

Molekulare Allianz – von orthosterischen und allosterischen Liganden zu dualsterischen/bitopischen Agonisten G-Protein-gekoppelter Rezeptoren

Klaus Mohr, Jens Schmitz, Ramona Schrage, Christian Tränkle und Ulrike Holzgrabe*

Agonisten · Allosterie · Antagonisten · Dualsterie · Rezeptoren

Die Zellmembran-ständigen G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (GPCRs) gehören zu den wichtigsten therapeutischen Zielstrukturen. Körpereigene Botenstoffe binden von außen an die „orthosterische“ Haftstelle in der Tiefe der Bindungstasche oder am extrazellulären N-terminalen Ende des Rezeptorproteins. Körperfremde Modulatoren, die ein anderes „allosterisches“ Haftareal nutzen, ebnen den Weg zu Rezeptorsubtypselektivität. Allerdings ist Rezeptoraktivierung über den orthosterischen Ort häufig besser möglich. Jetzt zeigt sich, dass orthosterisch/allosterische Hybridmoleküle Subtypselektivität und Rezeptoraktivierung vereinen können. Die „bitopischen“/„dualsterischen“ Modulatoren vermögen außerdem, den Rezeptor auf eine selektive Anschaltung intrazellulärer Signalwege auszurichten. Dieses Konzept bietet den Zugang zu GPCR-Modulatoren mit neuartigem Rezeptorsubtyp- und Signalwegs-Selektivitätsprofil und somit zu nebenwirkungsärmeren Wirkstoffen.

1. Einleitung

„The structure of the M₂ receptor provides insights into both orthosteric and allosteric regulation of muscarinic receptors. The development of more selective drugs for muscarinic receptors will probably require exploitation of the more diverse allosteric surface, either as exclusively allosteric ligands or as ligands that occupy both orthosteric and allosteric sites.“

Haga et al.^[1]

Paul Ehrlich (1854–1915) und John N. Langley (1854–1936) haben das Konzept der Rezeptoren und der über diese

wirkenden Arzneistoffe (Chemotherapeutika, Paul Ehrlichs „Zauberkügeln“) begründet. In den folgenden Jahrzehnten wurden die Begriffe Agonisten, welche die Rezeptoren vollständig aktivieren, und partielle Agonisten, welche die Rezeptoren nur teilweise aktivieren können, geprägt. Antagonisten binden an den Rezeptor, haben selbst keine Wirkung und verhindern die Aktivierung durch Agonisten. Inverse Agonisten heben eine spontane, konstitutive Aktivität eines Rezeptors auf. Obgleich man die Ligand-Rezeptor-Interaktionen pharmakologisch durch Radioligandbindungsmeßungen und viele andere Versuchsansätze gut charakterisieren kann, sind bis heute molekülmechanisch bei weitem noch nicht alle Details zum Zusammenhang von Struktur und Funktion aufgeklärt. Sicher ist jedoch, dass die Annahme, körperfremde Arzneistoffe zur Modulation der Rezeptorfunktion bändern an die „orthosterische“ Haftstelle des körpereigenen Botenstoffes, nicht grundsätzlich gilt.

In den letzten 100 Jahren hat man eine Vielzahl von Rezeptoren kennen gelernt; die größte Gruppe bilden die so genannten G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (GPCRs; G: Guanylnukleotid-bindend), die in der Zellmembran verankert sind und nach Agonistbindung durch Konformationsänderung das extrazelluläre Signal in das Zellinnere kommunizieren. Dabei nutzen sie die heterotrimeren G-Proteine, die unter Verbrauch von Guanosintriphosphat Effektorproteine, z.B. Adenylylcyclase und Phospholipase C, steuern.

[*] Dr. J. Schmitz, Prof. Dr. U. Holzgrabe

Institut für Pharmazie und Lebensmittelchemie
Universität Würzburg
Am Hubland, 97074 Würzburg (Deutschland)
E-Mail: u.holzgrabe@pharmazie.uni-wuerzburg.de
Homepage: <http://www.pharmazie.uni-wuerzburg.de/LehrstuhlPC.html>

Prof. Dr. K. Mohr, R. Schrage, Priv.-Doz. C. Tränkle
Pharmakologie und Toxikologie, Institut für Pharmazie
Universität Bonn
Gerhard-Domagk-Straße 3, 53121 Bonn (Deutschland)

Alternativ gibt es den Arrestinsignalweg oder auch die direkte Aktivierung von Kinasen.^[2]

Die GPCRs sind für die Therapie von Krankheiten von überragender Bedeutung, wie die Tatsache zeigt, dass 30–50% der vermarkteten Arzneistoffe an GPCRs binden und die Signaltransduktion beeinflussen. Derzeit kennt man ca. 1000 GPCRs, die in verschiedene Familien eingeteilt werden. Dieser Kurzaufsatzz konzentriert sich auf die größte Gruppe, die Familie A mit etwa 700 Rezeptoren, darunter die so wichtigen aminergen und cholinergen Rezeptoren.

2. GPCR-Struktur

Die GPCRs sind eine große Familien von Proteinen aus sieben transmembranären Helices, die über drei extrazelluläre (EL-) und drei intrazelluläre (IL-)Schleifen („Loops“)



Ulrike Holzgrabe studierte Chemie und Pharmazie an den Universitäten Marburg und Kiel; die Promotion (bei Rolf Haller) und Habilitation erfolgte in Kiel. Von 1990 bis 1999 war sie C3-Professorin an der Universität Bonn, wo sie von 1997 bis 1999 Prorektorin war. Seit 1999 hat sie den Lehrstuhl für Pharmazeutische und Medizinische Chemie an der Universität Würzburg inne. Von 2003 bis 2007 war sie Präsidentin der Deutschen Pharmazeutischen Gesellschaft. Ihr Forschungsschwerpunkt ist die Entwicklung neuartiger Liganden muscarinischer Rezeptoren und neuer Antivirale.



Klaus Mohr studierte von 1972 bis 1978 Humanmedizin an der Universität Kiel, wo auch die Promotion und Habilitation (bei Heinz Lüllmann) erfolgten. Seit 1992 leitet er die Abteilung „Pharmakologie und Toxikologie“ im Fachbereich Pharmazie der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität Bonn. Von 2001 bis 2010 war er Sprecher des Graduiertenkollegs 677 „Struktur und molekulare Interaktion als Basis der Arzneimittelwirkung“, von 2004 bis 2007 Generalsekretär der Deutschen Pharmazeutischen Gesellschaft und von 2003 bis 2012 Studiendekan der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät in Bonn.



Jens Schmitz studierte von 1999 bis 2003 Pharmazie an der Universität Würzburg. Die Approbation als Apotheker erfolgte 2005, die Promotion in pharmazeutischer Chemie 2008 unter Anleitung von Ulrike Holzgrabe. Von 2008 bis 2012 war er Postdoktorand bei Ulrike Holzgrabe, und seit 2012 ist er Akademischer Rat am Institut für Pharmazie in Würzburg.

