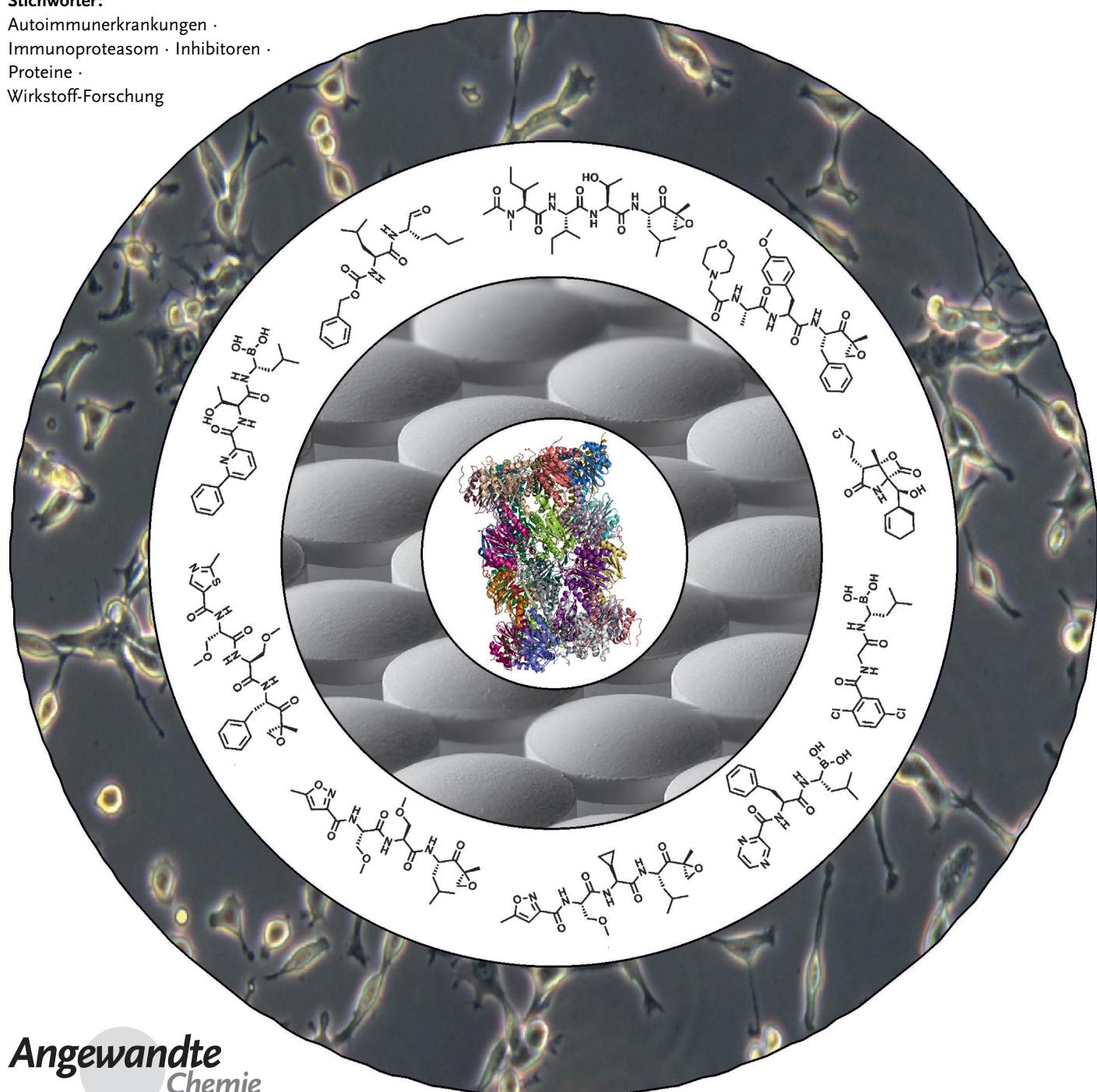


Inhibitoren für das konstitutive Proteasom und das Immunoproteasom: aktuelle und zukünftige Tendenzen in der Medikamentenentwicklung

Eva Maria Huber* und Michael Groll*

Stichwörter:

Autoimmunerkrankungen ·
Immunoproteasom · Inhibitoren ·
Proteine ·
Wirkstoff-Forschung



Proteolytischer Abbau ist ein essenzieller zellulärer Vorgang, der hauptsächlich durch das 20S-Proteasomkernpartikel (CP), eine Protease von 720 kDa und 28 einzelnen Untereinheiten, bewerkstelligt wird. Wegen seiner zentralen Funktion ist das Proteasom ein vielversprechendes Angriffsziel für Wirkstoffe, das nach intensiven Untersuchungen im letzten Jahrzehnt mit der Zulassung von Bortezomib durch die US Food and Drug Administration (FDA) auch validiert worden ist. Gegenwärtig werden mehrere verbesserte Proteasominhibitoren der zweiten Generation in klinischen Studien als Krebswirkstoffe untersucht, und die meisten von ihnen hemmen sowohl das konstitutive Proteasom (cCP) als auch das Immunoproteasom (iCP). Allerdings scheint die selektive Inhibition des iCP, einer speziellen Proteasomklasse, die vorrangig in Immunzellen exprimiert wird, eine erfolgversprechende therapeutische Maßnahme für die Behandlung von Autoimmunerkrankungen zu sein. Auch wenn bereits wenige selektive Substanzen identifiziert worden sind, unterstützt die kürzlich bestimmte Kristallstruktur des iCP die Entwicklung und Optimierung iCP-selektiver Verbindungen.

1. Einleitung

Als Herzstück des nichtlysosomalen Proteinabbauweges hydrolysiert das 20S-Proteasomkernpartikel (CP) Proteine zu Peptiden mit einer Länge von 2 bis 23 Aminosäuren.^[1] Daher sind viele verschiedene zelluläre Prozesse, darunter Zellzyklusverlauf, Signalübertragung und Antigenprozessierung, auf die Aktivität des Proteasoms angewiesen. In Wirbeltieren generieren drei Proteasomklassen Antigene: Das Thymusproteasom (tCP) findet man ausschließlich in kortikalen epithelialen Thymuszellen, das Immunoproteasom (iCP) dagegen hauptsächlich in Mono- und Lymphozyten und das konstitutive Proteasom (cCP) in allen anderen Geweben (Abbildung 1a).^[2] Allerdings können während einer Entzündungsreaktion Zytokine wie Interferon- γ und Tumornekrosefaktor(TNF)- α die Bildung von iCPs auch in Zellen nichthämatopoetischen Ursprungs auslösen.^[3] Im Unterschied zu cCPs steigern iCPs die Produktion von Oligopeptiden mit hydrophoben C-Termini. Diese binden nach N-terminalen Kürzen auf eine Länge von 8 bis 10 Aminosäuren an Haupthistokompatibilitätskomplex-Rezeptoren der Klasse I (MHC-I) und werden zytotoxischen T-Zellen präsentiert, um Immunantworten auszulösen.^[4] Daher bestimmt das Proteasom die C-terminalen Ankerreste von MHC-I-Liganden und ihre Affinität, während andere Proteasen im Zytosol oder im endoplasmatischen Retikulum die N-terminalen Enden sowie die Gesamtlänge der Peptide festlegen.^[4c] Zwar können von cCPs generierte MHC-I-Antigene zytotoxische T-Zellantworten hervorrufen, jedoch zeigen Studien an Mäusen, denen einzelne oder alle iCP-Aktivitäten fehlen, eine stark verminderte oder veränderte Präsentation von MHC-I-Epitopen; dies verdeutlicht die herausragende Bedeutung der iCPs für die Antigenproduktion.^[5] Zudem wurde gezeigt, dass iCPs wichtig für die Differenzierung von T-Zellen sowie für die

Aus dem Inhalt

1. Einleitung	8839
2. 20S-Proteasome als Angriffspunkte für Wirkstoffe	8840
3. Proteasominhibitoren – eine mechanistische Beschreibung	8841
4. Vor- und Nachteile bekannter Inhibitoren	8843
5. Zukünftige Entwicklungen	8847

Synthese von proinflammatorischen Zytokinen sind und dass ihnen eine Schutzfunktion bei oxidativem Stress zukommt.^[6]

cCPs, iCPs und tCPs üben verschiedene biologische Funktionen aus, da ihre jeweils einzigartige Kombination von katalytisch aktiven β -Untereinheiten unterschiedliche, aber sich überlappende Spaltmuster generiert (Abbildung 1a): Die Untereinheiten $\beta 1c$, $\beta 2c$ und $\beta 5c$ bilden die aktiven Zentren der cCPs, $\beta 1i$, $\beta 2i$ und $\beta 5i$ die der iCPs sowie $\beta 1i$, $\beta 2i$ und $\beta 5t$ die der tCPs. Die Schnittpräferenzen dieser katalytisch aktiven Untereinheiten werden von den chemischen Eigenschaften ihrer Substratspezifitäts(S)-Taschen bestimmt, welche die mittlere Verweilzeit von Liganden im Substratbindekanal durch die Bindung der Ligand-P-Seitenketten beeinflussen (Abbildung 1b). In Übereinstimmung mit Inhibitorbindestudien am 20S-Proteasom aus der Hefe (yCP), die die Bedeutung der P1-Seitenkette von Liganden belegen,^[7] wurden die drei Substratspezifitäten des Proteasoms je nach den bevorzugten P1-Seitenketten benannt. Auch wenn die $\beta 2$ -Aktivitäten als Trypsin(T)-ähnlich bezeichnet werden, ermöglichen ihre eher geräumigen Spezifitätstaschen eine breite Substratspezifität. Die cCP-Untereinheit $\beta 1c$ spaltet Peptidbindungen nach sauren Seitenketten, was einer Caspase(C)-ähnlichen Aktivität entspricht. Im Unterschied dazu führt die hydrophobe Auskleidung des $\beta 1i$ -Substratbindekanals zu einer Aktivität, die hydrophobe und verzweigte Aminosäuren bevorzugt (branched chain amino acid-preferring (BrAAP) activity).^[8] Ebenso sind die aktiven Zentren der beiden Untereinheiten $\beta 5c$ und $\beta 5i$ von unpolaren chemischen Gruppen umgeben, weshalb beide Chymotrypsin(ChT)-ähnliche Aktivitäten

[*] E. M. Huber,^[+] Prof. Dr. M. Groll^[+]

Center for Integrated Protein Science am Department Chemie,
Lehrstuhl für Biochemie, Technische Universität München
Lichtenbergstraße 4, 85747 Garching (Deutschland)
E-Mail: eva.huber@mytum.de
michael.groll@mytum.de

Homepage: <http://www.biochemie.ch.tum.de/>

[+] Diese Autoren haben gleichermaßen zu dieser Arbeit beigetragen.

aufweisen. Allerdings zeigten die Kristallstrukturen des cCP und iCP aus der Maus, dass die S1-Spezifitätstasche der β 5c-Untereinheit signifikant kleiner ist als diejenige der β 5i-Untereinheit; deshalb spaltet β 5c vorrangig C-terminal von kleinen neutralen Aminosäuren, was eher einer Elastase-ähnlichen Aktivität oder einer „small neutral amino acid preferring activity (SnAAP)“ als einer Chymotrypsinaktivität entspricht.^[7,8] Anders als β 5c vermittelt die β 5i-Untereinheit eine ChT-ähnliche Aktivität, indem sie bevorzugt C-terminal von großen hydrophoben Aminosäuren spaltet.^[7,9] Zusammenfassend produzieren die Untereinheiten β 1i, β 5c und β 5i hoch affine Epitope für MHC-I-Rezeptoren, während die β 5t-Untereinheit der tCPs vermutlich MHC-I-Liganden mit geringer Affinität generiert, da die S1-Spezifitätstasche mit Thr45 einen hydrophilen Charakter aufweist.^[2b,10] Diese unterschiedlichen Schnittpräferenzen der β 5-Untereinheiten ergeben sich hauptsächlich aus Veränderungen innerhalb des Substratbindekanals und nicht am Proteolysezentrum, da allen aktiven β -Untereinheiten der katalytische Mechanismus von N-terminalen nukleophilen (Ntn-)Threonin-Hydrolasen gemeinsam ist.^[7,11]

Während der letzten 15 Jahre wurde das CP intensiv als Angriffspunkt für Wirkstoffe untersucht, und auf Grundlage der empirisch gefundenen Substratspezifitäten sowie der Kristallstrukturen des 20S-Proteasoms aus *Thermoplasma acidophilum*,^[12] *Saccharomyces cerevisiae*^[13] und *Bos taurus*^[14] wurden zahlreiche Hemmstoffe entwickelt. Die meisten Substanzen, sowohl natürliche als auch synthetische, sind krebs- und entzündungshemmend und werden häufig in der Literatur abgehandelt.^[15] Allerdings rücken neue Studien über den therapeutischen Nutzen selektiver Inhibitoren des iCP bei Autoimmunerkrankungen das iCP in den Mittelpunkt der Wirkstoff-Entwicklung.^[6a,16] Dieser Aufsatz behandelt die gegenwärtigen Fortschritte auf dem Gebiet der Proteasominhibitoren, mit besonderem Augenmerk auf selektive Substanzen für das cCP und das iCP sowie ihr therapeutisches Potenzial.

