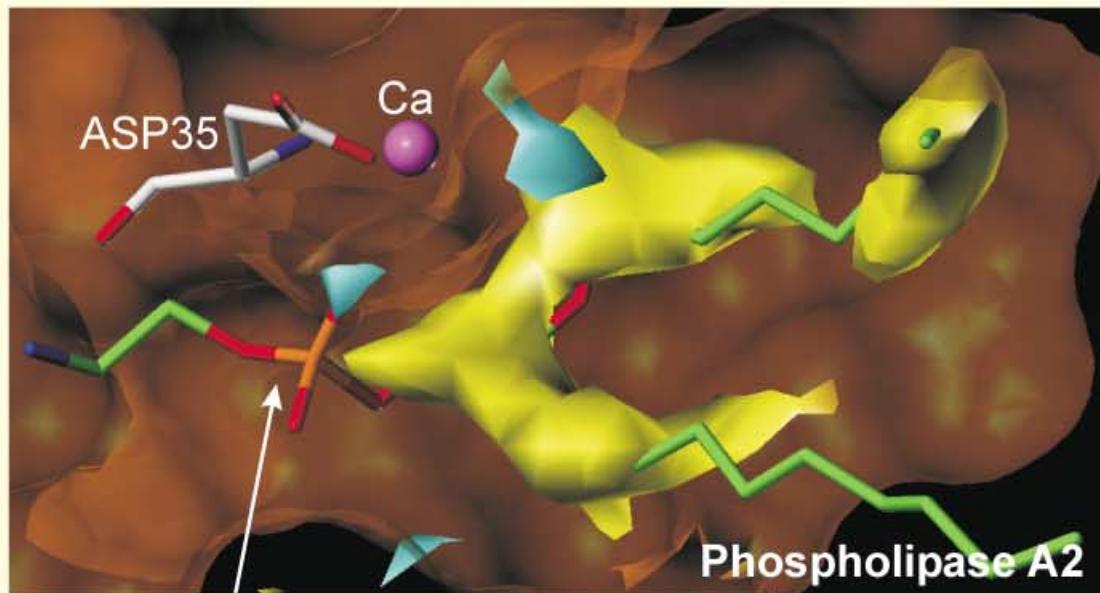
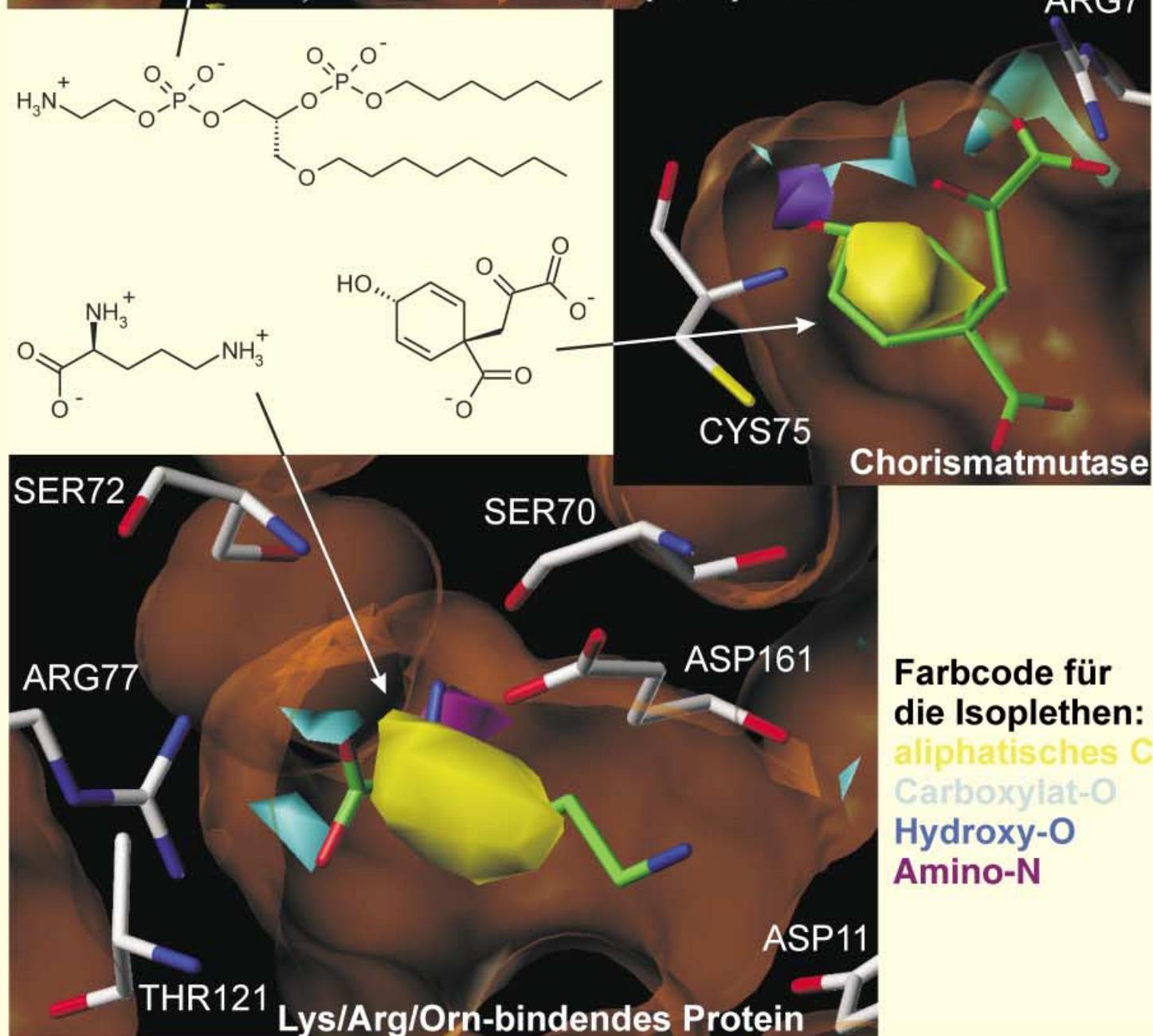


# Ortsaufgelöste Identifizierung günstiger Protein-Ligand-Wechselwirkungen in Bindetaschen



**ANGEWANDTE**  
**CHEMIE** © WILEY-VCH



# Ansätze zur Beschreibung und Vorhersage der Bindungsaffinität niedermolekularer Liganden an makromolekulare Rezeptoren

Holger Gohlke und Gerhard Klebe\*

Der Einfluss einer körperfremden Verbindung auf einen Organismus wird in aller Regel an dem Begriff der *biologischen Aktivität* festgemacht. Liegt eine gezielte, therapeutisch relevante und regulierende Wirkung vor, so hat die Verbindung das Potenzial zu einem Arzneistoff, andernfalls betrachtet man ihren toxikologischen Einfluss auf das biologische System. Doch was versteht man unter dem Begriff der biologischen Aktivität? Natürlich ist an dieser Stelle der gesamte Effekt auf einen Organismus zu betrachten, doch wegen der Komplexität der ineinander greifenden Vorgänge betrachtet man zunächst nur die „Hauptwirkung“ auf den Organismus. Auf die molekulare Ebene übertragen, bedeutet biologische Aktivität die Bindung einer (niedermolekularen) Verbindung an einen makromolekularen Rezeptor, in aller Regel ein Protein. Dadurch werden enzymatische Reaktionen oder

Signaltransduktionskaskaden in ihrer Funktion für den Organismus beeinflusst. Wir betrachten diese Bindung als einen Vorgang unter Gleichgewichtsbedingungen, sodass sich die Bindung als Assoziations- oder Dissoziationsvorgang beschreiben lässt. So mit wird *biologische Aktivität* als *Affinität* der beiden Partner zueinander in Form einer thermodynamischen Gleichgewichtsgröße ausgedrückt. Wie gut sind diese Begriffe heute verstanden und theoretisch vorhersagbar? Kern des rationalen Wirkstoffdesigns ist die Vorhersage der biologischen Aktivität einer Verbindung. Die Vorgänge bei der Ligandenbindung sind äußerst komplex, sowohl Ligand als auch Protein sind flexible Moleküle, und die Energiebilanz muss zwischen getrenntem und gebundenem Zustand in wässriger Umgebung betrachtet werden. Wie ausgereift und aussagekräftig sind unsere experimen-

tenellen Verfahren, um hier die notwendigen Einblicke zu gewinnen? Der vorliegende Aufsatz fasst den derzeitigen Kenntnisstand zur Bindungsaffinität eines niedermolekularen Liganden zu einem Protein zusammen. Es werden theoretische wie empirische Ansätze beschrieben und gegenübergestellt, die eine Vorhersage der Bindungsaffinität aus der Raumstruktur eines Protein-Ligand-Komplexes zum Ziel haben. Experimentelle Ansätze, vor allem die Mikrokalorimetrie, werden diskutiert. Als Ausblick werden ein eigenes wissensbasiertes Verfahren zur Affinitätsvorhersage und experimentelle Daten zur Faktorisierung von Bindungsbeiträgen zur Ligandenbindung an Proteine vorgestellt.

**Stichwörter:** Bindungsaffinität • Kalorimetrie • Protein-Ligand-Wechselwirkungen • Scoring-Funktion • Wirkstoff-Forschung

## 1. Einleitung

Die wechselseitige molekulare Erkennung steht am Anfang fast aller Prozesse in biologischen Systemen. Erkannt wurde dies erstmals vor mehr als 100 Jahren durch Emil Fischer, der schrieb, „daß Enzym und Glycosid wie Schloß und Schlüssel zueinander passen müssen, um eine chemische Wirkung aufeinander ausüben zu können“.<sup>[3]</sup> Auch in Paul Ehrlichs

Aussage „*Corpora non agunt nisi fixata*“<sup>[\*\*][4]</sup> bildet dieses Konzept – heute in z.T. erweiterter Form<sup>[5, 6]</sup> – den Ausgangspunkt für die wissenschaftliche Erklärung der Wirkung von Arzneistoffen. Danach bewirkt die geometrisch und chemisch komplementäre Anlagerung kleiner Moleküle (im Folgenden: *Liganden*) an biologische makromolekulare Zielstrukturen (häufig Proteine, im Folgenden allgemein *Rezeptoren* genannt) einen Eingriff in die Abfolge von Stoffwechsel- und Signaltransduktionsprozessen und löst somit einen physiologischen Effekt aus.

Dieses Wissen um die Zusammenhänge zwischen molekulärer Struktur und biologischer Wirkung hat in den letzten

[\*] Prof. Dr. G. Klebe, Dr. H. Gohlke  
Institut für Pharmazeutische Chemie  
Philipps-Universität Marburg  
Marbacher Weg 6, 35032 Marburg (Deutschland)  
Fax: (+49)6421-282-8994  
E-mail: klebe@mail.uni-marburg.de

[\*\*] „Die Körper wirken nicht, wenn sie nicht gebunden sind.“

Jahren zu einem grundlegenden Wandel der Methoden der modernen Arzneistoff-Forschung geführt. Molekularbiologische Verfahren ermöglichen es, die gestörte oder fehlregulierte Funktion eines Rezeptors als Ursache einer Krankheit zu identifizieren und Proteine in reiner Form zu gewinnen. Die Aufklärung ihrer dreidimensionalen Struktur ist dann vielfach mithilfe der Röntgenstrukturanalyse,<sup>[7, 8]</sup> NMR-Spektroskopie<sup>[9–11]</sup> oder Kryo-Elektronenmikroskopie<sup>[12–15]</sup> möglich. Darüber hinaus wächst die Zahl bekannter Proteinsequenzen im Zuge der Genomsequenzierungs-Projekte<sup>[16–19]</sup> derzeit dramatisch. Davon ausgehend werden Technologien zur Vorhersage von Proteinfunktion<sup>[20–24]</sup> und -struktur<sup>[25, 26]</sup> sowie zur Beschleunigung der kristallographischen Strukturanalytik<sup>[27–30]</sup> entwickelt. Computergestützte Verfahren zur Identifizierung und Selektion neuer biologischer Zielmoleküle<sup>[31, 32]</sup> werden bereits eingesetzt.<sup>[33]</sup> Als Folge dieser Anstrengungen ist für die Zukunft ein sich erweiterndes Spektrum strukturell und funktionell charakterisierter molekularer Zielsysteme für die Arzneimitteltherapie zu erwarten.<sup>[34]</sup>

Der Entwicklungsprozess eines neuen Arzneistoffes, der bis zu 15 Jahre dauern und bis zu einer halben Milliarde Dollar verschlingen kann,<sup>[35–37]</sup> lässt sich in mehrere Phasen unterteilen.<sup>[38, 39]</sup> Der am Anfang stehenden Suche nach einer Leitstruktur, d.h. einem Liganden mit nachweisbarer Affinität zu einem gegebenen Rezeptor, folgen mehrere Optimierungsphasen. Neben der Erhöhung der Affinität und Selektivität des Liganden zu seinem biologischen Zielmolekül geht es zusätzlich um die Einstellung günstiger pharmakokinetischer Eigenschaften. Hierunter versteht man Aspekte der Absorption des Arzneistoffs, dessen Verteilung und Metabolisierung im Organismus sowie seine Exkretion und Toxizität.<sup>[40–42]</sup> Die eigentliche Validierung erfolgt dann in mehreren Phasen der klinischen Prüfung.

Der schnellen und verlässlichen Identifizierung von potentiellen, hochaffinen Liganden kommt im Hinblick auf die durch die Genomprojekte zu erwartende Flut charakterisierter Rezeptoren eine besondere Bedeutung zu.<sup>[43, 44]</sup> Zur Bündelung der begrenzten Ressourcen muss mehr denn je schon in der Frühphase einer Arzneistoffentwicklung deren Aussicht auf Erfolg abgeschätzt werden. Gegenwärtig existieren für diese Suche nach neuen Leitstrukturen zwei einander ergänzende Methoden: das *experimentelle* (Hochdurchsatz-)Screening,<sup>[45, 46]</sup> d.h. das In-vitro-Testen großer Substanzbibliotheken, und das auf der Basis von vorhandenen Strukturinformationen des biologischen Zielmoleküls und/oder bereits bekannter Liganden beruhende *virtuelle Screening*<sup>[47, 48]</sup> bzw. *rationale Design*.<sup>[49–51]</sup>

Das experimentelle Random-Screening-Verfahren orientiert sich an der Methode der traditionellen Arzneistoffsuche, eine große Zahl synthetischer und natürlicher Substanzen unabhängig von ihrer Struktur auf eine eventuelle Wirkung in einem Bioassay zu untersuchen.<sup>[52, 53]</sup> Massiv vorangetrieben wurde diese Methode vergangener Zeit durch den Einsatz von Roboter-Verfahren zum Hochdurchsatztesten<sup>[54]</sup> sowie durch Verfahren der Kombinatorischen Chemie<sup>[55–59]</sup> und automatisierten Parallelsynthese, mit denen in kurzer Zeit ausgehend von einigen wenigen Reaktanten Bibliotheken mit mehreren zehntausend Substanzen hergestellt werden können. Die Trefferquoten dieser zeit- und kostenintensiven, wegen ihrer ungerichteten Vorgehensweise („so viel wie möglich und so schnell wie möglich“) auch als „irrational“ bezeichneten Verfahren betragen häufig weniger als ein Promille der Zahl der eingesetzten Substanzen.<sup>[60, 61]</sup> Dieses Vorgehen ignoriert zudem in der Regel Kenntnisse der biologischen Zielstruktur. Daher werden in jüngster Zeit besonders Nonrandom- oder Targeted-Screening-Ansätze entwickelt, bei denen die Testsubstanz hinsichtlich maximaler paarweiser Diversität, z.B.

*Holger Gohlke, geboren 1972, studierte Chemie in Darmstadt und fertigte seine Diplomarbeit 1997 in der Arbeitsgruppe von Prof. F. W. Lichtenthaler an. Er promovierte 2000 unter Anleitung von Prof. G. Klebe, Philipps-Universität Marburg, über die Entwicklung von Methoden zur Vorhersage von Protein-Ligand-Wechselwirkungen. Derzeit arbeitet er als Feodor-Lynen-Stipendiat in der Gruppe von Prof. D. A. Case am Scripps Research Institute, La Jolla, USA. Seine Forschungsinteressen liegen auf dem Gebiet der Computerchemie und des computergestützten Wirkstoffdesigns.*



H. Gohlke



G. Klebe

*Gerhard Klebe, Jahrgang 1954, studierte Chemie an der Universität Frankfurt und promovierte in Physikalischer Chemie. Als Stipendiat der Studienstiftung verbrachte er ein Jahr am CNRS und ILL in Grenoble, Frankreich, und arbeitete über experimentelle Elektronendichthebestimmungen. Nach Postdoktoraten in der Kristallographie (H. Fuess und H. B. Bürgi) wechselte er in die BASF-AG in Ludwigshafen und arbeitete im Bereich Molecular Modeling und Kristallographie. An der Universität Heidelberg habilitierte er sich 1992 für das Fach Pharmazeutische Chemie und Strukturchemie. Im Sommer 1996 übernahm er den Lehrstuhl für Pharmazeutische Chemie an der Universität Marburg. Der Schwerpunkt der dort entstandenen Arbeitsgruppe liegt auf dem Gebiet des Wirkstoffdesigns, wobei alle Aspekte der Wechselwirkung kleiner Moleküle mit Proteinen untersucht werden. Die eingesetzten Methoden umfassen Molekularbiologie und Proteinchemie, Kristallographie, bioinformatische Aspekte der Softwareentwicklung und Anwendung, Mikrokalorimetrie und Synthese von ersten Leitstrukturen.*

in Bezug auf ihre chemischen Eigenschaften,<sup>[62]</sup> ihre zu erwartenden günstigen pharmakokinetischen Eigenschaften<sup>[63, 64]</sup> oder im Hinblick auf das biologische Zielmolekül<sup>[65–69]</sup> mit Computermethoden vorselektiert werden.

Einen ganz anderen Ansatz verfolgt das rationale Wirkstoffdesign. Ausgehend von einem bekannten oder angenommenen Wirk- oder Bindemechanismus werden gezielte Vorschläge für eine Leitstruktur entwickelt, die anschließend im Experiment getestet werden. Das Ergebnis fließt als neue Information wieder in den Designzyklus zurück (Abbildung 1).<sup>[51, 70]</sup> Eindrucksvolle Beispiele für dieses Vorgehen

Tabelle 1. Proteine, für die durch rationales Wirkstoffdesign Inhibitoren gefunden oder optimiert werden konnten.

Protein	Literatur
Aldose-Reductase	[80, 81]
Calmodulin	[82]
Carboanhydrase	[83–86]
Cyclooxygenase-2	[87, 88]
Elastase	[89–91]
FKBP12	[92, 93]
Gyrase	[94]
HIV-Protease	[95–103]
Papain	[104]
Purin-Nucleosid-Phosphatase	[105]
Renin	[106–109]
Reverse Transkriptase	[110–117]
Selectin	[118–121]
Sialidase (Neuraminidase)	[122–132]
Streptavidin	[133–136]
Thermolysin	[137]
Thrombin	[138–145]
Thymidylat-Synthase	[146]

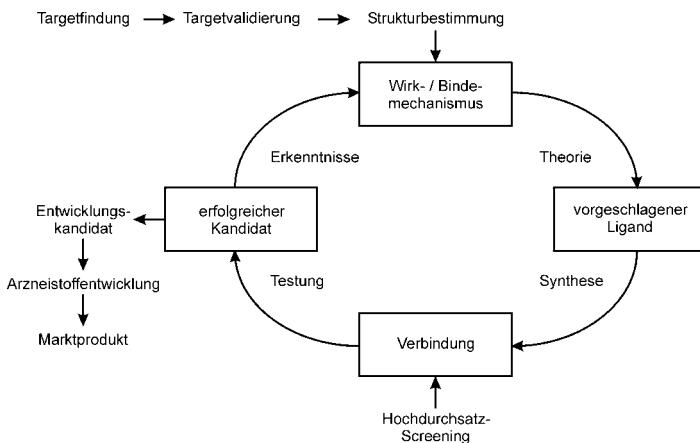
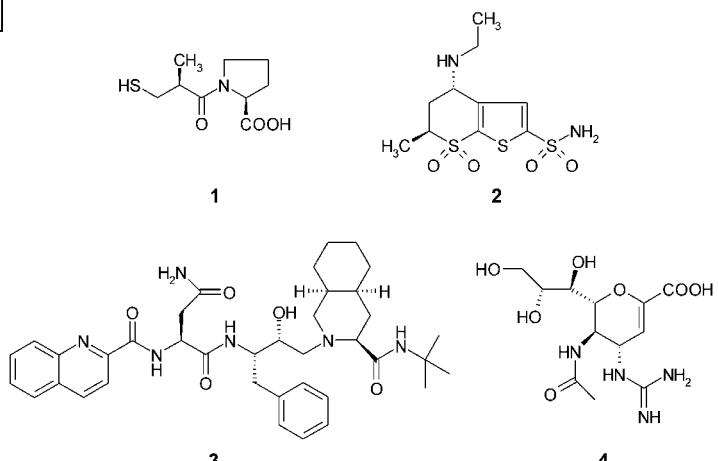


Abbildung 1. Allgemeiner Ansatz zum rationalen Design von Inhibitoren. Ausgehend von vorgeschlagenen oder bereits synthetisierten Verbindungen werden nach biologischer Testung gewonnene Erkenntnisse über den Wirk- oder Bindemechanismus mithilfe theoretischer Verfahren zur Erzeugung neuer Startpunkte für den Designzyklus verwendet.

sind in kürzlich erschienenen Arbeiten über die Inhibitorfindung für DNA-Gyrase<sup>[71]</sup> und Matrix-Metalloproteinase 13<sup>[72]</sup> zu finden. Obwohl dieser Ansatz noch relativ jung ist und erst in neuerer Zeit von den Fortschritten in der Computertechnologie und -methodologie<sup>[73, 74]</sup> profitiert, gibt es schon eine ganze Reihe von Beispielen, bei denen er zu Neuentwicklungen und Optimierungen von Wirkstoffen geführt hat (Tabelle 1).<sup>[75–79]</sup> Darüber hinaus existieren bereits in der Therapie eingesetzte Wirkstoffe, die auf diesem Weg gefunden wurden oder bei deren Entdeckung das rationale Design von entscheidender Bedeutung war, z.B. der Angiotensin-Converting-Enzym(ACE)-Hemmer Captopril **1**,<sup>[147]</sup> der Carboanhydrase-Inhibitor Dorzolamid **2**,<sup>[77]</sup> die HIV-Protease-Inhibitoren Saquinavir **3**, Indinavir, Ritonavir und Nelfinavir<sup>[148]</sup> und die Sialidase-Inhibitoren Zanamivir **4** und Oseltamivir (Schema 1).<sup>[149]</sup>

Der Einsatz des rationalen Designs hängt davon ab, ob die dreidimensionale Struktur des biologischen Zielmoleküls bekannt ist oder nicht. Im zweiten Fall ermöglichen „Quantitative-Struktur-Wirkungs-Beziehungen“ (QSAR-Verfahren),<sup>[150–154]</sup> die Erstellung von Modellen für den Zusammenhang von Molekülstruktur und Wirkung auf einen Rezeptor aus einer Serie von Wirkstoffen und dazugehörigen experimentell bestimmten Affinitäten. Diese Modelle können dann nicht nur zur Erklärung der relativen Abstufung beobachteter Affinitäten, sondern auch zur Vorhersage der Affinitäten



Schema 1. In der Therapie eingesetzte Wirkstoffe, bei deren Entwicklung das rationale Design von entscheidender Bedeutung war.

unbekannter Verbindungen herangezogen werden. Ein alternatives Verfahren besteht darin, aus einer Reihe wirksamer Verbindungen ein Pharmakophormodell abzuleiten,<sup>[155]</sup> d.h. eine geometrische Abbildung der molekularen Eigenschaften der Wirkstoffe, die notwendig für eine biologische Aktivität sind. Mit diesem Pharmakophormodell kann in einem Folgeschritt in einer Moleküldatenbank nach neuen, potenziell aktiven Verbindungen gesucht werden.<sup>[156]</sup> Zusätzlich erlauben die aus den QSAR-Verfahren erhaltenen Informationen, Rückschlüsse auf die den Struktur-Wirkungs-Beziehungen zugrundeliegenden strukturellen Eigenschaften des Rezeptors zu ziehen. Ausgehend von dieser Basis lassen sich Mini- oder Pseudorezeptormodelle generieren.<sup>[157–160]</sup>

Die ständig wachsende Zahl bekannter dreidimensionaler Strukturen der makromolekularen Rezeptoren<sup>[2]</sup> bildet die Grundlage des *strukturbasierten Entwurfs* von Wirkstoffen (Abbildung 2). Hauptsächlich werden röntgenstrukturanalytisch erhaltene Rezeptorgeometrien verwendet, wobei angenommen werden kann, dass diese Geometrien den aktiven Strukturen in Lösung gleichen.<sup>[161–166]</sup> Unter Ausnutzung der Informationen über die Eigenschaften der Ligandenbinde-

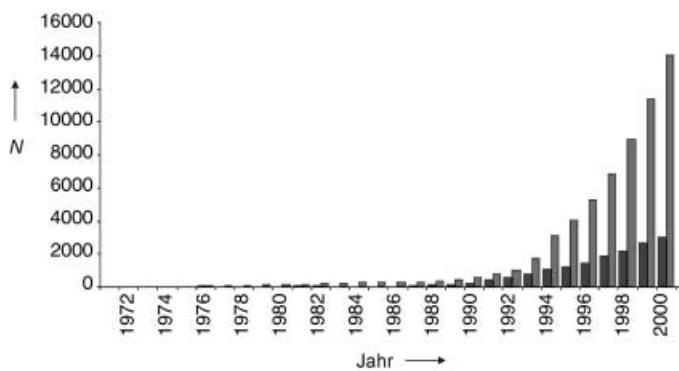


Abbildung 2. Zahl der in der Proteindatenbank PDB<sup>[2]</sup> insgesamt vorhandenen (graue Balken) und jedes Jahr neu hinterlegten Einträge  $N$  (schwarze Balken; Stand: 1. Januar 2001).

stelle und der auf dem Schlüssel-Schloss-Prinzip beruhenden zentralen Annahme, dass ein bindender Ligand deutliche strukturelle und chemische Komplementarität zum Wirkort aufweisen muss, ergeben sich zwei Ansätze zum computergestützten Wirkstoffdesign. Beim De-novo-Design werden in der Bindetasche neue Leitstrukturen durch Verknüpfung vorher platziert Atome oder Fragmente oder den sukzessiven Aufbau eines Moleküls ausgehend von einer „Keimstelle“ erzeugt.<sup>[167, 168]</sup> Alternativ dazu kann eine Moleküldatenbank nach einem komplementären Liganden durchsucht werden, indem die einzelnen Moleküle (flexibel) in die Ligandenbindestelle eingepasst werden (Docking-Verfahren).<sup>[169]</sup> Der entscheidende Schritt ist in beiden Fällen die *Vorhersage der Affinität* des Liganden zu seinem Rezeptor: Nur wenn diese Bewertung mit akzeptabler Genauigkeit und Zuverlässigkeit erfolgt, können neue Leitstrukturen ohne aufwändige Experimente gefunden werden. Im zweiten Fall spricht man daher auch von virtuellem Screening.<sup>[47, 48, 170]</sup> Dies wird nicht nur zu einer deutlichen Reduzierung der Entwicklungszeiten und Kosten führen. Vielmehr können die gewonnenen Struktur- und Affinitätsinformationen auch zur anschließenden Leitstrukturoptimierung genutzt werden.

Zwei Aspekte bestimmen dabei maßgeblich den Erfolg des computergestützten Ligandendesigns auf der Basis der Proteinstruktur: die Generierung relativer Anordnungen von Ligand und Rezeptor (*Konfigurationsgenerierungsproblem*) sowie das Erkennen der korrekten Bindungsgeometrie in der Menge der so erhaltenen Rezeptor-Ligand-Anordnungen und die Vorhersage der Bindungsaffinität (*Struktur- und Affinitätsvorhersageproblem*).<sup>[171]</sup> Ein 1997 unabhängig durchgeföhrter Test von Docking-Verfahren<sup>[172]</sup> bestätigte die Ansicht, dass die *Erkennung* nativ-ähnlicher Geometrien und Affinitätsvorhersagen nur unzureichend gelingen,<sup>[173–175]</sup> wohingegen das Problem der Generierung der relativen Orientierung von Ligand und Rezeptor als weitgehend gelöst angesehen werden kann,<sup>[50, 176]</sup> zumindest für Proteine mit rigiden Bindetaschen ohne Beteiligung von Wassermolekülen an der Bindung und ohne Wechsel des Protonierungszustandes von Ligand oder Protein bei der Bindung.<sup>[177]</sup>

In diesem Aufsatz soll unser derzeitiger Wissensstand zur Beschreibung, zum Verständnis und zur Vorhersage von Bindungsaffinitäten von niedermolekularen Verbindungen zu Proteinen zusammengestellt werden. Zudem wollen wir

eigene Ergebnisse aus jüngster Zeit zu diesem Thema vorstellen, die einerseits die thermodynamischen Aspekte der Ligandenbindung besser verstehen lassen, andererseits aus Sicht der computergestützten Verfahren einen deutlichen Zugewinn an Vorhersagekraft für das Docking und Virtuelle Screening ermöglichen.

## 2. Bindungsaffinität als Resultat inter- und intramolekularer Beiträge – makroskopische Größe und mikroskopische Ursachen

### 2.1. 3D-Rezeptor-Ligand-Strukturen – Sichtfenster in die Welt der Wechselwirkungen

3D-Strukturen von Rezeptoren (und Liganden) bilden nicht nur die Basis für das strukturbasierte Wirkstoffdesign. Viele der im folgenden Abschnitt erläuterten Beiträge zur Bindungsaffinität von Liganden zu Rezeptoren wären ohne die Möglichkeit ihrer Untersuchung auf molekularer Ebene bis heute nur unvollständig verstanden. Die dazu notwendigen Informationen über die Anordnung der Atome im Raum liefert – neben der hochauflösenden NMR-Spektroskopie<sup>[9–11]</sup> – vor allem die Proteinkristallographie.<sup>[7, 8, 178]</sup>

Im Hinblick auf die Untersuchung von Protein-Ligand-Komplexen ist zu beachten, dass durch Röntgenstrahlung kaum zwischen Isotopen und nur schlecht zwischen Elementen ähnlicher Ordnungszahl unterschieden werden kann. Im Falle von Proteinkristallen bedeutet dies, dass – ausgenommen bei sehr hoher Auflösung – die Positionen der terminalen N- und O-Atome von Asparagin und Glutamin nur aufgrund eines in sich konsistenten Wasserstoffbrückennetzwerks zugeordnet werden können. Analog sind häufig zwei mögliche Orientierungen des Imidazolrings von Histidin denkbar. Auch bleiben meist die Positionen von Wasserstoffatomen in Proteinkristallen unbestimmt. Dies ist vor allem bedeutsam für H-Atome konformativ flexibler Gruppen wie Hydroxy- oder Aminogruppen und für (de-)protonierbare Gruppen. Allerdings lässt sich durch die Analyse der umgebenden Atome in einem Kristall meist ein konsistentes Bild der Position von (polaren) H-Atomen und des Protonierungszustandes finden.<sup>[179, 180]</sup>

Die Aussagekraft der röntgenstrukturanalytisch erhaltenen Proteingeometrie wird maßgeblich schon durch die Qualität des untersuchten Kristalls bestimmt. Für Proteinkristalle werden selten Auflösungen unterhalb von 1.5 Å erreicht (der Größenordnung von Bindungslängen), meist erhält man Werte zwischen 2 und 3 Å. Von atomarer Auflösung spricht man bei Werten unter 1.2 Å;<sup>[181]</sup> sie erlaubt Einblicke in die elektronische Struktur von Molekülen<sup>[182]</sup> und die experimentelle Bestimmung der Positionen polarer H-Atome in Proteinmolekülen auch durch Röntgenbeugung. Inhärent verknüpft mit der erreichten Auflösung ist die Größe des Fehlers in den Koordinaten der Atompositionen: Für eine Auflösung von 2.5 Å ergibt sich ein Fehler von etwa 0.4 Å.<sup>[183–185]</sup> Dies ist auch bei der Betrachtung intermolekularer Wechselwirkungen zu berücksichtigen.

Für kristallographisch bestimmte Proteinstrukturen ist außerdem zu beachten, dass sie als zeitliche und räumliche

Mittelung über eine Vielzahl einzelner Moleküle entstanden sind.<sup>[163]</sup> Kristallkontakte zwischen benachbarten Molekülen können zu intermolekularen Wechselwirkungen führen, die einzelne Teile einer Struktur beeinflussen. Darüber hinaus kommt es neben dem Auftreten von statischer Unordnung durch unterschiedliche Besetzung analoger Atompositionen zu dynamischer Unordnung durch die thermische Bewegung der Atome um ihre Gleichgewichtslagen. Selbst für Atome mit einem durchschnittlichen Temperaturfaktor von  $B = 20 \text{ \AA}^2$  beträgt die mittlere Verschiebung von der Gleichgewichtsposition  $0.5 \text{ \AA}$ . Durch den Mittelungsprozess während der Sammlung der Beugungsdaten können außerdem nur solche Atome im Kristall erkannt werden, die Maxima der Aufenthalts wahrscheinlichkeit in eng umrissenen Bereichen zeigen. Dies gilt insbesondere für Wassermoleküle, die bis zu 70 % der Zahl der Atome eines Proteinkristalls ausmachen können.<sup>[186, 187]</sup> Während die Wassermoleküle der ersten Hydratationsphäre um ein Protein oder einen Liganden im Allgemeinen wohlgeordnet sind, nimmt ihre räumliche Unschärfe mit wachsendem Abstand zu.<sup>[188]</sup>

Im Fall der Bindung eines Liganden an einen Rezeptor ist als Folge des Mittelungsprozesses außerdem das Auftreten multipler Bindungsmodi zu erwähnen, wobei ein und derselbe Ligand mehrere energetisch gleichwertige Lagen in der Bindetasche eines Proteins einnehmen kann. Dies ist insbesondere für schwach bindende Liganden zu erwarten. Zusätzlich können abweichende Bindungsmodi im kristallinen Zustand infolge der Bildung unterschiedlicher polymorpher Formen auftreten. Hierunter wird die Eigenschaft einer Verbindung verstanden, bei kinetisch kontrollierten Bedingungen in unterschiedlichen Kristallstrukturen – mit durchaus unterschiedlichen physikochemischen Eigenschaften<sup>[189]</sup> – vorkommen zu können.<sup>[190–192]</sup> Im Fall von Protein- und Protein-Ligand-Kristallen wird meist von „unterschiedlichen Kristallformen“ anstelle von „Polymorphen“ gesprochen. Nichtsdestotrotz weisen auch diese oft unterschiedliche (enzymatische) Eigenschaften auf – als Beispiel seien Lipasekristalle genannt, die sich je nach Kristallisierungsbedingungen in der „offenen“ oder „geschlossenen“ Kristallform erhalten lassen.<sup>[166]</sup> Hieraus wird deutlich, dass nur eingeschränkt von „der“ Kristallstruktur einer Verbindung oder eines Protein-Ligand-Komplexes gesprochen werden kann.

## 2.2. Faktoren, die die Bindungsaffinität von Liganden zu ihren Rezeptoren bestimmen

Die selektive Bindung niedermolekularer Liganden an ein spezifisches Protein wird durch die strukturelle und energetische Erkennung zwischen beiden Partnern bestimmt.<sup>[193–195]</sup> Liganden können sowohl kovalent als auch nichtkovalent mit der biologischen Zielstruktur wechselwirken.

Die im Folgenden ausschließlich betrachtete nichtkovalente, reversible Assoziation von Rezeptor ( $R$ ) und Ligand ( $L$ ) zum Rezeptor-Ligand-Komplex ( $R'L'$ ) tritt im Allgemeinen in wässriger, elektrolythaltiger Lösung auf [Gl. (1)].



