

Diss. ETH Nr. 17268

**Inhibition einer Protein-Protein-Wechselwirkung:
Strukturbasiertes Design, Synthese und Evaluation
von wirkstoffähnlichen Inhibitoren der Dimerisierung der
Varicella Zoster Virus Thymidin Kinase (VZV TK)**

A B H A N D L U N G

zur Erlangung des Titels

DOKTOR DER WISSENSCHAFTEN

der

EIDGENÖSSISCHEN TECHNISCHEN HOCHSCHULE ZÜRICH

vorgelegt von

Lukas Brändli

Dipl. Chem. ETH
geboren am 28. Juli 1978
von Wädenswil (ZH)

angenommen auf Antrag von

Prof. Dr. François Diederich, Referent
Prof. Dr. Donald Hilvert, Korreferent
Prof. Dr. Leonardo Scapozza, Korreferent

Zürich 2007

Zusammenfassung

Protein-Komplexe sind von grundlegender Bedeutung in der Biologie. Die kontrollierte Inhibition einer Protein-Protein-Wechselwirkung setzt die spezifische Interaktion eines niedermolekularen Liganden mit oft flachen, flexiblen und Lösungsmittel-exponierten Regionen voraus. Während das Design von Verbindungen, welche die aktive Tasche eines Proteins erkennen, Routine geworden ist, stellt die Entwicklung kleiner, wirkstoffähnlicher Verbindungen zur spezifischen Inhibition von Protein-Protein-Wechselwirkungen eine grössere Herausforderung dar. Die pharmazeutische Industrie ist sehr stark an diesem Forschungsgebiet interessiert, da zahlreiche Protein-Protein-Wechselwirkungen an Signalkaskaden beteiligt sind, welche bei einer Störung zur Entstehung von Krebs oder anderen Krankheiten führen können. Pionierarbeiten basierend auf *Screening*-Methoden führten zu Liganden, welche selektiv an den flachen und flexiblen *Hot Spot* von Interleukin 2 (IL-2) binden und dessen Wechselwirkung mit dem Interleukin-2 Rezeptor (IL2-R α) inhibieren. Ein Meilenstein war die Entwicklung von wirkstoffähnlichen Verbindungen, welche die Interaktion zwischen dem antiapoptotischen Protein MDM2 und dem Tumorsuppressorprotein p53 *in vivo* im nanomolaren Bereich inhibieren.

Einen erfolgreichen strukturbasierten Ansatz verfolgten *Hamilton* und Mitarbeiter beim Design von Terphenyl- und Terpyridylderivaten als α -Helix-Mimetika, welche die Wechselwirkung zwischen dem antiapoptotischen Protein Bcl-x_L mit der BH3-Domäne des proapoptotischen Proteins Bak inhibieren.

Entscheidend bei der Auswahl eines Protein-Komplexes für das strukturbasierte Design von Inhibitoren einer Protein-Protein-Wechselwirkung sind die Grösse und die Polarität der Kontaktfläche, die daran beteiligten Sekundärstrukturelemente und die Grösse und Geometrie des *Hot Spots*. Es muss eine Bindungstasche für die niedermolekularen Liganden vorliegen, welche in Lösung konformationell stabil ist.

Das Ziel dieses Projekts war das strukturbasierte Design, die Synthese und die Evaluation wirkstoffähnlicher Inhibitoren der Dimerisierung der Varicella Zoster Virus Thymidin Kinase (VZV TK). Die VZV TK (EC 2.7.1.21, PDB-Code 1OSN) ist verantwortlich für die Aktivierung antiviraler Wirkstoffe in infizierten Zellen. Das Enzym zählt zur Klasse der Nukleotid-Monophosphat-Kinasen (NMP-Kinasen) und besitzt deren klassisches Faltungsmuster. Die VZV TK ist als C₂-symmetrisches

Homodimer biologisch aktiv. Die Kontaktfläche zwischen den Protein-Untereinheiten ist relativ klein und besitzt einen klassischen und ausgeprägten *Hot Spot*. Mutationsstudien zeigten, dass die drei Aminosäuren Leu276, Trp277, und Trp279 für die Dimerisierung essentiell sind (Abb. 1). Die drei Aminosäure-Seitenketten mit der relativen Abfolge i , $i+1$, $i+3$ befinden sich am Endpunkt einer α -Helix, welche abgewinkelt zur Ebene der Kontaktfläche orientiert ist. Die Region mit der die drei Aminosäurereste interagieren bildet eine Kavität, welche als Bindungstasche für das strukturbasierte Design der Dimerisierungsinhibitoren diene.



