

- Ikariya, R. Noyori, *Angew. Chem.* **1998**, *110*, 1792–1796; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, *37*, Nr. 13/14.

[11] X. Zhang, T. Taketomi, T. Yoshizumi, H. Kumobayashi, S. Akutagawa, K. Mashima, H. Takaya, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 3318–3319.

[12] T. Nagata, K. Yorozu, T. Yamada, T. Mukaiyama, *Angew. Chem.* **1995**, *107*, 2309–2311; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1995**, *34*, 2145–2147. Eine neuere Übersicht über die asymmetrische Reduktion von Carbonylgruppen durch Hydride findet man bei J. Seydel-Penne, *Reductions by the Alumino- and Borohydrides in Organic Synthesis*, 2. Aufl., Wiley, New York, **1997**, 55–84.

[13] Übersicht: a) R. Noyori, S. Hashiguchi, *Acc. Chem. Res.* **1997**, *30*, 97–112; b) K. Matsumura, S. Hashiguchi, T. Ikariya, R. Noyori, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 8738–8739.

[14] K. Nakamura, T. Matsuda, A. Ohno, *Tetrahedron: Asymmetry* **1996**, *7*, 3021–3024.

[15] a) J. Takehara, S. Hashiguchi, A. Fujii, S. Inoue, T. Ikariya, R. Noyori, *Chem. Commun.* **1996**, 233–234; b) T. Langer, G. Helmchen, *Tetrahedron Lett.* **1996**, *37*, 1381–1384; c) K. Püntener, L. Schwink, P. Knochel, *ibid.* **1996**, *37*, 8165–8168; d) T. Sammakia, E. L. Stangeland, *J. Org. Chem.* **1997**, *62*, 6104–6105; e) M. Palmer, T. Walsgrove, M. Wills, *ibid.* **1997**, *62*, 5226–5228; f) F. Touchard, P. Gamez, F. Fache, M. Lemaire, *Tetrahedron Lett.* **1997**, *38*, 2275–2278; g) S. Inoue, K. Nomura, S. Hashiguchi, R. Noyori, Y. Izawa, *Chem. Lett.* **1997**, 957–958.

[16] Y. Jiang, Q. Jiang, G. Zhu, X. Zhang, *Tetrahedron Lett.* **1997**, *38*, 215–218.

[17] R. Berenguer, J. Garcia, J. Villarasa, *Tetrahedron: Asymmetry* **1994**, *5*, 165–168.

[18] a) T. Osawa, T. Harada, A. Tai, *J. Mol. Catal.* **1994**, *87*, 333–342; b) T. Osawa, T. Harada, A. Tai, *Catal. Today* **1997**, *37*, 465–480.

[19] a) M. J. Burk, M. F. Gross, T. G. P. Harper, C. S. Kalberg, J. R. Lee, J. P. Martinez, *Pure Appl. Chem.* **1996**, *68*, 37–44; b) J. Albrecht, U. Nagel, *Angew. Chem.* **1996**, *108*, 444–446; *Angew. Chem. Int. Engl.* **1996**, *35*, 404–407.

[20] T. Imai, T. Tamura, A. Yamamoto, *J. Am. Chem. Soc.* **1986**, *108*, 7402–7404.

[21] F. Touchard, F. Fache, M. Lemaire, *Tetrahedron: Asymmetry* **1997**, *8*, 3319–3326.

[22] R. Stürmer (BASF AG), persönliche Mitteilung.

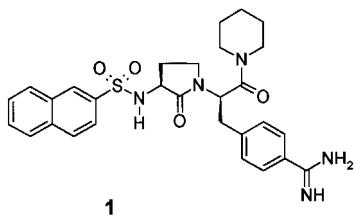
[23] Übersicht: K. Mori, *Chem. Commun.* **1997**, *13*, 1153–1158.

[24] T. Imamoto, J. Watanabe, Y. Wada, H. Masuda, H. Yamada, H. Tsuruta, S. Matsukawa, K. Yamaguchi, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 1635–1636.