Unter der Bedingung der Einstellung des thermodynamischen Gleichgewichts dieser Reaktion lässt sich die Freie Standardenthalpie der Bindung  $\Delta G^\circ$  aus der experimentell bestimmten Assoziationskonstanten  $K_A$  (oder der dazu reziproken Dissoziations- oder Inhibitionskonstanten ( $K_D$  bzw.  $K_i$ )) bestimmen [Gl. (2)].  $\Delta G^\circ$  setzt sich aus einem enthalpisch ( $\Delta H^\circ$ ) und einem entropisch bedingten Anteil ( $T\Delta S^\circ$ ) zusammen.  $T$  steht für die absolute Temperatur.<sup>[196, 197]</sup> Anstelle von  $\Delta G^\circ$  wird als Maß für die Neigung eines Moleküls zur Assoziation mit einem anderen Molekül auch der Begriff der (Bindungs-)Affinität verwendet.

$$K_A = K_D^{-1} = K_i^{-1} = \frac{[R'L']}{[R][L]} \quad (2)$$

$$\Delta G^\circ = -RT\ln K_A = \Delta H^\circ - T\Delta S^\circ$$

Gemäß Gleichung (3) mit  $\mu_i^\circ$  als chemischem Standardpotential der Spezies  $i$  lässt sich  $\Delta G^\circ$  auch als Funktion der Stabilität des Gesamtkomplexes gegenüber dem freien Liganden und dem freien Rezeptor auffassen.<sup>[198, 199]</sup>

$$\Delta G^\circ = \mu_{R'L'(\text{aq.})}^\circ - (\mu_{R(\text{aq.})}^\circ + \mu_{L(\text{aq.})}^\circ) \quad (3)$$

Experimentell bestimmte Inhibitionskonstanten liegen im Allgemeinen in einem Bereich zwischen  $10^{-2}$  und  $10^{-12} \text{ M}$ , entsprechend einer Freien Standardbindungsenthalpie von  $-10$  bis  $-70 \text{ kJ mol}^{-1}$  bei  $T = 298 \text{ K}$ .<sup>[194]</sup> Eine Änderung der Freien Standardenthalpie um  $5.7 \text{ kJ mol}^{-1}$  bewirkt bei dieser Temperatur eine Änderung der Inhibitionskonstanten um eine Größenordnung. Eine Aufstellung von Bindungsaffinitäten reversibel bindender Liganden zeigt dabei, dass für Moleküle mit bis zu 15 Nichtwasserstoffatomen die Zunahme der Bindungsaffinität etwa  $6.3 \text{ kJ mol}^{-1}$  pro Atom beträgt, für größere Liganden die Bindungsaffinität dagegen nur noch sehr geringfügig von der molekularen Masse abhängt.<sup>[200]</sup>

Allgemein anerkannt ist, dass bei der nichtkovalenten Bindung eines Liganden an einen Rezeptor elektrostatische Wechselwirkungen – hierunter fasst man Salzbrücken, Wasserstoffbrücken, Dipol/Dipol-Wechselwirkungen und Wechselwirkungen zu Metallionen zusammen –, Solvations- und Desolvatisationsbeiträge sowie die Komplementarität der Raumstruktur (d.h. Van-der-Waals-Wechselwirkungen) eine Rolle spielen.<sup>[199, 201–203]</sup> Letztgenannter Punkt ist im Zusammenhang mit Anziehung und Abstoßung in Molekülkristallen von Dunitz und Gavezotti als „empty space is wasted space“ treffend charakterisiert<sup>[204]</sup> und auch für Protein-Ligand-Komplexe bestätigt worden.<sup>[93]</sup> Zusätzlichen Einfluss nehmen noch Faktoren, die durch intramolekulare Veränderungen bei Rezeptor ( $R \rightarrow R'$ ) und Ligand ( $L \rightarrow L'$ ) im Verlauf der Komplexbildung bedingt sind.<sup>[194, 195]</sup>

### 2.2.1. Elektrostatische Wechselwirkungen

Die Bedeutung der Wasserstoffbrücke<sup>[205, 206]</sup> für die Strukturen von Proteinen und ihren Komplexen mit Liganden wurde bereits von Pauling erkannt.<sup>[207]</sup> Nichtsdestotrotz herrscht auch heute noch kein einheitliches Bild über ihren relativen Energiebeitrag zur Thermodynamik der Proteinfaltung und Ligandenbindung.<sup>[208–211]</sup>

Wasserstoffbrücken beruhen hauptsächlich auf der elektrostatischen Anziehung zwischen einem an ein elektronegatives Atom X (meist N oder O) gebundenes Wasserstoffatom und einem weiteren elektronegativen Atom Y oder einem  $\pi$ -Elektronensystem. Charakteristisch sind Abstände zwischen 2.5 und 3.2 Å zwischen Wasserstoffbrückendonor X und -acceptor Y sowie ein X-H $\cdots$ Y-Winkel von 130 bis 180°.<sup>[206]</sup> Während keine oder nur eine geringfügige Abhängigkeit der Wasserstoffbrückenstärke für Winkelbereiche von  $180 \pm 30^\circ$  gefunden wurde,<sup>[212]</sup> führen kürzere Abstände bis zu 2.3 Å zu einem eher kovalenten Bindungscharakter und größerer Bindungsgenergie,<sup>[213]</sup> wobei der letzte Punkt allerdings nicht verallgemeinert werden kann.<sup>[214, 215]</sup>

Bedingt durch ihren Charakter hängt die Stärke einer Wasserstoffbrücke von ihrer jeweiligen mikroskopischen Umgebung ab: Die Abschirmung elektrostatischer Wechselwirkungen ist abhängig von der Dielektrizitätskonstanten  $\epsilon$  des umgebenden Mediums, d.h., die Coulomb-Wechselwirkungsenergie ist proportional zu  $\epsilon^{-1}$ . Während im Inneren von Proteinen  $\epsilon$ -Werte von 1 bis 20 (meist 2–8) angenommen werden, beträgt der Wert an der Peripherie des Proteins in unmittelbarer Nähe zum umgebenden Wasser etwa 80.<sup>[216, 217]</sup> Darüber hinaus wird in der Nähe von polaren Gruppen eine höhere Dielektrizitätskonstante erwartet als in unpolarer Umgebung.<sup>[218]</sup> Ähnliches gilt für konformativ flexiblere Bereiche des Proteins.<sup>[219]</sup> Vergrabene Wasserstoffbrücken werden daher als bedeutsamer für die Protein-Ligand-Wechselwirkung angesehen als lösungsmittelexponierte.<sup>[220, 221]</sup>

Einen weiteren Hinweis auf die Bedeutung der Beteiligung von Wasser in der Gesamtbilanz der Wechselwirkungen liefert die Tatsache, dass nur 1–2 % aller vergrabenen N-H- und C=O-Gruppen der Amidbindungen eines Proteins keine Wasserstoffbrücke bilden.<sup>[222]</sup> Hierzu darf nicht übersehen werden, dass bei der Bildung einer Wasserstoffbrücke in einem Rezeptor-Ligand-Komplex bereits bestehende, ähnlich starke Wasserstoffbrücken der funktionellen Gruppen des freien Rezeptors und Liganden mit dem umgebenden Wasser aufgebrochen werden müssen. Die Differenz der Freien Enthalpien aus diesen Beiträgen des H-Brücken-Austauschprozesses bestimmt letztlich, ob die H-Brücken-Bildung zwischen Rezeptor und Ligand zur Bindungsaffinität beiträgt.<sup>[223–225]</sup> Nicht abgesättigte, vergrabene polare Gruppen von Liganden oder Proteinen dürften daher die Komplexbildung stark beeinträchtigen.<sup>[220]</sup> Eine Abschätzung ergab für diesen Fall als obere Schranke einen ungünstigen Beitrag zur freien Bindungsenthalpie von 29 kJ mol $^{-1}$ .<sup>[226]</sup> Umgekehrt betrachtet lässt sich so jedoch verstehen, dass gerade elektrostatische Wechselwirkungen und Wasserstoffbrücken zur Spezifität der molekularen Erkennung beitragen.<sup>[201, 210]</sup>

Beim physiologischen pH-Wert (ca. 7.4) ist anzunehmen, dass in Proteinen die Guanidinseitenkette von Arginin ( $pK_a = 12.5$ ) und die Aminseitenkette von Lysin ( $pK_a = 10.8$ ) protoniert, die Carboxygruppen von Asparagin- ( $pK_a = 3.9$ ) und Glutaminsäure ( $pK_a = 4.1$ ) dagegen deprotoniert vorliegen ( $pK_a$ -Werte nach Lit. [227]). Allerdings hängt der genaue Protonierungszustand auch hier von den lokalen elektrostatischen Verhältnissen in der Umgebung der jeweiligen funktionellen Gruppe ab und kann sich sogar während der Ligandenbindung ändern (Abbildung 3).<sup>[228, 229]</sup> Trägt der ge-

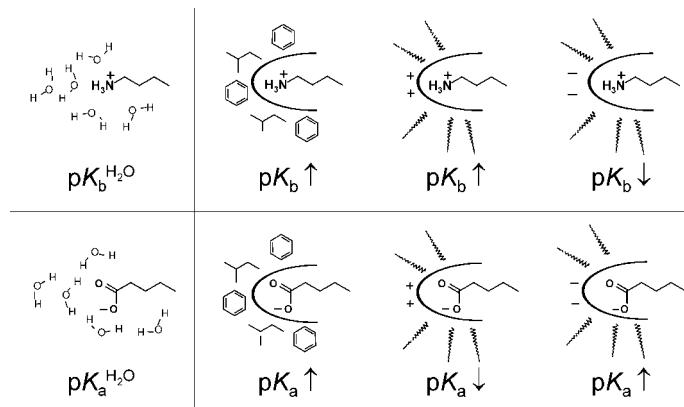


Abbildung 3. Einfluss der Proteinumgebung auf die  $\text{pK}_b$ -Werte einer basischen (obere Reihe) und die  $\text{pK}_a$ -Werte einer sauren Ligandengruppe (untere Reihe) im Vergleich zur wässrigen Umgebung ( $\text{pK}_b^{\text{H}_2\text{O}}, \text{pK}_a^{\text{H}_2\text{O}}$ ).

bundene Ligand in sterisch passender Anordnung entgegengesetzt geladene Gruppen, treten anziehende elektrostatische Wechselwirkungen auf („Salzbrücken“; Abbildung 4).<sup>[230]</sup>

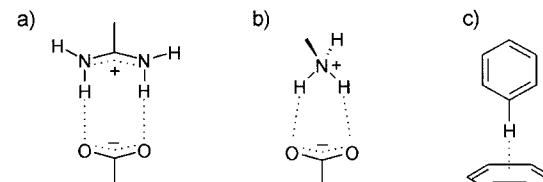


Abbildung 4. Beispiele für spezielle Wasserstoffbrücken: a, b) zweizähnige ionische Wasserstoffbrücken (Salzbrücken), c)  $\text{CH}\cdots\pi$ -Wechselwirkung.

Abschätzungen über die Beiträge der Wasserstoff- und Salzbrücken zur Affinität eines Liganden zu seinem Rezeptor müssen in Bezug auf ihren Ursprung betrachtet werden. Daten aus Proteinmutationsstudien ergeben Werte für den Beitrag einer Wechselwirkung zwischen ungeladenen Partnern von  $\Delta G^\circ = -5 \pm 2.5 \text{ kJ mol}^{-1}$ .<sup>[210, 223, 231]</sup> Ähnliche Zahlen resultieren aus Untersuchungen von Strukturen und Lösungsenergien kristalliner cyclischer Dipeptide<sup>[232]</sup> sowie aus Studien zum Stabilisierungsbeitrag von intramolekularen Wasserstoffbrücken in Proteinen.<sup>[233–235]</sup> Für ladungsunterstützte Wasserstoffbrücken und Salzbrücken werden dagegen Werte von –10 bis –20 kJ mol $^{-1}$  angegeben.<sup>[231, 236]</sup> Ein Problem bei diesen Untersuchungen ergibt sich allerdings bei der Interpretation der experimentell bestimmten „augenscheinlichen“ Bindungsbeiträge: Nur wenn zusätzliche Effekte ausgeschlossen werden können, dürfen sie mit dem „intrinsischen“ Beitrag einer Wechselwirkung gleichgesetzt werden.<sup>[231, 237, 238]</sup> So wurde von Williams et al. der Beitrag einer Wasserstoffbrücke zunächst mit etwa –25 kJ mol $^{-1}$  angegeben,<sup>[239, 240]</sup> nach Berücksichtigung vernachlässigter Einflüsse in späteren Arbeiten aber auf –1 bis –7 kJ mol $^{-1}$  korrigiert.<sup>[241, 242]</sup> Analog werden in einer Studie von Andrews et al. zur Bestimmung von Bindungsbeiträgen funktioneller Gruppen in Proteinliganden Wasserstoffbrücken hinsichtlich ihrer Stabilisierungseigenschaft überschätzt, weil entropische Bei-

träge, die die Bindung beeinträchtigen, bei der abschließenden Analyse zu groß angesetzt wurden.<sup>[203]</sup>

Wasserstoffbrücken beeinflussen den Ligandenbindungsprozess außerdem durch die starke geometrische Ausrichtung ihrer Wechselwirkungen. Neben theoretischen<sup>[243]</sup> und spektroskopischen Untersuchungen liefert hierzu vor allem die Analyse kristallographischer Datenbanken wertvolle Informationen.<sup>[244, 245]</sup> So bilden Carbonyl- und Carboxylat-Sauerstoffatome Wechselwirkungen hauptsächlich in Richtung ihrer freien Elektronenpaare aus;<sup>[246, 247]</sup> bei Carboxylat-Sauerstoffatomen sind die Elektronenpaare in *syn*-Stellung gegenüber denen in *anti*-Stellung bevorzugt.<sup>[244, 248, 249]</sup> Eine Zusammenstellung von beobachteten Geometrien bei nicht-bindenden Wechselwirkungen im kristallinen Festkörper ist in der Datenbank IsoStar enthalten (Abbildung 5).<sup>[250]</sup>

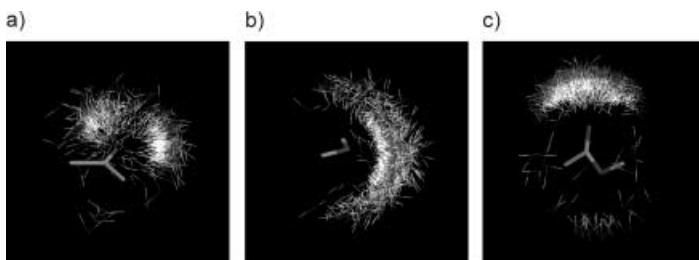


Abbildung 5. Intermolekulare Wechselwirkungen, die in Kristallpackungen niedermolekularer Verbindungen beobachtet wurden (enthalten in der Datenbank IsoStar).<sup>[250]</sup> Gezeigt sind Anordnungen von Hydroxygruppen um aliphatische Ketone (a), aliphatische Ether (b) und aliphatische Ester (c) als Zentralgruppen.

Ebenfalls bekannt als gerichtete,<sup>[251]</sup> wenn auch „schwache“ Wasserstoffbrücken sind Wechselwirkungen zwischen C-H···O-, C-H···N-, C-H···π-Systemen und C-H···Cl,<sup>[252–256]</sup> die in den hydrophoberen Bereichen der Proteine auftreten können. Wesentliche Beiträge zur Affinität eines Liganden zu seinem Rezeptor liefern ferner π-π-Wechselwirkungen<sup>[257, 258]</sup> zwischen aromatischen Systemen im Liganden und den Seitenketten von Phenylalanin, Tyrosin und Tryptophan<sup>[259–261]</sup> sowie Wechselwirkungen zwischen Kationen wie Tetraalkylaminen und aromatischen Systemen.<sup>[262–264]</sup> Letztgenannte Wechselwirkungen spielen etwa bei der Bindung von kationischen Liganden an den nicotinischen Acetylcholinrezeptor eine bedeutende Rolle.<sup>[265, 266]</sup> Interessanterweise wurde bei Rechnungen zum Vergleich von Salzbrücken und Kation-π-Systemen in wässrigen Medien ein um bis zu  $10 \text{ kJ mol}^{-1}$  größerer Beitrag zur Bindungsaffinität durch Kation-π-Systeme bestimmt.<sup>[267]</sup> Koordinative Bindungen funktioneller Gruppen von Liganden (z.B. Hydroxamate, Carboxylate, Phosphate, Thiole) an Metallionen im Protein stabilisieren ebenfalls Rezeptor-Ligand-Komplexe.<sup>[268, 269]</sup> Deutlich „subtile“ elektrostatische Beiträge zur Protein-Ligand-Bindung wie Wechselwirkungen zwischen Dipol-induzierten Dipolen, Dipol und Quadrupol sowie Quadrupol und Quadrupol konnten durch Analyse von hochaufgelösten Carboanhydase-II-Ligand-Komplexen ermittelt werden, wobei die elektrostatischen Wechselwirkungen durch systematischen Ersatz der Benzyl-H-Atome mit Fluor in *N*-(4-Sulfamylbenzoyl)-benzylamin variiert wurden.<sup>[270]</sup>

## 2.2.2. Solvation und Desolvatation

Die molekulare Erkennung zwischen zwei Molekülen findet in biologischen Systemen in wässriger Umgebung statt. Wasser kommt daher – zusätzlich zu der in Abschnitt 2.2.1 beschriebenen Rolle bei der Energetik von Wasserstoffbrücken – ein besonderer Einfluss bei der Bildung von Protein-Ligand-Komplexen zu.<sup>[271–273]</sup>

Wassermoleküle können nicht nur in der reinen, kondensierten Phase als H-Brücken-Donoren und -Acceptoren wirken und so ein Netz von drei bis vier H-Brücken pro Molekül ausbilden.<sup>[205]</sup> Vielmehr wurde diese Fähigkeit auch bei einer Analyse von 19 hochauflösten Kristallstrukturen von Protein-Ligand-Komplexen bei etwa 80 % der Wassermoleküle festgestellt, die verbrückend zwischen Protein und Ligand wirken.<sup>[274]</sup> Für diese indirekte, solvensvermittelte Wechselwirkung wurde unter der Voraussetzung optimaler Geometrie ein Beitrag zur Bindungsaffinität von  $-10.5$  bis  $-12.5 \text{ kJ mol}^{-1}$ <sup>[275, 276]</sup> und an anderer Stelle von  $-7 \text{ kJ mol}^{-1}$ <sup>[277]</sup> abgeschätzt. Der letztgenannte Wert ergibt sich aus der Bilanz zwischen dem entropischen ( $-30 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$  entsprechend  $9 \text{ kJ mol}^{-1}$  für  $-T\Delta S$  bei  $298 \text{ K}$ )<sup>[278]</sup> und dem enthalpischen Beitrag ( $-16 \text{ kJ mol}^{-1}$ ),<sup>[279]</sup> die bei der Überführung eines Wassermoleküls aus der umgebenden Wasserphase in das Bindungsepitop auftreten.

Bei der Untersuchung der Topographie der angrenzenden Moleküloberflächen zeigt sich, dass verbrückende Wassermoleküle im Bereich der Protein-Ligand-Wechselwirkungen bevorzugt in Einbuchtungen auf der Proteinseite und weniger in solchen auf der Ligandenseite sitzen (Abbildung 6).<sup>[277, 280, 281]</sup> Eine Serie hochauflöster Kristallstruktur-

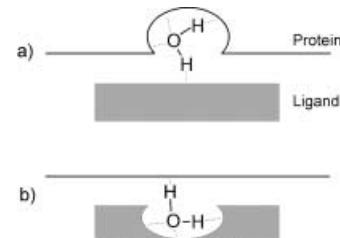


Abbildung 6. Schematische Darstellung von Wassermolekülen, die Protein und Ligand verbrücken; a) häufiger Fall, bei dem das Wassermolekül stärker an das Protein gebunden ist; b) stärker an den Liganden gebundenes Wassermolekül (Abdruck in veränderter Form nach Lit. [277]).

ren von an das Oligopeptid-bindende Protein (OppA) gebundenen Lys-xxx-Lys-Liganden (xxx: natürliche und nichtnatürliche Aminosäuren)<sup>[282, 283]</sup> zeigt, dass hier Wassermoleküle in der Bindetasche als Mediatoren zur Anpassung an die unterschiedlich großen xxx-Seitenkettenreste wirken, wohingegen die Proteinstruktur (bis auf eine Drehung der Seitenkette von Glu32) nahezu unverändert bleibt (Abbildung 7). Die Wassermoleküle bewegen sich jedoch nicht frei in der Ligandenbindetasche, sondern besetzen jeweils energetisch günstige, partiell konservierte Positionen (Abbildung 7).<sup>[277, 284–286]</sup> Interessanterweise ändern sich in diesem System selbst beim Austausch von Trp durch Ala oder Lys

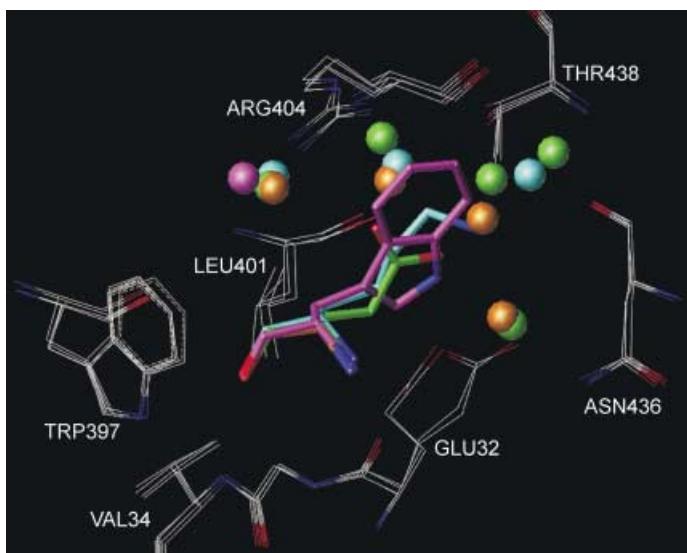


Abbildung 7. Überlagerung der Bindetaschenausschnitte von vier Komplexstrukturen des Oligopeptid-bindenden Proteins (OppA; weiß) mit den Liganden Lys-xxx-Lys, von denen jeweils nur der zentrale xxx-Rest farbcodiert dargestellt ist (orange: Ala (PDB-Code 1jet), violett: Trp (PDB-Code 1jev), grün: Glu (PDB-Code 1jeu), hellblau: Lys (PDB-Code 2olb)). Die als Kugeln dargestellten Wassermoleküle sind entsprechend eingefärbt. Deutlich zu sehen sind die Rigidität der Bindetasche (bis auf Glu32) und eine Clusterbildung durch die Wassermoleküle.<sup>[305]</sup>

durch Glu die Bindungskonstanten nur um maximal eine Größenordnung.<sup>[283]</sup>

Die besondere Stellung von Wasser unter den Lösungsmitteln – bei außergewöhnlich kleinem Molekülvolumen ein tetraedrisch verknüpftes molekulares Netzwerk zu bilden<sup>[287–289]</sup> – tritt auch bei der Desolvatation von Protein und Ligand im Verlauf der Komplexbildung hervor. Damit verbunden ist nicht nur das Aufbrechen von H-Brücken zu funktionellen Gruppen, sondern auch die Reorganisation der Wasserstruktur an der Grenzfläche. Dies geht sowohl mit enthalpischen als auch entropischen Einflüssen auf die Bindungsaaffinität einher.<sup>[240, 290–293]</sup>

Mit dem Begriff *hydrophober Effekt* beschreibt man die Tatsache, dass die Überführung einer unpolaren Substanz/ eines unpolaren Oberflächenbereichs in Wasser a) stark ungünstig ist, b) zu einer Abnahme der Entropie bei Raumtemperatur und c) zu einer Zunahme der Wärmekapazität führt.<sup>[233, 294–298]</sup> Ein erster Ansatz zur Interpretation des hydrophoben Effekts geht auf das „Eisbergmodell“ von Frank und Evans<sup>[299, 300]</sup> zurück: Bei der Hydratisierung einer unpolaren Substanz kommt es zwar zur *Verringerung* der Zahl an H-Brücken zwischen Wassermolekülen, allerdings bilden die unmittelbar an der Grenzfläche liegenden Wassermoleküle *stärkere* H-Brücken als diejenigen in der reinen Wasserphase. So bestimmten Silverstein et al.<sup>[301]</sup> für das Aufbrechen einer Wasserstoffbrücke in reinem Wasser eine Freie Enthalpie von  $\Delta G = 2.0 \text{ kJ mol}^{-1}$ , während der gleiche Prozess bei Wassermolekülen in der ersten Solvatationsphäre um Argon eine Freie Enthalpie von  $\Delta G = 2.6 \text{ kJ mol}^{-1}$  benötigt. Hieraus resultiert eine Clathrat-artige Strukturierung der angrenzenden Wasserhülle und ein partielles Einfrieren der Beweglichkeit der Wassermoleküle.<sup>[302–304]</sup>

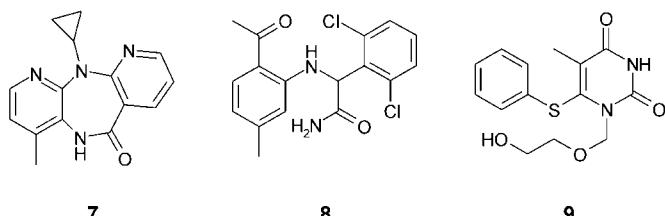
Während sich der enthalpische Beitrag bei Raumtemperatur für diesen Vorgang nahezu kompensiert (statt vieler mittelstarker nun wenige stärkere H-Brücken), nimmt die Entropie wegen der erhöhten Ordnung der Wassermoleküle ab,<sup>[301]</sup> allerdings nur bis zu einer von der unpolaren Substanz abhängigen Temperatur  $T_s$ , bei der die Transferentropie für die gelöste Substanz durch Null geht.<sup>[297, 302]</sup> Umgekehrt ergibt sich daraus für das Vergraben einer hydrophoben Oberfläche während der Komplexbildung für  $T < T_s$  ein günstiger, entropiegetriebener Vorgang ( $\Delta H \approx 0, \Delta S > 0$ ). Diese Sichtweise wird auch von oberflächenspezifischen Schwingungsspektroskopieuntersuchungen molekularer Strukturen an  $\text{CCl}_4/\text{H}_2\text{O}$ - und Kohlenwasserstoff/ $\text{H}_2\text{O}$ -Grenzflächen gestützt, die zwar eher schwache Wasserstoffbrücken zwischen Wassermolekülen an der Phasengrenze beschreiben, allerdings auf eine deutliche Orientierung der Wassermoleküle durch Wechselwirkungen mit den organischen Phasen hinweisen.<sup>[305]</sup>

Allerdings ist diese klassische Sichtweise nicht allgemein akzeptiert.<sup>[298, 302]</sup> Ein alternativer Ansatz sieht nicht in der Strukturierung der Wassermoleküle die Ursache für hydrophobe Wechselwirkungen, sondern in einer positiven Enthalpie bedingt durch das Aufbrechen von H-Brücken zur Bildung einer Kavität im Wasser, die anschließend die unpolare Substanz aufnimmt.<sup>[306, 307]</sup> Dementsprechend wurden in kalorimetrischen Studien Beiträge von 25 bis 100 % der Bindungsenthalpie von Liganden an Proteine bedingt durch Lösungsmittelreorganisation bestimmt.<sup>[308]</sup>

Der Beitrag hydrophober Wechselwirkungen zur Freien Enthalpie bei der Proteininfaltung und der Protein-Ligand-Komplexbildung kann als proportional zur Größe der während dieser Vorgänge vergrabenen hydrophoben Oberfläche angesehen werden.<sup>[309–314]</sup> Damit ergibt sich ein Zugang zur quantitativen Charakterisierung dieser Effekte.<sup>[315, 316]</sup> Bei Löslichkeitsstudien von Kohlenwasserstoffen in Wasser erhält man so als Beitrag der hydrophoben Wechselwirkungen  $-0.10$  bis  $-0.14 \text{ kJ mol}^{-1} \text{ Å}^{-2}$ .<sup>[309, 310, 317, 318]</sup> Die Analyse der vergrabenen Oberfläche bei Rezeptor-Ligand-Bindungsstellen im Zusammenhang mit experimentell bestimmten Bindungsaaffinitäten ergibt Werte von  $-0.11$  bis  $-0.24 \text{ kJ mol}^{-1} \text{ Å}^{-2}$  als Beiträge zur Freien Enthalpie.<sup>[240, 319, 320]</sup> Die Vergrabung einer Methylgruppe (ca.  $25 \text{ Å}^2$ ) liefert daher  $-2.75$  bis  $-6 \text{ kJ mol}^{-1}$ , was bei 298 K einer Erhöhung der Assoziationskonstanten um das drei- bis elffache entspricht. Aus Mutationsstudien zur Bestimmung des Einflusses der hydrophoben Wechselwirkungen auf die Stabilität von Proteinen resultieren dagegen Werte von  $-0.08$  bis  $-0.64 \text{ kJ mol}^{-1} \text{ Å}^{-2}$ ,<sup>[321–324]</sup> wobei die meisten Werte auch hier größer als die aus Löslichkeitsstudien sind. Dieser Befund kann mit einem kooperativen Effekt erklärt werden (siehe Abschnitt 2.2.4),<sup>[325]</sup> ohne dessen Berücksichtigung der alleinige Bezug auf die Größe der vergrabenen Oberfläche dann zu den berichteten höheren Beiträgen je  $\text{Å}^2$  führt. Huang und Chandler wiesen zudem kürzlich darauf hin, dass für kleine hydrophobe Moleküle eher eine Skalierung mit dem Molekülvolumen, für größere hydrophobe Moleküle dagegen mit der Moleküloberfläche angebracht ist.<sup>[326]</sup>

Hydrophobe Wechselwirkungen werden auch als Haupttriebkraft für konformativene Änderungen des Rezeptors bei

der Ligandenbindung angesehen. Diese induzierte Anpassung kann man sich als „Zusammenklappen“ des Rezeptors um den Liganden vorstellen.<sup>[199]</sup> So bedingt im Extremfall die Bindung von Trifluoperazin **5** an  $\text{Ca}^{2+}$ -Calmodulin eine Konformationsänderung des Proteins von einer verlängerten Hantel zu einer kompakten Form (Abbildung 8),<sup>[327]</sup> und



Schema 3. Inhibitoren der HIV-1-Reverse-Transkriptase.

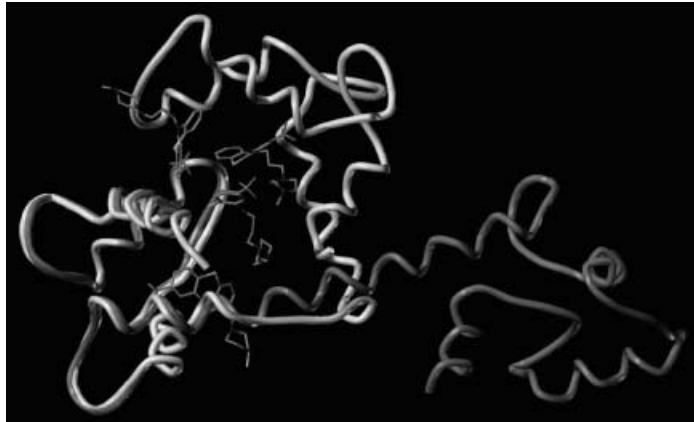


Abbildung 8. Überlagerung der N-terminalen Domänen von Calmodulin als Apoenzym (dunkelgrau; PDB-Code 1lin) und im Komplex (hellgrau; PDB-Code 3cln) mit vier Trifluoperazin-Molekülen **5**, die das „Zusammenklappen“ des Proteins um die Liganden zeigt. Von den Proteinen ist jeweils nur der Verlauf des Rückgrats dargestellt.

Kristallstrukturanalysen von 3,4,5-substituierten Piperidinderivaten (z. B. **6**), gebunden an Renin, ergaben eine induzierte Anpassung der Rezeptortasche zur Unterbringung der Substituenten (Schema 2).<sup>[328]</sup> Ähnliche Fälle diesbezüglich sind auch für Protein-Ligand-Komplexe der Aldosereduktase<sup>[329]</sup> und der Glycogenphosphorylase<sup>[330]</sup> beschrieben.

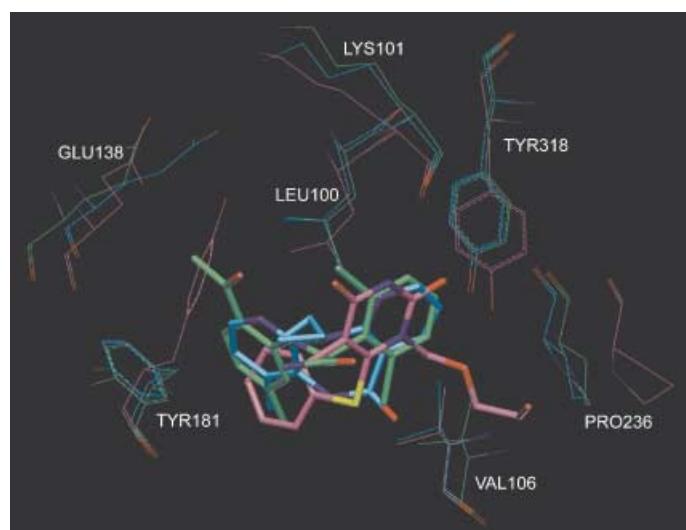


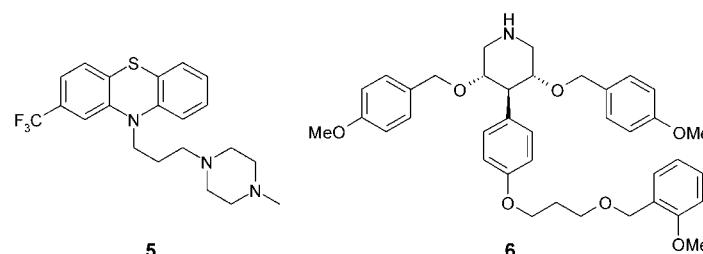
Abbildung 9. „Induced fit“ in der Bindetasche der HIV-1-Reverse-Transkriptase bedingt durch die Inhibitoren Nevirapin **7** (cyan; PDB-Code 1vrt),  $\alpha$ -APA **8** (grün; PDB-Code 1vru) und HEPT **9** (violett; PDB-Code 1rti). Die Aminosäuren des Proteins sind entsprechend den Liganden eingefärbt. Aus Gründen der Übersichtlichkeit wurden nur solche Aminosäuren dargestellt, bei denen sich mindestens ein Atom im Abstand  $<4\text{ \AA}$  zu den Liganden befindet und bei denen eine deutliche Konformationsänderung während der Bindung der unterschiedlichen Liganden zu beobachten ist.

Konformationsänderung zu beobachten ist, lässt sich hier vermuten, dass durch die Anwesenheit der Inhibitoren jeweils unterschiedliche „Stufen“ entlang dieses Umlagerungspfades eingefroren werden.

### 2.2.3. Intramolekulare Veränderungen bei Ligand und Rezeptor

Bei der Bildung eines Protein-Ligand-Komplexes kommt es zu Änderungen der Freiheitsgrade der beteiligten Komponenten und damit verbunden zu einer Entropieänderung.<sup>[332]</sup> Betrachtet man die Komplexbildung – ohne Berücksichtigung des Wassers – als bimolekulare Assoziation, so gehen je drei Freiheitsgrade der Translation und Rotation verloren, während sechs neue Schwingungszustände entstehen.<sup>[290, 333–335]</sup> Obwohl die Separierbarkeit der Standardentropie in einzelne Beiträge für Vorgänge in Lösung formal nicht möglich ist,<sup>[336]</sup> bildet dieses Vorgehen doch den Einstieg zum Verständnis des Einflusses von Flexibilität und Mobilität von Protein und Ligand auf die Komplexbildung.<sup>[332]</sup>

Unter Verwendung des Ansatzes von Sackur-Tetrode oder der Trouton'schen Regel<sup>[337]</sup> und der nicht unkritischen<sup>[338]</sup>



Schema 2. Liganden von  $\text{Ca}^{2+}$ -Calmodulin (**5**) und Renin (**6**), die eine Anpassung der jeweiligen Rezeptorbindetaschen induzieren.