2. 20S-Proteasome als Angriffspunkte für Wirkstoffe

Das 20S-Proteasom ist von herausragender Bedeutung für die intrazelluläre Proteinhomöostase. Hemmung des Proteasoms führt daher zur Anhäufung von fehlgefalteten Proteinen

sowie von reaktiven Sauerstoffspezies, was Stress im endoplasmatischen Retikulum und als Antwort die „unfolded protein response“ auslöst.^[18] Ferner verhindern Proteasomhemmstoffe den Abbau von Tumorsuppressoren wie dem Cyclinkinaseinhibitor p27^{kip1}^[19] und unterdrücken entzündungsfördernde Signale, die über den Nukleären Faktor- κ B vermittelt werden, sowie die Expression antiapoptotischer Zielgene. Letztlich häufen sich proapoptotische Faktoren an und verursachen Zellzyklusarrest und Apoptose.^[15b] Zahlreiche Studien belegen das therapeutische Fenster der Proteasominhibition für Krebsbehandlungen. Sich schnell teilende bösartige Zellen reagieren deutlich empfindlicher auf Hemmung des Proteasoms, da ihr beschleunigter Zellzyklus erhöhte Abbauraten an Zyklinen erfordert. Zudem ist die Aktivität des Proteasoms für Krebszellen essenziell, da ihre chromosomal Instabilität und unausgewogene Proteinsynthese zur Anhäufung von fehlgefalteten Proteinen führt, die entsorgt werden müssen. Daher verursacht Inhibition des Proteasoms vorrangig in sich teilenden Zellen den Zelltod, wohingegen gesunde, ruhende Zellen diese Belastung eher ertragen.^[15b,20]

Während erhöhte Proteasomkonzentrationen generell ein Merkmal von Tumorzellen sind, wurden ungewöhnliche iCP-Level mit der Entwicklung und dem Fortschreiten von neurodegenerativen Krankheiten, Autoimmunerkrankungen und bestimmten Krebsarten in Verbindung gebracht.^[21] Dennoch muss noch näher untersucht werden, ob erhöhte iCP-Konzentrationen wirklich ursächlich für den Verlauf einer Krankheit oder nur eine Folge erhöhter Zytokinproduktion oder zellulären Stresses sind. Bisher wurden Morbus Alzheimer, Chorea Huntington^[21a,22] und Makuladegeneration^[23] mit erhöhten Konzentrationen an proinflammatorischen Markern sowie iCPs assoziiert. Außerdem sind die β 1i-Konzentrationen bei rheumatoider Arthritis,^[24] Einschlusssköpermyositis, myofibrillärer Myopathie,^[25] amyotropher Lateralsklerose,^[21c,26] Morbus Crohn^[21d] und Dextransulfat-induzierter Kolitis^[27] erhöht. Des Weiteren wurden auffällige iCP-Konzentrationen in Krebsarten wie dem multiplen Myelom,^[28] dem feline Fibrosarkom^[29] ebenso wie in Dickdarm-,^[30] Lungen-^[30] und Prostatakrebszelllinien^[21b] nachgewiesen. Überexpression des iCP korreliert positiv mit chronisch-entzündlicher Tumorentstehung, Gefäßentzündungen und Zytokinproduktion.^[6a,25b,30] Daher ist Hemmung des iCP eine aussichtsreiche neue Therapiemöglichkeit für die oben



Michael Groll studierte Chemie und erhielt seinen Doktortitel für kristallographische und biochemische Studien zum 20S-Proteasom aus der Hefe. Nach Forschungsaufenthalten bei Prof. Huber (München), Prof. Finley (Boston), Prof. Neupert (München) und Prof. Kloetzel (Berlin) war er ab 2006 als Juniorprofessor an der Charité (Berlin) tätig. Seit 2007 ist er Inhaber des Lehrstuhls für Biochemie an der Technischen Universität München. Seine wissenschaftlichen Schwerpunkte liegen auf der strukturellen und funktionalen Charakterisierung von Multiproteinkomplexen.



Eva Huber studierte Biochemie an der Technischen Universität München und beendete 2009 ihr Masterstudium, das von der Studienstiftung des deutschen Volkes gefördert wurde. Im Rahmen ihrer Doktorarbeit bei Prof. Groll arbeitet sie auf dem Gebiet des Immunoproteasoms. Ihre augenblicklich größte Leistung besteht in der Kristallstrukturaufklärung des Immuno- und des konstitutiven Proteasoms aus der Maus alleine und im Komplex mit dem Immunoproteasom-spezifischen Inhibitor ONX 0914.

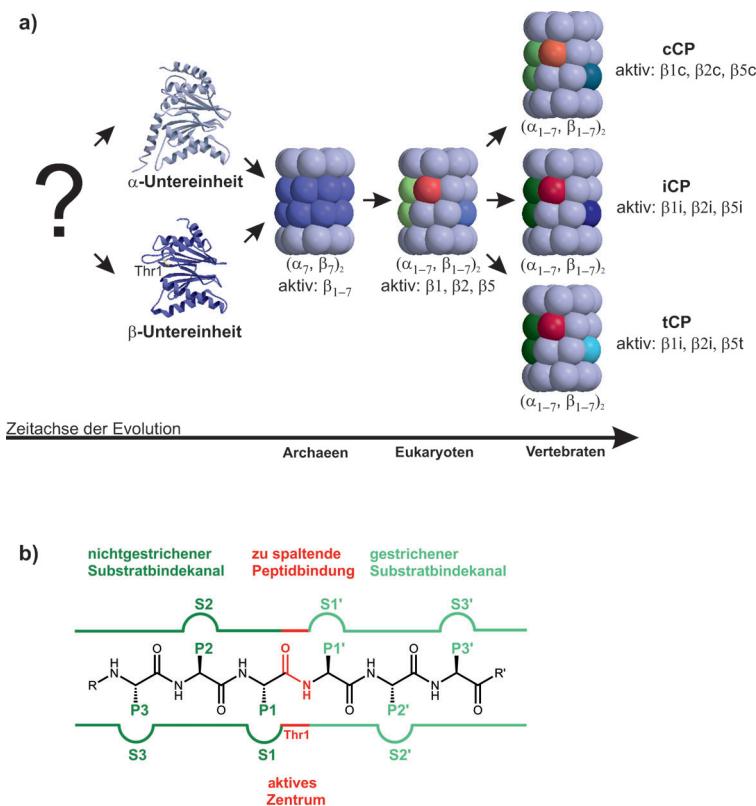


Abbildung 1. Evolutionäre Entwicklung der 20S-Proteasome (CPs). a) CPs und ihre Abkömmlinge existieren in allen drei Reichen des Lebens. Bakterien besitzen mit Ausnahme der Aktinomyzeten keine 20S-Proteasome, haben aber CP-ähnliche Komplexe wie HsLV, die aus zwei sechsgliedrigen Ringen einer einzigen aktiven β -Untereinheit bestehen.^[17] In der Regel besitzen Archaeen CPs, die aus zwei verschiedenen Monomeren aufgebaut sind, den inaktiven α -Untereinheiten (grau) und den proteolytisch aktiven β -Untereinheiten (blau), die vermutlich durch divergente Evolution aus einem gemeinsamen, unbekannten Vorläuferprotein hervorgingen. Während *Thermoplasma acidophilum* jeweils nur eine Art von α - und β -Untereinheiten in das CP einbaut,^[12] nutzen andere Organismen verschiedene α - und β -Untereinheiten. Eukaryoten, wie *Saccharomyces cerevisiae*, besitzen sieben verschiedene α - und sieben verschiedene β -Untereinheiten. Interessanterweise sind nur drei der β -Untereinheiten proteolytisch aktiv: $\beta 1$ (grün), $\beta 2$ (rot) und $\beta 5$ (blau).^[13] Der Übersichtlichkeit halber sind die katalytisch inaktiven β -Untereinheiten wie die α -Untereinheiten grau gefärbt. Im jüngsten Abschnitt der Evolution traten die Vertebraten auf, und mit ihrem adaptiven Immunsystem entwickelten sich drei Arten von 20S-Proteasomen: cCPs, iCPs und tCPs. Ihre katalytisch aktiven β -Untereinheiten sorgen für unterschiedliche Spaltpräferenzen von Substraten.^[7,14] Besonders die $\beta 5$ -Untereinheiten, die durch divergente Evolution entstanden, scheinen perfekt an die Anforderungen von Immunantworten und von möglichen anderen biologischen Pfaden angepasst zu sein. b) Substratbindekanal des Proteasoms. Die gestrichenen Taschen (S') und die Liganden-P'-Seitenketten sind grün hervorgehoben, die ungestrichenen Spezifitätstaschen (S) und die entsprechenden Substratreste (P) sind dunkelgrün dargestellt. Das aktive Zentrum mit Thr1 und die zu spaltende Peptidbindung sind rot eingezzeichnet.

aufgelisteten Krankheiten;^[6a,16] allerdings wurden bisher nur einige wenige selektive Inhibitoren für das iCP identifiziert. Das jetzt verfügbare Wissen um die Strukturunterschiede zwischen dem cCP und dem iCP in An- und Abwesenheit des spezifischen Inhibitors ONX 0914 (Onyx Pharmaceuticals; 4.3.3.) bietet die Grundlage für Modellierungs- und Ligan- denbindungsstudien sowie strukturbasiertes Wirkstoffdesign.

3. Proteasominhibitoren – eine mechanistische Beschreibung

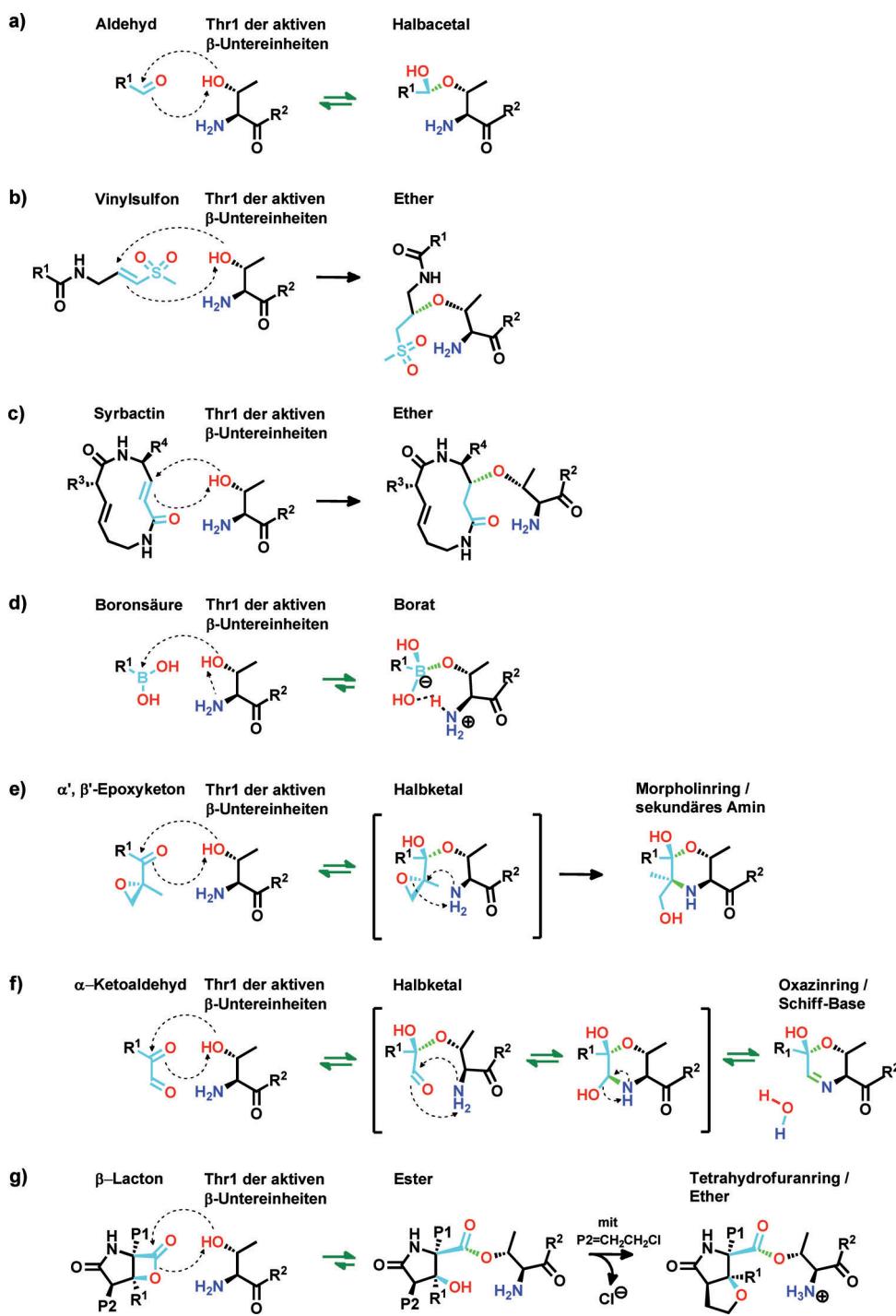
Die Substratbindekanäle mit ihren nichtgestrichenen und gestrichenen Spezifitätstaschen, die N- und C-terminal von der zu spaltenden Peptidbindung liegen, klassifizieren das Proteasom als eine Endoprotease (Abbildung 1b). Der Angriff des nukleophilen Thr1O^y des Proteasoms auf das Carbonylkohlenstoffatom von Peptidbindungen resultiert in einem Acyl-Enzym-Intermediate und einem Peptidfragment mit einem neu gebildeten N-Terminus. Die sich anschließende Hydrolyse des Acyl-Enzyms durch das nukleophile Wassermolekül regeneriert das aktive Zentrum und vervollständigt die Reaktion, indem der C-Terminus des N-terminalen Spaltproduktes freigelegt wird.^[13]