# **Metallionen als Coinhibitoren von Serin-Proteasen: ein neuer Ansatz bei der Suche nach hochaffinen und spezifischen Liganden**

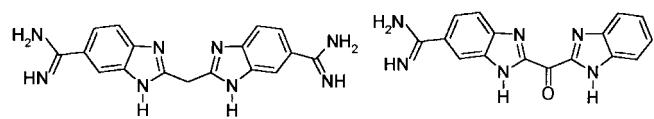
**Tanja Schirmeister\***

Serin-Proteasen haben als Schlüsselenzyme verschiedenster biologischer Prozesse für den Entwurf von Arzneistoffen eine große Bedeutung.<sup>[1]</sup> Zu denjenigen, die von besonderem Interesse sind, gehören die trypsinähnlichen Proteasen der Blutgerinnungskaskade Thrombin und Faktor Xa.<sup>[2]</sup> Gemeinsames Merkmal ist ihre Spezifität für basische Aminosäuren in P1.<sup>[3]</sup> Neben Trypsin werden auch die Proteasen der Fibrinolyse (Plasmin, t-PA, Urokinase)<sup>[4]</sup> und des Complement-Systems (Faktoren C1r, C1s)<sup>[5]</sup> sowie die Mastzellen-Tryptase<sup>[6]</sup> zu dieser Familie gezählt. Von therapeutischem Interesse ist weiterhin die Leukozyten-Elastase, die zwar den gleichen Hydrolysemechanismus nutzt, allerdings durch eine kleine, hydrophobe S1-Tasche nur eine P1-Spezifität für die kurzkettigen Aminosäuren Alanin und Valin aufweist.<sup>[7]</sup> Pathologische Prozesse, bei denen Serin-Protease-Inhibitoren von therapeutischem Nutzen sein können, sind Gefäßerkrankungen (Thrombin), Tumore (Plasmin, Urokinase), entzündliche Prozesse und Autoimmunerkrankungen (Tryptase, Complement-Proteasen), Lungenemphysem (Elastase) sowie Pankreatitis (Trypsin).<sup>[1]</sup> Bei der Entwicklung von Inhibitoren für trypsinähnliche Proteasen gab es bisher drei Ansätze, die sich in der Reaktion des Inhibitors mit dem aktiven Zentrum unterscheiden. 1 ist eines der zahlreichen Benzamidine, die mit ihrer positiv geladenen Amidiniumgruppe reversibel und nichtkovalent die durch die Aminosäure Asp189 negativ geladene S1-Tasche der Enzyme besetzen.<sup>[8]</sup> Der Peptidyl-



aldehyd GYKI 14766 (*N*-Me-d-Phe-Pro-Arg-H),<sup>[9]</sup> ein potenter Thrombininhibitor, reagiert zusätzlich in einer reversiblen Reaktion mit dem Serinrest des aktiven Zentrums zu einem Halbacetal. Irreversible Inhibitoren sind beispielsweise in der Gruppe der Peptidylchlormethylketone (z. B. d-Phe-Pro-Arg-CH<sub>2</sub>Cl)<sup>[9]</sup> zu finden.

Ein neuer Ansatz für die Entwicklung hochaffiner und selektiver Serin-Protease-Inhibitoren ist die kürzlich von Katz et al. publizierte Entdeckung, daß die Wirkung schwächer Inhibitoren wie des Amidinobenzimidazols<sup>[10]</sup> BABIM 2 durch den Zusatz von  $Zn^{2+}$ - oder  $Co^{2+}$ -Ionen um ein Vielfaches verstärkt werden kann.<sup>[11]</sup> So wird die Aktivität des Inhibitors 3 durch  $Zn^{2+}$  von einem  $K_I$ -Wert im mikromolaren Bereich (87.5  $\mu M$ ) um den Faktor 17000 auf  $K_I = 5.3 \text{ nM}$  erhöht.<sup>[11]</sup> Daß Metallkationen Proteasen hemmen



