



Kovalent-allosterische Kinase-Inhibitoren**

Jörn Weisner, Rajesh Gontla, Leandi van der Westhuizen, Sebastian Oeck, Julia Ketzer, Petra Janning, André Richters, Thomas Mühlenberg, Zhizhou Fang, Abu Taher, Verena Jendrossek, Stephen C. Pelly, Sebastian Bauer, Willem A. L. van Otterlo und Daniel Rauh*

Abstract: Proteinkinasen repräsentieren wichtige Knotenpunkte intrazellulärer Signalwege und sind somit an vielen physiologischen und pathologischen Prozessen beteiligt. Konformations-abhängige Eigenschaften dienen hierbei der Feinregulation ihrer enzymatischen Aktivität und Katalyse-unabhängigen Funktionen. Die Stabilisierung definierter Konformationen ermöglicht detaillierte Analysen solcher Konformations-abhängiger Funktionen. Hier beschreiben wir das strukturbasierte Design, die Synthese und die Charakterisierung Pleckstrin-Homologie(PH)-Domänen-abhängiger Akt-Inhibitoren, die einen neuartigen kovalent-allosterischen Bindungsmodus aufweisen. Durch die kovalente Modifizierung bestimmter Cysteine stabilisieren diese Moleküle die inaktive Kinasekonformation irreversibel. Ihre beträchtliche Inhibitorwirkung und Selektivität bezüglich verwandter Proteinkinasen machen sie zu einem neuartigen Hilfsmittel für die Erforschung chemisch-biologischer und medizinischer Fragestellungen.

In den letzten beiden Jahrzehnten sind Proteinkinasen zu zentralen Zielstrukturen der modernen Wirkstoff-Forschung geworden.^[1] Es konnten kleine organische Moleküle entwickelt werden, die fehlregulierte Kinasen bei Krebs, Autoimmun- sowie neurodegenerativen Erkrankungen adressieren und modulieren.^[2] Trotz der generell hohen Strukturhomologie innerhalb der Kinase-Familie, besonders im Fall der ATP- und Substratbindungstasche, konnten potente und selektive orthosterische Inhibitoren identifiziert werden. Zum Beispiel sind Erlotinib und Gefitinib von der FDA zugelassene ATP-kompetitive Wirkstoffe und finden Anwendung in

der Erstlinientherapie des nicht-kleinzelligen Lungenkarzinoms.^[3] Darüber hinaus wurden allosterische Inhibitoren entwickelt, die enzymatisch inaktive Konformationen stabilisieren,^[4] sowie kovalent bindende Moleküle, die weniger konservierte, nicht-katalytische Cysteine adressieren. Für beide Substanzklassen konnten verbesserte Selektivitäten und inhibitorische Aktivitäten nachgewiesen werden.^[5] Dies resultiert in erhöhter Wirksamkeit und vermindernden Nebenwirkungen bei der gezielten und personalisierten Therapie von Krebspatienten.^[6]

Die Proteinkinase Akt ist ein Multidomänenenzym und hat außer der katalytisch aktiven Kinasedomäne noch eine regulatorische Pleckstrin-Homologie(PH)-Domäne. Im Zuge der Stimulation und Aktivierung Wachstumsfaktor-abhängiger Signalwege dient die PH-Domäne der Rekrutierung an die Zellmembran, wo Akt von der Kinase PDK1 phosphoryliert und aktiviert wird.^[7] Der PI3K/Akt-Signalweg reguliert einen Großteil aller zellulären Prozesse, zu denen auch die so genannten „hallmarks of cancer“ gehören.^[8] Die Fehlregulation von Akt ist deshalb oftmals mit der neoplastischen Transformation gesunder Zellen sowie mit einer erhöhten Resistenz zahlreicher solider Tumoren gegenüber Chemo- und Radiotherapie verbunden.^[9] Wegen der zentralen Rolle von Akt in vielen Signalwegen und der häufigen Fehlregulation in Tumoren ist diese Proteinkinase ein besonders interessantes Zielmolekül bei der Behandlung von Krebspatienten.^[8] Allosterische, PH-Domänen-abhängige Akt-Inhibitoren weisen einen einzigartigen Bindungsmodus auf. Liganden wie MK-2206,^[10] dessen Eigenschaften und Wirksamkeit derzeit in klinischen Studien untersucht werden,

