

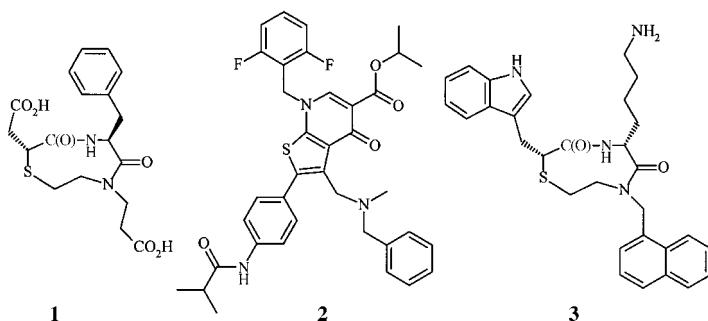
Sind β -Schleifenmimetika Mimetika für β -Schleifen?

Gerhard Müller,* Gerhard Hessler und Helene Y. Decornez

Dr. Pol Bamelis zum 60. Geburtstag gewidmet

Annähernd alle wichtigen physiologischen und pathophysiologischen Vorgänge im menschlichen Organismus werden auf molekularer Ebene von Peptid-Protein- und Protein-Protein-Interaktionen moduliert. Folglich stellen diese Erkennungssphänomene für die pharmazeutische Forschung attraktive Zielsysteme zur therapeutischen Intervention in ein breites Spektrum von Krankheitsgeschehen dar.^[1] Aus strukturchemischer Sicht kommt dabei den β -Schleifen als Trägern der molekularen Erkennung eine besondere Bedeutung zu, da sie im Sinne eines Pharmakophor-Arrangements eine sterisch kontrollierte Präsentation von zwei bis vier Interaktions-vermittelnden Aminosäureseitenketten ermöglichen.^[2] Die Beibehaltung der Orientierung der Aminosäureseitenketten bei gleichzeitigem Ersatz des peptidischen Rückgrats durch nichtpeptidische, wirkstoffähnliche Gerüststrukturen, so genannte β -Schleifenmimetika, avancierte in der Medizinischen Chemie beim strukturellen Design von Peptidomimetika zum etablierten Arbeitsgebiet.^[3]

Die Relevanz des Designelements „ β -Schleife“ mit variabler Dekoration in der Molekülperipherie wurde kürzlich durch kombinatorisch-chemische und klassische medizinisch-chemische Arbeiten eindrucksvoll belegt, aus denen z.B. hochaffine und selektive peptidomimetische $\alpha_4\beta_1$ -Integrin-Antagonisten wie **1**,^[4] LHRH-Antagonisten wie **2**^[5] und Somatostatin-Antagonisten wie **3**^[6] resultierten.



Wir greifen hier die Problematik der konformativen Kompatibilität von β -Schleifenmimetika mit den zu imitierenden Sekundärstrukturelementen auf und stellen ein Simulations-Procedere vor, mit dem es gelingt, nicht nur die Kompatibili-

[*] Dr. G. Müller, Dr. G. Hessler
Bayer AG
Zentrale Forschung, ZF-WFM (Molecular Modeling)
Gebäude Q18, 51368 Leverkusen (Deutschland)
Fax: (+49) 214-30-50351
E-mail: gerhard.mueller.gm1@bayer-ag.de
H. Y. Decornez
Department of Chemistry and Biochemistry
251 Nieuwland Science Hall
University of Notre Dame
Notre Dame, IN 46556-5670 (USA)

tät, sondern auch das schleifeninduzierende Potential eines entworfenen Schleifenmimetikums bereits im Vorfeld einer unter Umständen aufwändigen chemischen Synthese zu bewerten.

