

# Selektive Inhibierung von mutiertem Ras-Protein durch kovalent bindende Liganden

Joachim Rudolph\* und David Stokoe

Inhibitoren · Krebs · Ras-Mutationen · Wirkstoff-Entwicklung

Als eines der am längsten bekannten Onkogene und am meisten von Mutationen betroffenen Tumorgene ist *Ras* unter Krebsforschern und Klinikern gleichermaßen berüchtigt. Die Ras-Proteine erfüllen in einer Vielzahl von Signalkaskaden, die Wachstum und Differenzierung von Zellen regulieren, die Funktion von GDP-GTP-regulierten binären Schaltern; ausschließlich im GTP-gebundenen, aktiven Zustand werden Signale weitergeleitet. Der Aktivierungszustand von Ras wird von zwei zentralen Enzymklassen gesteuert: Guanin-Nukleotid-Austauschfaktoren (guanine nucleotide exchange factors, GEFs), die den GDP-GTP-Austausch katalysieren, und GTPase-aktivierende Proteine (GTPase activating proteins, GAPs), welche die Hydrolyse von gebundenem GTP zu GDP katalysieren und hierdurch den aktiven Zustand terminieren. Die meisten in Krebserkrankungen vorgefundene, mutierten Ras-Proteine reagieren nicht mehr auf das GTP-hydrolysierende Einwirken der GTPase-aktivierenden Proteine, wodurch Ras chronisch aktiv bleibt.<sup>[1]</sup>

Unter den drei Ras-Isoformen H-Ras, N-Ras und K-Ras sind insbesondere Mutationen der K-Ras-Form häufig in Krebserkrankungen vorzufinden, mit 60% Vorkommen im Bauchspeicheldrüsenkrebs, 34% im Darmkrebs und 16% im Lungenkrebs (Angaben der COSMIC-Datenbank;<sup>[2]</sup> höhere Vorkommen sind in anderen Erhebungen beschrieben). Glycin-12, beteiligt an der Nukleotid-Bindung und der für die Hydrolyse notwendigen Positionierung der  $\gamma$ -Phosphat-Einheit in GTP, ist der am meisten von Mutationen betroffene K-Ras-Aminosäurerest. Hierbei ist die G12D-Mutation die am häufigsten im Darm- und Bauchspeicheldrüsenkrebs und G12C die am meisten im Lungenkrebs beobachtete Form (siehe Tabelle 1).<sup>[2]</sup>

Forschungen widmeten sich den letzten 30 Jahren zahlreichen Strategien zur Unterbindung der Signalfunktion von onkogenem K-Ras, angefangen von direktem Einwirken auf die Ras-Proteinoberfläche bis hin zu weniger direkten Ansätzen wie der Inhibierung von post-translationalen Modifikationen von Ras, dessen Membranlokalisierung oder der

**Tabelle 1:** Krebsarten, denen am häufigsten K-Ras-Mutationen zugrunde liegen, und deren am häufigsten vorkommenden Mutationsformen.<sup>[a]</sup>

	Darmkrebs [%]	Bauchspeicheldrüsenkrebs [%]	Lungenkrebs [%]
K-Ras-Mutationen (gesamt)	33.6	59.8	16.3
davon:			
G12D	35.9	50.3	17.6
G12V	23.3	29.3	20.9
G12C	8.4	2.9	41.9

[a] Daten der COSMIC-Datenbank.<sup>[2]</sup>

Inhibierung von Ras-Effektor-Proteinen im nachgeschalteten Teil der Signalkaskade. Bis heute ergab keine dieser Strategien klinisch zufriedenstellende Lösungen, häufig aufgrund kompensierender Mechanismen, die der Wirksamkeit der verfolgten Ansätze entgegenstehen. Inhibierung von Ras-Effektor-Proteinen, wie Raf und PI3K, erschien einst als ein vielversprechender Ansatz, wird nach neueren Erkenntnissen voraussichtlich aber nur als Teil von Kombinationstherapien ausreichende Wirksamkeit zeigen; dies wird gegenwärtig in klinischen Studien intensiv untersucht.<sup>[3]</sup>

Die Oberfläche von Ras ist relativ flach, und es gibt, abgesehen von der Nukleotid-Bindungstasche, keine offensichtlich zur Ligandenbindung geeigneten Kavitäten. Dennoch gelang es in den letzten 20 Jahren mehreren Forschungsgruppen, funktionell aktive niedermolekulare Liganden zu finden.

