



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 698 25 066 T2** 2005.08.25

(12) **Übersetzung der europäischen Patentschrift**

(97) **EP 1 017 823 B1**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **698 25 066.4**

(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/US98/02522**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **98 906 268.2**

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 98/035048**

(86) PCT-Anmeldetag: **09.02.1998**

(87) Veröffentlichungstag
der PCT-Anmeldung: **13.08.1998**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **12.07.2000**

(97) Veröffentlichungstag
der Patenterteilung beim EPA: **14.07.2004**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **25.08.2005**

(51) Int Cl.⁷: **C12N 15/52**
C12N 9/12, G01N 33/50, A61K 38/45

(30) Unionspriorität:

797522	07.02.1997	US
46727 P	16.05.1997	US

(84) Benannte Vertragsstaaten:

**AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LI,
LU, MC, NL, PT, SE**

(73) Patentinhaber:

Princeton University, Princeton, N.J., US

(72) Erfinder:

SHOKAT, M., Kevan, Princeton, US

(74) Vertreter:

**Müller-Boré & Partner, Patentanwälte, European
Patent Attorneys, 81671 München**

(54) Bezeichnung: **Gentechnisch hergestellte Proteinkinasen, welche modifizierte Nukleotidtriphosphatsubstrate verwenden können**

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelegt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patent- und Markenamt inhaltlich nicht geprüft.

Beschreibung**I. GEBIET DER ERFINDUNG**

[0001] Die vorliegende Erfindung liegt auf dem Gebiet der Biotechnologie. Insbesondere liegt die Erfindung auf einem Gebiet, das häufig als Enzymtechnik bezeichnet wird, wobei durch genetische Änderungen oder andere Mittel die Aminosäuresequenzen von interessierenden Enzymen verändert werden, um deren katalytische Eigenschaften zu verändern oder zu verbessern. Die Ausführungsformen der Erfindung, die nachstehend beschrieben sind, betreffen Verfahren auf den Gebieten der Gentechnik und Enzymologie und insbesondere das Design von Proteinkinasen und anderen Multi-Substrat-Enzymen, einschließlich der Hemmfähigkeit derartiger Enzyme, und damit zusammenhängende Materialien, Techniken und Verwendungen.

II. HINTERGRUND DER ERFINDUNG

[0002] Es ist völlig logisch, dass ein Austausch von Informationen von Zelle zu Zelle in einem mehrzelligen Organismus schnell sein muss, und dass er in der Lage sein muss, den Zellen eine gegenseitige Reaktion auf verschiedenen und komplexen Wegen zu gestatten. Die verwendeten intrazellulären Signale sind typischerweise Moleküle, die „Liganden“ genannt werden, und ein gegebener Ligand kann an einen speziellen Rezeptortyp auf der Oberfläche derjenigen Zellen binden, die dieses Signal erhalten sollen. Jedoch ist diese einfache Ligandbindung alleine nicht ausreichend, um für die komplexen Reaktionen zu sorgen, die die Empfängerzellen möglicherweise ausführen müssen. Daher verstärken die Zellen dieses Signal und erhöhen dessen Komplexität über komplexe Mechanismen, häufig in Form von Kaskaden, die zu der schnellen Modulation von katalytischen Aktivitäten im Inneren der Zelle führen, was wiederum komplexe und manchmal dramatische intrazelluläre Reaktionen erzeugen kann. Dieser gesamte Prozess, von der anfänglichen Ligandenbindung bis zur Vervollständigung der intrazellulären Reaktion wird „Signaltransduktion“ genannt.

[0003] Die Signaltransduktion wird häufig durch die Aktivierung intrazellulärer Enzyme erreicht, die auf andere Enzyme einwirken und deren katalytische Aktivität ändern können. Dies kann die Aktivität bestimmter Stoffwechselwege erhöhen oder vermindern, oder es kann sogar zu großen intrazellulären Veränderungen, beispielsweise zu der Initiierung spezifischer Muster der Genexpression führen. Die Fähigkeit eines Enzyms zur Änderung der Aktivität anderer Enzyme weist im Allgemeinen darauf hin, dass das Enzym mit der zellulären Signaltransduktion verbunden ist.

[0004] Die am weitesten verbreitete kovalente Modifizierung, die in dem Signaltransduktionsprozeß verwendet wird, ist die Phosphorylierung, die zur Änderung der Aktivität derjenigen Enzyme führt, die phosphoryliert werden. Diese Phosphorylierung wird durch Enzyme katalysiert, die als Proteinkinasen bekannt sind und die häufig einfach als „Kinasen“ bezeichnet werden.

[0005] Mehrere Schlüsselmerkmale der Kinasen machen sie ideal geeignet als Signalproteine. Eines davon ist, dass sie häufig überlappende Zielsubstratspezifitäten aufweisen, die zwischen den verschiedenen Signalwegen einen „Cross-talk“ gestatten, wodurch die Integration verschiedener Signale (1) ermöglicht wird. Es wird angenommen, dass dies ein Ergebnis davon ist, dass jede Kinase mehrere Substrate phosphorylieren muss, bevor eine Reaktion hervorgerufen wird, die wiederum für viele Arten verschiedener Signalresultate sorgt. Zum Beispiel kann eine gegebene Kinase in einem Fall ein Wachstumshemmsignal übertragen und in einem anderen Fall ein wachstumsförderndes Signal übertragen, in Abhängigkeit von der Struktur des extrazellulären Liganden, der an die Zelloberfläche (2) gebunden hat.

[0006] Ein zweites Schlüsselmerkmal ist die Organisation der Kinasen in mehrere modulare funktionale Regionen oder „Domänen“ (3). Eine Domäne, die als „SH3“ bekannt ist, ist eine Prolin-reiche Region mit einer Länge von 55–70 Aminosäuren, und eine andere, die als „SH2“ bekannt ist, ist eine Phosphotyrosinbindungsregion mit einer Länge von ungefähr 100 Aminosäuren. Es wird angenommen, dass diese zwei Domänen mit dem Erkennen und Binden an die Proteinsubstrate zu tun haben. Die dritte Domäne, „SH1“, umfasst ungefähr 270 Aminosäuren und ist die Domäne, die für die Katalyse verantwortlich ist. Sie enthält ebenfalls die Bindungsstelle für das Nukleosidtriphosphat, das als Energiequelle und Phosphatdonor (3) verwendet wird. Andere Domänen, einschließlich den Myristylierungs- und Palmitoylierungsstellen, sind zusammen mit SH2 und SH3 für das Zusammenfügen von Multiproteinkomplexen verantwortlich, die die katalytische Domäne an die richtigen Ziele (3, 22, 23) leiten. Die molekulare Erkennung durch die verschiedenen Domänen wurde unter Verwendung von Röntgenbeugung und unter Verwendung von NMR-Verfahren (24–28) untersucht.

[0007] Es scheint, dass diese Domänen durch die Evolution gemischt und passend gemacht wurden, um die

große Proteinkinase-„Familie“ zu erzeugen. Es wird angenommen, dass soviel wie 1000 Kinasen von dem Säugetiergenom (4) kodiert werden und über 250 Kinasen sind schon identifiziert worden. Die große Zahl an Kinasen und die große Zahl an durch Phosphorylierung modulierten Enzymen, von denen bekannt ist, dass sie innerhalb der Zellen vorkommen, gestatten eine schnelle Signalamplifikation und mehrfache Regulationspunkte.

[0008] Ein drittes Schlüsselmerkmal der Kinasen ist ihre Geschwindigkeit. Die Kinetik der Phosphorylierung und Dephosphorylierung ist in vielen Zellen äußerst schnell (auf einer Zeitskala von Millisekunden), was für schnelle Reaktionen und kurze Erholungszeiten sorgt, was wiederum eine wiederholte Signalübertragung möglich macht (5).

[0009] Diese Merkmale der Kinasen führten offensichtlich dazu, dass sie in einem umfangreichen Gebiet von verschiedenen intrazellulären Signaltransduktionsmechanismen verwendet werden. Zum Beispiel verwenden Wachstumsfaktoren, Transkriptionsfaktoren, Hormone, Regulationsproteine für den Zellzyklus und viele andere Klassen von Zellregulatoren Tyrosinkinasen in ihren Signalkaskaden (12, 13). Tyrosinkinasen binden katalytisch ein Phosphat an einen oder mehrere Tyrosinreste auf ihren Proteinsubstraten. Die Tyrosinkinasen umfassen Proteine mit vielen verschiedenen Funktionen, einschließlich dem Zellzykluskontrollelement c-abl (14–16), dem epidermalen Wachstumsfaktorrezeptor, der eine zytoplasmatische Tyrosinkinasedomäne, c-src, (12) enthält, eine nicht-Rezeptor-Tyrosinkinase, die mit vielen Immunzellfunktionen (13) verbunden ist, und Tyk2, eine zytoplasmatische Tyrosinkinase, die mit der Phosphorylierung des p91-Proteins zu tun hat, das bei Rezeptorstimulation zu dem Kern verlagert wird und als Transkriptionsfaktor (17) wirkt. Die Serin/Threoninkinasen machen einen Großteil, wenn nicht die gesamte restliche Kinasefamilie aus; diese phosphorylieren katalytisch Serin- und Threoninreste in ihren Proteinsubstraten und sie haben gleichermaßen unterschiedliche Rollen. Sie sind zu der katalytischen Domäne mit 270 Aminosäuren der Tyrosinkinasen homolog. Obwohl die nachfolgende Diskussion sich insbesondere auf die Tyrosinkinasen richtet, ist daher diese Diskussion allgemein ebenfalls auf Serin/Threoninkinasen anwendbar.

[0010] Leider sind es genau die Eigenschaften, die die Kinasen so brauchbar für die Signaltransduktion machen und durch die sie sich so entwickelten, dass sie für beinahe jede Zellfunktion zentral wurden, die es ebenfalls äußerst schwierig, wenn nicht unmöglich machen, sie zu untersuchen und zu verstehen. Ihre überlappenden Proteinspezifitäten, ihre strukturellen und katalytischen Ähnlichkeiten, ihre große Zahl und ihre große Geschwindigkeit machen die spezifische Identifizierung ihrer in vivo Proteinsubstrate unter Verwendung genetischer und biochemischer Techniken äußerst schwierig, wenn nicht unmöglich. Dies ist derzeit das Haupthindernis, um die Signalkaskaden, die mit der Tyrosinkinase-vermittelten Signaltransduktion zu tun haben (4, 6-8), zu entschlüsseln.

[0011] Bemühungen, die Verwicklung der spezifischen Tyrosinkinasen in der Signaltransduktion gründlich zu untersuchen, wurden durch deren offensichtlichen Mangel an Proteinsubstratspezifität in vitro und in vivo zu nichte gemacht (4,8). Die katalytischen Domänen von Tyrosinkinasen besitzen wenig oder keine inhärente Proteinsubstratspezifität, wie durch Domänentauschexperimente gezeigt wurde (18-23). Die katalytische Domäne von einer Tyrosinkinase kann in eine davon verschiedene Tyrosinkinase mit einer geringen Änderung in der Proteinsubstratspezifität der letzteren substituiert werden (22).

[0012] Die schlechte in vitro Spezifität von Kinasen macht es ebenfalls schwierig, wenn nicht unmöglich, zu extrapolieren, welches die in vivo Funktion gegebener Kinasen sein könnte. Eine interessierende isolierte Tyrosinkinase wird häufig viele Testproteinsubstrate mit gleicher Leistungsfähigkeit phosphorylieren (29). Diese offensichtliche schlechte Substratspezifität wird ebenfalls in vivo festgestellt; zum Beispiel ergeben viele genetische Methoden, wie zum Beispiel Gen-Knock-Out-Experimente keinen interpretierbaren Phänotyp aufgrund der Kompensation durch andere zellulären Tyrosinkinasen (30, 31).

[0013] Eine weitere Komplikation besteht darin, dass bei vielen Tyrosinkinasen die Phosphorylierung stromabwärts und stromaufwärts von Proteinen, die selbst Tyrosinkinasen sind, vorgeschlagen wurde; obwohl es scheint, dass dies komplexe positive Rückkopplungsschleifen ermöglicht, macht das ebenfalls die gründliche Untersuchung der Kaskade sogar noch schwieriger (1).

[0014] Ein wichtiger Weg zur Entschlüsselung der Rolle und zum Verständnis der Funktion von Enzymen, sowohl in vitro als auch in vivo, ist die Verwendung spezifischer Enzyminhibitoren. Können eine oder mehrere Verbindungen gefunden werden, die das Enzym hemmen, kann der Inhibitor zur Modulation der Aktivität des Enzyms verwendet werden und es können die Auswirkungen dieser Verringerung beobachtet werden. Derartige Methoden trugen zur Entschlüsselung vieler Wege des Zwischenstoffwechsels bei und waren ebenfalls für

das Lernen bezüglich der Enzymkinetik und zur Bestimmung katalytischer Mechanismen von Bedeutung.

[0015] Zusätzlich dazu befinden sich derartige Inhibitoren unter den wichtigsten bekannten pharmazeutischen Verbindungen. Zum Beispiel ist Aspirin (Acetylsalicylsäure) ein derartiger Inhibitor. Es hemmt ein Enzym, das den ersten Schritt in der Prostaglandinsynthese katalysiert, wodurch die Bildung von Prostaglandinen, die mit der Schmerzerzeugung (72) verbunden sind, gehemmt wird. Die übliche Arzneimittellentdeckung kann als das Design und die Modifikation von Verbindungen charakterisiert werden, die so entworfen sind, dass sie spezifisch an ein krankheitsverursachendes Protein binden und dieses inaktivieren; der relative Erfolg einer derartigen Bemühung hängt von der Selektivität des Arzneimittels für das Zielprotein und davon ab, dass es nicht mit der Krankheit verbundene Enzyme mit ähnlichen Enzymaktivitäten nicht hemmt.

[0016] Derartige Methoden würden als viel versprechende Wege zur Entwicklung von Behandlungen für Krebs erscheinen, da viele menschliche Krebsgeschwüre durch Fehlregulation eines normalen Proteins verursacht werden (zum Beispiel, wenn ein Protoonkogen durch Gentranslokation in ein Onkogen umgewandelt wird). Und da Kinasen Schlüsselregulatoren sind, stellte sich heraus, dass sie sehr übliche Protoonkogene sind und somit ideale Ziele für das Arzneimitteldesign sind.

[0017] Das Verfahren zum Design selektiver Inhibitoren ist in den Fällen relativ einfach, in denen in dem Zielorganismus ähnliche Enzyme vorhanden sind, zum Beispiel in Fällen, in denen auf Inhibitoren eines für Bakterien einmaligen Proteins gezielt werden kann. Jedoch haben leider die Ähnlichkeiten zwischen den Kinasen und ihre große Zahl beinahe vollständig die Entdeckung und das Design spezifischer Inhibitoren zunichte gemacht und sie haben die meisten Hoffnungen auf die Entwicklung spezifischer pharmazeutischer Behandlungen, die auf das Protoonkogenniveau abzielten, blockiert. Es wird erwartet, dass die große Mehrheit von Inhibitor-kandidaten multiple Kinasen hemmen, selbst wenn sie ursprünglich dahingehend identifiziert werden konnten, dass sie eine spezielle gereinigte Kinase hemmen.

[0018] Damit soll jedoch nicht gesagt werden, dass Inhibitoren mit zumindest einem gewissen Grad an Kinasepezifität nicht gefunden werden können. Es wurden mehrere natürliche Produkte identifiziert, die für spezielle Kinasefamilien relativ spezifisch sind, jedoch gelang es nicht, allgemeine Regeln bezüglich der auf diesen Produkten basierenden Kinasehemmung, abzuleiten. Wie die folgenden Beispiele zeigen, ist weiterhin die Spezifität in den meisten Fällen ziemlich eingeschränkt. Zum Beispiel wurde über die Verbindung Damnacanthal berichtet, dass sie ein „hoch wirksamer, selektiver Inhibitor“ der Kinase p56lck (73) sei; wie in **Fig. 2A** gezeigt ist, weist diese Verbindung für diese Kinase eine Hemmkonstante (IC_{50}) auf, die beinahe siebenmal geringer als für die Kinase src ist (der IC_{50} -Wert ist die Inhibitorkonzentration, die zugegeben werden muss, um die katalytische Aktivität um 50 % zu verringern). Die Verbindung PPI (**Fig. 2B**) weist eine Bindungsaffinität für die Kinase lck auf, die sehr stark ist ($IC_{50} = 0,005 \mu M$); leider jedoch ist die Hemmung anderer Kinasen der src-Familie sehr ähnlich. Sie hemmt die Kinase fyn mit einem beinahe identischen IC_{50} -Wert, $0,006 \mu M$ und weist nur ungefähr einen viermal größeren IC_{50} -Wert für die Kinase hck ($IC_{50} = 0,020 \mu M$) auf. Es wurde berichtet, dass die Verbindung CGP 57148 (**Fig. 2C**) für die Kinasen abl ($IC_{50} = 0,025 \mu M$) und PDGFR ($IC_{50} = 0,030 \mu M$) „halbselektiv“ ist (74). In Anbetracht der gewaltigen Zahl von Kinasen und ihrer relativen Bedeutung für die Zelle und ebenfalls in Anbetracht dessen, dass die vorstehend beschriebenen Inhibitoren nur in den letzten zwei Jahren beschrieben wurden, scheint es nichtsdestotrotz, dass der Erfolg für die Entdeckung und Design selektiver Kinaseinhibitoren bemerkenswert begrenzt ist.

[0019] Diese vorstehend beschriebenen Schwierigkeiten haben Auswirkungen, die weit über die reine Frustration von Wissenschaftlern hinausreichen; sie vereiteln Bemühungen zum Entschlüsseln der Kinasekaskaden und der Funktion einzelner Kinasen in diesen Kaskaden und anderer Zellmechanismen. Ein derartiges Verständnis der Kinaseaktivität und der Funktion können wesentlich sein, bevor bestimmte menschliche Krankheiten wirksam behandelt, verhindert oder geheilt werden können. Zum Beispiel ist seit über 30 Jahren bekannt, dass das Onkogen bcr-abl eine Proteinkinase ist, die für chronische im Knochenmark entstandene Leukämie verantwortlich ist; jedoch müssen die physiologischen Substrate, auf die sie unter Verursachung von Tumorbildung wirkt und die wichtige Ziele für das Arzneimitteldesign sein können, noch erst endgültig identifiziert werden (11). Trotz dieser Unzulänglichkeiten ist es positiv, dass gemäß Berichten der vorstehend beschriebene Inhibitor CGP 57148 nun zur Verwendung bei der Behandlung einer im Knochenmark entstandenen Leukämie klinisch getestet wird, obwohl die Substrate, deren Phosphorylierung er in vivo blockieren könnte, nicht bekannt sind.

[0020] Die medizinische Bedeutung dieser Schwierigkeiten wird weiterhin durch das Rous-Sarkom-Virus (RSV) erläutert, das ein wichtiges Modellsystem zur Untersuchung der Rolle von Kinasen bei der Tumorbildung geworden ist. Die RSV-Transformation von Fibroblasten wird durch ein einzelnes virales Genprodukt, der Pro-

tein Tyrosinkinase v-src, kontrolliert (32). Der schnelle Zeitverlauf und die dramatischen morphologischen Änderungen während der RSV-Fibroblastentransformation machten RSV zu einem Musterbeispiel für Untersuchungen der Onkogenaktivität in allen Zellen. Der Ursprung (33), die Regulation (3, 8, 34, 35) und die Struktur (25, 27, 36) von v-Src wurden umfassend untersucht und werden gut verstanden (8, 37, 38). Jedoch bleiben zentrale Fragen über diese intensiv untersuchte Kinase unbeantwortet: welches sind ihre direkten Zellsubstrate? Hemmt die Hemmung ihrer katalytischen Aktivität wirksam die Transformation oder kehrt sie sie sogar um? Würde eine derartige Hemmung eine wirksame Therapie gegen die RSV-Transformation sein oder würde sie diese vorbeugen? Wie vorstehend diskutiert ist, sind leider Antworten auf diese Fragen nicht in Kürze zu erwarten, größtenteils, weil die Zahl von Zellkinasen enorm ist (es wird geschätzt, dass 2 % des Säugetierge-noms Proteinkinasen kodiert (4)) und weil Tyrosinkinasen überlappende Substratspezifitäten zeigen (8, 39) und katalytische Domänen gemeinsam haben, wodurch das Design spezifischer Inhibitoren enorm erschwert wird.

[0021] Die Expression von v-Src in Fibroblasten führt zur Tyrosinphosphorylierung von über 50 Zellproteinen (37). Dieselben Substrate werden ebenfalls durch andere Kinasen in nicht transformierten Fibroblasten phosphoryliert (40). Selbst die hochentwickeltsten biochemischen und genetischen Techniken, einschließlich von Antiphosphotyrosinproteinblots transformierter Fibroblasten, Transfektion von Fibroblasten mit v-Src-Mutanten mit unzulänglicher Transformation, temperaturempfindlichen v-Src-Mutanten, Gen-Knock-out-Untersuchungen von zellulärem Src, Wirtsbereich-abhängigen Src-Mutanten, Anti-v-Src-Immunfällung und der Verwendung von Kinase-spezifischen Inhibitoren, führten zu keiner eindeutigen Identifikation von direkten Substraten von v-Src (siehe Literaturverweis (38) für eine umfassende Übersicht). Diese Situation ist jedoch nicht einmalig; tatsächlich bleiben für die Mehrheit der Zellkinasen die direkten Substrate nicht identifiziert (8). Wie vorstehend erörtert wurde gibt es weiterhin ebenfalls bemerkenswert wenige Verbindungen, von denen bekannt ist, dass sie einzelne Kinasen, oder selbst Gruppen verwandter Kinasen selektiv hemmen.

[0022] Obwohl die vorstehenden Schwierigkeiten entmutigend sind, machen neue Verfahren für ein rationales Arzneimitteldesign und die kombinatorische organische Synthese das Design oder die Entdeckung Kinase-spezifischer Inhibitoren machbar, unter der Voraussetzung ausreichender Ressourcen. Weil jedoch die Kinasenetzwerke hoch entartet und auf unbekannten Wegen miteinander verbunden sind, gibt es eine beachtliche Unbestimmtheit hinsichtlich vieler Krankheiten, auf welche Kinasen für deren Inhibierung gezielt werden sollte. Überdies ist es keineswegs klar, dass ein spezifischer Inhibitor für eine gegebene Kinase eine Wirkung auf die Krankheit entweder in vitro oder in vivo aufweisen wird. Da viele Kinasen sehr veränderlich sein können, gibt es eine signifikante Wahrscheinlichkeit dafür, dass die Hemmung einer Kinase einfach eine andere Kinase zwingt, „ihren Platz einzunehmen“. Es besteht daher ein Bedarf an einem einfachen und direkten Weg zur Bestimmung der biochemischen und zellulären Wirkungen bei der Hemmung einer gegebenen Kinase, bevor übermenschliche Anstrengungen unternommen werden, spezifische Inhibitoren zu entwerfen oder zu entdecken.

[0023] Aus dem Vorstehenden wird klar, dass es schon einen lange bemerkten, aber nicht zufrieden gestellten Bedarf an Wegen gibt, um zu identifizieren, auf welche Zellproteine einzelne Proteinkinasen wirken. Ein derartiges Verfahren würde Idealerweise die quantitative Messung der relativen Aktivität einer gegebenen Kinase auf ihre Proteinsubstrate gestatten, die zum Beispiel zum Nachweis verwendet werden könnten, wie oder ob tatsächliche oder mögliche Arzneimittelverbindungen die Kinaseaktivität modulieren könnten. Zusätzlich gab es ebenfalls einen Bedarf an spezifischen Inhibitoren für einzelne Kinasen oder Kinasefamilien, die zur Identifikation von Proteinsubstraten (indem gesucht wird, welche Proteine in Gegenwart des Inhibitors nicht phosphoryliert oder schwächer phosphoryliert werden), zur Untersuchung der biochemischen und phänotypischen Wirkungen eines schnellen Herunterregels der Aktivität einer gegebenen Kinase, zur Verwendung als Arzneimittel zur Behandlung von Kinase-vermittelten Krankheiten und zur Bestätigung verwendet werden könnten, dass langwierige Anstrengungen bezüglich des Designs oder der Entwicklung von herkömmlicheren Inhibitorarzneimitteln lohnenswert wären.

[0024] Wie nachstehend sehr ausführlich beschrieben ist, stellt die vorliegende Erfindung zum ersten Mal ein Verfahren für die hochspezifische Hemmung einzelner Kinasen bereit, die gentechnisch so hergestellt wurden, dass sie leichter als die Wildtypform dieser Kinase oder als andere nicht gentechnisch hergestellte Kinasen an den Inhibitor binden. Die Erfindung stellt ebenfalls die gentechnisch hergestellten Kinasen und die Inhibitoren zur Verfügung, an die sie angepasst sind.

[0025] Wie aus der vorliegenden Beschreibung hervorgehen wird ist dieses Verfahren überdies sogar noch breiter anwendbar, da es ähnliche Vorteile für die Untersuchung anderer Enzyme zur Verfügung stellen würde, die wie Kinasen einen Teil von mindestens einem Substrat an mindestens ein anderes Substrat binden.

[0026] Die vorliegende Erfindung betrifft die gentechnische Herstellung von Kinasen und anderen Multi-Substrat-Enzymen derart, dass Inhibitoren an sie binden können, die nicht so leicht an ihre Wildtypformen binden. Modifizierte Substrate und mutierte Enzyme, die an diese binden können, wurden zur Untersuchung eines Verlängerungsfaktors (41) und eines Rezeptors für Cyclophilin A (42) verwendet. Jedoch war vor der vorliegenden Erfindung nicht bekannt, wie oder selbst wenn Multi-Substrat-Enzyme, die das gesamte Donorsubstrat oder einen Teil davon an ein Empfängersubstrat kovalent binden, gentechnisch so hergestellt werden könnten, dass sie an einen Inhibitor binden, aber dennoch zumindest etwas katalytische Aktivität und zumindest etwas Spezifität für das Empfängersubstrat in Abwesenheit des Inhibitors behalten. Die vorliegende Erfindung besteht darin, dass dies wie nachstehend erklärt ist gemacht werden kann, und die vorliegende Erfindung öffnet zum ersten Mal die Tür zur selektiven Hemmung einzelner Kinasen, die nicht nur wichtige Werkzeuge zum Verständnis der Kinasekaskaden und anderer komplexer katalytischer Zellmechanismen sind, sondern ebenfalls Wege zum therapeutischen Einschreiten bei Krankheiten, bei denen diese Mechanismen eine Rolle spielen, bereitstellen.

III. ZUSAMMENFASSUNG DER ERFINDUNG

[0027] Die vorliegende Erfindung stellt eine Lösung für die vorstehend beschriebenen Probleme zur Verfügung, indem sie Materialien und Verfahren bereitstellt, durch die eine einzelne Proteinkinase spezifisch gehemmt werden kann, ohne gleichzeitig andere Proteinkinasen zu hemmen.

[0028] In einem ersten Aspekt betrifft die vorliegende Erfindung die gentechnische Herstellung von Kinasen und anderen Multi-Substrat-Enzymen derart, dass sie modifizierte Substrate verwenden können, die nicht so leicht durch ihre Wildtypformen verwendet werden. Die Erfindung stellt weiterhin derartige chemisch modifizierte Nukleotidtriphosphat-Substrate, Verfahren zu deren Herstellung und Verfahren zu deren Verwendung zur Verfügung. Die Verfahren der vorliegenden Erfindung umfassen Verfahren zur Verwendung der modifizierten Substrate zusammen mit den gentechnisch hergestellten Kinasen zur Identifizierung, auf welche Proteinsubstrate die Kinasen wirken, zur Messung des Ausmaßes einer derartigen Wirkung und zur Bestimmung, ob Testverbindungen eine derartige Wirkung modulieren können.

[0029] In einem weiteren Aspekt stellt die Erfindung gentechnisch hergestellte Proteinkinasen zur Verfügung, die an Inhibitoren binden können, an die die Wildtypformen dieser Enzyme nicht so leicht binden können. Verfahren zur Herstellung und Verwendung aller derartig gentechnisch hergestellten Kinasen werden ebenfalls zur Verfügung gestellt. Die Erfindung stellt weiterhin Inhibitoren, Verfahren zu deren Herstellung und Verfahren zu deren Verwendung zur Verfügung. Die Verfahren der vorliegenden Erfindung umfassen Verfahren zur Verwendung der Inhibitoren zusammen mit den gentechnisch hergestellten Kinasen zur Identifizierung, auf welche Proteinsubstrate die Kinasen wirken, zum Messen der Kinetik einer derartigen Wirkung und zum Bestimmen der biochemischen und zellulären Wirkungen einer derartigen Hemmung. Sie betreffen ebenfalls die Verwendung derartiger Inhibitoren und gentechnisch hergestellter Kinasen, um aufzuklären, welche Kinasen mit der Krankheit zu tun haben könnten; diese Kinasen können dann Gegenstand der Bemühungen werden, herkömmlichere spezifische Inhibitoren ihrer Wildtypformen zu entwerfen oder zu entdecken, was sich bei der Behandlung der mit der Kinase zusammenhängenden Krankheit oder krankhaften Störung als wertvoll erweisen kann.

[0030] Weiterhin werden Verfahren zum Einschub der gentechnisch hergestellten Kinase in Zellen oder ganzen Tieren, vorzugsweise anstelle der entsprechenden Kinase vom Wildtyp und dann die Verwendung des Inhibitors, an den sie als Werkzeug zur Untersuchung der Beziehung zwischen Krankheit und Kinase, und letztlich als Arzneimittel zur Behandlung der Krankheit angepasst worden ist, bereitgestellt.

[0031] Allgemeiner betrifft die vorliegende Erfindung ebenfalls gentechnisch hergestellte Formen von Multi-Substrat-Enzymen, die einen Teil oder das gesamte von wenigstens einem (Donor-) Substrat an wenigstens ein anderes (Empfänger-) Substrat kovalent binden. Diese gentechnisch hergestellten Formen werden modifizierte Substrate und Inhibitoren akzeptieren, die nicht so leicht von den Wildtypformen dieser Enzyme gebunden werden.

[0032] Die Erfindung betrifft ebenfalls Verfahren zur Herstellung und Verwendung derartiger gentechnisch hergestellter Enzyme sowie der modifizierten Donorsubstrate. Die Verfahren der vorliegenden Erfindung umfassen Verfahren zur Verwendung der modifizierten Substrate und Inhibitoren zusammen mit den gentechnisch hergestellten Enzymen zur Identifizierung, auf welche Substrate die Enzyme wirken, zum Messen der Kinetik einer derartigen Wirkung und, im Falle der modifizierten Substrate, zur Bestimmung des Empfängersubstrats, an welches ein Teil oder das gesamte Donorsubstrat gebunden wird, zum Messen des Ausmaßes

einer derartigen Wirkung und zur Identifizierung und Messung des Ausmaßes der Modulation davon durch Testverbindungen.

[0033] Im Falle von Inhibitoren versuchen die Verfahren, die biochemischen und zellulären Wirkungen einer derartigen Hemmung zu bestimmen. Die Verfahren erstrecken sich ebenfalls auf die Verwendung derartiger Inhibitoren und gentechnisch hergestellter Enzyme, um aufzuklären, welche Enzyme mit der Krankheit zu tun haben könnten; diese Enzyme können dann Gegenstand der Bemühungen werden, spezifische Inhibitoren ihrer Wildtypformen zu entwerfen oder zu entdecken, was sich bei der Behandlung der mit dem Enzym zusammenhängenden Krankheit oder krankhaften Störung als wertvoll erweisen kann. Weiterhin werden Verfahren zum Einschleiben des gentechnisch hergestellten Enzyms in Zellen oder ganzen Tieren, vorzugsweise anstelle des entsprechenden Enzyms vom Wildtyp, und dann das Verwenden des Inhibitors, an den es als Werkzeug zum Untersuchen der Beziehung zwischen Krankheit und Enzym, und letztlich als Arzneimittel zur Behandlung der Krankheit angepasst worden ist, zur Verfügung gestellt.

[0034] Gemäß der vorliegenden Erfindung kann durch die gentechnische Enzymherstellung ein struktureller Unterschied zwischen der Nukleotidbindungsstelle einer interessierenden Proteinkinase und den Nukleotidbindungsstellen anderer Kinasen hergestellt werden. Dieser Unterschied gestattet der gentechnisch hergestellten Kinase, ein Nukleotidtriphosphat oder einen Inhibitor zu verwenden, der nicht so leicht an die Wildtypformen dieser Kinase oder an andere Kinasen bindet. In einer bevorzugten den Inhibitor betreffenden Ausführungsform ist der verwendete Inhibitor einer, der zu dem „natürlichen“ Nukleotidtriphosphatsubstrat für diese Kinase „orthogonal“ ist, oder der zu einem weniger spezifischen Inhibitor orthogonal ist (zum Beispiel einer, der leicht an die Wildtypform dieser Kinase binden kann). Der Ausdruck „orthogonal“, wie er nachstehend weiterhin erörtert wird, bedeutet, dass das Substrat oder der Inhibitor eine ähnliche Struktur aufweisen (einschließlich denjenigen, die geometrisch ähnlich aber chemisch nicht ähnlich sind, wie nachstehend beschrieben ist), dass sie sich jedoch auf eine Weise unterscheiden, die dessen Fähigkeit zur Bindung an die Wildtypformen einschränkt.

[0035] Eine gemäß der vorliegenden Erfindung gentechnisch hergestellte Kinase wird in der Lage sein, ein orthogonales Nukleotidtriphosphatsubstrat zu verwenden, das nicht so leicht von anderen in den Zellen vorhandenen nicht gentechnisch hergestellten Kinasen verwendet wird. Sie wird vorzugsweise in der Lage sein, ein orthogonales Nukleotidtriphosphat zu verwenden, das im Wesentlichen von anderen Kinasen nicht verwendet wird; und besonders bevorzugt wird sie in der Lage sein, ein orthogonales Nukleotidtriphosphat-Substrat zu verwenden, das von allen anderen Kinasen nicht verwendet werden kann. Durch Markieren des Phosphats auf dem orthogonalen Substrat, zum Beispiel unter Verwendung von radioaktivem Phosphor (P^{32}), und anschließender Zugabe dieses markierten Substrats zu permeabilisierten Zellen oder Zellextrakten werden die Proteinsubstrate der gentechnisch hergestellten Kinase markiert, während die Proteinsubstrate anderer Kinasen zumindest zu einem geringeren Grad markiert werden; die Proteinsubstrate der anderen Kinasen werden vorzugsweise im Wesentlichen nicht markiert und besonders bevorzugt werden sie überhaupt nicht markiert.

[0036] Die genaue Beschreibung und die nachstehend bereitgestellten Beispiele beschreiben die Verwendung dieser Strategie, um einzig die direkten Substrate der prototypischen Tyrosinkinase, v-Src, zu markieren. Durch die gentechnische Herstellung des Proteins wurde in der Aminosäuresequenz ein chemischer Unterschied erzeugt, der der Nukleotidbindungsstelle der modifizierten v-Src im Vergleich zu derjenigen von allen anderen Kinasen einen neuen strukturellen Unterschied verleiht. Die von uns gentechnisch hergestellte v-Src-Kinase erkennt ein ATP-Analogon (A^*TP), N^6 -(cyclopentyl)ATP, das zu dem Nukleotidsubstrat der Kinasen vom Wildtyp orthogonal ist. Die Erzeugung einer v-Src-Mutanten mit Spezifität für ein orthogonales A^*TP -Substrat gestattet, dass die direkten Substrate von v-Src einzig unter Verwendung von $[\gamma\text{-}^{32}P]N^6$ -(cyclopentyl)ATP radioaktiv markiert werden, weil es in der Lage ist, als Substrat für die gentechnisch hergestellte v-Src-Kinase zu dienen, jedoch ist es im Wesentlichen nicht in der Lage, als Substrat für andere zelluläre Kinasen zu dienen.

[0037] Die nachstehend bereitgestellte genaue Beschreibung und Beispiele beschreiben die Verwendung dieser Strategie, um einzig die direkten Substrate der prototypischen Tyrosinkinase, v-Src zu identifizieren. Durch die gentechnische Herstellung des Proteins wurde in der Aminosäuresequenz ein chemischer Unterschied erzeugt, der der Nukleotidbindungsstelle der modifizierten v-Src im Vergleich zu derjenigen von allen anderen Kinasen einen neuen strukturellen Unterschied verleiht. Die gentechnisch hergestellten v-Src-Kinasen, die hergestellt und hier dargestellt sind, binden ein orthogonales Analogon des allgemeineren Kinaseinhibitors PP3: die Verbindung N04-cyclopentoyl-PP3. Die Erzeugung einer v-Src-Mutante mit Spezifität für einen derartigen Inhibitor gestattet die Hemmung der Mutanten, wohingegen andere Kinasen in demselben Testsystem, selbst die Wildtypform derselben Kinase, im Wesentlichen nicht gehemmt werden.

[0038] Wie aus dem Vorstehenden offensichtlich ist, ist es ein Ziel der vorliegenden Erfindung, eine mutierte Proteinkinase zur Verfügung zu stellen, die ein orthogonales Nukleotidtriphosphatanalogon als ein PhoSphat-donorsubstrat akzeptiert.

[0039] Ein weiteres Ziel der vorliegenden Erfindung ist es, eine Nukleotidsequenz zur Verfügung zu stellen, die eine derartige mutierte Proteinkinase kodiert; und ein weiteres Ziel der Erfindung ist es, ein Verfahren zur Herstellung einer derartigen Nukleinsäuresequenz zur Verfügung zu stellen.

[0040] Es ist ebenfalls ein Ziel der Erfindung, Verfahren zur Herstellung einer derartigen mutierten Proteinkinase, zum Beispiel durch Exprimieren einer derartigen Nukleinsäuresequenz, zur Verfügung zu stellen.

