

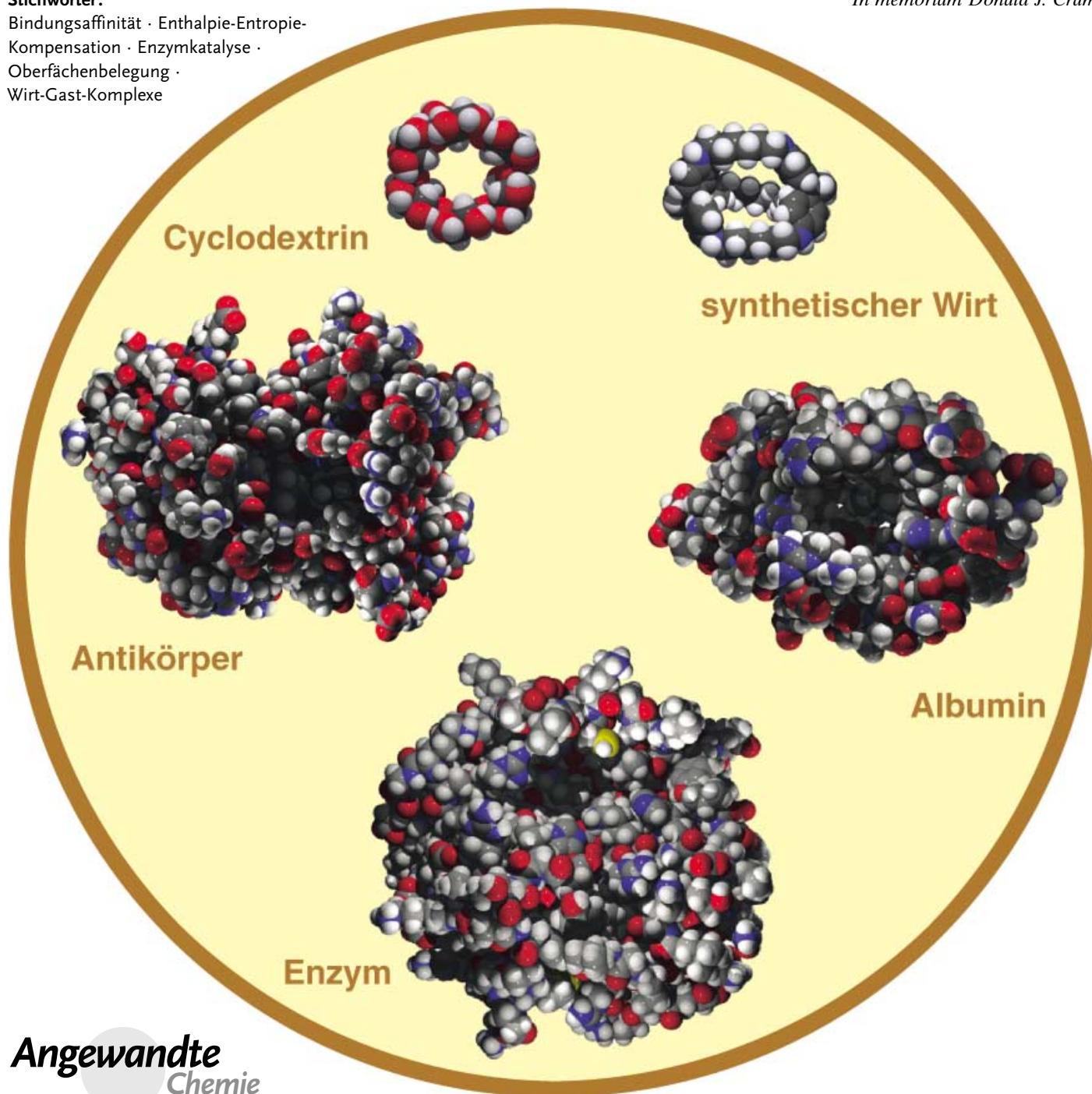
# Bindungsaffinitäten von Wirt-Gast-, Protein-Ligand- und Protein-Übergangszustands-Komplexen

Kendall N. Houk,\* Andrew G. Leach, Susanna P. Kim und Xiyun Zhang

Stichwörter:

Bindungsaffinität · Enthalpie-Entropie-Kompensation · Enzymkatalyse · Oberflächenbelegung · Wirt-Gast-Komplexe

*In memoriam Donald J. Cram*



Die Affinitäten von Wirten – ausgehend von kleinen synthetischen Cavitanten bis hin zu großen Proteinen – für organische Moleküle sind gut dokumentiert. Die mittleren Assoziationskonstanten für die Bindung organischer Moleküle durch Cyclodextrine, synthetische Wirte und Albumine in Wasser sowie von katalytischen Antikörpern oder Enzymen für Substrate betragen im Allgemeinen  $10^{3.5 \pm 2.5} \text{ M}^{-1}$ . Die Bindungsaffinitäten steigen bei der Komplexierung von Übergangszuständen und biologischen Antigenen durch Antikörper oder von Enzymen durch Inhibitoren auf  $10^{8 \pm 2} \text{ M}^{-1}$  und auf  $10^{16 \pm 4} \text{ M}^{-1}$  für Enzym-Übergangszustands-Komplexe. Die Gründe für die unterschiedlichen Stabilitäten dieser Wirt-Gast-Systeme sollen hier untersucht werden, und wir beschreiben Ansätze zur computergestützten Analyse der Wirt-Gast-Komplexbildung in Lösung. Bei vielen Komplexklassen besteht eine ungefähre Korrelation der Bindungsaffinität mit der Größe der Oberfläche, die bei der Komplexierung vergraben wird. Enzyme folgen dieser Korrelation nicht, sondern binden Übergangszustände sehr viel stärker als es anhand der Oberfläche zu erwarten wäre.

## 1. Einleitung

Der Begriff der molekularen Erkennung wurde zur Beschreibung nichtkovalenter Wechselwirkungen zwischen Molekülen eingeführt. Dies schließt die Chemie von Wirt-Gast-Komplexen, wie sie durch Cram definiert wurde, und die durch Lehn etablierte supramolekulare Chemie ein und umfasst Theorie und Experiment.<sup>[1]</sup> Ob Maskierung, Sensorkritik, Kristallisation, Katalyse, Löslichkeit, Selbstorganisation, Verteilungsverhältnisse in nichtmischbaren Lösungsmitteln, Rezeptor-Wirkstoff-Wechselwirkungen: Typ und Stärke von Wechselwirkungen zwischen Molekülen spielen bei vielen Phänomenen eine Rolle, die Gegenstand der aktuellen Forschung in der Chemie, der Biologie und den Materialwissenschaften sind.

Ein Hauptziel bei der Erforschung der molekularen Erkennung ist die Steuerung der Selektivität und die Maximierung der Bindungsenergien der Wirt-Gast-Komplexe. Für Maskierungs- und Sensormethoden und zur Steuerung des Aufbaus supramolekularer Aggregate werden große Bindungskonstanten und eine eindeutige Diskriminierung zwischen unterschiedlichen Wirten angestrebt.<sup>[1]</sup> Antikörper sind die vielseitigen Bindungspartner natürlicher Systeme, und für die meisten Antigene verfügt das Immunsystem über Antikörper mit einer geeigneten Bindungsstelle.<sup>[2]</sup> Antikörper sind zu Katalysatoren weiterentwickelt worden, wenngleich die angestrebte starke und selektive Bindung von Übergangszuständen durch Antikörper bislang nur in wenigen Fällen erreicht wurde.<sup>[3]</sup> Im Unterschied dazu sind die natürlichen Katalysatoren, die Enzyme, bemerkenswert selektive und leistungsfähige Liganden für Übergangszustände.<sup>[4]</sup> Versuche, beim Design und der Synthese von Katalysatoren die Bindung von Übergangszuständen nachzuahmen, lieferten Produkte, die den Enzymen oder auch nur den besten

## Aus dem Inhalt

1. Einleitung	5021
2. Bindungskonstanten: Trends	5022
3. Ursachen und Grenzwerte von Bindungsaffinitäten	5033
4. Beziehung zwischen Bindungskonstante und vergrabener Oberfläche	5039
5. Warum binden Übergangszustände fester an Enzyme als Substrate?	5042
6. Zusammenfassung und Ausblick	5043

katalytischen Antikörpern nicht ebenbürtig sind.<sup>[5]</sup> Zum Nachweis selektiver Enzym-Inhibitoren und Rezeptor-Agonisten und -Antagonisten wird in der Medizinischen Chemie eine Reihe von Techniken eingesetzt, vom rationalen strukturbezogenen Design über Methoden der kombinatorischen Chemie bis zum Hochdurchsatz-Screening.<sup>[6]</sup> Bei der Quantifizierung von Wirt-Gast-Komplexen wurden bereits große Fortschritte erzielt,<sup>[1,7,8]</sup> vieles aber bleibt noch aufzuklären.

Zu einem besseren quantitativen Verständnis molekulärer Erkennung haben wir die Bindungsenergien von Wirt-Gast-Komplexen unterschiedlicher Klassen verglichen. Mit eingeschlossen waren Komplexe mit Proteinwirten wie Albuminen, Antikörpern und Enzymen. Wir identifizieren Muster, denen die Bindungskonstanten von Komplexen organischer Moleküle mit synthetischen Wirten, Antikörpern und Enzymen folgen, und geben Grenzwerte für die Stärke von Bindungskonstanten an, die mit den jeweiligen Wirtssystemen erreicht werden (oder wahrscheinlich erreichbar sind). Des Weiteren legen wir fest, welche Bindungsenergien als typisch angesehen werden können.