Die meisten der gegenwärtig untersuchten Wirkstoffkandidaten sind peptidähnliche Substanzen, die die Bindungsweise von natürlichen Substraten über ein antiparalleles β -Faltblatt im Substratbindekanal der aktiven Proteasomuntereinheit nachahmen.^[15a] Da ein Inhibitor an alle Proteasomuntereinheiten identisch bindet, unabhängig vom Proteasomtyp, beruht die Selektivität von peptidähnlichen Verbindungen für die Untereinheiten hauptsächlich auf ihren Seitenketten.^[7] Um allerdings nicht nur Spezifität, sondern auch Affinität zu erreichen, trägt die Mehrheit der Inhibitoren eine reaktive Kopfgruppe, die entweder irreversibel oder reversibel das Thr1 der aktiven proteasomalen β -Untereinheiten durch die Bildung einer kovalenten Bindung modifiziert. Anhand des Typs der funktionellen Gruppe können kovalent reagierende Substanzen in sieben Klassen eingeteilt werden, die im folgenden Abschnitt kurz beschrieben werden: Aldehyde, Vinylsulfone, Vinylamide (Syrbactine), Boronsäuren, α',β' -Epoxyketone, α -Ketoaldehyde (Glyoxale) und β -Lactone (Schema 1).

a) Aldehyde waren die ersten Inhibitoren, die für das Proteasom entwickelt wurden.^[31] Sie reagieren über ihr elektronelles Carbonylkohlenstoffatom mit dem N-terminalen Thr1O^y der proteolytisch aktiven β -Untereinheiten, indem sie ein reversibles tetraedrisches Halbacetal bilden (Schema 1a). Mit diesem Reaktionsmechanismus inhibieren Aldehyde auch Serin- und Cysteinproteasen.^[31] Da sie durch Oxidation leicht inaktiviert werden können, haben Aldehyde nur ein eingeschränktes therapeutisches Potenzial.^[32]

b) Peptide mit einer Vinylsulfonkopfgruppe reagieren über eine Michael-1,4-Addition und bilden so eine irreversible Etherbindung mit dem proteasomalen Thr1O^y (Schema 1b).^[15a,33] Allerdings modifizieren Vinylsulfone wegen ihres unspezifischen Reaktionsmechanismus auch die funktionelle Thiolgruppe von Cysteinproteasen.^[15a]

c) Die Michael-1,4-Addition ist auch von Naturstoffen bekannt: Die aus einem zwölfgliedrigen Makrolactamring-



Schema 1. Kopfgruppen von Proteasominhibitoren und ihr Reaktionsmechanismus. Chemische Strukturen pharmakologischer Grundgerüste, die kovalent mit dem nukleophilen Thr1O^γ aktiver Proteasomuntereinheiten reagieren: a) Aldehyde, b) Vinylsulfone, c) Vinylamide (Syrbactine), d) Boronsäuren, e) α',β'-Epoxyketone, f) α-Ketoaldehyde und g) β-Lactone sind cyan dargestellt. Der variable Teil der Verbindungen wird als R¹ bezeichnet. Das Thr1 im aktiven Zentrum des Proteasoms ist schwarz gefärbt. R² repräsentiert die aktive β-Untereinheit. Sauerstoffatome, die zur Katalyse beitragen, sind rot gekennzeichnet und die Amingruppe des Thr1 blau. Bindungen, die während des Reaktionsmechanismus gebildet werden, sind grün hervorgehoben. P1 und P2 ebenso wie R³ und R⁴ bezeichnen Seitenketten von β-Lactoninhibitoren bzw. Syrbactinen. Pfeile von reversiblen Reaktionen sind dunkelgrün dargestellt.

system bestehenden Syrbactine reagieren mit ihrer funktionellen Vinylamidgruppe mit dem Thr1O^γ auf ähnliche Weise wie Vinylsulfone (Schema 1c).^[34]

d) Wegen der Zulassung von Bortezomib durch die US Food and Drug Administration (FDA) sind Boronsäuren die bekannteste Substanzklasse. Sie bilden einen reversiblen tetraedrischen Übergangszustand mit dem nukleophilen Thr1O^γ. Dieser wird durch Wasserstoffbrücken zwischen den Hydroxygruppen der Boronsäure und dem Oxyanionloch Gly47NH sowie Thr1N stabilisiert.^[35] Diese Wechselwirkungen und das Lewis-Säure-Base-Konzept erklären die erhöhte Affinität von Bortezomib für Ntn-Hydrolasen verglichen mit anderen Proteasen (Schema 1d; Tabelle 1; Abschnitt 4.1).^[35,36]

e),f) α',β'-Epoxyketone und α-Ketoaldehyde reagieren beide in einem zweistufigen Mechanismus mit dem nukleophilen Thr1 (Schema 1e,f).^[37] Auf die reversible Halbketalbildung des Thr1O^γ mit der Ketongruppe folgt ein nukleophiler Angriff des Thr1N auf das Epoxid von α',β'-Epoxyketonen oder, im Fall von α-Ketoaldehyden, auf die Aldehydfunktion. Während α',β'-Epoxyketone irreversibel mit dem Thr1 cyclisieren und so ein Morphinolingsystem unter Bildung eines sekundären Amins entsteht, reagieren α-Ketoaldehyde mit dem Thr1 zu einem ringförmigen Carbinolamin-Intermediat, das sich in einer Kondensationsreaktion in ein 5,6-Dihydro-2H-1,4-oxazin mit einer Schiff-Basenbindung umwandelt.^[37a,b,38] α-Ketoaldehyde und α',β'-Epoxyketone repräsentieren wegen ihres einzigartigen bivalenten Bindungsmechanismus unter Beteiligung von Thr1O^γ und

Tabelle 1: Übersicht über die Affinitäten von Verbindungen für die verschiedenen Proteasomuntereinheiten. IC₅₀-Werte sind in nm angegeben; n.v. entspricht unveröffentlichten IC₅₀-Werten.

	β1c	β1i	β2c	β2i	β5c	β5i	Lit.
Bortezomib	74	n.v.	4200	n.v.	7	4	[64]
MLN9708	31	n.v.	3500	n.v.	3.4	n.v.	[58]
CEP-18770	< 100	n.v.	> 100	n.v.	3.8	n.v.	[57]
Carfilzomib	2400	n.v.	3600	n.v.	6	33	[64]
ONX 0912	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.	36	82	[63a]
Marizomib	330	n.v.	26	n.v.	2.5	n.v.	[40a]
ONX 0914	ca. 7000	ca. 500	ca. 3000	ca. 1000	236	28	[6a]
PR-924	> 30000	8200	> 30000	> 30000	2900	22	[42b]
IPSI-001	239 000 ^[a]	1450 ^[a]	n.v.	n.v.	105 000 ^[a]	1030 ^[a]	[44a]
PR-893	2800	221	8900	3100	17	357	[42b]
PR-825	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.	9	238	[6a]

[a] Für IPSI-001 sind nur K_i-Werte publiziert.

Thr1N des proteasomalen aktiven Zentrums die stärksten Proteasom-spezifischen funktionellen Kopfgruppen, die heute bekannt sind.

g) β-Lactone sind ein weiteres vielversprechendes Grundgerüst, das aktuell im Mittelpunkt der Wirkstoff-Entwicklung steht.^[39] Der Angriff von Thr1O^γ auf das Carbonylkohlenstoffatom der Esterfunktion öffnet den β-Lactonring und generiert eine Hydroxygruppe sowie einen Acyl-Enzym-Ester. Obwohl während dieser Reaktion das nukleophile Wassermolekül von seiner normalen Position im aktiven Zentrum verdrängt wird, kann das katalytisch aktive Th1O^γ durch langsame Hydrolyse des Acyl-Enzym-Komplexes wieder regeneriert werden.^[40] Interessanterweise folgt nur im Falle von Marizomib, dem wirksamsten β-Lacton-basierten Inhibitor, auf die Acyl-Enzym-Komplexbildung ein zweiter Reaktionsschritt: Die neu gebildete Hydroxygruppe löst die Cyclisierung der P2-Chlorethylseitenkette von Marizomib aus, sodass in einer irreversiblen Reaktion Chlorid freigesetzt wird und ein Tetrahydrofuranring entsteht (Schema 1 g).^[40a,c] Aufgrund dieser Etherbildung wird die Rückreaktion der kovalenten Modifikation des Thr1O^γ mit Marizomib durch die Addition von Wasser verhindert.^[15a,40c]

Einige der oben aufgelisteten reaktiven Kopfgruppen sind mit einer erhöhten inhibitorischen Aktivität und Zelltoxizität, aber einer verringerten Untereinheitenselektivität verbunden. So konnten Screen et al. 2010 zeigen, dass der Austausch des α',β'-Epoxyketon-Grundgerüstes durch die weniger reaktive Vinylsulfonkopfgruppe die β5-Spezifität von Liganden erhöht und somit deren Zelltoxizität verringert.^[41] Bisher inhibieren die meisten Proteasomhemmstoffe beide β5-Untereinheiten des cCP und des iCP, und es scheint, dass dies nötig ist, um effizient Apoptose in Tumorzellen auszulösen.^[42] β2- und β1-selektive Verbindungen verursachen alleine keine zytotoxischen Effekte, machen aber maligne Zellen für β5 inhibierende Wirkstoffe wie Bortezomib oder Carfilzomib empfindlicher.^[42a,43] Da jedoch für Inhibitoren einzelner iCP-Untereinheiten antineoplastische Effekte in transformierten Zellen berichtet wurden (Abschnitte 4.3.2 und 4.3.3),^[21b,44] sind weitere experimentelle Daten notwendig, um den therapeutischen Nutzen der selektiven Inhibition

einzelner iCP-Untereinheiten auf verschiedene Krebserkrankungen besser beurteilen zu können. In der Zwischenzeit sind jedoch spezifische iCP-Inhibitoren potente Kandidaten für die Behandlung von Autoimmunerkrankungen (Abschnitt 4.3.3).