Mitte der 1990er Jahre erforschte Schering Phenylhydroxylamin-haltige Ras-Liganden, wie SCH-54292, und konnte mit diesen eine hemmende Wirkung auf den GEF-katalysierten Nukleotid-Austausch nachweisen (GEF = guanosine triphosphate exchange factor, dt.: GTP-Austauschfaktor).<sup>[4]</sup> In den letzten Jahren führten Forschungsgruppen bei Genentech und Vanderbilt unabhängig voneinander auf NMR-Spektroskopie basierende Fragment-Screens durch, die zu den ersten Beispielen von Cokristallstrukturen von Komplexen zwischen niedermolekularen Liganden und Ras führten. Trotz schwacher Affinität dieser Liganden zu Ras ( $> 100 \mu\text{M}$ ) ließ sich eine hemmende Wirkung auf den Nukleotid-Austausch nachweisen.<sup>[4]</sup> Im letzten Jahr beschrieb ein weiteres Forscherteam schwach bindende Ras-Liganden mit inhibierender Wirkung auf die Ras-Raf-Protein-Protein-Wechselwirkung.<sup>[5]</sup> Die erste mit Strukturdaten untermauerte Arbeit

[\*] Dr. J. Rudolph

Discovery Chemistry, Genentech, Inc., One DNA Way  
South San Francisco, CA 94080 (USA)  
E-Mail: rudolph.joachim@gene.com

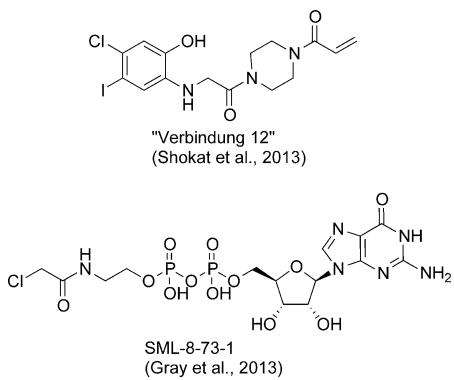
Dr. D. Stokoe

Discovery Oncology, Genentech, Inc., One DNA Way  
South San Francisco, CA 94080 (USA)

zu allosterischen Inhibitoren wurde vor vier Jahren veröffentlicht; die Liganden, Zn<sup>2+</sup> und Cu<sup>2+</sup>-Cyclen, bewirken das Einfrieren eines Ras-GTP-Konformationszustands mit geringerer Affinität zu Effektor-Proteinen.<sup>[4,6]</sup>

Mithilfe eines „Tethering“-Ansatzes zur Auffindung von Ras-Ligandenbindungtaschen gelang der Gruppe von Shokat die Entdeckung selektiver Ras-Liganden der besonders beim Lungenkrebs häufig auftretenden G12C-Mutation. Diese Form eröffnet die Möglichkeit zur spezifischen elektrophilen Bindung an den in dieser Mutation auftretenden Cystein-Rest.<sup>[7]</sup> Durch Screening einer Substanzbank von Disulfid-haltigen Molekülen gelang die Entdeckung einer Verbindungsklasse, die K-Ras-G12C mit hoher Selektivität gegenüber Wildtyp-K-Ras (obgleich letzteres drei Cystein-Reste enthält) und bevorzugt im GDP-gebundenen Zustand bindet. Wie durch Kristallstrukturanalyse nachgewiesen wurde, liegen die gebundenen Verbindungen in einer Falte, die, ausgehend von Cys-12, gegenüber von der Nukleotid-Bindungstasche liegt und durch Verschiebung von Aminosäureresten im „Switch II“-Bereich gebildet wurde. Diese Tasche (Switch II Pocket) ist in anderen publizierten Strukturen von Ras nicht erkennbar, wurde aber interessanterweise den damaligen Erkenntnissen nach zumindest partiell vom Liganden SCH-54292 besetzt, der vor zwei Jahrzehnten beschrieben wurde.<sup>[4]</sup>

Mithilfe mehrerer Verbindungen mit Vinylsulfonamid- oder Acrylamid-haltigen reaktiven Gruppen, z.B. der „Verbindung 12“, konnten die Autoren nachweisen, dass der



EDTA-stimulierte Austausch von GDP gegen GTP ungefähr dreimal langsamer verläuft und der GEF-katalysierte Austausch fast vollkommen zum Erliegen kommt. Weiterhin wurde gezeigt, dass die Ras-Bindung der Ras-Effektor-Proteine BRAF and cRaf in K-Ras-G12C-exprimierenden Zellen geschwächt wird. Dies ist entweder eine Folge der gesunkenen Affinität von Inhibitor-gebundenem K-RasGTP zu Effektor-Proteinen oder die Folge einer durch den Inhibitor bewirkte bevorzugte Aufnahme von GDP gegenüber GTP.

