



Untersuchung schwacher Protein-Ligand-Wechselwirkungen mithilfe langlebiger NMR-Zustände: verbesserter Kontrast für das fragmentbasierte Wirkstoffscreening**

Roberto Buratto,* Daniele Mammoli, Elisabetta Chiarparin, Glyn Williams und Geoffrey Bodenhausen

Abstract: Die vorteilhaften Eigenschaften langlebige Zustände (LLS, „long-lived states“) in der NMR-Spektroskopie ermöglichen ein effizientes Affinitätsscreening von Substanzbibliotheken. Wir beschreiben hier die Anwendung der LLS in kompetitiven Bindungsstudien, um präzise auch schwache Bindungskonstanten von Fragmenten an die ATP-Bindungsstelle der N-terminalen ATPase-Domäne des Hitzeschockproteins 90 (Hsp90), einem therapeutischen Ansatzpunkt in der Krebstherapie, zu bestimmen. Der LLS-Ansatz ermöglicht es, Liganden über einen außergewöhnlich weiten Bereich von Affinitäten aufzuspüren, denn er kann auch bei Ligandenkonzentrationen [L], die einige Größenordnungen kleiner als die Dissoziationskonstanten K_D sind, verwendet werden. Diese Eigenschaft macht das LLS-Experiment besonders für die erste Stufe des fragmentbasierten Screenings attraktiv, in dem kleine Moleküle (Fragmente) mit geringer Bindungsneigung identifiziert werden müssen, was mit allen anderen biophysikalischen Methoden nur schwer gelingt.

Im letzten Jahrzehnt hat sich der Ansatz eines fragmentbasierten Screenings als ein Erfolg versprechender Weg erwie-

sen, um neue Leitstrukturen zu finden.^[1] Die fragmentbasierte Wirkstoff-Findung (FBDD, „fragment-based drug discovery“) ist zu einer in der pharmazeutischen Industrie akzeptierten Methode gereift, wie die Zahl der Fragmente belegt, die inzwischen zu Leitstrukturen und klinischen Kandidaten entwickelt werden konnten.^[1a,2] Diese Vorgehensweise verwendet Bibliotheken sorgfältig ausgewählter, niedermolekularer Verbindungen (MW = 150–250 Da) zur Identifikation von schwach bindenden Liganden an das Zielprotein. Aussichtsreiche Fragmente weisen üblicherweise Dissoziationskonstanten (K_D) zwischen 0.1 bis 10 mM auf. Die anschließende Optimierung erfordert in der Regel strukturelle Methoden, um den Bindungsmodus zu bestimmen. Für das Fragmentenscreening finden Röntgenstrukturanalyse, Oberflächenplasmonenresonanz (SPR)-Spektroskopie, isotherme Kalorimetrie (ITC) sowie biologische Assays bei hoher Konzentration Verwendung. Der Messwert dieser proteinbasierten Methoden ist abhängig vom Anteil des gebundenen Proteins im Vergleich zur Gesamtkonzentration an Target-Protein.^[3] Wenn die Bindungsaffinität schwach ist, lässt sich dieses Gleichgewicht nur durch hohe Konzentration der Liganden verschieben, eine Anforderung die sich nur schwierig mit Substanzbibliotheken realisieren lässt. Ligandendetektierte Methoden führen zu Signalen, die proportional zum Verhältnis aus gebundenem und freiem Liganden sind, und dieses Verhältnis wäre bei Ligandenkonzentrationen maximal, die der Proteinkonzentration entsprechen. Damit ist ein Screening bei Ligandenkonzentrationen [L] durchführbar, die Größenordnungen unter der Dissoziationskonstanten K_D liegen.

Trotz ihrer inhärent geringen Empfindlichkeit kann man mit NMR-Spektroskopie damit Dissoziationskonstanten K_D über einen extrem großen dynamischen Bereich bei vergleichsweise geringer Ligand- und Proteinkonzentration nachweisen.^[3] Als am besten untersuchte NMR-Methoden seien der proteinvermittelte Magnetisierungstransfer vom Lösungsmittel („Water-LOGSY“),^[4] der Magnetisierungstransfer durch Sättigung der Proteinsignale, Sättigungstransferdifferenz (STD)^[5] und die durch Proteinbindung beschleunigte transversale Relaxation (T_2) von ^1H - und ^{19}F -Kernen^[6] erwähnt. Die Relaxationsmethoden, ob sie auf Spin-Echo-Sequenzen nach Carr-Purcell-Meiboom-Gill (CPMG) oder auf der Messung selektiver Relaxationsraten basieren, nützen die Differenz der Relaxationsraten zwischen gebundenen und freien Liganden aus Gleichung (1).

$$\Delta R_i = R_i^{\text{bound}} - R_i^{\text{free}} \quad (1)$$

[*] R. Buratto, D. Mammoli, Prof. G. Bodenhausen
Institut des Sciences et Ingénierie Chimiques
Ecole Polytechnique Fédérale de Lausanne
Batochime (BCH), 1015 Lausanne (Schweiz)
E-Mail: roberto.buratto@epfl.ch

Prof. G. Bodenhausen
Département de Chimie, Ecole Normale Supérieure
24 rue Lhomond, 75231 Paris Cedex 05 (Frankreich)

Dr. E. Chiarparin, Dr. G. Williams
Astex Pharmaceuticals
436 Cambridge Science Park, Milton Road, Cambridge CB4 0QA
(Großbritannien)

[**] Diese Arbeit wurde von der Swiss National Science Foundation (SNSF), der Swiss Commission for Technology and Innovation (CTI), der EPFL, dem Europäischen Forschungsrat (ERC) und der französischen CNRS gefördert. Diese Arbeit wurde von Dr. Herbert Kogler übersetzt. Wir danken Dr. Nicola Salvi, Harvard Medical School, für hilfreiche Diskussionen.

Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag (Details zu Experimenten und Probenvorbereitung) sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.201404921> zu finden.

© 2014 Dieser Open Access Beitrag steht unter den Bedingungen der Creative Commons Attribution Non-Commercial NoDerivs License, die eine Nutzung und Verbreitung in allen Medien gestattet, sofern der ursprüngliche Beitrag ordnungsgemäß zitiert und nicht für kommerzielle Zwecke genutzt wird und keine Änderungen und Anpassungen vorgenommen werden.

Darin steht $i=1$ für longitudinale Relaxation, $i=2$ für transversale Relaxation, $i=1\rho$ für Relaxation im rotierenden Koordinatensystem, $i=LLS$ für langlebige Zustände und $i=LLC$ für langlebige Kohärenzen usw. Die beobachtete Relaxationsrate $\langle R_i^{obs} \rangle$ ist der mit den molaren Anteilen gewichtete Mittelwert von R_i^{bound} und R_i^{free} im Fall des schnellen Austauschs,^[7] wenn also die Austauschraten schneller als der Unterschied der chemischen Verschiebungen sind [Gleichung (2)].

$$\langle R_i^{obs} \rangle = R_i^{bound} X^{bound} + R_i^{free} X^{free} \quad (2)$$

Die Nachweisgrenze eines gebundenen Liganden $X^{bound} = [PL]/[L]$ hängt also entscheidend von der Größe dieser Differenz ΔR_i ab. Die experimentellen Bedingungen müssen folglich so gewählt werden, dass ein hinreichend großer Kontrast C_i erreicht wird [Gleichung (3)].

$$C_i = \frac{R_i^{obs} - R_i^{free}}{R_i^{obs}} 100\% \quad (3)$$

Kürzlich wurden langlebige Zustände (LLS) für Protein-Ligand-Screening^[8] vorgeschlagen. Die Differenz ΔR_{LLS} kann deutlich größer werden als die entsprechenden Unterschiede in den Relaxationsraten ΔR_1 , ΔR_2 , usw. Damit wird es möglich, guten Kontrast auch bei hohem Ligandenüberschuss zu erzielen, was ein LLS-Screening für den fragmentbasierten Ansatz besonders attraktiv macht, bei dem zunächst nur schwach affine Liganden zu erwarten sind.

LLS sind Zustände von Kernspins, die gegenüber den dipolaren Wechselwirkungen der beiden beteiligten Spins unempfindlich sind.^[9] Infolgedessen zerfällt ein LLS langsam mit einer Rate R_{LLS} , die oft kleiner als die longitudinale Relaxationsrate R_1 ist. Es wurde schon eine Verringerung der Rate um bis zu einem Faktor $R_1/R_{LLS} = 37$ gemessen,^[10] was langlebige Zustände wertvoll für die Beobachtung langsamer Diffusion^[11] und langsamer Austauschphänomene^[12] macht und es ermöglicht, die durch DNP induzierte Hyperpolarisation zu erhalten.^[13] Da die LLS durch ein externes Radiofrequenzfeld aufrechterhalten werden müssen (siehe die Hintergrundinformationen), das exakt in der Mitte der beiden beteiligten Resonanzfrequenzen liegen muss, wird bereits eine kleine, durch die Bindung des Liganden an das Zielprotein verursachte, Änderung der chemischen Verschiebung diesen Effekt aufheben und damit die Relaxationsrate R_{LLS}^{bound} vergrößern und den Kontrast C_{LLS} verstärken. Ein großer Kontrast C_{LLS} in Verbindung mit einer verringerten Relaxationsrate $R_{LLS}^{free} < R_1^{free}$ macht das Screening mit LLS besonders vorteilhaft, weil Dissoziationskonstanten K_D über einen weiten Bereich beobachtet werden können. Hier konnten wir mittels LLS Dissoziationskonstanten bis 12 mM nachweisen, ein Bereich in dem alle anderen biophysikalischen Methoden, und selbst ligandenbasierte NMR-Methoden, versagen. Bisher machte der Nachweis solcher schwachen Affinitäten die aufwendige Analyse von ¹⁵N- und/oder ¹³C-markierten Proteinen erforderlich.