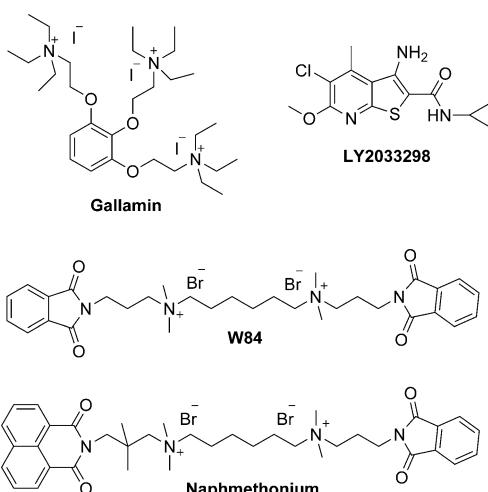
miteinander verbunden sind. Vergraben in der helicalen Domäne liegt die Bindungsstelle für den endogenen Liganden und für die an der gleichen Stelle bindenden Agonisten und Antagonisten der Klasse-A-Familie.^[3] Die inzwischen zahlreichen Röntgenkristallstrukturen dieser GPCR-Familie (β_1 - und β_2 -adrenerge Rezeptoren,^[4] Adenosin A_{2A},^[5] Dopamin D₃,^[6] Histamin H₁,^[7] Muscarin M₂ und M₃^[1,8] sowie Opioidrezeptoren^[9]) zeigen allerdings auch, dass trotz der großen Ähnlichkeit der Gesamtstruktur und der orthostatischen Bindungsstelle Agonisten, inverse Agonisten und Antagonisten unterschiedliche Orientierungen in ihrer Bindungsstelle einnehmen und verschiedene Konformationsänderungen der Rezeptoren hervorrufen.^[10,11]

Interessant ist, dass diese Familie über einen zusätzlichen Bindungsort in Form einer langen EL2 von großer struktureller Diversität verfügt. Einige Rezeptoren (z.B. β_2 -, β_1 -, Rhodopsin-, A_{2A}- und M₂-Rezeptoren)^[12] bilden mit EL2 ein Vestibül, das von den orthostatischen Liganden passiert werden muss und dabei für einen sehr kurzen Moment von diesen auch besetzt wird.^[13] Dieser „Vorraum zur orthostatischen Bindungsstelle“, kann den so genannten allosterischen Liganden zur Bindung dienen. Als allosterische Liganden bezeichnet man solche Substanzen, die ihren Bindungsort am Rezeptorprotein außerhalb der orthostatischen Bindungsstelle haben. Sie können körperfremde, aber auch körpereigene (d.h. endogene) Liganden sowie eine Vielzahl von Ionen, wie Natrium-, Calcium-, Magnesium- oder Zinkionen, sein.^[14] Die strukturelle Diversität des extrazellulären Vestibüls bietet die Möglichkeit zu einer bevorzugten, „selektiven“ Besetzung nur eines Rezeptors oder Rezeptortypen.^[12,15] Das GluAspGlyGlu(EDGE)-Motiv im EL2 des M₂-Acetylcholinrezeptors spielt eine Rolle z.B. für die M₂/M₅-Selektivität von Gallamin^[13,16] wie auch für Naphmethonium,^[17] während LY2033298 (Schema 1) entsprechende Regionen des M₄-Acetylcholinrezeptors besetzt.^[18] Dabei darf natürlich nicht aus den Augen verloren werden, dass es im Prinzip bei



Ramona Schrage studierte von 2004 bis 2009 molekulare Biomedizin an der Universität Bonn. Seit 2010 promoviert sie bei Klaus Mohr in der Abteilung „Pharmakologie und Toxikologie“ im Fachbereich Pharmazie der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität Bonn als Promotionsstipendiatin der Studienstiftung des Deutschen Volkes.

Christian Tränkle studierte Pharmazie (1989 Approbation zum Apotheker) und promovierte 1992 an der Universität Kiel bei Klaus Mohr; danach war er Postdoktorand bei Klaus Mohr in der Pharmakologie und Toxikologie am Pharmazeutischen Institut der Universität Bonn und 1998/1999 am National Institute for Medical Research (London) bei N. J. M. Birdsell. 2001 erfolgte die Habilitation für das Fach Pharmakologie und Toxikologie in Bonn. Sein Hauptforschungsinteresse sind Ligand-Rezeptor-Interaktionen in G-Protein-gekoppelten Rezeptoren und in Enzymen, mit einem Fokus auf allosterischen Mechanismen.



Schema 1. Muscarinische allosterische Liganden, deren Bindungsstelle insbesondere am Extrazellulären Loop 2 (EL2) ihre M_2 - und M_4 -Acetylcholinrezeptorselektivität erklärt.

keinem Rezeptor eine definierte allosterische Bindungsstelle gibt, denn der Terminus besagt ja nur, dass es sich dabei um eine andere als die orthosterische Bindungsstelle handelt. Dementsprechend kann ein Rezeptorprotein mehrere, gegebenenfalls überlappende, allosterische Bindungsareale aufweisen; darüber hinaus wird die Rezeptorbindungsstelle für das G-Protein ebenfalls als allosterische Bindungsstelle betrachtet.

3. Ligandkategorien

Rezeptorliganden lassen sich nach ihrem Einfluss auf die Rezeptorfunktion und ihrem Bindungsort – orthosterisch und allosterisch – kategorisieren. Der Funktionszustand des Rezeptorproteins kann grundsätzlich von beiden Bindungsregionen aus moduliert werden. Wie bereits erwähnt, besetzen endogene Liganden sowie konventionelle Agonisten, Antagonisten und inverse Agonisten typischerweise die orthosterische Bindungsstelle. Diese ist in der GPCR-Familie A hoch konserviert (die Sequenzidentität der transmembranären Region wird auf 20–50% geschätzt)^[19] und noch deutlich konservierter von Subtyp zu Subtyp eines Rezeptors. Dies macht die Entwicklung von selektiven orthosterischen Agonisten und Antagonisten sehr schwierig.

Proteine, wie Rezeptoren, Ionenkanäle und Enzyme, können – wie in Abschnitt 2 erwähnt – allerdings zusätzlich über eine allosterische Bindungsstelle verfügen,^[20,21] deren physiologische Funktion häufig ungeklärt ist.^[22] Im Falle des Vestibüls von Klasse-A-GPCRs wird eine Rolle für das Abstreifen von Wassermolekülen vom Transmittermolekül vor Eintritt in die orthosterische Bindungskavität^[13] sowie eine Kontrolle konformativer Umlagerungen, die zu Rezeptoraktivierung und G-Protein-Interaktionen führen, postuliert.^[23]

Die Mitte des letzten Jahrhunderts entdeckten, sedativ wirkenden Benzodiazepine sind die ersten bekannten therapeutisch eingesetzten allosterischen Rezeptormodulatoren; sie potenzieren den Effekt der γ -Aminobuttersäure (GABA),

des endogenen Liganden des $GABA_A$ -Rezeptors (eines Ligand-gesteuerten Ionenkanals aus fünf Untereinheiten), indem sie die Bindungsneigung von GABA erhöhen.^[24] Gleichermaßen ist im Prinzip an GPCRs möglich.^[20,21]

4. Allosterisch-orthosterische Interaktionen

Das arzneitherapeutisch interessante Charakteristikum allosterisch/orthosterischer Rezeptorinteraktionen besteht in der Möglichkeit der Bildung ternärer Komplexe (Abbildung 1). Dabei ist die gegenseitige Beeinflussung eines allosterisch/orthosterischen Ligandenpaares an einem gegebenen Rezeptorprotein wechselseitig und gleichgerichtet: Man spricht von Kooperativität. Wichtig ist weiterhin, dass kooperative Interaktionen „sättigbar“ sind, dass also die wechselseitige Beeinflussung ein Maximum aufweist, dessen Lage an einem gegebenen Rezeptor von der Art der Partner abhängt (Abbildung 1 a).

