

Niedermolekulare PROTACs: neue Wege zum Abbau von Proteinen

Momar Toure und Craig M. Crews*

E3-Ligase · Inhibitoren · PROTAC · Proteinabbau ·
Wirkstoffentwicklung

Die heutigen, auf Inhibitoren basierenden Therapieansätze sind zwangsläufig eingeschränkt durch 1) die Notwendigkeit von hoher systemischer Exposition, um ausreichende In-vivo-Effekte zu gewährleisten, 2) mögliche Nebenwirkungen aufgrund von hohen In-vivo-Konzentrationen des Wirkstoffs und 3) die Notwendigkeit, an ein aktives Zentrum zu binden, und die damit einhergehende Einschränkung der zugänglichen Zielproteine. Ein alternativer Ansatz nutzt einen neuen, katalytischen Mechanismus, um die Funktion eines Proteins irreversibel zu hemmen: den induzierten Abbau des Proteins durch die Rekrutierung an die zelluläre Maschinerie zur Qualitätskontrolle. Frühere Proteinabbau-Strategien hatten kein hohes therapeutisches Anwendungspotenzial, doch neue Studien zu niedermolekularen PROTACs („Proteolysis Targeting Chimeras“) haben gezeigt, dass diese Technik den Abbau von mehreren verschiedenen Proteinklassen überaus effizient vermitteln kann.

1. Einführung

Herkömmliche niedermolekulare Substanzen beschränken sich darauf, Proteine mit einer Ligandenbindestelle, wie Enzyme und Rezeptoren, zu erreichen. Deshalb ist nur einer kleiner Teil des Humanproteoms (ca. 25 %) pharmazeutisch zugänglich, während die Mehrheit der Proteine, wie Transkriptionsfaktoren, Gerüstproteine und nichtenzymatische Proteine für Wirkstoffe unzugänglich („undruggable“) bleibt.^[1] Diese Situation ist die Folge der derzeitigen pharmakologischen Herangehensweise, die auf eine Belegungsquote fokussiert ist. Die Hauptidee dieses Ansatzes ist, dass die Zeit, die eine Substanz das aktive Zentrum eines Proteins blockiert, in direktem Zusammenhang mit dem erzielten klinischen Effekt steht. Zusätzlich dazu, dass Pharmakologie, die auf diese Belegungsquote abzielt, das Spektrum der Zielmoleküle („Targets“) einschränkt, sind hohe Dosierun-

gen nötig, um Konzentrationen im Bereich der IC_{90-95} zu erreichen. Dies führt oft zu unerwünschten Nebeneffekten.

In den letzten zwei Jahrzehnten wurden vor allem Nukleinsäure-basierte Strategien verfolgt, um die Expression von krankheitsverursachenden Proteinen zu reduzieren. Trotz des

erfolgreichen Einsatzes von genetischen Methoden wie „Antisense“-Oligonukleotiden oder RNA-Interferenz, um Proteinkonzentrationen zu kontrollieren, ist die therapeutische Anwendbarkeit dieser Methoden aufgrund von metabolischen und Bioverteilungsproblemen sowie Nebeneffekten sehr eingeschränkt.^[2] Ein neuer Ansatz kombiniert daher die ADME-Charakteristika von niedermolekularen Substanzen und die Vorteile von genetischen Methoden, indem niedermolekulare Substanzen Zielproteine zum Ubiquitin-Proteasom-System (UPS) rekrutieren und dadurch ihren selektiven Abbau auslösen.^[3] Die Rekrutierung von E3-Ligasen durch PROTACs („Proteolysis Targeting Chimeras“) war bisher hauptsächlich auf Peptidliganden beschränkt, was das therapeutische Anwendungspotenzial eingeschränkt hat.^[3b] In diesem Kurzaufsatz beschreiben wir neueste Erkenntnisse in der Entwicklung von niedermolekularen PROTACs, die den Abbau von Zielproteinen vermitteln. Darüber hinaus werden wir den therapeutischen Anwendungsbereich sowie Möglichkeiten und Herausforderungen der neuen Technik diskutieren.

[*] Dr. M. Toure, Prof. C. M. Crews
Departments of Chemistry; Molecular, Cellular & Developmental
Biology; Pharmacology, Yale University
New Haven, CT 06511 (USA)
E-Mail: craig.crews@yale.edu

2. Frühe „niedermolekulare“ Verbindungen die zu Proteininstabilität führen

In dem Bestreben, neue Methoden und Verbindungen zu entwickeln, die die Stabilität von intrazellulären Proteinen steuern können, haben unsere und weitere Arbeitsgruppen verschiedene Ansätze beschrieben, um in das UPS einzugreifen. Diese Techniken umfassen HSP90-Inhibitoren (kürzlich zusammengefasst^[4]), Ansätze, die die Herstellung von Fusionsproteinen mit destabilisierenden Domänen (DD) oder ligandeninduzierten Abbau („ligand-induced degradation“, LID) erfordern, aber auch hydrophobes Markieren („hydrophobic tagging“, HyT). All diese Methoden waren sehr hilfreich, um die Funktion von Proteinen zu charakterisieren und um Zielmoleküle zu evaluieren.^[3d,5]

2.1. Destabilisierende Domänen und ligandeninduzierter Abbau: Shield-1

Die unterschiedlichen Halbwertszeiten verschiedener Proteine in Zellen wurden dazu genutzt, Fusionsproteine mit regulierbarer Stabilität herzustellen. In bahnbrechenden Studien aus den Arbeitsgruppen um Pickart und Deshaies wurde diese Strategie eingesetzt, um den Abbau von Ubiquitin-Fusionsproteinen zu inhibieren oder zu induzieren.^[5] Die Fusion von Proteinen und so genannten Degrons kann aber auch direkt zum Proteinabbau führen. Da die Ligandenbindung an ein Protein durch eine Vielzahl von Mechanismen die Stabilität eines Proteins beeinflusst, ist eine leistungsfähige Strategie, die intrazelluläre Stabilität eines Proteins zu bestimmen und es vor Abbau zu schützen, die Stabilisierung eines Degrons durch die Bindung einer niedermolekularen Verbindung (Abbildung 1).^[6] Eine instabile Version des Proteins FKBP12-YFP kann beispielsweise durch den hochaffinen Shield-1-Liganden stabilisiert werden.^[7,8] Weiterhin wurde in einer aufbauenden Studie eine FKBP-basierte Proteindomäne beschrieben, deren Stabilität durch Bindung an den Shield-1-Liganden reduziert wird. Dieser alternative Ansatz hat den gegenteiligen Effekt zur DD-Technik: die Zugabe des Shield-Liganden führt hier zum Abbau des Fusionsproteins. In diesem Fall wird eine Degronsequenz zusammen mit einer prolinreichen Sequenz, die spezifisch im aktiven Zentrum an die FKBP-Domäne bindet, mit FKBP verknüpft. In Abwesenheit von Shield-1 ist die Peptidsequenz durch die Bindung an FKBP maskiert und

wirkt als kryptisches Degron. Wenn jedoch Shield-1 an FKBP bindet, wird das Degron exponiert, und dies führt in der Folge zum Abbau des Fusionsproteins.^[9] Das beschriebene System wurde weitläufig in chemisch-genetischen Studien eingesetzt, um beispielsweise dendritische Proteine^[10] oder Transkriptionsfaktoren^[11] zu erforschen. Ein Nachteil der Strategie in Bezug auf ihre mögliche therapeutische Anwendung ist die Notwendigkeit der genetischen Manipulation und das Einbringen eines Fusionsproteins, um die Technik in Zellen oder Tiermodellen anzuwenden.