Abb. 1 VZV TK-Homodimer (links) und der Hot Spot (rechts).

Werden die drei *Hot Spot*-Aminosäuren zusammen mit Tyr52 und Glu59 durch Alanin ersetzt, resultiert ein monomerer, katalytisch inaktiver Mutant (VZV TK5x). Dies weist darauf hin, dass die Dimerisierung für die katalytische Aktivität des VZV TK-Wildtyps essentiell sein könnte, dass also eine Inhibition der Dimerisierung zu einem Funktionsverlust führen würde.

Ab initio entworfene niedermolekulare Dimerisierungsinhibitoren besitzen unter gewissen Bedingungen ein Aktivitätsprofil (Abb. 4), welches unter der Annahme einer spezifischen Interaktion mit der Bindungstasche (Abb. 2) an der Kontaktfläche der VZV TK rationalisiert werden kann. Überraschend wurde in Gegenwart von Verbindungen mit Imidazolkern eine Aktivierung anstelle einer Inhibition der VZV TK gefunden (Abb. 4).

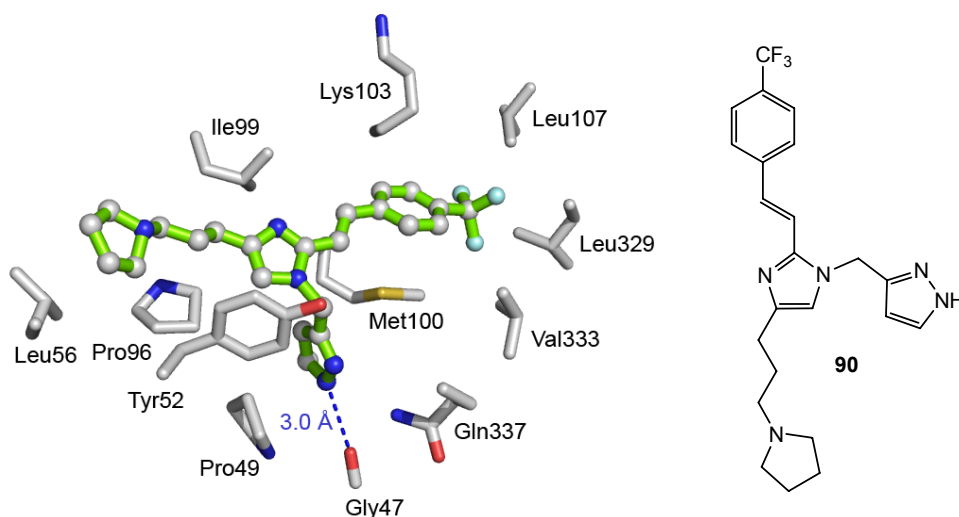


Abb. 2 Vermuteter Bindungsmodus des Dimerisierungsinhibitors **90** in der Bindungstasche am Hot Spot der VZV TK.

Eine *Ferguson Plot*-Analyse zeigt eine Verschiebung des Dimer-Monomer-Gleichgewichtes hin zum Monomer – ein Hinweis auf die Inhibition der Dimerisierung in Gegenwart des Dimerisierungsinhibitors **90**. Mittels CD-Spektroskopie gemessene thermische Denaturierungskurven in Gegenwart von Imidazol **90** (10 μM) zeigen einen ähnlichen Effekt auf die Schmelztemperatur der VZV TK (5 μM) wie in Gegenwart einer 50-fach höheren Konzentration des natürlichen Substrats dT (500 μM) (Abb. 3). Die beobachtete Stabilisierung der VZV TK weist auf die Bildung von VZV TK-Ligand-Komplexen in Gegenwart von Verbindung **90** hin.

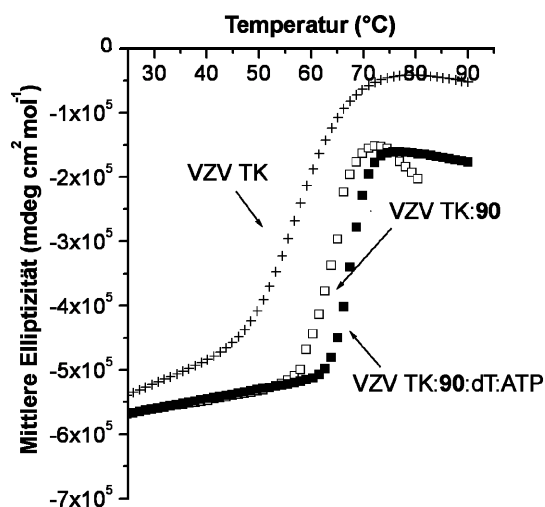


Abb. 3 Thermische Denaturierungskurven der VZV TK in Gegenwart von Dimerisierungsinhibitor **90**.