4. Vor- und Nachteile bekannter Inhibitoren

4.1. Bortezomib

Die intensiven wissenschaftlichen Arbeiten des letzten Jahrzehnts gipfelten in der FDA-Zulassung des Dipeptidboronsäure-Inhibitors Bortezomib (Velcade, PS-341; Millenium Pharmaceuticals; Abbildung 2a: Substanz 1) für die Behandlung des multiplen Myeloms sowie des rezidivierenden und refraktären Mantelzelllymphoms.^[45] Daneben wird Bortezomib aktuell in klinischen Studien für solide Tumoren, einschließlich dem nicht-kleinzeligen Bronchialkarzinom,^[46] untersucht und zeigt therapeutische Wirksamkeit bei Nierentransplantationen.^[47] Bortezomib inhibiert die β5c- und β5i-Untereinheiten mit IC₅₀-Werten (IC₅₀ = mittlere inhibitorische Konzentration) von 7 und 4 nm gleich stark und mit geringerer Affinität die C-ähnliche Aktivität des Proteasoms (IC₅₀ = 74 nm).^[18c,48] Die Unspezifität bezüglich der β5c- und β5i-Untereinheit kann durch die günstigen Wechselwirkungen des N-terminalen Pyrazinrings von Bortezomib mit der S3-Tasche beider Untereinheiten erklärt werden.^[7]

Trotz ihres Markterfolges hat die Therapie mit Bortezomib mehrere Nachteile, wie die intravenöse Applikationsform und nennenswerte Nebenwirkungen wie Thrombozytopenie und Neutropenie sowie gastrointestinale Beschwerden.^[49] Mehr als 30 % der mit Bortezomib behandelten Patienten leiden auch unter schweren, aber reversiblen neurodegenerativen Symptomen,^[50] wie Neurotoxizität, Zittern und einer verringerten Nervenleitgeschwindigkeit.^[50c,51] Erst kürzlich wiesen wissenschaftliche Studien nach, dass Bortezomib Nerven schädigt, indem es erhebliche Off-Target-Aktivität ausübt. In diesem Zusammenhang berichteten Arastu-Kapur et al. 2011, dass Bortezomib nicht nur das Proteasom inhibiert, sondern in gleichem Maße auch Serinproteasen wie Cathepsin G, Cathepsin A, Chymase, Dipeptidylpeptidase II und HtrA2/omi, die das Überleben von Neuronen garantieren.^[50c]

Erheblich Bedenken bereiten zudem der große Anteil an neu diagnostizierten Patienten, die nicht auf Bortezomib ansprechen, sowie die hohe Wahrscheinlichkeit, nach einer Therapie mit Bortezomib rückfällig zu werden.^[51c,52] Während primäre Resistenz gegen Bortezomib durch eine erhöhte Konzentration des Hitzeschockproteins Hsp27 ausgelöst wird,^[53] ist die Ursache für das während der Therapie erworbene Nichtansprechen aktuell umstritten. Durch Behandlung von Zellkulturen mit schrittweise steigenden Bortezomibkonzentrationen und die anschließende Analyse ihrer DNA konnte eine ganze Reihe von adaptiven Mutationen wie Met45Val, Met45Ile, Ala49Thr, Ala49Val, Cys52Phe und Cys63Phe im β5c-Substratbindekanal identifiziert werden.^[49c,54] Modellierungsstudien lassen darauf schließen, dass

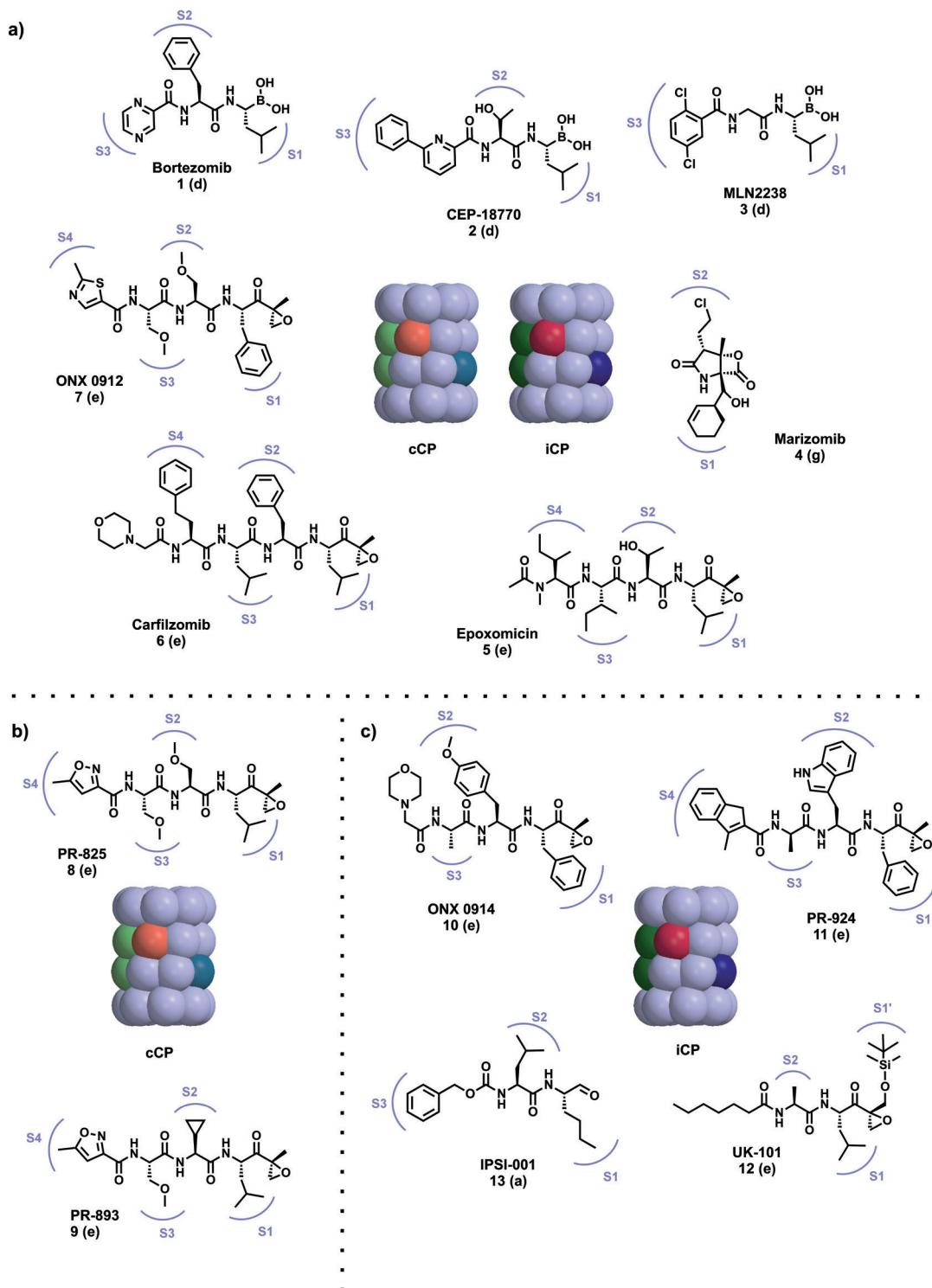


Abbildung 2. Inhibitoren und ihr bevorzugtes Zielproteasom. Die chemischen Strukturen von Hemmstoffen sind von 1 bis 13 nummeriert; die Buchstaben in Klammern beziehen sich auf die jeweiligen Reaktionsmechanismen, die in Schema 1 dargestellt sind. Die Spezifitätstaschen des Substratbindekanals des Proteasoms, die von den Ligandenseitenketten besetzt werden, sind grau gefärbt und werden gemäß der Standardnomenklatur mit S1–S4 bezeichnet. a) Substanzen, die das cCP und iCP gleichermaßen inhibieren. b) Spezifische Proteasominhibitoren für cCPs. c) iCP-selective Verbindungen für die Untereinheiten β 1i und β 5i. Die entsprechenden Selektivitäten für die einzelnen Untereinheiten können von den IC_{50} -Werten aus Tabelle 1 abgeleitet werden.

die Affinität von Bortezomib für diese mutierten Untereinheiten beeinträchtigt ist, was zu einer verringerten Inhibition und therapeutischen Wirksamkeit führt.^[54c] Die beschriebenen

Mutationen in der Untereinheit β 5c wurden auch mit einer verringerten katalytischen Aktivität in Verbindung gebracht, die möglicherweise durch erhöhte Expressionsraten

der Untereinheit $\beta 5$ kompensiert wird.^[54c] Interessanterweise finden sich diese mutierten $\beta 5c$ -Untereinheiten in vitro in malignen Zellen aus verschiedenen Geweben. Da aber bisher keine der Mutationen in Proben von Bortezomib-resistenten Patienten nachgewiesen werden konnte, ist ihre klinische Relevanz noch unklar. Daneben scheinen die Mutationen in der $\beta 5c$ -Untereinheit Kreuzresistenzen gegen andere Inhibitorklassen wie die Peptidaldehyde und Epoxyketone zu verursachen.^[49e, 55] Umstritten bleibt jedoch, ob die erworbene Resistenz gegen Bortezomib auch durch Multiwirkstoffresistenz(MDR)-Transporter wie das P-Glycoprotein oder das MDR-verwandte Protein 1 vermittelt wird.^[49e, 56] Da die Tendenz von Bortezomib, auch gesunde Zellen anzugreifen, und die daraus resultierenden Toxizitäten häufig eine Herabsetzung der Dosis oder einen Therapieabbruch erfordern, ist die Entwicklung einer zweiten Generation von Proteasominhibitoren nötig.

4.2. Proteasominhibitoren der zweiten Generation

4.2.1. Eine neue Generation von Boronsäureinhibitoren

Gegenwärtig werden zwei neue Peptidboronsäuren untersucht, nämlich Delanzomib (CEP-18770; Cephalon; Abbildung 2a: Substanz 2)^[57] und MLN9708 (Millennium Pharmaceuticals), eine Vorstufe, die nach der Verabreichung zum bioaktiven Wirkstoff MLN2238 (Abbildung 2a: Substanz 3) hydrolysiert wird.^[58] Beide Kandidaten zeichnen sich durch verbesserte pharmakokinetische und -dynamische Eigenschaften aus, ebenso wie durch eine höhere Antitumoraktivität als Bortezomib, und werden gegenwärtig für die Behandlung von hämatologischen und soliden Tumoren untersucht.^[58] Die orale Verabreichbarkeit von CEP-18770 und MLN9708 ist ein Vorteil gegenüber Bortezomib.^[57, 58] Interessanterweise hat MLN2238 eine höhere Dissoziationsgeschwindigkeit als Bortezomib und wird daher stärker im Körper verteilt als dieses. Allerdings bleibt aufzuklären, ob die Boronsäuren der zweiten Generation weniger Nebeneffekte verursachen und ob sie auch bei Bortezomibresistenzen wirksam sind. Da die Behandlung mit Proteasominhibitoren auch die DNA-Reparatur verhindert, könnte Polytherapie mit DNA schädigenden Substanzen eine wirksame Alternative für die Behandlung von Bortezomibresistenzen sein.^[59]

4.2.2. Carfilzomib und ONX0912

Ursprünglich wurden Boronsäuren für hoch spezifische Substanzen gehalten, aber bei einer Langzeitbehandlung mit Bortezomib zeigten sich mehrere Nebenwirkungen (Abschnitt 4.1), die Grundlagenforscher und pharmazeutische Industrie dazu ermutigten, neue, gleich wirksame Proteasominhibitoren mit verringriger Off-Target-Aktivität zu entwickeln. Einer der heutzutage aussichtsreichsten Kandidaten ist Carfilzomib (PR-171; Onyx Pharmaceuticals; Abbildung 2a: Substanz 6), ein vom Naturstoff Epoxomicin (Abbildung 2a: Substanz 5) abgeleitetes Tetrapeptid,^[60] das die $\beta 5c$ - und $\beta 5i$ -Untereinheiten des Proteasoms mit viel höherer Selektivität inhibiert als Bortezomib (Tabelle 1).^[42b] Im Einklang mit den Kristallstrukturen des cCP und des iCP be-

vorzugt Carfilzomib die Untereinheit $\beta 5c$ gegenüber $\beta 5i$, da seine Leucinseitenkette in der P1-Position vorzugsweise in die S1-Tasche der Untereinheit $\beta 5c$ bindet.^[7] Allerdings können vom P1-Rest alleine keine IC₅₀-Werte abgeleitet werden, da auch die P2-, P3- und P4-Seitenketten maßgeblich zur Affinität eines Peptidliganden beitragen.