[0041] Es ist ebenfalls ein Ziel der vorliegenden Erfindung, derartige orthogonale Nukleotidtriphosphate und Verfahren für deren Synthese, einschließlich N⁶-(cyclopentyl)ATP, N⁶-(cyclopentyloxy)ATP, N⁶-(cyclohexyl)ATP, N⁶-(cyclohexyloxy)ATP, N⁶-(benzyl)ATP, N⁶-(benzyloxy)ATP, N⁶-(pyrolidino)ATP und N⁶-(piperidino)ATP (27), bereitzustellen.

[0042] Ein weiteres Ziel der Erfindung ist es, ein Verfahren zur Bestimmung, ob eine Testverbindung die Aktivität einer Proteinkinase in Bezug auf ein oder mehrere Proteinsubstrate positiv oder negativ moduliert, zur Verfügung zu stellen.

[0043] Insbesondere und gemäß dem weiteren Aspekt der Erfindung ist es ein Hauptziel, eine mutierte Proteinkinase zur Verfügung zu stellen, die an einen Inhibitor bindet und durch diesen gehemmt wird, wobei der Inhibitor weniger leicht an die entsprechende Kinase vom Wildtyp bindet oder diese hemmt.

[0044] Ein weiteres Ziel der vorliegenden Erfindung ist es, eine Nukleotidsequenz zur Verfügung zu stellen, die für eine derartige mutierte Proteinkinase kodiert; und es ist ein weiteres Ziel, ein Verfahren zum Herstellen einer derartigen Nukleinsäuresequenz zur Verfügung zu stellen.

[0045] Es ist ebenfalls ein Ziel der Erfindung, Verfahren zum Herstellen einer derartigen mutierten Proteinkinase, zum Beispiel durch Exprimieren einer derartigen Nukleinsäuresequenz, zur Verfügung zu stellen.

[0046] Ein weiteres Ziel der vorliegenden Erfindung ist es, derartige Inhibitoren, wie zum Beispiel die Verbindung N-4-cyclopentoyl PP3, und Verfahren für deren Synthese zur Verfügung zu stellen.

[0047] Ein weiteres Ziel ist es, ein Verfahren zum Bestimmen, welches die Substrate für eine gegebene Proteinkinase sind, zur Verfügung zu stellen.

[0048] Ein weiteres Ziel der Erfindung ist es, ein Verfahren zur Bestimmung, ob eine spezifische Hemmung einer speziellen Kinase eine biochemische oder phänotypische Wirkung in einem Testsystem, wie zum Beispiel zellfreie Extrakte, Zellkulturen oder lebende mehrzellige Organismen, erzeugt, zur Verfügung zu stellen.

[0049] Es ist ein weiteres Ziel, Verfahren zum Untersuchen der Aktivität, der Kinetik und der katalytischen Mechanismen einer Kinase zur Verfügung zu stellen, indem die Hemmung der entsprechenden Mutante der vorliegenden Erfindung untersucht wird.

[0050] Diese und andere Ziele der vorliegenden Erfindung werden aus der ausführlichen Beschreibung, den nachstehend ausgeführten Beispielen und Ansprüchen dem Durchschnittsfachmann offenbar werden.

IV. KURZE BESCHREIBUNG DER FIGUREN

[0051] [Fig. 1](#) ist eine schematische Darstellung der Proteindomänenstrukturen von v-Src, von XD4 (das eine Deletion der Reste 77-225 aufweist), von dem Glutathion-S-Transferase (GST)-XD4-Fusionsprotein und von der GST-XD4-Fusionsprotein-Doppelmutanten (V323A, I338A);

[0052] [Fig. 2](#) ist eine schematische Darstellung von Adenosintriphosphat (ATP), wobei ein „X“ an die N⁶-Position gebunden ist; und in dem untenstehenden Kasten sind schematische Darstellungen für die zwölf Seitenketten zur Verfügung gestellt, die die Stelle von „X“ in jedem der orthogonalen ATP-Analoga einnehmen, die in den Beispielen beschrieben sind (auf die immer durch die fett gedruckten Zahlen 1-12 Bezug genommen wird);

[0053] [Fig. 3](#) ist ein Anti-Phosphotyrosin-Immunoblot, der den Grad der Proteintyrosinphosphorylierung nach

Behandlung eines murinen Lymphozytellenlysats mit ATP oder einem der ATP-Analoga (A*TPs) zeigt;

[0054] **Fig. 4** stellt eine Nahaufnahme des Röntgenmodells zur Verfügung, das die ATP-Bindungsdomäne in cAMP-abhängiger Proteinkinase (1ATP) zeigt;

[0055] **Fig. 5** zeigt (a) einen Anti-Phosphotyrosinblot von Zelllysaten, die XD4 und GST-XD4(V323A, I338A) exprimieren, (b) ein Autoradiogramm, das die Gehalte der Phosphorylierung zeigt, wenn die Zelllysate nur mit radioaktiv markiertem ATP oder nur radioaktiv markiertem N6(cyclopentyl)ATP versehen sind, und (c) ein Autoradiogramm, das die Autophosphorylierung von GST-XD4 und GST-XD4(V323A, I338A) durch radioaktiv markiertes ATP und radioaktiv markiertes N6(cyclopentyl)ATP (A*TP(8)) zeigt;

[0056] **Fig. 6** ist ein Balkendiagramm, das zeigt, zu welchem Grad ATP und jedes der zwölf ATP-Analoga die GST-XD4- und GST-XD4(V323A, I338A)-katalysierte Phosphorylierung durch radioaktiv markiertes ATP hemmen.

[0057] **Fig. 7** zeigt Autoradiogramme, die die Niveaus der Autophosphorylierung durch mehrere v-Src-Mutanten mit einer einzelnen Mutation an der Position 338 anzeigen, wenn sie mit radioaktiv markiertem ATP als auch mit radioaktiv markiertem N6(cyclopentyl)ATP als Phosphatdonorsubstrat versehen wurden;

[0058] **Fig. 8** ist ein schematisches Diagramm eines Verfahrens der vorliegenden Erfindung zur Bestimmung, welche phosphorylierten Substrate in Zellen durch eine spezielle Kinase, hier v-src, phosphoryliert wurden.

[0059] **Fig. 9** ist ein schematisches Diagramm, das zeigt, wie eine gentechnisch hergestellte Kinase der vorliegenden Erfindung durch einen Inhibitor der vorliegenden Erfindung, selbst in Gegenwart anderer Kinasen gehemmt werden kann, und wie sie zur Offenbarung der Proteinsubstrate der Kinase verwendet werden kann;

[0060] **Fig. 10** zeigt die chemischen Strukturen für drei bekannte Kinaseinhibitoren, Damnacanthal, PPI und CGP 57148, zusammen mit den Zusammenfassungen ihrer Hemmkonstanten (IC_{50} -Werte) für mehrere Kinasen;

[0061] **Fig. 11A** zeigt die Kernstruktur von Adenosin und PP3, und

[0062] **Fig. 11B** zeigt die Strukturen mehrerer voluminöser Substituenten, die an den N4-Stickstoff von PP3 addiert werden können, um die Inhibitor-kandidatsverbindungen herzustellen, deren IC_{50} -Werte in Tabelle 1 aufgelistet sind;

[0063] **Fig. 12** zeigt die chemische Struktur von N4-cyclopentoyl-PP3 und die Autoradiogramme elektrophoresierter Proteine, die in Gegenwart von N4-cyclopentoyl-PP3 in Gegenwart von entweder v-Src vom Wildtyp oder der Mutante (I338G) radioaktiv markiert worden sind;

[0064] **Fig. 13A–Fig. 13C** ist eine graphische Darstellung, die zusätzliche Inhibitoranaloga darstellt, die erfindungsgemäß hergestellt und getestet wurden;

[0065] **Fig. 14A.)** ist eine schematische Darstellung der Spezifitätsprobleme, die mit der Verwendung von Proteinkinaseinhibitoren, die kleine Moleküle sind, zum Entfalten der Zellsignalgebung verbunden sind. Kinase-katalytische Domänen (rote Ovale) sind stark konserviert. Somit blockiert die Mehrheit der wirksamen Inhibitoren die Aktivität nahe verwandter Kinasen und regelt die durch die Kinaseaktivität vermittelten Wege in einem weiten Bereich herunter. B.) Schematische Darstellung der Methode bezüglich der hier beschriebenen selektiven Proteinkinasehemmung. Eine raumerzeugende Mutation ist in die ATP-Bindungsstelle der Kinase der Wahl (Src) eingeführt. Diese Mutation erzeugt eine aktive Stellentasche (Kerbe) in Src, die einzig durch einen rational entworfenen Inhibitor, der ein kleines Molekül ist, erkannt werden kann. Dieser Inhibitor enthält eine voluminöse chemische Gruppe (Beule), die ihn zu den Proteinkinasen vom Wildtyp orthogonal macht. Das Design des komplementären Kinase/Inhibitor-Paars gestattet die hoch selektive Hemmung der Zielkinase in dem Inhalt einer gesamten Zelle.

[0066] **Fig. 15A.)** Struktur von N-6-cyclopentylxyadenosin (1). b.) Synthese von Pyrazolo[3,4-d]pyrimidin-Inhibitoranaloga. 2 wurde gemäß Hanfeld, et al. synthetisiert. (i) $RCOCl$ (10 Äquivalente), Pyridin, $5^{\circ}C$, 1 h; dann erwärmen auf $22^{\circ}C$, 11 h; (ii) $LiAlH_4$ (3,0 Äquivalente), trockenes THF unter Argon, $0^{\circ}C$, 30 min; dann Erwärmen unter Rückfluß während 30 min). Alle Verbindungen wurden durch 1H NMR (300 MHz) und hochauflösende Massenspektrometrie (EI) charakterisiert.

[0067] [Fig. 16a.](#)) Chemische Strukturen von Quercetin (5) und AMP PNP (6). b.) Vorhergesagte Bindungsorientierung von 2 an aktiven Stellen der src-Familie. Die Kristallstrukturen von Hck gebunden an AMP PNP (rot) und Hck gebunden an Quercetin (blau) wurden dem Hck-Proteingrundgerüst (weiß) entsprechend eingeblendet. Die Struktur von 2 (gelb) wurde nachfolgend an die aktive Stelle der Kinase gekoppelt, indem das Pyrazolo[3,4-d]pyrimidinringsystem von 2 über den Adeninring von AMP PNP gelegt wurde. c.) Vorhergesagter enger Kontakt zwischen N-4 von 2 und der Seitenkette des Restes 338 in Kinasen der src-Familie. Das Molekül 2 wurde an die ATP-Bindungsstelle einer Kinase der src-Familie, Hck, wie in [Fig. 3b](#) gekoppelt. Die Atome der Threonin-338-Seitenkette und von 2 sind ihrem elementaren Aufbau entsprechend gefärbt (grün = Kohlenstoff, blau = Stickstoff, rot = Sauerstoff, weiß = Wasserstoff) und das Hck-Grundgerüst ist purpurnfarben gezeigt. Die Methylwasserstoffatome der Threoninseitenkette sind nicht gezeigt. Die Bilder wurden unter Verwendung des Programms Insightll erstellt.

[0068] [Fig. 17](#) Das Inhibitoranalogon 3g hemmt nicht die B-Zellenrezeptor-vermittelte Tyrosinphosphorylierung. Murine Milzzellen wurden mit 1,1 % DMSO (Spuren 1–2), 100 mM 3g in 1,1 % DMSO (Spur 3), oder 100 mM 2 in 1,1 % DMSO (Spur 4) inkubiert. Die B-Zellenstimulierung (Spuren 2–4) wurde durch die Zugabe von 10 mg/mL Ziege-Anti-Maus-IgM initiiert. Zellproteine wurden durch 10 % PAGE aufgelöst, auf Nitrocellulose überragen und mit einem monoklonalen Antikörper für Phosphotyrosin (4G10) immungeblottet.

[0069] [Fig. 18](#) Der Inhibitor 3g blockiert die p36-Phosphorylierung in 1338G v-Src-, jedoch nicht in WT-v-Src-transformierten NIH3T3-Fibroblasten. Nicht transformierte NIH3T3-Zellen (Spur 1), WT-v-Src-transformierte NIH3T3-Zellen (Spuren 2–3) und 1338G-v-Src-transformierte NIH3T3-Zellen (Spuren 4–5) wurden mit 1,1 % DMSO (Spuren 1, 2 und 4) oder 100 mM 3g in 1,1 % DMSO (Spuren 3 und 5) inkubiert. Nach 12 Stunden wurden die Zellen lysiert. Die Phosphorylierungsgehalte wurden wie in [Fig. 4](#) bestimmt.

[0070] [Fig. 19](#) 1338G-vSrc-transformierte Fibroblasten nehmen selektiv eine abgeflachte Morphologie an und gewinnen Actinstressfasern nach Inkubation mit 3g selektiv wieder zurück. Nicht transformierte (a.–b.), WT-v-Src-transformierte (c., d., g., h.) und 1338G-v-Src-transformierte (e., f., i., j.) NIH3T3-Fibroblasten wurden mit entweder 1,1 % DMSO (a.-c-, e., g., i.) oder 100 mM 3g in 1,1 % DMSO (d., f., h., j.) behandelt. Nach 48 Stunden wurden die Zellen fotografiert (a., c.–f.), mit Phalloidin-FITC gefärbt und (b., g.–j.) durch Fluoreszenzmikroskopie sichtbar gemacht.

V. GENAUE BESCHREIBUNG DER ERFINDUNG

[Fig. 9](#)

[0071] Diese Figur zeigt eine schematische Darstellung eines nachstehenden Experiments zum Identifizieren von Kinasesubstraten, das die Erfindung zum Aufdecken der Substrate einer Src-Proteinkinase verwendet. Die Ovale am oberen Teil der Figur stellen Proteinkinasesubstrate dar, die durch die an den Pfeil angrenzenden Proteinkinasen phosphoryliert werden. Die Proteinkinasen, die mehrere durch Linien verbundene Ovale enthalten, sind Mitglieder der „Src-Familie“ von Proteinkinasen (Src, Fyn, Lck). Eine Kinase (Src) enthält eine ausgeschnittene Kerbe, die die 1338G-Mutation darstellt, die in der Adeninbindungstasche dieser Kinase einen zusätzlichen Raum erzeugt. Das Symbol über dieser Kinase stellt den orthogonalen Inhibitor dar, der einen Vorsprung enthält, der zur Mutation in der Src-1338G-Kinase komplementär ist, was zu seiner einzigartigen Hemmung führt. Die Kinase mit einem großen runden Oval und zwei hervorstehenden Stacheln ist die F-Ac-tin-anhängige Proteinkinase (FAK). Die Proteinkinasen mit nur einem Oval sind Mitglieder der Serin- oder Threoninspezifischen Proteinkinasefamilie. Die Ovale unterhalb des Pfeils, die kleine P's enthalten, stellen die phosphorylierten (P) Substrate nach Einwirkung durch die Proteinkinasen dar. Die stimulierten Gele am unteren Ende der Figur stellen die erwarteten Ergebnisse dar, wenn Zellen, die alle entweder Kinasen vom Wildtyp (links) oder eine mutierte Kinase (Src-1338G) anstelle der Src vom Wildtyp exprimieren, mit einem orthogonalen Inhibitor behandelt werden. Der Inhibitor sollte keine Wirkung auf Phosphoproteine, die in den Zellen vorhanden sind, die nicht die mutierte Src-Kinase exprimieren (identisches Muster im Gel links), aufweisen und mehrere Phosphoproteine sollten nach Behandlung der die Mutante exprimierenden Zellen mit dem Inhibitor (Gel rechts) abwesend sein.

Die Inhibitoren

[0072] Die [Fig. 11A](#) und [Fig. 11B](#) zeigen die Strukturen einer Vielzahl von voluminösen Substituenten, die entweder zu N-4 von PP3 oder zu N⁶ von Adenosindiphosphat oder zu N⁶ von Adenosinmonophosphat oder zu N⁶ von Adenosin (insbesondere N⁶-cyclopentylxyadenosin) zur Herstellung von Inhibitoren der mutierten Kinase v-Src(T120G), die eine gentechnisch hergestellte Kinase der vorliegenden Erfindung ist, zugegeben

werden; die Synthese und Hemmkonstanten für diese Inhibitoren werden in nachstehendem Beispiel 12 erörtert.

[0073] Derartige Inhibitoren können in Untersuchungen, die auf die Entwicklung anderer verwendbarer Mutanten von dieser oder anderen Kinasen gerichtet sind, und für mehrere an anderer Stelle hier beschriebene Verfahren verwendbar sein. Jedoch ist der Umfang der vorliegenden Erfindung nicht auf die Verwendung dieser speziellen Inhibitoren beschränkt und der Durchschnittsfachmann wird erkennen, dass viele andere mögliche Strukturen die hier beschriebenen ersetzen oder diese ergänzen könnten.

[0074] Zum Beispiel könnten verschiedene einfachere und sogar komplexere aliphatische oder aromatische Gruppen an die N⁶-Position von ADP oder an die N₄-Position von PP3 angefügt werden. Zusätzlich sind die Inhibitoren der vorliegenden Erfindung nicht auf Modifikationen von Nukleotiden an der N⁶-Position oder auf Modifikationen von PP3 an der N₄-Position beschränkt. Chemische Mittel zur Modifikation verschiedener Positionen an derartigen Verbindungen sind bekannt und jedes der resultierenden Derivate würde innerhalb des Umfangs der vorliegenden Erfindung liegen; es ist sogar möglich, Änderungen oder Substitutionen in ihren Ringstrukturen durchzuführen. Beispielhafte Varianten sind hierin dargestellt und besonders wird auf **Fig. 13** verwiesen, in der sowohl die Analoga als auch die Daten bezüglich ihrer Aktivität ausgeführt sind. Natürlich kann die Verwendung derartiger Inhibitoren erfordern, dass verschiedene Positionen in der Proteinsequenz der Kinase modifiziert werden müssen, um eine gentechnisch hergestellte Kinase zu erzeugen, die an sie binden wird, jedoch liegen derartige unterschiedliche Modifikationen ebenso innerhalb des Umfangs der Erfindung.

[0075] Zusätzlich ist es wichtig zu beachten, dass die Inhibitoren, auf die in der vorliegenden Erfindung Bezug genommen wird, nicht auf ADP- und PP3-Derivate beschränkt sind. Es sollte zum Beispiel möglich sein, Derivate eines anderen natürlichen Nukleotidphosphatdonorsubstrats als derartige Inhibitoren zu verwenden. Zur Untersuchung einiger Kinasen können tatsächlich unterschiedliche analoge Basen bevorzugt sein. Zum Beispiel ist bekannt, dass einige Kinasen GTP als Phosphatdonorsubstrat und Energiequelle verwenden; zum Herstellen von Inhibitoren für gentechnisch hergestellte Formen derartiger Kinasen wären Analoga von Guanosindiphosphat geeignet. Weiterhin ist es gut bekannt, dass verwandte Verbindungen (zum Beispiel andere Basen) und Verbindungen, die zum dem natürlichen Substrat nicht verwandt sind, dennoch manchmal an eine aktive Stelle binden können, und sie können (jedoch müssen sie es für die Zwecke der vorliegenden Erfindung nicht) auf andere Substrate durch chemische Katalyse durch das Enzym wirken oder zur Wirkung veranlasst werden. Manchmal beteiligen sie sich an der katalysierten Reaktion auf dieselbe Weise wie das natürliche Substrat, manchmal auf unterschiedliche Weisen. Derartige Verbindungen und deren Derivate wären als Ausgangspunkte für das Design von Inhibitoren geeignet, die zu ihnen orthogonal sind und die innerhalb des Umfangs der vorliegenden Erfindung liegen würden. Ähnlich können andere bekannte Kinaseinhibitoren als Ausgangspunkte zur Synthese von Inhibitoren der vorliegenden Erfindung verwendet werden, wie zum Beispiel diejenigen, deren Strukturen in **Fig. 10** erscheinen. Natürlich würden selbst Derivate von Inhibitoren, die derzeit unbekannt sind, als Kernstrukturen für das Design von Inhibitoren, die zur Verwendung in der vorliegenden Erfindung geeignet sind, geeignet sein, sobald sie identifiziert sind, wie es hier erläutert ist und Teil der Erfindung ist.

[0076] Weiterhin sind die zur Verwendung in der vorliegenden Erfindung geeigneten Inhibitoren nicht auf diejenigen, die durch chemische Synthesemittel hergestellt sind, beschränkt, sondern umfassen ebenfalls Verbindungen, die in der Natur gefunden werden können, und die diese Rolle erfüllen können, wobei einige von diesen vorstehend diskutiert sind. Zusätzlich wird dem Durchschnittsfachmann klar sein, dass es neben den hier ausgeführten Variationen noch weitere gibt und, dass all diese innerhalb des Umfangs der vorliegenden Erfindung liegen.

[0077] Die Inhibitoren, die Kandidaten für die erfindungsgemäße Verwendung sind, können praktischerweise gescreent werden, um das Ausmaß, in dem sie von Kinasen vom Wildtyp akzeptiert werden, zu bestimmen, wobei ein Screeningverfahren, wie zum Beispiel das in nachstehendem Beispiel 13 ausgeführte, verwendet wird oder durch ein Screeningverfahren, das die Verwendung einer Zelle oder mehrerer Zellen mit hoher Proteinkinaseaktivität betrifft, wie in Beispiel 9 hier ausgeführt ist. Durch einen derartigen Assay kann man bestimmen, ob jeder Inhibitor zu einem geringeren Grad an Kinasen vom Wildtyp als an die gentechnisch hergestellten Kinasen gebunden ist, oder vorzugsweise, ob die Kinasen vom Wildtyp an diesen Inhibitor im Wesentlichen nicht binden oder besonders bevorzugt, überhaupt nicht an den Inhibitor binden. Für diejenigen Substrate, die zumindest weniger leicht gebunden werden, kann es sich lohnen, zu versuchen, die interessierende Kinase gentechnisch so herzustellen, dass sie leichter an sie bindet. Vorzugsweise könnte man zuerst die Kinase gentechnisch herstellen und sie dann zusammen mit dem Enzym vom Wildtyp untersuchen, um zu bestimmen, ob sie ein gegebenes orthogonales Substrat besser als die Kinase vom Wildtyp verwendet; diese Methode wurde

in Beispiel 13 verwendet. Natürlich sind für den Fachmann andere Untersuchungsmethoden offensichtlich und die Verwendung derartiger Assays wäre innerhalb des Umfangs der vorliegenden Erfindung.

Die gentechnisch hergestellten Kinasen

[0078] Die gentechnische Rekonstruktion einer Kinase sollte mehreren Kriterien genügen, um einzig ihre authentischen Substrate in Gegenwart von Tyrosin- und Serin/Threoninkinasen vom Wildtyp zu markieren. Die gentechnisch hergestellte Kinase sollte (1) ein ATP-Analogon (A*TP) akzeptieren, das weniger leicht von Kinasen vom Wildtyp verwendet wird; vorzugsweise ein A*TP akzeptieren, das von Kinasen vom Wildtyp im Wesentlichen nicht verwendet wird; und besonders bevorzugt ein A*TP akzeptieren, das überhaupt nicht von Kinasen vom Wildtyp verwendet wird; (2) das A*TP-Analogon vorzugsweise mit hoher katalytischer Wirkungsfähigkeit verwenden; und (3) vorzugsweise eine verringerte katalytische Wirkungsfähigkeit für das natürliche Nukleotidsubstrat (ATP) aufweisen, so dass in Gegenwart von ATP mit zellulären Gehalten (1–2 mM) die mutierte Kinase vorzugsweise A*TP als Phosphordonor verwendet würde. Wenn derartige Kinasen zur Untersuchung der Proteinsubstratspezifität der Kinase vom Wildtyp verwendet werden sollen, dann müssen diese Kriterien ohne eine wesentliche Änderung der Proteinzielspezifität der Kinase erfüllt sein.

[0079] Desgleichen sollten bei der gentechnischen Rekonstruktion einer Kinase mehrere Kriterien erfüllt sein, damit sie durch die zur Verwendung in der vorliegenden Erfindung geeigneten Inhibitoren gehemmt wird. Die gentechnisch hergestellte Kinase sollte: (1) an einen Inhibitor binden, an den weniger leicht Proteinkinasen vom Wildtyp binden; vorzugsweise wird der Inhibitor im Wesentlichen nicht an Kinasen vom Wildtyp binden; und besonders bevorzugt wird er überhaupt nicht an Kinasen vom Wildtyp binden; (2) die gentechnisch hergestellte Kinase wird vorzugsweise an den Inhibitor mit hoher Affinität (das heißt niedriger IC_{50} -Wert) binden. Im Allgemeinen ist es nicht von besonderer Bedeutung, ob der Inhibitor an die Wildtypform der Kinase, die der gentechnisch hergestellten Kinase entspricht, bindet, da dabei die Bindung und die resultierende Hemmung diejenige der gentechnisch hergestellten Kinase steigert. Es ist jedoch äußerst wahrscheinlich, dass die Wildtypform dieser Kinase keineswegs besser an den Inhibitor bindet, als andere Kinasen vom Wildtyp. Falls eine inhibier gentechnisch hergestellte Kinase zur Untersuchung der Proteinsubstratspezifität der Kinase vom Wildtyp, oder zum Ersetzen der Wildtypform dieser Kinase durch Gentherapie oder andere Mittel, wie nachstehend weiter diskutiert wird, verwendet werden soll, dann ist weiterhin wichtig, dass die vorstehend beschriebenen Kriterien vorzugsweise ohne eine wesentliche Änderung der Proteinzielspezifität der gentechnisch hergestellten Kinase im Vergleich zu der entsprechenden Wildtypform erfüllt sein müssen.

[0080] Vom Stand der Technik zum Zeitpunkt der Anfertigung der vorliegenden Erfindung aus gesehen, war es nicht vorhersagbar, ob es möglich sein würde, alle dieser Kriterien gleichzeitig zu erfüllen; tatsächlich war es zweifelhaft, weil die ATP-Bindungsstelle, die gentechnisch hergestellt ist, sehr nahe bei der zweiten Substratbindungsstelle, das heißt, bei der Peptidbindungsstelle liegt. Wie jedoch durch die nachstehenden Beispiele gezeigt ist, wurden alle dieser Kriterien, einschließlich die bevorzugten Kriterien, tatsächlich gleichzeitig erfüllt, als wir die beschriebenen v-Src-Mutanten herstellten, sie mit N⁶(cyclopentyl)ATP versahen und sie unter Verwendung von N4-cyclopentyl-PP3 gehemmt.

[0081] Beispiel 1 beschreibt die zwölf ATP-Analoga, die in den Untersuchungen bezüglich mutierter v-Src verwendet wurden, die in den weiteren nachfolgenden Beispielen beschrieben sind. Diese orthogonalen ATP-Analoga können in Untersuchungen, die auf die Entwicklung anderer verwendbarer Mutanten von dieser oder anderen Kinasen gerichtet sind, und für mehrere Verfahren, die an anderer Stelle hierin beschrieben sind, verwendbar sein. Jedoch ist der Umfang der vorliegenden Erfindung nicht auf die Verwendung dieser speziellen ATP-Analoga beschränkt und der Durchschnittsfachmann wird erkennen, dass viele andere möglichen orthogonalen Substrate die hierin beschriebenen ersetzen oder diese ergänzen könnten. Zum Beispiel könnten verschiedene und sogar komplexere aliphatische oder aromatische Gruppen an die N⁶-Position von ATP addiert werden. Zusätzlich sind die orthogonalen Substrate der vorliegenden Erfindung nicht auf Modifikationen von Nukleotiden an der N⁶-Position beschränkt. Chemische Mittel zum Modifizieren verschiedener Positionen an Adenosin sind bekannt und jedes davon würde innerhalb des Umfangs der vorliegenden Erfindung liegen; und es ist selbst möglich, in den Ringstrukturen von Nukleotiden Änderungen oder Substitutionen auszuführen. Natürlich kann die Verwendung derartiger orthogonaler Substrate es erfordern, dass verschiedene Positionen in der Proteinsequenz der Kinase zur gentechnischen Herstellung einer Kinase, die an sie binden wird, modifiziert werden müssen, jedoch liegen derartige verschiedene Modifikationen durchaus innerhalb des Umfangs der vorliegenden Erfindung.

[0082] Es ist gut bekannt, dass Verbindungen, die zu dem natürlichen Substrat chemisch nicht verwandt sind, dennoch manchmal an eine aktive Stelle binden können und sogar auf andere Substrate durch chemische Ka-

talyse durch das Enzym wirken, oder zum Wirken veranlasst werden können. Manchmal beteiligen sie sich an der katalytischen Reaktion auf die gleiche Weise wie das natürliche Substrat, manchmal auf unterschiedliche Weisen. Derartige Verbindungen und deren Derivate würden ebenfalls innerhalb des Umfangs der Ausdrücke „natürliches Substrat“ und „orthogonales Substrat“, wie sie hier verwendet werden, liegen.

[0083] Weiterhin sind die orthogonalen Substrate der vorliegenden Erfindung nicht auf diejenigen, die durch chemische Synthesemittel hergestellt sind, beschränkt, sondern umfassen ebenfalls Verbindungen, die in der Natur gefunden werden können und die diese Rolle erfüllen können. Dem Durchschnittsfachmann wird klar sein, dass es neben den hier ausgeführten Variationen noch weitere gibt und dass all diese innerhalb des Umfangs der vorliegenden Erfindung liegen.

[0084] Die orthogonalen Nukleotide, die Kandidaten zur erfindungsgemäßen Verwendung sind, können praktischerweise gescreent werden, um das Ausmaß, mit dem sie von Kinasen vom Wildtyp akzeptiert werden zu bestimmen, wobei ein Screeningverfahren verwendet wird, wie es in nachstehend in Beispiel 2 ausgeführt ist. Durch einen derartigen Assay kann man bestimmen, ob jedes orthogonale Substrat zu einem geringeren Grad von Kinasen vom Wildtyp als das normale Substrat für derartige Kinasen akzeptiert wird, oder ob sie vorzugsweise dieses Substrat im Wesentlichen nicht akzeptieren, oder ob sie besonders bevorzugt, dieses überhaupt nicht akzeptieren. Für diejenigen Substrate, die zumindest weniger leicht akzeptiert werden, kann es sich lohnen, zu versuchen, die interessierende Kinase so gentechnisch herzustellen, dass sie sie leichter akzeptiert. Natürlich könnte man die gentechnisch konstruierte Kinase zuerst herstellen und sie dann zusammen mit dem Enzym vom Wildtyp untersuchen, um zu bestimmen, ob sie ein gegebenes orthogonales Substrat besser als die Kinase vom Wildtyp verwendet. Natürlich sind für den Fachmann andere Untersuchungsmethoden offensichtlich und die Verwendung derartiger Assays würde innerhalb des Umfangs der vorliegenden Erfindung liegen.

[0085] Das Design von gentechnisch konstruiertem v-Src ist nachstehend in Beispiel 3 beschrieben. Entsprechend der Beschreibung wurde die gentechnische konstruierte Form unter Bezugnahme auf die Kristallstrukturen anderer Kinasen entworfen, die Domänen aufweisen, die zu denjenigen homolog sind, die in den meisten, wenn nicht allen Kinasen gefunden werden. Wie ersichtlich ist, wurden die beispielhaften mutierten Kinasen eher als Fragmente von Proteinkinasen konstruiert, als dass sie die gesamten Sequenzen enthalten; jedoch wurde festgestellt, dass es bei Verwendung der gesamten Sequenz keinen wesentlichen Unterschied in der Leistungsfähigkeit gibt. Natürlich sind die Konzepte und praktischen Methoden die gleichen, ob Fragmente oder gesamte Kinasen verwendet werden, und beides liegt innerhalb des Umfangs der vorliegenden Erfindung. Als solches sollte der Ausdruck „Kinase“ so betrachtet werden, dass er das gesamte Enzym oder ein Fragment eines Enzyms umfasst, wobei dies die Auslegung der Ansprüche mit einschließt.

[0086] Unter Verwendung dieser Methode ist es möglich, ähnliche Mutanten von so gut wie jeder anderen Kinase zu entwerfen. Das Verfahren, um dies auszuführen, umfasst die Schritte des (a) Identifizierens aus der Kristallstruktur eines identischen oder homologen Enzyms, das an dessen Phosphatdonorsubstrat oder an einen bekannten Kinaseinhibitor (der bezüglich Kinasen nicht spezifisch sein kann, im Allgemeinen bezüglich Kinasen spezifisch sein kann, jedoch nicht für dieses Kinase, oder bezüglich dieser Kinase spezifisch sein kann) gebunden ist, von einer oder mehreren Aminosäuren, die andere als Glycin sind und die sich nahe genug an einem Substituenten auf dem gebundenen Phosphatdonorsubstrat oder Inhibitor befinden, so dass sie den Zutritt eines voluminösen Substituenten, der an diesen Substituenten in einem mutmaßlichen orthogonalen Inhibitor gebunden ist, sterisch hindern würden; und (b) das Mutieren einer Nukleotidsequenz, die die Proteinkinase vom Wildtyp kodiert, so dass die Nukleotidtripletts, die eine oder mehrere der identifizierten Aminosäuren kodieren, zu Nukleotidtripletts umgewandelt werden, die Aminosäuren mit Seitenketten kodieren, die sterisch weniger voluminös als die identifizierten Aminosäuren sind.

[0087] Das vorstehend beschriebene Verfahren verwendet die sterische Hinderung für den Zutritt oder dem Ausschluss als Kriterien, um darüber zu entscheiden, welche Aminosäure(n) geändert werden sollen) und wie sie geändert werden sollen. Jedoch ist die vorliegende Erfindung nicht derartig eingeschränkt. Es ist ebenfalls möglich, eine Kinase gentechnisch herzustellen, um ihre Fähigkeit zum Binden an ein orthogonales Substrat zu ändern, indem andere Faktoren berücksichtigt werden, wie zum Beispiel die Hydrophobie, Hydrophilie, ionische Bindung oder Abstoßung, Wasserstoffbindung, Bildung kovalenter Bindungen zwischen dem Enzym und den elektrophilen Gruppen auf orthogonalen Substraten, usw.

[0088] Die Untersuchung von Proteinkinasen unter Verwendung der vorliegenden Erfindung wird durch das gewaltige Wissen im Hinblick auf die Domänenstruktur vieler unterschiedlicher Kinasen und ihren im Allgemeinen homologen Sequenzen stark vereinfacht. Das Protein Kinase Fact Book (71) stellt Proteinsequenzdaten

für die drei funktionalen Domänen in buchstäblich hunderten von Proteinkinasen zur Verfügung, und dieses sollte zusammen mit der in der elementaren Literatur verfügbaren Sequenzinformation die weitere Anwendung der vorliegenden Erfindung auf Kinasen stark vereinfachen. Ähnliche Information ist im Hinblick auf andere Multi-Substrat-Enzyme erhältlich, die deren Untersuchung und erfindungsgemäße Verwendung vereinfachen sollte.

[0089] Obwohl das bevorzugte Verfahren der vorliegenden Erfindung das vernünftige Design von Substratanaloga und mutierten Proteinkinasen betrifft, könnten beide alternativ dazu durch Verwendung von Verfahren, die als kombinatorische Verfahren bekannt sind, hergestellt werden. Es gibt viele kombinatorische Verfahren zur Synthese organischer Verbindungen. Unter Verwendung eines derartigen Verfahrens könnte man Nukleosidanaloga auf Harzkügelchen unter Verwendung sequentieller chemischer Schritte synthetisieren und sie dann vor der Phosphorylierung zur Herstellung von Nukleotidtriphosphaten von dem Harz freisetzen. Nach Verwendung eines derartigen Verfahrens zur Herstellung einer Sammlung oder einer Bibliothek von mutmaßlichen orthogonalen Substraten für Mutanten der v-Src-Kinase, einer anderen Proteinkinase oder anderen Multi-Substrat-Enzymen könnte die Sammlung oder Bibliothek bezüglich besonders vorteilhafter Bindungs- oder Katalyseeigenschaften gescreent werden. Dies kann die gründlichere Suche nach Struktur-, Konformations- und elektronischen Eigenschaften bezüglich derartiger mutmaßlicher orthogonaler Substrate ermöglichen. Überdies wird häufig festgestellt, dass bei der Untersuchung von größeren Zahlen von Analoga eines gegebenen Substrats ein unerwartet wirkungsvolles Substrat oder Inhibitor gefunden werden kann. Weiterhin wären manchmal die Verbindungen, die besonderes erwünscht sind, nicht gefunden worden, wenn nur gut verstandene Parameter zum spezifischen Design der besten Verbindung verwendet worden wären.

[0090] Es gibt ebenfalls viele kombinatorischen Verfahren aus dem Stand der Technik zum Herstellen von Proteinmutanten. Diese umfassen die „Fehler anfällige“ Polymerasekettenreaktion (PCR), „Sexual“-PCR oder PCR unter Verwendung von Primern mit Zufallsnukleotiden an festgesetzten Positionen in der Proteinsequenz. Andere Sequenzrandomisierungsverfahren könnten das Verwenden chemischer Mutagene von cDNA oder Plasmid-DNA, oder von Bakterienstämmen vom MutD-Typ, von denen bekannt ist, dass sie in Proteine, die sie exprimieren, zufällige Mutationen einführen, umfassen. Es wäre möglich die vorliegende Erfindung durch Verwerten derartiger Verfahren zum Herstellen von zufällig mutierten Proteinkinasen oder anderen Multi-Substrat-Enzymen und dann durch Screening bezüglich einer mit besonders hoher Aktivität mit einem speziellen orthogonalen Substrat, oder mit einigen oder allen der mutmaßlichen orthogonalen Substrate, die unter Verwendung von kombinatorischer Synthese, entsprechend dem vorstehenden Abschnitt, hergestellt wurden, auszuführen. Die in den nachstehenden Beispielen beschriebenen Untersuchungsverfahren wären für diesen Zweck geeignet und der Fachmann wäre ohne weiteres in der Lage, alternative Methoden zu entwerfen.

