

Stabilisierung eines cysteinreichen Kegelschneckentoxins, MrIA, in Form eines 1,2,3-Triazol-Disulfidbrückenmimetikums**

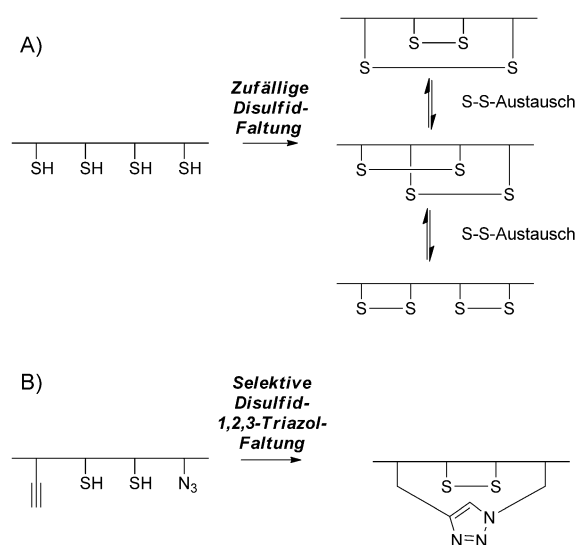
Alessandro Gori, Ching-I A. Wang, Peta J. Harvey, K. Johan Rosengren, Rebecca F. Bhola, Maria L. Gelmi, Renato Longhi, Macdonald J. Christie, Richard J. Lewis, Paul F. Alewood* und Andreas Brust*

Abstract: Die Synthese von Disulfidbrückenmimetika ist eine wichtige Strategie zur Optimierung disulfidreicher Peptide beim Wirkstoff-Design. Wir beschreiben Mimetika des Conotoxins MrIA, die durch selektiven Austausch einzelner Disulfidbindungen gegen Brücken aus einem 1,4-disubstituierten 1,2,3-Triazol erhalten wurden. Eine sequenzielle, Kupfer-katalysierte Azid-Alkin-Klick-Reaktion (CuAAC) mit nachfolgender Disulfidbildung führte regioselektiv zu hybriden Triazol-Disulfid-Analoga von MrIA. Mimetika, in denen Triazol die Cys4-Cys13-Disulfidbindung ersetzte, behielten ihre Tertiärstruktur sowie die volle In-vitro- und In-vivo-Aktivität als Inhibitoren der Noradrenalin-Wiederaufnahme bei. Diese Mimetika sind resistent gegen Reduktion mit Glutathion, was zu einer verbesserten Plasmastabilität führt und dadurch interessant für die Wirkstoff-Entwicklung ist.

Die Zielrezeptoren von Giftpeptiden sind G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCRs), Transporter und Ionenkanäle;^[1] eine Reihe solcher Peptide hat bereits klinische Testphasen erreicht.^[2] Diese Peptide enthalten Disulfidbrücken, die ein stabiles Gerüst für gut definierte Strukturen und topologische Orientierung ihrer Pharmakophore ergeben, wodurch stabile, potente und selektive Peptide resultieren.^[3]

Disulfidreiche Peptide sind relativ stabil gegen Proteasen, sind jedoch anfällig für einen „S-S-Austausch“^[4] über Thiol-

Disulfid-Austausch,^[4b,5] was in struktureller Umlagerung, geringerer Aktivität^[6] und zunehmender Schleifengröße resultiert und so den enzymatischen Abbau in vivo fördert.^[6,7] Orthogonale Cystein-Schutzgruppenstrategien^[8] ermöglichen regioselektive Disulfid-Faltung, aber das inhärente Potenzial für den S-S-Austausch verbleibt (Schema 1 A).^[9] Stabile Di-



Schema 1. A) Disulfid-Faltung führt zu mehreren Isomeren, disulfidreiche Peptide sind anfällig für „S-S-Austausch“. B) Disulfid-/1,2,3-Triazol-Faltung liefert nur eines der möglichen Isomere.