Wegen seiner Fähigkeit, in einer Vielzahl von Tumorzelllinien den Zelltod auszulösen, wird Carfilzomib gegenwärtig in klinischen Studien für die Behandlung des multiplen Myeloms (Phase III) und solider Tumoren (Phase I) untersucht. Ebenso wie für Bortezomib sind Neutropenie und Thrombozytopenie die dosislimitierenden Faktoren bei der Therapie mit Carfilzomib, allerdings induziert Carfilzomib keine periphere Neurotoxizität.^[49d] Bedingt durch sein α',β' -Epoxyketongrundgerüst ist Carfilzomib spezifischer für das Proteasom und übt weniger Off-Target-Effekte als Bortezomib aus.^[50c] Da die Modifikation des aktiven Zentrums des Proteasoms durch Epoxomicinanaloge über einen einzigartigen Bindemechanismus unter Bildung eines Morpholinring-systems erfolgt (Schema 1e),^[37b] sind Carfilzomib und andere Epoxyketone selektiv für Ntn-Hydrolasen. Daher ist periphere Neuropathie, entgegen vorherigen Bedenken, nicht generell mit Proteasominhibition assoziiert, sondern vielmehr mit dem unspezifischen Reaktionsmechanismus von Bortezomib.^[50c] Widersprüchliche Ergebnisse gibt es zur Möglichkeit von Epoxyketoninhibitoren wie Carfilzomib, ONX 0912 (siehe unten) und ONX 0914 (Abschnitt 4.3.3), Bortezomib-resistenz zu überwinden.^[53b, 55, 61] Zudem wird spekuliert, dass Epoxyketone von Transportern mit Adenosin-5'-triphosphat (ATP) bindender Kassette gezielt aus Zellen entfernt werden können.^[55, 62] Bekannte Nachteile von Carfilzomib sind seine geringe Bioverfügbarkeit, die eine intravenöse Verabreichung erfordert, sowie die eher kurze Halbwertszeit von weniger als 30 Minuten.^[45a]

Um diese Nachteile anzugehen, wurden Struktur-Affinitäts-Studien unternommen, die in die Entwicklung des oral verfügbaren Tripeptidepoxyketon-Inhibitors ONX 0912 (PR-047; Abbildung 2a: Substanz 7) mündeten.^[63] ONX 0912 wird aktuell in klinischen Studien der Phase I als Einzeltherapie für solide Tumoren und Blutkrebsarten untersucht, und erste Befunde lassen darauf schließen, dass ONX 0912 bezüglich des Auslösens von Apoptose in Myelomazellen genauso wirksam ist wie Carfilzomib.^[63b] Gemäß den Kristallstrukturen des cCP und des iCP sollte ONX 0912 mit seiner großen Phenylseitenkette als P1-Rest bevorzugt an die Untereinheit $\beta 5i$ binden.^[7] Allerdings wurde berichtet, dass ONX 0912 die Untereinheiten $\beta 5c$ und $\beta 5i$ mit IC₅₀-Werten von 36 bzw. 82 nm inhibiert.^[63a] Da die S3-Tasche des $\beta 5i$ -Substratbindekanals kleiner ist als die der $\beta 5c$ -Untereinheit, stellt sie eine sterische Hürde für die P3-Ser(OMe)-Gruppierung von ONX 0912 dar.^[7] Im Unterschied dazu passt die P3-Ser(OMe)-Seitenkette ausgezeichnet in die S3-Tasche der $\beta 5c$ -Untereinheit. Dieses Beispiel verdeutlicht, dass die Selektivität und Affinität eines Inhibitors der Summe der günstigen und ungünstigen Wechselwirkungen aller P-Reste mit den proteasomalen Substratbindetaschen entsprechen.

4.2.3. Marizomib

Ein weiterer vielversprechender Proteasominhibitor, der aktuell in klinischen Studien untersucht wird, ist der von Nereus Pharmaceuticals in die Entwicklung gebrachte Naturstoff Marizomib (NPI-0052; Salinosporamid A; Abbildung 2a: Substanz 4).^[39,65] Dieser Sekundärmetabolit aus dem marinem Aktinomyzeten *Salinisporea tropica* ist der kleinste heute bekannte Proteasominhibitor. Marizomib führt dank seiner einzigartigen chemischen Struktur zu einer längeren Proteasominhibition (vor allem der Untereinheiten $\beta 2c$ und $\beta 5c$) als andere β -Lactone (Tabelle 1)^[40a] und verursacht daher mit höherer Wahrscheinlichkeit den Zelltod. Gegenwärtig verhält sich Marizomib vielversprechend in Bortezomib-resistenten Zelllinien und in Phase-I-Studien für die Behandlung des multiplen Myeloms sowie zahlreicher Leukämien und solider Tumoren.^[15b,65b,66] Zwar ist Marizomib bei oraler und intravenöser Verabreichung gut verträglich, allerdings zeigen die geringe Halbwertszeit des Naturstoffs von weniger als fünf Minuten und seine Fähigkeit, die Blut-Hirn-Schranke zu überschreiten, Grenzen des therapeutischen Einsatzes auf.^[49d,67]

Bisher wurde Marizomib nicht auf Hemmung des iCP untersucht, aber im Einklang mit den Kristallstrukturen des cCP und iCP zeigen synthetische Omuralid- und Marizomibderivate mit einer Phenylgruppe in P1 eine deutlich geringere Affinität für die ChT-ähnliche Aktivität des yCP und des cCP als die Naturstoffe.^[68] Daher könnten neue interessante Befunde erhalten werden, wenn diese Derivate auf ihre Affinität für das iCP getestet werden. Weil Peptidmetika viele schlechte pharmakologische Eigenschaften aufweisen, ist Marizomib – der einzige nichtpeptidische Hemmstoff in klinischer Entwicklung – dank seinen deutlich andersartigen pharmakokinetischen und -dynamischen Eigenschaften eine aussichtsreiche Alternative.

4.3. Untereinheitenspezifische Inhibitoren

4.3.1. $\beta 2i$ -/ $\beta 2c$ -selektive Verbindungen

Erst kürzlich wurde über selektive Hemmung der T-ähnlichen Aktivität des Proteasoms durch Epoxyketone berichtet.^[43] Diese Verbindungen haben zwar alleine keine Antitumoraktivität, machen multiple Myelomzellen jedoch empfindlicher für die Behandlung mit Bortezomib und Carfilzomib. Bemerkenswerterweise scheint die gleichzeitige Inhibition der ChT- und der T-ähnlichen Aktivitäten zu stärkeren zytotoxischen Effekten zu führen als simultane Hemmung der ChT- und der C-ähnlichen Aktivitäten.^[43] Bisher sind keine selektiven Inhibitoren der T-ähnlichen Aktivitäten des cCP und des iCP verfügbar, da die hohe Strukturähnlichkeit der $\beta 2i$ - und $\beta 2c$ -Substratbindekanäle die Entwicklung spezifischer Substanzen für eine der T-ähnlichen aktiven Zentren erschwert.^[7] Außerdem ist die genaue biologische Funktion der Untereinheiten $\beta 2c$ und $\beta 2i$ noch unklar, besonders die Ursache für den Austausch von $\beta 2c$ gegen $\beta 2i$ in iCPs, der einzigen katalytisch aktiven iCP-Untereinheit, die nicht innerhalb der MHC-I-Clusterregion codiert ist.^[7] Ungeachtet der bisher unklaren physiologischen Rolle der $\beta 2$ -Unterein-

heiten sind $\beta 2i$ -Knockout-Mäuse genauso vor Dextransulfat-induzierter Kolitis geschützt wie $\beta 5i$ -Knockout-Mäuse,^[16a] was einen therapeutischen Nutzen für die Hemmung der katalytischen Aktivität von $\beta 2i$ andeutet. Es müssen allerdings zukünftige Studien zu $\beta 2$ -selektiven Verbindungen abgewartet werden, um die physiologische Rolle der $\beta 2$ -Untereinheiten im Allgemeinen aufzuklären und das therapeutische Potenzial ihrer Inhibition detaillierter beurteilen zu können.

4.3.2. $\beta 1i$ -/ $\beta 1c$ -selektive Verbindungen

UK-101, dessen chemische Struktur von Dihydroeponeycin abgeleitet ist, war der erste $\beta 1i$ -spezifische Inhibitor (Abbildung 2c: Substanz 12).^[21b] Da seine hydrophobe aliphatische C₇-Kette in der P3-Position $\beta 1i$ -Selektivität vermittelt,^[69] löst UK-101 in $\beta 1i$ überexprimierenden Prostata-tumorzellen Apoptose aus.^[21b] Simulationen der Bindung von UK-101 an das cCP und an ein modelliertes iCP zeigen, dass die lineare Kohlenwasserstoffgruppe hervorragend in die $\beta 1i$ - $\beta 2i$ -Kontaktfläche, die die S3-Tasche des $\beta 1i$ -aktiven Zentrums bildet, passt.^[70] Im Einklang mit der Struktur des iCP bindet die $\beta 1i$ -S1-Tasche die Leucinseitenkette.^[7] Weitere Modellierungsstudien lassen darauf schließen, dass die *tert*-Butyldimethylsilyl-Gruppierung in Position P1' von UK-101 nicht mit den umliegenden Proteinresten wechselwirkt.^[70]

Kürzlich wurde über einen zweiten $\beta 1i$ -spezifischen Inhibitor, IPSI-001, berichtet. Diese Substanz, auch als Calpeptin bekannt, ist ein Peptidaldehydinhibitor, der die $\beta 1i$ -Untereinheit des iCP mit 100-facher Selektivität gegenüber $\beta 1c$ inhibiert (Abbildung 2c: Substanz 13; Tabelle 1).^[44a] Im Einklang mit Strukturdaten und früheren Berichten, dass eine C-terminale hydrophobe Aminosäure eine hohe Selektivität für die $\beta 1i$ -Untereinheit des iCP verleiht, hat IPSI-001 eine Carbobenzoxy-Leucyl-Norleucinal(Z-L-nL-CHO)-Struktur. Dennoch inhibiert IPSI-001 auch die ChT-ähnliche Aktivität des iCP, sogar mit niedrigerem K_i -Wert als für die BrAAP-Aktivität (Tabelle 1).^[44a] Es wurde gezeigt, dass IPSI-001 in hämatologischen Krebserkrankungen, bei denen iCPs überexprimiert werden, Apoptose auslösen kann, ebenso wie in Bortezomib-resistenten Zellen; zudem scheint IPSI-001 weniger toxisch für gesunde Zellen zu sein.^[30,44a] Parlati et al. behaupteten 2009 allerdings, dass die beobachteten Antikrebseffekte von IPSI-001 nicht auf selektiver Hemmung der $\beta 1i$ -Untereinheit beruhen, da die eingesetzten Konzentrationen für IPSI-001 ebenfalls die $\beta 5c$ - und $\beta 5i$ -Untereinheiten inhibieren.^[42b] Bisher kann nicht ausgeschlossen werden, dass die bekannte Kreuzreakтивität von Aldehyden gegen Cysteinproteasen wie Calpain I und II zusätzlich zum zytotoxischen Effekt von IPSI-001 beiträgt.^[31] Was die geringe metabolische Stabilität von Aldehyden betrifft, könnte die Fusion des Peptidrückgrates von IPSI-001 mit einer irreversibel reagierenden funktionellen Kopfgruppe die Affinität von IPSI-001 für das Proteasom erhöhen und ungewollte Modifizierung anderer Enzyme verhindern; vermutlich wird hierdurch aber ebenfalls die Untereinheitenselektivität von IPSI-001 verringert.^[44a]

4.3.3. β 5i-/ β 5c-selektive Verbindungen

ONX 0914 (PR-957; Abbildung 2c: Substanz 10), der erste entwickelte β 5i-selektive Inhibitor, ist ein irreversibel reagierendes α' , β' -Epoxyketon. Indem diese Verbindung selektiv das iCP mit hoher Affinität hemmt (Tabelle 1), wird die Produktion von proinflammatorischen Zytokinen wie Interleukin(IL)-6, IL-23 und TNF herabgesetzt.^[6a] Folglich ist die Differenzierung von T_H1- und T_H17-Zellen, die mit Autoimmunerkrankungen assoziiert sind, beeinträchtigt, wogegen die Entwicklung regulatorischer T-Zellen nicht betroffen ist.^[4a, 6a] Darüber hinaus verringert ONX 0914 die Expression von MHC-I-Rezeptoren auf der Zelloberfläche auf 50% ebenso wie die Bildung von β 5i-abhängigen MHC-I-Peptiden und moduliert somit zytotoxische T-Zellantworten.^[6a] Bisher wurde gezeigt, dass ONX 0914 das Fortschreiten von chronischen Entzündungserkrankungen wie rheumatoider Arthritis, experimenteller Kolitis und systemischem Lupus erythematoses unterdrückt.^[6a, 16] Im Unterschied zu unselektiven Inhibitoren ist ONX 0914 bereits in Konzentrationen deutlich unterhalb der maximal tolerierten Dosis therapeutisch wirksam und ist effizienter als der lösliche TNF- α -Antagonist Etanercept, der bisher für die Behandlung von verschiedenen Autoimmunerkrankungen eingesetzt wird.^[6a] Dank seiner hervorragenden therapeutischen Wirkung in Mäusemodellen wurde ONX 0914 schnell in präklinische Studien aufgenommen, deren Ergebnisse abzuwarten sind.