[0091] Diese Verfahren und andere Verfahren, die zum Erforschen des Raums der Proteinsequenz und des strukturellen Raums kleiner organischer Moleküle entwickelt sind, oder entwickelt werden können, könnten insbesondere für die hier beschriebene technologische Anwendung verwendbar sein, wobei wir sowohl das Protein als auch den mutmaßlichen Inhibitor austauschen oder ändern können, um die bestmögliche nicht natürliche (das heißt orthogonale) Eignung zu finden. Die Verwendung jeder dieser oder jeder anderen hierin beschriebenen Verfahren würde innerhalb des Umfangs der vorliegenden Erfindung liegen.

[0092] Die Synthese einer gentechnisch hergestellten Kinase wird in Beispiel 4 beschrieben. Im Mittelpunkt der Bemühungen standen Aminosäureseitenketten, die sich innerhalb von ungefähr 4' bezüglich N⁶ von ATP befanden; der Abstand ist jedoch nicht verwunderlich. Reste mit Seitenketten, die sich innerhalb von ungefähr 1', 2', 3', 4' 5', 6', 7', 8', 9', 10' oder kleineren, größeren oder dazwischen liegenden Abständen befanden, sollten als Ziele zur Modifikation betrachtet werden. Aminosäuren mit Seitenketten, die sich innerhalb von ungefähr 3' bis ungefähr 6' befinden wären bevorzugte Ziele. Im Allgemeinen werden Aminosäuren, deren Seitenketten näher liegen, gegenüber denjenigen mit entfernter liegenden Seitenketten bevorzugt, da von diesen zu erwarten wäre, dass sie die größte sterische oder andere Störung mit dem orthogonalen Substituenten auf dem Inhibitor verursachen; und diejenigen mit sehr nahe liegenden Seitenketten wären am meisten bevorzugt.

[0093] Natürlich gibt es heutzutage viele andere Wege, um genetische Sequenzen zu modifizieren und zu exprimieren, als diejenigen, die in den Beispielen verwendet sind, wie zum Beispiel die ortsspezifische Mutagenese, und wir können erwarten, dass in der Zukunft andere Verfahren entwickelt werden. Die Verwendung irgendeines oder aller dieser Verfahren würde innerhalb des Umfangs der vorliegenden Erfindung liegen. Obwohl weiterhin die Verwendung der Gentechnologie heutzutage das bevorzugte Verfahren zur Herstellung derartiger Mutanten ist, ist sie nicht der einzige Weg. Zum Beispiel könnte man eine gentechnisch hergestellte Kinase entwerfen und dann dieses Protein durch bekannte Verfahren der chemischen Peptidsynthese synthetisieren. Oder es könnte möglich sein, ein gegebenes Enzym an einer spezifischen Stelle chemisch so zu mo-

difizieren, dass eine oder mehrere Seitenketten die Größe, Hydrophobie oder andere Merkmale verändern, so dass es leichter ein orthogonales Substrat verwenden kann. Die Verwendung aller derartigen Verfahren liegt innerhalb des Umfangs der Erfindung.

[0094] Beispiel 7 beschreibt das Testen, das zur Bestimmung, ob die gentechnisch hergestellte Kinase ihre Proteinsubstratspezifität bewahrt hat, durchgeführt werden kann. Die Substratspezifität des Proteins vom Wildtyp wird vorzugsweise im wesentlichen beibehalten, wenn es, wie in den Beispielen, das Ziel ist, die gentechnisch hergestellte Kinase zum Untersuchen zu verwenden, auf welche Substrate die Kinase wirkt und zu welchem Grad sie dies tut, oder sie zum Ersetzen oder Ergänzen der entsprechenden Kinase vom Wildtyp in vivo, zum Beispiel durch genetische Gentechnologie, verwendet werden soll. Obwohl es jedoch für derartige Zwecke wichtig ist, dass die Kinase noch dieselben Substrate wie der Wildtyp erkennt, ist es nicht entscheidend, dass sie dies mit derselben Kinetik tut; das heißt, falls sie dies langsamer oder schneller tut, oder zu einem höheren oder geringeren Grad, kann die gentechnisch hergestellte Kinase immer noch einen wesentlichen Wert für derartige Zwecke aufweisen. Falls die gentechnisch hergestellte Kinase nicht dieselben Proteinsubstrate wie das Enzym vom Wildtyp erkennt, kann sie für das Untersuchen des Enzyms vom Wildtyp weniger wertvoll sein, jedoch kann sie immer noch einen beträchtlichen Wert zum Untersuchen der Proteinphosphorylierung und von Kinasen im Allgemeinen aufweisen und würde innerhalb des Umfangs der vorliegenden Erfindung liegen.

[0095] Natürlich müssen die in Beispiel 7 verwendeten speziellen Assays, obwohl sie brauchbar sind, nicht verwendet werden. Der Fachmann wird ohne weiteres in der Lage sein, andere Assays, die eine vergleichbare Information liefern, zu entwickeln oder anzupassen.

[0096] Sobald eine mutierte Kinase hergestellt ist, die ein gegebenes orthogonales Substratanalogon akzeptiert, oder die durch einen gegebenen Inhibitor gehemmt wird, kann sie unter Verwendung der klassischer Analyse der Enzymkinetik charakterisiert werden, wie in den Beispielen 5 und 6 erläutert ist. Man kann ebenfalls, wie in Beispiel 8 gezeigt ist, den Grad untersuchen, zu welchem die Mutante das Analogon verwendet oder von diesem gehemmt werden kann, und, ob das Analogon ein „toter“ (das heißt vollständig wirkungsloser) Inhibitor für das Enzym vom Wildtyp ist. Natürlich sind die in den Beispielen verwendeten Verfahren nicht die einzigen Wege, auf denen die Untersuchungen durchgeführt werden können, und der Fachmann kann leicht veränderte Methoden entwerfen.

[0097] Wie in Beispiel 10 erläutert ist, ist es nicht notwendig, mehrfache Aminosäuresubstitutionen auszuführen, um eine Mutante zur Verfügung zu stellen, die durch einen Inhibitor der vorliegenden Erfindung gehemmt wird. Es könnte auch nur notwendig sein, eine einzelne Aminosäure zu ändern, wie es der Fall für die Mutanten GST-XD4(I338A) und GST-XD4(I338G) ist.

Assay zur Identifizierung von Kinasesubstraten

[0098] Eine sehr einfache Ausführungsform der vorliegenden Erfindung wäre folgendermaßen. Zuerst wird der orthogonale Inhibitor zu zwei Proben der interessierenden Zelle gegeben, die entweder ein zugegebenes Gen für die gentechnisch hergestellte Kinase exprimiert oder die die normale Kopie der interessierenden Kinase exprimiert. Der Inhibitor kann vor, nach oder während der Aktivierung einer Signalkaskade zugegeben werden (wie zum Beispiel permeabilisierte Zellen, Zellextrakte oder Zellen, die diesbezüglich natürlich durchlässig sind). Dann wird ein Verfahren verwendet, das den Nachweis aller phosphorylierten Proteine in einer Zelle oder einer Zellfraktion gestattet, zum Beispiel unter Verwendung von radioaktivem Phosphor [γ - ^{32}P]ATP oder unter Verwendung von monoklonalen Antikörpern, die für phosphorylierte Aminosäuren spezifisch sind, um das Ergebnis der spezifischen Hemmung der interessierenden Kinase zu offenbaren. In den Zellen, die die normale Kopie der interessierenden Kinase exprimieren, werden die Proteinsubstrate der nativen Kinase, selbst in Gegenwart des Inhibitors, markiert werden, wohingegen die Proteinsubstrate der gentechnisch hergestellten Kinase zumindest zu einem geringeren Grad markiert werden; vorzugsweise werden die Proteinsubstrate der gentechnisch hergestellten Kinasen im wesentlichen nicht markiert und besonders bevorzugt werden sie überhaupt nicht markiert.

[0099] Es ist ebenfalls bevorzugt, wenn die der Mutanten entsprechenden Kinase vom Wildtyp, zum Beispiel durch „Knockout“ des Zellgens (der Zellgene) für sie, aus den Zellen entfernt worden ist. Falls die markierten Proteine eines derartigen Assays zusammen mit Kontrollproben untersucht werden, die die Kinase vom Wildtyp, jedoch nicht die mutierte Kinase enthalten, wird die Intensität bestimmter Banden bei der mit der Mutante behandelten Probe im Vergleich zur Kontrolle verringert. Der Unterschied in der Intensität wird vorzugsweise groß sein; besonders bevorzugt wird es Banden geben, die in den die Mutante enthaltenden Proben, die mit

dem Inhibitor behandelt worden waren, fehlen. Dies würde darauf hinweisen, dass die Wildtypform dieser Kinase diese unterschiedlich markierten Proteine phosphoryliert; bei Hemmung der Kinase werden diese Banden nicht markiert.

[0100] Beispiel 10 liefert ein Beispiel eines Verfahrens zum Verwenden einer mutierten Kinase der vorliegenden Erfindung zusammen mit ihrem orthogonalen Substratanalogon oder ihrem Inhibitor, je nach dem vorliegenden Fall, um nachzuweisen, welches die intrazellulären Proteinsubstrate für diese Proteinkinase sind. Die Entwicklung eines derartigen Tests war ein Hauptziel der Forschung, die zu der vorliegenden Erfindung führte.

[0101] Im Allgemeinen würde das in Beispiel 10 und in [Fig. 8](#) beschriebene Verfahren allgemein anwendbar erscheinen; jedoch gibt es viele andere möglichen Methoden, die verwendet werden könnten, sobald eine Mutante hergestellt worden ist, die ein orthogonales Substratanalogon oder einen Inhibitor akzeptiert. Das natürliche Phosphatdonorsubstrat wird zuerst so hergestellt, dass es eine markierte Einheit auf dem endständigen Phosphat enthält, indem zum Beispiel das Phosphat gegen γ -Phosphat ersetzt wird. Dieses Substrat wird dann zusammen mit dem Analogon oder dem Inhibitor zu einer Probe aus lysierten Zellen, Zellextrakten, permeabilisierten Zellen oder Zellen gegeben, die von Natur aus gegenüber dem orthogonalen Nukleotidtriphosphatsubstratanalogon oder gegenüber dem Inhibitor durchlässig sind, und die die mutierte Kinase exprimieren oder zu denen die mutierte Kinase exogen (zum Beispiel durch Mikroinjektion) zugegeben worden ist. Nach Inkubieren unter Bedingungen, die die Hemmung der mutierten Kinase gestatten und/oder die Phosphorylierung ihrer Proteinsubstrate in einem Umfang ohne Inhibierung gestattet, werden dann die markierten Produkte im Vergleich zu denen extrahiert und analysiert, die von einer Kontrollprobe erzeugt wurden, die im wesentlichen auf die gleiche Art, jedoch ohne die Zugabe des Analogons beziehungsweise des Inhibitors behandelt wurde. Verfahren zum Nachweis der markierten Proteine sind gut bekannt und umfassen sowohl quantitative als auch qualitative Verfahren. Zusätzlich können alle Verfahren zum Charakterisieren und Identifizieren von Proteinen zur spezifischen Bestimmung, welches die Proteinsubstrate und welches ihre Funktionen sind, verwendet werden. Schließlich sollte es möglich sein, ein Verständnis dafür zu entwickeln, auf welche Proteinsubstrate jede der verschiedenen Kinasen wirkt, und es sollte möglich sein, die Geheimnisse der zellulären Signaltransduktion in allen Einzelheiten zu offenbaren.

[0102] Sobald ein oder mehrere zellulären Proteinsubstrate identifiziert worden sind, können ähnliche Assays zum Identifizieren von Arzneimitteln oder anderen Verbindungen verwendet werden, die die Aktivität einer gegebenen Proteinkinase auf ein oder mehrere Substrate modulieren kann. Zum Beispiel könnte man kleine Mengen an Lösungen einer Vielzahl derartiger Verbindungen zugeben, um Proben zu testen, die zellfreie Extrakte, mutierte Kinase zusammen mit einem markierten orthogonalen Substratanalogon und/oder einem Inhibitor enthalten. Die markierten Proteine können dann zum Beispiel durch Gelelektrophorese, gefolgt von Autoradioradiographie, identifiziert und mit einer auf dieselbe Weise behandelten doppelt ausgeführten Testprobe verglichen werden, der jedoch kein Arzneimittel oder eine andere Verbindung zugegeben wurde.

[0103] Falls ein Protein in einer Probe mit einer zugegebenen Verbindung zuzüglich einem Substratanalogon und/oder einem Inhibitor nicht markiert ist, welches in einer mit dem Analogon und/oder dem Inhibitor behandelten Probe markiert wird, weist dies darauf hin, dass die zugegebene Verbindung die Kinase zur Phosphorylierung eines Proteins veranlasst hat, die in Abwesenheit der Verbindung nicht auf dieses wirkt, das heißt, die Verbindung moduliert die Aktivität der Kinase für dieses Protein nach oben. Falls alternativ dazu ein markiertes Protein in einer Testprobe auftritt, der die Verbindung oder das Arzneimittel zugegeben wurde, jedoch nicht in einer Testprobe auftritt, der die Verbindung oder das Arzneimittel nicht zugegeben wurde, weist dies darauf hin, dass die zugegebene Verbindung die Kinase an der Phosphorylierung eines Proteins hinderte, auf das sie in Abwesenheit der Verbindung wirkt, das heißt, die Verbindung moduliert die Aktivität der Kinase für dieses Proteinsubstrat nach unten.

[0104] Falls weiterhin für jedes markierte Protein quantitative Messungen, zum Beispiel durch Rasteraudiogramme und Integrieren der Daten, durchgeführt werden, kann die feinere Wirkung auf die Kinaseaktivität nachgewiesen werden. Zum Beispiel kann festgestellt werden, dass ein Protein in Gegenwart oder Abwesenheit einer gegebenen Verbindung vollständiger oder weniger vollständig phosphoryliert wird (das heißt, es wurde weniger dramatisch moduliert). Es kann ebenfalls erwartet werden, dass einige Verbindungen die Kinaseaktivität für einige Proteine nach oben modulieren werden und gleichzeitig die Aktivität für andere nach unten modulieren werden.

Verwendung beim Screening auf Zielkinasen für das Arzneimitteldesign

[0105] Da, wie vorstehend erwähnt wurde, Kinasen bei verschiedenen Krankheiten Schlüsselrollen inneha-

ben, ist es von großer Wichtigkeit, Inhibitoren zu entwickeln, die eine einzelne Kinase vom Wildtyp oder eine Gruppe von Kinasen vom Wildtyp spezifisch hemmen können. Indem die Aktivität dieser mit einer Krankheit verbundenen Kinasen nach unten moduliert wird sollte es möglich sein, die Krankheitssymptome zu verringern oder sogar die Krankheit zu heilen.

[0106] Die große Schwierigkeit, auf die man jedoch bei der Herstellung derartiger Inhibitoren der Kinasen vom Wildtyp trifft, wie es vorstehend kurz beschrieben ist, schränkt jedoch das Potential dieser Methode ein. Das primäre Hindernis ist es, Inhibitoren zu finden, die spezifisch sind und die nicht andere Kinasen als das beabsichtigte Ziel hemmen. Die Gründe für eine derartige Unspezifität sind (i) die Nukleotidtriphosphatbindungsstellen von Kinasen werden bei der Entwicklung äußerst gut beibehalten, und (ii) viele Kinase sind „degeneriert“, das heißt, sie weisen ähnliche Aktivitäten und Spezifitäten auf, die ausreichen, um andere Kinasen ersetzen zu können, die aufgrund von Gendeletion oder einem anderen Grund abwesend oder eine geringere Konzentration in den Zellen aufweisen. Das Problem der Ähnlichkeiten von Bindungsstellen kann in vielen Fällen, zum Beispiel durch sorgfältiges rationales Inhibitor-Design oder durch eine Auswahl von Inhibitoren aus kombinatorischen Bibliotheken auf der Basis der Spezifität überwunden werden. Die Bemühungen jedoch, dies mit einer Kinase durchzuführen, die wirklich zu einer anderen Kinase degeneriert ist, werden wahrscheinlich nicht erfolgreich sind; entweder werden alle der codegenerierten Kinasen selbst durch die besten Kandidaten für die Verbindungen gehemmt werden, oder, selbst wenn das Ziel gehemmt ist, wird es unmöglich sein, dies mit Bestimmtheit zu sagen, weil eine degenerierte Kinase die Aktivität der Gehemmten „übernehmen“ wird.

[0107] Aufgrund dessen gibt es einen Bedarf an einem Weg zum Screening von Kinasen, um zu bestimmen, welche Kinasen vom Wildtyp degeneriert sind und somit für eine spezifische Hemmung wahrscheinlich schlechte Kandidaten sind, und welche nicht degeneriert sind und daher für eine spezifische Hemmung bevorzugte Kandidaten sind. Die vorliegende Erfindung stellt ein derartiges Verfahren zur Verfügung. Die vorliegende Erfindung stellt Mittel zum Erzeugen eines spezifischen, einzigartigen Inhibitors für jede interessierende Kinase zur Verfügung, indem eine Mutante der Kinase hergestellt wird, die spezifisch so entworfen ist, dass sie durch ausgewählte Inhibitor-Kandidaten gehemmt wird, und es werden die Wirkungen dieser Hemmung untersucht.

[0108] Ein Weg, um dies zu erreichen, besteht in dem Testen von Zellen oder Zellextrakten *in vitro*. Zum Beispiel könnte man ATP zu einer derartigen Probe geben, die eine Markierungsart (die „erste Markierung“) auf dem endständigen Phosphat aufweist, und den spezifischen Inhibitor zugeben, der an dem endständigen Phosphat unterschiedlich markiert ist (die „zweite Markierung“). Die Abnahme im Auftreten der zweiten Markierung auf einem gegebenen Proteinsubstrat (um Beispiel entsprechend der Betrachtung durch Gelelektrophorese) weist auf eine spezifische Hemmung der mutierten Kinase hin; und ein Auftreten der ersten Markierung auf demselben Substrat weist darauf hin, dass die anderen Kinasen die Rolle für die Phosphorylierung übernommen haben, wobei deren Grad durch den relativen Grad einer derartigen Markierung gezeigt wird. Stellt sich heraus, dass die gentechnisch hergestellte Kinase spezifisch gehemmt wird und andere Kinasen nicht die Phosphorylierung der Substrate der gentechnisch hergestellten Kinase bei deren Hemmung übernehmen oder zumindest diese nicht vollständig übernehmen, dann ist diese Kinase nicht oder zumindest nicht vollständig degeneriert; sie ist somit wahrscheinlich kein guter Kandidat für die Entwicklung eines spezifischen Inhibitors des Wildtyps zur Verwendung als Arzneimittel zur Behandlung der Krankheit, mit der sie zusammenhängt. Wird jedoch die Hemmung der mutierten Kinase mit einem Inhibitor der vorliegenden Erfindung durch andere Kinasen nicht kompensiert, dann ist sie für die Entwicklung eines Inhibitors der Kinase vom Wildtyp ein bevorzugter Kandidat.

[0109] Ein weiteres bevorzugtes Verfahren eines derartigen Screenings würde in der Erzeugung von Tiermodellen für die interessierende Krankheit und anschließend „Knock-out“ des Gens vom Wildtyp und anschließend Einschleusen eines Gens, „Knock-in“, das eine mutierte Kinase der vorliegenden Erfindung kodiert, in das Genom, mittels Gentechnologie bestehen. Dann kann ein zur Verwendung in der vorliegenden Erfindung geeigneter Inhibitor, vorzugsweise einer, von dem gezeigt wurde, dass er die Mutante *in vitro* hemmt, verwendet werden, um die mutierte Kinase nach unten zu regulieren. Führt die Regulierung nach unten zu einer Abnahme in den Symptomen oder der Erkrankungsrate in dem Tiermodell oder beseitigt sie die Krankheit, dann ist diese Kinase ein bevorzugter Kandidat für die Entwicklung eines spezifischen Inhibitors der Wildtypform.

Anwendungen der Gentherapie

[0110] Die mutierten Kinasen und Inhibitoren, die unter Verwendung der vorliegenden Erfindung identifiziert worden sind, können ebenfalls direkt zur Behandlung von Krankheiten in Menschen und Tieren verwendet werden. Genau wie vorstehend für die Tiermodellsysteme beschrieben ist, könnte eine Gensubstitution bei Pati-

enten mit Krankheiten, die durch diese Kinasen vermittelt werden, verwendet werden. Das Gen vom Wildtyp für eine oder mehrere derartiger Kinasen vom Wildtyp würde beispielsweise durch „Knock-out“-Verfahren aus dem Stand der Technik deletiert werden und dann würden spezifisch hemmbare Mutanten dieser einen oder mehreren Kinasen zu dem tierischen Genom, beispielsweise durch „Knock-in“- oder Gentherapieverfahren, die aus dem Stand der Technik bekannt sind, gegeben werden. Dann könnte der Inhibitor als ein Arzneimittel verwendet werden, um diese eine oder mehrere mutierte Kinasen so nach unten zu modulieren, dass die die Erkrankung zumindest zu einem gewissen Grad besser wird, jedoch könnte der Grad der Aktivität jener Kinasen, von denen festgestellt werden könnte, dass sie für die normale Zellfunktion notwendig sind, beibehalten werden. Natürlich könnten die Kinasen ebenfalls durch eine starke Hemmung im Wesentlichen „ausgeschaltet“ werden, falls sich dies als therapeutisch wirksam erweist. Wird weiterhin festgestellt, dass sich die Krankheit durch einen Zeitraum mit einer Regulation nach unten oder mit einem Ausgeschaltet sein stark bessert könnte die Verabreichung des Inhibitors unterbrochen werden und es könnte gut sein, dass die Krankheit nicht wiederauftritt oder sich verschlimmert. Falls nicht, dann könnte die Hemmung langfristig oder sogar auf dauerhafter Basis unterbrochen werden und man könnte die Mutanten an Stelle der Kinase vom Wildtyp für das restliche Leben des Patienten wirken lassen. Da die spezifischen Inhibitoren der vorliegenden Erfindung in der Umgebung nicht vorhanden sind, sollten sich die mutierten Kinasen genauso wie die vom Wildtyp verhalten (abgesehen von dem Ausmaß, zu dem die Gentechnologie ihre Aktivität oder Kinetik verändert haben könnte). Und falls die Krankheit wieder auftreten oder in Zukunft wiederauflodern sollte, könnte der Patient wieder mit dem Inhibitor behandelt werden, ohne, dass der Genaustausch wiederholt werden muss.

Andere Multi-Substrat-Enzyme

[0111] Die vorliegende Erfindung wird genauso gut für andere Multi-Substrat-Enzyme funktionieren, die einen Teil oder ein gesamtes Substrat, das hier Donor genannt wird, zu einem anderen Substrat, das hier Empfänger genannt wird, übertragen; und es gibt sicherlich mehrere solche Enzyme, die noch zu entdecken sind. In jedem Fall wird dem Fachmann, der die vorliegende Beschreibung studiert hat, die Anwendbarkeit der vorliegenden Erfindung auf derartige Enzyme klar sein. Die nahe liegenden Aufgaben für einen derartigen Fall sind ziemlich zu denjenigen ähnlich, die hier ausführlich für die Kinasen beschrieben sind. Zuerst ist es notwendig zu identifizieren, welches das Donorsubstrat ist, und/oder die Verbindungen zu identifizieren, die diese Kinase hemmen können, selbst wenn sie für diese Kinase nicht spezifisch sind.

[0112] Es ist zweitens notwendig zu erwägen, wo ein voluminöser Substituent an das Substrat oder den Inhibitor so addiert werden könnte, dass er nicht so leicht an die Kinase vom Wildtyp binden wird oder vorzugsweise im wesentlichen nicht an die Kinase vom Wildtyp binden wird und vorzugsweise überhaupt nicht binden wird. Natürlich ist es im Falle von Kinasen oder anderen Multi-Substrat-Enzymen, wie vorstehend beschrieben, nicht unbedingt notwendig, die Auswahl, welche Analoga von diesen herzustellen sind, einzuschränken; man kann eine Vielzahl von ihnen herstellen, wobei sogar einige eingeschlossen werden, für die es unwahrscheinlich scheint, dass sie ideal sind, und durch Screening bestimmen, welches oder welche die besten sind. Eine weitere Anleitung im Hinblick darauf, wie dies durchzuführen ist, kann aus den nachstehenden Beispielen ersehen werden. Der Hemmungssassay, dessen Ergebnisse in [Fig. 6](#) gezeigt sind, ist ein nicht einschränkendes Beispiel für einen Assay, der für ein derartiges Screening besonders gut geeignet ist.

[0113] Der dritte Schritt besteht aus der gentechnischen Herstellung der Kinase so, dass eine oder mehrere Aminosäuren an dem dreidimensionalen Ort, an dem man die Aminogruppe erwarten würde, wenn das Analogon nicht bindet, gegen Aminosäuren mit weniger voluminösen Seitenketten ersetzt werden, wodurch für die voluminöse Einheit des Inhibitors „Raum geschaffen“ wird. Die Schritte zwei und drei können natürlich in umgekehrter Reihenfolge ausgeführt werden.

[0114] Beispielsweise wären Transferaseenzyme besonders interessante Kandidaten für eine Untersuchung unter Verwendung der vorliegenden Erfindung. Man könnte, den hierin zur Verfügung gestellten Lehren folgend, mutierte Transferasen herstellen, die orthogonale Inhibitoren akzeptieren, und diese könnten zusammen zum Identifizieren der direkten Substrate einer speziellen Transferase in einer großen Familie homologer Transferasen durch die für die Kinasen vorstehend beschriebenen Verfahren verwendet werden. Die Familie der Methyl-Transferasen wäre offensichtlich von Bedeutung und könnte ziemlich einfach unter Verwendung der hierin zur Verfügung gestellten Verfahren untersucht werden. Diese Enzyme verwenden alle denselben auf einem Nukleotid basierenden Cofaktor, S-Adenosylmethionin (AdoMet), als einen Methylgruppen-(CH₃) Donor. Die verschiedenen Mitglieder der Familie können die Methylgruppe von AdoMet auf eine große Vielzahl von zellulären Komponenten, wie zum Beispiel Proteine (wobei in diesem Fall die Methylgruppe an Arginin-, Aspartat- und Glutamatseitenketten addiert wird), DNA (wobei in diesem Fall die Methylgruppe an die C-5-Position von Cytosin oder an die N-7-Position von Guanin addiert wird), auf Komponenten der Zellmembrankom-

ponenten, wie zum Beispiel Phospholipide, und ebenfalls auf eine Zahl kleiner Amin-enthaltender Hormone übertragen. Für diese mannigfaltige Familie von Enzymen werden ebenfalls viele neue Ziele identifiziert. Die vorliegende Erfindung stellt die Gelegenheit zur Verfügung, die überaus komplexen Zellmechanismen, die diese Enzyme ausführen, zu entschlüsseln.

[0115] Zum Beispiel könnte man einen Satz von AdoMet-Analoga synthetisieren, die zusätzliche voluminöse hydrophobe Gruppen an der N-6-Position oder an anderen Ringpositionen enthalten, die die Analoga orthogonal machen würden, und die daher im Vergleich zum natürlichen Substrat nicht so leicht von Methyltransferasen vom Wildtyp akzeptiert werden; und die Struktur in der Region der übertragenen Methylgruppe könnte so geändert werden, dass die Methylgruppe gegenüber einem Transfer chemisch beständiger ist; oder stattdessen könnte zum Beispiel S-Adenosylcystein als Ausgangsverbindung verwendet werden. Unter Verwendung der Kristallstrukturen der DNA-Methyltransferase M.HhaI und der Catechinmethyltransferase Catechin-O-methyltransferase (COMT) kann man diejenigen Aminosäuren in der Adeninbindungstasche identifizieren, die Kandidaten für eine Mutation sind, wie wir dies für die Proteinkinasen getan haben; und der Durchschnittsfachmann sollte ohne weiteres in der Lage sein, einen Satz von zu mutierenden Resten zu identifizieren, um die voluminösen hydrophoben Gruppen von einem oder mehreren der orthogonalen Substrate anzupassen.

[0116] Man könnte beispielsweise große hydrophobe Gruppen zu kleineren Alanin- oder Glycinresten mutieren oder Wasserstoffbrücken-bildende Aminosäuren gegen andere ersetzen, die die orthogonalen Purinanaloga von AdoMet ergänzen. Natürlich können unzählige andere mögliche Mutationen genauso gut funktionieren und alle würden innerhalb des Umfangs der vorliegenden Erfindung liegen. Zusätzlich ist aus Sequenzanordnungen und Kristallstrukturen von Methyltransferasen bekannt, dass sie eine gemeinsame katalytische Domänenstruktur (70) aufweisen; daher ist diese Methode nicht auf M.HhaI und COMT beschränkt, sondern sollte auf andere Methyltransferasen genauso anwendbar sein.

[0117] Nachdem eine Methyltransferasenmutante, die einen orthogonalen Inhibitor akzeptiert, identifiziert worden ist, kann anschließend radioaktiv markiertes AdoMet synthetisiert werden, das eine C-14-markierte Methylgruppe enthält, die an das Schwefelatom von AdoMet gebunden ist. Wird dieses radioaktiv markierte Analogon zu Zellen gegeben, die eine mutierte Methyltransferase exprimieren, werden die direkten Substrate (zum Beispiel Protein oder DNA oder Polyamine) aller Methyltransferasen in der Probe mit der C-14-Methylgruppe spezifisch markiert werden. Wird dies jedoch in Gegenwart des orthogonalen Inhibitors ausgeführt, werden die spezifischen Substrate für die interessierende Methyltransferase im Vergleich zu der Probe, die keinen Inhibitor enthält, weniger markiert werden; sie werden vorzugsweise im wesentlichen nicht markiert werden und besonders bevorzugt werden sie überhaupt nicht markiert werden. Auf diese Weise oder durch die Verwendung anderer hierin beschriebener Verfahren zur Untersuchung der Kinasen können direkte Substrate von Methyltransferasen identifiziert werden, die bei Krebs, der embryonale Entwicklung, der Chemotaxis von polymorphkerniger Leukozyten oder bei neurologischen Störungen von Bedeutung sind. Zusätzlich können dann die Verfahren der vorliegenden Erfindung zur Bestimmung verwendet werden, ob Verbindungen identifiziert werden können, die die Aktivität des Enzyms modulieren. Mehrere andere Aspekte der vorliegenden Erfindung, obwohl sie vielleicht hier nicht beschrieben sind, könnten ebenfalls auf Methyltransferasen und ebenfalls auf andere Multi-Substrat-Enzyme angewandt werden.

[0118] Wie dem Fachmann klar sein wird, könnte die vorliegende Erfindung auf andere Multi-Substrat-Enzyme unter Verwendung ähnlicher Methoden entsprechend angewandt werden.

Begriffe

[0119] Wie es im Falle der Biotechnologie allgemein der Fall ist, erforderte die Beschreibung der vorliegenden Erfindung die Verwendung einer beträchtlichen Zahl von Fachbegriffen. Obwohl es unpraktisch ist dies erschöpfend auszuführen, werden hier für einige dieser Begriffe zur Erleichterung der Bezugnahme Definitionen zur Verfügung gestellt. Ebenfalls erscheinen hierin Definitionen für andere Begriffe an anderer Stelle und diese werden hier nicht wiederholt. Es ist wichtig zu beachten, dass es nicht beabsichtigt ist, dass die hier oder an anderer Stelle hierin definierten Begriffe eine Bedeutung erhalten sollen, die eine andere ist, als diejenige, mit der sie der Fachmann bei Verwendung in dem Fachgebiet verstehen würde, und daher wird darauf gedrängt, dass ebenfalls andere Quellen bei der Interpretierung der Bedeutung dieser Ausdrücke und derjenigen, die an anderer Stelle hierin definiert sind, berücksichtigt werden. Jedoch sollten die hier und an anderer Stelle hierin zur Verfügung gestellten Definitionen immer bei der Bestimmung des beabsichtigten Umfangs und der Bedeutung der definierten Begriffe berücksichtigt werden.

[0120] Die Verwendung des Begriffs „orthogonal“ soll hier eine Verbindung bedeuten, die zu dem natürlichen

Substrat für ein gegebenes Enzym oder zu einem Inhibitor der Wildtypform des Enzyms strukturell und/oder geometrisch ähnlich ist, jedoch Unterschiede in der chemischen Struktur aufweist, die bewirken, dass die Verbindung weniger fähig ist, an die Wildtypform des Enzyms als an das natürliche Substrat zu binden. Mit „natürlichem“ Substrat meinen wir das Substrat, das von der Wildtypform dieses Enzyms verwendet wird. Die orthogonalen Inhibitoren der vorliegenden Erfindung können hier auf verschiedene Weisen bezeichnet werden; zum Beispiel werden sie manchmal als „modifizierte Substrate“, „modifizierte Inhibitoren“, „Analoge“, „Derivate“, nur als „Substrate“ oder „Inhibitoren“ und vielleicht ebenso mit anderen Begriffen bezeichnet. Jedoch ist in jedem Fall die gleiche Bedeutung beabsichtigt. Natürlich wird die Bedeutung von „orthogonal“ und dessen Synonymem in den Beschreibungen der vorstehend zur Verfügung gestellten Erfindung weiterhin erklärt.

[0121] Die mutmaßlichen orthogonalen Substrate und Inhibitoren der hierin beschriebenen Ausführungsformen der Erfindung wurden durch Addition voluminöser Substituenten an ein Atom auf dem natürlichen Substrat beziehungsweise einem bekannten Kinaseinhibitor hergestellt. Es ist jedoch ebenfalls möglich, zum Beispiel durch Herstellung eines Analogons, dem ein oder mehrere Atome oder Substituenten fehlen, die in dem natürlichen Substrat vorhanden sind, ein orthogonales Substrat herzustellen, das kleiner als ein bekannter Inhibitor oder das natürliche Substrat ist. Mit derartigen mutmaßlichen orthogonalen Substraten oder Inhibitoren könnte man das Enzym so mutieren, dass es eine oder mehrere Aminosäuren mit Seitenketten enthält, die voluminöser sind, als diejenigen, die in der Aminosäuresequenz vom Wildtyp gefunden wurden, so dass bei Bindung des orthogonalen Substrats oder Inhibitors diese voluminöseren Aminosäureseitenketten den durch die fehlenden Atome oder Substituenten zusätzlich erzeugten Raum ausfüllen oder teilweise ausfüllen. Es wäre zu erwarten, dass auf diese Weise die Mutante an das orthogonale Substrat oder den Inhibitor binden und/oder von diesem gehemmt werden würde, jedoch das normale Substrat im wesentlichen nicht verwenden würde, weil die addierten voluminösen Aminosäuren eine sterische Hinderung für deren Bindung darstellen. Eine derartige Methode würde eine hochselektive Kontrolle der resultierenden Mutante gestatten.

[0122] Es ist wichtig, nicht zu vergessen, dass, obwohl die Substrate und Inhibitoren der Beispiele hierin vom nicht kompetitiven Typ sind, dies nicht als eine Einschränkung des Umfangs der vorliegenden Erfindung angesehen werden sollte. Viele verschiedene Typen von Enzymsubstraten und Inhibitoren sind bekannt, zum Beispiel kompetitive, nicht kompetitive, unkompetitive, „Suizid“-Inhibitoren, usw. Kompetitive Inhibitoren konkurrieren mit einem Substrat um dessen Bindungsstelle, da jedoch der Inhibitor nicht an der katalytischen Reaktion teilnimmt, die dieses Enzym ausführt, verlangsamt er die Katalyse. Nicht kompetitive Inhibitoren binden an die aktive Stelle, dann werden sie jedoch kovalent oder ionisch an die Proteinstruktur des Enzyms gebunden, so dass sie sich nicht ablösen können. Sie hemmen daher die Katalyse, indem sie Enzymmoleküle aus der gesamten Reaktion herausnehmen. Ausführlichere Beschreibungen von diesen und anderen kompetitiven Mechanismen können in einer Vielzahl von Quellen (zum Beispiel 72) gefunden werden. Durch Anwendung des Verständnisses aus dem Stand der Technik hinsichtlich derartiger Mechanismen auf das Design von Inhibitoren der vorliegenden Erfindung könnten alle derartigen Typen von Inhibitoren hergestellt werden.

[0123] Zum Beispiel könnte ein Analogon, das binden aber nicht reagieren kann, für eine kompetitive Hemmung sorgen und ein Analogon, das bei Bindung kovalent an das Enzym gebunden wird, wäre ein nicht kompetitiver Inhibitor, das heißt, ein Gift.

[0124] Der Begriff „homolog zu“ wurde zur Beschreibung verwendet, wie Information darüber, wie ein Enzym modifiziert werden soll, aus der Information hinsichtlich der dreidimensionalen Struktur anderer verwandter Enzyme abgeleitet werden kann. Wie dem Fachmann gut bekannt ist, weist ein Teil eines Enzyms, das zu einem Teil eines zweiten Enzyms „homolog“ ist, eine Proteinsequenz auf, die mit derjenigen des zweiten Enzyms verwandt ist. Diese Verwandtschaft besteht darin, dass sie eine Anzahl von Aminosäuren an demselben Ort bezüglich ihrer gegenseitigen Sequenzen aufweisen. Zum Beispiel weisen die gedachte Sequenz Asp-Met-Phe-Arg-Asp-Lys-Glu und die gedachte Sequenz Asp-Met-Ile-Arg-Glu-Lys-Asp vier Aminosäuren an demselben relativen Ort auf und drei sind unterschiedlich, und man würde von ihnen sagen, dass sie homologe Sequenzen aufweisen. Beachte, dass die drei Aminosäuren, zwischen den Ketten unterschiedlich sind, „konservative“ Unterschiede darin sind, dass die Substitutionen in der zweiten Sequenz im Vergleich zur ersten Aminosäuren sind, die ähnliche Funktionalitäten auf ihren Seitenketten aufweisen. Zum Beispiel weisen Glu und Arg beide aliphatische Seitenketten mit endständigen carbocyclischen Säuregruppen auf und sowohl Phe als auch Ile sind hydrophob. Obwohl dies bei homologen Proteinsequenzen häufig der Fall ist, muss es nicht der Fall sein und diese zwei gedachten Sequenzen würden immer noch als homolog angesehen werden, selbst, wenn die Unterschiede nicht konservativ wären.