Wirte und Gäste sind gewöhnlich neutrale organische Moleküle, wobei insbesondere bei Proteinwirten und Rezeptoren auch Carboxylate oder protonierte Amine vorkommen. Metall-Ionen-Komplexe blieben in diesem Aufsatz bewusst nicht berücksichtigt, nur in einigen Fällen wurden Daten zu Metalloenzymen mitaufgenommen. Die Bindungskonstanten wurden gewöhnlich in Wasser gemessen, wir gehen aber auch

[\*] Prof. Dr. K. N. Houk, Dr. A. G. Leach, S. P. Kim, X. Zhang  
Department of Chemistry and Biochemistry  
University of California, Los Angeles  
Los Angeles, CA 90095-1569 (USA)  
Fax: (+1) 310-206-1843  
E-mail: houk@chem.ucla.edu

auf die Stabilität von Komplexen in organischen Lösungsmitteln ein.

Wir fassen in diesem Aufsatz die mittleren Bindungsenergien und die Verteilung der Komplexstabilitäten zahlreicher Wirtsklassen zusammen. Diese umfassen Cyclodextrine und synthetische nichtcyclodextrinische Werte in Wasser und organischen Lösungsmitteln, Albumine und andere Proteine in Komplexen mit organischen Molekülen, Antikörper-Komplexe mit Biomolekülen und nichtbiologischen organischen Molekülen sowie Enzym-Substrat-Komplexe. Ebenfalls untersucht wird die Bindung von Übergangszuständen und Übergangszustandsanologa durch katalytische Antikörper und Enzyme.

Zunächst stellen wir die Bindungsenergien jeder Wirtsklasse graphisch-statistisch dar. Die Bindungskonstanten der organischen Werte und einiger Proteine sind experimentell bestimmt worden; die Konstanten für katalytische Antikörper und Enzyme wurden hauptsächlich aus der Michaelis-Menten-Kinetik abgeleitet, aus der sich eine effektive Dissoziationskonstante  $K_M$  ergibt. Um Vergleiche zu erleichtern, werden die Bindungsenergien aller Wirt-Gast-Komplexe in diesem Aufsatz als Assoziationskonstanten mit der Einheit  $M^{-1}$  ausgedrückt. Insbesondere werden die Konstanten  $K_d$ ,  $K_M$ ,  $K_1$  (die Inhibitionskonstante) und  $K_{tx}$  (die Übergangszustands-Dissoziationskonstante nach Wolfenden) als Reziprokwerte angegeben, während  $K_a$ -Werte unverändert bleiben. Die Verteilungskurven geben die Zahl der Wirt-Gast-Komplexe an, die in ein bestimmtes Intervall von  $K_a$  fallen. Aus den Basisdaten wurden der Mittelwert von  $K_a$  und die Standardabweichung berechnet. Aus den verfügbaren Daten wurden ferner für einige Klassen  $\Delta H$  und  $\Delta S$  ermittelt und graphisch dargestellt. Diese Diagramme lassen erkennen, ob

eine Korrelation zwischen Enthalpie und Entropie existiert und ob diese eine extrathermodynamische Signifikanz hat.

Abschließend analysieren wir die Ursachen der beobachteten Trends in den Bindungsstärken. Das Phänomen der Enthalpie-Entropie-Kompensation und hydrophobe Effekte sowie deren Beiträge zur Bindungsstärke werden untersucht. Wir vergleichen die Größe der bei der Bindung vergrabenen Wirt-Gast-Oberfläche mit der Komplexstabilität und beschreiben schließlich eine einfache Methode zur Vorhersage von Bindungsaffinitäten unterschiedlicher Wirt-Gast-Systeme anhand der Größe der vergrabenen Oberfläche.

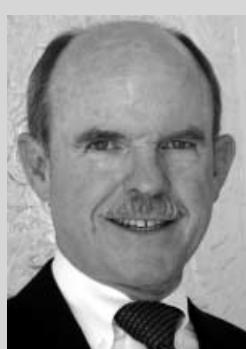
## 2. Bindungskonstanten: Trends

### 2.1. Bindungskonstanten organischer Werte

#### 2.1.1. Cyclodextrine

Cyclodextrine sind wasserlösliche Werte mit einem hydrophoben Hohlraum, der eine Vielfalt kleiner organischer Moleküle aufnehmen kann.<sup>[9]</sup>  $\alpha$ -Cyclodextrin besteht aus sechs Glucosebausteinen,  $\beta$ -Cyclodextrin aus sieben und  $\gamma$ -Cyclodextrin aus acht. Die Hohlräume dieser drei Cyclodextrine unterscheiden sich geringfügig in ihren geometrischen Eigenschaften und ihrer Bevorzugung von Molekülen bestimmter Größe (Abbildung 1).

Abbildung 2 zeigt ein Kalottenmodell des  $\alpha$ -Cyclodextrin-(*p*-hydroxybenzoësäure)-Komplexes, eines typischen, in wässriger Lösung gebildeten Cyclodextrinkomplexes, im Kristall.<sup>[10a]</sup> Der hydrophobe Hohlraum umgibt den aromatischen Ring, der polare Substituent ragt in die Wasserphase. Die Assoziationskonstante  $K_a$  dieses Komplexes beträgt



K. N. Houk ist Professor für Theoretische Organische Chemie an der University of California, Los Angeles. Mit computerchemischen Methoden untersucht er Probleme der Organischen und Biochemie und beschäftigt sich in der Hauptsache mit Cycloadditionen, Stereoselektivität und molekularer Erkennung. Er ist Fellow der American Academy of Arts and Sciences und wird 2003 den American Chemical Society Computers in Chemistry and Pharmaceutical Research Award erhalten.



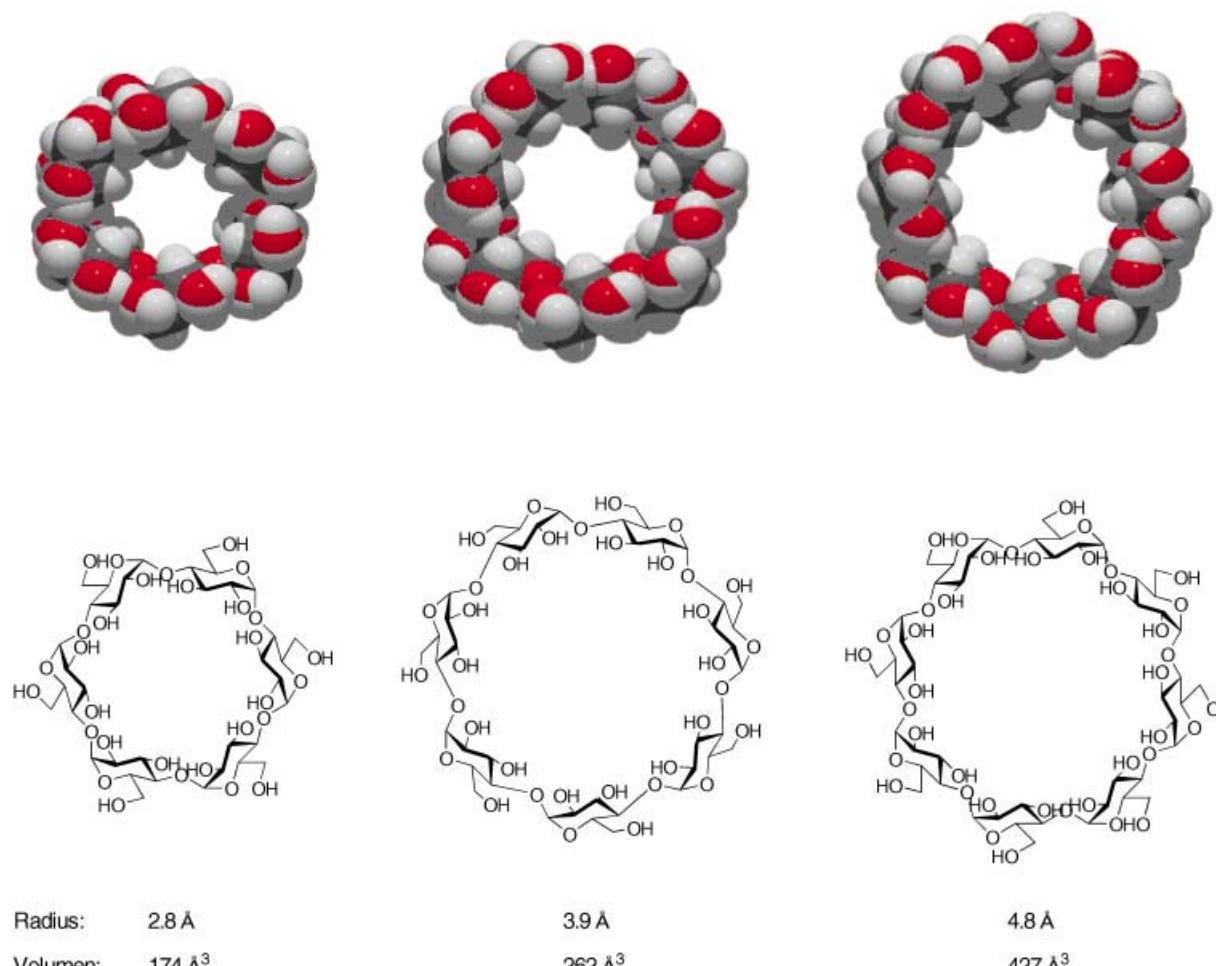
Andrew Leach stammt aus Chester, Großbritannien. Er studierte Naturwissenschaften in Cambridge und promovierte mit der Dissertation „New Techniques for Combinatorial Chemistry“ bei Prof. S. V. Ley. Als Postdoc an der University of California, Los Angeles, beschäftigte er sich bei Prof. K. N. Houk mit organischer Computerchemie. Er erhielt ein Fulbright-AstraZeneca-Stipendium und den Amgen Award der UCLA. Seit Oktober 2003 arbeitet er bei AstraZeneca. Er ist leidenschaftlicher Musiker und spielt mit der Golden State British Brass Band.



