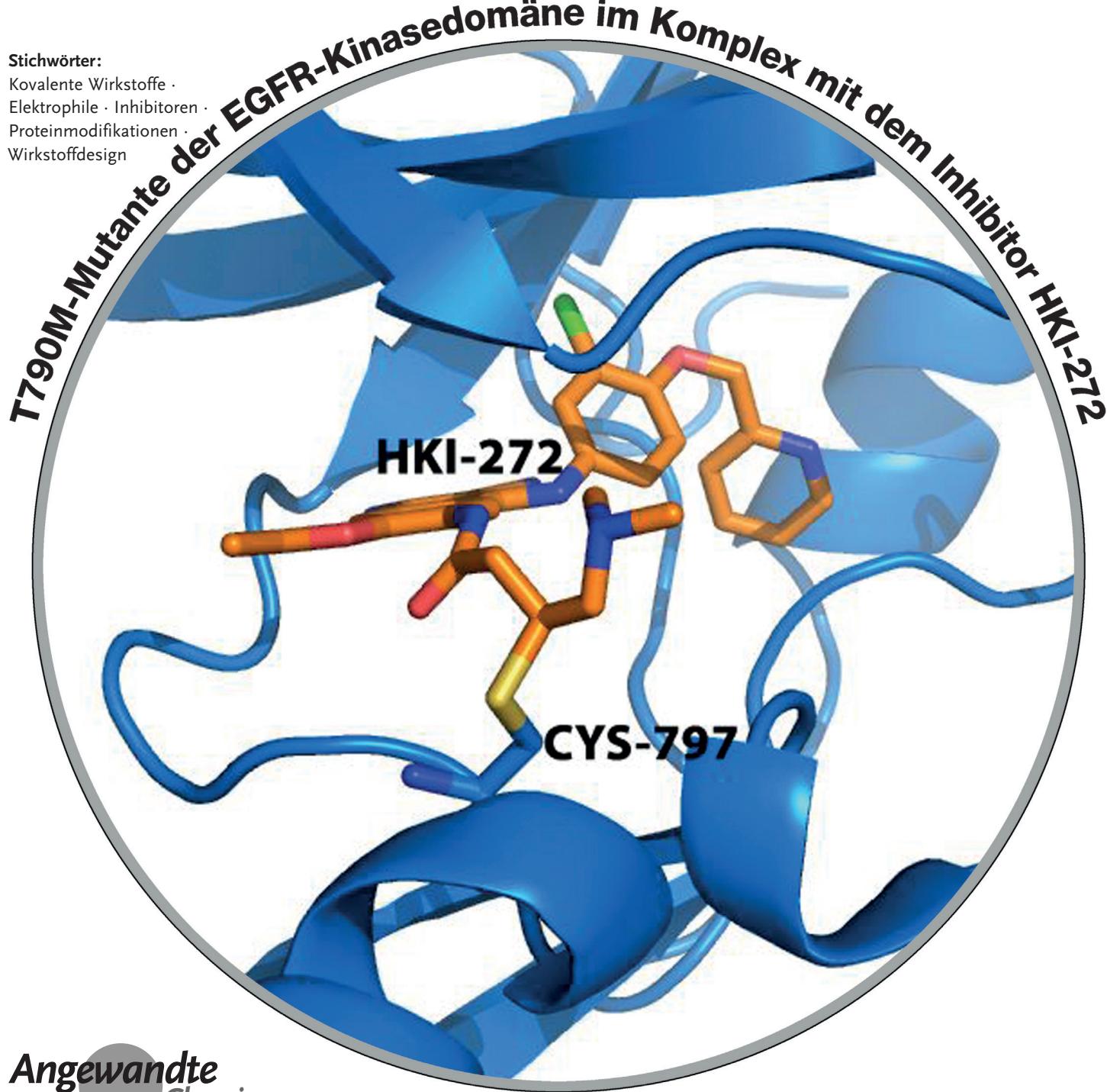


# Zielgerichtete kovalente Inhibitoren für das Wirkstoffdesign

Thomas A. Baillie\*

Stichwörter:

Kovalente Wirkstoffe ·  
Elektrophile · Inhibitoren ·  
Proteinmodifikationen ·  
Wirkstoffdesign



**A**bweichend vom üblichen Arzneimittelwirkmechanismus einer reversiblen, nichtkovalenten Wechselwirkung eines Liganden mit seinem biologischen Zielmolekül wird ein zielgerichteter kovalenter Inhibitor (TCI) so entwickelt, dass nach einer anfänglichen reversiblen Assoziation eine kovalente Bindung zwischen einem Elektrophil auf dem Liganden und einem nucleophilen Zentrum auf dem Protein geknüpft wird. Obwohl diese Methode einige potenzielle Vorteile bietet (hohe Wirksamkeit, verlängerte Wirkung), haben Bedenken wegen möglicher toxikologischer Folgen durch Proteinhaptenisierung die Entwicklung des TCI-Konzepts aufgehalten. Neue Ansätze zur Verringerung des Risikos ernster ungünstiger Reaktionen regten das Interesse an diesem Gebiet an und führten zur Vertriebsgenehmigung für eine erste Serie von TCIs. Der Zugang über kovalente Inhibitoren wird daher rasch als nützliches Mittel in der Arzneimittelforschung akzeptiert werden und großen Einfluss auf das Design von Enzyminhibitoren und Rezeptormodulatoren ausüben.

## 1. Einführung

Der Begriff „zielgerichteter kovalenter Inhibitor“ („targeted covalent inhibitor“, TCI) bezieht sich auf eine Verbindung, die entwickelt wurde, um kovalent an ein bestimmtes Zielmolekül zu binden und dessen biologische Funktion zu unterdrücken. Diese Methode zur Wirkstoffsuche, die weitgehende Unterstützung durch die Bioinformatik erfordert, übernimmt die Prinzipien des strukturbasierten Wirkstoffdesigns und unterscheidet sich von anderen pharmakologischen Mechanismen, bei denen ein kovalentes Addukt mit Proteinen gebildet wird, z.B. den Mechanismusbasierten („Suizid-Substrat“-)Inhibitoren, die eine Aktivierung durch das Zielenzym benötigen.<sup>[1]</sup> Der Vorgang, durch den TCIs die „Protein-Stummschaltung“ erreichen, beruht auf zwei verwandten, aber getrennten Schritten: Im ersten Schritt erfolgt eine reversible Assoziation des Inhibitors (ein hochaffiner Ligand) mit seinem biologischen Ziel in der Weise, dass eine schwache elektrophile Funktionalität („Gefechtskopf“, „warhead“) auf dem Liganden nahe an einen geeignet positionierten nucleophilen Rest des Proteins gebracht wird (gewöhnlich, aber nicht immer, eine Cysteinyl-SH-Gruppe). Im zweiten Schritt findet eine spontane Reaktion zwischen den beteiligten funktionellen Gruppen auf dem Liganden und dem Protein statt und liefert das kovalent modifizierte, inaktivierte Protein. Die Wirkung eines TCI kann durch den in Gleichung (1) gezeigten allgemeinen Mechanismus beschrieben werden, wobei  $K_i$  die Bindungskonstante für die nichtkovalente Bindung (die Affinität des Liganden zum Enzym) und  $k_{\text{inact}}$  die Geschwindigkeitskonstante für die Enzymaktivierung bezeichnen.<sup>[1]</sup>



## Aus dem Inhalt

<b>1. Einführung</b>	13607
<b>2. Reversibilität und Wirkungsdauer</b>	13610
<b>3. Selektivität und Wirksamkeit</b>	13613
<b>4. Metabolismus und Disposition</b>	13614
<b>5. Verringerung der Toxizitätsrisiken bei kovalenten Inhibitoren</b>	13616
<b>6. Zusammenfassung und Ausblick</b>	13617

Zur Adduktbildung können viele chemische Reaktionen herangezogen werden, wobei einige zu Produkten führen, deren Bildung auf der biologischen Zeitskala vermutlich reversibel ist (z.B. Acylierungen, Bildung von Thioimidaten, Halbketalen oder Disulfiden), während andere die Proteine eher irreversibel inaktivieren (z.B. Alkylierungen, Michael-Additionen).<sup>[2,3]</sup> Daher kann durch sorgfältige Planung der Ligandstruktur und vornünftige Wahl der reagierenden Funktionalitäten auf Ligand und Protein beim TCI-Ansatz ein hohes Maß an Selektivität erreicht werden, zusammen mit Faktoren wie Reversibilität, die zur Wirkungsdauer des Inhibitors beitragen. Wie in Abschnitt 3 diskutiert wird, ist für ein erfolgreiches TCI-Design die Selektivität von entscheidender Bedeutung.<sup>[4]</sup>

Aus dem TCI-Ansatz ergeben sich zahlreiche Vorteile, wie hohe Wirksamkeit (durch vollständige Blockade der Zielstruktur),<sup>[5]</sup> geringe Dosis (eine Folge der hohen Wirksamkeit), verlängerte Wirkungsdauer (bestimmt durch die Turnover-Zeit des Proteins im Unterschied zu den pharmakokinetischen (PK-)Eigenschaften des Wirkstoffs) und allgemeine Anwendbarkeit bei Enzymen, Rezeptoren und Zielstrukturen mit flachen Bindungsstellen, die mit herkömmlichen Methoden nicht zugänglich sind.<sup>[1–4,6,7]</sup> Technologien, die auf der Verwendung von Aktivitäts-basierten Sonden,<sup>[8–10]</sup> Klick-Chemie<sup>[11]</sup> und Proteomik-Massenspektrometrie<sup>[12]</sup> beruhen, ermöglichen eine Abschätzung der Selektivität sowie der Zeit- und Dosis-abhängigen Belegung der Zielstruktur *in vitro* und *in vivo*, woraus sich Beziehungen zwischen der Zielbelegung und biologischen Effekten ableiten lassen.<sup>[3]</sup> Letztere ersetzen für diese Arzneimittelklasse die Pharmakokinetik-Pharmakodynamik(PK-PD)-Bezie-

[\*] Prof. T. A. Baillie

Department of Medicinal Chemistry, School of Pharmacy  
University of Washington  
Box 357610, Seattle, WA 98195-7610 (USA)  
E-Mail: tbaillie@uw.edu

 Die Identifikationsnummer (ORCID) des Autors ist unter <http://dx.doi.org/10.1002/anie.201601091> zu finden.

hungen und sind entscheidend bei der Übersetzung präklinischer Wirkungen von TCIs auf die Situation im Menschen. Schließlich haben die TCIs der „zweiten Generation“ wie Afatinib und Neratinib (HKI-272) auf dem Gebiet der Kininasen eine hohe Aktivität gegenüber Mutanten (T790M, L858R) des epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptors (EGFR) gezeigt, der als hauptsächliche Quelle des Widerstands gegen eine Chemotherapie mit den reversiblen EGFR-Inhibitoren der „ersten Generation“ Gefitinib, Erlotinib und Lapatinib gilt.<sup>[13]</sup> Die T790M-Mutation in EGFR-Kinase erhöht die ATP-Affinität des onkogenen L858R-Mutanten um mehr als eine Größenordnung und macht kompetitive Inhibitoren ineffektiv, aber durch kovalente Modifizierung von Cys-797 in der ATP-Bindungstasche mit den genannten TCIs wird dieser resistente Phänotyp überwunden.<sup>[14]</sup>