Um die Vorteile des LLS-Screenings zu verdeutlichen, wurde der Kontrast C_{LLS} für die LLS-Signale der beiden aromatischen Protonen I und S von Vanillinsäurediethylamid

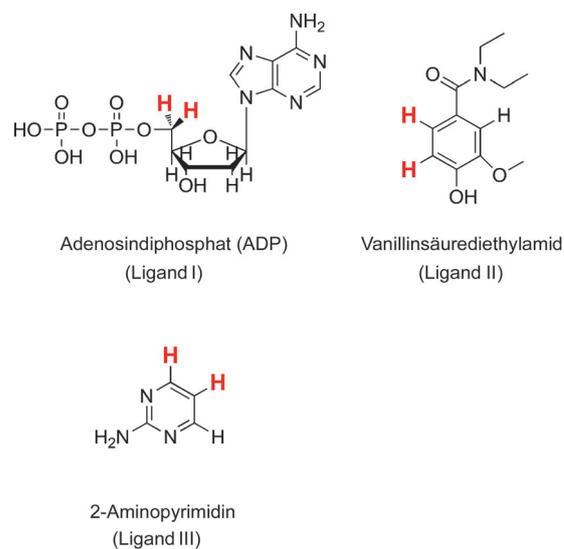


Abbildung 1. Schwach bindende Liganden an die ATP-Bindungstasche des Hitzeschockproteins 90 (Hsp90). Die für die Anregung von LLS geeigneten Paare von Protonen sind mit roten Buchstaben gekennzeichnet.

(Ligand II, Abbildung 1; die beiden Kerne sind in Rot markiert) durch Titration gegen die N-terminale ATPase-Domäne des Hitzeschockproteins 90 (Hsp90) bestimmt. Die Anregung der langlebigen Zustände (Details siehe die Hintergrundinformationen) erfolgte mit der Methode von Sarkar et al.^[10] Drei nichtselektive rf-Impulse $90^\circ - \tau - 180^\circ - \tau - 45^\circ$ wurden zur Anregung der Nullquanten-Kohärenz und des $2I_z S_z$ -Terms verwendet. Ein zusätzliches Radiofrequenzfeld (CW, „continuous wave“) mit einer exakt zwischen den beiden skalar gekoppelten Resonanzen^[8] liegenden Frequenz wird anschließend während einer Wartezeit Δ angelegt, um die beiden Kernspins zur magnetischen Äquivalenz zu zwingen. Solange das Radiofrequenzfeld aktiv ist, tragen die dipolaren Wechselwirkungen zwischen den Spins I und S nicht zur Relaxation des LLS bei, daher ist $R_{LLS} < R_1$. Abschließend überführt die Abfolge von zwei Pulsen $45^\circ - \tau - 180^\circ - \tau$ die LLS zurück in beobachtbare I_y - und S_y -Terme.

In Tabelle 1 sind die molaren Anteile X^{bound} an gebundenem Ligand für verschiedene Ligand/Protein-Verhältnisse und der zugehörige Kontrast C_{LLS} aufgelistet. Selbst für einen großen Ligandüberschuss $[L]_{tot}/[P]_{tot} = 272$ wird ein starker Kontrast von 45 % beobachtet.

Tabelle 1: Molare Anteile gebundener Liganden in Abhängigkeit des Ligand/Protein-Verhältnisses und des experimentell bestimmten Kontrasts C_{LLS} für die Titration von Vanillinsäurediethylamid (Ligand II, $K_D = 790 \mu\text{M}$) in Anwesenheit des Zielproteins.

$[L]_{tot}/[P]_{tot}$	X^{bound} [Mol-%]	Kontrast C_{LLS} [%]
56	0.74	72
125	0.49	63
202	0.36	54
272	0.28	45
366	0.22	41
548	0.16	29
707	0.13	23

Ein Kontrast $C_{LLS} = 23\%$, der einem Verhältnis von $R^{obs}/R^{free} = 1.3$ entspricht, kann noch bei einem Ligandenüberschuss von $[L]_{tot}/[P]_{tot} = 707$ beobachtet werden, also bei Bedingungen, unter denen weniger als 0.2% des vorhandenen Liganden an das Protein gebunden ist. Im Vergleich mit anderen NMR-Methoden, die alle einen geringeren Kontrast aufweisen, ermöglicht dies den Nachweis von Ligandbindungen bei geringerer Proteinkonzentration und/oder geringeren Bindungsaffinitäten. Für die Entwicklung eines Screening-Assays lassen sich so die geeigneten Konzentrationen für Protein und Liganden über einen größeren Bereich anpassen. Um beispielsweise Liganden mit einem $K_D \leq 1$ mM und $[L] = 500$ μ M noch nachweisen zu können, bedarf es einer Proteinkonzentration $[P] = 3$ μ M. Alternativ würden bei $[P] = 20$ mM noch Bindungskonstanten $K_D > 10$ mM nachweisbar. Derart geringe Affinitäten sind ein Kennzeichen von Fragmenten, die an Protein-Protein-Wechselwirkungsflächen binden. Auch dieses bietet einen Vorteil gegenüber dem Fragmentscreening mit herkömmlichen ligandenbasierten Methoden.