[0125] Ob eine spezielle Sequenz oder Domäne zu einer anderen homolog ist kann nicht mit einer charakteristischen Eigenschaft, zum Beispiel durch Verwendung von Prozentsätzen, angegeben werden, da es keinen

derartigen absoluten Maßstab gibt; wir müssen es daher dem Stand der Technik überlassen, zu definieren, welche Sequenzen als „homolog“ oder nicht als „homolog“ betrachtet werden. Der Verweis 71 gibt einen guten Überblick darüber, welche Domänen der bekannten Kinasen, entsprechend dem Stand der Technik, als „homolog“ anzusehen sind. Zusätzlich, obwohl der Stand der Technik damit im Allgemeinen nicht übereinstimmen sein könnte, wird hier beabsichtigt, das Sequenzen, die zueinander identisch sind, ebenfalls als zueinander „homolog“ anzusehen.

[0126] Der Begriff „Domäne“ ist ebenfalls aus dem Stand der Technik gut bekannt und betrifft eine Region in einem Protein, das als eine spezielle Funktionalität aufweisend identifiziert worden ist. Zum Beispiel wurden die drei Domänen in Proteinkinasen an anderer Stelle hierin diskutiert und ihre funktionellen Rollen wurden diskutiert. Wie es häufig der Fall bei den Kinasen ist, werden unterschiedliche Enzyme derselben Familie dieselbe Zahl an Domänen aufweisen, wobei jede denselben Funktionen dient, und sie sind häufig (aber wahrscheinlich nicht immer) in derselben Reihenfolge entlang der Proteinsequenz angeordnet. Wie es im Falle der Kinasen interessanterweise der Fall ist, kann ein Enzym eine von einem anderen Enzym unterschiedliche Länge einer Proteinsequenz zwischen seinen Domänen aufweisen. Da jedoch die Domänen von zwei verwandten Enzymen im Allgemeinen (jedoch wahrscheinlich nicht immer) zueinander homolog sind, behindert dies im Allgemeinen nicht die Identifikation der entsprechenden Domänen.

[0127] Bei der Beschreibung von umfangreicheren Aspekten der vorliegenden Erfindung wird der Ausdruck „Multi-Substrat“ verwendet. Dies soll sich auf Enzyme beziehen, die zwei oder mehrere Substrate binden. Die Multi-Substrat-Enzyme, die hier von besonderem Interesse sind, sind diejenigen, die katalytisch zumindest einen Teil eines Substrats an zumindest ein anderes Substrat binden. Die Kinasen und die Transferasen sind nur zwei Familien derartiger Multi-Substrat-Enzyme, und der Fachmann wird ohne weiteres erkennen, dass es andere derartigen Enzyme und Enzymfamilien gibt.

[0128] Der Begriff „erkennen“ wird hier manchmal verwendet, um die Fähigkeit eines Substrats zur spezifischen Bindung an die aktive Stelle auf einem Enzym zu beschreiben. Dies bezieht sich einfach auf die Tatsache, dass ein Substrat eines Enzyms (oder manchmal Substratderivate oder sogar vollständig verschiedene Verbindungen, die das Substrat nachahmen) mit der aktiven Stelle des Enzyms in Kontakt kommen und an diese binden kann, andere Verbindungen dies jedoch nicht können. Dieses Konzept ist aus dem Stand der Technik gut bekannt. Enzymologen sagen häufig, dass das Enzym eine Affinität für dessen Substrat aufweist, oder dass das Substrat eine Affinität für das Enzym aufweist. Sie sagen ebenfalls, dass ein Enzym eine „Substratspezifität“ aufweist. Dies alles beschreibt dasselbe Phänomen.

[0129] Ein verwandter Ausdruck ist der Ausdruck „binden“. Im Allgemeinen bindet oder haftet ein Inhibitor an einer aktiven Stelle durch eine oder mehrere hydrophobe, hydrophile, Wasserstoff- und/oder ionische Bindungen, oder im Falle von nicht kompetitiven Inhibitoren, durch kovalente Bindungen.

[0130] Obwohl das komplexe Verständnis in dem Fachgebiet, hinsichtlich der Inhibitorbindung und der Gründe für eine Hemmung, von Interesse sein kann, ist ein derartiges Verständnis nicht wesentlich, um die vorliegende Erfindung zu verstehen. Es ist ausreichend, einfach zu beachten, dass die Bindung durch einen Inhibitor eine Hemmung der katalytischen Reaktion verursacht.

[0131] Die Begriffe „mutiert“ und „gentechnisch hergestellte Form“, wenn sie zur Beschreibung der Enzyme der vorliegenden Erfindung verwendet werden, bedeuten einfach, dass sie Sequenzen aufweisen, die im Vergleich zu der Sequenz des Enzyms vom Wildtyp eine an einer oder mehreren Positionen davon unterschiedliche Aminosäure aufweisen. Bei der Beschreibung derartiger Mutanten zeigen zwei Buchstaben, die durch eine Zahl getrennt sind, die ausgeführten Aminosäuremutationen an. Die Buchstaben sind Einbuchstabencodes für Aminosäuren, und die Zahlen sind die Positionen von Aminosäureresten in dem intakten Enzym vom Wildtyp. Zum Beispiel ist GST-XD4 ein Fusionsprotein, das ein Fragment, XD4, enthält, das dieselbe Sequenz wie ein spezifischer Teil des Wildtyps v-Src aufweist. In der Bezeichnung GST-XD4(V232A, I338A) wurde das Valin in der Sequenz des v-Src-Fragments XD4, das die Position 323 in der vollständigen v-Src-Sequenz des Wildtyps darstellt, gegen Alanin ersetzt und das Isoleucin in dem XD4-Fragment, das die Position 338 in der vollständigen v-Src-Sequenz des Wildtyps darstellt, wurde ebenfalls gegen Alanin ersetzt.

[0132] Wie in den nachstehenden Beispielen beschrieben ist, haben wir unter Verwendung der vorliegenden Erfindung eine v-Src-Kinase entworfen, hergestellt und deren Verwendbarkeit gezeigt, wobei die v-Src-Kinase eine hohe Spezifität bezüglich eines synthetischen Inhibitors aufweist, während sie ihre Wildtyp-Spezifität bezüglich Tyrosin-enthaltender Peptide und Proteine beibehält, wodurch unsere ursprünglichen Forschungsziele erfüllt werden. Durch Ausnutzen der hochkonservativen Natur der ATP-Bindungsstelle über die Kinasen-

perfamilie hinweg und der Verfügbarkeit von Strukturinformation von anderen Proteinkinasen, waren wir in der Lage, ohne genaue strukturelle Information über v-Src selbst, eine neue Hemmungsspezifität für v-Src gentechnisch herzustellen. Die Verwendung einer nicht verwandten Kinase als Entwurf zum Design von orthogonalen ATP-Analoga, um die direkten zellulären Substrate von v-src zu markieren, und die Herstellung von Inhibitoren aus ähnlichen Quellen, zeigt, dass diese Methode ebenfalls für andere Kinasen funktionieren sollte.

BEISPIELE

[0133] Die folgenden Beispiele werden zur Beschreibung und Erläuterung der vorliegenden Erfindung bereitgestellt. Als solches sollten sie nicht zur Einschränkung des Umfangs der Erfindung gedacht sein. Der Fachmann wird leicht beurteilen können, dass viele andere Ausführungsformen ebenfalls in den Umfang der Erfindung fallen, wie sie hier vorstehend und in den Ansprüchen beschrieben ist.

BEISPIEL 1

Synthese von ATP-Analoga

[0134] Zwölf verschiedene orthogonale ATP-Analoga wurden synthetisiert. [Fig. 2](#) ist eine schematische Darstellung ihrer Struktur. Die Figur zeigt Adenosintriphosphat (ATP), wobei ein „X“ an die Position 6 gebunden ist; und in dem Kasten darunter werden schematische Darstellungen für die zwölf Seitenketten zur Verfügung gestellt, die in jedem der in den Beispielen beschriebenen ATP-Analoga (auf die immer durch die in Fettdruck ausgeführten Nummern 1–12 verwiesen wird) den Platz von „x“ einnehmen. Diese Analoga sind:

1-N ⁶ -(methoxy)ATP	7-N ⁶ -(pyrrolidino)ATP
2-N ⁶ -(ethoxy)ATP	8-N ⁶ -(cyclopentyl)ATP
3-N ⁶ -(acetyl)ATP	9-N ⁶ -(cyclopentyloxy)ATP
4-N ⁶ -(i-propoxy)ATP	10-N ⁶ -(piperidino)ATP
5-N ⁶ -(benzyl)ATP	11-N ⁶ -(cyclohexyl)ATP
6-N ⁶ -(benzyloxy)ATP	12-N ⁶ -(cyclohexyloxy)ATP

[0135] Die Analoga 1, 2, 4, 6, 9 und 12 wurden über Dimroth-Umlagerung der entsprechenden N¹-Alkoxyadeninderivate in vier Schritten, ausgehend von Adenosin, gemäß dem Verfahren von Fuji *et al.* (43) synthetisiert. Das Analogon 5 wurde ähnlich über Dimroth-Umlagerung von N¹-Benzyladenosin (44) synthetisiert. Das Analogon 3 wurde über Schützen der Adenosinhydroxylgruppen als Trimethylsilylether in situ und nachfolgender Behandlung mit Acetylchlorid, gemäß McLaughlin *et al.* (45), hergestellt.

[0136] Die Analoga 7, 8, 10 & 11 wurden über Behandlung von 6-Chlorpurinribosid (Aldrich) mit Pyrrolidin, Cyclopentylamin beziehungsweise Piperidin & Cyclohexylamin (46) synthetisiert.

[0137] Die Triphosphatsynthese wurde gemäß dem Verfahren von Ludwig (47) mit Ausnahme der Herstellung von Pyrophosphat, ausgeführt. Dementsprechend wurde Bis-tri-N-butylammoniumpyrophosphat hergestellt, indem 1 Äquivalent Pyrophosphorsäure mit 2 Äquivalenten Tributylamin in einer (1:1) Mischung von Wasser:Ethanol gemischt wurde bis eine homogene Lösung erhalten wurde. Das Lösungsmittel wurde unter Vakuum bis zur Trockene entfernt und das Pyrophosphat wurde über Nacht über P₂O₅ gelagert.

[0138] Alle nicht radioaktiven Nukleotide wurden durch ¹H-NMR, spektrale Massenanalyse und HPLC (Rainin # 83-E03-ETI) mit starkem Anionenaustausch charakterisiert.

[0139] [γ -³²P] N⁶-(cyclopentyl)ATP wurde gemäß dem Verfahren von Hecht und Kozarich (48) synthetisiert. Das radioaktiv markierte Analogon wurde durch DEAE (A-25) Sephadex (Pharmacia)-Säulenchromatographie gereinigt und das Triphosphat wurde durch Coinjektion des radioaktiv markierten Materials mit einer authentischen Probe von N⁶-(cyclopentyl)ATP auf einer SAX-Anionenaustauscher-HPLC-Säule (Rainin) (linearer Gradient von 5–750 mM Ammoniumphosphat bei einem pH-Wert von 3,9 in 10 min bei 9,5 mL/min) identifiziert. Die chemische Ausbeute der Reaktion variierte von 70 % bis 80 %.

BEISPIEL 2

Screening von Nukleotidanaloga

[0140] Zur Identifizierung von Verbindungen, die von allen vorkommenden zellulären Kinasen (53) als Subst-

rate nicht akzeptiert werden würden, screenen wir ein Feld synthetischer A*TP-Analoga in einem murinen Lymphozytenlysats (CF), das reich an Proteintyrosinkinasen ist (13).

[0141] Die Assays wurden unter Verwendung von Splenozyten (8–30 Wochen alte männliche und weibliche C57/B6-Mäuse von der Princeton University Animal Facility) durchgeführt, die isoliert und in RPMI-1640-Medium, das 5 % Rinderkälberserum (BCS), 1 % Hepes und DNaseI (1 µg/mL) enthielt, gewaschen wurden. Rote Zellen wurden bei 4 °C durch Behandlung mit 17 mM Tris-Ammoniumchlorid, pH-Wert 7,2, gewaschen. Die Zellen wurden auf Eis während 10 min in 1 mM Hepes, pH-Wert 7,4, 5 mM MgCl₂, Leupeptin (10 µg/mL), Aprotinin (10 µg/mL) und 100 µM PMSF, gemäß dem Verfahren von Fukazawa et al. (51) hypotonisch lysiert. Nach Verwirbeln und Zentrifugation bei 500xg wurde der Überstand gesammelt. Die Zellen wurden bei 4 °C während 20 min zum Abschwächen des Grundniveaus der Proteinphosphorylierung gelagert, worauf der Puffer auf 20 mM Hepes, pH-Wert 7,4, 10 mM MgCl₂ und 1 mM NaF eingestellt wurde. Dann wurde Natriumvanadat (100 µM) zum Hemmen der Aktivität von Phosphotyrosinphosphatasen zugegeben.

[0142] Jedes Nukleotidtriphosphat wurde auf eine Endkonzentration von 100 µM bis 5×10^6 Zelläquivalenten zugegeben und bei 37 °C während 5 min inkubiert, worauf 4X Laemmli-Gelbeladungspuffer zu dem Zelllysats zum Quenchen der Reaktion zugegeben wurden. Die Proteine wurden durch 12,5 % SDS-PAGE getrennt und auf Protran BA85 (Schleicher-Schuell) überführt. Der Blot wurde mit dem Antiphosphotyrosin monoklonalen Antikörper 4G10 (Upstate Biotechnology) sondiert und der gebundene Antikörper wurde über verstärkte Chemilumineszenz (Kat. 34080, Pierce), nach Behandlung mit HRP-gekoppeltem Ziege-Antimausantikörper (VWR Kat. 7101332) entsprechend den Anweisungen des Herstellers, nachgewiesen.

[0143] Die Ergebnisse sind in [Fig. 3](#) dargestellt, die ein Antiphosphotyrosinprotein-Immunoblot ist, der das Niveau der Proteintyrosinphosphorylierung, auf die Behandlung eines murinen Lymphozytenzelllysats (CF) mit 100 µM ATP oder A*TPs (1–12) folgend, zeigt. Das Zelllysats umfasst die Tyrosinkinasen Src, Fyn, Lck, Lyn, Yes, Fgr, Hck, Zap, Syk, Btk, Blk und andere Tyrosinkinasen, die in B- und T-Lymphozyten, Makrophagen und follikulären dendritischen Zellen (13) vorhanden sind. Molekulare Größenstandards (in Kilodalton) sind angezeigt. Die A*TPs, die die kleinsten N⁶-Substituenten, 1 (Methoxy), 2 (Ethoxy) und 3 (Acetyl) enthielten, zeigten eine gewisse Fähigkeit, als zelluläre Tyrosinkinasesubstrate zu dienen ([Fig. 3](#), Spuren 3–5). Die A*TPs mit sterisch anspruchsvollen N⁶-Substituenten, 4 (i-Propoxy), 5 (Benzyl) und 6 (Benzyloxy), und alle Analoga, die cyclische aliphatische Substituenten (7–12) enthielten, zeigten wenig oder keine Proteinphosphorylierung ([Fig. 3](#), Spuren 6–8, 11–16).

[0144] Zum Testen auf eine mögliche Metathese orthogonaler A*TPs (7–12) mit zellulären ADP, um A*DP und ATP zu ergeben, fügten wir 1 mM ADP zu Zelllysatskinasereaktionen hinzu, die zu den in [Fig. 3](#) gezeigten identisch waren; (Daten sind nicht gezeigt); das Muster des Phosphoproteins war dasselbe, was darauf hinweist, dass in einem vollständigen Zelllysatsystem keine signifikante Metathese von A*TP stattfindet.

[0145] Basierend auf diesen Ergebnissen scheint es, dass die Analoga (7–12) für Tyrosinkinasen vom Wildtyp „tote Substrate“ sind, das heißt, die Substrate vom Wildtyp akzeptieren diese im wesentlichen nicht oder überhaupt nicht als Donorsubstrate. Folglich wurden diese Analoga als besonders bevorzugte Ziele für die Rekonstruktion der Nukleotidbindungsstelle von v-Src ausgewählt.

BEISPIEL 3

Design der mutierten v-Src

[0146] Bis jetzt wurden keine Kristallstrukturen von irgendwelchen Tyrosinkinasen in einer aktiven Konformation gelöst, obwohl mehrere Strukturen inaktiver Kinasen gelöst worden sind (54, 55). Jedoch sind zwei Kristallstrukturen von katalytisch aktiven ser/thr-Kinasen gelöst worden (56, 57). Zwischen den katalytischen Domänen der ser/thr- und der Tyrosinkinase gibt es einen hohen Grad an funktionaler Homologie, wie durch Affinitätsmarkierung des identischen katalytisch aktiven Lysinrests in beiden Kinasefamilien (K72 in cAMP-abhängiger Kinase (PKA), K295 in v-Src) gezeigt wurde (58, 58). Eine Inspektion der Kristallstrukturen der PKA (56) und Cyclinabhängigen Kinase-2 (CDK2)-CyclinA (57) offenbarte zwei Aminosäureseitenketten innerhalb einer Kugel von 4' der N⁶-Aminogruppe von gebundenem ATP: V104/M120 (PKA) und V64/F80 (CDK2) (60).

[0147] [Fig. 4](#) zeigt eine Nahaufnahme der ATP-Bindungsstelle in der cAMP-abhängigen Proteinkinase (PKA), die an ATP gebunden ist. Drei Reste innerhalb einer Sphäre von 4' des N⁶-amins von ATP (Val104, Met120 und Glu121) und der unbedingt erforderliche katalytische Lysinrest (Lys72) sind in einer Kugel-Stab-Modell-darstellung gezeigt. Der Rest des Proteins ist in einem Bandformat gezeigt. Diese Figur wurde durch Eingeben

der Ausgabe von Molscript in das Raster3D-Wiedergabeprogramm erzeugt (68, 69). Es ist zu beachten, dass in dem Modell die Seitenkette von Glu121 aus der Adeninringbindungsregion nach außen gehend angezeigt wird und Glu121 daher kein Kandidat für eine Änderung war.

[0148] Die Sequenzausrichtung der ATP-Bindungsregionen von PKA (SEQ ID Nr.1), CDK2 (SEQ ID Nr.2) und v-Src (SEQ ID Nr. 3) sind nachstehend gezeigt. Die fettgedruckt gezeigten Reste entsprechen den Aminosäuren mit Seitenketten in einer Kugel von 5 der N^6 -Aminogruppe von Kinase-gebundenem ATP.

Unterdomäne

IV

V

PKA (SEQ ID Nr.1) (99)NFPFL**V**KLEFSFKDNSNLYM**V**MEYVPG(125)

CDK2 (SEQ ID Nr.2) (59)NHPNIVKLLDVIHTENKLYLVFEFLHQ(85)

v-Src (SEQ ID Nr.3)(318)RHEKL**V**QLYAVVSE-EPIYIVIEYMSK(343)

[0149] Basierend auf der funktionalen Ähnlichkeit zwischen den vorstehend beschriebenen Kinasen entschlossen wir uns, die Positionen V323 und I338 in der katalytischen Domäne von v-Src, die V104/M120 in PKA & V64/F80 in CDK2 entspricht, zu mutieren. Durch Mutation dieser Reste zu Alanin hofften wir, eine zusätzliche „Tasche“ in der Nukleotidbindungsstelle von v-Src zu erzeugen, um die Bindung an eines der bevorzugten orthogonalen A*TPs (4–12) zu gestatten.

BEISPIEL 4

Mutantensynthese, -expression und -reinigung

[0150] Die Mutante (V323A, I338A) wurde, wie nachstehend beschrieben ist, hergestellt. Sowohl die Wildtyp- als auch die doppelte Alaninmutante der katalytischen Domäne von v-Src, (das XD4-Fragment), wurden als Glutathion-S-Transferase (GST)-Fusionsproteine (GST-XD4) hergestellt (61, 62). Diese wurde in E. coli hergestellt, das ein guter Expressionswirt ist, weil ihm jegliche endogenen Tyrosinkinasen fehlen, wie in dem folgenden Beispiel beschrieben ist. Wir verwendeten das XD4-Fragment von v-Src, weil es eine intakte SH1-katalytische Domäne enthält, ihm jedoch die nicht katalytischen regulatorischen SH3- und SH2-Domänen fehlen und es eine höhere spezifische Aktivität als v-Src mit voller Länge zeigt.

[0151] Zur Herstellung von GST-XD4 (V323A, I338A) wurde eine Verlängerungs-PCR mit Überlappung verwendet. Pfu-Polymerase (Stratagene) wurde in den PCR-Reaktionen entsprechend dem Protokoll des Herstellers verwendet. Es wurden sechs synthetische Oligonukleotide verwendet:

SEQ ID Nr.4 (5'-TTTGGATCCATGGGGAGTAGCAAGAGCAAG),

SEQ ID Nr.5 (5'-TTTGAATTCCTACTCAGCGACCTCCAACAC),

SEQ ID Nr.6 (5'-TGAGAAGCTGGCTCAACTGTACGCAG),

SEQ ID Nr.7 (5'-CTGCGTACAGTTGAGCCAGCTTCTCA),

SEQ ID Nr.8 (5'-CTACATCGTCGCTGAGTACATGAG),

SEQ ID Nr.9 (5'-CTCATGTACTCAGCGACGATGTAG).

[0152] Der Primer SEQ ID Nr.4 enthält eine BamHI-Stelle und der Primer SEQ ID Nr.5 enthält eine EcoRI-Stelle (kursiv gezeigt). Die Primer SEQ ID Nr.6 und SEQ ID Nr.7 enthalten die Änderungen in der Nukleotidsequenz zur Einführung der V323A-Mutation (die die Mutationen kodierenden Nukleotide sind in Fettdruck gezeigt). Die Primer SEQ ID Nr.8 und SEQ ID Nr.9 enthalten die fehlende Übereinstimmung I338A.

[0153] Das XD4-Gen aus dem YEp51-XD4-Plasmid (eine Gabe von B. Cochran an der Tufts Medical School) wurde mit den Primern SEQ ID Nr.4 und SEQ ID Nr.5 amplifiziert. Das PCR-Produkt wurde mit BamHI und EcoRI verdaut und in BamHI- und EcoRI-verdautes pGEX-KT ligiert und dann in den E. coli-Stamm DH5a transformiert.

[0154] Das GST-XD4 (V323A) wurde unter Verwendung der Primer SEQ ID Nr.4, SEQ ID Nr.5, SEQ ID Nr.6 und SEQ ID Nr.7 mit dem GST-XD4-Plasmid als Templat hergestellt. Das PCR-Produkt aus dem zweistufigen

Verfahren wurde mit BamHI und EcoRI verdaut, in BamHI- und EcoRI-verdautes pGEX-KT ligiert und in DH5a-E. coli-Zellen transformiert. GST-XD4 (V323A, I338A) wurde auf dieselbe Weise unter Verwendung der Primer SEQ ID Nr. 8 & SEQ ID Nr.9 mit GST-XD4 (V323A) als Templat hergestellt.

[0155] Expression und Reinigung der GST-Fusionskinasen wurden in dem E. coli-Stamm DH5a, wie von Xu et al. (50) beschrieben wurde, ausgeführt, mit der Ausnahme, dass die Zellen vor der Zentrifugation und Lyse mittels French-press bei 4 °C über Nacht gelagert wurden (eine Lagerung über Nacht ist zur Herstellung hoch-aktiver Kinasen unentbehrlich).

[0156] Die Expression von 6-His-XD4 und 6-His-XD4 (V323A, I338A) in Sf9-Insektenzellen wurde unter Verwendung des BAC-zu-BAC-Systems von Life Technologies ausgeführt. Kurz gesagt, die 6-His-XD4 und 6-His-XD4 (V323A, I338A)-Gene wurden durch PCR unter Verwendung der entsprechenden pGEX-Vektoren als Template mit den Primern SEQ ID Nr.4 und SEQ ID Nr.5, gefolgt von dem Verdau mit BamHI und EcoRI erzeugt. Das resultierende PCR-Fragment wurde in pFASTBAC kloniert, das mit BamHI und EcoRI verdaut worden war. Die Transformation von HB10BAC-Zellen und die nachfolgende Transfektion von Sf9-Zellen mit dem XD4- oder XD4 (V323A, I338A)-enthaltenden Bacmid wurden ausgeführt, wie von dem Hersteller vorge-schlagen wurde.

[0157] In einem hierin durchgeführten alternativen Verfahren wurde die Transfektion von v-src oder der mutierten Kinase v-src(1338G) durch Klonieren des v-src-Gens aus dem pGEX-v-Src-Vektor(4) in den pBabe-Vektor(5), der den Itr-Promotor für eine Expression in NIH 3T3-Zellen auf hohem Niveau enthält, durchgeführt. Das pBabe-v-Src (1338G)-Plasmid wurde in die virale Verpackungszelllinie BOSC 23(6) transfiziert und die viralen Teilchen wurden nach 2 Tagen, wie beschrieben ist (6), geerntet. NIH 3T3-Zellen wurden, wie beschrieben ist (7), mit diesen viralen Teilchen infiziert und stabile Transfektanten wurden in Pyromycin-enthaltenden Medien, wie beschrieben ist (5), ausgewählt. Stabile Transfektanten wurden in Puromycin-enthaltenden Medien bewahrt, um sie gegen einen Verlust an Expression von v-Src zu schützen.

[0158] Die Endergebnisse sind in [Fig. 1](#) gezeigt, das ein Diagramm ist, das die Domänenstruktur von v-Src, einschließlich der Domänen der Src-Homologie 3, 2 und 1 (SH3, SH2 & SH1), zeigt, wobei die Domänengrenzen durch die Aminosäurerestnummern, die oberhalb von jeder Domäne eines Kastens aufgelistet sind, angezeigt werden. Die Domänenstruktur von XD4, die eine Deletion der Reste 77–225 ($\Delta 77-225$) enthält, ist ebenfalls dargestellt. Die Domänenorganisationen der Glutathion S-Transferase (GST)-Fusion mit XD4 (Nummerierung von v-Src) und das doppelt mutierte GST-XD4 (das sowohl V323A, I338A als auch I338 G darstellt) werden ebenfalls schematisch gezeigt.

BEISPIEL 5

Testen der mutierten v-Src auf die Fähigkeit zur Bindung von orthogonalen ATP-Analoga

[0159] Als nächstes bewerteten wir die Fähigkeit der N^6 -substituierten Analoga (1–12) bezüglich der unterschiedlichen Hemmung der Wildtyp- und mutierten Kinasephosphorylierung von RR-Src mit $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$, welches ein Maß für ihre Fähigkeit ist, an die entsprechenden ATP-Bindungsstellen zu binden. Die Assays wurden in dreifacher Ausführung bei 37 °C in einem Endvolumen von 30 μL ausgeführt, das bei einem pH-Wert von 8,0 gepuffert war und 50 mM Tris, 10 mM MgCl_2 , 1,6 mM Glutathion, 1 mg/mL BSA, 1 mM RR-Src-Peptid mit entweder GST-XD4 (100 nM) oder GST-XD4(V323A, I338A) (100 nM) und 10 μM $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ (1000 cpm/pmol) [Dupont NEN] enthielt. Kaltes ATP oder A*TP-Analoga (100 μM) (1–12) wurden vor der Zugabe der Kinase zugegeben. Nach 30 Minuten wurden die Reaktionen gequencht, indem 25 μL des Reaktionsvolumens auf p81-Phosphocellulosescheiben (Whatman) getüpfelt wurden, und diese wurden in 250 mL 10 % Essigsäure während >30 Minuten, gefolgt von Waschen und Szintillationszählen, entsprechend den Standardverfahren (52), eingetaucht.

[0160] Die Ergebnisse sind in [Fig. 1](#) gezeigt. Die relative Hemmung von GST-XD4 ist durch die massiven Balken gezeigt und die relative Hemmung von GST-XD4(V323A, I338A) ist durch die mit Diagonalstreifen gefüllten Balken gezeigt. Die prozentuale Hemmung $(1-v_i/v_0)$ wird als ein Verhältnis von v_i (cpm in Gegenwart von 100 μM $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ (1000 cpm/pmol)/ v_0 (cpm nur in Gegenwart von 10 μM $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ (1000 cpm/pmol) – cpm des Hintergrunds aufgrund nicht spezifischer 10 μM $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ -Bindung an die Phosphocellulosescheiben (<0,1 % der gesamten Eingangszählimpulse)) berichtet. Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichungen dar, die aus vier getrennten Experimenten mit drei Wiederholungen bestimmt wurden.

[0161] Die Kinase GST-XD4-vom Wildtyp zeigt für die meisten A*TP-Analoga ([Fig. 6](#), massive Balken) eine

schlechte Bindungsaffinität, wie aus dem Lymphozytenkinaseassay (Fig. 3) erwartet wurde. Im Gegensatz dazu zeigt die doppelt mutierte GST-XD4(V323A, I338A) eine ausgezeichnete Hemmung durch die sterisch anspruchsvolleren N^6 -substituierten ATP-Analoga (Fig. 6, schattierte Balken). Besonders signifikant wird die GST-XD4(V323A, I338A)-Mutante von phosphorylierender RR-Src mit die ATP Analoga 5, 8, 9 und 11 beinahe genauso gut gehemmt, wie die Kinase vom Wildtyp GST-XD4 von phosphorylierender RR-Src mit ^{32}P -ATP durch ihr natürliches Substrat ATP gehemmt wird. Wir haben bestätigt, dass GST-XD4(V323A, I338A) und die GST-v-Src(V323A, I338A) mit voller Länge dasselbe Hemmungsmuster mit den A*TPs (1–12) zeigen. (Daten sind nicht gezeigt).

[0162] Vier der neun „toten“ Substrate, die beim Screening der Spezifität der Kinase vom Wildtyp (Fig. 3) identifiziert wurden, binden gut an die mutierte Kinase. Diese hohe Erfolgsrate in der Identifizierung neuer Substrate für eine mutierte v-Src, die von Kinasen vom Wildtyp nicht akzeptiert werden, lässt darauf schließen, dass wir ein Schlüsselmerkmal der v-Src-Nukleotidbindungsstelle identifiziert haben, nämlich die Reste, die eine enge Anpassung um die N^6 -Aminogruppe von ATP bewirken. Es ist beachtenswert, dass wir keine Proteinkinase vom Wildtyp kennen, die an der Position, die 1338 in v-Src (Position 120 in PKA) entspricht, ein Alanin enthält. Falls eine sterisch anspruchsvolle Aminosäureseitenkette an dieser Position ebenfalls eine entscheidende Rolle bei der Bestimmung der Spezifität anderer Kinasen spielt, sollte es gut möglich sein, sie gentechnisch so herzustellen, dass sie orthogonale Substrate akzeptieren, wobei eine ähnlich zu der hier beschriebenen Methode verwendet wird, und derartige gentechnisch hergestellte Kinasen würden ebenso innerhalb des Umfangs der vorliegenden Erfindung liegen.

BEISPIEL 6

Bestimmung der katalytischen Leistungsfähigkeit von mutierter v-Src mit dem besonders bevorzugten orthogonalen ATP-Analogon

[0163] Wir beschlossen, die Fähigkeit von N^6 -(cyclopentyl)ATP, 8, gegenüber den anderen drei ATP-Analoga 5, 9 und 11 zu testen, als katalytisch fähiges Substrat von sowohl der GST-XD4 vom Wildtyp als auch der GST-XD4(V323A, I338A)-Mutante zu dienen, weil das Analogon 8 ein leicht geringeres Niveau der Phosphorylierung mit Kinasen vom Wildtyp zeigte (Fig. 3, Spur 12).

[0164] Die ATP- und N^6 -(cyclopentyl)ATP-abhängige RR-Src-Phosphorylierung (1 mM) durch GST-XD4(V323A, I338A) und GST-XD4 wurde bei einer niedrigen Substratumsetzung (<5 %) dreifach ausgeführt. Kinetische Konstanten wurden durch Analyse von Lineweaver-Burk-Auftragungen der Geschwindigkeitsdaten (64) bestimmt. Die Assays wurden bei 37 °C in einem Endvolumen von 30 μ L, gepuffert bei einem pH-Wert von 8,0, enthaltend 50 mM Tris, 10 mM $MgCl_2$, 1,6 mM Glutathion, 1 mg/mL BSA, 1 mM RR-Src-Peptid mit entweder GST-XD4 (100 nM) oder GST-XD4(V323A, I338A) (100 nM) und 10 μ M [γ - ^{32}P]ATP (1000 cpm/pmol) oder [γ - ^{32}P] N^6 -(cyclopentyl)ATP (5000 cpm/pmol), dreifach ausgeführt, wie angezeigt ist.

Tabelle 1

Kinetik für Phosphatdonorsubstrate

Nukleotid	GST-XD4			GST-XD4(V323A, I338A)		
	K_{kat} (min^{-1})	K_M (μM)	K_{kat}/K_M (min^{-1}/M^{-1})	K_{kat} (min^{-1})	K_M (μM)	K_{kat}/K_M (min^{-1}/M^{-1})
ATP	2 \pm 0,5	12 \pm 3	1,6 $\times 10^5$	0,8 \pm 0,2	150 \pm 20	5,3 $\times 10^3$
N^6 -(cyclopentyl)ATP		2000(K_I)		(5,2 \pm 2) $\times 10^{-2}$	15 \pm 3	3,3 $\times 10^3$

[0165] Wie in vorstehender Tabelle 1 gezeigt ist, phosphorylierte die Kinase vom Wildtyp GST-XD4 nicht wesentlich das RR-Src-Peptid mit [γ - ^{32}P] N^6 -(cyclopentyl)ATP, was unsere vorherigen Beobachtungen bestätigte, dass dieses Analogon kein signifikantes Substrat für die Kinase vom Wildtyp ist. Im Gegensatz dazu zeigte GST-XD4(V323A, I338A) mit dem orthogonalen A*TP, [γ - ^{32}P] N^6 -(cyclopentyl)ATP eine Michaelis-Menten-Kinetik. Der K_M -Wert der Mutante für das orthogonale Substrat liegt ziemlich nahe an dem K_M -Wert von GST-XD4 für ATP. Andererseits weist die Mutante einen K_M -Wert für ATP auf, der mehr als 10 mal so hoch wie der K_M -Wert für GST-XD4 für ATP ist.

[0166] Der Parameter, der zum Einschätzen von Katalysatoren für konkurrierende Substrate verwendet wurde, ist das Verhältnis der Wechselzahl zu der Michaelis-Menten-Konstante, k_{kat}/K_M (die „Spezifitätskonstante“) (64). Der k_{kat}/K_M -Wert der gentechnisch hergestellten Mutante GST-XD4(V323A, I338A) mit dem orthogonalen Substrat $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{N}^6\text{-(cyclopentyl)ATP}$ ist nur um das 50-fache geringer als der k_{kat}/K_M -Wert der Kinase vom Wildtyp mit deren natürlichem Substrat, ATP. Diese katalytische Leistungsfähigkeit mit dem orthogonalen A*TP-Substrat, gekoppelt mit der niedrigeren katalytischen Leistungsfähigkeit mit ATP, im Vergleich zum Wildtyp, genügt zwei der vorstehend erörterten Designkriterien.

[0167] Es ist sogar noch bezeichnender, dass das neue Substrat, $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{N}^6\text{-(cyclopentyl)ATP}$ durch GST-XD4 vom Wildtyp im wesentlichen nicht verwendet wird, wie durch die offensichtliche vollständige Unfähigkeit von GST-XD4, dieses Analogon als einen Phosphodonor für die Autophosphorylierung zu verwenden, gezeigt wurde; dies ist in [Fig. 5c](#), Spur 3 erläutert. [Fig. 5c](#) ist ein Autoradiogramm, das die $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ -abhängige Autophosphorylierung von GST-XD4, Spur 1, oder von GST-XD4(V323A, I338A), Spur 2; und die $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{N}^6\text{-(cyclopentyl)ATP}$ -abhängige Phosphorylierung von GST-XD4, Spur 3, oder von GST-XD4(V323A, I338A), Spur 4, zeigt. Beachte, dass im Gegensatz zu GST-XD4 die gentechnisch hergestellte Kinase wirkungsvoll mit $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{N}^6\text{-(cyclopentyl)ATP}$ ([Fig. 5\(c\)](#), Spur 4) autophosphoryliert wird.

BEISPIEL 7

Bestätigung der Beibehaltung der Proteinsubstratspezifität

[0168] Wie in untenstehender Tabelle 2 gezeigt ist, haben wir festgestellt, dass die GST-XD4-Kinase vom Wildtyp ein gut charakterisiertes Peptidsubstrat von v-Src, RR-Src, mit einer Kinetik phosphorylierte, die mit Literaturberichten (63) übereinstimmt. Dies weist darauf hin, dass die gentechnische Sequenzherstellung die katalytische Aktivität des Enzyms bezüglich seiner Proteinsubstrate nicht wesentlich beeinflusst hat.

Tabelle 2

Kinetik für das Proteinsubstrat RR-Src

	<u>GST-XD4</u>	<u>GST-XD4(V323A, I338A)</u>
Nukleotid	K_M (mM)	K_M (mM)
ATP	2,6±0,9	3,1±0,9
$\text{N}^6\text{-(cyclopentyl)ATP}$	---	2,1±0,9

[0169] Die Assays der GST-XD4- und GST-XD4(V323A, I338A)-Phosphorylierung von RR-Src wurden bei 37 °C in einem Endvolumen von 30 µL, gepuffert bei einem pH-Wert von 8,0, enthaltend 50 mM Tris, 10 mM MgCl_2 , 1,6 mM Glutathion, 1 mg/mL BSA, 1 mM RR-Src-Peptid, mit entweder GST-XD4 (100 nM) oder GST-XD4(V323A, I338A) (100 nM) und 10 µM $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ (1000 cpm/pmol) [Dupont NEN] dreifach ausgeführt.