[*] J. Weisner,^[+] Dr. R. Gontla,^[+] Dr. A. Richters, Dr. Z. Fang, Prof. Dr. D. Rauh
Technische Universität Dortmund
Fakultät für Chemie und Chemische Biologie
Otto-Hahn-Straße 6, 44227 Dortmund (Deutschland)
E-Mail: daniel.rauh@tu-dortmund.de

L. van der Westhuizen, Dr. A. Taher, Dr. S. C. Pelly,
Prof. Dr. W. A. L. van Otterlo
Department of Chemistry and Polymer Sciences
Stellenbosch University, Matieland (Südafrika)

S. Oeck, Prof. Dr. V. Jendrossek
Institut für Zellbiologie (Tumorforschung), Abteilung Molekulare Zellbiologie, Universität Duisburg-Essen, Medizinische Fakultät (Deutschland)

J. Ketzer, Dr. T. Mühlenberg, Prof. Dr. S. Bauer
Abteilung Medizinische Onkologie, Sarkomzentrum, Westdeutsches Tumorzentrum, Universität Duisburg-Essen, Medizinische Fakultät (Deutschland)

und
Deutsches Konsortium für Translationale Krebsforschung (DKTK),
Heidelberg (Deutschland)
Dr. P. Janning
Max-Planck-Institut für Molekulare Physiologie
Abteilung Chemische Biologie, Dortmund (Deutschland)

[†] Diese Autoren haben zu gleichen Teilen zu der Arbeit beigetragen.
[**] Diese Arbeit wurde unterstützt vom Bundesministerium für Bildung und Forschung (NGFNPlus und e:Med) (BMBF-Förderkennzeichen: 01GS08104, 01ZX1303C) und von der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG).

Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.201502142> zu finden.

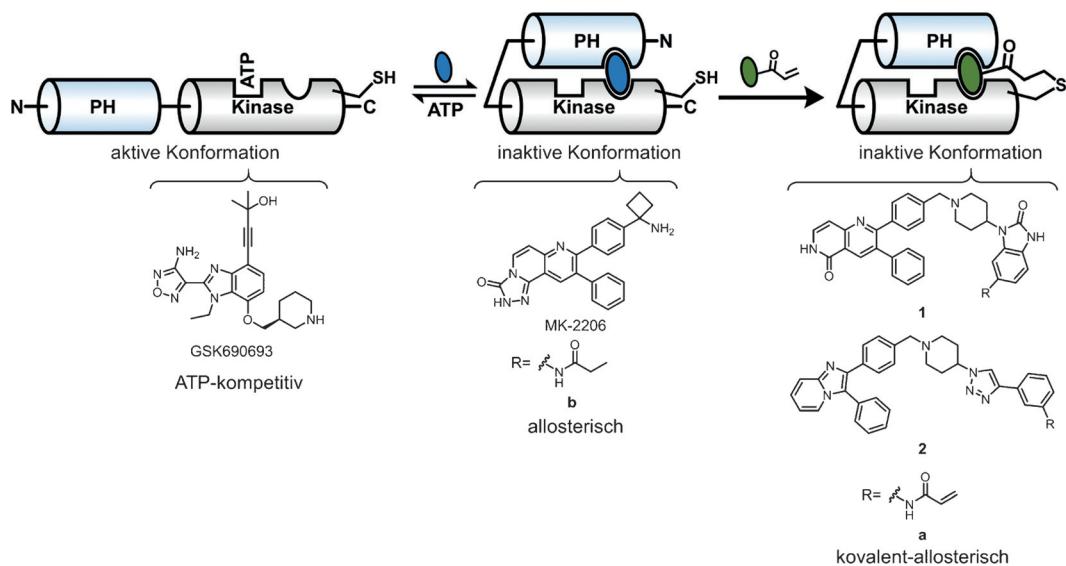


Abbildung 1. Schematische Strukturen von Akt in der aktiven und inaktiven Konformation. ATP-kompetitive Inhibitoren adressieren die Kinase-Domäne von Akt (links). Allosterische PH-Domänen-abhängige Akt-Inhibitoren (blau) binden reversibel an die Grenzfläche zwischen der Kinase- und der PH-Domäne (Mitte). Kovalent-allosterisch PH-Domänen-abhängige Inhibitoren (grün) stabilisieren irreversibel die enzymatisch inaktive Konformation. Chemische Strukturen von KAI **1a** und **2a** sowie ihrer reversiblen Analoga **1b** und **2b**.

