

Die räumlichen Orientierungen von H-Brücken-Kontakten, die aus den Kristallstrukturen niedermolekularer Verbindungen abgeleitet wurden (Stäbchen „haufen“), passen hervorragend zur Ausrichtung von Methotrexat in der Bindetasche der Dihydrofolat-Reduktase aus *Escherichia coli*.

# Was läßt sich aus der molekularen Erkennung in Protein-Ligand-Komplexen für das Design neuer Wirkstoffe lernen?

Hans-Joachim Böhm\* und Gerhard Klebe\*

Das Verständnis der nichtkovalenten Wechselwirkungen in Protein-Ligand-Komplexen ist essentiell für die moderne Biochemie und trägt zur Entdeckung neuer Wirkstoffe bei. In der vorliegenden Übersicht fassen wir die jüngsten Arbeiten zusammen, die sich das bessere Verständnis der physikalischen Natur der molekularen Erkennung in Protein-Ligand-Komplexen zum Ziel gesetzt haben. Hierzu gehören auch die Entwicklung und Anwendung neuer Computermethoden, die das vorhandene Wissen über strukturelle und energeti-

sche Aspekte der Protein-Ligand-Wechselwirkungen für das Design neuer Liganden nutzen. Diese Ansätze beruhen auf der exponentiell wachsenden Information über den Aufbau von Proteinen und die Eigenschaften von niedermolekularen organischen Molekülen in einer strukturierten molekularen Umgebung. Die vielfältigen Beiträge, die die Bindungsspezifitäten von Liganden für einen gegebenen Rezeptor bestimmen, werden diskutiert, die möglichen Konformationen der Liganden in der Bindetasche analysiert und Vorhersagemetho-

den diskutiert. Des weiteren werden die Ähnlichkeiten von Liganden im Hinblick auf deren Erkennungseigenschaften geprüft. Dieses Wissen gilt es zu verwenden, um Bindungsmoden zu verstehen und vorherzusagen. Außerdem wird ein Überblick über die existierenden Methoden zum Design und zur Auswahl von neuen Proteinliganden gegeben.

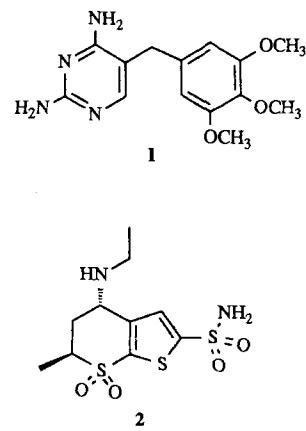
**Stichworte:** Computerchemie · Molekulare Erkennung · Protein-Ligand-Komplexe · Wirkstoffsuche

## 1. Einleitung

Die molekulare Erkennung in Protein-Ligand-Komplexen ist verantwortlich für die selektive Bindung von niedermolekularen Liganden an ein spezifisches Zielprotein<sup>[1]</sup>. In biologischen Systemen dienen die Protein-Ligand-Wechselwirkungen einem bestimmten Zweck, z. B. der enzymatischen Transformation, dem Substanztransport oder der Signalübertragung. Normalerweise sind sie von nichtkovalenter Natur. Die experimentell bestimmten Bindungskonstanten  $K_i$  liegen typischerweise im Bereich von  $10^{-2}$  bis  $10^{-12}$  M. Dies entspricht einer Gibbs-Bindungsenthalpie von  $-10$  bis  $-80$  kJ mol $^{-1}$  in wäßriger Lösung<sup>[2]</sup>.

Verbindungen, die spezifisch an ein bestimmtes, pharmakologisch relevantes Protein binden, können sich als nützliche Arzneimittel erweisen. Besonders Enzyme, die biochemische Reaktionen regulieren, sind wichtige Ansatzpunkte in der modernen

Medizinischen und Pharmazeutischen Chemie. Exemplarisch seien zwei Beispiele genannt: 1) Der Enzyminhibitor Trimethoprim **1**, ein Hemmstoff der bakteriellen Dihydrofolat-Reduktase, hat sich schon lange bei der Behandlung bakterieller Infektionen bewährt<sup>[3]</sup>. 2) Kürzlich wurde der Wirkstoff Dorzolamid **2** zur Behandlung von Glaukoma zugelassen und in den Markt eingeführt<sup>[4]</sup>. Dieser Inhibitor der Carboanhydrase ist die erste Verbindung, bei deren Entwicklung die Methoden des auf Strukturmerkmalen basierenden (strukturbasierenden) Wirkstoffdesigns entscheidend zum Erfolg beigetragen haben. Neben den Enzymen sind Rezeptoren wie die G-Protein-gekoppelten eine andere, nicht minder wichtige Klasse von Zielproteinen<sup>[5]</sup>.



[\*] Dr. H.-J. Böhm<sup>[+]</sup>, Prof. Dr. G. Klebe<sup>[++]</sup>  
BASF AG, D-67056 Ludwigshafen

[+] Neue Adresse:  
Hoffmann-La Roche AG, Pharma Research – New Technologies  
CH-4002 Basel (Schweiz)  
Telefax: Int. +61/6881075  
E-mail: Hans-Joachim.Boehm@Roche.com

[+++] Neue Adresse:  
Institut für pharmazeutische Chemie der Universität  
Marbacher Weg 6, D-35032 Marburg  
Telefax: Int. +6421/288994  
E-mail: klebe@mail.uni-marburg.de

Unsere derzeitigen Kenntnisse über den strukturellen Aufbau von Protein-Ligand-Komplexen stammen zumeist von globulären Proteinen. Obwohl einige wenige Membranproteine kristallographisch untersucht wurden<sup>[6–13]</sup>, kennen wir bis heute keine hochauflöste Struktur eines pharmakologisch relevanten,

membrangebundenen Rezeptors. Daher beschränken wir unsere Diskussion auf niedermolekulare Liganden, die an globuläre Proteine, insbesondere Enzyme, binden. Wir sind aber davon überzeugt, daß die Daten aus diesen Systemen auch auf die membrangebundenen Rezeptorproteine übertragbar sind.

Das Verständnis der Prinzipien der molekularen Erkennung in Protein-Ligand-Komplexen ist entscheidend für das strukturbasierende Ligandendesign. Wenn die dreidimensionale (3D) Struktur eines Proteins bekannt ist, kann diese Information direkt für den Design-Prozeß genutzt werden. Fortschritte bei der Isolierung und Kristallisation von reinen Proteinen und der nachfolgenden Strukturbestimmung durch NMR-Spektroskopie<sup>[14-17]</sup> und Röntgenstrukturanalyse<sup>[18, 19]</sup> führten zu einem exponentiellen Anstieg der Zahl strukturell aufgeklärter Proteine. Die Brookhaven Protein Databank<sup>[20]</sup> umfaßte im August 1995 mehr als 4000 Einträge. Darüber hinaus wächst unser Wissen über die Strukturen von kleinen organischen Molekülen und deren Wechselwirkungen mit einer strukturierten molekularen Umgebung durch die ständig wachsende Zahl an kristallstrukturanalytischen Daten, die in der Cambridge Crystallographic Database hinterlegt sind (>140 000 Einträge)<sup>[21-23]</sup>. Dazu kommen die Ergebnisse von ab-initio-Rechnungen<sup>[24]</sup>.

Als eine Konsequenz dieser Entwicklungen hat sich das strukturbasierende Design von Proteinliganden als neues Werkzeug in der Medizinischen und Pharmazeutischen Chemie etabliert<sup>[25]</sup>. Insbesondere die Kenntnis der Raumstruktur eines Proteins kann genutzt werden, um Liganden mit noch besseren Bindungseigenschaften zu entwickeln (Tabelle 1)<sup>[26-42]</sup>. In den meisten Fällen wurde eine bekannte Leitstruktur zielgerichtet optimiert, in einigen ließ sich die 3D-Struktur jedoch auch verwenden, um neue Liganden „de novo“ zu entwerfen. Diese neuen Ansätze in der Wirkstoffsuche benötigen neue Software-

Tabelle 1. Beispiele für Enzyminhibitoren, die mit Hilfe des strukturbasierenden Designs gefunden oder optimiert wurden.

Enzym	Behandlungsziel	Lit.
Dihydrofolat-Reduktase	bakterielle Infektion	[28]
Thrombin	Thrombose	[36, 42]
Elastase	Emphysemie	[40, 50, 51]
Neuramidase	Virusinfektion	[35]
Thymidylat-Synthase	Krebs, Schuppenflechte	[27, 30]
Purin-Nucleosid-Phosphorylase	Krebs	[33]
HIV-Protease	AIDS	[27, 29, 34]
Phospholipase A <sub>2</sub>	Entzündungen	[32, 38]
trypanosomale GAPDH	parasitäre Infektion	[26, 41]
Glycogen-Phosphorylase	Diabetes	[58]
Carboanhydrase	Glaucom	[4, 27, 31]

Werkzeuge. Einige Algorithmen sind für diesen Zweck bereits beschrieben worden. Sie befassen sich mit folgenden Fragen:

- Wie stark bindet ein neuer Ligand an ein gegebenes Protein?
- Welche Konformationen werden von Liganden vermutlich in der Bindetasche eingenommen?
- Wo und in welcher Orientierung bindet ein Ligand im aktiven Zentrum?
- Wie kann die Ähnlichkeit von Liganden im Hinblick auf deren Fähigkeit zur molekularen Erkennung definiert werden?
- Mit welchen Verfahren kann man neue Proteinliganden auswählen und bewerten?

Das strukturbasierende Ligandendesign ist ein iterativer Prozeß. Als erstes wird die Struktur des Zielproteins im Kristall, am besten komplexiert mit einem Liganden, bestimmt. Ist diese nicht verfügbar, kann häufig ein Modell aus der Struktur eines eng verwandten Homologen abgeleitet werden. Anhand der Struktur des Komplexes lassen sich Bindungsmodus und Kon-

**Hans-Joachim Böhm**, 1956 in Frankfurt am Main geboren, studierte in Karlsruhe Chemie und promovierte dort 1984 bei Reinhart Ahlrichs in Theoretischer Chemie. Während der Doktorarbeit war er 1981/82 ein Jahr als DAAD-Stipendiat am Department of Physical Chemistry der University of Cambridge bei Ian McDonald und Paul Madden. Die Habilitation in Theoretischer Chemie erfolgte 1993 ebenfalls in Karlsruhe. Von 1985 bis 1987 arbeitete er im Forschungslabor der Siemens AG in München, anschließend von 1988 bis 1996 im Hauptlaboratorium der BASF AG in Ludwigshafen. Seit April 1996 ist er bei Hoffmann-La Roche in Basel tätig und beschäftigt sich dort mit der Entwicklung und Anwendung neuer Methoden für das computergestützte Wirkstoffdesign.



H.-J. Böhm



G. Klebe

**Gerhard Klebe**, 1954 in Frankfurt am Main geboren, studierte an der dortigen Universität Chemie und promovierte 1982 in Physikalischer Chemie. Als Stipendiat der Studienstiftung verbrachte er ein Jahr in Grenoble (Frankreich) am CNRS und ILL im kristallographischen Institut von Erwin F. Bertaut. Nach Postdoktoraten in der Kristallographie bei Hartmut Fuess (Frankfurt) und Hans-Beat Bürgi (Bern, Schweiz) wechselte er 1984 in das Hauptlaboratorium der BASF AG in Ludwigshafen. Die Habilitation erfolgte 1992 an der Universität Heidelberg in Pharmazeutischer Chemie und Strukturchemie. Im Sommer 1995 erhielt er einen Ruf auf den Lehrstuhl für Pharmazeutische Chemie der Philipps-Universität Marburg, den er zum Wintersemester 1996/97 angenommen hat. Seine Interessen umfassen die Bestimmung und Korrelation von Kristallstrukturen und den Einsatz und die Entwicklung von Methoden zum strukturbasierenden Wirkstoffdesign.

formation des Liganden sowie die essentiellen Wechselwirkungen identifizieren. Dieses Wissen wird dann für Überlegungen genutzt, wie ein bestehender Ligand weiter verbessert oder ein alternatives Molekülgerüst entworfen werden kann. Computermethoden, unterstützt durch graphische Auswertungen, helfen beim Aufstellen von Hypothesen. Anschließend müssen die vorgeschlagenen Verbindungen synthetisiert und getestet werden. Ihre Bindungseigenschaften werden dann mit biochemischen, kristallographischen und spektroskopischen Methoden untersucht. Die genaue Analyse der so erhaltenen Daten geht dem nächsten Design-Cyclus voraus. Ein entscheidender Vorteil dieses Vorgehens ist, daß es auf jeder Stufe anhand der neu bestimmten Protein-Ligand-Strukturen zusätzliche Informationen über das System liefert. Für jeden neuen Liganden wird der Bindungsmodus bestimmt. Falls ein vorgeschlagener Ligand nicht in der erwarteten Weise bindet, liefert die Analyse häufig eine Erklärung dafür. Dadurch ergeben sich neue Hinweise, wie der Ligand weiter zu verbessern ist.

Mit diesem Ansatz können nicht nur Leitstrukturen optimiert, sondern auch völlig neue Leitstrukturen entworfen werden. Ausgehend von den strukturellen Gegebenheiten in der Bindetasche ermöglichen die De-novo-Design-Techniken den Entwurf von neuartigen Molekülgerüsten. Diese Vorschläge basieren auf ausgiebigen Suchen in Datenbanken, auf dem Dokking oder auf dem Aufbau von Wirkstoffmolekülen aus kleinen Molekülbausteinen in der Bindetasche.

Trotz der eingangs erwähnten Fortschritte bei den experimentellen Methoden sind wir immer noch häufig mit der Situation konfrontiert, daß für viele der pharmakologisch relevanten Proteine keine hochauflösten Strukturen bekannt sind. Was kann das strukturbasierte Ligandendesign hier leisten? Ohne Kenntnis einer experimentellen Struktur können vergleichende Untersuchungen an bekannten Liganden Vorstellungen darüber liefern, welche funktionellen Gruppen essentiell für eine Rezeptorbindung sind. Solche Ähnlichkeitsanalysen an bekannten Liganden im Hinblick auf deren Erkennungseigenschaften vermögen die Konzeption neuer Moleküle mit abweichenden Bindungsgerüsten zu stimulieren. Dabei sind aber zuverlässige Vorschläge über mögliche Bindungsgeometrien entscheidend. Dazu lassen sich Hinweise aus Pharmakophorhypothesen oder über systematische Rigidisierungen der Liganden gewinnen. Methoden zur Behandlung dieser Probleme müssen entwickelt und daraufhin überprüft werden, ob sie den experimentellen Befunden aus strukturell bekannten Protein-Ligand-Komplexen gerecht werden können.

Im folgenden wollen wir die neueren experimentellen Ergebnisse zu diesen Fragen zusammenfassen und unter dem Blickwinkel der Natur der Protein-Ligand-Wechselwirkungen analysieren. Wir werden nicht versuchen, einen vollständigen Überblick über die neuesten Arbeiten zur Natur dieser Wechselwirkungen zu geben, sondern uns auf die strukturellen Aspekte konzentrieren, die zu einem besseren Verständnis und zu einer Beschreibung der Beziehung zwischen Raumstruktur und Bindungseigenschaften beitragen. Unsere eigenen Arbeiten befassten sich mit der Frage, wie das schnell wachsende Wissen über 3D-Strukturen von Protein-Ligand-Komplexen und kleinen organischen Molekülen genutzt werden kann, um Computeralgorithmen zur Vorhersage der Bindungsaffinitäten, Molekülkonformationen und Bindungsmoden zu entwickeln. Die dabei

abgeleiteten Ansätze werden bereits zum Entwurf von Proteinliganden verwendet. Dennoch wollen wir in diesem Beitrag auch vermitteln, daß das Ligandendesign noch einer Vielzahl grundlegender Untersuchungen bedarf und damit noch weit von einer reinen Ingenieurtechnik entfernt ist.

## 2. Experimentelle Daten zur Korrelation von Strukturen mit Bindungseigenschaften

Wir verwenden hier Struktur- und Bindungsdaten aus mehreren Quellen. Bevor wir Rückschlüsse aus diesen Daten ziehen, wollen wir kurz auf ihre Genauigkeit eingehen: Bindungsgeometrien stammen in der Regel aus kristallographisch untersuchten Protein-Ligand-Komplexen. Dabei werden die Strukturen nicht bis zu einer atomaren Auflösung bestimmt. Dennoch sind sie die einzige zuverlässige Quelle für Informationen über die Wechselwirkungen zwischen Protein und Ligand. Die mittleren Fehler in den Atompositionen hängen vom Streuvermögen der Proteinkristalle ab. Für eine mittlere Auflösung von ca. 2.4 Å wurde ein Fehler von ungefähr 0.4 Å im Raum abgeschätzt (eine grobe Faustregel besagt, daß der Fehler ungefähr ein Sechstel der Auflösung beträgt)<sup>[43–46]</sup>. Bedingt durch Verbesserungen in den Kristallisationstechniken und apparative Fortschritte in den Beugungsexperimenten konnte eine immer höhere Auflösung erreicht werden. Bei einer Auflösung von 1.5–1.8 Å und einer vollständigen Besetzung der Bindetaschen durch Liganden ist die Elektronendichte gut definiert, und die Moleküle können eindeutig in sie eingepaßt werden. Im Bereich zwischen 2.0 und 3.0 Å Auflösung oder bei einer nur partiellen Besetzung wird die Zuweisung schwieriger. Während der Strukturbestimmung werden kleine Moleküle üblicherweise in die Elektronendichte hineinmodelliert<sup>[47]</sup>. Das Festlegen einer Ausgangskonformation ist der kritische Schritt bei diesem Vorgehen. Beginnend mit einer beliebigen Konformation aus Standardbindungslängen und -winkeln werden manuell Drehungen um Einfachbindungen des Liganden vorgenommen, um ihn möglichst optimal in die Elektronendichte einzupassen. Am Ende wird der gesamte Protein-Ligand-Komplex verfeinert, um die Unterschiede zwischen beobachteten und berechneten Strukturfaktoren zu minimieren. Wegen eines unbefriedigenden Verhältnisses zwischen experimentellen Beobachtungen (Reflexen) und anpaßbaren Bestimmungsstücken (z. B. Raumpositionen der Atome) bei Proteinstruktur-Bestimmungen wird die manuell eingepaßte Ligandenkonformation häufig während der Verfeinerung als starr belassen. Bestenfalls werden einige Torsionswinkel freigegeben – unter Maßgabe des angewendeten Kraftfeldes und der zusätzlichen Bedingungen für die Übereinstimmung der Strukturfaktoren<sup>[48]</sup>. Diese Kraftfelder sind aber auf Proteinstrukturen ausgerichtet, und ihre Zuverlässigkeit bei allgemeinen organischen Molekülen läßt sich kaum abschätzen. Diese Einschränkungen sind von geringer Bedeutung, wenn die Daten von gut streuenden Kristallen stammen. Sie werden aber zunehmend wichtiger, wenn die Auflösung abnimmt oder Fehlordnungen und partielle Besetzungen vorliegen.

Für die statistische Auswertung der konformativen Präferenzen und der Wechselwirkungsgeometrien werden Daten aus Kristallstrukturanalysen an niedermolekularen Verbindungen genutzt. Im allgemeinen sind diese Strukturen bis zu einer

atomaren Auflösung bestimmt und zeigen nur kleine Positionsfehler. Mit Röntgen-Strahlen werden Wasserstoffatome weniger genau lokalisiert als schwerere Atome. Aber auch die Genauigkeit der Strukturdaten niedermolekularer Verbindungen kann reduziert sein, z. B. durch Kristallbaufehler, unsachgemäße Datensammlung und Datenreduktion, nichteindeutige Raumgruppenzuweisungen oder Fehlordnungen. Die Suche nach Daten in der Cambridge Crystallographic Database<sup>[21-23]</sup> benötigt eine Eingabeauffrage. Dabei ist in einigen Fällen die Zuordnung der chemischen Konnektivität zu den kristallographischen Raumkoordinaten nicht eindeutig. Hierdurch können für eine kleine Zahl von Verbindungen inadäquate Einträge in den Datensatz rutschen. Sie verbleiben dann bei den statistischen Auswertungen als ein gewisser Anteil an „Hintergrundrauschen“.

Die experimentellen Bindungsdaten können zur Ableitung von Modellen zur Vorhersage von Affinitäten dienen. Probleme entstehen, wenn Daten aus mehreren Laboratorien verglichen werden. Variationen in den experimentellen Bedingungen, z. B. Temperatur oder Salzkonzentration, können einen Einfluß haben. So zeigen mehrere Messungen am gleichen Protein-Ligand-Komplex eine relative Abweichung um den Faktor fünf<sup>[49]</sup>. Dies muß als Warnung dienen und legt die Grenzen für jede theoretische Vorhersage von Bindungskonstanten fest.

### 3. Nichtkovalente Wechselwirkungen in Protein-Ligand-Komplexen

Niedermolekulare Liganden können mit Proteinen sowohl kovalent als auch nichtkovalent wechselwirken. Beispiele für Liganden, die kovalent an das Zielprotein binden, sind Trifluormethylketone als Elastase-Inhibitoren<sup>[50, 51]</sup>,  $\beta$ -Lactam-Antibiotika, Aspirin und andere nichtsteroidale Entzündungshemmer<sup>[52]</sup>. In der folgenden Diskussion werden wir allerdings solche Beispiele nicht berücksichtigen und uns nur mit nichtkovalent bindenden Liganden befassen. Die wichtigsten Beiträge zu nichtkovalenten Protein-Ligand-Wechselwirkungen sind in Abbildung 1 zu sehen, wobei der Thrombin-NAPAP-Komplex<sup>[53]</sup> als Beispiel dient. In der Regel werden mehrere Wasserstoffbrückenbindungen zwischen Protein und Ligand gebildet<sup>[54]</sup>. Des weiteren sind häufig entgegengesetzt geladene funktionelle Gruppen des Proteins und des Liganden miteinander

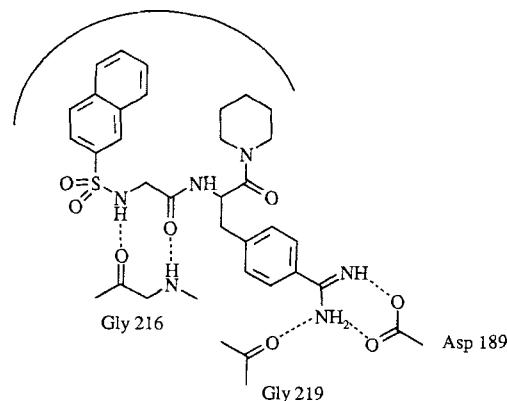


Abb. 1. Wechselwirkungen zwischen der Serin-Protease Thrombin und dem Inhibitor NAPAP, wie sie kristallographisch im Komplex von Brandstetter et al. [53] bestimmt wurden. Der Bogen symbolisiert die lipophile Bindetasche.

in Kontakt. Darüber hinaus werden lipophile Gruppen des Liganden in hydrophoben Taschen gefunden, die durch Seitenketten der hydrophoben Aminosäuren gebildet werden. Die Bindungskonstante  $K_i$  und die damit in Zusammenhang stehende Gibbs-Bindungsenthalpie  $\Delta G$  ( $\Delta G = -RT\ln K_i$ ) sind für eine große Zahl von Protein-Ligand-Komplexen bestimmt worden. Die Bindungskonstante wird routinemäßig in zahlreichen Laboratorien ermittelt.

Die Kenntnis dieser Daten führt sofort zu folgenden Fragen: 1) Wie hängt die Bindungskonstante von den strukturellen Eigenschaften eines Komplexes ab? 2) Welches sind die wichtigen Eigenschaften, die es einem Protein ermöglichen, einen Liganden fest und selektiv zu binden? 3) Was unterscheidet eine Liganden-Bindetasche von anderen Höhlen in der Proteinstruktur? Unser gegenwärtiges Verständnis der Protein-Ligand-Wechselwirkungen reicht bei weitem noch nicht aus, all diese Fragen wirklich befriedigend zu beantworten. Die wichtigste Voraussetzung, die erfüllt sein muß, scheint eine gute sterische und elektronische Komplementarität von Protein und Ligand zu sein. Allerdings ist dieses Kriterium wegen Desolvatisierungseffekten allein nicht ausreichend, um die Bindungsstärke von Liganden zu charakterisieren.

#### 3.1. Wasserstoffbrückenbindungen

Wir haben achtzig Protein-Ligand-Komplexe analysiert, für die sowohl die 3D-Struktur als auch die Bindungskonstante bekannt sind. In Abbildung 2 ist der Logarithmus der Bindungskonstanten  $K_i$  gegen die Zahl der zwischen Protein und

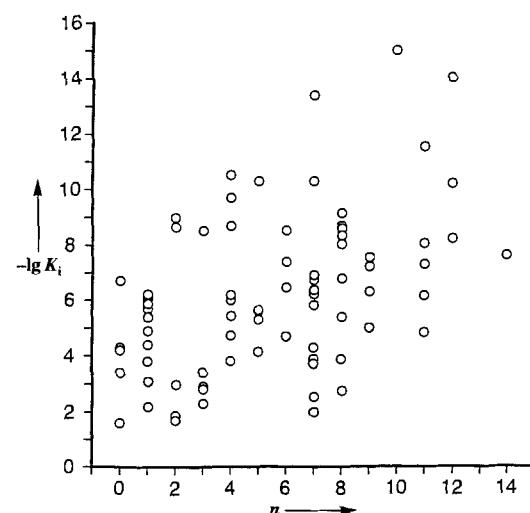


Abb. 2. Beiträge von H-Brücken zur Bindungsaffinität von Proteinliganden. Der Logarithmus der Bindungskonstanten  $K_i$  ist als Funktion der Zahl  $n$  an H-Brücken zwischen Protein und Ligand aufgetragen (Daten aus achtzig kristallographisch charakterisierten Protein-Ligand-Komplexen).

Ligand gefundenen H-Brücken aufgetragen. Die Bindungsaffinität nimmt pro H-Brücke um ungefähr eine Größenordnung zu. Allerdings ist die Streuung der Daten sehr groß. So gibt es mehrere Protein-Ligand-Komplexe mit starker Bindung im Nanomol-Bereich ohne H-Brücke (z. B. den Komplex zwischen dem Retinolbindeprotein und Retinol<sup>[55]</sup>) oder nur mit ganz

wenigen H-Brücken (z. B. den zwischen Antikörper und Steroid<sup>[56]</sup> sowie den zwischen Antikörper und Fluorescein<sup>[57]</sup>). Die Bindung dieser Liganden beruht auf unpolaren Wechselwirkungen. Des weiteren bilden manche Liganden viele H-Brücken zum Protein und binden trotzdem nur ganz schwach (z. B. der Glycogen-Phosphorylase-Glucose-<sup>[58]</sup>, der Hemagglutinin-Sialinsäure-<sup>[59]</sup> und der Gluthathion-S-Transferase-Gluthathion-Komplex<sup>[60]</sup>). Interessanterweise enthält keiner dieser Liganden eine größere lipophile Gruppe.

Die bekannten Daten zeigen aber auch, daß nicht in eine H-Brücke eingebundene vergrabene polare Gruppen an der Protein-Ligand-Grenzfläche der Bindung abträglich sind. Eine vor kurzem durchgeführte statistische Analyse hochaufgelöster Proteinstrukturen ergab, daß weniger als 2% der polaren Atome vergraben sind, ohne zugleich eine H-Brücke auszubilden<sup>[61]</sup>. Polare Gruppen werden also fast immer in H-Brücken abgesättigt. Beim Entwurf neuer Liganden ist daher darauf zu achten, daß die polaren Gruppen von Protein und Ligand passende Gegengruppen zur Verfügung haben, wenn sie durch die Bindung des Liganden vergraben werden.

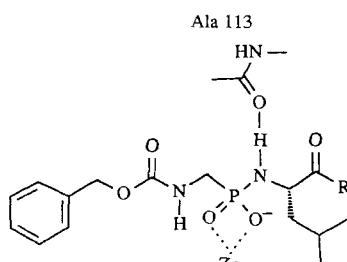
Zusätzlich zu H-Brücken treten in Protein-Ligand-Komplexen noch andere wichtige polare Wechselwirkungen auf, insbesondere koordinative Bindungen an Metallionen. Beispielsweise binden Hydroxamsäuren und Thiole stark an das im aktiven Zentrum von Metalloproteasen vorhandene Zink-Ion<sup>[62]</sup>. Diese Wechselwirkung ist in vielen Metalloprotease-Inhibitor-Komplexen der wichtigste Beitrag zur Bindung.