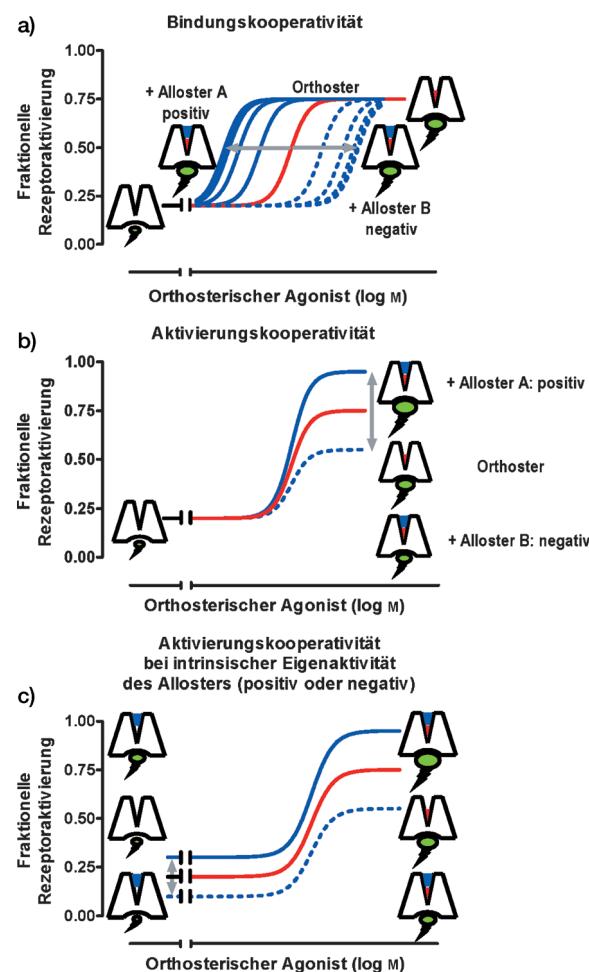


Abbildung 1. Einfluss ternärer Komplexe (bestehend aus Rezeptor mit etwas Spontanaktivität, allosterischem Modulator und orthosterischem Partialagonisten) und von Kooperativität innerhalb solcher Komplexe auf a) die Bindungsaffinität und b) die Rezeptoraktivierung durch den orthosterischen Agonisten. c) Allosterische Liganden mit eigener (d.h. in Abwesenheit eines orthosterischen Agonisten auftretender) agonistischer Aktivität oder invers agonistischer Aktivität.

Alloster und Orthoster können ihre Bindung demnach gegenseitig fördern, hemmen oder neutral zueinander sein, was positiver, negativer oder neutraler Kooperativität der Rezeptorbindung entspricht (Abbildung 1a). Darüber hinaus besteht die Möglichkeit einer positiven, negativen oder neutralen Kooperativität bezüglich der Rezeptoraktivierung (Abbildung 1b).

Zu betonen ist, dass Richtung und Ausmaß der Kooperativität an einem gegebenen GPCR individuell für jedes Paar aus orthosterischem und allosterischem Liganden verschieden sein können. So kann ein allosterischer inverser Agonist (per se keine Rezeptoraktivierung) die Bindung eines orthosterischen inversen Agonisten (per se keine Rezeptoraktivierung) fördern, hingegen die Bindung eines orthosterischen Agonisten (per se Rezeptoraktivierung) hemmen oder dessen intrinsische Aktivität zur Rezeptoraktivierung abschalten, so z.B. gezeigt am M₂-Rezeptor für die Akteure Naphmethonium (allosterisch) versus Acetylcholin oder Pilocarpin (beide orthosterisch).^[17] Diese Beobachtungen, die auch an anderen Rezeptoren gemacht worden sind, verwundern nicht, denn ein Rezeptor, der einen Alloster oder Orthoster gebunden hat, kann als neuer Rezeptor betrachtet werden, da sich seine Struktur und damit möglicherweise auch die Signalweiterleitung verändert hat.

Diese „Partnerabhängigkeit“ der Wirkung eines allosterischen Liganden an einem gegebenen Rezeptorprotein ist zu bedenken, wenn allosterische Modulatoren als negative allosterische Modulatoren (NAMs), positive allosterische Modulatoren (PAMs) oder „silent“ (stille) allosterische Modulatoren (SAMs) klassifiziert werden. In diesen Fällen ist immer darauf zu achten, welcher orthosterische Partner gemeint ist.

Im vorliegenden Fall ist wichtig, dass allosterische Liganden wesentlich selektiver an die gewünschten Rezeptor subtypen binden als ihre orthosterischen Gegenstücke, da das allosterische Bindungsareal – wie bereits in Abschnitt 2 erörtert – zumeist in der Nähe oder an den extrazellulären „Loops“ lokalisiert und strukturell wenig konserviert ist.^[25] Dies wird später am Beispiel muscarinischer Agonisten, Modulatoren und bitopischer Agonisten noch im Detail erläutert werden (siehe Abschnitt 5.1).

4.1. Negative allosterische Modulation

Liganden, die die allosterische Bindungsstelle besetzen und die Rezeptorfunktion hemmen (NAMs), verschieben die Konzentrations-Wirkungs-Kurve z.B. des endogenen Agonisten nach rechts (negative Bindungskooperativität; Abbildung 1a) und können gegebenenfalls auch die Effektivität des Agonisten senken (negative Aktivierungskooperativität; Abbildung 1b). Beide Effekte sind begrenzt (d.h. sättigbar) und erreichen ihr Maximum, wenn die NAMs die Bindungsstelle vollständig besetzt haben. Dies unterscheidet sie von klassischen kompetitiven Antagonisten, die eine theoretisch unbegrenzte, wesentlich größere Rechtsverschiebung der Agonisten-Dosis-Wirkungskurve hervorrufen können, weil ihr antagonistischer Effekt nicht sättigbar ist.

Man vermutet, dass NAMs entweder die Energiebarriere für die Aktivierung des Rezeptors erhöhen oder die inaktive Konformation des Rezeptors stabilisieren, sodass die Affinität der orthosterischen Liganden zum Rezeptor herabgesetzt ist.^[26]

4.2. Positive allosterische Modulation

Liganden, die die allosterische Bindungsstelle besetzen und die Gleichgewichtsbindung des gleichzeitig gebundenen endogenen oder exogenen orthosterischen Liganden steigern (PAMs; Abbildung 1a), erhöhen entweder die Affinität eines orthosterischen Agonisten oder verringern die Aktivierungsbarriere für das Umschalten von der inaktiven zur aktiven Konformation des Rezeptors.^[26] Wiederum ist das Ausmaß der Wirksamkeitssteigerung limitiert und erreicht sein Maximum, wenn alle allosterischen Bindungsstellen besetzt sind. Wie Abbildung 2 zeigt, könnte damit eine unge-

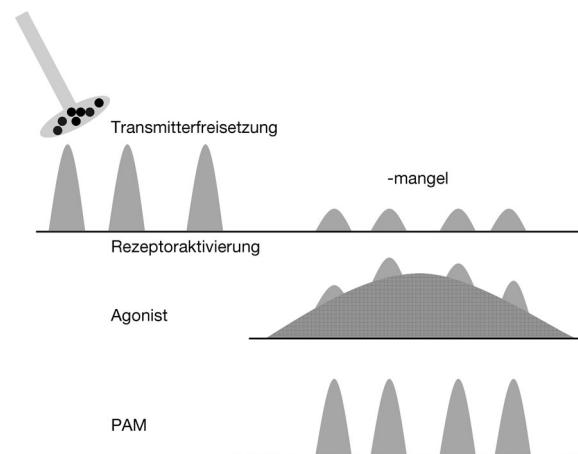


Abbildung 2. Ansätze zur Kompensation neurodegenerativ verminderter Transmitterfreisetzung. Oben: Pulsatile Transmitterfreisetzung unter normalen Bedingungen (links) und krankhaft verminderter Freisetzung (rechts). Mitte: therapeutische Gabe eines orthosterischen Agonisten – Addition der Effekte von Agonist und Transmitter. Unten: therapeutische Gabe eines allosterischen Verstärkers – Erhaltung des physiologischen Erregungsmusters.

nügende Rezeptoraktivierung wieder auf das Normalmaß, d.h. die maximale Wirksamkeit, zurückgeführt werden. PAMs können also ihre Wirkung nur in Gegenwart des endogenen Liganden (oder eines Orthosters) entfalten und bieten damit ein großes Sicherheitspotenzial in Bezug auf Off-Target-Effekte, haben aber den Nachteil, dass in Abwesenheit des Neurotransmitters (z.B. bei fortgeschrittenen neurodegenerativen Erkrankungen wie Mb. Alzheimer) eine Wirkung ausbleibt.