Unter Verwendung deterministischer (Moleküldynamik, MD) und stochastischer (Monte Carlo, MC) Molekülmekanik-Simulationsverfahren haben wir eine Reihe bekannter β -Schleifenmimetika hinsichtlich der bevorzugten Konformation untersucht. Alle Dipeptidmimetika wurden in die Schleifenposition $i+1-i+2$ eines cyclischen Hexapeptidanalogons eingebaut (Abbildung 1), das aufgrund seiner verbliebenen Tetrapeptidsequenz (-Ala-D-Ala-Ala-Ala-) bereits eine inhärente Tendenz zur Bildung und Stabilisierung eines β,β -Schleifenmusters aufweist. Von cyclischen Hexapeptiden dieser Bauart ist bekannt, dass Aminosäuren in D-Konfiguration bevorzugt die $i+1$ -Position von β II'-Schleifen besetzen und damit das entsprechende Schleifenmuster induzieren.^[7]

Durch MD-Simulationen über 100 ps wurde die Stabilität des β,β -Schleifenmusters unter expliziter Berücksichtigung einer wässrigen Lösungsmittelumgebung für die diskutierten Schleifenmimetika untersucht.

Anhand der Verbindungen **4–8**^[8] wird die nach der hier vorgestellten Methode identifizierte unerwartete konformative Heterogenität der als β -Schleifenmimetika beschriebenen Dipeptidmodule demonstriert. Während für die Mimetika **4–6** und **8** über die Trajektorie der MD-Simulation das

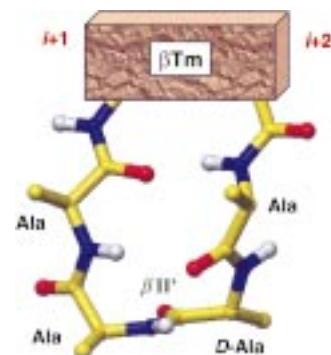
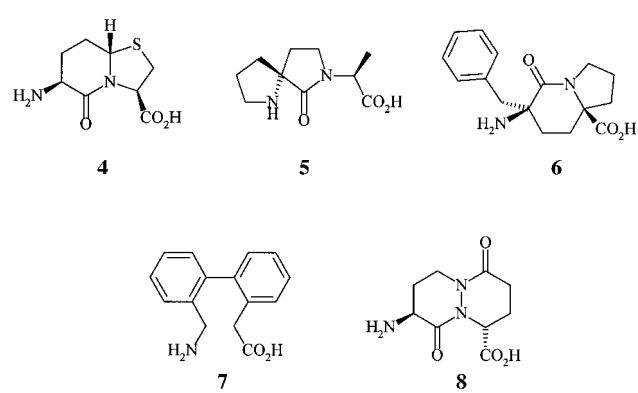


Abbildung 1. Konstruktionsprinzip der cyclischen Hexapeptidanaloge cyclo-(β TM-Ala-D-Ala-Ala-Ala-), in deren Kontext die β -Schleifenmimetika durch MD-Simulation hinsichtlich Strukturkompatibilität untersucht wurden. β TM (β -turn mimic) gibt die Position des Mimetikums an, wobei alle Startkonformationen so aufgebaut waren, dass das abgebildete β,β -Schleifenmuster vorgebildet war.

β,β -Schleifenmuster stabil bleibt, resultiert aus der Analyse der MD-Simulation des *ortho,ortho'*-disubstituierten Biphenylderivats **7** hingegen eine deutliche Inkompatibilität mit der eigentlich zu stabilisierenden Schleifengeometrie (Abbildung 2).



β,β -Schleifenmuster stabil bleibt, resultiert aus der Analyse der MD-Simulation des *ortho,ortho'*-disubstituierten Biphenylderivats **7** hingegen eine deutliche Inkompatibilität mit der eigentlich zu stabilisierenden Schleifengeometrie (Abbildung 2).