sulfidbrückenmimetika^[10] können diesen Austausch verhindern, allerdings mangelt es ihnen an breiter Anwendbarkeit wegen ihrer komplexen Chemie oder der Unvereinbarkeit der mimetischen Gruppierung mit Bioaktivität.^[10a] Selenocysteinsubstitution ist die tragfähigste Strategie^[9b,10f,11] und hat bereits zur regioselektiven Disulfid-Faltung in Kombination mit erhöhter Stabilität gegen Reduktion geführt.^[7,12]

Der Ersatz von Disulfidbrücken durch 1,4-disubstituierte 1,2,3-Triazole,^[13] die mithilfe einer Kupfer-katalysierten Azid-Alkin-Klick-Reaktion (CuAAC) synthetisiert wurden,^[14] könnte in Anbetracht der Stabilität der Triazole gegen proteolytische Hydrolyse in vivo^[15] nützlich sein. Ihre Einführung könnte Disulfidaustausch verhindern und die Faltung verbleibender Cysteinreste beschleunigen, wie es in α -Selenoconotoxinen beobachtet wurde.^[12a]

Wir stellen hier eine Strategie vor (Schema 1 B), die Disulfidbrückenbildung mit orthogonaler CuAAC^[14] verbindet.

[*] Dr. C. Wang, Dr. P. J. Harvey, Prof. R. J. Lewis, Prof. P. F. Alewood, Dr. A. Brust
Institute of Molecular Bioscience
The University of Queensland, St Lucia 4072 (Australien)
E-Mail: p.alewood@imb.uq.edu.au
a.brust@imb.uq.edu.au

Dr. A. Gori, R. Longhi
Istituto di Chimica del Riconoscimento Molecolare
Consiglio Nazionale delle Ricerche, and (Italien)

Dr. K. J. Rosengren
School of Biomedical Science
The University of Queensland (Australien)

R. F. Bhola, Prof. M. J. Christie
Discipline of Pharmacology
University of Sydney (Australien)

Prof. M. L. Gelmi
Dipartimento di Scienze Farmaceutiche
Università degli Studi di Milano, and (Italien)

[**] Wir danken dem NHMRC für finanzielle Unterstützung (Program Grant No. 351446).

Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag (experimentelle Details) sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.201409678> zu finden.

Dies ermöglichte die regioselektive Synthese von Triazolmimetika von Inhibitoren der Noradrenalin-Wiederaufnahme (χ -Conotoxine MrIA und **1**) mit verbesserter Stabilität in thiolreicher Umgebung (Hintergrundinformationen (SI): Abbildungen 7S–10S).

Acht Analoga (**2–9**) von **1** wurden mithilfe von Fluorenylmethoxycarbonyl(Fmoc)-Chemie synthetisiert, und zwar durch individuellen Ersatz der Cys5-Cys10- oder der Cys4-Cys13-S-S-Bindung mit einer Triazolbrücke, während die zweite S-S-Bindung beibehalten wurde (Schema 2). Die 1,2,3-Triazole wurden mit Direktionalität in Abhängigkeit von der Positionierung der Azid/Alkin-Bausteine eingebaut (siehe Schema 2 und Tabelle 1: Azid in Richtung C-terminal (**2,4,6,8**) oder Azid in Richtung N-terminal (**3,5,7,9**)). Brückenflexibilität wurde eingeführt, indem entweder (*S*)-2-Amino-3-azidopropionsäure (**2,3,6,7**) oder (*S*)-2-Amino-4-azidobutansäure (**4,5,8,9**) verwendet wurde. Propargylglycin [Prg] wurde als Alkinkomponente für die Triazolbildung genutzt.

Cysteinreste wurden mit *S*-Acetamidomethyl(Acm)-Schutzgruppe eingeführt, und die Peptid-Faltung erfolgte durch Cyclisierung zum 1,2,3-Triazol über CuAAC (CuSO₄/Ascorbinsäure generieren in situ den Cu^I-Katalysator);^[14] dem schloss sich die Disulfidbrückenbildung durch Iod in

