

Ein neuartiges Verfahren zur Wirkstoffsuche mit einem kombinatorisch-rationalen Ansatz

Horst Kessler*

Die Suche nach neuen Leitstrukturen zur Arzneimittelentwicklung beinhaltet schon immer zufällige Entdeckungen ebenso wie „rationales“ Design. Die Chance für das zufällige Auffinden von Wirkstrukturen wurde durch Screening von Substanzpools erhöht. Beim rationalen Ansatz optimiert der auf medizinischem Gebiet arbeitende Chemiker die Wirkstoffeigenschaften anhand seiner Erfahrung oder basierend auf der molekularen Struktur des Wirkstoffs. Der extremen Überbetonung des rationalen Ansatzes, die sicherlich auch auf die suggestive Kraft bunter Computerdarstellungen der Moleküle zurückzuführen ist, folgte die Ernüchterung, weil ein Wirkstoff mit den gewünschten vielfältigen Eigenschaften, wie hohe Aktivität und Selektivität, metabolische Stabilität und Bioverfügbarkeit, allein durch molekulares Design nicht zu erreichen ist. Dennoch spielt das Design in direkter oder indirekter Weise eine große Rolle beim Auffinden neuer Pharmaka.

Seit einigen Jahren äußern namhafte Vertreter der pharmazeutischen Forschung, daß rationale Ansätze nicht weiter führen, und wenden sich ganz der Kombinatorik zu. „Kombi-chem“, wie das neue Schlagwort heißt, wird der Pharmaforschung sicherlich viele neue Impulse geben,^[1] wenn sich auch die Grenzen der neuen Entwicklung schon abzeichnen.^[1] Extreme Standpunkte sind immer nur kurze Zeit von Bedeutung und die Frage wird nicht sein, „Kombi-chem oder rationales Design“, denn beide Techniken können die Suche nach und die Entwicklung von Arzneimitteln beschleunigen.

Durch das tiefere Verständnis der biologischen Vorgänge im gesunden oder kranken Organismus wurden in den letzten Jahren immer mehr Verbindungen identifiziert, deren Inhibierung oder Aktivierung durch ein Pharmakon ein vielversprechendes Ziel ist. Dabei spielen vor allem Proteine, z. B. in Form von Enzymen, Rezeptoren oder Inhibitoren, eine entscheidende Rolle. Deren gentechnische Identifizierung, Exprimierung, Isotopenmarkierung und Strukturaufklärung ermöglicht eine gezielte strukturorientierte Suche nach Partnerverbindungen zur Bildung molekularer Komplexe, um die gewünschten biologischen Effekte zu erreichen.

Die Entwicklung von Substraten mit optimaler Anpassung an Falten oder Taschen der Proteinrezeptoren war schwieriger als

ursprünglich angenommen, weil molekulare Erkennung nicht auf einem einfachen „Andocken“ gegebener Oberflächen beruht, sondern auf einem doppelt induzierten „Fit“, bei dem sich die Moleküle dynamisch aneinander anpassen.

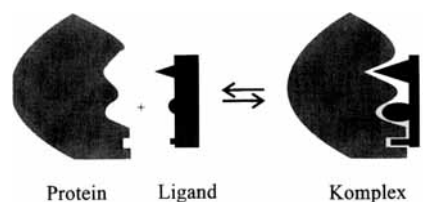


Abb. 1. Beiderseitige induzierte Anpassung von Rezeptor und Substrat bei der molekularen Erkennung.

Darüber hinaus ist die für die Stabilität eines Komplexes entscheidende Freie Enthalpie rechnerisch schwer zugänglich, und oftmals füllen Wassermoleküle in unvorhersehbarer Weise Lücken im Bindungsbereich aus oder leiten Wasserstoffbrücken über weite Bereiche.^[2] So können mit den molekularen Strukturen zwar bekannte Substrate verbessert werden, aber das *De-novo*-Design neuer Substrate muß sich trotz vielversprechender Ansätze (z. B. mit dem Programmpaket LUDI)^[2] noch bewähren.