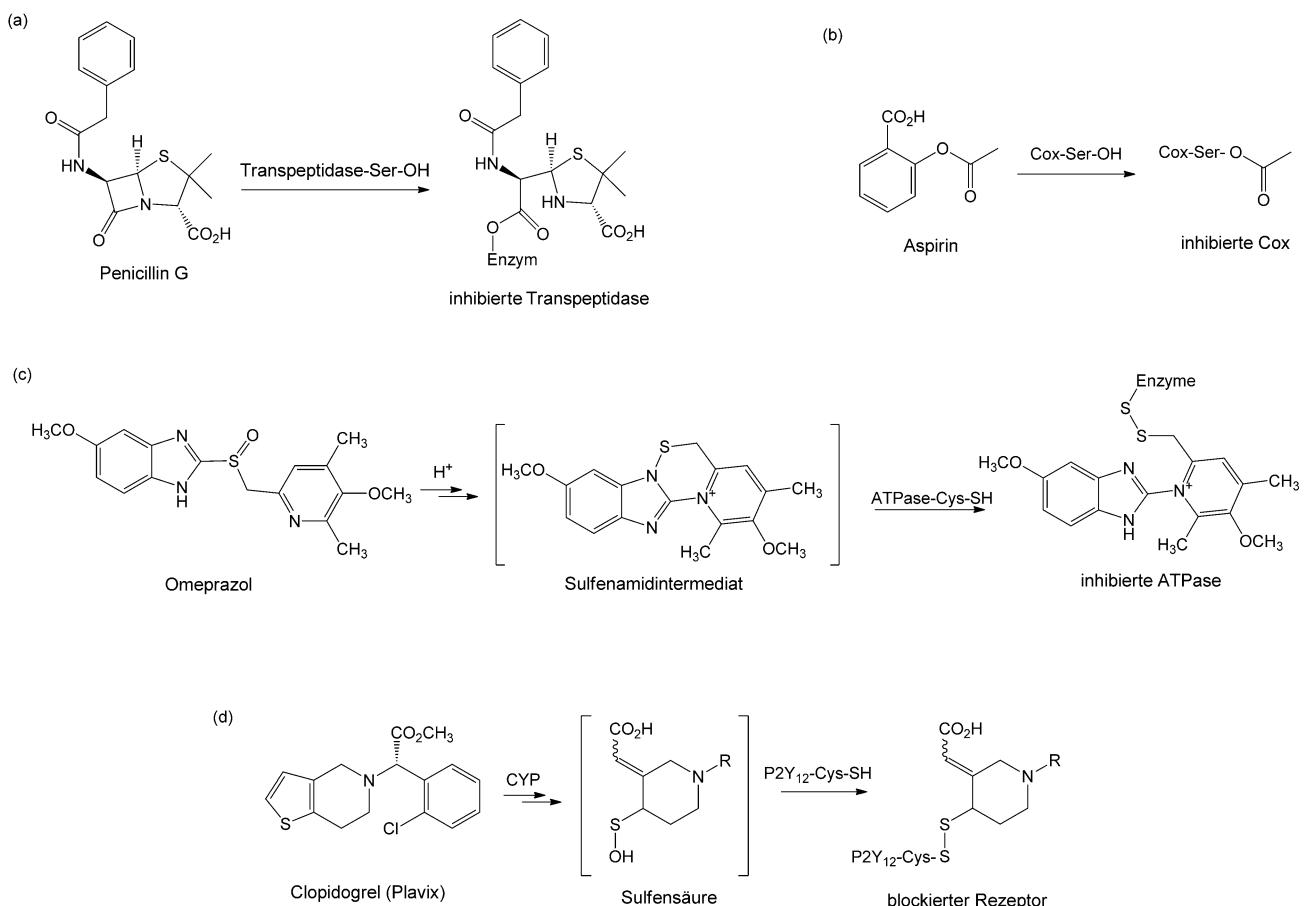
Trotz der erwarteten Vorteile des TCI-Ansatzes beim Wirkstoffdesign wurde eine Anwendung des Konzepts in industriellen Arzneimittel-Forschungsprogrammen bis zu den späten 1990ern nicht ernsthaft in Erwägung gezogen,<sup>[15]</sup> teilweise wegen des Mangels an Bioinformatik- und Proteomik-Instrumenten, die heute zu wesentlichen Komponenten des Designs kovalenter Inhibitoren geworden sind. Noch wichtiger war vielleicht der warnende Einfluss von Forschungsarbeiten zur mechanistischen Basis schwerer Wirkstoff-vermittelter Toxizität, die während der vorhergehenden zwei Dekaden durchgeführt wurden und die in vielen Fällen auf chemisch reaktive Wirkstoffmetaboliten als ursächliche Agentien hinwiesen.<sup>[16,17]</sup> So wurde gezeigt, dass die hepatotoxischen Effekte einiger zugelassener Arzneimittel (z.B. Acetaminophen, Isoniazid, Furosemid, Halothan) und Modell-Hepatotoxine (z.B. Brombenzol, Thioacetamid) in Tieren und Menschen mit elektrophilen Zwischenstufen zusammenhängen, die im Verlauf der durch Cytochrom P-450 (CYP) katalysierten Oxidationsreaktionen gebildet werden.<sup>[18]</sup> Isotopenmarkierungsstudien ergaben, dass die von diesen Agentien gebildeten reaktiven Spezies kovalent an zelluläre Proteine gebunden werden, und es wurde vermutet, dass der resultierende strukturelle und funktionelle Defekt die Basis für die beobachtete Zelltoxizität bildet.<sup>[19]</sup> In einigen Situationen schienen bei empfindlichen Individuen Wirkstoff-Protein-Addukte immunogen zu sein und eine Antwort auszulösen, die sich häufig Wochen oder Monate nach Beginn der Therapie als idiosynkratische Reaktion äußerte.<sup>[20]</sup> Folglich zögerte die pharmazeutische Industrie verständlicher-

weise, die Entwicklung von Verbindungen, deren Wirkmechanismus auf der kovalenten Modifizierung zellulärer Proteine beruhte, weiter zu verfolgen. Moleküle mit reaktiven funktionellen Gruppen galten lange als uninteressante Wirkstoffkandidaten, da sie typischerweise geringe PK-Eigenschaften (bemerkenswert hohe Clearance) aufweisen,<sup>[21]</sup> während Komponenten, die zu reaktiven Elektrophilen metabolisiert wurden, in einem frühen Entwicklungsstadium ausgesiebt wurden, um das Risiko zu minimieren, auf Wirkstoff-induzierte Toxizität zu stoßen.<sup>[22–24]</sup>

Entgegen dem obigen Hintergrund ergaben sich aus der Forschung auf den Gebieten Wirkstoffmetabolismus und -toxikologie zwei Faktoren, die das Vorurteil gegenüber kovalenten Modifikatoren als Therapeutika infrage stellten. Zuerst wurde festgestellt, dass nicht alle Wirkstoffe, die metabolisch aktiviert werden, für den Wirt toxisch sind, und obwohl die Gründe dafür unklar waren (und größtenteils bleiben), legte diese Beobachtung nahe, dass nicht alle Typen kovalenter Proteinmodifizierung notwendigerweise zur Toxizität führen. Unterstützt wurde diese Ansicht durch die Entdeckung, dass eine Anzahl sicherer und effektiver kommerzieller Wirkstoffe ihre pharmakologische Wirkung durch kovalente Modifizierung ihrer entsprechenden Zielproteine ausübt; so fungieren Aspirin und  $\beta$ -Lactam-haltige Antibiotika (Penicilline, Cephalosporine, Carabapeneme) als acylirende Agentien bei Cyclooxygenasen (Cox-1 und -2) bzw. der bakteriellen D-Ala,D-Ala-Transpeptidase; Omeprazol und verwandte Inhibitoren von Protonenpumpen werden in der Magensäure in reaktive Sulfensäuren umgewandelt, die im Gleichgewicht mit Sulfenamiden stehen und an die H<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase in Parietalzellen des Magens binden;<sup>[2,25]</sup> Clopidogrel und dazugehörige Gerinnungshemmer werden ebenfalls in Sulfensäuren überführt (in diesem Fall durch oxidative Metabolisierung) und binden im Blut kovalent an den P2Y<sub>12</sub>-Purinorezeptor auf der Thrombozytenoberfläche (Abbildung 1).<sup>[2,26]</sup> Bemerkenswert ist, dass die durch diese Wirkstoffe gebildeten Addukttypen entweder Esterderivate von Serinresten (Aspirin und  $\beta$ -Lactame) oder Disulfidderivate von Cysteinresten enthalten — d.h. in beiden Fällen Bindungen, die in biologischer Umgebung enzymatisch (durch Hydrolyse bzw. Reduktion) gespalten werden können, sodass die Schädigungen an den Zielproteinen in der Natur nicht permanent sein würden. Ob diese Eigenschaft zur ausgezeichneten Sicherheit dieser Wirkstoffklasse beiträgt, bleibt ungewiss, die Frage ist aber für das Design sicherer TCIs äußerst relevant (siehe Abschnitt 2). Zweitens zeigten Studien zur Beschaffenheit der durch metabolische Aktivierung hepatotoxischer Wirkstoffe gebildeten, kovalenten Proteinaddukte, dass die betreffenden reaktiven Metaboliten mit zahlreichen Leberproteinen reagierten und dass sich die Bindungen zu den nucleophilen Zentren der Proteine nicht durch chemische oder Enzym-vermittelte Prozesse trennen ließen. Zum Beispiel bildet der reaktive Metabolit von Acetaminophen, N-Acetyl-p-benzochinonimin (NAPQI), Addukte mit mehr als 20 Proteinen in der Mausleber,<sup>[27]</sup> was auf einen deutlichen Mangel an Selektivität für eine Bindung an individuelle Zielproteine schließen lässt — ein kaum überraschender Befund angesichts der großen chemischen Reaktivität dieses Elektrophils.<sup>[28]</sup> Interessanterweise zeigt



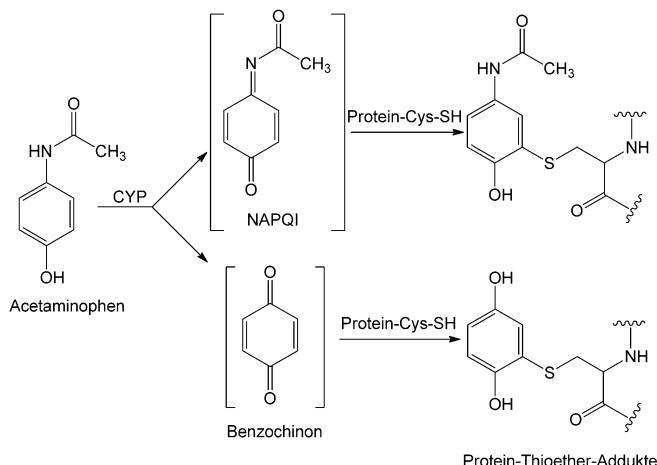
Thomas A. Baillie ist Dean Emeritus der School of Pharmacy an der University of Washington. Er studierte Chemie (B.Sc., Ph.D., D.Sc.) an der University of Glasgow (Schottland) und war Postdoktorand am Karolinska Institute in Stockholm bei Prof. Jan Sjövall. Zusätzlich zu akademischen Anstellungen an der University of London und der University of California San Francisco war er Global Vice President of Drug Metabolism and Pharmacokinetics in den Merck Research Laboratories. Seine Forschungsinteressen sind die metabolische Aktivierung körperfremder Verbindungen und die Rolle reaktiver Zwischenstufen bei chemisch induzierter Toxizität.



**Abbildung 1.** Beispiele für Wirkstoffe, deren pharmakologischer Reaktionsmechanismus nachträglich aufgeklärt wurde und eine kovalente Modifizierung ihrer jeweiligen biologischen Zielmoleküle umfasst. Diese Verbindungen wurden nicht *a priori* entwickelt, um als kovalente Inhibitoren zu wirken, und sind daher nicht als TCIs klassifiziert. Penicillin G (a) und Aspirin (b) sind von Natur aus reaktive acylierende Agentien, die mit Serinresten von Proteinen Ester bilden, während Omeprazol (c) und Clopidogrel (d) *in vivo* aktiviert werden müssen, um elektrophile Intermediate zu generieren, die Disulfidbrücken mit Cysteinresten auf ihren Zielproteinen bilden.

NAPQI (ebenso wie *p*-Benzochinon, das parallel aus Acetaminophen gebildet wird<sup>[29]</sup>) eine starke Präferenz für Cysteinylthiole als Alkylierungsstelle auf Proteinen, wodurch stabile Thioetherkonjugate an der C-3'-Position des aromatischen Rings entstehen (Abbildung 2).<sup>[30]</sup> Diese Befunde, zusammen mit solchen aus Adduktstudien, die mit anderen elektrophilen Intermediaten erhalten wurden,<sup>[31]</sup> lassen auf wichtige Eigenschaften chemisch reaktiver Wirkstoffmetaboliten schließen, nämlich auf deren Tendenz, ein hohes Maß an Elektrophilie zu zeigen und infolgedessen recht wahllos an zelluläre Proteine zu binden. Diese Eigenschaften sind entgegengesetzt zu denen eines idealen TCI, der eine schwach elektrophile Gruppe („Gefechtskopf“) trägt, die zu einem spezifischen Zielprotein liefert wird.

Angesichts der Unterschiede zwischen chemisch reaktiven Metaboliten und TCIs in Bezug auf ihre intrinsischen elektrophilen Eigenschaften und ihre Selektivität gegenüber Zielproteinen wurde vorgeschlagen, die Vorzüge selektiver kovalenter Modifikatoren als Wirkstoffkandidaten neu zu bewerten.<sup>[1,2]</sup> Angeregt durch die vielseitige Chemie, die bei Protein-reaktiven Naturstoffen genutzt wird,<sup>[34]</sup> konzentrieren sich erste Arbeiten auf die Entwicklung acylierender



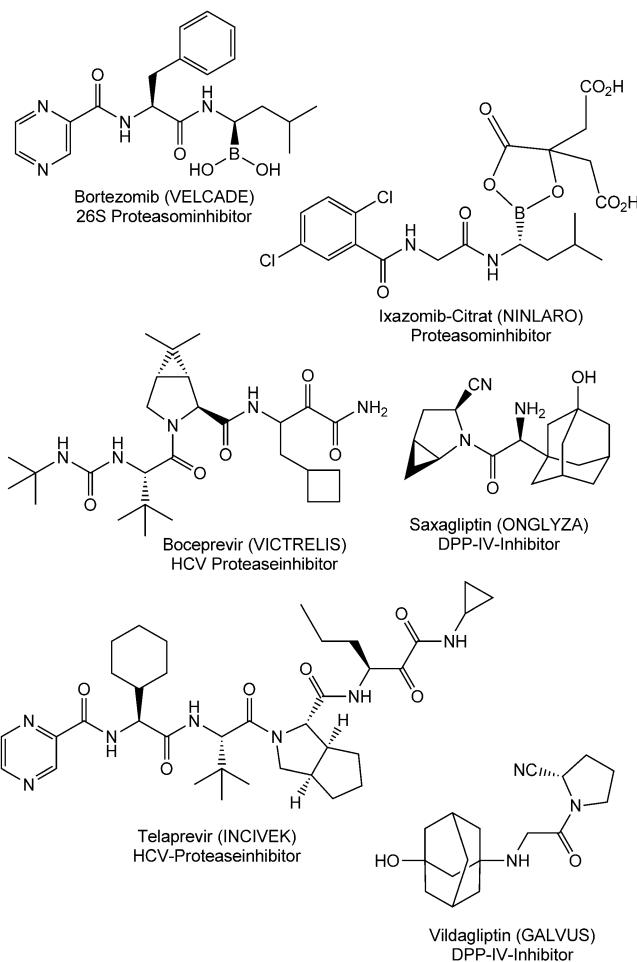
**Abbildung 2.** Cytochrom-P-450-vermittelte Oxidation von Acetaminophen zu reaktiven Chinon-Zwischenstufen (NAPQI und Benzochinon), die durch Reaktionen mit Cysteinylsulphydrylgruppen eine breite Auswahl an Proteinen kovalent modifizieren. Für eine genauere Diskussion der zugrundeliegenden Katalysemechanismen sei der Leser auf Lit. [29] verwiesen.