binden an der Grenzfläche zwischen der PH- und der Kinase-Domäne und stabilisieren dadurch die geschlossene, inaktive Konformation von Akt (Abbildung 1).^[11] Kürzlich konnte gezeigt werden, dass Akt über Kinase-unabhängige, aber Konformations-abhängige Funktionen das Überleben von Krebszellen fördern kann.^[12] Die chemische Modulation und Disruption solcher Interdomänen-Wechselwirkungen eröffnen eine Strategie zur Analyse von Kinasefunktionen jenseits der enzymatischen Katalyse. Die Analyse von Kristallstrukturen von Akt im Komplex mit den allosterischen Inhibitoren Akti-1/2 (PDB-Code: 3O96)^[13] und **12j** (PDB-Code: 4EJN)^[14] offenbarte die Gegenwart von zwei nicht-katalytischen Cysteinen an den Positionen 296 und 310 innerhalb der Aktivierungsschleife (Abbildung S2 der Hintergrundinformationen). Die redoxempfindlichen Reste Cys296 und Cys310 befinden sich dabei in räumlicher Nähe zu diesen Inhibitoren und können möglicherweise durch Cystein-reaktive, kovalente Sondenmoleküle adressiert werden.^[15]

Das Ziel dieser Arbeit bestand somit aus der Entwicklung neuartiger Akt-Inhibitoren, welche die herausragende Selektivität PH-Domänen-abhängiger Liganden^[16] mit den pharmakologischen und therapeutischen Vorteilen irreversibler Modulatoren, wie gesteigerter Verweilzeit am Zielprotein und erhöhter inhibitorischer Potenz, kombinieren.^[5c] Wir berichten über das Design, die Synthese sowie die biochemische und zelluläre Charakterisierung PH-Domänen-abhängiger, kovalent-allosterischer Akt-Inhibitoren (KAIs) als innovative Hilfsmittel zur Analyse Katalyse-unabhängiger Funktionen von Akt und Proteinkinasen im Allgemeinen.

Ausgehend von 1,6-Naphthyridinon-^[17] und Imidazo-1,2-pyridin-Grundgerüsten,^[18] die bereits als Kernstrukturen allosterischer Akt-Inhibitoren bekannt sind, wurden zwei Elektrophil-haltige Sondenmoleküle (**1a** und **2a**) design und synthetisiert, um Cys296 und Cys310 zu adressieren (Abbildung 1). Zusätzlich wurden die reversiblen Gegenstücke **1b** und **2b** hergestellt. Alle synthetisierten Moleküle wurden mithilfe des iFLiK-Assays (iFLiK: interface Fluorescent Labels in Kinases),^[19] der die Identifikation PH-Domänen-abhängiger Akt-Liganden ermöglicht, auf ihre Bindungsaffinität zu einem Fluorophor-markierten Akt1-Konstrukt analysiert (Tabelle 1 und Abbildung S2).

Die erhaltenen Daten zeigten ähnliche Bindungsaffinitäten für das Sondenmolekül **1a** und den Referenzinhibitor MK-2206 [(58 ± 8) bzw. (69 ± 13) nm], wohingegen **2a** eine signifikant geringere Affinität für Akt1 aufwies [(795 ± 176) nm]. Die reversiblen Analoga **1b** und **2b** hatten zudem vergleichbare Dissoziationskonstanten [(62 ± 12) bzw. (797 ± 180) nm]. Diese Befunde sind übereinstimmend mit der Tatsache, dass bei dem verwendeten Akt1-Protein alle oberflächenexponierten Cysteine, darunter auch Cys296 und Cys310, durch Serine ausgetauscht wurden, um eine ortsspezifische Bindung zu ermöglichen.

Tabelle 1: Halbmaximale inhibitorische Konzentrationen (IC_{50}), k_{inakt}/K_i und Dissoziationskonstanten (K_d) von Referenzmolekülen und KAI. n.r.=keine Signaländerung bis 100 μM.