[0170] Zur Bestimmung, ob die Alaninmutationen irgendeine Wirkung auf die Proteinsubstratspezifität aufweisen, maßen wir den K_M -Wert von sowohl den Wildtyp- als auch den mutierten Fusionsproteinen für das RR-Src-Peptid. Bei Sättigungskonzentrationen von $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ zeigten der Wildtyp und die Mutante im wesentlichen denselben K_M -Wert für RR-Src, 2,6±0,9 mM beziehungsweise 3,1±0,9 mM (63). Zusätzlich war der K_M -Wert der Mutante für das Proteinsubstrat in Gegenwart von Sättigungsmengen an orthogonalem Substrat ebenfalls im wesentlichen derselbe, 2,1±0,9 mM. Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass die Alaninmutationen in der ATP-Bindungstasche, die nächstgelegen zu der benachbarten Phospho-Akzeptorbindungsstelle ist, die Proteinzielspezifität nicht beeinflussen.

[0171] Zur Unterstützung dessen, phosphoryliert die gentechnisch hergestellte Kinase denselben breiten Satz von Proteinen, die durch XD4 vom Wildtyp phosphoryliert werden, wenn jedes in Sf9-Insektenzellen exprimiert wird. Dies ist in der [Fig. 5\(a\)](#) gezeigt, die einen Anti-Phosphotyrosinproteinblot von Zelllysaten (10^8 Zelläquivalente/Spur) aus Sf9-Insektenzellen, die 6-His-XD4, Spur 2, oder 6-His-XD4 (V323A, I338A), Spur 3, exprimieren, zeigt. Diese Blots wurden nach der Lyse von 10^6 -Zellen in einem Puffer, der 0,1 % Triton-X-100, 50 mM Tris, bei einem pH-Wert von 8,0 enthielt, unter Verwendung eines Verfahrens, das zu demjenigen der Blots von Beispiel 2 ähnlich ist, ausgeführt.

[0172] Das Sf9-Insektenzellensystem ist ein guter Wirt zum Exprimieren kleiner Mengen an Tyrosinkinasen, weil diese Zellen größtenteils dieselbe Maschinerie enthalten, die zum Ausführen der post-translationalen Modifikationen an Proteinen notwendig sind, die zu Kinasen führen, die in der Aktivität zu denjenigen, die in Säugerzellen gefunden wurden, ähnlicher sind. Weiterhin fehlt nicht infizierten Sf9-Zellen eine endogene Tyrosinkinaseaktivität, wie in **Fig. 5(a)**, Spur 1 gezeigt ist, und somit sind die Phosphotyrosin-enthaltenden Proteine in den Spuren 2 und 3 von **Fig. 5(a)** Substrate der exprimierten 6-His-XD4- oder mutierten 6-His-XD4-Kinasen. Wir führen die kleinen Unterschiede in dem Phosphorylierungsniveau spezieller Proteine auf die niedrigere katalytische Aktivität der mutierten XD4 (V323A, I338A)-Kinase im Vergleich zu der Kinase vom Wildtyp zurück.

[0173] Zusammengekommen zeigen diese Daten, dass die Peptidspezifität der gentechnisch hergestellten Kinase so gut wie identisch zu derjenigen von v-Src vom Wildtyp ist.

BEISPIEL 8

Bestätigung, dass die gentechnisch hergestellte Kinase das bevorzugte orthogonale Substrat akzeptiert, die Kinase vom Wildtyp jedoch dies im Wesentlichen nicht akzeptiert

[0174] Das Endziel dieser Arbeit ist es, für synthetische Substratanaloga spezifische mutierte Kinasen zu verwenden, um die direkten Proteinsubstrate in ganzen Zellen oder Zelllysaten zu markieren. Dafür wird bevorzugt, dass im Wesentlichen keine Kinase vom Wildtyp, einschließlich ser/thr-spezifische Kinasen (die den Großteil der zellulären Phosphorylierung ausführen, da nur 0,03 % aller Phosphoamino-säuren Tyrosin sind) (65), das synthetische Substrat akzeptiert. Zum Beweis, dass $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{N}^6\text{-(cyclopentyl)ATP}$ für alle zellulären Kinasen vom Wildtyp im wesentlichen ein „totes Substrat“ ist, wurden in vitro Kinasereaktionen mit $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ oder $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{N}^6\text{-(cyclopentyl)ATP}$ mit murinen Lymphozytenlysaten durchgeführt.

[0175] Diese Assays wurde auf ein Weise durchgeführt, die ähnlich zu dem in Beispiel 2 ausgeführten Verfahren ist, mit der Ausnahme, dass radioaktiv markiertes $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ oder $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{N}^6\text{-(cyclopentyl)ATP}$ (5000 cpm/pmol) verwendet wurde, das auf eine Endkonzentration von 100 μM mit 5×10^6 Zelläquivalenten zugegeben und bei 37 °C während 10 min inkubiert wurde, worauf 4X Laemmli-Gelbeladungspuffer zu dem Zelllysatz zum Quenchen der Reaktion zugegeben wurde. Die Proteine wurden durch 12,5 % SDS-PAGE getrennt. Das Gel wurde mit 10 % Essigsäure, 10 % Isopropanol während 1 h getränkt, worauf es in einem Gelrockner getrocknet wurde und auf einem Biomax MS-Film (Kodak # 111-1681) während 1 h belichtet wurde.

[0176] Die Ergebnisse sind in **Fig. 5(b)** gezeigt, die ein Autoradiogramm ist, das das Niveau der Phosphorylierung in hypotonisch lysierten murinen Lymphozyten mit $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$, Spur 1, oder $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{N}^6\text{-(cyclopentyl)ATP}$, Spur 2, zeigt. Auf die Zugabe von $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{N}^6\text{-(cyclopentyl)ATP}$ folgend gibt es keine radioaktiv markierten Phosphoproteine in dem Zelllysatz, was die wirkliche orthogonale Natur von $\text{N}^6\text{-(cyclopentyl)ATP}$ in Bezug auf alle Proteinkinasen vom Wildtyp bestätigt. Dasselbe Ergebnis wurde festgestellt, wenn in vitro Kinasereaktionen mit $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ oder $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{N}^6\text{-(cyclopentyl)ATP}$ und NIH 3T3-Zelllysaten anstelle von frisch isolierten murinen Lymphozyten verwendet wurden (nicht gezeigt).

[0177] Im Prinzip würde die Fähigkeit, der Aktivität einer Proteinkinase in Gegenwart aller anderen zellulären Kinasen zu folgen, die Identifikation der direkten Kinaseziele in einem speziellen Zelltyp gestatten. Um dies zu erreichen, verwenden wir gegenwärtig die Membranpermeabilisierung (66) und eine Zell-permeable Form von A^*TP , um $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{A}^*\text{TP}$ in Zellen einzuführen (67).

BEISPIEL 9

Herstellung und Analyse von v-Src-Mutanten mit einer einzelnen Mutation

[0178] Zur Bestimmung, ob eine einzelne Mutation ausreichend sein könnte, um $\text{N}^6\text{-(cyclopentyl)ATP}$ zu gestatten, wirkungsvoll als ein Substrat verwendet zu werden, wurden drei zusätzlich von v-Src-abgeleitete Mutanten hergestellt, wobei Verfahren verwendet wurden, die zu denjenigen von Beispiel 4 vergleichbar sind. Jedoch wiesen diese nur einzelne Mutationen, an der Position 338, auf. Diese wurden wiederum als GST-XD4-Fusionsproteine exprimiert. Diese Mutanten, GST-XD4(I338A), GST-XD4(I338S) und GST-XD4(I338G) wurden dann entsprechend der Beschreibung in Beispiel 8 getestet.

[0179] Die Ergebnisse sind in **Fig. 7** gezeigt. Die oben links von **Fig. 7** gezeigten Gelspuren zeigen, dass die Mutante mit Alanin an der Position 338 in der Lage war, das natürliche Substrat, ATP, leichter zu verwenden

als die Mutante mit Serin an derselben Position. Die in [Fig. 7](#) unten links gezeigten Gelspuren zeigen, dass die Mutante mit Alanin an der Position 338 ebenfalls besser in der Lage ist, ATP als Substrat zu verwenden, als die Mutante mit Glycin an dieser Position.

[0180] Die Felder auf der rechten Seite von [Fig. 7](#) erzählen sogar noch eine interessantere Geschichte. Aus dem oberen rechten Feld wird klar, dass die Mutante mit Serin an der Position 338 nicht in der Lage ist, nahezu genauso gut N^6 -(cyclopentyl)ATP zu verwenden, wie die Mutante mit Alanin an dieser Position. Jedoch zeigt das untere Feld, dass die Mutante mit Glycin an der Position 338 besser in der Lage ist, N^6 -(cyclopentyl)ATP als Substrat zu verwenden als die Mutante mit Alanin an dieser Position.

[0181] Diese Ergebnisse sind äußerst viel versprechend. Es scheint, dass eine einzelne Mutation ausreicht, um die Verwendung dieses orthogonalen Substrats zu gestatten. Besonders scheint die Mutante mit Glycin an der Position 338 die beste gentechnisch hergestellte v-Src-Mutante zu sein, die wir bis jetzt hergestellt haben.

[0182] Überdies ist es ziemlich überraschend, dass eine Glycinsubstitution hier funktionieren würde. Im Allgemeinen wird von einer Glycinsubstitution nicht erwartet, dass sie in derartigen Situationen funktioniert, weil sie zu viel Flexibilität in die Enzymstruktur einführt und somit das gewünschte Ergebnis nachteilig beeinflusst.

BEISPIEL 11

Identifizierung der Substrate von v-Src

[0183] Eine schematische Darstellung einer experimentellen Methode zum Identifizieren von v-Src-Substraten ist in [Fig. 8](#) gezeigt. Die gentechnisch hergestellte v-Src, wie zum Beispiel GST-XD4(V323A, I338A), wird zusammen mit einem radioaktiv markierten orthogonalen Substrat, wie zum Beispiel $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{N}^6$ -(cyclopentyl)ATP, Zellextrakten oder permeabilisierten Zellen zugegeben. Dies würde typischerweise in dreifacher Ausführung durchgeführt werden. Nach Inkubation würden die Zellen lysiert werden (fall sich nicht schon lysiert sind) und die resultierenden Proben würden durch Polyacrylamid-Gelelektrophorese getrennt werden. Ein Western-Blot, der von dem Gel abgenommen und mit Anti-Phosphotyrosin markiert wurde, würde alle phosphorylierten Proteine in derselben Probe zeigen; und ein Autoradiogramm des Gels würde offenbaren, welche von diesen durch v-Src phosphoryliert wurden.

BEISPIEL 12

Synthese von Inhibitoren

[0184] Das Pyrazolpyrimidingrundgerüst für die ersten sechs Inhibitoren ist in [Fig. 11A](#) gezeigt. Die Synthese von 4-Amino-1-tert-butyl-3-phenylpyrazol(3,4-d]pyrimidin mit einer Phenylgruppe an der „R“-Position, Verbindung 1 (die dieselbe Struktur wie das in [Fig. 10](#) gezeigte PP1, jedoch ohne die para-Methylgruppe auf dem Phenylring, aufweist) wurde gemäß dem Verfahren von Hanefeld et al. (76) durchgeführt. Die Verbindungen 2–6 ([Fig. 11B](#)) mit Cyclobutoyl-, Cyclopentoyl-, Cyclohexoyl-, Benzoyl- beziehungsweise 2-Furoylsubstituenten an der „R“-Position wurden durch Behandlung von 1 mit Cyclobutoylchlorid, Cyclopentoylchlorid, Cyclohexoylchlorid, Benzoylchlorid beziehungsweise Furoylchlorid in trockenem Pyridin während 1 Stunde bei Raumtemperatur synthetisiert. Die Strukturen von jedem der Substituenten sind in [Fig. 11B](#) gezeigt. Die Reinigung durch Silikagelchromatographie ergab reine Produkte mit einer Ausbeute von 16–84 %. Die Verbindungen 1–6 wurden durch ^1H -NMR und spektrale Massenverfahren charakterisiert.

BEISPIEL 13

Screening von Inhibitoren, die zu Kinasen vom Wildtyp orthogonal sind

[0185] Zum Identifizieren von Verbindungen, die keine vorkommenden zellulären Kinasen hemmen würden, screenen wir das Feld der synthetischen Pyrazolpyrimidinanaloga (1–6) gegen zwei nahe verwandte gereinigte Tyrosinkinasen, v-Src und Fyn, in einem Peptidphosphorylierungsassay unter Verwendung von $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ als radioaktiv markierten Tracer der Kinaseaktivität, entsprechend der Beschreibung in Shah et al. (79).

[0186] Die Ergebnisse zeigten, dass jede der Verbindungen 2–6 IC_{50} -Werte von über 400 μM für die Hemmung von Src aufwies, und die Verbindungen 3 und 5 zeigten IC_{50} -Werte von über 400 μM für die Hemmung von Fyn vom Wildtyp, was darauf hinweist, dass diese Analoga (2 und 5) zu diesen repräsentativen Kinasen vom Wildtyp orthogonal sind (diese nicht hemmen).

[0187] Die Entfaltung der Proteinkinasesignalwege unter Verwendung herkömmlicher genetischer und biochemischer Verfahren ist aufgrund der überwältigenden Zahl nahe verwandter Kinasen schwierig gewesen. Falls Zell-durchlässige Inhibitoren von jeder einzelnen Kinase entworfen werden können, könnte die Rolle von jeder Proteinkinase systematisch abgeschätzt werden.

[0188] Ergebnisse: Wir dachten uns eine Methode aus, die die Chemie und Genetik zur Entwicklung des ersten einzigartig spezifischen zelldurchlässigen Inhibitors der onkogenen Proteintyrosinkinase, v-Src, kombiniert. Eine Mutation einer funktional stillen aktiven Stelle wurde in v-Src erzeugt, um sie von allen anderen zellulären Kinasen zu unterscheiden. Ein eng bindender Zell-durchlässiger Inhibitor ($IC_{50} = 430 \text{ nM}$) dieser mutierten Kinase, der keine Kinasen vom Wildtyp hemmt, wurde entworfen und synthetisiert. In vitro Assays und Assays mit ganzen Zellen bewiesen die einzigartige Spezifität des mutierten v-Src/Inhibitor-Paars. Dieser Inhibitor kehrt die Transformationswirkungen der zellulären Expression der gentechnisch hergestellten v-Src um, ohne jedoch die durch die v-Src vom Wildtyp vermittelte zelluläre Transformation zu unterbrechen. Diese Zelllinien unterscheiden sich nur durch eine einzelne Aminosäure in einer einzelnen Proteinkinase, was beweist, dass dramatische Änderungen in der zellulären Signalgebung direkt auf die spezifische Hemmung der gentechnisch hergestellten Kinase zurückzuführen sind. Die Allgemeingültigkeit dieses Verfahrens wurde durch die gentechnische Herstellung einer weiteren Tyrosinkinase, Fyn, wobei sie die entsprechende stille Mutation enthielt, getestet. Es wurde festgestellt, dass dieselbe Verbindung ebenso ein wirksamer Inhibitor ($IC_{50} = 830 \text{ nM}$) dieser mutierten Kinase ist, was die Allgemeingültigkeit der Strategie gegenüber der Herstellung von Allel-spezifischen Inhibitoren von mehrfachen Tyrosinkinasen bestätigt.

[0189] Schlussfolgerungen: Allel-spezifische zelldurchlässige Inhibitoren von einzelnen Kinasen der Src-Familie können unter Verwendung einer kombinierten chemischen und genetischen Methode schnell entwickelt werden. Eine Behandlung von NIH 3T3-Fibroblasten, die mit mutierter v-Src-transformiert worden waren, mit einer einzigartig spezifischen v-Src verwandelt die morphologischen Kennzeichen der Transformation zurück. Der Inhibitor zeigt keine Wirkung auf Zellen, die durch die v-Src-Allele vom Wildtyp transformiert worden waren, was stark darauf hinweist, dass der durch Behandlung mit dem Inhibitor induzierte Phänotyp ein Ergebnis eines einzigen hemmenden Ereignisses ist. Die Fähigkeit zur schnellen Erzeugung von Kinase-spezifischen Inhibitoren auf eine verallgemeinerbare Weise wird für die Entfaltung der Kinase-vermittelten zellulären Wege und für die Validierung neuer Kinasen als gute Ziele zur Arzneimittelforschung sowohl in vitro als auch in vivo nützlich sein.

[0190] Wie vorstehend angegeben wurde, ist eine kombinierte chemische und genetische Strategie ausgedacht worden, die die Erzeugung „chemisch empfindlicher“ mutierter Kinasen gestattet, die einzig durch einen rational entworfenen Inhibitor, der ein kleines Molekül ist, gehemmt werden. Unsere Methode betrifft das gentechnische Herstellen einer einzigartigen Tasche an der aktiven Stelle der interessierenden Kinase mit einer funktional stillen Mutation. Dann wird ein spezifischer Inhibitor der gentechnisch hergestellten Kinase durch Derivatisierung eines bekannten Kinaseinhibitors mit einer voluminösen Gruppe synthetisiert, die so konstruiert ist, dass sie in die Tasche, die eine neue aktive Stelle ist, passt. Die voluminöse Gruppe zerstört die Wirkung des Inhibitors für Kinasen vom Wildtyp. Erfolgreiches komplementäres Design führt daher zu vorteilhaften Bindungswechselwirkungen, die nur in dem gentechnisch hergestellten Kinase/Inhibitor-Komplex möglich sind. Die Transfektion von Zellen mit dem die gentechnische Kinase kodierenden Gen erzeugt eine Zelle, in der nur eine Kinase durch den konstruierten Inhibitor blockiert werden kann (siehe [Fig. 14](#)).

[0191] Da die mutierte Kinase dieselbe Funktion wie die Wildtypkinase erfüllt, ist es von Bedeutung, dass ein Inhibitor der Mutante die Zellsignalgebung auf dieselbe Weise beeinflussen wird, wie ein selektiver Inhibitor der Kinase vom Wildtyp in nicht transfizierten Zellen. Die Fähigkeit, den Phänotyp von Zellen nach selektiver Hemmung von jeder Proteinkinase zu beobachten, stellt ein schnelles Verfahren zur Bestimmung der einzigartigen Rollen einzelner Kinasen in den Signaltransduktionskaskaden zur Verfügung.

[0192] Für ein spezifisches Inhibitor-Design richteten wir uns auf Proteintyrosinkinasen der src-Familie, aufgrund deren allgegenwärtigen Bedeutung bei der Vermittlung einer Zellfunktion. Trotz intensiver Untersuchung war es aufgrund der zellulären Co-lokalisierung und ihrer hohen Sequenzidentitäten schwierig, die Rollen einzelner Mitglieder der src-Familie abzuschätzen. Obwohl einige wirksame Inhibitoren von Kinasen der src-Familie bekannt sind wurden keine Moleküle identifiziert, die wirksam (20-fache Selektivität für ein Mitglied der src-Familie) zwischen diesen nahe verwandten Enzymen unterscheiden können.

[0193] Zwei funktional wichtige src-Kinasen, v-Src und Fyn wurden, als primäre Ziele für das Design unseres mutierten Kinase/Inhibitor-Paars ausgewählt. Src-Kinase stellte sich als ein Hauptziel für ein Arzneimittel aufgrund seiner Auswirkung bei der Onkogenese von Brust-, Lungen- und Kolonkarzinomen heraus. Obwohl

v-Src der Prototyp für onkogene Tyrosinkinasen ist, wurden keine Inhibitoren, die kleine Moleküle und für diese Kinase hochselektiv sind, entdeckt. Fyn ist eine Tyrosinkinase aus der src-Familie, die bei der T-Zellenrezeptor-vermittelten Lymphozytenaktivierung von Bedeutung ist. Src und Fyn haben eine ähnliche Domänenstruktur gemeinsam und weisen eine Aminosäureidentität von näherungsweise 85 % in ihren katalytischen Domänen auf. Die enge strukturelle Verwandtschaft der Mitglieder der src-Familie sorgt für den idealen Test unserer Fähigkeit zur gentechnischen Herstellung einer Enzym/Inhibitorspezifität zwischen hochhomologen Kinasen. Falls man zwischen diesen nahe verwandten src-Mitgliedern unter Verwendung eines Zell-permeablen Inhibitors unterscheiden kann, ist es wahrscheinlich, dass ebenfalls für Mitglieder anderer Proteinkinasefamilien unter Verwendung einer ähnlichen Methode eine Spezifität erreicht werden kann.

Ergebnisse und Diskussion

Gentechnische Enzymherstellung

[0194] Aus unseren vorherigen Anstrengungen zur gentechnischen Herstellung von Kinasen mit neuer ATP-Spezifität identifizierten wir einen funktional erhaltenen Rest in der ATP-Bindungstasche von v-Src (Ile 338), der zu Glycin mutiert werden konnte, ohne die Phosphoakzeptorspezifität oder biologische Funktion der Kinase zu verändern. Die Raum-erzeugende Mutation bewirkt nur einen geringen Abfall in k_{kat} , eine geringe Zunahme in dem K_m -Wert für ATP und keine quantitative Änderung in dem Niveau der Fibroblastentransformation (Shah K., nicht veröffentlichte Ergebnisse). Die biologischen Substrate der mutierten v-Src sind unverändert und 1338G-v-Src führt dieselben biologischen Funktionen wie die v-Src vom Wildtyp aus. Alle Kristallstrukturen von ATP-gebundenen Proteinkinasen enthüllten eine enge Wechselwirkung zwischen dem der Position 338 (Src-Nummerierung) entsprechendem Rest und ATP. Eine Analyse der Proteinkinasesequenzalignierungen bestätigte, dass der Rest 338 in allen bekannten eukaryotischen Proteinkinasen eine voluminöse Seitenkette (normalerweise Thr, Ile, Leu, Met oder Phe) enthält. Folglich sollte eine Glycinmutation an der Position 338 eine neue Tasche erzeugen, die in keiner Kinase vom Wildtyp vorhanden ist. Aufgrund der erweiterten ATP-Bindungsstelle sollte die Glycinmutierte Kinase voluminöse Inhibitoren akzeptieren, die nicht an Kinasen vom Wildtyp binden könnten. Unter Verwendung von Standardverfahren klonierten, exprimierten und reinigten wir das Glutathion-S-Transferase (GST)-Fusionsprotein der katalytischen WT- und 1338-v-Src-Domänen wie vorher beschrieben wurde. WT-Fyn, T339G-Fyn (Src-Nummerierung) und WT-Abl wurden ebenfalls als GST-Fusionsproteine exprimiert und gereinigt.

Inhibitor-Design und -Synthese

[0195] Zum Testen unserer grundlegenden Designstrategie screenen wir die WT- und 1338G-v-Src-SH1-Domänen gegen ein früher synthetisiertes Feld von N-6-substituierten Adenosinmolekülen auf eine selektive Hemmung von 1338G-v-Src gegenüber WT-v-Src. Da Adenosin nur ein mäßiger Inhibitor für Tyrosinkinasen der src-Familie ist, erwarteten wir nicht, einen wirksamen Inhibitor für die gentechnisch hergestellte Kinase zu entdecken. Wie erwartet, hemmten alle der N-6-Adenosinanaloga 1338-G-v-Src stärker als WT-v-Src (Daten sind nicht gezeigt). Der in diesem Screening gefundene stärkste Inhibitor war N-6-Cyclopentylxyadenosin (1, **Fig. 15a**.) mit einer 50 %-Hemmkonzentration (IC_{50}) von 1 mM für 1338G-v-Src. Nachfolgende Experimente zum Testen auf die Selektivität zeigten, dass N-6-Cyclopentylxyadenosin keine nachweisbare in vitro-Hemmung von WT-v-Src oder Fyn bei Konzentrationen von bis zu 400 mM zeigte. Dieses erste Screening ermutigte uns, die Strategie des Entwickelns neuer Inhibitoren von 1338G-v-Src weiterzuführen, da unser Design es uns gestattete, Selektivitätsbarrieren, die bei der herkömmlichen Inhibitor-Entdeckung bedeutende Probleme sind, leicht zu überwinden.

[0196] Adenosinanaloga sind aufgrund der von Adenosin ausgeführten zahlreichen zellulären Funktionen sowie der großen Zahl zellulärer Proteine, die Adenosin binden, als Inhibitoren nicht ideal. Es wurde gezeigt, dass N-6-Adenosinanaloga als Adenosinrezeptoragonisten und -antagonisten wirken, und man kann sich N-6-Adenosinanaloga vorstellen, die als Substrate für Nukleosidkinasen wirken. Aus diesen Gründen wandten wir uns an eine Klasse bekannter Tyrosinkinaseinhibitoren, die nicht direkte Analoga biologisch bekannter Moleküle sind. Unsere Designstrategie erforderte eine Kernstruktur, die eine starke Hemmung von multiplen Kinasen vom Wildtyp zeigt und leicht zu synthetisieren ist. Ebenfalls muss die Bindungsorientierung des Moleküls an der aktiven Stelle des Enzyms bekannt oder leicht vorhersagbar sein. Zusätzlich muss das Molekül auf eine Weise binden, wobei die in Richtung auf Ile338 zeigende Stelle leicht modifiziert werden kann. Als unsere Kerninhibitorstruktur wählten wir 4-Amino-1-tert-butyl-3-phenylpyrazol[3,4-d]pyrimidin (2, **Fig. 15b**). Dieses Molekül ist ein Derivat von 4-Amino-1-tert-butyl-3-(p-methylphenyl)pyrazol[3,4-d]pyrimidin (pp1), über das Hanke und Mitarbeiter als starken Inhibitor einer Kinase aus der src-Familie berichteten. Basierend auf der Kristallstruktur der Kinase, Hck, der src-Familie, die an den allgemeinen Kinaseinhibitor, Quercetin (5, **Fig. 16**)

gebunden ist, postulierten wir, dass 2 an Kinasen der src-Familie in einer zu derjenigen von ATP ähnlichen Konformation binden. Die vorhergesagte Bindungsorientierung von 2 in Hck wird als Überlagerung mit den bekannten Hck-Kokristallstrukturen von AMP PNP (6) und Quercetin (**Fig. 16b.**) gezeigt. In dieser Konformation entspricht die leicht derivatisierbare N-4-Position von 2 dem N-6- von ATP (enger Kontakt mit dem Rest 338, **Fig. 16c.**) und die tert-Butyleinheit entspricht ungefähr dem Ribosering von ATP. Wir nahmen weiterhin an, dass in dieser Orientierung der C-3-Phenylring von 2 in einer Tasche binden könnte, die das N-7 von ATP umgibt, wie in der Hck-Quercetin-Kokristallstruktur erkannt wurde. Diese Analyse veranlasst uns, ein kleines Feld von N-4-derivatisierten Analoga von 2 zu synthetisieren (**Fig. 2**).

Identifikation eines einzigartig selektiven Inhibitors

[0197] Das Feld von Pyrazol[3,4-d]pyrimidinen wurde gegen WT- und 1338G-v-Src-Kinasen gescreent (siehe **Fig. 13**). Alle der Analoga sind im Vergleich zum Wildtyp bessere Inhibitoren der gentechnisch hergestellten v-Src, wodurch unsere Vorhersage der Bindungsorientierung von 2 an der aktiven Stelle der Kinase bestätigt wird. Jede Derivatisierung von 2 an der N-4-Position zerstört die hemmende Aktivität gegen WT-v-Src (keine nachweisbare Hemmung an der Löslichkeitsgrenze, 300 mM). Alle 10 Analoga zeigten eine messbare Hemmung von 1338G-v-Src und mehrere der Verbindungen weisen IC_{50} -Werte im niederen mM-Bereich auf. Das N-4-(p-tert-butyl)benzoylanaloga (3g) ist in dem Feld der stärkste Inhibitor von 1338G-v-Src ($IC_{50} = 430$ nM). Dieses Molekül zeigt keine Hemmung von WT-v-Src bei 300 nM, was darauf hinweist, dass 3g im Vergleich zum Wildtyp zumindest ein um das 1000-fache besserer Inhibitor der mutierten v-Src ist. Das große Ausmaß der Derivatisierung, die zum Erreichen einer sub-mikromolaren Wirksamkeit für die aktive Stelle von 1338G-v-Src erforderlich war war ziemlich unerwartet. Wir entfernten nur vier Kohlenstoffatome aus der ATP-Bindungsstelle und derivatisierten das Ausgangsmolekül mit elf Kohlenstoffatomen. Diese Diskrepanz kann auf einen Fehler in unserer Bindungsvorhersage zurückzuführen sein. Ebenfalls kann die Mutation von Ile zu Gly der aktiven Stelle des Enzyms eine Größere Flexibilität verleihen, wodurch es der mutierten Kinase gestattet wird ein größeres Inhibitoranaloga, als vorhergesagt, zu akzeptieren. Zum Bestätigen dass 3g 1338G-v-Src an der ATP-Bindungsstelle hemmt, untersuchten wir dessen Kinetik der Inhibierung bei verschiedenen ATP-Konzentrationen. Die Lineweaver-Burk-Analyse bestätigte dass 3g in Konkurrenz mit ATP 1338G-v-Src mit einer Hemmkonstante (K_i) von näherungsweise 400 nM hemmt (Daten sind nicht gezeigt).

[0198] Das Feld der Inhibitoranaloga wurde als nächstes gegen WT-Fyn gescreent, um deren Potential zur Kreuzreaktion mit dieser Kinase zu untersuchen. WT-Fyn wurde als „worst case“ Kontrolle von Kinasen vom Wildtyp gewählt, weil die veröffentlichten Ausgangsmoleküle PP1 und 2 hochwirksame (geringer nM-Wert) Fyn-Inhibitoren sind. Viele der 10 synthetischen Analoga zeigten keine hohe Selektivität für die Zielkinase (siehe **Fig. 13**). Die N-Acylanaloga mit gesättigten Ringsystemen (3a–3c) hemmten wirksam Fyn vom Wildtyp. Die N-Methylenverbindungen (4b, 4d, 4e) sind zu WT-Fyn ausreichend orthogonal, jedoch zeigten sie nur eine schlechte bis mäßige Hemmung der gentechnisch hergestellten v-Src. Bedeutsamerweise hemmte 3g, der stärkste Inhibitor der mutierten v-Src, WT-Fyn sehr schwach ($IC_{50} = 300$ mM). Somit hemmt 3g die gentechnisch hergestellte v-Src über 700 mal wirksamer als WT-Fyn, die wahrscheinlich die zelluläre Kinase vom Wildtyp ist, die am besten zum Binden des Moleküls in der Lage ist.

[0199] Wir testeten ebenfalls, ob andere Kinasen, die nicht aus der src-Familie stammen, zufällig durch 3g in vitro gehemmt wurden. Die Serin/Threoninkinasen PKCd und PKA wurden bei Konzentrationen bis zu 300 mM nicht nachweisbar gehemmt. Desgleichen zeigte 3g nur eine schwache Hemmung ($IC_{50} > 300$ mM) der Abl-Tyrosinkinase. Daher genügte 3g allen unseren anfänglichen Designanforderungen für eine wirksame selektive Hemmung einer gentechnisch hergestellten Kinase.

Selektivität in ganzen Zellen

[0200] Zur weiteren Demonstration, dass 3g keine Tyrosinkinasen vom Wildtyp hemmt, untersuchten wir die Wirkungen einer 3g-Behandlung auf die B-Zellenrezeptor (BCR)-vermittelte Phosphorylierungskaskade. Von den Tyrosinkinasen (Fyn, Lyn, Lck, Blk) aus der src-Familie und (Btk, Syk) nicht aus der src-Familie ist bekannt, dass sie auf eine BCR-Vernetzung hin aktiviert werden. Aufgrund der amplifizierenden Natur der BCR-vermittelten Kaskade würde eine Hemmung von einer beliebigen dieser Kinasen die Verteilung und Intensität von zellulärem Phosphotyrosin nach der Aktivierung dramatisch verändern. Da 3g so entworfen wurde, dass es mit den aktiven Stellen der Kinasen vom Wildtyp sterisch inkompatibel ist, sollte es die Tyrosinphosphorylierungs-abhängige Signalgebung in B-Zellen vom Wildtyp nicht unterbrechen. **Fig. 17** (Spur 3) zeigt, dass eine 3g-Behandlung mit 100 nM von Antigenrezeptor-vernetzten murinen B-Zellen keine Wirkung auf das Phosphotyrosinmuster der B-Zellenstimulierung (vergleiche Spur 2) aufweist. Die Signalintensitäten aller Hauptbanden sind unverändert und nur eine leichte Verarmung einiger kleinerer Banden ist nachweisbar, was bestätigt, dass

3g das Feld der Tyrosinkinasen, die durch die BCR-Vernetzung aktiviert werden, nicht merklich hemmt. Eine Behandlung von B-Zellen mit 100 mM 2 bewirkt jedoch eine signifikante Verringerung der Tyrosinphosphorylierung ([Fig. 4](#), Spur 4), die mit dessen starker Hemmung der Kinasen vom Wildtyp der src-Familie übereinstimmt.

Selektive Hemmung von 1338G-v-Src in NIH3T3-Zellen

[0201] Zur Verwendung unseres selektiven Inhibitors zur Untersuchung eines Src-vermittelten Weges führten wir sowohl WT- als auch 1338G-v-Src retroviral in NIH3T3-Fibroblasten ein. Diese Zellen nehmen einen transformierten Phänotyp an, der von der v-Src-Expression abhängig ist. Wir versuchten zu zeigen, dass 3g selektiv den Src-abhängigen Signaltransduktionsweg von 1338G-v-Src-transformierten Zellen unterbricht, während WT-transformierte Zellen nicht beeinflusst werden. Eine Behandlung von WT-v-Src-infizierten Zellen (100 mM 3g) bewirkt im Vergleich zu den mit Kontroll-DMSO behandelten Spuren keinen Verlust der Tyrosinphosphorylierung ([Fig. 18](#)), was zeigt, dass der konstruierte Inhibitor keine WT-v-Src- oder irgendeine der anderen Tyrosinkinasen hemmt, die durch die v-Src-vermittelte zelluläre Transformation aktiviert werden. Die äquivalente Behandlung von 1338G-v-Src-transformierten Zellen führt zu einer dramatischen Verminderung der Tyrosinphosphorylierung des mutmaßlichen v-Src-Substrats, p36, sowie zu einer mäßigen gesamten Abnahme des zellulären Phosphotyrosinniveaus. Vorher wurde gezeigt, dass eine Behandlung von v-Src-transformierten Zellen mit allgemeinen Tyrosinkinaseinhibitoren eine Verringerung der Tyrosinphosphorylierung eines 36 kD Proteins bewirkt. Es wird angenommen, dass p36 mit einer spezifischen Phosphotyrosinphosphatase assoziiert ist, was möglicherweise dessen schnelle Dephosphorylierung in mit Inhibitor behandelten Zellen erklärt. Der IC_{50} -Wert von 3g für das p36-Phosphotyrosinsignal in 1338G-v-Src-exprimierenden Zellen (50 mM) beträgt ungefähr das 100-fache des in vitro Werts (Daten sind nicht gezeigt). Dies ist vermutlich auf die Tatsache zurückzuführen, dass in den zellulären Experimenten der Inhibitor mit ATP-Konzentrationen im millimolaren Bereich um die aktive Stelle der Kinase konkurrieren muss.

Die selektive Hemmung der 1338G-mutierten v-Src kehrt die transformierte Zellmorphologie um

[0202] Eine V-Src-Aktivität ist für eine Rous-Sarkom-Virustransformation von Säugerzellen erforderlich. Eine Behandlung der 1338G-v-Src-exprimierenden NIH3T3-Zellen mit 100 mM 3g bewirkte dramatische Änderungen in der Zellmorphologie, die mit der Umkehrung der Transformation übereinstimmen ([Fig. 19](#)). Die mutierten Zellen, die mit dem Inhibitor 3g behandelt wurden, erschienen flach und zeigten keine Wachstumscharakteristika von transformierten Zellen (das heißt, die Fähigkeit übereinander zu wachsen). Unter identischen Bedingungen zeigten WT-v-Src-infizierte Zellen die prototypische gerundete Morphologie und überlappende Wachstumsmuster von transformierten Zellen.

[0203] Zur weiteren Demonstration der selektiven Umkehrung der Zellmorphologie verwendeten wir Fluoreszenzmikroskopie, um 3g-behandelte Zellen nach Färben des zellulär polymerisierten Actins mit Phalloidin-FITC zu betrachten ([Fig. 19](#)). Nicht transformierte NIH3T3-Zellen zeigen lange Actinspindeln, die sich quer durch die Zellen bilden. V-Src-transformierte Zellen (sowohl WT als auch 1338G) erscheinen gerundet ohne ein erkennbares Muster einer Actinbildung. In Übereinstimmung mit den Lichtmikroskopiedaten erscheinen mit Inhibitor behandelte WT-v-Src-exprimierende Zellen ununterscheidbar von unbehandelten WT-Zellen. Jedoch weisen mit 3g behandelte 1338G-v-Src-exprimierende Zellen definierte polymerisierte Actinfäden auf, die stark den Actinbildungen der nicht transformierten NIH3T3-Fibroblasten ähneln. Diese mit Inhibitor behandelten Zellen weisen eine übertriebene abgeflachte Morphologie auf und zeigen eine periphere Actinfärbung die in den nicht transformierten NIH3T3-Zellen nicht vorhanden ist. Diese Daten zeigen, dass 3g einzigartig morphologische Änderungen in Zellen auslösen kann, die so gentechnisch hergestellt wurden, dass sie eine einzelne Änderung einer Aminosäure in der interessierenden Kinase enthalten. Dies ist die erste Beweisführung, dass ein Inhibitor, der ein kleines Molekül ist und für ein onkogenes Produkt einer Tyrosinkinase selektiv ist, die morphologischen Änderungen, die mit einer zellulären Transformation verbunden sind, zurückverwandeln kann. Es wurde gezeigt, dass frühere Beispiele der morphologischen Umkehrung der Transformation durch Herbiomycin A (und andere Benzochinonansamycine) über einen Mechanismus wirken, der mit der Kinasehemmung in keinem Zusammenhang steht und aus einem Hitzeschockprotein (hsp90)-vermittelten Zielen der onkogenen Tyrosinkinase auf das Proteasom besteht.