Diese Anpassung kann auch eine ähnliche Orientierung von Wirkstoffen unterschiedlicher Gestalt in derselben Bindetasche eines Rezeptors bedingt durch das Auftreten günstiger hydrophober Wechselwirkungen ermöglichen. Ein eindrucksvolles Beispiel ist die Bindung zwischen HIV-1-Reverse-Transkriptase und den Inhibitoren Nevirapin **7**,  $\alpha$ -APA **8** und HEPT **9** (Schema 3).<sup>[331]</sup> Während beim Vergleich der Strukturen keine der C- $\alpha$ -Atompositionen des Proteins um mehr als  $2.7\text{ \AA}$  verschoben werden, lassen sich die beobachteten Änderungen als Folge einer Anpassung an die strukturellen Variationen der Inhibitorsubstituenten erklären (Abbildung 9).<sup>[199]</sup> Da im Fall der HIV-1-Reverse-Transkriptase jedoch auch bei der RNA-Bindung eine deutliche

Annahme, dass die Ergebnisse auf Vorgänge in Lösung zu übertragen sind,<sup>[198, 339]</sup> ergibt sich für den Entropieverlust durch vollständige Einschränkung von Translation und Rotation eines Moleküls ein Wert von etwa  $-420 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$ .<sup>[340]</sup> Unter Berücksichtigung der Restmobilität der Moleküle im Komplex – abgeschätzt aus den experimentell beobachteten Bewegungen von Lysozym<sup>[341]</sup> und Insulinmolekülen<sup>[342]</sup> in ihren Kristallen – und aus Entropieänderungen bei inter- und intramolekularen Reaktionen wurden allerdings nur etwa halb so große Entropieverluste (ca.  $-200 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$ <sup>[290, 333, 334, 343]</sup> entsprechend  $60 \text{ kJ mol}^{-1}$  bei 298 K) bestimmt. Noch kleinere Beiträge wurden von Searle und Williams mit Werten von 9 bis  $45 \text{ kJ mol}^{-1}$  aus Schmelz- und Sublimationsstudien an Kohlenwasserstoffen und polaren organischen Molekülen angegeben,<sup>[292]</sup> in Übereinstimmung mit Ergebnissen aus Assoziationsstudien rigider cyclischer Dipeptide in fester, flüssiger und gasförmiger Phase.<sup>[344]</sup> Hermans und Wang berechneten den durch die Einschränkung von Translation und Rotation des Liganden bedingten Beitrag zur Freien Enthalpie der Bindung von Benzol an eine Lysozym-T4-Mutante zu  $29 \text{ kJ mol}^{-1}$  (bei 300 K). Eine Zerlegung in translatorische und rotatorische Anteile ermöglichte zudem, den verbliebenen „Freiraum“ des Benzols in der Bindetasche abzuschätzen. Es ergaben sich mittlere quadratische Abweichungen („root-mean-square deviations“; rmsd) bezüglich der Position von  $0.6 \text{ \AA}$  und bezüglich der Rotation um den Normalenvektor von 10 bis  $15^\circ$ .<sup>[345]</sup>

Bei der Bindung des Liganden an den Rezeptor kommt es darüber hinaus noch zur Einschränkung der konformativen Beweglichkeit, d.h. der internen Freiheitsgrade um drehbare Bindungen. Der Beitrag zur Freien Bindungsenthalpie durch Entropieerniedrigung aufgrund Einschränkung eines Rotors wurde für 298 K allgemein mit  $0.5 \text{ kJ mol}^{-1}$ ,<sup>[236]</sup>  $2.5 \text{ kJ mol}^{-1}$ <sup>[292, 343]</sup> und  $4-6 \text{ kJ mol}^{-1}$ <sup>[290, 333, 334]</sup> angegeben. Im Fall von Aminosäuren wurden Wahrscheinlichkeiten für den jeweiligen rotameren Zustand aus beobachteten Verteilungen solvensexponierter Seitenketten in Proteinkristallen bestimmt und zur Abschätzung des Entropieverlustes bei Einschränkung ihrer konformativen Beweglichkeit verwendet.<sup>[346, 347]</sup> Dabei ergaben sich Beiträge zur Freien Enthalpie von 0 (für Ala, Gly, Pro) bis  $8.7 \text{ kJ mol}^{-1}$  (für Gln) bei einem Mittelwert von  $3.7 \text{ kJ mol}^{-1}$  pro Rest.

Eine Reihe experimenteller Ergebnisse zeigt, dass Liganden tatsächlich oft einen beträchtlichen Teil ihrer Mobilität im rezeptorgebundenen Zustand behalten und eine Zunahme der Beweglichkeit auf der Proteinseite sogar die Freie Bindungsenthalpie günstig beeinflussen kann.<sup>[348]</sup> Der erstgenannte Effekt zeigt sich z.B. bei der Bindung von Camphan, Adamantan und Thiocampher an Cytochrom P450<sub>cam</sub>.<sup>[349]</sup> Ohne eine Wasserstoffbrücke zu bilden, rotieren die Liganden frei in der Bindetasche und werden daher nichtstereoselektiv hydroxyliert. Ein anderes Beispiel dafür, dass Komplexbildung nicht grundsätzlich mit Einschränkung molekulärer Beweglichkeit einhergeht, ergibt sich bei der Bindung von DNA an die C-terminale Domäne von Topoisomerase I:<sup>[350]</sup> Während ein Teil der Proteinreste eine höhere Ordnung einnimmt, werden andere stärker beweglich. Im Fall der Bindung eines hydrophoben Mauspheromons an „mouse major urinary“-Protein konnte mit NMR-Relaxa-

tionsstudien sogar gezeigt werden,<sup>[351]</sup> dass eine Zunahme der Entropie des Proteinrückgrats einen beträchtlichen günstigen Beitrag zur Freien Bindungsenthalpie liefert, der in der Größenordnung anderer Beiträge liegt. Analog fanden Weber et al.<sup>[134, 352]</sup> bei kristallographischen und thermodynamischen Studien natürlicher und synthetischer Liganden für die Bindung an Streptavidin, dass der Ligand mit der höchsten Bindungsaffinität zugleich die größte Beweglichkeit im Komplex aufweist.

Ein alternativer Weg, den ungünstigen Einfluss der Einschränkung der Beweglichkeit des Liganden bei der Komplexbildung zu minimieren, besteht darin, seine konformative Vororientierung in Lösung zu erreichen. Dies ist z.B. im Fall des Thrombin-Inhibitors D-Phe-Pro-boro-Arg gelungen,<sup>[353]</sup> bei dem ein „hydrophober Kollaps“<sup>[354]</sup> zur Minimierung der hydrophoben Oberfläche der Seitenketten von D-Phe und Pro und somit zur Ausbildung einer Konformation führt, die der rezeptorgebundenen stark ähnelt.<sup>[355]</sup> Interessanterweise wird ein inverser „hydrophiler Kollaps“ der Immunsuppressoren CsA und FK506 und eine daraus resultierende Präorganisation als Grund für deren gute Permeabilität durch biologische Membranen angesehen und durch eine Formulierung der Darreichungsform mit Olivenöl unterstützt.<sup>[356]</sup>

Neben entropischen haben auch enthalpische Unterschiede zwischen Lösungs- und rezeptorgebundenen Konformationen des Liganden einen Einfluss auf die Freie Bindungsenthalpie. Vergleiche zwischen Kraftfeldenergien von Konformationen proteingebundener Liganden mit denen der Konformationen des globalen Minimums ergaben Differenzen zwischen 0 und  $167 \text{ kJ mol}^{-1}$  bei 33 untersuchten Verbindungen bei einem Mittelwert von  $67 \text{ kJ mol}^{-1}$ ,<sup>[357]</sup> und ungünstige konformativen Energien rezeptorgebundener Konformationen von 112 bis  $296 \text{ kJ mol}^{-1}$  für drei Dihydrofolatreduktase-Inhibitoren.<sup>[358]</sup> Diese hohen Werte sind allerdings darauf zurückzuführen, dass die rezeptorgebundenen Geometrien mit solchen aus Gasphasenensembles verglichen wurden. Ein solcher Vergleich kann jedoch kaum als relevant gelten. Bei analogen Studien unter Verwendung von Konformationsensembles, die mit einem Solvationsmodell erzeugt wurden, zeigt sich denn auch, dass die proteingebundene Geometrie hinsichtlich ihrer Konformationsenthalpie weniger als  $12 \text{ kJ mol}^{-1}$  ungünstiger ist.<sup>[359]</sup> Vieth et al. fanden zudem, dass die Positionen von für die Bindung an das Protein wichtigen „Ankerpunkten“ bei proteingebundenen Ligandenkonformationen mit denen bei Minimumsenergie-Strukturen festgestellten übereinstimmen. Auch konnten in mehreren Fällen Konformationen für Liganden gefunden werden, die nur geringfügig von denen in der Kristallstruktur abweichen, aber dennoch eine wesentlich geringere Konformationsenergie aufweisen.<sup>[360]</sup>

Darüber hinaus ist zu bedenken, dass die anisotrope molekulare Umgebung des Proteins die Energiebarrieren zwischen konformativen (Rotations-)Zuständen beeinflussen kann, wie es z.B. für den Dihydrofolatreduktase-Hemmer Methotrexat beim Vergleich von enzymgebundener Konformation mit solchen aus Kristallen des Liganden alleine beschrieben wurde.<sup>[361]</sup> Dieser Effekt wird erst in zukünftigen Kraftfeldern berücksichtigt werden können.<sup>[362]</sup>

### 2.2.4. Additivität, Kooperativität und Enthalpie-Entropie-Kompensation

Für das Verständnis und die Vorhersage von Protein-Ligand-Wechselwirkungen werden oft Ansätze auf Basis von Gruppenadditivitäten [Gl. (4)] oder der Additivität Freier-Enthalpie-Komponenten herangezogen [Gl. (5)]. Sehr frühe Arbeiten hierzu wurden von Andrews et al.<sup>[203]</sup> sowie von Lau und Pettitt<sup>[363]</sup> durchgeführt.

$$\Delta G = \Delta G_{\text{CH}_3} + \Delta G_{\text{OH}} + \Delta G_{\text{Phenyl}} + \dots \quad (4)$$

$$\Delta G = \Delta G_{\text{H-Brücke}} + \Delta G_{\text{Solvatation}} + \Delta G_{\text{Konformation}} + \dots \quad (5)$$

Schon die schwankenden Zahlenwerte für die in den vorherigen Abschnitten diskutierten Beiträge verdeutlichen, dass dieses Vorgehen nicht ohne weiteres möglich ist. Eine strikte Betrachtung im Rahmen der statistischen Thermodynamik zeigt,<sup>[364]</sup> dass die Freie Energie (Freie Enthalpie) eine globale Eigenschaft eines betrachteten Systems ist und als solche vom gesamten Konfigurationsraum des Systems abhängt. Während es also möglich ist, in guter erster Näherung die Energie eines Systems in (paarweise) Einzelbeiträge zu separieren, gilt dies *prinzipiell* nicht für die Entropie<sup>[332]</sup> und die Freie Energie (Freie Enthalpie).<sup>[365]</sup> Die Freie Energie (Freie Enthalpie) ist zwar als Zustandsfunktion wegunabhängig, dies gilt jedoch nicht für ihre Komponenten. Beispiele der Nichtadditivität aus Mutationstudien belegen dies.<sup>[237, 238, 366–368]</sup> Eine Zerlegung in einzelne Komponenten ist jedoch dann möglich, wenn sich das betrachtete Gesamtsystem in voneinander *unabhängige* Subsysteme zerlegen lässt.<sup>[364]</sup> Eine solche Zerlegung ist allerdings für biologische Systeme mit schwachen, nichtkovalenten Wechselwirkungen und damit sehr ähnlichen (makroskopischen) Zuständen fraglich.<sup>[369]</sup>

Eine Alternative besteht darin, nur den energiedominierenden Teil der Freien Energie (Freien Enthalpie) zu zerlegen [Gl. (6)]:<sup>[365, 369, 370]</sup>

$$\Delta G = \Delta H_{\text{H-Brücke}} + \Delta H_{\text{Solvatation}} + \Delta H_{\text{Konformation}} + \dots + T \Delta S \quad (6)$$

Dieses Vorgehen wurde z. B. zur Bestimmung „intrinsischer Bindungsenergien“ aus Freien Enthalpien der Bindung von Molekülen mit den Gruppen A, B und A + B an ein Protein angewendet.<sup>[237, 291]</sup>

Ein deutliches Beispiel für Nichtadditivität – an anderer Stelle<sup>[371, 372]</sup> als „Kooperativität“ bezeichnet – zeigt sich beim Versuch der Korrelation der „hydrophoben Freien Enthalpie“ mit der dem Lösungsmittel nicht zugänglichen unpolaren Oberfläche. Ergebnisse aus Mutationsstudien an Proteinen und Studien zur Ligandenbindung zeigen, dass der hydrophobe Effekt Stabilität und Bindung in wässriger Lösung augenscheinlich stärker fördert, als dies in Lösungsmittel-Transfer-Messungen bestimmt wurde (siehe Abschnitt 2.2.2).<sup>[315]</sup> Es konnte jedoch gezeigt werden, dass das Vergraben eines hydrophoben Molekülteils in einer molekularen Erkennungsstelle zur gleichzeitigen, kooperativen Verstärkung benachbarter elektrostatischer Wechselwirkungen führen kann.<sup>[325, 372]</sup>

Der Anteil der Standardenthalpie  $\Delta H^\circ$  und Standardentropie  $\Delta S^\circ$  an der Freien (Bindungs-)Enthalpie  $\Delta G^\circ$  [Gl. (1)] kann direkt aus mikrokalorimetrischen Messungen<sup>[373]</sup> oder über Van't Hoff-Auftragungen von Affinitätsmessungen bei unterschiedlichen Temperaturen<sup>[374]</sup> bestimmt werden (siehe Abschnitt 4). Hierbei ergibt sich im Allgemeinen keine Korrelation zwischen  $\Delta H^\circ$  und  $\Delta G^\circ$ , d. h., eine Interpretation und Vorhersage von Bindungseigenschaften eines Liganden an ein Protein allein auf enthalpischer Grundlage ist unzureichend.<sup>[194]</sup> Eine Ausnahme kann aber für Serien ähnlicher Liganden bestehen, innerhalb derer der entropische Anteil sich dann als nahezu konstant erweist.

Die deutliche Korrelation zwischen  $\Delta H^\circ$  und  $\Delta S^\circ$  („Enthalpie-Entropie-Kompensation“) ist dagegen eine intrinsische Eigenschaft schwacher intermolekularer Wechselwirkungen<sup>[242, 336]</sup> und wird allgemein bei (supramolekularen) Wirt-Gast-<sup>[375]</sup> und Rezeptor-Ligand-Komplexen<sup>[293, 376, 377]</sup> beobachtet. Allerdings ist diese Form der Kompensation keineswegs als „universal“ anzusehen.<sup>[378, 379]</sup> Sie kann dahingehend interpretiert werden, dass eine Verstärkung einer intermolekularen Bindung gleichzeitig zu einem Verlust an Freiheitsgraden der Bewegung führt und umgekehrt. Ihr Auftreten ist von besonderer Bedeutung für die Vorhersage von Rezeptor-Ligand-Wechselwirkungen: Während der enthalpische und entropische Anteil allein beträchtliche Größen annehmen kann, liegt die Änderung der Freien Enthalpie häufig bei Null. Schon kleine *relative* Fehler bei der Vorhersage von  $\Delta H^\circ$  und  $\Delta S^\circ$  können daher einen deutlichen Einfluss auf  $\Delta G^\circ$  haben.

### 3. Theoretische Ansätze zur Vorhersage von Bindungsaffinitäten

Arbeiten zur Vorhersage von Bindungsaffinitäten lassen sich in zwei Hauptkategorien einteilen:

- Ist die *3D-Struktur des biologischen Zielmoleküls nicht bekannt*, beruht die (oft qualitative) Vorhersage der Bindungsaffinität neuer Liganden auf dem Vergleich mit Referenzstrukturen – etwa endogenen Liganden oder bereits synthetisierten Verbindungen.<sup>[150, 151, 380, 381]</sup> Die große Bedeutung<sup>[382]</sup> dieser Verfahren ergibt sich aus der Tatsache, dass viele pharmakologisch interessante Zielmoleküle, z. B. G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCR),<sup>[383, 384]</sup> Ionenkanäle<sup>[385]</sup> oder Transportproteine, (trans-)membranständige Proteine sind.<sup>[386–388]</sup> Für diese existieren bislang bis auf wenige Ausnahmen keine experimentell bestimmten 3D-Strukturen hinreichender Genauigkeit, sondern oft nur auf indirektem Weg erhaltene Modelle.
- Bei *Kenntnis der 3D-Struktur des Rezeptors* dagegen erfolgt die Vorhersage der Bindungsaffinität aufgrund der geometrischen und chemischen Komplementarität der in das biologische Zielmolekül eingelagerten Liganden.<sup>[173–175, 198, 389–394]</sup> Bedingt durch die ständig wachsende Zahl dreidimensionaler Strukturen der makromolekularen Rezeptoren (Abbildung 2) ist in Zukunft eine deutliche Zunahme der Bedeutung dieser Verfahren zu erwarten.

In diesem Aufsatz liegt der Schwerpunkt auf Methoden, die bei Kenntnis der 3D-Struktur des Rezeptors angewendet werden. Da allerdings die feldbasierten 3D-QSAR-Verfahren als lediglich an einem Ligandentrainingssatz lernende Verfahren erstaunlich gute Affinitätsvorhersagen erzielen, sollen diese Methoden in die folgende Zusammenstellung mit aufgenommen werden.

### 3.1. Ansätze ohne Kenntnis der Rezeptorstruktur

Ausgangspunkt für die Vorhersage der Bindungsaffinität eines Liganden ohne Kenntnis der Rezeptorstruktur ist die Annahme, dass sich biologische Ähnlichkeit in der molekularen (chemischen) Ähnlichkeit niedermolekularer Verbindungen widerspiegelt.<sup>[380]</sup> Auf Ansätze, die Moleküle auf eindimensionaler und zweidimensionaler Basis miteinander vergleichen<sup>[395]</sup> (etwa über das Auftreten/Fehlen funktioneller Gruppen oder über Bitvektorrepräsentationen topologischer Deskriptoren (Fingerprints)) soll hier jedoch genauso wenig eingegangen werden wie auf 3D-Verfahren auf der Basis von Substrukturvergleichen,<sup>[396]</sup> Pharmakophorsuchen<sup>[397]</sup> und Überlagerungen niedermolekularer Verbindungen.<sup>[398–400]</sup> Diese Methoden können oft nur ein qualitatives Maß für die zu erwartende Bindungsaffinität liefern.

Quantitative Vorhersagen lassen sich dagegen aus Quantitativen-Struktur-Aktivitäts-Beziehungen (QSARs) gewinnen.<sup>[150]</sup> Auf Basis physikochemischer und struktureller Parameter wird eine Relation zwischen der Struktur einer Verbindung und ihrer Wirkung (im biologischen Sinn etwa Affinität und Selektivität) aufgestellt. Die klassischen 2D-QSAR-Verfahren, die auf den Arbeiten von Hansch und Fujita<sup>[401]</sup> sowie Free und Wilson beruhen,<sup>[402]</sup> haben den Nachteil, dass nur Datensätze strukturell ähnlicher Moleküle untersucht werden können und für das Verständnis von Rezeptor-Ligand-Wechselwirkungen essentielle 3D-Strukturinformationen nur untergeordnet oder indirekt berücksichtigt werden.<sup>[403]</sup>

Dieser letzte Punkt wird durch Anwendung von 3D-QSAR-Verfahren<sup>[152, 404]</sup> umgangen: Aus der räumlichen Struktur von Liganden werden relative Unterschiede der einzelnen Mitglieder eines Datensatzes ermittelt und mit bekannten Eigenschaften der Verbindungen, etwa der Bindungsaffinität zu einem Rezeptor, korreliert. Voraussetzung dafür ist aber, dass eine bioaktive Konformation für jeden Liganden bestimmt werden kann und diese Konformationen relativ zueinander so angeordnet werden, wie es für ihre Anordnung in der Bindetasche zu erwarten ist.<sup>[398]</sup> Ausgangspunkt für diese Überlagerungen können rigide Mitglieder des zu untersuchenden Datensatzes,<sup>[405]</sup> Konformationen aus bekannten Protein-Ligand-Kristallstrukturen<sup>[406, 407]</sup> oder einen Pharmakophor bildende funktionelle Gruppen sein.<sup>[408, 409]</sup> Neben atom- und gruppenbasierten Überlagerungsverfahren wird vor allem die (flexible) Überlagerung von Molekülen durch Maximierung der Ähnlichkeit ihrer molekularen Felder angewendet.<sup>[398, 400]</sup>

Im Folgenden soll eine kurze Beschreibung gängiger 3D-QSAR-Verfahren gegeben werden; der Schwerpunkt wird auf der prototypischen CoMFA-Methode und

davon ausgehenden Erweiterungen liegen. Vollständige Übersichten über dieses Gebiet finden sich in Lit. [150, 151, 410, 411].

- Das aus dem Vorläufer DYLOMMS<sup>[412]</sup> hervorgegangene dreidimensionale, gitterbasierte CoMFA („Comparative Molecular Field Analysis“)-Verfahren<sup>[405]</sup> vergleicht molekulare Energiefelder einer Serie von Molekülen und korreliert Unterschiede darin mit Unterschieden in abhängigen Zielgrößen, hier den Bindungsaffinitäten. Im klassischen Verfahren werden unter der Annahme, dass entropische Beiträge dazu innerhalb des betrachteten Datensatzes als konstant angesehen werden können, für jedes Molekül für die Punkte eines Gitterkastens, der die gesamten Moleküle umschließt, sterische und elektrostatische Wechselwirkungsenergien berechnet. Für jedes Molekül  $n$  ergibt sich damit die QSAR-Gleichung (7):

$$\text{Affinität}_n = k + \alpha_1 S_{n,1} + \dots + \alpha_M S_{n,M} + \beta_1 E_{n,1} + \dots + \beta_M E_{n,M} \quad (7)$$

Die Indizes 1, 2, ...,  $M$  stehen für den jeweiligen Gitterpunkt und  $S_{n,1}, \dots, S_{n,M}$  sowie  $E_{n,1}, \dots, E_{n,M}$  für die jeweilige sterische bzw. elektrostatische Energie an diesem Punkt. Die Koeffizienten  $\alpha_1, \dots, \alpha_M$  und  $\beta_1, \dots, \beta_M$  werden aus dem linearen Gleichungssystem durch Anwendung einer PLS („partial least squares“)-Analyse<sup>[413, 414]</sup> erhalten. Mit dem so erhaltenen Modell können nun Bindungsaffinitäten für neue, im Trainingsdatensatz nicht enthaltene Moleküle berechnet werden.

Während die sterischen und elektrostatischen molekularen Felder rein enthalpische Beiträge beschreiben, wird durch Charakterisierung hydrophober Eigenschaften der Moleküle versucht, entropische Beiträge zu berücksichtigen.<sup>[415]</sup> Hierunter fallen die Verwendung von Feldern auf Basis des HINT („Hydrophobic Interaction“)-Ansatzes,<sup>[416, 417]</sup> molekulare Lipophilie-Potentiale (MLPs),<sup>[316]</sup> die durch das Programm GRID<sup>[418]</sup> mit der H<sub>2</sub>O- oder DRY-Probe erzeugten Felder sowie mit dem DelPhi-Programm<sup>[419]</sup> berechnete Desolvatationsenergie-Felder.

- Ein alternativer Ansatz zur Berechnung molekularer Wechselwirkungsfelder wird in dem CoMSIA („Comparative Molecular Similarity Indices Analysis“)-Verfahren verfolgt.<sup>[420]</sup> Hier werden Gauß-Funktionen zur Beschreibung sterischer, elektrostatischer und hydrophober Ähnlichkeiten sowie zur Beschreibung von H-Brücken-Donor- und H-Brücken-Acceptoreigenschaften<sup>[244, 421]</sup> der Moleküle verwendet. Somit wird der Nachteil des klassischen CoMFA-Ansatzes umgangen, gerade in der Nähe der Moleküloberfläche besonders steile Potentialverläufe aufzuweisen. Mit CoMSIA können deshalb auch Ähnlichkeitsindizes in unmittelbarer Nähe von Molekülatomen bestimmt werden. Die weitere Auswertung ähnelt dann jedoch dem bei CoMFA beschriebenen Weg.
- Der HASL („Hypothetical Active Site Lattice“)-Ansatz<sup>[422]</sup> ist ebenfalls eine gitterbasierte 3D-QSAR-Technik, bei der allerdings partielle Aktivitäten auf Gitterpunkten innerhalb des Van-der-Waals-Volumens der verwendeten Liganden verteilt werden. Die Summe der Werte an allen Punkten, die zu einem Molekül gehören, entspricht dann der zu korrelierenden Größe.

- Bei der Compass-Technik<sup>[423]</sup> werden molekulare Wechselwirkungsfelder nur in der Nähe der Van-der-Waals-Oberfläche der jeweiligen Moleküle berechnet, womit eine Fokussierung auf den Bereich des (hypothetischen) Rezeptor-Ligand-Bindungsepitops erreicht wird. Zudem wird die Zahl der verwendeten Deskriptoren stark reduziert. Aus ihnen wird dann unter Verwendung eines neuronalen „back-propagation“-Netzes ein QSAR-Modell erzeugt. Dieses Modell kann weiterhin durch einen automatischen Prozess der iterativen Konformationserzeugung und Überlagerung der verwendeten Verbindungen verbessert werden.
- Im Unterschied zu den bisherigen Verfahren werden beim Expertensystem APEX-3D<sup>[424]</sup> keine molekularen Wechselwirkungsfelder berechnet. Stattdessen wird versucht, den komplexen Mustererkennungsprozess zur Aufstellung einer Beziehung zwischen strukturellen Moleküleigenschaften und beobachteter Aktivität in einzelne automatisierte Schritte zu zerlegen. Moleküle mit ähnlicher Aktivität werden zunächst nach ähnlichen 2D-topologischen oder 3D-topographischen Mustern untersucht. Unter Verwendung logischer Programmierung werden damit Pharmakophore identifiziert, die als Basis zur Überlagerung der Moleküle verwendet werden. Abschließend wird ein 3D-QSAR-Modell aus physikochemischen Eigenschaften der pharmakophoren Gruppen sowie globalen molekularen Eigenschaften wie Hydrophobie und Molrefraktion erstellt.
- Die Methode YAK<sup>[158]</sup> geht auf Ansätze von Höltje und Kier<sup>[425]</sup> zurück, bei denen mit einem Satz von Liganden wechselwirkende Seitenketten von Aminosäuren explizit in Form eines Pseudorezeptors modelliert werden. YAK selektiert und positioniert diese Rezeptorseitenketten automatisch, wobei kristallographische Zusatzinformationen, Daten aus Sequenzanalysen homologer Proteine oder aus Mutationsstudien einfließen können. Die Auswahl und Positionierung hängt zudem davon ab, ob berechnete Energien der Wechselwirkung zwischen den Aminosäuren und den Liganden mit den Affinitätsdaten korrelieren. Aus den zunächst generierten, zu funktionellen Gruppen der Liganden komplementären Aminosäuren wird durch Verbrückung mit Poly-Gly-Fragmenten ein Pseudorezeptor konstruiert.

### 3.2. Ansätze mit Kenntnis der Rezeptorstruktur

Der Erfolg von Docking- und De-novo-Design-Verfahren hängt maßgeblich von der Bewertung der erhaltenen geometrischen Orientierungen zwischen Ligand und Protein hinsichtlich der zu erwartenden Bindungsaffinität ab.<sup>[174, 175, 426]</sup> Eine kritische Zusammenfassung der Grundlagen der statistischen Thermodynamik zur Berechnung der Bindungsaffinitäten wird in Lit. [173, 198] gegeben. Übersichten über angewendete Verfahren im Allgemeinen sind in Lit. [174, 175, 389–391, 394, 427, 428] enthalten. Die Berechnung molekularer Wechselwirkungsfelder auf Grundlage der bekannten Rezeptorstruktur beschreibt Lit. [429] im Überblick, während Lit. [430, 431] im Speziellen Anwendungen

und Fortschritte bei kraftfeldbasierten Rechnungen behandelt. Einen Überblick über die rechnerische Behandlung der Elektrostatik bei makromolekularen Systemen ist in Lit. [216, 432–436] zu finden, wohingegen Lit. [437–445] die Berechnung von Freier Enthalpie und Entropie durch thermodynamische Störungsrechnungen zusammenfassen.

Im Folgenden werden die Verfahren hinsichtlich ihrer methodischen Grundlagen klassifiziert und beschrieben. Allerdings sind die Grenzen dabei nicht immer scharf einzuhalten, einige Verfahren kombinieren außerdem mehrere Ansätze. In diesen Fällen folgt die Einteilung dem zentralen methodischen Element.

#### 3.2.1. Freie-Energie-Störungsrechnungen und Lineare-Freie-Energie-Ansätze

Der vom thermodynamischen Standpunkt einzige korrekte Weg zur Vorhersage relativer Freier Energien der Bindung von Liganden an Proteine beruht auf der Anwendung von Freie-Energie-Störungsrechnungen (FEPs, „free energy perturbations“) [Gl. (8)]<sup>[446]</sup> und den Verfahren der thermodynamischen Integration (TI) [Gl. (9)]<sup>[447]</sup> unter expliziter Berücksichtigung von Solvensmolekülen und der Flexibilität von Rezeptor und Ligand.<sup>[173, 390, 426]</sup>

$$\Delta F = F_1 - F_0 = -k_B T \ln \left\langle \exp \left( -\frac{H_1(\vec{X}) - H_0(\vec{X})}{k_B T} \right) \right\rangle_0 \quad (8)$$

$$\Delta F = F_1 - F_0 = \int_0^1 \left\langle \frac{\partial H_\lambda(\vec{X})}{\partial \lambda} \right\rangle_\lambda d\lambda \quad (9)$$

Grundlage hierfür ist die Beziehung zwischen der *Freien Energie*  $F$  eines betrachteten Systems und dem Ensemblemittelwert einer Energiefunktion, die dieses System beschreibt.<sup>[444, 448, 449]</sup>  $H_\lambda(\vec{X})$  steht für eine von den Koordinaten  $\vec{X}$  der Partikel im Phasenraum und einem Kopplungsparameter  $\lambda$  abhängige Energiefunktion des Systems,  $k_B$  für den Boltzmann-Faktor,  $T$  für die absolute Temperatur. Die Indizes „0“ und „1“ stehen für  $\lambda=0$  bzw.  $\lambda=1$ . Die spitzen Klammern verweisen auf eine Mittelwertbildung. Die Konfigurationsensembles eines Systems können dabei durch Monte-Carlo(MC)-<sup>[450]</sup> und Moleküldynamik(MD)-Simulationen<sup>[451]</sup> erhalten werden. Da die Differenz zwischen Freier *Enthalpie* und Freier *Energie*, das Produkt aus Druck und Änderung des Volumens während einer isothermen und isobaren Reaktion, für Vorgänge in Lösung vernachlässigbar ist, ergibt sich auf diesem Weg auch ein Zugang zu Freien Enthalpien.

Obwohl die Methode geeignet ist, einzelne Beiträge zur Freien Energie/Enthalpie auf atomarer Ebene und auf der Ebene einzelner Subsysteme (z.B. des Liganden oder des Proteins) zu untersuchen,<sup>[238, 452, 453]</sup> stehen dem gegenüber jedoch Probleme hinsichtlich einer allgemeinen Anwendbarkeit bedingt durch die Frage der ausreichenden Durchmustierung des Konfigurationsraumes, der Genauigkeit der verwendeten Kraftfelder sowie der Abhängigkeit der Ergebnisse vom durchgeführten Berechnungsprotokoll.<sup>[437, 438, 454]</sup> Dazu kommen lange Rechenzeiten und die Beschränkung auf lediglich kleine Veränderungen, z.B. bei Liganden, für die Vorhersage verlässlicher relativer Freier Energien/Enthal-

- pien.<sup>[455–458]</sup> Einige (klassische) Anwendungsbeispiele sowie neuere Ansätze sollen im Folgenden aufgezeigt werden.
- Die auf Arbeiten von Postma et al.<sup>[448]</sup> bzw. Jorgensen und Ravimohan<sup>[459]</sup> zurückgehenden FEP-MD- und FEP-MC-Ansätze wurden u.a. zur Vorhersage relativer Freier Energiedifferenzen der Bindung von Benzamidin bzw. *p*-Fluorbenzamidin an Trypsin<sup>[460]</sup> und von Thermolysinhibitoren<sup>[225]</sup> verwendet. Im letztgenannten Fall wurde dabei eine bemerkenswerte Übereinstimmung zwischen *vorhergesagten* und anschließend experimentell bestimmten Werten erzielt,<sup>[461]</sup> die allerdings auf sehr kleinen strukturellen Veränderungen bei den untersuchten Liganden (Austausch von NH gegen O oder CH<sub>2</sub>) beruht. Dass dagegen die Addition eines Phenylrings an ein Inhibitorgerüst selbst bei 400 ps Simulationszeit noch nicht zur vollständigen Konvergenz der berechneten Energien führt und die vorhergesagte relative Freie Energie sogar das falsche Vorzeichen in Bezug auf den experimentell ermittelten Wert hat, verdeutlicht die immer noch bestehenden Schwierigkeiten bei diesen Methoden.<sup>[457]</sup> Graffner-Nordberg et al. betonen zudem die Notwendigkeit, *alle* während der Ligandenbindung auftretenden Prozesse – wie etwa Wechsel in den Protonierungszuständen – energetisch zu berücksichtigen.<sup>[229]</sup> Einen umfangreichen Überblick über Anwendungsbeispiele dieser Methoden zur Vorhersage von Protein-Ligand-Affinitäten bietet Lit. [442].
  - In einem Ansatz von Ota und Brunger<sup>[462]</sup> wird eine Kombination aus nicht-Boltzmann-bestimmter Durchmusterung des Konfigurationsraumes und TI verwendet (NBTI). Der Vorteil der auch „umbrella sampling“ genannten Methode besteht in der Erhöhung der Flexibilität der betrachteten Liganden durch Erniedrigung ihrer Rotationsbarrieren und einer damit einhergehenden verstärkten Durchmusterung des Konfigurationsraumes. Verglichen mit einer (klassischen) TI-Rechnung zeigten sich geringere Abweichungen zwischen berechneten und experimentell bestimmten relativen Freien Energien der Bindung von Benzamidin und Benzylamin an Trypsin.<sup>[463]</sup>
  - Während in (klassischen) Freie-Energie-Rechnungen für jede an einem Liganden durchgeführte Modifikation eine separate, zeitlich aufwändige Durchmusterung des Konfigurationsraumes erfolgen muss, wird durch ein Verfahren von Gerber et al.<sup>[464]</sup> die Einbeziehung eines ganzen Satzes von Modifikationen in eine einzige MD-Simulation erreicht. Unter Annahme einer linearen Separierbarkeit einzelner Beiträge wird für jede spezifische Wechselwirkung des betrachteten Systems deren Ableitung in Bezug auf den Kopplungsparameter  $\lambda$  analytisch bestimmt. So kann aus den Anfangssteigungen der Freien Energiebeiträge bei einem Anfangszustand  $\lambda=0$  auf die Beiträge bei einem Endzustand  $\lambda=1$  geschlossen werden. Wenngleich die vorgestellte Methode für das System Trimethoprim-basierter Inhibitoren mit NADPH in Dihydrofolatreduktase den Rechenaufwand um den Faktor 10<sup>-3</sup> reduzierte, ergab sich allerdings keine signifikante Korrelation zwischen berechneten und experimentellen Ergebnissen.
  - Oostenbrink et al.<sup>[465]</sup> verwenden bei der Abschätzung relativer Freier Bindungsenergien von natürlichen Ligan-

den und Xenoöstrogenen an den Östrogenrezeptor eine „single-step perturbation“-Methode.<sup>[466]</sup> Anstatt für jeden betrachteten Liganden eine klassische FEP- oder TI-Rechnung durchzuführen, wird ein nichtphysikalisches Ligandenreferenzmolekül in einer einzigen Simulation zur Erzeugung eines Konfigurationsensembles benutzt, das auch für die zu untersuchenden Liganden relevant ist. Durch Anwendung von Gleichung (8) und Gleichung (9) ergibt sich dann die relative Freie Bindungsenthalpie zwischen zwei (echten) Liganden als Differenz der Freien Enthalpien der Liganden gegenüber dem Referenzzustand. Obwohl sich der Rechenaufwand gegenüber einer klassischen TI-Rechnung um den Faktor 4–6 reduziert und für fünf Liganden eine mittlere Abweichung vom experimentellen Wert von 1.7 kJ mol<sup>-1</sup> ergibt, darf auch hier nicht übersehen werden, dass sich bei vier der fünf Liganden die strukturellen Variationen auf die An- und Abwesenheit von Hydroxy- und Methylgruppen beschränkten.