4.3. Stille allosterische Modulation – allosterische Antagonisten

So genannte „silent allosteric modulators“ (SAMs) binden an die allosterische Bindungsstelle, bewirken aber keinerlei Modulation einer Aktivität eines orthosterischen

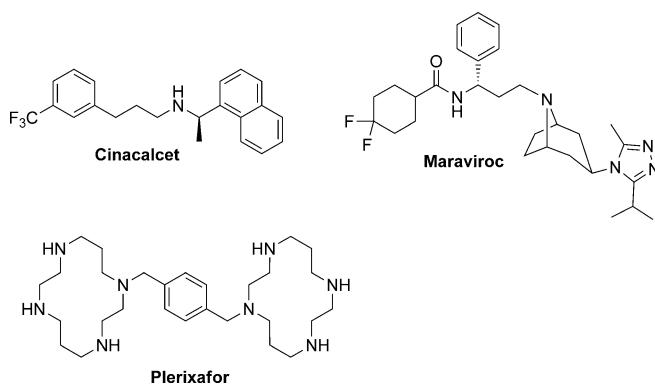
Agonisten (neutrale Kooperativität der Bindung und Aktivierung). Da sie an die gleiche Bindungsstelle wie die PAMs, NAMs und allosterischen Agonisten (siehe Abschnitt 4.4) binden und damit Konkurrenten um diese Bindungsstelle sind, was in eine Rechtsverschiebung der Konzentrations-Wirkungs-Kurve dieser allosterischen Modulatoren mündet, könnte man sie auch als allosterische Antagonisten bezeichnen. Aus dem Gesagten ergibt sich, dass es für SAMs keine therapeutische Anwendung gibt, allerdings sind sie interessante pharmakologische Experimentalwerkzeuge.^[26]

4.4. Allosterische Agonisten

Eine Reihe von allosterischen Liganden, die ausschließlich an der allosterischen Bindungsstelle binden, vermittelt eine agonistische Aktivität in Abwesenheit des endogenen Liganden oder anderer orthosterischer Agonisten (Abbildung 1c). Diese Verbindungen bezeichnet man als allosterische Agonisten (oder „ago-allosterische Modulatoren“).^[27] Für mehrere PAMs wurde berichtet, dass sie gleichzeitig auch allosterische Agonisten sind, allerdings tritt die agonistische Aktivität erst bei höheren Konzentrationen zutage als die PAM-Aktivität. Es ist davon auszugehen, dass die Zahl der PAMs mit gleichzeitig allosterischen und agonistischen Eigenschaften höher ist als bisher publiziert, da sie in den dazu notwendigen Konzentrationen wegen fehlender Relevanz nicht untersucht wurden.

4.5. Erste allosterische Modulatoren in der Klinik

Maraviroc (Celsentry; Schema 2) ist ein hochaffiner negativer allosterischer Modulator des HIV-gp120-Proteins am CCR5-Rezeptor (CC-Motiv-Chemokin-Rezeptor 5). Es verhindert das „Andocken“ des HI-Virus und somit seine Aufnahme in die humanen Wirtszellen. Die Interaktion der endogenen Liganden MIP-1 β sowie RANTES („regulated and normal T cell expressed and secreted“; auch Chemokin-Ligand 5 = CCL5 genannt) mit CCR5 wird ebenso allosterisch gehemmt. Die Wirkung ist auf HI-Viren beschränkt. Erwähnt sei auch das kürzlich zugelassene Plerixafor (Mozobil; Schema 2), das ein allosterischer Antagonist am Chemokinrezeptor 5 (CCR5) ist.



Schema 2. Strukturen der drei allosterischen Modulatoren, die seit einigen Jahren auf dem Markt sind.

tor CXCR4 ist und zur Freisetzung von Stammzellen in die Blutbahn bei autologen Stammzelltransplantationen eingesetzt wird.^[28]

Cinacalcet (Mimpara; Schema 2) ist ein PAM von Ca^{2+} -Ionen am Calcium-sensitiven Rezeptor (CaSR). Die mit der Bindung an die allosterische Bindungsstelle einhergehende Konformationsänderung führt zu einer Erhöhung der Empfindlichkeit des Rezeptors für extrazelluläre Calciumionen und damit zu einer verminderteren Freisetzung des Knochenstoffwechselhormons Parathormon. Cinacalcet wird zur Therapie des sekundären Hyperparathyreoidismus, einer Nebenschilddrüsenerkrankung, eingesetzt.^[29]

Aufgrund dieser klinischen Erfolge verwundert es nicht, dass das Konzept der allosterischen Modulation Eingang in die akademische und industrielle Wirkstoffsuche gefunden hat, so z.B. bei der Suche nach besseren Arzneistoffen zur Therapie von Mb. Alzheimer oder Schizophrenie.^[30]

5. Bitopische/dualsterische Liganden

Vor wenigen Jahren wurden dem Wirkstoffrepertoire Liganden hinzugefügt, die so entworfen waren, dass sie gleichzeitig an die orthosterischen und allosterischen GPCR-Bindungsareale binden. Das Konzept leitet sich von dem „Message-Address“ („Botschaft-Adresse“)-Konzept von Schwizer ab, das bereits in den 1970er Jahren publiziert wurde.^[31] Prinzipiell bestehen die Moleküle aus zwei Teilen: Der „Botschaft“-Anteil ist z.B. für die Aktivierung des Rezeptors zuständig, während die „Adresse“ den Liganden zum Rezeptor oder einem Subtyp eines Rezeptors lenkt. Beide Teile sind durch ein Verbindungsstück („Linker“) miteinander verbunden. Besetzt die Botschaft das hoch konservierte orthosterische Areal und die Adresse die wenig konservierte allosterische Bindungsstelle, spricht man von dualsterischen Liganden. Wie wir in Abschnitt 5.2 sehen werden, ist dies aber eine stark vereinfachte Sichtweise, da Selektivität, Rezeptoraktivierung und Signalweiterleitung nicht voneinander zu trennen sind.

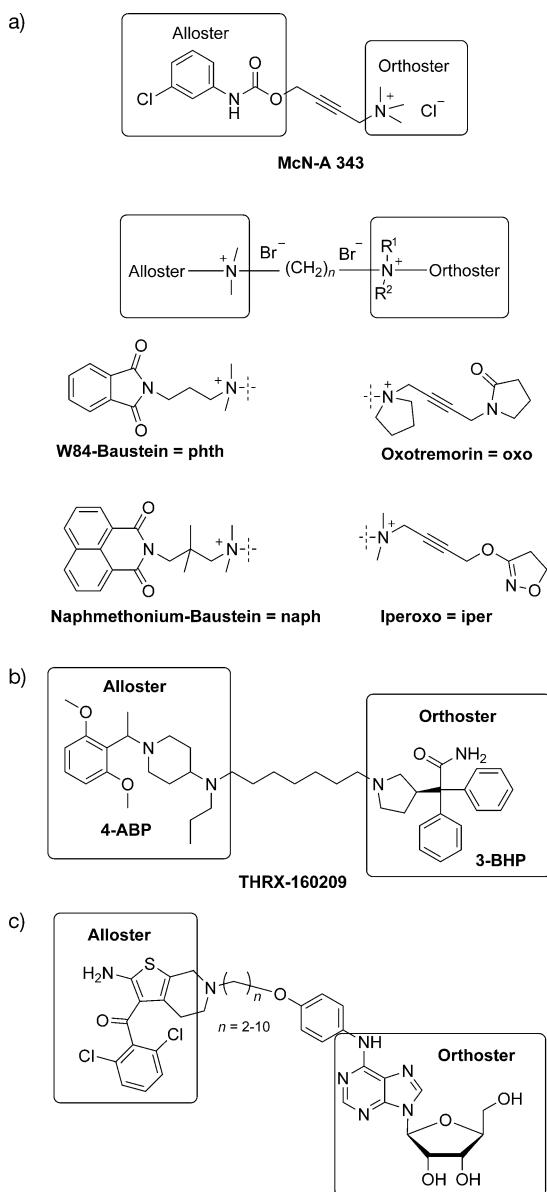
Die dualsterischen Liganden sind eine Untergruppe der bitopischen Liganden; letzteren binden definitionsgemäß zwar an zwei Stellen am Rezeptor, nutzen aber nicht notwendigerweise die allosterische und orthosterische Bindungsstelle. Davon zu unterscheiden sind die von Portoghesi synthetisierten bivalenten Liganden,^[32] die an gleiche oder unterschiedliche Bindungsstellen (auch Rezeptoren) binden und zwei pharmakophore Strukturen – homobivalent oder heterobivalent – enthalten,^[33] was nicht Gegenstand dieses Kurzaufsatzen ist.