Langlebige Zustände (LLS) können am besten in isolierten Zweispinsystemen angeregt werden, obwohl auch größere Spinsysteme LLS bilden können.^[14] Viele kleine Fragmente enthalten geeignete Paare von 1 H- oder 19 F-Kernen. LLS-Screening wird, wie von Dalvit et al.^[15] für die klassischen R_1 - und R_2 -Experimente vorgeschlagen, am besten in einem Konkurrenzexperiment durchgeführt: ein besser bindender Ligand verdrängt einen schwach bindenden Reporterliganden teilweise aus der Bindungsstelle, sodass eine Verringerung der Relaxationsrate R_{LLS} des freigesetzten Reporterliganden beobachtet wird. So wird es möglich, die Affinität eines stärker bindenden Liganden aus der Änderung der R_{LLS} des Reporterliganden zu berechnen. Da man die Konzentration des Reporterliganden gering halten kann, ist es möglich, auch von wenig löslichen konkurrierenden Liganden die Dissoziationskonstante K_D zu bestimmen. Das ist ein entscheidender Vorteil beim Screening von Mischungen und auch um die Bindungskonstanten schwach bindender Fragmente zu bestimmen.

Vor dem Screening einer ganzen Bibliothek von Fragmenten wird üblicherweise eine kleine Auswahl von Verbindungen mit unterschiedlichen NMR-Methoden untersucht, um den späteren NMR-Assay auf das Zielprotein hin zu optimieren. Bereits zu diesem Zeitpunkt kann eine kleine Zahl von Hits identifiziert werden, aus denen dann ein geeigneter Reporterligand für die Konkurrenzexperimente ausgewählt wird. Zur Demonstration der Anwendbarkeit unserer Methode wurden die Relaxationsraten R_{LLS} von drei bekannten Liganden an die ATP-Bindungsstelle der N-terminalen ATPase-Domäne von Hsp90 bestimmt.^[16] Adenosindiphosphat (ADP, Ligand I) ist das Produkt der ATPase-Reaktion. Vanillinsäurediethylamid (Ligand II) und 2-Aminopyrimidin (Ligand III) wurden als schwach bindende Liganden in einem Fragmentscreening identifiziert.^[16]

Für die LLS-Experimente wurden jeweils Paare skalar gekoppelter 1 H-Kerne (in Abbildung 1 rot markiert) ausgewählt. Die beiden diastereotopen Protonen H5 und H5' im Ribose-Teil wurden zur Anregung von LLS in ADP verwendet, während Paare aromatischer Wasserstoffkerne für

Verbindung II verwendet wurden. (Für Ligand III gelang es nicht, einen LLS mit einer vorteilhaften Langlebigkeit $R_{LLS}^{bound}/R_1 < 1$ anzuregen.) Um die Relaxationsraten R_{LLS}^{bound} zu messen, wurden Titrationsreihen mit 0.3 mM $< [L]_{tot} < 6$ mM in Gegenwart von $[P]_{tot} = 10$ μ M Hsp90 aufgenommen. Die Daten wurden anschließend an die folgende Funktion^[17] angepasst, um K_D und R_{LLS}^{bound} nach Gleichung (4) zu berechnen.

$$\langle R_{LLS}^{obs} \rangle = \frac{[PL]}{[L]_{tot}} (R_{LLS}^{bound} - R_{LLS}^{free}) + R_{LLS}^{free} \quad (4)$$

Dabei stellt $[PL]/[L]_{tot}$ eine Funktion der Dissoziationskonstanten K_D dar.^[17] In Tabelle 2 sind zum Vergleich auch die Dissoziationskonstanten K_D aufgelistet, die mit isothermer Kalorimetrie (ITC)^[16] bestimmt wurden.

Tabelle 2: Dissoziationskonstanten K_D die mit LLS und isothermer Kalorimetrie (ITC) bestimmt wurden, sowie die Relaxationsraten R_{LLS} für den gebundenen und freien Liganden I und II in Anwesenheit von Hsp90.

Ligand	K_D [μ M] LLS	K_D [μ M] ITC	R_{LLS}^{bound} [s^{-1}]	R_{LLS}^{free} [ms^{-1}]
I	15 ± 10	10	77 ± 6	731 ± 7
II	708 ± 97	790	94 ± 3	228 ± 11
III ^[a]	–	> 1000	–	–

[a] Für Ligand III konnte kein verwertbares LLS-Signal beobachtet werden.

Die mit ITC und LLS bestimmten Gleichgewichtskonstanten sind in guter Übereinstimmung. Um auch Fragmente mit Affinitäten 100 μ M $< K_D < 10$ mM in Konkurrenzexperimenten nachzuweisen, wurde der Ligand mit der geringsten in der ITC nachweisbaren Affinität (Ligand II) als Reportermolekül verwendet. In Abbildung 2 sind die LLS-Spektren von Ligand II in Abwesenheit (oben) und in Anwesenheit von Hsp90 (mittleres Spektrum) dargestellt. Wird der klini-