Ähnlich zum LID-System wurde kürzlich eine neue Methode beschrieben, die sich das Auxin-induzierbare Degron zunutze macht. Ein lichtinduzierbares Auxinderivat kann Auxin nach gezielter lokaler Bestrahlung freisetzen. Nach der Freisetzung bindet Auxin eine künstliche E3-Ligase und rekrutiert Proteine, die mit einem Auxin-induzierbaren Degron verknüpft sind, und induziert damit den Abbau dieser Zielproteine.^[12] Obwohl das System noch immer den Einsatz von Fusionsproteinen bedingt, bietet es zusätzliche zeitliche und subzelluläre Kontrolle und ermöglicht dadurch die Feinregulierung der Proteinfunktion.

2.2. Hydrophobes Markieren

Aufbauend auf den erfolgreichen Einsatz von spezifischen Degrons hat unsere Arbeitsgruppe die Entwicklung von „chemischen Degrons“ oder niedermolekularen Substanzen, die die Entfaltung von Proteinen auslösen, verfolgt. Diese Strategie des hydrophoben Markierens wurde zuerst unter Verwendung von hydrophoben Chloralkanliganden untersucht; die Liganden führten den Abbau von Proteinen herbei, die an die Dehalogenase HaloTag2 fusioniert waren.^[13] Es wird angenommen, dass die hydrophobe Markierung ein teilweise ungefaltetes Protein imitiert und dadurch von Chaperonen erkannt wird, die in der Folge den Chaperon-abhängigen Abbau des Proteins durch das Proteasom auslösen (Abbildung 2). Hydrophobe Markierungen (HyTs) mit einer hydrophoben Adamantylgruppe erwiesen sich als äußerst effektiv, um den Abbau von verschiedenen HaloTag2-Fusionsproteinen (GFP, Luciferase, HRas1^{G12V}, ROR2) zu vermitteln. Außerdem konnte hydrophobes Markieren den Abbau eines HRas-HaloTag2-Fusionsproteins in vivo auslösen und dadurch eine Rückbildung von Ras-abhängigen Tumoren in Mäusen bewirken.^[14] Weiterhin haben wir auch ein Molekül (HALTS) identifiziert, das HaloTag2-Fusionspro-



Craig Crews studierte Chemie an der University of Virginia und promovierte in Harvard bei R. L. Erikson. Nach einem Postdoktorat bei S. L. Schreiber erhielt er 1995 einen Ruf nach Yale. Seine Forschungen gelten der Kontrolle intrazellulärer Proteinmengen durch niedermolekulare Substanzen und führten unter anderem zu dem Proteasominhibitor Carfilzomib/Kyprolis basierend auf der Leitverbindung YU101.



Momar Toure studierte Chemie am ENSCM in Frankreich (M.Sc. 2010) und promovierte bei Dr. J.-L. Parrain und Dr. O. Chuzel an der Aix-Marseille Université. Zurzeit arbeitet er als Postdoktorand an der PROTAC-Technik in der Arbeitsgruppe von Prof. Crews an der Yale University.

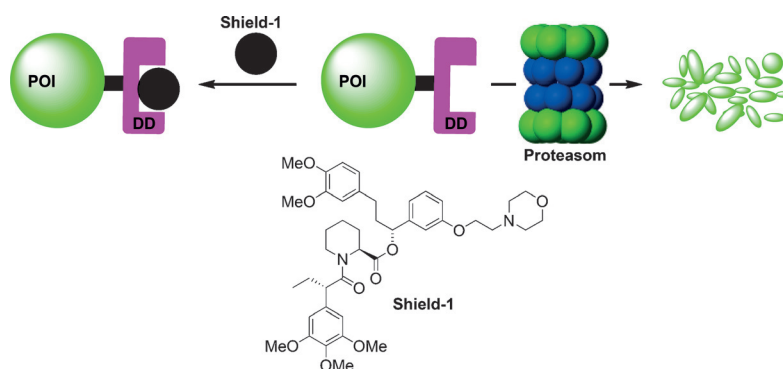


Abbildung 1. Shield-1 destabilisiert ein FKBP-Fusionsprotein. DD = destabilisierende Domäne, POI = Zielprotein.

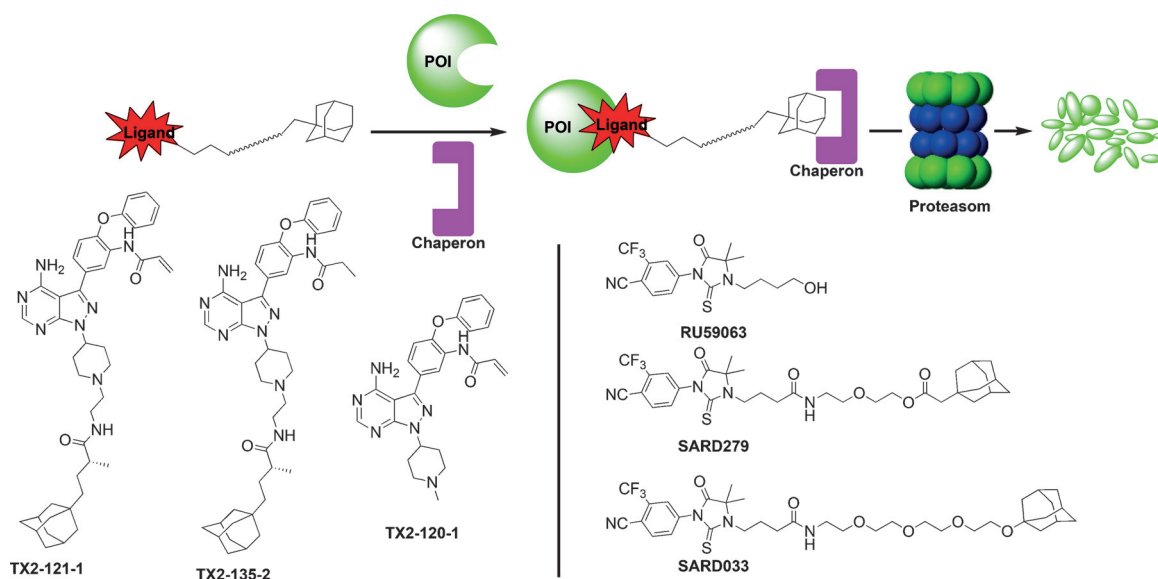


Abbildung 2. Die Strategie des hydrophoben Markierens und Strukturformeln von repräsentativen HyTs.

teine stabilisiert.^[15] Mit HyT-induziertem Abbau und HALTS-bedingter Stabilisierung ist es möglich, die intrazelluläre Stabilität eines Halotag2-Fusionsprotein über einen 50-fachen Bereich zu kontrollieren.

Hydrophobe Markierungen ohne Adamantylgruppe wurden eingesetzt, um zu bestätigen, dass sie als „greasy tags“ den Abbau eines Proteins induzieren können. Hedstrom und Mitarbeiter zeigten, dass Boc3-Arg als hydrophobe Markierung wirken kann.^[16] Obwohl Boc3-Arg deutlich größer als Adamantan ist, kann es den Abbau von GST (Gluthation-S-Transferase) und *E.-coli*-DHFR auslösen, wenn es an die entsprechenden Liganden gekuppelt ist. In dieser Studie wurde auch zum ersten Mal demonstriert, dass die hydrophobe Markierung nicht kovalent an ein Zielprotein gebunden sein muss, um dessen Abbau zu induzieren.

