

Wirkstoffe nach Zahlen: reaktionsbasierter De-novo-Entwurf von potenten und selektiven Leitstrukturen für die Krebsforschung**

Birgit Spänkuch, Sarah Keppner, Lisa Lange, Tiago Rodrigues, Heiko Zettl, Christian P. Koch, Michael Reutlinger, Markus Hartenfeller, Petra Schneider und Gisbert Schneider*

Mit Blick auf jüngste Untersuchungen zur Effizienz der pharmazeutischen Wirkstoffforschung sind neue chemische Leitstrukturen mit einem definierten pharmakologischen Profil gesuchter denn je.^[1-4] Rechnerbasiertes „De-novo“-Design bietet sich als eine Methode der Wahl zu genau diesem Zweck an, da mittels dieses Ansatzes innovative molekulare Grundgerüste („Chemotypen“) aus einem scheinbar unendlichen chemischen Raum zugänglich gemacht werden können.^[5-7] Hier berichten wir über die erfolgreiche Anwendung eines vollautomatischen und chemiegetriebenen De-novo-Designverfahrens, mit dessen Hilfe ein neuartiger, niedermolekularer, potenter und selektiver Inhibitor der humanen Polo-like Kinase 1 (hPlk1) entdeckt wurde. Diese potentielle Antitumor-Substanz wurde vom Designalgorithmus von Grund auf neu entworfen und konnte entsprechend dem vom Computerprogramm vorgeschlagenen Syntheseweg chemisch dargestellt werden. Die Tumorzellproliferation wird durch diese signifikant reduziert, ohne dabei die Vitalität nicht-transformierter Zellen zu beeinflussen und ohne auffällige inhibierende Effekte in einem Paneltest aktiver Kinasen. Bemerkenswerterweise ist die vom Computer entworfene Substanz eine „Superstruktur“ des Antidepressivums Fluoxetin, für welches wir vergleichbare, jedoch deutlich schwächere zelluläre Effekte beobachteten. Die vorlie-

gende Studie weist das Konzept des rechnerbasierten De-novo-Designs als eine zeit- und ressourcensparende Methode für den Neuentwurf molekularer Grundgerüste aus, ohne dabei auf ein Strukturmodell des makromolekularen Zielproteins angewiesen zu sein.

Die Serin/Threonin-Kinase hPlk1 spielt eine zentrale Rolle bei der Kontrolle des Zellzyklus und ist eine Zielstruktur für die Entwicklung neuartiger Tumorthapeutika.^[8,9] Typ-I-Inhibitoren binden an eine aktive Konformation der Kinase, wohingegen Typ-II-Inhibitoren die inaktive Kinase ausschalten, bei der sich die Aktivierungsschlaufe der Proteinstruktur in der sogenannten „DFG-out“-Konformation befindet.^[10,11] Kürzlich berichteten wir über die Identifizierung von Verbindung **1** als einen solchen starken ($IC_{50} = 0.2 \text{ nm}$) Inhibitor der inaktiven hPlk1.^[12] Ausgehend von Verbindung **1** als Designvorlage setzten wir unsere neue Software DOGS (*Design Of Genuine Structures*) ein, um automatisch neue Chemotypen zu entwerfen, die im Vergleich zu **1** andere Grundgerüste, aber dennoch eine ähnliche Verteilung von Wechselwirkungspunkten (Pharmakophormuster) besitzen.^[13,14] Die Software wendet dafür insgesamt 83 organisch-chemische Reaktionen auf eine Sammlung von mehr als 25 000 kommerziell verfügbaren Molekülbausteinen an.^[15] Neue Verbindungen wachsen durch die iterative Anwendung motivierter In-silico-Syntheseschritte.^[16] Jeder einzelne Schritt entlang des virtuellen Synthesewegs wird dabei über den Konservierungsgrad der Pharmakophormerkmale und die strukturelle Ähnlichkeit des aktuellen Molekülfunktionswurfs zur Referenzverbindung (**1**) geleitet.^[17] Unter den so erhaltenen besten Entwürfen identifizierten wir Verbindung **4** mit einem die strukturelle Vielfalt bekannter Kinaseinhibitoren erweiternden Grundgerüst (Abbildung 1A). Überraschenderweise handelt es sich bei dieser chemisch hochattraktiven, de novo entworfenen Verbindung um ein Strukturanalagon des bekannten Antidepressivums Fluoxetin.^[18,19] Dieser Befund ließ uns eine funktionelle Verwandtschaft zwischen den beiden Substanzen vermuten, sodass wir Verbindung **4** weitergehend untersuchten.

Die DOGS-Software erzeugte insgesamt 218 Verbindungen ausgehend von 100 Startfragmenten. Die erhaltenen Entwürfe sind wirkstoffartig und der chemischen Synthese zugänglich (Werte als Mittelwert $\pm \sigma$: Molekulargewicht = $457 \pm 59 \text{ Da}$, Lipophilie ($Slog P$) = 4.5 ± 1.1 , Wasserlöslichkeit ($\log S$) = -5.9 ± 1.3 , synthetische Plausibilität ($rsynth$) = 0.7 ± 0.3). Der von Hopkins eingeführte quantitative Index für „Wirkstoffartigkeit“ (QED)^[20] beträgt für die entworfenen Moleküle 0.5 ± 0.2 und ist damit in Übereinstimmung mit dem Mittelwert aus allen zugelassenen Wirksubstanzen ($QED = 0.49$).^[21] Insgesamt wurden 57 unterschiedliche mo-