### 3.2. Zur Rolle des Lösungsmittels bei polaren Protein-Ligand-Wechselwirkungen

Der Beitrag einer H-Brücke hängt von ihrer mikroskopischen Umgebung ab und variiert stark. So können Desolvatisierungseffekte bei der Protein-Ligand-Bindung die Wirkung einer intermolekularen H-Brücke vollständig kompensieren, so daß ihr Nettobeitrag zur Bindung nahe Null liegt, während eine Hydroxygruppe in einem Enzyminhibitor, der als Analogon zum Übergangszustand bindet, offensichtlich sehr viel zur Bindungsaffinität beiträgt<sup>[63]</sup>. Von Matthews et al. wurde an Lysozymmutanten gezeigt, daß der Einfluß vergrabener und an der Oberfläche befindlicher Salzbrücken auf die Proteinstabilität stark unterschiedlich ist<sup>[64]</sup>.

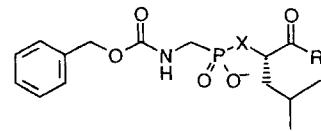
Ein instruktives Beispiel, das die Wichtigkeit von Desolvatisierungseffekten unterstreicht, sind die von Bartlett et al. untersuchten Thermolysin-Inhibitoren, die eine Phosphonamid-, eine Phosphonat- oder eine Phosphinatgruppe enthalten<sup>[65]</sup>. Die ge-

messenen Bindungskonstanten sind in Tabelle 2 zusammengefaßt. Die Wechselwirkungen zwischen der Phosphonamidgruppe und Thermolysin sind in Schema 1 zu sehen. Die  $\text{PO}_2^-$ -Gruppe bindet an das Zink-Ion, und die  $\text{PNH}$ -Gruppe bildet eine H-Brücke zur Hauptketten-Carbonylgruppe von



Schema 1. Wechselwirkungen zwischen der Phosphonamidgruppe des Thermolysin-Inhibitors ZG'LR und Thermolysin.

Tabelle 2. Bindungskonstanten  $K_i$  [ $\mu\text{M}$ ] von Thermolysin-Inhibitoren mit einer Phosphonamid- ( $\text{X} = \text{NH}$ ), Phosphonat- ( $\text{X} = \text{O}$ ) oder Phosphinatgruppe ( $\text{X} = \text{CH}_2$ ).



R	X = NH	O	$\text{CH}_2$
OH	0.76	660	1.4
Gly-OH	0.27	230	0.3
Phe-OH	0.08	53	0.07
Ala-OH	0.02	13	0.02
Leu-OH	0.01	9	0.01

Ala 113. Der Austausch dieser NH-Gruppe gegen eine  $\text{CH}_2$ -Gruppe hat keinen Einfluß auf die Bindungsaffinität. Die Resultate werden verständlich, wenn man die Zahl der H-Brücken betrachtet, die zwischen Inhibitor und Protein sowie zwischen Inhibitor und Wasser gebildet werden: Die NH-Gruppe des Phosphonamids bildet eine H-Brücke zum Protein. Ebenso wird jedoch auch eine H-Brücke mit einem Wassermolekül in Lösung gebildet. Die Gesamtzahl der H-Brücken wird also durch die Ligandenbindung nicht verändert. Die  $\text{CH}_2$ -Gruppe wiederum kann weder eine H-Brücke zu Thermolysin noch eine zu Wasser bilden. Die H-Brücken-Bilanz bleibt also auch für die  $\text{CH}_2$ -Gruppe unverändert. Die etwa 1000mal schwächere Bindung der analogen Phosphonate an Thermolysin (siehe Tabelle 2) beruht auf der abstoßenden elektrostatischen Wechselwirkung zwischen dem Sauerstoffatom des Liganden und der  $\text{C}=\text{O}$ -Gruppe von Ala 113, die beide eine negative Partialladung tragen. Das Sauerstoffderivat kann zudem keine H-Brücke zum Protein bilden, während eine solche jedoch vermutlich in Wasser vorhanden ist. Die Röntgenstrukturanalyse des Phosphonats ergab, daß dieser Inhibitor in der Tat genauso an Thermolysin bindet wie das Phosphonamid<sup>[66]</sup>. Bemerkenswerterweise konnten Bash et al.<sup>[67]</sup> sowie Merz und Kollman<sup>[68]</sup> die relativen Bindungsaffinitäten dieser drei Inhibitorklassen korrekt vorhersagen, und zwar mit einem auf Moleküldynamik-Simulationen beruhenden Verfahren der thermodynamischen Störungstheorie (siehe auch Abschnitt 3.7).

Eine feste Bindung ist möglich, wenn die Gesamtzahl der H-Brücken durch die Ligandenbindung zunimmt. Wir glauben, daß der Komplex Avidin-Biotin<sup>[69]</sup> seine extrem hohe Bindungsaffinität teilweise durch die große Zahl an H-Brücken erreicht, die nur mit Wassermolekülen in der Bindetasche nicht gebildet werden können. Die Strukturen des Proteins mit und ohne gebundenem Liganden im Kristall sind bestimmt worden. Dabei wurden in der Bindetasche des nichtkomplexierten Proteins vier Wassermoleküle identifiziert. Allerdings ist die tatsächliche Zahl höher, da die beweglichen Wassermoleküle bei röntgenographischen Untersuchungen nicht sichtbar sind: Füllt man die Bindetasche in einer Molekülmekanikrechnung mit Wassermolekülen, so erhält man neun bis zehn Wassermoleküle [Böhm, unveröffentlichte Ergebnisse]. Allerdings können auch mit dieser Zahl an Wassermolekülen nicht so viele H-Brücken zu Avidin erreicht werden wie mit Biotin.

Die Berücksichtigung von Wassermolekülen ist ein Schlüssel zum besseren Verständnis von Protein-Ligand-Wechselwirkun-

gen. Alle direkten Protein-Ligand-Wechselwirkungen konkurrieren mit Wechselwirkungen zu Wassermolekülen. Sowohl der Ligand als auch das Protein sind vor der Komplexbildung vollständig solvatisiert. Durch die Bindung geht ein Teil der Lösungsmittelhülle verloren. Bei diesem Prozeß spielen zahlreiche enthalpische und entropische Beiträge eine Rolle<sup>[70-73]</sup>. Beste-hende H-Brücken werden gebrochen und neue gebildet. Darüber hinaus ändert sich die Wasserstruktur an der Protein-Ligand-Grenzfläche. Wasser hat die einzigartige Fähigkeit, ein dichtes Netzwerk von H-Brücken zu bilden<sup>[54]</sup>. Die H-Brücke zwischen zwei Wassermolekülen in der Gasphase ist stark; die Dimerisierungsenthalpie beträgt ungefähr  $-20 \text{ kJ mol}^{-1}$ <sup>[74, 75]</sup>. Dies bedeutet, daß die Bindung eines Liganden schwach sein wird, wenn dieser lediglich fest an das Protein gebundene Wassermoleküle ersetzt, ohne zusätzliche Wechselwirkungen mit dem Protein einzugehen. Die Verdrängung eines nur schwach gebundenen Wassermoleküls dagegen trägt deutlich zur Bindung bei, da sowohl entropische (Freisetzung von Wassermolekülen) als auch enthalpische Faktoren (günstige Wechselwirkungen mit anderen Wassermolekülen) diesen Prozeß begünstigen. Genauere Untersuchungen zur Bedeutung von Wasser bei Protein-Ligand-Wechselwirkungen ergeben ein recht komplexes Bild<sup>[76]</sup>. Beispielsweise zeigen neuere kalorimetrische Studien, daß in einigen Fällen die Reorganisation des Lösungsmittels zu über 25% zur beobachteten Bindungsenthalpie beiträgt<sup>[77]</sup>. Für den Entropiegewinn durch das Freisetzen eines Wassermoleküls wurden von Dunitz  $28 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$  als Obergrenze angegeben<sup>[78]</sup>. Die Schätzung stützt sich auf einfache thermodynamische Argumente.

Interessanterweise findet man für viele kleine Moleküle mit funktionellen Gruppen, die häufig an Protein-Ligand-Wechselwirkungen beteiligt sind, keine Assoziation in Wasser. Beispielsweise assoziiert Essigsäure in Wasser nicht mit Guanidin<sup>[79]</sup>. Ebenso bilden einfache Amide in Wasser keine Dimere<sup>[80]</sup>. Offensichtlich ist die direkte anziehende Wechselwirkung zwischen den kleinen Molekülen nicht ausreichend, um die eine Dissoziation begünstigenden Faktoren, z. B. Wechselwirkungen mit Solvengmolekülen, zu überkompensieren. Wie von Williams und anderen diskutiert<sup>[70-73]</sup>, existieren zudem entropische Effekte, die der Komplexbildung entgegenstehen und die anziehenden Wechselwirkungen überkompensieren können.

### 3.3. Lipophile Wechselwirkungen

In Abbildung 3 haben wir den Logarithmus der Bindungskonstanten  $K_i$  gegen die Größe der lipophilen Kontaktfläche aufgetragen. Hierbei wurde der gleiche achtzig Protein-Ligand-Komplexe umfassende Datensatz verwendet wie bei der H-Brücken-Statistik (Abb. 2). Es existiert eine Korrelation zwischen der Bindungsaffinität und der Größe der lipophilen Kontaktfläche, jedoch ist auch hier die Streuung groß. Retinol ist ein Beispiel für einen Liganden, der an das Protein (Retinolbindeprotein) nur durch lipophile Wechselwirkungen bindet<sup>[55]</sup>. Die Röntgenstrukturanalyse des Komplexes ergab, daß zwischen Protein und Ligand keine H-Brücken gebildet werden. Die Bindungskonstante  $K_i$  ist  $190 \text{ nm}$ , entsprechend einer Gibbs-Bindungsenthalpie von  $-38 \text{ kJ mol}^{-1}$ . Die gesamte molekulare Oberfläche von Retinol, bestimmt mit einem Gitter-

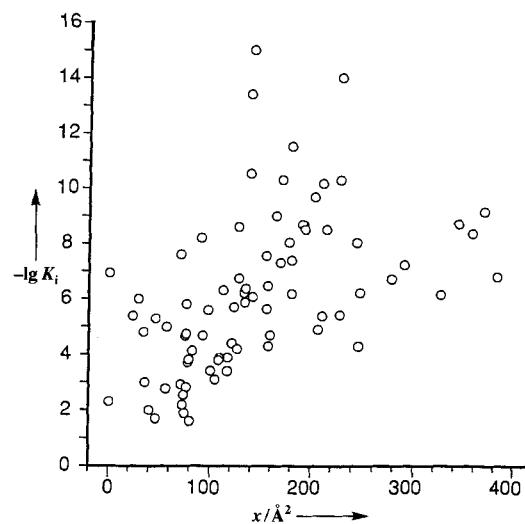


Abb. 3. Beiträge der lipophilen Kontakte zur Bindungsaffinität von Proteinliganden. Der Logarithmus der Bindungskonstanten  $K_i$  ist als Funktion der Größe  $x$  der lipophilen Kontaktfläche zwischen Protein und Ligand aufgetragen (Daten aus achtzig kristallographisch charakterisierten Protein-Ligand-Komplexen).

algorithmus<sup>[81]</sup>, beträgt  $326 \text{ Å}^2$ . Hier von werden  $295 \text{ Å}^2$  (90%) durch die Bindung an das Protein vergraben. Daneben gibt es aber auch Liganden wie  $\text{SO}_4^{2-}$ , die keinerlei lipophile Kontakte bilden, aber trotzdem fest an bestimmte Proteine binden (z. B. bindet  $\text{SO}_4^{2-}$  an das Sulfatbindeprotein mit  $K_i = 100 \text{ nm}$ <sup>[82]</sup>). Nach der weitgehend akzeptierten Sichtweise beruhen lipophile Wechselwirkungen im wesentlichen auf der Verdrängung und Freisetzung geordneter Wassermoleküle und sind daher hauptsächlich entropischer Natur<sup>[83, 84]</sup>. Der Entropiegewinn entsteht dadurch, daß die freigesetzten Wassermoleküle nicht länger an einem Ort fixiert sind. Es gibt aber auch enthalpische Beiträge zu den lipophilen Wechselwirkungen: Wassermoleküle, die sich in einer lipophilen Tasche befinden, können keine H-Brücken bilden; nach der Freisetzung sind sie dann in der Lage, H-Brücken mit anderen Wassermolekülen zu bilden. Zusätzlich existieren auch direkte anziehende Wechselwirkungen zwischen den lipophilen Gruppen (hauptsächlich Dispersionswechselwirkungen).

Der Einfluß spezifischer Wechselwirkungen zwischen aromatischen Molekül(teilen) hat in letzter Zeit zunehmend Aufmerksamkeit auf sich gezogen<sup>[85]</sup>. Eine statistische Analyse der Kontakte zwischen Benzolringen in Proteinen ergibt eine Bevorzugung von Kontaktgeometrien, die zu einer anziehenden elektrostatischen Quadrupol-Quadrupol-Wechselwirkung führen<sup>[86]</sup>. Außerdem zeigen Daten zur Bindung von aromatischen Gastmolekülen an Cyclophane in Wasser, daß die Bindung enthalpiegetrieben ist<sup>[87]</sup>. Wir haben eine bemerkenswerte Ähnlichkeit zwischen dem Packungsmuster im Benzolkristall und den nichtkovalenten Aren-Aren-Kontakten in mehreren Protein-Ligand-Komplexen und aromatischen Wirt-Gast-Komplexen gefunden<sup>[88]</sup>. Ein Beispiel ist in Abbildung 4 zu sehen. Wegen ihrer großen Polarisierbarkeit sind aromatische Seitenketten darüber hinaus in der Lage, günstige Wechselwirkungen mit der positiven Ladung einer quartären Ammoniumgruppe einzugehen. Diese Art von Wechselwirkung tritt beispielsweise im Komplex von Acetylcholin-Esterase mit Acetylcholin<sup>[89]</sup> auf. Sie trägt auch zur Bindung in Wirt-Gast-Komplexen bei<sup>[90]</sup>. Für viele

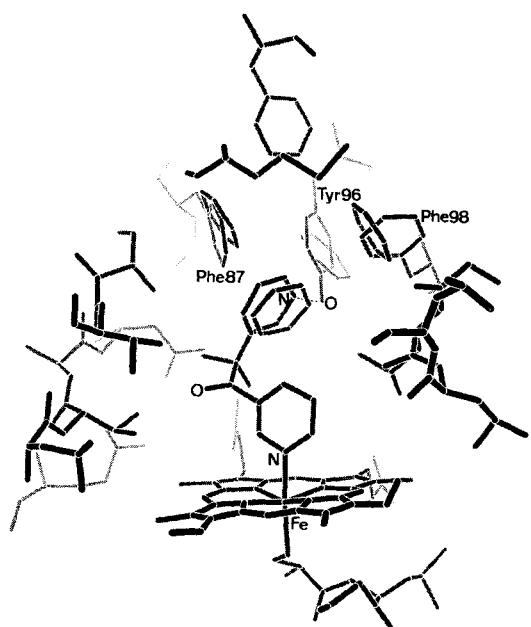


Abb. 4. Kristallographisch bestimmte Struktur des Komplexes aus Metyrapone und Cytochrom P450<sub>CAM</sub>, überlagert mit einem Ausschnitt aus der Packung von Benzol im Kristall. Vier Benzolringe fallen mit den aromatischen Substituenten des Liganden sowie von Phe87, Tyr96 und Phe98 zusammen.

Protein-Ligand-Komplexe ist aber auch bekannt, daß ein Phenylsubstituent, der eine lipophile Tasche besetzt, ohne Verlust an Bindungsaffinität durch einen Cyclohexylsubstituenten ersetzt werden kann<sup>[91]</sup>. Darüber hinaus scheinen neuere Befunde zum Einfluß aromatischer Wechselwirkungen auf die molekulare Vorzugskonformation in Widerspruch zu der angenommenen Wichtigkeit dieser Wechselwirkung zu stehen<sup>[92]</sup>.

### 3.4. Zur Additivität von Protein-Ligand-Wechselwirkungen

Ein wichtiger Aspekt der Protein-Ligand-Wechselwirkungen ist ihre Additivität aus Gruppenbeiträgen. Aus Untersuchungen an Proteinmutanten ergab sich als Beitrag einer H-Brücke zur Bindungsaffinität ein Wert von  $(-5 \pm 2.5) \text{ kJ mol}^{-1}$ <sup>[93, 94]</sup>. Ähnliche Werte wurden auch für den Beitrag einer H-Brücke zur Proteinstabilität gefunden<sup>[95-97]</sup>. Die Konsistenz dieser für eine Reihe von Proteinen ermittelten Werte legt den Schluß nahe, daß die Beiträge von H-Brücken bis zu einem gewissen Grad additiv sind. Eine 1992 von Bohacek und McMartin vorgestellte Studie an Thermolysin-Inhibitor-Komplexen<sup>[98]</sup> ergab einen linearen Zusammenhang zwischen der Zahl an H-Brücken und lipophilen Kontakten und der Bindungskonstanten. Ein ähnliches Resultat wurde von Schneider und Mitarbeitern für die Bildung von Wirt-Gast-Komplexen publiziert<sup>[99]</sup>. Das Konzept der paarweisen Additivität der nichtkovalenten Wechselwirkungen in Protein-Ligand-Komplexen wird weiterhin durch den Erfolg einfacher empirischer Ansätze zur Abschätzung der Bindungsaffinität gestützt, die von einer solchen Additivität ausgehen<sup>[2, 81, 100-102]</sup>.

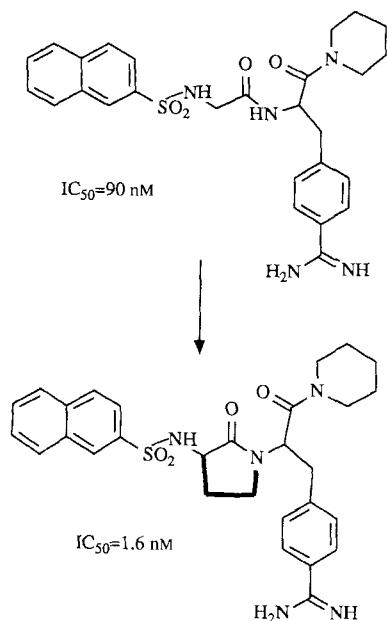
Analog wie bei den polaren Wechselwirkungen wurde auch bei den unpolaren Wechselwirkungen in mehreren Arbeiten die Additivität untersucht. Für lipophile Wechselwirkungen wurde gezeigt<sup>[103-105]</sup>, daß sich die Gibbs-Bindungsenthalpie propor-

tional zur Größe der lipophilen Oberfläche ändert, die nach der Bindung nicht mehr für das Lösungsmittel zugänglich ist; die ermittelten Beiträge zu  $\Delta G$  liegen zwischen  $80^{[106-108]}$  und  $200 \text{ J mol}^{-1} \text{ Å}^{-2}$ <sup>[109]</sup>. Die Bindung einiger Inhibitoren an Carboxypeptidase A dagegen ist ein eindrucksvolles Beispiel für den Einfluß nichtadditiver Effekte. Der Ersatz des C-terminalen Alanins durch Phenylalanin im Inhibitor ZFA<sup>P</sup>(O)A führt zu einer größeren lipophilen Oberfläche. Die Konsequenz ist eine Steigerung der Bindungsaffinität um mehr als den Faktor 50 000<sup>[110]</sup>. Der Ersatz des zweiten Alaninrests durch Valin vergrößert die lipophile Oberfläche weiter und steigert die Bindungsaffinität nochmals um den Faktor 100: ZFV<sup>P</sup>(O)F bindet an Carboxypeptidase A mit  $K_i = 10-27 \text{ fm}$ . Der erste, die Affinität stark erhöhende Austausch (Ala  $\rightarrow$  Phe) führt zur perfekten Ausfüllung einer lipophilen Bindetasche, die durch das Ala-Derivat nicht besetzt wird. Der zweite Austausch (Ala  $\rightarrow$  Val) hat zwei Auswirkungen: Erstens wird der intermolekulare lipophile Kontakt mit dem Protein vergrößert. Zweitens ist auch die intramolekulare lipophile Kontaktfläche in der proteingebundenen Konformation beim Val-Derivat größer als bei der Ala-Verbindung. Der zweite Effekt stabilisiert die in der gebundenen Form vorliegende Konformation schon in Lösung und führt zu einer Präorganisation des Liganden. Das Phänomen der Minimierung der lipophilen Oberfläche in wässriger Lösung ist von Wiley und Rich als „hydrophober Kollaps“ bezeichnet worden<sup>[111]</sup>. Ein ähnliches Verhalten wurde für den Thrombin-Inhibitor D-Phe-Pro-boro-Arg gefunden<sup>[112]</sup>: Der intramolekulare Kontakt zwischen den Seitenketten der Aminosäuren D-Phe und Pro stabilisiert die proteingebundene Konformation. NMR-Studien zeigen, daß die Konformation dieses Moleküls in Wasser sehr ähnlich zu der in der Proteinbindetasche ist. Die Autoren schätzen, daß in diesem Fall die Präorganisation des Liganden die Bindungsaffinität um den Faktor 10 erhöht. Weitere Beispiele für präorganisierte Proteinliganden sind beschrieben worden<sup>[113]</sup>. – Eine Steigerung der Bindungsaffinität durch Präorganisation ist ein nichtadditives Phänomen.

### 3.5. Der Einfluß der Ligandenflexibilität und -mobilität

Die Flexibilität ist ein weiterer wichtiger Faktor, der die Stärke von Protein-Ligand-Wechselwirkungen beeinflußt. In diesem Abschnitt diskutieren wir die energetischen Aspekte (strukturelle Aspekte werden in Abschnitt 4 dargestellt). Wenn mit einem flexiblen und einem starren Liganden das gleiche Muster aus H-Brücken und lipophilen Wechselwirkungen mit einem Protein entsteht, dann wird der starre Ligand wesentlich fester binden. Ein zentraler Lehrsatz des strukturbasierenden Liganden-Designs lautet, daß die Bindungsaffinität eines flexiblen Liganden gesteigert werden kann, wenn die konformativ Beweglichkeit in Lösung auf die des proteingebundenen Zustands beschränkt werden kann<sup>[114]</sup>. In mehreren Arbeiten wurde über konformativ fixierte Inhibitoren berichtet, deren Bindungsaffinität wesentlich höher ist als die der flexiblen Ausgangsverbindung<sup>[136, 37, 115]</sup>. Die Konsequenz einer konformativen Fixierung wurde in einer Studie von Mack et al. für Thrombin-Inhibitoren demonstriert<sup>[136]</sup>. Die röntgenographisch ermittelte Struktur von Thrombin im Komplex mit dem Inhibi-

tor NAPAP wurde hierbei genutzt, um neue Inhibitoren mit besseren Bindungseigenschaften zu entwerfen. Die 3D-Struktur legte die Einführung eines Lactamrings nahe, wie in Schema 2 zu sehen ist. Die Einführung des zusätzlichen Rings reduziert die Zahl der drehbaren Bindungen und schränkt die konformative Flexibilität ein. Der neue Inhibitor bindet 60mal stärker an Thrombin als NAPAP.



Schema 2. Die Einführung einer Lactameinheit (feste Bindungen) in den bekannten Thrombin-Inhibitor NAPAP (oben) reduziert dessen Flexibilität und verbessert seine Bindungsaffinität um den Faktor 60.

Andere experimentelle Daten deuten für viele Fälle darauf hin, daß der Ligand über eine beträchtliche Mobilität verfügt, auch wenn er an das Protein gebunden ist. Die Bindung von Camphan, Adamantan und Thiocampher an Cytochrome P450<sub>CAM</sub><sup>[116]</sup> ist hierfür ein interessantes Beispiel. Die Liganden bilden keine H-Brücke zum Enzym und können in der Bindetasche frei rotieren. Als Folge davon verläuft die Hydroxylierung nicht stereoselektiv. In einer an diesem System durchgeführten Moleküldynamik-Simulation wurde eine hohe Korrelation zwischen den berechneten Häufigkeiten von Ligandenorientierungen in der Bindetasche und den experimentell bestimmten Hydroxylierungsraten gefunden<sup>[117]</sup>.

Von Weber et al.<sup>[118]</sup> durchgeführte kristallographische und thermodynamische Untersuchungen zeigen, daß die Verdrängung von Wassermolekülen und die Erhaltung der Beweglichkeit des Liganden die Entropieänderung bei der Ligandenbindung günstig beeinflussen. In einer Reihe von Streptavidin-Liganden wies der Ligand mit der höchsten Affinität auch die größte Beweglichkeit im gebundenen Zustand auf<sup>[118]</sup>. Ähnliche Resultate wurden für die Bindung kleiner Gastmoleküle an  $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\gamma$ -Cyclodextrine in Wasser gefunden<sup>[119]</sup>.

### 3.6. Enthalpische und entropische Beiträge zu Protein-Ligand-Wechselwirkungen

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß die physikalischen Grundlagen der Ligandenbindung komplizierter sind, als vielfach angenommen wird. Mehrere die Bindungsaffinität bestim-

mende Beiträge sind in Abbildung 5 dargestellt. Der Ligand und die Proteinbindetasche sind vor der Bindung vollständig solvatisiert; die polaren Gruppen bilden H-Brücken mit dem Lösungsmittel. Der Ligand ist in der Regel flexibel (mehrere drehbare Bindungen) und kann daher eine unter Umständen sehr große Zahl unterschiedlicher Konformationen einnehmen (siehe hierzu Abschnitt 4). Das Protein ist ebenfalls flexibel. Die Konformationen des Proteins mit und ohne gebundenem Liganden können signifikant voneinander abweichen. Wenn der Ligand an das Protein bindet, muß er einen Teil seiner Wasserhülle abstreifen und außerdem Wassermoleküle aus der Bindetasche verdrängen. Hierbei werden zahlreiche H-Brücken zu Wassermolekülen gebrochen. Der Ligand ist dann in der Lage, direkte günstige Wechselwirkungen zum Protein zu bilden. Als Konsequenz der Bindung können Ligand und auch Protein die Konformation ändern und außerdem an innerer Beweglichkeit verlieren, denn wegen der räumlichen Begrenzung der Bindetasche sind bestimmte Teile des Konformationsraums für den Liganden im gebundenen Zustand nicht mehr zugänglich.

$\Delta G$  besteht aus einer enthalpischen und einer entropischen Komponente ( $\Delta G = \Delta H - T\Delta S$ ). Beide Komponenten können bestimmt werden, beispielweise durch mikrokalorimetrische Messungen<sup>[120]</sup>. Leider wurden diese wichtigen Messungen bislang nur selten durchgeführt. Trotzdem lassen die vorliegenden Daten<sup>[121-124]</sup> einige Schlußfolgerungen zu. Als wichtigstes Resultat zeigen alle Studien, daß es keine Korrelation zwischen der Bindungsenthalpie  $\Delta H$  und der Gibbs-Bindungsenthalpie  $\Delta G$  gibt. An ein gegebenes Protein können unterschiedliche Liganden sowohl über enthalpiegetriebene als auch über entropiegetriebene Mechanismen binden. Beispielsweise ist die Bindung von Biotin an Streptavidin enthalpiegetrieben, während die Bindung von Azobenzolderivaten an das gleiche Protein entropiegetrieben ist<sup>[125]</sup>. Trägt man für einen Satz ähnlicher Liganden  $\Delta H$  gegen  $\Delta S$  auf, so erhält man häufig eine Gerade. Zur Erklärung dieser Enthalpie-Entropie-Kompensation wurde ein auf einer Reorganisation des Lösungsmittels beruhendes Modell vorgeschlagen<sup>[126]</sup>.

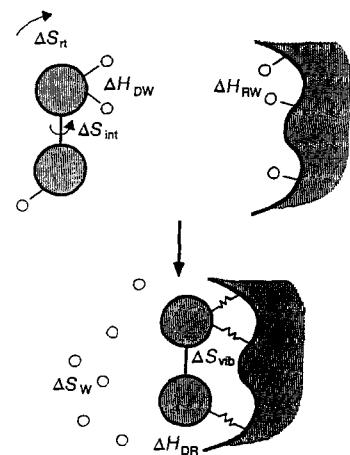


Abb. 5. Beiträge zur Stärke von Protein-Ligand-Wechselwirkungen. Im unkomplizierten Zustand (oben) interagieren die als Rezeptor fungierende Bindetasche (R) und der Ligand (D) mit Wassermolekülen (kleine Kreise, Enthalpie  $\Delta H_{rw}$ ,  $\Delta H_{dw}$ ). Durch die Komplexierung tritt ein enthalpischer Beitrag  $\Delta H_{dr}$  auf, der auf die direkten Wechselwirkungen des Liganden mit dem Protein zurückgeht (unten). Im gebundenen Zustand hat der Ligand eine Gesamtrotations- und Translationsentropie  $\Delta S_n$  und eine innere Entropie  $\Delta S_{int}$ , die von den Konformationsfreiheitsgraden herführen. Während der Bindung werden beide Beiträge verändert, wobei die Veränderungen teilweise auch durch einen Entropiezuwachs aufgrund der Freisetzung der gebundenen Wassermoleküle von der Oberfläche und aus der Bindetasche des Proteins und vom Liganden ( $\Delta S_v$ ) kompensiert werden können. Zusätzlich gehen niedrfrequente Schwingungsmoden der nichtkovalenten Protein-Ligand-Wechselwirkungen in diesen Beitrag ein (Darstellung adaptiert von Andrews et al. [2]).