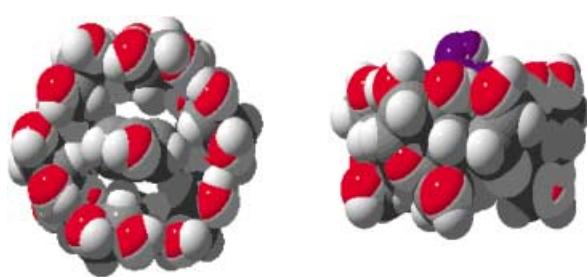
Susanna P. Kim studierte im Hauptfach Mikrobiologie an der University of California, Los Angeles, und sammelte erste Forschungserfahrungen in der Arbeitsgruppe von K. N. Houk. Gegenwärtig promoviert sie in Pharmazie an der University of Illinois in Chicago.



Xiyun Zhang wuchs in Chongqing, China, auf und erhielt ihren BSc 1997 von der Beijing Normal University. Dort setzte sie ihr Studium in der Arbeitsgruppe von Prof. Qinghua Chen mit Schwerpunkt in der organischen Synthese fort und schloss nach drei Jahren mit dem MSc ab. Im Rahmen ihrer Promotion beschäftigt sie sich gegenwärtig in der Arbeitsgruppe von Prof. Houk mit theoretischen Untersuchungen von enzymatisch und Antikörper-katalysierten organischen Reaktionen unter kombinierter Anwendung von quantenmechanischen Rechnungen und Moleküldynamik-Simulationen.



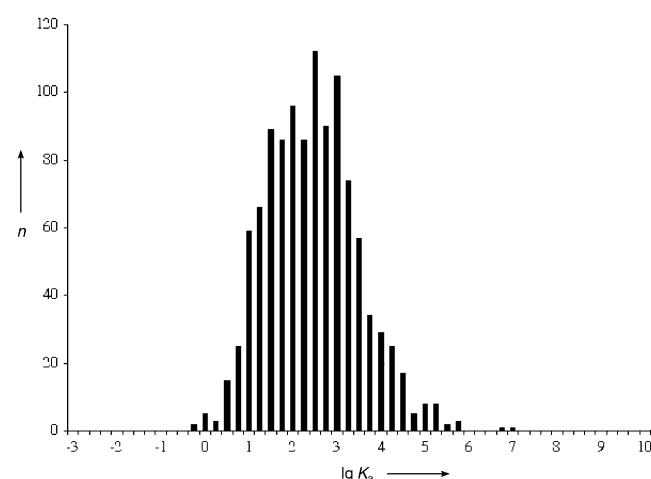
**Abbildung 1.** Strukturen von  $\alpha$ - (links),  $\beta$ - (Mitte) und  $\gamma$ -Cyclodextrinen (rechts). Die Abmessungen wurden zwischen Punkten auf der Van-der-Waals-Oberfläche der Moleküle ermittelt.



**Abbildung 2.** Aufsicht (links) und Seitenansicht (rechts) des Komplexes aus  $\alpha$ -Cyclodextrin und *p*-Hydroxybenzoësäure.

$10^3 \text{ M}^{-1}$ ,<sup>[10b]</sup> die Größe wird häufig als millimolare Dissoziationskonstante angegeben ( $K_d = 10^{-3} \text{ M}$ ). Die entsprechende Gibbs-Bindungsenergie in Wasser beträgt  $-4.1 \text{ kcal mol}^{-1}$ .

Zahlreiche neutrale Gastmoleküle, die hinreichend klein sind, um in den Hohlraum zu passen, weisen ähnliche Bindungsenergien auf. In Abbildung 3 ist die Häufigkeit von Komplexen in bestimmten  $K_a$ -Intervallen für  $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\gamma$ -Cyclodextrine aufgetragen.<sup>[11,12]</sup> Diese und nachfolgende Verteilungskurven geben für den gesamten Bereich, für den Daten zugänglich sind, die Zahl der Komplexe mit Gleich-



**Abbildung 3.** Verteilung der  $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\gamma$ -Cyclodextrin-Komplexe auf Intervalle von  $\lg K_a$  ( $K_a = 10^{2.5 \pm 1.1} \text{ M}^{-1}$ ,  $n$  = Zahl der Komplexe).<sup>[11,12]</sup>

gewichtskonstanten in einem Intervall von 0.25  $\text{p}K_a$ -Einheiten an. Einzelgraphiken dieses Typs für  $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\gamma$ -Cyclodextrine wurden von Connors erstellt.<sup>[8]</sup> Bei den Gast-

molekulären handelt es sich meist um Benzol- und Adamantan-Derivate sowie andere kleine organische Moleküle mit hydrophoben und polaren Teilen. Die mittlere Gibbs-Bindungsenergie ( $\Delta G$ ) der in Abbildung 3 aufgenommenen 1257 Komplexe beträgt  $-3.5 \pm 1.4 \text{ kcal mol}^{-1}$ , der entsprechende  $K_a$ -Wert ist  $10^{2.5 \pm 1.1} \text{ M}^{-1}$ . Die für die  $\Delta G$ - und  $K_a$ -Werte genannten Fehlergrenzen sind Standardabweichungen. Anders ausgedrückt fallen 68% (1 Standardabweichung) der Komplexe in den Bereich  $10^{2.5 \pm 1.1} \text{ M}^{-1}$  ( $10^{1.4} \text{--} 10^{3.6} \text{ M}^{-1}$ ) und 95% (2 Standardabweichungen) in den Bereich  $10^{2.5 \pm 2.2} \text{ M}^{-1}$ ; die  $K_a$ -Werte betragen somit  $1 \text{--} 10^5 \text{ M}^{-1}$ . Dies kann noch als schmaler Bereich aufgefasst werden, ermöglicht aber eine erhebliche Selektivität in einem dynamischen Bereich der Bindungsaaffinität von  $10^5$ .

Trotz dieser schmalen Verteilung der Gibbs-Bindungsenergien von  $-3.5 \pm 1.4 \text{ kcal mol}^{-1}$  variieren die Komplexierungsenthalpien ( $\Delta H$ ) über einen weiten Bereich von  $-20$  bis  $5 \text{ kcal mol}^{-1}$ . In Abbildung 4 sind die  $\Delta H$ - gegen die  $\Delta S$ -Werte

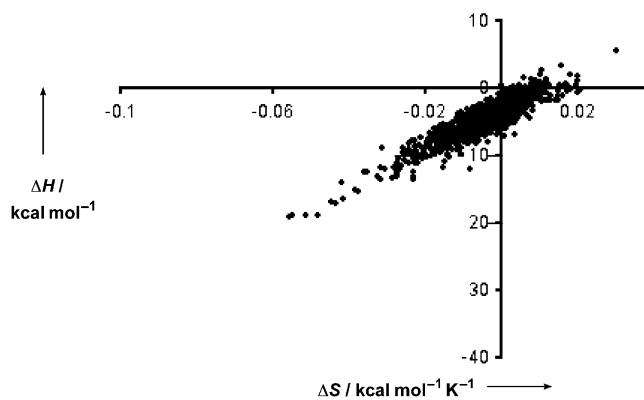


Abbildung 4. Auftragung von  $\Delta H$  gegen  $\Delta S$  für  $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\gamma$ -Cyclodextrin-Komplexe;<sup>[11]</sup> ein Geradenangleich ergibt  $\Delta H = 281.8 (\pm 4.1) \Delta S - 3.3 (\pm 0.0)$ .

aufgetragen, die für 1121 der Komplexe in Abbildung 3 gemessen wurden.<sup>[11]</sup> Es tritt ein starker Enthalpie-Entropie-Kompensationseffekt auf, sodass die Gibbs-Komplexierungsenergie stets etwa  $-3.5 \text{ kcal mol}^{-1}$  beträgt. Auftragungen dieses Typs wurden von Connors für einzelne Cyclodextrinklassen veröffentlicht.<sup>[8]</sup> Die Anordnung der Wertepaare könnte eine enge Beziehung zwischen der Stärke einer Bindung und den  $\Delta H$ - und  $\Delta S$ -Werten widerspiegeln. Alternativ könnte es auch ein fundamentales Prinzip geben, nach dem die  $\Delta G$ -Werte sämtlicher Komplexe etwa  $-3.5 \text{ kcal mol}^{-1}$  betragen; da  $\Delta G = \Delta H - T\Delta S$  ist, müsste  $\Delta H$  dann ungefähr  $(T\Delta S - 3.5) \text{ kcal mol}^{-1}$  betragen. Falls die Temperaturabhängigkeit von  $K_a$  nicht mit hoher Genauigkeit über einen großen Temperaturbereich messbar ist, können auch experimentelle Fehler für eine scheinbare Korrelation zwischen  $\Delta H$  und  $\Delta S$  verantwortlich sein. Auf diesen Punkt werden wir in Abschnitt 3.2 genauer eingehen.