Die molekulare Ursache für die β 5i-Selektivität von ONX 0914 wurde kürzlich durch Strukturstudien aufgeklärt.^[7] Die Kristallstrukturen des cCP und des iCP zeigen, dass wegen unterschiedlicher Orientierungen von Met45 die β 5i-Untereinheit eine größere S1-Tasche besitzt als β 5c. Anders als im Fall der Untereinheit β 5i erfordert eine kovalente Reaktion von ONX 0914 mit dem Thr1O^y von β 5c eine Drehung der Seitenkette von Met45. Die Rotation von Met45 verursacht die Umorientierung von Ile35 und löst zusätzliche große Strukturverschiebungen im Proteindrückgrat zwischen den Aminosäuren 34 und 76 um bis zu 1.7 Å aus. In der Untereinheit β 5c zeigt Met45 in die S1-Tasche des Substratkanals und erschwert damit das Binden des Phe-Restes von ONX 0914 oder jeder anderen aromatischen Seitenkette an das aktive Zentrum.^[7] Dies ist im Einklang mit Berichten über synthetische β -Lactoninhibitory mit einer großen und rigiden Phenyleinheit in P1, die eine deutlich geringere Affinität für die ChT-ähnliche Aktivität des yCP und des cCP als die Naturstoffe zeigen.^[68] Ferner ist der IC₅₀-Wert von Bortezomibvarianten, die eine m-CF₃-Phe-Gruppe als P1-Rest enthalten, für das humane cCP um das 220-Fache erhöht.^[71]

Zusätzliche Untersuchungen zum Reaktionsmechanismus der Epoxyketoninhibitory zeigen, dass der erste Schritt der Bindung von ONX 0914 an das proteasomale aktive Zentrum nur über die reaktive funktionelle Kopfgruppe und die P1-Seitenkette des Liganden erfolgt.^[7] Diese Beobachtungen verdeutlichen die Wichtigkeit der Wechselwirkungen des P1-Restes des Liganden mit der S1-Tasche des Substratbindekanals und sind konsistent mit nichtpeptidischen Proteasominhibitoren wie Marizomib, das nur die S1-Tasche des Substratbindekanals besetzt.

Abgeleitet von den Kristallstrukturen des iCP und des cCP sollten Substanzen mit einem kleinen hydrophoben P1-Rest und einer großen unpolaren P3-Seitenkette bevorzugt an die β 5c-Untereinheit binden, während β 5i-selektive Substanzen vorrangig eine aromatische P1-Seitenkette und eine kleine, polare P3-Seitenkette aufweisen sollten.^[7] Diese Strukturforderungen stimmen mit den Sequenzen der selektiven Fluoreszenzsubstrate Ac-WLA-AMC und Ac-ANW-AMC für die Untereinheiten β 5c und β 5i überein.^[9, 71] In Anbetracht der antiinflammatorischen Aktivität von ONX 0914 und der Struktur des aktiven Zentrums der β 5i-Untereinheit könnten regulatorische Faktoren der Zytokin-synthese selektiv durch Spaltung C-terminal von großen hydrophoben Resten prozessiert werden.^[6a, 7]

Außer ONX 0914 gibt es mit PR-924 (Abbildung 2c: Substanz 11) noch einen weiteren β 5i-selektiven Epoxyketoninhibitory, der von Onyx Pharmaceuticals entwickelt wurde.^[42b] Im Unterschied zu früheren Daten von Parlati et al. aus dem Jahr 2009, die eine Antitumoraktivität von β 5c- bzw. β 5i-selektiven Substanzen ausschließen,^[42b] wurde gezeigt, dass PR-924 selektiv den Zelltod in humanen multiplen Myelomzelllinien auslöst.^[44b] Bisher befindet sich PR-924 jedoch noch nicht in klinischen Studien. Neben β 5i-selektiven Substanzen gibt es zwei β 5c-spezifische Inhibitoren: PR-825^[6a] (Abbildung 2b: Substanz 8) und PR-893^[42b] (Abbildung 2b: Substanz 9) sind beide Derivate von Epoxomicin.^[60a] Mit Ausnahme ihrer P2-Seitenketten sind die chemischen Strukturen von PR-825 und PR-893 identisch, was beiden eine ähnliche Untereinheitspezifität und -affinität verleiht (Tabelle 1). Gemäß den in diesem Abschnitt beschriebenen Eigenschaften der β 5c- und β 5i-Untereinheiten vermittelt Leucin in P1 und Ser (OMe) in P3 Selektivität für die β 5c-Untereinheit. PR-825 und PR-893 wurden als Kontrollen für Experimente mit ONX 0914 und Carfilzomib verwendet.^[6a, 42b] Diese Studien zeigten, dass PR-825 anders als ONX 0914 weder entzündungshemmende Aktivität noch therapeutisches Potenzial für Autoimmunerkrankungen zeigt.^[6a] Ebenso verursacht PR-893 keine Apoptose in multiplen Myelomzellen, wogegen simultane Inhibition der β 5c- und β 5i-Untereinheiten durch Carfilzomib antineoplastische Effekte bewirkt.^[42b] Aktuell ist für β 5c-selektive Inhibitoren noch keine medizinische Indikation bekannt, aber selektive Hemmstoffe des iCP sind bereits vielversprechende Kandidaten für Wirkstoffe, die in Zukunft eine FDA-Zulassung erlangen könnten.

5. Zukünftige Entwicklungen

Vor dem Hintergrund einer Sequenzidentität von mehr als 90% zwischen den Proteasomuntereinheiten der Maus und des Menschen werden die jetzt verfügbaren Strukturinformationen über das cCP und das iCP aus der Maus Modellierungs- und Ligandenbindungsstudien ermöglichen und so die Entwicklung von neuen spezifischen und selektiven Inhibitoren unterstützen.

Nachdem die β 2-Untereinheiten des cCP und des iCP bislang kaum Beachtung fanden, werden sie jetzt als neue potenzielle Wirkstoffziele entdeckt.^[43] Allerdings konnten die

physiologischen Unterschiede zwischen den strukturell ähnlichen Untereinheiten $\beta 2c$ und $\beta 2i$ noch nicht identifiziert werden, sodass weitere experimentelle Untersuchungen notwendig sind. Für die $\beta 1i$ -Untereinheit wurden zwei selektive Inhibitoren charakterisiert, jedoch ist deren Weiterentwicklung bezüglich höherer Selektivität und Affinität nötig.^[21b,44a] Erleichtert wird dies nun durch das Wissen um die Architektur des Substratbindekanals der $\beta 1c$ -Untereinheit, die vorrangig negativ geladene Seitenketten in die S1-Tasche aufnimmt, und der $\beta 1i$ -Untereinheit, die unpolare verzweigte Reste in Position P1 sowie kleine, vorzugsweise polare Gruppen in P3 bindet.^[7]

Aktuelle experimentelle Befunde lassen darauf schließen, dass $\beta 5i$ -selektive Inhibitoren ein großes Potenzial für die Behandlung von Autoimmunerkrankungen haben. Außer auf iCP-selektive Inhibitoren werden sich zukünftige Untersuchungen auf die Entwicklung von Hemmstoffen richten, die spezifisch das für die Entwicklung der T-Zellen wichtige tCP hemmen.^[2b] Zudem steigt das Interesse daran, Proteasominhibitoren für andere therapeutische Anwendungen, wie die Verhinderung der Abstoßung von Allo- und Xenotransplantaten, einzusetzen.

Bekannte Proteasomhemmstoffe haben zwar großes inhibitorisches und therapeutisches Potenzial, allerdings müssen die meisten von ihnen in Bezug auf Stabilität, Halbwertszeit, Bioverfügbarkeit, Ausscheidungsgeschwindigkeit, Verabreichungsform, Wirksamkeit, Sicherheit und Toxizität verbessert werden. Diesbezüglich könnten Chemiker auch das kürzlich untersuchte α -Ketoaldehydgrundgerüst in Betracht ziehen.^[37a,38] Da die reversibel reagierenden α -Ketoaldehyde ähnlich wie Epoxyketone den einzigartigen katalytischen Mechanismus des proteasomalen Thr1 nutzen, sind sie möglicherweise interessante Kandidaten für zukünftige Wirkstoff-Entwicklungen. Mit Ausnahme von Bortezomib sind von Inhibitoren mit einem reversiblen Reaktionsmechanismus weniger ungewollte Nebeneffekte zu erwarten, weshalb auch nichtkovalent bindende Inhibitoren im Mittelpunkt von zukünftigen Wirkstoff-Entwicklungen stehen werden. Da diese Hemmstoffe keinen Acyl-Enzym-Komplex mit $\text{Thr}1\text{O}^{\gamma}$ bilden, ist ihre Affinität einzig von ihrer entropischen und enthalpischen Stabilisierung im Substratbindekanal abhängig, und ihre Selektivität und Spezifität werden von ihrer Rigidität und ihren optimierten Wechselwirkungen mit den Substratbindetaschen bestimmt. Zur Entwicklung iCP-spezifischer nichtkovalent bindender Inhibitoren könnten die chemischen Strukturen von bereits charakterisierten Verbindungen, wie der Naturstoffklasse der cyclischen TMC-95-Peptide,^[72] den decarboxylierten Peptiden^[73] oder den Hydroxyharnstoffen,^[74] als Ausgangspunkte fungieren. Allerdings bleibt abzuwarten, ob sich mithilfe dieser oder anderer Substanzen die Nachteile der derzeit verabreichten oder untersuchten Verbindungen überwinden lassen werden. Fazit: Der Status quo, wie wir ihn hier geschildert haben, lässt für die Zukunft weitere interessante Berichte über die Proteasominhibition und ihre klinische Anwendung erwarten.

Eingegangen am 28. Februar 2012
Online veröffentlicht am 18. Juni 2012

- [1] a) D. Finley, *Annu. Rev. Biochem.* **2009**, *78*, 477–513; b) E. Genin, M. Reboud-Ravaux, J. Vidal, *Curr. Top. Med. Chem.* **2010**, *10*, 232–256.
- [2] a) J. Neefjes, M. L. Jongsma, P. Paul, O. Bakke, *Nat. Rev. Immunol.* **2011**, *11*, 823–836; b) S. Murata, K. Sasaki, T. Kishimoto, S. Niwa, H. Hayashi, Y. Takahama, K. Tanaka, *Science* **2007**, *316*, 1349–1353.
- [3] a) P. M. Klotzel, F. Ossendorp, *Curr. Opin. Immunol.* **2004**, *16*, 76–81; b) T. A. Griffin, D. Nandi, M. Cruz, H. J. Fehling, L. V. Kaer, J. J. Monaco, R. A. Colbert, *J. Exp. Med.* **1998**, *187*, 97–104; c) M. Groettrup, R. Kraft, S. Kostka, S. Standera, R. Stohwasser, P. M. Klotzel, *Eur. J. Immunol.* **1996**, *26*, 863–869.
- [4] a) M. Groettrup, C. J. Kirk, M. Basler, *Nat. Rev. Immunol.* **2010**, *10*, 73–78; b) P. M. Klotzel, *Nat. Immunol.* **2004**, *5*, 661–669; c) I. A. York, S. C. Chang, T. Saric, J. A. Keys, J. M. Favreau, A. L. Goldberg, K. L. Rock, *Nat. Immunol.* **2002**, *3*, 1177–1184.
- [5] a) E. Z. Kincaid, J. W. Che, I. York, H. Escobar, E. Reyes-Vargas, J. C. Delgado, R. M. Welsh, M. L. Karow, A. J. Murphy, D. M. Valenzuela, G. D. Yancopoulos, K. L. Rock, *Nat. Immunol.* **2011**, *13*, 129–135; b) H. J. Fehling, W. Swat, C. Laplace, R. Kuhn, K. Rajewsky, U. Muller, H. von Boehmer, *Science* **1994**, *265*, 1234–1237; c) M. Basler, U. Beck, C. J. Kirk, M. Groettrup, *J. Immunol.* **2011**, *187*, 5548–5557.
- [6] a) T. Muchamuel, M. Basler, M. A. Aujay, E. Suzuki, K. W. Kalim, C. Lauer, C. Sylvain, E. R. Ring, J. Shields, J. Jiang, P. Shwonek, F. Parlati, S. D. Demo, M. K. Bennett, C. J. Kirk, M. Groettrup, *Nat. Med.* **2009**, *15*, 781–787; b) U. Seifert, L. P. Bialy, F. Ebstein, D. Bech-Otschir, A. Voigt, F. Schroter, T. Prozorovski, N. Lange, J. Steffen, M. Rieger, U. Kuckelkorn, O. Aktas, P. M. Klotzel, E. Kruger, *Cell* **2010**, *142*, 613–624.
- [7] E. Huber, M. Basler, R. Schwab, W. Heinemeyer, C. J. Kirk, M. Groettrup, M. Groll, *Cell* **2012**, *148*, 727–738.
- [8] M. Orlowski, C. Cardozo, C. Michaud, *Biochemistry* **1993**, *32*, 1563–1572.
- [9] C. Blackburn, K. M. Gigstad, P. Hales, K. Garcia, M. Jones, F. J. Brizzese, 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, *J. Biochem.* **2010**, *430*, 461–476.
- [10] S. Murata, Y. Takahama, K. Tanaka, *Curr. Opin. Immunol.* **2008**, *20*, 192–196.
- [11] a) J. A. Brannigan, G. Dodson, H. J. Duggleby, P. C. Moody, J. L. Smith, D. R. Tomchick, A. G. Murzin, *Nature* **1995**, *378*, 416–419; b) E. Seemuller, A. Lupas, D. Stock, J. Lowe, R. Huber, W. Baumeister, *Science* **1995**, *268*, 579–582.
- [12] J. Lowe, D. Stock, B. Jap, P. Zwickl, W. Baumeister, R. Huber, *Science* **1995**, *268*, 533–539.
- [13] M. Groll, L. Ditzel, J. Lowe, D. Stock, M. Bochtler, H. D. Bartunik, R. Huber, *Nature* **1997**, *386*, 463–471.
- [14] M. Unno, T. Mizushima, Y. Morimoto, Y. Tomisugi, K. Tanaka, N. Yasuoka, T. Tsukihara, *Structure* **2002**, *10*, 609–618.
- [15] a) L. Borisenko, M. Groll, *Chem. Rev.* **2007**, *107*, 687–717; b) L. R. Dick, P. E. Fleming, *Drug Discovery Today* **2010**, *15*, 243–249; c) M. A. Gräwert, M. Groll, *Chem. Commun.* **2012**, *48*, 1364–1378; d) A. F. Kisselov, W. A. van der Linden, H. S. Overkleef, *Chem. Biol.* **2012**, *19*, 99–115.
- [16] a) M. Basler, M. Dajee, C. Moll, M. Groettrup, C. J. Kirk, *J. Immunol.* **2010**, *185*, 634–641; b) H. T. Ichikawa, T. Conley, T. Muchamuel, J. Jiang, S. Lee, T. Owen, J. Barnard, S. Nevarez, B. I. Goldman, C. J. Kirk, R. J. Looney, J. H. Anolik, *Arthritis Rheum.* **2012**, *64*, 493–503.
- [17] M. Bochtler, L. Ditzel, M. Groll, R. Huber, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1997**, *94*, 6070–6074.
- [18] a) D. J. McConkey, K. Zhu, *Drug Resist. Updates* **2008**, *11*, 164–179; b) S. T. Nawrocki, J. S. Carew, K. Dunner, Jr., L. H. Boise, P. J. Chiao, P. Huang, J. L. Abbruzzese, D. J. McConkey, *Cancer Res.* **2005**, *65*, 11510–11519; c) E. A. Obeng, L. M. Carlson,