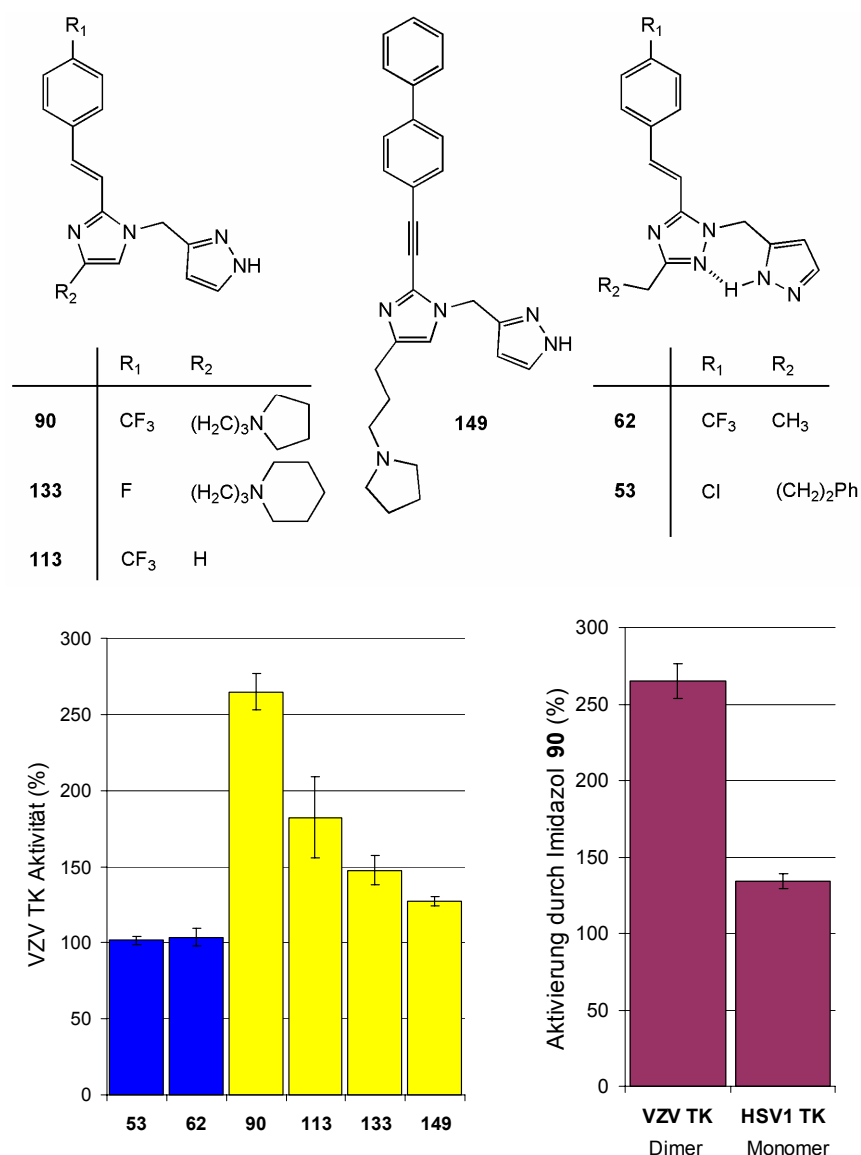


Abb. 4 Repräsentative Auswahl an evaluierten Verbindungen. Blau: inaktive 1,2,4-Triazole; Gelb: Imidazole. Unter den Bedingungen im HPLC-Assay zeigen Imidazole wie Verbindung **90** eine Aktivierung der VZV TK. Die Aktivität der homologen monomeren Herpes Simplex Virus Typ1 Thymidin Kinase (HSV1 TK) ändert sich in Gegenwart von Verbindung **90** nur geringfügig.