- Guo et al.<sup>[467]</sup> verwenden einen Ansatz, bei dem der Kopplungsparameter  $\lambda$  als dynamische Variable behandelt wird und sich zusammen mit den Atomkoordinaten eines Systems gemäß den Newton'schen Bewegungsgleichungen entwickelt. Damit können für eine Serie von verwandten Liganden gleichzeitig unter Verwendung eines Satzes von  $\lambda$ -Werten relative Freie Energien der Bindung simuliert werden, wobei die verschiedenen Teile der Liganden zwar alle das umgebende Protein „spüren“, nicht jedoch jeweils andere Ligandenteile. Der Vorteil ist ein effizienteres Durchmustern des Konfigurationsraumes und ein damit einhergehender reduzierter Rechenaufwand.<sup>[468]</sup>
- Um die Probleme zu umgehen, die für große, strukturell unterschiedliche Sätze von Liganden bei der Verwendung von (klassischen) Freie-Energie-Verfahren auftreten, wurde von Åqvist et al.<sup>[469, 470]</sup> eine semiempirische Methode zur Berechnung absoluter Freier Energien der Bindung auf der Grundlage der Simulationen zweier physikalischer Zustände entwickelt. Hierbei werden die polaren und nichtpolaren Beiträge zur Freien Energie aus Mittelwerten von MD-Simulationen des Liganden in Wasser bzw. des Protein-Ligand-Komplexes in Wasser linear approximiert. Benötigte Wichtungsparameter werden an Komplexen mit bekannten Bindungsaffinitäten kalibriert. Allerdings ist die Wahl der Energiebeiträge und die Größe ihrer Wichtungsparameter vom betrachteten System und den Simulationsbedingungen abhängig,<sup>[471, 472]</sup> wodurch die allgemeine Anwendbarkeit stark eingeschränkt wird.<sup>[473]</sup>
- In dieser Hinsicht noch einen Schritt weiter gehen Jorgensen und Mitarbeiter, die eine Gleichung der Form (10) verwenden.<sup>[474, 475]</sup>

$$\Delta G = \sum_i c_i \xi_i + \text{const} \quad (10)$$

Die physikochemischen Parameter  $\xi_i$  ergeben sich als Ensemblemittelwerte aus MD- oder MC-Simulationen und umfassen etwa die Zahl ausgebildeter Wasserstoffbrücken oder die Größe der hydrophoben, hydrophilen und aromatischen Bereiche der vergraben Oberfläche. Die  $c_i$ -Werte werden mithilfe multipler linearer Regression an einem Trainingsdatensatz bestimmt, ein Vorgehen, das die

Methode sehr stark in den Bereich der regressionsbasierten Ansätze (siehe Abschnitt 3.2.3) rückt. Schon bei der Untersuchung von Bindungsaffinitäten von HEPT- und Nevirapin-Analoga an HIV-1-Reverse-Transkriptase zeigt sich allerdings, dass für unterschiedliche Zusammenstellungen des Trainingsdatensatzes unterschiedlich zusammengesetzte Gleichungen (10) gefunden werden.<sup>[475]</sup> Dies wirft die Frage nach der generellen Anwendbarkeit und Übertragbarkeit des Ansatzes auf.

### 3.2.2. Kraftfeldbasierte Verfahren und Ansätze beruhend auf additiven Freie-Enthalpie-Beiträgen

Die in diesem Abschnitt beschriebenen Ansätze beruhen auf der Annahme, dass die Freie Enthalpie der Bindung eines Liganden an einen Rezeptor als Summe einzelner Beiträge dargestellt werden kann [Gl. (5)] (bezüglich dieser Annahme siehe Abschnitt 2.2.4).<sup>[173, 198, 426]</sup> Ausgehend von dieser „Zentralgleichung“ („Master Equation“, ME) werden die einzelnen Terme auf physikochemischer Grundlage formuliert, wobei Kreuzkorrelationen zwischen ihnen zu vermeiden sind. Außerdem wird im Vergleich zu Verfahren aus dem vorherigen Abschnitt 3.2.1 als einschränkende Näherung der Ersatz von auf Ensemble-Mittelwerten beruhenden (Freien) Energiebeiträgen durch solche, die auf einer *einzigem* oder *wenigen* zugrundeliegenden Strukturen beruhen, vorgenommen.<sup>[173]</sup>

- Die Modellierung intermolekulärer Wechselwirkungen auf Grundlage von Molekülmechanik-Kraftfeldern führt im einfachsten Fall, der Berechnung für Protein-Ligand-Komplexe im Vakuum, zu einem rein enthalpischen Beitrag zur Freien Enthalpie der Bindung.<sup>[194, 426]</sup> Unter Berücksichtigung von Van-der-Waals- und elektrostatischen Wechselwirkungen sowie z. T. von intramolekularen Energiebeiträgen ergibt sich – allerdings nur für Serien eng verwandter Liganden, bei denen der entropische Beitrag zur Freien Enthalpie jeweils als konstant angesehen werden kann – eine Korrelation zu experimentell bestimmten Bindungsaffinitäten.<sup>[476–480]</sup> In einem Fall konnte dieses ohne explizite Berücksichtigung von Wasser erhaltenen Ergebnis durch die Dominanz von Van-der-Waals-Wechselwirkungen sowie durch lösungsmittelunabhängige elektrostatische Beiträge begründet werden.<sup>[481]</sup>
- Ein einfacher Ansatz, der den Einfluss des Lösungsmittels Wasser auf die Rezeptor-Ligand-Bindung in die „Hauptgleichung“ mit einbezieht, besteht in der Verwendung atombasierter Solvations-Parameter<sup>[311, 312, 314]</sup> im Zusammenhang mit der im Komplexbildungsprozess vergrabenen Oberfläche von Protein und Ligand. Die Verfahren von Vajda et al.,<sup>[482]</sup> Weng et al.,<sup>[483]</sup> Williams und Mitarbeitern,<sup>[240, 241, 484]</sup> Krystek et al.<sup>[485]</sup> und Novotny et al.<sup>[486]</sup> berücksichtigen in weiteren Termen außerdem noch die der Bindungsaffinität abträglichen Beiträge bedingt durch die Einschränkung der translatorischen und rotatorischen Freiheitsgrade der Moleküle sowie die Verringerung ihrer intramolekularen Beweglichkeit (siehe Abschnitt 2.2.3). Die intermolekularen Wechselwirkungen werden bei Krystek et al., Vajda et al. und Weng et al. durch Coulomb-Wechselwirkungen unter Verwendung einer abstandsabhängigen Dielektrizitätskonstanten modelliert; Williams

und Mitarbeiter verwenden stattdessen intrinsische Bindungsbeiträge funktioneller Gruppen. Vajda et al.<sup>[482]</sup> bestimmen für flexible Liganden zudem noch den Energiebeitrag bedingt durch unterschiedliche *intramolekulare* Wechselwirkungen des Moleküls in freiem und gebundenem Zustand.

- Der Beitrag elektrostatischer Wechselwirkungen in Gewebe von Wasser kann im Rahmen einer Näherung des „gemittelten Feldes“ oder einer Kontinuumsrepräsentation des Lösungsmittels durch Lösung der linearisierten Poisson-Boltzmann-Gleichung<sup>[216]</sup> nach der Methode der finiten Differenzen<sup>[487]</sup> oder der Methode der finiten Elemente<sup>[488]</sup> bestimmt werden. Hierbei werden die *polaren* Wechselwirkungsenergien von Rezeptor, Ligand bzw. Rezeptor-Ligand-Komplex untereinander und mit dem umgebenden Solvens bestimmt, indem die Moleküle (versehen mit diskreten Atomladungen) als Bereiche mit niedriger Dielektrizitätskonstante in ein umgebendes Medium mit hoher Dielektrizitätskonstanten eingebettet werden.<sup>[432]</sup> Der *nichtpolare* Beitrag der Desolvatation wird weiterhin proportional zur Größe der vergrabenen Oberfläche beider Moleküle während der Komplexbildung angesetzt; entropische Beiträge durch Einschränkung der Mobilität und Flexibilität werden wie im vorherigen Absatz beschrieben modelliert. Beispiele für auf diesen Prinzipien beruhenden Verfahren zur Vorhersage der Freien Enthalpie der Bindung wurden von Froloff et al.,<sup>[489]</sup> Zhang und Koshland,<sup>[490]</sup> Hoffmann et al.,<sup>[491]</sup> Politcelli et al.,<sup>[492]</sup> und Shoichet et al.<sup>[493]</sup> vorgestellt. Zou et al.<sup>[494]</sup> verwenden anstelle des Poisson-Boltzmann-Ansatzes das „Generalisierte Born-Modell“ (GB/SA) von Still et al.<sup>[495]</sup> zur Bestimmung der polaren Wechselwirkungsenergien.
- Beim MM/PBSA-Verfahren<sup>[440, 496, 497]</sup> und bei verwandten Ansätzen<sup>[498–500]</sup> ergeben sich Freie Enthalpien für eine Molekülspesies gemäß Gleichung (11):

$$\langle G \rangle = \langle E_{MM} \rangle + \langle G_{PBSA/GBSA} \rangle - TS_{MM} \quad (11)$$

$E_{MM}$  steht dabei für die mittlere Molekülmechanikenergie,  $G_{PBSA/GBSA}$  für die durch (De-)Solvatation bedingte Freie Enthalpie, die durch Lösen der Poisson-Boltzmann-Gleichung (PB) oder mithilfe des Generalisierten Born-Ansatzes (GB) sowie jeweils unter Verwendung eines oberflächenabhängigen Terms (SA) bestimmt wurde. Beide Größen werden durch Mittelung über einen Satz repräsentativer Geometrien erhalten, die aus einer MD-Trajektorie der betrachteten Spezies unter expliziter Berücksichtigung von Wasser und Gegenionen stammen. Der Term  $-TS_{MM}$  steht für die Entropie der betrachteten Spezies, die aus einer quasiharmonischen oder Normalmodi-Analyse der MD-Trajektorie gewonnen werden kann. Wie der breite Anwendungsbereich dieser Verfahren<sup>[501–504]</sup> zeigt, können damit auch Einflüsse größerer struktureller Unterschiede in Protein-Ligand-Systemen untersucht werden.

- Alternativ dazu kann eine implizite Berücksichtigung der Beiträge der Solvatation und Desolvatation auch direkt in einem Molekülmechanik-Kraftfeld erfolgen.<sup>[505]</sup> Hierbei wird die Freie Solvationsenergie einer funktionellen

Gruppe oder eines Aminosäurerestes aus der Freien Solvatationsenergie dieser Gruppe in einem kleinen Molekül abzüglich eines Beitrags berechnet, der durch den Ausschluss von Lösungsmittelmolekülen durch die Anwesenheit anderer Atome im makromolekularen System bedingt ist.

### 3.2.3. Regressionsbasierte Ansätze

Regressionsbasierte Ansätze – auch „empirische Bewertungsfunktionen“ genannt – beruhen wie die im vorherigen Abschnitt vorgestellten auf der Annahme der Additivität einzelner Freie-Enthalpie-Beiträge. Allerdings werden die Beiträge der einzelnen Terme einer Regressionsgleichung durch Bestimmung der Koeffizienten vor den unabhängigen (strukturbeschreibenden) Variablen in dieser Gleichung mithilfe von Verfahren der multiplen linearen Regression, Partial-Least-Squares-Regression<sup>[414]</sup> oder durch neuronale Netze<sup>[506]</sup> aus einem Trainingsdatensatz kristallographisch bekannter Rezeptor-Ligand-Komplexe mit experimentell bestimmten Bindungsaffinitäten berechnet. Basierend auf einem heuristischen Ansatz rechtfertigen die Plausibilität der erhaltenen Beiträge und ihre Eignung zur Vorhersage unbekannter Bindungsaffinitäten die anfänglich gewählte Aufteilung der Freien Enthalpie. Wie bei allen regressionsbasierten Verfahren hängen die erhaltenen Ergebnisse und ihre Übertragbarkeit auf neue Fälle jedoch auch hier maßgeblich von der Zusammensetzung des Trainingsdatensatzes hinsichtlich der betrachteten Terme ab.<sup>[173]</sup> Weiterhin ist es nur begrenzt möglich, die Größe der Beiträge für solche Phänomene zu bestimmen, die in den experimentellen Daten selten auftreten (d. h. von sich aus „ungünstig“ sind).

- Der Archetyp einer empirischen Bewertungsfunktion für Protein-Ligand-Wechselwirkungen, SCORE1, wurde von Böhm<sup>[507]</sup> entwickelt. Die Summe aus Beiträgen für Wasserstoffbrücken, ionische Wechselwirkungen, vergraben unpolare Oberflächenbereiche und die Einschränkung (intra-)molekularer Beweglichkeit ergibt bei der Regressionsanalyse an einem Trainingsdatensatz von 45 Protein-Ligand-Komplexen eine kreuzvalidierte Standardabweichung von  $9.3 \text{ kJ mol}^{-1}$  gegenüber den experimentell bestimmten Affinitäten. Unter Verwendung eines erweiterten Trainingsdatensatzes von 82 Komplexen sowie der Beachtung der Vergrabenheit von Wasserstoffbrücken im Bindungsepitop, der Hinzunahme von aromatischen Wechselwirkungen und der „Bestrafung“ ungünstiger elektrostatischer Wechselwirkungen wird für einen *Vorhersagedatensatz* eine Standardabweichung von  $8.8 \text{ kJ mol}^{-1}$  erhalten (SCORE2).<sup>[508]</sup> Die Abhängigkeit der (relativen) Beiträge einzelner Terme von der Zusammensetzung des Trainingsdatensatzes wie auch der verwendeten Separation der Freien Enthalpie zeigt sich insbesondere beim Vergleich der auf beiden Wegen erhaltenen Parameter.
- Einen analogen Ansatz verfolgen die Arbeiten von Eldridge et al.<sup>[509]</sup> (82 Komplexe im Trainingssatz, ChemScore) und Wang et al.<sup>[510]</sup> (170 Komplexe im Trainingssatz, SCORE). Der Hauptunterschied zu den Ansätzen von Böhm<sup>[507, 508]</sup> liegt bei Eldridge et al.<sup>[509]</sup> in der Beschreibung der Beiträge durch die Einschränkung der intramoleku-

ren Flexibilität und bei Wang et al.<sup>[510]</sup> bei der Unterteilung von Wasserstoffbrücken in „starke, moderate und schwache“ sowie der Einbeziehung von Wassermolekülen als Vermittler von Wechselwirkungen. Unter Verwendung eines „evolutionären Tests“ zeigt sich außerdem,<sup>[510]</sup> dass eine Konvergenz der erzielten Ergebnisse nur bei der Verwendung von mehr als 100 bis 120, hinsichtlich des Charakters ihrer intermolekularen Wechselwirkungen ausreichend unterschiedlichen Protein-Ligand-Komplexen im Trainingsdatensatz erhalten werden kann. Murray et al.<sup>[511]</sup> verbessern die Vorhersagefähigkeit der von Eldridge et al.<sup>[509]</sup> erhaltenen Bewertungsfunktion im Hinblick auf *ein spezielles* Protein noch durch Einbeziehung von Zusatzinformation im Rahmen der Bayes'schen Statistik.

- Head et al.<sup>[512]</sup> verwenden in ihrem „VALIDATE“-Ansatz eine auf dem AMBER-Kraftfeld<sup>[513]</sup> basierende elektrostatische und sterische Wechselwirkungsenergie, einen HlogP-basierten<sup>[514]</sup> Octanol-Wasser-Verteilungskoeffizienten, polare und unpolare Kontaktobерflächen und einen Term zur Berücksichtigung intramolekularer Beweglichkeit. Allerdings werden die Koeffizienten hierbei unter Verwendung von 55 Protein-Ligand-Komplexen im Trainingsdatensatz mithilfe eines Partial-Least-Squares-Verfahrens<sup>[414]</sup> oder eines neuronalen Netzes bestimmt. Beide Wege führen zu Ausdrücken, die physikalisch nicht oder nur schwer zu interpretieren sind, sodass ihr Einsatz insbesondere innerhalb einer Ligandenoptimierung fraglich ist.
- In den Arbeiten von Takamatsu und Itai<sup>[515]</sup> (29 Avidin-Ligand-Komplexe im Trainingssatz), Venkataraman und Hopfinger<sup>[516]</sup> (23 Glycogen-Phosphorylase-Inhibitor-Komplexe im Trainingssatz) und Viswanadhan et al.<sup>[517]</sup> (11 HIV-1-Protease-Inhibitor-Komplexe im Trainingssatz) werden ebenfalls mit dem AMBER-Kraftfeld<sup>[513]</sup> berechnete Wechselwirkungsenergien zwischen Protein und Ligand mit zusätzlichen Termen zur Behandlung hydrophober Wechselwirkungen und weiterer entropischer Einflüsse kombiniert und die Koeffizienten durch multiple lineare Regression bestimmt.
- Auch Rognan et al.,<sup>[518]</sup> Bohacek und McMartin<sup>[519]</sup> und Kasper et al.<sup>[520]</sup> entwickeln empirische Bewertungsfunktionen, die auf *ein* betrachtetes Protein zugeschnitten sind. So werden im ersten Fall Trainingssätze von fünf kristallographisch bestimmten HLA-A\*0201-Peptidinhibitor-Komplexen sowie von 37 modellierten H-2K<sup>k</sup>-Peptidinhibitor-Komplexen verwendet, um eine an Eldridge et al.<sup>[509]</sup> angelehnte Funktion zu reparametrisieren. Bohacek und McMartin verwenden sogar nur neun bekannte Thrombolytin-Inhibitor-Komplexe zur Kalibrierung. Allerdings gehen in ihre Bewertungsfunktionen auch nur die Zahl an Wasserstoffbrücken und hydrophoben Kontakten ein. Kasper et al. verwenden einen zu Gleichung (11) analogen Ansatz, skalieren ihre Beiträge jedoch auf einen Trainingsdatensatz aus 11 Peptid-Chaperon-DnaK-Komplexen.
- Im Unterschied zu allen bisher betrachteten empirischen Bewertungsfunktionen ist die von Jain<sup>[521]</sup> entwickelte Funktion kontinuierlich differenzierbar. Terme zur Beschreibung hydrophober und polarer Komplementarität zwischen Rezeptor und Ligand werden dazu durch eine

Kombination einer Gauß- und einer sigmoiden Funktion modelliert und mit nur vom Liganden abhängigen Beiträgen für die entropischen Kosten kombiniert. Der Trainingsdatensatz umfasst 34 Protein-Ligand-Komplexe.

### 3.2.4. Wissensbasierte Ansätze

Allgemein gehen wissensbasierte Systeme von der Annahme aus, dass auf Grundlage einer adäquat repräsentierten Sammlung von Wissen die Ableitung darin inhärent enthaltener Regeln und Gesetzmäßigkeiten möglich ist.<sup>[522]</sup> Im übertragenen Sinne lässt sich damit die Entwicklung einer wissensbasierten Bewertungsfunktion auf molekularer Ebene auf beobachtete Häufigkeitsverteilungen charakteristischer Wechselwirkungen in experimentell bestimmten Systemen zurückführen: Nur diejenigen Wechselwirkungen im gerade zu bewertenden System werden als günstig erkannt, die in der Nähe von Häufigkeitsmaxima dieser Wechselwirkungen in der Wissensbasis liegen. Beispiele für eine erfolgreiche Anwendung dieser Verfahren stammen insbesondere aus der Proteinfaltungsvorhersage,<sup>[523–525]</sup> wobei unter Anwendung des „inversen Boltzmann-Gesetzes“<sup>[526]</sup> die aus kristallographisch bestimmten Proteinstrukturen erhaltenen Häufigkeitsverteilungen für interatomare Wechselwirkungen in „Freie-Energie-Beiträge“ („potentials of mean force“) oder „wissensbasierte Potentiale“ umgesetzt werden. Obwohl die thermodynamische Grundlage für dieses Vorgehen<sup>[365, 527–529]</sup> und die verwendete Terminologie<sup>[530]</sup> kritisch angesehen werden, sind die damit erhaltenen Ergebnisse den mit Molekülmechanik-Kraftfeldern erzielten überlegen.<sup>[531–534]</sup>

In jüngster Zeit sind folgende Ansätze dazu im Hinblick auf Protein-Ligand-System bekannt geworden:

- Unter Verwendung eines Datensatzes von 30 HIV-1-, HIV-2- und SIV-Protease-Inhibitor-Komplexen erzeugen Verkhivker et al.<sup>[535]</sup> distanzabhängige wissensbasierte Paarpotentiale. Sie werden mit Termen für Desolvatisationsbeiträge von Ligand und Protein unter Verwendung atombasierter Parameter<sup>[536]</sup> sowie einem auf Arbeiten von Pickett und Sternberg<sup>[346]</sup> beruhenden Verfahren zur Abschätzung der Beiträge durch Einschränkung der konformativen Beweglichkeit von Proteineinheiten kombiniert. Ebenfalls für HIV-1-Protease-Komplexe können damit Unterschiede in den Bindungsaffinitäten nachvollzogen werden.
- Wallqvist et al.<sup>[537]</sup> bestimmen aus 38 Protein-Ligand-Kristallstrukturen Häufigkeitsverteilungen während der Komplexbildung vergrabener Oberflächenelemente für *Paare* wechselwirkender Atome. Normalisierung mit dem Produkt der vergrabenen Oberflächen der jeweils *einzelnen* Atome liefert daraus Atom-Atom-basierte statistische Präferenzen. Unter Verwendung zweier Parameter, die anhand experimentell bekannter Bindungsaffinitäten des Trainingssatzes kalibriert werden müssen, können für 10 HIV-Protease-Inhibitor-Komplexe, die nicht im Trainingsatz enthalten waren, Bindungsaffinitäten mit einer Standardabweichung von  $6.3 \text{ kJ mol}^{-1}$  berechnet werden.
- De Witte und Shakhnovich<sup>[538]</sup> verwenden 17 bzw. 109 Kristallstrukturen aus der Proteindatenbank PDB<sup>[2]</sup> und entwickeln damit je einen Satz von „interatomaren Freien Wechselwirkungsenergien“ (SMoG-Score) für Liganden,

die an der Oberfläche eines Proteins und für solche, die in Bindetaschen binden. Kombiniert mit einem Metropolis-Monte-Carlo-basierten<sup>[450]</sup> Aufbauprozess des Liganden in der Bindetasche werden Komplexe der Purinnucleosid-Phosphorylase, der SH3-Domäne sowie der HIV-1-Protease erzeugt und energetisch bewertet.

- Muegge und Martin<sup>[539]</sup> erzeugten aus 697 kristallographisch bestimmten Protein-Ligand-Komplexen Helmholz'sche Freie Wechselwirkungsenergien (PMF-Score; „Potential of Mean Force“) unter Verwendung von 16 bzw. 34 Atomtypen für Proteine und Liganden. Die implizite Berücksichtigung der durch Wasser bedingten Beiträge wird durch die Verwendung eines Volumenkorrekturterms<sup>[540]</sup> und maximale Abstände zwischen den betrachteten Atomen bis zu 12 Å bei der Erzeugung der Paarverteilungsfunktionen begründet. Für 77 Protein-Ligand-Kristallstrukturen ergibt sich eine Abweichung von 1.8 logarithmischen Einheiten von der experimentell bestimmten Inhibitionskonstanten.
- Mitchell et al.<sup>[541]</sup> beschrieben Paar-Potentiale (BLEEP) aus 820 Protein-Ligand-Atompaaerverteilungen unter Verwendung des inversen Boltzmann-Ansatzes. Mit dem Programm HBPlus<sup>[222]</sup> regelbasiert beim Protein gesetzte Wasserstoffe wurden mit eingeschlossen. Als Referenzzustand verwenden sie ein von Ng et al.<sup>[542]</sup> entwickeltes semiempirisches Ne-Ne-Paarpotential. Außerdem wird die Einbeziehung von Wassermolekülen als Teil des Proteins getestet. Für 90 gemischte Protein-Ligand-Komplexe ergibt sich ein Korrelationskoeffizient von 0.74 (eine Standardabweichung wird nicht aufgeführt) zu experimentell bestimmten Affinitäten.<sup>[543]</sup>
- Die von uns entwickelte Bewertungsfunktion DrugScore<sup>[544]</sup> (siehe Abschnitt 5) setzt sich aus distanzabhängigen Paarpotentialen sowie von der lösungsmittelzugänglichen Oberfläche abhängigen Einteilchenpotentialen zusammen, die aus an 1376 Protein-Ligand-Komplexen unter Verwendung der Datenbank ReliBase<sup>[545]</sup> bestimmten Verteilungsfunktionen erhalten wurden. Für 55 kristallographisch bestimmte gemischte Protein-Ligand-Komplexe ergibt sich eine Abweichung von 1.8 logarithmischen Einheiten von der experimentell bestimmten Inhibitionskonstanten.<sup>[546]</sup>

### 3.2.5. Consensus-Scoring und Filterfunktionen

Ein pragmatischer, wenn auch vom wissenschaftlichen Standpunkt her nicht befriedigender Ansatz, die Verlässlichkeit berechneter Bindungsaffinitäten zu steigern, beruht auf der Zusammenfassung der mit mehreren Methoden erhaltenen Ergebnisse. So zeigen Charifson et al.,<sup>[547]</sup> dass durch die UND-Verknüpfung der Ergebnisse der ChemScore-Funktion,<sup>[509]</sup> der auf dem AMBER-Kraftfeld<sup>[513]</sup> basierenden Bewertungsfunktion des Docking-Programms DOCK<sup>[548]</sup> und des „stückweisen linearen Potentials“ („piecewise linear potential“)<sup>[549]</sup> für drei Enzymsysteme in einem virtuellen Screening das Auffinden bekannter Inhibitoren in einem Satz zufällig ausgewählter Moleküle deutlich verbessert werden kann (Consensus-Scoring). Ergebnisse durch Mittelwertbildung aus Kombinationen von bis zu fünf verschiedenen QSAR-Methoden erweisen sich bei So und Karplus<sup>[550]</sup>

ebenfalls den Ergebnissen aus den Einzelverfahren als überlegen. Stahl und Rarey<sup>[551]</sup> kombinieren in einem Virtual-Screening-Test an sieben unterschiedlichen Zielproteinen Terme von PLP-Score<sup>[549]</sup> sowie der im Docking-Programm FlexX<sup>[552]</sup> implementierten Form von SCORE1,<sup>[507]</sup> um insgesamt robustere Anreicherungsraten zu erzielen. Interessanterweise werden dabei in einzelnen Fällen die mit den ursprünglichen Funktionen erzielten (hohen) Anreicherungsraten nicht erreicht. Terp et al.<sup>[553]</sup> gehen sogar einen Schritt weiter, indem sie die Werte von acht Scoring-Funktionen unter Anwendung einer PLS-Analyse mit experimentell bestimmten Bindungsaffinitäten für einen gemischten Datensatz aus 120 kristallographisch bestimmten Protein-Ligand-Komplexen korrelieren. Anders als beim Consensus-Scoring von Charlifson et al. ergibt sich dadurch die Möglichkeit zur quantitativen Vorhersage von Bindungseigenschaften von Liganden. Eine Anwendung des Modells zur Vorhersage von Affinitäten von 120 gedockten MMP-Inhibitoren ergab eine Abweichung von weniger als einer logarithmischen Einheit vom  $pK_i$ -Wert in 49% der Fälle.

Regressionsbasierte Ansätze bewerten – bedingt durch die Art ihrer Ableitung (siehe Abschnitt 3.2.3) – vor allem für den Bindungsprozess günstige Wechselwirkungen, wie sie in Protein-Ligand-Kristallstrukturen auftreten. Um durch virtuelles Screening jedoch auch Protein-Ligand-Geometrien erkennen zu können, die nicht in Übereinstimmung mit experimentell zu erwartenden Geometrien sind, wurde von Stahl und Böhm<sup>[220]</sup> die Verwendung von „Filter-Funktionen“ vorgeschlagen. Diese „bestrafen“ z.B. das Auftreten von vergrabenen, nicht an einer Wasserstoffbrücke beteiligten polaren Atomen der Bindungspartner oder die Bildung hydrophober Kavitäten im Protein-Ligand-Bindungsepitop.

### 3.2.6. Ansätze zur ortsaufgelösten Identifizierung von Wechselwirkungen

Unter der Annahme, dass die Bindungsaffinität in einzelne (additive) Beiträge separiert werden kann (siehe Abschnitt 2.2.4), erhalten Methoden für die Ligandenoptimierung eine Bedeutung, die (günstige) Wechselwirkungspositionen von Ligandenatomen oder -gruppen mit dem Protein in seiner Bindetasche identifizieren können.

- Das archetypische Verfahren GRID von Goodford<sup>[418, 554]</sup> basiert auf einem dafür parametrisierten Kraftfeldansatz und konturiert Bereiche innerhalb der Proteinbindetasche gemäß den Wechselwirkungsenergien einzelner Sonden auf festgelegten Gitterplätzen. Als Sonden stehen z.B. Wasser, eine Amino- und Carboxy-Gruppe sowie eine hydrophobe Gruppe (DRY) zur Verfügung.
- Einen GRID-ähnlichen Ansatz, allerdings mit anderer Datenbasis, verfolgen die Methoden X-SITE<sup>[555]</sup> und SuperStar.<sup>[556, 557]</sup> X-SITE verwendet räumliche Kontaktverteilungen beruhend auf 163 dreiatomigen Fragmenten, um in der Bindetasche günstige Wechselwirkungsregionen zu identifizieren. Die Verteilungen werden aus 83 hochaufgelösten Proteinstrukturen (ohne Liganden) erhalten. SuperStar benutzt die in IsoStar<sup>[250]</sup> enthaltenen räumlichen Informationen über nichtbindende Wechselwirkun-

gen aus Kristallstrukturen niedermolekularer Verbindungen der CSD,<sup>[1]</sup> um Wahrscheinlichkeitsdichten für Kontakte mit Atomen funktioneller Gruppen (etwa Ammonium-N, Carbonyl-O, Methyl-C, ...) auf Gitterpositionen in einer Proteinbindetasche zu berechnen.

- Ebenfalls auf einer wissensbasierten Methode beruht das Verfahren zur Identifikation von „hot spots“ mit Drug-Score<sup>[544]</sup> (siehe Abschnitt 5), bei dem für an Gitterpositionen in der Bindetasche eines Proteins platzierte Sondenatome (etwa aliphatischer Kohlenstoff, Carboxylat-, Carbonyl-, Hydroxy-O, Amin-N, ...) die Wechselwirkungen zu umliegenden Proteinatomen unter Verwendung der distanzabhängigen Paarpotentiale berechnet und durch Konturierung der ausgezeichneten Bereiche als „Potentialfelder“ dargestellt werden.<sup>[546]</sup>
- Beim MCSS („Multiple Copy Simultaneous Search“)-Ansatz<sup>[558]</sup> wird dagegen das Kraftfeld CHARMM<sup>[559]</sup> verwendet, um günstige Positionen für in die Bindetasche verteilte Acetamid-, Methanol-, Acetat-, Propan- u.a. Moleküle zu ermitteln. Mittlerweile ist das Verfahren auch auf die Untersuchung flexibler Bindetaschenbereiche ausgeweitet worden.<sup>[560]</sup>
- Der PROFEC („Pictorial Representation of Free Energy Changes“)-Ansatz von Radmer und Kollman<sup>[561]</sup> und die Weiterentwicklung von Pearlman<sup>[562]</sup> (OWFEG, „One-Window Free Energy Grid“) beruhen auf FEP-Rechnungen und verwenden zwei Trajektorien aus MD-Simulationen, um die Änderung der Freien Enthalpie durch Hinzufügen eines Atoms/einer Gruppe an verschiedenen Positionen um den Inhibitor in Lösung und im Protein zu bestimmen.

### 3.2.7. Vergleich der Ansätze

Ein Vergleich der existierenden Verfahren bezüglich Qualität der Ergebnisse und benötigter Laufzeit ist schwierig. Zum einen existiert nach wie vor kein einheitlich verwendeter Datensatz von Protein-Ligand-Komplexen, der als Grundlage des Vergleichs herangezogen werden könnte. Unterschiedlich sind auch die Hardware-Voraussetzungen und der Grad der benötigten Vorbereitungen für einzelne Methoden. Dazu kommt, dass häufig nur Anwendungsbeispiele veröffentlicht werden, die hinsichtlich ihrer Zahl und den zugrundeliegenden biologischen Systemen eng begrenzt sind, sodass eine zuverlässige Beurteilung des Verfahrens schwierig ist. Nichtdestotrotz sollen die in den vorherigen Abschnitten 3.2.1 – 3.2.4 unter methodischen Aspekten zusammengefassten literaturbekannten Verfahren zur Vorhersage von Bindungsaffinitäten in Tabelle 2 gegenübergestellt werden. Darüber hinaus werden Verknüpfungen zu anderen Arbeiten und Methoden aufgeführt.

Bislang sind nur wenige unabhängige Vergleichsstudien von Bewertungsverfahren für Protein-Ligand-Affinitätsvorhersagen bekannt. In allen drei Fällen<sup>[547, 551, 563]</sup> waren Anreicherungsraten in Virtual-Screening-Tests die untersuchte Zielgröße, nicht jedoch die Genauigkeit der Vorhersage von Bindungsaffinitäten. Als Essenz dieser Arbeiten kann jedoch gesagt werden, dass bislang kein „universell“ anwendbares Verfahren besteht, sondern dass in Abhängigkeit des unter-

Tabelle 2. Vergleich der in den Abschnitten 3.2.1–3.2.4 aufgeführten Verfahren zur Vorhersage von Bindungsaffinitäten von Rezeptor-Ligand-Komplexen bei Kenntnis der 3D-Rezeptorgeometrie.