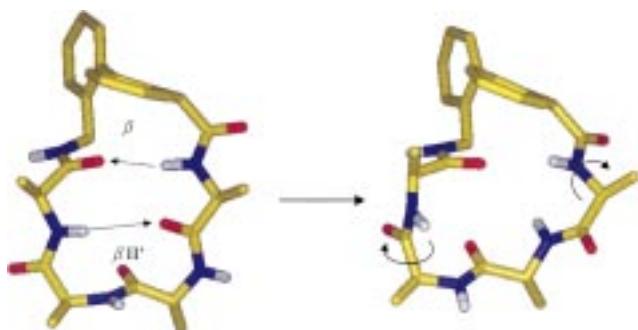


Abbildung 2. Startkonformation (links) des cyclischen Hexapeptidanalogs cyclo(-7-Ala-d-Ala-Ala-Ala-) mit vorliegendem β,β -Schleifenmuster (transanulare Wasserstoffbrückenbindungen sind als Pfeile gekennzeichnet), das im Laufe der MD-Simulation aufgegeben wird. Das Mimetikum 7 destabilisiert offensichtlich die reguläre Schleifenkonformation zugunsten der rechts dargestellten Konformation. Die mit Pfeilen gekennzeichneten Drehungen um Bindungen (rechts) führen zur Aufgabe der β II-Schleife im unteren Molekülteil.

Um ein differenzierteres Bild der konformativen Charakteristika der hier untersuchten Schleifenmimetika zu erhalten, wurde neben der Kompatibilität (notwendige Voraussetzung für ein Mimetikum) auch das Potential zur Schleifeninduktion (hinreichende Voraussetzung) jedes Mimetikums durch Computersimulationsmethoden untersucht. Durch ein Simulated-Annealing-Verfahren auf MC-Basis wurden die bevorzugten Konformationen aller Dipeptidanaloga untersucht, die als zentrale Bausteine in die lineare Modellpeptidsequenz Ac-Ala-Ala- β TM-Ala-Ala-NHMe eingebaut wurden. Damit ist die unmittelbare Berücksichtigung des Einflusses einer minimalen flexiblen peptidischen Umgebung gewährleistet. Die stochastische Durchmusterung des durch alle frei drehbaren Torsionen aufgespannten Konformationsraums liefert für jedes Schleifenmimetikum ein aus 1000 Strukturen bestehendes Konformerenensemble, das anhand schleifendiagnostischer geometrischer Parameter analysiert wurde (Abbildung 3).

