

Identifizierung eines Sulfonamids als $\beta 1/\beta 2$ -spezifischer Proteasom-ligand durch kristallographisches Screening

Philipp Beck, Michèle Reboud-Ravaux und Michael Groll*

Abstract: Das Proteasom ist ein etabliertes Angriffsziel zur Behandlung von Krebs, jedoch erfordert das Aufkommen resistenter Tumore die Entdeckung neuartiger Inhibitoren. Die häufig genutzten fluoreszenzbasierten Screeningmethoden besitzen jedoch eine geringe Empfindlichkeit und sind auf den Nachweis von Liganden mit konventionellen Bindungsprofilen begrenzt. Aufgrund dieser Nachteile haben wir ein kristallographisches Screeningverfahren angewendet, um Proteasom-inhibitoren mit einem neuartigen Wirkmechanismus zu identifizieren. Die optimierte Prozedur wurde anhand eines Screenings einer fokussierten Gruppe von Verbindungen getestet und führte zur Entdeckung eines $\beta 1/\beta 2$ -spezifischen Sulfonamid-Derivats, das nicht-kovalent zwischen den Proteasomuntereinheiten $\beta 1$ und $\beta 2$ bindet. Die Bindetasche zeigt signifikante Größen- und Polaritätsunterschiede zwischen konstitutivem und Immunproteasom auf, wodurch der identifizierte Ligand wertvolle Erkenntnisse für die strukturbasierte Entwicklung von Subtyp-spezifischen Proteasom-inhibitoren bietet.

Der Kampf gegen onkologische Erkrankungen erfordert die permanente Suche nach chemischen Verbindungen, die unverzichtbare zelluläre Signalwege in Krebszellen unterbinden. Das 20S-Proteasom ist das Kernstück (core particle; CP) eines solchen Signalweges und von zentraler Bedeutung für die Proteinqualitätskontrolle, Regulation des Zellzyklus, Zelldifferenzierung, den Proteinumsatz und Apoptose. Die Marktzulassung der CP-Inhibitoren Bortezomib (BTZ, Velcade) und Carfilzomib (CFZ, Kyprolis) hat gezeigt, dass die Blockierung der proteasomalen Aktivität einen hohen therapeutischen Nutzen bei der Behandlung des Multiplen Myeloms und Mantelzelllymphoms mit sich bringt (Abbildung S1 in den Hintergrundinformationen).^[1,2] Beide Inhibitoren besitzen ein peptidisches Grundgerüst mit einer elektrophilen Kopfgruppe zur kovalenten Bindung an das katalytisch aktive Thr1 der Protease. Die zunehmende Resistenzentwicklung gegen beide Therapeutika unterstreicht jedoch die dringende Notwendigkeit für die Entwicklung nicht-

peptidischer CP-Inhibitoren.^[3-8] Darüber hinaus steht die nächste Generation von Proteasom-Blockern im Fokus der selektiven Adressierung des konstitutiven CP (cCP) und den gewebspezifischen Isoformen, welche eine entscheidende Rolle bei Autoimmun- und Entzündungskrankheiten (Immunproteasom, iCP) sowie T-Zellentwicklung im Thymus spielen (Thymoproteasom, tCP).^[9-11]

Erst kürzlich hat die Entdeckung von Hydroxyharnstoffen und Indolo-Phakellinen als Proteasom-inhibitoren das Spektrum möglicher Grundgerüste wesentlich erweitert.^[12,13] Einige innovative Strukturen wurden auch in Patenten publiziert,^[14-18] aber abgesehen von diesen Weiterentwicklungen ist die allgemeine Struktur von validierten CP-Blockern auf peptidische Pharmakophore beschränkt.^[19,20] Gleichzeitig wird die Entdeckung neuartig bindender Liganden durch zwei fundamentale Einschränkungen bei den derzeitigen fluoreszenzbasierten Screeningverfahren begrenzt. Erstens sind die Assays empfindlich gegenüber Artefakten durch Fluoreszenzauslöschung, was zu einer hohen Anzahl an falsch-positiven oder falsch-negativen Screening-Treffern führt. Zweitens werden schwach oder allosterisch bindende Liganden nicht detektiert, da ausschließlich hochaffine, peptidische Substrate zur Messung der Proteasomaktivität herangezogen werden. Darüber hinaus können sonstige biophysikalische Screeningmethoden wie isotherme Kalorimetrie, Oberflächenplasmonenresonanz oder NMR-Spektroskopie, durch die Architektur und Größe des CP nicht angewendet werden.