Ras und andere kleine G-Proteine enthalten eine Nukleotid-Bindungstasche zur Aufnahme von GTP und GDP, wobei die Mitwirkung der  $\gamma$ -Phosphat-Einheit in GTP-gebundenem Ras eine Grundvoraussetzung für dessen Aktivität ist. Die Idee einer Entwicklung von GTP-Analoga, ähnlich zu ATP-Analoga im Feld der Kinase-Inhibitoren, wurde häufig diskutiert, letztlich aber wegen der thermodynamisch un-

günstigen Konstellation verworfen: Guanin-Nukleotide zeigen pikomolare Affinität zu Ras, und GTP kommt in sehr hohen (annähernd millimolaren) Konzentrationen im Zytosol vor.

Gray und Mitarbeiter erkannten die Chance, die die am aktiven Zentrum liegende G12C-Mutation bietet (nahe der  $\gamma$ -Phosphat-Einheit von gebundenem nativen GTP), und verfolgten die Idee, durch Bildung einer kovalenten Bindung eines mit einer reaktiven Funktionalität ausgestatteten GTP-Analogs die thermodynamische Barriere zur Nukleotid-Verdrängung zu überwinden.<sup>[8]</sup> Über die Anwendung von strukturbasiertem Design gelangte das Team zur Verbindung „SML-8-73-1“, einem GDP-Analogon, das mit einer elektrophilen  $\alpha$ -Chloracetamid-Einheit verknüpft ist. Massenspektrometrisch wurde eine kovalente Bindungsbildung an der GTP-Bindungstasche von K-Ras-G12C nachgewiesen, und Wasserstoffaustausch-Massenspektrometrie sowie funktionelle biochemische Assays lassen darauf schließen, dass diese Verbindung eine inaktive Form von K-Ras-G12C mit verringriger Affinität zu Effektor-Proteinen stabilisiert.

Da SML-8-73-1 wegen zweier negativ geladener Phosphat-Gruppen nicht zellgängig ist, wurde die  $\beta$ -Phosphat-Einheit mit Alanin-Ester-Phosphoramidat versiegelt, um nach Eintritt in die Zelle enzymatisch entfernt zu werden. Mithilfe zellulärer „Zielwirkungs“-Assays mit der entsprechenden Verbindung, SML-10-70-1, konnten in der Tat Eindringen in Zellen und effektive Bindungskonkurrenz in der GTP-Bindungstasche nachgewiesen werden. In ausgewählten Zelllinien zeigte die Verbindung jedoch nur schwache anti-proliferative Wirkung ( $EC_{50} > 20 \mu\text{M}$ ), und es wurde keine Korrelation zum Ras-G12C-Mutationsstatus beobachtet.

Obleich diese Studien eine Anwendung zum gezielten Eingreifen gegen onkogenes K-Ras versprechen lassen, bleiben einige Fragen unbeantwortet. Beispielsweise wurden die In-vitro-Studien mit nichtmodifiziertem Ras durchgeführt, und es wäre interessant zu wissen, ob ähnliche Effekte mit modifiziertem Ras erzielt werden können. Für Verbindungen mit bevorzugter Bindung an GDP-Ras ist der Zeitverlauf der GTP-Hydrolyse unter Umständen von entscheidender Bedeutung. Die beschriebene Halbwertzeit von Ras (ca. 24 h) ist nicht wesentlich länger als die Hydrolysegeschwindigkeit von GTP in mutiertem Ras (8–17 h mit  $k_{\text{cat}} \approx 10^{-3}–2 \times 10^{-3} \text{ min}^{-1}$ ), und neu biosynthetisiertes Ras würde bevorzugt das in höherem Maße vorhandene GTP binden. Des Weiteren ist die Frage der K-Ras-Selektivität gegenüber dem gesamten Zell-Proteom offen. Während die von Gray et al. beschriebenen Verbindungen keine Selektivität gegenüber K-Ras-G12C-exprimierenden Zellen zeigten, scheinen die Verbindungen von Shokat et al. selektiver zu sein. Es wäre jedoch interessant zu wissen, ob in einer erweiterten Palette von K-Ras-G12C-exprimierenden Zellen der Anspruch hoher Selektivität aufrecht erhalten werden kann. Trotz dieser offenen Fragen halten wir die von den Autoren verfolgten Ansätze für hochinteressant, und es gibt Anlass zur Hoffnung, dass sich derzeitige Hürden durch weitere Optimierung überwinden lassen werden.