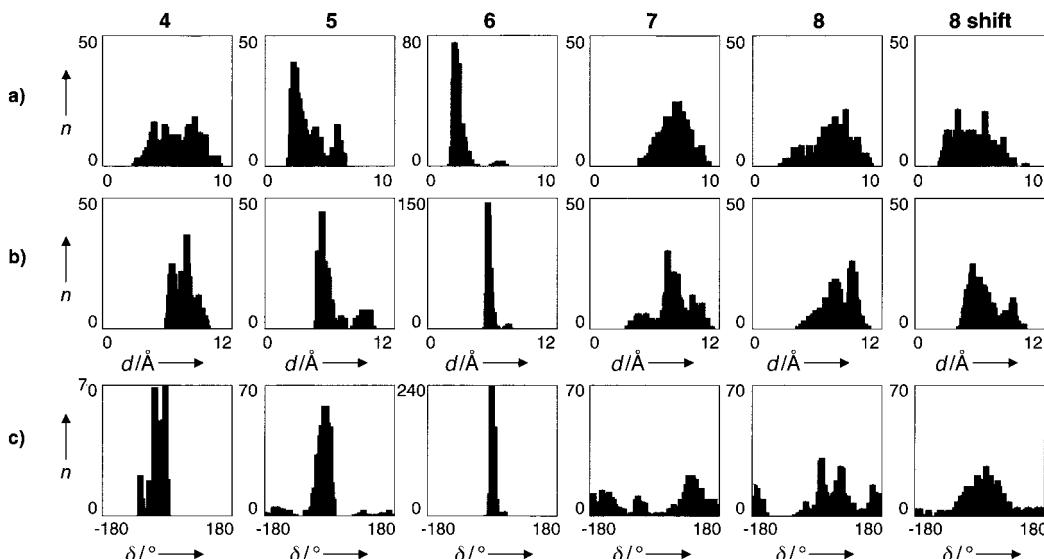


Abbildung 3. Statistische Auswertung der durch MC-Simulation erzeugten Konformerenensembles. Folgende Häufigkeitsverteilungen sind dargestellt: a) Donor-Acceptor-Abstand ($(\text{HN}_{i+3})-(\text{C}=\text{O}_i)$) der schleifenstabilisierenden Wasserstoffbrückenbindung;^[9] b) der nach Lewis et al.^[10] für β -Schleifen charakteristische $\text{C}_{\alpha_i}\text{C}_{\alpha_{i+3}}$ -Abstand (Idealwert: 4.1–4.8 Å); c) Pseudodiederwinkel, aufgespannt von den vier konsekutiven C_{α} -Atomen der schleifenkonstituierenden Aminosäuren, bzw. Dipeptidanaloga (Idealwert: $50^\circ > \Theta > -50^\circ$). Die Idealwerte sind den Geometrien der bekannten β -Schleifen^[2a] (β I, β I', β II, β II', β VIa, β VIb) entnommen.

Die in Abbildung 3 dargestellten, über die Konformerenensemble ermittelten Häufigkeitsverteilungen zeigen deutlich, dass das Potential zur Schleifeninduktion in der Reihenfolge **6** > **5** > **4** > **8** > **7** abnimmt. Das β -Schleifenmimetikum **BTD 4** (bicyclic turned dipeptide), der „Klassiker“ unter den Mimetika, wird von der Spiroverbindung **5** und dem β VI-Schleifenmimetikum **6** ($i+1-i+2-cis$ -Amid) in der Schleifeninduktion sogar noch übertroffen, was sich aus den scharfen Maxima der Häufigkeitsverteilungen der analysierten geometrischen Deskriptoren ableiten lässt (Abbildung 3). Anhand der in Abbildung 4 dargestellten Konformationsfamilien wird die aus der MC-Rechnung resultierende strukturelle Konvergenz im Schleifenbereich der Mimetika **5** und **6** verdeutlicht.

Die auf MC beruhende Konformationsanalyse des Hydrazidderivats **8** liefert einen äußerst interessanten und unerwarteten Befund: Außer der nur mäßig populierten, dem Design entsprechenden Konformationsfamilie, in der das Mimetikum

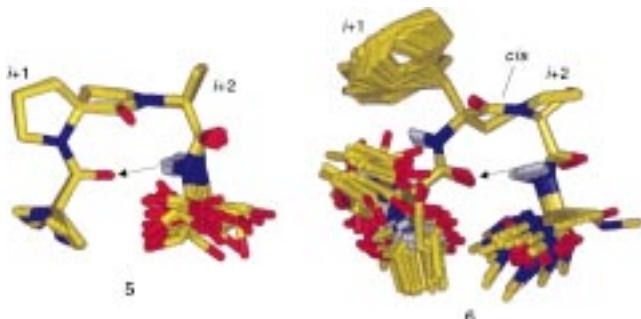


Abbildung 4. Überlagerung repräsentativer Beispiele aus den höchst populierten Konformationsfamilien nach Analyse der MC-Rechnungen für die in das Modellpeptid eingebauten β -Schleifenmimetika **5** (links) und **6** (rechts). Als Referenzatome zur Überlagerung dienten die Schweratome des peptidanalogen Rückgrats der Mimetika einschließlich der Atome der ein- und ausgehenden Amidbindung. Aus Gründen der Übersichtlichkeit sind nur die Schweratome (C: gelb, N: blau, O: rot) und Amidprotonen (weiß) dargestellt.

die Eckpositionen ($i+1-i+2$) der zu induzierenden β -Schleife einnimmt, konnte eine zweite, offensichtlich energetisch günstigere Vorzugskonformation identifiziert werden. In dieser stabilisiert **8** eine reguläre β -Schleife, die im zugrunde liegenden Schleifenmuster um eine Rückgratposition in Richtung N-Terminus verschoben ist (Abbildung 5).