Die experimentelle Bestimmung von  $\Delta H$  und  $\Delta S$  führt manchmal zu überraschenden Resultaten. Beispielsweise haben Connelly et al.<sup>[94]</sup> die thermodynamischen Daten für die Bildung einer H-Brücke im Komplex aus FK 506 oder Rapamycin und dem FK 506-Bindeprotein bestimmt. In der Arbeit wurde die Ligandenbindung sowohl an den Wildtyp als auch an die Proteinmutante Tyr 82 → Phe untersucht. Aus der Röntgenstrukturanalyse ist bekannt, daß die Seitenkette von Tyr 82 eine H-Brücke mit dem Liganden bildet. Wird Tyr 82 gegen Phe ausgetauscht, so geht diese H-Brücke verloren. Wie erwartet sinkt dadurch die Bindungsaffinität. Der Unterschied in den Gibbs-Bindungsenthalpien beträgt  $(4 \pm 1.5) \text{ kJ mol}^{-1}$ . Überraschend hingegen ist der Befund, daß die Destabilisierung auf einem Entropieverlust beruht. Mit anderen Worten, die Bildung der H-Brücke ist enthalpisch ungünstig, aber entropisch begünstigt. Der Entropiegewinn resultiert hauptsächlich aus der Freisetzung von zwei Wassermolekülen.

Für ein besseres Verständnis der Ligandenbindung und auch für ihr Vorhersagen ist eine Aufteilung der Gibbs-Bindungsenthalpie in physikalisch interpretierbare Einzelbeiträge wünschenswert. Solche Aufteilungen erweisen sich allerdings als problematisch. In einer von Andrews et al.<sup>[12]</sup> durchgeführten quantitativen Analyse von Protein-Ligand-Wechselwirkungen wurde angenommen, daß der gebundene Ligand seine Translations- und Rotationsfreiheitsgrade (sowohl Rotation als starrer Körper als auch innere Rotationen) vollständig einbüßt. Aus dieser Annahme ergaben sich sehr hohe Beiträge, die der Bindung abträglich sind ( $\Delta G_{\text{trans, rot}} = + 48 \text{ kJ mol}^{-1}$ ,  $\Delta G_{\text{rot, bond}} = + 5.6 \text{ kJ mol}^{-1}$ ). Als Konsequenz dieser Annahme wurden ebenfalls große Beiträge einzelner funktioneller Gruppen zur Bindung errechnet. Die Problematik der Aufteilung in Einzelbeiträge ist auch aus den Arbeiten von Williams et al. ersichtlich<sup>[127]</sup>. Eine wichtige Schlußfolgerung aus diesen Arbeiten ist, daß der Entropieverlust wesentlich geringer ist, als zuvor von Page abgeschätzt worden war<sup>[70]</sup>. Offensichtlich ist auch beim gebundenen Liganden eine Restbewegung vorhanden. Kürzlich haben Murphy et al.<sup>[128]</sup> gezeigt, daß die Verwendung der Sackur-Tetrode-Gleichung zur Berechnung des Verlusts an Translationsentropie zu hohe Werte liefert. Die Autoren argumentieren, daß das dem Liganden für eine Bewegung zur Verfügung stehende Volumen in Lösung und im Komplex in etwa gleich ist. Daraus ziehen sie den Schluß, daß der Verlust an Translationsentropie am besten über einen speziellen Entropieterm, „cratic entropy“ (den Beitrag, der durch die Vermischung des Lösungsmittels mit den darin gelösten Molekülen entsteht), abgeschätzt werden kann.

### 3.7. Die Bedeutung theoretischer Verfahren zur Vorhersage der Bindungsaffinitäten von Liganden

Der Befund, daß sowohl  $\Delta H$  als auch  $\Delta S$  signifikant zur Ligandenbindung beitragen, hat wichtige Konsequenzen für die theoretische Beschreibung von Protein-Ligand-Wechselwirkungen. Ein häufig verwendetes Ansatz zur Berechnung dieser Wechselwirkungen besteht darin, die Geometrie des Komplexes in einer Kraftfeldrechnung zu optimieren und dann die Wechselwirkungsenergien für die optimierte Struktur zu analysieren. Mehrere Gruppen haben versucht, experimentell bestimmte

Bindungsaffinitäten mit den durch Kraftfeldrechnungen erhaltenen Protein-Ligand-Wechselwirkungsenergien zu korrelieren. Für einen Satz von HIV-Protease-Inhibitoren<sup>[129]</sup> und für einige Thrombin-Inhibitoren<sup>[130]</sup> wurde eine gute Korrelation gefunden. Allerdings kann dieses Vorgehen nur erfolgreich sein, wenn der Entropiebeitrag zur Bindung für alle Liganden gleich ist. Dies ist im allgemeinen nicht der Fall. Daher kann man nicht davon ausgehen, daß aus Molekülmechanikrechnungen erhaltene Wechselwirkungsenergien immer mit gemessenen Gibbs-Bindungsenthalpien korrelieren.

Im Prinzip kann die Gibbs-Bindungsenthalpie berechnet werden, beispielsweise durch „Free-energy-perturbation“ (FEP)- oder „Thermodynamic-integration“ (TI) Verfahren<sup>[131]</sup>. Einige beeindruckende Resultate sind mit diesen Methoden erhalten worden<sup>[132, 133]</sup>. Diese FEP- und TI-Rechnungen haben wertvolle Einsichten in die physikalische Natur spezifischer Protein-Ligand-Wechselwirkungen geliefert. Beispielsweise konnten die relativen Bindungsaffinitäten einer Reihe von Thermolysin-Inhibitoren<sup>[67–68]</sup> und HIV-Protease-Inhibitoren<sup>[132]</sup> korrekt vorhergesagt werden. Der Vorteil dieser Verfahren ist die weitgehend korrekte Behandlung aller für Protein-Ligand-Wechselwirkungen relevanten Effekte, einschließlich der Desolvatisierung und Konformationsänderung. In der Praxis treten allerdings Konvergenzprobleme auf, wodurch die Rechenzeiten sehr lang werden. Darüber hinaus hängen die Rechenergebnisse von den verwendeten Näherungen ab, insbesondere von der Genauigkeit des Kraftfelds. Gegenwärtig können mit diesen Verfahren nur Unterschiede in den Bindungsaffinitäten sehr eng verwandter Liganden vorhergesagt werden. Daher ist es auch bei bekannter 3D-Proteinstruktur schwierig, die Bindungsenergie von Protein-Ligand-Komplexen vorherzusagen. Die korrekte Modellierung solcher Wechselwirkungen ist immer noch eine beachtliche Herausforderung<sup>[134]</sup>. Wegen der derzeitigen Grenzen des FEP- und des TI-Ansatzes wurden auch alternative Verfahren zur Vorhersage von Bindungsaffinitäten untersucht. Kürzlich haben Warshel et al.<sup>[135]</sup> gezeigt, daß sich mit einer semimakroskopischen Version der „Protein-Dipoles-Langevin-Dipoles (PDLD/S)-Methode“  $\Delta G$ -Werte in einer annehmbaren Rechenzeit auf einer Workstation gut abschätzen lassen.

Angesichts der Wichtigkeit der Wechselwirkungen mit dem Lösungsmittel wurden beachtliche Anstrengungen unternommen, um Methoden zur Berechnung der Solvatisierungsenergien, insbesondere der Gibbs-Solvatisierungsenthalpien, zu entwickeln<sup>[136]</sup>. So wurden empirische<sup>[137, 138]</sup> und quantenmechanische Methoden<sup>[139, 140]</sup> zur Berechnung der Solvatisierungsenergien kleiner organischer Moleküle verwendet.

#### 3.7.1. Funktionen zur Bewertung von Protein-Ligand-Komplexen

Die Vorhersage der Bindungsaffinität eines Liganden ist derzeit eine der großen Herausforderungen des computergestützten Ligandendesigns. Wir haben eine einfache empirische Bewertungsfunktion zur Vorhersage der Bindungsaffinität für einen Protein-Ligand-Komplex mit bekannter 3D-Struktur untersucht<sup>[81]</sup>. Die Bewertungsfunktion soll zur Festlegung einer Rangfolge unter Strukturen dienen, die von einem Computerprogramm zum De-novo-Design oder aus einer Suche zu 3D-Strukturen in einer Datenbank stammen (siehe hierzu Ab-

schnitt 5). Die nichtkovalenten Wechselwirkungen werden als additiv angenommen. Die Funktion berücksichtigt H-Brücken, ionische Wechselwirkungen, die Größe der lipophilen Kontaktfläche und die Zahl der drehbaren Bindungen im Liganden und läßt sich gemäß Gleichung (a) formulieren.

$$\Delta G_{\text{Bindung}} = \Delta G_0 + \Delta G_{\text{hb}} \sum_{\text{H-Br.}} f(\Delta R, \Delta \alpha) + \Delta G_{\text{ionisch}} \sum_{\text{ion. WW}} f(\Delta R, \Delta \alpha) + \Delta G_{\text{lipo}} |A_{\text{lipo}}| + \Delta G_{\text{rot}} \text{NROT} \quad (\text{a})$$

$f(\Delta R, \Delta \alpha)$  ist dabei ein Strafterm, der große Abweichungen der H-Brücke von der Idealgeometrie berücksichtigt<sup>[8][1]</sup>. Kleine Abweichungen von der Idealgeometrie (bis zu 0.2 Å und bis zu 30°) beruhen häufig auf Ungenauigkeiten der Röntgenstrukturanalyse und werden daher toleriert.  $\Delta G_0$  ist ein Beitrag zur Bindungsenergie, der nicht direkt von spezifischen Wechselwirkungen mit dem Protein abhängt. Er berücksichtigt den allgemeinen Verlust an Translations- und Rotationsentropie des Liganden bei der Bindung.  $\Delta G_{\text{hb}}$  beschreibt den Beitrag einer idealen H-Brücke (H-Br.),  $\Delta G_{\text{ionisch}}$  repräsentiert den Beitrag einer ungestörten ionischen Wechselwirkung, und  $\Delta G_{\text{lipo}}$  ist der Beitrag der lipophilen Wechselwirkungen zur Bindung, wobei angenommen wird, daß diese proportional zur Größe der lipophilen Kontaktfläche  $A_{\text{lipo}}$  zwischen Protein und Ligand sind. Der letzte Parameter,  $\Delta G_{\text{rot}}$ , beschreibt den Verlust an Bindungsaffinität, der durch das Einfrieren innerer Freiheitsgrade des Liganden entsteht. NROT ist die Zahl der drehbaren Bindungen.

Der zur Kalibrierung der Funktion verwendete Datensatz stammt von 45 Protein-Ligand-Komplexen. Für diesen Datensatz reproduziert die Bewertungsfunktion die Bindungskonstanten (zwischen  $2.5 \times 10^{-2}$  und  $4 \times 10^{-14}$  M, entsprechend Bindungsenergien zwischen  $-9$  und  $-76 \text{ kJ mol}^{-1}$ ) mit einer Standardabweichung von  $7.9 \text{ kJ mol}^{-1}$ , was einem Fehlerfaktor von 1.4 logarithmischen Einheiten entspricht. Die Einzelbeiträge zur Protein-Ligand-Bindung, die sich aus der Bewertungsfunktion ergeben, sind folgende: eine ungestörte, ungeladene H-Brücke ( $\Delta G_{\text{hb}}$ ):  $-4.7 \text{ kJ mol}^{-1}$ , eine ideale ionische Wechselwirkung ( $\Delta G_{\text{ionisch}}$ ):  $-8.3 \text{ kJ mol}^{-1}$ , ein lipphiler Kontakt ( $\Delta G_{\text{lipo}}$ ):  $-0.17 \text{ kJ mol}^{-1} \text{ Å}^{-2}$ , eine drehbare Bindung des Liganden ( $\Delta G_{\text{rot}}$ ):  $+1.4 \text{ kJ mol}^{-1}$ . Der sich aus der Kalibrierung ergebende konstante Beitrag ( $\Delta G_0$ ) ist  $+5.4 \text{ kJ mol}^{-1}$  (wirkt also der Bindung entgegen). Das vorgestellte Verfahren ist schnell: Für ein gegebenes Protein können auf einer Einprozessor-UNIX-Workstation ca. zehn kleine Liganden pro Sekunde bewertet werden.

Derzeit untersuchen wir eine verbesserte Bewertungsfunktion mit drei zusätzlichen Termen. Der erste neue Term ( $\Delta G_{\text{arom.}}$ ) berücksichtigt spezifische Wechselwirkungen zwischen aromatischen Ringen. Die beiden anderen zusätzlichen Terme beschreiben die Verdrängung von Wassermolekülen: Der Ersatz eines Wassermoleküls, das H-Brücken zum Protein bildet ( $\Delta G_{\text{H-Br.-gebundenes Wasser}}$ ), und der Ersatz eines Wassermoleküls, das keine H-Brücken bildet ( $\Delta G_{\text{nicht-H-Br.-gebundenes Wasser}}$ ), werden als unterschiedliche Terme angesetzt. Zusätzlich werden die Terme  $\Delta G_{\text{hb}}$  und  $\Delta G_{\text{ionisch}}$  nunmehr durch einen Faktor moduliert, der zwischen vergraben und lösungsmittelzugänglichen Wechselwirkungen unterscheidet. Die neue Bewertungsfunktion basiert derzeit auf achtzig Protein-Ligand-Komplexen und ist auf ein breiteres Spektrum von Protein-Ligand-Komplexen anwendbar [Böhm, unveröffentlichte Ergebnisse].

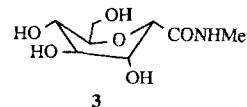
## 4. Die Molekülkonformation in der Bindetasche

Die Bindung eines niedermolekularen Liganden an ein Protein setzt deren Komplementarität in Gestalt und Eigenschaften voraus, d. h. beide Partner müssen sich während des Bindevorgangs aneinander anpassen, damit es zu einem erfolgreichen Erkennungsprozeß kommt. Der niedermolekulare Ligand ist dabei in aller Regel der flexible Partner. Enthält er mehrere drehbare Bindungen, so kann er eine Vielzahl von unterschiedlichen, energetisch tiefliegenden Konformationen einnehmen. Für die Vorhersage der Ligandenbindung und der damit verbundenen Affinität ist somit eine geeignete Beschreibung der konformativen Flexibilität unerlässlich.

### 4.1. Methoden zum Erzeugen multipler Konformationen

Eine Vielzahl von Methoden wurde entwickelt, um multiple Konformationen für Moleküle mit der Größe von Wirkstoffen (< 500 Da) zu erzeugen<sup>[141-143]</sup>. Diese Methoden generieren energetisch günstige Konformere, die den lokalen Minima auf einer vorgegebenen Energiehyperfläche entsprechen. Die Effizienz und Zuverlässigkeit dieser Methoden wird an folgenden Kriterien gemessen: 1) Wird das globale Minimum gefunden? 2) Wieviele lokale Minima werden in einem bestimmten Energiefenster oberhalb des globalen Minimums entdeckt? Hierbei betrachtet man den Liganden meist isoliert, zu einen, um das Problem zu vereinfachen, zum anderen aber vor allem, weil häufig keine Informationen über die Struktur der Proteinbindetasche zur Verfügung stehen. Daher stellt sich die wichtige Frage, ob die Liganden in der Proteinbindetasche eine Konformation einnehmen, die der Struktur an einem der lokalen Minima im isolierten Zustand nahekommt. Man kann sich leicht vorstellen, daß die lokale Umgebung in der Lage ist, die konformativen Eigenschaften zu modifizieren. Daher ist eine geeignete Definition der Systembegrenzungen für die Rechnungen entscheidend. Bei der Betrachtung von Ligand-Rezeptor-Wechselwirkungen sollte das System wenigstens den Liganden, das Protein und die umgebenden Lösungsmittelmoleküle oder die Membrumgebung umfassen. Unter Berücksichtigung dieser Überlegungen ist eine Beschränkung auf lokale Konformationsminima des isolierten Liganden gerechtfertigt, und nur dann kann man überhaupt relevante Rückschlüsse erwarten.

Der beste Weg, um sich an diese Frage heranzutasten, besteht in der Auswertung experimenteller Daten, z. B. aus kristallographischen Untersuchungen<sup>[120]</sup>. Wir müssen dabei im Auge behalten, daß Proteinstrukturen nur mit einer beschränkten Auflösung bekannt sind. Bei der Strukturbestimmung werden die Liganden in einer ausgewählten Konformation in die Elektronendichte eingepaßt. Eine kürzlich veröffentlichte Arbeit über eine Serie von glucoseartigen Liganden der Glycogen-Phosphorylase unterstreicht die Notwendigkeit, eine gewisse Vorsicht bei der Einstellung der Startkonformation walten zu lassen<sup>[144]</sup>. In Analogie zu den Strukturen anderer Komplexe mit diesem Enzym wurde das Glucosederivat **3** (ein relativ schwacher Inhibitor,  $K_i = 37 \text{ mM}$ ) mit der üblichen energetisch günstigsten Sesselkonformation des Pyranose-



rings in die Elektronendichte des Proteins eingepaßt. Da nur eine sehr unbefriedigende Einpassung gelang (Daten bis 2.3 Å Auflösung), wurde auch die Struktur des freien Liganden im Kristall bestimmt<sup>[145]</sup>. Überraschenderweise fand man eine verdrehte Bootkonformation. Diese unerwartete Ringkonformation ergab dann auch eine deutlich bessere Einpassung in die Elektronendichte des Proteins. Bei der Entwicklung von nicht-peptidischen, cyclischen, siebengliedrigen Harnstoffderivaten als HIV-Protease-Hemmern konnte ebenfalls anhand der Strukturen der niedermolekularen Verbindungen im Kristall eine ungewöhnliche Konformation in der Proteinbindetasche bestätigt werden<sup>[129]</sup>.

#### 4.1.1. Konformationsbibliotheken aus Kristallstrukturdaten

Auf den ersten Blick mögen diese Beispiele suggerieren, die Konformation eines Moleküls im kristallinen Zustand sei ein guter Ausgangspunkt, um Informationen über seine Konformation bei der Bindung an den Rezeptor zu erhalten. In einigen Fällen, so beim unpolaren Retinol, ist die Konformation im Protein tatsächlich sehr ähnlich zu der im Kristall des reinen Retinols<sup>[146]</sup>. Untersucht man aber eine größere Zahl an Liganden, so zeigt sich, daß die alleinige Betrachtung der Konformation des freien Liganden im kristallinen Zustand sicherlich nicht ausreicht, um korrekte Vorhersagen über die rezeptorgebundene Konformation zu machen<sup>[147, 148]</sup>. Vielleicht mag ein solches Vorgehen bei ziemlich unpolaren und starren Liganden in gewissem Umfang gerechtfertigt sein. Dort setzt sich die Umgebung aus vielen kleinen, isotrop im Raum verteilten Atom/Atom-Potentialbeiträgen zusammen. Somit bestimmen im wesentlichen intramolekulare Kräfte die eingenommene Konformation, d. h. es treten keine signifikanten Verzerrungen als Folge stark gerichteter Wechselwirkungen im Kristallverband oder in der Proteinbindetasche auf. Vermutlich ist diese Annahme auch bei hydrophoben Teilen oder Seitenketten eines Ligandengerüsts gültig.

Welche Rückschlüsse können für polare Liganden gezogen werden? Zitronensäure soll als ein Beispiel betrachtet werden. In unterschiedlichen Kristallen der Zitronensäure liegen die Moleküle in mehreren, voneinander verschiedenen Konformationen vor<sup>[146]</sup>. Daher scheint es schwierig, eine Vorhersage zur rezeptorgebundenen Konformation, z. B. im Komplex mit dem Enzym Citrat-Synthase, zu machen. Glücklicherweise ist die Geometrie von Zitronensäure im Komplex mit diesem Enzym bekannt. Die Torsionswinkel liegen in ähnlichen Bereichen wie in Zitronensäurekristallen. Statt aus einer einzelnen Kristallstruktur eines kleinen Moleküls einen Vorschlag für die Konformation im Protein abzuleiten, analysiert man viele verwandte Strukturen auf eventuelle konformativ Präferenzen, die sich je nach molekularer und Kristallfeld-Umgebung einstellen. Dieses Vorgehen liefert Hinweise darauf, welche Torsionswinkelwerte relevant sein könnten. Daraus ergeben sich dann Vorschläge für Konformationen, die in der strukturierten molekularen Umgebung einer Bindetasche eingenommen werden könnten. Ausgiebige Suchen in der Cambridge Crystallographic Data Base<sup>[21-23]</sup> haben die Grundlage für Konformationsbibliotheken mit Torsionswinkelfragmenten geschaffen. Diese Bibliotheken können in einer Konformationsanalyse verwendet werden, um biologisch relevante Konformationen zu erzeugen<sup>[146, 149]</sup>.

Die zentralen Aspekte dieses Ansatzes seien im folgenden an einigen Beispielen erläutert. Für einen Satz von achtzig Liganden, für die die Strukturen der Komplexe mit dem jeweiligen Bindeprotein bekannt sind, analysierten wir die Daten auf häufig auftretende Torsionswinkelfragmente. In den berücksichtigten Beispiele existieren drehbare Bindungen zwischen zwei  $sp^3$ - oder einem  $sp^2$ - und einem  $sp^3$ -Zentrum. Die Verteilung der Winkelwerte in diesen Fragmenten ist in Abbildung 6 darge-

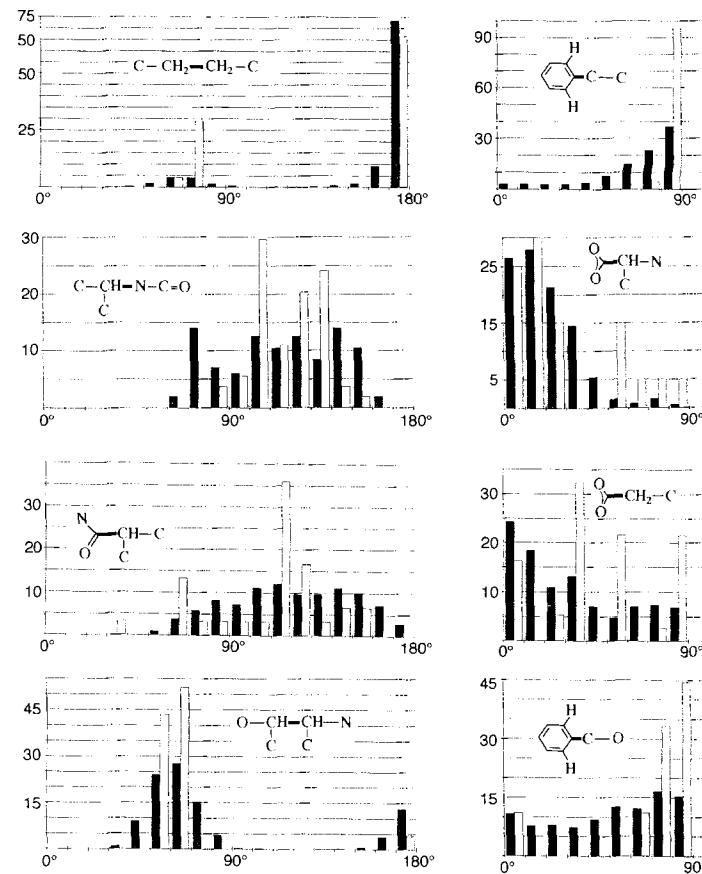


Abb. 6. Histogrammatische Darstellungen der Torsionswinkelverteilungen für die fett gezeichneten Bindungen, wie sie in häufig vorkommenden Fragmenten (siehe Formelbilder) niedermolekularer organischer Moleküle (dunkle Säulen) und gebundener Proteinliganden (offene Säulen) auftreten. Die Daten stammen aus Kristallstrukturanalysen an kleinen Molekülen bzw. Protein-Ligand-Komplexen. Jede Verteilung ( $y$ -Achse) ist in Prozent der Gesamtzahl der berücksichtigten Strukturen angegeben.

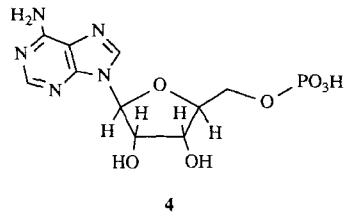
stellt. Zum Vergleich sind außerdem die Befunde für äquivalente Fragmente in kleinen Molekülen gezeigt<sup>[141]</sup>. Offensichtlich werden weitgehend ähnliche Verteilungen gefunden. Die Winkelbereiche für die niedermolekularen Verbindungen, die aus einer größeren Zahl an Daten ermittelt wurden, decken sich überzeugend mit denen für die Protein-Ligand-Komplexe.

#### 4.1.2. Vergleich der konformativen Präferenzen in Kristallpackungen und in der Umgebung einer Bindetasche

Der Inhibitor Trimethoprim 1 konnte mit der Dihydrofolat-Reduktase zweier Spezies cokristallisiert werden (*Escherichia coli* und Hühnerleber)<sup>[150]</sup>. Überraschenderweise nimmt er in

den beiden Bindetaschen unterschiedliche Konformationen an: Im Enzym aus Hühnerleber wird eine Schmetterlingskonformation beobachtet (Torsionswinkel an den Bindungen zwischen dem Brückenatom und den beiden aromatischen Ringen:  $\tau_1/\tau_2 = -85^\circ/102^\circ$ ). Dagegen orientieren sich die aromatischen Ringe in der Bindetasche des bakteriellen Enzyms nahezu senkrecht zueinander (verdrillte Konformation,  $\tau_1/\tau_2 = -177^\circ/76^\circ$ ). Das Molekülgerüst von Trimethoprim ähnelt dem von Diphenylmethan. Eine statistische Auswertung der Strukturen von kristallinen Diphenylmethan-Derivaten<sup>[151, 152]</sup> ergab, daß beide rezeptorgebundenen Konformationen auch in Kristallen kleiner Moleküle häufig populiert sind. Die verdrillte Konformation kommt dabei öfter vor als die Schmetterlingskonformation. Man kann dies als einen Hinweis auf einen höheren Energieinhalt werten. Interessanterweise ist der Inhibitor affiner zum bakteriellen Enzym (verdrillte Konformation). Eventuell ist der niedrigere Energieinhalt der verdrillten Konformation für diese höhere Bindungsaffinität mitentscheidend.

Um die übereinstimmenden konformativen Eigenschaften genauer zu analysieren, haben wir einen Liganden gewählt, für den genügend Datenmaterial vorliegt, um Aussagen über ihn sowohl in Komplexen mit Proteinen als auch niedermolekular im Kristall zu machen. Adenosin- und Guanosin-Monophosphat-Fragmente **4** werden häufig als Cofaktoren in Proteinen angetroffen. Weiterhin ist oft ihre Struktur im

**4**

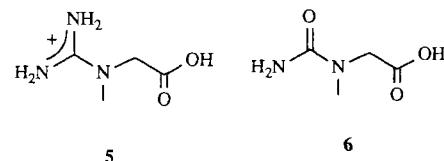
verdrillten Guanidinium- bzw. Carbamoyleinheit an Creatinase<sup>[155, 156]</sup>. Dieser Molekülteil ist in starke, ladungsunterstützte H-Brücken eingebunden. Für das isolierte Molekül würde man dagegen eine planare Form des  $\pi$ -Systems erwarten. Dennoch kann man aus den Kristallstrukturdaten der niedermolekularen Verbindungen Hinweise auf mögliche Verzerrungen weg von der Planarität in einer strukturierten Umgebung erhalten. In diesen Kristallen ist beispielsweise die Guanidiniumgruppe von Kreatin in starke, ladungsunterstützte H-Brücken eingebunden – ähnlich wie im Enzym. Quantenchemische Rechnungen zeigen, daß der Energieunterschied zwischen planarer und verdrillter Geometrie drastisch kleiner wird, wenn man das Molekül in einer Umgebung mit H-Brücken untersucht<sup>[157, 158]</sup>.

Diese polarisierenden Wechselwirkungen bewirken eine Umverteilung der Elektronendichte im Molekül. Dadurch werden die Barrieren für Rotationen um bestimmte Bindungen deutlich reduziert. Experimentelle Hinweise auf solche Umverteilungen der Elektronendichte zwischen isoliertem Zustand und unter den Bedingungen eines molekularen Umfelds stammen aus präzisen Beugungsexperimenten, die die Elektronendichtevertteilung in Kristallen analysierten<sup>[159]</sup>.