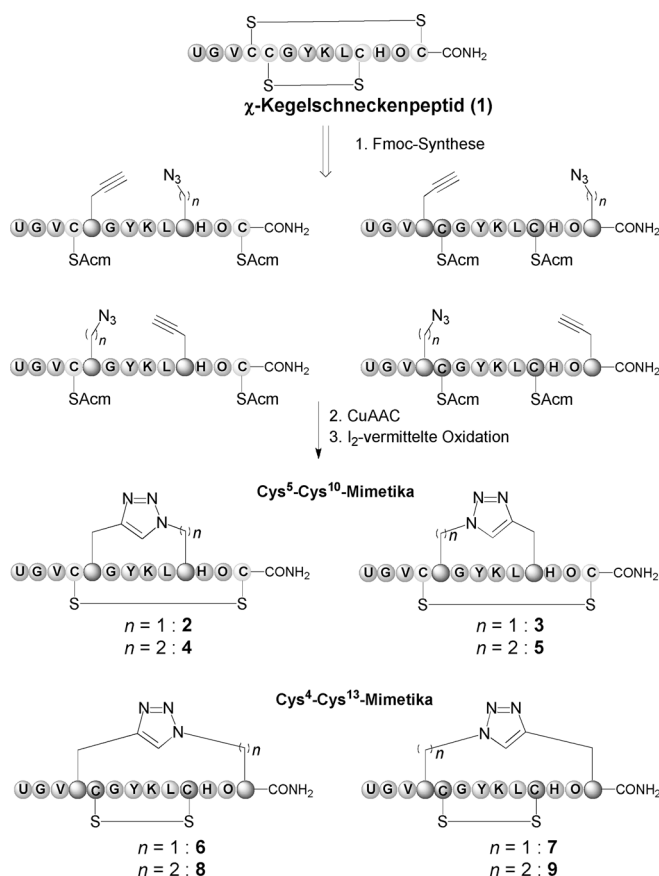
Tabelle 1: Noradrenalin-Wiederaufnahme-Inhibition durch hybride Triazol-Disulfid-Analoga (**2–9**) im Vergleich mit Stammpeptid (MrIA/**1**).

	Sequenz ^[a]	IC ₅₀ [μ M] ^[f]
MrIA	NGVCCGYKLCHOC ^[b]	2.45 \pm 0.07
1	UGVCCGYKLCHOC ^[b,c]	2.55 \pm 0.18
2	UGVC[Prg]GYKL[Aza]HOC ^[d,f]	52.40 \pm 5.50
3	UGVC[Aza]GYKL[Prg]HOC ^[d,f]	60.60 \pm 14.8
4	UGVC[Prg]GYKL[Aha]HOC	41.20 \pm 5.80
5	UGVC[Aha]GYKL[Prg]HOC	30.00 \pm 2.00
6	UGV[Prg]CGYKLCHO[Aza]	3.84 \pm 0.50
7	UGV[Aza]CGYKLCHO[Prg]	1.73 \pm 0.30
8	UGV[Prg]CGYKLCHO[Aha]	8.90 \pm 1.00
9	UGV[Aha]CGYKLCHO[Prg]	1.10 \pm 0.25

[a] C-terminal amidiert. [b] Disulfidverbrückung (1–4, 2–3), O = Hydroxyprolin. [c] U = Pyroglutaminsäure. [d] [Prg] = Propargylglycin, [Aza] = Azidoalanin. [e] [Aha] = Azidohomoalanin. [f] In **2–9** wurde eine 1,2,3-Triazolbrücke zwischen [Aza]/[Aha]- und [Prg]-Resten und eine S-S-Brücke zwischen verbleibendem Cystein gebildet.

Methanol/Wasser an.^[16] Dies lieferte Hybridpeptide (**2–9**) in guter Ausbeute (SI: Tabelle 2S). Die Peptide wurden in einem funktionellen Noradrenalin-Wiederaufnahme-Assay untersucht und mit **1** und dem gleich aktiven MrIA verglichen. Tabelle 1 zeigt, dass die Strategie voll funktionale Mimetika des Stammpeptids liefert, wenn die Triazolgruppe korrekt positioniert wurde.