Verbindung	wtAkt1		iFLiK-Akt1 (E49C/C296S/C310S/C344S)
	IC_{50} [nM]	k_{inakt}/K_i [$\mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$]	K_d [nM]
MK-2206	6.5 ± 0.8	–	69 ± 13
GSK690693	2.3 ± 0.3	–	n.r.
1a	0.2 ± 0.1	3.29 ± 0.40	58 ± 8
1b	7.5 ± 2	–	62 ± 12
2a	372 ± 48	0.0023 ± 0.0003	795 ± 176
2b	992 ± 328	–	797 ± 180

zifische Markierung mit dem Fluorophor zu ermöglichen. Zur weiteren Charakterisierung der synthetisierten Sondenmoleküle wurden deren inhibitorische Potenzen inaktivitätsbasierten Experimenten unter Verwendung von aktiviertem Wildtyp-Akt1 (Tabelle 1 und Abbildung S3) und aktiviertem ΔPH-Akt1 (Abbildung S4) analysiert. Hierbei zeigte **2a** eine moderate Inhibition der enzymatischen Aktivität von Akt im Vergleich zu den Referenzmolekülen MK-2206 und GSK690693 [(372 ± 48)] gegenüber (7 ± 1) bzw. (2 ± 1) nm]. Für **1a** hingegen konnte eine subnanomolare halbmaximale inhibitorische Konzentration nachgewiesen werden [(0.2 ± 0.1) nm]. Die reversiblen Analoga **1b** und **2b** wiesen hingegen einen 10-fach bzw. 4-fach höheren IC_{50} -Wert auf, was auf einen kovalenten Bindungsmodus von **1a** und **2a** schließen ließ. Zudem konnten mithilfe zeitabhängiger IC_{50} -Bestimmungen zusätzliche Hinweise für eine kovalente Modifizierung von Akt1 durch **1a** erhalten werden (Abbildung S5). Die kinetische Charakterisierung der hergestellten Sondenmoleküle durch die Bestimmung von k_{inakt}/K_i verdeutlichte die besseren Inhibitionseigenschaften von **1a** gegenüber denen von **2a** bezüglich der Bindungsaffinität sowie der Bildung des kovalenten Enzym-Ligand-Komplexes (Tabelle 1 und Abbildung S6). Auch ein Vergleich mit dem Wirkstoff MK-2206, der unter anderem für die Behandlung von HER2-positiven soliden Tumoren sowie akuter myeloischer Leukämie getestet wird,^[20] veranschaulichte die überlegenen inhibitorischen Eigenschaften von **1a**.

Für die weitere Untersuchung des Bindungsmodus von **1a** und **2a** wurden ESI-MS-basierte Experimente durchgeführt. Hierbei konnten Verschiebungen in den dekonvolutierten Massenspektren für rekombinantes Wildtyp-Akt1 beobachtet werden, das zuvor mit **1a** oder **2a** inkubiert worden war. Die detektierten Massenzunahmen (587 bzw. 572 Da) entsprachen den jeweils einfach modifizierten Akt1-Konstrukten verglichen mit DMSO-behandeltem Akt1 (Abbildung 2). Auch diese Ergebnisse ließen auf einen kovalenten Bindungsmodus schließen, der wegen der Resultate der aktivitätsbasierten Studien (Tabelle 1) bereits erwartet worden war.

Durch ESI-MS/MS-Analysen von Akt1, das zuvor mit **1a** oder **2a** behandelt und anschließend tryptisch verdaut worden war, konnten die designierten Cysteine an den Position 296 und 310 als modifizierte Reste identifiziert werden (Abbildung S7). Hierbei wurden Peptidfragmente detektiert, welche die jeweiligen Cysteine 296 und 310 inklusive des jeweiligen Moleküls enthielten. Die erhaltenen Ergebnisse verdeutlichen, dass keine Präferenz der Sondenmoleküle für eines der beiden Cysteine vorhanden ist, woraus auf eine generelle kovalente Adressierbarkeit dieser beiden Reste geschlossen wurde (Abbildung S7).

Im nächsten Schritt wurde die Selektivität von Sondenmolekül **1a** für Akt1 gegenüber Proteinkinasen mit ähnlichen Charakteristika analysiert. Dazu wurden insbesondere a) Kinasen der AGC-Familie, b) Kinasen mit einer PH-Domäne und c) Kinasen mit Cysteinen innerhalb der Aktivierungsschleife ausgewählt. Eine Auswahl von 100 Protein-kinasen wurde anschließend mithilfe des SelectScreen Kinase Profiling Service von LifeTechnologies charakterisiert (Tabelle S1).