Erstautor (Methodenname)	Litera- tur	Verknüp- fungen <sup>[a]</sup>	Methode <sup>[b]</sup>	Zahl der Testsysteme <sup>[c]</sup>	SD <sup>[d]</sup>	Laufzeit	Bemerkungen
Wong [460]	–	FEP-MD	2	2.2	–	–	Ersatz von Benzamidin durch <i>p</i> -Fluorbenzamidin; Mutation Gly216Ala in Trypsin
Reddy [564]	–	FEP-MD	2	3.6	–	–	Ersatz einer Formyl- durch eine Proparaglygruppe
Bash [225]	[461]	FEP-MD	2	0.5	–	–	Ersatz einer NH-Gruppe durch ein O-Atom
McCarrick [457]	–	FEP-MD	3	8.4	–	–	Substitution von Phenylringen
Ota [463]	[462]	NBTI	2	1.7	–	–	bessere Durchmusterung des Konfigurationsraums; Ersatz von Benzamidin durch Benzylamin
Gerber [464]	–	Ableitungen der Freien Energie	2 × 36	–	Beschleunigung um 1000 <sup>–1</sup>	–	keine signifikante Korrelation zwischen experimentellen und berechneten Affinitäten
Oostenbrink [465]	[466]	Einschritt-FEP-MD	5	3.3 <sup>[e]</sup>	Beschleunigung um 5 <sup>–1</sup>	–	Substitution von Hydroxy- und Methylgruppen bei vier der fünf Liganden.
Guo [467]	[468]	λ-Dynamik-Ansatz	4	2.1	–	–	Ersatz von Benzamidin mit <i>p</i> -Aminobenzamidin, <i>p</i> -Methylbenzamidin, <i>p</i> -Chlorbenzamidin
Åqvist [469]	[471–473]	LIE	18	3.9	–	–	SD-Wert von Modell 6 in Tabelle 2 aus Lit. [470]
Rizzo [475]	[474]	LIE/LR	2 × 20	3.9	–	–	unterschiedliche Regressionsgleichungen je nach Zusammensetzung der Datensätze
Grootenhuis [476]	[477, 479]	CHARMM-Energie	35	8.3	2–5 min je Verbindung	–	SD-Wert von Protokoll 8 aus Tabelle 3
Holloway [478]	–	MM2X-Energie	15	5.7	–	–	SD für Testsatz aus Tabelle 2
Vajda [482]	[486]	ME-basiert	9 + 3 + 5 + 9	5.4	–	–	SD für Testsatz aus Tabelle 1
Wenig [483]	[482]	ME-basiert	9 + 10 + 8	≈ 4.2	–	–	Betrachtung von Protein-Protein-Komplexen
Williams [484]	[240, 241]	ME-basiert	1	≈ 11.4	–	–	SD aus Fehlern der Einzelbeiträge abgeschätzt
Krystek [485]	–	ME-basiert	9	16.7	–	–	SD aus Fehlern der Einzelbeiträge abgeschätzt
Checa [481]	–	AMBER-Energie + PBE	7	3.3	–	–	AMBER-Energie alleine korreliert ebenfalls signifikant
Froloff [489]	–	PBE + ASP	3 + 5	> 42	–	–	SD für Testsatz aus Tabelle 2 in Lit. [489]; systematischer Fehler
Zhang [490]	–	PBE + ASP	9 × 7	2.1	–	–	9 Mutanten der Isocitrat-Dehydrogenase als Proteinkomponenten
Kuhn [502]	[440, 497]	PBE + ASP	1	16.7	–	–	SD für den Komplex Biotin/Avidin
Hoffmann [491]	[565]	CHARMM + PBE + ASP	10	–	„mehrere h für 100 Verbindungen“	–	Verbesserung der Platzierung gedockter Geometrien als Ziel
Polticelli [492]	–	PBE + ASP	4	56.4	–	–	SD für Testsätze aus Tabelle 1 und 2; systematischer Fehler
Shoichet [493]	[548, 566]	Born-GI. + ASP	5	20.9	–	–	SD für Testsatz in Tabelle III; systematischer Fehler
Zou [494]	[566]	GB/SA	6	6.3	10 s je Verbindung	–	SD für Parametersatz 1 in Tabelle 2 und 3
Böhm (SCORE1) [507]	[565, 567]	regressionsbasiert	45	9.3	„mehrere Verbindungen je Sekunde“	–	kreuzvalidierte SD für Funktion 2
Böhm (SCORE2) [508]	[565, 567]	regressionsbasiert	82 + 12	8.8	„mehrere Verbindungen je Sekunde“	–	SD für Testsatz aus Tabelle 3
Eldridge (ChemScore) [509]	[511]	regressionsbasiert	82 + 20 + 10	8.7	–	–	kreuzvalidierte SD für gesamten Trainingssatz aus Tabelle 8
Wang (SCORE) [510]	[568]	regressionsbasiert	170	6.3	–	–	kreuzvalidierte SD für gesamten Trainingssatz aus Tabelle 6
Head (VALIDATE) [512]	–	regressionsbasiert	51 + 14 + 13 + 11	6.3	–	–	kreuzvalidierte SD für gesamten Trainingssatz aus Tabelle 2
Takamatsu [515]	–	regressionsbasiert	29	–	–	–	Kalibrierung ausschließlich an Avidin-Komplexen
Hopfinger [516]	–	regressionsbasiert	15	–	–	–	Kalibrierung ausschließlich an Glycogen-Phosphorylase-Komplexen
Viswanadhan [517]	–	regressionsbasiert	11	2.4	–	–	Kalibrierung ausschließlich an HIV-1-Protease-Komplexen
Rognan [518]	[509]	regressionsbasiert	5 + 37	3.1/5.1	–	–	Kalibrierung an HLA-A*0201-/H-2K <sup>k</sup> -Komplexen; SD jeweils angegeben
Bohacek [519]	–	regressionsbasiert	9	2.3	–	–	Kalibrierung ausschließlich an Thermolysin-Inhibitoren
Kasper [520]	–	regressionsbasiert	11	1.7	–	–	Kalibrierung ausschließlich an DnaK-Heptapeptid-Komplexen
Jain [521]	–	regressionsbasiert	34	5.7	–	–	kreuzvalidierte SD für Funktion „F“
Verkhivker [535]	–	wissensbasiert	7	–	–	–	Ableitung und Test der Funktion ausschließlich an HIV- und SIV-Proteasen
Wallqvist [537]	[569]	wissensbasiert	8	6.3	–	–	SD für Kalibrierungssatz in Tabelle 3
DeWitte (SMoG-Score) [538]	–	wissensbasiert	17 + 8 + 11	–	–	–	keine SD angegeben
Muegge (PMF-Score) [539]	[570, 571]	wissensbasiert	77	10.3	–	–	SD für Testsatz 6 in Tabelle 4
Mitchell (BLEEP) [541]	[543, 572]	wissensbasiert	90	–	–	–	keine SD angegeben
Gohlke (DrugScore) [544]	[546]	wissensbasiert	71	9.2	0.2 s je Verbindung	–	SD für Testsatz „Böhm1998“ in Tabelle 2

[a] Aufgeführt sind Literaturstellen zu verwandten Arbeiten und Anwendungen der Methoden in anderen Programmen. [b] Für detaillierte Erläuterungen der aufgeführten Methoden siehe Text. FEP-MD = Freie-Energie-Störungsrechnung/Moleküldynamik, NBTI = nicht-Boltzmann-Thermodynamische-Integration, LIE = Lineare Wechselwirkungsenergie, ME = „Hauptgleichung“, PBE = Poisson-Boltzmann-Gleichung, ASP = atomarer Solvationsparameter, GB/SA = Generalisierter Born-Ansatz, LR = lineare Regression. [c] Angegeben ist die Zahl der in einzelnen Testdatensätzen zur Validierung verwendeten Protein-Ligand-Komplexe. [d] Angegeben ist die Standardabweichung zwischen berechneten und experimentell bestimmten Bindungsaffinitäten (in kJ mol<sup>–1</sup>; für die Umrechnung von logarithmischen Bindungsaffinitäten wurde eine Temperatur von 298 K angenommen). [e] Angegeben ist die mittlere Abweichung für relative freie Bindungsenergien.

suchten Zielproteins und der vorherrschenden Protein-Ligand-Wechselwirkungen die adäquate Methode in Voruntersuchungen bestimmt werden sollte.

## 4. Experimentelle Ansätze zur Beschreibung der Bindungsaffinität

### 4.1. Indirekte Verfahren

Bindungsaffinitäten werden üblicherweise in einem Bindungssassay ermittelt. Im Falle von Enzymreaktionen wird die Beeinflussung der Enzymkinetik über eine einfach messbare physikalische Größe (z.B. Absorptionsverhalten, Fluoreszenz- oder Fluoreszenz-Polarisationsvermögen der Reaktionspartner) beobachtet. Indirekt wird dann aus Konzentrationsbestimmungen und der Veränderung der Enzymkinetik auf die Inhibitions- und die Bindungskonstante eines Liganden geschlossen. An die Stelle der Enzyminhibition tritt bei Rezeptorsystemen z.B. ein Verdrängungssassay, in dem über die Freisetzung potenter, geeignet markierter Substanzen Bindung registriert wird. In allen Fällen erfolgt eine indirekte Bestimmung der Bindungskonstanten und damit der Freien Bindungsenthalpie  $\Delta G^\circ$ . Der Anteil der Standardenthalpie  $\Delta H^\circ$  und Standardentropie  $\Delta S^\circ$  an  $\Delta G^\circ$  [Gl. (2)] kann über Van't-Hoff-Auftragungen der Affinitätsmessungen bei unterschiedlichen Temperaturen<sup>[573]</sup> bestimmt werden.

In den letzten Jahren ist eine ganze Reihe physikalisch-chemischer Messverfahren zur quantitativen Charakterisierung der Ligand-Protein-Bindung aufgegriffen und für diese Fragestellung weiterentwickelt worden. In diesem Aufsatz sollen nur einige dieser Methoden exemplarisch aufgezählt werden. Mit der Plasmonen-Resonanz-Spektroskopie lässt sich die Bindung eines Partners an ein auf einem Festkörperträger immobilisiertes Protein oder einen über einen Anker fixierten Liganden detektieren.<sup>[574–576]</sup> Vor allem können mit dieser Methode die „On“- und „Off“-Geschwindigkeiten der Bindung studiert werden. Eine Vielzahl NMR-spektroskopischer Pulsverfahren wurde entwickelt, mit denen über Signalverschiebungen und die Detektion des Transfers von Magnetisierung zwischen Protein und Ligand der Bindungsvorgang verfolgt wird.<sup>[577–582]</sup> Die Massenspektrometrie ermöglicht es, über den Zerfall von Komplexen in Abhängigkeit der Messparameter (z.B. Beschleunigungsspannung) Rückschlüsse auf die Stabilität und Bindungsaffinität zu ziehen.<sup>[583]</sup> Hierbei werden Bindungsgrößen außerhalb eines Lösungsmittels bestimmt – eine wichtige Ergänzung zu den anderen Verfahren.<sup>[584]</sup> Weiterhin wird inzwischen die atomare Kraftmikroskopie zur Bestimmung der Stärke von Protein-Ligand-Wechselwirkungen angewendet. Dabei wird ein gezieltes „Auseinanderreißen“ der Komplexe untersucht.<sup>[585]</sup>

### 4.2. Direkte Vermessung thermodynamischer Größen

Ein direkter Zugang zur Bindungsaffinität ergibt sich aus mikrokalorimetrischen Messungen.<sup>[573]</sup> Wegen ihrer Bedeutung für das Verständnis des thermodynamischen Hintergrunds der Bindungsaffinität soll diese Methode genauer

betrachtet werden. Bei der isothermen Titrationskalorimetrie (ITC) wird ein Ligand bei konstanter Temperatur schrittweise zu einem in gepufferter Lösung vorgelegten Rezeptor gegeben und die bei der Komplexbildung auftretende pauschale Wärmetönung bestimmt.<sup>[586]</sup> Neben der Assoziationskonstanten  $K_A$  und damit  $\Delta G^\circ$  lässt sich so die Stöchiometrie der Ligand-Rezeptor-Bindung erfassen. Dazu wird aus dem Kurvenverlauf der Titrationskurve die Bindungskonstante berechnet. Die integrierte Wärmetönung lässt auf den enthalpischen Anteil des Bindungsprozesses schließen, der entropische Anteil  $T\Delta S^\circ$  errechnet sich aus den Werten für  $\Delta H^\circ$  und  $\Delta G^\circ$ . Um eine zuverlässige Auswertung des Kurvenverlaufs zu ermöglichen, muss die Bindungskonstante  $< 10^9 \text{ M}^{-1}$  betragen. Bei stärker affinen Verbindungen kann der Messbereich erweitert werden, indem ein weniger affiner Ligand verdrängt wird.<sup>[587–589]</sup> Alternativ kann bei zu großer Affinität die Bindungskonstante aber auch aus einem anderen Experiment (z.B. Enzymkinetik) entnommen werden.

Die in der ITC-Messung bestimmte Wärmetönung umfasst alle dem Bindungsprozess überlagerten Zwischen- und Nebenreaktionen. Durch die Messung in unterschiedlichen Puffersystemen kann bestimmt werden, ob dem Bindungsvorgang eine Protonenverschiebung überlagert ist.<sup>[586, 590–592]</sup> Dabei können sowohl die funktionellen Gruppen des Proteins wie des Liganden einen Wechsel ihres Protonierungszustandes durchlaufen. Bedingt durch die Überführung eines Liganden aus dem wässrigen Medium in die Proteinumgebung können die Dielektrizitätseigenschaften der Umgebung dieser Gruppen sehr stark variieren, ein Effekt, der zu deutlichen  $pK_a$ - oder  $pK_b$ -Verschiebungen führt (Abbildung 3). Die gemessene Enthalpie  $\Delta H_{\text{total}}$  setzt sich dann aus der Reaktionenthalpie  $\Delta H_{\text{bind}}$  und der Enthalpie des Protonenaustauschs mit dem Puffermedium  $\Delta H_{\text{ion}}$  zusammen. Da unterschiedliche Puffer abweichende Ionisierungsenthalpien aufweisen,<sup>[593]</sup> lässt sich dieser Vorgang leicht durch Messung aus mehreren Puffern detektieren [Gl. (12)].<sup>[586]</sup>

$$\Delta H_{\text{total}} = \Delta H_{\text{bind}} + n \Delta H_{\text{ion}} \quad (12)$$

Aus  $n$  wird die Stöchiometrie der Protonierungsreaktion ersichtlich, das Vorzeichen von  $n$  verweist auf die Aufnahme bzw. Abgabe von Protonen.

Aus der in der Literatur häufig verwendeten Van't-Hoff-Auftragung der Ergebnisse einer Affinitätsmessung bei unterschiedlichen Temperaturen lässt sich nur der Teil der Bindungsenthalpie entnehmen, der direkt mit der Messgröße korreliert, die das beobachtete Messsignal bestimmt (z.B. Absorption, Fluoreszenzlösung). Dies bedeutet, dass ausschließlich für den direkten Übergang des Systems von einem eindeutig definierten Ausgangs- (Ligand und Protein) zu einem Endzustand (Protein und gebundener Ligand) eine Enthalpie resultiert, die mit der aus der ITC-Messung stammenden gleichbedeutend ist. Es dürfen keine weiteren (z.B. konformativen) Zustände auftreten oder andere Schritte (z.B. Wechsel des Protonierungszustands) dem Bindungsvorgang überlagert sein.<sup>[594]</sup> In den betrachteten biologischen Systemen zeigt  $\Delta G$  zudem meist nur eine sehr geringe Temperaturabhängigkeit (siehe unten). Daher ist schon aus experimentellen Gründen anhand einer Van't-Hoff-Auftra-

gung kaum eine zuverlässige Bestimmung von Enthalpie und Entropie möglich.

Die Interpretation von ITC-Messergebnissen hat eine Reihe interessanter Aspekte ergeben, vor allem im Hinblick auf strukturelle Details der Rezeptor-Ligand-Bindung.<sup>[197]</sup> Neben dem Nachweis überlagerter Protonierungsreaktionen ist die Bestätigung einer weitgehenden Temperaturunabhängigkeit von  $\Delta G^\circ$  aufgrund einer ausgeprägten Enthalpie-Entropie-Kompensation zu nennen (siehe Abschnitt 2.2.4).

Ein weiterer Zugang für strukturelle Interpretationen ergibt sich aus der Messung der Änderung der Wärmekapazität  $\Delta C_p$ . ITC-Messungen bei unterschiedlichen Temperaturen ergeben für die meisten biologischen Systeme eine starke Temperaturabhängigkeit von  $\Delta H^\circ$  und gegenläufig von  $T\Delta S^\circ$ . Analoge Van't-Hoff-Auftragungen zeigen in solchen Fällen dann keinen linearen Verlauf von  $\Delta G^\circ/T$  als Funktion der reziproken Temperatur. Im Unterschied zu Enthalpie- und Entropieänderungen erweist sich  $\Delta C_p$  als weitgehend temperaturunabhängig in dem für biologische Systeme erfassbaren Temperaturbereich. Für Protein-Ligand-Komplexe ergeben sich im Allgemeinen negative Werte, d.h., der Komplex weist eine geringere Wärmekapazität auf als die Summe der freien Komponenten. Im Hinblick auf Enthalpie und Entropie bedeutet dies, dass mit steigender Temperatur im Allgemeinen die Protein-Ligand-Bindung exothermer bzw. entropisch ungünstiger wird. Die Frage nach einer Enthalpie- oder Entropie-getriebenen Bindung muss daher im Hinblick auf die vorliegende Temperatur betrachtet werden. In der Literatur wird eine Reihe von Modellen diskutiert, die die bei der Protein-Protein-Bindung und Proteinfaltung vergrabene, zuvor Wassermolekülen zugängliche hydrophobe Oberfläche mit der Wärmekapazitätsänderung korrelieren.<sup>[590, 595–600]</sup> Entsprechende Beiträge, die mit der Größe der Oberfläche korrelieren, wurden für die Überführung von hydrophoben Lösungsmittelmolekülen aus der Wasserphase in ihre Reinphase bestimmt (siehe Abschnitt 2.2.2). Überträgt man diese empirischen Korrelationsmodelle auf die Bindung kleiner Liganden an ihre Rezeptoren, werden dem Betrag nach zu kleine Werte für  $\Delta C_p$  berechnet.<sup>[601–603]</sup> Die Wärmekapazität des gebildeten Komplexes fällt demnach im Vergleich zu den getrennten Komponenten geringer aus, als es das Rechenmodell auf der Basis der Oberflächenbeiträge annimmt. Voraussetzung für die Berechnung dieser Oberflächenbeiträge ist die Kenntnis einer relevanten Struktur des freien und des ligandengebundenen Proteins. In der Regel werden dazu Kristallstrukturen herangezogen. Somit kann für die Bindung eines kleinen Liganden an seinen Rezeptor das oberflächenabhängige Abstreifen der Hydrathüllen nicht den alleinigen Beitrag zur Wärmekapazitätsänderung liefern. Als weitere Effekte werden konformativ Änderungen der Bindungspartner oder durch die Komplexbildung verursachte Differenzen in den anregbaren Schwingungsmodi des makromolekularen Systems diskutiert.<sup>[604–606]</sup> Die Abweichungen sind allerdings auch bei konformativ starren Proteinen wie Trypsin zu beobachten<sup>[607]</sup> und stellen offensichtlich ein generell bei der Protein-Ligand-Bindung auftretendes Phänomen dar. Daher erscheint es wahrscheinlich, dass sie mit dem ubiquitär am Bindungsprozess beteiligten Wasser im Zusammenhang stehen. Liggins

und Privalov<sup>[608]</sup> gehen davon aus, dass die enthalpischen Bindungsbeiträge für im Komplex gebildete Wasserstoffbrücken überschätzt werden. In diesen Beitrag geht auch die aufzuwendende Enthalpie der Dehydratisierung ein. Im Grenzbereich einer Bindetasche zum Lösungsmittelraum ist die Annahme einer vollständigen Dehydratisierung vermutlich eine Überschätzung. Vielmehr ist anzunehmen, dass polare Gruppen eines Liganden auch nach der Proteinbindung noch einen Einfluss auf die benachbarten Wassermoleküle und damit auf die lokal angrenzende Wasserstruktur nehmen. Dieser Effekt führt zu reduzierten Desolvationsbeiträgen, die sich auch in den Wärmekapazitätsänderungen niederschlagen könnten. Dies kann möglicherweise die Diskrepanzen zwischen den aufgrund von Proteinfaltungsexperimenten abgeleiteten empirischen Beziehungen zur Berechnung von  $\Delta C_p$  und den gemessenen Werten für Ligand-Protein-Komplexe erklären.

Weitere Hinweise auf Wärmekapazitäten und deren Änderung können DSC("Differential Scanning Calorimetry")-Messungen entnommen werden.<sup>[594]</sup> Hierbei wird das zu untersuchende System quasi adiabatisch mit einer konstanten Aufheizgeschwindigkeit erwärmt und die Temperaturänderung in der Probe verfolgt. Üblicherweise werden diese Messungen für Stabilitätsmessungen von Proteinen bei ihrer Denaturierung eingesetzt. Die Messungen liefern wichtige Einblicke in das konformative Verhalten eines biologischen Systems im untersuchten Temperaturintervall. Abweichungen von einer konstanten Wärmeaufnahme verweisen auf Änderungen in der intramolekularen Packung der Proteine oder auf strukturelle Fluktuationen und konformative Umlagerungen.<sup>[591, 609]</sup> Die Bindung eines Liganden an ein Protein nimmt Einfluss auf dessen Stabilität und Wärmekapazität, ein Verhalten, das sich in deutlichen Veränderungen der DSC-Thermogramme niederschlägt<sup>[610–613]</sup> und mit zur Interpretation der Wechselwirkung zwischen den Partnern beiträgt.<sup>[614–616]</sup>

## 5. Charakterisierung und Bewertung der Ligandenbindung mit einer wissensbasierten Scoring-Funktion

Im Folgenden soll die in eigenen Arbeiten entwickelte wissensbasierte Bewertungsfunktion DrugScore und ihre Anwendung zur Vorhersage von Bindungsmodi und -affinitäten sowie ihre Eignung zur graphischen Identifizierung günstiger Wechselwirkungsbereiche in Proteinbindetaschen beschrieben werden.<sup>[544, 546]</sup>

Bei der Entwicklung von DrugScore wurde Strukturinformation, die mit der Protein-Ligand-Datenbank ReliBase<sup>[545]</sup> in einem wissensbasierten Ansatz aus 1376 kristallographisch bestimmten Protein-Ligand-Komplexen extrahiert worden war, in auf 17 Atomtypen beruhende, statistische Präferenzen umgewandelt. Die Notwendigkeit, sowohl spezifische Wechselwirkungen als auch hauptsächlich entropisch bedingte Lösungsmittelbeiträge bei der Protein-Ligand-Bindung berücksichtigen zu müssen, führte dabei zur Verwendung von zwei Termen – einer bis zu einem Atom-Atom-Abstand von 6 Å reichenden distanzabhängigen Paarpräferenz (Abbil-

dung 10) sowie einer von der Lösungsmittel-zugänglichen Oberfläche von Protein und Ligand sowohl im gebundenen

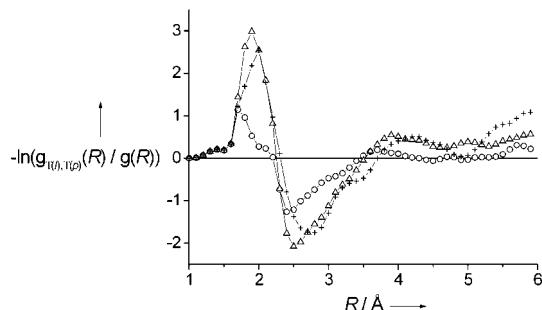


Abbildung 10. Beispiele für Paarpräferenzen zwischen polaren und geladenen ( $\text{O.co}_2\text{-N.pl3}$  (+),  $\text{O.3-O.co}_2$  ( $\Delta$ ),  $\text{O.3-O.3}$  ( $\circ$ )) Liganden- und Proteinalogenen als Funktion des Abstands. Die erste Atomtypbezeichnung bezieht sich dabei auf das betrachtete Ligandenatom, die zweite auf das Proteinalogen.

als auch im ungebundenen Zustand abhängigen Einteilchenpräferenz. Als bedeutsam für die in den jeweiligen Präferenzen enthaltene Information hat sich die Wahl des jeweiligen Referenzzustandes gezeigt, auf den die atomtypspezifischen Verteilungsfunktionen bezogen werden. Während im Fall der Paarpräferenzen ein auf einer kompakten Protein-Ligand-Konfiguration mit nichtspezifischen Wechselwirkungen beruhender Zustand gewählt wurde, wurde für die von der Lösungsmittel-zugänglichen Oberfläche abhängigen Einteilchenpräferenzen eine vollständige Separation von Protein und Ligand als Bezugspunkt verwendet. Die Bewertung gegebener 3D-Anordnungen von Protein und Ligand ergibt sich demnach durch Summation aller Paarwechselwirkungs- und Einteilchenbeiträge der Protein- und Ligandenatome. Intramolekulare enthalpische und entropische Beiträge werden nicht einbezogen.

Unter Verwendung eines approximierenden, auf einem Gitteralgorithmus beruhenden Verfahrens zur Berechnung der Lösungsmittel-zugänglichen Oberfläche wird pro Protein-Ligand-Konfiguration eine Rechenzeit von nur 0.2 s benötigt. Bedingt durch die Beschränkung auf Nichtwasserstoffatome während der Ableitung der Präferenzen sind außerdem für die Anwendung der Bewertungsfunktion keinerlei Annahmen über im Protein-Ligand-Komplex auftretende Protonierungszustände notwendig. Die Verwendung einer Dreiecksfunktion zur Glättung („moving window“-Technik) der zunächst aus den Strukturinformationen erhaltenen Paar- und Einteilchen-Verteilungsfunktionen sollte zudem zu ausreichend „weichen“ Präferenzen führen, die in Kristall- und gedockten Protein-Ligand-Strukturen auftretende Abweichungen von idealen Geometrieparametern tolerieren. Da keinerlei Protein- oder Ligandenotyp-spezifischer Trainingsdatensatz zur Entwicklung der Funktion verwendet wurde, sollte ihre allgemeine Anwendbarkeit gewährleistet sein.

Die Untersuchung der Eignung dieser Funktion zur Identifizierung nativ-ähnlicher Protein-Ligand-Anordnungen in einer Menge davon abweichender Geometrien erfolgte an Datensätzen von 91 und 68 Komplexen, für die mit dem Dockingprogramm FlexX<sup>[552]</sup> bis zu 500 Protein-Ligand-Konfigurationen erzeugt wurden. Hierbei ergab sich eine Erkennungsquote für am besten bewertete Ligandenanordnungen

mit einem rmsd-Wert von  $<2.0 \text{ \AA}$  von der Kristallstruktur („nativ-ähnliche Anordnung“) in 80 % der möglichen Fälle. Bezogen auf den 91 Komplexe umfassenden Datensatz bedeutete dies eine Verbesserung um 35 % gegenüber den mit der FlexX-Bewertungsfunktion erzielten Ergebnissen (Abbildung 11). Ähnlich gute Resultate konnten auch mit Protein-Ligand-Anordnungen erhalten werden, die von dem Dockingprogramm DOCK<sup>[566, 617]</sup> generiert wurden.

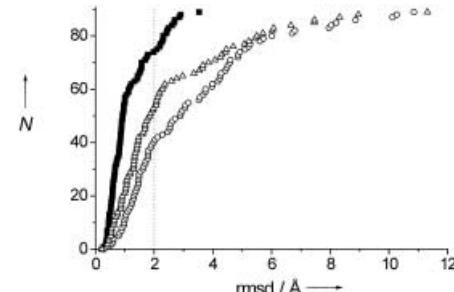
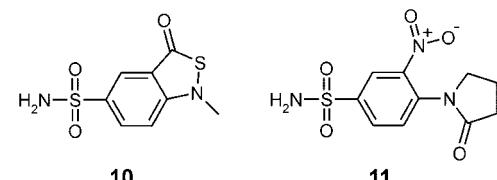


Abbildung 11. Akkumulierte Zahl  $N$  von 91 Protein-Ligand-Komplexen in Abhängigkeit vom rmsd-Wert bezüglich der jeweiligen Kristallstruktur für die Protein-Ligand-Anordnungen, die von FlexX ( $\circ$ ) und DrugScore ( $\Delta$ ) jeweils am besten innerhalb einer Menge von generierten Alternativen bewertet wurden. Ebenfalls angegeben ist die akkumulierte Zahl von Komplexen, für die eine Geometrie mit kleinstem rmsd-Wert unabhängig von einer Bewertung überhaupt generiert wurde ( $\blacksquare$ ). Diese Kurve gibt einen Eindruck des Limits, das eine ideale Bewertungsfunktion erreichen könnte. Alle Kurven wurden unabhängig voneinander nach dem rmsd-Wert sortiert.

Innerhalb einer Virtual-Screening-Studie an humaner Carboanhydrase II (hCAII)<sup>[618]</sup> wurden zudem von zwei der in silico gefundenen neuen Inhibitoren (**10**, **11**; Schema 4) Komplexstrukturen mit hCAII kristallographisch bestimmt. Dies ermöglichte es, die in diesem Fall unter Verwendung der



Schema 4. Innerhalb eines Virtual-Screening-Ansatzes an hCAII gefundene Inhibitoren.<sup>[618]</sup>

Bewertungsfunktionen von FlexX und DrugScore getroffenen „echten“ Vorhersagen mit den danach erhaltenen experimentellen Resultaten zu vergleichen. Wie Abbildung 12 zeigt, liegt die von DrugScore vorhergesagte Bindungsgeometrie (rmsd-Wert bezüglich der Kristallstruktur:  $1.2 \text{ \AA}$  für **10**,  $1.4 \text{ \AA}$  für **11**) dabei deutlich näher an der tatsächlich beobachteten Geometrie als die von der FlexX-Bewertungsfunktion vorgeschlagene (rmsd-Wert bezüglich der Kristallstruktur:  $2.2 \text{ \AA}$  für **10**,  $2.7 \text{ \AA}$  für **11**). Eine zuverlässige Identifizierung nativ-ähnlicher Bindungsmodi ist aber nicht nur für eine nachfolgende Ligandenoptimierung unverzichtbar, sondern Grundvoraussetzung für eine verlässliche Vorhersage der Bindungsaffinität von durch Dockingprogramme erzeugten Protein-Ligand-Anordnungen.

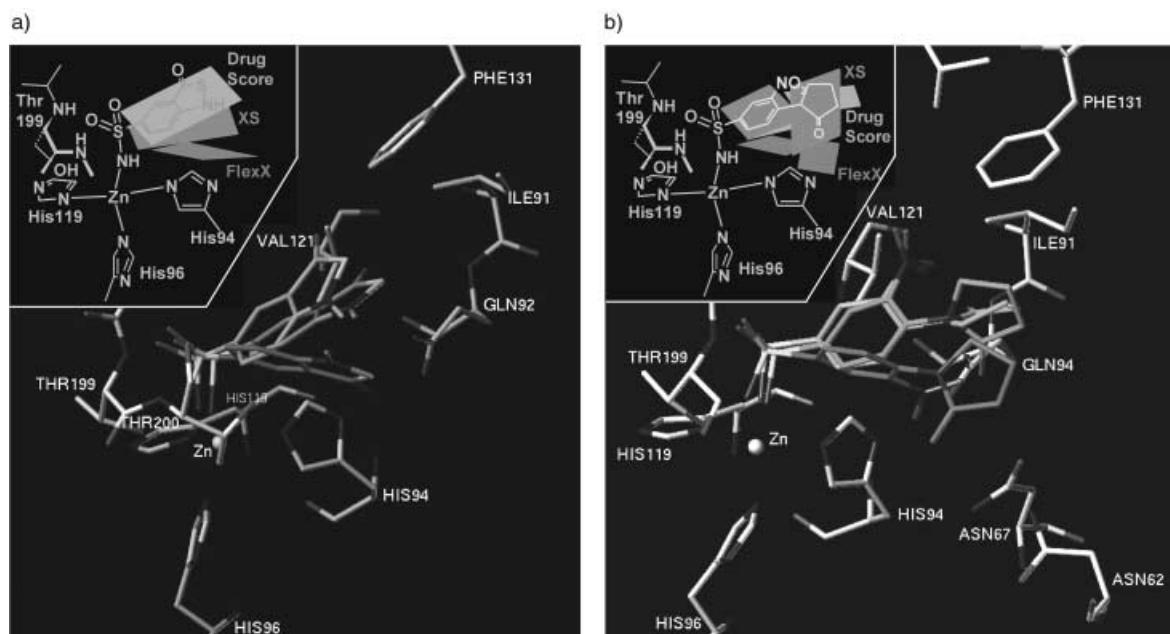


Abbildung 12. Überlagerung von Kristallstrukturen (mittelgrau) und als am besten von DrugScore (hellgrau) und der Scoring-Funktion von FlexX (dunkelgrau) bewerteten gedockten Lösungen zweier innerhalb eines Virtual-Screening-Ansatzes an hCAII gefundener Inhibitoren [a] **10**, b) **11**.<sup>[618]</sup> Die unterschiedlichen Bindungsmodi sind schematisch jeweils auch in den Einschüben dargestellt.

Die Validierung von DrugScore zur Vorhersage von Bindungsaffinitäten erfolgte an sechs Datensätzen mit kristallographisch bestimmten Protein-Ligand-Komplexen sowie drei Datensätzen, für die Protein-Ligand-Anordnungen mit FlexX erzeugt wurden. Im Fall von 16 Serinprotease-Inhibitor-Komplexen mit experimentell bestimmter Struktur wird dabei ein  $r^2$ -Wert von 0.86 und eine Standardabweichung von 0.95 logarithmischen Einheiten verglichen mit den experimentell bestimmten Affinitäten erzielt. Für einen Satz von 64 in das jeweilige Protein gedockten Thrombin- und Trypsin-Inhibitoren ergibt sich ein  $r^2$ -Wert von 0.48 und eine Standardabweichung von 0.71 logarithmischen Einheiten. Die erzielten Abweichungen liegen dabei innerhalb des experimentellen Fehlers.

Werden unter Verwendung der distanzabhängigen Paarpräferenzen in Proteinbindetaschen für an Gitterpunkten lokalisierte Sondenatome Potentialwerte berechnet und die Ergebnisse in Form von Isokonturoberflächen visualisiert, können damit für einen Ligandenatomtyp günstige Bereiche („hot spots“) identifiziert werden (Abbildung 13 und Vorti-

tel). Diese können dann sowohl für eine Ligandenoptimierung als auch zur Formulierung von Pharmakophorhypothesen, etwa für Suchen in Moleküldatenbanken, verwendet werden.

In einer Validierungsstudie konnte anhand von 159 Protein-Ligand-Komplexen bei Verwendung von fünf Sondenatomen in 74 % der Fälle der korrekte Atomtyp und in 85 % der Fälle ein für die korrekte Wechselwirkung passender Atomtyp vorhergesagt werden. Eine innerhalb der Virtual-Screening-Studie an hCAII<sup>[618]</sup> durchgeführte Untersuchung der Proteinbindetasche mit GRID,<sup>[418]</sup> SuperStar,<sup>[556]</sup> LUDI<sup>[619]</sup> und DrugScore zeigte zudem, dass alle Methoden hinsichtlich eines Wechselwirkungstyps qualitativ die gleichen Regionen identifizieren, allerdings mit unterschiedlicher Wichtigkeit.

## 6. Faktorisierung thermodynamischer Beiträge zur Ligandenbindung am Beispiel von Inhibitoren von Serinproteasen

Als ein Beispiel für die experimentell untersuchte Aufteilung affinitätsbestimmender Faktoren soll die Inhibitorbindung an Trypsin und Thrombin aus eigenen Arbeiten betrachtet werden.<sup>[607]</sup> Eine Serie strukturell eng verwandter Benzamidinhemmstoffe **12a–12dAc** (Schema 5) sowie die Entwicklungssubstanzen Napsagatran **13**, CRC220 **14**, Inogatran **15** und Melagatran **16** (Schema 6) wurden kristallographisch und mikrokalorimetrisch untersucht.

Die Kristallstrukturuntersuchungen ergaben einen einheitlichen Bindungsmodus mit einer Salzbrücke zwischen der Amidgruppe des Liganden und Asp189 und Wechselwirkungen der zentralen Amid- oder Sulfonamidgruppe zu den Carbonyl- bzw. Amid-NH-Gruppen der Aminosäuren Gly216 und Gly219. Im Detail ergeben sich aber interessante

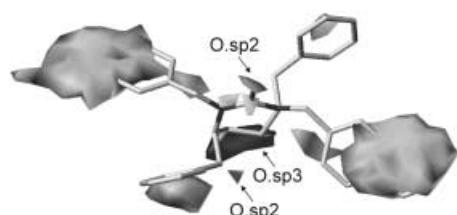
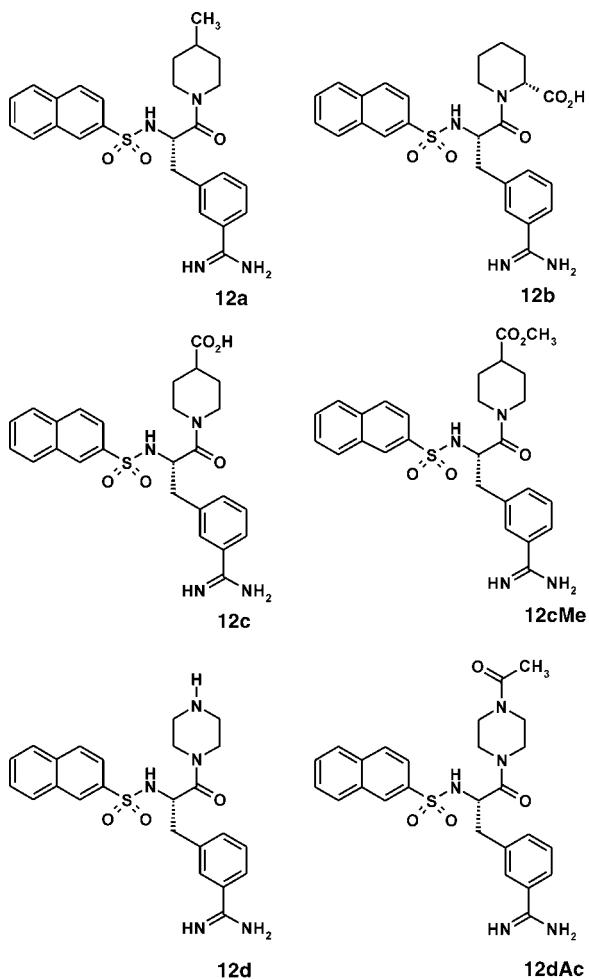


Abbildung 13. Mit den distanzabhängigen Paarpräferenzen von DrugScore berechnete und als Isokonturoberflächen dargestellte „hot spots“ in der Bindetasche der HIV-1-Protease (PDB-Code: 1hvr) zusammen mit dem ausschließlich zu Vergleichszwecken gezeigten Liganden XK263 von Merck. Für Aren-C-Atome günstige Bereiche sind hellgrau, für Carboxyl-O-Atome günstige mittelgrau und für Hydroxy-O-Atome günstige dunkelgrau eingefärbt.