Daher gibt man zur Zeit dem Absuchen von Substanzgemischen („Bibliotheken“) absoluten Vorrang. Enthält eine solche Bibliothek eine aktive Verbindung, versucht man sie durch mehr oder weniger raffinierte Verfahren zu identifizieren. Wenn es gelingt, auf einfache Weise große Bibliotheken mit struktureller Vielfalt zu synthetisieren, spart man sich viele biologische Tests sowie die mühsame Einzelsynthese und Reinigung möglicher Substrate. Der Nachteil dieses Verfahrens liegt vor allem darin, daß bei großen Bibliotheken nur sehr aktive Verbindungen aufzufinden sind, da die Empfindlichkeit des biologischen Testsystems begrenzt ist. Außerdem muß noch eine ausreichende Strukturvielfalt mit verschiedensten funktionellen Gruppen erzielt werden. Amid- und Esterbindungen sind nur bedingt zu verwenden, weil sie den Anwendungsbereich im Pharmasektor oft einschränken.^[3]

In einer kürzlich erschienenen, bahnbrechenden Arbeit der Gruppe Fesik, Abbott Laboratories, werden die Vorteile beider Techniken – des rationalen Ansatzes und der Kombinatorik – auf elegante Weise vereinigt: „SAR durch NMR“, d. h. Struktur-Aktivitäts-Beziehung durch NMR-Spektroskopie.^[4] Das

[*] Prof. Dr. H. Kessler
Institut für Organische Chemie und Biochemie
der Technischen Universität München
Lichtenbergstraße 4, D-85747 Garching
Telefax: Int. + 89/289-13210
E-mail: kessler@artus.org.chemie.tu-muenchen.de

neue Verfahren^[5] ist eine interessante Alternative. Bei einem ^{15}N -isotopenmarkierten Protein mit einer relativen Molekülmasse bis zu ca. 30 kDa kann man die Protonen- und ^{15}N -NMR-Signale der Amidbindung durch heteronucleare NMR-Techniken meist relativ einfach zuordnen. Die ^{15}N - ^1H -Paare liefern im zweidimensionalen (2D-)HSQC-Spektrum^[6] eines gefalteten Proteins gut aufgelöste Spektren. Setzt man nun der Lösung eines solchen ^{15}N -angereicherten Proteins ein ausreichend affines Substrat zu, so treten im HSQC-NMR-Spektrum Signalverschiebungen für alle Gruppen in der Nähe der Bindungsstelle auf.

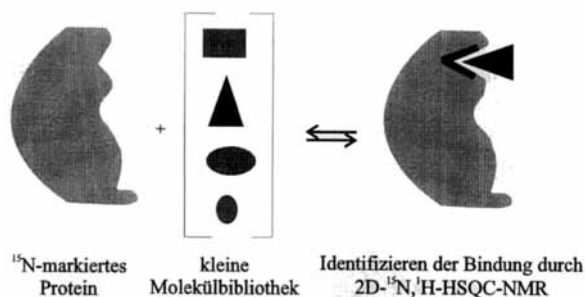


Abb. 2. Absuchen von Substanzbibliotheken auf bindende Liganden durch NMR-Spektroskopie. Ein Ligand induziert in der Nähe der Bindungsstelle eine Änderung der chemischen Verschiebungen der NH-Protonen und der Stickstoffatome, die durch 2D- ^{15}N , ^1H -NMR-Spektroskopie nachgewiesen wird.

Am Beispiel des für die Immunsuppression bei Organtransplantationen wichtigen ^{15}N -markierten FKBP^[7] (FK506^[8] binding protein) wurden Liganden gesucht, indem HSQC-Spektren (Meßzeit 10 min im automatisierten Betrieb am 500-MHz-NMR-Gerät) mit Gemischen aus jeweils zehn Verbindungen des firmeneigenen Substanzpools aufgenommen wurden. Wenn genügend Protein zur Verfügung steht, kann ein Substanzpool von ca. 1000 Verbindungen in einer Meßzeit von etwa 1 d getestet werden. Wird ein Molekül aus der Substanzmischung gebunden, kommt es zur Verschiebung der Signale der NH-Protonen an der Bindungsstelle. Der Ort der Bindung kann so identifiziert werden. In den aktiven Substanzgemischen ist die aktive Einzelsubstanz mit wenigen Messungen zu identifizieren.