Verallgemeinerung auf andere Kinasen

[0204] Der Vorteil der Verwendung von Mutagenese zur Bereitstellung eines einzigartigen molekularen Unterschieds zwischen dem interessierenden Enzym und allen anderen ist, dass aufgrund der erhaltenen Kinasefaltung die Methode über die Kinasesuperfamilie hinweg erweiterbar sein sollte. Beinahe alle bekannten Pro-

teinkinasen enthalten eine voluminöse Seitenkette an der dem Rest 338 von v-Src entsprechenden Position. Daher sollte eine Raum-erzeugende Mutation an dieser Position multiple Kinasen für eine selektive Hemmung empfänglich machen. Um dies zu testen, maßen wir die Hemmung der Analoga gegen T339G-Fyn (Tabelle 1). Es besteht eine auffallende Ähnlichkeit in den Struktur-Aktivitätsbeziehungen der Analoga für 1338G-v-Src und T339G-Fyn. In Übereinstimmung mit den Daten für 1338G-v-Src war 3 g das wirksamste Inhibitoranalogon gegen T339G-Fyn, wobei es einen IC_{50} -Wert von 830 nM aufwies. Diese Selektivität für T339G-Fyn entspricht mehr als dem 300-fachen der Selektivität für WT-Fyn. Die Auswirkung dieser Daten besteht darin, dass multiple Tyrosinkinasen systematisch gentechnisch so hergestellt werden können, dass sie ein Inhibitoranalogon vorzugsweise akzeptieren, ohne dass große Bibliotheken mutmaßlicher Inhibitoren gescreent werden müssen.

Schlussfolgerung

[0205] In diesem Bericht beschreiben wir eine neue Methode für eine selektive Proteinkinasehemmung durch die komplementäre gentechnische Herstellung chemisch empfindlicher Kinasen und vernünftig konstruierter Inhibitoren. Wir zeigen, dass eine hohe Selektivität für die Zielkinase in ganzen Zellen erreicht werden kann und dass die Hemmung der aktiven Stelle einer onkogenen Tyrosinkinase für die Unterbrechung einer transformierten Zellmorphologie ausreichend sein kann. Da die Methode leicht verallgemeinert wird, sollte sie weit reichende Anwendungen bei der Entfaltung der Signaltransduktionswege, sowie bei der Validierung von Kinasen als Ziele für ein Arzneimitteldesign aufweisen. Das Tempo einer wirksamen Arzneimittellentdeckung wird durch die Identifikation und Validierung wichtiger Arzneimittelizele eingeschränkt. Dies ist kein triviales Problem in einem Milieu von 2000 homologen Proteinen. Die Verwendung chemisch empfindlicher Mutanten von Proteinkinasen erweitert die Fähigkeit die zellulären und physiologischen Wirkungen einer pharmakologischen Kinasehemmung zu sondieren. Da transfizierte Zelllinien und sogar „knock-in“-Mäuse nun schnell erzeugt werden können, sollte unsere Methode den Prozess des Testens der Wirkungen der selektiven Hemmung einer gegebenen Kinase in einer ganzen Zelle oder in einem Tiermodell stark beschleunigen. Da mehr Inhibitor-gebundene Proteinkinase-Kristallstrukturen verfügbar werden, wird diese Strategie eine systematische Untersuchung der zeitlichen Wirkungen und der Dosis-abhängigen Hemmung einer gegebenen Kinase im Rahmen einer gesamten Signaltransduktionskaskade gestatten.

Materialien und Verfahren

Chemische Synthese

[0206] Alle Ausgangsmaterialien und synthetischen Reagenzien wurden von Aldrich bezogen, sofern es nicht anders angegeben ist. Alle Verbindungen wurden durch ^1H NMR und hochauflösende Massenspektrometrie charakterisiert. 4-Amino-1-tert-butyl-3-phenylpyrazol[3,4-d]pyrimidin (2) wurde entsprechend Hanefeld, et al. synthetisiert.

[0207] Allgemeines Verfahren für die N-4-Acylierung von Z (3a-3g). Zu einer Lösung von 2 (100 mg), gelöst in 2 mL Pyridin, wurden 10 Äquivalente des gewünschten Acylchlorids bei 0 °C zugegeben. Man ließ die Reaktionsmischung auf Raumtemperatur erwärmen und rührte während 12 Stunden. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 25 mL Wasser gequenchet. Die resultierende Mischung wurde mit Et_2O extrahiert und die vereinigten Et_2O -Extrakte wurden mit 1 N HCl und 5 % NaHCO_3 gewaschen. Die Et_2O -Schicht wurde über MgSO_4 getrocknet und eingedampft. Der Rückstand wurde durch Flash-Chromatographie auf 25 g Silikagel durch Elution mit Et_2O /Hexanen, 1:1, gewaschen, um reines 3a-3g zu ergeben.

[0208] 4-Cyclobutylamido-1-tert-butyl-3-phenylpyrazol[3,4-d]pyrimidin (3a): Ausbeute 0,0116 g (16 %), weißes Pulver; HRMS (EI) Molekülion, berechnet für $\text{C}_{20}\text{H}_{23}\text{N}_5\text{O}$ 349,19049, gefunden 349,18762; ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3 , ppm) d 1,86 (9H, s), 1,89–2,27 (6H, m), 3,58 (1H, m), 7,26–7,67 (5H, m), 8,69 (1H, s).

[0209] 4-Cyclopentylamido-1-tert-butyl-3-phenylpyrazol[3,4-d]pyrimidin (3b): Ausbeute 0,0456 g (68 %), weißes Pulver; HRMS (EI) Molekülion, berechnet für $\text{C}_{21}\text{H}_{23}\text{N}_5\text{O}$ 363,20615, gefunden 363,20398; ^1H NMR (270 MHz, CDCl_3 , ppm) d 1,41–1,91 (8H, m), 1,87 (9H, s), 2,97 (1H, m), 7,51–7,67 (5H, m), 8,70 (1H, s).

[0210] 4-Cyclohexylamido-1-tert-butyl-3-phenylpyrazol[3,4-d]pyrimidin (3c): Ausbeute 0,0575 g (84 %), weißes Pulver; HRMS (EI) Molekülion, berechnet für $\text{C}_{22}\text{H}_{27}\text{N}_5\text{O}$; ^1H NMR (270 MHz, CDCl_3 , ppm) d 1,21–1,93 (10H, m), 1,86 (9H, s), 2,43 (1H, m), 7,51–7,67 (5H, m), 8,70 (1H, s).

[0211] 4-2'-Furylamido-1-tert-butyl-3-phenylpyrazol[3,4-d]pyrimidin (3d): Ausbeute 0,0342 g (60 %), weißes Pulver; HRMS (EI) Molekülion, berechnet für $\text{C}_{20}\text{H}_{19}\text{N}_5\text{O}_2$ 361,15407, gefunden 361,15254; ^1H NMR (270 MHz,

CDCl_3 , ppm) d 1,87 (9H, s), 6,52 (1H, d), 7,23 (1H, d), 7,43–7,53 (5H, m), 7,95 (1H, s), 8,59 (1H, s).

[0212] 4-Benzamido-1-tert-butyl-3-phenylpyrazol[3,4-d]pyrimidin (3e): Ausbeute 0,1309 g (56 %), weißes Pulver; HRMS (EI) Molekülion, berechnet für $\text{C}_{22}\text{H}_{21}\text{N}_5\text{O}$ 371,17933, gefunden 371,17324; ^1H NMR (270 MHz, CDCl_3 , ppm) d 1,41–1,91 (8H, m), 7,22–8,11 (10H, m), 8,48 (1H, s).

[0213] 4-(p-Methyl)benzamido-1-tert-butyl-3-phenylpyrazol[3,4-d]pyrimidin (3f): Ausbeute 0,0751 g (33 %), weißes Pulver; HRMS (EI) Molekülion, berechnet für $\text{C}_{23}\text{H}_{23}\text{N}_5\text{O}$ 385,19499, gefunden 385,18751; ^1H NMR (270 MHz, CDCl_3 , ppm) d 1,88 (9H, s), 2,42 (3H, s), 7,19 (2H, d), 7,41–8,11 (7H, m), 8,49 (1H, s).

[0214] 4-(p-tert-butyl)benzamido-1-tert-butyl-3-phenylpyrazol[3,4-d]pyrimidin (3g): Ausbeute 0,1050 g (42 %), weißes Pulver; HRMS (EI) Molekülion, berechnet für $\text{C}_{26}\text{H}_{29}\text{N}_5\text{O}$ 427,23747, gefunden 427,23474; ^1H NMR (270 MHz, CDCl_3 , ppm) d 1,35 (9H, s), 1,88 (9H, s), 7,38–7,99 (9H, m), 8,50 (1H, s).

[0215] Allgemeines Verfahren zur Reduktion von N-4-Acylverbindungen zu N-4-Methylenverbindungen (4b, 4d, 4e). Ein Rundkolben wurde mit 30 mg LiAlH_4 beschickt. Der Kolben war mit einem den Druck ausgleichenden Tropftrichter ausgestattet und wurde mit trockenem Argon gespült. Das LiAlH_4 wurde in 3 mL THF über einem Eisbad suspendiert. Ungefähr 100 mg des entsprechenden N-4-Acyl-Analogons von 2 wurden in 5 mL THF gelöst und tropfenweise zu der LiAlH_4 -Suspension gegeben. Die Reaktionsmischung wurde während 30 min auf dem Eisbad gerührt und nachfolgend 30 min unter Rückfluß erhitzt. Die Reaktion wurde durch die aufeinanderfolgenden tropfenweisen Zugaben von 1 mL EtOAc, 1 mL Wasser und 1 mL 6N NaOH gequenchet. Nach Rühren während fünf Minuten wurde die Reaktionsmischung durch ein Kieselgurkissen filtriert, mit Wasser verdünnt und mit Et_2O extrahiert. Die Et_2O -Extrakte wurden kombiniert, über MgSO_4 getrocknet und eingedampft. Der Rückstand wurde durch Flash-Chromatographie auf 10 g Silikagel durch Elution mit einer 4:1-Mischung von Hexanen/EtOAc gereinigt.

[0216] 4-Cyclopentylmethylamino-1-tert-butyl-3-phenylpyrazol[3,4-d]pyrimidin (4b): Ausbeute 0,0649 g (75 %), klares Öl; HRMS (EI) Molekülion, berechnet für $\text{C}_{20}\text{H}_{27}\text{N}_5$ 349,22691, gefunden 349,22420; ^1H NMR (270 MHz, CDCl_3 , ppm) d 1,16–2,14 (9H, m), 1,84 (9H, s), 3,54 (2H, d), 5,51 (1H, s), 7,46–7,67 (5H, m), 8,43 (1H, s).

[0217] 4-2'-Furylmethylamino-1-tert-butyl-3-phenylpyrazol[3,4-d]pyrimidin (4d): Ausbeute 0,0620 g (66 %), beiges Pulver; HRMS (EI) Molekülion, berechnet für $\text{C}_{20}\text{H}_{21}\text{N}_5\text{O}$ 347,17483, gefunden 347,17330; ^1H NMR (270 MHz, CDCl_3 , ppm) d 1,83 (9H, s), 4,75 (2H, d), 5,64 (1H, s), 6,25 (2H, d), 7,34–7,63 (6H, m), 8,45 (1H, s).

[0218] 4-Benzylamino-1-tert-butyl-3-phenylpyrazol[3,4-d]pyrimidin (4e): Ausbeute 0,0520 g (154%), weißes Pulver; HRMS (EI) Molekülion, berechnet für $\text{C}_{22}\text{H}_{23}\text{N}_5$ 357,19559, gefunden 357,19303; ^1H NMR (270 MHz, CDCl_3 , ppm) d 1,82 (9H, s), 4,76 (2H, d), 5,63 (1H, s), 7,28–7,63 (10H, m), 8,44 (1H, s).

Proteinexpression und -reinigung.

[0219] Die ortsspezifische Mutagenese und das Klonieren von Genen für die Glutathion-S-Transferasefusionsproteine der WT-v-Src-SH1-Domäne, von 1338G-v-Src-SH1, WT-Fyn, T339G-Fyn und WT-Abl in das pGEX-KT-Plasmid wurde, wie früher beschrieben wurde, ausgeführt. Diese Kinasen wurden in DH5a E. coli exprimiert und auf immobilisierten Glutathionkügelchen (Sigma) gereinigt. PKA wurde von (Pierce) bezogen und ohne weitere Reinigung verwendet. PKCd wurde als das 6-His-Konstrukt unter Verwendung des Bac-zu-Bac-Expressionssystems (pFastBac-B-Vektor) exprimiert. PKCd wurde unter Verwendung einer QIA-express-Ni-NTA-Agarosesäule gereinigt.

In Vitro Kinaseinhibierungssassay

[0220] Für mutmaßliche Kinaseinhibitoren wurden IC_{50} -Werte bestimmt, indem die Zählimpulse pro Minute (cpm) von ^{32}P , das zu einem für die Kinasen der src-Familie (IYGEFKKK) optimierten Peptidsubstrat übertragen wurde, gemessen wurden. Verschiedene Konzentrationen des Inhibitors wurden mit 50 mM Tris (pH-Wert 8,0), 10 mM MgCl_2 , 1,6 mM Glutathion, 1 mg/mL BSA, 133 mM IYGEFKKK, 3,3 % DMSO, 0,05 mM Kinase und 11 nM (2 m Ci) $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ (6000 Ci/mmol, NEN) in einem Gesamtvolumen von 30 mL während 30 Minuten inkubiert. Die Reaktionsmischungen (25 mL) wurden auf eine Phosphozellulosescheibe getüpfelt, in 10 % HOAc eingetaucht und mit 0,5 % H_3PO_4 gewaschen. Die Übertragung von ^{32}P wurde durch Standardscintillationszählung gemessen. Der IC_{50} -Wert wurde als die Konzentration des Inhibitors definiert, bei der der cpm-Wert 50 % der Kontrollscheibe betrug. Fiel der IC_{50} -Wert zwischen zwei gemessene Konzentrationen, wurde er, basierend auf der Annahme einer umgekehrt proportionalen Beziehung zwischen Inhibitorkonzentration und cpm-Wert,

zwischen zwei Datenpunkten berechnet. Da die Löslichkeitsgrenze der Inhibitoranaloga in wässrigen Lösungen 300 μM beträgt, konnten IC_{50} -Werte von 250 μM als ungefähre vollständige Titrations bis zu der oberen Inhibierungsgrenze nicht getestet werden. IC_{50} -Werte für Kinasen nicht aus der src-Familie wurden entsprechend mit den folgenden Ausnahmen gemessen. Kemptide (Pierce, 133 g/mL) wurde als Substrat für PKA verwendet. Für die Abl-Assays wurde ein optimiertes Abl-Substrat (EATYAAPFAFFF, 133 mg/mL) verwendet. Die PKCd-Assays wurden in Gegenwart von 17 ng/mL Diacylglycerol (Sigma) und 17 ng/mL Phosphatidylserin (Sigma) mit 170 ng/mL Histon (Sigma) als Kinasesubstrat durchgeführt.

Muriner B-Zellen-Assay

[0221] Splenische Lymphozyten wurden aus 6–20 Wochen alten Balb/c oder C57/B6-Mäusen isoliert. Die Zellen wurden aus der Milz in RPMI-Medien gespült, die 1 mg/mL DNase I enthielten, und die roten Blutzellen wurden in 17 mM Tris-ammoniumchlorid, pH-Wert 7,2, lysiert. Ungefähr 4×10^6 Zellen wurden bei 37 °C während 30 Minuten mit 100 mM 3g oder 2 in 1,1 % DMSO inkubiert. Die B-Zellenstimulation wurde durch die Zugabe von 2 mg Ziege-Anti-Maus-IgM (Jackson Immuno Research, Kat # 115-005-075) und nachfolgender Inkubation während 5 Minuten bei 37 °C eingeleitet. Die Zellen wurden durch Zentrifugation (13.000 Upm, 2 min) isoliert und lysiert (Lysepuffer: 1 % Triton X-100, 50 mM Tris pH-Wert 7,4, 2 mM EDTA, 150 mM NaCl, 100 mM PMSF, 2 mM Natriumorthovanadat, 10 mg/mL Leupeptin, 10 mg/mL Apoptotin). Die Zelltrümmer wurden dann mit 13.000 Upm während 15 min pelletisiert. Die zellulären Proteine wurden durch 10 % Polyacrylamidgelelektrophorese getrennt und auf eine Nitrocellulosemembran durch Western-Blotting übertragen. Die Phosphotyrosin-enthaltenden Proteine wurden durch Immun-Blotting mit Anti-Phosphotyrosin-Antikörper (Upstate Biotechnology, Inc.) sichtbar gemacht.

Retrovirale Infektion von NIH3T3-Fibroblasten

[0222] Die WT- und 1338-G-v-Src-kodierenden Gene wurden in eine Verpackungszelllinie transfiziert und NIH3T3-Fibroblasten wurden unter Verwendung des pBabe-retroviralen Vektors und eines Puromycin (2,5 mg/mL) selektierbaren Makers, wie beschrieben ist (Shah, K., Liu, Y., Shokat, K.K. in Vorbereitung), retroviral infiziert. Die WT- und 1338G-v-Src-transformierten Zellen wurden in DMEM/10 % BCS, das 2,5 mg/mL Puromycin enthielt, kultiviert.

Hemmung von v-Src in NIH3T3-Fibroblasten

[0223] Nicht transformierte NIH3T3-Zellen, WT-v-Src-transformierte NIH3T3-Zellen und 1338G-v-Src-transformierte NIH3T3-Zellen wurden bei 37 °C mit 1,1 % DMSO oder 100 mM 3g in 1,1 % DMSO inkubiert. Nach 12 Stunden wurden die Zellen mit PBS gewaschen und lysiert (Lysepuffer: 1 % Triton X-100, 50 mM Tris pH-Wert 7,4, 2 mM EDTA, 150 mM NaCl, 100 mM Phenylmethylsulfonylfluorid, 2 mM Natriumorthovanadat, 10 mg/mL Leupeptin, 10 mg/mL Apoptotin). Das Lysat wurde durch Zentrifugation mit 13.000 Upm während 15 min geklärt. Die Lysatproteinkonzentrationen wurden normiert und gleiche Volumina des Lysats wurden elektrophoretisch aufgelöst und bezüglich des Phosphotyrosingehalts, wie vorstehend beschrieben ist, analysiert.

Mikroskopie

[0224] Nicht transformierte, WT-v-Src-transformierte und 1338G-v-Src-transformierte NIH3T3-Fibroblasten wurden in DMEM/10 % BCS auf mit Zellkultur behandelten Objektträgern vermehrt. V-Src-exprimierende Zellen wurden entweder mit 1,1 % DMSO oder 100 mM 3g in 1,1 % DMSO behandelt. Nach 48 Stunden wurden die Zellen mit 400-facher Vergrößerung auf einem Nikon TMS-Lichtmikroskop photographiert. Unmittelbar nach der Lichtmikroskopie wurden die Zellen während 20 min in 3,7 % Formaldehyd/PBS fixiert und während 60 sek in 0,2 % Triton X-100/PBS permeabilisiert. Die permeabilisierten Zellen wurden mit 200 ng/mL Phalloidin-FITC/PBS während 20 min inkubiert. Die Objektträger wurden mit PBS gewaschen und polymerisiertes Actin wurde durch Fluoreszenzmikroskopie mit 600-facher Vergrößerung auf einem Zeiss-Fluoreszenzmikroskop sichtbar gemacht.

BEISPIEL 17

Bestätigung der Beibehaltung der Proteinsubstratspezifität und der biologischen Aktivität

[0225] Dies könnte, wie in (79) beschrieben ist, ausgeführt werden. Weiterhin kann die stereotypisierte Rolle von v-Src in der onkogenen Transformation von NIH3T3-Zellen durch Beobachten der morphologischen Änderung in den v-Src-exprimierenden Zellen bestimmt werden. Die mutierte 1338G-v-Src-exprimierenden

NIH3T3-Zellen zeigen morphologische Merkmale, die zu den Zellen identisch sind, die v-Src vom Wildtyp exprimieren, und die sich dramatisch von den NIH3T3-Zellen unterscheiden, die keine der beiden v-Src-Kinasen exprimieren, wobei bestätigt wird, dass die 1338G-Mutation nicht zu irgendeinem Verlust oder Gewinn an biologischer Funktion der normalen v-Src führt. Weiterhin kann ein Assay bezüglich der Fähigkeit von NIH3T3-Zellen, sich ohne „Kontakthemmung“ zu vermehren, in einem auf einer Zellkultur basierenden Assay, die Agarose und ein viskoses Wachstumsmedium enthält, beurteilt werden. Die v-Src vom Wildtyp- und die mutierte v-Src-exprimierenden NIH3T3-Zellen zeigen in diesem stereotypisierten Assay ebenfalls die genau gleiche Fähigkeit zur Bildung großer Wachstumskolonien, wodurch weiter ihre identischen Funktionen in Fibroblasten (einschließlich die Substratspezifität, Kinetik, Zellverteilung, usw.) bestätigt werden.

BEISPIEL 18

Bestätigung, dass der orthogonale Inhibitor keine Kinasen vom Wildtyp in Zellen hemmt, die multiple Tyrosinkinasen exprimieren.

[0226] Zur Bestätigung unserer anfänglichen Assays hinsichtlich der orthogonalen Natur von Verbindung 3 in gereinigten Kinasen, wie in Beispiel 2 beschrieben ist, führten wir Inhibierungsexperimente unter Verwendung ganzer Zellen (siehe [Fig. 12](#), zwei linke Spuren) durch. Anti-Phosphotyrosin-Blots von mit Pyrazolpyrimidin (2–6) (25 µM) behandelten NIH3T3-Zellen, die die v-Src-Kinase exprimieren, wurden durch Lysieren der Zellen in modifiziertem RIPA-Puffer, gemäß dem Verfahren von Coussens et al. (84), durchgeführt. Die Zellen wurden ebenfalls während verschiedenen Zeitdauern vor der Lyse und dem Anti-Phosphotyrosinnachweis behandelt. Die Proteine wurden durch 12,5 %-SDS-PAGE getrennt und auf Protran BA85 (Schleicher-Schuell) übertragen. Der Blot wurde mit Anti-Phosphotyrosin-monoklonalem Antikörper 4G10 (eine Gabe von Dr. Brian Druker, Oregon Health Sciences Center Portland, Oregon) sondiert und der gebundene Antikörper wurde über erhöhte Chemilumineszenz (Kat. 34080, Pierce), nach der Behandlung mit HRP-gekoppeltem Ziege-Anti-Maus-Antikörper (VWR Kat. 7101332), entsprechend den Anweisungen des Herstellers, nachgewiesen.

BEISPIEL 19

Identifizierung der Substrate

[0227] Eine schematische Darstellung einer experimentellen Methode zur Identifizierung von v-Src-Substraten ist in [Fig. 1](#) dargelegt und die Daten, die die experimentelle Validierung zeigen, befinden sich in [Fig. 12](#). Die Assays wurden durchgeführt, indem Anti-Phosphotyrosin-Blots von mit Pyrazolpyrimidin (2–6) (25 µM)-behandelten NIH3T3-Zellen, die entweder v-Src- oder v-Src-(1338G)-Kinasen exprimieren, hergestellt wurden, indem Zellen in modifiziertem RIPA-Puffer, entsprechend dem Verfahren von Coussens et al. (84), lysiert wurden. Die Zellen wurden ebenfalls während verschiedenen Zeitdauern vor der Lyse und dem Anti-Phosphotyrosinnachweis (in einem Zellkultur-CO₂-Inkubator) behandelt. Die Proteine wurden durch 12,5 % SDS-PAGE getrennt und auf Protran BA85 (Schleicher-Schuell) übertragen. Der Blot wurde mit Anti-Phosphotyrosin-monoklonalem Antikörper 4G10 (eine Gabe von Dr. Brian Druker, Oregon Health Sciences Center Portland, Oregon) sondiert und der gebundene Antikörper wurde über erhöhte Chemilumineszenz (Kat. 34080 Pierce), nach Behandlung mit HRP-gekoppeltem Ziege-Anti-Maus-Antikörper (VWR Kat. 7101332), entsprechend den Anweisungen des Herstellers, nachgewiesen. Wie in Beispiel 18 erörtert ist, zeigen die zwei linken Spuren in [Fig. 12](#) dasselbe Phosphoproteinbandmuster, was darauf hinweist, dass der orthogonale Inhibitor 3 die v-Src-Kinase vom Wildtyp nicht hemmt. Die Reihe von Spuren in dem rechten Gel zeigt eine vorspringende Bande im untersten Teil des Gels (die einem Proteingewicht von 3 Kilodalton entspricht), die nach Behandlung mit 100 µM Verbindung 3 verloren geht.

[0228] Diese spezifische Hemmung eines Phosphoproteins ist ein Kennzeichen eines spezifischen Kinaseinhibitors. Die Spezifität der Hemmung wird in den letzten Spuren des Gels bestätigt, in denen der Inhibitor verdünnt ist, und die Phosphorylierung der 36 Kilodalton Bande tritt wieder auf, wenn die Inhibitorkonzentration geringer als 5 µM (der gemessene IC₅₀-Wert in vitro beträgt 5 µM, siehe Text) ist. Dieses Protein wurde vorläufig, basierend auf dessen einzigartigem Molekulargewicht, als ein Protein identifiziert, das Annexin II genannt wird und ein Actin-bindendes Protein mit unbekannter Funktion ist.

1. Mustelin, T. 1994. T Cell antigen receptor signaling: Three families of tyrosine kinases and a phosphatase. *Immunity*. 1: S. 351–356.
2. Renshaw, M.W., E.T. Kipreos, M.R. Albrecht and J.Y.J. Wang 1992. Oncogenic v-Abl tyrosine kinase can inhibit or stimulate growth, depending on the cell context. *EMBO J.* 11(11): S. 3941–3951.
3. Cohen, G.B., R. Ren and D. Baltimore 1995. Modular Binding Domains in Signal Transduction Proteins. *Cell*.

80: S. 237–248.

4. Hunter, T. 1987. A Thousand and One Protein Kinases. *Cell*. 50: S. 823–829.

5. Eiseman, E. and J.B. Bolen 1992. Engagement of the high-affinity IgE receptor activates src protein-related tyrosine kinases. *Nature*. 355.

6. Murray, A.W. 1994. Cyclin-dependent kinases: regulators of the cell cycle and more. *Chem. and Bio.* 1(4): S. 191–195.

7. White, M.F. 1991. Mini-Review: Structure and Function of Tyrosine Kinase Receptors. *J. Bioenergetics Bio-mem.* 23(1): S. 63–83.

8. Hunter, T. 1995. Protein Kinases and Phosphatases: The Yin and Yang of Protein Phosphorylation and Signaling. *Cell*. 80: S. 225–236.

9. Sawyers, C.L. 1992. The bcr-abl gene in chronic myelogenous leukaemia. *Cancer Surveys*. 15: S. 37–51.

10. Crabtree, G.R. and N.A. Clipstone 1994. Signal Transmission between the plasma membrane and nucleus of T lymphocytes. *Annu. Rev. Biochem.* 63: S. 1045–1983.

11. Kurzrock, R., J.U. Gutterman and M. Talpaz 1998. The molecular genetics of Philadelphia chromosome-positive leukemias. *New Engl. J. Med.* 319(15): S. 990–998.

12. Ullrich, A. and J. Schlessinger 1990. Signal transduction by receptors with tyrosine kinase activity. *Cell*. 61: S. 203–212.

13. Bolen, J.B., R.B. Rowley, C. Spana and A.Y. Tsygankov 1992. The Src family of tyrosine protein kinases in hemopoietic signal transduction. *FASEB*. 6: S. 3403–3409.

14. Cicchetti, P., B.J. Mayer, G. Thiel and D. Baltimore 1992. Identification of a Protein that binds to the SH3 region of Abl and is similar to Bcr and GAP-rho. *Science*. 257: S. 803–806.

15. Sawyers, C.L. J. McLaughlin, A. Goga, M. Havlik and O. Witte 1994. The nuclear tyrosine kinase c-Abl negatively regulates cell growth. *Cell*. 77: S. 121–131.

16. Kipreos, E.T. and J.Y.J. Wang 1992. Cell Cycle-regulated binding of c-abl Tyrosine kinase to DNA. *Science*. 256: S. 382–385.

17. Velazquez, L., M. Fellous, G.R. Stark and S. Pellegrini 1992. *Cell*. 70: S. 313–320.

18. Duyster, J., R. Baskaran and J.Y.J. Wang 1995. Src homology 2 domain as a specificity determinant in the c-Abl-mediated tyrosine phosphorylation of the RNA-Polymerase II carboxyl-terminal repeated domain. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*. 92: S. 15[^]55–1559.

19. Mayer, B.J., P.K. Jackson and D. Baltimore 1991. The noncatalytic src homology region 2 segment of abl tyrosine kinase binds to tyrosine-phosphorylated cellular proteins with high affinity. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*. 88: S. 627–631.

20. Kamps, M.P., J.E. Buss and B.M. Sefton 1986. Rous Sarcoma Virus Transforming protein lacking myristic acid phosphorylates known polypeptide substrates without inducing transformation. *Cell*. 45: S. 105–112.

21. Muller, A.J., A.-M. Pendergast, K. Parmar, M.H. Havlik, N. Rosenberg and O.N. Witte 1993. En Bloc Substitution of the Src homology region 2 domain activates the transforming potential of the c-abl protein tyrosine kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*. 90: S. 3457–3461.

22. Mayer, B.J. and D. Baltimore 1994. Mutagenic analysis of the roles of SH2 and SH3 domains in regulation of the abl tyrosine kinase. *Mol. Cell. Bio.* 14(5): S. 2883.

23. Mayer, B.J., P.K. Jackson, R.A. Van Etten and D. Baltimore 1992. Point Mutations in the abl SH2 domain coordinately impair phosphotyrosine binding in vitro and transforming activity in vivo. *Mol. Cell. Bio.* 12(2): S. 609–618.

24. Koyama, S., H. Yu, D.C. Dalgarno, T.B. Shin, L.D. Zydowsky and S.L. Schreiber 1993. Structure of the PI3K SH3 domain and analysis of the SH3 Family. *Cell*. 72: S. 945–952.

25. Yu, H., M.K. Rosen, T.B. Shin, C. Seidel-Dugan, J.S. Brugge and S.L. Schreiber 1992. Solution Structure of the SH3 domain of Src and identification of its ligand binding site. *Science*. 258: S. 1665–1668.

26. Kohda, D., H. Hatanaka, M. Odaka, V. Mandiyan, A. Ullrich, J. Schlessinger and F. Inagaki 1993. Solution Structure of the SH3 domain of phospholipase C-gamma. *Cell*. 72: S. 953–960.

27. Waksman, G., S.E. Shoelson, N. Pant, D. Cowburn and J. Kuriyan 1993. Crystal structure/NMR of SH2. *Cell*. 72: S. 779–790.

28. Eck, M.J., S.E. Shoelson and S.C. Harrison 1993. SH2 crystal structure. *Nature*. 362: S. 87.

29. Wang, J.Y.J., C. Queen and D. Baltimore 1982. Expression of an Abelson Murine Leukemia Virus-encoded protein in *Escherichia coli* Causes Extensive Phosphorylation of Tyrosine Residues. *J. Biol. Chem.* 257(22): S. 13181–13184.

30. Schwartzberg, P.L., A.M. Stall, J.D. Hardin, K.S. Bowdish, T. Humaran, S. Boast, M.L. Harbison, E.J. Robertson and S.P. Goff 1991. Mice homozygous for the abl mu mutation show poor viability and depletion of selected B and T cell populations. *Cell*. 65: S. 1165–1175.

31. Tybulewicz, V.L., C.E. Crawford, P.K. Jackson, R.T. Bronson and R.C. Mulligan 1991. Neonatal lethality and lymphopenia in mice with a homozygous disruption of the c-abl proto-oncogene. *Cell*. 65: S. 1153–1163.

32. Brugge, J.S. & Erikson, R.L. 1977. *Nature* 269(5626), 346–8.

33. Jove, R. & Hanafusa, H. 1987. *Ann. Rev. Cell Biol.* 3, 31–56.
34. Erpel, T. & Courtneidge, S.A. 1995. *Curr Op*, in *Cell Biology* 7, 176–182.
35. Pawson, T. 1995. *Nature* 373, 573–580.
36. Waksman, G., Kominos, D., Robertson, S.C., Pant, N., Baltimore, D., Birge, R.B., Cowburn, D., Hanafusa, H., Mayer, B.J., Overduin, M., Resh, M.D., Rios, C.B., Silverman, L. & Kuriyan, J. 1992. *Nature* 358, 646–653.
37. Taylor, S.J. & Shalloway, D. 1993. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 3, 26–34.
38. Brown, M.T. & Cooper, J.A. 1996. *Biochemica et Biophysica Acta* 1287, 121–149.
39. Songyang, Z., Carraway, K.L.I., Eck, M.J., Harrison, S.C., Feldman, R.A., Mohammadi, M., Schlessinger, J., Hubbard, S.R., Smith, D.P., Eng, C., Lorenzo, M.J., Ponder, B.A.J., Mayer, B.J. & Cantley, L.C. 1995. *Nature* 373, 536–539.
40. Kamps, M.P. & Sefton, B.M. 1988. *Oncogene Res.* 3, 105–115.
41. Weijland, A. & Parmeggiani, A. 1993. *Science* 259, 1311–1314.
42. Belshaw, P.J., Schoepfer, J.G., Liu, K.-Q., Morrison, K.L. & Schreiber, S.L. 1995. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 34(19), 2129–2132.
43. Fujii, T., Wu, C.C., Itaya, T., Moro, S. & Saito, T. 1973. *Chem. Pharm. Bull.* 21(8), 1676–1682.
44. Robins, M.J. & Trip, E.M. 1973. *Biochemistry* 12(12), 2179–2187.
45. McLaughlin, L.W., Piel, N. & Hellmann, T. 1985. *Synthesis*, 322–3.
46. Kikugawa, K., Iizuka, K. & Ichino, M. 1973. *J. Med. Chem.* 16, 358–364.
47. Ludwig, J. 1981. *Acta Biochim. et Biophys. Acad. Sci. Hung.* 16(304), 131–133.
48. Hecht, S.M. & Kozarich, J.W. 1973. *Biochim. Biophys. Acta* 331, 307–309.
49. Reikofski, J. & Tao, B.Y. 1992. *Biotech. Adv.* 10, 535–554.
50. Xu, B., Bird, G.V. & Miller, T.W. 1995. *J. Biol. Chem.* 270, 29825–29830.
51. Fukazawa, H., Li, P., Mizuno, S. & Uehara, Y. 1993. *Analytical Biochemistry*, 212, 106–110.
52. Lee, T.R., Niu, J. & Lawrence, D.S. 1995. *J. Biol. Chem.* 270(10), 5375–5380.
53. Kwiatkowski, A.P. & King, M.M. 1987. *Biochemistry* 26, 7636–7640.
54. Hubbard, S.R., Wie, L., Ellis, L. & Hendrickson, W.A. (1994) *Nature* 372, 746–754.
55. Mohammadi, M., Schlessinger, J. & Hubbard, S.R. 1996. *Cell* 86, 577–587.
56. Zheng, J., Knighton, D.R., Ten Eyck, L.F., Karlsson, R., Zuong, N.-H., Taylor, S.S. & Sowadski, J.M. 1993. *Biochemistry* 32, 2154–2161.
57. Jeffrey, P.D., Russo, A.A., Polyak, K., Gibbs, E., Hurwitz, J., Massague, J. & Pavletich, N.P. 1995. *Nature* 376, 313–320.
58. Kamps, M.P., Taylor, S.S. & Sefton, B.M. 1984, *Nature* 310, 589–592.
59. Zoller, M.J., Nelson, N.C. & Taylor, S.S. 1981, *J. Biol. Chem.* 256, 10837–10842.
60. Taylor, S.S. & Radizio-Andzelm, E. 1995. *Structure* 2, 345–355.
61. DeClue, J.E. & Martin, G.S. 1989. *J. Virol.* 63(2), 542–554.
62. Seidel-Dugan, D., Meyer, B.E., Thomas, S.M. & Brugge, J.S. 1992. *Mol. Cell Biol.* 12(4), 1835–45.
63. Czernilofsky, A.D., Levison, A.D., Varmus, H.E., Bishop, J.M., Tischer, E. & Goodman, H.M. 1980. *Nature (London)* 287, 198–200.
64. Fersht, A., *Enzyme Structure and Mechanism*. Zweite Aufl. 1985, New York: W.H. Freeman and Co. 475.
65. Hunter, T. & Sefton, B.M. 1980. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77(3), 1311–1315.
66. Ozawa, K., Szallasi, Z., Kazanietz, M.G., Blumberg, P.M., Mischak, H., Mushinski, J.F. & Beaven, M.A. 1993, *J. Biol. Chem.* 268(3), 1749–1756.
67. Schultz, C., Vajanaphanich, M., Genieser, H.-G., Jastorff, B., Barret, K.E. & Tsien, R.Y. 1994. *Mol. Pharm.* 46, 702–708.
68. Merritt, E.A. & Murphy, M.E.P. 1994, *Acta Cryst. D* 50, 869–873.
69. Bacon, D.J. & Anderson, W.F. 1988. *J. Molec. Graphics* 6, 219–220.
70. Schluckebeir, G., O-Gara, M., Saenger, W. & Chen, X. "Universal Catalytic Domain Structure of AdoMet-dependent Methyltransferases", 1995. *Mol. Biol.* 247, S. 16–20.
71. *Protein Kinase Facts Book*, G. Hardie and S. Hanks, Herausg. 1995, Academic Press, San Diego, ISBN 0-12-324719-5.
72. *Principles of Biochemistry*, A. Lehninger, D. Nelson and M. Cox, 2. Aufl., 1993. Worth Publishers, New York, ISBN 0-87901-500-4.
73. C.R. Faltynek. Et al. 1995. *Biochemistry* 34, 12404–10.
74. J. Hanke, et al. 1996. *J. Biol. Chem.* 271, 695–701.
75. B.J. Druker, et al. 1996. *Nat. Med.* 5, 561–6.
76. U. Hanefeld, C.W. Rees, A.J.P. White, D.J. Williams (1996). One-pot synthesis of tetrasubstituted pyrazoles-proof of regiochemistry *J. Chem. Soc. Perkin Trans 1*, 1545–1552.
77. J. Reikofski, B.Y. Tao (1992). *Polymerase Chain Reaction (PCR Techniques for Site-directed Mutagenesis)* *Biotech. Adv.* 10, 535–554.
78. B. Xu, G.V. Bird, T.W. Miller (1995). *Substrate Specificities of the Insulin and Insulin-like Growth Factor 1*

Receptor Tyrosine Kinase Catalytic Domains J. Biol. Chem. 270, 29825–29830.