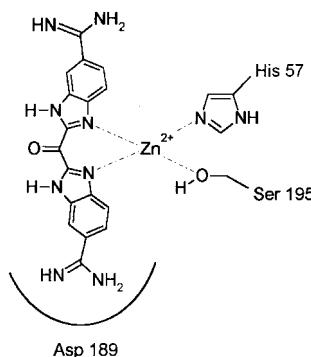
[\*] Dr. T. Schirmeister  
Pharmazeutisches Institut der Universität  
Hermann-Herder-Straße 9, D-79104 Freiburg  
Fax: (+49) 761-2036351  
E-mail: schirmei@sun2.ruf.uni-freiburg.de

können, war bisher nur von Cystein- und Aspartat-Proteasen bekannt, bei denen durch Komplexierung das aktive Zentrum, im Falle der Aspartat-Proteasen die beiden katalytisch relevanten Asp-Reste und im Falle der Cystein-Proteasen das Thiolat des aktiven Zentrums, blockiert wird. Ausnahmen bei Serin-Proteasen bildeten Kallikreine<sup>[12]</sup> und Herpesvirus-Proteasen wie die Cytomegalievirus-Protease hCMV.<sup>[13]</sup> Diese sind jedoch untypisch für Serin-Proteasen, da sie als katalytische Triade nicht Asp/Glu-Ser-His, sondern His-Ser-His verwenden und dadurch erst eine Komplexbildung ermöglichen. Bei den trypsinähnlichen Kallikreinen wird die Komplexbildung durch zusätzliche Histidin-enthaltende Loops ermöglicht.

Bekannt sind ferner Serin- und Cystein-Proteasen, die über eine zusätzliche  $Zn^{2+}$ -Bindungsstelle verfügen und  $Zn^{2+}$ -Ionen zwar nicht für die hydrolytische Aktivität, so doch für eine Stabilisierung der aktiven Konformation benötigen. Beispiele hierfür sind das NS3-Protein des Hepatitis-C-Virus (HCV), eine chymotrypsinähnliche Serin-Protease, und die 2A-Proteinasen der Picornaviren, eine Gruppe von chymotrypsinähnlichen Cystein-Proteasen.<sup>[14]</sup>

Ebenso sind mehrere Trypsin-Mutanten synthetisiert worden, die durch Austausch verschiedener Aminosäuren gegen Histidin durch  $Zn^{2+}$ -Ionen und andere Metallkationen gehemmt, aktiviert oder in ihrer Substratspezifität verändert werden können.<sup>[15]</sup>

Die enorme Erhöhung der Inhibitor-Aktivität der Benzamidine vom Typ **2** durch Kombination mit  $Zn^{2+}$ -Ionen ist zurückzuführen auf eine Chelatisierung des Metallions durch die Aminosäuren des aktiven Zentrums der Protease (His57, Ser195) und die N-Atome der beiden Imidazolringe.<sup>[11]</sup> Eine Komplexbildung wird hier also durch chelatisierende Elemente des Inhibitors ermöglicht und nicht nur wie im Falle der oben genannten metallabhängigen Trypsin-Varianten oder Virus-Proteasen durch Histidinreste im Enzym. Wie Röntgenstrukturanalysen<sup>[19]</sup> am Beispiel von Keto-BABIM/Trypsin (Schema 1) zeigen,<sup>[11]</sup> ist für diese hohe Affinität der



Schema 1. Bindungsmodus von Keto-BABIM an Trypsin.

Abstand zwischen dem S1-Erkennungselement, der Amidiumgruppe, und dem chelatisierenden Element des Inhibitors von entscheidender Bedeutung. Dadurch können sowohl die S1-Tasche als auch beide katalytisch relevanten Aminosäurereste des Enzyms blockiert werden.

Ein ähnliches Phänomen konnten Katz et al. schon bei der Hemmung von Trypsin durch Peptidylboronate (z.B. **4**; BOC = *tert*-Butoxycarbonyl) in Kombination mit Alkoholen

nachweisen.<sup>[16]</sup> Dieses Verhalten des Enzyms, Komponenten aus dem Reaktionsmedium für die Bindung „auszuwählen“, wurde als Episelektion bezeichnet.<sup>[16]</sup>

Hauptproblem bei der Entwicklung neuer Inhibitoren ist neben der Pharmakokinetik (z.B. orale Verfügbarkeit) die mangelnde Selektivität. Erreicht werden kann diese durch Substituenten, die nicht nur die P1-Spezifität der einzelnen Proteasen, sondern auch größere Substratsequenzen berücksichtigen. Beispielsweise konnte die Selektivität zwischen Thrombin und Trypsin erheblich durch Ausnutzung der Tatsache gesteigert werden, daß Thrombin im Unterschied zu Trypsin über eine ausgeprägte, lipophile P3-Tasche verfügt, wie dies z.B. in GYKI14766 verwirklicht ist.