### 2.1.2. Synthetische Wirte

Auch für viele andere neutrale Wirt-Gast-Komplexe in Wasser wurden experimentelle Daten gesammelt.<sup>[13-27]</sup> Ab-

bildung 5 enthält die Häufigkeitsverteilung der  $\lg K_a$ -Werte aller 973 Komplexe, deren Assoziationskonstanten in wässriger Lösung in Lit. [13-27] aufgeführt sind. Komplexe mit metallhaltigen Wirten und/oder geladenen Gastmolekülen wurden nicht berücksichtigt. Bei den Gästen handelt es sich meist um kleine neutrale organische Moleküle von Benzol-Derivaten bis zu Steroiden.

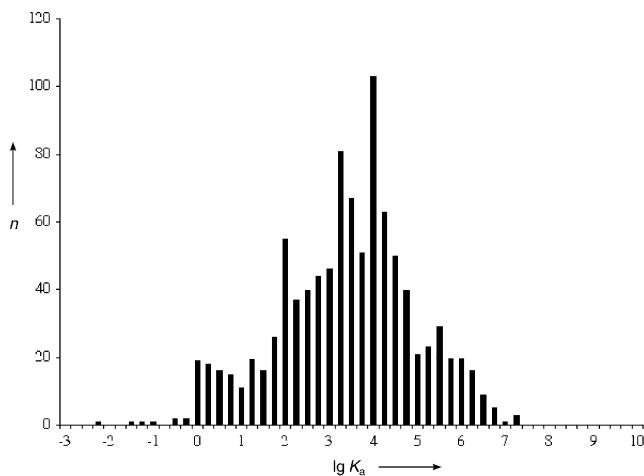
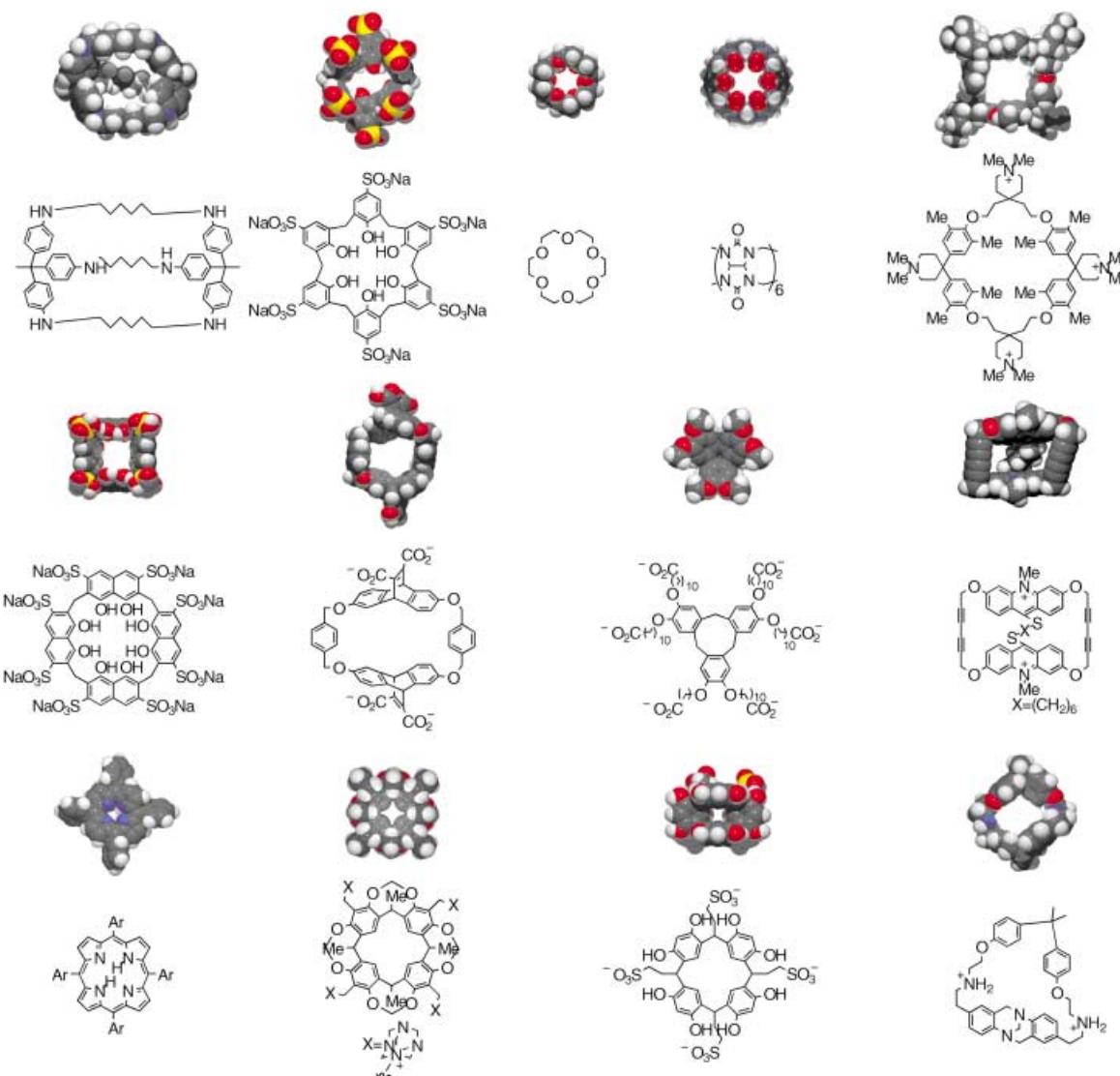


Abbildung 5. Häufigkeitsverteilung von Komplexen nichtcyclodextrinischer Wirte in wässriger Lösung auf Intervalle von  $\lg K_a$  ( $K_a = 10^{3.4 \pm 1.6} \text{ M}^{-1}$ ).<sup>[13-27]</sup>

Als Wirte wurden viele der bekanntesten organischen Rezeptoren eingesetzt, wobei einige erst durch spezielle Substituenten in eine wasserlösliche Form überführt wurden: Resorcinole,<sup>[13]</sup> Resorcinarene,<sup>[14]</sup> Cyclophane,<sup>[15]</sup> Azacyclophane,<sup>[16]</sup> Ammoniumcyclophane,<sup>[17]</sup> Kronenether und ihre Stickstoffanaloga (makrocyclische Polyamine),<sup>[18]</sup> Calixarene,<sup>[19]</sup> Dougherty-Cyclophane,<sup>[20]</sup> ein makrocyclisches Derivat der Trögerschen Base,<sup>[21]</sup> Flavinophane,<sup>[22]</sup> metallfreie Porphyrine,<sup>[23]</sup> Cyclotetrachromtropylen,<sup>[24]</sup> die Lehnschen Arenwirte,<sup>[25]</sup> Hexapus<sup>[26]</sup> und Cucurbituril<sup>[27]</sup> (siehe Abbildung 6). Die  $K_a$ -Werte liegen hauptsächlich im Bereich von 1 bis  $10^7 \text{ M}^{-1}$  (siehe Abbildung 5). Der statistische Wert von  $K_a$  ist  $10^{3.4 \pm 1.6} \text{ M}^{-1}$ , entsprechend einem  $\Delta G$ -Wert von  $-4.6 \pm 2.1 \text{ kcal mol}^{-1}$ . Die mittlere Bindungsenergie dieser synthetischen Wirte in Wasser ist nur etwa  $1 \text{ kcal mol}^{-1}$  größer als die der Cyclodextine, und die Werte dieser unterschiedlichen Wirtstypen streuen über einen etwas größeren Bereich.

Es gibt einige Ausnahmen von diesem allgemeinen Bild: Beispielsweise berichteten Whitesides et al. über eine hohe Assoziationskonstante von  $K_a = 10^{17} \text{ M}^{-1}$  bei einem synthetischen Wirt-Gast-Komplex.<sup>[28]</sup> In diesem Fall besteht das Wirtsmolekül allerdings aus drei Vancomycineinheiten an einem Arenkern, und der Gast enthält drei Peptideinheiten, die an die Vancomycinreste binden. Die Bindungsenergie pro Einheit ist in diesem System fast die gleiche wie bei einem einzelnen Vancomycin-Peptid-Komplex.<sup>[28]</sup> Die einzelne Wirt-Gast-Wechselwirkung in diesem und anderen polyvalenten Systemen ist somit in Einklang mit obigen Aussagen.

Bei den 58 Systemen, für die thermodynamische Daten bekannt sind, tritt ebenfalls eine Enthalpie-Entropie-Kompensation auf (Abbildung 7). Die Werte streuen deutlich

Abbildung 6. Beispiele wasserlöslicher nichtcyclodextrinischer Wirte von organischen Molekülen.<sup>[13-27]</sup>

stärker als bei den Cyclodextrinen, was auf die größeren Unterschiede der Wirtsmoleküle zurückgeführt werden kann. Angesichts dieser strukturellen Vielfalt ist die Verteilung der Bindungskonstanten aber bemerkenswert schmal.