[*] Dr. T. Rodrigues, Dr. H. Zettl, C. P. Koch, M. Reutlinger, Dr. M. Hartenfeller, Dr. P. Schneider, Prof. Dr. G. Schneider
Departement Chemie und Angewandte Biowissenschaften
Eidgenössische Technische Hochschule (ETH)
Wolfgang-Pauli-Strasse 10, 8093 Zürich (Schweiz)
E-Mail: gisbert.schneider@pharma.ethz.ch
Homepage: <http://www.modlab.ethz.ch>
Priv.-Doz. Dr. B. Spänkuch, Dr. S. Keppner, L. Lange
Universitätsfrauenklinik, Molekulare Onkologie und Gynäkologie
Eberhard Karls Universität
Calwerstraße 7, 72076 Tübingen (Deutschland)

[**] Wir danken Dr. M. Bieler für die Berechnung von QED -Werten. Dr. T. Geppert führte das Dockingexperiment durch, und Sarah Haller leistete technische Unterstützung. Dr. M. Rupp steuerte die ISOAK-Ähnlichkeitsfunktion für DOGS bei. Diese Forschungsstudie wurde finanziell unterstützt von der Deutschen Krebshilfe (Bewilligungs-Nr. 108651), der Wilhelm-Sander-Stiftung (Bewilligungs-Nr. 2009.024.1) und der Messer-Stiftung (an B.S.) sowie dem Schweizerischen Nationalfonds (Bewilligungs-Nr. 205321-134783) und der Deutschen Forschungsgemeinschaft (Bewilligungs-Nr. FOR1406TP4) (an G.S.). B.S. dankt Dr. D. Wallwiener für Arbeitsmöglichkeiten. G.S. dankt der Chemical Computing Group, Inc. (Montreal, Kanada) für eine Forschungslizenz der Software MOE.

 Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag (Angaben zu Materialien, Methoden und Analytik) sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.201206897> zu finden.