- D. M. Gutman, W. J. Harrington, Jr., K. P. Lee, L. H. Boise, *Blood* **2006**, *107*, 4907–4916; d) G. Bianchi, L. Oliva, P. Cascio, N. Pengo, F. Fontana, F. Cerruti, A. Orsi, E. Pasqualetto, A. Mezghrani, V. Calbi, G. Palladini, N. Giuliani, K. C. Anderson, R. Sitia, S. Cenci, *Blood* **2009**, *113*, 3040–3049; e) T. Mujtaba, O. P. Dou, *Discovery Med.* **2011**, *12*, 471–480.
- [19] I. Nickeleit, S. Zender, F. Sasse, R. Geffers, G. Brandes, I. Sorensen, H. Steinmetz, S. Kubicka, T. Carlomagno, D. Menche, I. Gutgemann, J. Buer, A. Gossler, M. P. Manns, M. Kalesse, R. Frank, N. P. Malek, *Cancer Cell* **2008**, *14*, 23–35.
- [20] a) M. Bazzaro, M. K. Lee, A. Zoso, W. L. Stirling, A. Santillan, M. Shih Ie, R. B. Roden, *Cancer Res.* **2006**, *66*, 3754–3763; b) T. Hideshima, P. Richardson, D. Chauhan, V. J. Palombella, P. J. Elliott, J. Adams, K. C. Anderson, *Cancer Res.* **2001**, *61*, 3071–3076; c) P. M. Voorhees, E. C. Dees, B. O’Neil, R. Z. Orlowski, *Clin. Cancer Res.* **2003**, *9*, 6316–6325.
- [21] a) M. Diaz-Hernandez, F. Hernandez, E. Martin-Aparicio, P. Gomez-Ramos, M. A. Moran, J. G. Castano, I. Ferrer, J. Avila, J. J. Lucas, *J. Neurosci.* **2003**, *23*, 11653–11661; b) Y. K. Ho, P. Bargagna-Mohan, M. Wehenkel, R. Mohan, K. B. Kim, *Chem. Biol.* **2007**, *14*, 419–430; c) K. Puttaparthi, J. L. Elliott, *Exp. Neurol.* **2005**, *196*, 441–451; d) A. Visekruna, N. Slavova, S. Dullat, J. Grone, A. J. Kroesen, J. P. Ritz, H. J. Buhr, U. Steinhoff, *Int. J. Colorectal Dis.* **2009**, *24*, 1133–1139.
- [22] a) M. Mishto, E. Bellavista, A. Santoro, A. Stolzing, C. Ligorio, B. Naemias, L. Spazzafumo, M. Chiappelli, F. Licastro, S. Sorbi, A. Pession, T. Ohm, T. Grune, C. Franceschi, *Neurobiol. Aging* **2006**, *27*, 54–66; b) L. R. Fitzpatrick, J. S. Small, L. S. Poritz, K. J. McKenna, W. A. Koltun, *Dis. Colon Rectum* **2007**, *50*, 337–348; Diskussion: c) L. R. Fitzpatrick, J. S. Small, L. S. Poritz, K. J. McKenna, W. A. Koltun, *Dis. Colon Rectum* **2007**, *50*, 348–350.
- [23] C. M. Ethen, S. A. Hussong, C. Reilly, X. Feng, T. W. Olsen, D. A. Ferrington, *FEBS Lett.* **2007**, *581*, 885–890.
- [24] T. Egerer, L. Martinez-Gamboa, A. Dankof, B. Stuhlmuller, T. Dorner, V. Krenn, K. Egerer, P. E. Rudolph, G. R. Burmester, E. Feist, *Arthritis Rheum.* **2006**, *54*, 1501–1508.
- [25] a) I. Ferrer, B. Martin, J. G. Castano, J. J. Lucas, D. Moreno, M. Olive, *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **2004**, *63*, 484–498; b) Z. Yang, D. Gagarin, G. St Laurent III, N. Hammell, I. Toma, C. A. Hu, A. Iwasa, T. A. McCaffrey, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **2009**, *29*, 1213–1219.
- [26] K. Puttaparthi, L. Van Kaer, J. L. Elliott, *Exp. Neurol.* **2007**, *206*, 53–58.
- [27] L. R. Fitzpatrick, V. Khare, J. S. Small, W. A. Koltun, *Dig. Dis. Sci.* **2006**, *51*, 1269–1276.
- [28] M. Altun, P. J. Galardy, R. Shringarpure, T. Hideshima, R. LeBlanc, K. C. Anderson, H. L. Ploegh, B. M. Kessler, *Cancer Res.* **2005**, *65*, 7896–7901.
- [29] F. Cerruti, M. Martano, C. Petterino, E. Bollo, E. Morello, R. Bruno, P. Buracco, P. Cascio, *Neoplasia* **2007**, *9*, 960–969.
- [30] W. Lee, K. B. Kim, *Curr. Top. Med. Chem.* **2011**, *11*, 2923–2930.
- [31] A. Vinitsky, C. Michaud, J. C. Powers, M. Orlowski, *Biochemistry* **1992**, *31*, 9421–9428.
- [32] K. Lindsten, V. Menendez-Benito, M. G. Masucci, N. P. Dantuma, *Nat. Biotechnol.* **2003**, *21*, 897–902.
- [33] M. Bogyo, J. S. McMaster, M. Gaczynska, D. Tortorella, A. L. Goldberg, H. Ploegh, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1997**, *94*, 6629–6634.
- [34] M. Groll, B. Schellenberg, A. S. Bachmann, C. R. Archer, R. Huber, T. K. Powell, S. Lindow, M. Kaiser, R. Dudler, *Nature* **2008**, *452*, 755–758.
- [35] M. Groll, C. R. Berkers, H. L. Ploegh, H. Ovaa, *Structure* **2006**, *14*, 451–456.
- [36] B. Walker, J. F. Lynas, *Cell. Mol. Life Sci.* **2001**, *58*, 596–624.
- [37] a) M. A. Gräwert, N. Gallastegui, M. Stein, B. Schmidt, P. M. Kloetzel, R. Huber, M. Groll, *Angew. Chem.* **2011**, *123*, 563–566; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 542–544; b) M. Groll, K. B. Kim, N. Kairies, R. Huber, C. M. Crews, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 1237–1238; c) L. J. Crawford, B. Walker, H. Ovaa, D. Chauhan, K. C. Anderson, T. C. Morris, A. E. Irvine, *Cancer Res.* **2006**, *66*, 6379–6386.
- [38] J. F. Lynas, P. Harriott, A. Healy, M. A. McKervey, B. Walker, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1998**, *8*, 373–378.
- [39] B. C. Potts, M. X. Albilar, K. C. Anderson, S. Baritaki, C. Berkers, B. Bonavida, J. Chandra, D. Chauhan, J. C. Cusack, Jr., W. Fenical, I. M. Ghobrial, M. Groll, P. R. Jensen, K. S. Lam, G. K. Lloyd, W. McBride, D. J. McConkey, C. P. Miller, S. T. C. Neuteboom, Y. Oki, H. Ovaa, F. Pajonk, P. G. Richardson, A. M. Roccaro, C. M. Sloss, M. A. Spear, E. Valashi, A. Younes, M. A. Palladino, *Curr. Cancer Drug Targets* **2011**, *11*, 254–284.
- [40] a) M. Groll, B. C. Potts, *Curr. Top. Med. Chem.* **2011**, *11*, 2850–2878; b) H. Burgi, J. Dunitz, E. Shefter, *J. Am. Chem. Soc.* **1973**, *95*, 5065–5067; c) M. Groll, R. Huber, B. C. Potts, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 5136–5141.
- [41] M. Screen, M. Britton, S. L. Downey, M. Verdoes, M. J. Voges, A. E. Blom, P. P. Geurink, M. D. Risseeuw, B. I. Florea, W. A. van der Linden, A. A. Pletnev, H. S. Overkleef, A. F. Kisselov, *J. Biol. Chem.* **2010**, *285*, 40125–40134.
- [42] a) 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. Overkleef, A. F. Kisselov, *Chem. Biol.* **2009**, *16*, 1278–1289; b) F. Parlati, S. J. Lee, M. Ajay, E. Suzuki, K. Levitsky, J. B. Lorens, D. R. Micklem, P. Ruurs, C. Sylvain, Y. Lu, K. D. Shenk, M. K. Bennett, *Blood* **2009**, *114*, 3439–3447.
- [43] A. C. Mirabella, A. A. Pletnev, S. L. Downey, B. I. Florea, T. B. Shabaneh, M. Britton, M. Verdoes, D. V. Filippov, H. S. Overkleef, A. F. Kisselov, *Chem. Biol.* **2011**, *18*, 608–618.
- [44] a) D. J. Kuhn, S. A. Hunsucker, Q. Chen, P. M. Voorhees, M. Orlowski, R. Z. Orlowski, *Blood* **2009**, *113*, 4667–4676; b) A. V. Singh, M. Bandi, M. A. Ajay, C. J. Kirk, D. E. Hark, N. Raje, D. Chauhan, K. C. Anderson, *Br. J. Haematol.* **2011**, *152*, 155–163.
- [45] a) O. A. O’Connor, J. Wright, C. Moskowitz, J. Muzzy, B. MacGregor-Cortelli, M. Stubblefield, D. Straus, C. Portlock, P. Hamlin, E. Choi, O. Dumetrescu, D. Esseltine, E. Trehu, J. Adams, D. Schenkein, A. D. Zelenetz, *J. Clin. Oncol.* **2005**, *23*, 676–684; b) J. Wolf, P. G. Richardson, M. Schuster, A. LeBlanc, I. B. Walters, D. S. Battleman, *Clin. Adv. Hematol. Oncol.* **2008**, *6*, 755–760; c) R. C. Kane, P. F. Bross, A. T. Farrell, R. Pazdur, *Oncologist* **2003**, *8*, 508–513; d) R. C. Kane, R. Dagher, A. Farrell, C. W. Ko, R. Sridhara, R. Justice, R. Pazdur, *Clin. Cancer Res.* **2007**, *13*, 5291–5294; e) R. C. Kane, A. T. Farrell, R. Sridhara, R. Pazdur, *Clin. Cancer Res.* **2006**, *12*, 2955–2960.
- [46] a) T. Li, L. Ho, B. Piperdi, T. Elrafei, F. J. Camacho, J. R. Rigas, R. Perez-Soler, R. Guclup, *Lung Cancer* **2010**, *68*, 89–93; b) A. M. Davies, C. Ho, A. S. Metzger, L. A. Beckett, S. Christensen, M. Tanaka, P. N. Lara, D. H. Lau, D. R. Gandara, *J. Thorac. Oncol.* **2007**, *2*, 1112–1116; c) J. Voortman, E. F. Smit, R. Honeywell, B. C. Kuennen, G. J. Peters, H. van de Velde, G. Giaccone, *Clin. Cancer Res.* **2007**, *13*, 3642–3651.
- [47] R. Raghavan, A. Jeroudi, K. Achkar, A. O. Gaber, S. J. Patel, A. Abdellatif, *J. Transplant.* **2010**, *2010*, 698594.
- [48] G. Jackson, H. Einsele, P. Moreau, J. S. Miguel, *Cancer Treat. Rev.* **2005**, *31*, 591–602.
- [49] a) R. Z. Orlowski, T. E. Stinchcombe, B. S. Mitchell, T. C. Shea, A. S. Baldwin, S. Stahl, J. Adams, D. L. Esseltine, P. J. Elliott, C. S. Pien, R. Guerciolini, J. K. Anderson, N. D. Depcik-Smith, R. Bhagat, M. J. Lehman, S. C. Novick, O. A. O’Connor, S. L. Soignet, *J. Clin. Oncol.* **2002**, *20*, 4420–4427; b) P. G. Richardson, T. Hideshima, K. C. Anderson, *Cancer Control* **2003**, *10*, 361–369; c) P. G. Richardson, C. Mitsiadis, *Future Oncol.* **2005**, *1*, 161–171; d) A. M. Ruschak, M. Slassi, L. E. Kay, A. D. Schimmer, *J. Natl. Cancer Inst.* **2011**, *103*, 1007–1017; e) R.