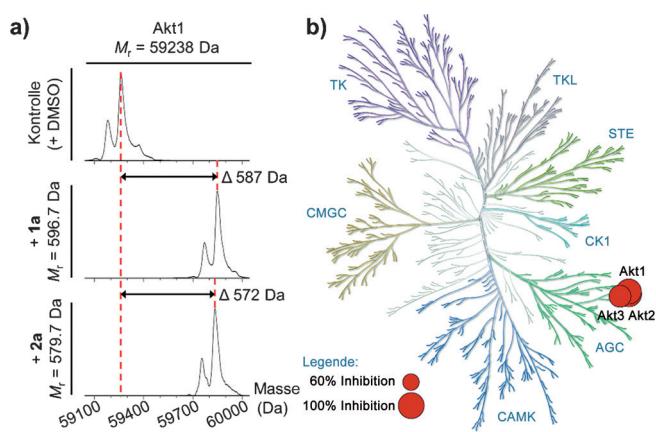


Abbildung 2. a) Dekonvolutierte Massenspektren von Akt1, das mit DMSO (oben), **1a** (Mitte) und **2a** (unten) inkubiert wurde. Massendifferenzen im Vergleich zur DMSO-behandelten Kontrolle sind dargestellt als Δ -Werte und demonstrieren die kovalente Modifikation von Akt1 mit **1a** und **2a**. b) Kinomdendrogramm von **1a**. Bei einer Konzentration von **1a** von $1 \mu\text{M}$ zeigten nur Akt1, Akt2 und Akt3 eine signifikante Inhibition (98, 96 bzw. 83 %), wohingegen die restlichen 97 Kinasen weniger als 40 % inhibiert wurden. Die Profilierrungsstudien wurden mithilfe des SelectScreen Profiling Service von LifeTechnologies durchgeführt. Das Kinomdendrogramm wurde adaptiert von Kinome Render,^[22] und die Abbildung wurde unter Einverständnis von Cell Signaling Technology, Inc. (<http://www.cellsignal.com>) reproduziert.

Von den ausgewählten Kinasen zeigten lediglich die Akt-Isoformen 1–3 eine signifikante Inhibition ($> 80\%$) bei einer Konzentration von **1a** von $1 \mu\text{M}$ (Tabelle S1). Die vierthöchste Inhibition (37 %) wurde für MAP4K5 erzielt, die keine der drei oben genannten Kriterien erfüllt, jedoch bei der Selektivitätsanalyse eines substratkompetitiven, Phenylalanin-basierten Akt-Inhibititors ebenfalls eine moderate Inhibition aufwies.^[21] Darüber hinaus zeigten die Ergebnisse für PKC θ (35 % Inhibition), MAPKAPK2 (30 %) und MELK (30 %) sowie 43 weitere Kinasen (< 30 %), dass analoge Cysteine innerhalb der Aktivierungsschleife keine unspezifische Inhibition durch **1a** hervorrufen. Die vorliegenden Resultate untermauern somit die herausragende Selektivität von **1a** für Akt-Isoformen gegenüber sequenziell und strukturell ähnlichen Kinasen.

Zur weiteren Charakterisierung von **1a** wurden zelluläre Studien mit Prostatakrebs- (PC3), Brustkrebs- (BT474) und gastrointestinalen Stromatumorzellen (GIST-T1) durchgeführt. Diese Zelllinien weisen genetische Läsionen im PI3K/Akt-Signalweg auf (PC3: PTEN $^{-/-}$; BT474: PI3K mut, HER2 $^{+/-}$; GIST-T1: c-KIT mut), die in unterschiedlichen Konzentrationen von phospho-Akt unter basalen Bedingungen resultieren. Diese Modellsysteme wurden für Western-Blot-Analysen verwendet, um die Zellpermeabilität von **1a** sowie dessen Wirkung auf die Phosphorylierung von Akt1 und nachgeschalteten Substraten wie GSK3 β zu untersuchen. Die Zugabe von MK-2206 als Referenzinhibitor und von **1a** führte zur dosisabhängigen Dephosphorylierung von Akt1 an Thr308 sowie Ser473 in PC3- und BT474-Zellen; diese Befunde stimmten mit der gesteigerten Dephosphorylierung von GSK3 β als Substrat von Akt1 überein (Abbildung S8).