### 2.1.3. Organische Wirt-Gast-Komplexe in nichtwässrigen Lösungsmitteln

Abbildung 8 zeigt eine Häufigkeitsverteilung der Bindungskonstanten von Komplexen aus organischen Wirten und kleinen neutralen organischen Gastmolekülen.<sup>[29]</sup> Für die 1710 berücksichtigten Komplexe ist  $K_a = 10^{2.2 \pm 1.6} \text{ M}^{-1}$ , entsprechend einer Gibbs-Bindungsenergie von  $-3.1 \pm 2.2 \text{ kcal mol}^{-1}$ . Die Streuung ähnelt der in wässriger Lösung, die Bindungskonstanten sind im Mittel aber etwa zehnmal kleiner. Einige Beispiele von Wirten sowie die Lösungsmittel, in denen die Bindungsenergien gemessen wurden, sind in Abbildung 9 wiedergegeben. Die Wirtsmoleküle ähneln den in Abschnitt 2.1.2 behandelten wasserlöslichen Wirten. Die

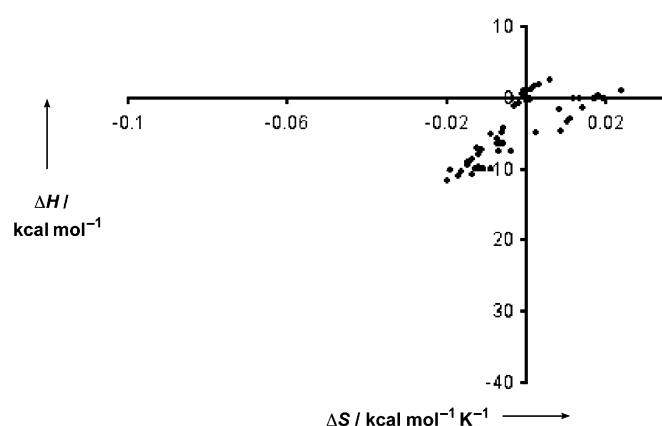


Abbildung 7. Auftragung von  $\Delta H$  gegen  $\Delta S$  für Komplexe aus organischen nichtcyclodextrinischen Wirten und Gästen in wässriger Lösung;<sup>[13-27]</sup> ein Geradenangleich ergibt  $\Delta H = 310.7 (\pm 33.2) \Delta S - 3.3 (\pm 0.4)$ .

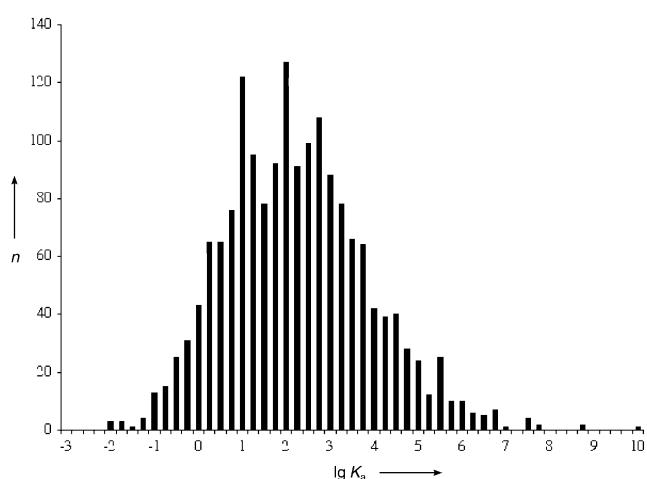


Abbildung 8. Verteilung von Komplexen organischer Wirte in nichtwässrigen Lösungsmitteln auf Intervalle von  $\lg K_a$  ( $K_a = 10^{2.2 \pm 1.6} \text{ M}^{-1}$ ).<sup>[29]</sup>

mittlere Differenz von  $1.5 \text{ kcal mol}^{-1}$  zwischen den Gibbs-Bindungsenergien in Wasser und in organischen Lösungsmitteln unterstreicht den Einfluss hydrophober Effekte auf die Komplexstabilität. Bei den 276 Fällen, für die entsprechende Daten veröffentlicht wurden, tritt erneut eine Enthalpie-Entropie-Kompensation auf (Abbildung 10).<sup>[29]</sup>

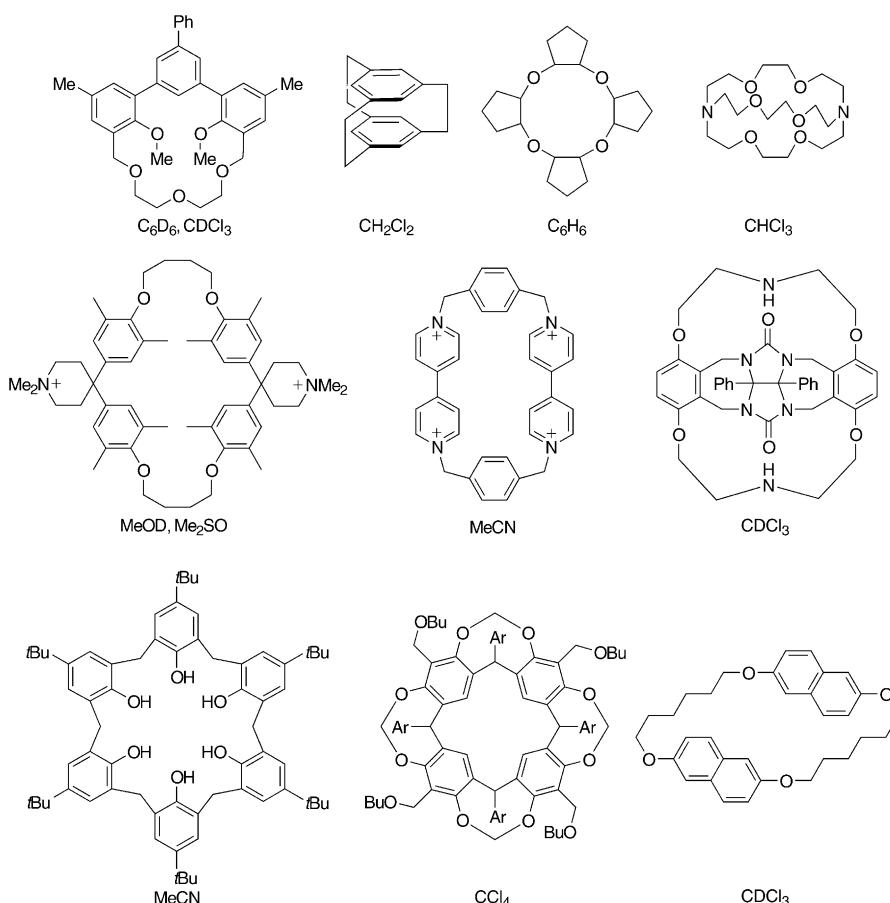


Abbildung 9. Beispiele von Wirten für organische Moleküle in nichtwässrigen Lösungen. Die Gleichgewichtskonstanten wurden in den genannten Lösungsmitteln gemessen.<sup>[29]</sup>

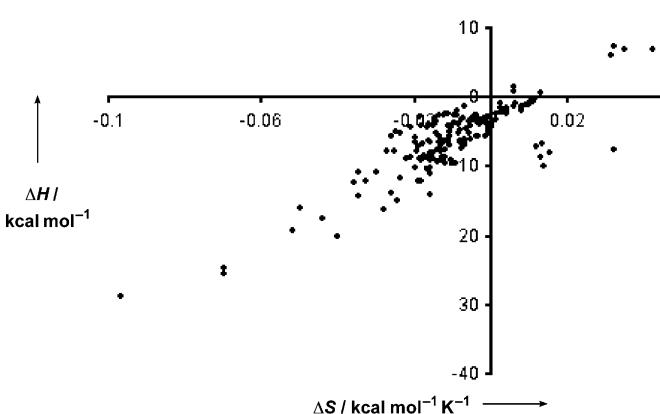


Abbildung 10. Auftragung von  $\Delta H$  gegen  $\Delta S$  für Komplexe aus organischen Wirt- und Gastmolekülen in nichtwässrigen Lösungen.<sup>[29]</sup> Ein Geradenangleich ergibt  $\Delta H = 229.9(\pm 11.0) \Delta S - 3.2(\pm 0.2)$ .

## 2.2. Bindungskonstanten von Proteinen

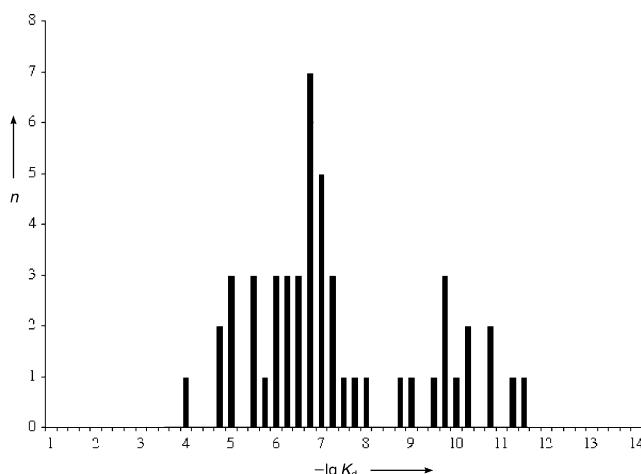
### 2.2.1. Antikörper-Antigen-Komplexe

Antikörper werden vom Immunsystem von Säugern produziert, um Fremdstoffe und Fragmente von Bakterien und Viren zur späteren Entfernung und Zerstörung zu komplexieren und zu markieren. Die sechs hochvariablen Schlaufen der Antikörperbindungtaschen enthalten ungefähr 100 Aminosäurereste. Die Affinitäten ( $K_d^{-1}$ ) reifer Antikörper für natürliche Antigene (hauptsächlich immunogene organische Moleküle, Proteine, Kohlenhydrate und Nucleinsäurefragmente) verteilen sich über einen weiten Bereich von  $10^4$  bis  $10^{14} \text{ M}^{-1}$ . Die  $\Delta G$ -Werte erreichen im günstigsten Fall  $-19 \text{ kcal mol}^{-1}$ .<sup>[30]</sup>

Basierend auf dem begrenzten Satz verfügbarer Daten wurde eine Häufigkeitsverteilung erstellt.<sup>[31]</sup> Die Bindungsdaten wurden in zwei Gruppen aufgeteilt: Abbildung 11 enthält die Daten von Antikörperkomplexen mit organischen Molekülen, Abbildung 13 die von Antikörper-Protein- und Antikörper-Oligosaccharid-Komplexen. Unter den untersuchten Antikörpern befinden sich ganze Immunglobuline (speziell Immunglobulin G, IgG), Fab- und einkettige Fv-Regionen. Es wurde nicht versucht, potenziell geladene Haptene von den Auftragungen auszuschließen.