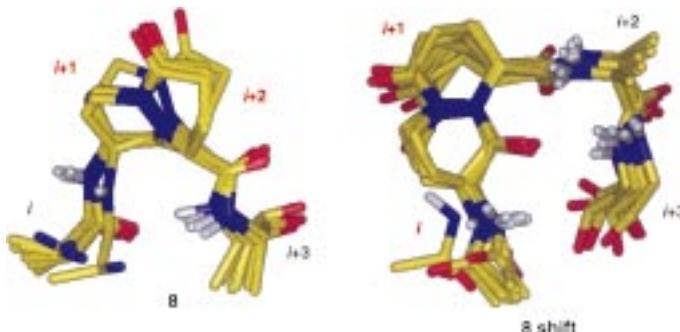


Abbildung 5. Struktureller Vergleich der durch MC identifizierten Schleifenkonformationen, die durch das Mimetikum **8** stabilisiert werden. In der weniger populierten Konformationsfamilie (links) nimmt das Mimetikum die Eckpositionen ($i+1-i+2$) der β -Schleife ein, während in der am häufigsten populierten Familie (rechts) die Schleifenpositionen $i-i+1$ vom Mimetikum imitiert werden.

Der Vergleich der Häufigkeitsverteilungen für die eigentlich zu stabilisierende Topologie (**8** in Abbildung 3) mit der Häufigkeitsverteilung des um eine Position verschobenen Arrangements (**8shift** in Abbildung 3) lässt die letztere Geometrie als die plausiblere Schleifenanordnung erscheinen (Abbildung 5).

Angesichts der nach dem hier vorgestellten Simulationsverfahren erhaltenen Resultate zur prädiktiven Einschätzung des schleifeninduzierenden Potentials schlagen wir vor, das Design potentieller Schleifenmimetika durch die hier beschriebene Computermethode zu unterstützen, denn offenbar verdienen es nicht alle als β -Schleifenmimetika beschriebenen Verbindungen, als solche bezeichnet zu werden. Der Wert des Simulationsverfahrens liegt in der frühzeitigen Identifizierung und Eliminierung so genannter „falsch-positiver“ β -Schleifenmimetika, also solcher Substanzen, die zwar als Schleifenmimetika entworfen wurden, aber im dreidimensionalen strukturellen Kontext keine entsprechende Kompatibilität aufweisen. Die hier diskutierte Molecular-Modeling-Methode eignet sich darüber hinaus für ein effizientes Ranking der zum Teil aufwändig zu synthetisierenden Strukturimetika, die sich in den letzten Jahren immer häufiger als attraktive peptidomimetische Template für das rationale Design von kombinatorischen Bibliotheken erwiesen haben.

Eingegangen am 16. Juli 1999 [Z13732]

[1] a) C. R. Beddell, *The Design of Drugs to Macromolecular Targets*, Wiley, Chichester, 1992; b) K. Gubernator, H. J. Böhm, *Structure-Based Ligand Design*, Wiley-VCH, Weinheim, 1998; c) R. E. Babine, S. L. Bender, *Chem. Rev.* **1997**, 97, 1359–1472; d) P. Veerapandian, *Structure-Based Design*, Dekker, New York, 1997.

[2] a) J. S. Richardson, *Adv. Protein Chem.* **1981**, 34, 167–339; b) G. D. Rose, L. M. Giersch, J. A. Smith, *Adv. Protein Chem.* **1985**, 37, 1–109; c) G. Müller, *Angew. Chem.* **1996**, 108, 2941–2943; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1996**, 35, 2767–2769.