Fesik et al. wählten zwei Verbindungen aus, die mit unterschiedlichen, aber benachbarten Bindungsstellen im submillimolaren Bereich interagierten. In wenigen Versuchen wurden die Substituenten an den beiden Grundstrukturen optimiert und dann mit NMR-Methoden die Struktur und damit die genaue Lage der Liganden des ternären Komplexes ermittelt. Anschließend wurden Linker zur Verknüpfung der Liganden per Computer modelliert. Die Synthese von nur fünf Verbindungen ergab, daß alle im nanomolaren Bereich binden. Die beste Verbindung inhibiert mit einer K_d von 19 nmol.

Die Effizienz dieses Verfahrens ist beeindruckend. Sie beruht darauf, daß die Vorteile des strukturorientierten Designs mit den Vorteilen des Screenings von Substanzpools kombiniert werden. Das ist echtes „Kombi-Chem-Design“. Durch die Möglichkeit, ein Screening von Substrukturen komplexer Liganden durchzuführen, ist bei zwei Bindungsstellen eine Bibliothek von jeweils 1000 Verbindungen einer herkömmlichen Bibliothek von $1000 \times 1000 = 1$ Million Einzelverbindungen äquivalent. Von Vorteil ist auch, daß für die Einzelliganden nur eine schwache

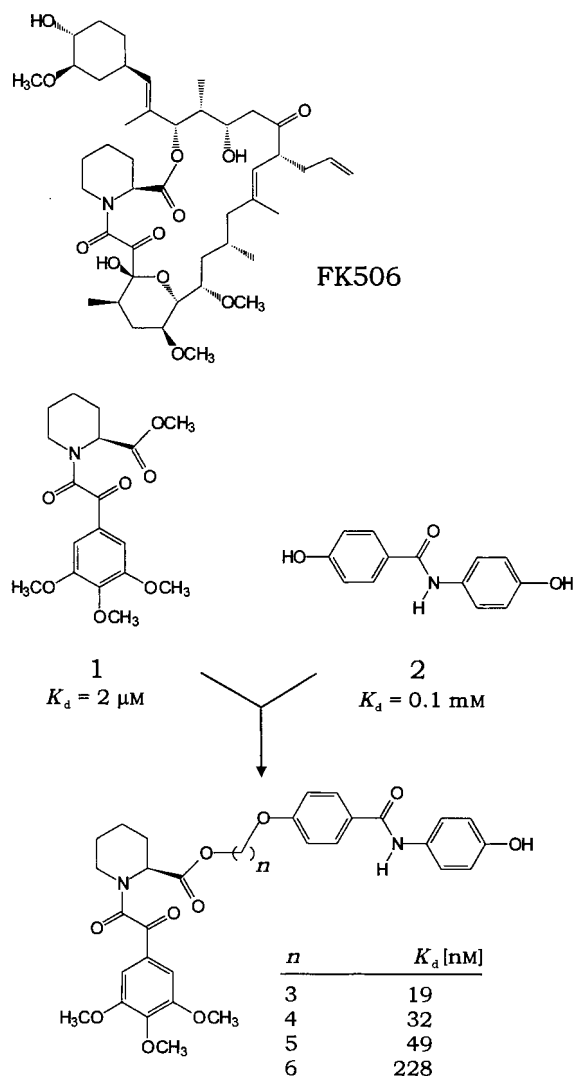


Abb. 3. FK506 und zwei mit „SAR durch NMR“ identifizierte schwach bindende Liganden und deren Verknüpfung. Während der Ligand 1 noch wegen der Struktur-analogie zu FK506 rational ableitbar scheint, gilt dies für den zweiten, schwach bindenden Liganden nicht. Erst die Identifizierung der Bindungsstellen durch NMR-Spektroskopie lieferte einen raschen Zugang zu der Art der Verknüpfung und damit dem hochaffinen Liganden.