Analoga zu natürlichen  $\beta$ -Lactamen und  $\beta$ -Lactonen.<sup>[32,33]</sup> Bald wurden schwach reaktive Michael-Akzeptoren (vorzugsweise Acrylamidderivate) die bevorzugten „Gefechtsköpfen“ auf TCIs; sie zielen dabei auf Proteinkinasen wie EGFR<sup>T790M</sup>, erbB2 oder Her2 und auf die Kinase der Tec-Familie, Brutons Tyrosinkinase (BTK), wo die Alkylierung des Cys-481-Rests im aktiven Zentrum durch Agentien wie Ibrutinib (PCI-32765) zur wirksamen Hemmung des Proteins führte.<sup>[35–39]</sup> Im letzten Jahrzehnt hat das TCI-Konzept als wertvolles Mittel zur Wirkstoffentdeckung schnell an Akzeptanz gewonnen, und es wurden verschiedenartige Proteine als Ziel für diesen Zugang ausgewählt, darunter eine Reihe von Serin-, Threonin- und Cystein-Proteasen<sup>[40]</sup> wie HCV NS3/4A,<sup>[41]</sup> und NSSB<sup>[42]</sup>-Virus-Proteasen, Dengue-Virus-Protease<sup>[43]</sup> und Methionin-Aminopeptidase 2.<sup>[44]</sup> Zu den weiteren Zielmolekülen gehören Sichelzellenhämoglobin,<sup>[45]</sup> Fettsäureamid-Hydrolase,<sup>[46,47]</sup> Keap-1,<sup>[21]</sup> Caspase-1,<sup>[48]</sup> Glyceraldehyd-2-phosphat-Dehydrogenase,<sup>[49]</sup> 20S-Proteasom<sup>[50]</sup> und mutiertes Ras-Protein.<sup>[51]</sup> Die stärkste Aktivität gab es auf dem Gebiet der Proteinkinasen,<sup>[52]</sup> wo, zusätzlich zu BTK und den erworbenen wirkstoffresistenten Formen von EGFR, TCIs für Bmx-<sup>[53]</sup> FGFR-<sup>[54]</sup> GSK3 $\beta$ -,<sup>[55]</sup> Itk-<sup>[56]</sup> JNK-<sup>[57]</sup> Kit/PDGFR-<sup>[58]</sup> Nek2-<sup>[59]</sup> PI3ka-<sup>[60]</sup> RSK-<sup>[61]</sup> eEF-2K-<sup>[62]</sup> und Src-Kinasen entwickelt wurden.<sup>[63,64]</sup>

In diesem Aufsatz wird die Entwicklung der TCIs innerhalb der letzten Dekade zusammengefasst, mit Schwerpunkt auf den Erkenntnissen aus der Arbeit mit klinischen Kandidaten und neu zugelassenen kovalenten Wirkstoffen. Typische Beispiele für TCIs, die bisher die FDA-Marktzulassung erhalten haben, sind in den Abbildungen 3 und 4 gezeigt. Für eine umfassendere Übersicht zu elektrophilen „Gefechtsköpfen“, gegenwärtigen TCI-Zielproteinen und Verbindungen in unterschiedlichen Entwicklungsstadien sei der Leser auf mehrere ausgezeichnete Beiträge zu diesen Themen verwiesen.<sup>[1,3,6,13,24,65–70]</sup>

## 2. Reversibilität und Wirkungsdauer

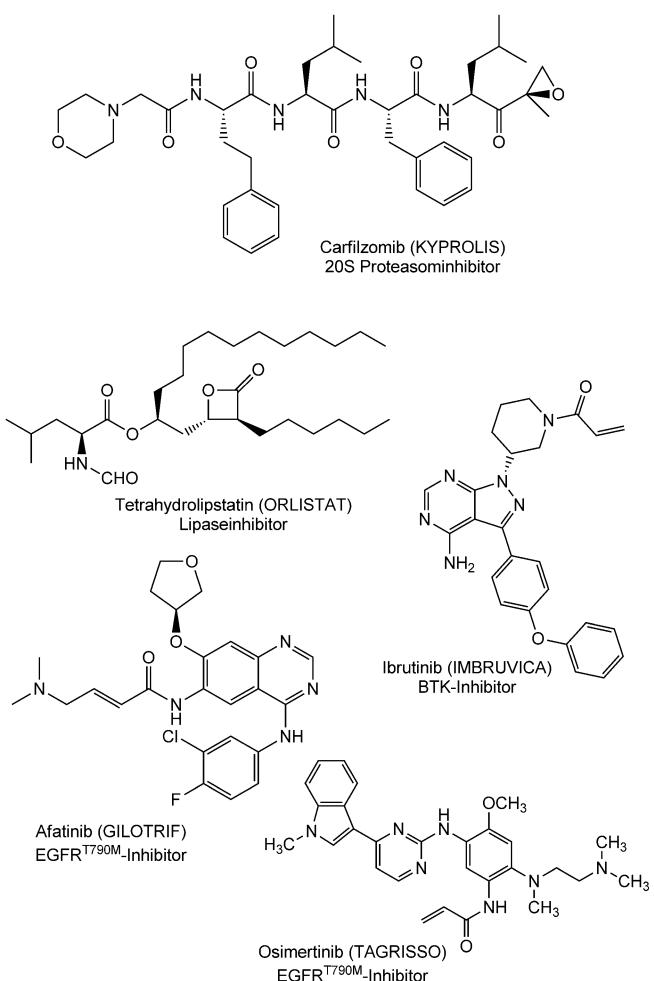
Kovalente Inhibitoren können in zwei Kategorien eingeteilt werden, je nachdem, ob die Addukte mit dem Zielprotein auf der biologischen Zeitskala funktionell reversibel sind oder nicht. Reversible TCIs binden kovalent an ihre Zielstruktur und dissoziieren anschließend wieder mit einer Geschwindigkeit ab, die höher als die Umsatzgeschwindigkeit des Proteins ist.<sup>[3]</sup> Beispiele für diesen Mechanismus finden sich bei Reaktionen zwischen Proteinen und Inhibitoren mit elektrophilen „Gefechtsköpfen“ wie Aldehyden, aktivierten Ketonen,  $\alpha$ -Ketoamiden,  $\alpha$ -Ketoheterocyclen, Carbonitrilen und Boronsäurederivaten, von denen viele als kovalente Übergangszustands-Inhibitoren fungieren, die als reversible TCIs auf das 20S- oder 26S-Proteasom<sup>[71]</sup> sowie auf Serinhydrolasen,<sup>[72]</sup> Cathepsin-Cystein-Proteasen<sup>[73]</sup> und Dipeptidylpeptidase-IV<sup>[74]</sup> wirken (Abbildung 3). Irreversible TCIs wiederum bilden mit ihren Zielproteinen Addukte, die innerhalb der Lebensdauer des Proteins nicht dissoziieren oder nur mit einer kinetischen Halbwertszeit, die beträchtlich länger ist als die Neusynthesegeschwindigkeit des Proteins.<sup>[3]</sup> Solche Verbindungen, von denen viele Kinaseinhibitoren sind



**Abbildung 3.** Strukturen FDA-zugelassener Wirkstoffe, die durch reversible kovalente Modifizierung ihrer jeweiligen Zielmoleküle wirken.

(Abbildung 4), enthalten häufig „Gefechtsköpfe“ aus stärkeren Elektrophilen, z.B. Epoxide,  $\alpha$ -Halogenketone, Acyloxymethylketone, Aziridine, Vinylsulfone und aktivierte Acetylene, aber am meisten verwendet werden Michael-Akzeptoren auf Grundlage der Acrylamid-Funktionalität, die, als relativ schwaches Elektrophil, für eine Reaktion eine große Nähe zum nucleophilen Ziel benötigt.

Im Allgemeinen erfordern TCIs, die über einen reversiblen Mechanismus funktionieren, nachhaltige Konzentrationen im Plasma, um die Wirksamkeit an der Zielstruktur aufrechtzuerhalten (genau wie nichtkovalente Wirkstoffe), während die Wirkungsdauer irreversibler Inhibitoren recht lange sein kann, da die Wiedergewinnung der Aktivität von der De-novo-Synthese des Proteins abhängt. Zum Beispiel weist die Interleukin-2-induzierbare T-Zell-Kinase (Itk) in ruhenden primären T-Zellen *in vitro* eine Halbwertszeit von ca. 2 h auf, während die kovalente Inhibierung von Itk zur Stabilisierung des Proteins und funktionalen Stilllegung des T-Zell-Rezeptorweges für mehr als 24 h führt.<sup>[56]</sup> Ähnliche Effekte werden *in vivo* beobachtet, wo die Dauer der pharmakologischen Wirkung eines TCI in Tieren und Menschen seine PK-Halbwertszeit in hohem Maße überschreiten kann. Ein typisches Beispiel ist der zugelassene BTK-Inhibitor

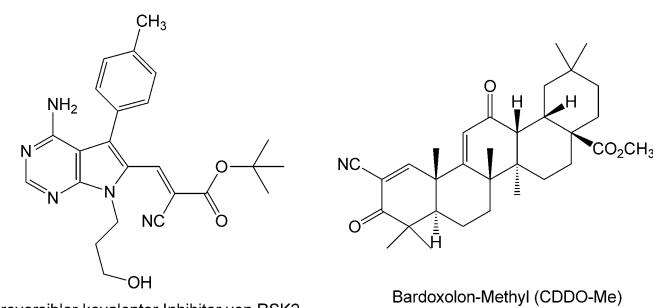


**Abbildung 4.** Strukturen FDA-zugelassener Wirkstoffe, die durch irreversible kovalente Modifizierung ihrer jeweiligen Zielmoleküle wirken.

Ibrutinib (IMBRUVICA), der nach oraler Dosierung in menschlichen Probanden eine apparante Halbwertszeit von 3 h hat,<sup>[75]</sup> aber 24 h nach Dosierungen von 420 mg Tag<sup>-1</sup> eine Targetbelegung von >95 % bietet.<sup>[76]</sup> Dieser Befund wird einer „Entkopplung“ der PK-Eigenschaften des Inhibitoren von seinen PD-Effekten zugeschrieben; obwohl es natürlich eine Beziehung zwischen den beiden gibt, ist dies nicht die typische lineare Beziehung, die mit nichtkovalenten Inhibitoren besteht; es ist daher notwendig, PK-Targetbelegungs-Beziehungen einzuführen, um die zeitlichen Effekte von TCIs zu verstehen. Aufgrund dieser Überlegungen wurde diskutiert, dass der größte Nutzen aus dem TCI-Ansatz dann gezogen wird, wenn der Inhibitor irreversibel wirkt und das betreffende Zielprotein langsam umgesetzt wird, was eine weniger häufige Verabreichung und eine geringere Wirkstoffdosis ermöglicht und damit Off-Target-Effekte und Wirkstoff-Wirkstoff-Wechselwirkungen vermindert. Jedoch erwies sich, wie in Abschnitt 3 angesprochen, dass – sowohl für reversible als auch für irreversible kovalente Inhibitoren – eine hohe Selektivität für das Zielprotein unabdingbar ist.

Eine interessante Variante des Themas „reversible TCIs“ lieferten Taunton et al.:<sup>[77,78]</sup> Sie beschrieben die hemmenden Eigenschaften von Heteroaryl-substituierten Acrylamidderi-

vaten mit einer elektronenziehenden Gruppe am  $\alpha$ -Kohlenstoffatom. Modellstudien zufolge bildeten Kinaseinhibitoren mit  $\alpha$ -Cyanacrylnitrilgruppe rasch  $\beta$ -Thioetheraddukte mit Schwefelnucleophilen, gingen aber wegen des verringerten  $pK_a$ -Werts des  $\alpha$ -Protons leicht eine Retro-Michael-Reaktion ein. Nur wenn der kovalente Komplex zwischen Inhibitor und Kinase durch Wasserstoffbrücken stabilisiert war, verhielt sich die Verbindung wie ein irreversibler TCI; fehlten diese Wechselwirkungen, z.B. wenn sich die Kinase entfaltete oder Proteolyse einging, dissozierte der Inhibitor vom Enzym. Viele andere elektronenziehende Substituenten am  $\alpha$ -Kohlenstoffatom verursachten ähnliche Effekte und ermöglichen so, die Reaktivität des Michael-Akzeptor-„Gefechtskopfs“ in vorhersagbarer Weise „anzupassen“.<sup>[79]</sup> Dieser neue Ansatz, der zur Entdeckung wirksamer, selektiver, reversibler kovalenter Inhibitoren der p90-ribosomalen Protein-S6-Kinase RSK2<sup>[77]</sup> führte (Abbildung 5), verbindet die Vorteile von