Kürzlich wurde hydrophobes Markieren dazu genutzt, den Abbau des bisher pharmazeutisch unzugänglichen Proteins HER3, das eine Rolle bei Krebserkrankungen spielt, herbeizuführen. Ein potenter HER3-Ligand (TX2-121-1) wurde mit einem kurzen Linker an eine Adamantylgruppe gekuppelt.^[17] Zellbiologische Experimente zeigten, dass die

so entstandene Verbindung den „Knockdown“ von HER3 bei einer Konzentration von 2 μM in PC9-GR4-Zellen herbeiführen kann. Dies führt zu einer Reduktion von phosphoryliertem Akt (p-Akt) und p-Erk, Elementen aus einem nachgeschalteten Signaltransduktionsweg, nach der Stimulation mit Neuregulin. Adamantan-gekoppeltes TX2-121-1 wirkt antiproliferativ und ist 7-fach wirksamer bei der Verminderung von Zellwachstum als die Negativkontrolle TX2-135-2.^[17] Diese Resultate zeigen die erste Anwendung des hydrophoben Markierens im derzeit pharmazeutisch unzugänglichen Bereich, an der Pseudokinase HER3. Die nötige kovalente Bindung der TX2-121-1-basierten Verbindung und die geringe Wirksamkeit, die sich derzeit im einstelligen μM -Bereich befindet, begrenzen jedoch die zukünftige therapeutische Anwendung.

Wegen seiner maßgeblichen Rolle bei Prostatakrebs und Brustkrebs ist der Androgenrezeptor (AR) der Angriffspunkt zahlreicher Krebstherapeutika, z.B. des AR-Antagonisten Enzalutamid. Nach dem erfolgreichen Abbau von HER3 durch hydrophobes Markieren wurde der Androgenrezeptor als nächstes Ziel ausgewählt, um selektive Abbauagentien für

den Androgenrezeptor („selective androgen receptor degraders“, SARDs) zu entwickeln. Kürzlich hat unsere Arbeitsgruppe erstmals den Abbau von AR durch hydrophobes Markieren demonstriert.^[18] Der bereits bekannte AR-Agonist RU59063^[19] wurde mit einem kurzen PEG-Linker an eine Adamantangruppe gekuppelt. Die neue niedermolekulare Verbindung, SARD279, mit einem nur 8 Atome langen Linker löste den Abbau von 50 % AR bei einer Konzentration von 1 μM (DC_{50}) aus. Im Vergleich dazu war SARD033 mit einem längeren Ether-Linker (13 Atome) halb so potent. Dieses Ergebnis unterstreicht die Bedeutung von Linkerzusammenstellung und -länge und der physikochemischen Eigenschaften von SARD, um das Zielprotein optimal zu rekrutieren. SARD279 hemmt das Zellwachstum mit ähnlicher Wirksamkeit wie Enzalutamid.^[18] Trotz der Wirksamkeit von Enzalutamid im Bereich von AR-basierten CRPCs („castration-resistant prostate cancer“) erleiden Patienten oft Rückfälle, die auf die Entwicklung von Resistenzen und folglich Reaktivierungen von AR zurückzuführen sind. SARD-basierter Abbau von AR könnte die Resistenzmechanismen umgehen, die im Fall von Enzalutamid auftreten.

3. Die PROTAC-Technik

Wie hydrophobe Markierungen sind auch PROTACs heterodifunktionelle Moleküle, in denen zwei Liganden durch einen Linker verbunden wurden. Ein Ligand bindet das Zielprotein („protein of interest“, POI), während der andere Ligand eine E3-Ligase rekrutiert. Durch gleichzeitiges Binden von POI und E3-Ligase führt ein PROTAC die Bildung eines trimeren Komplexes herbei. Durch die Rekrutierung der E3-Ligase wird das POI günstig positioniert, um seine Ubiquitinierung zu ermöglichen und so seinen Knockdown zu erzielen (Abbildung 3).^[20] Ein Vorteil dieser Strategie ist, dass PROTACs im Vergleich zu niedermolekularen Inhibitoren katalytisch wirken und dadurch mehrere Zyklen des POI-Abbaus vermitteln können (Abbildung 3).

3.1. Peptid-basierte PROTACs

Mangels niedermolekularer Liganden, die an E3-Ligasen binden, wurden die ersten PROTACs basierend auf größeren Peptidmotiven wie beispielsweise einem Degron von I κ B α , einem Protein, das von der SKP-Cullin-F-Box-E3-Ligase β TRCP abgebaut wird, entwickelt.^[21] Diese ersten PROTACs demonstrierten die Wirksamkeit des Konzepts des PROTAC-induzierten Proteinabbaus. Die Peptid-enthaltenden PROTACs sind jedoch nicht zellpermeabel, und ihr Einsatz war dadurch stark eingeschränkt.^[22]

Um diese Einschränkung zu überwinden, wurde der erste zellpermeable PROTAC entwickelt. Eine 7-Aminosäuren-Sequenz des HIF-Proteins (ALAPYIP) wurde dazu an eine Poly-D-Arg-Sequenz angehängt. Dieses Peptid wurde dann an einen „Bump-hole“-Liganden (AP21998) der FKBP12-F36V-Mutante gekuppelt.^[23] Der so entstandene PROTAC induzierte den Abbau eines GFP-FKBP12-F36V-Fusionsproteins bei einer Konzentration von 25 μM in Zellen.^[24]

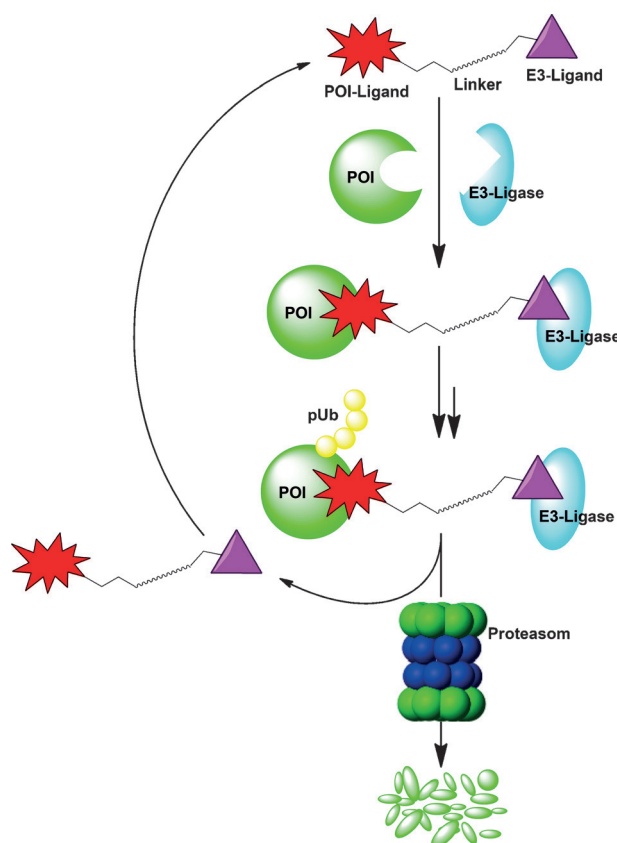


Abbildung 3. Direkte Rekrutierung einer E3-Ligase durch einen PROTAC.