Vollständige In-vitro-Aktivität wurde beibehalten für Peptide mit einem Cys4-Cys13-Disulfidbrückenersatz (**→6–9**), während durch Modifikationen der Cys5-Cys10-Brücke des Noradrenalin-Transporters (NET) produziert wurden. Die aktivsten Analoga **7** und **9** waren auch gleichermaßen aktiv wie MrIA in einer Studie zu neuropathischem Schmerz unter Verwendung eines Rattenmodells mit verletztem Ischiasnerv (SI: Abbildungen 5S und 6S).^[17] Der Aktivitätsverlust in **2–5** wird durch die Empfindlichkeit der Schleifenregion gegen topologische Veränderungen verursacht,^[17,18] deren Auftreten wahrscheinlich ist, wenn ein 1,2,3-Triazolring die Cys4-Cys10-Disulfidbrücke ersetzt. Die Orientierung der Triazolgruppe war wichtig für die Aktivität bezüglich NET (vgl. Peptide **7, 9** mit **6, 8**). Dagegen spielte die Länge der Brücke, die sich um eine CH₂-Gruppe unterschied, eine untergeordnete Rolle (vgl. **7** mit **9**). Diese Struktureffekte wurden durch einen Sekundäre-H α -NMR-Verschiebungs-Vergleich von MrIA mit den Analoga **2–9** untersucht;^[17] diese Untersuchung ergab, dass die weniger aktiven Analoga **2–5** eine starke Verzerrung der Peptidhauptkette aufwiesen (Abbildung 1A). Im Unterschied dazu zeigten die aktiven Analoga **6–9** sehr gute Übereinstimmung der H α -Verschiebung mit der von MrIA, besonders in der entscheidenden GYKL-Schleifenregion^[18] (Abbildung 1B). Die aktivsten Analoga (**7, 9**) waren hoch konsistent mit MrIA, während die etwas weniger aktiven Isomere (**6, 8**), mit einer invertierten Triazolstruktur, eine schwache Störung der H α -Verschiebung des Peptidrückgrats aufwiesen. Eine 3D-NMR-Struktur für das aktivste Peptid **9** wurde mit der von MrIA verglichen (Abbildung 1C). Die Überlagerung der Faltblattregion (Wurzel aus der mittleren quadratischen Abweichung (RMSD): 0.3 Å) und der Pharmakophor-Seitenketten (Tyr7,



Schema 2. Selektiver Disulfidbrückenersatz in **1** durch 1,4-disubstituierte 1,2,3-Triazole führt zu den Produkten **2–9**. Cystein wurde substituiert durch [Aza]/[Aha] ($n=1/2$) und [Prg] als Alkinegegenstück. Vorstufen wurden durch CuAAC cyclisiert, gefolgt von I₂-initiiertem Acm-Entschützung/Oxidation, die die Produkte **2–9** lieferte.