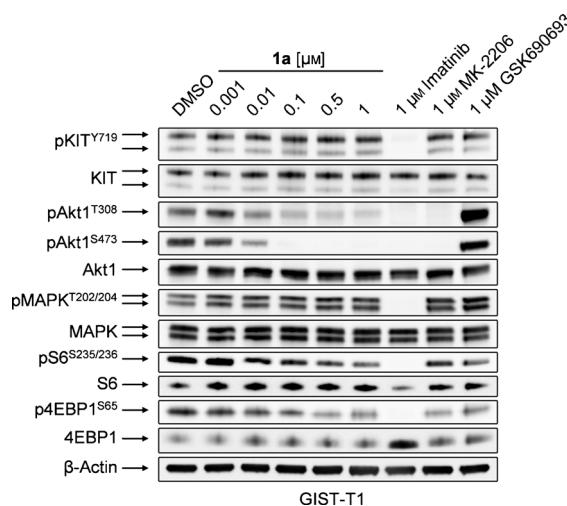


Abbildung 3. Der kovalent-allosterische Inhibitor **1a** reduziert die Akt1-Phosphorylierung in Krebszellen. Zellen von gastrointestinalem Stromatumoren (GIST-T1) zeigen hohe basale Konzentrationen von pAkt1 aufgrund von konstitutiv aktivem c-KIT (Imatinib: Positivkontrolle für c-KIT-Inhibition). Behandlung mit KAI **1a** verringert zelluläre pAkt1-Konzentrationen bereits bei nanomolaren Inhibitorkonzentrationen und geht mit der verminderten Phosphorylierung der nachgeschalteten Akt1-Substrate S6 und 4EBP1 einher; die Phosphorylierung anderer relevanter Proteinkinasen wie c-KIT und MAPK (Erk1/2) wird nicht durch **1a** beeinflusst. Zwei Banden sind für c-KIT beobachtbar und repräsentieren die unreife sowie die reife, glykosylierte Variante. Im Fall von MAPK entsprechen die Banden den Isoformen Erk1 bzw. Erk2.

Die Selektivität von **1a** für Akt1 wurde zudem in GIST-T1-Zellen demonstriert, wobei onkogene Proteinkinasen wie c-KIT und Erk1/2 nicht von unserem Sondenmolekül adressiert wurden (Abbildung 3). Aus diesen Beobachtungen wurde geschlossen, dass **1a** als zellpermeabler, selektiver Modulator von Akt in verschiedenen Krebszelllinien verwendet werden kann. Hierzu zählen beispielsweise die Anwendung als molekulare Sonde in chemisch-biologischen Studien sowie die Weiterentwicklung als irreversibles Krebstherapeutikum.

Wir haben hier das rationale Design, die Synthese und die Charakterisierung neuartiger allosterischer Inhibitoren beschrieben, die Cys296 und Cys310 in der Proteinkinase Akt irreversibel modifizieren. Die kovalente Modulation von Akt1 durch die hier vorgestellten Inhibitoren wurde mithilfe der Massenspektrometrie nachgewiesen, wobei stets einfach modifizierte Spezies detektiert wurden.

Zusätzlich zu vielversprechenden biochemischen Eigenschaften wie inhibitorischer Potenz und Selektivität bezüglich verwandter Proteinkinasen konnten auch relevante Effekte in zellulären Studien erzielt werden, die vergleichbar mit denen für den Referenzinhibitor MK-2206 sind. Weiterhin konnte demonstriert werden, dass die kovalente Adressierung von nicht-katalytischen Cysteinen in Akt mit strukturell unterschiedlichen Molekülen realisierbar ist. Diese funktionellen Sonden können für die Modulation von Akt in investigativen Studien der chemischen Biologie und Systembiologie von Bedeutung sein. Dieser Machbarkeitsnachweis veranschaulicht das enorme Potenzial der hier vorgestellten kovalent-allosterischen Inhibitoren (KAIs) in der gezielten und per-

sonalisierten Therapie von Krebspatienten, bei denen die Überaktivierung von Akt in pathologischen Prozessen von Bedeutung ist. Darüber hinaus unterstreicht diese Arbeit die entscheidende Bedeutung der Identifizierung, der Charakterisierung sowie des Verständnisses fundamentaler molekulärer Mechanismen, die die Entwicklung von Krebs induzieren, regulieren und kontrollieren.