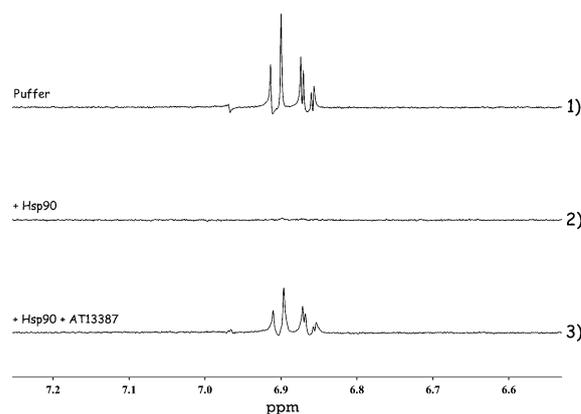


Abbildung 2. LLS-NMR-Spektren von Ligand II in drei unterschiedlichen Lösungen. Die langlebigen Zustände wurden während $\Delta = 2.5$ s aufrechterhalten: 1) 500 μ M Ligand II in Abwesenheit von Hsp90; 2) 500 μ M Ligand II in Anwesenheit von 10 μ M Hsp90; 3) 500 μ M Ligand II in Anwesenheit von 10 μ M Hsp90 und 10 μ M AT13387. In Spektrum (3) wird der Ligand II teilweise aus der ATP-Bindungsstelle von Hsp90 freigesetzt und das LLS-Signal wiederhergestellt.

sche Kandidat AT 13387 (ASTEX Pharmaceuticals) zugegeben (unterstes Spektrum), ist das LLS-Signal des Reporter-moleküls wieder zu erkennen, was beweist, dass beide Verbindungen um dieselbe ATP-Bindungsstelle von Hsp90 konkurrieren.

Der effizienteste Weg, um eine Bibliothek von zum Beispiel 1000 Fragmenten gegen ein Zielprotein zu testen, ist die Verwendung von Mischungen aus 3 bis 10 Verbindungen, um die notwendige Proteinmenge und die Dauer der Messungen zu reduzieren. Die Leistungsfähigkeit, LLS in Konkurrenzexperimenten für ein realitätsnahes Screening zu verwenden, wurde mit Mischungen aus bekannten bindenden und nicht bindenden Verbindungen untersucht. Die Verbindungen V, VI und VII (Abbildung 3) waren bereits zuvor als schwache mit ADP konkurrierende Liganden in einem Screening-Assay bei ASTEX gefunden worden.^[16]

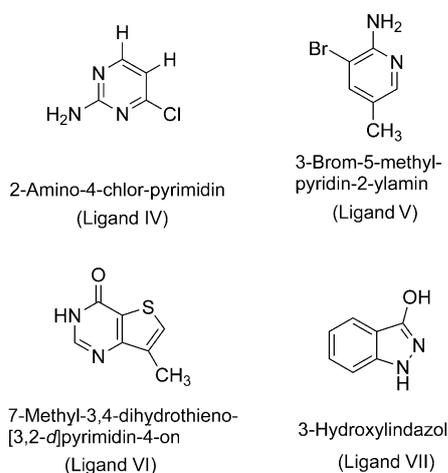


Abbildung 3. Fragmente, die als Liganden von Hsp90 identifiziert wurden. Die Dissoziationskonstanten K_D (Tabelle 3) wurden erstmals mit LLS bestimmt (siehe Text).

In Abwesenheit eines konkurrierenden Liganden führt die Bindung des Reporterliganden an das Protein zu einer schnellen Relaxation der LLS und damit zu einer Abschwächung des Signals (Spektrum 1 in Abbildung 4). Dagegen führt der Zusatz eines konkurrierenden Liganden zu einer teilweisen Freisetzung des Reporterliganden und damit zu einer verlangsamten Relaxation des LLS, was zu einer Signalverstärkung führt (Spektrum 2 in Abbildung 4).

Dieser Effekt beruht auf der relativen Änderung von 13% der gebundenen Menge an Reporterligand, absolut werden nur 0,3% des Reporterliganden an das Protein gebunden. Wird eine Mischung von Fragmenten verwendet, muss nach dem Nachweis eines Effekts der einzelne bindende Ligand identifiziert werden (Dekonvolution). In Abbildung 4 ist beispielhaft die Identifizierung von 3-Hydroxyimidazol als schwach bindender Ligand an Hsp90 gezeigt.

Es sei angemerkt, dass für die Verdrängung eines schwach bindenden Reporterliganden durch einen geringeren affinen Liganden nur eine vergleichbare Konzentration von letzterem erforderlich ist. Dies stellt einen erheblichen Vorteil gegenüber anderen NMR-basierten Konkurrenzexperimenten