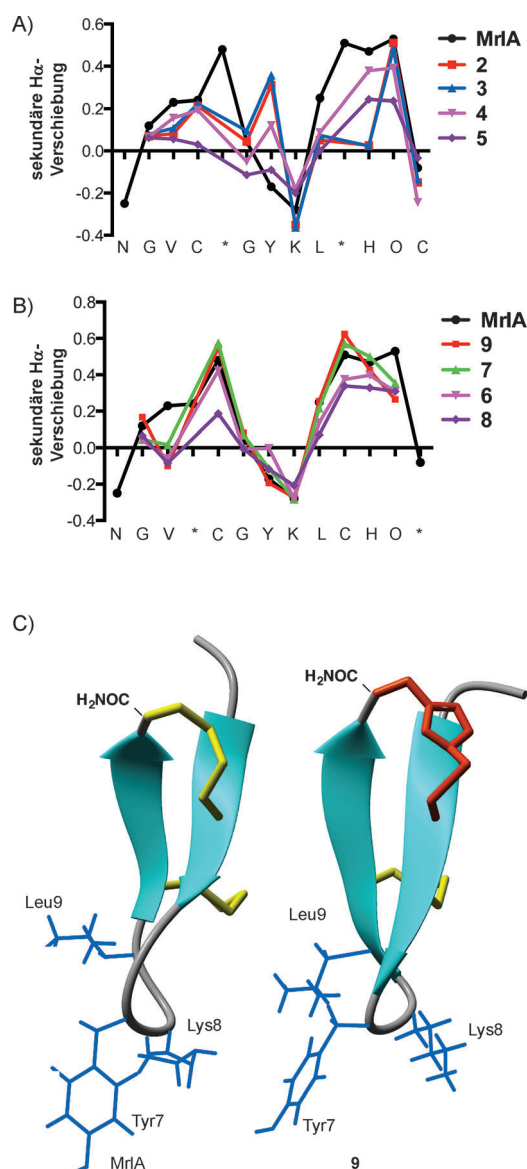


Abbildung 1. NMR-Spektroskopie von 1,2,3-Triazol-Disulfid-Hybridpeptiden im Vergleich mit MrIA. Veränderung der sekundären H_α -Verschiebung A) der inaktiven Analoga 2–5 und B) der aktiven Analoga 6–9. C) NMR-Struktur von MrIA (links) und 1,2,3-Triazolanalogen 9 (rechts). Disulfide in Gelb und 1,2,3-Triazol in Rot.

Lys8 und Leu9) zeigte eine starke strukturelle Identität auf (RMSD: 0.24 Å über das Rückgrat und die β -C-Atome), mit einer Orientierung der Seitenketten, die identisch zu der für MrIA und **1** beschrieben ist.^[17,19] Disulfidreiche Peptide haben rigide Strukturen und schränken so den Zugang zu spaltbaren Amidbindungen ein; dies resultiert in einer erhöhten Stabilität gegen Proteolyse.^[20] Diese Tatsache spricht dafür, dass Peptidhydrolyse möglicherweise partielle(n) Disulfidreduktion/Disulfidaustausch umfasst.^[4a] Tatsächlich geht Peptid **1** Isomerbildung, partielle Reduktion sowie Additionsprodukt- und Dimerbildung in der Gegenwart von Thiolen (GSH) ein und ist instabil in Plasma^[21] (Abbildung 2; SI: Abbildung 7S). In den Hybriden 2–9 hat die Einführung einer stabilen Triazolbrücke S-S-Umlagerungen verhindert

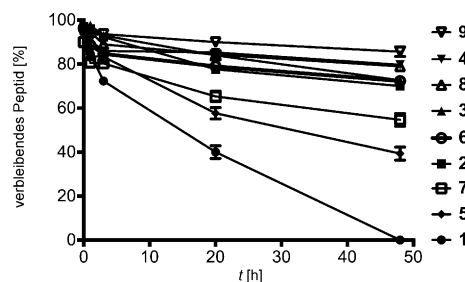


Abbildung 2. Stabilität von Peptid **1** und den hybriden Triazol-Disulfid-Analoga 2–9 im Plasma aus Ratten.

und die Tendenz zur Reduktion der verbleibenden Disulfidbindungen herabgesetzt. Ein Stabilitätsvergleich der Peptide 2–9 mit dem Stammolekül **1** zeigte, dass alle Triazol-Hybridmoleküle (2–9) verbesserte Plasmastabilität mit Halbwertszeiten von über zwei Tagen aufwiesen, während **1** in weniger als zwei Tagen komplett abgebaut wurde (Abbildung 2). Eine erhöhte Stabilität gegen Disulfidaustausch in der Gegenwart von Glutathion wurde für Peptide mit einer Triazolsubstitution von Cys4-Cys13 (6–9) gefunden. Die Cys5-Cys10-Triazol-substituierten Peptide (2–5) zeigten eine höhere Plasmastabilität als **1**, waren aber immer noch zugänglich für Disulfidaustausch in einer Umgebung mit hoher Thiolkonzentration (SI: Abbildungen 8S–10S).

Eine Strategie für die selektive Faltung disulfidreicher Peptide durch Kombination von CuAAC und Disulfidbildung wurde mit dem klinischen Kandidaten **1** untersucht. Die Peptidmimetika 6–9, mit einem 1,2,3-Triazol als Ersatz für Cys4-Cys13, zeigten verbesserte Stabilität gegen Reduktion und behielten zudem ihre Peptidstruktur sowie In-vitro- und In-vivo-Aktivität bei. Mimetika der Cys5-Cys10-Disulfidbindung in 2–5 waren wegen der strukturellen Empfindlichkeit der Pharmakophorregion nicht erfolgreich.^[17] Eine eindeutige Erhöhung der Plasmastabilität wurde für alle Hybridpeptide 2–9 beobachtet, was darauf schließen lässt, dass diese Strategie breit für die Verbesserung von cysteinreichen Peptiden eingesetzt werden kann.