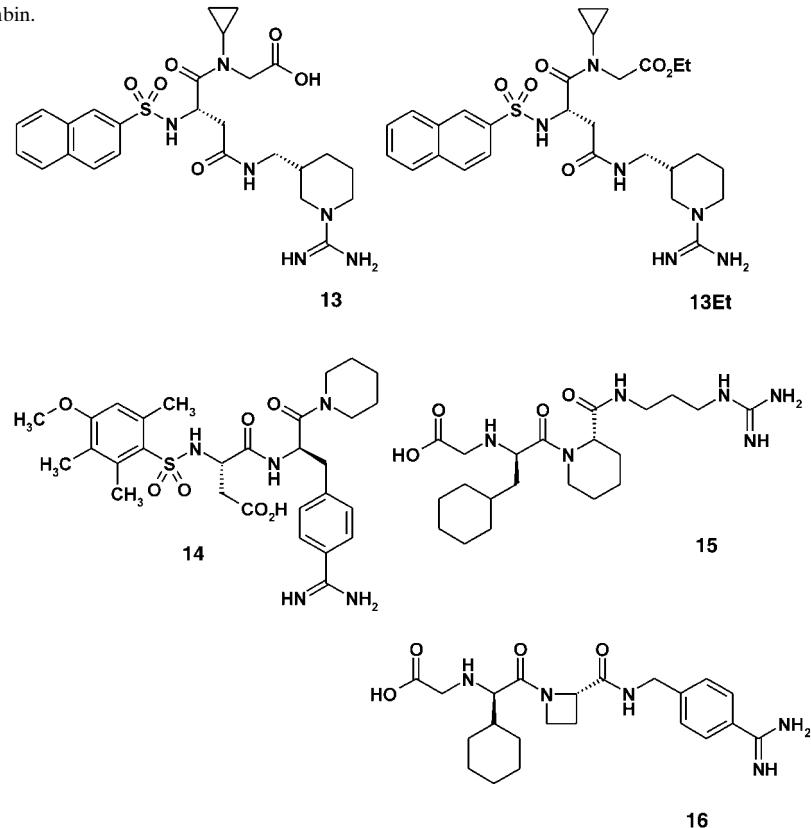
Schema 5. Strukturell verwandte Inhibitoren von Trypsin und Thrombin.

Abweichungen, die im Zusammenhang mit den thermodynamischen Parametern wichtige Rückschlüsse erlauben.

Interessanterweise nehmen das 2-Carboxyderivat **12b** und Napsagatran **13** ein Proton bei der Proteinbindung auf, das Piperazinderivat **12d** gibt bei der Bindung ein Proton ab. Das eng verwandte 4-Carboxy-Derivat **12c** verbleibt bei der Bindung deprotoniert an der Säuregruppe. Die gleiche Beobachtung ist für CRC220 **14** zu verzeichnen, auch hier verbleibt die Säuregruppe des zentralen Aspartats deprotoniert. Erklärbar werden die deutlichen  $pK_a$ -Verschiebungen der betrachteten Gruppen – die in Wasser sehr ähnliche  $pK_a$ -Werte aufweisen – wenn man die Bindungsmodi dieser Liganden betrachtet. Bei CRC220 ragt die Carboxylatgruppe aus der Bindetasche heraus in Richtung auf das Lösungsmittel (Abbildung 14), d.h., diese Gruppe wird nur partiell desolvatisiert und die lokalen Dielektrizitätseigenschaften entsprechen noch stark den Verhältnissen in der reinen Wasserphase. In **12b** und Napsagatran stehen die nach der Bindung protonierten Säuregruppen in Richtung auf das katalytische Serin und bilden eine Wasserstoffbrücke zum Protein aus (Abbildung 14).

Hier nimmt die Umgebung einen so starken Einfluss auf die dielektrischen Eigenschaften („induced dielectric fit“), dass der  $pK_a$ -Wert der Carboxylgruppen um mehr als vier Einheiten verschoben wird. Die in **12b** unverändert deprotonierte 4-Carboxy-Gruppe orientiert sich parallel zu der hydrophoben Ringebene des katalytischen Histidin. Die induzierte  $pK_a$ -Verschiebung der Umgebung reicht nunmehr nicht aus, um diese Säuregruppe in den protonierten Zustand zu überführen. Die terminale Aminogruppe von **12d**, die mit einem  $pK_a$ -Wert von 7.5 bei den gewählten Pufferbedingungen von pH 7.8 im umgebenden Medium partiell protoniert vorliegt, verliert durch die Proteinbindung das Proton. Jetzt bewirkt die hydrophobe Proteinumgebung eine Verringerung des  $pK_a$ -Wertes der basischen Gruppe.

Vergleicht man die Aufspaltung in einen enthalpischen und entropischen Bindungsanteil, so stehen mit den freien Säuren und dem Ester **12b/12bMe** und **12c/12cMe** aufschlussreiche Paare zur Verfügung. Die Inhibitoren mit der funktionellen Gruppe in 4-Position unterscheiden sich um mehr als 8  $\text{kJ mol}^{-1}$  in  $\Delta G^\circ$  (**12c**:  $-35.5$ , **12cMe**:  $-43.6 \text{ kJ mol}^{-1}$ ), wo-



Schema 6. Entwicklungssubstanzen, die an Trypsin oder Thrombin binden.

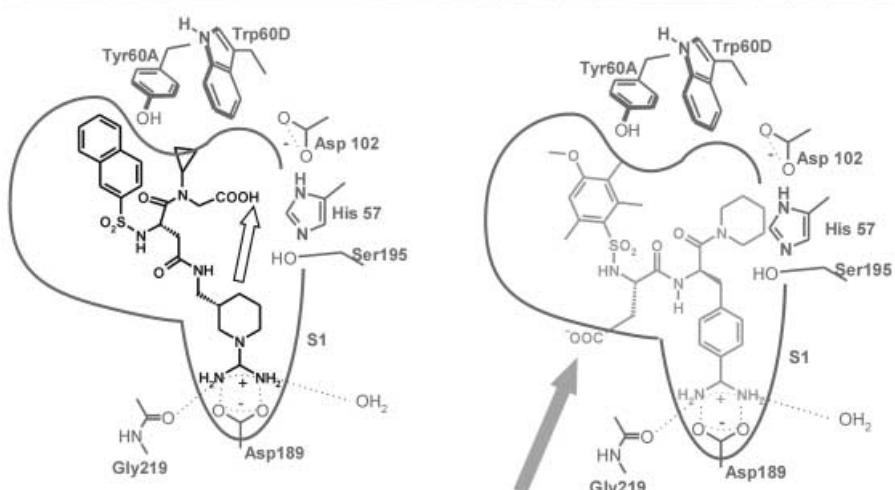
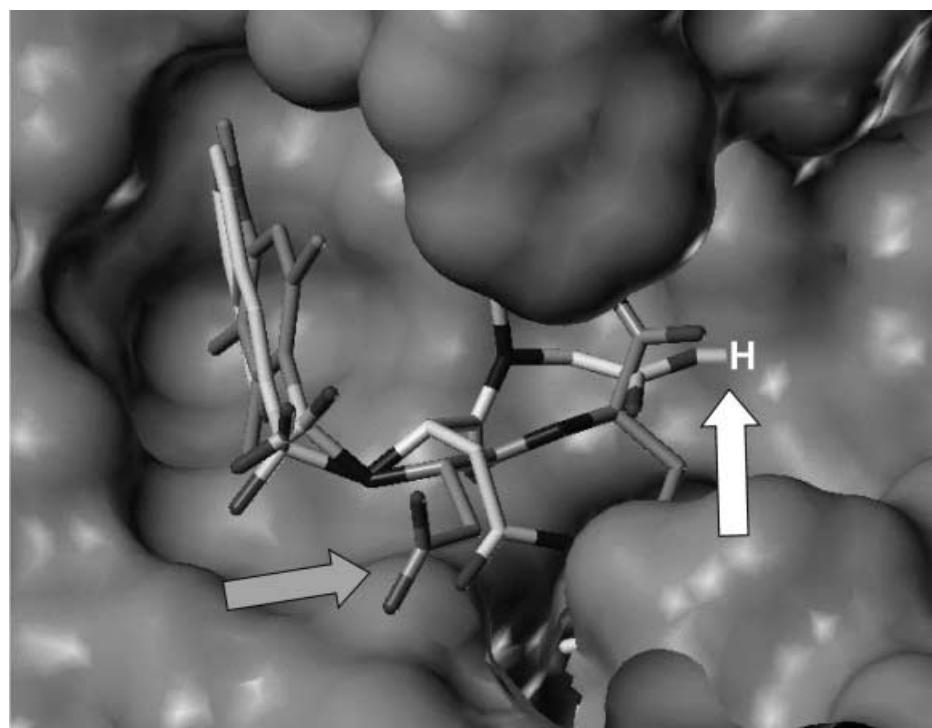


Abbildung 14. Schematischer Bindungsmodus (unten) von Napsagatran **13** und CRC220 **14** an Thrombin. Oben sind überlagert die kristallographisch bestimmten Bindungsgeometrien (hell: Napsagatran, der weiße Pfeil deutet auf die protoniert bindende Carboxylatgruppe; dunkel: CRC220, der graue Pfeil zeigt auf die deprotonierte Säurefunktion) beider Inhibitoren dargestellt.

bei die höhere Affinität des Esters auf eine stärker enthalpische Bindung zurückzuführen ist ( $\Delta H^\circ$ ; **12b**:  $-26.8$ , **12bMe**:  $-39.6 \text{ kJ mol}^{-1}$ ); die entropischen Beiträge  $T\Delta S^\circ$  sind ähnlich (**12b**:  $+8.7$ , **12bMe**:  $+4.0 \text{ kJ mol}^{-1}$ ). Die bei  $25^\circ\text{C}$  enthalpisch herabgesetzte Bindung der Säure lässt sich durch eine ungünstigere Desolvatisationsbilanz erklären: Die Säure verliert für zwei polare Wasserstoffbrücken-Acceptoren die H-Brücken-Partner im Solvens, wohingegen der Ester nur für den Carbonylsauerstoff den Solvationsbeitrag aufwenden muss. Der verbrückende Sauerstoff zeigt praktisch keine basischen Eigenschaften.<sup>[620]</sup> Für das analoge Paar mit der Carboxylat- bzw. Estergruppe in 2-Position ergeben sich umgekehrte Verhältnisse. Hier sind Säure und Ester praktisch gleich affin ( $\Delta G^\circ$ ; **12b**:  $-36.4$ , **12bMe**:  $-37.0 \text{ kJ mol}^{-1}$ );

allerdings ist jetzt die freie Säure enthalpisch begünstigt, der Ester fällt in seinem Enthalpiebeitrag ab ( $\Delta H^\circ$ ; **12b**:  $-46.7$ , **12bMe**:  $-16.9 \text{ kJ mol}^{-1}$ ). Aus Entropiegründen ist die Bindung der Säure jetzt deutlich ungünstiger ( $T\Delta S^\circ$ ; **12b**:  $-10.6$ , **12bMe**:  $20.6 \text{ kJ mol}^{-1}$ ). Die nach der Bindung protonierte Säure (siehe oben) bildet eine enthalpisch günstige H-Brücke zum Protein aus, gleichzeitig verliert dieser Molekülteil durch seine Fixierung an Restbeweglichkeit in der Bindetasche. Dies drückt sich in dem ungünstigeren Entropieanteil aus. Die in der Kristallstruktur reduzierten Temperaturfaktoren in diesem Molekülteil von **12b** sprechen ebenfalls für diese Beobachtung. Das Piperazin **12d** und das Acetyl-derivat **12dAc** weisen sehr ähnliche Bindungsaffinitäten auf ( $\Delta G^\circ$ ; **12d**:  $-40.8$ , **12dAc**:  $-42.7 \text{ kJ mol}^{-1}$ ). Für beide entfallen (nach Korrektur der Beiträge für den überlagerten Deprotonierungsschritt von **12d**) gleiche Anteile auf  $\Delta H^\circ$  und  $T\Delta S^\circ$  ( $\Delta H^\circ$ ; **12d**:  $-32.9$ , **12dAc**:  $-34.4$ ,  $T\Delta S^\circ$ ; **12d**:  $-7.9$ , **12dAc**:  $-8.2 \text{ kJ mol}^{-1}$ ). Sowohl das freie Amin als auch die geschützte Acetylverbindung weisen ein polares, zu H-Brücken befähigtes Atom auf. Da im gebundenen Zustand in beiden Fällen keine H-Brücke durch diese Gruppen zum Protein aufgebaut wird, muss für die ungünstige Desolvatation „bezahlt“ werden, offensichtlich für beide mit einem ähnlichen thermodynamischen Beitrag. Die weiteren in der Studie untersuchten Verbindungen bestätigen die beschriebenen Trends.

Interessant ist ebenfalls der Vergleich der Wärmekapazitäten. In allen Fällen wird ein stark negatives  $\Delta C_p$  gemessen, d. h., mit steigender Temperatur wird  $\Delta H^\circ$  zunehmend exotherm und – da sich  $\Delta G^\circ$  als weitgehend temperaturunabhängig erweist – der Bindungsvorgang entropisch ungünstiger. Aus den bekannten Kristallstrukturen der Ligand-Protein-Komplexe wurden die Oberflächenanteile berechnet, die bei der Bindung vergraben werden. Da Thrombin und Trypsin als relativ rigide Proteine beschrieben werden, wurden die Oberflächenanteile des nichtinhibierten Proteins aus der Struktur des von dem Liganden „befreiten“ Proteins ermittelt. Legt man die aus der Proteinfaltung (siehe oben) bekannten empirischen Korrelationen zur Abschätzung von  $\Delta C_p$  zugrunde, so werden dem Betrag nach zu geringe  $\Delta C_p$ -Werte vorhergesagt. Expe-

rimentell ergeben sich somit kleinere Wärmekapazitäten für die Komplexe, als sich aus der alleinigen Korrelation mit solvationsbedingten Oberflächenbeiträgen ergibt. Für eine detaillierte strukturelle Deutung von  $\Delta C_p$  müssen vermutlich die oben beschriebenen zusätzlichen Faktoren berücksichtigt werden. Überraschenderweise tritt für Thrombin – im Unterschied zu Trypsin – eine Natrium-spezifische Abhängigkeit von  $\Delta C_p$  auf. Eine allosterische Regulierung von Thrombin ist bekannt, unklar ist allerdings, wie dieser ionenspezifische Effekt strukturell zu interpretieren ist.

## 7. Zusammenfassung und Ausblick

Die Affinität einer niedermolekularen Verbindung zu einem makromolekularen Rezeptor wird häufig als Maß für die Charakterisierung der biologischen Aktivität dieser Substanz verwendet. Sie ist das Resultat elektrostatischer Wechselwirkungen zwischen Ligand und Rezeptor sowie von Beiträgen durch Solvation und Desolvation beider Bindungspartner und deren räumlicher Komplementarität zueinander. Zusätzlichen Einfluss nehmen Faktoren, die durch Änderungen in der Zahl der Freiheitsgrade und Konformationsänderungen von Ligand und Rezeptor im Verlauf der Komplexbildung bedingt sind. Ein grundlegendes Verständnis dieser enthalpischen und entropischen Beiträge ist notwendige Voraussetzung für eine Vorhersage der Affinität.

Die Methoden des virtuellen Screenings und rationalen Wirkstoffdesigns benötigen schnelle und verlässliche Verfahren zur Affinitätsvorhersage. In diesem Aufsatz haben wir bekannte theoretische Ansätze hierzu anhand ihrer methodischen Grundlagen klassifiziert und beschrieben. Hierbei treten deutliche Unterschiede im benötigten Rechenaufwand und in der allgemeinen Anwendbarkeit der einzelnen Verfahren zutage. Die pragmatische Kombination einzelner Ansätze in Consensus-Verfahren weist darauf hin, dass zurzeit keine einzelne „ideale“ Verfahren existiert, das alle oben angeführten, für eine Ligand-Rezeptor-Bindung wichtigen Beiträge adäquat beschreibt. Allerdings wurden gerade in letzter Zeit durch die Entwicklung wissensbasierter Scoring-Funktionen Fortschritte bei der (schnellen) Vorhersage der Bindungsaffinität erzielt.

Physikalisch-chemische Messverfahren zur quantitativen Charakterisierung der Ligand-Rezeptor-Bindung sind in den letzten Jahren deutlich weiterentwickelt worden. Insbesondere die direkte Bestimmung thermodynamischer Größen mithilfe von mikrokalorimetrischen Messungen eröffnet einen Zugang zum Verständnis des thermodynamischen Hintergrundes der Bindungsaffinität. Im Zusammenhang mit der Strukturaufklärung von Ligand-Rezeptor-Komplexen ergibt sich so die Möglichkeit, eine Faktorisierung der Bindungsaffinität in einzelne Beiträge vorzunehmen. Allerdings zeigen die aufgeführten Beispiele der Vermessung von Serinprotease-Inhibitoren, dass hierbei dem Bindungsvorgang überlagernde Schritte erkannt und adäquat behandelt werden müssen.

Mit dem Anwachsen von Strukturinformationen und energetischen Daten über Ligand-Rezeptor-Komplexe sind in Zukunft weitere Fortschritte im Verständnis und in der Beschreibung der Bindungsaffinität sowie die Verbesserung

ihrer Vorhersage zu erwarten. Insbesondere die heutzutage verwendeten Näherungen – etwa Vernachlässigung von Änderungen des Protonierungszustandes beider Bindungspartner während der Komplexbildung, Betrachtung des Rezeptors als starr, Nichtberücksichtigung allosterischer Effekte und die bisher kaum adäquate Berücksichtigung von Wasserstoffmolekülen bei der Ligandenbindung – werden hierbei Ausgangspunkte neuer Entwicklungen sein.

## Anhang: Abkürzungen

ASP	atomarer Solvationsparameter
CSD	Cambridge-Strukturdatenbank, eine Datenbank mit Kristallstrukturen niedermolekularer Verbindungen <sup>[1]</sup>
FEP-MD	Freie-Energie-Störungsrechnung/Moleküldynamik
GB/SA	Generalisierter Born-Ansatz
LIE	lineare Wechselwirkungsenergie
ME	Hauptgleichung („master equation“)
NBTI	nicht-Boltzmann-thermodynamische Integration
PBE	Poisson-Boltzmann-Gleichung
PDB	Protein-Strukturdatenbank <sup>[2]</sup>
PLS	„Partial Least Squares“-Verfahren
QSAR	quantitative Struktur-Aktivitäts-Beziehung
rmsd	mittlere quadratische Abweichung in den kartesischen Koordinaten einander entsprechender Atome in zwei Molekülen

Eingegangen am 22. Oktober 2001 [A 497]

- [1] F. H. Allen, J. E. Davies, J. J. Galloy, O. Johnson, O. Kennard, C. F. Macrae, E. M. Mitchell, G. F. Mitchell, J. M. Smith, D. G. Watson, *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* **1991**, *31*, 187–204.
- [2] F. C. Bernstein, T. F. Koetzle, G. J. Williams, E. E. Meyer, Jr., M. D. Brice, J. R. Rodgers, O. Kennard, T. Shimanouchi, M. Tasumi, *J. Mol. Biol.* **1977**, *112*, 535–542.
- [3] E. Fischer, *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1894**, *27*, 2985–2993.
- [4] P. Ehrlich, *Lancet* **1913**, *II*, 445–451.
- [5] D. E. Koshland, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1958**, *44*, 98–104.
- [6] D. E. Koshland, *Angew. Chem.* **1994**, *106*, 2468–2472; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1994**, *33*, 2375–2378.
- [7] J. P. Glusker, M. Lewis, M. Rossi, *Crystal Structure Analysis for Chemists and Biologists*, VCH, Weinheim, **1994**.
- [8] J. Drenth, *Principles of Protein X-ray Crystallography*, Springer, New York, **1999**.
- [9] K. Wüthrich, *NMR of Proteins and Nucleic Acids*, Wiley, New York, **1986**.
- [10] G. Siegal, J. van Duynhoven, M. Baldus, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **1999**, *3*, 530–536.
- [11] G. M. Clore, A. M. Gronenborn, *Science* **1991**, *252*, 1390–1399.
- [12] W. Kühlbrandt, K. A. Williams, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **1999**, *3*, 537–543.
- [13] M. H. Stowell, A. Miyazawa, N. Unwin, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **1998**, *8*, 595–600.
- [14] W. Chiu, A. McGough, M. B. Sherman, M. F. Schmid, *Trends Cell Biol.* **1999**, *9*, 154–159.
- [15] W. Baumeister, C. S. Alasdair, *Trends Biochem. Sci.* **2000**, *25*, 624–631.
- [16] F. S. Collins, A. Patrinos, E. Jordan, A. Chakravarti, R. Gesteland, L. Walters, E. Fearon, L. Hartwelt, C. H. Langley, R. A. Mathies, M. Olson, A. J. Pawson, T. Pollard, A. Williamson, B. Wold, K. Buetow, E. Branscomb, M. Capocchi, G. Church, H. Garner, R. A. Gibbs, T.

- Hawkins, K. Hodgson, M. Knotek, M. Meisler, G. M. Rubin, L. M. Smith, M. Westerfield, E. W. Clayton, N. L. Fisher, C. E. Lerman, J. D. McInerney, W. Nebo, N. Press, D. Valle, *Science* **1998**, 282, 682–689.
- [17] G. M. Rubin, M. D. Yandell, J. R. Wortman, G. L. Gabor Miklos, C. R. Nelson, I. K. Hariharan, M. E. Fortini, P. W. Li, R. Apweiler, W. Fleischmann, J. M. Cherry, S. Henikoff, M. P. Skupski, S. Misra, M. Ashburner, E. Birney, M. S. Boguski, T. Brody, P. Brokstein, S. E. Celniker, S. A. Chervitz, D. Coates, A. Cravchik, A. Gabrielian, R. F. Galle, W. M. Gelbart, R. A. George, L. S. Goldstein, F. Gong, P. Guan, N. L. Harris, B. A. Hay, R. A. Hoskins, J. Li, Z. Li, R. O. Hynes, S. J. Jones, P. M. Kuehl, B. Lemaitre, J. T. Littleton, D. K. Morrison, C. Mungall, P. H. O'Farrell, O. K. Pickeral, C. Shue, L. B. Vosshall, J. Zhang, Q. Zhao, X. H. Zheng, F. Zhong, W. Zhong, R. Gibbs, J. C. Venter, M. D. Adams, S. Lewis, *Science* **2000**, 287, 2204–2215.
- [18] S. Broder, J. C. Venter, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **2000**, 40, 97–132.
- [19] Siehe Ausgabe „The Human Genome“: *Nature* **2001**, 409, 813–958.
- [20] E. M. Marcotte, M. Pellegrini, H. Ng, D. W. Rice, T. O. Yeates, D. Eisenberg, *Science* **1999**, 285, 751–753.
- [21] F. Lottspeich, *Angew. Chem.* **1999**, 111, 2630–2647; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, 38, 2477–2492.
- [22] J. H. Wang, R. M. Hewick, *Drug Discovery Today* **1999**, 4, 129–383.
- [23] A. Danchin, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **1999**, 9, 363–367.
- [24] C. A. Orengo, A. E. Todd, J. M. Thornton, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **1999**, 9, 374–382.
- [25] D. R. Westhead, J. M. Thornton, *Curr. Opin. Biotechnol.* **1998**, 9, 383–389.
- [26] B. Rost, *Structure* **1998**, 6, 259–263.
- [27] S. K. Burley, S. C. Almo, J. B. Bonanno, M. Capel, M. R. Chance, T. Gaasterland, D. Lin, A. Sali, F. W. Studier, S. Swaminathan, *Nat. Genet.* **1999**, 23, 151–157.
- [28] I. Usón, G. M. Sheldrick, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **1999**, 9, 643–648.
- [29] D. J. Diller, M. R. Redinbo, E. Pohl, W. G. J. Hol, *Proteins* **1999**, 36, 526–541.
- [30] D. J. Diller, E. Pohl, M. R. Redinbo, B. T. Hovey, W. G. J. Hol, *Proteins* **1999**, 36, 512–525.
- [31] D. A. Jones, F. A. Fitzpatrick, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **1999**, 3, 71–76.
- [32] J. Scolnick, J. S. Fetrow, *Trends Biotechnol.* **2000**, 18, 34–39.
- [33] F. Spaltmann, M. Blunck, K. Ziegelbauer, *Drug Discovery Today* **1999**, 4, 17–26.
- [34] J. Drews in *Human Disease – from Genetic Causes to Biochemical Effects* (Hrsg.: J. Drews, S. Ryser), Blackwell, Berlin, **1997**, S. 5–9.
- [35] G. A. Petsko, *Nature* **1996**, 384, 7–9.
- [36] J. Drews, *Drug Discovery Today* **2000**, 5, 2–4.
- [37] J. Drews, *Nat. Biotechnol.* **1996**, 14, 1516–1518.
- [38] R. B. Silvermann, *Medizinische Chemie für Organiker, Biochemiker und Pharmazeutische Chemiker*, VCH, Weinheim, **1994**.
- [39] H.-J. Böhm, G. Klebe, H. Kubinyi, *Wirkstoffdesign*, Spektrum, Heidelberg, **1996**.
- [40] O. H. Chan, B. H. Stewart, *Drug Discovery Today* **1996**, 1, 461–473.
- [41] D. A. Smith, H. van de Waterbeemd, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **1999**, 3, 373–378.
- [42] A. P. Watt, D. Morrison, D. C. Evans, *Drug Discovery Today* **2000**, 5, 17–24.
- [43] D. B. Searls, *Drug Discovery Today* **2000**, 5, 135–143.
- [44] G. R. Lenz, H. M. Nash, S. Jindal, *Drug Discovery Today* **2000**, 5, 145–156.
- [45] M. H. Beydon, A. Fournier, L. Drugeault, J. Becquart, *J. Biomol. Screening* **2000**, 5, 13–22.
- [46] R. P. Hertzberg, A. J. Pope, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2000**, 4, 445–451.
- [47] W. P. Walters, M. T. Stahl, M. A. Murcko, *Drug Discovery Today* **1998**, 3, 160–178.
- [48] *Virtual Screening for Bioactive Molecules, Vol. 10* (Hrsg.: H.-J. Böhm, G. Schneider), Wiley-VCH, Weinheim, **2000**.
- [49] I. D. Kuntz, *Science* **1992**, 257, 1078–1082.
- [50] I. D. Kuntz, E. C. Meng, B. K. Shoichet, *Acc. Chem. Res.* **1994**, 27, 117–123.
- [51] D. B. Boyd, *Mod. Drug Discovery* **1998**, 6, 41–48.
- [52] E. M. Gordon, M. A. Gallop, D. V. Patel, *Acc. Chem. Res.* **1996**, 29, 144–154.
- [53] T. Carell, E. A. Wintner, J. Rebek, Jr., *Angew. Chem.* **1994**, 106, 2162–2164; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1994**, 33, 2061–2064.
- [54] J. G. Houston, M. Banks, *Curr. Opin. Biotechnol.* **1997**, 8, 734–740.
- [55] N. K. Terrett, M. Gardner, D. W. Gordon, R. J. Kobylecki, J. Steele, *Tetrahedron* **1995**, 51, 8135–8173.
- [56] F. Balkenhohl, C. von dem Bussche-Hünnefeld, A. Lansky, C. Zechel, *Angew. Chem.* **1996**, 108, 2436–2488; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1996**, 35, 2289–2337.
- [57] S. Kauffman, A. D. Ellington, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **1999**, 3, 256–259.
- [58] A. Dömling, I. Ugi, *Angew. Chem.* **2000**, 112, 3300–3344; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000**, 39, 3169–3210.
- [59] S. F. Oliver, C. Abell, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **1999**, 3, 299–306.
- [60] R. Lahana, *Drug Discovery Today* **1999**, 4, 447–448.
- [61] M. A. Sills, *Drug Discovery Today* **1998**, 3, 304–312.
- [62] W. A. Warr, *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* **1997**, 37, 134–140.
- [63] D. E. Clark, S. D. Pickett, *Drug Discovery Today* **2000**, 5, 49–58.
- [64] J. F. Blake, *Curr. Opin. Biotechnol.* **2000**, 11, 104–107.
- [65] J. H. Van Drie, M. S. Lajiness, *Drug Discovery Today* **1998**, 3, 274–283.
- [66] L. Weber, S. Wallbaum, C. Broger, K. Gubernator, *Angew. Chem.* **1995**, 107, 2452–2454; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1995**, 34, 2280–2282.
- [67] C. M. Murray, S. J. Cato, *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* **1999**, 39, 46–50.
- [68] S. J. Teague, A. M. Davis, P. D. Leeson, T. Oprea, *Angew. Chem.* **1999**, 111, 3962–3967; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, 38, 3743–3748.
- [69] S. L. Schreiber, *Science* **2000**, 287, 1964–1969.
- [70] *Designing Bioactive Molecules* (Hrsg.: Y. C. Martin, P. Willet, S. R. Heller), American Chemical Society, Washington, **1999**.
- [71] H.-J. Böhm, M. Böhringer, D. Bur, H. Gmuender, W. Huber, W. Klaus, D. Kostrewa, H. Kühne, T. Lübbers, N. Meunier-Keller, F. Müller, *J. Med. Chem.* **2000**, 43, 2664–2674.
- [72] J. M. Chen, F. C. Nelson, J. I. Levin, D. Mobilio, F. J. Moy, R. Nilakantan, A. Zask, R. Powers, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, 122, 9648–9654.
- [73] B. Buzbee, *Science* **1993**, 261, 852–853.
- [74] J. Couzin, *Science* **1998**, 281, 762.
- [75] G. Klebe, *Period. Biol.* **1998**, 100 (Suppl. 2), 93–98.
- [76] H. Kubinyi, *Curr. Opin. Drug Discovery Dev.* **1998**, 1, 4–15.
- [77] J. Greer, J. W. Erickson, J. J. Baldwin, M. D. Varney, *J. Med. Chem.* **1994**, 37, 1035–1054.
- [78] D. B. Boyd, *Rev. Comput. Chem.* **1990**, 1, 355–371.
- [79] R. E. Babine, S. L. Bender, *Chem. Rev.* **1997**, 97, 1359–1472.
- [80] D. H. Harrison, K. M. Bohren, G. A. Petsko, D. Ringe, K. H. Gabbay, *Biochemistry* **1997**, 36, 16134–16140.
- [81] L. Costantino, G. Rastelli, K. Vescovini, G. Cignarella, P. Vianello, A. D. Corso, M. Cappiello, U. Mura, D. Barlocco, *J. Med. Chem.* **1996**, 39, 4396–4405.
- [82] I. R. Hardcastle, M. G. Rowlands, J. Houghton, I. B. Parr, G. A. Potter, M. Jarman, K. J. Edwards, C. A. Laughton, J. O. Trent, S. Neidle, *J. Med. Chem.* **1995**, 38, 241–248.
- [83] A. Scozzafava, C. T. Supuran, *J. Med. Chem.* **2000**, 43, 3677–3687.
- [84] P. A. Boriack-Sjodin, S. Zeitlin, H. H. Chen, L. Crenshaw, S. Gross, A. Dantanarayana, P. Delgado, J. A. May, T. Dean, D. W. Christianson, *Protein Sci.* **1998**, 7, 2483–2489.
- [85] L. R. Scolnick, A. M. Clements, J. Liao, L. Crenshaw, M. Hellberg, J. May, T. R. Dean, D. W. Christianson, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, 119, 850–851.
- [86] A. Jain, G. M. Whitesides, R. S. Alexander, D. W. Christianson, *J. Med. Chem.* **1994**, 37, 2100–2105.
- [87] A. S. Kalgutkar, B. C. Crews, S. W. Rowlinson, A. B. Marnett, K. R. Kozak, R. P. Remmel, L. J. Marnett, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2000**, 97, 925–930.
- [88] C. I. Bayly, W. C. Black, S. Leger, N. Ouimet, M. Ouellet, M. D. Percival, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1999**, 9, 307–312.
- [89] C. A. Veale, J. R. Damewood, G. B. Steelman, C. Bryant, B. Gomes, J. Williams, *J. Med. Chem.* **1995**, 38, 86–97.
- [90] R. J. Cregge, S. L. Durham, R. A. Farr, S. L. Gallion, C. M. Hare, R. V. Hoffman, M. J. Janusz, H. O. Kim, J. R. Koehl, S. Mehdi, W. A.