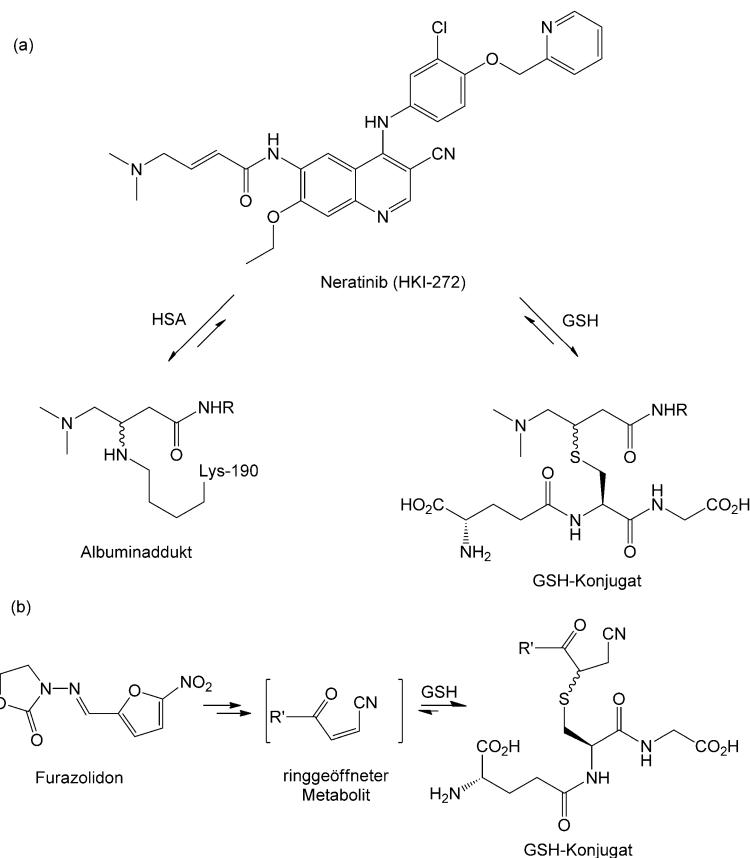
**Abbildung 5.** „Chemisch abgestimmte“ Elektrophile, die einen Michael-Akzeptor basierend auf einer  $\alpha$ -Cyanacrylat- (RSK2-Inhibitor) oder  $\alpha$ -Cyanoneineinheit (Bardoxolon-Methyl) einbauen. Kovalente Addukte dieser Verbindungen mit Proteinen sind nur stabil beim Vorhandensein spezifischer Wechselwirkungen (H-Bindung oder elektrostatisch) mit benachbarten Aminosäureresten.

reversiblen und irreversiblen TCI-Mechanismen darin, dass die Proteinstilllegung bestehen bleibt, bis die Kinase abgebaut wird, und erst zu diesem Zeitpunkt der Ligand abdissoziiert, der nun keine kovalent modifizierten Peptidfragmente hinterlässt, die vom Immunsystem als „fremd“ erkannt werden.<sup>[80]</sup> Vor kurzem wurde dieses Konzept des „chemisch abgestimmten Elektrophils“ auf das Design kovalenter Inhibitoren für Wirkstoff-resistente Formen von EGFR ausgedehnt,<sup>[81,82]</sup> und es gibt Hinweise, dass das günstige Sicherheitsprofil des reaktiven  $\alpha$ -Cyan- $\alpha$ , $\beta$ -ungesättigten Ketons Bardoxolon-Methyl (CDDO-Me) aus der Bildung eines transienten kovalenten Addukts mit dem Thiol-reichen elektrophilen Sensorprotein Keap1 resultiert.<sup>[83]</sup>

Ein Aspekt der TCI-Methode, der bisher wenig Aufmerksamkeit erhalten hat, betrifft die mögliche Reversibilität kovalenter Addukte, die mit Off-Target-Nucleophilen wie Glutathion (GSH) und Proteinen mit exponierten nucleophilen Zentren wie Serumalbumin gebildet werden. Im Fall der TCIs mit Acrylamid als „Gefechtskopf“ (das sind gegenwärtig die meisten Verbindungen in der Entwicklung) werden die Addukte durch konjugierte 1,4-Addition (die Michael-Reaktion) gebildet und können prinzipiell durch

eine Retro-Michael-Reaktion in die Ausgangskomponenten zurückkehren. Wie bei Johansson<sup>[84]</sup> diskutiert, sind die sterischen und elektronischen Faktoren, welche die Hinreaktion kontrollieren, durch Studien mit Modellnucleophilen wie GSH relativ gut bekannt, aber die Faktoren, die Einfluss auf die Rückreaktion haben, sind oft weniger klar und hängen zum großen Teil von der lokalen Umgebung im Protein ab. Viele Acrylamid-basierte TCIs reagieren spontan, wenn auch langsam, mit GSH unter Bildung der entsprechenden Thioetheraddukte. Dagegen kann die Reaktionsgeschwindigkeit mit einem Nucleophil auf dem Protein recht hoch sein, da die Reaktionspartner während des Schritts der nichtkovalenten Bindung in sehr engen Kontakt kommen.

Die Konjugation mit GSH ist ein bekannter TCI-Stoffwechselweg *in vivo*, wo die Additionsreaktion katalytisch durch hepatische und extrahepatische Glutathion-S-transferasen (GSTs) beschleunigt werden kann.<sup>[85]</sup> Es ist zu erwähnen, dass Agentien wie Afatinib (GILOTrif) und das im Spätstadium der Entwicklung befindliche Neratinib in pH-7.4-Puffer und in cytosolischen Fraktionen humäner Leber und Niere *in vitro* rasch GSH-Addukte bilden,<sup>[85]</sup> jedoch spiegeln die Metaboliten dieser Wirkstoffe in menschlichen Ausscheidungen diesen Weg nicht als einen hauptsächlichen Clearance-Mechanismus wider, da Afatinib im Wesentlichen als unveränderter Ausgangsstoff in Fäkalien eliminiert wird<sup>[86]</sup> und Neratinib vor allem durch CYP3A4-vermittelte Oxidationen beseitigt wird.<sup>[87]</sup> Ibrutinib durchläuft einen GSH-abhängigen Metabolismus, doch ist es in diesem Fall ein reaktiver Epoxidmetabolit des Wirkstoffs, der hauptsächlich in Konjugation tritt.<sup>[88]</sup> Diese offensichtliche In-vitro/In-vivo-Diskrepanz hinsichtlich der Bedeutung der GSH-Konjugation im Metabolismus von Afatinib und Neratinib erhöht die Möglichkeit, dass die Addition von GSH (und möglicherweise weiterer Nucleophile) an den Acrylamid-„Gefechtskopf“ dieser TCIs *in vivo* geschieht, aber dass dieser Vorgang über eine Retro-Michael-Reaktion reversibel ist. Gestützt wird diese Hypothese durch die Tatsache, dass diese Wirkstoffe kovalente Addukte mit Plasmaproteinen bilden, wie in Gegenwart von langlebigen radioaktiven Komponenten im systemischen Kreislauf von Testpersonen, denen radioaktiv markierte Dosen der Wirkstoffe verabreicht wurden, nachgewiesen werden konnte.<sup>[86,88,89]</sup> Im Fall von Neratinib resultiert diese nichtextrahierbare Radioaktivität nachweislich aus der Bildung eines kovalenten Addukts mit humanem Serumalbumin (HSA), in dem die  $\epsilon\text{-NH}_2$ -Gruppe von Lys-190 (im Unterschied zum nucleophileren Cys-34-thiol) über eine Michael-Reaktion an das  $\beta$ -Kohlenstoffatom des Acrylamid-„Gefechtskopfs“ gebunden wurde (Abbildung 6).<sup>[89]</sup> Nachfolgende In-vitro-Studien zeigten, dass das Neratinib-HSA-Addukt reversibel gebildet wird, da bei Inkubation in pH-7.4-Phosphatpuffer ( $37^\circ\text{C}$ , 18 h) langsam Neratinib vom Proteinkonjugat freigesetzt wird.<sup>[90]</sup> Während das Neratinib-Addukt mit Albumin im Plasma von Menschen



**Abbildung 6.** Reversible Michael-Additionen mit a) Neratinib, einem TCI des EGFR-Rezeptors, und b) einem Acrylnitril-haltigen Metaboliten des tierärztlichen Arzneimittels Furazolidon.

und Affen beobachtet wurde, konnte es nicht im Plasma von Hunden, Kaninchen oder Nagetieren gefunden werden, was auf ein speziesabhängiges Phänomen schließen lässt.<sup>[90]</sup> Die meisten derzeit entwickelten TCIs sind recht lipophil und zeigen eine starke (nichtkovalente) Bindung an Plasmaproteine wie Serumalbumin; daher überrascht es nicht, dass daraus ein gewisses Maß an kovalenter Markierung dieser Moleküle erfolgt, wenn der gebundene Inhibitor eine Orientierung annimmt, durch die das Elektrophil („Gefechtskopf“) nahe einer nucleophilen Stelle auf dem Protein platziert wird. Demzufolge beruht die speziesabhängige Bildung des Neratinib-Albumin-Konjugats vermutlich auf feinen Strukturunterschieden im Serumalbumin der verschiedenen Spezies.

Die Reversibilität der GSH-Konjugation und Proteinadduktbildung hat einige Auswirkungen auf die Wirksamkeit und Toxizität der TCIs. Wie die Pfizer-Arbeitsgruppe, die Neratinib erforschte, bemerkt hat: „It is reasonable to speculate that the release of neratinib from human serum albumin provides a transport system leading to release of neratinib in the more acidic environment of the tumor“,<sup>[89]</sup> wodurch ein Depot an latentem Inhibitor, der langsam von seinem Proteincarrier freigesetzt wird, zur Verfügung steht. In Bezug auf Sicherheitserwägungen wurde unter Verwendung von Modell-Elektrrophilen gezeigt, dass diese kovalenten, reversiblen Proteinaddukte dazu tendieren, *in vitro* weniger to-

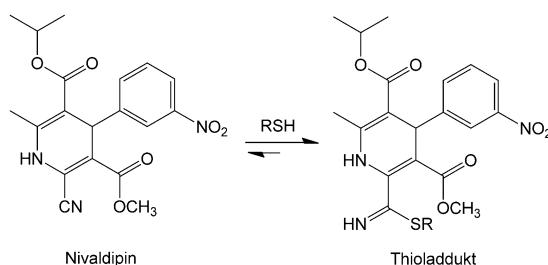
xisch zu sein als entsprechende stabile Konjugate, vermutlich da die Proteinadduktbildung nur vorübergehend ist und daher keine Schadenssignalwege induzieren kann.<sup>[91]</sup> Ähnliche Überlegungen gelten für die elektrophilen Intermediate, die bekanntermaßen die pharmakologische Aktivität bestimmter zugelassener Arzneimittel wie Aspirin, Penicillin, Omeprazol und Clopidogrel (siehe Abschnitt 1) vermitteln, die allesamt kovalente Addukte mit Proteinen bilden, die durch Stoffwechselprozesse gespalten werden können, um das native Protein wiederherzustellen. Es wurde auch beschrieben, dass die Acrylnitrilgruppe reversibel mit Protein-nucleophilen und GSH reagiert, was beispielhaft an der Reaktion eines Metaboliten des tierärztlichen Arzneimittels Furazolidon mit Thiolgruppen auf mikrosomalem Protein<sup>[92]</sup> gezeigt wurde (Abbildung 6). Das Nettoergebnis derartiger reversibler Michael-Additionen ist, dass das Thiol innerhalb und außerhalb der Zelle als Transportvehikel für das Elektrophil fungiert.<sup>[93]</sup> Es bleibt noch viel zu lernen über die biologischen Auswirkungen der Reversibilität bei der Reaktion von TCIs mit ihren Zielproteinen sowie mit GSH und Off-Target-Makromolekülen; es ist aber zu erwarten, dass aus der Forschung mit dem gegenwärtigen Repertoire an TCI-Wirkstoffkandidaten ein besseres Verständnis resultieren wird.

### 3. Selektivität und Wirksamkeit

Im Lauf der Weiterentwicklung des TCI-Ansatzes ist allgemein akzeptiert worden, dass eine hohe Selektivität für das vorgesehene Zielprotein entscheidend ist und vermutlich die einzige wichtige Eigenschaft für das Design sicherer und effektiver kovalenter Inhibitoren ist.<sup>[4, 67, 68, 80]</sup> Sicherheitsbedenken in Bezug auf die mögliche Immunogenität kovalenter Proteinaddukte (und der modifizierten Peptide, zu denen diese letztlich abgebaut werden) zwingen dazu, den Umfang an Proteinen, die einer Adduktbildung mit einem TCI ausgesetzt werden, auf ein Minimum zu begrenzen, um das Risiko für idiosynkratische Toxizität zu minimieren (dies scheint besonders für TCIs zuzutreffen, die über einen irreversiblen Mechanismus operieren, wodurch die kovalente Modifizierung des Protein durch seine gesamte Lebenszeit begleitet), und es kamen etliche experimentelle Zugänge für die Entwicklung hochselektiver kovalenter Inhibitoren zur Anwendung. Die Planung eines Gerüsts, an dem der „Gefechtskopf“ angeheftet werden soll, geht häufig zunächst von bekannten hochaffinen, reversiblen Liganden der Zielstruktur aus und kann durch Messung der Bindungskonstante,  $K_i$ , optimiert werden. Die Selektivität beim Schritt der kovalenten Bindungsbildung hingegen wird bestimmt durch die Wahl eines entsprechend angepassten elektrophilen „Gefechtskopfs“ und einer engen Nachbarschaft dieser Funktionalität auf dem Inhibitor zu einem „nichtkatalytischen, wenig konservierten, zugänglichen, geeignet positionierten und orientierten“ Nucleophil auf dem Target.<sup>[83]</sup> Dieser Schritt wird durch die Geschwindigkeitskonstante der Inaktivierung,  $k_{\text{inact}}$ , kinetisch charakterisiert, während die Gesamtwirksamkeit des TCI gegen das Enzym durch das Verhältnis  $k_{\text{inact}}/K_i$  ausgedrückt wird.<sup>[1, 6, 75]</sup> Wie in Abschnitt 1 erwähnt, ist eine hohe Wirksamkeit wünschenswert für eine starke Wirkung bei

niedriger Dosierung und für die damit verbundenen Vorteile infolge einer geringeren Belastung des Körpers durch den Wirkstoff selbst und die Abbaustoffe.<sup>[94]</sup> Vom praktischen Standpunkt aus können  $\text{IC}_{50}$ -Werte nützlich sein, um innerhalb einer Strukturklasse die Verbindungen nach ihrer Wirksamkeit zu ordnen; da aber der gemessene  $\text{IC}_{50}$ -Wert sehr stark von den experimentellen Bedingungen abhängt, ist das  $k_{\text{inact}}/K_i$ -Verhältnis der geeignete Indikator für die TCI-Potenz.<sup>[1, 83]</sup>