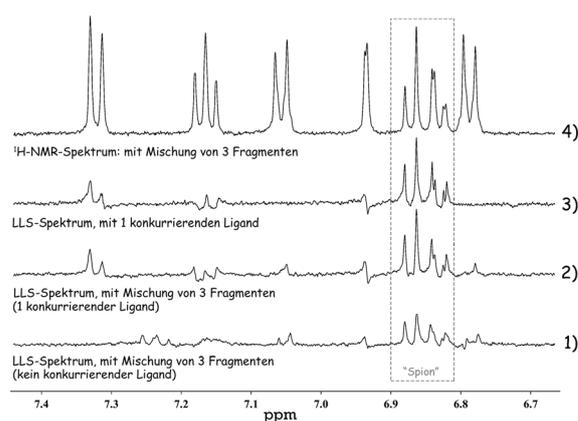


Abbildung 4. Identifizierung eines schwach bindenden Liganden in einer Mischung. 1) Schwaches LLS-Signal des Reporterliganden in Abwesenheit eines konkurrierenden Liganden, nachdem der langlebige Zustand während $\Delta = 2.5$ s aufrechterhalten wurde (siehe die Hintergrundinformationen). Die Mischung 1 enthält $500 \mu\text{M}$ des Reporterliganden [II] mit einem $K_D = 790 \mu\text{M}$, $2.5 \mu\text{M}$ Hsp90-Protein und drei nicht bindenden Verbindungen: $600 \mu\text{M}$ Tyrosin, $600 \mu\text{M}$ 3,4-Difluorbenzylamin und $600 \mu\text{M}$ 4-Trifluormethylbenzamidin. 2) Verstärktes LLS-Signal in Anwesenheit eines schwach bindenden Liganden. Die Mischung 2 enthält $600 \mu\text{M}$ des schwach bindenden Liganden [V] 3-Brom-5-methylpyridin-2-ylamin ($K_D = 2.2 \mu\text{M}$) anstelle des nicht bindenden Liganden 3,4-Difluorbenzylamin. 3) LLS-Signal in Anwesenheit eines bindenden Liganden. Die Mischung 3 enthält $500 \mu\text{M}$ Reporterligand II, $2.5 \mu\text{M}$ Hsp90-Protein und $600 \mu\text{M}$ des schwach bindenden Liganden [V] 3-Brom-5-methylpyridin-2-ylamin. 4) Normales $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum der Mischung 2.

ten dar, die eine deutlich höhere Konzentration für eine nachweisbare Verdrängung erforderlich machen, weil schwach bindende Liganden nur bei einem starken Verhältnis von Ligand zu Protein nachweisbar sind. Im Gegensatz zu anderen NMR-Methoden, bei denen in einem Konkurrenzexperiment von komplexen Mischungen das Signal des Reporter-moleküls durch überlagerte Resonanzen verdeckt sein kann,^[18] ist dieses Risiko in LLS-Experimenten aufgrund der hohen Selektivität bei der Entwicklung des langlebigen Zustands beinahe ausgeschlossen. Wie in Abbildung 4 (Spektrum 2) gezeigt, werden in einem LLS-Spektrum die Signale aller anderen Komponenten im Vergleich mit einem konventionellen $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum (Spektrum 4) deutlich reduziert. Die Selektivität des LLS-Experiments kann noch weiter verbessert werden, wenn man einen Reporterliganden verwendet, bei dem die beiden verwendeten Resonanzen eine möglichst große Differenz der chemischen Verschiebung aufweisen und damit die Wahrscheinlichkeit einer Überlagerungen mit anderen Paaren gekoppelter Signale verringert wird.

Nachdem ein schwach bindender Ligand identifiziert wurde, kann dessen Dissoziationskonstante K_D im Verhältnis zu K_D^{app} des Reporter-moleküls durch Titration bestimmt werden, indem man entweder den Reporterliganden in Anwesenheit einer konstanten Konzentration des schwach bindenden Liganden titriert oder umgekehrt.^[15] Die Titration mit dem Reporterliganden ermöglicht es aber, dieselben experimentellen Bedingungen für verschiedene Fragmente beizubehalten. Die maximale Konzentration des konkurrierenden

Liganden wird nur durch dessen Löslichkeit begrenzt. Die Relaxationsrate des langlebigen Zustands R_{LLS} kann bei jeder Konzentration aus den Signalintensitäten bei mindestens zwei unterschiedlichen Wartezeiten τ_a und τ_b , während derer der langlebige Zustand aufrecht erhalten wird, bestimmt werden. Um zu überprüfen, dass das hier geschilderte Vorgehen zu selbstkonsistenten Resultaten führt, wurde die Dissoziationskonstanten K_D von ADP (Ligand I) bestimmt, indem die Rate R_{LLS} von Vanillinsäurediethylamid (Ligand II) in einem Konzentrationsbereich $500 \mu\text{M} < [L_{II}] < 5 \text{ mM}$ mit $10 \mu\text{M}$ Hsp90 und einer konstanten ADP-Konzentration $[L_I] = 15 \mu\text{M}$ gemessen wurde. Der daraus abgeleitete $K_D(L_I) = 8 \pm 3 \mu\text{M}$ ist in Übereinstimmung mit dem $K_D(L_I) = 15 \pm 10 \mu\text{M}$, der durch direkte Titration von ADP mit Hsp90 bestimmt wurde (Tabelle 2). Mit demselben Protokoll wurde die Affinität von 2-Aminopyrimidin (Ligand III) bestimmt (Abbildung 5) in Anwesenheit von $10 \mu\text{M}$ Hsp90, einer konstanten