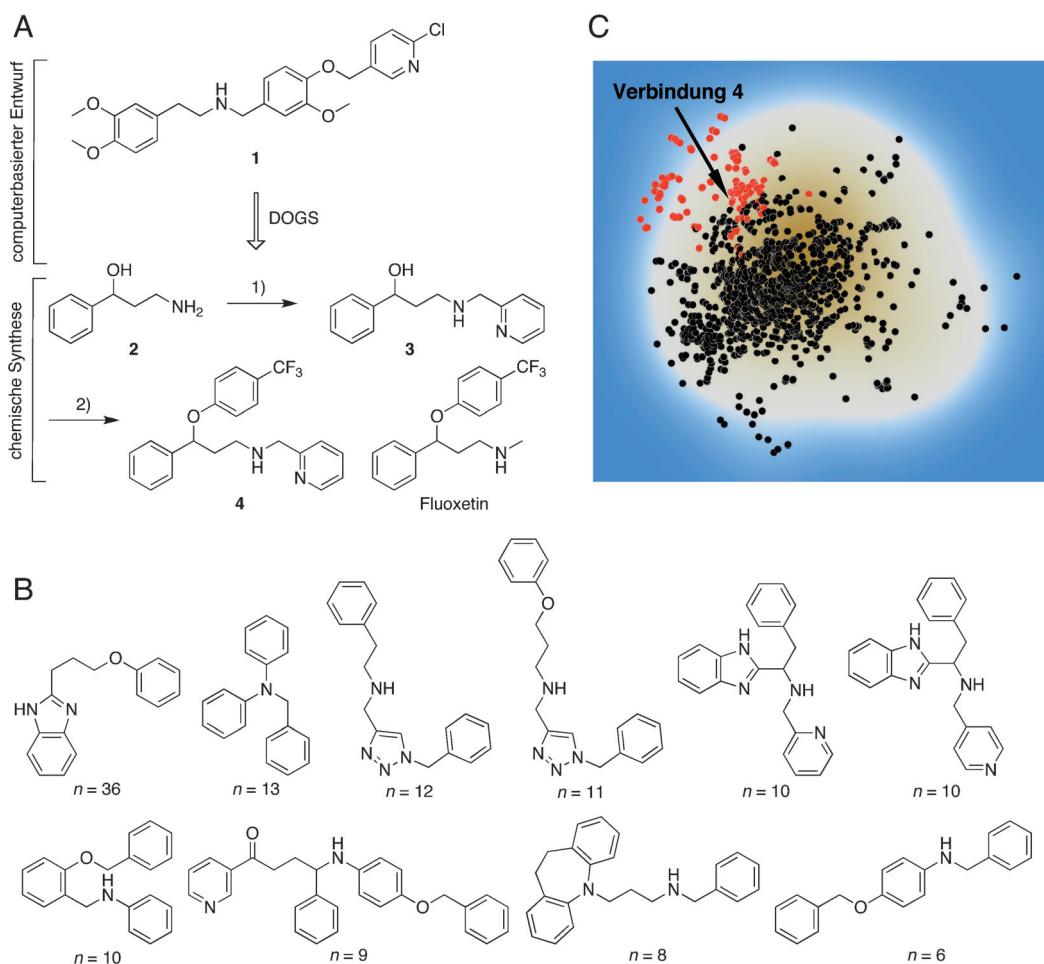


Abbildung 1. A) De-novo-Design und Synthese von Verbindung 4: Reagentien und Bedingungen: 1) 2-Pyridincarboxaldehyd, DCE (1,2-Dichlorethan), NaBH(OAc)₃, RT; 2) 4-Trifluormethylphenol, PPh₃, DEAD (Diethylazodicarboxylat), THF, 0°C. Die entworfene Verbindung ist ein Derivat von Fluoxetin. B) Grundgerüstvielfalt: Die 10 häufigsten vom Computer entworfenen molekularen Grundgerüste (*n*: Anzahl Moleküle). C) Künstliche „Fitness“-Landschaft: Die Abbildung zeigt die Verteilungen bekannter Kinaseinhibitoren (schwarze Punkte) und der de novo entworfenen Moleküle (rote Punkte) in einem pharmazeutisch relevanten chemischen Raum aus 12 647 bioaktiven Substanzen (COBRA-Datensammlung). Die Moleküldichte wird durch einen Farbgradienten von Blau (wenige Moleküle) nach Orange (viele Moleküle) wiedergegeben. Für alle Moleküle wurde die topologische CATS-Pharmakophorrepräsentation berechnet und durch „Stochastic Neighbor Embedding“ (SNE) auf die Ebene projiziert.

lekulare Grundgerüste erhalten, von denen die zehn häufigsten in 57% aller Entwürfe auftreten (Abbildung 1B). Diese breite Diversität spiegelt die Toleranz des beim Design verwendeten Pharmakophor-Ähnlichkeitsmaßes wider. Unter den besten Entwürfen beobachteten wir mehrere verzweigte Molekülstrukturen, obwohl das Referenzmolekül **1** ein lineares Grundgerüst aufweist. In einer früheren Studie hatten wir eine de novo erzeugte lineare Verbindung aus dieser Serie bereits synthetisiert und auf hPlk1-Inhibition getestet.^[14] Hier fokussierten wir uns nunmehr auf den Molekülentwurf Nr. **4**.

Für in der Literatur beschriebene Kinaseinhibitoren berechneten wir eine „Fitness“-Landschaft, die ein Modell von deren Struktur-Wirkungs-Beziehungen darstellt (Abbildung 1C). Die Landschaft beruht auf der Visualisierung der Verteilung von 12 647 bioaktiven, 256 makromolekularen Tar-

gets beeinflussende Substanzen^[22] sowie unseren 218 de novo entworfenen Molekülen. Für alle Substanzen wurde eine Repräsentation ihrer topologischen Pharmakophormuster (CATS)^[23] berechnet, und die resultierenden 210-dimensionalen reellzähligen Vektoren mittels dem „Stochastic Neighbor Embedding“-Verfahren auf die Ebene projiziert.^[24] Diese Methode erfasst lokale Nachbarschaftsbeziehungen zwischen den Substanzen^[25] und minimiert Artefakte bei der Projektion nicht-normalverteilter Daten.^[26,27] Offensichtlich ist die Mehrzahl der entworfenen Moleküle in einem Bereich des chemischen Raums zu finden, der bekannten Kinaseinhibitoren unmittelbar benachbart ist. Diese Beobachtung lässt vermuten, dass beide Verbindungsklassen teilweise überlappende, aber nicht identische Merkmale haben und die entworfenen Moleküle die chemische Vielfalt bekannter Kinaseinhibitoren erweitern. Die Tatsache, dass Verbindung **4** im Übergangsbereich zwischen den bekannten und entworfenen Molekülen liegt, motivierte weitergehende Untersuchungen zusätzlich.

Weiterhin erstellten wir Computermodelle der Komplexe zwischen Verbindung **4** bzw. Fluoxetin und hPlk1. Automatisches flexibles Ligandendocking in die ATP-Bindetasche der aktiven hPlk1 (Protein Data Bank,^[28] PDB ID: 2ou7)^[29] und einem Modell der inaktiven hPlk1, welches wir ausgehend von einer inaktiven DFG-out-Konformation der strukturverwandten Aurora A-Kinase (PDB ID: 2c6e)^[30] erstellt hatten,^[14] legte die bevorzugte Bindung von **4** an die inaktive Kinase nahe (GOLD-Software, ASP-Score^[31,32] = 40 bzw. 47; höhere positive Werte deuten eine mögliche stärkere Bindung an). Für Fluoxetin erhielten wir bei gleichem Trend insgesamt niedrigere Werte (aktive hPlk1: 29; inaktive hPlk1:

37). Diese Modellierungsstudie deutete an, dass sowohl Verbindung **4** als auch Fluoxetin in eine inaktive hPlk1-Konformation binden könnten.

Verbindung **4** war der chemischen Synthese unmittelbar zugänglich, wobei wir die vom Computerprogramm vorgeschlagene Synthesestrategie verfolgten (Abbildung 1 A). Wir erhielten racemisches Produkt **4** nach Aufreinigung, wobei zunächst das Zwischenprodukt **3** über reduktive Aminierung von 3-Amino-1-phenylpropan-1-ol (**2**) erhalten wurde, gefolgt von Mitsunobu-Etherbildung.^[33] Hiermit bestätigen wir die Eignung des reaktions- und computergestützten Moleküldesigns für die medizinische Chemie.