Um diese Nachteile zu adressieren, haben wir ein kristallographisches Screeningverfahren für die schnelle Evaluation von fokussierten Substanzbibliotheken angewendet (Schema 1). Die Aufreinigung und Kristallisation von Hefeproteasom (yCP) ist etabliert und macht eine Fülle von qualitativ hochwertigen Kristallen für Soaking-Experimente zugänglich.^[21] Jüngste Fortschritte bei der Synchrotron-Automatisierung und Auswertungssoftware ermöglichen einen beschleunigten Arbeitsablauf, der einschließlich Kristallmontage, Datensatzaufnahme, -reduktion, -verfeinerung und anschließender automatischer Absuche der Elektronendichthekarte weniger als 10 Minuten pro Datensatz in Anspruch nimmt (Schema 1, Protokolle in den Hintergrundinformationen).^[22]

Als Test für das beschleunigte Protokoll wurde ein fokussiertes Set an Substanzen zusammengestellt, die mit hoher Wahrscheinlichkeit einen neuartigen Bindemodus aufweisen und darüber hinaus folgende Kriterien erfüllen (Schema S2 und Tabelle S1 in den Hintergrundinformationen):

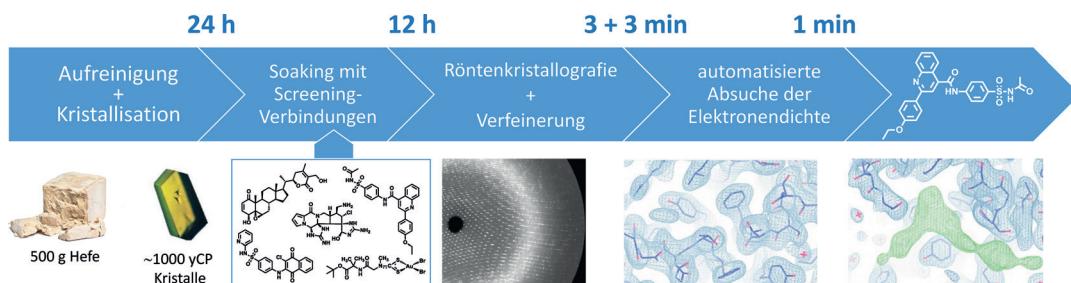
- Breites Spektrum von Chemotypen mit überwiegend nicht-peptidischen Grundgerüsten.

[*] Dr. P. Beck, Prof. Dr. M. Groll

Center for Integrated Protein Science Munich (CIPSM)
Department für Chemie, Technische Universität München
Lichtenbergstraße 4, 85748 Garching (Deutschland)
E-Mail: michael.groll@tum.de

Prof. Dr. M. Reboud-Ravaux
Sorbonne Universités, UPMC Univ Paris 06
UMR/CNRS 8256, Case 256
7 Quai St-Bernard, 75252 Paris Cedex 05 (Frankreich)

 Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.201505054> zu finden.



Schema 1. Optimierter Arbeitsablauf für einen kristallographischen Screening-Ansatz zur Identifizierung neuartiger Proteasomliganden.

- b) Vorliegen von Daten hinsichtlich Proteasominhibition aus In-vitro- oder Zellkulturstudien.
- c) Fehlende Strukturinformationen der jeweiligen Liganden im Komplex mit dem CP.
- d) Einfache chemische Synthese bzw. Verfügbarkeit aus kommerziellen Quellen oder durch Kooperationsprojekte.