Bei der vorliegenden Arbeit handelte es sich um ein riskantes Projekt. In der Anfangsphase war die Chemie der limitierende Faktor, während sich in der Endphase zeigte, dass es schwierig sein kann, die Effekte von Liganden, welche nicht mit der aktiven Tasche eines Proteins interagieren, zu messen. Die erhaltenen Daten weisen auf eine Inhibition der Dimerisierung der VZV TK hin, welche durch weitere Messungen (z.B. mittels analytischer Ultrazentrifugation oder durch *Light Scattering*) nachgewiesen werden könnte.

Abstract

Protein-protein interactions are of fundamental importance in biology. The controlled disruption of a protein complex requires the specific binding of a small molecule ligand to often relatively flat regions at a protein-protein interface, which constitutes a significant challenge in modern medicinal chemistry. Current drug discovery programs are strongly interested in this hot topic due to a large number of important protein-protein interactions involved in signaling pathways related to cancer and other diseases.

Pioneering studies involving screening methods led to the identification of small molecules that bind selectively to the flat and adaptive hot spot of interleukin 2 (IL-2), inhibiting its association with the receptor IL2-R α . The discovery of small molecules inhibiting the association of the anti-apoptotic protein MDM2 with p53 in the nanomolar range represents a true milestone.

There is an increasing number of small-molecule modulators of protein-protein interactions, but compared with common enzyme inhibitors, this class of compounds is still small. Successful approaches involving structure-based ligand design include terphenyl- and terpyridyl derivatives developed by *Hamilton* and coworkers. They act as α -helix mimetics, binding to the anti-apoptotic protein Bcl-x_L, preventing its association with the BH3 domain of the pro-apoptotic protein Bak.

The challenges of the structure-based approach include the careful selection of a protein complex, with consideration of the size and secondary structural elements of the protein interface and the size and geometry of the hot spot, which must have a well-defined binding pocket that is conformationally stable in solution.

The goal of this project was the structure-based design and synthesis of drug-like inhibitors of the dimerization of varicella zoster virus thymidine kinase (VZV TK). VZV TK (EC 2.7.1.21, PDB-code 1OSN) is responsible for the activation of nucleoside antiviral drugs in infected cells. The enzyme belongs to the family of the nucleotide monophosphate (NMP) kinases and is characterized by the classical mononucleotide binding fold. It is biologically active as a C₂-symmetric homodimer. The interface of the enzyme is relatively small and contains a classical and distinct hot spot. Mutation studies showed that amino acids Leu276, Trp277, and Trp279 are essential for dimerization (Fig. 1). The hot spot amino acids with the relative

positions i , $i+1$, $i+3$ are located at the terminal point of an α -helix. The region where the three residues interact with the other protein subunit creates a cavity, which served as the target binding pocket for the structure-based design of the ligands.