Bindung nötig ist. Man erhält als Bindungsaffinitäten nicht nur das Produkt der Bindungskonstanten der Einzelsubstrate, sondern gewinnt einen zusätzlichen Beitrag durch deren Knüpfung [Gl. (1)].

$$\Delta G_{AB} = \Delta G_A + \Delta G_B + \Delta G_{\text{link}} \quad (1)$$

Ein weiterer Vorteil des Verfahrens ist die Möglichkeit, allosterische Effekte direkt zu untersuchen. Wird ein zweiter Ligand nur in Gegenwart eines ersten gebunden, so kann der zweite durch Screening einer Bibliothek am Protein in Gegenwart des ersten Liganden identifiziert werden.

Natürlich ist auch dieses Verfahren nicht in allen Fällen anwendbar. So sollte die Proteingröße die 30-kDa-Marke nicht wesentlich überschreiten. Auch muß das Protein in guten Ausbeuten exprimierbar sein, so daß mindestens 200 mg ^{15}N -mar-

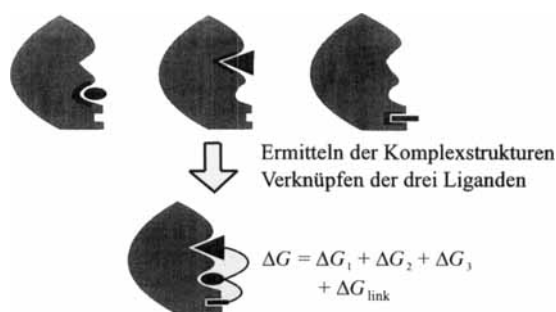


Abb. 4. Die Verknüpfung mehrerer Liganden, die an verschiedene Stellen binden, liefert superaktive Substrate.

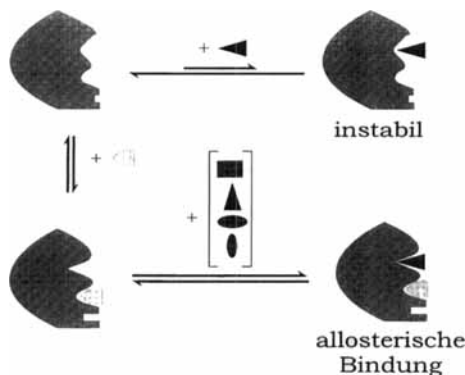


Abb. 5. Absuchen nach allosterischen Effekten. Der dreieckige Ligand wird nur gebunden, wenn auch die zweite Bindungsstelle besetzt ist. Daher wird der 1:1-Komplex von Protein und Ligand mit Bibliotheken auf weitere Bindungsstellen abgesucht.

kierte Substanz zugänglich sind. Doch gibt es dank der ständigen Erweiterung der biochemischen Kenntnisse pathogener Vorgänge auf molekularer Ebene noch sehr viele Aufgaben, die durch „SAR durch NMR“ bearbeitet werden können. Tatsächlich wurde die Methode durch Fesik et al. bereits erfolgreich auf andere Proteine angewendet.

Stichworte: Kombinatorische Chemie • Struktur-Aktivitäts-Beziehungen • Proteine • Wirkstoffdesign