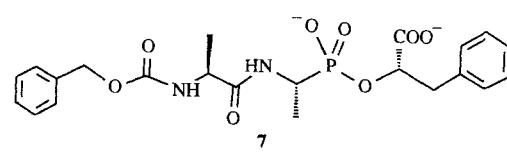
Einige peptidische Inhibitoren der Carboxypeptidase A wie **7** binden mit einer *cis*-orientierten Peptidbindung in der terminalen Carbamatgruppe<sup>[160]</sup>. Außer beim Prolinrest wird die *cis*-Konformation in nichtcyclischen Peptiden selten beobachtet<sup>[161]</sup>. Eine statistische Auswertung von Kristalldaten niedermolekularer Verbindungen beweist eine klare Bevorzugung der *trans*-Peptidbindung in Carbamaten. Trotzdem liegt ein nicht zu

takt zwischen der Phosphateinheit und dem basischen Stickstoffatom des Purinbausteins. Die gestreckte Konformation, die häufig in Proteinkomplexen angetroffen wird, tritt dort vermutlich aus folgendem Grund auf: Ein langes, polares Molekül kann in gestreckter Form seine polaren Gruppen besser exponentieren und so effizienter an die Oberfläche eines globulären Proteins binden. Dies verweist auf von der jeweiligen Umgebung abhängige, spezielle Bedingungen. Diese können eine Statistik verzerren.

Bei polaren Molekülen, die in ein Netz aus starken, gerichteten Wechselwirkungen, wie H-Brücken, eingebunden sind, kann die Umgebung einen bestimmenden Einfluß auf die Konformation haben. Als Konsequenz können Liganden in Proteinen mit einer Konformation vorliegen, die einer energetisch hochliegenden zu entsprechen scheint. „Energetisch hoch“ bezieht sich dabei auf die im isolierten Zustand angenommene Konformation. Beispielsweise binden das natürliche Substrat Kreatin **5** und der verwandte Inhibitor Carbamoyl-Sarkosin **6** mit einer



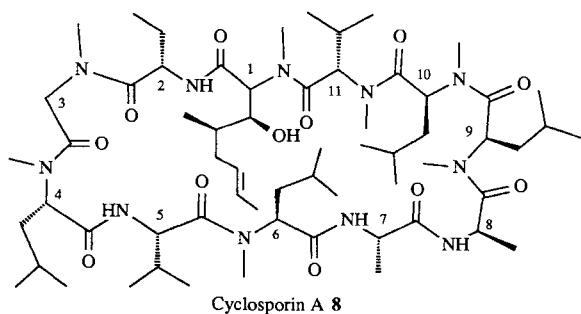
verdrillten Guanidinium- bzw. Carbamoyleinheit an Creatinase<sup>[155, 156]</sup>. Dieser Molekülteil ist in starke, ladungsunterstützte H-Brücken eingebunden. Für das isolierte Molekül würde man dagegen eine planare Form des  $\pi$ -Systems erwarten. Dennoch kann man aus den Kristallstrukturdaten der niedermolekularen Verbindungen Hinweise auf mögliche Verzerrungen weg von der Planarität in einer strukturierten Umgebung erhalten. In diesen Kristallen ist beispielsweise die Guanidiniumgruppe von Kreatin in starke, ladungsunterstützte H-Brücken eingebunden – ähnlich wie im Enzym. Quantenchemische Rechnungen zeigen, daß der Energieunterschied zwischen planarer und verdrillter Geometrie drastisch kleiner wird, wenn man das Molekül in einer Umgebung mit H-Brücken untersucht<sup>[157, 158]</sup>. Diese polarisierenden Wechselwirkungen bewirken eine Umverteilung der Elektronendichte im Molekül. Dadurch werden die Barrieren für Rotationen um bestimmte Bindungen deutlich reduziert. Experimentelle Hinweise auf solche Umverteilungen der Elektronendichte zwischen isoliertem Zustand und unter den Bedingungen eines molekularen Umfelds stammen aus präzisen Beugungsexperimenten, die die Elektronendichtevertteilung in Kristallen analysierten<sup>[159]</sup>.



vernachlässigender Anteil der Carbamate mit *cis*-Orientierung vor. Eine genauere Betrachtung der Strukturen liefert zumindest keine offensichtliche „intramolekulare“ Erklärung für diese Geometrie. Die Esterbindung in den Carbamaten tritt dagegen nahezu ausschließlich mit *trans*-Konformation auf.

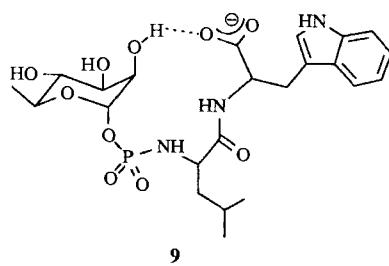
#### 4.1.3. Intramolekulare Wasserstoffbrückenbindungen in rezeptorgebundenen Konformationen

Die Bedeutung der Umgebung wird insbesondere offensichtlich, wenn man die mögliche Bildung von intramolekularen H-Brücken betrachtet. Geometricänderungen an Molekülen im isolierten Zustand, die zur Bildung von H-Brücken in der Lage sind, enden in lokalen Minima mit intramolekularen H-Brücken. Beispielsweise liefert eine für Vakuumbedingungen durchgeführte Konformationsanalyse an Zitronensäure nur Konforme mit intramolekularen H-Brücken<sup>[146]</sup>. In der Bindetasche von Citrat-Synthase werden aber nur intermolekulare H-Brücken mit dem Protein beobachtet. Allgemein scheint das Auftreten von intramolekularen H-Brücken in der gebundenen Konformation sehr selten zu sein. Normalerweise sind alle Gruppen, die H-Brücken eingehen können, auch an intermolekularen Kontakten zum Protein beteiligt. Im Kristall und in unpolaren Lösungsmitteln bildet das Undecapeptid Cyclosporin A **8** vier

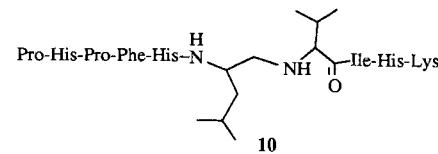


intramolekulare H-Brücken aus und organisiert sich zu einem  $\beta$ -Faltblatt<sup>[162, 163]</sup>. In der Bindetasche von Cyclophilin geht diese intramolekulär organisierte Faltung vollständig verloren<sup>[164]</sup>. Nahezu alle zuvor intramolekular abgesättigten Gruppen werden nach außen gekehrt, und der Ligand bildet nur noch intermolekulare H-Brücken mit dem Protein. NMR-Untersuchungen an polareren Derivaten des Cyclosporins in Wasser ergaben allerdings eine Konformation, die der im Protein zu entsprechen scheint<sup>[165]</sup>.

Trotzdem kennt man auch einige wenige Beispiele von Liganden mit intramolekularen H-Brücken in der Bindetasche. So bindet der potente Thermolysin-Inhibitor Phosphoramidon **9**



an das Enzym unter gleichzeitigem Vorliegen einer intramolekularen H-Brücke zwischen dem Carboxy-Terminus des Inhibitors und der C(2)-Hydroxygruppe des Rhamnoserings<sup>[166]</sup>. Diese Brücke hat zwei Auswirkungen: Einerseits fixiert sie den Inhibitor in der für die Bindung korrekten Konformation, andererseits bindet sie dessen freien Carboxy-Terminus, der nicht adäquat durch Kontakte mit dem Enzym abgesättigt wird, in eine H-Brücke ein. Im natürlichen Substrat des Thermolysins (Polypeptidkette) tritt an dieser Stelle keine freie, negativ geladene Carboxylatfunktion auf. Dementsprechend wird auch vom Enzym keine Gegengruppe bereitgestellt, die eine solche Carboxylateinheit spezifisch erkennen könnte. Ein anderes Beispiel ist die gebundene Konformation des peptidischen Endothiapepsin-Inhibitors H-142 **10**<sup>[167]</sup>. Dieser Inhibitor enthält das reduzierte



Isoster  $\text{H}_2\text{C}-\text{NH}_2$  anstelle der zu spaltenden Amidbindung. Insgesamt nimmt das Molekül eine gestreckte Konformation ein und bildet eine antiparallele Faltblattstruktur mit den Aminosäureresten des aktiven Zentrums aus. Dabei befindet sich das Isoster zwischen den Positionen P1 und P1', d. h. an der Stelle, an der die Carboxygruppen der beiden katalytisch aktiven Aspartate 35 und 215 zueinander stehen. Die beobachtete Bindungsgeometrie kann so interpretiert werden, daß die unter physiologischen Bedingungen protonierte Aminogruppe mit einem ihrer Protonen mit den beiden Carboxylatresten wechselwirkt. Dies ist vergleichbar mit dem Verhalten der OH-Gruppe in den Übergangzustands-analogen Statinresten. Das verbleibende NH-Proton wird in eine intramolekulare,  $\gamma$ -Turn-ähnliche H-Brücke mit der benachbarten Carbonylgruppe einbezogen. Ein solcher zweiter H-Brücken-Donor tritt während der Peptidspaltung nicht auf. Folglich stellt das Enzym auch keine zusätzliche Acceptorgruppe bereit. Vermutlich ist nur dann mit intramolekularen H-Brücken in der Bindetasche zu rechnen, wenn eine unausgeglichene Bilanz von H-Brücken-Donor- und -Acceptorgruppen zwischen Ligand und Rezeptor vorliegt oder wenn sie mithelfen, die erforderliche Bindungsgeometrie des Liganden zu fixieren.

#### 4.2. Ein schnelles Verfahren zum Generieren biologisch relevanter Konformationen

In den vorausgegangenen Abschnitten haben wir die konformativen Eigenschaften niedermolekularer Liganden im rezeptorgebundenen Zustand diskutiert. Offensichtlich beeinflußt die strukturierte Umgebung der Bindetasche die Geometrie des Liganden deutlich. Entsprechend haben die Konformation eines freien Liganden im Kristall oder ein für den isolierten Zustand ermitteltes lokales Minimum kaum Relevanz für die Verhältnisse im Protein. Wir konnten aber auch feststellen, daß die konformativen Präferenzen, die man für Torsionswinkelfragmente

in den Strukturen niedermolekularer Verbindungen im Kristall findet, in Einklang sind mit den Verhältnissen in der Proteinbindetasche. Jeder Ansatz, der Bindungsgeometrien von Liganden ohne explizite Berücksichtigung der Proteinumgebung berechnet, muß daher implizit deren Anwesenheit oder Einflüsse in Form von „Auswahlregeln“ berücksichtigen.

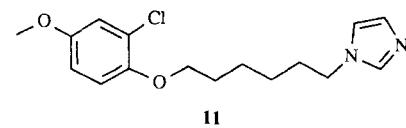
Um zu zeigen, daß die beschriebenen Torsionswinkelbibliotheken zur Vorhersage von Bindungsgeometrien verwendet werden können, haben wir diese Daten in ein Computerprogramm eingebunden<sup>[149]</sup>. Ein Ligand wird in dem Programm MIMUMBA zunächst hinsichtlich drehbarer Bindungen analysiert. Er wird hierbei in rigide Fragmente, die durch drehbare Bindungen getrennt sind, und flexible Ringbausteine zerlegt. Für die Generierung der Ringkonformationen greift das Programm auf eine interne Datenbank mit abgespeicherten Mustern möglicher Ringkonformationen zu. Diese wurden aus Kristallstrukturdaten zusammengestellt und mit einer relativen Energiebewertung versehen. Konformativ Multiplizität als Folge einer Pseudorotation oder Ringinversion wird für jeden Elementarring des Liganden berücksichtigt<sup>[168]</sup>.

Die Torsionswinkel um die drehbaren Bindungen in den offenkettigen Teilen werden entsprechend der konformativen Präferenzen verwandter Torsionsfragmente eingestellt<sup>[149]</sup>. Auch hier erfolgt eine Bewertung der Fragmente hinsichtlich ihrer relativen Energie. Ähnlich wie bei den cyclischen Molekülteilen baut das Programm das Gesamtmoletkül aus den individuellen Bausteinen auf. Hierbei werden wieder bevorzugt die Torsionswinkelwerte eingestellt, die in Kristallen niedermolekularer Verbindungen häufiger beobachtet werden. Beim Zusammenbau der Einzelfragmente in ihren vielfältigen Konformationen werden die Energiebeiträge aufsummiert. Eine „Energiestrafe“ wird angewendet, wenn Fragmente überlappen. In einer anschließenden Geometrieeoptimierung, die im Torsionswinkelraum erfolgt, beseitigt das Programm eventuell auftretende räumliche Überlappungen. In diesem Schritt werden nur van-der-Waals- und Torsionswinkelpotentiale verwendet. Die zweiten leiten sich aus den statistischen Häufigkeitsverteilungen ab. Hierdurch wird sichergestellt, daß während der Minimierung die individuellen Torsionswinkelwerte so nahe wie möglich an den experimentell am häufigsten beobachteten bleiben<sup>[149]</sup>. Das Verfahren ist schnell: Für jedes erzeugte Konformer werden 1–2 s auf einer Einprozessor-UNIX-Workstation benötigt.

Um zu überprüfen, wie gut die Minimumsstruktur eines Liganden aus diesem Ansatz mit der Struktur des proteingebundenen Liganden übereinstimmt, wurden die Geometrien von 63 Liganden (mit 3–45 drehbaren Bindungen) ausgehend von der im Proteinkomplex gefundenen Konformation in das nächste lokale Minimum des MIMUMBA-Kraftfelds relaxiert<sup>[141]</sup>. Der visuelle Vergleich von experimentellen und minimierten Strukturen ergab, daß sich die Strukturen bei der Minimierung in der Regel kaum ändern. Im Mittel findet man eine Standardabweichung für alle Atome von 0.07 Å pro drehbarer Bindung (d. h. bei zehn drehbaren Bindungen 0.7 Å).

Eine genauere Analyse der Fälle mit den größten Abweichungen ergab, daß in den experimentell ermittelten Strukturen nichtbindende interatomare Kontakte unter 1.5 Å vorlagen. Solche mit offensichtlichen Unzulänglichkeiten in die Elektronendichte eingepaßten Liganden müssen bei einer Strukturminimie-

zung kurze van-der-Waals-Kontakte abbauen und laufen daher zwangsläufig von den Startgeometrien weg. Ein Beispiel (PDB-Code: 1HRI) ist die antiviral wirksame Verbindung **11**, die an



das Hüllprotein des humanen Rhinovirus bindet. Im Komplex mit dem Protein wird es mit einer ekliptischen Konformation entlang der aliphatischen Kohlenwasserstoffkette angegeben. Weiterhin liegt ein unwahrscheinlicher Torsionswinkel für ein *ortho*-substituiertes Phenoxyfragment vor (die Methyengruppe am Sauerstoff orientiert sich zum *ortho*-ständigen Chloratom)<sup>[169]</sup>. Bei der Minimierung driftet die Struktur von der experimentellen weg. Ein anderes lokales Minimum konnte gefunden werden, in dem die kurzen Kontakte und unwahrscheinlichen Torsionswinkel vermieden werden. Diese Konformation sollte aber genauso gut in die Elektronendichte der Komplexstruktur passen (Abb. 7). Um die Relevanz der mit

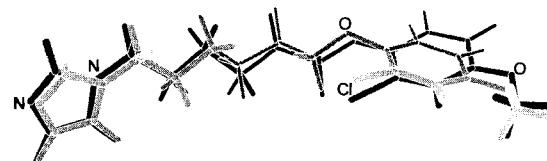


Abb. 7. Grau: Konformation der antiviral wirksamen Verbindung **11**, wie sie bei der Strukturbestimmung durch Einpassung in die Elektronendichte der Komplexstruktur erhalten wurde. Schwarz: Eine alternative Konformation, die ungünstige Torsionswinkel (Kette und *ortho*-substituiertes Phenoxyfragment) vermeidet.

MIMUMBA generierten Konformationen zu überprüfen, wurden für eine Teilmenge von 23 Liganden mit bis zu 15 drehbaren Bindungen multiple Konformationen (zwischen 6 und 150) erzeugt. Im Mittel trat eine Abweichung von 0.1 Å pro drehbarer Bindung zwischen dem experimentell ermittelten und dem am besten dazu passenden berechneten Konformer auf. Wenn man die generierten Konformere zufällig miteinander überlagert und dabei nur die Molekülschwerpunkte zur Deckung bringt, ergibt sich eine mittlere Standardabweichung von 0.3 Å pro drehbarer Bindung<sup>[141]</sup>.

#### 4.3. Die Fähigkeiten von Molekülen zur molekularen Erkennung und ihre gegenseitige Ähnlichkeit

In der Wirkstoffsuche werden Leitstrukturen gezielt modifiziert, um die Bindungsaffinität zu steigern und die Selektivität zu verbessern. Rezeptorbindung ist ein molekularer Erkennungsprozeß, der von den Eigenschaften beider Partner abhängt. Diese bestimmen die Wechselwirkungen der funktionellen Gruppen des Liganden mit den Aminosäureresten des Proteins. Sie definieren die relative Lage des Liganden in der Bindetasche („Bindungsmodus“). Einmal unveränderte Eigenschaften des Rezeptors vorausgesetzt, stellen sich die Fragen, ob man innerhalb eines Satzes strukturell verwandter Liganden die

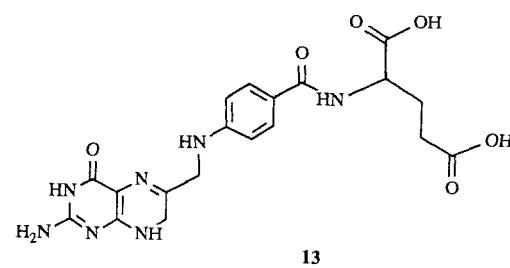
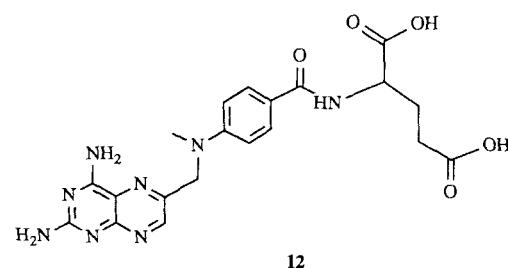
Bindungsmoden mit den Unterschieden im molekularen Erkennen korrelieren kann und ob man eine solche Beziehung zum Vergleich und zur Vorhersage von Bindungsmoden verwenden kann.

Sterische und elektrostatische Komplementarität der Liganden und der Bindetasche ist die Voraussetzung für einen erfolgreichen Erkennungsprozeß. Gestalt und elektronische Eigenschaften werden durch die Elektronendichteverteilung bestimmt. Sie definiert auch die H-Brücken-Donor- und -Acceptor-eigenschaften, die Hydrophobie und die Polarisierbarkeit. Alle diese Kriterien definieren die Erkennungseigenschaften eines Liganden. Sie lassen sich verwenden, um Moleküle zu vergleichen und ihre Ähnlichkeit zu messen. Ähnlichkeiten im Bindeverhalten werden stets in bezug auf einen vorgegebenen Rezeptor betrachtet. Dieser ist eine relative Bezugsgröße; absolute Ähnlichkeiten lassen sich deshalb auf diesem Weg nicht definieren. Trotzdem soll im folgenden davon ausgegangen werden, daß ähnliche Moleküle auch in ähnlicher Weise an einen Rezeptor binden. – Ist diese Annahme gerechtfertigt?

#### 4.3.1. Beobachtete Liganden-Bindungsmoden im gleichen Protein

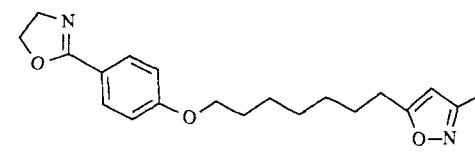
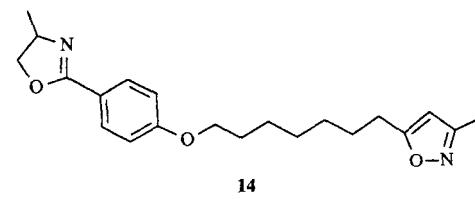
Wieder wollen wir uns die experimentell bestimmten Protein-Ligand-Komplexe vornehmen, um dieser Frage nachzugehen. In den letzten Jahren sind zunehmend strukturanalytische Arbeiten bekannt geworden, in denen ein bestimmtes Protein mit einer Reihe von Liganden kristallisiert wurde. Für viele dieser Komplexe bewiesen die Untersuchungen, daß Liganden mit verwandten Gerüsten auch ähnliche Bereiche der Bindetasche ausfüllen (z. B. bei den Proteinen  $\alpha$ -Lytic-Protease<sup>[170]</sup>, Endothiapsin<sup>[171]</sup>, Renin<sup>[172]</sup> und HIV-Protease<sup>[173-175]</sup>). So wurde über die Strukturen von Thrombinkomplexen mit vier verschiedenen Inhibitoren berichtet, in denen sich kein einziger Aminosäurerest um mehr als 1 Å in der Position unterscheidet. Einige Umlagerungen in der Größenordnung von 0.5–1 Å wurden beobachtet, die aber eindeutig mit einer Anpassung des Proteins an den Inhibitor erklärt werden können<sup>[176]</sup>. Von HIV-Protease-Inhibitor-Komplexen konnten fünf Kristallformen gefunden werden. Unabhängig von der speziellen Kristallform und vom vorliegenden Inhibitor bleibt die Enzymstruktur innerhalb einer Grenze von 0.7 Å erhalten. Die Konservierung der Struktur gilt auch für das aktive Zentrum<sup>[177]</sup>. Diese Beispiele legen nahe, daß Moleküle mit gleichen oder verwandten Gerüsten auch ähnliche Bindungsmoden aufweisen. Dennoch ist eine bemerkenswerte Zahl an Strukturen bekannt, in denen die Verhältnisse komplizierter sind. Im folgenden wollen wir einige davon beschreiben, um so die auftretenden Probleme zu erläutern.

Der Inhibitor Methotrexat (MTX **12**) und das natürliche Substrat Dihydrofolat (ionische Form der Folsäure, DHF **13**) werden beide vom Enzym Dihydrofolat-Reduktase erkannt<sup>[150, 178]</sup>. Betrachtet man nur die heterocyclischen Ringe, so mag man geneigt sein, einen direkten Atom-für-Atom-Vergleich der Moleküle vorzunehmen. Verwendet man allerdings die H-Brücken-Eigenschaften als Vergleichskriterium ( $pK_a$ -Argumente legen nahe, daß **12** an N1 protoniert ist<sup>[178]</sup>) und vernachlässigt die zugrundeliegenden Molekülgerüste, so stellt man fest, daß eine Proteinumgebung bei der aus einem solchen Atom-für-Atom-Vergleich resultierenden Orientierung recht unterschiedliche H-Brücken-Muster zu spüren bekommt (Abb. 8 oben). Dreht



man den Heterocycle in **13** um 180° um die Bindung zur Seitenkette, so weisen die beiden Molekületeile nicht mehr die optimale räumliche Deckung auf. Doch das H-Brücken-Muster zeigt nun eine viel größere Ähnlichkeit (Abb. 8 unten). Die Bindungsmoden beider Verbindungen sind aus kristallographischen Studien bekannt<sup>[178, 179]</sup>. Sie beweisen, daß die Überlegungen anhand der Ähnlichkeiten in den H-Brücken-Eigenschaften zu korrekten Rückschlüssen führen<sup>[178]</sup>. Ein Vergleich der elektrostatischen Eigenschaften führt zum gleichen Ergebnis.

Ziemlich überraschende Bindungsmoden wurden für zwei antiviral wirksame Verbindungen (**14**, **15**) beobachtet. Diese haben



sehr ähnliche Molekülgerüste und binden trotzdem in umgekehrter Ausrichtung in einer Furche an der Oberfläche des humanen Rhinovirus<sup>[180]</sup>. Betrachtet man ihre Raumerfüllung und ihre elektrostatischen Felder, so ist näherungsweise eine Spiegelsymmetrie zu erkennen<sup>[181]</sup>. Abbildung 9 zeigt die ähnliche Form der elektrostatischen Potentiale bei der „regulären“ bzw. „umgekehrten“ Orientierung in der Proteinbindetasche.

Ein anderes Beispiel zweier Liganden mit sehr ähnlichen Bindungsgerüsten und Bindungsgeometrien, die sehr weit von einer einfachen 1:1-Atomzuweisung abweichen, sind *N*-(3-Phenyl-

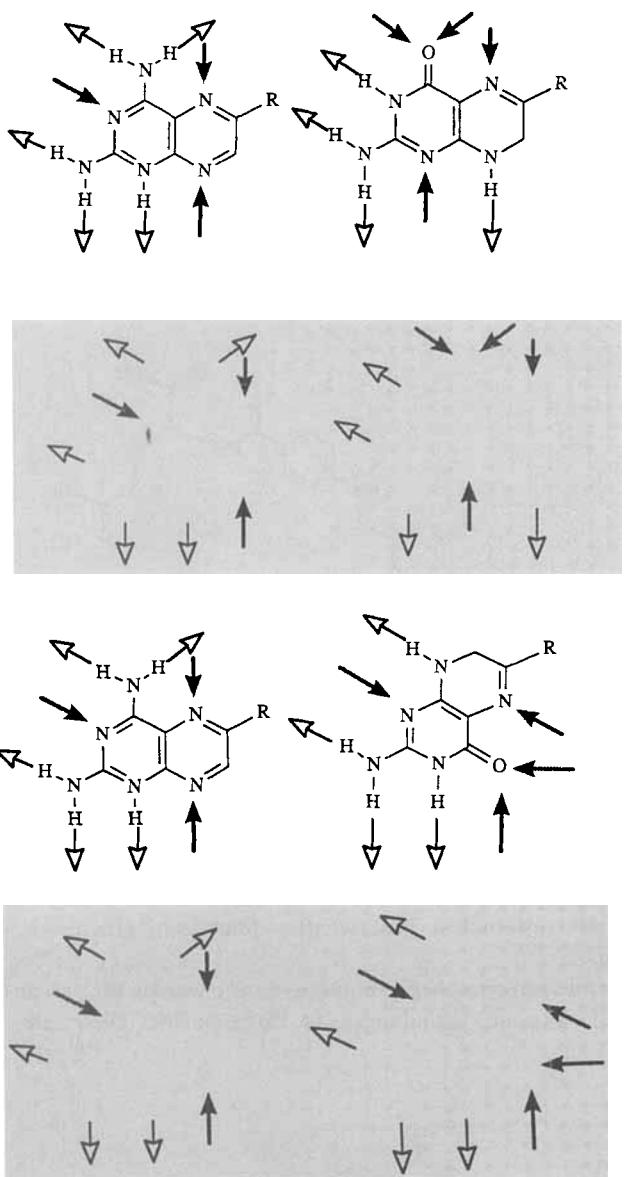


Abb. 8. Vergleich der heterocyclischen Bausteine der beiden Liganden Methotrexat 12 und Dihydrofolat (ionisierte Form von 13). Bei einer direkten Atom-für-Atom-Überlagerung beider Liganden (oben) erzielt man nur eine geringe Ähnlichkeit in den H-Brücken-Mustern (zum Liganden orientierte Pfeile entsprechen H-Brücken-Acceptor-, von ihm wegweisende H-Brücken-Donoreigenschaften). Eine Änderung der Konformation von 13 durch Drehung des heterocyclischen Teils um die Bindung zur Seitenkette (unten) ergibt eine viel überzeugendere Ähnlichkeit in den H-Brücken-Eigenschaften.

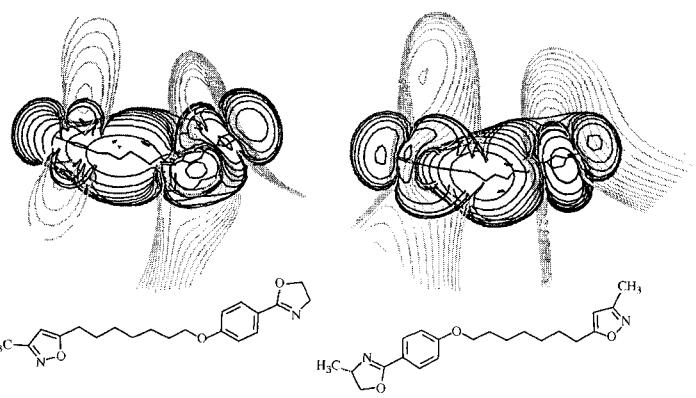


Abb. 9. Zwei strukturell verwandte, antiviral wirksame Verbindungen (14, 15) in ihren kristallographisch ermittelten Bindungsorientierungen. Das elekrostatische Potential, berechnet mit AM1-Ladungen, ist in Form von Isokonturflächen dargestellt (grau/hellgrau/schwarz: 4.14/0/-4.14  $\text{kJ mol}^{-1}$ ). Auf den ersten Blick sind die Potentiale beider Moleküle annähernd spiegelsymmetrisch bezüglich der langen Moleküllachse. Dies könnte eine mögliche Erklärung dafür sein, daß die beiden Moleküle in der Bindetasche in umgekehrter Orientierung beobachtet werden.

propionyl)phenylalanin **16** und *N*-(Benzylloxycarbonyl)phenylalanin **17**. Beide inhibieren die Zinkprotease Thermolysin<sup>[18,21]</sup>. Sie bestehen aus zwei hydrophoben terminalen Gruppen und einem zentralen polaren Teil, der H-Brücken und eine koordinative Bindung zum Zink ausbilden kann. Im Proteinkomplex besetzen die endständigen Benzolringe in vergleichbarer Weise zwei hydrophobe Taschen. Verbindung **17** koordiniert an das Zink über die Säurefunktion, während **16** mit der Carbonylgruppe an das Metallion bindet (Abb. 10). Zusätzlich stehen die sich gegenüberliegenden Reste Ala 113 und Arg 203 als Bindungspartner zur Verfügung. In **17** ist die zentrale Amidfunktion in H-Brücken zu beiden Resten eingebunden, allerdings wird die zu Arg 203 über ein Wassermolekül vermittelt. In **16** interagiert die Carbonsäureeinheit direkt mit Arg 203, und zusätzlich wird eine H-Brücke vom Amidstickstoff zu Ala 113 gebildet.