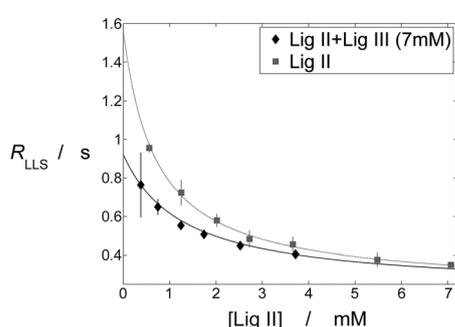


Abbildung 5. Graue Linie: direkte Titration von Vanillinsäurediethylamid (Ligand II) in Anwesenheit von $10 \mu\text{M}$ Hsp90. Schwarze Linie: Konkurrenzexperiment mit einer Titration von Vanillinsäurediethylamid (Ligand II) als Reporterligand in Anwesenheit von $10 \mu\text{M}$ Hsp90 und einer konstanten Konzentration von 7 mM 2-Aminopyrimidin (Ligand III).

Konzentration von $[L_{III}] = 7 \text{ mM}$ und einer Titration im Bereich $500 \mu\text{M} < [L_{II}] < 5 \text{ mM}$. Die gemessene Dissoziationskonstante $K_D(L_{III}) = 11 \pm 2 \text{ mM}$ legt eine sehr schwache Bindung dieses Liganden an das Protein nahe, die aber spezifisch erfolgen muss, um die Beobachtung zu erklären. Dieses Fragment wurde durch Röntgen-Kristallographie als Ligand an Hsp90 gefunden und in einer Veröffentlichung von Murray et al.^[16] beschrieben.

Dasselbe Vorgehen wurde auch verwendet, um die Dissoziationskonstanten K_D der vier in Abbildung 2 gezeigten Fragmente zu bestimmen. K_D -Werte, die aus einer kompletten Titration erhalten wurden, sind in guter Übereinstimmung mit einer Einfachbestimmung bei nur einer einzigen Konzentration (Tabelle 3). Letzteres Vorgehen ist zu bevorzugen, wenn nach dem Screening einer Bibliothek die gefundenen Hits nach ihrer Affinität verglichen werden sollen.

Es sei noch darauf hingewiesen, dass die Wahl des Reporterliganden die experimentellen Bedingungen des LLS-Screenings bestimmt. Mit unserer Wahl eines Reporterliganden (Ligand II, $K_D = 790 \mu\text{M}$) ergibt der konkurrierende Ligand III ($K_D = 12 \text{ mM}$) bei einer Konzentration von 7 mM einen Kontrast von 19% (erster Punkt der schwarzen Kurve in Abbildung 5). Die Konzentration könnte also auf 3.3 mM

Tabelle 3: Dissoziationskonstanten K_D der Fragmente, die in einem LLS-Konkurrenzexperiment untersucht wurden.

Ligand	K_D^{COMP} [mM]	K_D^{COMP} [mM] (berechnet aus dem ersten Datenpunkt)	Konzentration [L] der konkurrierenden Liganden [mM]
I	0.008 ± 0.003	0.010	0.015
II (Reporter)	–	–	–
III	11 ± 2	12	7
IV	0.9 ± 0.2	0.7	0.9
V	1.4 ± 0.9	2.2	1
VI	1.7 ± 0.9	2.2	1.6
VII	7 ± 1	5	2.9

reduziert werden, um mit einem dann immer noch ausreichenden Kontrast von 10% die Bindung eines Liganden in einem Screening-Experiment nachzuweisen, wie das in Abbildung 4 für den Liganden V gezeigt wird (Unterschiede zwischen Spektren 1 und 2). Wenn die erwarteten Affinitäten der Fragmente für ein Ziel in der Größenordnung von 5 mM oder mehr liegen, wäre es günstiger einen Reporterliganden mit einer geringen Affinität zu verwenden, damit man für 10% Kontrast eine geringere Konzentration der Liganden verwenden kann [siehe Gl. (4)]. Als Konsequenz lässt sich so effizient nach schwach bindenden Liganden suchen, selbst wenn diese nur eine geringe Löslichkeit aufweisen.