Stichwörter: Interdomänen-Interaktionen · Krebs · Medizinische Chemie · Tumortherapeutika · Wirkstoff-Design

Zitierweise: *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, *54*, 10313–10316
Angew. Chem. **2015**, *127*, 10452–10456

- [1] P. Cohen, D. R. Alessi, *ACS Chem. Biol.* **2013**, *8*, 96–104.
- [2] M. Rask-Andersen, J. Zhang, D. Fabbro, H. B. Schiöth, *Trends Pharmacol. Sci.* **2014**, *35*, 604–620.
- [3] T. Yoshida, K. Yamada, K. Azuma, A. Kawahara, H. Abe, S. Hattori, F. Yamashita, Y. Zaizen, M. Kage, T. Hoshino, *Med. Oncol.* **2013**, *30*, 349–355.
- [4] Z. Fang, C. Grütter, D. Rauh, *ACS Chem. Biol.* **2013**, *8*, 58–70.
- [5] a) D. A. Cross, S. E. Ashton, S. Ghiorgiu, C. Eberlein, C. A. Nebhan, P. J. Spitzler, J. P. Orme, M. R. Finlay, R. A. Ward, M. J. Mellor, G. Hughes, A. Rahi, V. N. Jacobs, M. Red Brewer, E. Ichihara, J. Sun, H. Jin, P. Ballard, K. Al-Kadhim, R. Rowlinson, T. Klinowska, G. H. Richmond, M. Cantarini, D. W. Kim, M. R. Ranson, W. Pao, *Cancer Discov.* **2014**, *4*, 1046–1061; b) A. O. Walter, R. T. Sjin, H. J. Haringsma, K. Ohashi, J. Sun, K. Lee, A. Dubrovskiy, M. Labenski, Z. Zhu, Z. Wang, M. Sheets, T. St Martin, R. Karp, D. van Kalken, P. Chaturvedi, D. Niu, M. Nacht, R. C. Petter, W. Westlin, K. Lin, S. Jaw-Tsai, M. Raponi, T. Van Dyke, J. Etter, Z. Weaver, W. Pao, J. Singh, A. D. Simmons, T. C. Harding, A. Allen, *Cancer Discov.* **2013**, *3*, 1404–1415; c) T. Barf, A. Kaptein, *J. Med. Chem.* **2012**, *55*, 6243–6262.
- [6] J. Singh, R. C. Petter, T. A. Baillie, A. Whitty, *Nat. Rev. Drug Discovery* **2011**, *10*, 307–317.
- [7] I. Hers, E. E. Vincent, J. M. Tavaré, *Cell. Signalling* **2011**, *23*, 1515–1527.
- [8] D. Hanahan, R. A. Weinberg, *Cell* **2011**, *144*, 646–674.
- [9] a) J. Rudner, C. E. Ruiner, R. Handrick, H. J. Eibl, C. Belka, V. Jendrossek, *Radiat. Oncol.* **2010**, *5*, 108–119; b) J. D. Carpten, A. L. Faber, C. Horn, G. P. Donoho, S. L. Briggs, C. M. Robbins, G. Hostetter, S. Boguslawski, T. Y. Moses, S. Savage, M. Uhlik, A. Lin, J. Du, Y. W. Qian, D. J. Zeckner, G. Tucker-Kellogg, J. Touchman, K. Patel, S. Mousses, M. Bittner, R. Schevitz, M. H. Lai, K. L. Blanchard, J. E. Thomas, *Nature* **2007**, *448*, 439–444; c) T. L. Yuan, L. C. Cantley, *Oncogene* **2008**, *27*, 5497–5510.
- [10] H. Hirai, H. Sootome, Y. Nakatsuru, K. Miyama, S. Taguchi, K. Tsuijoka, Y. Ueno, H. Hatch, P. K. Majumder, B. S. Pan, H. Kotani, *Mol. Cancer Ther.* **2010**, *9*, 1956–1967.
- [11] S. F. Barnett, D. Defeo-Jones, S. Fu, P. J. Hancock, K. M. Haskell, R. E. Jones, J. A. Kahana, A. M. Kral, K. Leander, L. L. Lee, J. Malinowski, E. M. McAvoy, D. D. Nahas, R. G. Robinson, H. E. Huber, *Biochem. J.* **2005**, *385*, 399–408.
- [12] I. Vivanco, Z. C. Chen, B. Tanos, B. Oldrini, W. Y. Hsieh, N. Yannuzzi, C. Campos, I. K. Mellinghoff, *eLife* **2014**, *3*, e03751.
- [13] W. I. Wu, W. C. Voegli, H. L. Sturgis, F. P. Dizon, G. P. Vigers, B. J. Brandhuber, *PLoS ONE* **2010**, *5*, e12913.
- [14] M. A. Ashwell, J. M. Lapierre, C. Brassard, K. Bresciano, C. Bull, S. Cornell-Kennon, S. Eathiraj, D. S. France, T. Hall, J. Hill, E. Kelleher, S. Khanapurkar, D. Kizer, S. Koerner, J. Link, Y. Liu, S. Makhija, M. Moussa, N. Namdev, K. Nguyen, R. Nicewonger, R. Palma, J. Szwaja, M. Tandon, U. Uppalapati, D. Vensel, L. P. Volak, E. Volkova, N. Westlund, H. Wu, R. Y. Yang, T. C. Chan, *J. Med. Chem.* **2012**, *55*, 5291–5310.