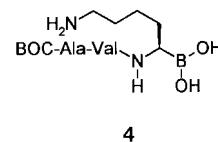
Wie Katz et al. zeigten, ist eine Verbesserung der Selektivität auch mit  $Zn^{2+}$ -Ionen als Coinhibitor möglich.<sup>[11]</sup> So wird die Hemmung von Thrombin durch den Inhibitor **5** mit  $Zn^{2+}$ -Ionen um den Faktor 760 erhöht ( $K_I = 41\text{ nM}$  mit  $Zn^{2+}$ ,  $31\text{ }\mu\text{M}$  ohne  $Zn^{2+}$ ), während der  $Zn^{2+}$ -Zusatz sich auf die Hemmung von Trypsin kaum auswirkt ( $K_I = 22.5$ ,  $31.2\text{ }\mu\text{M}$  mit bzw. ohne  $Zn^{2+}$ ).

Zwischen Thrombin und Tryptase wird sogar eine Selektivitätserhöhung um den Faktor 4750 erreicht ( $K_I = 54.5$ ,  $8.8\text{ }\mu\text{M}$  mit bzw. ohne  $Zn^{2+}$ , Tryptase). Offensichtlich werden durch die Chelatisierung die Unterschiede der einzelnen Enzyme in den Substratbindungsseiten außerhalb von S1 verstärkt.

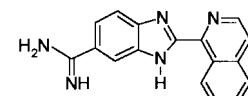
Da die Erhöhung von Selektivität und Affinität bereits bei  $Zn^{2+}$ -Konzentrationen von  $100\text{ nM}$ , d.h. weit unter physiologischen Konzentrationen, zu beobachten ist,<sup>[11]</sup> ergeben sich vielversprechende Möglichkeiten für die Entwicklung neuer Wirkstoffe. Allerdings sollten Ergebnisse mit Inhibitoren, die zur Chelatbildung fähige funktionelle Gruppen tragen, und die ohne den absoluten Ausschluß komplexbildender Metallkationen erhalten wurden, kritisch überdacht werden.

Übertragen auf andere Serin-Proteasen bedeuten diese Ergebnisse, daß durch Kombination eines geeigneten S1-Erkennungselementes, für Chymotrypsin hydrophobe Reste oder für Elastase kurze Alkylketten, mit einer chelatisierenden Gruppe durch Komplexbildung mit Metallionen aus schwachen, unselektiven Liganden hochaffine und spezifische niedermolekulare Inhibitoren entstehen können. Für Cystein-Proteasen, bei denen vor allem die lysosomalen Cathepsine interessante Targets für den therapeutischen Einsatz von Inhibitoren sind,<sup>[17]</sup> müßten neben der Tatsache, daß diese durch das Vorliegen eines Thiolats im aktiven Zentrum über eine funktionelle Gruppe mit höherer Komplexbildungstendenz verfügen, auch die zur Struktur von Serin-Proteasen spiegelbildliche Geometrie des aktiven Zentrums<sup>[18]</sup> und die ausgesprochene P2-Spezifität für hydrophobe Aminosäuren berücksichtigt werden.