- Oerlemans, N. E. Franke, Y. G. Assaraf, J. Cloos, I. van Zantwijk, C. R. Berkers, G. L. Scheffer, K. Debipersad, K. Vojtekova, C. Lemos, J. W. van der Heijden, B. Ylstra, G. J. Peters, G. L. Kaspers, B. A. Dijkmans, R. J. Schepen, G. Jansen, *Blood* **2008**, *112*, 2489–2499.
- [50] a) G. Cavaletti, A. J. Jakubowiak, *Leuk. Lymphoma* **2010**, *51*, 1178–1187; b) J. Adams, M. Behnke, S. Chen, A. A. Cruickshank, L. R. Dick, L. Grenier, J. M. Klunder, Y. T. Ma, L. Plamondon, R. L. Stein, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1998**, *8*, 333–338; c) S. Arastu-Kapur, J. L. Anderl, M. Kraus, F. Parlati, K. D. Shenk, S. J. Lee, T. Muchamuel, M. K. Bennett, C. Driessen, A. J. Ball, C. J. Kirk, *Clin. Cancer Res.* **2011**, *17*, 2734–2743; d) P. G. Richardson, *Lancet Oncol.* **2010**, *11*, 1014–1016; e) P. G. Richardson, P. Sonneveld, M. W. Schuster, E. A. Stadtmauer, T. Facon, J. L. Harousseau, D. Ben-Yehuda, S. Lonial, H. Goldschmidt, D. Reece, J. Blade, M. Boccadoro, J. D. Cavenagh, A. L. Boral, D. L. Esseltine, P. Y. Wen, A. A. Amato, K. C. Anderson, J. San Miguel, *Br. J. Haematol.* **2009**, *144*, 895–903.
- [51] a) G. Cavaletti, A. Gilardini, A. Canta, L. Rigamonti, V. Rodriguez-Menendez, C. Ceresa, P. Marmiroli, M. Bossi, N. Oggioni, M. D'Incallei, R. De Coster, *Exp. Neurol.* **2007**, *204*, 317–325; b) P. F. Bross, R. Kane, A. T. Farrell, S. Abraham, K. Benson, M. E. Brower, S. Bradley, J. V. Gobburu, A. Goheer, S. L. Lee, J. Leighton, C. Y. Liang, R. T. Lostritto, W. D. McGuinn, D. E. Morse, A. Rahman, L. A. Rosario, S. L. Verbois, G. Williams, Y. C. Wang, R. Pazdur, *Clin. Cancer Res.* **2004**, *10*, 3954–3964; c) D. J. Kuhn, R. Z. Orlowski, C. C. Bjorklund, *Curr. Cancer Drug Targets* **2011**, *11*, 285–295.
- [52] S. Kumar, S. V. Rajkumar, *Blood* **2008**, *112*, 2177–2178.
- [53] a) D. Chauhan, G. Li, R. Shringarpure, K. Podar, Y. Ohtake, T. Hideshima, K. C. Anderson, *Cancer Res.* **2003**, *63*, 6174–6177; b) K. C. Anderson, *J. Clin. Oncol.* **2012**, *30*, 445–452.
- [54] a) S. Lü, J. Yang, Z. Chen, S. Gong, H. Zhou, X. Xu, J. Wang, *Exp. Hematol.* **2009**, *37*, 831–837; b) M. Ri, S. Iida, T. Nakashima, H. Miyazaki, F. Mori, A. Ito, A. Inagaki, S. Kusumoto, T. Ishida, H. Komatsu, Y. Shiotsu, R. Ueda, *Leukemia* **2010**, *24*, 1506–1512; c) N. E. Franke, D. Niewerth, Y. G. Assaraf, J. van Meerloo, K. Vojtekova, C. H. van Zantwijk, S. Zweegman, E. T. Chan, C. J. Kirk, D. P. Geerke, A. D. Schimmer, G. J. Kaspers, G. Jansen, J. Cloos, *Leukemia* **2012**, *26*, 757–768.
- [55] S. E. Verbrugge, Y. G. Assaraf, B. A. Dijkmans, G. L. Scheffer, M. Al, D. den Uyl, R. Oerlemans, E. T. Chan, C. J. Kirk, G. J. Peters, J. W. van der Heijden, T. D. de Gruyl, R. J. Schepen, G. Jansen, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2012**, *341*, 174–182.
- [56] a) R. C. Sharma, S. Inoue, J. Roitelman, R. T. Schimke, R. D. Simoni, *J. Biol. Chem.* **1992**, *267*, 5731–5734; b) M. C. de Jong, J. W. Slootstra, G. L. Scheffer, A. B. Schroeijers, W. C. Puijk, R. Dinkelberg, M. Kool, H. J. Broxterman, R. H. Meloen, R. J. Schepen, *Cancer Res.* **2001**, *61*, 2552–2557; c) H. Minderman, Y. Zhou, K. L. O'Loughlin, M. R. Baer, *Cancer Chemother. Pharmacol.* **2007**, *60*, 245–255.
- [57] R. Piva, B. Ruggeri, M. Williams, G. Costa, I. Tamagno, D. Ferrero, V. Giai, M. Coscia, S. Peola, M. Massaia, G. Pezzoni, C. Allievi, N. Pescallini, M. Cassin, S. di Giovine, P. Nicoli, P. de Feudis, I. Strepponi, I. Roato, R. Ferracini, B. Bussolati, G. Camussi, S. Jones-Bolin, K. Hunter, H. Zhao, A. Neri, A. Palumbo, C. Berkers, H. Ovaa, A. Bernareggi, G. Inghirami, *Blood* **2008**, *111*, 2765–2775.
- [58] E. Kupperman, E. C. Lee, Y. Cao, B. Bannerman, M. Fitzgerald, A. Berger, J. Yu, Y. Yang, P. Hales, F. Buzzese, J. Liu, J. Blank, K. Garcia, C. Tsu, L. Dick, P. Fleming, L. Yu, M. Manfredi, M. Rolfe, J. Bolen, *Cancer Res.* **2010**, *70*, 1970–1980.
- [59] a) T. Hideshima, C. Mitsiades, M. Akiyama, T. Hayashi, D. Chauhan, P. Richardson, R. Schlossman, K. Podar, N. C. Munshi, N. Mitsiades, K. C. Anderson, *Blood* **2003**, *101*, 1530–1534; b) T. Takeshita, W. Wu, A. Koike, M. Fukuda, T. Ohta, *Cancer Chemother. Pharmacol.* **2009**, *64*, 1039–1046.
- [60] a) L. Meng, R. Mohan, B. H. Kwok, M. Elofsson, N. Sin, C. M. Crews, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1999**, *96*, 10403–10408; b) M. Hanada, K. Sugawara, K. Kaneta, S. Toda, Y. Nishiyama, K. Tomita, H. Yamamoto, M. Konishi, T. Oki, *J. Antibiot.* **1992**, *45*, 1746–1752.
- [61] E. Suzuki, S. Demo, E. Deu, J. Keats, S. Arastu-Kapur, P. L. Bergsagel, M. K. Bennett, C. J. Kirk, *PLoS One* **2011**, *6*, e27996.
- [62] D. Gutman, A. A. Morales, L. H. Boise, *Leukemia* **2009**, *23*, 2181–2183.
- [63] a) H. J. Zhou, M. A. Aujay, M. K. Bennett, M. Dajee, S. D. Demo, Y. Fang, M. N. Ho, J. Jiang, C. J. Kirk, G. J. Laidig, E. R. Lewis, Y. Lu, T. Muchamuel, F. Parlati, E. Ring, K. D. Shenk, J. Shields, P. J. Shwonek, T. Stanton, C. M. Sun, C. Sylvain, T. M. Woo, J. Yang, *J. Med. Chem.* **2009**, *52*, 3028–3038; b) D. Chauhan, A. V. Singh, M. Aujay, C. J. Kirk, M. Bandi, B. Ciccarelli, N. Rajee, P. Richardson, K. C. Anderson, *Blood* **2010**, *116*, 4906–4915.
- [64] S. D. Demo, C. J. Kirk, M. A. Aujay, T. J. Buchholz, M. Dajee, M. N. Ho, J. Jiang, G. J. Laidig, E. R. Lewis, F. Parlati, K. D. Shenk, M. S. Smyth, C. M. Sun, M. K. Vallone, T. M. Woo, C. J. Molineaux, M. K. Bennett, *Cancer Res.* **2007**, *67*, 6383–6391.
- [65] a) M. Millward, T. Price, A. Townsend, C. Sweeney, A. Spencer, S. Sukumaran, A. Longenecker, L. Lee, A. Lay, G. Sharma, R. M. Gemmill, H. A. Drabkin, G. K. Lloyd, S. T. Neuteboom, D. J. McConkey, M. A. Palladino, M. A. Spear, *Invest. New Drugs* **2011**, DOI: 10.1007/S10637-011-9766-6; b) D. Chauhan, L. Catley, G. Li, K. Podar, T. Hideshima, M. Velankar, C. Mitsiades, N. Mitsiades, H. Yasui, A. Letai, H. Ovaa, C. Berkers, B. Nicholson, T. H. Chao, S. T. Neuteboom, P. Richardson, M. A. Palladino, K. C. Anderson, *Cancer Cell* **2005**, *8*, 407–419.
- [66] C. P. Miller, K. Ban, M. E. Dujka, D. J. McConkey, M. Munsell, M. Palladino, J. Chandra, *Blood* **2007**, *110*, 267–277.
- [67] a) S. M. Molineaux, *Clin. Cancer Res.* **2012**, *18*, 15–20; b) M. J. Williamson, J. L. Blank, F. J. Buzzese, Y. Cao, J. S. Daniels, L. R. Dick, J. Labutti, A. M. Mazzola, A. D. Patil, C. L. Reimer, M. S. Solomon, M. Stirling, Y. Tian, C. A. Tsu, G. S. Weatherhead, J. X. Zhang, M. Rolfe, *Mol. Cancer Ther.* **2006**, *5*, 3052–3061.
- [68] a) E. J. Corey, W. D. Li, *Chem. Pharm. Bull.* **1999**, *47*, 1–10; b) M. Nett, T. A. Gulder, A. J. Kale, C. C. Hughes, B. S. Moore, *J. Med. Chem.* **2009**, *52*, 6163–6167.
- [69] K. B. Kim, J. Myung, N. Sin, C. M. Crews, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1999**, *9*, 3335–3340.
- [70] B. Lei, M. D. Abdul Hameed, A. Hamza, M. Wehenkel, J. L. Muzyka, X. J. Yao, K. B. Kim, C. G. Zhan, *J. Phys. Chem. B* **2010**, *114*, 12333–12339.
- [71] G. Lin, C. Tsu, L. Dick, X. K. Zhou, C. Nathan, *J. Biol. Chem.* **2008**, *283*, 34423–34431.
- [72] a) M. Groll, Y. Koguchi, R. Huber, J. Kohno, *J. Mol. Biol.* **2001**, *311*, 543–548; b) Y. Koguchi, J. Kohno, M. Nishio, K. Takahashi, T. Okuda, T. Ohnuki, S. Komatsubara, *J. Antibiot.* **2000**, *53*, 105–109.
- [73] 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*, 1701–1705.
- [74] N. Gallastegui, P. Beck, M. Arciniega, R. Huber, S. Hillebrand, M. Groll, *Angew. Chem.* **2012**, *124*, 251–254; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 247–249.