Weitere Peptid-basierte PROTACs induzierten erfolgreich den Abbau des Östrogenrezeptors und des Aryl-Hydrocarbon-Rezeptors, wobei sie interessanterweise keine Poly-D-Arg-Sequenz benötigten.^[25]

Ähnlich dazu wurde ein weiterer zellpermeabler Peptid-basierter PROTAC beschrieben, der den Abbau des X-Proteins des Hepatitis-B-Virus induziert. Die ODD-Domäne („oxygen-dependent degradation“) von HIF-1 α , die von der E3-Ligase VHL gebunden wird, wurde an die X-Protein-Oligomerisierungsdomäne und an ein zellpenetrierendes Polyargininpeptid gekuppelt. So erzeugte PROTACs vermitteln den fast vollständigen Abbau von Vollängen-X-Protein und verkürzten Formen.^[26]

In Anlehnung an frühe Studien zu Phosphopeptid-basierten PROTACs, wurde ein vollständig Peptid-basierter Phospho-PROTAC ($\text{ErbB2PP}_{\text{PI3K}}$) entwickelt um den Abbau von PI3K in Abhängigkeit von Wachstumsfaktorstimulation zu ermöglichen (Abbildung 4). Wie auch frühere PROTACs beinhaltet der PROTAC ein VHL-bindendes Peptid sowie eine Poly-D-Arg-Sequenz, um die Zellpermeabilität zu erhöhen.

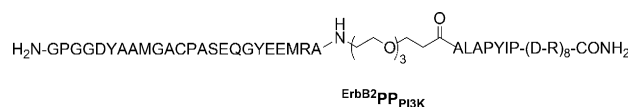


Abbildung 4. Peptid-basierter Phospho-PROTAC, der VHL bindet.

hen. Im Unterschied zu niedermolekularen PROTACs bindet der Phospho-PROTAC das Zielprotein nur nach der Zugabe des Wachstumsfaktors. Das System basiert auf der Verwendung einer bestimmten Sequenz einer Rezeptortyrosinkinase, die eine Phosphorylierungsstelle enthält, die als Bindungsmotiv für nachgeschaltete Signaltransduktionsproteine (z. B. PI3K) fungiert. In einem Experiment löste der Wachstumsfaktor Neuregulin die Phosphorylierung von Erb3 und der Phosphorylierungsstelle im Phospho-PROTAC aus.^[27] Dies führte zur Rekrutierung und in weiterer Folge zur Ubiquitinierung und zum Abbau von PI3K. Darüber hinaus bewirkte $\text{ErbB}^{\text{B2}}\text{PP}_{\text{PI3K}}$ in Tumorexenotransplantaten in Mäusen eine 40 %ige Reduktion der Tumorgroße und bewies damit zum ersten Mal die Wirksamkeit von PROTACs in vivo. Trotz der vielversprechenden Resultate sind Phospho-PROTACs aufgrund ihres hohen Molekulargewichts, ihrer eher geringen Zellpermeabilität und der möglichen metabolischen Instabilität keine guten Kandidaten für die pharmazeutische Weiterentwicklung.

3.2. Vollständig niedermolekulare PROTACs

Obwohl die erste Generation der Peptid-basierten PROTACs kaum Charakteristika von herkömmlichen Arzneimitteln aufwies, zeigte ihr Einsatz, dass der Einsatz von E3-Ligasen, um die zelluläre Lebenszeit eines Proteins zu beeinflussen, einen guten Ansatz zur Therapieentwicklung darstellt. Der nächste Schritt in diesem Prozess würde allerdings die Entwicklung von vollständig niedermolekularen PROTACs bedingen, die größere Ähnlichkeit zu bestehenden Therapeutika zeigen. Diese PROTACs hätten klare Vorteile gegenüber den Peptid-basierten Versionen: höhere In-vivo-Stabilität, Bioverteilung und mögliche Wirksamkeit. Erfreulicherweise hat die Entwicklung und Evaluierung von niedermolekularen Verbindungen, die an E3-Ligasen binden, die PROTAC-Technik unter dem Gesichtspunkt der therapeutischen Anwendung vorangetrieben.

3.2.1. Rekrutierung der Ubiquitin-E3-Ligase MDM2

Der erste vollständig niedermolekulare PROTAC nutzte den bekannten MDM2-Liganden Nutlin als E3-Ligase-rekrutierenden Part (Abbildung 5).^[28] Durch die Kupplung von Nutlin an einen Androgenrezeptorliganden wurde ein PROTAC erzeugt, der den Abbau des Androgenrezeptors in Prostata-tumorzellen auslösen konnte. Dieser erste vollständig niedermolekulare PROTAC war ein wichtiger Schritt, um über Peptid-basierte PROTACs hinauszukommen, er ist je-

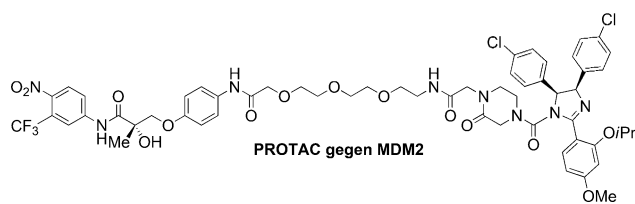


Abbildung 5. Niedermolekularer PROTAC, der die E3-Ligase MDM2 rekrutiert.

doch wesentlich weniger effektiv als Peptid-basierte Versionen.^[29] Ob diese geringe Wirksamkeit durch eine Optimierung des Linkers erhöht werden kann, ist noch offen.

3.2.2. Rekrutierung der Ubiquitin-E3-Ligase cIAP1

Vor kurzem hat die Gruppe von Hashimoto Bestatin-Ester, die an cIAP („cellular inhibitor of apoptosis“) binden, eingesetzt, um den Abbau von Zielproteinen herbeizuführen (Abbildung 6).^[30] Diese Bestatin-Ester-basierten PROTACs

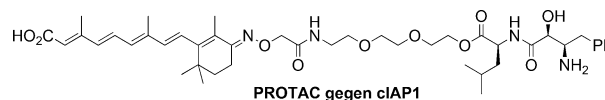


Abbildung 6. Niedermolekularer PROTAC, der die E3-Ligase cIAP rekrutiert.

bewirkten den Abbau von nukleären Rezeptoren, wie dem Androgenrezeptor, dem Östrogenrezeptor und dem Retinoidsäurerezeptor.^[31] Die neue Klasse von niedermolekularen PROTACs hat jedoch einige wesentliche Einschränkungen. Eine Vielzahl von Nebenwirkungen wurde beobachtet, die dem Bestatin-Anteil, einem gewöhnlichen Aminopeptidase-inhibitor,^[32] zuzuschreiben sind. Zusätzlich dazu sind sehr hohe Konzentrationen nötig, um den gewünschten Abbau zu erzielen.^[31] Schlussendlich ist bekannt, dass IAP-Liganden zur Autoubiquitinierung und zum Abbau von IAPs führen. Dies könnte sich vor allem in Bezug auf eine therapeutische Anwendung dieser PROTACs als problematisch erweisen.

3.2.3. Rekrutierung der Ubiquitin-E3-Ligase CRBN

Obwohl die ersten vollständig niedermolekularen PROTACs, die die E3-Ligasen MDM2 oder cIAP rekrutieren, den Abbau vieler Proteine ausgelöst haben, waren diese PROTACs nur im zweistelligen μM -Bereich aktiv. Dies war ein großer Anreiz, wirksamere und selektivere PROTACs zu entwickeln. Eine dieser neuen PROTAC-Serien, die auf das Krebsprotein BRD4 abzielt, verwendet Phthalimidverbindungen als E3-Ligase-Liganden. Diese Liganden rekrutieren Cereblon (CRBN), eine Cullin-RING-Ubiquitinligase (Abbildung 7). In den letzten Jahren ist das Interesse an Thalidomid und an den Derivaten Lenalidomid und Pomalidomid aufgrund ihres Einsatzes als immunmodulierende Arzneimittel gestiegen. Eine neue Studie ergab, dass Thalidomid an die E3-Ligase Cereblon bindet und den Abbau von essenziellen Transkriptionsfaktoren im multiplen Myelom, IKZF1 und IKZF3, bedingt.^[33] Diese Resultate zeigten, dass Thalidomid und seine Derivate als Ansatzpunkt für die Entwicklung neuer PROTACs, die die E3-Ligase Cereblon rekrutieren, genutzt werden können.