Entsprechend unseres optimierten Versuchsablaufs wurden Hefe-20S-Proteasomkristalle mit den Screeningverbindungen behandelt und Beugungsdaten mit einer Auflösung von bis zu 2.6 Å innerhalb von 3 Minuten aufgezeichnet. Rigid-Body-Verfeinerung mit yCP-Startkoordinaten (PDB ID 1RYP)^[21] ergaben freie *R*-Faktoren < 25 % in weniger als 3 Minuten. Im Anschluss visualisiert eine automatisierte Absuche der $F_o - F_c$ -Elektronendichtekarte innerhalb von einer Minute die Gegenwart von ligandenbezogener Positivdichte. Die Methode wurde durch die Identifikation einer Kokristallstruktur des Proteasoms mit dem nicht-peptidischen Sulfonamid-Derivat (**1**) verifiziert, welches bereits als möglicher CP-Inhibitor in einem In-silico-Screening für neuartige β 5-spezifische Liganden proklamiert wurde.^[23] Allerdings zeigten In-vitro-Experimente eine Präferenz für die Inhibition der β 1- und β 2-Aktivität, während die Spaltaktivität der β 5-Untereinheit nicht beeinträchtigt wird. Dieses ungewöhnliche Inhibitionsprofil führte zur Einbindung von **1** in die Screeningbibliothek und zur Identifizierung der yCP:**1**-Kokristallstruktur ($R_{\text{free}} = 21.4\%$, PDB ID 5BOU).

Überraschenderweise zeigte die Untersuchung der kristallographischen Daten, dass die nicht-gestrichene Seite der Substratbindekanäle aller katalytisch aktiven Untereinheiten frei von ligandbezogener Positivdichte sind. Stattdessen wurde **1** in der gestrichenen Seite des Substratbindekanals von Untereinheit β 2 lokalisiert, was eine bisher unentdeckte Bindetasche darstellt. Der Ligand überbrückt die gesamte Länge der gestrichenen Seite von β 2 und bildet eine Reihe hydrophiler und hydrophober Wechselwirkungen mit dem Protein aus. Insbesondere werden die Sulfonylsauerstoffatome von **1** stark durch β 2-Thr1O^YH, β 2-Thr1NH₃⁺ und β 2-Gly47NH koordiniert und stören somit wichtige Proteinreste, die für die Stabilisierung des tetraedrischen Übergangszustands während der katalytischen Peptidbindungsspaltung verantwortlich sind (Abbildung 1). Darüber hinaus besetzt das 2,4-substituierte Chinolin-Ringsystem einen ausgeprägten Hohlraum, der durch Aminosäureseitenketten der β 1- und β 2-Untereinheit gebildet wird. Die Bindung von **1** wird