- Metz, N. P. Peet, J. T. Pelton, H. A. Schreuder, S. Sunder, C. Tardif, *J. Med. Chem.* **1998**, *41*, 2461–2480.
- [91] P. R. Bernstein, D. Andisik, P. K. Bradley, C. B. Bryant, C. Ceccarelli, J. R. Damewood, Jr., 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. Woolson, *J. Med. Chem.* **1994**, *37*, 3313–3326.
- [92] M. B. Andrus, S. L. Schreiber, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 10420–10421.
- [93] P. S. Dragovich, J. E. Barker, J. French, M. Imbacuan, V. J. Kalish, C. R. Kissinger, D. R. Knighton, C. T. Lewis, E. W. Moomaw, H. E. Parge, L. A. Pelletier, T. J. Prins, R. E. Showalter, J. H. Tatlock, K. D. Tucker, J. E. Villafranca, *J. Med. Chem.* **1996**, *39*, 1872–1884.
- [94] T. Lubbers, P. Angehrn, H. Gmunder, S. Herzig, J. Kulhanek, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2000**, *10*, 821–826.
- [95] A. Tossi, I. Bonin, N. Antcheva, S. Norbedo, F. Benedetti, S. Miertus, A. C. Nair, T. Maliar, F. Dal Bello, G. Palu, D. Romeo, *Eur. J. Biochem.* **2000**, *267*, 1715–1722.
- [96] A. K. Ghosh, K. Krishnan, D. E. Walters, W. Cho, H. Cho, Y. Koo, J. Trevino, L. Holland, J. Buthod, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1998**, *8*, 979–982.
- [97] T. Y. Lee, V. D. Le, D. Y. Lim, Y. C. Lin, G. M. Morris, A. L. Wong, A. J. Olson, J. H. Elder, C. H. Wong, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 1145–1155.
- [98] H. I. Skulnick, P. D. Johnson, P. A. Aristoff, J. K. Morris, K. D. Lovasz, W. J. Howe, K. D. Watenpaugh, M. N. Janakiraman, D. J. Anderson, R. J. Reischer, T. M. Schwartz, L. S. Banitt, P. K. Tomich, J. C. Lynn, M.-M. Horng, K.-T. Chong, R. R. Hinshaw, L. A. Dolak, E. P. Seest, F. J. Schwende, B. D. Rush, G. M. Howard, L. N. Toth, K. R. Wilkinson, T. J. Kakuk, C. W. Johnson, S. L. Cole, R. M. Zaya, G. L. Zipp, P. L. Possert, R. J. Dalga, W.-Z. Zhong, M. G. Williams, K. R. Romines, *J. Med. Chem.* **1997**, *40*, 1149–1164.
- [99] G. V. DeLuca, S. Erickson Vitanen, P. Y. S. Lam, *Drug Discovery Today* **1997**, *2*, 6–18.
- [100] S. Thaisrivongs, D. L. Romero, R. A. Tommasi, M. N. Janakiraman, J. W. Strohbach, S. R. Turner, C. Biles, R. R. Morge, P. D. Johnson, P. A. Aristoff, P. K. Tomich, J. C. Lynn, M. M. Horng, K. T. Chong, R. R. Hinshaw, W. J. Howe, B. C. Finzel, K. D. Watenpaugh, *J. Med. Chem.* **1996**, *39*, 4630–4642.
- [101] S. H. Reich, M. Melnick, M. J. Pino, M. A. Fuhr, A. J. Trippe, K. Appelt, J. F. Davies II, B. W. Wu, L. Musick, *J. Med. Chem.* **1996**, *39*, 2781–2794.
- [102] M. D. Varney, K. Appelt, V. Kalish, M. R. Reddy, J. Tatlock, C. L. Palmer, W. H. Romines, B. W. Wu, L. Musick, *J. Med. Chem.* **1994**, *37*, 2274–2284.
- [103] M. A. Navia, R. D. Tung, P. R. Chaturvedi, B. G. Rao, J. A. Partaledis, E. E. Kim, *FASEB J.* **1996**, *10*, 2436.
- [104] H. M. Cheng, P. Keitz, J. B. Jones, *J. Org. Chem.* **1994**, *59*, 7671–7676.
- [105] 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.
- [106] M. S. Plummer, A. Shahripour, J. S. Kaltenbronn, E. A. Lunney, B. A. Steinbaugh, J. M. Hamby, H. W. Hamilton, T. K. Sawyer, C. Humblet, A. M. Doherty, M. D. Taylor, G. Hingorani, B. L. Batley, S. T. Rapundalo, *J. Med. Chem.* **1995**, *38*, 2893–2905.
- [107] J. Rahuel, V. Rasetti, J. Maibaum, H. Rueger, R. Goschke, N. C. Cohen, S. Stutz, F. Cumin, W. Fuhrer, J. M. Wood, M. G. Grutter, *Chem. Biol.* **2000**, *7*, 493–504.
- [108] B. A. Lefker, W. A. Hada, A. S. Wright, W. H. Martin, I. A. Stock, G. K. Schulte, J. Pandit, D. E. Danley, M. J. Ammirati, S. F. Sneddon, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1995**, *5*, 2623–2626.
- [109] A. B. Smith III, R. Akaishi, D. R. Jones, T. P. Keenan, M. C. Guzman, R. C. Holcomb, P. A. Sprengeler, J. L. Wood, R. Hirschmann, M. K. Holloway, *Biopolymers* **1995**, *37*, 29–53.
- [110] C. Mao, E. A. Sudbeck, T. K. Venkatachalam, F. M. Uckun, *Biochem. Pharmacol.* **2000**, *60*, 1251–1265.
- [111] R. Silvestri, M. Artico, G. De Martino, E. Novellino, G. Greco, A. Lavecchia, S. Massa, A. G. Loi, S. Doratiotto, P. La Colla, *Bioorg. Med. Chem.* **2000**, *8*, 2305–2309.
- [112] M. Artico, R. Silvestri, E. Pagnozzi, B. Bruno, E. Novellino, G. Greco, S. Massa, A. Ettorre, A. G. Loi, F. Scintu, P. La Colla, *J. Med. Chem.* **2000**, *43*, 1886–1891.
- [113] C. Mao, E. A. Sudbeck, T. K. Venkatachalam, F. M. Uckun, *Antiviral Chem. Chemother.* **1999**, *10*, 233–240.
- [114] E. A. Sudbeck, C. Mao, R. Vig, T. K. Venkatachalam, L. Tuel-Ahlgren, F. M. Uckun, *Antimicrob. Agents Chemother.* **1998**, *42*, 3225–3233.
- [115] R. Vig, C. Mao, T. K. Venkatachalam, L. Tuel-Ahlgren, E. A. Sudbeck, F. M. Uckun, *Bioorg. Med. Chem.* **1998**, *6*, 1789–1797.
- [116] I. Kang, J. H. Wang, *J. Biol. Chem.* **1994**, *269*, 12024–12031.
- [117] D. W. Zaharevitz, R. Gussio, A. Wiegand, R. Jalluri, N. Pattabiraman, G. E. Kellogg, L. A. Pallansch, S. S. Yang, R. W. Buckheit, *Med. Chem. Res.* **1999**, *9*, 551–564.
- [118] T. P. Kogan, B. Dupré, K. M. Keller, I. L. Scott, H. Bui, R. V. Market, P. J. Beck, J. A. Voytus, B. M. Revelle, D. Scott, *J. Med. Chem.* **1995**, *38*, 4976–4984.
- [119] C. M. Huwe, T. J. Woltering, J. Jiricek, G. Weitz-Schmidt, C. H. Wong, *Bioorg. Med. Chem.* **1999**, *7*, 773–788.
- [120] C. H. Wong, F. Moris-Varas, S.-C. Hung, T. G. Marron, C.-C. Lin, K. W. Gong, G. Weitz-Schmidt, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 8152–8158.
- [121] M. von Itzstein, P. Colman, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **1996**, *6*, 703–709.
- [122] M. von Itzstein, J. C. Dyason, S. W. Oliver, H. F. White, W.-Y. Wu, G. B. Kok, M. S. Pegg, *J. Med. Chem.* **1996**, *39*, 388–391.
- [123] J. C. Wilson, R. J. Thomson, J. C. Dyason, P. Florio, K. J. Quelch, S. Abo, M. von Itzstein, *Tetrahedron: Asymmetry* **2000**, *11*, 53–73.
- [124] N. R. Taylor, A. Cleasby, O. Singh, T. Skarzynski, A. J. Wonacott, P. W. Smith, S. L. Sollis, P. D. Howes, P. C. Cherry, R. Bethell, P. Colman, J. Varghese, *J. Med. Chem.* **1998**, *41*, 798–807.
- [125] P. W. Smith, S. L. Sollis, P. D. Howes, P. C. Cherry, I. D. Starkey, K. N. Cobley, H. Weston, J. Scicinski, A. Merritt, A. Whittington, P. Wyatt, N. Taylor, D. Green, R. Bethell, S. Madar, R. J. Fenton, P. J. Morley, T. Pateman, A. Beresford, *J. Med. Chem.* **1998**, *41*, 787–797.
- [126] G. Taylor, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **1996**, *6*, 830–837.
- [127] S. Singh, M. J. Jedrzejas, G. M. Air, M. Luo, W. G. Laver, W. J. Brouillette, *J. Med. Chem.* **1995**, *38*, 3217–3225.
- [128] W. Lew, X. Chen, C. U. Kim, *Curr. Med. Chem.* **2000**, *7*, 663–672.
- [129] V. R. Atigadda, W. J. Brouillette, F. Duarte, Y. S. Babu, S. Bantia, P. Chand, N. Chu, J. A. Montgomery, D. A. Walsh, E. Sudbeck, J. Finley, G. M. Air, M. Luo, G. W. Laver, *Bioorg. Med. Chem.* **1999**, *7*, 2487–2497.
- [130] J. B. Finley, V. R. Atigadda, F. Duarte, J. J. Zhao, W. J. Brouillette, G. M. Air, M. Luo, *J. Mol. Biol.* **1999**, *293*, 1107–1119.
- [131] J. N. Varghese, P. W. Smith, S. L. Sollis, T. J. Blick, A. Sahasrabudhe, J. L. McKimm-Breschkin, P. M. Colman, *Structure* **1998**, *6*, 735–746.
- [132] C. U. Kim, W. Lew, M. A. Williams, H. T. Liu, L. J. Zhang, S. Swaminathan, N. Bischofberger, M. S. Chen, D. B. Mendel, C. Y. Tai, W. G. Laver, R. C. Stevens, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 681–690.
- [133] B. A. Katz, C. R. Johnson, R. T. Cass, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 8541–8547.
- [134] P. C. Weber, M. W. Pantoliano, D. M. Simons, F. R. Salemme, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 2717–2727.
- [135] B. A. Katz, *Biomol. Eng.* **1999**, *16*, 57–65.
- [136] B. A. Katz, B. Liu, R. Cass, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 7914–7920.
- [137] B. P. Morgan, D. R. Holland, B. W. Matthews, P. A. Bartlett, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 3251–3260.
- [138] K. Hilpert, J. Ackermann, D. W. Banner, A. Gast, K. Gubernator, P. Hadvary, L. Labler, K. Müller, G. Schmid, T. B. Tschopp, H. van de Waterbeemd, *J. Med. Chem.* **1994**, *37*, 3889–3901.
- [139] J. J. Slon-Usakiewicz, J. Sivaraman, Y. Li, M. Cygler, Y. Konishi, *Biochemistry* **2000**, *39*, 2384–2391.
- [140] S. Hanessian, E. Balaux, D. Musil, L. L. Olsson, I. Nilsson, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2000**, *10*, 243–247.
- [141] M. Li, Z. Lin, M. E. Johnson, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1999**, *9*, 1957–1962.
- [142] H. J. Böhm, D. W. Banner, L. Weber, *J. Comput. Aided Mol. Des.* **1999**, *13*, 51–56.
- [143] J. Wagner, J. Kallen, C. Ehrhardt, J. P. Evenou, D. Wagner, *J. Med. Chem.* **1998**, *41*, 3664–3674.
- [144] P. Burkhard, P. Taylor, M. D. Walkinshaw, *J. Mol. Biol.* **1998**, *277*, 449–466.
- [145] U. Obst, D. W. Banner, L. Weber, F. Diederich, *Chem. Biol.* **1997**, *4*, 287–295.

- [146] B. Shoichet, R. Stroud, D. Santi, I. Kuntz, K. Perry, *Science* **1993**, 259, 1445–1450.
- [147] *The Practice of Medicinal Chemistry* (Hrsg.: C. G. Wermuth), Academic Press, London, **1996**.
- [148] J. P. Vacca, J. H. Condra, *Drug Discovery Today* **1997**, 2, 261–272.
- [149] P. Wutzler, *Infection* **2000**, 28, 261–266.
- [150] *3D QSAR in Drug Design: Theory, Methods and Applications* (Hrsg.: H. Kubinyi), Escom, Leiden, **1993**.
- [151] *3D QSAR in Drug Design: Recent Advances* (Hrsg.: H. Kubinyi, G. Folkers, Y. C. Martin), Kluwer/Escom, Leiden, **1997**.
- [152] T. I. Oprea, C. L. Waller, *Rev. Comput. Chem.* **1997**, 11, 127–182.
- [153] G. Greco, E. Novellino, Y. C. Martin, *Rev. Comput. Chem.* **1997**, 11, 183–240.
- [154] *Chemometric Methods in Molecular Design, Vol. 2* (Hrsg.: H. van de Waterbeemd), Wiley-VCH, Weinheim, **1995**.
- [155] Y. C. Martin in *Designing Bioactive Molecules* (Hrsg.: Y. C. Martin, P. Willett, S. R. Heller), American Chemical Society, Washington, **1999**.
- [156] D. P. Marriot, I. A. Dougall, P. Meghani, Y. Liu, D. R. Flower, *J. Med. Chem.* **1999**, 42, 3210–3216.
- [157] J. P. Snyder, S. N. Rao, K. F. Koehler, A. Vedani in *3D QSAR in Drug Design. Theory, Methods and Applications* (Hrsg.: H. Kubinyi), Escom, Leiden, **1993**, S. 336–354.
- [158] A. Vedani, P. Zbinden, J. P. Snyder, P. A. Greenidge, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, 117, 4987–4994.
- [159] M. Gurrath, G. Müller, H.-D. Höltje in *3D QSAR in Drug Design. Recent Advances* (Hrsg.: H. Kubinyi, G. Folkers, Y. C. Martin), Kluwer/Escom, Dordrecht, **1998**, S. 135–157.
- [160] A. Schafferhans, G. Klebe, *J. Mol. Biol.* **2001**, 307, 407–427.
- [161] M. S. Doscher, F. M. Richards, *J. Biol. Chem.* **1963**, 238, 2399–2406.
- [162] C. C. F. Blake, R. Cassels, C. M. Dobson, F. M. Poulsen, R. J. P. Williams, K. S. Wilson, *J. Mol. Biol.* **1981**, 147, 73–95.
- [163] A. T. Brünger, *Nat. Struct. Biol.* **1997**, 4 (*NMR Suppl.*), 862–865.
- [164] A. L. Margolin, *Trends Biotechnol.* **1996**, 14, 223–230.
- [165] A. Mozzarelli, G. L. Rossi, *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **1996**, 25, 343–365.
- [166] A. L. Margolin, M. A. Navia, *Angew. Chem.* **2001**, 113, 2262–2281; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, 40, 2205–2222.
- [167] M. A. Murcko, *Rev. Comput. Chem.* **1997**, 11, 1–66.
- [168] D. E. Clark, C. W. Murray, J. Li, *Rev. Comput. Chem.* **1997**, 11, 67–125.
- [169] T. Lengauer, M. Rarey, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **1996**, 6, 402–406.
- [170] H. J. Böhm, M. Stahl, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2000**, 4, 283–286.
- [171] G. M. Verkhivker, D. Bouzida, D. K. Gehlhaar, P. A. Rejto, S. Arthurs, A. B. Colson, S. T. Freer, V. Larson, B. A. Luty, T. Marrone, P. W. Rose, *J. Comput. Aided Mol. Des.* **2000**, 14, 731–751.
- [172] J. S. Dixon, *Proteins* **1997**, Suppl. 1, 198–204.
- [173] Ajay, M. A. Murcko, *J. Med. Chem.* **1995**, 38, 4953–4967.
- [174] R. M. A. Knegtel, P. D. J. Grootenhuis in *3D QSAR in Drug Design. Ligand Protein Interactions and Molecular Similarity* (Hrsg.: H. Kubinyi, G. Folkers, Y. C. Martin), Kluwer/Escom, Dordrecht, **1998**, S. 99–114.
- [175] T. I. Oprea, G. R. Marshall in *3D QSAR in Drug Design. Ligand Protein Interactions and Molecular Similarity* (Hrsg.: H. Kubinyi, G. Folkers, Y. C. Martin), Kluwer/Escom, Dordrecht, **1998**, S. 3–17.
- [176] B. Kramer, M. Rarey, T. Lengauer, *Proteins* **1999**, 37, 145–156.
- [177] H. A. Carlson, J. A. McCammon, *Mol. Pharmacol.* **2000**, 57, 213–218.
- [178] N. E. Chayen, T. J. Boggon, A. Casetta, A. Deacon, T. Gleichmann, J. Habash, S. J. Harrop, J. R. Hellwell, Y. P. Nieh, M. R. Peterson, J. Raftery, E. H. Snell, A. Hädener, A. C. Niemann, D. P. Siddons, V. Stojanoff, A. W. Thompson, T. Ursby, M. Wulff, *Q. Rev. Biophys.* **1996**, 29, 227–278.
- [179] R. W. W. Hooft, C. Sander, G. Vriend, *Proteins* **1996**, 26, 363–376.
- [180] J. E. Nielsen, G. Vriend, *Proteins* **2001**, 43, 403–412.
- [181] S. Longhi, M. Czjzek, C. Cambillau, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **1998**, 8, 730–737.
- [182] R. Flraig, T. Koritsanszky, R. Soyka, L. Häming, P. Luger, *Angew. Chem.* **2001**, 113, 368–371; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, 40, 355–359.
- [183] A. A. Kossiakoff, M. Randal, J. Guenot, C. Eigenbrot, *Proteins* **1992**, 14, 65–74.
- [184] A. Wlodawer, J. Nachman, G. L. Gilliland, W. Gallagher, C. J. Woodward, *J. Mol. Biol.* **1987**, 198, 469–480.
- [185] P. Dauber-Osguthorpe, V. A. Roberts, D. J. Osguthorpe, J. Wolff, M. Genest, A. T. Hagler, *Proteins* **1988**, 4, 31–47.
- [186] M. Levitt, B. H. Park, *Structure* **1993**, 1, 223–226.
- [187] O. Carugo, D. Bordo, *Acta Crystallogr. Sect. D* **1999**, 55, 479–483.
- [188] P. A. Karplus, C. Caerman, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **1994**, 4, 770–776.
- [189] T. Beyer, G. M. Day, S. L. Price, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, 123, 5086–5094.
- [190] J. Bernstein, *Prog. Clin. Biol. Res.* **1989**, 289, 203–215.
- [191] P. Verwer, F. J. J. Leusen, *Rev. Comput. Chem.* **1998**, 12, 327–365.
- [192] J. D. Dunitz, J. Bernstein, *Acc. Chem. Res.* **1995**, 28, 193–200.
- [193] J. M. Lehn, *Angew. Chem.* **1988**, 100, 91–116; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1988**, 27, 89–112.
- [194] H.-J. Böhm, G. Klebe, *Angew. Chem.* **1996**, 108, 2750–2778; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1996**, 35, 2589–2614.
- [195] G. Klebe, H.-J. Böhm, *Period. Biol.* **1998**, 100 (Suppl. 2), 77–83.
- [196] E. di Cera, *Thermodynamic Theory of Site-Specific Binding Processes in Biological Macromolecules*, Cambridge University Press, Cambridge, **1995**.
- [197] *Drug-Receptor Thermodynamics: Introduction and Applications* (Hrsg.: R. B. Raffa), Wiley, Chichester, **2001**.
- [198] M. K. Gilson, J. A. Given, B. L. Bush, J. A. McCammon, *Biophys. J.* **1997**, 72, 1047–1069.
- [199] A. M. Davis, S. J. Teague, *Angew. Chem.* **1999**, 111, 778–792; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, 38, 737–749.
- [200] I. D. Kuntz, K. Chen, K. A. Sharp, P. A. Kollman, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1999**, 96, 9997–10002.
- [201] A. Fersht, *Enzyme Structure and Mechanism*, Freeman, New York, **1985**.
- [202] P. M. Dean, *Molecular Foundations of Drug-Receptor Interaction*, Cambridge University Press, Cambridge, **1987**.
- [203] P. R. Andrews, D. J. Craik, J. L. Martin, *J. Med. Chem.* **1984**, 27, 1648–1657.
- [204] J. D. Dunitz, A. Gavezotti, *Acc. Chem. Res.* **1999**, 32, 677–684.
- [205] G. A. Jeffrey, W. Saenger, *Hydrogen Bonding in Biological Structures*, Springer, Berlin, **1991**.
- [206] G. A. Jeffrey, *An Introduction to Hydrogen Bonding*, Oxford University Press, New York, **1997**.
- [207] L. Pauling, R. B. Corey, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1951**, 37, 729–740.
- [208] K. P. Murphy, S. J. Gill, *J. Mol. Biol.* **1991**, 222, 699–706.
- [209] A. Yang, K. A. Sharp, B. Honig, *J. Mol. Biol.* **1992**, 227, 889–900.
- [210] A. R. Fersht, *Trends Biochem. Sci.* **1987**, 12, 301–304.
- [211] Q. Zou, S. M. Habermann-Röttinghaus, K. P. Murphy, *Proteins* **1998**, 31, 107–115.
- [212] H. Adalsteinsson, A. H. Maulitz, T. C. Bruice, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, 118, 7689–7693.
- [213] T. Steiner, W. Saenger, *Acta Crystallogr. Sect. B* **1994**, 50, 348–357.
- [214] Z. Wang, H. Luecke, Y. Nanhua, F. Quiocco, *Nat. Struct. Biol.* **1997**, 4, 519–522.
- [215] A. Warshel, A. Papazyan, P. A. Kollman, *Science* **1995**, 269, 102–104.
- [216] B. Honig, A. Nicholls, *Science* **1995**, 268, 1144–1149.
- [217] T. Simonson, G. Archontis, M. Karplus, *J. Phys. Chem. B* **1999**, 103, 6142–6156.
- [218] H. Nakamura, *Q. Rev. Biophys.* **1996**, 29, 1–90.
- [219] W. Rocchia, E. Alexov, B. Honig, *J. Phys. Chem. B* **2001**, 105, 6507–6514.
- [220] M. Stahl, H.-J. Böhm, *J. Mol. Graphics Modell.* **1998**, 16, 121–132.
- [221] C. Beeson, N. Pham, G. Shipps, T. A. Dix, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, 115, 6803–6812.
- [222] I. K. McDonald, J. M. Thornton, *J. Mol. Biol.* **1994**, 238, 777–793.
- [223] P. R. Connelly, R. A. Aldape, F. J. Buzzese, 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.
- [224] D. Grobelny, U. B. Goli, R. E. Galardy, *Biochemistry* **1989**, 28, 4948–4951.
- [225] P. A. Bash, U. C. Singh, F. K. Brown, R. Langridge, P. A. Kollman, *Science* **1987**, 235, 574–576.
- [226] A. R. Fersht, J. S. Shindler, W. C. Tsui, *Biochemistry* **1980**, 19, 5520–5524.

- [227] R. M. C. Dawson, D. C. Elliott, W. H. Elliott, K. M. Jones, *Data for Biochemical Research*, Oxford University Press, Oxford, 1969.
- [228] J. Antosiewicz, J. A. McCammon, M. K. Gilson, *Biochemistry* **1996**, 35, 7819–7833.
- [229] M. Graffner-Nordberg, J. Marelius, S. Ohlsson, A. Persson, G. Swedberg, P. Andersson, S. E. Andersson, J. Åqvist, A. Hallberg, *J. Med. Chem.* **2000**, 43, 3852–3861.
- [230] X. Barril, C. Aleman, M. Orozco, F. J. Luque, *Proteins* **1998**, 32, 67–79.
- [231] 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.
- [232] S. M. Habermann, K. P. Murphy, *Protein Sci.* **1996**, 5, 1229–1239.
- [233] K. A. Dill, *Biochemistry* **1990**, 29, 7133–7155.
- [234] J. S. Thorson, E. Chapman, E. C. Murphy, P. G. Schultz, J. K. Judice, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, 117, 1157–1158.
- [235] J. Fernandez-Recio, A. Romero, J. Sancho, *J. Mol. Biol.* **1999**, 290, 319–330.
- [236] M. A. Hossain, H.-J. Schneider, *Chem. Eur. J.* **1999**, 5, 1284–1290.
- [237] D. E. Otzen, A. R. Fersht, *Protein Eng.* **1999**, 12, 41–45.
- [238] J. Gao, K. Kuczera, B. Tidor, M. Karplus, *Science* **1989**, 244, 1069–1072.
- [239] A. J. Doig, D. H. Williams, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, 114, 338–343.
- [240] M. S. Searle, D. H. Williams, U. Gerhard, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, 114, 10697–10704.
- [241] D. H. Williams, M. S. Searle, J. P. Mackay, U. Gerhard, R. A. Maplestone, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1993**, 90, 1172–1178.
- [242] D. H. Williams, M. S. Westwell, *Chem. Soc. Rev.* **1998**, 27, 57–63.
- [243] M. S. Gordon, J. H. Jensen, *Acc. Chem. Res.* **1996**, 29, 536–543.
- [244] G. Klebe, *J. Mol. Biol.* **1994**, 237, 212–235.
- [245] F. H. Allen, *Acta Crystallogr. Sect. A* **1998**, 54, 758–771.
- [246] J. Kroon, J. A. Kanters, J. G. C. M. van Duijneveldt-van de Rijdt, F. B. van Duijneveldt, J. A. Vliegenhardt, *J. Mol. Struct.* **1975**, 24, 109–129.
- [247] P. Murray-Rust, J. P. Glusker, *J. Am. Chem. Soc.* **1984**, 106, 1018–1025.
- [248] M. Tintelnot, P. Andrews, *J. Comput. Aided Mol. Des.* **1989**, 3, 67–84.
- [249] S. M. Roe, M. M. Teeter, *J. Mol. Biol.* **1993**, 229, 419–427.
- [250] I. J. Bruno, J. C. Cole, J. P. Lommerse, R. S. Rowland, R. Taylor, M. L. Verdonk, *J. Comput. Aided Mol. Des.* **1997**, 11, 525–537.
- [251] J. C. Cole, R. Taylor, M. L. Verdonk, *Acta Crystallogr. Sect. D* **1998**, 54, 1183–1193.
- [252] R. Taylor, O. Kennard, *J. Am. Chem. Soc.* **1982**, 104, 5063–5070.
- [253] S. Harder, *Chem. Eur. J.* **1999**, 5, 1852–1861.
- [254] G. R. Desiraju, *Acc. Chem. Res.* **1996**, 29, 441–449.
- [255] S. Tsuzuki, K. Honda, T. Uchimaru, M. Mikami, K. Tanabe, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, 122, 11450–11458.
- [256] M. Brandl, M. S. Weiss, A. Jabs, J. Sühnel, R. Hilgenfeld, *J. Mol. Biol.* **2001**, 307, 357–377.
- [257] C. A. Hunter, J. K. M. Sanders, *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, 112, 5525–5534.
- [258] S. K. Burley, G. A. Petsko, *Science* **1985**, 229, 23–28.
- [259] U. Samanta, D. Pal, P. Charkrabarti, *Acta Crystallogr. Sect. D* **1999**, 55, 1421–1427.
- [260] C. A. Hunter, J. Singh, J. M. Thornton, *J. Mol. Biol.* **1991**, 218, 837–846.
- [261] G. B. McGaughey, M. Gagné, A. K. Rappé, *J. Biol. Chem.* **1998**, 273, 15458–15463.
- [262] D. A. Dougherty, *Science* **1996**, 271, 163–168.
- [263] J. C. Ma, D. A. Dougherty, *Chem. Rev.* **1997**, 97, 1303–1324.
- [264] E. V. Pletneva, A. T. Laederach, D. B. Fulton, N. M. Kostic, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, 123, 6232–6245.
- [265] J. D. Schmitt, *Curr. Med. Chem.* **2000**, 7, 749–800.
- [266] K. Brejc, W. J. van Dijk, R. V. Klaasen, M. Schuurmans, J. van der Oost, A. B. Smit, T. K. Sixma, *Nature* **2001**, 411, 269–276.
- [267] J. P. Gallivan, D. A. Dougherty, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, 122, 870–874.
- [268] M. M. Harding, *Acta Crystallogr. Sect. D* **1999**, 55, 1432–1443.
- [269] M. M. Harding, *Acta Crystallogr. Sect. D* **2000**, 56, 857–867.
- [270] C.-Y. Kim, J. S. Chang, J. B. Doyon, T. T. Baird, C. A. Fierke, A. Jain, D. W. Christianson, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, 122, 12125–12134.
- [271] R. U. Lemieux, *Acc. Chem. Res.* **1996**, 29, 373–380.
- [272] J. Israelachvili, H. Wennerstrom, *Nature* **1996**, 379, 219–225.
- [273] D. G. Covell, A. Wallqvist, *J. Mol. Biol.* **1997**, 269, 281–297.
- [274] C. S. Poornima, P. M. Dean, *J. Comput. Aided Mol. Des.* **1995**, 9, 500–512.
- [275] H. Wang, A. Ben-Naim, *J. Med. Chem.* **1996**, 39, 1531–1539.
- [276] A. Ben-Naim, *Statistical Thermodynamics for Chemists and Biochemists*, Plenum, New York, 1992.
- [277] J. E. Ladbury, *Chem. Biol.* **1996**, 3, 973–980.
- [278] J. D. Dunitz, *Science* **1994**, 264, 670.
- [279] *Structural-Based Drug Design: Thermodynamics, Modeling and Strategy* (Hrsg.: P. R. Connolly), Landes, Austin, 1997.
- [280] C. S. Poornima, P. M. Dean, *J. Comput. Aided Mol. Des.* **1995**, 9, 513–520.
- [281] L. A. Kuhn, M. A. Siani, M. E. Pique, C. L. Fisher, E. D. Getzoff, J. A. Trainer, *J. Mol. Biol.* **1992**, 228, 13–22.
- [282] J. R. H. Tame, A. J. Wilkinson, *Science* **1994**, 264, 1578–1581.
- [283] J. R. H. Tame, S. H. Sleigh, A. J. Wilkinson, J. E. Ladbury, *Nat. Struct. Biol.* **1996**, 3, 998–1001.
- [284] C. S. Poornima, P. M. Dean, *J. Comput. Aided Mol. Des.* **1995**, 9, 521–531.
- [285] M. L. Raymer, P. C. Sanschagrin, W. F. Punch, S. Venkataraman, E. D. Goodman, L. A. Kuhn, *J. Mol. Biol.* **1997**, 265, 445–464.
- [286] D. Ringe, C. Mattos, *Med. Res. Rev.* **1999**, 19, 321–331.
- [287] *Water, a Comprehensive Treatise*, Vol. 1–7 (Hrsg.: F. Franks), Plenum, New York, 1972–1982.
- [288] D. Eisenberg, W. Kauzmann, *The Structure and Properties of Water*, Oxford University Press, Oxford, 1969.
- [289] R. Ludwig, *Angew. Chem.* **2001**, 113, 1856–1876; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, 40, 1809–1827.
- [290] M. Page, *Angew. Chem.* **1977**, 89, 456–467; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1977**, 16, 449–459.
- [291] W. P. Jencks, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1981**, 78, 4046–4050.
- [292] M. S. Searle, D. H. Williams, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, 114, 10690–10697.
- [293] E. Grunwald, C. Steel, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, 117, 5687–5692.
- [294] C. Tanford, *The Hydrophobic Effect: Formation of Micelles and Biological Membranes*, Wiley, New York, 1980.
- [295] A. Ben-Naim, *Hydrophobic Interactions*, Plenum, New York, 1980.
- [296] A. Ben-Naim, *Solvation Thermodynamics*, Plenum, New York, 1987.
- [297] K. A. T. Silverstein, A. D. J. Haymet, K. A. Dill, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, 120, 3166–3175.
- [298] W. Blokzijl, J. B. F. N. Engberts, *Angew. Chem.* **1993**, 105, 1610–1648; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1993**, 32, 1545–1579.
- [299] H. S. Frank, M. W. Evans, *J. Chem. Phys.* **1945**, 13, 507.
- [300] G. Nemethy, H. A. Scheraga, *J. Chem. Phys.* **1962**, 36, 3401.
- [301] K. A. T. Silverstein, A. D. J. Haymet, K. A. Dill, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, 122, 8037–8041.
- [302] N. Muller, *Acc. Chem. Res.* **1990**, 23, 23–28.
- [303] A. Pertsemlidis, A. M. Saxena, A. K. Soper, T. Head-Gordon, R. M. Glaser, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1996**, 93, 10769.
- [304] K. E. Laidig, V. Daggett, *J. Phys. Chem.* **1996**, 100, 5616–5619.
- [305] L. F. Scatena, M. G. Brown, G. L. Richmond, *Science* **2001**, 292, 908–912.
- [306] R. L. Mancera, *J. Comput. Aided Mol. Des.* **1996**, 10, 321–326.
- [307] K. P. Murphy, P. L. Privalov, S. J. Gill, *Science* **1990**, 247, 559.
- [308] M. C. Chervenak, E. J. Toone, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, 116, 10533–10539.
- [309] C. Chothia, *Nature* **1974**, 248, 338–339.
- [310] C. Chothia, J. Janin, *Nature* **1975**, 256, 705–708.
- [311] T. Ooi, M. Oobatake, G. Nemethy, H. A. Scheraga, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1987**, 84, 3086–3090.
- [312] D. Eisenberg, A. D. McLachlan, *Nature* **1986**, 319, 199–203.
- [313] C. N. Pace, *J. Mol. Biol.* **1992**, 226, 29–35.
- [314] J. Wang, W. Wang, S. Huo, M. Lee, P. A. Kollman, *J. Phys. Chem. B* **2001**, 105, 5055–5067.
- [315] D. H. Williams, B. Bardsley, *Perspect. Drug Discovery Des.* **1999**, 17, 43–59.
- [316] P. Carrupt, B. Testa, P. Gaillard, *Rev. Comput. Chem.* **1997**, 11, 241–315.
- [317] J. A. Reynolds, D. B. Gilbert, C. Tanford, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1974**, 71, 2925–2927.
- [318] R. B. Hermann, *J. Phys. Chem.* **1972**, 76, 2754.

- [319] A. Nicholls, K. A. Sharp, B. Honig, *Proteins* **1991**, *11*, 281–296.
- [320] P. D. Ross, M. V. Rekharsky, *Biophys. J.* **1996**, *71*, 2144–2155.
- [321] L. Serrano, J.-L. Neira, J. Sancho, A. R. Fersht, *Nature* **1992**, *356*, 453–455.
- [322] J. T. Kellis, K. Nyberg, A. R. Fersht, *Biochemistry* **1989**, *28*, 4914–4922.
- [323] D. Shortle, W. E. Stites, A. K. Meeker, *Biochemistry* **1990**, *29*, 8033–8041.
- [324] M. Matsumura, W. J. Becktel, B. W. Matthews, *Nature* **1988**, *334*, 406–410.
- [325] G. J. Sharman, M. S. Searle, B. Benhamu, P. Groves, D. H. Williams, *Angew. Chem.* **1995**, *107*, 1644–1646; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1995**, *34*, 1483–1485.
- [326] D. M. Huang, D. Chandler, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2000**, *97*, 8324–8327.
- [327] M. Vandonselaar, R. A. Hickie, J. W. Quail, L. T. J. Delbaere, *Nat. Struct. Biol.* **1994**, *1*, 795–801.
- [328] H. P. Märki, W. Fischli, A. Binggeli, V. Breu, D. Bur, J. P. Clozel, A. D'Arcy, F. Grüninger, R. Güller, G. Hirth, T. Lave, S. Mathews, M. Müller, C. Oefner, H. Stadler, E. Vieira, M. Wilhelm, W. Wostl, *9th RSC-SCI Medicinal Chemistry Symposium* (Cambridge, UK), **1997**.
- [329] A. Urzhumtsev, F. Tete-Favier, A. Mitschler, J. Barbanton, P. Barth, L. Urzhumtseva, J. F. Biellmann, A. Podjarny, D. Moras, *Structure* **1997**, *5*, 601–612.
- [330] S. E. Zographos, N. G. Oikonomakos, K. E. Tsitsanou, D. D. Leonidas, E. D. Chrysina, V. T. Skamnaki, H. Bischoff, S. Goldmann, K. A. Watson, L. N. Johnson, *Structure* **1997**, *5*, 1413–1425.
- [331] J. Ren, R. Esnouf, E. Garman, D. Somers, C. Ross, I. Kirby, J. Keeling, G. Dardy, Y. Jones, D. Stuart, D. Stammers, *Nat. Struct. Biol.* **1995**, *2*, 293–302.
- [332] G. P. Brady, K. A. Sharp, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **1997**, *7*, 215–221.
- [333] M. I. Page, W. P. Jencks, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1971**, *68*, 1678–1683.
- [334] M. I. Page, *Chem. Soc. Rev.* **1973**, *2*, 295–323.
- [335] J. M. Sturtevant, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1977**, *74*, 2236–2240.
- [336] J. D. Dunitz, *Chem. Biol.* **1995**, *2*, 709–712.
- [337] P. W. Atkins, *Physikalische Chemie*, VCH, Weinheim, **1990**.
- [338] K. P. Murphy, D. Xie, K. Thompson, M. Arnel, E. Freire, *Proteins* **1994**, *18*, 63–67.
- [339] J. Janin, *Proteins* **1996**, *24*, R1–R2.
- [340] J. Janin, *Proteins* **1995**, *21*, 30–39.
- [341] J. Doucet, J. P. Benoit, *Nature* **1987**, *325*, 643.
- [342] D. L. Caspar, J. Clarage, D. M. Salunke, M. Clarage, *Nature* **1988**, *332*, 659–662.
- [343] A. V. Finkelstein, J. Janin, *Protein Eng.* **1989**, *3*, 1–3.
- [344] G. P. Brady, K. A. Sharp, *Biophys. J.* **1997**, *72*, 913–927.
- [345] J. Hermans, L. Wang, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 2707–2714.
- [346] S. D. Pickett, M. J. Sternberg, *J. Mol. Biol.* **1993**, *231*, 825–839.
- [347] A. J. Doig, M. J. E. Sternberg, *Protein Sci.* **1995**, *4*, 2247–2251.
- [348] J. D. Forman-Kay, *Nat. Struct. Biol.* **1999**, *6*, 1086–1087.
- [349] R. Raag, T. L. Poulos, *Biochemistry* **1991**, *30*, 2674–2684.
- [350] L. Yu, C. X. Zhu, Y. C. Tse-Dinh, S. W. Fesik, *Biochemistry* **1996**, *35*, 9661–9666.
- [351] L. Zidek, M. V. Novotny, M. J. Stone, *Nat. Struct. Biol.* **1999**, *6*, 1118–1121.
- [352] P. C. Weber, J. J. Wendoloski, M. W. Pantoliano, F. R. Salemme, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 3197–3200.
- [353] M. S. L. Lim, E. R. Johnston, C. A. Kettner, *J. Med. Chem.* **1993**, *36*, 1831–1838.
- [354] R. A. Wiley, D. H. Rich, *Med. Res. Rev.* **1993**, *13*, 327–384.
- [355] B. Testa, P. A. Carrupt, P. Gaillard, F. Billois, P. Weber, *Pharm. Res.* **1996**, *13*, 335–343.
- [356] M. A. Navia, P. R. Chaturvedi, *Drug Discovery Today* **1996**, *1*, 179–189.
- [357] M. C. Nicklaus, S. Wang, J. S. Driscoll, G. W. A. Milne, *Bioorg. Med. Chem.* **1995**, *3*, 411–428.
- [358] M. J. Spark, D. A. Winkler, P. R. Andrews, *Int. J. Quantum Chem.* **1982**, *9*, 321.
- [359] J. Bostrom, P. O. Norrby, T. Liljefors, *J. Comput. Aided Mol. Des.* **1998**, *12*, 383–396.
- [360] M. Vieth, J. D. Hirst, C. L. Brooks III, *J. Comput. Aided Mol. Des.* **1998**, *12*, 563–572.
- [361] D. Mastropaoletti, A. Camerman, N. Camerman, *J. Med. Chem.* **2001**, *44*, 269–273.
- [362] T. A. Halgren, W. Damm, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2001**, *11*, 236–242.
- [363] W. F. Lau, B. M. Pettitt, *J. Med. Chem.* **1989**, *32*, 2542–2547.
- [364] A. E. Mark, W. F. van Gunsteren, *J. Mol. Biol.* **1994**, *240*, 167–176.
- [365] A. Ben-Naim, *J. Chem. Phys.* **1997**, *107*, 3698–3706.
- [366] G. F. Ackers, F. R. Smith, *Annu. Rev. Biochem.* **1985**, *54*, 597–629.
- [367] A. Horovitz, *J. Mol. Biol.* **1987**, *196*, 733–735.
- [368] J. A. Wells, *Biochemistry* **1990**, *29*, 8509–8515.
- [369] K. A. Dill, *J. Biol. Chem.* **1997**, *272*, 701–704.
- [370] G. P. Brady, K. A. Sharp, *J. Mol. Biol.* **1995**, *254*, 77–85.
- [371] G. K. Ackers, M. L. Doyle, D. Myers, M. A. Daugherty, *Science* **1992**, *255*, 54–63.
- [372] D. H. Williams, A. J. Maguire, W. Tsuzuki, M. S. Westwell, *Science* **1998**, *280*, 711–714.
- [373] T. Wieseman, S. Wiliston, J. Brandts, L. Lin, *Anal. Biochem.* **1989**, *179*, 131–137.
- [374] R. Hitzemann, *Trends Pharmacol. Sci.* **1988**, *9*, 408.
- [375] A. F. D. de Namor, M.-C. Ritt, M.-J. Schwing-Weill, F. Arnaud-Neu, D. F. V. Lewis, *J. Chem. Soc. Faraday Trans.* **1991**, *87*, 3231–3239.
- [376] P. Gilli, V. Ferretti, G. Gilli, P. A. Borea, *J. Phys. Chem.* **1994**, *98*, 1515–1518.
- [377] C. T. Calderone, D. H. Williams, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 6262–6267.
- [378] E. Gallicchio, M. M. Kubo, R. M. Levy, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 4526–4527.
- [379] K. Sharp, *Protein Sci.* **2001**, *10*, 661–667.
- [380] G. Klebe in *Rational Molecular Design in Drug Research* (Hrsg.: T. Liljefors, F. S. Jorgensen, P. Krogsgaard-Larsen), Munksgaard, Copenhagen, **1998**, S. 151–160.
- [381] H. Kubinyi, *Drug Discovery Today* **1997**, *2*, 457–467.
- [382] K. H. Kim, G. Greco, E. Novellino, *Perspect. Drug Discovery Des.* **1998**, *12*, 257–315.
- [383] M. Gurrath, *Curr. Med. Chem.* **2001**, *8*, 1605–1648.
- [384] S. Halazy, *Expert Opin. Ther. Pat.* **1999**, *9*, 431–446.
- [385] B. Fontaine, E. Plassart-Schiess, S. Nicole, *Mol. Aspects Med.* **1997**, *18*, 415–463.
- [386] S. J. Oh, H. J. Ha, D. Y. Chi, H. K. Lee, *Curr. Med. Chem.* **2001**, *8*, 999–1034.
- [387] P. Schloss, D. C. Williams, *J. Psychopharmacol.* **1998**, *12*, 115–121.
- [388] R. J. Vandenberg, *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* **1998**, *25*, 393–400.
- [389] J. A. McCammon, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **1998**, *8*, 245–249.
- [390] J. R. H. Tame, *J. Comput. Aided Mol. Des.* **1999**, *13*, 99–108.
- [391] M. R. Reddy, V. N. Viswanadhan, M. D. Erion in *3D QSAR in Drug Design: Ligand Protein Interactions and Molecular Similarity* (Hrsg.: H. Kubinyi, G. Folkers, Y. C. Martin), Kluwer/Escom, Leiden, **1998**, S. 85–98.
- [392] J. D. Hirst, *Curr. Opin. Drug Discovery Dev.* **1998**, *1*, 28–33.
- [393] P. A. Kollman, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **1994**, *4*, 240–245.
- [394] H. Gohlke, G. Klebe, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2001**, *11*, 231–235.
- [395] R. D. Brown, Y. C. Martin, *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* **1996**, *36*, 572–584.
- [396] C. Humbert, J. B. Dunbar, *Annu. Rep. Med. Chem.* **1993**, *28*, 275–284.
- [397] P. Willett, *J. Mol. Recognit.* **1995**, *8*, 290–303.
- [398] G. Klebe in *3D QSAR in Drug Design. Theory, Methods and Applications* (Hrsg.: H. Kubinyi), Escom, Leiden, **1993**, S. 173–199.
- [399] M. G. Bures in *Practical Application of Computer-Aided Drug Design* (Hrsg.: P. S. Charifson), Marcel Dekker, New York, **1997**, S. 39–72.
- [400] C. Lemmen, T. Lengauer, *J. Comput. Aided Mol. Des.* **2000**, *14*, 215–232.
- [401] C. Hansch, T. Fujita, *J. Am. Chem. Soc.* **1964**, *86*, 1616–1626.
- [402] S. M. Free, J. W. Wilson, *J. Med. Chem.* **1964**, *7*, 395–399.
- [403] K. H. Kim in *3D QSAR in Drug Design. Theory, Methods and Applications* (Hrsg.: H. Kubinyi), Escom, Leiden, **1993**, S. 619–642.
- [404] G. Greco, E. Novellino, Y. C. Martin in *Designing Bioactive Molecules* (Hrsg.: Y. C. Martin, P. Willett, S. R. Heller), American Chemical Society, Washington, **1998**, S. 219–251.
- [405] R. D. Cramer III, D. E. Patterson, J. D. Bunce, *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, *110*, 5959.