5.1. Bitopische und dualsterische Agonisten

Ein allosterisch/orthosterischer GPCR-Agonismus wurde erstmals am muscarinischen M_2 -Acetylcholinrezeptor realisiert, und zwar einerseits durch molekulärmechanische Untersuchungen eines bekannten Agonisten^[34] und andererseits durch gezielte Neusynthese eines Liganden zur gleichzeitigen

Besetzung der allosterischen und orthosterischen Bindungsstelle.^[23,35]

Die Gruppe von Christopoulos konnte den lange bekannten partiellen Agonisten McN-A 343, der strukturell in die Gruppe der Oxotremorine gehört (Schema 3a), als bito-



Schema 3. Bitopische/dualsterische Liganden: a) M_2 -Agonisten McN-A 343, Iper-6-naph und Iper-6-phth (Orthoster-Linker-Alloster); b) M_2 -Antagonist THRX-160209; c) Adenosin-A₁-Agonisten.

pischen Liganden charakterisieren.^[34a] Dabei entspricht das Fragment des endogenen Liganden Acetylcholin – ein Tetramethylammoniumkation – dem Bindepartner für die orthosterische Bindungsstelle, und das 3-Chlorphenylcarbamat dem Partner für das allosterische EL2-Vestibül, beides verknüpft über einen starre Butinylkette. Jedoch scheint dieses Molekül zu klein, um durch Besetzung größerer Areale der allosterischen Bindungsstelle subtypselektiv nur an M_2 -Ae-

tylcholin-Subtyp zu docken, da es ähnliche Affinität zum M_4 -Rezeptor zeigt.^[36]

Iper-6-phth und Iper-6-naph wurden auf dem Reißbrett entworfen. Bausteine der allosterischen Hexamethoniumverbindungen W84 und Naphmethonium (Schema 1), NAMs orthosterischer Agonisten^[17] mit Präferenz für den M_2 -Acetylcholinrezeptor,^[37] wurden mit verschiedenen orthosterischen Agonistbausteinen, die vom Oxotremorin abgeleitet sind,^[38] verknüpft (Schema 3a). Die so erhaltenen dualsterischen Substanzen weisen alle eine relativ gute Subtypselektivität zum M_2 -Rezeptor auf, auch wenn ihre Wirksamkeit/Affinität kleiner ist als die der orthosterischen Bausteine. Diese konnte durch Linkeroptimierung gesteigert werden.^[23] Hybride, die Iperoxo als Orthoster enthielten, erwiesen sich als Agonisten, alle weiteren Hybride waren Antagonisten. Unerwarteterweise zeigte sich darüber hinaus eine Signalwegsselektivität. Der M_2 -Subtyp des muscarinischen Acetylcholinrezeptors aktiviert normalerweise zwei gegenläufige G-Protein-abhängige Signalwege. Bevorzugt wird der G_i -Weg (Inhibition der intrazellulären Bildung von cyclischem Adenosinmonophosphat (cAMP)), hinzu kommt bei höheren Agonistkonzentrationen der G_s -Weg (Stimulation der cAMP-Bildung). Iper-6-phth und Iper-6-naph vermögen im Unterschied zur orthosterischen Muttersubstanz Iperoxo nur noch den G_i -Weg zu aktivieren. Damit wird über die Rezeptor-subtypselektivität hinaus ein weiterer Selektivitätsmechanismus verfügbar, auf den im GPCR-Feld zurzeit große Hoffnungen gesetzt werden: Signalwegsselektivität, auch als „funktionelle Selektivität“ oder „biased signaling“ bezeichnet.

Steinfeld et al. haben für die Verbindung THRX-160209 (Schema 3b) einen orthosterischen 3-Benzylhydrylpyrrolinyl-Baustein über eine Heptankette mit einem allosterischen 4-Aminobenzylpiperidin-Motiv verknüpft und so einen Antagonisten erhalten, der beide Bindungsstellen besetzt und eine deutlich höhere Rezeptoraffinität aufweist als die Einzelkomponenten ($pK_{\text{i}}(\text{gesamt}) = 9.5$ gegenüber $pK_{\text{i}} \approx 5.5$ für die Einzelkomponenten) und eine gewisse Präferenz für den M_2 -Acetylcholin-Rezeptor hat.^[39]

Ähnlich systematisch wie beim Design der M_2 -Hybride Iper-6-phth und Iper-6-naph wurden bitopische A1-Agonisten hergestellt, indem ein orthosterischer Adenosinagonist mit einem PAM vom Typ PD81,723 über Linker verschiedener Alkylkettenlänge verknüpft wurde (Schema 3c).^[40] LUF6258 mit einer Kettenlänge von neun C-Atomen gibt Hinweise auf seine dualsterische Rezeptorinteraktion durch eine unveränderte Bindungsaaffinität und funktionelle Potenz in Ab- und Anwesenheit einer die allosterische Bindungsstelle sättigenden Konzentration des PAM PD81,723 (10 μM). LUF6258 zeigte jedoch keine erhöhte Affinität oder Potenz gegenüber dem monovalenten orthosterischen Agonisten.

5.2. Strategien für das Design von bitopischen oder dualsterischen Agonisten

Die Entwicklung dualsterischer oder bitopischer Wirkstoffe ist ein mehrdimensionales Problem, da mehrere Molekülteile, d.h. der orthosterische und der allosterische Teile

sowie das Verbindungsstück, jeweils optimiert und auch noch in der richtigen Weise verknüpft werden müssen. Die Strategie ist dem computergestützten Fragment-basierten Design ähnlich.

Bezogen auf die Fähigkeit zur Rezeptoraktivierung sind folgende orthosterisch-allosterische Bausteinverknüpfungen denkbar: aktiv-aktiv, aktiv-inaktiv, inaktiv-aktiv, inaktiv-inaktiv. Die vorgenannten dualsterischen M₂-Rezeptoragonisten repräsentieren die Konstellation „orthosterisch aktiv – allosterisch inaktiv“. Für einen hoch wirksamen dualsterischen Liganden dieser Art sollte der orthosterische Agonist über eine sehr hohe Affinität zum Rezeptor (möglichst im subnanomolaren Bereich) verfügen, damit das bitopische Konstrukt nicht eine rein allosterische gegenüber der dualsterischen Bindung bevorzugt. Der orthosterische Agonist sollte darüber hinaus eine hohe intrinsische Aktivität zur Rezeptoraktivierung haben, damit das dualsterische Konstrukt ausreichend rezeptoraktivierend bleibt; denn die Konstellation „orthosterisch aktiv – allosterisch inaktiv“ bedeutet gegenläufige Rezeptorkonformationen. Das allosterische Bauteil sollte eine sehr hohe Affinität und Selektivität zu dem Rezeptorsubtyp, der adressiert werden soll, aufweisen.