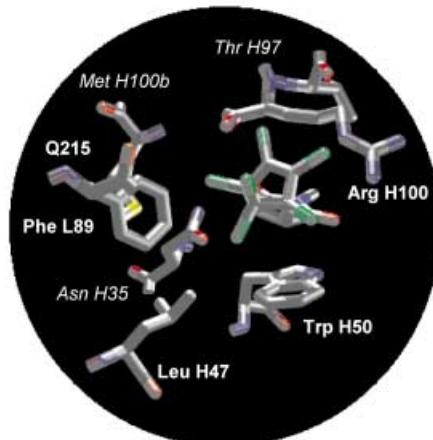
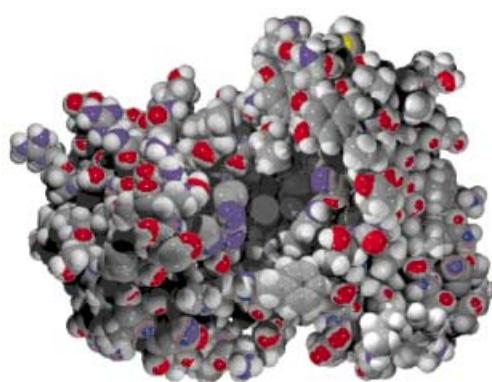
Für Komplexe von Antikörpern mit organischen Molekülen wurden typische  $K_a$ -Werte von  $10^{7.3 \pm 1.9} \text{ M}^{-1}$  bestimmt. Dies entspricht einer Gibbs-Bindungsenergie von  $-10 \pm 3 \text{ kcal mol}^{-1}$ , was etwa dem doppelten Wert der in Abschnitt 2.1.1 beschriebenen Komplexe aus Cyclodextrinen und synthetischen Wirten entspricht.

In Abbildung 12 sind unterschiedliche Ansichten einer typischen Antikörperbindungstasche mit und ohne komplexiertem



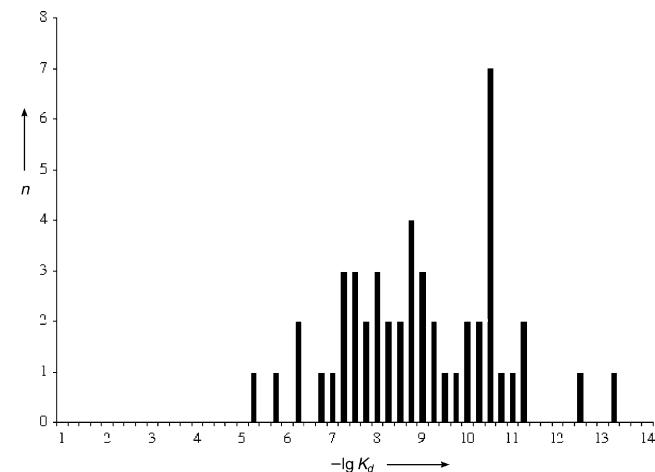
**Abbildung 11.** Verteilung der Antikörper-Antigen-Komplexe auf Intervalle von  $-\lg K_d$  ( $=\lg K_a$ ) ( $K_a=10^{7.3 \pm 1.9} \text{ M}^{-1}$ ).<sup>[31]</sup> Die hier erfassten Antigene sind relativ kleine organische Moleküle, Daten für Proteine und Kohlenhydrate wurden ausgeschlossen.

Hapten dargestellt.<sup>[32]</sup> Die Abmessungen der Fab-Region von Antikörpern übersteigen die der synthetischen Wirtse, im Übrigen ähneln sich die Hohlräume der Wirtse aber, da beide Typen weitgehend analog aus hydrophoben Gruppen bestehen.

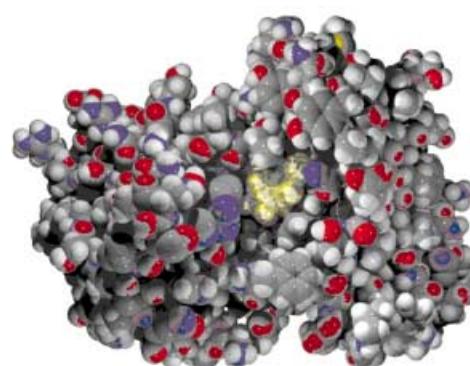
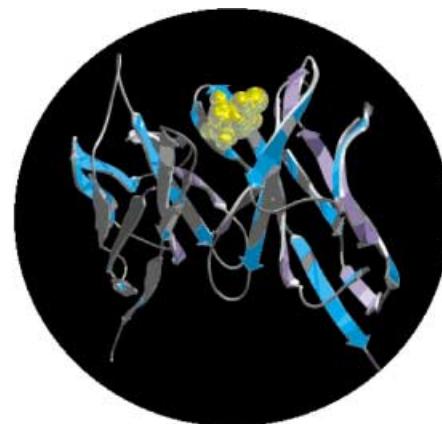


**Abbildung 12.** Darstellungen des katalytischen Antikörpers 1E9. Oben links: Kalottenmodell der leeren Bindungsstelle; oben rechts: Bändermodell des Antikörpers mit Kalottenmodell des komplexierten Haptons; unten links: Bindungsstelle mit komplexiertem organischem Hapton; unten rechts: Kalottenmodell der Bindungsstelle mit Kalottenmodell (gelb) des komplexierten Haptons.<sup>[32]</sup>

Die Bindung in Antikörper-Protein- und Antikörper-Oligosaccharid-Komplexen ist stärker ( $K_a=10^{8.9 \pm 1.7} \text{ M}^{-1}$ , Abbildung 13). Diese Fragmenttypen sind die natürlichen Liganden von Antikörpern in vivo. Die Bindungsstellen von Antikörpern für Proteine und Kohlenhydrate sind größer und flacher als die für kleine organische Moleküle.<sup>[2,33]</sup> Die

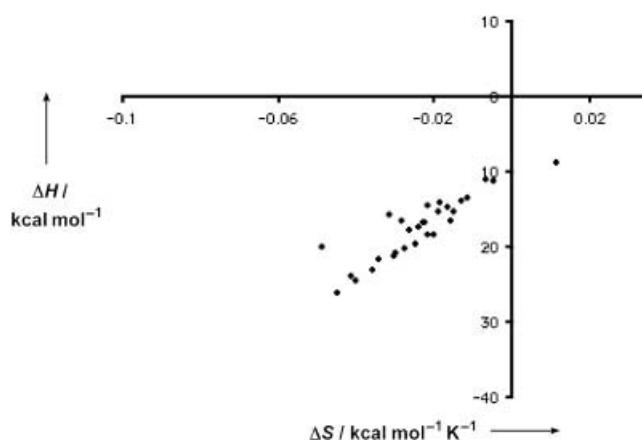


**Abbildung 13.** Verteilung der Antikörper-Antigen-Komplexe von Proteinen und Kohlenhydraten auf Intervalle von  $-\lg K_d$  ( $=\lg K_a$ ) ( $K_a=10^{8.9 \pm 1.7} \text{ M}^{-1}$ ).<sup>[31]</sup>



Bindungskonstanten  $K_a$  können in zwei Geschwindigkeitskonstanten zerlegt werden, in die der Bindung ( $k_1$ ) und der Freisetzung ( $k_{-1}$ ). Es gilt:  $K_a = k_1 k_{-1}^{-1}$ . Für Antikörper ist  $k_1$  etwa  $10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ .<sup>[2]</sup> Die Bindung verläuft somit etwa 100-mal langsamer als die Diffusion in Wasser, kann aber dennoch als sehr schnell aufgefasst werden, da die Bindungstasche beim Bindungsprozess desolvatisiert und zu einem gewissen Ausmaß reorganisiert werden muss.  $k_{-1}$  ist typischerweise  $10^{-1} \text{ s}^{-1}$ ,<sup>[34a]</sup> sodass die Bindungskonstanten der Antikörper-Antigen-Komplexe etwa  $10^7$ – $10^{12} \text{ M}^{-1}$  betragen.