79. K. Shah, Y. Liu, C. Deirmengian, K.M. Shokat (1997). Engineering Unnatural Nucleotide Specificity for Rous sarcoma virus tyrosine kinase to uniquely Label its Direct Substrates Proc. Natl. Acad. Sci. 94, 3565–3570.

80. J.P. Morgenstern, H. Land (1990). Advanced mammalian gene transfer: high titre retroviral vectors with multiple drug selection markers and a complementary helper-free packaging cell line Nucleic Acids Res. 18, 3587–3596.

81. W.S. Pear, G.P. Nolan, M.L. Scott, D. Baltimore (1993). Production of high-titer helper-free retroviruses by transient transfection Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90, 8392–8396.

82. O. Danos, R.C. Mulligan (1988). Safe and efficient generation of recombinant retroviruses with amphotropic and ecotropic host ranges. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85, 6560–4.

83. T.R. Lee, J. Niu, D.S. Lawrence (1995). The extraordinary active site substrate specificity of pp60c-src. A multiple specificity protein kinase. J. Biol. Chem. 270, 5375–5380.

84. P.M. Coussens, J.A. Cooper, T. Hunter, D. Shalloway (1985). Restriction of the In Vitro and In Vivo Tyrosine Kinase Activities of pp60c-src Relative to pp60v-Src Molecular and Cell. Biol., 2753–2763.

[0229] Die vorliegende Erfindung kann in anderen Ausführungsformen oder auf anderen Wegen ausgeführt werden, ohne von ihrem Geist oder wesentlichen Merkmalen abzuweichen. Die vorliegende Offenbarung ist daher in jeder Beziehung erläuternd und nicht als einschränkend anzusehen, wobei der Umfang der Erfindung durch die beigefügten Ansprüche angezeigt ist, und alle Änderungen, die innerhalb der Bedeutung und des Bereichs der Äquivalenz liegen, sollen darin umfaßt sein.

(1) ALLGEMEINE INFORMATION:

(i) ANMELDER: SHOKAT, KEVAN

(ii) TITEL DER ERFINDUNG: GENTECHNISCH HERGESTELLTE
KINASEN UND ANDERE GENTECHNISCH HERGESTELLTE MULTI-
SUBSTRAT-ENZYME; UND VERFAHREN ZU DEREN SYNTHESE UND
VERWENDUNG

(iii) ZAHL DER SEQUENZEN: 9

(iv) KORRESPONDENZADRESSE:

(A) ADRESSAT: Klauber & Jackson

(B) STRASSE: 411 Hackensack Avenue, 4. Stock

(C) STADT: Hackensack

(D) BUNDESSTAAT: New Jersey

(E) LAND: U.S.A.

(F) POSTLEITZAHL: 07601

(v) COMPUTERLESBARE FORM:

(A) MEDIUM: Floppydisk

(B) COMPUTER: IBM PC kompatibel

(C) BETRIEBSSYSTEM: PC-DOS/MS-DOS

(D) SOFTWARE: PatentIn Release #1.0, Version #1.30

(vi) GEGENWÄRTIGE ANMELDEDATEN:

(A) ANMELDENUMMER: US

(B) ANMELDETAG:

(C) KLASSIFIKATION:

(viii) ANWALT/VERTRETERINFORMATION

(A) NAME: Jackson Esq., David A.

(B) REGISTRIERNUMMER: 26,742

(C) REFERENZ/AKTENZEICHEN: 2275-1-004

(ix) TELEKOMMUNIKATIONSINFORMATION:

(A) TELEFON: 201-487-5800

(B) TELEFAX: 201-343-1684

(C) TELEX: 133521

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR: 1:

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:

(A) LÄNGE: 27 Aminosäuren

(B) TYP: Aminosäure

(C) STRÄNGIGKEIT: nicht relevant

(D) TOPOLOGIE: nicht relevant

(ii) MOLEKÜLART: Peptid

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iv) ANTISENSE: NEIN

(v) FRAGMENTART: intern

(vi) URSPRUNG:

(A) ORGANISMUS: Homo sapiens

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR: 1:

Asn Phe Pro Phe Leu Val Lys Leu Glu Phe Ser Phe Lys Asp Asn Ser

1 5 10 15

Asn Leu Tyr Met Val Met Glu Tyr Val Pro Gly

20 25

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR: 2:

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:

(A) LÄNGE: 27 Aminosäuren

(B) TYP: Aminosäure

(C) STRÄNGIGKEIT: nicht relevant

(D) TOPOLOGIE: nicht relevant

(ii) MOLEKÜLART: Peptid

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iv) ANTISENSE: NEIN

(v) FRAGMENTART: intern

(vi) URSPRUNG:

(A) ORGANISMUS: Homo sapiens

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR: 2:

Asn His Pro Asn Ile Val Lys Leu Leu Asp Val Ile His Thr Glu Asn

1 5 10 15

Lys Leu Tyr Leu Val Phe Glu Phe Leu His Gln

20 25

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR: 3:

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:

(A) LÄNGE: 26 Aminosäuren

(B) TYP: Aminosäure

(C) STRÄNGIGKEIT: nicht relevant

(D) TOPOLOGIE: nicht relevant

(ii) MOLEKÜLART: Peptid

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iv) ANTISENSE: NEIN

(v) FRAGMENTART: intern

(vi) URSPRUNG:

(A) ORGANISMUS: Rous-Sarkom-Virus

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR: 3:

Arg His Glu Lys Leu Val Gln Leu Tyr Ala Val Val Ser Glu Glu Pro

1 5 10 15

Ile Tyr Ile Val Ile Glu Tyr Met Ser Lys

20 25

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR: 4:

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:

(A) LÄNGE: 30 Basenpaare

(B) TYP: Nukleinsäure

(C) STRÄNGIGKEIT: einfach

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLART: weitere Nukleinsäure

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iv) ANTISENSE: JA

(vi) URSPRUNG:

(A) ORGANISMUS: Rous-Sarkom-Virus

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR: 4:

TTTGGATCCA TGGGGAGTAG CAAGAGCAAG

30

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR: 5:

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:

(A) LÄNGE: 30 Basenpaare

(B) TYP: Nukleinsäure

(C) STRÄNGIGKEIT: einfach

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLART: weitere Nukleinsäure

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iv) ANTISENSE: JA

(vi) URSPRUNG:

(A) ORGANISMUS: Rous-Sarkom-Virus

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR: 5:

TTTGAATTCC TACTCAGCGA CCTCCAACAC

30

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR: 6:

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:

(A) LÄNGE: 26 Basenpaare

(B) TYP: Nukleinsäure

(C) STRÄNGIGKEIT: einfach

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLART: weitere Nukleinsäure

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iv) ANTISENSE: JA

(vi) URSPRUNG:

(A) ORGANISMUS: Rous-Sarkom-Virus

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR: 6:

TGAGAAGCTG GCTCAACTGT ACGCAG

26

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR: 7:

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:

(A) LÄNGE: 26 Basenpaare

- (B) TYP: Nukleinsäure
- (C) STRÄNGIGKEIT: einfach
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLART: weitere Nukleinsäure

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iv) ANTISENSE: JA

(vi) URSPRUNG:

(A) ORGANISMUS: Rous-Sarkom-Virus

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR: 7:

CTGCGTACAG TTGAGCCAGC TTCTCA

26

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR: 8:

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:

(A) LÄNGE: 24 Basenpaare

(B) TYP: Nukleinsäure

(C) STRÄNGIGKEIT: einfach

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLART: weitere Nukleinsäure

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iv) ANTISENSE: JA

(vi) URSPRUNG:

(A) ORGANISMUS: Rous-Sarkom-Virus

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR: 8:

CTACATCGTC GCTGAGTACA TGAG

24

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR: 9:

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:

(A) LÄNGE: 24 Basenpaare

(B) TYP: Nukleinsäure

(C) STRÄNGIGKEIT: einfach

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLART: weitere Nukleinsäure

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iv) ANTISENSE: JA

(vi) URSPRUNG:

(A) ORGANISMUS: Rous-Sarkom-Virus

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR: 9:

CTCATGTACT CAGCGACGAT GTAG

24

Patentansprüche

1. Mutierte Proteinkinase, welche ein Alanin oder Glycin als die Aminosäure umfaßt, welche der Position 21 von SEQ ID Nr. 3 entspricht, die Position 338 von v-Src ist, wodurch die mutierte Proteinkinase ein ATP-Analogon mit einem Substituenten, umfassend mindestens drei kovalent an die N⁶-Position gebundene Kohlenstoffatome, bindet und die mutierte Proteinkinase die Phosphorylierung unter Verwendung des ATP-Analogon katalysiert.

2. Mutierte Proteinkinase nach Anspruch 1, welche weiter ein Alanin oder Glycin als die Aminosäure umfaßt, welche der Position 6 von SEQ ID Nr. 3 entspricht, die Position 323 von v-Src ist.

3. Mutierte Proteinkinase nach Anspruch 1, wobei das ATP-Analogon aus der Gruppe, bestehend aus N⁶-(cyclopentyl)ATP, N⁶-(cyclopentyloxy)ATP, N⁶-(cyclohexyl)ATP, N⁶-(cyclohexyloxy)ATP, N⁶-(benzyl)ATP, N⁶-(pyrrolidino)ATP und N⁶-(piperidino)ATP, ausgewählt ist.

4. Mutierte Proteinkinase nach Anspruch 3, wobei das ATP-Analogon N⁶-(cyclopentyl)ATP ist.

5. Mutierte Proteinkinase nach Anspruch 3, wobei das ATP-Analogon N⁶-(benzyl)ATP ist.

6. Nukleinsäure, welche die mutierte Proteinkinase nach Anspruch 1 oder Anspruch 2 kodiert.

7. Verfahren zur Identifizierung von Proteinsubstraten für eine mutierte Proteinkinase, umfassend das Inkubieren permeabilisierter Zellen, welche die mutierte Proteinkinase exprimieren, mit einem radioaktiv markierten Analogon für eine ausreichende Zeitdauer, das Lysieren der Zellen, das Trennen des Lysats durch SDS-PAGE und das Identifizieren der Proteinsubstrate, wobei das Analogon ein Gamma-P³² radioaktiv markiertes N⁶-substituiertes ATP-Analogon ist, welches ein Substrat für eine mutierte Form einer Proteinkinase vom Wildtyp ist, wobei das Analogon nicht als ein Substrat für die Proteinkinase vom Wildtyp dient, und wobei die mutierte Proteinkinase ausgewählt ist aus der Gruppe, bestehend aus:

einer mutierten Proteinkinase, welche ein Alanin oder ein Glycin als die Aminosäure umfaßt, welche der Position 21 von SEQ ID Nr. 3 entspricht, die Position 338 von v-Src ist, und
einer mutierten Proteinkinase, welche ein Alanin oder ein Glycin als die Aminosäure umfaßt, welche der Position 21 von SEQ ID Nr. 3 entspricht, die Position 338 von v-Src ist, und welche weiter ein Alanin oder ein Glycin als die Aminosäure umfaßt, welche der Position 6 von SEQ ID Nr. 3 entspricht, die Position 323 von v-Src ist.

8. Verfahren nach Anspruch 7, wobei das Analogon mindestens drei Kohlenstoffe an der N⁶-Position umfaßt.

9. Verfahren nach Anspruch 7, wobei das Analogon aus der Gruppe, bestehend aus N⁶-(benzyl)ATP und N⁶-(cyclopentyl)ATP, ausgewählt ist.

10. Verfahren nach Anspruch 7, wobei die Proteinsubstrate durch Autoradiographie identifiziert werden.

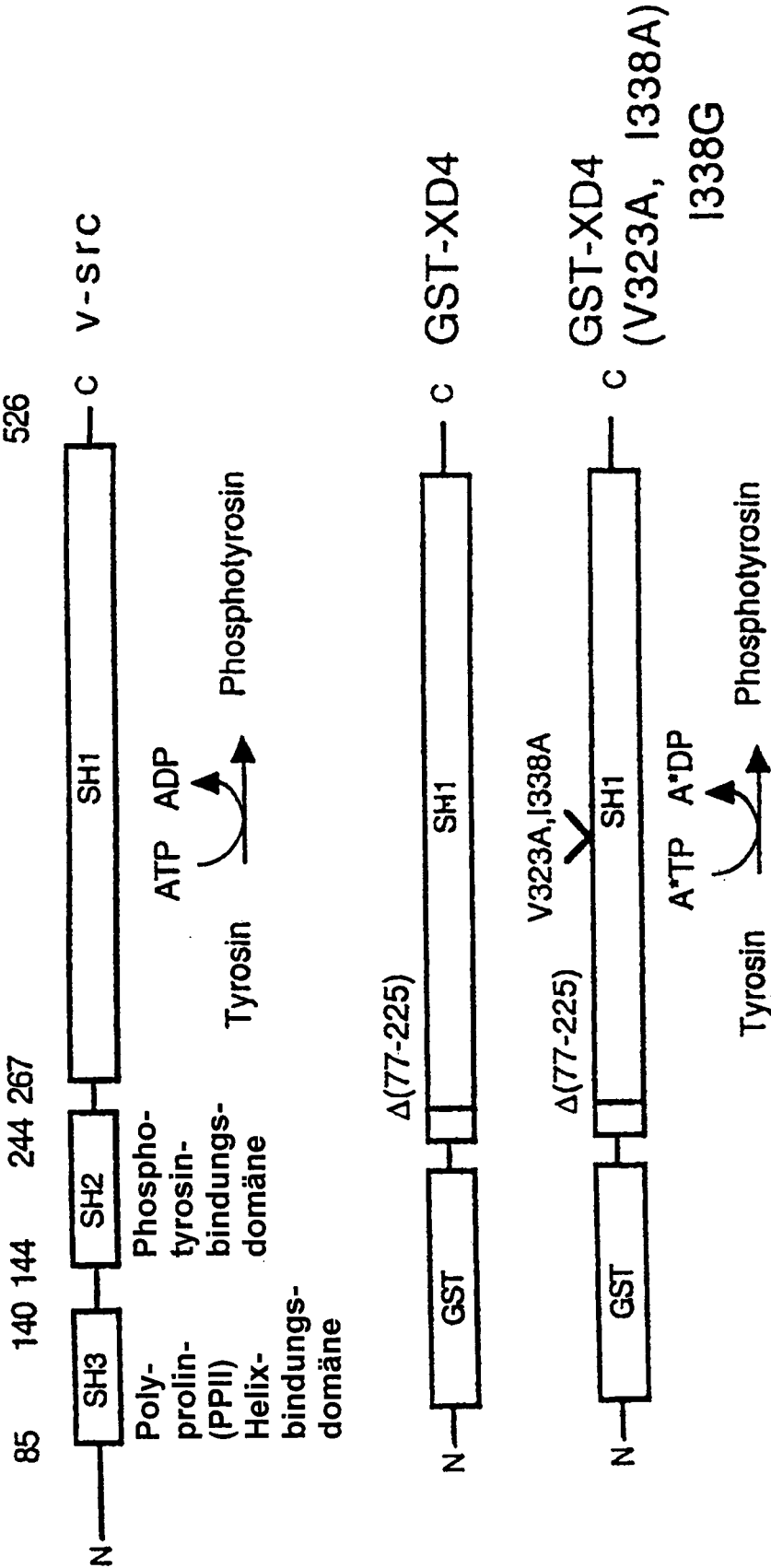
11. Verfahren zur Identifizierung von Proteinsubstraten für eine mutierte Proteinkinase, umfassend das Inkubieren von Zellextrakten mit einem radioaktiv markierten Analogon für eine ausreichende Zeitdauer, das Trennen der Lysate durch SDS-PAGE und das Identifizieren der Proteinsubstrate, wobei das Analogon ein radioaktiv markiertes N⁶-substituiertes ATP-Analogon ist, welches ein Substrat für eine mutierte Form einer Proteinkinase vom Wildtyp ist, wobei das Analogon nicht als ein Substrat für die Proteinkinase vom Wildtyp dient, und wobei die mutierte Proteinkinase ausgewählt ist aus der Gruppe, bestehend aus: einer mutierten Proteinkinase, welche ein Alanin oder ein Glycin als die Aminosäure umfaßt, welche der Position 21 von SEQ ID Nr. 3 entspricht, die Position 338 von v-Src ist, und einer mutierten Proteinkinase, welche ein Alanin oder ein Glycin als die Aminosäure umfaßt, welche der Position 21 von SEQ ID Nr. 3 entspricht, die Position 338 von v-Src ist, und welche weiter ein Alanin oder Glycin als die Aminosäure umfaßt, welche der Position 6 von SEQ ID Nr. 3 entspricht, die Position 323 von v-Src ist.

12. Verfahren nach Anspruch 11, wobei das Analogon mindestens drei Kohlenstoffe an der N⁶-Position umfaßt.

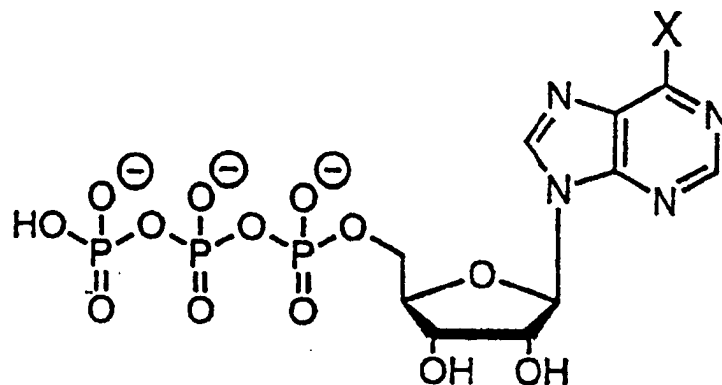
13. Verfahren nach Anspruch 11, wobei das Analogon aus der Gruppe, bestehend aus N⁶-(benzyl)ATP und N⁶-(cyclopentyl)ATP, ausgewählt ist.

14. Verfahren nach Anspruch 11, wobei die Proteinsubstrate durch Autoradiographie identifiziert werden.

Es folgen 24 Blatt Zeichnungen



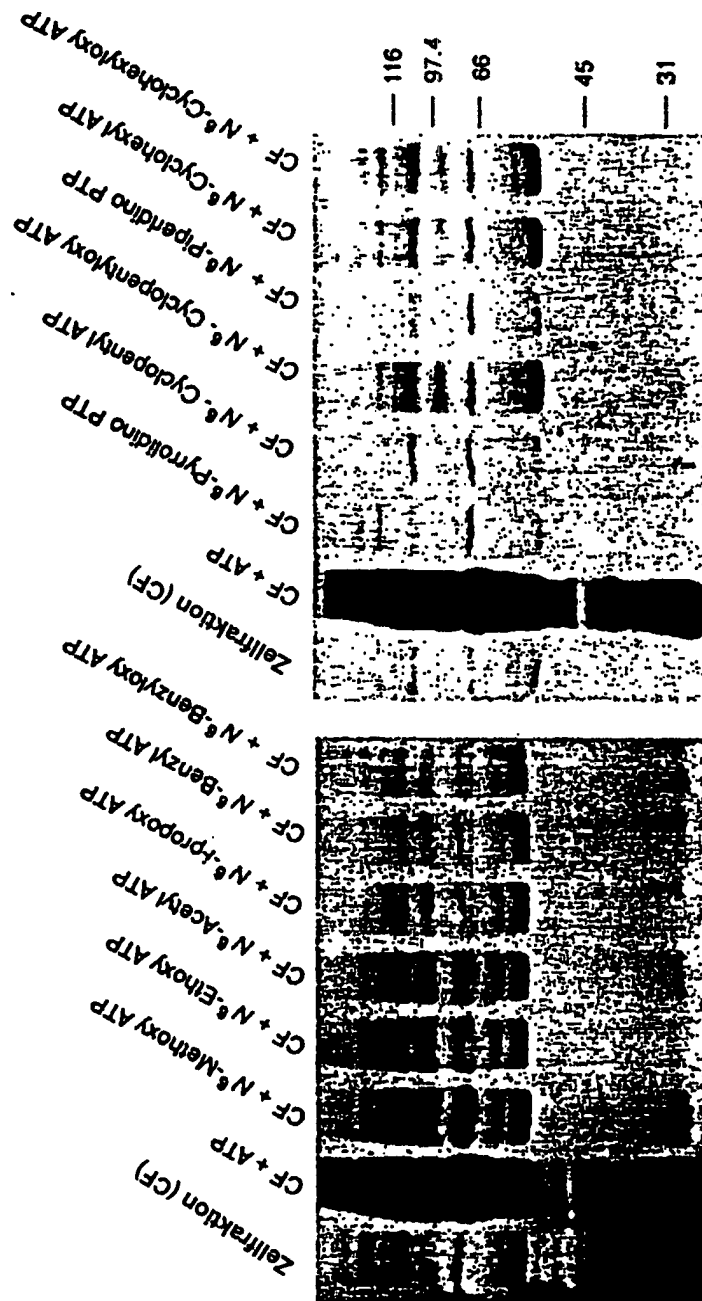
Figur 1



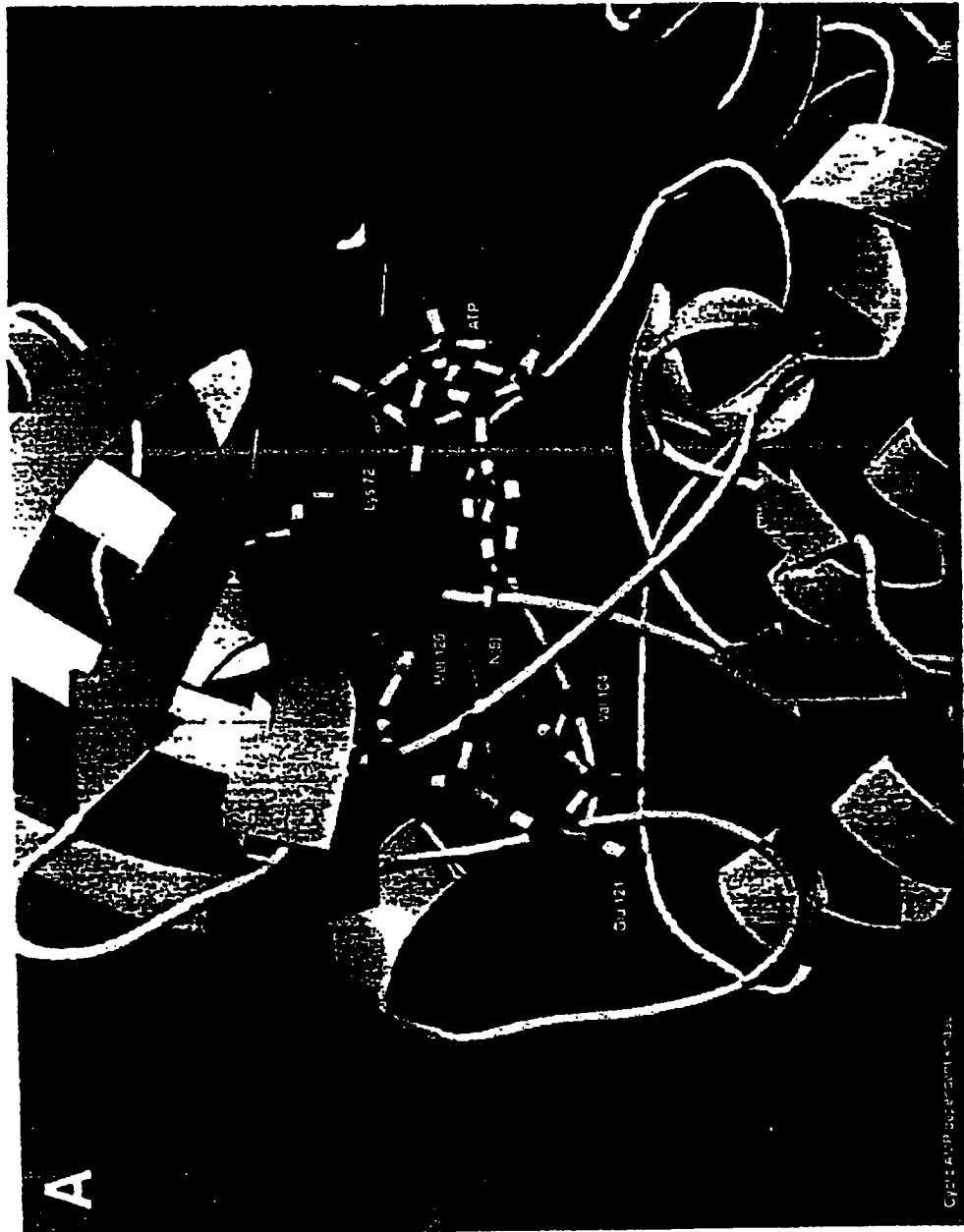
X =

1:	—N—OCH_3 H	6:	$\text{—NH—O—CH}_2\text{—Ph}$	10:	—N— (piperidine ring)
2:	$\text{—N—OCH}_2\text{CH}_3$ H	7:	—N— (pyrrolidine ring)	11:	—NH— (cyclohexyl ring)
3:	—N—COCH_3 H	8:	—NH— (cyclopentyl ring)	12:	—NH—O— (cyclohexyl ring)
4:	$\text{—N—O—C(CH}_3)_2$ H	9:	—NH—O— (cyclopentyl ring)		
5:	$\text{—N—CH}_2\text{—Ph}$ H				