Ausgehend von OTX015, einem potenten BRD4-Wirkstoffkandidat, wurde ein PROTAC entwickelt, der den Abbau dieses für das Wachstum und Überleben von Krebszellen essenziellen Proteins auslöst. In diesem PROTAC (ARV-825) war OTX015 über einen kurzen Alkyllinker an Pomalidomid gekuppelt.^[34] ARV-825 bewirkte den nahezu vollständigen

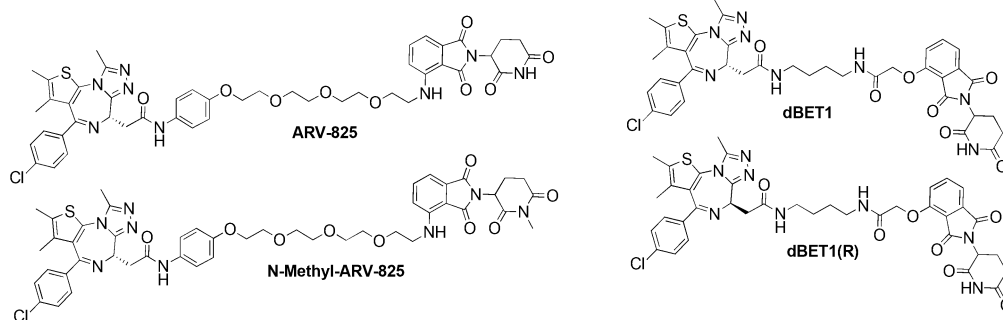


Abbildung 7. Niedermolekulare PROTACs, die die E3-Ligase CRBN rekrutieren.

Abbau von BRD4 bei einer Konzentration von 10 nM binnen 6 Stunden und erzielte einen lang anhaltenden Effekt (länger als 24 Stunden). Der PROTAC ist bereits bei einer substöchiometrischen Konzentration aktiv, da die Bindungsmotive für BRD4 und Cereblon eine Affinität von 28–90 nM und ca. 3 μ M zu ihren jeweiligen Wechselwirkungspartnern aufweisen. Dieses Ergebnis ist Teil der ersten Belege für die katalytische Aktivität von PROTACs. Auch der charakteristische „hook effect“ für einen Proteinabbau, ausgelöst durch die Bildung eines PROTAC-abhängigen trimeren Komplexes, wurde beobachtet. In einer Negativkontrolle wurde die NH-Gruppe des Piperidion-Fragments methyliert. Diese Modifizierung lieferte den inaktiven N-methylierten ARV-825-PROTAC, der weder an Cereblon binden noch den Abbau von BRD4 auslösen konnte. Interessanterweise zeigte ARV-825 höhere antiproliferative Wirkung und konnte effektiver Apoptose induzieren als die BRD4-Inhibitoren JQ1 und OTX015.

Ein ähnlicher PROTAC wurde erzeugt, indem der BRD4-Ligand JQ1 an Thalidomid gekuppelt wurde.^[35,36] Der resultierende PROTAC, dBET1, induzierte den Abbau von 87 % BRD4 bei 100 nM in der AML-Zelllinie MV4-11 nach 18 Stunden, während ein dBET1(R)-Epimer inaktiv war. Wie zu erwarten war, löste dBET1 auch den Abbau von anderen BRD-Proteinen (z. B. BRD2 und BRD3) aus, da JQ1 nicht spezifisch für BRD4 ist. Die pharmakologischen Eigenschaften von dBET1 wurden in Proliferationsassays evaluiert. Der Abbau von BRD4 hemmte das Wachstum von mehreren Lymphomzelllinien und war dem ursprünglichen Inhibitor JQ1 in der Wirksamkeit überlegen. Weiterhin wurde in einem Xenograft-Modell von MV4-11-Leukämiezellen gezeigt, dass die tägliche Behandlung mit dBET1 innerhalb von 14 Tagen zur Tumorrückbildung führt. Die Menge an BRD4 wurde allerdings 24 Stunden nach der Behandlung mit dBET1 wieder erreicht; Möglicherweise aufgrund der Instabilität des PROTACs, einer bekannten Schwäche von Phthalimiden. Diese Beobachtung könnte ein Problem für die weitere Entwicklung von dBET1 als zukünftiges Therapeutikum darstellen.

Obwohl ARV-825 und dBET1 sich strukturell sehr ähnlich sind, baut ARV-825 10mal wirksamer BRD4 ab. Ob diese Überlegenheit durch den Phenylring in ARV-825 zustandekommt oder in einem Aspekt des Linkers liegt, muss erst in einer Linkeroptimierungsstudie geklärt werden.

3.2.4. Rekrutierung der Ubiquitin-E3-Ligase VHL („Von-Hippel-Lindau“)

Peptid-basierte PROTACs, die VHL rekrutieren, erwiesen sich als sehr effektiv im Auslösen von Proteinabbau. Die Umstellung auf einen vollständig niedermolekularen PROTAC war allerdings sehr schwierig, da keine hochaffinen Liganden für VHL existierten. Glücklicherweise wurden in neueren Studien niedermolekulare Verbindungen gefunden, die kompetitiv an der HIF-Bindungsstelle von VHL binden.^[37] Mit der Entdeckung dieser Liganden wurden mehrere PROTACs entwickelt, die VHL binden. Der erste PROTAC zielte auf den nukleären Rezeptor ERR α ab (Abbildung 8), indem ein Thiazolidin-basierter selektiver ERR α -Ligand an einen VHL-Liganden gekuppelt wurde.^[38] Dieser PROTAC induzierte den Abbau von 50 % ERR α bei einer Konzentration von 100 nM (DC₅₀). Bemerkenswert ist, dass der PROTAC auch in vivo aktiv war. Die Behandlung mit PROTAC führte zu Reduzierung von ERR α auf 44 % in Herzen und Nieren von Mäusen sowie auf 39 % in MDA-MB-231-Xenograft-Tumoren.^[39]

Aufbauend auf diese vielversprechenden Resultate wurde ein weiterer PROTAC entwickelt, der auf die Serin/Threonin-Kinase RIPK2 (ein wichtiger Bestandteil der angeborenen Immunität) abzielt. Um den PROTAC RIPK2 zu erstellen, wurde ein RIPK2-Ligand mit einem 12 Atome langen Linker an den VHL-Liganden gekuppelt. Der so erhaltene PROTAC bedingte die Ubiquitinierung und folglich den proteasomalen Abbau von RIPK2 mit einer maximalen Effizienz von 95 % bei einer Konzentration von nur 10 nM. Als Negativkontrolle wurde das Epimer PROTAC RIPK2 epi eingesetzt, das keinen RIPK2-Abbau induziert. Im Unterschied zu CRBN-basierten PROTACs kann für VHL-PROTACs eine optimale Kontrolle (Hydroprolin-Epimer) hergestellt werden, die einen akkurateren Vergleich von Abbau und Inhibierung ermöglicht. Außerdem wurde der maximale Knockdown von RIPK2 nach nur 4 Stunden erreicht. Dies ist bemerkenswert, wenn man bedenkt, dass die natürliche intrazelluläre Halbwertszeit des Proteins bei 60 Stunden liegt.