Eingegangen am 1. Oktober 2014

Online veröffentlicht am 5. Dezember 2014

Stichwörter: Disulfidmimetika · Klick-Chemie · Peptidmimetika · Struktur-Aktivitäts-Beziehungen · Wirkstoff-Design

- [1] a) R. J. Lewis, S. Dutertre, I. Vetter, M. J. Christie, *Pharmacol. Rev.* **2012**, *64*, 259–298; b) K. B. Akondi, M. Muttenthaler, S. Dutertre, Q. Kaas, D. J. Craik, R. J. Lewis, P. F. Alewood, *Chem. Rev.* **2014**, *114*, 5815–5847.
- [2] G. F. King, *Expert Opin. Biol. Ther.* **2011**, *11*, 1469–1484.
- [3] a) J. Gehrman, P. F. Alewood, D. J. Craik, *J. Mol. Biol.* **1998**, *278*, 401–415; b) V. Laverne, R. J. Taft, P. F. Alewood, *Curr. Top. Med. Chem.* **2012**, *12*, 1514–1533; c) L. J. Drew, F. Rugiero, P. Cesare, J. E. Gale, B. Abrahamsen, S. Bowden, S. Heinzmann, M. Robinson, A. Brust, B. Colless, R. J. Lewis, J. N. Wood, *PLoS One* **2007**, *2*, e515.
- [4] a) M. Góngora-Benítez, J. Tulla-Puche, F. Albericio, *Chem. Rev.* **2014**, *114*, 901–926; b) C. J. Armishaw, N. L. Daly, S. T. Nevin,