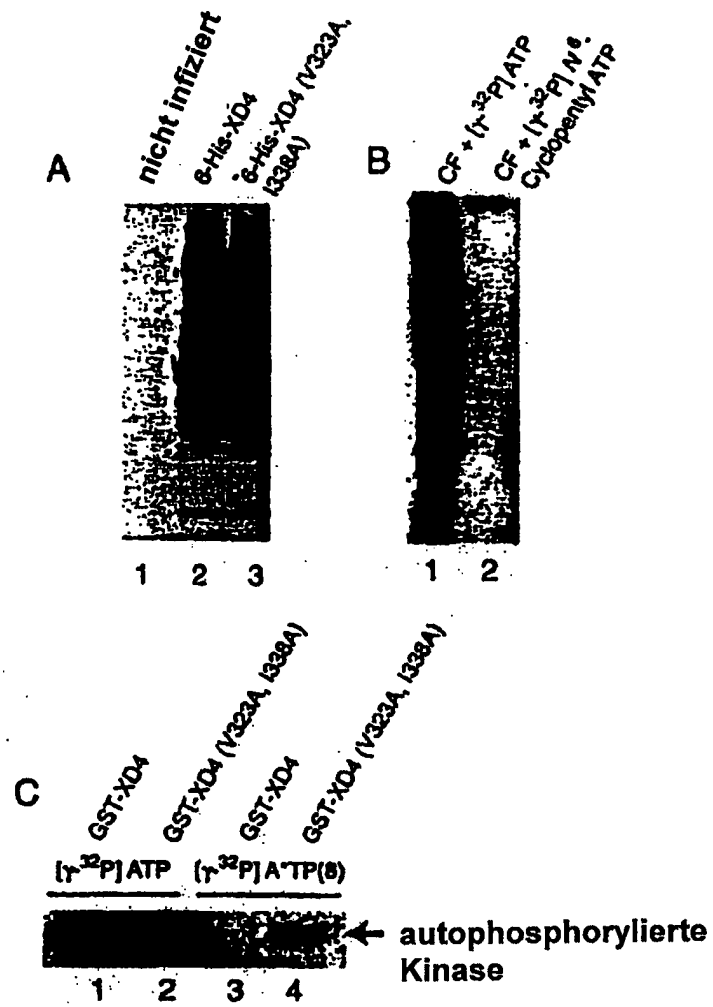
Figur 2



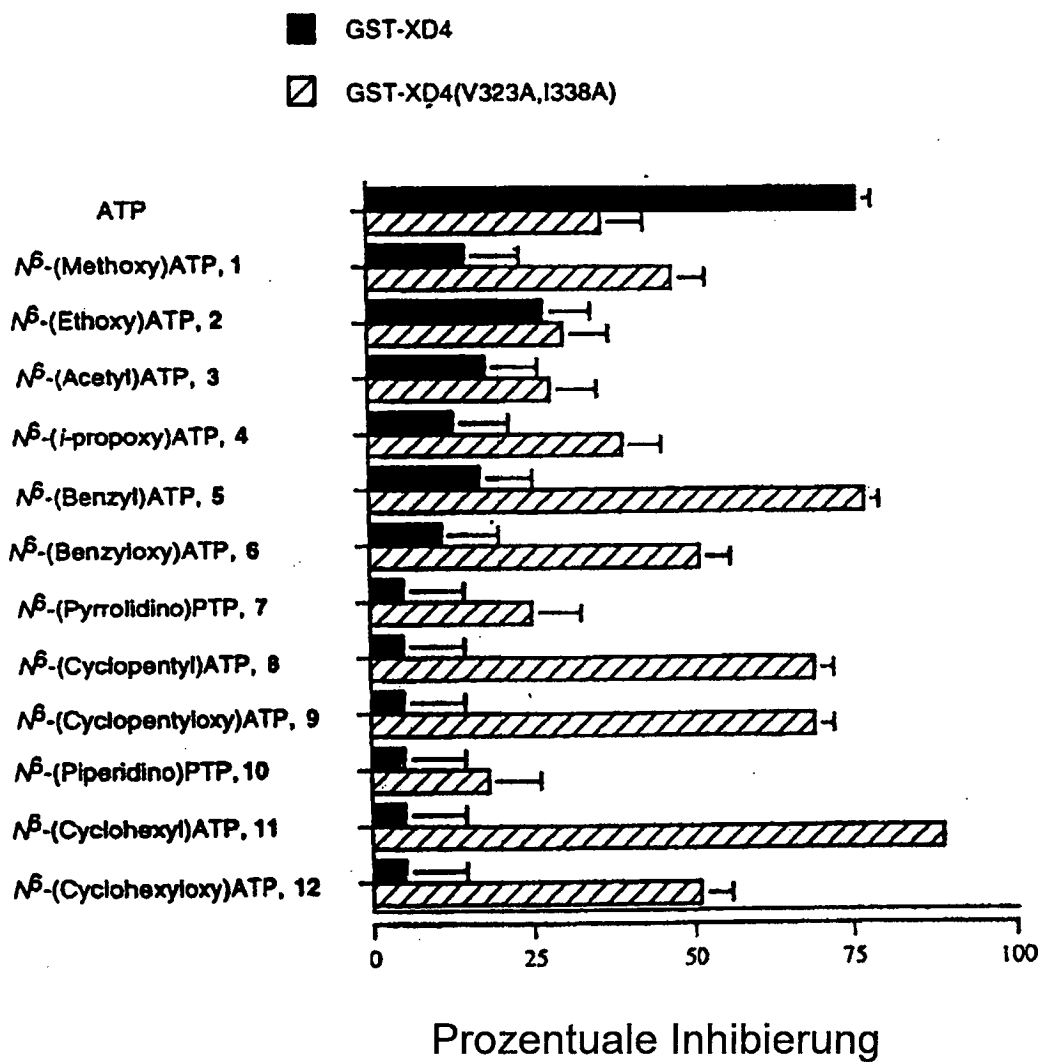
Figur 3



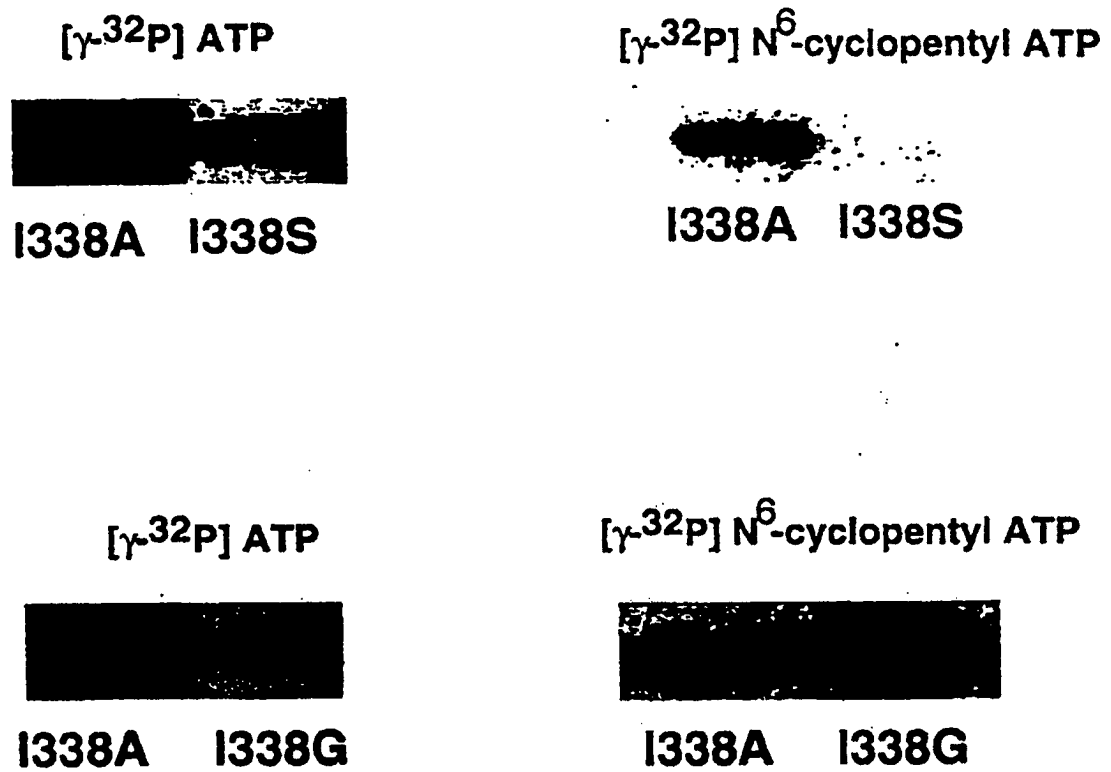
Figur 4



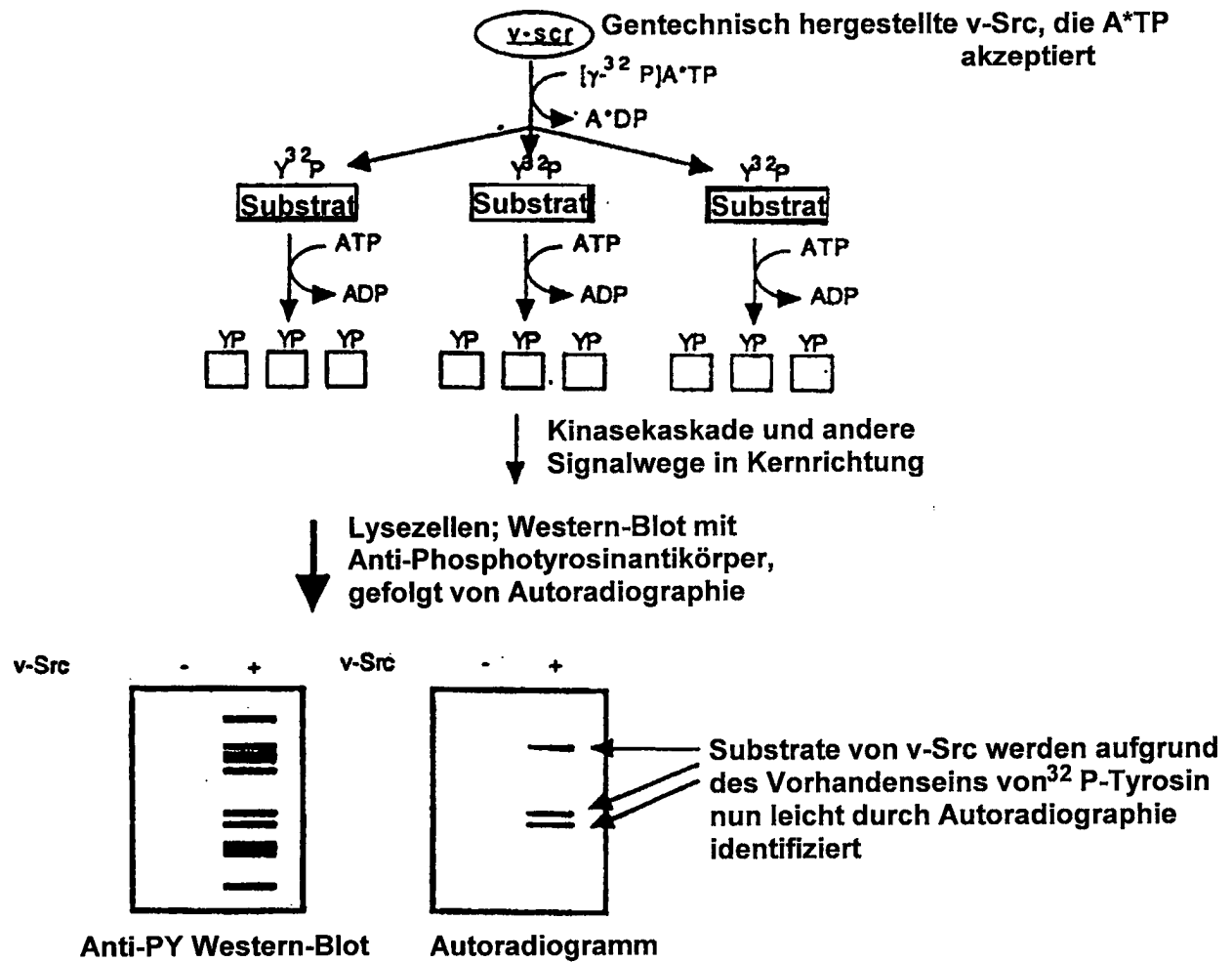
Figur 5



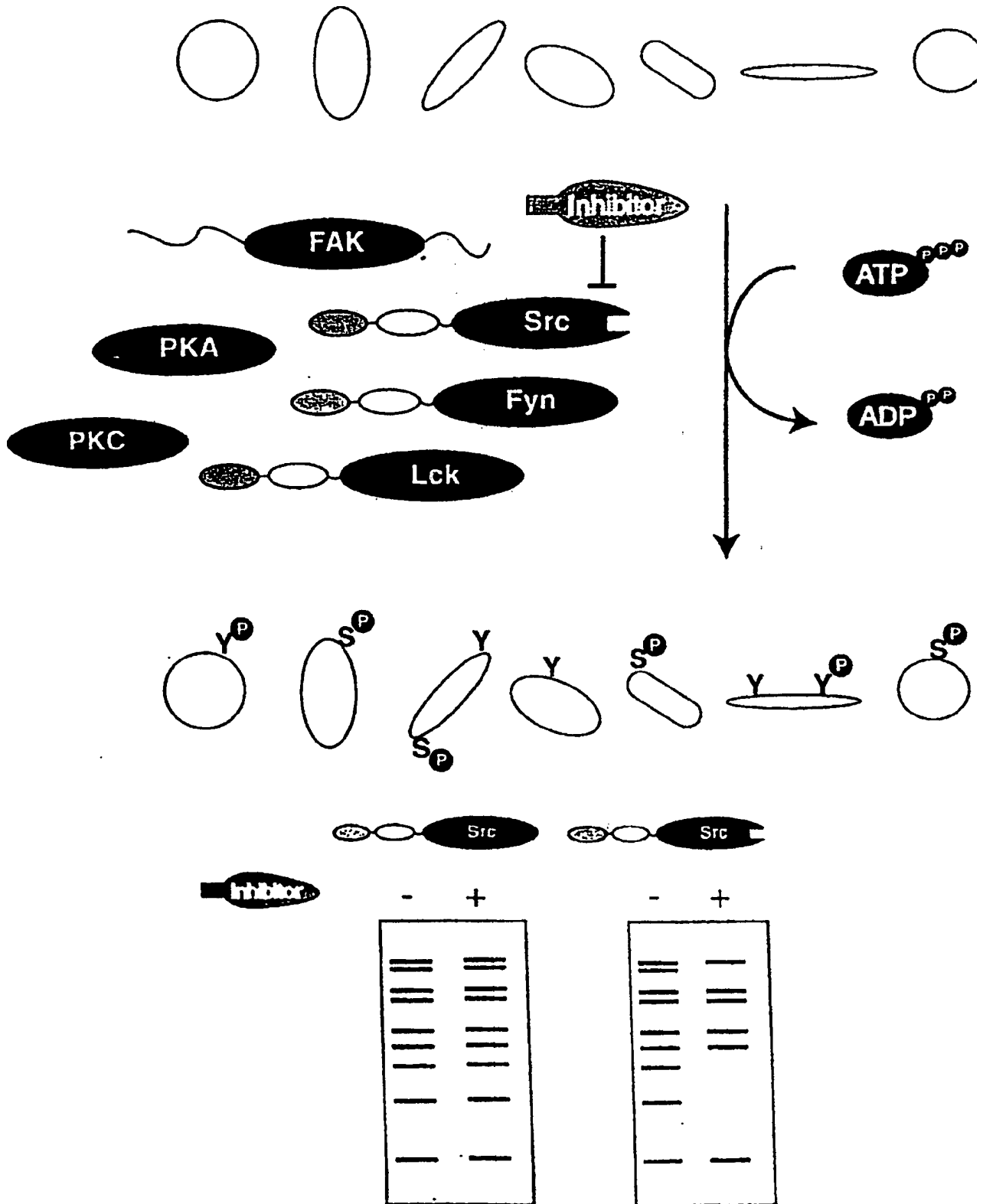
Figur 6



Figur 7

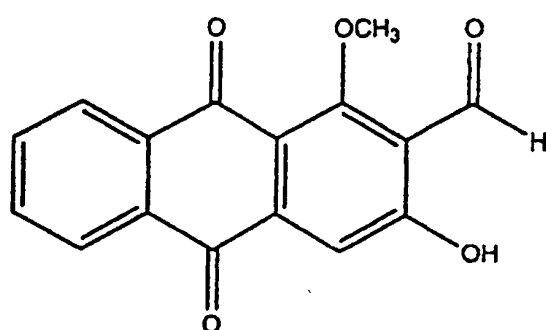


Figur 8



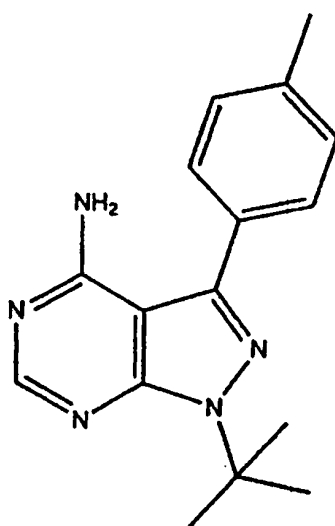
Figur 9

A. Damnacanthal



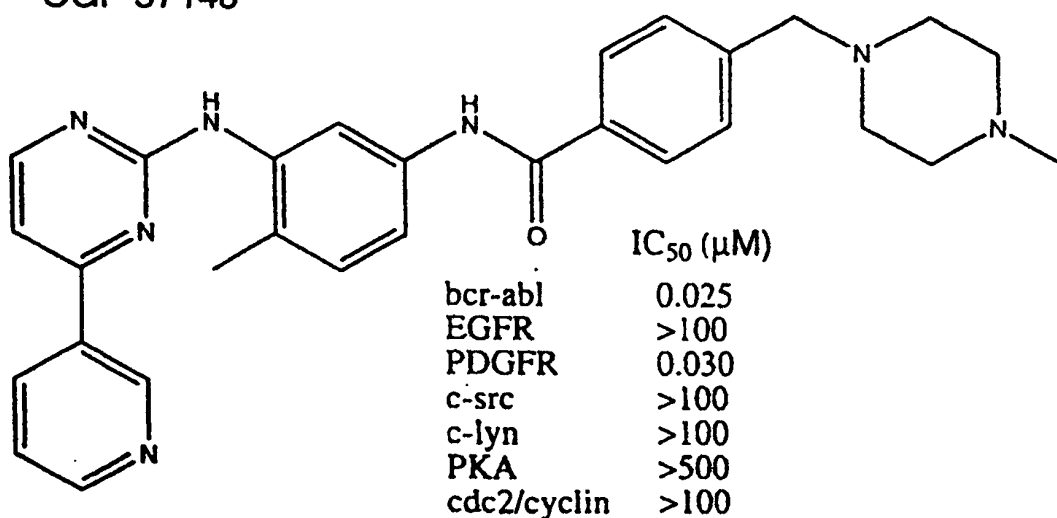
	IC ₅₀ (μM)
lck	0.10
fyn	2.09
src	0.68
erbB2	3.5

B. PP1



	IC ₅₀ (μM)
lck	0.005
fyn	0.006
src	0.17
hck	0.020
zap-70	>100
JAK2	>50
EGFR	0.25

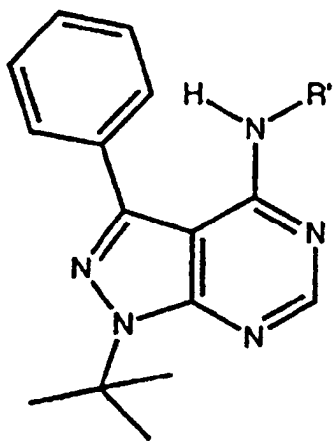
C. CGP 57148



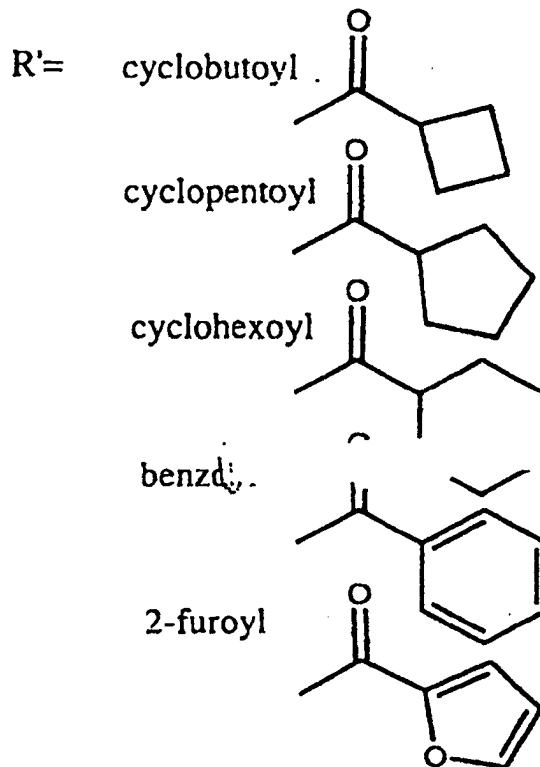
	IC ₅₀ (μM)
bcr-abl	0.025
EGFR	>100
PDGFR	0.030
c-src	>100
c-lyn	>100
PKA	>500
cdc2/cyclin	>100

Figur 10

A. N-4-Acylanaloga



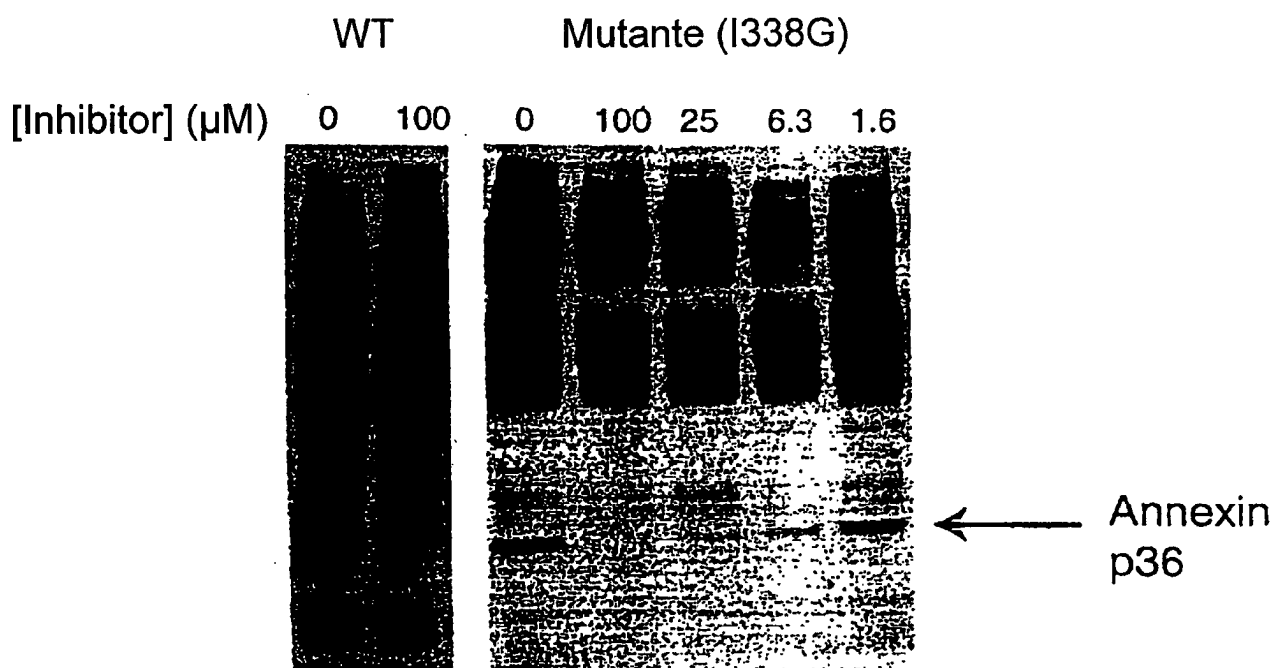
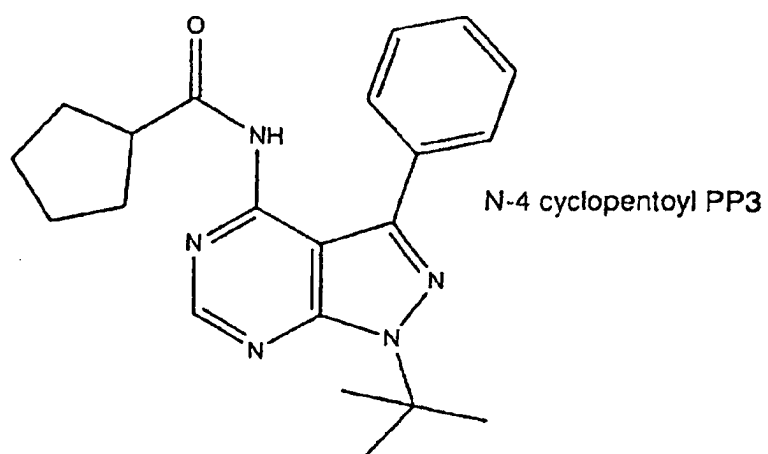
B.



C. *In vitro* Inhibierungsdaten

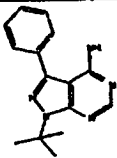
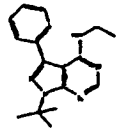
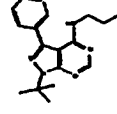
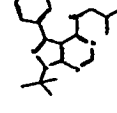
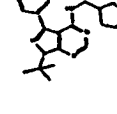
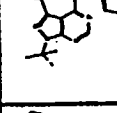
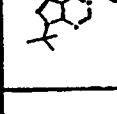
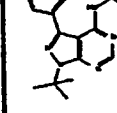
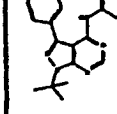
R' =	IC ₅₀ (μM)		
	WT fyn	WT src	I338G src
H	0.08	35	<1
cyclobutoyl		>>400	12
cyclopentoyl	400	>>400	5
cyclohexoyl	50	>>400	20
benzoyl	>400	>>400	50
2-furoyl		>>400	150

Figur 11

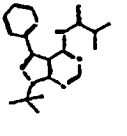
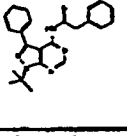
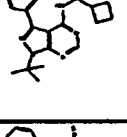
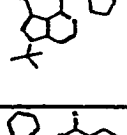
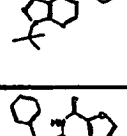
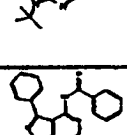
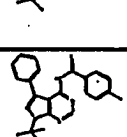
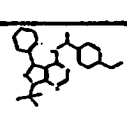
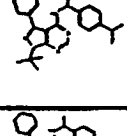
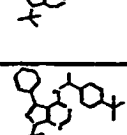
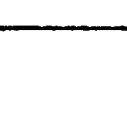



Figur 12

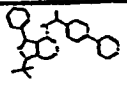
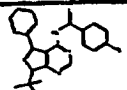
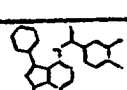
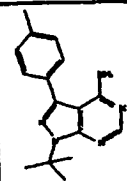
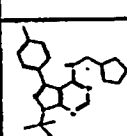
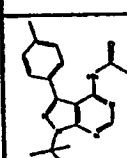
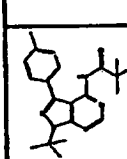
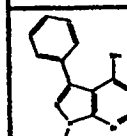
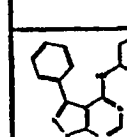
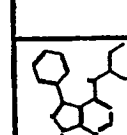
IC₅₀ (μM)

Molekül	WT XD4	I338G XD4	WT Fyn	T339G Fyn	WT Abl	T120A Abl
	35	0.13	0.05			<<10
		200	>300			
		300	>300			
		>300	>300			
	>300	75	>300	100		>10
	>300	250	>300	26		>10
	>300	85	>300	63		>10
						
						

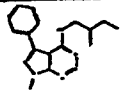
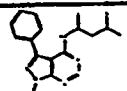
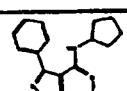
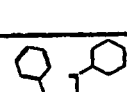

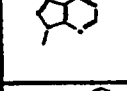
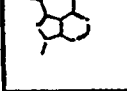
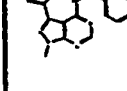
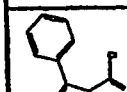
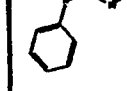
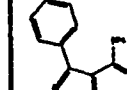
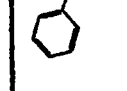
Figur 13A

						
						
	>300	12	6.5	5		
	>300	19	80	9		
	>300	20	50	5		
	>300	150	15	19		
	>300	10	300	11		(10
	>300	10	300	6		(10
		1.2				<10
		0.63				
		(0.411				1.8
	>300	0.43	300	0.83	300	(10

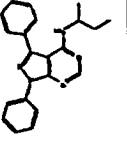
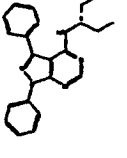
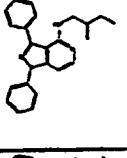
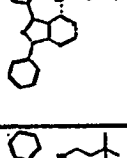
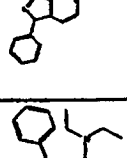
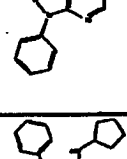
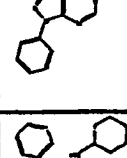
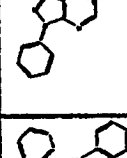
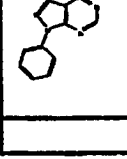
Figur 13B

						
						
						>10
	100	(0.05	0.1			
		>100	>300			
			2			
			7			
						
						
						

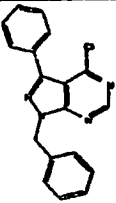
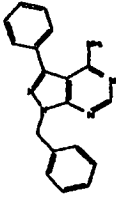
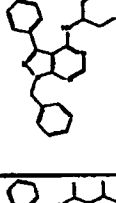
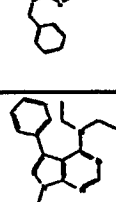
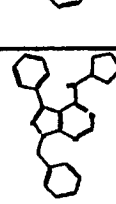
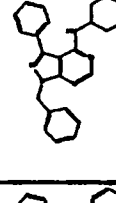
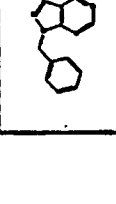
Figur 13C

						
						
						
						
						
						
						
						
						
						
	>1000	0.510	0.4		<<6.5	
	>300	>10	>300			

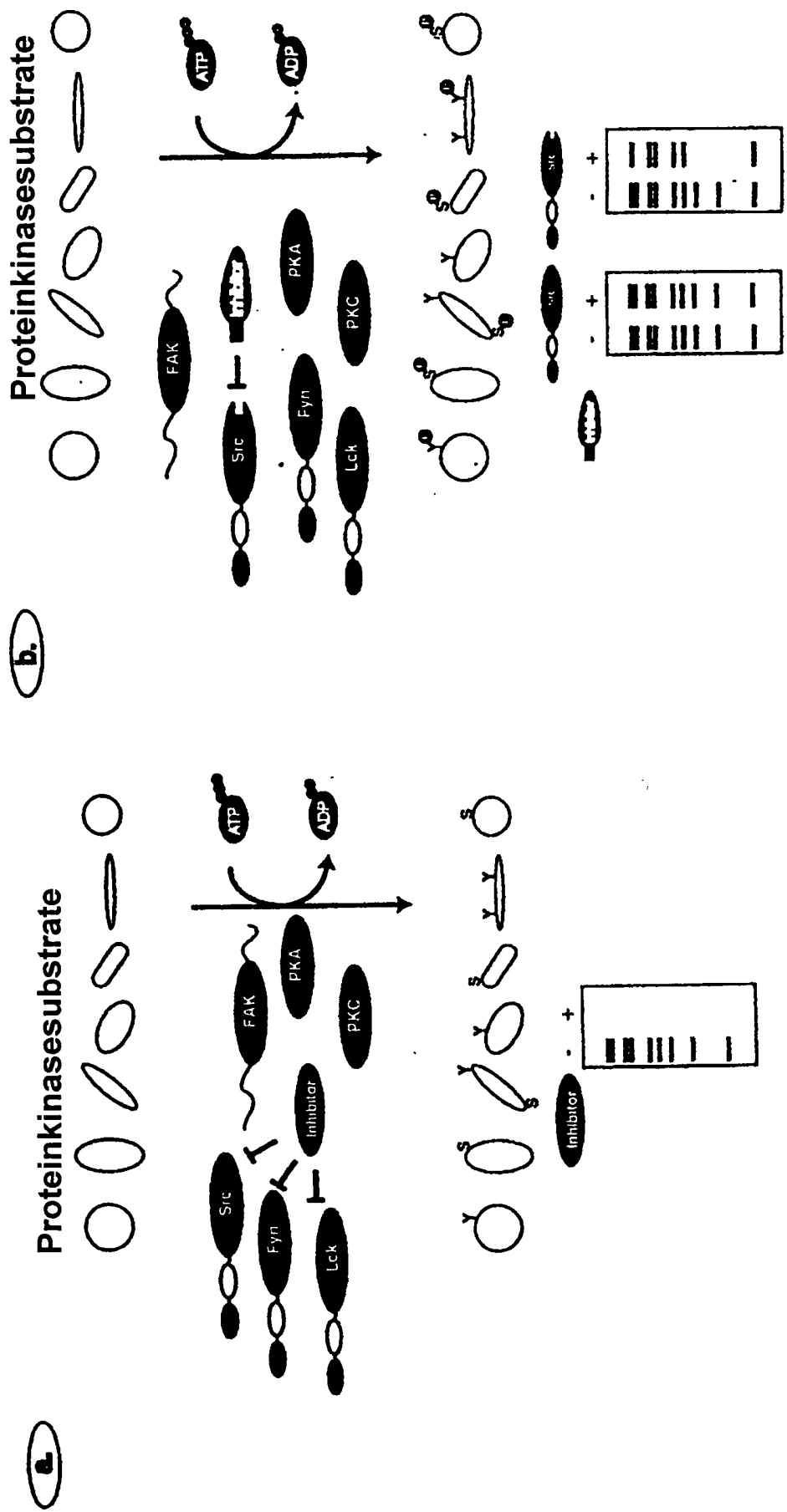
Figur 13D

	>300	>10	>300			
	>300	>10	>300			
	>300	>10	>300			
	>300	>10	>300			
	>300	>10	>300			
	>300	>10	>300			
	>300	>10	>300			
	>300	>10	>300			
	>300	>10	>300			

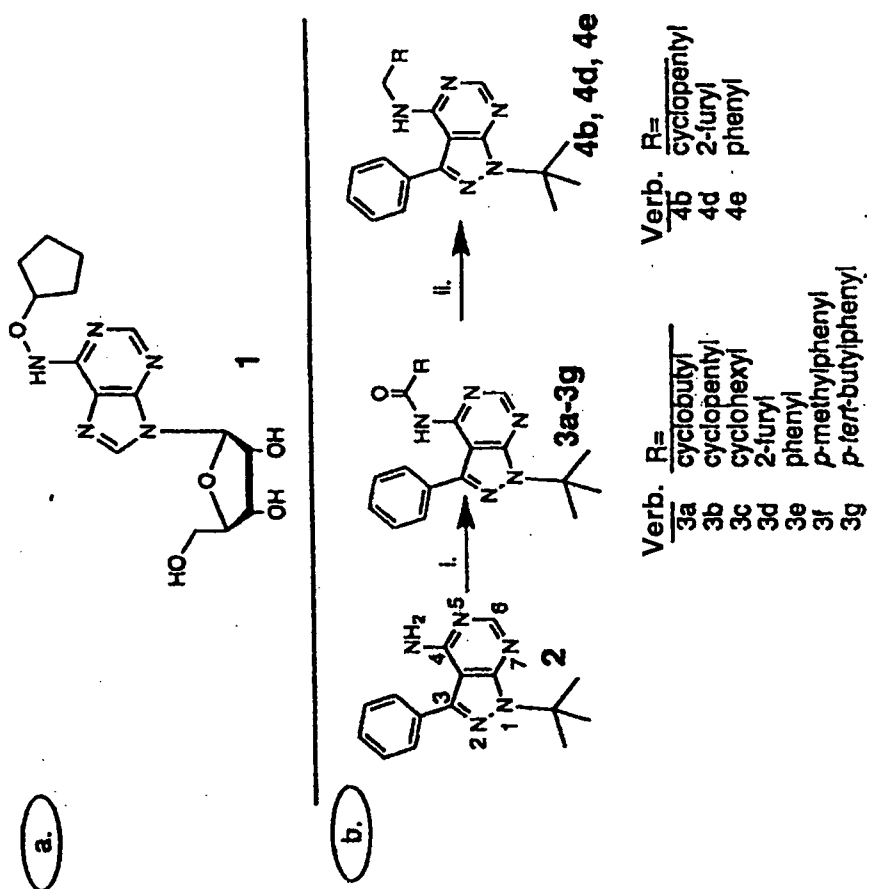
Figur 13E

						
	<10	2.5	<<10			
	>300	>10	>300			
	>300	>10	>300			
	>300	>10	>300			
	>300	>10	>300			
	>300	>10	>300			

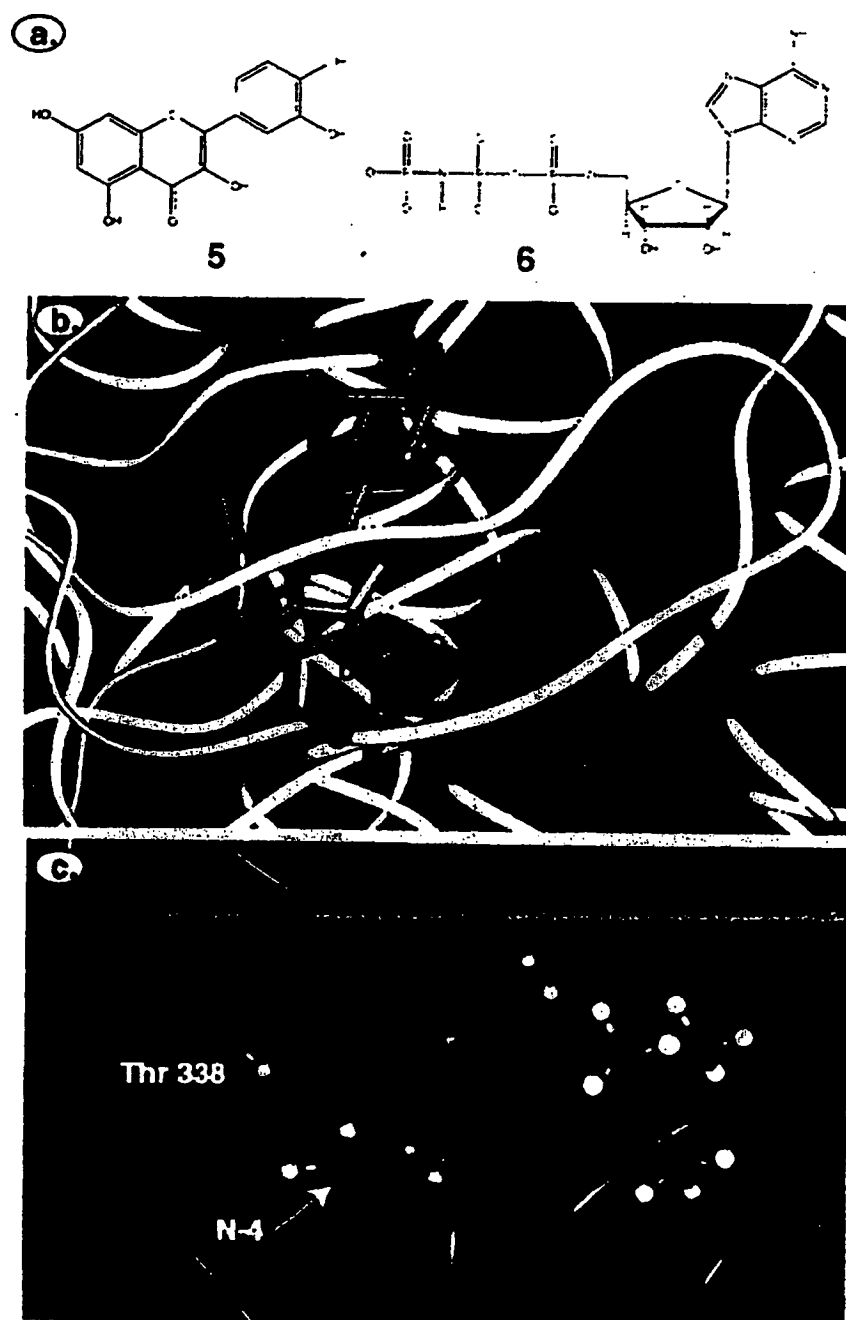
Figur 13F



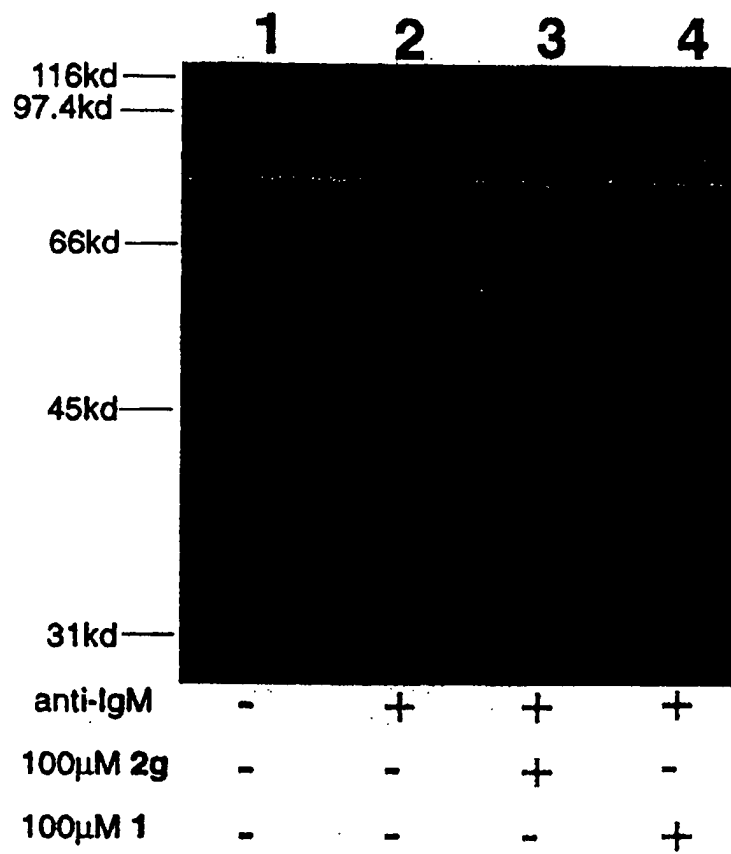
Figur 14



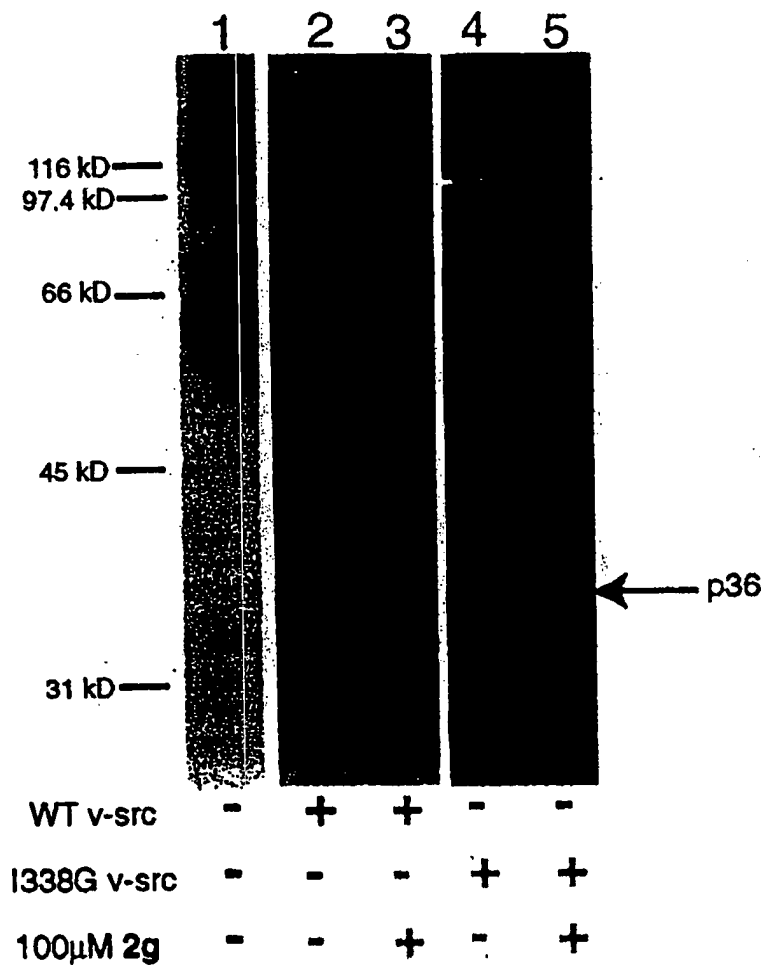
Figur 15



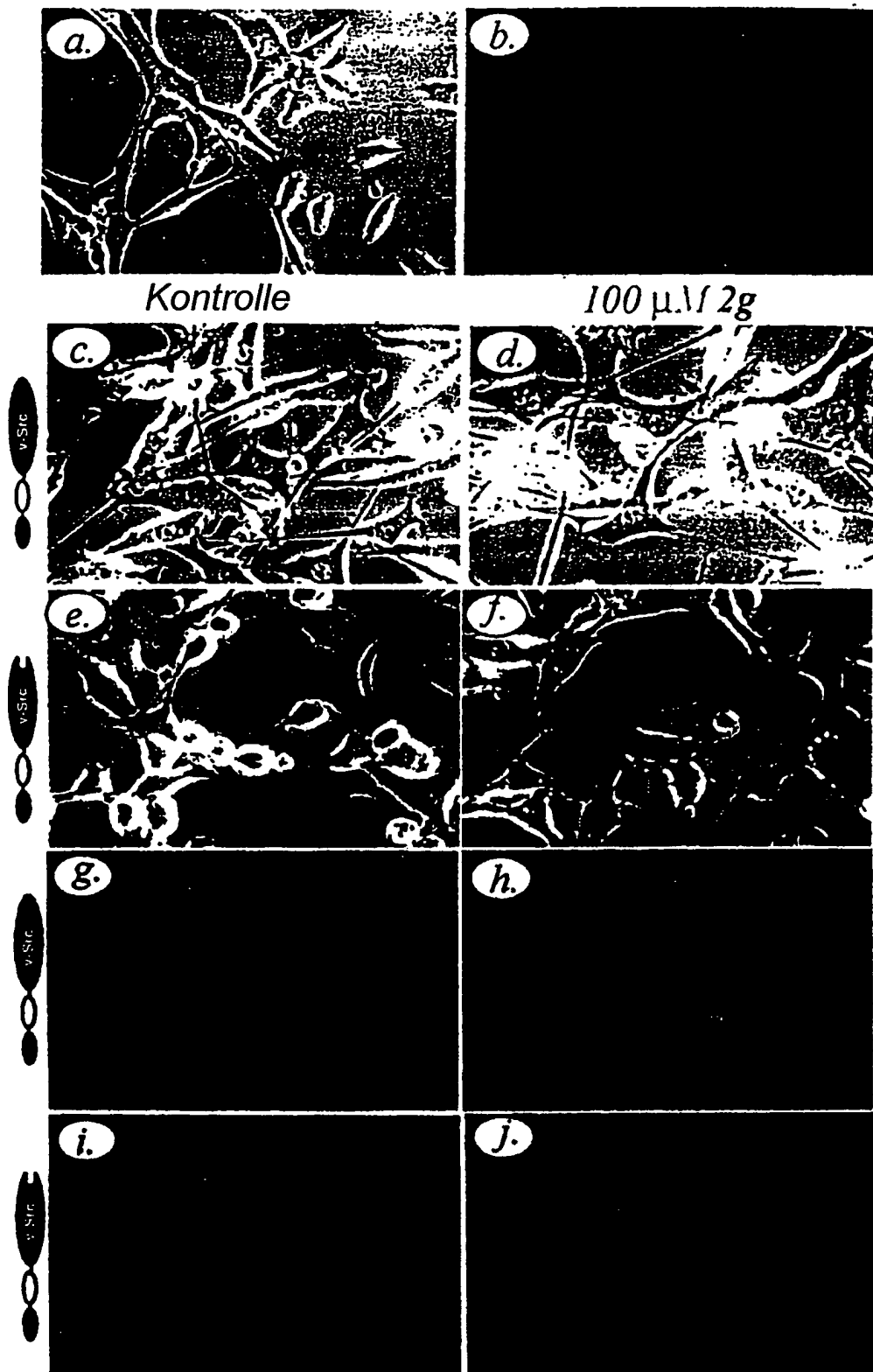
Figur 16



Figur 17



Figur 18



Figur 19