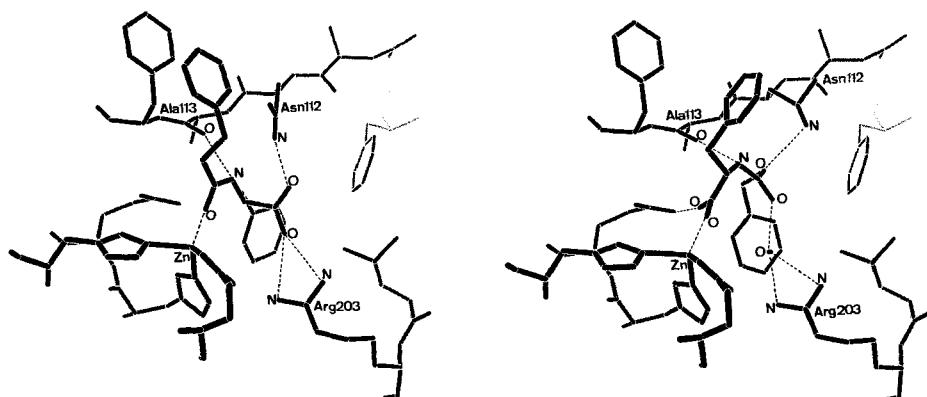


Abb. 10. Kristallographisch ermittelte alternative Bindungsmodi der beiden, sich nur in einem Atom unterscheidenden Thermolysin-Inhibitoren **16** (links) und **17** (rechts). In **17** ist die zentrale Amidfunktion an H-Brücken zu Ala 113 und Arg 203 beteiligt, und die Carbonsäureeinheit komplexiert das Zink-Ion. Dagegen koordiniert **16** mit der Carbonylgruppe der Amidbindung an das Metallion, und seine Carbonsäureeinheit bildet eine direkte H-Brücke zu Arg 203 und zusätzlich eine zu Asn 112. Der Amidstickstoff geht eine H-Brücke mit Ala 113 ein.

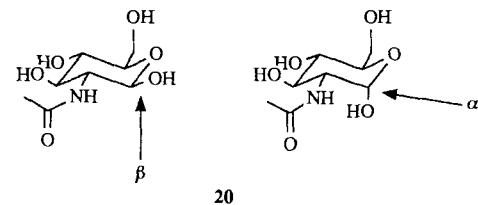
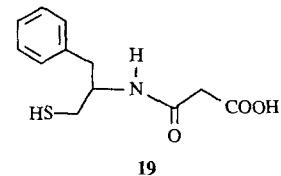
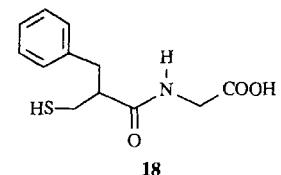
### 4.3.2. Ähnliche, alternative und multiple Bindungsmoden

Um Ligandenorientierungen in der Bindetasche eines Proteins zu beschreiben, werden in der Literatur Begriffe wie „ähnlicher“, „alternativer“ und „multipler“ Bindungsmodus verwendet. Unserer Meinung nach werden diese Begriffe nicht einheitlich verwendet, und eine saubere Definition ist erforderlich. Verwandte Moleküle mit ähnlichen Erkennungseigenschaften (siehe oben), die mit den gleichen funktionellen Gruppen eines Proteins wechselwirken und dabei auch weitgehend die gleichen Bindungsregionen besetzen, zeichnen sich durch „ähnliche“ Bindungsmoden aus (z. B. MTX **12** und DHF **13**). Wenn unterschiedliche Aminosäurereste für die Bindung zwischen Ligand und Protein verwendet oder andere funktionelle Gruppen des Liganden für die Wechselwirkungen eingesetzt werden, liegen „alternativer“ Bindungsmoden vor (z. B. in Thrombin<sup>[182, 183]</sup>, im Thyroid-Bindeprotein<sup>[184]</sup>, in Elastase<sup>[185, 186]</sup> und in P450-Campher<sup>[187]</sup>). Selbst geringe Abwandlungen der Molekültopologie können zu gravierenden Änderungen der konformativen und damit der Erkennungseigenschaften führen. Augenblicklich ist unser Verständnis der Ähnlichkeit von flexiblen Molekülen noch nicht ausreichend, um eindeutig Änderungen dieser Eigenschaften mit Änderungen in der Molekültopologie zu verknüpfen.

Unseres Erachtens sollte der Begriff „multipler Bindungsmodus“ nur dann verwendet werden, wenn mehr als eine Orientierung des gleichen Liganden in der Bindetasche experimentell nachgewiesen wurde. Ein Bezug zu Strukturen der niedermolekularen Verbindungen im Kristall bietet sich an. Dort sind Besetzungsfehlordnungen ein häufiges Phänomen. Leider wurde nur in ganz wenigen Fällen der genaue Grund für solche Fehlordinungen aufgeklärt. Es kann sich entweder um eine zufällige Fehlordnung (von Zelle zu Zelle) oder um eine Domänen-überspannende Fehlordnung von regelmäßig gepackten Mosaikblöcken handeln. Der erste und vermutlich viel seltener Fall deutet an, daß ein bestimmter Molekülbaustein von seiner Umgebung in zwei oder mehr („multiplen“) Orientierungen erkannt werden kann. Es ist wahrscheinlich, daß auch in Proteinen die „multiplen“ Bindungsmoden unter den eine Erkennung steuernden Effekten eher die Ausnahme als die Regel sind. Läßt man *p*-Guanidinobenzoat aus einer nahezu gesättigten Lösung in Trypsinkristalle eindiffundieren (engl. soaking), so kann man multiple Bindungsmoden nachweisen<sup>[188]</sup>: Zwei Orientierungen wurden in die Elektronendichte (1.8 Å Auflösung) der Spezifitätstasche eingepaßt. Eine davon ergibt die übliche zweizähnige H-Brücke zwischen der Guanidinumgruppe und Asp 189. Eine dritte Orientierung mit der Guanidiniumgruppe in Richtung auf Cys 50 und Lys 60 wurde in der Nähe von His 57 angegeben. In allen Fällen befindet sich die Carboxylatgruppe des Inhibitors in der Nähe des  $\gamma$ -O-Atoms von Ser 195. Ebenfalls multiple Bindungsmoden wurden in Cymotrypsin<sup>[189]</sup>, HIV-Protease<sup>[190]</sup> und *para*-Hydroxybenzoat-Hydrolase<sup>[191]</sup> beobachtet. Einige Vorsicht ist allerdings bei der Zuordnung von multiplen Bindungsmoden angebracht, denn in solchen Fällen kann der Ligand ungeordnet vorliegen, oder es können nur partiell populierte Orientierungen auftreten. Folglich muß eine weniger klar definierte Elektronendichte interpretiert werden.

Moleküle können trotz strukturell unterschiedlicher Bindungsgerüste in sehr ähnlicher Bindungsgeometrie mit dem Protein in Wechselwirkung treten (ähnliche Bindungsmoden).

Die Inhibitoren Thiorphan **18** und retro-Thiorphan **19** hemmen beide die Metalloprotease Thermolysin<sup>[192]</sup>, und beide binden mit den gleichen funktionellen Gruppen an die gleichen Reste des Proteins. Auch bei  $\alpha$ - und  $\beta$ -*N*-Acetylglucosamin **20** findet man ganz ähnlich die Erkennung durch eine Peptidgruppe in reverser Ausrichtung, und zwar mit Lysozym<sup>[193]</sup>. Die *N*-Acetyl-Seitenkette der bezüglich C2 spiegelbildlich konfigurierten Verbindungen wird jeweils analog von Ala 107 und Asn 59 er-



kannt (Abb. 11). Die weiteren Erkennungseigenschaften der beiden Formen sind aber so verschieden, daß die beiden Isomere unterschiedliche Regionen der Bindetasche besetzen (alternative Bindungsmoden): Die  $\alpha$ -Form ist in eine H-Brücke zu Trp 108 eingebunden, das  $\beta$ -Isomer wechselwirkt mit Trp 62 und Trp 63.

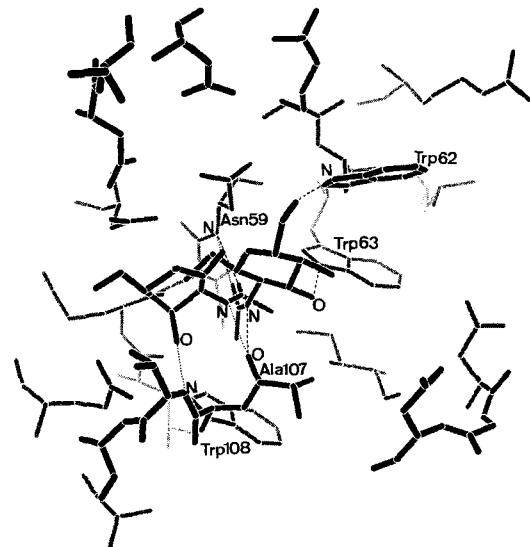
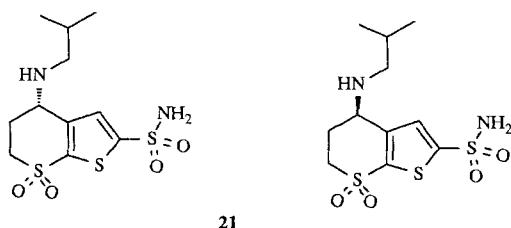


Abb. 11. Kristallographisch bestimmte Bindungsgeometrien von  $\alpha$ - und  $\beta$ -**20** im Komplex mit Lysozym. Beide Liganden sind zusammen gezeigt. Die  $\beta$ -Form orientiert sich nach rechts und bildet H-Brücken (gestrichelt) zu Trp 62 und Trp 63. Mit seiner Amidgruppe interagiert der Ligand mit der Carbonylgruppe von Ala 107 und der Hauptketten-NH-Funktion von Asn 59. Die  $\alpha$ -Form orientiert sich nach links und bildet die gleichen Wechselwirkungen über ihre Amidgruppe mit Lysozym aus (gepunktet). Zusätzlich bildet sie eine H-Brücke zur Hauptketten-NH-Funktion von Trp 108.

Lysozym verfügt über eine ziemlich große Bindetasche, die deutlich größere Moleküle als **20** aufnehmen kann. Im Lysozymkomplex von Tri-*N*-acetylchitotriose, (*GlcNAc*)<sub>3</sub>, bindet der erste Zuckerbaustein ganz analog wie der Pyranosering in der  $\beta$ -Form<sup>[194]</sup>. Die Region, die das  $\alpha$ -Isomer von **20** einnimmt, wird dort durch fünf Wassermoleküle besetzt.

Wegen der Händigkeit von Proteinstrukturen sind unterschiedliche Bindungsmoden für chirale Verbindungen nicht überraschend. Dennoch lässt sich auch das Gegenteil beobachten. Beispielsweise unterscheiden sich die Affinitäten der enantiomeren Sulfonamide **21** für humane Carboanhydrase um den Faktor 100<sup>[195]</sup>. Wie die Proteinkristallographie allerdings beweist, binden die beiden Liganden in der gleichen Region der Bindetasche (ähnliche Bindungsmoden).

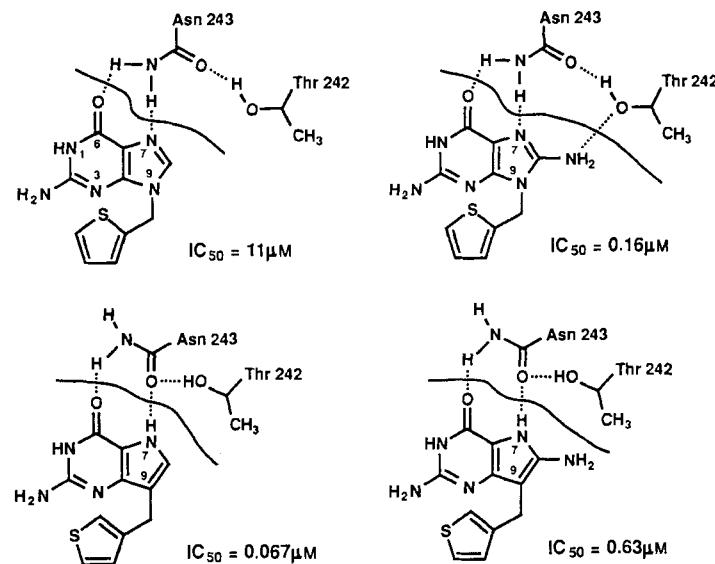


#### 4.3.3. Ligandeninduzierte Anpassung der Bindetasche

Bisher haben wir nur die Eigenschaften der Liganden betrachtet und angenommen, das Protein sei starr. Aber Ligandenbindung ist ein Erkennungsprozess zwischen flexiblen Partnern. Daher kann die Ligandenbindung auch Veränderungen der räumlichen Struktur des Proteins induzieren. In einer Reihe von Fällen konnte die Proteinstruktur sowohl mit als auch ohne Ligand bestimmt werden. Diese Untersuchungen geben eine Vorstellung davon, in welcher Größenordnung sich solche Konformationsänderungen im Protein abspielen. Proteine wie Trypsin weisen eine sehr starre Bindetasche auf<sup>[196]</sup>. In anderen Fällen bewegen sich aber auch Teile des Proteins (z. B. eine Schleife) infolge der Ligandenbindung<sup>[171, 172, 197]</sup>. Glücklicherweise sind diese Änderungen weitgehend unabhängig vom Liganden (z. B. unveränderte Orientierung der Aminosäurereste in Thrombin<sup>[176]</sup>, HIV-Protease<sup>[177]</sup>, Thermolysin<sup>[198]</sup>, Renin<sup>[172]</sup> und Endothiapepsin<sup>[170]</sup>). In der kubischen Kristallform von nichtinhibiertem Renin treten zwei unabhängige Moleküle in der asymmetrischen Einheit auf<sup>[172]</sup>. Beide unterscheiden sich wegen unterschiedlicher Kristallkontakte in der Konformation. Sie lassen sich als „offene“ und „geschlossene“ Form bezeichnen und unterscheiden sich durch eine Rotation der C- gegen die N-terminale Domäne um eine gedachte Achse, die nahe dem aktiven Zentrum verläuft. Interessanterweise ist die geschlossene Form der Struktur des inhibierten Renins in einer tetragonalen Kristallform konformativ viel ähnlicher. Die Konformationsänderungen, die durch die Kristallkontakte hervorgerufen werden, sind offenbar sehr ähnlich zu denen, die durch die Ligandenbindung ausgelöst werden. Für das strukturell verwandte Endothiapepsin führte die Auswertung von 15 Protein-Ligand-Komplexen zu 2 Zuständen des Enzyms<sup>[171]</sup>. Aus diesen Daten ist keine klare Korrelation etwa mit der Zusammensetzung des Inhibitors oder mit den Kristallkontakten abzulesen. Vermutlich sind viele der bei der Ligandenbindung

beobachteten Konformationsänderungen des Proteins mit Bewegungen in Einklang, die für die Funktion des Proteins notwendig sind. Deutliche Änderungen im aktiven Zentrum zwischen Apo- und komplexierter Form wurden beispielsweise für HRV-14<sup>[180]</sup> berichtet.

Ein instruktives Beispiel für die Bedeutung dieser induzierten Anpassung ist die Bindung von Guanin an das aktive Zentrum der Purinnucleosid-Phosphorylase<sup>[199]</sup>. Dieser Ligand bildet über N7 und den C6-Sauerstoff H-Brücken zur Seitenkette von Asn 243 (Schema 3). Ein einfacher, auf den ersten Blick als isoster anzunehmender Ersatz von N durch C in Position 9 erweist sich als folgenreicher Austausch: In 7-Stellung wird aus



Schema 3. Bindungsmoden von vier Liganden für die Purinnucleosid-Phosphorylase. Der N/C-Austausch an der 9-Position des Guaninbausteins führt zu einer unerwarteten induzierten Anpassung: In 7-Stellung wird aus einem H-Brücken-Acceptor ein H-Brücken-Donor, und die Seitenkette von Asn 243 bewegt sich zur Seite, um andere Reste dem Liganden zu präsentieren. Diese induzierte Anpassung macht verständlich, warum nur beim Aza-Analogon (oben) eine zusätzliche  $\text{NH}_2$ -Gruppe in der 8-Position zu einer Wirkungssteigerung führt. Im Desazaderivat (unten) tritt eine abstoßende Wechselwirkung zwischen der  $\text{NH}_2$ -Gruppe und der Methylgruppe des benachbarten Threonins auf.

einem H-Brücken-Acceptor ein H-Brücken-Donor. Überraschenderweise weist 9-Desazaguanin trotz gleicher Bindungsgeometrie eine höhere Affinität als Guanin auf. Der Grund dafür ist in einer Umorientierung des benachbarten Asn-Rests zu suchen, der sich zur Seite dreht und nun anstelle seiner zweizähnigen  $\text{NH}_2$ -Gruppe eines seiner  $\text{NH}$ -Protonen und seine  $\text{C}=\text{O}$ -Gruppe dem Liganden zur Wechselwirkung zur Verfügung stellt. Diese induzierte Anpassung wäre wohl kaum ohne Kenntnis der Strukturen der Protein-Ligand-Komplexe vorhergesagt worden.

#### 4.3.4. Bindungsmoden in unterschiedlichen Spezies und bei unterschiedlichen pH-Werten

Die Bindungsgeometrien können für Enzyme aus unterschiedlichen Spezies differieren. Wie bereits erwähnt, bindet Trimethoprim **1** an Dihydrofolat-Reduktase aus Hühnerleber in einer schmetterlingsförmigen Konformation, während im bak-

teriellen Enzym aus *E. coli* eine verdrillte Konformation gefunden wird<sup>[150]</sup>. Dieses Beispiel mag als Warnung dienen, allzu unkritisch die Bindungsverhältnisse von einem Protein auf ein anderes (z. B. ein modelliertes Homologes) zu übertragen.

Die Bindungsmoden von Molekülen hängen auch vom Protomerzustand der Aminosäurereste im aktiven Zentrum ab. Ein einfaches Beispiel, die pH-abhängige Bindung des Carbonat-Ions an Creatinase, illustriert diese Einflüsse<sup>[156]</sup>. Zwei Kristallformen des Enzyms mit einem Carbonat-Ion und einem Wassermolekül in der Bindetasche konnten bei den pH-Werten 5.4 und 7.4 strukturell charakterisiert werden. Die Gastmoleküle besetzen unterschiedliche Positionen in diesen Strukturen und verweisen damit auf pH-abhängige Bindungsmoden. Bei niedrigem pH-Wert wird das Anion, vermutlich als Bicarbonat, von zwei protonierten Glu-Resten gebunden, und das Wassermolekül vermittelt ein H-Brücken-Netz zu den gegenüberliegenden Arg-Resten. Bei hohem pH-Wert bindet das Anion, vermutlich immer noch als Bicarbonat, mit umgekehrter Orientierung. Es steht jetzt gegen die beiden Argininreste, während das Wassermolekül eine Verbrückung zu den Glutamatresten vornimmt.

Diese Beobachtung hat auch Konsequenzen für das Design von Enzyliganden mit maßgeschneiderten Erkennungseigenschaften. Phosphastatin-Analoga wurden als potente Inhibitoren der Aspartyl-Protease Pepsin beschrieben. Sie sind aber nur schwache Inhibitoren von Renin, einer anderen Aspartyl-Protease. Dieser Unterschied kann, zumindest teilweise, auf die unterschiedlichen pH-Optima zurückgeführt werden, bei denen beide Enzyme arbeiten. Pepsin operiert als Verdauungsenzym in stark saurem Medium, Renin dagegen versieht seinen Dienst unter Neutralbedingungen. Im zweiten Fall muß man annehmen, daß die Hydroxygruppen am Phosphor der Phosphastatin-Analoga weitgehend deprotoniert vorliegen und daher nicht geeignet sind, an die katalytisch aktiven Aspartatreste des aktiven Zentrums von Renin zu binden<sup>[200]</sup>.

#### 4.4. Automatische Einpassung von Molekülen in Bindetaschen durch Vergleich ihrer Erkennungseigenschaften

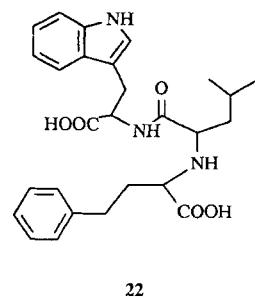
Die im letzten Abschnitt vorgestellten experimentellen Beispiele zeigen, daß die Beziehung zwischen dem Gerüst der Liganden, ihren Bindungsmoden und ihren Erkennungseigenschaften recht komplex ist. Trotzdem wollen wir zu unserer eingangs gestellten Frage zurückkehren und prüfen, in welchem Umfang man Bindungsmoden anhand der Erkennungseigenschaften beschreiben und vorhersagen kann. Beim Versuch, ein räumliches Maß für den Unterschied oder die Ähnlichkeit von Liganden abzuleiten, müssen wir uns in Erinnerung rufen, daß Bindungseigenschaften in bezug auf einen bestimmten Rezeptor definiert werden. Daher ist jedes Ähnlichkeitsmaß ein relatives Maß.

Rechenverfahren, die dieses Problem angehen, können mehrere Möglichkeiten für das Einpassen eines neuen Liganden in die Bindetasche eines Proteins vorschlagen<sup>[181]</sup>. Liegen keine Angaben über die Struktur des Rezeptors vor, so können diese Verfahren zur Überlagerung der Liganden genutzt werden. Die erhaltene Einpassung ist eine Voraussetzung für vergleichende Feldanalysen (CoMFA-Methode<sup>[201]</sup>). Diese Methode quantifiziert relative Unterschiede zwischen Liganden, die für Verän-

derungen der Bindungsaffinitäten ursächlich sind. Mehrere Verfahren zur Berechnung dieser Überlagerungen wurden beschrieben<sup>[202–209]</sup>. Wir haben die ursprünglich von Kearsley und Smith entwickelte Prozedur SEAL<sup>[209]</sup> erweitert. Es können nunmehr sterische, elektrostatische, hydrophobe und H-Brücken-Eigenschaften verglichen werden<sup>[141, 210]</sup>. Um die Ähnlichkeit von Molekülen zu quantifizieren, wird ihre Gestalt durch einen Satz räumlicher Gauß-Funktionen angenähert. Diese Funktionen werden an den Atompositionen lokalisiert und für jedes Molekül mit einem Vektor physikochemischer Eigenschaften verknüpft. Diese Eigenschaften stammen aus atombasierenden Deskriptoren. Um die Ähnlichkeit von zwei Molekülen im Raum zu berechnen, wird das Skalarprodukt der Eigenschaftsvektoren ausgewertet und mit dem Überlappungsintegral der Gauß-Funktionen gewichtet. Anhand dieser Größe versucht man, die räumliche Ähnlichkeit zu maximieren. Dazu wird ausgehend von Zufallspositionen die Überlagerung zweier Moleküle durch Minimierung der Abstände zwischen Molekülteilen ähnlicher physikochemischer Eigenschaften optimiert. Das Verfahren benötigt keine vorab definierten Paare äquivalenter Zentren in den Molekülgerüsten. Daher können auch strukturell stark voneinander abweichende Bindungsgerüste verglichen und überlagert werden.

Die Überlagerungsfunktion wurde auf die Daten von 184 Ligandenpaaren angewendet, die jeweils an das gleiche Protein binden<sup>[141]</sup>. Ihre Bindungsmoden und damit ihre relativen strukturellen Überlagerungen sind aus kristallographischen Untersuchungen bekannt. Für den Testdatensatz konnten die experimentell beobachteten Überlagerungen in einem Drittel der Fälle mit einer Standardabweichung (rms-Abweichung) unter 0.7 Å reproduziert werden; bei 51 % lag sie unter 1 Å und bei fast 90 % unter 2 Å. Berücksichtigt man die gegebenen Genauigkeitsgrenzen von ca. 0.7 Å für eine experimentelle Überlagerung von Protein-Ligand-Komplexen, so scheint die erzielte Übereinstimmung recht überzeugend<sup>[210]</sup>. Die Überlagerungsfunktion weist mehrere Minima auf. Daher liefert der Ansatz mehrere Lösungen, jede mit einem bestimmten Ähnlichkeitsmaß. In zwei Dritteln der Beispiele beschreibt die beste Lösung auch wirklich die experimentellen Verhältnisse; in 91 % der untersuchten Fälle decken sich die experimentellen Gegebenheiten mit der ersten oder zweiten Lösung. Unterschiedliche Lösungen deuten auf alternative Bindungsmoden hin. Beispielsweise wird der experimentell beobachtete reverse Bindungsmodus der beiden antiviral wirksamen Verbinungen **14** und **15** mit sehr ähnlichem Gerüst (siehe Abb. 9) als zweite Lösung vorgeschlagen. Sie wird nur um 4 % schlechter bewertet als die beste Lösung, die dem regulären Überlagern beider Liganden entspricht.

Die Überlagerungsfunktion des beschriebenen Verfahrens berücksichtigt sterische, elektrostatische, hydrophobe und H-Brücken-Donor- und -Acceptor-Eigenschaften. Genaugenommen sind diese Eigenschaften nicht unabhängig voneinander, aber sie heben unterschiedliche Aspekte der molekularen Erkennung hervor. Die relative Bedeutung der Einzelbeiträge zum Ähnlichkeitsmaß innerhalb der 184 Ligandenpaare läßt sich nach einer genaueren Auswertung abschätzen. Mit 30–85 % Anteil am gesamten Ähnlichkeitsmaß liefert die sterische Ähnlichkeit in allen Fällen den größten Beitrag. Dies unterstreicht die Bedeutung einer großen räumlichen Ähnlichkeit in der Bindetasche als Voraussetzung für gute Bindungseigenschaften.



Ein Beispiel soll aber auch angeführt werden, für das der Ansatz versagt. Die beiden Thermolysin-Inhibitoren **16**<sup>[182]</sup> und **22**<sup>[211]</sup> lassen sich mit einer Standardabweichung von 0.54 Å überlagern. Analog können das Reaktionsprodukt der Proteinasereaktion, Val-Trp, und **22** mit einer Abweichung von 1.03 Å überlagert werden (Abb. 12). Val-Trp und **16** sind beide kleiner als **22**, und ihre Überlagerungen mit **22** berücksichtigen unterschiedliche Molekülteile. Berechnet man da-

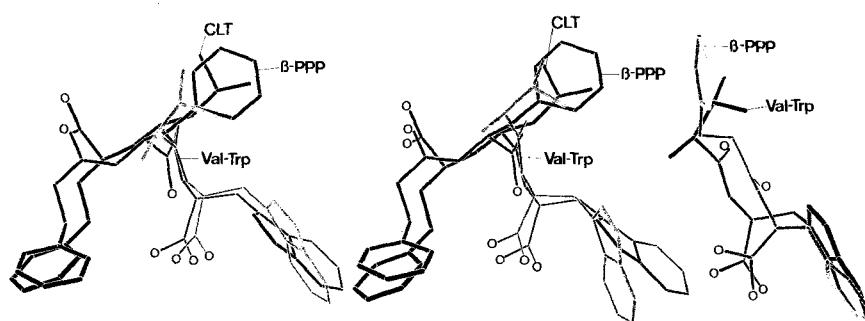


Abb. 12. Beobachtete und berechnete Überlagerung von Thermolysin-Inhibitoren. In der Mitte ist die Überlagerung der drei Verbindungen CLT **22** (schwarz),  $\beta$ -PPP **16** (dunkelgrau) und Val-Trp (hellgrau) zu sehen. Sie entspricht der kristallographisch ermittelten Orientierung dieser Verbindungen im Komplex mit Thermolysin. Links ist die berechnete Überlagerung mit CLT (schwarz) als Referenz gegeben. Die verbleibende Standardabweichung zur experimentellen Anordnung beträgt 0.54 Å und für Val-Trp 1.03 Å. Rechts ist die Überlagerung von  $\beta$ -PPP (grau) mit Val-Trp (schwarz) als Referenz gezeigt. Eine Anordnung, wie sie in Thermolysin auftritt, kann nicht erzielt werden, da die sterische Überlappung in der Proteinbindetasche sehr klein ist (Mitte).

gegen die direkte Überlagerung von **16** und Val-Trp, so wird deren sterische Überlappung optimiert. Daher kann auf diese Art kein den experimentellen Verhältnissen entsprechendes Resultat erzielt werden. Dieses Beispiel zeigt klar die Grenzen der Verfahren auf, die nur die 3D-Strukturen von Liganden berücksichtigen. Es ist außerdem eine Warnung davor, zu leichtfertig eine Überlagerung von Molekülen als Voraussetzung für 3D-QSAR-Analysen zu nutzen.