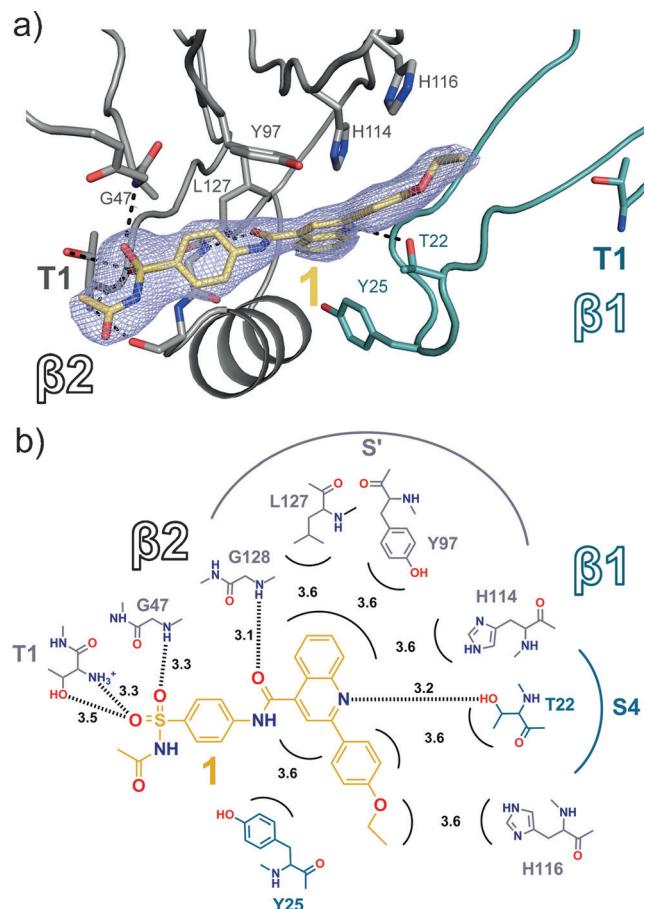


Abbildung 1. Kristallstruktur des yCP im Komplex mit **1**. a) $2 F_o - F_c$ -Elektronendichte (blaues Netz, 1a, PDB ID 5BOU) von **1** (gelb) in der gestrichenen Seite des Substratbindekanals der β 2-Aktivität (grau). Die Sulfonylgruppe von **1** bildet ein enges Netzwerk aus Wasserstoffbrücken (schwarze gestrichelte Linien) mit β 2-Thr1O^YH, β 2-Thr1NH₃⁺ und β 2-Gly47NH und stört somit den Substratabbau. b) Darstellung von (a) mit chemischen Strukturformeln. Aminosäuren der β 1-Untereinheit sind türkis und die Untereinheit β 2 grau dargestellt, Abstände sind in Å angegeben.

hierbei durch Van-der-Waals-Wechselwirkungen sowohl mit L127, Y97, H114 (alle β 2) als auch β 1-Y25 begünstigt, wobei eine weitere polare Interaktion zwischen β 1-T22O^YH und dem Chinolin-Stickstoffatom zusätzliche Stabilisierung bringt.

Interessanterweise zeigt die strukturelle Überlagerung von yCP:**1** und yCP im Komplex mit dem tetrapeptidischen

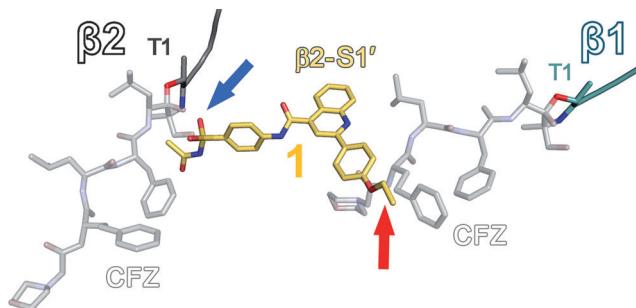


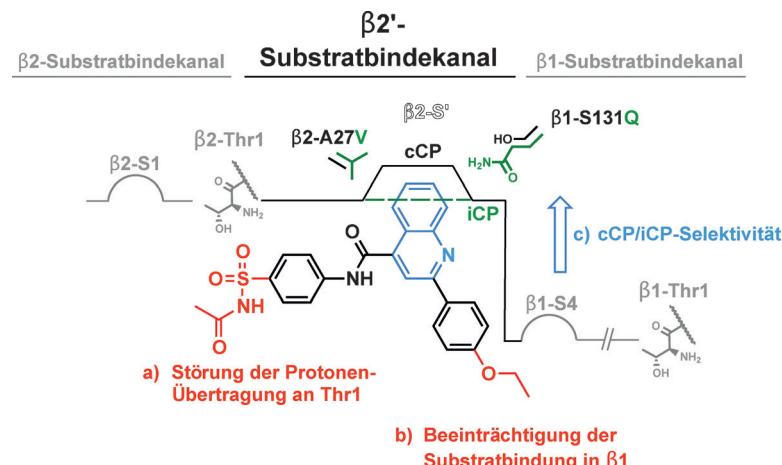
Abbildung 2. Bivalente Inhibition der Untereinheiten $\beta 1$ und $\beta 2$. Die strukturelle Überlagerung von **1** (gelb) und CFZ (grau),^[24] gebunden an die Untereinheiten $\beta 1$ und $\beta 2$ des yCP, verdeutlicht die kombinierte, kompetitive Wirkungsweise auf beide proteasomale Spaltaktivitäten. Der Sulfonyl-Rest von **1** ist in engem Kontakt mit $\beta 2$ -Thr1 (blauer Pfeil), während die 4'-Ethoxyphenyl-Gruppe die S4-Spezifitätstasche von Untereinheit $\beta 1$ belegt (roter Pfeil).