Eine wesentliche, aber bislang nicht bewiesene Annahme besagt, dass PROTACs theoretisch mehrere Zyklen der Ubiquitinierung des Zielproteins vermitteln und dadurch katalytisch wirken können. Obwohl die katalytische Aktivität bereits in Studien, die den PROTAC-abhängigen Proteinab-

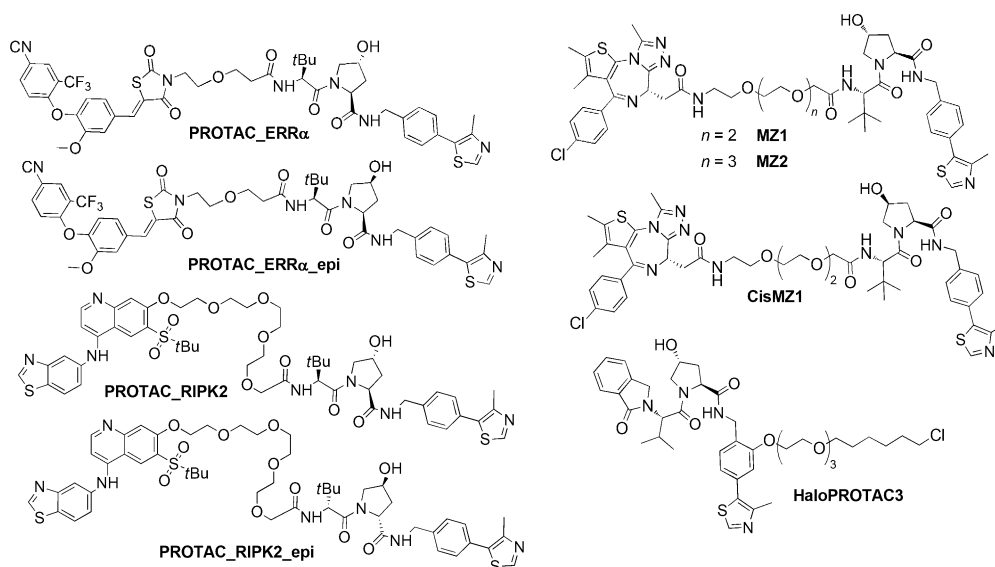


Abbildung 8. Niedermolekulare PROTACs, die die E3-Ligase VHL rekrutieren.

bau mit DC_{50} -Werten, die weit unter der Bindungsaffinitäten zu den jeweiligen Zielproteinen und E3 Ligasen liegen, angedeutet wurde, gab es noch keinen direkten Beweis dafür. Erst kürzlich beschäftigten sich Bondeson et al. direkt mit dieser Fragestellung in In-vitro-Ubiquitinierungsassays. 1 pmol PROTAC RIPK2 führte zur Bildung von 3.4 pmol ubiquitiniertem RIPK2, was eine Stöchiometrie von 3.4 ergibt.^[39] Dieses Resultat demonstriert die substöchiometrisch katalytischen Eigenschaften von PROTACs, ein wesentlicher Vorteil gegenüber herkömmlichen niedermolekularen Inhibitoren.

Niedermolekulare VHL-Liganden wurden auch verwendet, um PROTACs für BRD4 herzustellen. Der BRD4-Inhibitor JQ1 wurde mit einem VHL-Liganden verbunden, um die PROTACs MZ1 und MZ2 zu erzeugen.^[40] Beide PROTACs induzieren den Abbau von BRD4 innerhalb von 24 Stunden, wobei MZ1, der einen kurzen PEG-Linker enthält, wirksamer war. Dieses Ergebnis zeigt noch einmal, dass Linkerlänge und -zusammensetzung wichtige Variablen bei der Entwicklung von effizienten PROTACs darstellen.^[41] Bemerkenswert ist, dass die neuen Verbindungen nur den partiellen Abbau von BRD2 und BRD3 innerhalb von 24 Stunden vermitteln,^[40] im Unterschied zu den CRBN-basierten BRD4 PROTACs ARV-825^[34] und dBET1.^[36] Diese gegensätzlichen Resultate werfen die Frage auf, ob die Rekrutierung von verschiedenen E3-Ligasen zu verschiedenen Selektivitätsprofilen führen kann. Während MZ1 (90% BRD4 Abbau bei 100 nM) geringere Wirksamkeit als ARV-825 zeigt, ist die Verbindung eindeutig so potent wie dBET1. Diese Beobachtungen legen nahe, dass – zumindest im Fall von BRD4 – VHL oder CRBN rekrutiert werden können, um den effizienten PROTAC-abhängigen Abbau auszulösen. Dennoch wäre ein direkter Vergleich der beiden E3-Ligasen nützlich, um die Entscheidung zu unterstützen, welche E3-Ligase verwendet werden sollte, um mit zukünftigen PROTACs erhöhte Wirksamkeit und Selektivität zu erzielen.

Um den Einfluss des Linkers zwischen den beiden Liganden in einem PROTAC auf optimalen PROTAC-abhängigen Proteinabbau zu untersuchen, wurde ein vereinfachter chemisch-biologischer Assay entwickelt. Es wurden verschiedene VHL-PROTACs in Bezug auf ihre Aktivität bezüglich des Abbaus eines intrazellulären GFP-HaloTag7-Fusionsproteins getestet.^[13a] Durch das Testen von verschiedenen Linkerlängen und Befestigungspunkten wurde der beste PROTAC, HaloPROTAC3, gefunden. Dieser zeigte mehr als 90% Abbau von GFP-HaloTag7 – mit 50% Abbau nach 6 Stunden. Diese Untersuchung lieferte zwar einen sehr wirkungsvollen PROTAC, doch die Entwicklung von optimalen Linkern in zukünftigen PROTACs ist abhängig vom Zielprotein und wird daher eine individuelle Optimierung in jedem Einzelfall erfordern. Beindruckend ist, dass der HaloPROTAC3 bei einer Konzentration von 500 nM den vollständigen Knockdown von wichtigen Kinasen, die an HaloTag7 fusioniert wurden (HaloTag7-ERK1 und HaloTag7-Mek1), vermittelte.^[42] Zusammengefasst deuten diese Ergebnisse darauf hin, dass der HaloPROTAC3 eine Alternative zur weit verbreiteten Shield-1-Technik darstellt, um die biologische Rolle von bestimmten Proteinen zu erforschen.

4. Zusammenfassung und Ausblick

Im letzten Jahrzehnt hat die Strategie PROTACs zu nutzen um E3-Ligasen zu rekrutieren und dadurch den Abbau von Zielproteinen zu erzwingen, das Potenzial für therapeutische Anwendung gezeigt. Viele Proto-Onkoproteine wie der Androgenrezeptor, Östrogenrezeptor, BRD4, ERRα und RIPK2 wurden erfolgreich mithilfe dieser neuen Technik abgebaut, die robuster als beispielsweise hydrophobes Tagging ist. Darüber hinaus unterstreicht eine neue Studie die katalytische Aktivität von PROTACs. Dies legt nahe, dass PROTACs schon bei geringeren Konzentrationen als einfache Inhibitoren die entsprechenden therapeutischen Effekte

erzielen können. Die PROTAC-Strategie erscheint vielversprechend, um auch Proteine zu erreichen, die zurzeit als pharmazeutisch unzugänglich angesehen werden, da sie kein aktives Zentrum aufweisen oder eine nichtenzymatische Funktion ausüben, die nicht mit Inhibitoren adressierbar ist (z. B. im Fall von Pseudokinasen). Dennoch ist noch viel Arbeit nötig, um PROTACs in die klinische Entwicklung zu bringen. Die Herausforderungen bestehen jetzt darin, für jedes Zielprotein die optimale Linkerlänge und -zusammensetzung zu bestimmen und metabolische Schwachstellen zu beseitigen. Die Lösung dieser Probleme mithilfe von medizinischer Chemie wird es der PROTAC-Technik ermöglichen, in das Stadium der klinischen Erprobung vorzustoßen.