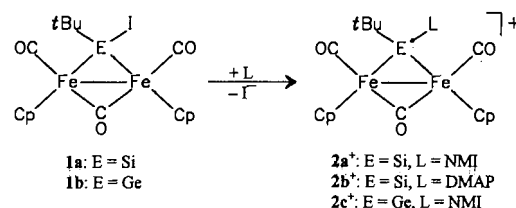
- [1] Ein Beispiel für Übersichtsartikel der letzten Jahre: F. Balkenhohl, C. von dem Bussche-Hünnefeldt, A. Lansky, C. Zechel, *Angew. Chem.* **1996**, *108*, 2436–2488; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1996**, *35*, 2289–2337.
- [2] H.-J. Böhm, G. Klebe, *Angew. Chem.* **1996**, *108*, 2750–2778; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1996**, *35*, 2588–2614.
- [3] *Trends and Future Perspectives in Peptide and Protein Drug Delivery* (Hrsg.: V. H. L. Lee, M. Hashida, Y. Mizushima), Harwood, Chur, Schweiz, **1995**.
- [4] S. B. Shuker, P. J. Hajduk, R. P. Meadows, S. W. Fesik, *Science*, **1996**, *274*, 1531–1534.
- [5] Es ist seit längerem bekannt, daß sich ^{15}N , ^1H -HSQC-Spektren zum Studium der Komplexierung oder Modifizierung, z. B. der Phosphorylierung, hervorragend eignen. Neu ist dagegen, daß sie systematisch zum Absuchen von Bibliotheken verwendet und zudem mit dem Prinzip des Verknüpfens von Liganden kombiniert werden: W. P. Jencks, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1981**, *78*, 4046–4050.
- [6] G. Bodenhausen, D. J. Ruben, *Chem. Phys. Lett.* **1980**, *69*, 185–189.
- [7] J. Liu, J. D. Farmer, Jr., W. S. Lane, J. Friedman, I. Weissman, S. L. Schreiber, *Cell* **1991**, *66*, 807–815.
- [8] H. Tanaka, A. Kuroda, H. Marusawa, H. Hatanaka, T. Kino, T. Goto, M. Hashimoto, T. Taga, *J. Am. Chem. Soc.* **1987**, *109*, 5031–5033.

Die erste Übergangsmetall-Germanium-Dreifachbindung

Ulrich Siemeling*

Die Chemie der Übergangsmetall-Carbin(= Alkylidin)-Komplexe spielt in der Metallorganischen Chemie eine wichtige Rolle. Man kennt mittlerweile eine Vielzahl von Komplexen mit terminalen und auch mit zwei- und dreifach verbrückenden CR-Liganden.^[1] Die Homologen des Kohlenstoffs findet man dagegen nur selten in ähnlichen Koordinationssituationen. Am längsten bekannt und noch relativ häufig sind Komplexe mit dreifach verbrückenden Silan- oder Germantriyleinheiten $\mu_3\text{-ER}$ (E = Si, Ge).^[2]

Die ersten Komplexe mit – allerdings basenstabilisierten – μ_2 -Silan- oder -Germantriyleinheiten wurden 1991 bzw. 1994 von Ogino, Tobita und Mitarbeitern beschrieben.^[3] Durch Austausch des Iodsubstituenten gegen eine starke Lewis-Base L entstehen aus den $\mu_2\text{-EtBuI}$ -verbrückten Dieisenkomplexen **1** die kationischen μ_2 -Silan- und -Germantriylkomplexe **2a**⁺–**2c**⁺ mit vierfach koordiniertem E (Schema 1). Die Peaks der ent-



Schema 1. Synthese der basenstabilisierten Komplexe **2**. NMI = *N*-Methylimidazol, DMAP = *N,N*-Dimethyl-4-pyridinamin.

sprechenden L-freien Kationen treten mit hoher Intensität in den FAB-Massenspektren der Komplexe **2**⁺ auf.

Grumbine, Tilley und Rheingold erhielten 1993 in einer Metathesereaktion aus dem Rutheniumkomplex **3** und $\text{Na}_2[\text{Os}(\text{CO})_4]$ den Heterodimetallkomplex **4** (Tol = *para*-Tolyl) mit einem planar trikoordiniertem Si-Atom (Winkelsumme 360.1°).^[4] Aus der röntgenographisch ermittelten Struktur von **4** folgt, daß von den drei sinnvollen Resonanzstrukturen **4A**–**4C** die zwitterionische Resonanzstruktur **4C** den wichtig-

[*] Priv.-Doz. Dr. U. Siemeling
Fakultät für Chemie der Universität
Universitätsstraße 25, D-33615 Bielefeld
Telefax: Int. + 521/106-6146
E-mail: usie@hrz.uni-bielefeld.de