Inhibitor Carfilzomib, dass die 4'-Ethoxyphenyl-Gruppe von **1** in engem Kontakt mit $\beta 2$ -H116 steht, welches zu der S4-Spezifitätstasche von Untereinheit $\beta 1$ beiträgt (Abbildung 1 und 2).^[24] Folglich ist der Ligand in der Lage, den Substratabbau in den Untereinheiten $\beta 1$ und $\beta 2$ gleichzeitig zu beeinträchtigen ($IC_{50} \approx 100$ bzw. $50 \mu\text{M}$), während die Chymotrypsin-ähnliche Aktivität unberührt bleibt.^[23] Hierzu bildet der Sulfonyl-Rest zunächst Wasserstoffbrücken mit $\beta 2$ -Thr1 und verhindert so die Hydrolyse von Peptidbindungen an der $\beta 2$ -Untereinheit. Zudem erstreckt sich das Biaryl-System von **1** bis in den Substratbindekanal von Untereinheit $\beta 1$ und beeinträchtigt die Bindung von Substraten. Die relativ hohen mikromolaren IC_{50} -Werte von **1** lassen jedoch nur eine grobe Einschätzung der Bindungsstärke zu, da die standardmäßig im *In-vitro*-Assay angewandten peptidischen Substrate nicht mit der Bindung des Liganden in der gestrichenen Seite des Substratbindekanals konkurrieren. Demnach ist auch die Leitstrukturoptimierung anhand von Struktur-Aktivitäts-Daten nur unzureichend möglich, da die entsprechenden *In-vitro*-CP-Aktivitätsassays auf artifiziellen Substratmimetika beruhen.

Im nächsten Schritt wurde ein kristallographischer Ansatz verfolgt, um die Mindestanforderungen für die yCP:**1**-Komplexbildung festzustellen. Das Sulfonamid **1** besteht aus einem starren, durchkonjugierten Grundgerüst mit einer begrenzten Anzahl von drehbaren Bindungen, was den entropischen Aufwand des Bindungsprozesses minimiert. Folglich resultieren die überwiegenden Bindungsbeiträge aus enthalpisch begünstigten Vorgängen. Tatsächlich konnte für das bekannte Sulfonamid-Antibiotikum Sulfacetamid **2** und die synthetisierten Ligandfragmente **3** und **4** (Abbildung S3 in den Hintergrundinformationen) keine definierte Elektronendichte erhalten werden. Es ist somit die Kombination des biarylischen Chinonsystems zusammen mit dem Sulfonamid-Motiv für ausreichende enthalpische Energiebeiträge zur Komplexbildung notwendig.

Die Entwicklung von iCP-spezifischen Liganden ist trotz jüngster Fortschritte begrenzt durch den Mangel an struktureller Diversität der Inhibitor-Bindestaschen zwischen den Proteasom-Isoformen.^[25,26] Allerdings zeigt der Vergleich der gestrichenen Substratbindekanäle von $\beta 2c$ und $\beta 2i$ außergewöhnliche strukturelle Variationen zwischen den beiden Proteasom-Subtypen.^[11,27] Die Überlagerung der Bindestelle von **1** mit den murinen $\beta 2c$ - und $\beta 2i$ -Untereinheiten verdeutlicht, dass die $\beta 2$ -S'-Tasche signifikante Unterschiede bezüglich Größe und Polarität besitzt (Schema 2). Insbesondere die charakteristischen cCP/iCP-Austausche $\beta 2$ -S131Q und $\beta 1$ -A27V resultieren in einer kleineren, polareren S'-Tasche im Immunproteasom und ermöglichen künftig das strukturbasierte Design von spezifischen Liganden.