Beide Teile können getrennt voneinander optimiert werden. Dabei darf nicht vergessen werden, dass die Bindung der Einzelbestandteile die jeweils andere Rezeptorbindungsstelle strukturell verändern kann, d.h. dass der Rezeptor Konformationsänderungen im Sinne einer negativen Kooperativität unterworfen wird, wenn das dualsterische Konstrukt bindet. Infolgedessen würden sich Affinität und/oder Aktivität des jeweils anderen Partners zum Rezeptorprotein vermindern.^[41] Möglicherweise ist gerade das „Kräfteverhältnis“ in der Konstellation „orthosterisch aktiv – allosterisch inaktiv“ der Schlüssel zur Feineinstellung der Signalwegsselektivität.^[23]

Eine entscheidende Rolle spielt das Verbindungsstück zwischen beiden Bausteinen (Abbildung 3). Es muss an je-



Abbildung 3. Prinzipieller Aufbau dualsterischer Liganden.

dem Bauteil so angeknüpft werden, dass der Bindemodus nicht verändert wird. Zudem muss es in Bezug auf Länge, Flexibilität und chemische Natur maßgeschneidert werden. Die Länge der Zwischenkette muss einerseits ausreichen, damit beide Bausteine ihr Bindungsareal erreichen und in der vorgesehenen Weise andocken können, darf aber andererseits nicht zu lang sein, da es ansonsten zu sterischen Problemen kommen kann. Verbindungsstücke können Alkan- und Polyethylenglykolketten oder auch Polyglycine sein.^[42] Diese sind entweder chemisch inert oder können Wechselwirkungen mit dem Rezeptorprotein eingehen.^[43]

Sind alle Bausteine des dualsterischen Liganden zusammengefügt, können die Affinität zum Rezeptorprotein und die agonistische Aktivität geringer sein als beim ursprünglich eingesetzten orthosteren Agonisten^[43,44] und die Rezeptor-

subtypeselektivität kleiner als beim allosterischen Liganden. Dieser Effekt kann durch Feinabstimmung zwar abgeschwächt, aber nicht immer vollständig aufgehoben werden. Nichtsdestoweniger kann die Kombination aus großer Aktivität und Selektivität die der Einzelliganden deutlich übertreffen.

Eine erhöhte Affinität eines bitopischen oder dualsterischen Liganden gegenüber jener der unabhängigen Einzelliganden, die dann möglich ist, wenn beide Bausteine optimal in ihre Bindetaschen docken können und es zu keinen Konformationsänderungen während der Bindung eines der Bestandteile gekommen ist, lässt sich durch die geringeren Gesamtentropiekosten des Ligand-Rezeptor-Komplexes erklären; die zumeist günstige räumliche Nähe der orthosterischen und allosterischen Bindeareale trägt zur Senkung der Entropiekosten bei, wenn dies nicht durch einen zu flexiblen Linker konterkariert wird.^[32,33,45] Letztlich kann dies von Fall zu Fall verschieden sein, da bei einer sequenziellen Bindung bitopischer Liganden an das ortho- und dualsterische Bindeareal die treibenden Kräfte entropischer wie auch enthalpischer Natur sein können und sehr wohl Konformationsänderungen zwischen den beiden Bindungseignissen stattfinden können. Die allgemeine Regel, dass die treibende Kraft des Andockens eines polaren Agonisten die Entropiesteigerung und die eines zumeist hydrophoben Antagonisten die Enthalpieabnahme ist,^[46] ist hier nur schwer anwendbar, da beides in einem Molekül vereint sein kann.

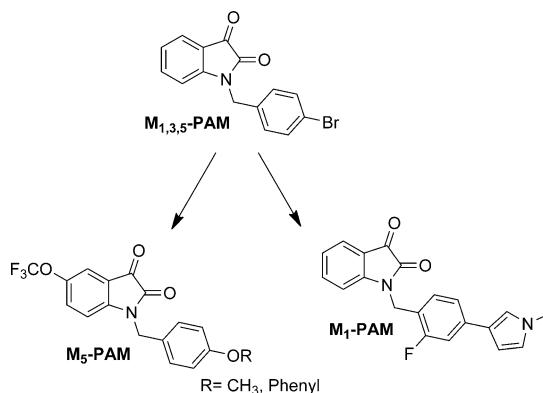
Vorsicht beim Zusammenbau dieser drei Elemente ist geboten in Bezug auf die Größe des Liganden. Arzneistoffe, die oral eingenommen werden sollen, sollten entsprechend der „Lipinski Rule Five“^[47] ein Molekulargewicht von 500 Dalton nicht überschreiten. Moleküle, die an molekularer „Fettleibigkeit“ (molecular obesity) leiden, d.h. zu groß und zu lipophil sind, scheitern häufig in den klinischen Prüfungen.^[48] Dies bedeutet, dass die allosterischen und orthosterischen Einzelbausteine möglichst klein sein müssen.

Die Optimierung kann heute von validen Computermodellierungen begleitet werden, da für eine ganze Reihe von GPCRs Kristallstrukturen zur Verfügung stehen. Allerdings muss einerseits beachtet werden, welcher Zustand des Rezeptorproteins – aktiv oder inaktiv oder Zwischenzustände – in dem Kristall festgehalten worden ist, und andererseits, welche Funktion (Agonist oder Antagonist) der Ligand haben soll.

5.3. Molekulare Schalter

Man spricht von molekularen Schaltern, wenn bei nur kleinen Strukturänderungen im Molekül z.B. aus einem PAM ein NAM wird. Molekulare Schalter gibt es auch in Bezug auf Rezeptorselektivität. In der Gruppe von Lindsley wurde kürzlich durch Variation der Substitution der N-Benzylsatin-derivate aus einem PAM an den Acetylcholinrezeptoren M₁, M₃ und M₅ ein selektiver M₅-PAM (Methoxy- oder Phenoxy-substitution am Benzylrest) oder M₁-PAM (Fluor- und Pyrazolreste; Schema 4) erhalten.^[49]

Über ein PAM-NAM-Umschalten wurde auch von Wood et al. für Modulatoren von metabotropen Glutamatrezepto-



Schemata 4. N-Benzylisatinderivate mit unterschiedlicher Subtypselektivität an den Muscarinrezeptoren.

ren (mGlu) berichtet^[50] und von Muth et al. für die Antagonistbindung von N-Methylscopolamin (NMS) am muscarinischen Acetylcholinrezeptor.^[51] Beim zweiten Beispiel konnte allein durch die Einführung von Methylgruppen in die lateralen Zwischenketten aus einem NAM ein PAM für einen orthosterischen Antagonist-Radioliganden gemacht werden. Der Effekt ist besondersprononziert, wenn die Methylgruppen an der Naphthalimidopropylkette (**1b**) substituiert werden (Abbildung 4).

Molekulare Schalter gibt es auch in der Gruppe der dualsterischen Agonisten am M₂-Acetylcholinrezeptor. Die oben beschriebenen dualsterischen Agonisten am M₂-Rezeptor können allein durch die Einführung einer Doppelbindung in den Isoxazolinring zu Antagonisten werden (Schema 5).^[55]

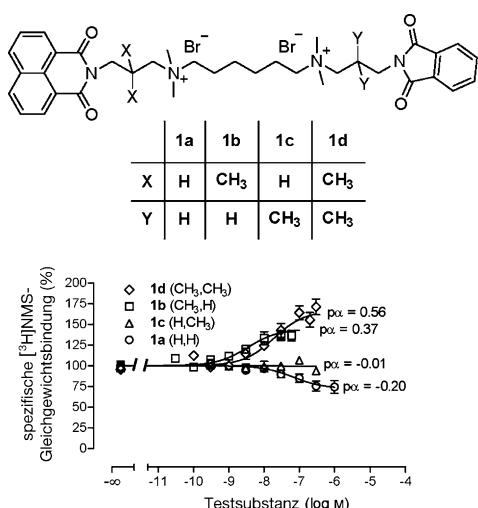
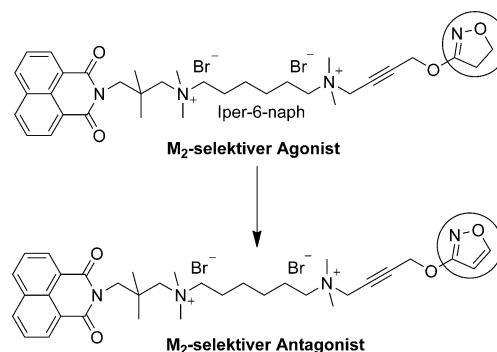


Abbildung 4. Molekularer Schalter von NAM zu PAM bei allosterischen Modulatoren des M₂-Rezeptors in Gegenwart des orthosterischen Antagonisten N-Methylscopolamin. Der Kooperativitätsfaktor α fungiert als Maßzahl, um die Qualität (Richtung) und das Ausmaß (Stärke) der allosterischen Interaktion im ternären Komplex aus allosterischem Modulator, orthosterischem N-Methylscopolamin und M₂-Rezeptor zu quantifizieren; sein negativer dekadischer Logarithmus $-\lg \alpha = p\alpha$ ermöglicht es anhand seines Vorzeichens auf einfache Weise, positive ($p\alpha > 0$), negative ($p\alpha < 0$) oder neutrale ($p\alpha = 0$) Kooperativität voneinander zu unterscheiden.