**Stichwörter:** Chelate • Enzyminhibitoren • Kationen • Serin-Proteasen • Zink



4



5

- [1] Y. Nakayama, K. Senokuchi, H. Nakai, T. Obata, M. Kawamura, *Drugs Future* **1997**, 22, 285–293.
- [2] E. Davie, K. Fujikawa, W. Kisiel, *Biochemistry* **1991**, 30, 10363–10370.
- [3] J. J. Perona, C. S. Craik, *Prot. Science* **1995**, 4, 337–360.
- [4] D. Collen, H. R. Lijinen in *Hematology Basic Principles & Practice* (Hrsg.: R. Hoffman, E. J. Benz, S. J. Shattil, Jr., B. Furie, H. J. Cohen), Churchill Livingstone, New York, **1991**, S. 1232–1242.
- [5] M. M. Frank, L. F. Fries in *Fundamental Immunology* (Hrsg.: W. E. Paul), Raven, New York, **1989**, S. 679–701.
- [6] G. H. Caughey, W. W. Raymond, E. Bacci, R. Lombardy, R. R. Tidwell, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1993**, 264, 676–682.
- [7] A. Krantz, *Ann. Rep. Med. Chem.* **1993**, 29, 195–204.
- [8] a) D. Banner, P. Hadváry, *J. Biol. Chem.* **1991**, 266, 20085–20093; b) D. Banner, J. Ackermann, A. Gast, K. Gubernator, P. Hadváry, K. Hilpert, L. Labler, K. Müller, G. Schmid, T. Tschopp, H. van de Waterbeemd, B. Wirz in *Perspectives in Medicinal Chemistry* (Hrsg.: B. Testa, E. Kyburz, W. Fuhrer, R. Giger), VCH, Weinheim, **1993**, S. 27–43.
- [9] H.-J. Böhm, G. Klebe, H. Kubinyi, *Wirkstoffdesign*, Spektrum, Heidelberg, **1996**, S. 469–485.
- [10] a) R. Tidwell, J. Geratz, O. Dann, G. Volz, D. Zeh, H. Loewe, *J. Med. Chem.* **1978**, 21, 613–623; b) R. Tidwell, J. Geratz, E. Dubovi, *ibid.* **1983**, 26, 294–298.
- [11] B. A. Katz, J. M. Clark, J. S. Finer-Moore, T. E. Jenkins, C. R. Johnson, M. J. Ross, C. Luong, W. R. Moore, R. M. Stroud, *Nature* **1998**, 391, 608–612.
- [12] a) K. Watt, P.-J. Lee, T. M'Timkulu, W.-P. Chan, R. Loor, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1986**, 83, 3166–3170; b) M. Fujinaga, M. James, *J. Mol. Biol.* **1987**, 195, 373–396; c) F. Fiedler, E. Werle, *Eur. J. Biochem.* **1968**, 7, 27–33.
- [13] L. Tong, C. Qian, M.-J. Massariol, P. Bonneau, M. Cordingley, L. Lagacé, *Nature* **1996**, 383, 272–275.
- [14] R. De Francesco, A. Urbani, M. Nardi, L. Tomei, C. Steinkühler, A. Tramontano, *Biochemistry* **1996**, 35, 13282–13287.
- [15] a) W. Willett, L. Brinen, R. Fletterick, C. S. Craik, *Biochemistry* **1996**, 35, 5992–5998; b) L. Brinen, W. Willett, C. S. Craik, R. Fletterick, *ibid.* **1996**, 35, 5999–6009; c) J. Higaki, B. Haymore, S. Chen, R. Fletterick, C. S. Craik, *ibid.* **1990**, 29, 8582–8586; d) S. Halfon, C. S. Craik, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, 118, 1227–1228.
- [16] B. A. Katz, J. Finer-Moore, R. Mortezaei, D. Rich, R. Stroud, *Biochemistry* **1995**, 34, 8264–8280.
- [17] T. Schirmeister, H.-H. Otto, *Chem. Rev.* **1997**, 97, 133–171.
- [18] a) R. M. Garavito, M. G. Rossmann, P. Argos, W. Eventoff, *Biochemistry* **1977**, 16, 5065–5071; b) W. Bode, R. Engh, D. Musil, B. Laber, M. Stubbs, R. Huber, V. Turk, *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* **1990**, 371, Suppl., 111–118.
- [19] Katz et al. beschreiben in Lit. [11] drei kristallographisch gesicherte Bindungsmodi von BABIM sowie Keto-BABIM an Trypsin: 1. mit  $Zn^{2+}$  bzw.  $Co^{2+}$ , 2. mit  $SO_4^{2-}$ , 3. ohne Ionen.