Danksagung

Wir danken Dr. John Hines, Daniel Bondeson, Ashton Lai and Saul Jaime-Figueroa für hilfreiche Beiträge zum Manuskript sowie der Leukemia & Lymphoma Society und den NIH (R35A197589, R01AI084140) für finanzielle Unterstützung.

Zitierweise: *Angew. Chem. Int. Ed.* **2016**, 55, 1966–1973
Angew. Chem. **2016**, 128, 2002–2010

- [1] a) J. A. Wells, C. L. McClendon, *Nature* **2007**, 450, 1001–1009; b) J. Kim, H. Kim, S. B. P. Seung, *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, 136, 14629–14638.
- [2] T. Tokatlian, T. Segura, *WIREs Nanomed. Nanobiotechnol.* **2010**, 2, 305–315.
- [3] a) K. Raina, C. M. Crews, *J. Biol. Chem.* **2010**, 285, 11057–11060; b) D. L. Buckley, C. M. Crews, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, 53, 2312–2330; *Angew. Chem.* **2014**, 126, 2344–2363; c) J. Liu, S. Shaik, X. Dai, Q. Wu, X. Zhou, Z. Wang, W. Wei, *Biochim. Biophys. Acta Rev. Cancer* **2015**, 1855, 50–60; d) E. Bulatov, A. Ciull, *Biochem. J.* **2015**, 467, 365–386.
- [4] K. Jhaveri, T. Taldone, S. Modi, G. Chiosis, *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell Res.* **2012**, 1823, 742–755.
- [5] J. S. Thrower, L. Hoffman, M. Rechsteiner, C. M. Pickart, *EMBO J.* **2000**, 19, 94–102; M. D. Petroski, R. J. Deshaies, *Mol. Cell* **2003**, 11, 1435–1444.
- [6] R. Rakhit, R. Navarro, T. J. Wandless, *Chem. Biol.* **2014**, 21, 1238–1252.
- [7] a) L. A. Banaszynski, L.-C. Chen, L. A. Maynard-Smith, A. G. L. Ooi, T. J. Wandless, *Cell* **2006**, 126, 995–1004; b) L. A. Banaszynski, T. J. Wandless, *Chem. Biol.* **2006**, 13, 11–21.
- [8] L. A. Banaszynski, M. A. Sellmyer, C. H. Contag, T. J. Wandless, S. H. Thorne, *Nat. Med.* **2008**, 14, 1123–1127.
- [9] K. M. Bongers, L.-C. Chen, C. W. Liu, T. J. Wandless, *Nat. Chem. Biol.* **2011**, 7, 531–537.
- [10] S. Al-Bassam, M. Xu, T. J. Wandless, D. B. Arnold, *Cell Rep.* **2012**, 2, 89–100.
- [11] M. D. Shoulders, L. M. Ryno, C. B. Cooley, J. W. Kelly, R. L. Wiseman, *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, 135, 8129–8132.
- [12] Q. Delacour, C. Li, M.-A. Plamont, E. Billon-Denis, I. Aujard, T. Le Saux, L. Jullien, A. Gautier, *ACS Chem. Biol.* **2015**, 10, 1643–1647.
- [13] a) C. G. England, H. Luo, W. Cai, *Bioconjugate Chem.* **2015**, 26, 975–986; b) G. V. Los, L. P. Encell, M. G. McDougall, D. D. Hartzell, N. Karassina, C. Zimprich, M. G. Wood, R. Learish, R. F. Ohana, M. Urh, D. Simpson, J. Mendez, K. Zimmerman, P. Otto, G. Vidugiris, J. Zhu, A. Darzins, D. H. Klaubert, R. F. Bulleit, K. V. Wood, *ACS Chem. Biol.* **2008**, 3, 373–382.
- [14] a) T. K. Neklesa, H. S. Tae, A. R. Schneekloth, M. J. Stulberg, T. W. Corson, T. B. Sundberg, K. Raina, S. A. Holley, C. M. Crews, *Nat. Chem. Biol.* **2011**, 7, 538–543; b) H. S. Tae, T. B. Sundberg, T. K. Neklesa, D. J. Noblin, J. L. Gustafson, A. G. Roth, K. Raina, C. M. Crews, *ChemBioChem* **2012**, 13, 538–541; c) T. K. Neklesa, D. J. Noblin, A. Kuzin, S. Lew, J. Seetharaman, T. B. Acton, G. Kornhaber, R. Xiao, G. T. Montelione, L. Tong, C. M. Crews, *ACS Chem. Biol.* **2013**, 8, 2293–2300.
- [15] T. K. Neklesa, C. M. Crews, *Nature* **2012**, 487, 308–309.
- [16] M. J. C. Long, D. R. Gollapalli, L. Hedstrom, *Chem. Biol.* **2012**, 19, 629–637.
- [17] a) T. Xie, S. M. Lim, K. D. Westover, M. E. Dodge, D. Ercan, S. B. Ficarro, D. Udayakumar, D. Gurbani, H. S. Tae, S. M. Riddle, T. Sim, J. A. Marto, P. A. Jänne, C. M. Crews, N. S. Gray, *Nat. Chem. Biol.* **2014**, 10, 1006–1012; b) S. M. Lim, T. Xie, K. D. Westover, S. B. Ficarro, H. S. Tae, D. Gurbani, T. Sim, J. A. Marto, P. A. Jänne, C. M. Crews, N. S. Gray, *Bioorg. Med. Chem.* **2015**, 25, 3382–3389.
- [18] J. L. Gustafson, T. K. Neklesa, C. S. Cox, A. G. Roth, D. L. Buckley, H. S. Tae, T. B. Sundberg, D. B. Stagg, J. Hines, D. P. McDonnell, J. D. Norris, C. M. Crews, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, 54, 9659–9662; *Angew. Chem.* **2015**, 127, 9795–9798.
- [19] G. Teutsch, F. Goubet, T. Battmann, A. Bonfils, F. Bouchoux, E. Cerede, D. Gofflo, M. Gaillard-Kelly, D. Philibert, *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **1994**, 48, 111–119.
- [20] T. W. Corson, N. S. Aberle, C. M. Crews, *ACS Chem. Biol.* **2008**, 3, 677–692.
- [21] K. Sakamoto, K.-B. Kim, A. Kumagai, F. Mercurio, C. M. Crews, R. J. Deshaies, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2001**, 98, 8554–8559.
- [22] K. Sakamoto, K.-B. Kim, R. Verma, A. Ransick, B. Stein, C. M. Crews, R. J. Deshaies, *Mol. Cell. Proteomics* **2003**, 2, 1350–1358.
- [23] W. Yang, L. W. Rozamus, S. Narula, C. T. Rollins, R. Yuan, L. J. Andrade, M. K. Ram, T. B. Phillips, M. R. van Schravendijk, D. Dalgarno, T. Clackson, D. A. Holt, *J. Med. Chem.* **2000**, 43, 1135–1142.
- [24] J. S. Schneekloth, Jr., F. N. Fonseca, M. Koldobskiy, A. K. Mandal, R. J. Deshaies, K. Sakamoto, C. M. Crews, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, 126, 3748–3754.
- [25] a) P. Bargagna-Mohan, S.-H. Baek, H. Lee, K.-B. Kim, R. Mohan, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2005**, 15, 2724–2727; b) H. Lee, D. Puppala, E.-Y. Choi, H. Swanson, K.-B. Kim, *ChemBioChem* **2007**, 8, 2058–2062; c) D. Puppala, H. Lee, K. B. Kim, H. I. Swanson, *Mol. Pharmacol.* **2008**, 73, 1064–1071; d) K. Cyrus, M. Wehenkel, E.-Y. Choi, H. Lee, H. Swanson, K.-B. Kim, *Chem-MedChem* **2010**, 5, 979–985.
- [26] K. Montrose, G. W. Krissansen, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2014**, 453, 735–740.
- [27] J. Hines, J. D. Gough, T. W. Corson, C. M. Crews, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2013**, 110, 8942–8947.
- [28] L. T. Vassilev, B. T. Vu, B. Graves, D. Carvajal, F. Podlaski, Z. Filipovic, N. Kong, U. Kammlott, C. Lukacs, C. Klein, N. Fotouhi, E. A. Liu, *Science* **2004**, 303, 844–848.
- [29] A. R. Schneekloth, M. Pucheault, H. S. Tae, C. M. Crews, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2008**, 18, 5904–5908.
- [30] Y. Itoh, M. Ishikawa, M. Naito, Y. Hashimoto, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, 132, 5820–5826.
- [31] Y. Itoh, R. Kitaguchi, M. Ishikawa, M. Naito, Y. Hashimoto, *Bioorg. Med. Chem.* **2011**, 19, 6768–6778.
- [32] a) S. Sato, M. Tetsuhashi, K. Sekine, H. Miyachi, M. Naito, Y. Hashimoto, H. Aoyama, *Bioorg. Med. Chem.* **2008**, 16, 4685–4698; b) K. Sekine, K. Takubo, R. Kikuchi, M. Nishimoto, M. Kitagawa, F. Abe, K. Nishikawa, T. Tsuruo, M. Naito, *J. Biol. Chem.* **2008**, 283, 8961–8968.
- [33] a) T. Ito, H. Ando, T. Suzuki, T. Ogura, K. Hotta, Y. Imamura, Y. Yamaguchi, H. Handa, *Science* **2010**, 327, 1345–1350; b) J. Krönke, N. D. Udeshi, A. Narla, P. Grauman, S. N. Hurst, M. McConkey, T. Svinkina, D. Heckl, E. Comer, X. Li, C. Ciarlo, E.