Schemata 5. Durch Einführung allein einer Doppelbindung wird aus dem M₂-Agonisten Iper-6-naph ein Antagonist.

6. Ausblick

Mit den allosterischen Liganden konnte die Tür zu selektiver Wirkung geöffnet werden, und darüber hinaus bieten diese Substanzen abgesehen von den klassischen FRET-Messungen^[52] und Moleküldynamiksimulations^[13] sowie Molecular Modeling^[10] auch die Möglichkeit, den Rezeptoraktivierungsprozess aufzuklären.^[23]

Einige allosterische Modulatoren haben bereits den Weg in die Klinik gefunden, und einige befinden sich in der Pipeline.^[28] Die hier vorgestellten bitopischen/dualsterischen Liganden zeigen ein neues, vielversprechendes Konzept für das rationale Design von Signalweg-selektiven GPCR-Aktivatoren auf. Die Zukunft wird weisen, wann wir die ersten dualsterischen/bitopischen Liganden als Arzneistoff auf dem Markt finden werden und ob sie bei der Anwendung an großen Patientenklientelen wirklich die in sie gesetzten Hoffnungen erfüllen werden.^[53]

Unsere Arbeiten wurden von der Deutschen Forschungsgemeinschaft ((HO1368/7-1 bis 7-3, 12-1; MO 821/1-1 bis 1-4, 2-1; KO 1582/3-2) gefördert.

Eingegangen am 5. Juli 2012

Online veröffentlicht am 6. Dezember 2012

- [1] K. Haga, A. C. Kruse, H. Asada, T. Yurugi-Kobayashi, M. Shiroishi, C. Zhanf, W. I. Weis, T. Okada, B. K. Koblika, T. Haga, T. Kobayashi, *Nature* **2012**, *482*, 547–552.
- [2] G. Vauquelin, B. von Mentzer, *G Protein-coupled Receptors—Molecular Pharmacology*, Wiley, Chichester, **2007**.
- [3] a) D. M. Rosenbaum, S. G. F. Rasmussen, B. Kobilka, *Nature* **2009**, *459*, 356–363; b) P. Kolb, G. Klebe, *Angew. Chem.* **2011**, *123*, 11778–11780; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 11573–11575.
- [4] a) S. G. F. Rasmussen, H.-J. Choi, D. M. Rosenbaum, T. S. Kobilka, F. S. Thian, P. C. Edwards, M. Burghammer, V. R. P. Ratnala, R. Sanishvili, R. F. Fischetti, G. F. X. Schertler, W. I. Weis, B. K. Kobilka, *Nature* **2007**, *450*, 383–387; b) S. G. Rasmussen, H. J. Choi, J. J. Fung, E. Pardon, P. Casarosa, P. S. Chae, B. T. Devree, D. M. Rosenbaum, T. S. Kobilka, A. Schnapp, I. Konetzki, R. K. Sunahara, S. H. Gellman, A. Pautsch, J. Steyaert, W. I. Weis, B. K. Kobilka, *Nature* **2011**, *469*, 175–180; c) D. M. Rosenbaum, C. Zhang, J. A. Lyons, R. Holl, D. Aragao, D. H. Arlow, S. G. Rasmussen, H. J. Choi, B. T. Devree, R. K.