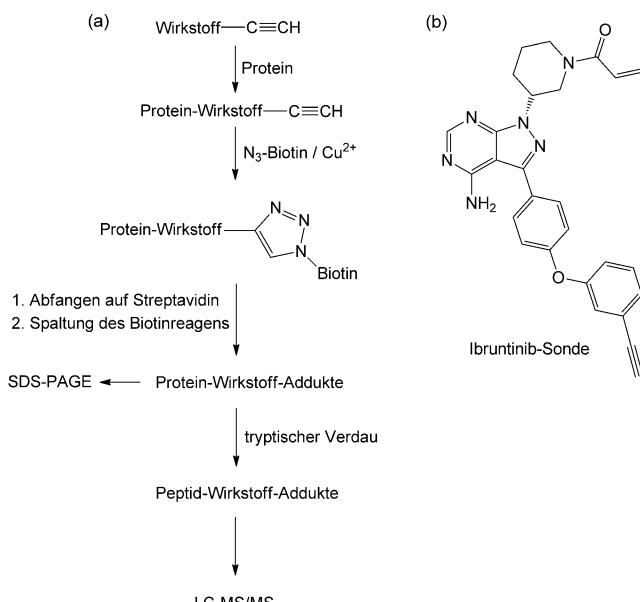
Weitere Möglichkeiten zur Erhöhung der Selektivität bietet der in Abschnitt 2 diskutierte Ansatz „chemisch abgestimmter Elektrophile“ für das Design reversibler TCIs,<sup>[78, 79]</sup> da die komplementären nichtkovalenten Bindungswechselwirkungen, die den ansonsten labilen kovalenten Inhibitor-Protein-Komplex stabilisieren, sogar bei nah verwandten Mitgliedern der Familie des Zielproteins fehlen könnten. Bei solchen Designarbeiten ist eine intensive Unterstützung durch die Bioinformatik von großer Bedeutung.<sup>[36, 58, 61]</sup> Um die Reaktivität des „Gefechtskopfs“ für eine Verwendung als TCI zu optimieren, muss man einen Mittelweg zwischen einer genügend hohen Reaktionsgeschwindigkeit mit dem gewählten Nucleophil auf dem Zielprotein und einer minimalen Reaktionsgeschwindigkeit mit Off-Target-Nucleophilen finden. Ein üblicher Weg zum Erreichen des letztgenannten Ziels nutzt In-vitro-Benchmarking-Strategien mit Proteinsurrogaten, wie GSH, wobei die intrinsische chemische Reaktivität des „Gefechtskopfs“ mit dem Thiol unter Verwendung von LC-MS/MS- oder NMR-Techniken ermittelt wird.<sup>[48, 83, 95–97]</sup> Man sollte jedoch vorsichtig sein, Halbwertszeiten für die Reaktion zwischen Inhibitorkandidaten und GSH in wässrigem Puffer von einer strukturellen Reihe auf die andere oder von einem Labor zum anderen zu extrapolieren, da die Ergebnisse signifikant durch die Reaktionsbedingungen beeinflusst werden können.<sup>[95]</sup> Man sollte sich auch bewusst sein, dass der  $pK_a$ -Wert von Proteinthiolen – abhängig von deren lokaler Umgebung – sehr stark von dem von GSH in wässrigem Puffer abweichen kann, sodass absolute Reaktionsgeschwindigkeiten mit GSH in vitro kein zuverlässiges Anzeichen für eine Off-Target-Reaktivität in vivo sind.<sup>[84]</sup> Darum ist es zweckmäßiger, Messungen der relativen, statt absoluten, Reaktionsgeschwindigkeiten mit GSH, Cystein oder anderen Modellnucleophilen zu entwickeln und ein Benchmarking mit einem abgestimmten Standardelektrophil durchzuführen.<sup>[6]</sup> Der Calciumkanal-Antagonist Nivaldipin, ein im Handel befindliches Arzneimittel mit einem günstigen Sicherheitsprofil, wurde wegen seiner schwach elektrophilen Cyangruppe für diesen Zweck verwendet und zeigt in vitro eine Halbwertszeit von 40 h für die Reaktion mit GSH und 2 h für diejenige mit Cystein<sup>[98]</sup> (Abbildung 7). Mit der kürzlich erfolgten Zulassung von Ibrutinib, Afatinib und Osimertinib als kovalente Kinaseinhibitoren ist es wahrscheinlich, dass diese Verbindungen einen Platz in zukünftigen Benchmarking-Studien finden werden. In letzter Zeit wurden einige Proteomik-Massenspektrometrie-basierte Arbeitsabläufe für die Suche nach TCI-Kandidaten angepasst, wenn es darum ging, direkt die Stelle der Adduktbildung kovalenter Inhibitorkandidaten mit ihren jeweiligen Zielproteinen zu bestätigen sowie das Ausmaß der Reaktion mit reichlich vorhandenen Off-Target-Proteinen wie Serumalbumin und



**Abbildung 7.** Reaktion von Nivaldipin mit Thiolen (GSH oder Cystein) in vitro unter Bildung von Thioimidatderivaten. Die Reaktion ist zwar reversibel, es wurden jedoch Bedingungen eingeführt, unter denen die Geschwindigkeit der Rückreaktion vernachlässigbar ist.<sup>[98]</sup> Nivaldipin wurde als Benchmark-Verbindung verwendet, um die Reaktionsgeschwindigkeiten von TCI-Kandidaten mit GSH in eine Rangfolge zu bringen.

Hämoglobin abzuschätzen.<sup>[99–102]</sup> Analoga von TCIs, in denen der Acrylamid-Gefechtskopf durch ein gesättigtes Gegenstück (Propionamid) ersetzt wurde, haben sich als nützlich erwiesen, um die relativen Beiträge von reversiblen und irreversiblen Komponenten zur Inhibition der Zielstruktur zu bewerten.<sup>[56]</sup>

Lanning et al.<sup>[4]</sup> beschrieben eine leistungsfähige Methode, um die proteomweite Selektivität kovalenter Kinaseinhibitoren zu evaluieren; sie verwendeten ein Aktivitäts-basiertes Protein-Profilierung (ABPP), gekoppelt mit quantitativer Massenspektrometrie, um sowohl die spezifischen als auch die nichtspezifischen Zielstrukturen der kovalenten Kinaseinhibitoren in humanen Zellkulturen global zu erfassen. Sonden für Ibrutinib (BTK-Inhibitor) und Afatinib (EGFR<sup>T790M</sup>-Inhibitor), die weit entfernt vom Acrylamid-Gefechtskopf einen terminalen Acetylenrest enthalten, wurden 1 h lang bei 37°C mit intakten Zellen oder Zelllysaten inkubiert, und danach wurden die Ansätze mit einem Azid-Rhodamin-Reporter-Marker mittels kupferkatalysierter Azid-Alkin-Cycloaddition (Klick-Chemie) umgesetzt; die durch diese Sonden gebundenen Proteine wurden im Anschluss unter Verwendung von Streptavidin-Kügelchen isoliert und durch SDS-PAGE mit In-Gel-Fluoreszenz-Scanning sichtbar gemacht (Abbildung 8). Es wurde gezeigt, dass bei Erhöhung der Sondenkonzentration von 1 auf 1000 nm die Selektivität für die Zielstruktur (BTK- oder EGFR-Variante) deutlich geringer wurde. Im Fall der Ibrutinib-Sonde wurden zusätzlich zu BTK auch MAP2K7, TEC und MLTK markiert, sogar bei Sondenspiegeln, die pharmakologisch relevanten Konzentrationen von Ibrutinib entsprachen. Dieser Verlust an Selektivität ging mit einer Erhöhung der Sondenzytotoxizität einher, woraus die Autoren schlussfolgerten, dass weit verbreitete, nichtspezifische kovalente Bindung (in diesem Fall größtenteils an Cysteinylthiole) die wahrscheinliche Ursache für die Zelltötung war. Eine Steigerung der Reaktivität des Acrylamid-Gefechtskopfs durch Einbau eines *N,N*-Dimethylaminomethyl-Substituenten am β-Kohlenstoffatom hatte einen ähnlichen nachteiligen Effekt auf die Selektivität und die entsprechende Erhöhung der Cytotoxizität. Insgesamt unterstreichen diese Befunde, dass ein hohes Maß an Selektivität bei der kovalenten Modifizierung von Proteinen durch TCIs erforderlich ist, um das Risiko einer Off-Target-



**Abbildung 8.** a) Schematischer Arbeitsablauf, der die Basis der ABPP-Analyse von Zielproteinen für kovalente Wirkstoffe bildet.<sup>[8]</sup> Der interessierende Wirkstoff, der mit einer terminalen Acetylengruppe markiert ist, kann mit zellulären Proteinen über seinen elektrophilen Gefechtskopf reagieren, und das resultierende Proteinadduktgemisch wird durch Klick-Chemie in biotinierte Derivate überführt. Diese werden mittels Affinitätsreinigung auf Streptavidin-Kügelchen abgefangen und entweder durch SDS-PAGE analysiert oder mit Trypsin behandelt und die erhaltenen, modifizierten Peptide durch LC-MS/MS bestimmt. b) Struktur eines Acetylen-markierten Derivats des BTK-Inhibitors Ibrutinib, das als ABPP-Sonde für Ibrutinib verwendet wurde.<sup>[4]</sup>

Toxizität zu verringern. Im Hinblick auf irreversible Proteinkinaseinhibitoren fassten Barf und Kaptein<sup>[67]</sup> ihre Ansicht zur Selektivität wie folgt zusammen: „*In a nutshell, the therapeutic applicability or the success of irreversible binding inhibitors is dependent on whether or not the covalent bond can be confined solely to the protein kinase of interest.*“ Auch wenn vermutlich keine absolute Spezifität der Reaktion von TCIs erreichbar ist, sind für die Entwicklung kovalenter Inhibitoren Versuche zur Optimierung dieser Eigenschaft äußerst wichtig. Schließlich ist zu bemerken, dass Selektivität auch erreicht werden kann, wenn der Kontakt zum Inhibitor auf dessen Wirkort beschränkt wird. Omeprazol und seine Kongener sind „maskierte“ kovalente Wirkstoffe, insofern als sie erst in der aciden Umgebung im Magen, wo ihre Zielstruktur, die H<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase, in parietalen Zellen<sup>[25]</sup> lokalisiert ist, in die reaktiven Sulfensäure/Sulfenamid-Spezies überführt werden, während Tetrahydrolipstatin (Orlistat) nach oraler Verabreichung nur wenig absorbiert wird und seine inhibitorische Wirkung auf Magen-Lipasen im Magen-Darm-Trakt ausübt.<sup>[103]</sup>

#### 4. Metabolismus und Disposition

Die Tatsache, dass die pharmakodynamische Reaktion auf ein TCI „losgelöst“ von dessen PK-Merkmalen sein kann, gab den Hinweis, dass eine hohe metabolische Clearance mit

kovalenten Inhibitoren besser toleriert werden könnte als bei den meisten anderen Arzneimittelklassen.<sup>[7,66]</sup> Das zugrundeliegende Prinzip ist wie folgt: Wenn in der Anfangszeit nach der Dosierung eine vollständige Belegung der Zielstruktur erreicht werden kann, würde ein schneller Metabolismus des Inhibitors dazu dienen, den unveränderten Wirkstoff aus der systemischen Zirkulation zu entfernen und damit eine unerwünschte Exposition in Nicht-Zielgeweben zu minimieren. Während ein solches Szenario einen Sicherheitsgewinn bieten würde, zeigen jedoch Wirkstoffe, die durch Stoffwechselprozesse schnell eliminiert werden, nach oraler Aufnahme gewöhnlich einen ausgeprägten First-pass-Effekt<sup>[\*]</sup>, was zu einer geringen oralen Bioverfügbarkeit, einer höheren wirksamen Dosis und zu erhöhter interindividueller PK-Variabilität führt. In der Praxis darf daher die metabolische Clearance für diese Wirkstoffklasse nicht zu hoch sein, wenn die möglichen Vorteile einer hohen Wirksamkeit und geringen Dosierung realisiert werden sollen.<sup>[66]</sup>

Eine zweite Überlegung, die nicht auf die Klasse kovalenter Inhibitoren beschränkt ist, bezieht sich auf das Phänomen der metabolischen Aktivierung, wobei im Verlauf der Metabolisierung (gewöhnlich ein oxidativer Metabolismus, katalysiert durch Cytochrom-P-450-Enzyme) ein elektrophiles Zentrum in das Wirkstoffmolekül eingeführt wird.<sup>[18]</sup> Im Fall von Acrylamid-basierten TCIs ist durch die terminale Doppelbindung auf dem Gefechtskopf, die eine CYP-vermittelte Epoxidierung (wie bei Ibrutinib) eingehen kann, eine Möglichkeit zur Bioaktivierung vorhanden.<sup>[88]</sup> Natürlich kann die Bioaktivierung auch an anderer Stelle auf dem Molekül erfolgen, abhängig von der Art der Wechselwirkung mit den Wirkstoff-metabolisierenden Enzymen. In jedem Fall wird das normalerweise gebildete, reaktive Intermediat ein höheres Maß an Elektrophilie aufweisen als der TCI-Gefechtskopf selbst; dies hat die Konsequenz, dass die selektiven Alkylierungseigenschaften, die in den kovalenten Inhibitor eingebaut wurden, beeinträchtigt werden und der Metabolit ein breites Spektrum an Off-Target-Proteinen alkyliert. Deshalb ist es wichtig, dass Inhibitorkandidaten in einem frühen Stadium unter Verwendung von In-vitro-Standardvorschriften, die nucleophile Afsangtechniken nutzen, auf ihre Anfälligkeit für metabolische Aktivierung geprüft werden.<sup>[22]</sup> Wo eine metabolische Aktivierung nachgewiesen und der zugehörige Reaktionsweg aufgeklärt wurde, kann nach Strukturmodifikationen gesucht werden, welche die störende Reaktion minimieren oder eliminieren.<sup>[104]</sup> Zu bemerken ist, dass viele TCIs als zeitabhängige Inhibitoren von mindestens einem humanen CYP-Enzym<sup>[66]</sup> beschrieben wurden – was die Bildung eines reaktiven Intermediats widerspiegelt –, und diese Eigenschaft sollte ebenfalls in einem frühen Entwicklungsstadium geprüft werden, um eine mögliche Anfälligkeit für Wirkstoff-Wirkstoff-Wechselwirkungen vorherzusagen.