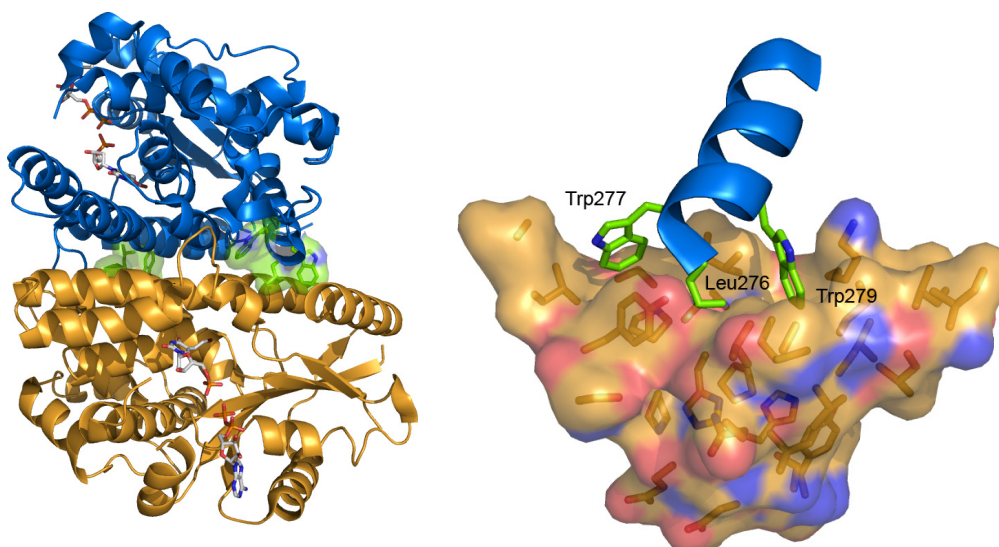


Fig. 1 *VZV TK homodimer (left) and its hot spot (right).*

Replacing the three hot spot amino acids as well as Tyr52 and Glu59 by alanine leads to the formation of a catalytically inactive monomeric mutant (VZV TK5x), indicating that dimerization might be essential for the catalytic activity of wildtype VZV TK, and that inhibition of dimerization could lead to a loss of function. Small-molecule inhibitors that were developed *ab initio* show an activity profile that can be rationalized assuming specific binding to the hot spot cavity at the VZV TK interface (Fig. 2). Surprisingly, activation – rather than inhibition – of VZV TK was observed in the presence of compounds with an imidazole core under certain conditions (Fig. 3).

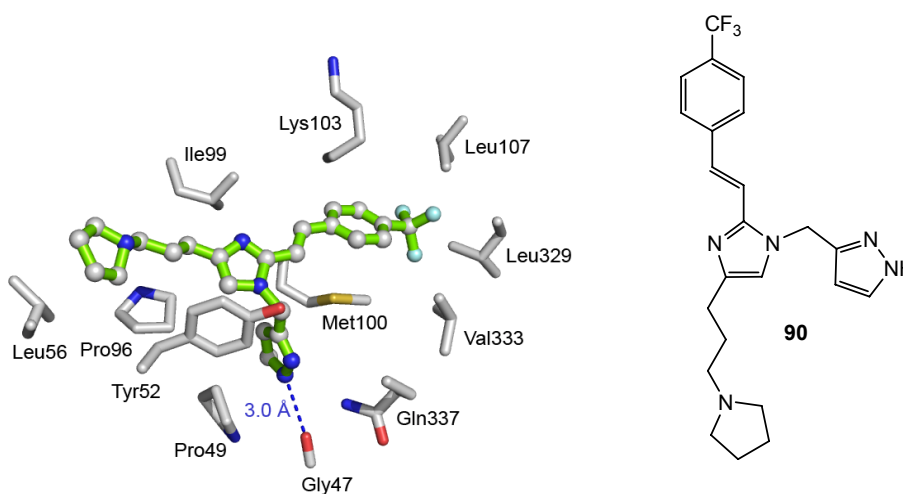
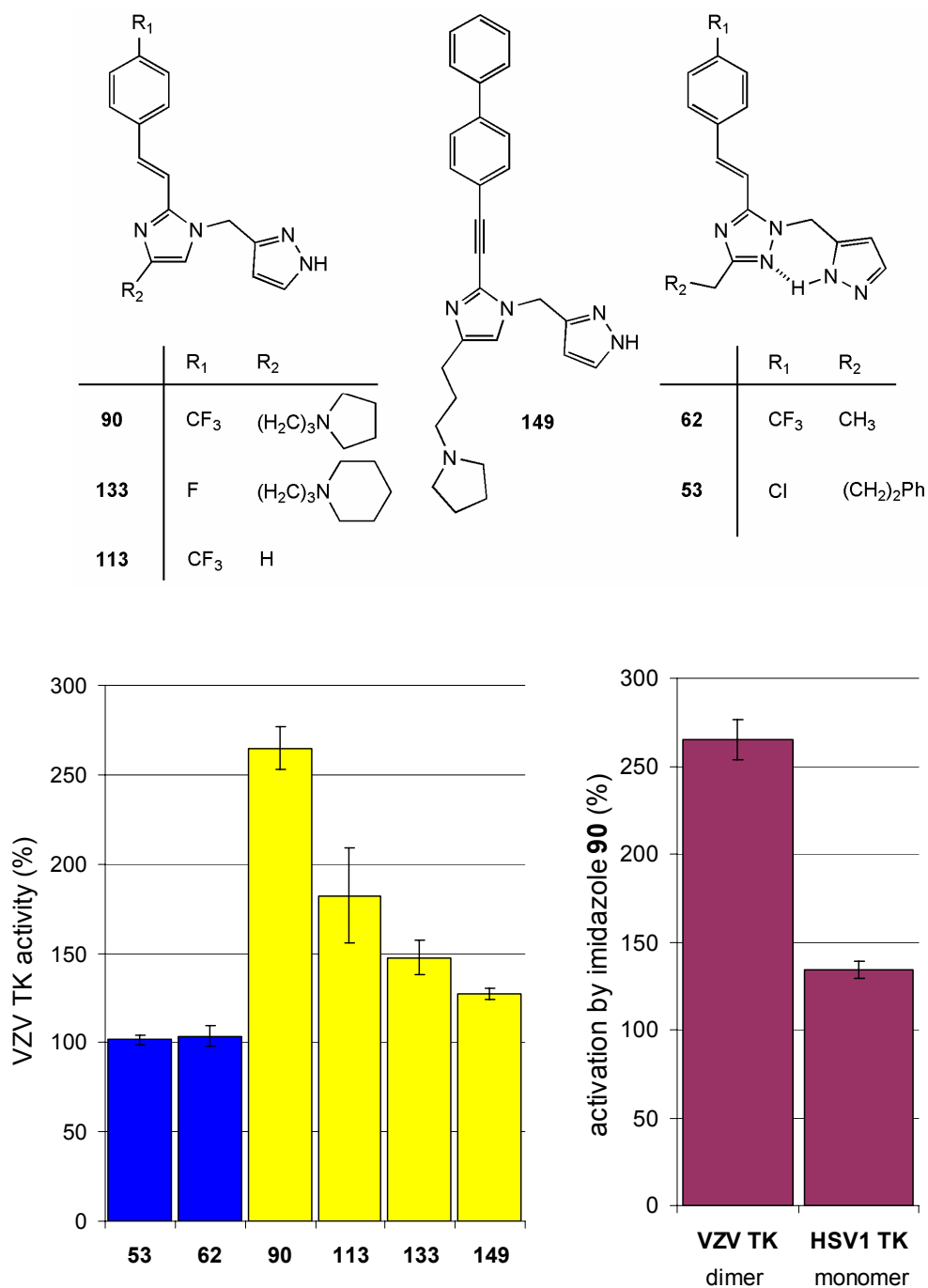