- Sunaharam, P. S. Chae, S. H. Gellman, R. O. Dror, D. E. Shaw, M. Caffrey, P. Gmeiner, B. K. Kobilka, *Nature* **2011**, *469*, 236–240.
- [5] V. P. Jaakola, M. T. Griffith, M. A. Hanson, V. Cherezov, E. Y. Chien, J. R. Lane, A. P. IJzerman, R. C. Stevens, *Science* **2008**, *322*, 1211–1217.
- [6] E. Y. Chien, W. Liu, Q. Zhao, V. Katritch, G. W. Han, M. A. Hanson, L. Shi, A. H. Newman, J. A. Javitch, V. Cherezov, R. C. Stevens, *Science* **2010**, *330*, 1091–1095.
- [7] T. Shimamura, M. Shiroishi, S. Weyand, H. Tsujimoto, G. Winter, V. Katritch, R. Abagyan, V. Cherezov, W. Liu, G. W. Han, T. Kobayashi, R. C. Stevens, S. Iwata, *Nature* **2011**, *475*, 65–70.
- [8] A. C. Kruse, J. Hu, A. C. Pan, D. H. Arlow, D. M. Rosenbaum, E. Rosemond, H. F. Green, T. Liu, P. S. Chae, R. O. Dror, D. E. Shaw, W. I. Weis, J. B. K. Kobilka, *Nature* **2012**, *482*, 552–556.
- [9] a) S. Granier, A. Manglik, A. C. Kruse, T. S. Kobilka, F. S. Thian, W. I. Weis, B. K. Kobilka, *Nature* **2012**, *485*, 400–404; b) A. Manglik, A. C. Kruse, T. S. Kobilka, F. S. Thian, J. M. Mathiesen, R. K. Sunahara, L. Pardo, W. I. Weis, B. K. Kobilka, S. Granier, *Nature* **2012**, *485*, 321–326; c) H. Wu, D. Wacker, M. Mileni, V. Katritch, G. W. Han, E. Vardy, A. A. Thompson, X.-P. Huang, F. I. Carroll, S. W. Mascarella, R. B. Westkaemper, P. D. Mosier, B. L. Roth, V. Cherezov, R. C. Stevens, *Nature* **2012**, *485*, 327–332; d) A. A. Thompson, W. Liu, E. Chun, V. Katritch, H. Wu, E. Vardy, X.-P. Huang, C. Trapella, R. Guerrini, G. Calo, B. L. Roth, V. Cherezov, R. C. Stevens, *Nature* **2012**, *485*, 395–399.
- [10] V. Katritch, R. Abagyan, *Trends Pharmacol. Sci.* **2011**, *32*, 637–643.
- [11] H. Unal, S. S. Karnik, *Trends Pharmacol. Sci.* **2012**, *33*, 79–88.
- [12] M. C. Peeters, G. J. P. van Westen, Q. Li, A. P. IJzerman, *Trends Pharmacol. Sci.* **2011**, *32*, 35–42.
- [13] R. O. Dror, A. C. Pan, D. H. Arlow, D. W. Borhani, P. Maragakis, Y. Shan, H. Xu, D. E. Shaw, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2011**, *108*, 13118–13123.
- [14] A. Christopoulos, *Nat. Rev. Drug Discovery* **2002**, *1*, 198–210.
- [15] V. Katritch, V. Cherezov, R. C. Stevens, *Trends Pharmacol. Sci.* **2012**, *33*, 17–27.
- [16] a) J. M. Stockton, N. J. M. Birdsall, A. S. V. Burgen, E. C. Hulme, *Mol. Pharmacol.* **1983**, *23*, 551–557; b) X.-P. Huang, S. Prilla, K. Mohr, J. Ellis, *Mol. Pharmacol.* **2005**, *68*, 769–778; c) A. L. Gnagey, M. Seidenberg, J. Ellis, *Mol. Pharmacol.* **1999**, *56*, 1245–1253.
- [17] D. Jäger, C. Schmalenbach, S. Prilla, A. Kebig, M. Sennwitz, J. Schrobang, E. Heller, C. Tränkle, U. Holzgrabe, H.-D. Höltje, K. Mohr, *J. Biol. Chem.* **2007**, *282*, 34968–34976.
- [18] V. Nawaratne, K. Leach, C. C. Felder, P. M. Sexton, A. Christopoulos, *J. Biol. Chem.* **2010**, *285*, 19012–19021.
- [19] B. K. Shoichet, B. K. Kobilka, *Trends Pharmacol. Sci.* **2012**, *33*, 268–272.
- [20] P. J. Conn, A. Christopoulos, C. W. Lindsley, *Nat. Rev. Drug Discovery* **2009**, *8*, 41–54.
- [21] M. de Amici, C. Dallanoce, U. Holzgrabe, C. Tränkle, K. Mohr, *Med. Res. Rev.* **2010**, *30*, 463–549.
- [22] J. P. Changeux, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **2010**, *50*, 1–38.
- [23] A. Bock, N. Merten, R. Schrage, C. Dallanoce, J. Bätz, J. Klöckner, J. Schmitz, C. Matera, K. Simon, A. Kebig, L. Peters, A. Müller, J. Schrobang-Ley, C. Tränkle, C. Hoffmann, M. De Amici, U. Holzgrabe, E. Kostenis, K. Mohr, *Nat. Commun.* **2012**, DOI: 10.1038/ncomms2028.
- [24] H. Möhler, J. N. Fritschy, U. Rudolph, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2002**, *300*, 2–8.
- [25] Siehe Lit. [12].
- [26] N. T. Burford, J. Watson, R. Bertekap, A. Alt, *Biochem. Pharmacol.* **2011**, *81*, 691–702.
- [27] T. W. Schwartz, B. Holst, *Trends Pharmacol. Sci.* **2007**, *28*, 366–373.
- [28] D. J. Scholten, M. Canals, D. Maussang, L. Roumen, M. J. Smit, M. Wijtmans, C. de Graaf, H. F. Vischer, R. Leurs, *Br. J. Pharmacol.* **2012**, *165*, 1617–1643.
- [29] A. Kebig, K. Mohr, *Dtsch. Med. Wochenschr.* **2008**, *133*, 1681–3.
- [30] a) M. Decker, U. Holzgrabe, *MedChemComm* **2012**, *3*, 752–762; b) G. J. Digby, J. K. Shirey, P. J. Conn, *Mol. BioSyst.* **2010**, *6*, 1345–1354.
- [31] R. Schwyzer, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1977**, *297*, 3–26.
- [32] P. S. Portoghesi, *Trends Pharmacol. Sci.* **1989**, *10*, 230–235.
- [33] C. Valant, J. R. Lane, P. M. Sexton, A. Christopoulos, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **2012**, *52*, 153–178.
- [34] a) C. Valant, K. J. Gregory, N. E. Hall, P. J. Scammels, M. J. Lew, P. M. Sexton, A. Christopoulos, *J. Biol. Chem.* **2008**, *283*, 29312–29321; b) K. J. Gregory, N. E. Hall, A. B. Tobin, P. M. Sexton, A. Christopoulos, *J. Biol. Chem.* **2010**, *285*, 7459–7474.
- [35] a) T. Disingrini, M. Muth, C. Dallanoce, E. Barocelli, S. Bertoni, K. Kellershohn, K. Mohr, M. De Amici, U. Holzgrabe, *J. Med. Chem.* **2006**, *49*, 366–372; b) J. Antony, K. Kellershohn, M. Mohr-Andrä, A. Kebig, S. Prilla, M. Muth, E. Heller, T. Disingrini, C. Dallanoce, S. Bertoni, J. Schrobang, C. Tränkle, E. Kostenis, A. Christopoulos, H.-D. Höltje, E. Barocelli, M. De Amici, U. Holzgrabe, K. Mohr, *FASEB J.* **2009**, *23*, 442–450.
- [36] M. P. Caulfield, N. J. M. Birdsall, *Pharmacol. Rev.* **1998**, *50*, 279–290.
- [37] U. Voigtlander, K. Jöhren, M. Mohr, A. Raasch, C. Tränkle, S. Buller, J. Ellis, H. D. Höltje, K. Mohr, *Mol. Pharmacol.* **2003**, *64*, 21–31.
- [38] C. Dallanoce, P. Conti, M. De Amici, C. De Michelis, E. Barocelli, M. Chiavarini, V. Ballabeni, S. Bertoni, M. Impicciatore, *Bioorg. Med. Chem.* **1999**, *7*, 1539–1547.
- [39] T. Steinfeld, M. Mamman, J. A. M. Smith, R. D. Wilson, J. R. Jasper, *Mol. Pharmacol.* **2007**, *72*, 291–302.
- [40] R. Narlawar, J. R. Lane, M. Doddareddy, J. Lin, J. Brussee, A. P. IJzerman, *J. Med. Chem.* **2010**, *53*, 3028–3037.
- [41] K. Mohr, C. Tränkle, E. Kostenis, E. Barocelli, M. De Amici, U. Holzgrabe, *Br. J. Pharmacol.* **2010**, *159*, 997–1008.
- [42] a) D. J. Daniels, N. R. Lenard, C. L. Etienne, P.-Y. Law, S. C. Roerig, P. S. Portoghesi, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2005**, *102*, 19208–19213; b) S. Zhang, A. Yekkiral, Y. Tang, P. S. Portoghesi, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2009**, *19*, 6978–6980.
- [43] J. Shonberg, P. J. Scammels, B. Capuano, *ChemMedChem* **2011**, *6*, 963–974.
- [44] A. Soriano, R. Ventura, A. Molero, R. Hoen, V. Casadó, A. Cortés, F. Fanelli, F. Albericio, C. Lluís, R. Franco, M. Royo, *J. Med. Chem.* **2009**, *52*, 5590–5602.
- [45] M. Mammen, S.-K. Choi, G. M. Whitesides, *Angew. Chem.* **1998**, *110*, 2908–2953; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, *37*, 2754–2794.
- [46] G. Maksay, *Prog. Biophys. Mol. Biol.* **2011**, *106*, 463–473.
- [47] C. A. Lipinski, F. Lombardo, B. W. Dominy, P. J. Feeney, *Adv. Drug Delivery Rev.* **1997**, *23*, 3–25.
- [48] M. M. Hann, *MedChemComm* **2011**, *2*, 349–355; W. P. Walters, J. Green, J. R. Weiss, M. A. Murcko, *J. Med. Chem.* **2011**, *54*, 6405–6416; N. A. Meanwell, *Chem. Res. Toxicol.* **2011**, *24*, 1420–1456.
- [49] B. J. Melancon, C. R. Hopkins, M. R. Wood, K. A. Emmitt, C. N. Niswender, A. Christopoulos, P. J. Conn, C. W. Lindsley, *J. Med. Chem.* **2012**, *55*, 1445–1464.
- [50] M. R. Wood, C. R. Hopkins, J. T. Brogan, P. J. Conn, C. W. Lindsley, *Biochemistry* **2011**, *50*, 2403–2410.
- [51] a) M. Muth, W. Bender, O. Scharfenstein, U. Holzgrabe, E. Balatkova, C. Tränkle, K. Mohr, *J. Med. Chem.* **2003**, *46*, 1383–1389; b) A. Raasch, O. Scharfenstein, C. Tränkle, U. Holzgrabe, K. Mohr, *J. Med. Chem.* **2002**, *45*, 3809–3812.
- [52] M. J. Lohse, S. Nuber, C. Hoffmann, *Pharmacol. Rev.* **2012**, *64*, 299–336.
- [53] T. P. Kenakin, *Br. J. Pharmacol.* **2012**, *165*, 1659–1669.