Der Bindemechanismus und die Möglichkeiten zur Optimierung des Sulfonamid-Liganden **1** kann unter den folgenden Aspekten zusammengefasst werden (Schema 2):



Schema 2. Übersicht der strukturellen Grundvoraussetzungen, welche den Bindungsmodus und die Bindungsaffinität von **1** beeinflussen. Die $\beta 2$ -S'-Taschen von cCP und iCP sind durch durchgehend schwarze oder gestrichelte grüne Linien dargestellt.

- Die Sulfonyl-Gruppe bildet ein dichtes Netzwerk von Wasserstoffbrücken mit Proteinresten, die für die katalytische Substratsspaltung in der Untereinheit $\beta 2$ unentbehrlich sind.
- Eine Erweiterung des Liganden ist in Richtung des $\beta 1$ -Substratbindekanals durch die Verlängerung des 4'-Ethoxyphenyl-Rests möglich, da dieser bereits die S4-Bindetasche von Untereinheit $\beta 1$ besetzt.
- Anpassung des Chinolinringmotivs (blau) ermöglicht die selektive Adressierung von $\beta 2c$ oder $\beta 2i$.

Im Ergebnis führte das vorgestellte kristallographische Screeningverfahren zur Identifikation des Sulfonamids **1** als vielversprechenden, nicht-kovalenten Proteasoliganden. Die neu entdeckte Bindetasche in der gestrichenen Seite der $\beta 2$ -Untereinheit zeigt signifikante Größen- und Polaritätsunterschiede zwischen der konstitutiven und Immun-Isoform des Proteasoms auf und ermöglicht das strukturbasierte Design Subtyp-selektiver Wirkstoffe. Zusätzlich resultiert das starre Molekülgerüst des Liganden in einem vorwiegend

enthalpisch kontrollierten Bindungsprozess, was als eine treibende Kraft für Zielprotein-Selektivität gilt.^[28] Des Weiteren verfügt **1** über eine nicht-peptidische Grundstruktur und enthält keine pharmakokinetisch bedenkliche elektrophile Kopfgruppe, was bisher als Grundmerkmal von Protaesom inhibitoren galt. Somit bildet **1** eine interessante Ausgangsubstanz für weitere Optimierungen in Richtung eines selektiven, nicht-peptidischen Protaesom inhibitoren.

Danksagung

Diese Arbeit wurde durch die DFG (GR1861/10-1) gefördert. Wir danken unseren Kooperationspartnern für ihre Beiträge zur Screening-Bibliothek. Besonderer Dank gebührt R. Feicht für die Aufreinigung und Kristallisation von Hefe-20S-Proteasom sowie den Mitarbeitern der Beamline X06SA des Paul-Scherrer-Instituts, Swiss Light Source (Villigen, Schweiz) für die Unterstützung bei der Datenaufnahme.

Stichwörter: Kristallographisches Screening · Proteasom · Reversible Inhibition · Sulfonamide · Wirkstoffentdeckung

Zitierweise: *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, *54*, 11275–11278
Angew. Chem. **2015**, *127*, 11428–11431