- [406] C. L. Waller, T. I. Oprea, A. Giolitti, G. R. Marshall, *J. Med. Chem.* **1993**, *36*, 4152.
- [407] A. Golbraikh, P. Bernard, J. R. Chrétien, *Eur. J. Med. Chem.* **2000**, *35*, 123–136.
- [408] G. R. Marshall, C. D. Barry, H. E. Bosshard, R. A. Dammkoehler, D. A. Dunn in *Computer-Assisted Drug Design* (Hrsg.: E. C. Olson, R. E. Christoffersen), American Chemical Society, Washington, **1979**, S. 205–226.
- [409] Y. C. Martin, M. G. Bures, E. A. Danaher, J. DeLazzer in *Trends in QSAR and Molecular Modelling 92* (Hrsg.: C.-G. Wermuth), Escom, Leiden, **1993**, S. 20–27.
- [410] *QSAR and Molecular Modelling: Concepts, Computational Tools and Biological Applications* (Hrsg.: F. Sanz, J. Giraldo, F. Manaut), Prous, Barcelona, **1995**.
- [411] *Chemometric Methods in Molecular Design*, Vol. 2 (Hrsg.: H. van de Waterbeemd), VCH, Weinheim, **1995**.
- [412] R. D. Cramer III, J. D. Bunce in *QSAR in Drug Design and Toxicology* (Hrsg.: D. Hadzi, B. Jerman-Blasiz), Elsevier, Amsterdam, **1987**.
- [413] P. Geladi, B. R. Kowalski, *Anal. Chim. Acta* **1986**, *185*, 1–17.
- [414] S. Wold, E. Johansson, M. Cochini in *3D QSAR in Drug Design. Theory, Methods and Applications* (Hrsg.: H. Kubinyi), Escom, Leiden, **1993**.
- [415] G. Folkers, A. Merz in *Lipophilicity in Drug Action and Toxicology*, Vol. 4 (Hrsg.: V. Pliska, B. Testa, H. van de Waterbeemd), VCH, Weinheim, **1996**, S. 219–232.
- [416] G. E. Kellogg, D. J. Abraham, *J. Comput. Aided Mol. Des.* **1991**, *5*, 545.
- [417] G. E. Kellogg, J. C. Burnett, D. J. Abraham, *J. Comput. Aided Mol. Des.* **2001**, *15*, 381–393.
- [418] P. J. Goodford, *J. Med. Chem.* **1985**, *28*, 849–857.
- [419] DelPhi/Solvation, Molecular Simulations Inc., San Diego, CA, **1995**.
- [420] G. Klebe, U. Abraham, T. Mietzner, *J. Med. Chem.* **1994**, *37*, 4130–4146.
- [421] G. Klebe, U. Abraham, *J. Comput. Aided Mol. Des.* **1999**, *13*, 1–10.
- [422] A. Doweyko, *J. Med. Chem.* **1988**, *31*, 1396–1406.
- [423] A. N. Jain, K. Koile, D. Chapman, *J. Med. Chem.* **1994**, *37*, 2315–2327.
- [424] V. E. Golender, E. R. Vorpagel in *3D QSAR in Drug Design. Theory, Methods and Applications* (Hrsg.: H. Kubinyi), Escom, Leiden, **1993**, S. 137–149.
- [425] H.-D. Höltje, L. B. Kier, *J. Pharm. Sci.* **1974**, *63*, 1722–1725.
- [426] D. Joseph-McCarthy, *Pharm. Ther.* **1999**, *84*, 179–191.
- [427] H.-J. Böhm, M. Stahl, *Med. Chem. Res.* **1999**, *9*, 445–462.
- [428] P. Bamforth, F. E. Cohen, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **1996**, *6*, 236–241.
- [429] R. C. Wade in *3D QSAR in Drug Design*, Vol. 2 (Hrsg.: H. Kubinyi, G. Folkers, Y. C. Martin), Kluwer, Dordrecht, **1998**, S. 486–505.
- [430] I. T. Weber, R. W. Harrison in *3D QSAR in Drug Design*, Vol. 2 (Hrsg.: H. Kubinyi, G. Folkers, Y. C. Martin), Kluwer, Dordrecht, **1998**, 115–127.
- [431] T. Lilje fors in *3D QSAR in Drug Design*, Vol. 2 (Hrsg.: H. Kubinyi, G. Folkers, Y. C. Martin), Kluwer, Dordrecht, **1998**, 3–17.
- [432] A. Warshel, A. Papazyan, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **1998**, *8*, 211–217.
- [433] M. K. Gilson, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **1995**, *5*, 216–223.
- [434] D. Bashford, D. A. Case, *Annu. Rev. Phys. Chem.* **2000**, *51*, 129–152.
- [435] M. Orozco, F. J. Luque, *Chem. Rev.* **2000**, *100*, 4187–4225.
- [436] M. Schaefer, H. W. T. van Vlijmen, M. Karplus, *Adv. Protein Chem.* **1998**, *51*, 1–57.
- [437] P. A. Kollman, *Acc. Chem. Res.* **1996**, *29*, 461–469.
- [438] P. Kollman, *Chem. Rev.* **1993**, *93*, 2395–2417.
- [439] P. A. Kollman, K. M. Merz, Jr., *Acc. Chem. Res.* **1990**, *23*, 246–252.
- [440] P. A. Kollman, I. Massova, C. Reyes, B. Kuhn, S. Huo, L. Chong, M. Lee, T. Lee, Y. Duan, W. Wang, O. Donini, P. Cieplak, J. Srinivasan, D. A. Case, T. E. Cheatham III, *Acc. Chem. Res.* **2000**, *33*, 889–897.
- [441] W. P. Reinhardt, M. A. Miller, L. M. Amon, *Acc. Chem. Res.* **2001**, *34*, 607–614.
- [442] M. R. Reddy, M. D. Erion, A. Agarwal, *Rev. Comput. Chem.* **2000**, *16*, 217–304.
- [443] W. L. Jorgensen, *Acc. Chem. Res.* **1989**, *22*, 184–189.
- [444] T. P. Straatsma, *Rev. Comput. Chem.* **1996**, *9*, 81–127.
- [445] H. Meirovitch, *Rev. Comput. Chem.* **1998**, *12*, 1–74.
- [446] J. G. Kirkwood, *J. Chem. Phys.* **1935**, *3*, 300–313.
- [447] R. J. Zwanzig, *J. Chem. Phys.* **1954**, *22*, 1420–1426.
- [448] J. P. M. Postma, H. J. C. Berendsen, J. R. Haak, *Faraday Symp. Chem. Soc.* **1981**, *17*, 55–67.
- [449] B. L. Tembe, J. A. McCammon, *Comput. Chem.* **1984**, *4*, 281–283.
- [450] N. Metropolis, A. W. Rosenbluth, M. N. Rosenbluth, A. H. Teller, E. Teller, *J. Chem. Phys.* **1953**, *21*, 1087–1092.
- [451] W. F. van Gunsteren, H. J. C. Berendsen, *Angew. Chem.* **1990**, *102*, 1020–1055; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1990**, *29*, 992–1023.
- [452] S. Boresch, M. Karplus, *J. Mol. Biol.* **1995**, *254*, 801–807.
- [453] G. Archontis, T. Simonson, M. Karplus, *J. Mol. Biol.* **2001**, *306*, 307–327.
- [454] D. L. Beveridge, F. M. DiCapua, *Annu. Rev. Biophys. Biophys. Chem.* **1989**, *18*, 431–492.
- [455] D. A. Pearlman, *J. Phys. Chem.* **1994**, *98*, 1487–1493.
- [456] S. Sen, L. Nilsson, *J. Comput. Chem.* **1999**, *20*, 877–885.
- [457] M. A. McCarrick, P. A. Kollman, *J. Comput. Aided Mol. Des.* **1999**, *13*, 109–121.
- [458] M. L. Plount Price, W. L. Jorgensen, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 9455–9466.
- [459] W. L. Jorgensen, C. Ravimohan, *J. Chem. Phys.* **1985**, *83*, 3050–3054.
- [460] C. F. Wong, J. A. McCammon, *J. Am. Chem. Soc.* **1986**, *108*, 3830–3831.
- [461] K. M. Merz, P. A. Kollman, *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, *111*, 5649–5658.
- [462] N. Ota, A. T. Brunger, *Theor. Chem. Acc.* **1997**, *98*, 407–435.
- [463] N. Ota, C. Stroupe, J. M. S. Ferreira-da-Silva, S. A. Shah, M. Mares-Guia, A. T. Brunger, *Proteins* **1999**, *37*, 641–653.
- [464] P. R. Gerber, A. E. Mark, W. F. van Gunsteren, *J. Comput. Aided Mol. Des.* **1993**, *7*, 305–323.
- [465] B. C. Oostenbrink, J. W. Pitera, M. M. H. van Lipzig, J. H. N. Meereman, W. F. van Gunsteren, *J. Med. Chem.* **2000**, *43*, 4594–4605.
- [466] H. Liu, A. E. Mark, W. F. van Gunsteren, *J. Phys. Chem.* **1996**, *100*, 9485–9494.
- [467] Z. Guo, C. L. Brooks, X. Kong, *J. Phys. Chem. B* **1998**, *102*, 2032–2036.
- [468] S. Banba, Z. Guo, C. L. Brooks III, *J. Phys. Chem. B* **2000**, *104*, 6903–6910.
- [469] J. Åqvist, C. Medina, J. E. Samuelsson, *Protein Eng.* **1994**, *7*, 385–391.
- [470] T. Hansson, J. Marelius, J. Åqvist, *J. Comput. Aided Mol. Des.* **1998**, *12*, 27–35.
- [471] J. Wang, R. Dixon, P. A. Kollman, *Proteins* **1999**, *34*, 69–81.
- [472] H. A. Carlson, W. L. Jorgensen, *J. Phys. Chem.* **1995**, *99*, 10667–10673.
- [473] I. D. Wall, A. R. Leach, D. W. Salt, M. G. Ford, J. W. Essex, *J. Med. Chem.* **1999**, *42*, 5142–5152.
- [474] A. C. Pierce, W. L. Jorgensen, *J. Med. Chem.* **2001**, *44*, 1043–1050.
- [475] R. C. Rizzo, J. Tirado-Rives, W. L. Jorgensen, *J. Med. Chem.* **2001**, *44*, 145–154.
- [476] P. D. J. Grootenhuis, P. J. M. van Galen, *Acta Crystallogr. Sect. D* **1995**, *51*, 560–566.
- [477] P. D. J. Grootenhuis, S. P. van Helden in *Computational Approaches in Supramolecular Chemistry* (Hrsg.: G. Wipff), Kluwer, Dordrecht, **1994**, S. 137–149.
- [478] M. K. Holloway, J. M. Wai, T. A. Halgren, P. M. Fitzgerald, J. P. Vacca, B. D. Dorsey, R. B. Levin, W. J. Thompson, L. J. Chen, S. J. de-Solms, N. Gaffin, A. K. Ghosh, E. A. Giuliani, S. L. Graham, J. P. Guare, R. W. Hungate, T. A. Lyle, W. M. Sanders, T. J. Tucker, M. Wiggins, C. M. Wiscount, O. W. Woltersdorf, S. D. Young, P. L. Darke, J. A. Zugay, *J. Med. Chem.* **1995**, *38*, 305–317.
- [479] D. Joseph-McCarthy, J. M. Hogle, M. Karplus, *Proteins* **1997**, *29*, 32–58.
- [480] I. V. Kurinov, R. W. Harrison, *Nat. Struct. Biol.* **1994**, *1*, 735–743.
- [481] A. Checa, A. R. Ortiz, B. de Pascual-Teresa, F. Gago, *J. Med. Chem.* **1997**, *40*, 4136–4145.
- [482] S. Vajda, Z. Weng, R. Rosenfeld, C. DeLisi, *Biochemistry* **1994**, *33*, 13977–13988.
- [483] Z. Weng, S. Vajda, C. DeLisi, *Protein Sci.* **1996**, *5*, 614–626.
- [484] D. H. Williams, J. P. L. Cox, A. J. Doig, M. Gardener, U. Gerhard, P. T. Kaye, A. R. Lal, I. A. Nicholls, C. J. Salter, R. C. Mitchell, *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 7020–7030.
- [485] S. Krystek, T. Stouch, J. Novotny, *J. Mol. Biol.* **1993**, *234*, 661–679.

- [486] J. Novotny, R. E. Brucolieri, F. A. Saul, *Biochemistry* **1989**, 28, 4735–4749.
- [487] J. Warwicker, H. C. Watson, *J. Mol. Biol.* **1982**, 157, 671–679.
- [488] R. J. Zauhar, R. S. Morgan, *J. Mol. Biol.* **1985**, 186, 815–820.
- [489] N. Froloff, A. Windemuth, B. Honig, *Protein Sci.* **1997**, 6, 1293–1301.
- [490] T. Zhang, D. E. Koshland, *Protein Sci.* **1996**, 5, 348–356.
- [491] D. Hoffmann, B. Kramer, T. Washio, T. Steinmetzer, M. Rarey, T. Lengauer, *J. Med. Chem.* **1999**, 42, 4422–4433.
- [492] F. Politicelli, P. Ascenzi, M. Bolognesi, B. Honig, *Protein Sci.* **1999**, 8, 2621–2629.
- [493] B. K. Shoichet, A. R. Leach, I. D. Kuntz, *Proteins* **1999**, 34, 4–16.
- [494] X. Zou, Y. Sun, I. D. Kuntz, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, 121, 8033–8043.
- [495] W. C. Still, A. Tempczyk, R. C. Hawley, T. Hendrickson, *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, 112, 6127–6129.
- [496] I. Massova, P. A. Kollman, *Perspect. Drug Discovery Des.* **2000**, 18, 113–135.
- [497] J. Srinivasan, T. E. Cheatham, P. Cieplak, P. A. Kollman, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, 120, 9401–9409.
- [498] Y. N. Vorobjev, J. C. Almagro, J. Hermans, *Proteins* **1998**, 32, 399–413.
- [499] B. Jayaram, D. Sprous, M. A. Young, D. L. Beveridge, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, 120, 10629–10633.
- [500] G. Archontis, T. Simonson, M. Karplus, *J. Mol. Biol.* **2001**, 306, 307–327.
- [501] C. M. Reyes, P. A. Kollman, *J. Mol. Biol.* **2000**, 297, 1145–1158.
- [502] B. Kuhn, P. A. Kollman, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, 122, 3909–3916.
- [503] T. Lee, P. A. Kollman, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, 122, 4385–4393.
- [504] J. Wang, P. Morin, W. Wang, P. A. Kollman, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, 123, 5221–5230.
- [505] T. Lazaridis, M. Karplus, *Proteins* **1999**, 35, 133–152.
- [506] J. Gasteiger, J. Zupan, *Angew. Chem.* **1993**, 105, 510–536; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1993**, 32, 503–527.
- [507] H. J. Böhm, *J. Comput. Aided Mol. Des.* **1994**, 8, 243–256.
- [508] H. J. Böhm, *J. Comput. Aided Mol. Des.* **1998**, 12, 309–323.
- [509] M. D. Eldridge, C. W. Murray, T. R. Auton, G. V. Paolini, R. P. Mee, *J. Comput. Aided Mol. Des.* **1997**, 11, 425–445.
- [510] R. Wang, L. Liu, L. Lai, Y. Tang, *J. Mol. Model.* **1998**, 4, 379–394.
- [511] C. W. Murray, T. R. Auton, M. D. Eldridge, *J. Comput. Aided Mol. Des.* **1998**, 12, 503–519.
- [512] R. D. Head, M. L. Smythe, T. I. Oprea, C. L. Waller, S. M. Green, G. R. Marshall, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, 118, 3959–3969.
- [513] S. J. Weiner, P. A. Kollman, D. A. Case, U. C. Singh, C. Ghio, G. Alagona, S. Profeta, P. Weiner, *J. Am. Chem. Soc.* **1984**, 106, 765–784.
- [514] C. Hansch, A. Leo, *Substituent Constants for Correlation Analysis in Chemistry and Biology*, Wiley, New York, **1979**.
- [515] Y. Takamatsu, A. Itai, *Proteins* **1998**, 33, 62–73.
- [516] P. Venkatarangan, A. J. Hopfinger, *J. Med. Chem.* **1999**, 42, 2169–2179.
- [517] V. N. Viswanadhan, M. R. Reddy, A. Wlodawer, M. D. Varney, J. N. Weinstein, *J. Med. Chem.* **1996**, 39, 705–712.
- [518] D. Rognan, S. L. Lauemoller, A. Holm, S. Buus, V. Tschinke, *J. Med. Chem.* **1999**, 42, 4650–4658.
- [519] R. S. Bohacek, C. McMullan, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, 116, 5560–5571.
- [520] P. Kasper, P. Christen, H. Gehring, *Proteins* **2000**, 40, 185–192.
- [521] A. N. Jain, *J. Comput. Aided Mol. Des.* **1996**, 10, 427–440.
- [522] W. Bibel, S. Hölldobler, T. Schaub, *Wissensrepräsentation und Inferenz: Eine grundlegende Einführung*, Vieweg, Braunschweig, **1993**.
- [523] R. L. Jernigan, I. Bahar, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **1996**, 6, 195–209.
- [524] A. E. Torda, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **1997**, 7, 200–205.
- [525] S. Vajda, M. Sippl, J. Novotny, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **1997**, 7, 222–228.
- [526] M. J. Sippl, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **1995**, 5, 229–235.
- [527] H. B. Bürgi, J. D. Dunitz, *Acta Crystallogr. Sect. B* **1988**, 44, 445–448.
- [528] P. D. Thomas, K. A. Dill, *J. Mol. Biol.* **1996**, 257, 457–469.
- [529] A. V. Finkelstein, A. M. Gutin, A. Y. Badretdinov, *Proteins* **1995**, 23, 151–162.
- [530] W. A. Koppensteiner, M. J. Sippl, *Biochemistry* **1998**, 63, 247–252.
- [531] T. Lazaridis, M. Karplus, *J. Mol. Biol.* **1999**, 288, 477–487.
- [532] J. Moult, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **1997**, 7, 194–199.
- [533] A. V. Finkelstein, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **1997**, 7, 60–71.
- [534] M. J. E. Sternberg, P. A. Bates, L. A. Kelley, R. M. MacCallum, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **1999**, 9, 368–373.
- [535] G. Verkhivker, K. Appelt, S. T. Freer, J. E. Villafranca, *Protein Eng.* **1995**, 8, 677–691.
- [536] K. A. Sharp, A. Nicholls, R. Friedman, B. Honig, *Biochemistry* **1991**, 30, 9686–9697.
- [537] A. Wallqvist, R. L. Jernigan, D. G. Covell, *Protein Sci.* **1995**, 4, 1881–1903.
- [538] R. S. DeWitte, E. I. Shakhnovich, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, 118, 11733–11744.
- [539] I. Muegge, Y. C. Martin, *J. Med. Chem.* **1999**, 42, 791–804.
- [540] I. Muegge, *J. Comput. Chem.* **2001**, 22, 418–425.
- [541] J. B. O. Mitchell, R. A. Laskowski, A. Alex, J. M. Thornton, *J. Comput. Chem.* **1999**, 20, 1165–1176.
- [542] K.-C. Ng, W. J. Meath, A. R. Allnatt, *Mol. Phys.* **1979**, 37, 237–253.
- [543] J. B. O. Mitchell, R. A. Laskowski, A. Alex, M. J. Forster, J. M. Thornton, *J. Comput. Chem.* **1999**, 20, 1177–1185.
- [544] H. Gohlke, M. Hendlich, G. Klebe, *J. Mol. Biol.* **2000**, 295, 337–356.
- [545] M. Hendlich, *Acta Crystallogr. Sect. D* **1998**, 54, 1178–1182.
- [546] H. Gohlke, M. Hendlich, G. Klebe, *Perspect. Drug Discovery Des.* **2000**, 20, 115–144.
- [547] P. S. Charifson, J. J. Corkery, M. A. Murcko, W. P. Walters, *J. Med. Chem.* **1999**, 42, 5100–5109.
- [548] E. C. Meng, B. K. Shoichet, I. D. Kuntz, *J. Comput. Chem.* **1992**, 13, 505–524.
- [549] D. K. Gehlhaar, G. M. Verkhivker, P. A. Rejto, C. J. Sherman, D. B. Fogel, S. T. Free, *Chem. Biol.* **1995**, 2, 317–324.
- [550] S.-S. So, M. Karplus, *J. Comput. Aided Mol. Des.* **1999**, 13, 243–258.
- [551] M. Stahl, M. Rarey, *J. Med. Chem.* **2001**, 44, 1035–1042.
- [552] M. Rarey, B. Kramer, T. Lengauer, G. Klebe, *J. Mol. Biol.* **1996**, 261, 470–489.
- [553] G. E. Terp, B. N. Johansen, I. T. Christensen, F. S. Jorgensen, *J. Med. Chem.* **2001**, 44, 2333–2343.
- [554] D. N. A. Boobbyer, P. J. Goodford, P. M. McWhinnie, R. C. Wade, *J. Med. Chem.* **1989**, 32, 1083–1094.
- [555] R. A. Laskowski, J. M. Thornton, C. Humbert, J. Singh, *J. Mol. Biol.* **1996**, 259, 175–201.
- [556] M. L. Verdonk, J. C. Cole, R. Taylor, *J. Mol. Biol.* **1999**, 289, 1093–1108.
- [557] M. L. Verdonk, J. C. Cole, P. Watson, V. Gillet, P. Willett, *J. Mol. Biol.* **2001**, 307, 841–859.
- [558] A. Miranker, M. Karplus, *Proteins* **1991**, 11, 29–34.
- [559] A. D. MacKerell, D. Bashford, M. Bellott, R. L. Dunbrack, J. D. Evanseck, M. J. Field, S. Fischer, J. Gao, H. Guo, S. Ha, D. Joseph-McCarthy, L. Kuchnir, K. Kuczera, F. T. K. Lau, C. Mattos, S. Michnick, T. Ngo, D. T. Nguyen, B. Prodhom, W. E. Reiher, B. Roux, M. Schlenkrich, J. C. Smith, R. Stote, J. Straub, M. Watanabe, J. Wiorkiewicz-Kuczera, D. Yin, M. Karplus, *J. Phys. Chem. B* **1998**, 102, 3586–3616.
- [560] C. M. Stultz, M. Karplus, *Proteins* **1999**, 37, 512–529.
- [561] R. J. Radmer, P. A. Kollman, *J. Comput. Aided Mol. Des.* **1998**, 12, 215–227.
- [562] D. A. Pearlman, *J. Med. Chem.* **1999**, 42, 4313–4324.
- [563] C. Bissantz, G. Folkers, D. Rognan, *J. Med. Chem.* **2000**, 43, 4759–4767.
- [564] M. R. Reddy, R. J. Bacquet, D. Zichi, D. A. Matthews, K. M. Welsh, T. R. Jones, S. Freer, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, 114, 10117–10122.
- [565] M. Rarey, B. Kramer, T. Lengauer in *Proceedings of the 3rd International Conference on Intelligent Systems for Molecular Biology* (Cambridge, Großbritannien, **1995**), S. 300–308.
- [566] I. D. Kuntz, J. M. Blaney, S. J. Oatley, R. Langridge, T. E. Ferrin, *J. Mol. Biol.* **1982**, 161, 269–288.
- [567] H. J. Böhm, *J. Comput. Aided Mol. Des.* **1992**, 6, 61–78.
- [568] P. Tao, L. Lai, *J. Comput. Aided Mol. Des.* **2001**, 15, 429–446.
- [569] A. Wallqvist, D. G. Covell, *Proteins* **1996**, 25, 403–419.
- [570] I. Muegge, Y. C. Martin, P. J. Hajduk, S. W. Fesik, *J. Med. Chem.* **1999**, 42, 2498–2503.
- [571] H. Sookhee, R. Andreani, A. Robbins, I. Muegge, *J. Comput. Aided Mol. Des.* **2000**, 14, 435–448.
- [572] I. Nobeli, J. B. O. Mitchell, A. Alex, J. M. Thornton, *J. Comput. Chem.* **2001**, 22, 673–688.

- [573] R. Hitzemann, *Trends Pharmacol. Sci.* **1988**, *9*, 408–411.
- [574] H. Roos, R. Karlsson, H. Nilshans, A. Persson, *J. Mol. Recognit.* **1998**, *11*, 204–210.
- [575] J. Piehler, A. Brecht, G. Gauglitz, C. Maul, S. Grabley, M. Zerlin, *Biosens. Bioelectron.* **1997**, *12*, 531–538.
- [576] R. L. Rich, D. G. Myszka, *Curr. Opin. Biotechnol.* **2000**, *11*, 54–61.
- [577] R. P. Hicks, *Curr. Med. Chem.* **2001**, *8*, 627–650.
- [578] J. M. Moore, *Biopolymers* **1999**, *51*, 221–243.
- [579] B. Meyer, T. Weimar, T. Paters, *Eur. J. Biochem.* **1997**, *246*, 705–709.
- [580] W. Jahnke, L. B. Perez, C. G. Paris, A. Strauss, G. Fendrich, C. M. Nalin, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 7394–7395.
- [581] W. Jahnke, S. Rüdisser, M. Zurini, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 3149–3150.
- [582] M. Mayer, B. Meyer, *Angew. Chem.* **1999**, *111*, 1824–1844; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, *38*, 1784–1788.
- [583] T. D. Veenstra, *Biophys. Chem.* **1999**, *79*, 63–79.
- [584] A. A. Rostom, J. H. R. Tame, J. E. Ladbury, C. V. Robinson, *J. Mol. Biol.* **2000**, *296*, 269–279.
- [585] A. Janshoff, M. Neitzert, Y. Oberdörfer, H. Fuchs, *Angew. Chem. 2000*, *112*, 3346–3374; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000**, *39*, 3212–3237.
- [586] I. Jelesarov, H. R. Bosshard, *Biochemistry* **1994**, *33*, 13321–13328.
- [587] R. G. Khalifah, F. Zhang, J. S. Parr, E. S. Rowe, *Biochemistry* **1993**, *32*, 3058–3066.
- [588] D. D. Hu, M. R. Eftink, *Biophys. Chem.* **1994**, *49*, 233–239.
- [589] B. W. Sigurskjold, C. R. Berland, B. Svensson, *Biochemistry* **1994**, *33*, 10191–10199.
- [590] K. P. Murphy, D. Xie, K. C. Garcia, L. M. Amzel, E. Freire, *Proteins 1993*, *15*, 113–120.
- [591] J. Gomez, E. Freire, *J. Mol. Biol.* **1995**, *252*, 337–350.
- [592] G. C. Kresheck, L. B. Vitello, J. E. Erman, *Biochemistry* **1995**, *34*, 8398–8405.
- [593] J. J. Christensen, L. D. Hansen, R. M. Izatt, *Handbook of Proton Ionization Heats and Related Thermodynamic Quantities*, Wiley, New York, **1976**.
- [594] I. Jelesarov, H. R. Bosshard, *J. Mol. Recognit.* **1999**, *12*, 3–18.
- [595] K. P. Murphy, E. Freire, *Adv. Protein Chem.* **1992**, *43*, 313–361.
- [596] R. S. Spolar, J. R. Livingstone, M. T. Record, Jr., *Biochemistry* **1992**, *31*, 3947–3955.
- [597] P. R. Connelly, J. A. Thomson, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1992**, *89*, 4781–4785.
- [598] G. I. Makhatadze, P. L. Privalov, *Adv. Protein Chem.* **1995**, *47*, 307–425.
- [599] B. M. Baker, K. P. Murphy, *J. Mol. Biol.* **1997**, *268*, 557–569.
- [600] C. McNemar, M. E. Snow, W. T. Windsor, A. Prongay, P. Mui, R. Zhang, J. Durkin, H. V. Le, P. C. Weber, *Biochemistry* **1997**, *36*, 10006–10014.
- [601] N. J. Faergeman, B. W. Sigurskjold, B. B. Kragelund, K. V. Andersen, J. Knudsen, *Biochemistry* **1996**, *35*, 14118–14126.
- [602] G. A. Holdgate, A. Tunnicliffe, W. H. Ward, S. A. Weston, G. Rosenbrock, P. T. Barth, I. W. Taylor, R. A. Paupit, D. Timms, *Biochemistry* **1997**, *36*, 9663–9673.
- [603] R. Perozzo, I. Jelesarov, H. R. Bosshard, G. Folkers, L. Scapozza, *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 16139–16145.
- [604] M. V. Botuyan, D. A. Keire, C. Kroen, D. G. Gorenstein, *Biochemistry* **1993**, *32*, 6863–6874.
- [605] J. E. Ladbury, J. G. Wright, J. M. Sturtevant, P. B. Sigler, *J. Mol. Biol.* **1994**, *238*, 669–681.
- [606] H. Berglund, M. Wolf-Watz, T. Lundback, S. van den Berg, T. Hard, *Biochemistry* **1997**, *36*, 11188–11197.
- [607] F. Dullweber, M. T. Stubbs, J. Stürzebecher, D. Musil, G. Klebe, *J. Mol. Biol.* **2001**, *313*, 593–614.
- [608] J. R. Liggins, P. L. Privalov, *Proteins 2000, Suppl.*, 50–62.
- [609] P. L. Privalov, S. A. Potekhin, *Methods Enzymol.* **1986**, *131*, 4–51.
- [610] K. Takahashi, H. Fukada, *Biochemistry* **1985**, *24*, 297–300.
- [611] A. Shrake, P. D. Ross, *J. Biol. Chem.* **1990**, *265*, 5055–5059.
- [612] L. N. Lin, A. B. Mason, R. C. Woodworth, J. F. Brandts, *Biochemistry* **1994**, *33*, 1881–1888.
- [613] F. Conejero-Lara, P. L. Mateo, *Biochemistry* **1996**, *35*, 3477–3486.
- [614] K. G. Davis, S. E. Plyte, S. R. Robertson, A. Cooper, G. G. Kneale, *Biochemistry* **1995**, *34*, 148–154.
- [615] S. V. Litvinovich, K. C. Ingham, *J. Mol. Biol.* **1995**, *248*, 611–626.
- [616] V. V. Filimonov, V. V. Rogov, *J. Mol. Biol.* **1996**, *255*, 767–777.
- [617] S. Makino, I. D. Kuntz, *J. Comput. Chem.* **1997**, *18*, 1812–1825.
- [618] S. Grüneberg, B. Wendt, G. Klebe, *Angew. Chem.* **2001**, *113*, 404–408; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 389–393.
- [619] H. J. Böhm, *J. Comput. Aided Mol. Des.* **1992**, *6*, 593–606.
- [620] H. J. Böhm, S. Brode, U. Hesse, G. Klebe, *Chem. Eur. J.* **1996**, *2*, 1509–1513.