Wie in Abschnitt 2 erwähnt, kann GSH in einer Reaktion, die durch eines oder mehrere Mitglieder der GST-Familie katalysiert wird, direkt an den Acrylamid-Gefechtskopf eines TCI (d.h. beim Ausbleiben metabolischer Aktivierung) ad-

dieren; dieser Vorgang kann in extrahepatischen Geweben sowie in der Leber stattfinden.<sup>[85]</sup> Bestimmte GST-Enzyme, wie GST mu1, zeigen in der menschlichen Population genetische Polymorphie. Hieraus ergibt sich die Möglichkeit, in Fällen, wo die GSH-Addition an den TCI-Gefechtskopf eine quantitativ wichtige Clearance-Route ist und durch diese GST-Isoform vermittelt wird, Individuen in „langsame“ und „schnelle“ Metabolisierer-Phänotypen zu unterteilen. Daraus wurde geschlossen, dass bei der Entwicklung kovalenter Modifikatoren, die zu dieser Kategorie gehören, die GSTM1-Genotypen in Betracht gezogen werden müssen.<sup>[105]</sup> Die Wirkung einer möglichen Reversibilität der GSH-Konjugatbildung, wie in Abschnitt 2 diskutiert, auf das PK-Gesamtprofil von TCIs bleibt zu ermitteln; dieses Phänomen kann aber eine weitere Komplikation beim Analysieren der Faktoren, die die Disposition<sup>[\*\*]</sup> bestimmter TCIs in vivo steuern, bedeuten.

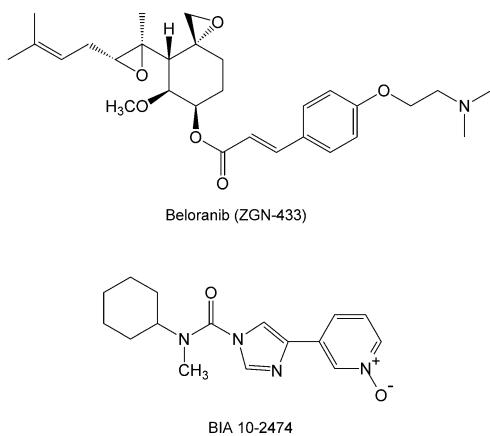
Im Hinblick auf Programme zur Wirkstoffsuche scheint es, dass ein etwas anderer Satz an ADME-Assays (Absorption, Distribution, Metabolismus und Exkretion) benötigt wird, um TCI-Leitstrukturen für weitere Studien zu selektieren.<sup>[66,83]</sup> Auf Grundlage einer Analyse der präklinischen In-vitro- und In-vivo-ADME-Eigenschaften von zehn im späten klinischen Entwicklungsstadium befindlichen oder zugelassenen kovalenten Inhibitoren folgerten Moghaddam et al.<sup>[66]</sup>, dass das Standardrepertoire an Assays bei der Auswahl erfolgversprechender Verbindungen nicht diskriminierend wirkte. Entscheidend für eine erfolgreiche Wirkstoffentwicklung sind dagegen weniger übliche Assays, wie die Bestimmung der Modifikation der Zielmolekülmasse, der Nachweis der Zielstruktur durch Aminosäuresequenzierung sowie die Ermittlung der zellulären Targetbelegung und der Target-Umsatzgeschwindigkeiten. Die Pharmakokinetik bleibt insoweit wichtig, als die für eine orale Dosierung vorgesehenen Inhibitoren eine akzeptable orale Bioverfügbarkeit aufweisen müssen, obwohl – wie oben diskutiert wurde – auch nicht optimale PK-Profil (besonders in Bezug auf die Clearance) für irreversible TCIs geeignet sein können. Die Bewertung der Inhibitorselektivität wird zu einem wichtigen Faktor bei Studien zur Optimierung von Leitstrukturen; dabei können sowohl die Identität von Off-Target-Proteinen als auch die Ausmaße an kovalenter Modifizierung, die mit zunehmenden Inhibitorkonzentrationen einhergehen, unter Verwendung heutiger Proteomikansätze bestimmt werden.<sup>[4,7,83]</sup> In-vivo-Messungen der zeitabhängigen Targetbelegung, die (wenn die Zielstruktur zugänglich ist) zunächst in Tieren und anschließend in Menschen durchgeführt werden, ermöglichen das Aufstellen von Targetbelegungs-PD-Beziehungen, die bisherige PK-PD-Beziehungen bei der Designplanung im klinischen Entwicklungsprogramm ersetzen. Zu guter Letzt benötigen TCIs die erforderlichen physikochemischen Eigenschaften (Löslichkeit, Lipophilie,  $pK_a$ -Wert) und Sicherheitscharakteristika, die mit Wirkstoff-ähnlichen Molekülen zusammenhängen, wenn sie erfolgreich zu Therapeutika entwickelt werden sollen.<sup>[106]</sup>

[\*] Der Begriff „First-pass-Effekt“ bezieht sich auf den Prozess, bei dem ein Teil des vom Magen-Darm-Trakt absorbierten Wirkstoffs metabolisch durch Enzyme in der Darmwand und Leber entfernt wird.

[\*\*] Der Begriff „Disposition“ bezieht sich auf die kollektiven Prozesse der Wirkstoff-Absorption, -Verteilung in die Gewebe und aus diesen heraus sowie -Eliminierung aus dem Körper.

## 5. Verringerung der Toxizitätsrisiken bei kovalenten Inhibitoren

Im vergangenen Jahrzehnt gab es große Fortschritte bei der Entwicklung zielgerichteter kovalenter Inhibitoren, von denen jetzt einige als zugelassene Arzneimittel auf den Markt gekommen sind. Dass sich diese Verbindungen als sichere und wirksame Chemotherapeutika erwiesen haben, bestätigt, dass die selektive kovalente Modifizierung von Proteinen unter „Stilllegung“ der Zielstruktur nicht zwangsläufig ein hohes Risiko für immunvermittelte Toxizität birgt. Trotzdem bleiben Bedenken, besonders bezüglich der kovalenten Inhibitoren, dass dies eine riskante Strategie in der Wirkstoffentwicklung ist. Zwei ernste Ereignisse, die bei klinischen Studien mit irreversiblen TCIs zu Todesfällen führten, waren innerhalb des letzten Jahres zu verzeichnen: Beim ersten Fall war der Methioninaminopeptidase-2-Inhibitor Beloranib (ZGN-433) im späten klinischen Entwicklungsstadium als Mittel gegen Adipositas beteiligt,<sup>[107]</sup> während beim zweiten Fall der Fettsäureamidhydrolase-Inhibitor BIA 10-2474 in Phase-I-Studien mit Mehrfachgabe bei neuropathischem Schmerz<sup>[108]</sup> involviert war (Abbildung 9). Der



**Abbildung 9.** Strukturen zweier irreversibler TCIs, Beloranib und BIA 10-2474, die mit schwerwiegenden Vorfällen in klinischen Studien in Verbindung gebracht werden.

Grund für diese tragischen Ereignisse wird noch untersucht, und während des Verfassens dieses Aufsatzes lagen noch keine Hinweise darauf vor, dass die Todesfälle mit dem kovalenten Reaktionsmechanismus der beiden betreffenden Substanzen in Beziehung stehen; dennoch mahnen diese Vorfälle zur Vorsicht und verdeutlichen die inhärenten Risiken der Wirkstoffentwicklung. Angesichts der Sicherheitsbedenken und in Anbetracht der in diesem Aufsatz zusammengefassten TCI-Aspekte kann eine Anzahl von Methoden genutzt werden, um das Risiko von Nebenwirkungen zu verringern, darunter:<sup>[7,70]</sup>

- a) Maximierung der Bindungsselektivität für das Zielprotein. Diese Zielsetzung ist der Schlüssel angesichts aktueller Daten, denen zufolge die Off-Target-Bindung bei TCIs zu einem größeren Toxizitätsrisiko führen könnte.<sup>[4]</sup> Selekti-

vität kann erreicht werden durch: 1. Optimierung der einleitenden, nichtkovalenten Assoziation des Inhibitors mit dem Target und 2. Einsatz von Bioinformatik, um die Platzierung eines geeigneten Gefechtskopfs auf dem Inhibitor relativ zu einem zugänglichen, nichtkonservierten Nucleophil auf dem Protein zu optimieren. Die Selektivität kann experimentell durch Kombination von Aktivitäts-basiertem Protein-Profilierung mit Proteomik-Massenspektrometrie-Techniken evaluiert werden.<sup>[7]</sup>

- b) Beibehaltung einer geringen Dosis. Die Überprüfung der Merkmale von Arzneimitteln, die wegen eines nichtakzeptabel hohen Auftretens toxischer Wirkungen vom Markt genommen wurden oder die „black box“-Warntungen für Toxizität erhielten, haben die Bedeutung einer täglichen Dosis betont.<sup>[94,109–111]</sup> So wurden nur sehr wenige Arzneimittel mit Verabreichungen  $\leq 10 \text{ mg Tag}^{-1}$  mit ernsthaften Toxizitäten wie Leberschädigung in Verbindung gebracht, während bei Arzneimitteln mit einer Dosierung von  $\geq 50 \text{ mg Tag}^{-1}$  starke Nebenwirkungen signifikant zunahmen.<sup>[109]</sup> Dies scheint mit der „Körperlast“ („body burden“) an Wirkstoff und Metaboliten zusammenzuhängen, die so niedrig wie in der Praxis möglich gehalten werden sollte, um Off-Target-Effekte zu minimieren. Dank der hohen Wirksamkeit zielgerichteter kovalenter Wirkstoffe sowie durch Selektierung von Kandidaten mit guter oraler Bioverfügbarkeit sollte es möglich sein, sichere, niedrig dosierte TCIs mit einmal täglicher Verabreichung für eine Vielzahl therapeutischer Indikationen zu entwickeln.
- c) Minimale Bildung reaktiver Metaboliten. Es gibt überzeugende Informationen, denen zufolge reaktive Metaboliten Mediatoren für einige (aber nicht alle) Wirkstoff-induzierte Toxizitäten sein könnten, und da nach gegenwärtigem Kenntnisstand nicht vorhersagbar ist, welche reaktiven Intermediate Nebenwirkungen verursachen werden, scheint es klug, Wirkstoffkandidaten, die sich als anfällig für metabolische Aktivierung erwiesen haben, zu vermeiden.<sup>[22,104]</sup> Die Einführung eines hochreaktiven elektrophilen Zentrums durch Metabolisierung hebt die kontrollierte Reaktivität, die im TCI-Gefechtskopf installiert wurde, auf und führt zum Verlust der Alkylierungsselektivität sowie zu erhöhtem Risiko für eine Off-Target-induzierte Toxizität.

Zwar könnten noch weitere risikoverringernde Kriterien zu dieser Liste hinzugefügt werden, z.B. die Präferenz für reversible anstelle irreversibler kovalenter Inhibitoren, jedoch gibt es gegenwärtig zu wenig Belege für Faktoren außer den drei oben genannten. An diesem Punkt scheint es daher vernünftig zu folgern, dass hoch selektive, niedrig dosierte TCIs, die keine metabolische Aktivierung erfahren, Sicherheitsprofile zeigen sollten, die denen konventioneller, nichtkovalenten Wirkstoffe gleichkommen, während sie gleichzeitig eine Reihe therapeutischer Vorteile bieten, die mit ihrer Bindungsweise über eine Nicht-Gleichgewichtsreaktion zusammenhängen.

## 6. Zusammenfassung und Ausblick

Der Ansatz zielgerichteter kovalenter Inhibitoren für die Wirkstoffsuche hat sich in den letzten Jahren stark verbreitet, und angesichts der großen Zahl kovalenter Wirkstoffkandidaten, die sich gegenwärtig in der Entwicklung befinden, dürfte dieser Trend bis auf weiteres auch anhalten. Die Hauptinvestitionen der pharmazeutischen Industrie lagen bisher auf dem Gebiet der kovalenten Kinaseinhibitoren zur Behandlung verschiedener Krebsformen, aber mit der wachsenden Datenbasis zur klinischen Sicherheit dieser Wirkstoffklasse ist es wahrscheinlich, dass TCIs auch für Indikationen auf anderen Gebieten als der Onkologie entwickelt werden. Proteine mit niedrigen Umsatzgeschwindigkeiten, die zugängliche nucleophile Zentren in einer einzigartigen molekularen Umgebung aufweisen, sind vielversprechende Kandidaten für den Ansatz kovalenter Inhibitoren, der eine niedrig dosierte Arzneimitteltherapie mit verlängerter Wirkungsdauer verspricht. Während die Sicherheit weiterhin Grund zur Besorgnis bietet und erst nach vielen Jahren klinischer Erfahrung mit zugelassenen TCIs vollständig geprüft sein wird, sind erste Ergebnisse durchaus ermutigend.