Der bislang beschriebene Rechenansatz berücksichtigt noch keine molekulare Flexibilität. Um diese Flexibilität in den Überlagerungsprozeß einzubinden, wurde die oben definierte Ähnlichkeitsbedingung als zusätzlicher Potentialterm in MIMUMBA eingeführt<sup>[210]</sup>. Da dabei nur eine lokale Optimierung durchgeführt wird, werden eine anfängliche Orientierung und Startkonformation benötigt. Um diese wichtige Einschränkung zu umgehen, werden mit MIMUMBA multiple Konformationen generiert und anschließend bei der Überlagerung genutzt. Im folgenden Schritt werden die am besten bewerteten, paarweise eingepaßten Konformere einer lokalen Konformationsrelaxation bei gleichzeitiger Maximierung der Ähnlichkeit unterworfen. Dieser kombinierte Ansatz ist auf Thrombin- und Thermolysin-Inhibitoren angewendet worden. Dabei wurden Konformere generiert und ausgelesen, die den experimentellen Verhältnissen in Geometrie und Orientierung nahekommen<sup>[210]</sup>.

## 5. Aktuelle rechnergestützte Methoden zur Suche nach neuen Leitstrukturen

Die 3D-Strukturen von Proteinen und Protein-Ligand-Komplexen können dazu genutzt werden, die essentiellen Wechselwirkungen zu identifizieren und nach zusätzlichen Bindetaschen zu suchen, die von den bislang bekannten Liganden noch nicht besetzt wurden. Solche Bindetaschen könnten Positionen sein, an denen eine H-Brücke zum Protein gebildet werden kann, oder hydrophobe Taschen in der Proteinstruktur, die durch lipophile Gruppen ausgefüllt werden können. Mehrere Computerprogramme sind in der letzten Zeit beschrieben worden, mit denen sich mögliche Liganden auswählen und ihre Wechselwirkungen mit dem Protein vorhersagen lassen. Diese neuen Werkzeuge für das Liganden-Design lassen sich wie folgt einteilen<sup>[212]</sup>:

- 1) Analyse der Proteinstruktur
- 2) Liganden-Docking und Suche in Strukturdatenbanken
- 3) De-novo-Liganden-Design
- 4) Abschätzung der Bindungsaffinität des Liganden
- 5) Analyse der elektronischen und konformativen Eigenschaften des Liganden

Wir fassen den aktuellen Stand der verschiedenen Methoden kurz zusammen. Zum Auffinden neuer Liganden kann man entweder Datenbanken mit den 3D-Strukturen bekannter kleiner Moleküle durchsuchen, oder man versucht ein De-novo-Design. Hierunter wird der teilweise oder vollständige Entwurf eines Moleküls verstanden. Die möglichen Vorgehensweisen sind in Abbildung 13 dargestellt.

### 5.1. Analyse der Proteinstruktur

Der erste Schritt bei der Suche nach einem neuen Liganden ist die Analyse der 3D-Struktur des Zielproteins. Die Oberfläche des Proteins kann zusammen mit gewissen Eigenschaften, beispielsweise der Lipophilie<sup>[213, 214]</sup> oder dem elektrostatischen Potential<sup>[215]</sup>, dargestellt werden. Weitere Methoden zur Suche nach Spalten oder Höhlen in der Proteinstruktur sind beschrieben worden<sup>[216–218]</sup>. Darüber hinaus gibt es Verfahren zur Vorhersage günstiger Bindungsstellen für kleine Testteilchen, wie etwa ein Wassermolekül oder eine Carbonylgruppe<sup>[219–221]</sup>. Meist wird die Wechselwirkungsenergie für mehrere Testteilchen auf einem Gitter ausgerechnet, das die Bindetasche einschließt. Diese Gitter können dargestellt werden und sind ein wertvoller Wegweiser beim Entwurf neuer Liganden.

Die vermutlich am häufigsten verwendete Methode zur Analyse von Protein-Ligand-Wechselwirkungen sind Molekülmechanikrechnungen. In der letzten Zeit wurden neue Kraftfelder entwickelt<sup>[222–225]</sup>, die eine genauere Beschreibung der kovalenten und nichtkovalenten Wechselwirkungen in diesen Komplexen ermöglichen. Einfache Geometrieeoptimierungen können nützlich sein, um die sterische und elektronische Komplementarität von Protein und Ligand theoretisch zu untersuchen.

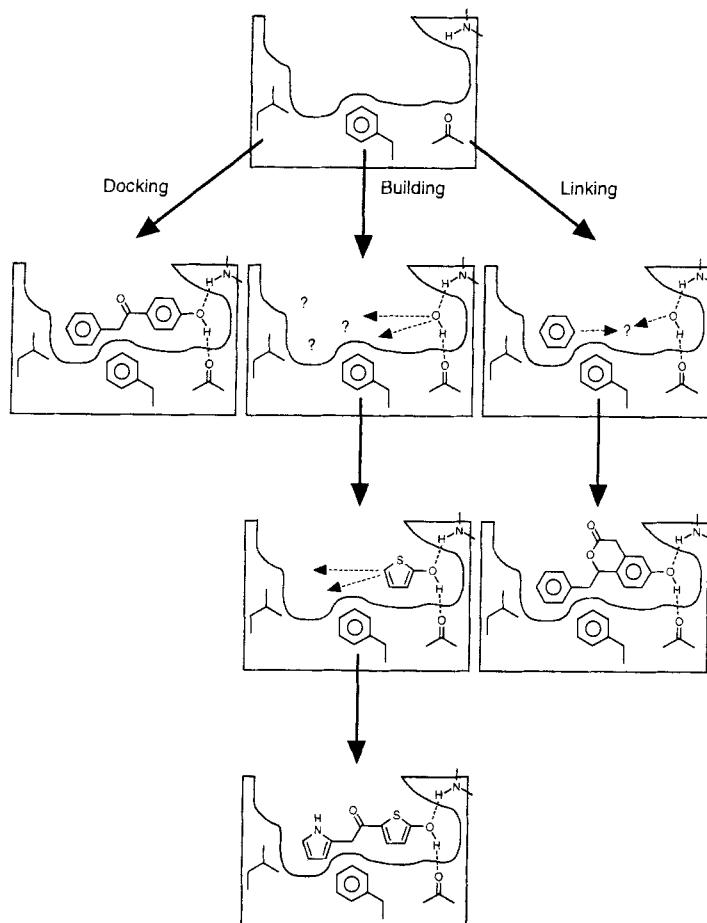


Abb. 13. Strategien zur Entdeckung neuer Leitstrukturen (siehe auch Abschnitt 5.3.1). Vollständige Liganden, beispielsweise aus einer Datenbank, können in die Bindetasche eingepaßt werden (links). Das De-novo-Design neuer Liganden kann entweder über die Positionierung eines „Keims“ erfolgen, der dann durch zusätzliche Baugruppen vergrößert wird (Mitte), oder es werden mehrere Fragmente gleichzeitig eingepaßt und durch geeignete Brückenglieder miteinander verknüpft (rechts). Die Abbildung wurde von Verlinde und Hol [26] adaptiert.

Das von Miranker und Karplus<sup>[226]</sup> entwickelte Programm MCSS kombiniert die Analyse der Proteinbindetasche mit der Plazierung kleiner Moleküle in einer energetisch günstigen Orientierung. MCSS verwendet zur Positionierung der kleinen Liganden ein Molekülmechanik-Kraftfeld.

Wir haben einen anderen Ansatz zur Analyse der Proteinbindetasche gewählt und konzentrieren uns hierbei auf die geometrischen Aspekte der Protein-Ligand-Wechselwirkungen<sup>[227]</sup>. Informationen über typische Arten von Wechselwirkungen zwischen den funktionellen Gruppen eines Liganden und den Aminosäuren eines Proteins können aus einer statistischen Analyse der zwischenmolekularen Kontaktgeometrien funktioneller Gruppen in Kristallpackungen kleiner organischer Moleküle erhalten werden. Gemeinsame Darstellungen dieser Wechselwirkungsgeometrien können genutzt werden, um bevorzugte Orientierungen aufzuspüren. Als Beispiel ist in Abbildung 14 ein überlagertes Bild der als Donor oder Acceptor fungierenden Partner in einer H-Brücke mit einem phenolischen Sauerstoffatom zu sehen. Die gefundenen räumlichen Häufungen sind repräsentativ für die bevorzugten Geometrien von Wechselwirkungen mit einer Tyrosinseitenkette. Um zu belegen, daß diese kombinierten Kristallumgebungen wirklich als zuverlässiger

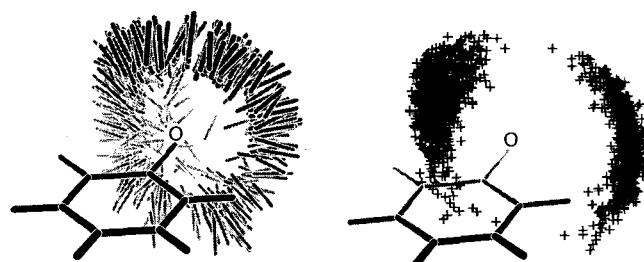


Abb. 14. Zusammengesetztes Bild von Kontaktgeometrien zum Abschätzen der möglichen räumlichen Orientierung von Wechselwirkungen zwischen einem phenolischen Sauerstoffatom und H-Brücken-Donoren (links) bzw. -Aczeptoren (rechts). Die Daten stammen von kristallographisch charakterisierten niedermolekularen Verbindungen. Dazu wurden die Koordinaten des Testfragments zusammen mit denen der Kontaktatome (NH, OH bzw. N, O) extrahiert. Um die Orientierungen aller berücksichtigten Beispiele vergleichen zu können, wurde eine Kleinst-Quadrat-Überlagerung der Atome des Benzolrings vorgenommen. Die direkt an das Phenol-Sauerstoffatom gebundenen Wasserstoffatome wurden aus Gründen der Übersichtlichkeit in der Darstellung weggelassen.

Wegweiser zur Vorhersage der Geometrie in der Bindetasche verwendet werden können, haben wir sie mit Aminosäuren zur Deckung gebracht, die in die Bindetasche eines Proteins hineinragen. In Abbildung 15 ist die kristallographisch bestimmte Struktur von Methotrexat **12** in Dihydrofolat-Reduktase mit Verteilungen um funktionelle Gruppen, die mit dem Inhibitor wechselwirken, verglichen. Die Positionen der Ligandenatome fallen genau in die Bereiche, die auch häufig von vergleichbaren Wechselwirkungspartnern in Kristallen organischer Verbindungen besetzt werden. Ein ähnliches Bild ergibt sich für andere Protein-Ligand-Komplexe<sup>[227]</sup>. Die in den kombinierten Kristallumgebungen enthaltenen Informationen haben wir in

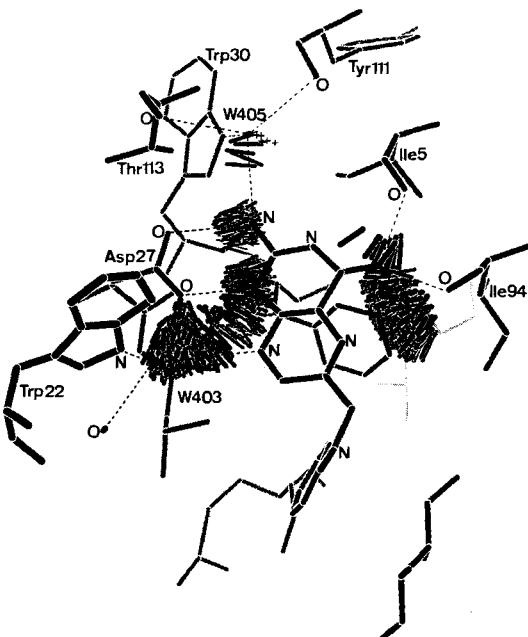


Abb. 15. Schnitt durch die Bindetasche der Dihydrofolat-Reduktase aus *E. coli* mit dem Liganden **12**. Blickrichtung senkrecht zum Pteridinring, H-Brücken gestrichelt. Die Wassermoleküle W403 und W405 vermitteln H-Brücken zwischen Ligand und Protein. Den zur Bindetasche ausgerichteten Aminosäureresten wurden die Verteilungen analog zu denen in Abb. 14 überlagert. Nach dem Löschen der Kontaktatome, die mit Atomen des Proteins zusammenfallen, verbleiben die angezeigten Positionen als mögliche Bindestellen um die Carboxylatgruppe von Asp27, die Hauptketten-Carbonylgruppen von Ile5, Ile94 und Tyr111, das Seitenketten-Sauerstoffatom von Thr113 (NH- bzw OH-Bindungsvektoren) und die Indol-NH-Gruppe von Trp22 (N- und O-Atompositionen).

Regeln übersetzt, die als Richtschnur für die automatische Einpassungen kleiner Moleküle in das aktive Zentrum von Proteinen dienen (siehe hierzu Abschnitt 5.3).

Eine wichtige Eigenschaft von Proteinen ist ihre Flexibilität. Das am häufigsten verwendete Rechenverfahren, um Informationen über die Proteinflexibilität zu erhalten, ist die Moleküldynamik(MD)-Simulation. Mehrere Übersichten haben sich den Möglichkeiten dieser Methode gewidmet<sup>[228, 229]</sup>, methodisch hat es Anfang der neunziger Jahre bedeutende Fortschritte gegeben<sup>[230–232]</sup>. Zusammen mit der Weiterentwicklung der Computerhardware ermöglichen diese die Durchführung längerer und genauerer MD-Simulationen. In der Tat sind beeindruckende Rechnungen beschrieben worden, die neue Einsichten in die Natur der Proteinflexibilität liefern<sup>[233, 234]</sup>.

## 5.2. Suche in Strukturdatenbanken

Der direkteste Weg, um mit dem Computer neue Liganden zu finden, ist die Suche in einer aus 3D-Strukturen bestehenden Datenbank (3D-Datenbank)<sup>[235–237]</sup>. Von Kuntz und Mitarbeitern wurde das auf diesem Gebiet bahnbrechende Programm DOCK entwickelt, das dem in Abbildung 13 links geschilderten Vorgehen entspricht<sup>[238]</sup>. DOCK sucht in einer 3D-Datenbank nach Liganden, die eine hohe sterische Komplementarität zur Proteinbindetasche aufweisen. Das Programm ist inzwischen auch in der Lage, die elektronische Komplementarität über ein Kraftfeld mit zu berücksichtigen<sup>[239, 240]</sup>. Es wurde über mehrere erfolgreiche Anwendungen von DOCK berichtet<sup>[241–243]</sup>. Weitere Computerprogramme zur Suche in 3D-Datenbanken sind beschrieben worden<sup>[244, 245]</sup>: CLIX<sup>[244]</sup> verwendet das GRID-Kraftfeld<sup>[219, 220]</sup> zur Einpassung möglicher Liganden; das von Miller et al.<sup>[245]</sup> entwickelte Programm FLOG berücksichtigt die Flexibilität des Liganden, indem bis zu 25 Konformere für jede Struktur in der Datenbank abgespeichert werden; das im nächsten Abschnitt beschriebene Programm LUDI kann ebenfalls zur Suche in 3D-Datenbanken eingesetzt werden<sup>[246]</sup>.

## 5.3. De-novo-Ligandendesign

In der letzten Zeit sind mehrere Computerprogramme vorgestellt worden, mit denen automatisch neue Liganden für eine gegebene Proteinstruktur generiert werden sollen<sup>[247–270]</sup>. Mehrere Übersichtsartikel sind hierzu publiziert worden<sup>[247, 248]</sup>. Die meisten Programme versuchen, neue Moleküle durch das Zusammenfügen von Bruchstücken zu erzeugen. Dies können entweder einzelne Atome<sup>[249–252]</sup> oder größere, chemisch sinnvolle Fragmente<sup>[253–255, 269, 270]</sup> sein. Beide Ansätze haben Vor- und Nachteile. Die Verwendung einzelner Atome als Baugruppen liefert die größtmögliche Vielfalt an Strukturen. Alternativ lässt sich eine große strukturelle Diversität auch durch Verwendung einer großen Zahl unterschiedlicher Fragmente erreichen. Ein möglicher Vorteil der Arbeit mit chemisch sinnvollen Fragmenten betrifft die präparative Zugänglichkeit der erzeugten Strukturen, da bei diesem Ansatz chemisches Wissen in die Verknüpfung der Fragmente einfließen kann. So können Aminosäuren als Baugruppen verwendet werden, um Peptide zu konstruieren<sup>[253]</sup>. Eine Erweiterung auf andere einfache

chemische Reaktionen wie die Bildung eines Ethers ist ohne Probleme möglich. Diese Kontrolle der präparativen Zugänglichkeit ist bei Programmen, die Moleküle atomweise zusammenfügen, schwierig. Daher ist es bei diesem Ansatz notwendig, die Synthesierbarkeit am kompletten Molekül zu überprüfen. Dies ist wesentlich schwieriger als die Beantwortung der Frage, ob die Bildung einer bestimmten Bindung synthetisch machbar ist.

Beim von Fragmenten ausgehenden De-novo-Ligandendesign gibt es zwei Hauptstrategien. Die erste ist, einzelne Fragmente unabhängig voneinander in der Bindetasche zu plazieren (oder sie von einer bekannten Ligandenstruktur zu übernehmen) und dann nach Templatstrukturen zu suchen, mit denen sich die Fragmente zu einem Molekül verbinden lassen (siehe Abb. 13 rechts). Der Vorteil dieses Ansatzes besteht darin, daß die Fragmente ohne die Randbedingung einer chemischen Bindung plaziert werden und sich daher an den für sie optimalen Positionen befinden. Die Strategie führt darüber hinaus häufig zu –wünschenswert – starren Strukturen. Ein möglicher Nachteil ist, daß es bisweilen schwierig sein kann, Template zu finden, die die Fragmente auf stereochemisch sinnvolle Weise verknüpfen und zugleich synthetisierbar sind. Die zweite Strategie beginnt mit einem Fragment an einer bestimmten Stelle der Bindetasche, um dann schrittweise weitere Fragmente anzufügen (siehe Abb. 13 Mitte). Ein Vorteil dieser Vorgehensweise ist, daß chemisches Wissen relativ leicht in den Verknüpfungsschritt eingebaut werden kann. Mit diesem Verfahren erhält man eher synthetisch zugängliche Strukturen. Allerdings zeigt der Ansatz die Tendenz zur Erzeugung flexiblerer Strukturen. Weiterhin haben Rotstein und Murcko<sup>[255]</sup> darauf hingewiesen, daß das schrittweise Aufbauen einer Struktur Schwierigkeiten macht, wenn es gilt, zwei voneinander entfernte Bindungsregionen zu verbrücken. Dies gelingt nur dann gut, wenn die Möglichkeit besteht, zwischen den beiden Bindungsregionen zusätzliche spezifische Wechselwirkungen mit dem Protein auszubilden.

Eine große Herausforderung sowohl für das De-novo-Design als auch für die Suche in 3D-Datenbanken ist die Entwicklung neuer Methoden zur Festlegung einer Rangfolge innerhalb der großen Zahl an Strukturkandidaten, die als Resultat solcher Rechnungen anfallen. Die verfügbaren, auf MD-Simulationen basierenden Verfahren sind zu rechenzeitaufwendig, um mehr als 10–100 Ligandenstrukturen bewerten zu können. Notwendig ist deshalb ein schnelles und zuverlässiges Verfahren zur Bewertung der Strukturen. Ein möglicher Ansatz ist die Verwendung eines Zweistufenverfahrens. Zunächst wird eine schnelle, empirische Bewertungsfunktion eingesetzt. Die hierbei am besten abschneidenden Strukturen werden genauer mit einem der rechenzeitintensiveren Verfahren analysiert. Mehrere einfache Bewertungsfunktionen sind vorgeschlagen worden<sup>[2, 81, 100–102, 253]</sup>, darunter auch die in Abschnitt 3.7 beschriebene.

### 5.3.1. Das Computerprogramm LUDI

LUDI ist ein von Molekülfragmenten ausgehendes Programm zum De-novo-Design, das sowohl zur Suche in 3D-Datenbanken als auch zur automatischen Konstruktion neuer Liganden durch „Building“ (schrittweisen Aufbau) oder „Linking“ (Verknüpfung der plazierten Einzelfragmente, siehe Abb. 13)<sup>[269–270]</sup> eingesetzt werden kann. Das Programm posi-

tioniert Moleküle oder neue Substituenten für eine bekannte Leitstruktur so in der Proteinbindetasche, daß H-Brücken gebildet werden können und hydrophobe Taschen mit lipophilen Gruppen ausgefüllt werden. Wie andere Programme zum Ligandendesign auch benötigt LUDI im wesentlichen folgende Daten: 1) die 3D-Struktur des Zielproteins, 2) die 3D-Strukturen möglicher Liganden und Fragmente zum Einpassen oder zum Konstruieren neuer Moleküle und 3) Informationen über mögliche günstige Wechselwirkungen zwischen Protein und Ligand.

Das Programm berechnet zunächst sogenannte Wechselwirkungszentren. Dies sind diskrete Positionen und Vektoren im Raum, die geeignet sind, eine H-Brücke zu bilden oder eine lipophile Tasche zu besetzen. Diese Wechselwirkungszentren leiten sich von den in Abschnitt 5.1 beschriebenen Kontaktmustern in Kristallpackungen ab<sup>[227]</sup>. Im nächsten Schritt werden molekulare Fragmente mit diesen Zentren überlagert. Die Fragmente stammen aus einer Bibliothek, die 1100 kleine Moleküle enthält. Es ist ebenfalls möglich, größere Fragmentbibliotheken zu durchsuchen, die sich vom ACD<sup>[271]</sup> oder von der Cambridge Structural Database (CSD)<sup>[21-23]</sup> ableiten. Anschließend kann LUDI im Link-Modus verwendet werden, um die platzierten Fragmente durch Brückenfragmente zu einem Molekül zu verbinden. Alternativ besteht die Möglichkeit, neue Fragmente direkt mit bereits positionierten Fragmenten oder mit einer bekannten Leitstruktur zu verknüpfen. Schließlich werden die

erhaltenen Strukturen mit der in Abschnitt 3.7 beschriebenen Funktion bewertet. Das LUDI-Konzept ist in Abbildung 16 zusammengefaßt.

Ein wichtiger Aspekt des LUDI-Konzepts ist die Fähigkeit des Programms, kleine Ungenauigkeiten in der experimentell bestimmten Proteinstruktur zu tolerieren. Die Positionierung der Fragmente erfolgt durch rein geometrische Operationen. Wir haben uns entschlossen, weder bei der Positionierung noch bei der Bewertung Kraftfeldrechnungen zu verwenden. Denn zum einen benötigen solche Verfahren recht viel Rechenzeit, zum anderen können Ungenauigkeiten in der Proteinstruktur unrealistisch große Beiträge zur Protein-Ligand-Wechselwirkungsenergie verursachen, wenn diese mit einem Kraftfeld berechnet wird. Die Resultate sind dann nur interpretierbar, wenn eine vollständige Geometrieoptimierung des Komplexes durchgeführt wird. Statt dessen verwenden wir in LUDI die in Abschnitt 3.7 beschriebene, schnelle und fehlertolerante, empirische Bewertungsfunktion<sup>[81]</sup>.

In einer Validierungsstudie haben wir LUDI erfolgreich zum Entwurf von Inhibitoren für Dihydrofolat-Reduktase und HIV-Protease eingesetzt<sup>[270]</sup>. Pisabarro et al.<sup>[38]</sup> haben mit diesem Programm einen neuen Inhibitor mit höherer Bindungsaffinität für HSF-Phospholipase A2 gefunden. Vor kurzem haben Babine et al.<sup>[39]</sup> mit LUDI den Ether **23** als neuen Liganden für FKBP-12 konstruiert. Die Verbindung wurde anschließend synthetisiert und erwies sich tatsächlich als stark bindender Ligand für FKBP-12 ( $K_i = 12 \mu\text{M}$ ). In einer weiteren Anwendung wurde in einer aus ca. 30000 Molekülen bestehenden Untermenge (<40 Atome, 0-2 drehbare Bindungen) des FCD<sup>[271]</sup> nach neuen Liganden für Trypsin, HIV-Protease, Purinnucleosid-Phosphorylase und Streptavidin gesucht. Die 3D-Strukturen der Liganden wurden hierbei mit dem Programm CONCORD<sup>[272]</sup> erzeugt (in der letzten Zeit haben wir auch das Programm CORINA<sup>[273]</sup> zur Generierung von 3D-Strukturen eingesetzt). Für die Spezifitätstasche des Enzyms Trypsin benötigte die Suche 2 Stunden auf einer Silicon-Graphics-Indigo-R 4000-Workstation und lieferte 153 Strukturen. Die Treffer mit der besten Bewertung sind *para*-Methylbenzamidin und Benzamidin. Beide Verbindungen binden in der Tat mit Affinitätskonstanten im  $\mu\text{M}$ -Bereich an Trypsin<sup>[274, 275]</sup>.

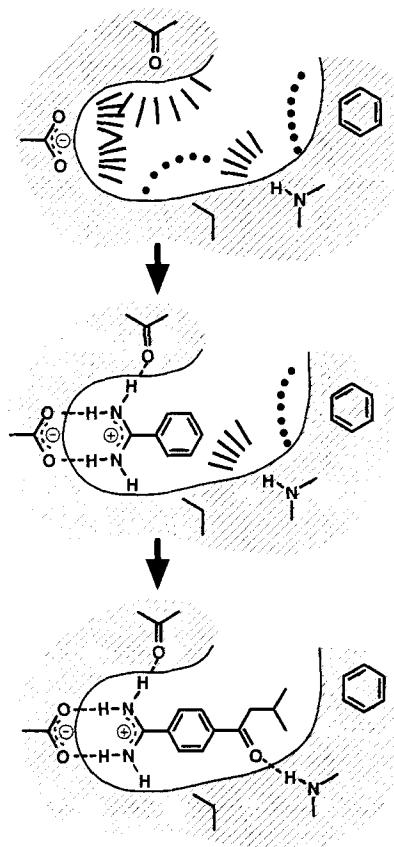
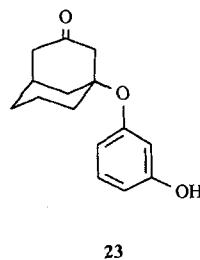


Abb. 16. Die einzelnen Schritte im De-novo-Design von Proteinliganden mit dem Programm LUDI. Zuerst werden die Wechselwirkungszentren entsprechend einem Regelsystem erzeugt (oben) und danach kleine Molekülfragmente in diese Wechselwirkungszentren eingepaßt. Zuletzt verknüpft man die positionierten Fragmente miteinander oder vergrößert sie durch zusätzliche Substituenten (unten).

## 6. Ausblick und künftige Entwicklungen

In den letzten fünf Jahren sind wir Zeugen einer enormen Verbesserung der Computerwerkzeuge für das auf Strukturmerkmalen basierende Ligandendesign geworden. Neue Programme zur Konformationsanalyse, zum Liganden-Docking, zum Vergleich von Liganden und zum De-novo-Ligandendesign sind beschrieben worden. Die ersten Beispiele für einen erfolgreichen Entwurf von Proteinliganden wurden offengelegt<sup>[29-42]</sup>. Die Motivation für Weiterentwicklungen dieser Methoden ist sicherlich zunächst die intellektuelle Herausforderung, die Natur der Protein-Ligand-Wechselwirkungen besser zu verstehen, darüber hinaus aber auch die Notwendig-

keit, den Prozeß, der zur Entdeckung neuer Wirkstoffe führt, zu beschleunigen. Da diese Motivation immer stärker wird, wird auch die Entwicklung verbesserter Methoden für das struktur-basierende Ligandendesign an Bedeutung gewinnen.