Zunächst untersuchten wir die Verbindungen **1**, **4** und Fluoxetin in einem 48-Kinase-Panel auf ihr inhibierendes Potenzial. In einer Konzentration von 10 μM führte keine der Verbindungen zu einer signifikanten Blockade der hPlk1-Aktivität oder einer anderen getesteten Kinase (nicht gezeigt). Bemerkenswerterweise inhibierte Verbindung **4** auch nicht Aurora-Kinase A (STK6), welche in vivo mit hPlk1-Effekten zusammenspielt.^[34]

Anschließend führten wir Kinaseassays mit synchronisierten HeLa-Zellen durch, um zu untersuchen, ob Verbindung **4** die Kinaseaktivität von hPlk1 in der inaktiven Konformation hemmt. Dazu wurde immunpräzipitierte hPlk1 mit ansteigenden Konzentrationen von Verbindung **4** und mit Casein als Substrat im Kinaseassay eingesetzt. Dabei konnten wir eine signifikant reduzierte hPlk1-Aktivität auf 40–60% für alle eingesetzten Konzentrationen beobachten (Abbildung 2 A, 1 nM: 55%, $p = 0.0031$ (zweiseitige ANOVA mit Bonferroni-Korrektur); 10 nM: 60%, $p = 0.0006$; 100 nM: 46%, $p = 0.007$; 1 μM : 54%, $p = 0.001$; 33 μM : 41%, $p = 0.01$). Darüber hinaus haben wir die Kinaseaktivität von hPlk1 nach der Inkubation von immunpräzipitierter Kinase mit Fluoxetin ermittelt, wobei wir hierbei erst bei 100-fach höherer Konzentration von 10 bzw. 100 μM eine signifikant reduzierte hPlk1-Kinaseaktivität beobachteten (Abbildung 2 B). Mit einer Konzentration von 10 nM Fluoxetin konnte die hPlk1-Aktivität auf 80% ($p = 0.08$), mit 100 nM auf 90% ($p = 0.4$), mit 1 μM auf 71% ($p = 0.09$), mit 10 μM auf 61% ($p = 0.03$) und mit 100 μM auf 37% ($p = 0.0003$) reduziert werden. Diese Ergebnisse unterstreichen Fluoxetin als einen schwachen Inhibitor inaktiver hPlk1 und könnten einen Teil der beschriebenen anti-proliferativen Effekte von Fluoxetin auf Tumorzellen erklären.^[35,36]

Um einen weiteren Hinweis auf die Selektivität von Verbindung **1** zu erhalten, untersuchten wir zusätzlich deren Einfluss auf inaktive Aurora A-Kinase. Bis zu einer Ligandenkonzentration von 33 μM war kein inhibierender Effekt zu beobachten (Abbildung 2 C). Aufgrund der nanomolaren Affinität zu hPlk1 in der inaktiven Konformation und einer hohen Ligandeneffizienz^[37] ($\Delta G/\text{Anzahl Nicht-Wasserstoffatome}$ ca. 0.66) bietet sich Verbindung **4** daher als Ausgangspunkt für die Leitstrukturoptimierung an.

Um den Einfluss von Verbindung **4** und Fluoxetin auf den Zellzyklus zu untersuchen, führten wir FACScan-Analysen mit HeLa-Zellen nach Synchronisation mit Doppelthymidinblock durch. Über einen Zeitraum von 48 h zeigte sich ein deutlich verlangsamter Zellzyklus (Hintergrundinformationen, Abbildung S1 A). 4 h nach der Freilassung (*release*) be-