- Hartman, N. Munshi, M. Schenone, S. L. Schreiber, S. A. Carr, B. L. Ebert, *Science* **2014**, *343*, 301–305; c) G. Lu, R. E. Middleton, H. Sun, M. Naniong, C. J. Ott, C. S. Mitsiades, K. K. Wong, J. E. Bradner, W. G. Kaelin, Jr., *Science* **2014**, *343*, 305–309; d) E. S. Fischer, K. Böhm, J. R. Lydeard, H. Yang, M. B. Stadler, S. Cavadini, J. Nagel, F. Serluca, V. Acker, G. M. Lingaraju, R. B. Tichkule, M. Schebesta, W. C. Forrester, M. Schirle, U. Hassiepen, J. Ottl, M. Hild, R. E. Beckwith, J. W. Harper, J. L. Jenkins, N. H. Thomä, *Nature* **2014**, *512*, 49–53; e) K. M. Kortüm, Y. X. Zhu, C. X. Shi, P. Jedlowski, A. K. Stewart, *Blood Rev.* **2015**, *29*, 329–334.
- [34] J. Lu, Y. Qian, M. Altieri, H. Dong, J. Wang, K. Raina, J. Hines, J. D. Winkler, A. P. Crew, K. Coleman, C. M. Crews, *Chem. Biol.* **2015**, *22*, 755–763.
- [35] P. Filippakopoulos, J. Qi, S. Picaud, Y. Shen, W. B. Smith, O. Fedorov, E. M. Morse, T. Keates, T. T. Hickman, I. Felletar, M. Philpott, S. Munro, M. R. McKeown, Y. Wang, A. L. Christie, N. West, M. J. Cameron, B. Schwartz, T. D. Heightman, N. La Thangue, C. A. French, O. Wiest, A. L. Kung, S. Knapp, J. E. Bradner, *Nature* **2010**, *468*, 1067–1073.
- [36] a) G. E. Winter, D. L. Buckley, J. Paulk, J. M. Roberts, A. Souza, S. Dhe-Paganon, J. E. Bradner, *Science* **2015**, *348*, 1376–1381; b) S. Crunkhorn, *Nat. Rev. Drug Discovery* **2015**, *14*, 459.
- [37] a) D. L. Buckley, I. Van Molle, P. C. Gareiss, H. S. Tae, J. Michel, D. J. Noblin, W. L. Jorgensen, A. Ciulli, C. M. Crews, *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 4465–4468; b) I. Van Molle, A. Thomann, D. L. Buckley, E. C. So, S. Lang, C. M. Crews, A. Ciulli, *Chem. Biol.* **2012**, *19*, 1300–1312; c) D. L. Buckley, J. L. Gustafson, I. Van Molle, A. G. Roth, H. S. Tae, P. C. Gareiss, W. L. Jorgensen, A. Ciulli, C. M. Crews, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 11463–11467; *Angew. Chem.* **2012**, *124*, 11630–11634; d) C. Galdeano, M. S. Gadd, P. Soares, S. Scaffidi, I. Van Molle, I. Birced, S. Hewitt, D. M. Dias, A. Ciulli, *J. Med. Chem.* **2014**, *57*, 8657–8663.
- [38] R. J. Patch, L. L. Searle, A. J. Kim, D. De, X. Zhu, H. B. Askari, J. C. O'Neill, M. C. Abad, D. Rentzeperis, J. Liu, M. Kemmerer, L. Lin, J. Kasturi, J. G. Geisler, J. M. Lenhard, M. R. Player, M. D. Gaul, *J. Med. Chem.* **2011**, *54*, 788–808.
- [39] a) D. P. Bondeson, A. Mares, I. E. D. Smith, E. Ko, S. Campos, A. H. Miah, K. Mulholland, N. Routly, D. L. Buckley, J. L. Gustafson, N. Zinn, P. Grandi, S. Shimamura, G. Bergamini, M. Faelth-Savitski, M. Bantscheff, C. Cox, D. A. Gordon, R. R. Willard, J. J. Flanagan, L. N. Casillas, B. J. Votta, W. den Besten, K. Famm, L. Kruidenier, P. S. Carter, J. D. Harling, I. Churcher, C. M. Crews, *Nat. Chem. Biol.* **2015**, *11*, 611–617; b) R. J. J. Deshaies, *Nat. Chem. Biol.* **2015**, *11*, 634–635.
- [40] M. Zengerle, K.-H. Chan, A. Ciulli, *ACS Chem. Biol.* **2015**, *10*, 1770–1777.
- [41] K. Cyrusa, M. Wehenkela, E.-Y. Choib, H.-J. Hana, H. Leea, H. Swansonb, K.-B. Kim, *Mol. BioSyst.* **2011**, *7*, 359–364.
- [42] D. L. Buckley, K. Raina, N. Darricarrere, J. Hines, J. L. Gustafson, I. E. Smith, A. H. Miah, J. D. Harling, C. M. Crews, *ACS Chem. Biol.* **2015**, *10*, 1831–1837.

Eingegangen am 25. August 2015

Online veröffentlicht am 12. Januar 2016

Übersetzt von Doris Hellerschmied und Lukas Jelinek