Trotz der bemerkenswerten Fortschritte bestehen nach wie vor wichtige Einschränkungen für den Einsatz der bestehenden Rechenverfahren. Die wichtigste Einschränkung ist die Verfügbarkeit von 3D-Proteinstrukturen. Hier sind immer noch erhebliche Anstrengungen erforderlich, um durch bessere Techniken mehr Proteine einer Strukturbestimmung zugänglich zu machen. Im günstigsten Fall liegen vom Protein Strukturuntersuchungen im Komplex mit mehreren Liganden vor. Ist keine 3D-Struktur des Proteins verfügbar, kann man unter Umständen ausgehend von der bekannten Struktur eines eng verwandten Proteins ein Modell bauen. Andernfalls bleibt für den Entwurf neuer Ligandenstrukturen nur der Vergleich bereits bekannter Liganden übrig. Hier ist zu beachten, daß sich dieser Vergleich auf die räumliche Verteilung der physikochemischen Eigenschaften bezieht. Es ist klar, daß mit abnehmender Information über die strukturellen Aspekte der Protein-Ligand-Wechselwirkungen auch die Aussagekraft und Zuverlässigkeit der Methoden zum Ligandendesign abnimmt.

In den vorgestellten Verfahren werden Liganden und ihre möglichen Wechselwirkungen mit dem Protein berücksichtigt. Andere wichtige Faktoren wie Transportverhalten, metabolische Stabilität, orale Verfügbarkeit, geringe Toxizität, ausreichende Halbwertszeit und geringes Suchtpotential werden nicht berücksichtigt. Diese Faktoren entscheiden aber letztendlich darüber, ob ein Ligand auch als Wirkstoff eingesetzt werden kann. Des weiteren wird in den gegenwärtigen Programmen zum De-novo-Design die Frage der Synthesierbarkeit der generierten Strukturen nur ansatzweise behandelt. Schließlich müssen die existierenden Methoden zur Vorhersage der Bindungsaffinität weiter verbessert werden.

In den Fällen, in denen die Proteinstruktur verfügbar ist, wird das Protein von den meisten Methoden zum Docking und De-novo-Design als starr angesehen. In der Realität wird aber eine durch die Ligandenbindungen hervorgerufene induzierte Anpassung beobachtet, die eigentlich berücksichtigt werden müßte. Es hat sich jedoch in vielen Fällen gezeigt, daß diese Änderung der Proteinstruktur für die Bindung unterschiedlicher Liganden ähnlich ist. Daher ist die 3D-Struktur eines Protein-Ligand-Komplexes ein guter Ausgangspunkt für das De-novo-Design. Die Berücksichtigung der Flexibilität des Liganden, insbesondere bei Strukturen mit mehr als fünf drehbaren Bindungen, ist immer noch eine beachtliche Herausforderung. Hier ist es wichtig, die Ligandenflexibilität sowohl beim Molekülvergleich als auch beim Docking auf effiziente Weise zu berücksichtigen.

Rechnergestützte Verfahren sind nur ein Aspekt der neuen Strategien zur Wirkstoffsuche. In den letzten Jahren wurden molekulare Testsysteme entwickelt, die das schnelle Testen einer großen Zahl an Verbindungen ermöglichen. In günstigen Fällen können mit einem Assay mehrere tausend Verbindungen pro Tag getestet werden. Dies hat wiederum die Entwicklung neuer Methoden zur Synthese großer Substanzbibliotheken stimuliert. Die kombinatorische Chemie<sup>[277–279]</sup> ist ein vielversprechender Ansatz zum Auffinden neuer Leitstrukturen. Unserer Meinung nach können die rechnergestützten Verfahren auch beim

Massenscreening hilfreich sein. Die Treffer aus dem Screening haben häufig stark unterschiedliche Strukturen. Ein Vergleich ihrer 3D-Strukturen kann Hinweise auf gemeinsame Strukturelemente liefern, die für die Rezeptorbindung verantwortlich sind. Ist einmal eine neue Leitstruktur identifiziert, sei es durch experimentelles Screening oder durch neue Rechenverfahren, können Molecular Modeling und Röntgenstrukturanalyse eingesetzt werden, um die effiziente Optimierung der Leitstruktur zu unterstützen.

Im Augenblick stehen wir erst am Anfang eines Verständnisses der wichtigsten Phänomene und der damit verbundenen Prinzipien, die die molekulare Erkennung in Protein-Ligand-Komplexen bestimmen. Auf empirischem Wissen basierende Rechenverfahren sind schon jetzt wirkungsvolle Werkzeuge bei der Entdeckung und Optimierung neuer Leitstrukturen. Wir sind fest davon überzeugt, daß der zunehmende Reichtum an experimentellen Befunden über Strukturen und Bindungsdaten von Protein-Ligand-Komplexen die Genauigkeit und den Anwendungsbereich dieser Methoden in Zukunft weiter verbessern wird.

*Wir möchten uns recht herzlich bei unseren Kollegen Wolfgang Höffken, Hugo Kubinyi, Thomas Mietzner und Nigel Walker für zahlreiche hilfreiche Kommentare und anregende Diskussionen bedanken. Ein Teil unserer eigenen, hier vorgestellten Arbeiten wurde im Rahmen der BMBF-Projekte RELIWE und ÄBAV gefördert.*

Eingegangen am 26. Juli 1995 [A 125]

- [1] J. M. Lehn, *Angew. Chem.* **1988**, *100*, 91–116; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1988**, *27*, 89–112.
- [2] P. R. Andrews, D. J. Craik, J. L. Martin, *J. Med. Chem.* **1984**, *27*, 1648–1657.
- [3] a) B. Roth, E. A. Falco, G. H. Hitchings, S. R. M. Bushby, *J. Med. Pharm. Chem.* **1962**, *5*, 1103–1123; b) D. A. Matthews, J. T. Bolin, J. M. Burridge, D. J. Filman, K. W. Volz, B. T. Kaufmann, C. R. Bedell, J. N. Champness, D. K. Stammers, J. Kraut, *J. Biol. Chem.* **1985**, *260*, 381–391.
- [4] *Drugs, News Perspect.* **1995**, *8*, 237.
- [5] a) S. Trumpp-Kallmeyer, J. Hoffack, A. Bruunvels, M. Hibert, *J. Med. Chem.* **1992**, *35*, 3448–3462; b) J. Findley, E. Eliopoulos, *TIPS* **1992**, *11*, 492–499.
- [6] a) B. Humblet, T. Mirzadegan, *Annu. Rep. Med. Chem.* **1992**, *27*, 291–300; b) P. Cronet, C. Sander, G. Vriend, *Protein Eng.* **1993**, *6*, 59–64; c) M. Kontoyianni, T. P. Lybrand, *Med. Chem. Res.* **1993**, *3*, 407–418.
- [7] J. Deisenhofer, O. Epp, K. Miki, R. Huber, H. Michel, *J. Mol. Biol.* **1984**, *180*, 385–398; *Nature* **1985**, *318*, 618–624.
- [8] Siehe auch: J. Deisenhofer, H. Michel, *Angew. Chem.* **1989**, *101*, 872–892; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1989**, *28*, 829–847; R. Huber, *ibid.* **1989**, *101*, 849–871 bzw. **1989**, *28*, 848–869.
- [9] A. Kreusch, G. E. Schultz, *J. Mol. Biol.* **1994**, *243*, 891–905.
- [10] R. Henderson, J. M. Baldwin, T. A. Ceska, F. Zemlin, E. Beckmann, K. H. Downing, *J. Mol. Biol.* **1990**, *213*, 899–929.
- [11] W. Kühlbrandt, D. N. Wang, Y. Fujiyoshi, *Nature* **1994**, *367*, 614–621.
- [12] D. Picot, P. J. Loll, M. Garavito, *Nature* **1994**, *367*, 243–249.
- [13] a) N. Unwin, *J. Mol. Biol.* **1993**, *229*, 1101–1124; b) *Nature* **1995**, *373*, 37–43.
- [14] H. Oschkinat, T. Müller, T. Dieckmann, *Angew. Chem.* **1994**, *106*, 284–300; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1994**, *33*, 277–293.
- [15] S. W. Fesik, *J. Med. Chem.* **1991**, *34*, 2937–2945.
- [16] E. R. P. Zuiderweg, S. R. van Doren, A. V. Kurochkin, R. R. Neubig, A. Majumdar, *Perspect. Drug Discovery Des.* **1993**, *1*, 391–417.
- [17] a) M. Billeter, *Q. Rev. Biophys.* **1992**, *25*, 325; b) K. Wüthrich, *Acta Crystallogr. Sect. D* **1995**, *51*, 249–270.
- [18] B. Cudney, S. Patel, K. Weisgraber, V. Newhouse, *Acta Crystallogr. Sect. D* **1994**, *50*, 414–423.
- [19] J. Jancarik, S. H. Kim, *J. Appl. Crystallogr.* **1991**, *24*, 409–411.
- [20] F. C. Bernstein, T. F. Koetzle, G. J. B. Williams, E. F. Meyer, Jr., M. D. Brice, J. R. Rodgers, O. Kennard, T. Shimanouchi, T. Tasumi, *J. Mol. Biol.* **1977**, *112*, 535–542.
- [21] F. H. Allen, O. Kennard, R. Taylor, *Acc. Chem. Res.* **1983**, *16*, 146–153.

[22] F. H. Allen, S. Bellard, M. D. Brice, B. A. Cartwright, A. Doubleday, H. Higgs, T. Hummelink-Peters, O. Kennard, W. D. S. Motherwell, J. R. Rodgers, D. G. Watson, *Acta Crystallogr. Sect. B* **1979**, *35*, 2331–2339.

[23] F. H. Allen, J. E. Davies, J. J. Galloy, O. Johnson, O. Kennard, C. F. Macrae, E. H. Mitchell, G. F. Mitchell, J. M. Smith, D. G. Watson, *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* **1991**, *31*, 187–204.

[24] W. J. Hehre, L. Radom, P. von R. Schleyer, J. A. Pople, *Ab initio molecular orbital theory*, Wiley, New York, **1986**.

[25] a) W. G. J. Hol, *Angew. Chem.* **1986**, *98*, 765–777; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1986**, *25*, 767–778; b) M. D. Walkinshaw, *Med. Res. Rev.* **1992**, *12*, 317–372; c) M. A. Navia, M. A. Murcko, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **1992**, *2*, 202–210; d) H.-J. Böhm, G. Klebe, H. Kubinyi, *Wirkstoffdesign*, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, **1996**.

[26] C. L. M. J. Verlinde, W. G. J. Hol, *Structure* **1994**, *2*, 577–587.

[27] J. Greer, J. W. Erickson, J. J. Baldwin, M. D. Varney, *J. Med. Chem.* **1994**, *37*, 1035–1054.

[28] L. F. Kuyper, B. Roth, D. P. Baccanari, R. Ferone, C. R. Bedell, J. N. Champness, D. K. Stammers, J. G. Dunn, F. E. Norrington, D. J. Baker, P. J. Goodford, *J. Med. Chem.* **1982**, *25*, 1120–1122.

[29] P. Y. S. Lam, P. K. Jadhav, C. J. Eymann, C. N. Hodge, Y. Ru, L. T. Bacherer, J. L. Meek, M. L. Otto, M. M. Rayner, Y. N. Wong, C. H. Chang, P. C. Weber, D. A. Jackson, T. R. Sharpe, S. Erickson-Viitanen, *Science* **1994**, *263*, 380–384.

[30] a) K. Appelt, R. J. Bacquet, C. A. Bartlett, C. L. J. Booth, S. T. Freer, M. A. M. Fuhr, M. R. Gehring, S. M. Herrmann, E. F. Howland, C. A. Janson, T. R. Jones, C. C. Kan, V. Katharadkar, K. K. Lewis, G. P. Marzoni, D. A. Matthews, C. Mohre, E. W. Moomaw, C. A. Morse, S. J. Oatley, R. C. Ogden, M. R. Reddy, S. H. Reich, W. S. Schoettlin, W. W. Smith, M. D. Varney, J. E. Villafranca, R. W. Ward, S. Webber, S. E. Webber, K. M. Welsh, J. White, *J. Med. Chem.* **1991**, *34*, 1925–1934; b) S. H. Reich, M. A. M. Fuhr, D. Nguyen, M. J. Pino, K. M. Welsh, S. Webber, C. A. Janson, S. R. Jordan, D. A. Matthews, W. W. Smith, C. A. Bartlett, C. L. J. Booth, S. M. Herrmann, E. F. Howland, C. A. Morse, R. W. Ward, J. White, *ibid.* **1992**, *35*, 847–858; c) M. D. Varney, G. P. Marzoni, C. L. Palmer, J. G. Deal, S. Webber, K. M. Welsh, R. J. Bacquet, C. A. Bartlett, C. A. Morse, C. L. J. Booth, S. M. Herrmann, E. F. Howland, R. W. Ward, J. White, *ibid.* **1992**, *35*, 663–676; d) M. D. Varney, C. L. Palmer, J. G. Deal, S. Webber, K. M. Welsh, C. A. Bartlett, C. A. Morse, W. W. Smith, C. A. Janson, *ibid.* **1995**, *38*, 1892–1903.

[31] J. J. Baldwin, G. S. Ponticello, P. S. Anderson, M. E. Christy, M. A. Murcko, W. C. Randall, H. Schwarm, M. F. Sugrue, J. P. Springer, P. Gautheron, J. Grove, P. Mallorga, M. P. Viader, B. M. McKeever, M. A. Navia, *J. Med. Chem.* **1989**, *32*, 2510–2513.

[32] a) W. C. Ripka, W. J. Sipio, J. M. Blaney, *Lect. Heterocycl. Chem.* **1987**, *9*, 95–104; b) R. W. Scheitz, N. J. Bach, D. G. Carlson, N. Y. Chirgadze, D. K. Clawson, R. D. Dillard, S. E. Draheim, L. W. Hartley, N. D. Jones, E. D. Mihelich, J. L. Olkowski, D. W. Snyder, C. Sommers, J. P. Wery, *Nature Struct. Biol.* **1995**, *2*, 458–465.

[33] S. E. Ealick, Y. S. Babu, C. E. Bugg, M. D. Erion, W. C. Guida, J. A. Montgomery, J. A. Secrist, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1991**, *88*, 11540–11544.

[34] a) W. J. Thompson, P. Fitzgerald, M. K. Holloway, E. A. Emini, P. L. Darke, B. M. McKeever, W. A. Schleif, J. C. Quintero, J. A. Zugay, T. J. Tucker, J. E. Schwering, C. F. Homnick, J. Nunberg, J. P. Springer, J. R. Huff, *J. Med. Chem.* **1992**, *35*, 1685–1701; b) E. E. Kim, C. T. Baker, M. D. Dwyer, M. A. Murcko, B. G. Rao, R. D. Tung, M. A. Navia, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 1181–1182.

[35] M. von Itzstein, W. Y. Wu, G. B. Kok, M. S. Pegg, J. C. Dyason, B. Jin, T. V. Phan, M. L. Smythe, H. F. White, S. W. Oliver, P. M. Colman, J. N. Varghese, D. M. Ryan, J. M. Woods, R. C. Bethell, V. J. Hotham, J. M. Cameron, C. R. Penn, *Nature* **1993**, *363*, 418–423.

[36] H. Mack, T. Pfeiffer, W. Hornberger, H. J. Böhm, H. W. Höffken, *J. Enzyme Inhib.* **1995**, *9*, 73–86.

[37] B. P. Morgan, D. R. Holland, B. W. Matthews, P. A. Bartlett, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 3251–3260.

[38] M. T. Pisabarro, A. R. Ortiz, A. Palomar, F. Cabre, L. Garcia, R. C. Wade, F. Gago, D. Mauleon, G. Carganico, *J. Med. Chem.* **1994**, *37*, 337–341.

[39] R. E. Babine, T. M. Bleckman, C. R. Kissinger, R. Showalter, L. A. Pelletier, C. Lewis, K. Tucker, E. Moomaw, H. E. Parge, J. E. Villafranca, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1995**, *5*, 1719–1724.

[40] a) C. A. Vale, J. R. Damewood, G. B. Steelman, C. Bryant, B. Gomes, J. Williams, *J. Med. Chem.* **1995**, *38*, 86–97; b) C. A. Vale, P. R. Bernstein, C. Bryant, C. Ceccarelli, J. R. Damewood, R. Earley, S. W. Feeney, B. Gomes, B. J. Kosmider, G. B. Steelman, R. M. Thoms, E. P. Vacek, J. C. Williams, D. J. Wolanin, S. Woolson, *ibid.* **1995**, *38*, 98–108.

[41] C. L. M. J. Verlinde, M. Callens, S. van Calenbergh, A. van Aerschot, P. Herdewijn, V. Hannaert, P. A. M. Michels, F. R. Opperdon, W. G. J. Hol, *J. Med. Chem.* **1994**, *37*, 3605–3613.

[42] K. Hilpert, J. Ackermann, D. W. Banner, A. Gast, K. Gubernator, P. Hadaway, L. Labler, K. Müller, G. Schmid, T. B. Tschopp, H. van de Waterbeemd, *J. Med. Chem.* **1994**, *37*, 3889–3901.

[43] J. L. Chambers, R. M. Stroud, *Acta Crystallogr. Sect. B* **1979**, *35*, 1861–1874.

[44] P. Dauber-Ösguthorpe, V. A. Roberts, D. J. Osguthorpe, J. Wolff, M. Genest, A. T. Hagler, *Proteins* **1988**, *4*, 31–47.

[45] A. Wlodawer, J. Nachman, G. L. Gilliland, W. Gallagher, C. J. Woodward, *J. Mol. Biol.* **1987**, *198*, 469–480.

[46] A. A. Kossiakoff, M. Randal, J. Guenot, C. Eigenbrot, *Proteins* **1992**, *14*, 65–74.

[47] T. A. Jones, J. Y. Zou, S. W. Cowan, M. Kjeldgaard, *Acta Crystallogr. Sect. A* **1991**, *47*, 110–119.

[48] A. T. Brünger, A. Kruckowski, *Acta Crystallogr. Sect. A* **1990**, *46*, 585–593.

[49] a) H. Zöllner, *Handbook of Enzyme Inhibitors*, VCH, Weinheim, **1993**; b) J. Erickson, D. J. Neidhart, J. VanDrie, D. J. Kempf, X. C. Wang, D. W. Norbeck, J. J. Plattner, J. W. Rittenhouse, M. Turon, N. Wideburg, W. E. Kohlbrenner, R. Simmer, R. Helfrich, D. A. Paul, M. Knigge, *Science* **1990**, *249*, 527–533; c) B. R. Baker, E. H. Erickson, *J. Med. Chem.* **1967**, *10*, 1123–1128; d) I. V. Kurinov, R. W. Harrison, *Struct. Biol.* **1994**, *1*, 735–743; e) R. Kikumoto, Y. Tamao, K. Ohkubo, T. Tezuka, S. Tonomura, H. Hara, K. Nominami, A. Hijikata, S. Okamoto, *Biochemistry* **1994**, *23*, 85–90; f) C. Taparelli, R. Metternich, C. Erhardt, N. S. Cook, *Trends Pharmacol. Sci.* **1993**, *14*, 366–376.

[50] J. R. Damewood, P. D. Edwards, S. Feeney, B. C. Gomes, G. B. Steelman, P. A. Tuthill, J. C. Williams, P. Warner, S. A. Woolson, D. J. Wolanin, C. A. Veale, *J. Med. Chem.* **1994**, *37*, 3303–3312.

[51] P. R. Bernstein, D. Andisik, P. K. Bradley, C. B. Bryant, C. Ceccarelli, J. R. Damewood, R. Earley, P. D. Edwards, S. Feeney, B. C. Gomes, B. J. Kosmider, G. B. Steelman, R. M. Thomas, E. P. Vacek, C. A. Veale, J. C. Williams, D. J. Wolanin, S. A. Woolson, *J. Med. Chem.* **1994**, *37*, 3313–3326.

[52] R. B. Silverman, *The organic chemistry of drug design and drug action*, Academic Press, San Diego, **1992**; *Medizinische Chemie*, VCH, Weinheim, **1994**.

[53] H. Brandstetter, D. Turk, H. W. Höffken, D. Grosse, P. D. Martin, B. F. P. Edwards, W. Bode, *J. Mol. Biol.* **1992**, *226*, 1085–1099.

[54] G. A. Jeffrey, W. Saenger, *Hydrogen bonding in biological structures*, Springer, Berlin, **1991**.

[55] S. W. Cowan, M. E. Newcomer, T. A. Jones, *Proteins* **1990**, *8*, 44–61.

[56] J. H. Arevalo, E. A. Stura, M. J. Taussig, I. A. Wilson, *J. Mol. Biol.* **1993**, *231*, 103–118.

[57] J. N. Herron, X. He, M. L. Mason, E. W. Voss, A. B. Edmundson, *Proteins* **1989**, *5*, 271–280.

[58] K. A. Watson, E. P. Mitchell, L. N. Johnson, J. C. Son, C. J. F. Bichard, M. G. Orchard, G. W. J. Fleet, N. G. Oikonomakos, D. D. Leonidas, M. Kontou, A. Papageorgiou, *Biochemistry* **1994**, *33*, 5745–5758.

[59] N. K. Sauter, M. D. Bednarski, B. A. Wurzburg, J. E. Hanson, G. M. Whitesides, J. J. Skehel, D. C. Wiley, *Biochemistry* **1989**, *28*, 8388–8396.

[60] W. Janes, G. E. Schulz, *J. Biol. Chem.* **1990**, *265*, 10443–10445.

[61] I. K. McDonald, J. M. Thornton, *J. Mol. Biol.* **1994**, *238*, 777–793.

[62] J. C. Powers, J. W. Harper in *Proteinase Inhibitors* (Hrsg.: A. J. Barrett, G. Salvesen), Elsevier, New York, **1986**, 244–253.

[63] R. Wolfenden, W. M. Kati, *Acc. Chem. Res.* **1991**, *24*, 209–215.

[64] S. Dao-pin, H. Nicholson, W. A. Baase, X. J. Zhang, J. A. Wozniak, B. W. Matthews, *Protein Conformation* (Ciba Foundation Symposium 161), Wiley, Chichester, **1991**, S. 52.

[65] B. P. Morgan, J. M. Scholtz, M. D. Ballinger, I. D. Zipkin, P. A. Bartlett, *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 297–307.

[66] D. H. Tronrud, H. M. Holden, B. W. Matthews, *Science* **1987**, *235*, 571–574.

[67] P. A. Bash, U. C. Singh, F. K. Brown, R. Langridge, P. A. Kollman, *Science* **1987**, *235*, 574–576.

[68] K. M. Merz, P. A. Kollman, *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, *111*, 5649–5658.

[69] O. Livnah, E. A. Bayer, M. Wilchek, J. L. Sussman, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1993**, *90*, 5076–5080.

[70] M. I. Page, *Angew. Chem.* **1977**, *89*, 456–467; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1977**, *16*, 449–459.

[71] W. P. Jencks, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1981**, *78*, 4046–4050.

[72] M. S. Searle, D. H. Williams, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 10690–10697.

[73] M. S. Searle, D. H. Williams, U. Gerhard, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 10697–10704.

[74] G. Chalasinski, M. M. Szczesniak, *Chem. Rev.* **1994**, *94*, 1723–1765.

[75] K. S. Kim, B. J. Mhin, U. S. Choi, K. Lee, *J. Chem. Phys.* **1992**, *97*, 6649–6662.

[76] W. V. Blokzijl, J. B. F. N. Engberts, *Angew. Chem.* **1993**, *105*, 1610–1648; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1993**, *32*, 1545–1579.

[77] M. C. Chervenak, E. J. Toone, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 10533–10539.

[78] J. D. Dunitz, *Science* **1994**, *264*, 670.

[79] B. Spriggs, P. Haake, *Bioorg. Chem.* **1977**, *6*, 181–190.

[80] S. E. Krikorian, *J. Phys. Chem.* **1982**, *86*, 1875–1881.

[81] H. J. Böhm, *J. Comput. Aided Mol. Des.* **1994**, *8*, 243–256.

[82] B. L. Jacobson, J. J. He, P. S. Vermesch, D. D. Lemon, F. A. Quiocio, *J. Biol. Chem.* **1991**, *266*, 5220–5225.

[83] C. Tanford, *The Hydrophobic Effect*, 2. Aufl., Wiley, New York, **1980**.

[84] A. Ben-Naim, *Hydrophobic Interactions*, Plenum, New York, **1980**.

[85] a) S. K. Burley, G. A. Petsko, *Science* **1985**, *229*, 23–28; b) C. A. Hunter, J. Singh, J. M. Thornton, *J. Mol. Biol.* **1991**, *218*, 837–846.

[86] C. A. Hunter, *Chem. Soc. Rev.* **1994**, *101*–109.

[87] D. B. Smithrud, T. B. Wyman, F. Diederich, *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 5420–5426.

[88] G. Klebe, F. Diederich, *Philos. Trans. R. Soc. London A* **1993**, *345*, 37–48.

[89] J. L. Sussman, M. Harel, F. Frolov, C. Oefner, A. Goldman, L. Toker, I. Silman, *Science* **1991**, *253*, 872–879.

[90] D. A. Dougherty, D. A. Staufer, *Science* **1990**, *250*, 1558–1560.

[91] a) R. T. Shuman, R. B. Rothenberger, C. S. Campbell, G. F. Smith, D. S. Gifford-Moore, P. D. Gesellchen, *J. Med. Chem.* **1993**, *36*, 314–319; b) N. Balasubramanian, D. R. St. Laurent, M. E. Federici, N. A. Meanwell, J. J. Wright, W. A. Schumacher, S. M. Seiler, *ibid.* **1993**, *36*, 300–303; c) C. Hutchins, J. Greer, *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **1991**, *26*, 77–127.

[92] S. Paliwal, S. Geib, C. S. Wilcox, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 4497–4498.

[93] a) A. R. Fersht, J. P. Shi, J. Knill-Jones, D. M. Lowe, A. J. Wilkinson, D. M. Blow, P. Brick, P. Carter, M. M. Y. Waye, G. Winter, *Nature* **1985**, *314*, 235–238; b) J. S. Thorson, E. Chapman, P. G. Schultz, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 9361–9362.

[94] P. R. Connelly, R. A. Aldape, F. J. Bruzzese, S. P. Chambers, M. J. Fitzgibbon, M. A. Fleming, S. Itoh, D. J. Livingston, M. A. Navia, J. A. Thomson, K. P. Wilson, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1994**, *91*, 1964–1968.

[95] B. A. Shirley, P. Stanssens, U. Hahn, C. N. Pace, *Biochemistry* **1992**, *31*, 725–732.

[96] Y. W. Chen, A. R. Fersht, K. Henrick, *J. Mol. Biol.* **1993**, *234*, 1158–1170.

[97] S. K. Jandu, S. Ray, L. Brooks, R. J. Leatherbarrow, *Biochemistry* **1990**, *29*, 6264–6269.

[98] R. S. Bohacek, C. McMullan, *J. Med. Chem.* **1992**, *35*, 1671–1684.

[99] H. J. Schneider, T. Schiestel, P. Zimmermann, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 7698–7703.

[100] S. Vajda, Z. Weng, R. Rosenfeld, C. DeLisi, *Biochemistry* **1994**, *33*, 13977–13988.

[101] S. Krystek, T. Stouch, J. Novotny, *J. Mol. Biol.* **1993**, *234*, 661–679.

[102] N. Horton, M. Lewis, *Protein Sci.* **1992**, *1*, 169–181.

[103] C. N. Pace, *J. Mol. Biol.* **1992**, *226*, 29–35.

[104] a) J. L. Cohen, K. A. Connors, *J. Pharm. Sci.* **1970**, *59*, 1271; b) J. Gao, S. Qiao, G. M. Whitesides, *J. Med. Chem.* **1995**, *38*, 2292–2301.

[105] M. Matsumura, W. J. Becktel, B. W. Matthews, *Nature* **1988**, *334*, 406–410.

[106] F. M. Richards, *Annu. Rev. Biophys. Bioeng.* **1977**, *6*, 151–176.

[107] C. Chothia, *Nature* **1975**, *254*, 304–308.

[108] M. Matsumura, W. J. Becktel, B. W. Matthews, *Nature* **1988**, *334*, 406–410.

[109] K. A. Sharp, A. Nicholls, R. Friedman, B. Honig, *Biochemistry* **1991**, *30*, 9686–9697.

[110] A. P. Kaplan, P. A. Bartlett, *Biochemistry* **1991**, *30*, 8165–8170.

[111] R. A. Wiley, D. H. Rich, *Med. Res. Rev.* **1993**, *13*, 327–384.

[112] M. S. L. Lim, E. R. Johnston, C. A. Kettner, *J. Med. Chem.* **1993**, *36*, 1831–1838.

[113] H. Sakamoto, Y. Shimohigashi, T. Ogawa, K. Sakamoto, M. Ohno, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1991**, *64*, 2519–2523.

[114] a) W. P. Jencks, *Adv. Enzymol.* **1975**, *43*, 219–410; b) A. Fersht, *Enzyme Structure and Mechanism*, 2. Aufl., Freeman, New York, **1995**.