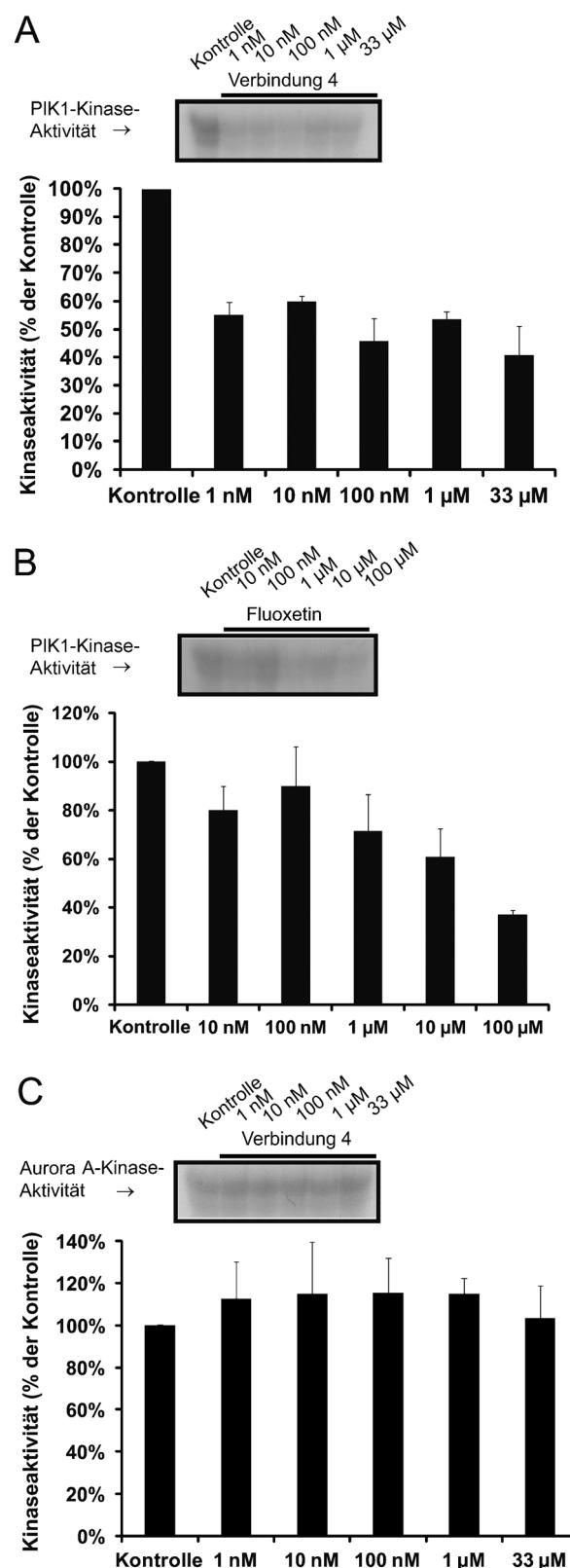


Abbildung 2. Hemmung der inaktiven hPlk1- und Aurora A-Kinase. hPlk1-Aktivität von immunpräzipitierter hPlk1-Kinase aus HeLa-Zellen nach Inkubation mit Verbindung **4** (A) oder Fluoxetin (B), bzw. Verbindung **4** mit immunpräzipitierter Aurora A-Kinase aus HeLa-Zellen (C). Dargestellt sind repräsentative Autoradiogramme. Die Balkendiagramme zeigen drei unabhängige Experimente zur Messung der hPlk1- bzw. Aurora A-Kinaseaktivität mit Casein als Substrat.

fanden sich die Kontrollzellen zu je 1/3 in der G0/G1-, S- bzw. G2/M-Phase, während die Zellen, die mit 10 μM Verbindung 4 behandelt worden waren, hauptsächlich noch in der S-Phase waren und bei 33 μM sogar dauerhaft in der S-Phase arrestierten (Abbildung S1A, erste Zeile). Nach 6 h erreichten die Kontrollzellen die G2/M-Phase, nach Behandlung mit 33 μM Verbindung 4 waren die Zellen jedoch immer noch in der S-Phase (Abbildung S1A, zweite Zeile). Nach 8 h verhielt sich der Zellzyklus nach Behandlung mit 10 μM wieder wie bei den Kontrollzellen, allerdings verharrten die Zellen, die mit 33 μM behandelt worden waren, noch immer in der S-Phase (Abbildung S1A, dritte Zeile). 10 bis 14 h nach der Freilassung erreichten die Kontrollzellen und die mit 10 μM behandelten Zellen wieder eine normale Zellzyklusverteilung. Die mit 33 μM Verbindung 4 behandelten Zellen beendeten die S-Phase und erreichten die G2/M-Phase (Abbildung S1A, vierte bis sechste Zeile). Im Zeitraum von 24–48 h durchliefen die Kontrollzellen schließlich einen kompletten Zellzyklus, aber Zellen, die mit Verbindung 4 behandelt worden waren, gingen vom G2/M-Arrest in die Apoptose über (Abbildung S1A, siebte bis letzte Zeile).

Die Behandlung von HeLa-Zellen mit Fluoxetin führte im Zeitraum von 48 h nach dem Doppelthymidinblock zu vergleichbaren Effekten auf den Zellzyklusverlauf wie die Behandlung mit Verbindung 4 (Abbildung S1B). Die Zellen wiesen ein verzögertes Durchlaufen des Zellzyklus auf und gingen über einen G2/M-Arrest zur Apoptose über.

Um den Einfluss von Verbindung 4 und Fluoxetin auf die Zellproliferation zu untersuchen, wurden HeLa-Zellen 24–72 h nach der Behandlung gezählt. Dabei führte Verbindung 4 zur konzentrations- und zeitabhängigen Verringerung der Zellproliferation mit einem EC₅₀-Wert von $4 \pm 1 \mu\text{M}$ (Abbildung 3A, obere Zeile). Nach 72 h war die Reduktion ab einer Konzentration von 100 nm signifikant (100 nm: 81%, $p = 0.03$; 1 μM : 60%, $p = 0.02$; 10 μM : 35%, $p = 0.01$; 33 μM : 0%, $p = 0.002$). Um darüber hinaus zu ermitteln, ob die Zellen in der Lage waren, sich von der Behandlung mit den beiden Testsubstanzen zu erholen, wurde die Zellproliferation über einen Zeitraum von weiteren 72 h nach erneutem Aussäen in frischem Medium ohne Testsubstanzen bestimmt („wash-out grow-out“-Assay). Die Zellen wurden dafür nach den ersten 72 h Inkubationszeit gezählt und erneut ausgesät, anschließend wurde die Zellzahl nach weiteren 72 h ermittelt. Die Inkubation mit frischem Medium ohne Verbindung 4 führte in den niedrigeren Konzentrationen (10 nm–1 μM) dazu, dass die Zellen sich wieder erholen konnten und weiter proliferierten (Abbildung 3A, untere Zeile). Die Zunahme liegt hier wie bei unbehandelten Kontrollzellen bei ca. 400–500%. Nach Behandlung mit höheren Konzentrationen hingegen konnten die Zellen auch nach Entfernung von Verbindung 4 nicht weiter proliferieren, sondern waren irreversibel geschädigt. 10 μM Verbindung 4 führten zu einer verminderten Proliferation im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollen (42%). Die höheren Konzentrationen (16 und 22 μM) führten sogar zu einer Erholungsrate von 0%. HeLa-Zellen, die zuvor mit 28 bzw. 33 μM Verbindung 4 behandelt worden waren, waren bereits nach den ersten 72 h so geschädigt, dass zu diesem Zeitpunkt 0% der Zellen proliferierten, sodass

nach der Erholungsphase ebenfalls keine proliferierenden Zellen mehr detektiert wurden.