Der Nachweis langlebiger Zustände in der NMR-Spektroskopie erfordert Liganden, die ein (bevorzugt isoliertes) System aus zwei gekoppelten Kernspins aufweisen, eine Voraussetzung, die sich nicht generell von allen Bestandteilen einer Mischung für das Fragmentscreening erfüllen lässt. Wir haben daher die LLS-Methode als Konkurrenzexperiment durchgeführt, bei dem sehr effektiv die Freisetzung eines geeigneten Reporterliganden durch die Änderung seines LLS nachgewiesen werden kann. Wir konnten zeigen, dass in LLS-gefilterten Konkurrenzexperimenten sowohl ein Screening als auch die Bestimmung von Bindungskonstanten von sehr schwach bindenden Fragmenten mit einem K_D von bis zu 12 mM möglich ist und dies bei einem bis zu 200-fachen Ligandenüberschuss. Diesen Vorteil kann man nutzen, um die Proteinkonzentration im Assay zu senken und die Empfindlichkeit des Nachweises im Vergleich mit etablierten Screeningmethoden wie STD, LOGSY, $T_{1\rho}$ usw. zu erweitern. Ein hinreichender Kontrast kann noch mit einem bis zu 700-fachen Überschuss des Liganden im Verhältnis zur Proteinkonzentration erreicht werden, was den Nachweis von Fragmenten mit einem $K_D = 790 \mu\text{M}$ ermöglicht. Die Möglichkeit mit LLS auch sehr geringe Konzentrationen an Protein-Ligand-Komplexen nachzuweisen, lässt sich aber auch dazu nutzen schwache Bindungen ($K_D > 10 \text{ mM}$) zu bestimmen, was eine Voraussetzung für das Fragmentscreening schwieriger Zielproteine ist. Wir konnten außerdem die Dissoziationskonstante des Reporterliganden und verschiedener konkurrierender Liganden quantitativ bestimmen. Die Möglichkeit mittels LLS präzise Bindungskonstanten im mM-Bereich zu bestimmen, in dem ITC und biologische Assays üblicherweise versagen, und dies sogar für wenig lösliche Verbindungen, ermöglicht es, bereits früh Struktur-Wirkungs-Be-

ziehungen aufzustellen und damit Anhaltspunkte für eine chemische Optimierung eines Hits zu liefern.

Eingegangen am 2. Mai 2014

Online veröffentlicht am 3. September 2014

Stichwörter: Dissoziationskonstanten · Fragment-Screening · Ligandbindung · NMR-Spektroskopie · Wirkstoff-Forschung

-
- [1] a) P. J. Hajduk, J. Greer, *Nat. Rev. Drug Discovery* **2007**, *6*, 211–219; b) W. Jahnke, D. A. Erlansson, *Fragment-based Approaches in Drug Discovery*, Wiley, Hoboken, **2006**; c) H. Jhoti, A. R. Leach, *Structure-based Drug Discovery*, Springer, Heidelberg, **2007**; d) E. Zartler, M. Shapiro, *Fragment-Based Drug Discovery: A Practical Approach*, Wiley, Hoboken, **2008**.
- [2] a) M. Congreve, G. Chessari, D. Tisi, A. J. Woodhead, *J. Med. Chem.* **2008**, *51*, 3661–3680; b) M. Baker, *Nat. Rev. Drug Discovery* **2013**, *12*, 5–10.
- [3] C. Dalvit, *Drug Discovery Today* **2009**, *14*, 1051–1057.
- [4] C. Dalvit, P. Pevarello, M. Tato, M. Veronesi, A. Vulpetti, M. Sundstrom, *J. Biomol. NMR* **2000**, *18*, 65–68.
- [5] M. Mayer, B. Meyer, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, *38*, 1784–1788; *Angew. Chem.* **1999**, *111*, 1902–1906.
- [6] P. J. Hajduk, E. T. Olejniczak, S. W. Fesik, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 12257–12261.
- [7] B. Meyer, T. Peters, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42*, 864–890; *Angew. Chem.* **2003**, *115*, 890–918.
- [8] N. Salvi, R. Buratto, A. Bornet, S. Ulzega, I. R. Rebollo, A. Angelini, C. Heinis, G. Bodenhausen, *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 11076–11079.
- [9] G. Pileio, *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* **2010**, *56*, 217–231.
- [10] R. Sarkar, P. R. Vasos, G. Bodenhausen, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 328–334.
- [11] P. Ahuja, R. Sarkar, P. R. Vasos, G. Bodenhausen, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 7498–7499.
- [12] R. Sarkar, P. Ahuja, P. R. Vasos, G. Bodenhausen, *ChemPhys-Chem* **2008**, *9*, 2414–2419.
- [13] P. R. Vasos, A. Comment, R. Sarkar, P. Ahuja, S. Jannin, J. P. Ansermet, J. A. Konter, P. Hautle, B. van den Brandt, G. Bodenhausen, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2009**, *106*, 18469–18473.
- [14] B. Meier, J. N. Dumez, G. Stevanato, J. T. Hill-Cousins, S. S. Roy, P. Hakansson, S. Mamone, R. C. D. Brown, G. Pileio, M. H. Levitt, *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 18746–18749.
- [15] C. Dalvit, M. Flocco, S. Knapp, M. Mostardini, R. Perego, B. J. Stockman, M. Veronesi, M. Varasi, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 7702–7709.
- [16] C. W. Murray, M. G. Carr, O. Callaghan, G. Chessari, M. Congreve, S. Cowan, J. E. Coyle, R. Downham, E. Figueroa, M. Frederickson, B. Graham, R. McMenamin, M. A. O'Brien, S. Patel, T. R. Phillips, G. Williams, A. J. Woodhead, A. J. A. Woolford, *J. Med. Chem.* **2010**, *53*, 5942–5955.
- [17] G. C. K. Roberts, *NMR of Macromolecules: A Practical Approach*, IRL Press at Oxford University Press, New York, **1993**.
- [18] C. Dalvit, D. T. A. Hadden, R. W. Sarver, A. M. Ho, B. J. Stockman, *Comb. Chem. High Throughput Screening* **2003**, *6*, 445–453.
-