Fig. 2 *Model of dimerization inhibitor 90 at the hot spot cavity of VZV TK, with the postulated binding mode of the evaluated compounds.*

**Fig. 3**

Representative subset of the evaluated compounds. Blue: inactive 1,2,4-triazoles; Yellow: imidazoles. Under the HPLC-assay conditions used, imidazoles such as **90** show an activation of VZV TK. The activity of the homologous monomeric herpes simplex virus type 1 thymidine kinase (HSV1 TK) is not significantly affected by imidazole **90**.

A *Ferguson* plot analysis of a series of native polyacrylamid gels of VZV TK in the presence of dimerization inhibitor **90** shows a shift in the molecular weight towards the monomer, which indicates the inhibition of the dimerization.

Thermal denaturation curves in the presence of dimerization inhibitor **90** (10 μM) indicate a shift of the melting temperature of the VZV TK (5 μM) that is in the same range as in the presence of the natural substrate dT at a 50-fold higher concentration (500 μM) (Fig. 4). The observed stabilization of VZV TK indicates the formation of stable VZV TK-ligand complexes in the presence of compound **90**.

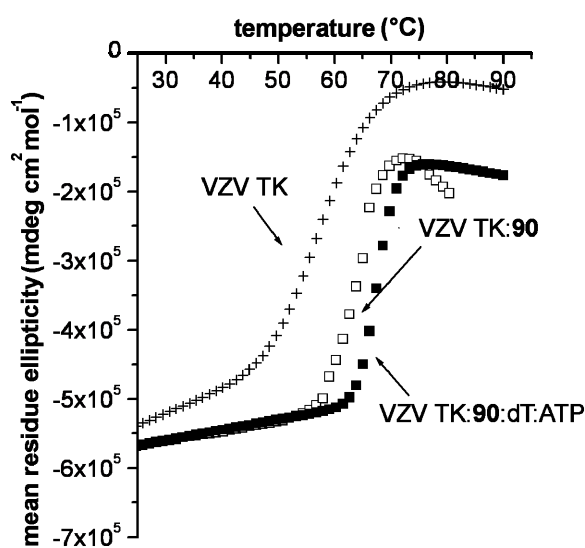


Fig. 4 Thermal denaturation curves of VZV TK in the presence of dimerization inhibitor **90**.

This project was rather risky. Initially, chemistry was the limiting factor, and later it became obvious that quantification of the effects of ligands that do not bind to the active site of a protein is challenging.

Although no direct evidence for the inhibition of the dimerization of VZV TK was obtained, the results provide some hints that this might be the case. Further measurements, for example directly monitoring the oligomeric state of the protein in solution via light scattering or analytical ultracentrifugation, might prove the current hypothesis.