Verglichen mit Verbindung 4 führte Fluoxetin zu einer schwächeren Reduktion der HeLa-Zellproliferation über den Zeitraum von 24–72 h, die aber dennoch signifikant für Konzentrationen ab 10 μM war (Abbildung 3B, obere Zeile). Auch hier war die Reduktion konzentrations- und zeitabhängig mit einem EC₅₀-Wert von $14 \pm 2 \mu\text{M}$ [10 μM : Reduktion auf 64% ($p = 0.02$), 33 μM : 1% ($p = 0.0001$), 66 μM : 0% ($p < 0.0001$), 100 μM : 0% ($p < 0.0001$)]. Die „wash-out grow-out“-Assays nach Behandlung der HeLa-Zellen mit Fluoxetin ergaben ähnliche Effekte (Abbildung 3B, untere Zeile). Fluoxetin-Konzentrationen bis zu 1 μM führten zur Erholung der HeLa-Zellen, vergleichbar mit den Kontrollzellen (430–570% verglichen mit der wiederausgesäten Zellzahl). Höhere Fluoxetin-Konzentrationen führten jedoch zu einer Beeinträchtigung der Erholung nach Inkubation mit frischem Medium ohne Testsubstanzen (10 μM : 295%), und für Konzentrationen von 66 und 100 μM waren die Beobachtungen vergleichbar zu Verbindung 4, wo bereits nach der ersten 72-stündigen Inkubation keine Zellen mehr für ein erneutes Aussäen überlebt hatten, sodass auch nach den weiteren 72 h 0% im Vergleich zu den Kontrollzellen vorhanden waren.

Darüber hinaus untersuchten wir den Einfluss von Verbindung 4 und Fluoxetin auf hTERT-RPE1-Zellen, um ihre Eignung als potentielle Wirkstoffe zu analysieren. Dabei ermittelten wir die Zellerholung nach einer erneuten 72-Stunden-Periode ohne Testsubstanzen, nachdem die Zellen zuvor mit 100 nm und 10 μM Verbindung 4 bzw. mit 10 und 33 μM Fluoxetin behandelt worden waren (Abbildung 3C,D). Wie für die HeLa-Zellen beschrieben, ermittelten wir auch die hTERT-RPE1-Zellzahlen nach den ersten 72 h Inkubation mit den Testsubstanzen sowie nach erneuter Aussaat in frischem Medium ohne Substanzen und nach weiteren 72 h. Beide Testsubstanzen führten lediglich zu einer geringen Beeinträchtigung der Erholung, sodass alle Zellen lebendig waren und nach der Entfernung der Testsubstanzen normal weiter proliferierten.

Um eine mögliche Apoptose-Induktion als Ursache für die reduzierte Proliferation zu untersuchen, führten wir zunächst Western-Blot-Analysen gegen Parp in HeLa-Zellen durch. Dabei konnten wir bereits nach Behandlung mit 100 nm Verbindung 4 ansteigende Mengen des Spaltprodukts von 85 kDa Größe bei gleichzeitig abnehmendem Volllängenprotein von 116 kDa Größe messen (Abbildung 3E). Nach Behandlung mit ansteigenden Konzentrationen bis hin zu 33 μM war nur noch das Spaltprodukt detektierbar. Nach der Inkubation mit Fluoxetin war die Spaltung des Volllängenproteins erst ab einer Konzentration von 33 μM messbar, in niedrigeren Konzentrationen war nur eine schwache Zunahme des Spaltprodukts zu sehen (Abbildung 3F). Um die durch Parp-Spaltung nachgewiesene Apoptose-Induktion nach Behandlung mit Verbindung 4 zu bestätigen, führten wir anschließend Caspase 3/7-Assays nach 24 und 48 h Inkubation durch, die deutlich die zeit- und konzentrationsabhängige Aktivierung der Caspasen 3/7 als Apoptose-Indikator bestätigten (Abbildung 3G,H).

Als das wichtigste Ergebnis unserer Untersuchungen sehen wir die Tatsache, dass sich die vollautomatisch de novo