Wenn sich das Gebiet weiterentwickelt, werden sowohl durch experimentelle als auch durch rechnerbasierte Methoden tiefere Einblicke in den Einfluss der Struktur und Reaktivität des Gefechtskopfs auf die Selektivität, Wirksamkeit und Toxizitätsprofile von TCIs erhalten werden.<sup>[95,112–117]</sup> Die biologischen Folgen von Off-Target-Reaktivität werden klarer definiert werden, und man wird Strategien zur Minimierung breiter Proteom-Reaktivität entwickeln. Ebenso werden Richtlinien aufgestellt werden, um die optimalen PK-Merkmale für einen kovalenten Inhibitor sowie für die zweckmäßige Untergrenze der Turnover-Zeit von Zielproteinen festzulegen. Man hat erst begonnen, Daten über erworbene Resistenzen gegen TCIs in der Krebstherapie zu sammeln, im Wesentlichen aus der klinischen Praxis mit EGFR-Inhibitoren.<sup>[118,119]</sup> Neue Zielproteine werden identifiziert werden, einschließlich solcher, die geschaffen wurden, um Protein-Protein-Wechselwirkungen zu stören,<sup>[120,121]</sup> und eine neue, dritte Generation hochselektiver Kinaseinhibitoren wird zur Entwicklung kommen. Anspruchsvollere Ziele umfassen das Design allosterischer kovalenter Enzyminhibitoren<sup>[122]</sup> sowie kovalenter Modulatoren der Rezeptorfunktion. Man wird wahrscheinlich Möglichkeiten finden, die Bandbreite des TCI-Ansatzes zu erweitern, indem andere Proteinnucleophile als Cysteinylthiole angesteuert werden; zum Beispiel gelangen Fortschritte beim Adressieren katalytisch wirkender Lysine in Proteinkinasen, obgleich das Erreichen von Selektivität angesichts der zahlreichen Lysinreste, die häufig auf Proteinoberflächen gefunden werden, eine enorm anspruchsvolle Designaufgabe bedeutet.<sup>[80]</sup> Dies sind aufregende Zeiten für die medizinische Chemie, und wir dürfen erwarten, dass im kommenden Jahrzehnt der TIC-Ansatz als Strategie zum Design neuer Therapeutika sowie die dazugehörigen Sicherheitsrisiken vollständiger evaluiert werden.

## Abkürzungen

ABPP	Aktivitäts-basiertes Protein-Profilng
ADME	Absorption, Distribution, Metabolismus und Exkretion
BTK	Brutons Tyrosinkinase
CYP	Cytochrom P-450
EGFR	epidermaler Wachstumsfaktorrezeptor
GSH	Glutathion
GST	Glutathion-S-Transferase
HSA	humane Serumalbumin
NAPQI	<i>N</i> -Acetyl- <i>p</i> -benzochinonimin
PK-PD	Pharmakokinetik-Pharmakodynamik
TCI	zielgerichteter kovalenter Inhibitor

## Danksagung

Ich danke Drs. Jus Singh, Wes Westlin und Russ Petter (ehemals Avila Therapeutics) für die Einführung in das faszinierende Thema der zielgerichteten kovalenten Inhibitoren sowie für zahlreiche anregende Diskussionen hierzu.

**Zitierweise:** *Angew. Chem. Int. Ed.* **2016**, *55*, 13408–13421  
*Angew. Chem.* **2016**, *128*, 13606–13619

- [1] J. Singh, R. C. Petter, T. A. Baillie, A. Whitty, *Nat. Rev. Drug Discovery* **2011**, *10*, 307–317.
- [2] M. H. Potashman, M. E. Duggan, *J. Med. Chem.* **2009**, *52*, 1231–1246.
- [3] M. C. Noe, A. M. Gilbert, *Annu. Rep. Med. Chem.* **2012**, *47*, 413–439.
- [4] B. R. Lanning, L. R. Whitby, M. M. Dix, J. Douhan, A. M. Gilbert, E. C. Hett, T. O. Johnson, C. Joslyn, J. C. Kath, S. Niessen, L. R. Roberts, M. E. Schnute, C. Wang, J. J. Hulce, B. Wei, L. O. Whiteley, M. M. Hayward, B. J. Cravatt, *Nat. Chem. Biol.* **2014**, *10*, 760–767.
- [5] A. J. T. Smith, X. Zhang, A. G. Leach, K. N. Houk, *J. Med. Chem.* **2009**, *52*, 225–233.
- [6] A. S. Kalgutkar, D. K. Dalvie, *Expert Opin. Drug Discovery* **2012**, *7*, 561–581.
- [7] D. S. Johnson, E. Weerapana, B. F. Cravatt, *Future Med. Chem.* **2010**, *2*, 949–964.
- [8] N. Li, H. S. Overkleft, B. I. Florea, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2012**, *16*, 227–233.
- [9] R. E. Moellering, B. F. Cravatt, *Chem. Biol.* **2012**, *19*, 11–22.
- [10] L. E. Sanman, M. Bogyo, *Annu. Rev. Biochem.* **2014**, *83*, 249–273.
- [11] J. E. Moses, A. D. Moorhouse, *Chem. Soc. Rev.* **2007**, *36*, 1249–1262.
- [12] M. Schirle, M. Bantscheff, B. Kuster, *Chem. Biol.* **2012**, *19*, 72–84.
- [13] R. A. Ward, M. J. Anderton, S. Ashton, P. A. Bethel, M. Box, S. Butterworth, N. Colclough, C. G. Chorley, C. Chuquai, D. A. E. Cross, L. A. Dakin, J. E. Debreczeni, C. Eberlein, M. R. V. Finlay, G. B. Hill, M. Grist, T. C. M. Klinowska, C. Lane, S. Martin, J. P. Orme, P. Smith, F. Wang, M. J. Waring, *J. Med. Chem.* **2013**, *56*, 7025–7048.
- [14] C.-H. Yun, K. E. Mengwasser, A. V. Toms, M. S. Woo, H. Greulich, K.-K. Wong, M. Meyerson, M. J. Eck, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2008**, *105*, 2070–2075.
- [15] J. Singh, E. M. Dobrusin, D. W. Fry, T. Haske, A. Whitty, D. J. McNamara, *J. Med. Chem.* **1997**, *40*, 1130–1135.

- [16] D. P. Williams, N. R. Kitteringham, D. J. Naissbitt, M. Pirmohamed, D. A. Smith, B. K. Park, *Curr. Drug Metab.* **2002**, *3*, 351–366.
- [17] J. C. Erve, *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.* **2006**, *2*, 923–946.
- [18] F. P. Guengerich, *Chem. Res. Toxicol.* **2001**, *14*, 611–650.
- [19] S. Zhou, E. Chan, W. Duan, M. Huang, Y. Z. Chen, *Drug Metab. Rev.* **2005**, *37*, 41–213.
- [20] J. Utrecht, D. J. Naissbitt, *Pharmacol. Rev.* **2013**, *65*, 779–808.
- [21] A. J. Wilson, J. K. Kerns, J. F. Callahan, C. J. Moody, *J. Med. Chem.* **2013**, *56*, 7463–7476.
- [22] D. C. Evans, A. P. Watt, D. A. Nicoll-Griffith, T. A. Baillie, *Chem. Res. Toxicol.* **2004**, *17*, 3–16.
- [23] T. A. Baillie, *Chem. Res. Toxicol.* **2006**, *19*, 889–893.
- [24] C. Carmi, A. Lodola, S. Rivara, F. Vacondio, A. Cavazzoni, R. R. Alfieri, P. G. Petronini, M. Mor, *Mini-Rev. Med. Chem.* **2011**, *11*, 1019–1030.
- [25] J. M. Shin, Y. M. Cho, G. Sachs, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 7800–7811.
- [26] P. M. Dansette, J. Libraire, G. Bertho, D. Mansuy, *Chem. Res. Toxicol.* **2009**, *22*, 369–373.
- [27] Q. Yongchang, L. Z. Benet, A. L. Burlingame, *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 17940–17953.
- [28] D. C. Dahlin, S. D. Nelson, *J. Med. Chem.* **1982**, *25*, 885–886.
- [29] T. A. Baillie, *Drug Metab. Rev.* **2015**, *47*, 4–11.
- [30] K.-J. Hoffmann, A. J. Streeter, D. B. Axworthy, T. A. Baillie, *Mol. Pharmacol.* **1985**, *27*, 566–573.
- [31] T. J. Monks, S. S. Lau, *Toxicol. Pathol.* **2013**, *41*, 315–321.
- [32] A. F. Kluge, R. C. Petter, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2010**, *14*, 421–427.
- [33] P.-Y. Yang, K. Liu, M. H. Ngai, M. J. Lear, M. R. Wenk, S. Q. Yao, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 656–666.
- [34] C. Drahl, B. J. Cravatt, E. J. Sorensen, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 5788–5809; *Angew. Chem.* **2005**, *117*, 5936–5958.
- [35] D. W. Fry, A. J. Bridges, W. A. Denny, A. Doherty, K. D. Greis, J. L. Hicks, K. E. Hook, P. R. Keller, W. R. Leopold, J. A. Loo, D. J. McNamara, J. M. Nelson, V. Sherwood, J. B. Smail, S. Trumpp-Kallmeyer, E. M. Dobrusin, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1998**, *95*, 12022–12027.
- [36] J. Singh, R. C. Petter, A. F. Kluge, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2010**, *14*, 475–480.
- [37] L. A. Honigberg, A. M. Smith, M. Sirisawad, E. Verner, D. Loury, B. Chang, S. Li, Z. Pan, D. H. Thamm, R. A. Miller, J. J. Buggy, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2010**, *107*, 13075–13080.
- [38] J. B. Smail, G. W. Newcastle, J. A. Loo, K. D. Greis, O. H. Chan, E. L. Reyner, E. Lipka, H. D. Showalter, P. W. Vincent, W. L. Elliott, W. A. Denny, *J. Med. Chem.* **2000**, *43*, 1380–1397.
- [39] W. A. Denny, *Pharmacol. Ther.* **2002**, *93*, 253–261.
- [40] J. C. Powers, J. L. Asgian, O. D. Ekici, K. E. James, *Chem. Rev.* **2002**, *102*, 4639–4750.
- [41] M. Hagel, D. Niu, T. St. Martin, M. P. Sheets, L. Qiao, H. Bernard, R. M. Karp, Z. Zhu, M. T. Labenski, P. Chaturvedi, M. Nacht, W. F. Westlin, R. C. Petter, J. Singh, *Nat. Chem. Biol.* **2011**, *7*, 22–24.
- [42] Q. Zeng, A. G. Nair, S. B. Rosenblum, H.-C. Huang, C. A. Lesburg, Y. Jiang, O. Selyutin, T.-Y. Chan, F. Bennett, K. X. Chen, S. Venkatraman, M. Sannigrahi, F. Velaquez, J. S. Duca, S. Gavalas, Y. Huang, H. Pu, L. Wang, P. Pinto, B. Vibulhan, S. Agrawal, E. Ferrari, C. Jiang, C. Li, D. Hesk, J. Gesell, S. Sorota, N.-Y. Shih, F. G. Njoroge, J. A. Kozlowski, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2013**, *23*, 6585–6587.
- [43] X. Koh-Stenta, J. Joy, S. F. Wang, P. Z. Kwek, J. L. K. Wee, K. F. Wan, S. Gayen, A. S. Chen, C. Kang, M. A. Lee, A. Poulsen, S. G. Vasudevan, J. Hill, K. Nacro, *Drug Des. Dev. Ther.* **2015**, *9*, 6389–6399.
- [44] M. Morgen, C. Jöst, M. Malz, D. Niessing, C. D. Klein, N. Gunkel, A. K. Miller, *ACS Chem. Biol.* **2016**, *11*, 1001–1011.
- [45] A. M. Omar, M. A. Mahran, M. S. Ghate, N. Chowdhury, F. H. A. Bamane, M. E. El-Araby, O. Abdulmalik, M. K. Safo, *Org. Biomol. Chem.* **2015**, *13*, 6353–6370.
- [46] K. Otrubova, M. Brown, M. S. McCormick, G. W. Han, S. T. O'Neal, B. J. Cravatt, R. C. Stevens, A. H. Lichtman, D. L. Boger, *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 6289–6299.
- [47] K. Otrubova, B. J. Cravatt, D. L. Boger, *J. Med. Chem.* **2014**, *57*, 1079–1089.
- [48] M. Cocco, D. Garella, A. Di Stilo, E. Borreto, L. Stevanato, M. Giorgis, E. Marini, R. Fantozzi, G. Miglio, M. Bertinaria, *J. Med. Chem.* **2014**, *57*, 10366–10382.
- [49] S. Bruno, A. Pinto, G. Paredi, L. Tamborini, C. De Micheli, V. La Pietra, L. Marinelli, E. Novellino, P. Conti, A. Mozzarelli, *J. Med. Chem.* **2014**, *57*, 7465–7471.
- [50] D. J. Kuhn, Q. Chen, P. M. Voorhees, J. S. Strader, K. D. Shenk, C. M. Sun, S. D. Demo, M. K. Bennett, F. W. Leeuwen, A. A. Chanan-Khan, R. Z. Orłowski, *Blood* **2007**, *110*, 3281–3290.
- [51] J. Rudolph, D. Stokoe, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53*, 3777–3779; *Angew. Chem.* **2014**, *126*, 3851–3853.
- [52] K. Sanderson, *Nat. Rev. Drug Discovery* **2013**, *12*, 649–651.
- [53] F. Liu, X. Zhang, E. Weisberg, S. Chen, W. Hur, H. Wu, Z. Zhao, W. Wang, M. Mao, C. Cai, N. I. Simon, J. Wang, A. T. Look, J. D. Griffin, S. P. Balk, Q. Liu, N. S. Gray, *ACS Chem. Biol.* **2013**, *8*, 1423–1428.
- [54] W. Zhou, W. Hur, U. McDermott, A. Dutt, W. Xian, S. B. Ficarro, J. Zhang, S. V. Sharma, J. Brugge, M. Meyerson, J. Settleman, N. S. Gray, *Chem. Biol.* **2010**, *17*, 285–295.
- [55] D. L. Perez, V. Palomo, C. Perez, C. Gil, P. D. Dans, F. J. Luque, S. Conde, A. Martinez, *J. Med. Chem.* **2011**, *54*, 4042–4056.
- [56] C. W. Zapf, B. S. Gerstenberger, L. Xing, D. C. Limburg, D. R. Anderson, N. Caspers, S. Han, A. Aulabaugh, R. Kurumbail, S. Shakya, X. Li, V. Spaulding, R. M. Czerwinski, N. Seth, Q. G. Medley, *J. Med. Chem.* **2012**, *55*, 10047–10063.
- [57] T. Zhang, F. Inesta-Vaquera, M. Niepel, J. Zhang, S. B. Ficarro, T. Machleidt, T. Xie, J. A. Marto, N. Kim, T. Sim, J. D. Laughlin, H. Park, P. V. LoGrasso, M. Patricelli, T. K. Nomanbhoy, P. K. Sorger, D. R. Alessi, N. S. Gray, *Chem. Biol.* **2012**, *19*, 140–154.
- [58] E. Leproult, S. Barluenga, D. Moras, J. M. Wurtz, N. Wissinger, *J. Med. Chem.* **2011**, *54*, 1347–1355.
- [59] J. C. Henise, J. Taunton, *J. Med. Chem.* **2011**, *54*, 4133–4146.
- [60] M. Nacht, L. Qiao, M. P. Sheets, T. St. Martin, M. Labenski, H. Mazdiyasni, R. Karp, Z. Zhu, P. Charurvedi, D. Bhavsar, D. Niu, W. Westlin, R. C. Petter, A. P. Medikonda, J. Singh, *J. Med. Chem.* **2013**, *56*, 712–721.
- [61] M. S. Cohen, C. Zhang, K. M. Shokat, J. Taunton, *Science* **2005**, *308*, 1318–1321.
- [62] A. K. Devkota, R. Edupuganti, C. Yan, Y. Shi, J. Jose, Q. Wang, T. S. Kaoud, E. J. Cho, P. Ren, K. N. Dalby, *ChemBioChem* **2014**, *15*, 2435–2442.
- [63] F. E. Kwarciński, C. C. Fox, M. E. Steffey, M. B. Soellner, *ACS Chem. Biol.* **2012**, *7*, 1910–1917.
- [64] N. N. Gushwa, S. Kang, J. Chen, J. Taunton, *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 20214–20217.
- [65] L. Xing, A. Huang, *Future Med. Chem.* **2014**, *6*, 675–695.
- [66] M. F. Moghaddam, Y. Tang, Z. O'Brien, S. J. Richardson, M. Bacolod, P. Chaturvedi, J. Apuy, A. Kulkarni, *Drug Metab. Lett.* **2014**, *8*, 19–30.
- [67] T. Barf, A. Kaptein, *J. Med. Chem.* **2012**, *55*, 6243–6262.
- [68] Q. Liu, Y. Sabnis, Z. Zhao, T. Zhang, S. J. Buhrlage, L. H. Jones, N. Gray, *Chem. Biol.* **2013**, *20*, 146–159.
- [69] L. Garuti, M. Roberti, G. Bottegoni, *Curr. Med. Chem.* **2011**, *18*, 2981–2994.
- [70] A. S. Kalgutkar, D. Dalvie, R. S. Obach, D. A. Smith in *Reactive Drug Metabolites, Methods and Principles in Medicinal Chemistry*, Bd. 55 (Hrsg.: R. Mannhold, H. Kubinyi, G. Folkers), Wiley-VCH, Weinheim, **2012**, S. 313–334.