[115] a) T. W. Ku, F. E. Ali, L. S. Barton, J. W. Bean, W. E. Bondinell, J. L. Burgess, J. F. Callahan, R. R. Calvo, L. Chen, D. S. Eggleston, J. G. Gleason, W. F. Huffman, S. M. Hwang, D. Jakas, C. B. Karash, R. M. Keenan, K. D. Koppke, W. M. Miller, K. A. Newlander, A. Nichols, M. F. Parker, C. E. Peishoff, J. M. Samanen, I. Uzinskas, J. W. Venslavsky, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 8861–8862; b) P. R. Bovy, F. S. Tjoeng, J. G. Rico, T. E. Rogers, R. J. Lindmark, J. A. Zablocki, R. B. Garland, D. E. McMackins, H. Dayringer, M. V. Toth, M. E. Zupec, S. Rao, S. G. Panzer-Knodle, N. S. Nicholson, A. Salyers, B. B. Taite, M. Herin, M. Miyano, L. P. Feigen, S. P. Adams, *Bioorg. Med. Chem.* **1994**, *2*, 881–895; c) D. G. Alberg, S. L. Schreiber, *Science* **1993**, *262*, 248–250.

[116] R. Raag, T. L. Poulos, *Biochemistry* **1991**, *30*, 2674–2684.

[117] M. D. Paulsen, R. L. Ornstein, *J. Comput. Aided Mol. Des.* **1992**, *6*, 449–460.

[118] P. C. Weber, M. W. Pantoliano, D. M. Simons, F. R. Salemme, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 2717–2724.

[119] Y. Inoue, T. Hakushi, Y. Liu, L. H. Tong, B. J. Shen, D. S. Jin, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 475–481.

[120] T. Wieseman, S. Wiliston, J. Brandts, L. Lin, *Analyt. Biochem.* **1989**, *179*, 131–137.

[121] R. Hitzemann, *Trends Pharmacol. Sci.* **1988**, *9*, 408–411.

[122] R. Hitzemann, M. Murphy, J. Currell, *Eur. J. Pharmacol.* **1985**, *108*, 171–177.

[123] G. A. Weiland, G. P. Minnemann, P. B. Molinoff, *Mol. Pharmacol.* **1980**, *18*, 341–347.

[124] a) D. E. Epps, J. Cheney, H. Schostarez, T. K. Sawyer, M. Prairie, W. C. Krueger, F. Mandel, *J. Med. Chem.* **1990**, *33*, 2080–2086; b) B. C. Braden, W. Dall'Asqua, E. Eisenstein, B. A. Fields, F. A. Goldbaum, E. L. Malchiodi, R. A. Mariuzza, F. P. Schwartz, X. Ysern, R. J. Poljak, *Pharm. Acta Helv.* **1995**, *69*, 225–230.

[125] P. C. Weber, J. J. Wendlowski, M. W. Pantoliano, F. R. Salemme, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 3197–3200.

[126] E. Grunewald, C. Steel, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 5687–5692.

[127] D. H. Williams, M. S. Scarle, J. P. Mackay, U. Gerhard, R. A. Maplestone, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1993**, *90*, 1172–1178.

[128] K. P. Murphy, D. Xie, K. S. Thompson, L. M. Amzel, E. Freire, *Proteins Struct. Funct. Genet.* **1994**, *18*, 63–67.

[129] M. K. Holloway, J. M. Wai, T. A. Halgren, *J. Med. Chem.* **1995**, *38*, 305–317.

[130] P. D. J. Grootenhuis, P. J. M. Van Galen, *Acta Crystallogr. Sect. D* **1995**, *51*, 560–566.

[131] W. F. van Gunsteren, P. K. Weiner, *Computer simulations of biomolecular systems*, Escom, Leiden, **1989**.

[132] a) M. R. Reddy, V. N. Viswanadhan, J. N. Weinstein, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1991**, *88*, 10287–10291; b) B. G. Rao, R. F. Tilton, U. C. Singh, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 4447–4452.

[133] a) C. F. Wong, J. A. McCammon, *J. Am. Chem. Soc.* **1986**, *108*, 3830–3832; b) L. M. Hansen, P. A. Kollman, *J. Comput. Chem.* **1990**, *11*, 994–1002; c) K. M. Merz, M. A. Murcko, P. A. Kollman, *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 4484–4490; d) J. J. McDonald, C. L. Brooks III, *ibid.* **1991**, *113*, 2295–2301; e) S. Miyamoto, P. A. Kollman, *Proteins* **1993**, *16*, 226–245; f) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1993**, *90*, 8402–8406.

[134] a) P. A. Kollman, *Chem. Rev.* **1993**, *93*, 2395–2417; b) *Curr. Opin. Struct. Biol.* **1994**, *4*, 240–245.

[135] A. Warshel, H. Tao, M. Fothergill, Z. T. Chu, *Isr. J. Chem.* **1994**, *34*, 263–256.

[136] B. Honig, A. Nicholls, *Science* **1995**, *268*, 1144–1149.

[137] Y. K. Kang, K. D. Gibson, G. Nemethy, H. A. Scheraga, *J. Phys. Chem.* **1988**, *92*, 4739–4742.

[138] R. L. Williams, J. Vila, G. Perrot, H. A. Scheraga, *Proteins* **1992**, *14*, 110–119.

[139] C. J. Cramer, D. G. Truhlar, *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 8305–8311.

[140] C. J. Cramer, D. G. Truhlar, *J. Comput. Aided Mol. Des.* **1992**, *6*, 629–666.

[141] G. Klebe, *Perspect. Drug Des. Develop.* **1995**, *3*, 85–105.

[142] M. Saunders, *J. Comput. Chem.* **1991**, *12*, 645–663.

[143] M. Saunders, K. N. Houk, Y. D. Wu, W. C. Still, M. Lipton, G. Chang, W. C. Guida, *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 1419–1427.

[144] K. A. Watson, E. P. Mitchell, L. N. Johnson, J. C. Son, C. J. F. Bichard, M. G. Orchard, G. W. J. Fleet, N. G. Oikonomakos, D. D. Leonidas, M. Kontou, A. Papageorgiou, *Biochemistry* **1994**, *33*, 5745–5758.

[145] K. A. Watson, E. P. Mitchell, L. N. Johnson, J. C. Son, C. J. F. Bichard, G. W. J. Fleet, P. Ford, D. J. Watkin, N. G. Oikonomakos, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1993**, 654–656.

[146] G. Klebe in *Structure Correlation* (Hrsg.: H. B. Bürgi, J. D. Dunitz), VCH, Weinheim, **1994**, Kap. 13, S. 543–603.

[147] E. M. Ricketts, J. Bradshaw, M. Hann, F. Hayes, N. Tanna, D. M. Ricketts, *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* **1993**, *33*, 905–925.

[148] M. C. Nicklaus, S. Wang, J. S. Driscoll, G. W. A. Milne, *Bioorg. Med. Chem.*, im Druck.

[149] G. Klebe, T. Mietzner, *J. Comput. Mol. Aided Des.* **1994**, *8*, 583–606.

[150] D. A. Matthews, J. T. Bolin, J. M. Burridge, D. J. Filman, K. W. Volz, J. Kraut, *J. Biol. Chem.* **1985**, *260*, 392–399.

[151] G. Klebe, *Struct. Chem.* **1990**, *1*, 597–616.

[152] G. Klebe, *J. Mol. Struct. Theochem* **1994**, *308*, 53–89.

[153] M. Sundaralingam, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1975**, 255.

[154] W. Saenger, *Angew. Chem.* **1973**, *85*, 680–690; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1973**, *12*, 591–601.

[155] H. W. Hoeffken, S. H. Knof, P. A. Bartlett, R. Huber, H. Moellering, G. Schumacher, *J. Mol. Biol.* **1988**, *204*, 417–433.

[156] M. Coll, S. H. Knof, Y. Ohga, A. Messerschmidt, R. Huber, H. Moellering, L. Rüssmann, G. Schumacher, *J. Mol. Biol.* **1990**, *214*, 597–610.

[157] G. Klebe in *The Application of Charge Density to Chemistry and Drug Design* (Hrsg.: G. A. Jeffrey), Plenum, S. 287.

[158] M. Häser, R. Ahlrichs, *J. Comput. Chem.* **1989**, *10*, 104–111.

[159] M. A. Spackman, *Chem. Rev.* **1992**, *92*, 1769–1797.

[160] H. Kim, W. N. Lipscomb, *Biochemistry* **1991**, *30*, 8171–8180.

[161] T. Ashida, Y. Tsunogae, I. Tanaka, T. Yamane, *Acta Crystallogr. Sect. B* **1987**, *43*, 212–218.

[162] H. R. Loosli, H. Kessler, H. Oschkinat, H. P. Weher, T. J. Petcher, A. Widmer, *Helv. Chim. Acta* **1985**, *68*, 682–704.

[163] H. Kessler, M. Köck, T. Wein, M. Gehrke, *Helv. Chim. Acta* **1990**, *73*, 1818–1832.

[164] C. Weber, G. Wider, B. von Freyberg, R. Traber, W. Braun, A. Widmer, K. Wüthrich, *Biochemistry* **1991**, *30*, 6563–6574.

[165] S. W. Fesik, Vortrag auf dem 206th Am. Chem. Soc. Natl. Meeting, Chicago, **1993**.

[166] L. H. Weaver, W. R. Kester, B. W. Matthews, *J. Mol. Biol.* **1977**, *114*, 119–132.

[167] S. I. Foundling, J. Cooper, F. E. Watson, A. Cleasby, L. H. Pearl, B. L. Sibanda, A. Hemmings, S. P. Wood, T. L. Blundell, M. J. Valler, C. G. Norey, J. Kay, J. Boger, B. M. Dunn, B. J. Leckie, D. M. Jones, B. Atrash, A. Hallett, M. Szelke, *Nature* **1987**, *327*, 349–352.

[168] P. J. DeClerq, J. Hofslack, S. Cauwbergh, QCPE Program No. QCMP079.

[169] A. Zhang, R. G. Nanni, T. Li, G. F. Arnold, D. A. Oren, A. Jacobo-Molina, R. L. Williams, G. Kamer, D. A. Rubenstein, Y. Li, E. Rozhon, S. Cox, P. Buontempo, J. O. Connell, J. Schwartz, G. Miller, B. Bauer, R. Versace, P. Pinto, A. Ganguly, V. Girijavallabhan, E. Arnold, *J. Mol. Biol.* **1993**, *230*, 857–867.

[170] R. Bone, D. Frank, C. Kettner, D. A. Agrad, *Biochemistry* **1987**, *26*, 7609–7614.

[171] A. Sali, B. Veerapandian, J. B. Cooper, D. S. Moss, T. Hoffmann, T. L. Blundell, *Proteins: Struct. Funct. Genet.* **1992**, *12*, 158–170.

[172] J. Rahuel, J. P. Priestle, M. G. Grüter, *J. Struct. Biol.* **1991**, *107*, 227–236.

[173] M. Clare, *Perspect. Drug Discovery Des.* **1993**, *1*, 49–68.

[174] S. C. Pettit, S. F. Michael, R. Swanstrom, *Perspect. Drug Discovery Des.* **1993**, *1*, 69–83.

[175] M. L. Moore, G. B. Dreyer, *Perspect. Drug Discovery Des.* **1993**, *1*, 85–108.

[176] D. W. Banner, P. Hadváry, *J. Biol. Chem.* **1991**, *166*, 20085–20093.

[177] K. Appelt, *Perspect. Drug Discovery Des.* **1993**, *1*, 23–48.

[178] J. T. Bolin, D. J. Filman, D. A. Matthews, R. C. Hamlin, J. Kraut, *J. Biol. Chem.* **1982**, *257*, 13650–13662.

[179] C. Bystroff, S. J. Oatley, J. Kraut, *Biochemistry* **1987**, *26*, 3263–3277.

[180] J. Badger, I. Minor, M. J. Kremer, M. A. Oliveira, T. J. Smith, J. P. Griffith, D. M. A. Guerin, S. Krishnasamy, M. Luo, M. G. Rossmann, M. A. McKinlay, G. T. D. Diana, F. J. Dutko, M. Fancher, R. R. Rueckert, B. A. Heinz, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1988**, *85*, 3304–3308.

[181] G. Klebe in *3D QSAR in Drug Design* (Hrsg.: H. Kubinyi), Escom, Leiden, **1993**, S. 173–199.

[182] W. R. Kester, B. W. Matthews, *Biochemistry* **1977**, *16*, 2506–2516.

[183] D. Banner, J. Ackermann, A. Gast, K. Gubernator, P. Hadváry, K. Hilpert, L. Labler, K. Müller, G. Schmid, T. Tschopp, H. van den Waterbeemd, B. Wirz in *Perspectives in Medical Chemistry* (Hrsg.: B. Testa, E. Kyburz, W. Fuhrer, R. Giger), Helvetica Chimica Acta & VCH, Basel, **1993**, S. 27–43.

[184] A. Wojtczak, J. Luft, V. Cody, *J. Biol. Chem.* **1992**, *267*, 353–357.

[185] C. Mattos, D. Ringe in *3D QSAR in Drug Design* (Hrsg.: H. Kubinyi), Escom, Leiden, **1993**, S. 226–254.

[186] C. Mattos, B. Rasmussen, X. Ding, G. A. Petsko, D. Ringe, *Struct. Biol.* **1994**, *1*, 55–58.

[187] T. L. Poulos, A. J. Howard, *Biochemistry* **1987**, *26*, 8165–8174.

[188] O. Matsumoto, T. Taga, M. Matsushima, T. Higashi, K. Machida, *Chem. Pharm. Bull.* **1990**, *38*, 2253–2255.

[189] E. F. Meyer, R. Radhakrishnan, G. J. M. Cole, L. G. Presta, *J. Mol. Biol.* **1986**, *189*, 533–539.

[190] E. Rutenber, E. B. Fauman, R. J. Keenan, S. Fong, P. S. Furth, P. R. Ortiz de Montellano, E. Meng, I. D. Kuntz, D. L. DeChamp, R. Salto, J. R. Rose, C. S. Craik, R. M. Stroud, *J. Biol. Chem.* **1993**, *268*, 15343–15346.

[191] D. L. Gatti, B. A. Palfey, M. S. Lah, B. Entsch, V. Massey, D. P. Ballou, M. L. Ludwig, *Science* **1994**, *266*, 110–114.

[192] S. L. Roderick, M. C. Fournie-Zaluski, B. P. Roques, B. W. Matthews, *Biochemistry* **1989**, *28*, 1493–1497.

[193] T. Imoto, L. N. Johnson, A. C. T. North, D. C. Phillips, J. A. Rupley in *The Enzymes*, Vol. VII (Hrsg.: P. D. Boyer), 3. Aufl., Academic Press, New York, **1972**, S. 665–868.

[194] J. C. Cheetham, P. J. Artymuk, D. C. Phillips, *J. Mol. Biol.* **1992**, *224*, 613–628.

[195] J. J. Baldwin, G. S. Ponticello, P. S. Anderson, M. E. Christy, M. A. Murcko, W. C. Randall, H. Schwam, M. F. Sugrue, J. P. Springer, P. Gautheron, J. Grove, P. Mallorga, M. P. Viader, B. M. McKeever, M. A. Navia, *J. Med. Chem.* **1989**, *32*, 2510–2513.

[196] M. Marquart, J. Walter, J. Deisenhofer, W. Bode, R. Huber, *Acta Crystallogr. Sect. B* **1983**, *39*, 480–490.

[197] R. K. Wierenga, M. E. M. Noble, R. C. Davenport, *J. Mol. Biol.* **1992**, *224*, 1115–1126.

[198] B. W. Matthews, *Acc. Chem. Res.* **1988**, *21*, 333–340.

[199] J. A. Montgomery, S. Niwas, J. D. Rose, J. A. Secrist III, Y. S. Babu, C. E. Bugg, M. D. Erion, W. C. Guida, S. E. Ealick, *J. Med. Chem.* **1993**, *36*, 55–69.

[200] M. C. Allen, W. Fuhrer, B. Tuck, R. Wade, J. M. Wood, *J. Med. Chem.* **1989**, *32*, 1652–1661.

[201] R. D. Cramer III, D. E. Patterson, J. D. Bunce, *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, *110*, 5959–5967.

[202] Y. Kato, A. Itai, Y. Ittaka, *Tetrahedron* **1987**, *43*, 5229–5236.

[203] Y. Kato, A. Inoue, M. Yamada, N. Tomioka, A. Itai, *J. Comput. Aided Mol. Des.* **1992**, *6*, 475–486.

[204] R. B. Herrmann, D. K. Herron, *J. Comput. Aided Mol. Des.* **1991**, *5*, 511–524.

[205] M. Manaut, F. Sanz, J. Jose, M. Milesi, *J. Comput. Aided Mol. Des.* **1991**, *5*, 371–380.

[206] A. C. Good, E. E. Hodgkin, W. G. Richards, *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* **1992**, *32*, 188–191.

[207] P. M. Dean, P. L. Chau, *J. Mol. Graph.* **1987**, *5*, 152–164.

[208] P. M. Dean, P. Callow, P. L. Chau, *J. Mol. Graph.* **1988**, *6*, 28–34.

[209] S. K. Kearsley, G. M. Smith, *Tetrahedron Comput. Methodol.* **1990**, *3*, 615–633.

[210] G. Klebe, T. Mietzner, F. Weber, *J. Comput. Aided Mol. Des.* **1994**, *8*, 751–778.

[211] A. F. Monzingo, B. W. Matthews, *Biochemistry* **1984**, *23*, 5724–5729.

[212] N. C. Cohen, J. M. Blaney, C. Humblet, P. Gund, D. C. Barry, *J. Med. Chem.* **1990**, *33*, 883–894.

[213] F. C. Wierko, G. E. Kellogg, D. J. Abraham, *J. Med. Chem.* **1991**, *34*, 758–767.

[214] G. E. Kellogg, G. S. Joshi, D. J. Abraham, *Med. Chem. Res.* **1992**, *1*, 444–453.

[215] A. Nicholls, K. A. Sharp, B. H. Honig, *Proteins* **1991**, *11*, 281–296.

[216] M. L. Connolly, *Biopolymers* **1992**, *32*, 1215–1236.

[217] R. A. Lewis, *J. Comput. Aided Mol. Des.* **1989**, *3*, 133–147.

[218] G. J. Kleywegt, T. A. Jones, *Acta Crystallogr. Sect. D* **1994**, *50*, 178–185.

[219] P. J. Goodford, *J. Med. Chem.* **1985**, *28*, 849–857.

[220] D. N. A. Boobbyer, P. J. Goodford, P. M. McWhinnie, R. C. Wade, *J. Med. Chem.* **1989**, *32*, 1083–1094.

[221] N. Tomioka, A. Itai, *J. Comput. Aided Mol. Des.* **1994**, *8*, 347–366.

[222] W. L. Jorgensen, J. Tirado-Rives, *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, *110*, 1657–1666.

[223] W. D. Cornell, P. Cieplak, C. I. Bayly, I. R. Gould, K. M. Merz, D. M. Ferguson, D. C. Spellmeyer, T. Fox, J. W. Caldwell, P. A. Kollman, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 5179–5197.

[224] J. R. Maple, M. J. Hwang, T. P. Stockfisch, U. Dinur, M. Waldman, C. Ewig, A. T. Hagler, *J. Comput. Chem.* **1994**, *15*, 162–182.

[225] T. Halgren, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 7827–7843.

[226] A. Miranker, M. Karplus, *Proteins: Struct. Funct. Genet.* **1991**, *11*, 29–34.

[227] G. Klebe, *J. Mol. Biol.* **1994**, *237*, 212–235.

[228] C. L. Brooks, M. Karplus, B. M. Pettit, *Proteins: a theoretical perspective of dynamics, structure and thermodynamics*, Wiley, New York, **1988**.

[229] J. A. McCammon, S. C. Harvey, *Dynamics of proteins and nucleic acids*, Cambridge University Press, Cambridge, **1987**.

[230] H. Q. Ding, N. Karasawa, W. A. Goddard III, *J. Chem. Phys.* **1992**, *97*, 4309–4315.

[231] J. A. Board, J. W. Causey, J. F. Leathrum, A. Windemuth, K. Schulten, *Chem. Phys. Lett.* **1992**, *198*, 89–94.

[232] J. A. Braatz, *J. Biomol. Struct. Dyn.* **1992**, *9*, 935.

[233] I. Chandrasekhar, G. M. Clore, A. Szabo, A. M. Gronenborn, B. R. Brooks, *J. Mol. Biol.* **1992**, *226*, 239–250.

[234] K. Lim, J. N. Herron, *Biochemistry* **1995**, *34*, 6962–6974.

[235] Y. C. Martin, *J. Med. Chem.* **1992**, *35*, 2145–2154.

[236] J. M. Blaney, J. S. Dixon, *Perspect. Drug Discovery Des.* **1993**, *1*, 301–319.

[237] I. D. Kuntz, E. C. Meng, B. K. Shoichet, *Acc. Chem. Res.* **1994**, *27*, 117–123.

[238] R. L. DesJarlais, R. P. Sheridan, G. L. Seibel, J. S. Dixon, I. D. Kuntz, R. Venkataraghavan, *J. Med. Chem.* **1988**, *31*, 722–729.

[239] E. C. Meng, B. K. Shoichet, I. D. Kuntz, *J. Comput. Chem.* **1992**, *13*, 505–524.

[240] E. C. Meng, D. A. Gschwend, J. M. Blaney, I. D. Kuntz, *Proteins* **1993**, *17*, 266–278.

[241] I. D. Kuntz, *Science* **1992**, *257*, 1078–1082.

[242] B. K. Shoichet, R. M. Stroud, D. V. Santi, I. D. Kuntz, K. M. Perry, *Science* **1993**, *259*, 1445–1450.

[243] Z. Li, X. Chen, E. Davidson, O. Zwang, C. Mendis, C. S. Ring, W. R. Roush, G. Fegley, R. Li, P. J. Rosenthal, G. K. Lee, G. L. Kenyon, I. D. Kuntz, F. E. Cohen, *Chem. Biol.* **1994**, *1*, 31–37.

[244] M. C. Lawrence, P. C. Davis, *Proteins* **1992**, *12*, 31–41.

[245] M. D. Miller, S. K. Kearsley, D. J. Underwood, R. P. Sheridan, *J. Comput. Aided Mol. Des.* **1994**, *8*, 153–174.

[246] H. J. Böhm, *J. Comput. Aided Mol. Des.* **1994**, *8*, 623–632.

[247] R. A. Lewis, A. R. Leach, *J. Comput. Aided Mol. Des.* **1994**, *8*, 467–475.

[248] H. J. Böhm in *3D-QSAR in drug design* (Hrsg.: H. Kubinyi), Escom, Leiden, **1993**, S. 386–405.

[249] Y. Nishibata, A. Itai, *Tetrahedron* **1991**, *47*, 8985–8990.

[250] Y. Nishibata, A. Itai, *J. Med. Chem.* **1993**, *36*, 2921–2928.

[251] R. S. Bohacek, C. McMartin, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 5560–5571.

[252] D. K. Gehlhaar, K. E. Moerder, D. Zichi, C. J. Sherman, R. C. Ogden, S. T. Freer, *J. Med. Chem.* **1995**, *38*, 466–472.

[253] J. B. Moon, W. J. Howe, *Proteins* **1991**, *11*, 314–328.

[254] V. Tschinke, N. C. Cohen, *J. Med. Chem.* **1993**, *36*, 3863–3870.

[255] S. H. Rotstein, M. A. Murcko, *J. Med. Chem.* **1993**, *36*, 1700–1710.

[256] M. B. Eisen, D. C. Wiley, M. Karplus, R. E. Hubbard, *Proteins* **1994**, *19*, 199–221.

[257] A. Caflish, A. Miranker, M. Karplus, *J. Med. Chem.* **1993**, *36*, 2142–2167.

[258] R. A. Lewis, D. C. Roe, C. Huang, T. E. Ferrin, R. Langridge, I. D. Kuntz, *J. Mol. Graphics* **1992**, *10*, 66–78.

[259] V. J. Gillet, A. P. Johnson, P. Mata, S. Sike, *Tetrahedron Comput. Methodol.* **1990**, *3*, 681–696.

[260] V. Gillet, P. Johnson, P. Mata, S. Sike, P. Williams, *J. Comput. Aided Mol. Des.* **1993**, *7*, 127–153.

[261] P. Mata, V. J. Gillet, P. Johnson, J. Lampreia, G. J. Myatt, S. Sike, A. L. Stubbings, *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* **1995**, *35*, 479–493.

[262] S. H. Rotstein, M. A. Murcko, *J. Comput. Aided Mol. Des.* **1993**, *7*, 23–43.

[263] P. A. Bartlett, G. T. Shea, S. J. Telfer, S. Waterman in *Molecular Recognition: Chemical and Biological Problems* (Hrsg.: S. M. Roberts), Royal Society London, **1989**, S. 182–196.

[264] P. A. Pearlman, M. A. Murcko, *J. Comput. Chem.* **1993**, *14*, 1184–1193.

[265] R. A. Lewis, P. M. Dean, *Proc. R. Soc. London B* **1989**, *236*, 125–140.

[266] R. A. Lewis, P. M. Dean, *Proc. R. Soc. London B* **1989**, *236*, 141–162.

[267] P. L. Chau, P. M. Dean, *J. Comput. Aided Mol. Des.* **1992**, *6*, 385–396.

[268] J. VanDrie, D. Weininger, Y. C. Martin, *J. Comput. Aided Mol. Des.* **1989**, *3*, 225–251.

[269] H. J. Böhm, *J. Comput. Aided Mol. Des.* **1992**, *6*, 61–78.

[270] H. J. Böhm, *J. Comput. Aided Mol. Des.* **1992**, *6*, 593–606.

[271] Das *Fine Chemicals Directory* (FCD) und das *Available Chemicals Directory* (ACD) werden durch Molecular Design, San Leandro, 2132 Farallon Drive, CA 94577, USA vertrieben.

[272] Programm CONCORD, vertrieben durch Tripos Ass., 1699 S. Hanley Rd., St. Louis, MO 63144, USA.

[273] J. Sadowski, C. Rudolph, J. Gasteiger, *Tetrahedron Comput. Methodol.* **1990**, *3*, 537–547.

[274] M. Mares-Guia, E. Shaw, *J. Biol. Chem.* **1965**, *240*, 1579–1585.

[275] M. Recanatini, T. Klein, C. Z. Yang, J. McClarin, R. Langridge, C. Hansch, *Mol. Pharmacol.* **1986**, *29*, 436–446.

[276] LUDI kann von BIOSYM Technologies, 9685 Scranton Road, San Diego, CA 92121–2777, USA, bezogen werden.

[277] M. A. Gallop, R. W. Barrett, W. J. Dower, S. P. A. Fodor, E. M. Gordon, *J. Med. Chem.* **1994**, *37*, 1233–1248, 1385–1401.

[278] R. N. Zuckermann, E. J. Martin, D. C. Spellmeyer, G. B. Stauber, K. R. Shoemaker, J. M. Kerr, G. M. Figliozzi, D. A. Goff, M. A. Siani, R. J. Simon, S. C. Banville, E. G. Brown, L. Wang, L. S. Richter, W. H. Moos, *J. Med. Chem.* **1994**, *37*, 2678–2685.

[279] G. Jung, A. G. Beck-Sickinger, *Angew. Chem.* **1992**, *104*, 375–391; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1992**, *34*, 367–383; T. Carell, E. A. Wintner, J. Rebek, Jr., *ibid.* **1994**, *106*, 2159–2162, 2162–2165 bzw. **1994**, *33*, 2059–2061, 2061–2064; J. K. Chen, S. L. Schreiber, *ibid.* **1995**, *107*, 1041–1058 bzw. **1995**, *34*, 953–969.

## Die Stellung von Literaturverweisen

Mancher Autor hat schon sich oder uns gefragt, warum wir in der deutschen Ausgabe der *Angewandten Chemie* Hinweise auf Literaturzitate **vor** und in der englischen Ausgabe **hinter** Satzzeichen plazieren. Eine deshalb eingeleitete „Nachforschung“ hat nun ergeben, daß auch in deutschsprachigen Empfehlungen zur Gestaltung wissenschaftlicher Texte der Plazierung hinter dem Satzzeichen der Vorzug gegegen wird.<sup>[1]</sup> Aus diesem Grund und um uns und den Autoren das Leben zu erleichtern, werden wir daher **ab Januar 1997** auch in der deutschen Ausgabe die Literaturverweise **hinter** die Satzzeichen stellen. Unsere Autoren bitten wir, ab sofort bei eingereichten Manuskripten diese neue Gestaltung bereits zu berücksichtigen.

Vielen Dank

Die Redaktion

[1] *Rechtschreibung der deutschen Sprache und der Fremdwörter* (Duden Band 1), 19. Aufl., Bibliographisches Institut, Mannheim, **1986**, S. 73; H. F. Ebel, C. Bliefert, *Schreiben und Publizieren in den Naturwissenschaften*, 3. Aufl., VCH, Weinheim, **1994**, S. 227, 369.