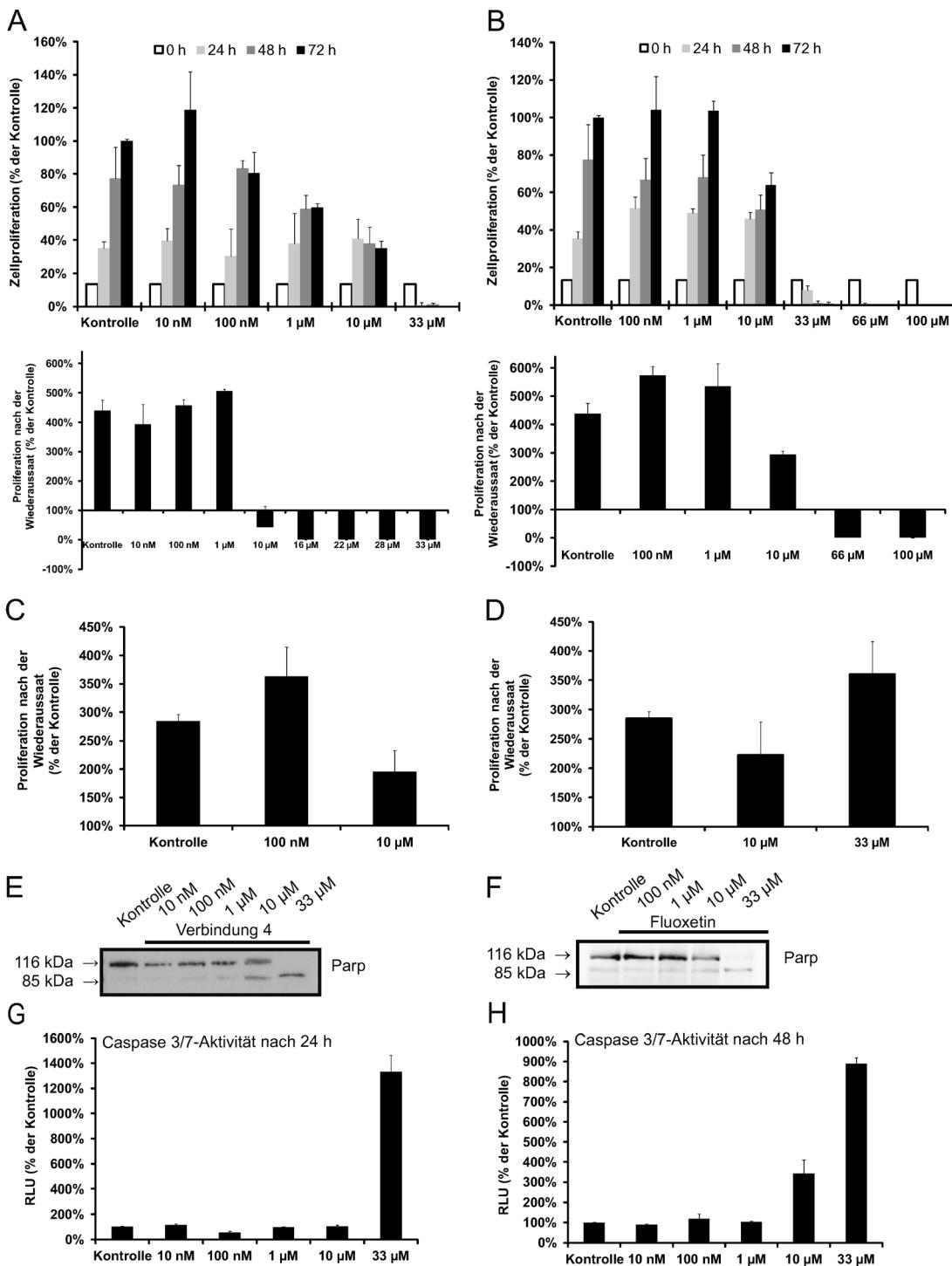


Abbildung 3. A–D) Zellproliferation und Vitalität: Effekt von Verbindung 4 (A) bzw. Fluoxetin (B) auf die Zellproliferation und „wash-out grow-out“-Assay in HeLa-Zellen. Effekt von Verbindung 4 und Fluoxetin in „wash-out grow-out“-Assays in hTERT-RPE1-Zellen (C, D). Die Zellproliferation von HeLa-Zellen wurde nach 24–72 h nach Behandlung bestimmt, Kontrollzellen erhielten reines Kulturmedium. Die prozentuale Proliferation ist angegeben bezogen auf die Kontrollzellen (= 100%) nach 72 h Inkubation mit den Testsubstanzen ($n = 3$). Für die „wash-out grow-out“-Assays wurden HeLa-Zellen (A, B) und hTERT-RPE1-Zellen (C, D) mit der jeweiligen Testsubstanz 72 h inkubiert, die Zellzahl ermittelt und anschließend 1/5 (HeLa-Zellen) bzw. 1/3 (hTERT-RPE1-Zellen) wieder ausgesät und die Zellzahl nach weiteren 72 h mit frischem Medium ohne Testsubstanzen ermittelt. E–H) Apoptoseinduktion: Western-Blot-Analyse der Parp-Spaltung nach Behandlung von HeLa-Zellen mit Verbindung 4 (E) bzw. Fluoxetin (F). Die Western-Blot-Analysen zur Bestimmung der Parp-Spaltung wurden nach 48 h Inkubation der HeLa-Zellen mit den Testsubstanzen durchgeführt. Die Aktivierung der Caspase 3/7 wurde nach 24 h (G) bzw. nach 48 h (H) Inkubation mit Verbindung 4 ermittelt. Die Lumineszenz wird als relativer RLU-Level angegeben ($n = 3$, Mittelwert $\pm \sigma$). Kontrollzellen wurden mit reinem Kulturmedium inkubiert.

entworfene Verbindung **4** als synthetisch leicht zugänglich erwiesen hat, zudem das Zielprotein hPlk1 potent und selektiv in einer inaktiven Konformation arretierte, und die damit im Zusammenhang stehende anti-proliferative Aktivität gegen Tumorzellen bei gleichzeitigen minimalen Effekten auf immortalisierte nicht-transformierte Zellen aufzeigte. Die Ergebnisse bestätigen deutlich unser Konzept des liganden- und reaktionsbasierten De-novo-Moleküldesigns als einen geeigneten methodischen Ansatz zur Identifizierung innovativer medizinisch-chemischer Leitstrukturen mit einem gewünschten Aktivitätsspektrum. Das vorgestellte Verfahren könnte zum wissenschaftlichen Fortschritt in stagnierenden Wirkstofffindungsprojekten beitragen.