- [71] L. Kubiczkova, L. Pour, L. Sedlankova, R. Hajek, S. Sevcikova, *J. Cell. Mol. Med.* **2014**, *18*, 947–961.
- [72] D. A. Bachovchin, B. F. Cravatt, *Nat. Rev. Drug Discovery* **2012**, *11*, 52–68.
- [73] J. J. M. Wiener, S. Sun, R. L. Thurmond, *Curr. Top. Med. Chem.* **2010**, *10*, 717–732.
- [74] A. Smelcerovic, F. Miljkovic, J. Lazarevic, A. Djorjevic, G. Kocic, M. Anderluh, *Top. Med. Chem.* **2015**, *15*, 2342–2372.
- [75] P. A. Schwartz, P. Kuzmic, J. Solowiej, S. Bergqvist, B. Bolanos, C. Almaden, A. Nagata, K. Ryan, J. Feng, D. Dalvie, J. C. Kath, M. Xu, R. Wani, B. W. Murray, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2014**, *111*, 173–178.
- [76] S. Parmar, K. Patel, J. Pinilla-Ibarz, *Pharm. Ther.* **2014**, *39*, 483–487.
- [77] I. M. Serafimova, M. A. Pufall, S. Krishnan, K. Duda, M. S. Cohen, R. L. Maglathlin, J. M. McGarland, R. M. Miller, M. Frödin, J. Taunton, *Nat. Chem. Biol.* **2012**, *8*, 471–476.
- [78] R. M. Miller, V. O. Paavilainen, S. Krishnan, I. M. Serafimova, J. Taunton, *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 5298–5301.
- [79] S. Krishnan, R. M. Miller, B. Tian, R. D. Mullins, M. P. Jacobson, J. Taunton, *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136*, 12624–12630.
- [80] R. M. Miller, J. Taunton, *Methods Enzymol.* **2014**, *548*, 93–116.
- [81] G. Xia, W. Chen, J. Zhang, J. Shao, Y. Zhang, W. Huang, L. Zhang, W. Qi, X. Sun, B. Li, Z. Xiang, C. Ma, J. Xu, H. Deng, Y. Li, P. Li, H. Miao, J. Han, Y. Liu, J. Shen, Y. Yu, *J. Med. Chem.* **2014**, *57*, 9889–9900.
- [82] D. Basu, A. Richters, D. Rauh, *Bioorg. Med. Chem.* **2015**, *23*, 2767–2780.
- [83] R. Mah, J. R. Thomas, C. M. Shafer, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2014**, *24*, 33–39.
- [84] M. H. Johansson, *Mini-Rev. Med. Chem.* **2012**, *12*, 1330–1344.
- [85] Y. Shibata, M. Chiba, *Drug Metab. Dispos.* **2015**, *43*, 375–384.
- [86] P. Stopfer, K. Marzin, H. Narjes, D. Gansser, M. Shahidi, M. Uttereuther-Fischer, T. Ebner, *Cancer Chemother. Pharmacol.* **2012**, *69*, 1051–1061.
- [87] R. Abbas, B. A. Hug, C. Leister, J. Burns, D. Sonnichsen, *Br. J. Clin. Pharmacol.* **2011**, *71*, 522–527.
- [88] E. Scheers, L. Leclercq, J. de Jong, N. Bode, M. Bockx, A. Laenen, F. Cuyckens, D. Skee, J. Murphy, J. Sukbuntherng, G. Mannens, *Drug Metab. Dispos.* **2014**, *43*, 289–297.
- [89] A. Chandrasekaran, L. Shen, S. Lockhead, A. Oganesian, J. Wang, J. Scatina, *Drug Metab. Lett.* **2010**, *4*, 220–227.
- [90] J. Wang, X. Li-Chan, J. Atherton, L. Deng, R. Espina, L. Yu, P. Horwatt, S. Ross, S. Lockhead, S. Ahmad, A. Chandrasakeran, A. Oganesian, J. Scatina, A. Mutlib, R. Talaat, *Drug Metab. Dispos.* **2010**, *38*, 1083–1093.
- [91] D. Lin, S. Saleh, D. C. Liebler, *Chem. Res. Toxicol.* **2008**, *21*, 2361–2369.
- [92] L. H. M. Vroomen, M. C. Berghmans, J. P. Groten, J. H. Koeman, P. J. van Bladeren, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **1988**, *95*, 53–60.
- [93] T. A. Baillie, J. G. Slatter, *Acc. Chem. Res.* **1991**, *24*, 264–270.
- [94] U. P. Dahal, R. S. Obach, A. M. Gilbert, *Chem. Res. Toxicol.* **2013**, *26*, 1739–1745.
- [95] M. E. Flanagan, J. A. Abramite, D. P. Anderson, A. Aulbaugh, U. P. Dahal, A. M. Gilbert, C. Li, J. Montgomery, S. R. Oppenheimer, T. Ryder, B. P. Schuff, D. P. Uccello, G. S. Walker, Y. Wu, M. F. Brown, J. M. Chen, M. W. Hayward, M. C. Noe, R. S. Obach, L. Philippe, V. Shanmugasundaram, M. J. Shapiro, J. Starr, J. Stroh, Y. Che, *J. Med. Chem.* **2014**, *57*, 10072–10079.
- [96] R. M. Oballa, J.-F. Truchon, C. I. Bayly, N. Chauret, S. Day, S. Crane, C. Berthelette, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2007**, *17*, 998–1002.
- [97] A. Böhme, D. Thaens, A. Paschke, G. Schüürmann, *Chem. Res. Toxicol.* **2009**, *22*, 742–750.
- [98] P. A. MacPaul, A. D. Morely, J. J. Crawford, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2009**, *19*, 1136–1138.
- [99] T. E. Ballard, U. P. Dahal, A. J. Bessire, R. P. Schneider, K. F. Geoghegan, A. D. N. Vaz, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2015**, *29*, 2175–2183.
- [100] M. Gersch, M. W. Hackl, C. Dubiella, A. Dobrinevski, M. Groll, S. A. Sieber, *Chem. Biol.* **2015**, *22*, 404–411.
- [101] I. D. G. Campuzano, T. S. Miguel, T. Rowe, D. Onea, V. J. Cee, T. Arvedson, J. D. McCarter, *J. Biomol. Screening* **2015**, *1*–9.
- [102] Y. Yang, Y.-Z. Shu, W. G. Humphreys, *Chem. Res. Toxicol.* **2016**, *29*, 109–116.
- [103] R. Guerciolini, *Int. J. Obes.* **1997**, *21*, S12–S23.
- [104] S. Kumar, K. Kassahun, R. A. Tschirret-Guth, K. Mitra, T. A. Baillie, *Curr. Opin. Drug Discovery Dev.* **2008**, *11*, 43–52.
- [105] T. J. Strelevitz, X. Yang, L. Wood, J.-C. Marshall, M. Zientek, L. Tremaine, L. Leung, *Drug Metab. Rev.* **2015**, *47(SI)*, 59.
- [106] J. D. Hughes, J. Blagg, D. A. Price, S. Bailey, G. A. DeCrescenzo, R. V. Devraj, E. Ellsworth, Y. M. Fobian, M. E. Gibbs, R. W. Gilles, N. Greene, E. Huang, T. Krieger-Burke, J. Loesel, T. Wager, L. Whiteley, Y. Zhang, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2008**, *18*, 4872–4875.
- [107] The Wall Street Journal, 2. Dezember 2015.
- [108] D. Butler, E. Callaway, *Nature* **2016**, *529*, 263–264.
- [109] C. Lammert, S. Einarsson, C. Saha, A. Niklasson, E. Bjornsson, N. Chalasani, *Hepatology* **2008**, *47*, 2003–2009.
- [110] M. Chen, J. Borlak, W. Tong, *Hepatology* **2013**, *58*, 388–396.
- [111] A. F. Stepan, D. P. Walker, J. Bauman, D. A. Price, T. A. Baillie, A. S. Kalgutkar, M. D. Aleo, *Chem. Res. Toxicol.* **2011**, *24*, 1345–1410.
- [112] V. J. Cee, L. P. Volak, Y. Chen, M. D. Bartberger, C. Tegley, T. Arvedson, J. McCarter, A. S. Tasker, C. Fotsch, *J. Med. Chem.* **2015**, *58*, 9171–9178.
- [113] P. M. S. D. Cal, J. B. Vicente, E. Pires, A. V. Coelho, L. F. Veiros, C. Cordeiro, P. M. P. Gois, *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 10299–10305.
- [114] C. Jöst, C. Nitsche, T. Scholz, L. Roux, C. D. Klein, *J. Med. Chem.* **2014**, *57*, 7590–7599.
- [115] A. Berteotti, F. Vacondio, A. Lodola, M. Bassi, C. Silva, M. Mor, A. Cavalli, *ACS Med. Chem. Lett.* **2014**, *5*, 501–505.
- [116] J. Schröder, A. Klinger, F. Oellien, R. J. Marhöfer, M. Duszenko, P. M. Selzer, *J. Med. Chem.* **2013**, *56*, 1478–1490.
- [117] S. G. Kathman, Z. Xu, A. V. Statsyuk, *J. Med. Chem.* **2014**, *57*, 4969–4974.
- [118] N. Godin-Heymann, L. Ulkas, W. B. Brannigan, U. McDermott, J. Lamb, S. Maheswaran, J. Settleman, D. A. Haber, *Mol. Cancer Ther.* **2008**, *7*, 874–879.
- [119] D. Ercan, H. G. Choi, C.-H. Yun, M. Capalletti, T. Xie, M. J. Eck, N. S. Gray, P. A. Jänne, *Clin. Cancer Res.* **2015**, *21*, 3913–3923.
- [120] J. C. Way, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2000**, *4*, 40–46.
- [121] H. M. Dickson, A. Wilbur, A. A. Reinke, M. A. Young, A. B. Vojetek, *BMC Neurosci.* **2015**, *16*, 34.
- [122] R. Nussinov, C.-J. Tsai, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **2015**, *55*, 249–267.

Eingegangen am 30. Januar 2016  
 Online veröffentlicht am 19. August 2016  
 Übersetzt von Dr. Margit Knauer, Bensheim