- [1] P. G. Richardson, T. Hidemitsu, K. C. Anderson, *Cancer Control* **2003**, *10*, 361–369.
- [2] S. D. Demo, C. J. Kirk, M. A. Aujay, T. J. Buchholz, M. Dajee, M. N. Ho, J. Jiang, G. J. Laidig, E. R. Lewis, F. Parlati et al., *Cancer Res.* **2007**, *67*, 6383–6391.
- [3] M. Groll, C. R. Berkers, H. L. Ploegh, H. Ova, *Structure* **2006**, *14*, 451–456.
- [4] M. Groll, K. B. Kim, N. Kairies, R. Huber, C. M. Crews, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 1237–1238.
- [5] R. Z. Orlowski, D. J. Kuhn, *Clin. Cancer Res.* **2008**, *14*, 1649–1657.
- [6] V. Cheriath, B. S. Jacobs, M. A. Hussein, *Drugs R&D* **2007**, *8*, 1–12.
- [7] D. J. McConkey, K. Zhu, *Drug Resist. Updates* **2008**, *11*, 164–179.
- [8] W. Harshbarger, C. Miller, C. Diedrich, J. Sacchettini, *Structure* **2015**, *23*, 418–424.
- [9] M. Groettrup, R. Kraft, S. Kostka, S. Standera, R. Stohwasser, P.-M. Kloetzel, *Eur. J. Immunol.* **1996**, *26*, 863–869.
- [10] S. Murata, K. Sasaki, T. Kishimoto, S.-I. Niwa, H. Hayashi, Y. Takahama, K. Tanaka, *Science* **2007**, *316*, 1349–1353.
- [11] E. M. Huber, M. Basler, R. Schwab, W. Heinemeyer, C. J. Kirk, M. Groettrup, M. Groll, *Cell* **2012**, *148*, 727–738.
- [12] N. Gallastegui, P. Beck, M. Arciniega, R. Huber, S. Hillebrand, M. Groll, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 247–249; *Angew. Chem.* **2012**, *124*, 251–254.
- [13] P. Beck, T. A. Lansdell, N. M. Hewlett, J. J. Tepe, M. Groll, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, *54*, 2830–2833; *Angew. Chem.* **2015**, *127*, 2872–2875.
- [14] S. M. Lynch, W. Neidhart, J. M. Plancher, T. Schulz-Gasch, WO 2014086664, **2014**.
- [15] „Substituted Thiazole Compounds“: R. C. Hawley, S. M. Lynch, WO 2014114603A1, **2014**.
- [16] „Substituted Thiazole Compounds“: M. Alam, R. C. Hawley, S. M. Lynch, A. Narayanan, WO 2014086701A1, **2014**.
- [17] „Substituted Thiazole Compounds“: Stephen M. Lynch, A. Narayanan, WO 2014086697A1, **2014**.
- [18] „Substituted Triazole And Imidazole Compounds“: S. M. Lynch, R. E. Martin, W. Neidhart, J.-M. Plancher, T. Schulz-Gasch, WO 2014086663A1, **2014**.
- [19] A. F. Kisselev, W. van der Linden, H. S. Overkleef, *Chem. Biol.* **2012**, *19*, 99–115.
- [20] C. Blackburn, C. Barrett, J. L. Blank, F. J. Buzzese, N. Bump, L. R. Dick, P. Fleming, K. Garcia, P. Hales, M. Jones et al., *MedChemComm* **2012**, *3*, 710.
- [21] M. Groll, L. Ditzel, J. Lowe, D. Stock, M. Bochtler, H. D. Bartunik, R. Huber, *Nature* **1997**, *386*, 463–471.
- [22] M. Groll, R. Huber, *Methods Enzymol.* **2005**, *398*, 329–336.
- [23] N. Basse, M. Montes, X. Maréchal, L. Qin, M. Bouvier-Durand, E. Genin, J. Vidal, B. O. Villoutreix, M. Reboud-Ravaux, *J. Med. Chem.* **2010**, *53*, 509–513.
- [24] E. M. Huber, W. Heinemeyer, M. Groll, *Structure* **2015**, *23*, 407–417.
- [25] C. Dubiella, H. Cui, M. Gersch, A. J. Brouwer, S. A. Sieber, A. Krüger, R. M. J. Liskamp, M. Groll, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53*, 11969–11973; *Angew. Chem.* **2014**, *126*, 12163–12167.
- [26] G. de Bruin, E. M. Huber, B. Xin, E. J. van Rooden, K. Al-Ayed, K. Kim, A. F. Kisselev, C. Driessens, M. van der Stelt, G. A. van der Marel, et al., *J. Med. Chem.* **2014**, *57*, 6197–6209.
- [27] E. M. Huber, M. Groll, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 8708–8720; *Angew. Chem.* **2012**, *124*, 8838–8850.
- [28] H. Gohlke, G. Klebe, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 2644–2676; *Angew. Chem.* **2002**, *114*, 2764–2798.

Eingegangen am 3. Juni 2015,
veränderte Fassung am 3. Juli 2015
Online veröffentlicht am 4. August 2015