Eingegangen am 25. August 2012
Online veröffentlicht am 20. November 2012

Stichwörter: Enzyminhibitoren · Fragmentbasierter Entwurf · Polo-like Kinase · Virtuelle Synthese · Wirkstoffdesign

- [1] M. E. Bunnage, *Nat. Chem. Biol.* **2011**, *7*, 335–339.
- [2] K. I. Kaitin, J. A. DiMasi, *Clin. Pharmacol. Ther.* **2011**, *89*, 183–188.
- [3] F. Pammolli, L. Magazzini, M. Riccaboni, *Nat. Rev. Drug Discovery* **2011**, *10*, 428–438.
- [4] Y. L. Bennani, *Drug Discovery Today* **2011**, *16*, 779–792.
- [5] G. Schneider, U. Fechner, *Nat. Rev. Drug Discovery* **2005**, *4*, 649–663.
- [6] M. Hartenfeller, G. Schneider, *WIREs Comp. Mol. Sci.* **2011**, *1*, 742–759.
- [7] G. Schneider, *J. Comput. Aided Mol. Des.* **2012**, *26*, 115–120.
- [8] C. McInnes, M. D. Wyatt, *Drug Discovery Today* **2011**, *16*, 619–625.
- [9] K. Strebhardt, *Nat. Rev. Drug Discovery* **2010**, *9*, 643–660.
- [10] Y. Liu, N. S. Gray, *Nat. Chem. Biol.* **2006**, *2*, 358–364.
- [11] I. Akritopoulou-Zanke, P. J. Hajduk, *Drug Discovery Today* **2009**, *14*, 291–297.
- [12] S. Keppner, E. Proschak, G. Schneider, B. Spänkuch, *Chem-MedChem* **2009**, *4*, 1806–1809.
- [13] M. Hartenfeller, H. Zettl, M. Walter, M. Rupp, F. Reisen, E. Proschak, S. Weggen, H. Stark, G. Schneider, *PLoS Comput. Biol.* **2012**, *8*, e1002380.
- [14] G. Schneider, T. Geppert, M. Hartenfeller, F. Reisen, A. Klenner, M. Reutlinger, V. Hähnke, J. A. Hiss, H. Zettl, S. Keppner, B. Spänkuch, P. Schneider, *Future Med. Chem.* **2011**, *3*, 415–424.
- [15] M. Hartenfeller, G. Schneider, *Methods Mol. Biol.* **2011**, *672*, 299–323.
- [16] M. Hartenfeller, M. Eberle, P. Meier, C. Nieto-Oberhuber, K.-H. Altmann, G. Schneider, E. Jacoby, S. Renner, *J. Chem. Inf. Model.* **2012**, *52*, 1167–1178.
- [17] G. Schneider, M. Hartenfeller, M. Reutlinger, Y. Tanrikulu, E. Proschak, P. Schneider, *Trends Biotechnol.* **2009**, *27*, 18–26.
- [18] D. T. Wong, J. S. Horng, F. P. Bymaster, K. L. Hauser, B. B. Molloy, *Life Sci.* **1974**, *15*, 471–479.
- [19] D. T. Wong, F. P. Bymaster, E. A. Engleman, *Life Sci.* **1995**, *57*, 411–441.
- [20] G. R. Bickerton, G. V. Paolini, J. Besnard, S. Muresan, A. L. Hopkins, *Nat. Chem.* **2012**, *4*, 90–98.
- [21] P. Leeson, *Nature* **2012**, *481*, 455–456.
- [22] P. Schneider, G. Schneider, *QSAR Comb. Sci.* **2003**, *22*, 713–718.
- [23] G. Schneider, W. Neidhart, T. Giller, G. Schmid, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, *111*, 3068–3070; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, *38*, 2894–2896.
- [24] G. Hinton, S. Roweis, *Adv. Neural Inf. Proc. Syst. (NIPS)*, **2002**, *15*, 857–864.
- [25] D. Horvath, C. Jeandanans, *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* **2003**, *43*, 680–690.
- [26] M. Reutlinger, G. Schneider, *J. Mol. Graphics Modell.* **2012**, *34*, 108–117.
- [27] M. Rupp, P. Schneider, G. Schneider, *J. Comput. Chem.* **2009**, *30*, 2285–2296.
- [28] H. M. Berman, J. Westbrook, Z. Feng, G. Gilliland, T. N. Bhat, H. Weissig, I. N. Shindyalov, P. E. Bourne, *Nucleic Acids Res.* **2000**, *28*, 235–242.
- [29] M. Kothe, D. Kohls, S. Low, R. Coli, A. C. Cheng, S. L. Jacques, T. L. Johnson, C. Lewis, C. Loh, J. Nonomiya, A. L. Sheils, K. A. Verdries, T. A. Wynn, C. Kuhn, Y. H. Ding, *Biochemistry* **2007**, *46*, 5960–5971.
- [30] N. M. Heron, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2006**, *16*, 1320–1323.
- [31] G. Jones, P. Willett, R. C. Glen, A. R. Leach, R. Taylor, *J. Mol. Biol.* **1997**, *267*, 727–748.
- [32] G. Jones, P. Willett, R. C. Glen, *J. Mol. Biol.* **1995**, *245*, 43–53.
- [33] T. Y. But, P. H. Toy, *Chem. Asian J.* **2007**, *2*, 1340–1355.
- [34] S. M. Lens, E. E. Voest, R. H. Medema, *Nat. Rev. Cancer* **2010**, *10*, 825–841.
- [35] A. Krishnan, R. Hariharan, S. A. Nair, M. R. Pillai, *Biochem. Pharmacol.* **2008**, *75*, 1924–1934.
- [36] A. Stepulak, W. Rzeski, M. Siflinger, K. Brocke, A. Gratopp, K. Kupisz, L. Turki, C. Ikonomidou, *Cancer Biol. Ther.* **2008**, *7*, 1685–1693.
- [37] A. L. Hopkins, C. R. Groom, A. Alex, *Drug Discovery Today* **2004**, *9*, 430–431.