In dem begrenzten Satz von nur 30 Systemen mit verfügbaren Daten kann Enthalpie-Entropie-Kompensation nachgewiesen werden (Abbildung 14). Bei den Komplexen,

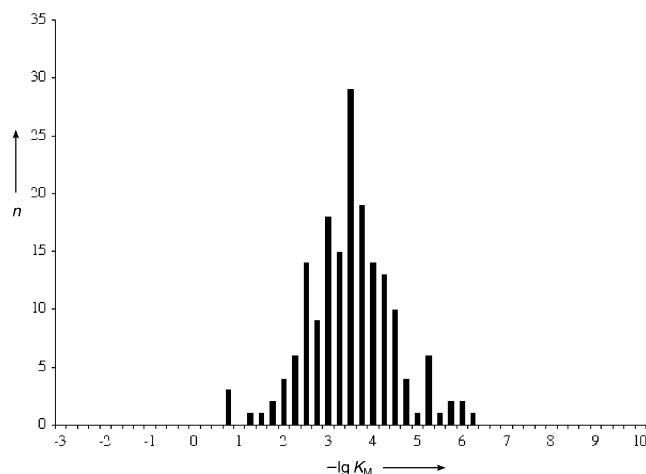


**Abbildung 14.** Auftragung von  $\Delta H$  gegen  $\Delta S$  für Antikörper-Antigen-Komplexe.<sup>[31]</sup> ein Geradenangleich ergibt  $\Delta H = 296.9(\pm 28.2) \text{ } \Delta S - 10.5(\pm 0.8)$ .

deren Temperaturabhängigkeit der Bildung untersucht wurde, variierten die Bindungsenthalpien  $\Delta H$  zwischen  $-28$  und  $-8 \text{ kcal mol}^{-1}$ . Die Assoziationsenergien werden allerdings durch die Enthalpie-Entropie-Kompensation begrenzt. Die Bindungskonstanten wurden in einem sehr schmalen Temperaturbereich gemessen, weshalb eine beträchtliche Ungenauigkeiten der Daten angenommen wird. Dies kann zu einer scheinbaren Enthalpie-Entropie-Kompensation beitragen (siehe Abschnitt 3.2).

Katalytische Antikörper wie 1E9 (Abbildung 12) werden vom Immunsystem als Antwort auf kleine stabile Moleküle (Haptene) produziert, die Analoga der Übergangszustände organischer Reaktionen sind. Haptene docken an Proteine wie Keyhole-Limpet-Hämocyanin oder Rinderserumalbumin und induzieren die Antikörperproduktion. Einige dieser Antikörper können eine selektive Affinität für Übergangszustände aufweisen und als Katalysatoren fungieren. Katalytische Antikörper für eine Reihe von organischen Reaktionen wurden bereits entwickelt.<sup>[3]</sup> Zur kinetischen Analyse wurden die Michaelis-Menten-Parameter gemessen. Die Michaelis-Konstante ( $K_M$ ) bildet einen oberen Grenzwert für die Dissoziationskonstante des Substrats. Es gilt:  $K_M = (k_{-1} + k_{\text{cat.}}) k_1^{-1}$ , mit  $K_d = k_{-1} k_1^{-1}$ . Wenn die Geschwindigkeitskon-

stante der Reaktion des Protein-Substrat-Komplexes ( $k_{\text{cat.}}$ ) klein ist gegen die Geschwindigkeitskonstante der Dissoziation ( $k_{-1}$ ), dann ist  $K_M$  eine gute Näherung für  $K_d$ . Andernfalls ist  $K_d$  kleiner als der experimentelle Wert von  $K_M$ . Auf der Basis von 175 Werten aus der Übersicht von Blackburn et al. wurde für katalytische Antikörper ein Wert für  $K_M^{-1}$  von  $10^{3.5 \pm 1.0} \text{ M}^{-1}$  ermittelt (Abbildung 15).<sup>[3a]</sup> Die Bindungsstärke

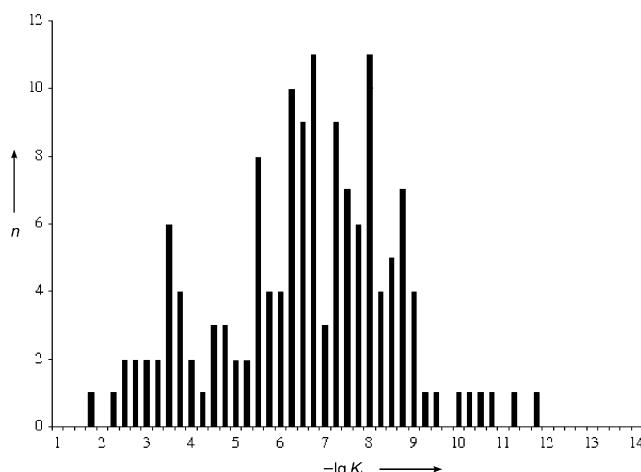


**Abbildung 15.** Verteilung der Komplexe aus katalytischen Antikörpern und Substraten auf Intervalle von  $-\lg K_M$  ( $K_a = 10^{3.5 \pm 1.0} \text{ M}^{-1}$ ).<sup>[3a]</sup>

hat somit die gleiche Größenordnung wie die einfacher Komplexe von Cyclodextrinen und synthetischen Wirten in Wasser.

Zur Beschreibung der „Katalyseleistung“ („catalytic proficiency“) führte Wolfenden die Größe  $K_{tx}^{-1}$  ein ( $K_{tx}^{-1} = k_{\text{cat.}} K_M^{-1} k_{\text{uncat.}}^{-1}$ ; Dimension  $\text{M}^{-1}$ ).  $K_{tx}^{-1}$  beschreibt die hypothetische Bindungsaffinität eines Antikörpers oder Enzyms für einen Übergangszustand.<sup>[34b]</sup>  $K_{tx}$  wurde auch als Dissoziationskonstante des Enzym-Übergangszustands-Komplexes interpretiert. Da Übergangszustände nur eine Lebensdauer von  $10^{-13} \text{ s}$  haben, ist ein Gleichgewicht zwischen einem Übergangszustand in Wasser und einem Übergangszustand am Enzym nicht möglich. Der hypothetische Gleichgewichtszustand kann über einen thermodynamischen Kreisprozess simuliert werden, der wiederum aus der Kinetik der katalysierten und der unkatalysierten Reaktion abgeleitet wird.

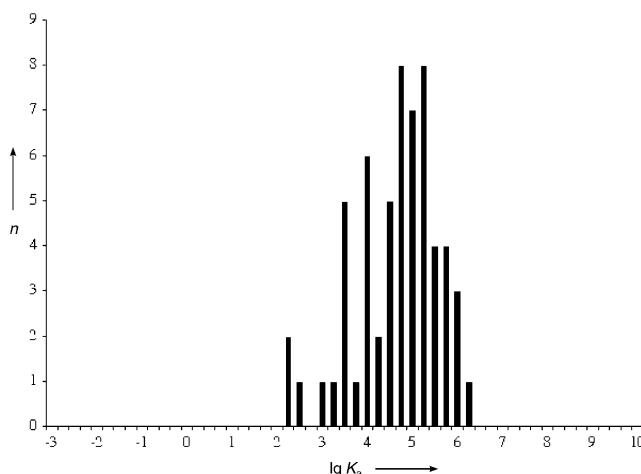
Abbildung 16 gibt die Bindungskonstanten  $K_{tx}^{-1}$  von Übergangszuständen Antikörper-katalysierter Reaktionen wieder, die aus den Daten von Blackburn et al. abgeleitet wurden.<sup>[3a]</sup> Der Mittelwert von  $K_{tx}^{-1}$  ist  $10^{6.6 \pm 2.0} \text{ M}^{-1}$ , die entsprechende Bindungsenthalpie beträgt  $-9.0 \pm 2.7 \text{ kcal mol}^{-1}$ . Die Übergangszustände typischer Antikörper-katalysierter Reaktionen werden somit etwa 1000-mal stärker gebunden als die Substrate. Dieser Mittelwert für die Reaktionsbeschleunigung durch katalytische Antikörper wurde aus einem Vergleich von Mittelwerten erhalten; durch Vergleich individueller Antikörper kommt man zum gleichen Wert. Übergangszustände werden geringfügig schwächer gebunden als Antikörper und kleine immunogene organische Haptene ( $10^{7.3} \text{ M}^{-1}$ ).



**Abbildung 16.** Verteilung der Bindungskonstanten von Komplexen katalytischer Antikörper mit Übergangszuständen auf Intervalle von  $-\lg K_{tx}$  ( $= \lg K_a$ ) ( $K_a = 10^{6.6 \pm 2.0} \text{ M}^{-1}$ ).<sup>[3a]</sup>

## 2.2.2. Albumin- und andere Protein-Ligand-Komplexe

Albumine sind Proteine, die in der Blutbahn kleine Moleküle transportieren.<sup>[35]</sup> Gute Transportproteine müssen gute Bindungs- und gute Freisetzungseigenschaften aufweisen, sodass die Bindungskonstanten nur wenig größer sind als die der in Abschnitt 2.1.2 beschriebenen synthetischen Wirt-Gast-Systeme. Abbildung 17 enthält eine Übersicht über die gemessenen Bindungskonstanten von Albuminen. Es sind nur 59 Werte verfügbar, aus denen für die Bindungskonstante ein Mittelwert von  $10^{4.6 \pm 0.9} \text{ M}^{-1}$  erhalten wurde.



**Abbildung 17.** Verteilung der Albumin-Gast-Komplexe auf Intervalle von  $\lg K_a$  ( $K_a = 10^{4.6 \pm 0.9} \text{ M}^{-1}$ ).<sup>[35]</sup>

Die Bindung durch Albumine ist relativ unspezifisch. Eine typische Bindungsstelle eines Albumins ist in Abbildung 18 wiedergegeben.<sup>[36]</sup> Albumine weisen im Allgemeinen eine Anzahl unterschiedlicher Bindungsstellen am gleichen Protein auf. Eine der sechs nachgewiesenen Bindungstaschen des menschlichen Serumalbumins zur Bindung der Fettsäure

Myristinsäure ist in Abbildung 18 hervorgehoben. Die globale Struktur des Proteins mit allen Bindungsstellen wird ebenfalls dargestellt.