- [15] F. Ahmad, P. Nidadavolu, L. Durgadoss, V. Ravindranath, *Free Radical Biol. Med.* **2014**, *74*, 118–128.
- [16] L. Logie, A. J. Ruiz-Alcaraz, M. Keane, Y. L. Woods, J. Bain, R. Marquez, D. R. Alessi, C. Sutherland, *Diabetes* **2007**, *56*, 2218–2227.
- [17] M. T. Bilodeau, A. E. Balitz, J. M. Hoffman, P. J. Manley, S. F. Barnett, D. Defeo-Jones, K. Haskell, R. E. Jones, K. Leander, R. G. Robinson, A. M. Smith, H. E. Huber, G. D. Hartman, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2008**, *18*, 3178–3182.
- [18] J. G. Kettle, S. Brown, C. Crafter, B. R. Davies, P. Dudley, G. Fairley, P. Faulder, S. Fillery, H. Greenwood, J. Hawkins, M. James, K. Johnson, C. D. Lane, M. Pass, J. H. Pink, H. Plant, S. C. Cosulich, *J. Med. Chem.* **2012**, *55*, 1261–1273.
- [19] Z. Fang, J. R. Simard, D. Plenker, H. D. Nguyen, T. Phan, P. Wolle, S. Baumeister, D. Rauh, *ACS Chem. Biol.* **2015**, *10*, 279–288.
- [20] a) C. Hudis, C. Swanton, Y. Y. Janjigian, R. Lee, S. Sutherland, R. Lehman, S. Chandarlapaty, N. Hamilton, D. Gajria, J. Knowles, J. Shah, K. Shannon, E. Tetteh, D. M. Sullivan, C. Moreno, L. Yan, H. S. Han, *Breast Cancer Res.* **2013**, *15*, R110; b) M. Y. Konopleva, R. B. Walter, S. H. Faderl, E. J. Jabbour, Z. Zeng, G. Borthakur, X. Huang, T. M. Kadia, P. P. Ruvolo, J. B. Felici, H. Lu, L. Debose, J. A. Burger, M. Andreeff, W. Liu, K. A. Baggerly, S. M. Kornblau, L. A. Doyle, E. H. Estey, H. M. Kantarjian, *Clin. Cancer Res.* **2014**, *20*, 2226–2235.
- [21] T. Nguyen, R. A. Coover, J. Verghese, R. G. Moran, K. C. Ellis, *ACS Med. Chem. Lett.* **2014**, *5*, 462–467.
- [22] M. Chartier, T. Chénard, J. Barker, R. Najmanovich, *PeerJ* **2013**, *1*, e126.

Eingegangen am 6. März 2015,
veränderte Fassung am 13. April 2015
Online veröffentlicht am 25. Juni 2015