- D. J. Adams, D. J. Craik, P. F. Alewood, *J. Biol. Chem.* **2006**, *281*, 14136–14143.
- [5] J.-Y. Chang, B.-Y. Lu, L. Li, *Anal. Biochem.* **2005**, *342*, 78–85.
- [6] J. R. Claybaugh, C. F. T. Uyehara, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1993**, *689*, 250–268.
- [7] N. Darby, T. E. Creighton, *Mol. Biotechnol.* **1997**, *7*, 57–77.
- [8] a) L. Moroder, D. Besse, H.-J. Musiol, S. Rudolph-Boehner, F. Sideler, *Biopolymers* **1996**, *40*, 207–234; b) S. Flemer, Jr., *Mini-Rev. Org. Chem.* **2009**, *6*, 196–210; c) I. Vetter, Z. Dekan, O. Knapp, D. J. Adams, P. F. Alewood, R. J. Lewis, *Biochem. Pharmacol.* **2012**, *84*, 540–548; d) Z. Dekan, M. Mobli, M. W. Pennington, E. Fung, E. Nemeth, P. F. Alewood, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53*, 2931–2934; *Angew. Chem.* **2014**, *126*, 2975–2978.
- [9] a) G. Bulaj, B. M. Olivera, *Antioxid. Redox Signaling* **2008**, *10*, 141–156; b) T. S. Han, M.-M. Zhang, K. H. Gowd, A. Walewska, D. Yoshikami, B. M. Olivera, G. Bulaj, *ACS Med. Chem. Lett.* **2010**, *1*, 140–144.
- [10] a) R. M. J. Liskamp, D. T. S. Rijkers, J. A. W. Kruijtz, J. Kemmink, *ChemBioChem* **2011**, *12*, 1626–1653; b) M. Muttenthaler, A. Andersson, A. A. D. de, Z. Dekan, R. J. Lewis, P. F. Alewood, *J. Med. Chem.* **2010**, *53*, 8585–8596; c) A. D. de Araujo, M. Mobli, G. F. King, P. F. Alewood, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 10298–10302; *Angew. Chem.* **2012**, *124*, 10444–10448; d) Z. Dekan, I. Vetter, N. L. Daly, D. J. Craik, R. J. Lewis, P. F. Alewood, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 15866–15869; e) C. A. MacRaid, J. Illesinghe, B. J. Van Lierop, A. L. Townsend, M. Chebib, B. G. Livett, A. J. Robinson, R. S. Norton, *J. Med. Chem.* **2009**, *52*, 755–762; f) A. D. de Araujo, M. Mobli, J. Castro, A. M. Harrington, I. Vetter, Z. Dekan, M. Muttenthaler, J. Wan, R. J. Lewis, G. F. King, S. M. Brierley, P. F. Alewood, *Nat. Commun.* **2014**, *5*, 3165–3176.
- [11] C. J. Armishaw, N. L. Daly, S. T. Nevin, D. J. Adams, D. J. Craik, P. F. Alewood, *J. Pept. Sci.* **2004**, *10*, 121–121.
- [12] a) M. Muttenthaler, S. T. Nevin, A. A. Grishin, S. T. Ngo, P. T. Choy, N. L. Daly, S.-H. Hu, C. J. Armishaw, C.-I. A. Wang, R. J. Lewis, J. L. Martin, P. G. Noakes, D. J. Craik, D. J. Adams, P. F. Alewood, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 3514–3522; b) R. Bhattacharyya, D. Pal, P. Chakrabarti, *Protein Eng. Des. Sel.* **2004**, *17*, 795–808; c) K. S. Jensen, R. E. Hansen, J. R. Winther, *Antioxid. Redox Signaling* **2009**, *11*, 1047–1058.
- [13] a) M. Empting, O. Avrutina, R. Meusinger, S. Fabritz, M. Reinwarth, M. Biesalski, S. Voigt, G. Buntkowsky, H. Kolmar, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 5207–5211; *Angew. Chem.* **2011**, *123*, 5313–5317; b) K. Holland-Nell, M. Meldal, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 5204–5206; *Angew. Chem.* **2011**, *123*, 5310–5312; c) R. Kowalczyk, P. W. R. Harris, M. A. Brimble, K. E. Callon, M. Watson, J. Cornish, *Bioorg. Med. Chem.* **2012**, *20*, 2661–2668; d) M. Roice, I. Johannsen, M. Meldal, *QSAR Comb. Sci.* **2004**, *23*, 662–673.
- [14] M. Meldal, C. W. Tornøe, *Chem. Rev.* **2008**, *108*, 2952–3015.
- [15] C. W. Tornøe, S. J. Sanderson, J. C. Mottram, G. H. Coombs, M. Meldal, *J. Comb. Chem.* **2004**, *6*, 312–324.
- [16] E. V. Kudryavtseva, M. V. Sidorova, M. V. Ovchinnikov, Z. D. Bespalova, V. N. Bushuev, *J. Pept. Res.* **1997**, *49*, 52–58.
- [17] A. Brust, E. Palant, D. E. Croker, B. Colless, R. Drinkwater, B. Patterson, C. I. Schroeder, D. Wilson, C. K. Nielsen, M. T. Smith, D. Alewood, P. F. Alewood, R. J. Lewis, *J. Med. Chem.* **2009**, *52*, 6991–7002.
- [18] A. Brust, C.-I. A. Wang, N. L. Daly, J. Kennerly, M. Sadeghi, M. J. Christie, R. J. Lewis, M. Mobli, P. F. Alewood, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52*, 12020–12023; *Angew. Chem.* **2013**, *125*, 12242–12245.
- [19] K. P. R. Nilsson, E. S. Lovelace, C. E. Caesar, N. Tynngard, P. F. Alewood, H. M. Johansson, I. A. Sharpe, R. J. Lewis, N. L. Daly, D. J. Craik, *Biopolymers* **2005**, *80*, 815–823.
- [20] a) M. A. Fázio, V. X. Oliveira, Jr., P. Bulet, M. T. M. Miranda, S. Daffre, A. Miranda, *Biopolymers* **2006**, *84*, 205–218; b) F. Zoller, T. Schwaebel, A. Markert, U. Haberkorn, W. Mier, *ChemMedChem* **2012**, *7*, 237–247; c) A. C. Conibear, K. J. Rosengren, N. L. Daly, S. T. Henriques, D. J. Craik, *J. Biol. Chem.* **2013**, *288*, 10830–10840; d) L. T. Nguyen, J. K. Chau, N. A. Perry, L. de Boer, S. A. J. Zaat, H. J. Vogel, *PLoS One* **2010**, *5*, e12684.
- [21] Z. Dekan, C.-I. A. Wang, R. K. Andrews, R. J. Lewis, P. F. Alewood, *Org. Biomol. Chem.* **2012**, *10*, 5791–5794.