Die kovalente Modifizierung wurde vor vielen Jahren als Strategie vorgeschlagen, um das fundamentale thermodynamische Problem der Inhibierung von Protein-Protein-Wech-

selwirkungen mit niedermolekularen Verbindungen zu überwinden,<sup>[9]</sup> und dieser Ansatz, von den Forschungsgruppen um Shokat und Gray in eleganter Weise zur Anwendung gebracht, erscheint insbesondere angebracht bei Krankheiten mit hohem therapeutischem Bedarf, z.B. Krebserkrankungen, denen Ras-Mutationen zugrunde liegen. Während die Zahl der K-Ras-G12C-exprimierenden Tumore lediglich ca. 10% aller vorgefundenen K-Ras-Mutationen entspricht, würden 7% aller Lungenkrebs- und 3% aller Bauchspeicheldrüsenkrebs- und Darmkrebs-Patienten als Träger dieser Mutationen von entsprechenden Wirkstofftherapien profitieren. Es gibt nicht viele Beispiele für Mutations-selektive Therapien in der Krebsbehandlung, und eine Weiterführung dieser vielversprechenden neuen Ansätze erscheint deshalb in hohem Maße gerechtfertigt. Des Weiteren richtet die Arbeit von Shokat et al. die Aufmerksamkeit auf den konformativ dynamischen Charakter des Ras-Proteins und stellt die weit verbreitete Annahme infrage, dass Ras keine Bindungsstellen außerhalb der Nukleotid-Bindungstasche besitze. Es bleibt abzuwarten, ob sich diese oder andere transiente Bindungstaschen zur Bindung von niedermolekularen Verbindungen auch ohne die Mitwirkung eines benachbarten nukleophilen Zentrums nutzen lassen, wodurch sich das Therapiepotenzial auch auf andere Ras-Mutationsformen außerhalb von G12C ausweiten ließe.

Eingegangen am 9. Januar 2014  
Online veröffentlicht am 3. März 2014

- 
- [1] S. Gysin, M. Salt, A. Young, F. McCormick, *Genes Cancer* **2011**, *2*, 359–372.
  - [2] COSMIC database: <http://cancer.sanger.ac.uk>.
  - [3] C. D. Britten, *Cancer Chemother. Pharmacol.* **2013**, *71*, 1395–1409.
  - [4] Übersicht über Ras-Binder, die die Literatur bis 2012 abdeckt: W. Wang, G. Fang, J. Rudolph, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2012**, *22*, 5766–5776.
  - [5] F. Shima, Y. Yoshikawa, M. Ye, M. Araki, S. Matsumoto, J. Liao, L. Hu, T. Sugimoto, Y. Ijiri, A. Takeda, Y. Nishiyama, C. Sato, S. Muraoka, A. Tamura, T. Osoda, K.-i. Tsuda, T. Miyawaka, H. Fukunishi, J. Shimada, T. Kumasaka, M. Yamamoto, T. Kataoka, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2013**, *110*, 8182–8187.
  - [6] H. R. Kalbitzer, I. C. Rosnizeck, C. E. Munte, S. P. Narayanan, V. Kropf, M. Spoerner, *Angew. Chem.* **2013**, *125*, 14492–14496; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52*, 14242–14246.
  - [7] J. M. Ostrem, U. Peters, M. L. Sos, J. A. Wells, K. M. Shokat, *Nature* **2013**, *503*, 548–551.
  - [8] S. M. Lim, K. D. Westover, S. B. Ficarro, R. A. Harrison, H. G. Choi, M. E. Pacold, M. Carrasco, J. Hunter, N. D. Kim, T. Xie, T. Sim, P. A. Jänne, M. Meyerson, J. A. Marto, J. R. Engen, N. S. Gray, *Angew. Chem.* **2014**, *126*, 203–208; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53*, 199–204.
  - [9] J. C. Way, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2000**, *4*, 40–46.