- [3] a) G. Hölzemann, *Kontakte (Darmstadt)* **1991**, 3–12; b) G. Hölzemann, *Kontakte (Darmstadt)* **1991**, 55–63; c) A. E. P. Adang, P. H. H. Hermkens, J. T. M. Linders, H. C. J. Ottenheijm, C. J. van Staveren, *Recl. Trav. Chim. Pays-Bas* **1994**, 113, 63–78.
- [4] A. J. Souers, A. A. Virgilio, S. S. Schürer, J. A. Ellman, T. P. Kogan, H. E. West, W. Ankener, P. Vanderslice, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1998**, 8, 2297–2302.
- [5] N. Cho, M. Harada, T. Imaeda, T. Imada, H. Matsumoto, Y. Hayase, S. Sasaki, S. Furuya, N. Suzuki, S. Okubo, K. Ogi, S. Endo, H. Onda, M. Fujino, *J. Med. Chem.* **1998**, 41, 4190–4195.
- [6] A. J. Souers, A. A. Virgilio, Å. Rosenquist, W. Fenuik, J. A. Ellman, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, 121, 1817–1825.
- [7] a) G. Müller, M. Gurrath, M. Kurz, H. Kessler, *Proteins Struct. Funct. Genet.* **1993**, 15, 235–251; b) M. Gurrath, G. Müller, H. Kessler, M. Aumailley, R. Timpl, *Eur. J. Biochem.* **1992**, 210, 911–921.
- [8] Eine ausführliche Zusammenstellung von β -Schleifenmimetika: a) S. Hanessian, G. McNaughton-Smith, H.-G. Lombart, W. D. Lubell, *Tetrahedron* **1997**, 53, 12789–12854; b) P. Gillespie, J. Cicariello, G. L. Olson, *Biopolymers* **1997**, 43, 191–217.
- [9] M. Venkatachalam, *Biopolymers* **1968**, 6, 1425–1436.
- [10] P. Lewis, F. Momany, H. Scheraga, *Biochim. Biophys. Acta* **1973**, 303, 211–229.

Synthese eines membranständigen THF-Gramicidin-Kationenkanals und Funktionsstudie**

Anna Schrey, Andrea Vescovi, Andrea Knoll, Corry Rickert und Ulrich Koert*

Unter den molekularen Funktionen kommt dem Kanalvermittelten Ionentransport durch Lipiddoppelschichten besondere Bedeutung zu.^[1] Zur Aufklärung der aktiven Konformation von biologischen Ionenkanälen können synthetische Ionenkanäle wichtige Beiträge leisten.^[2, 3] Da Tetrahydrofurane (THFs) Kationen komplexieren, wurde ein Konzept entwickelt, aus Oligo-THFs^[4] und Oligo-THF-Aminosäuren^[5] Kationenkanäle aufzubauen. Hier berichten wir über die Synthese eines funktionsfähigen Kationenkanals, bei dem ein biomimetischer Ansatz für den Kanaleingang und -ausgang verfolgt wird und THF-Aminosäuren als Bausteine verwendet werden.

Unser biomimetischer Ansatz orientiert sich an Gramicidin A, einem Ionenkanal-aktiven Pentadecapeptid mit der Sequenz HCO-L-Val₁-Gly₂-L-Ala₃-D-Leu₄-L-Ala₅-D-Val₆-L-Val₇-D-Val₈-L-Trp₉-D-Leu₁₀-L-Trp₁₁-D-Leu₁₂-L-Trp₁₃-D-Leu₁₄-L-Trp₁₅-CONHCH₂CH₂OH.^[6] Die aktive Konformation des Gramicidinkanals in Lipiddoppelschichten ist ein H-Brücken-verknüpftes Kopf-Kopf-Dimer aus zwei rechtshändigen,

[*] Prof. Dr. U. Koert, Dipl.-Chem. A. Schrey, Dipl.-Chem. A. Vescovi, Dr. A. Knoll, Dipl.-Chem. C. Rickert
Institut für Chemie der Humboldt-Universität zu Berlin
Hessische Straße 1–2, 10115 Berlin (Deutschland)
Fax: (+49) 30-2093-7266
E-mail: koert@lyapunov.chemie.hu-berlin.de

[**] Diese Arbeit wurde von der Deutschen Forschungsgemeinschaft, dem Fonds der Chemischen Industrie, der Volkswagen-Stiftung, der Schering AG und der Pinguin-Stiftung gefördert.