Die Untersuchung von Protein-Ligand-Bindungen ist Gegenstand eines schnell wachsenden und umfangreichen Forschungsgebietes. Wir wollen uns daher auf einige bekannte oder sehr starke Wechselwirkungen beschränken, um die wesentlichen Unterschiede zu den anderen in diesem Aufsatz behandelten Systemen zu verdeutlichen. Die stärksten und bekanntesten Proteinkomplexe mit relativ einfachen organischen Molekülen treten bei der Bindung von Biotin durch Avidin und Streptavidin auf (Abbildung 19).<sup>[37]</sup> Die Assoziationskonstante des Streptavidin-Biotin-Komplexes beträgt  $2.5 \times 10^{13} \text{ M}^{-1}$ , die Gibbs-Bindungsenergie  $-18 \text{ kcal mol}^{-1}$ . Der  $\Delta G$ -Wert des Avidin-Biotin-Komplexes beträgt sogar  $-21 \text{ kcal mol}^{-1}$ .<sup>[38]</sup> Wichtiger Bestandteil des Bindungsvorgangs ist eine Aufklappbewegung des Proteins, die die Bindung von Biotin erleichtert.

Ein wegen seiner breiten Bindungsspezifität für Wirkstoffe in jüngster Zeit intensiv untersuchtes Substrat<sup>[37]</sup> ist der Pregnan-X-Rezeptor (pregnane xenobiotic receptor, PXR), der an Wirkstoff-Wirkstoff-Wechselwirkungen beteiligt ist. Seine Kristallstruktur wurde aufgeklärt.<sup>[38b]</sup> PXR weist einen großen Hohlraum und flexible „Klappen“ auf, sodass vielfältige Gastmoleküle gebunden werden können. Für Liganden wie Hyperforin (Abbildung 19) wurden typische Dissoziationskonstanten von  $27 \text{ nm}$ , entsprechend einer Gibbs-Bindungsenergie von  $-11 \text{ kcal mol}^{-1}$  gemessen.<sup>[38]</sup>

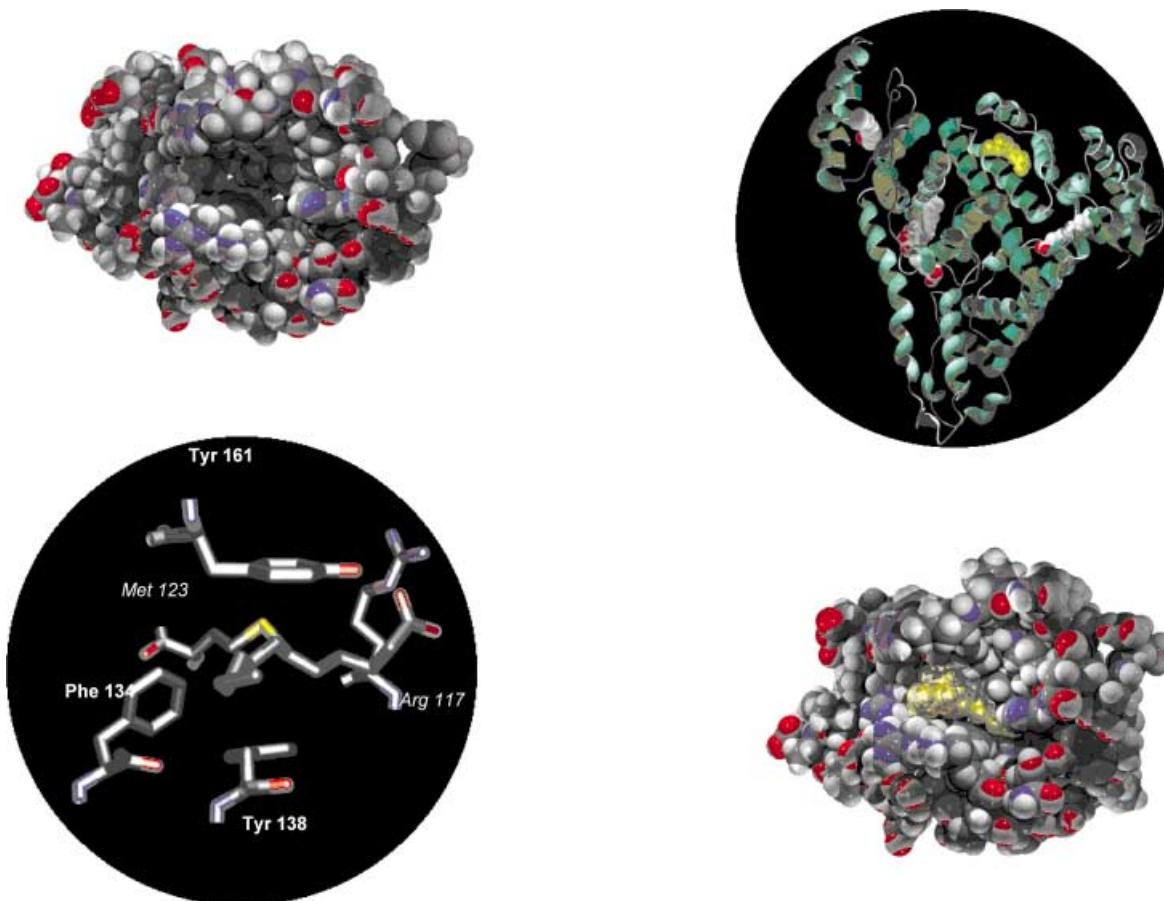
## 2.2.3. Enzym-Substrat-Komplexe

Die Dissoziationskonstanten von Enzym-Substrat-Komplexen,  $K_S = [\text{Enzym}][\text{Substrat}][\text{Enzym-Substrat}]^{-1}$ , wurden nur in wenigen Fällen experimentell bestimmt, die kinetischen Michaelis-Menten-Parameter sind aber für die meisten Enzyme bekannt. Wie bei den katalytischen Antikörpern wurden die  $K_M$ -Werte der Enzyme als Näherung der Dissoziationskonstanten der Substrate eingesetzt.

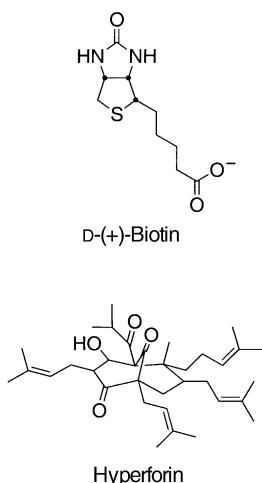
Eine Übersicht über die  $K_M$ -Werte von nahezu 22000 Enzymen liegt vor.<sup>[39]</sup> Abbildung 20 zeigt die Häufigkeitsverteilung der Werte von  $K_M^{-1}$ , einem Maß für die Enzym-Substrat-Assoziation. Auch hier tritt die von den organischen Wirt-Gast-Komplexen bekannte Verteilung auf. Wir haben nicht versucht, geladene Substrate auszuschließen, sodass die Bindungszentren in einigen Fällen Metallionen enthalten.

Verglichen mit anderen Wirten weisen Enzyme keine herausragenden Bindungseigenschaften für ihre Substrate auf. Der Mittelwert von  $K_M^{-1}$  beträgt  $10^{3.7 \pm 1.3} \text{ M}^{-1}$ , und für 95 % aller analysierten Werte liegt  $K_M^{-1}$  zwischen  $10^1$  und  $10^6 \text{ M}^{-1}$  ( $K_M = 100 \text{ mM}$  bis  $1 \mu\text{M}$ ). Die Gibbs-Bindungsenergien von Enzymen für Substrate betragen somit  $-5.1 \pm 1.7 \text{ kcal mol}^{-1}$ . Dieser Wert verdeutlicht, dass das Vermögen von Enzymen, Reaktionen zu katalysieren, aus der Bindung von Übergangszuständen und nicht aus der Bindung von Substraten herrührt (Näheres siehe Abschnitt 2.2.4).

Es wurde vermutet, dass Enzyme im Verlauf der Evolution  $K_M$ -Werte im  $\text{mM}$ - bis  $\mu\text{M}$ -Bereich hervorgebracht haben, um die unter physiologischen Bedingungen niedrigen Substratkonzentrationen  $[S]$  auszugleichen. Solange  $K_M$  größer

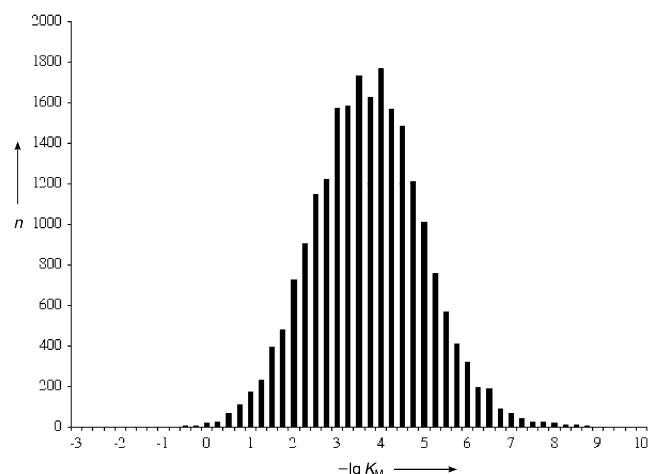


**Abbildung 18.** Darstellungen von Albumin. Oben links: Kalottenmodell der leeren Bindungsstelle; oben rechts: Bändermodell von Albumin mit Kalottenmodell des Liganden Myristinsäure, der in unterschiedlichen Bindungstaschen gebunden ist; unten links: Bindungsstelle mit komplexierter Myristinsäure; unten rechts: Kalottenmodell der Bindungsstelle mit Kalottenmodell (gelb) der komplexierten Myristinsäure.<sup>[36]</sup>



**Abbildung 19.** Formeln von Biotin und Hyperforin.

ist als  $[S]$ , wird die Geschwindigkeit der katalysierten Reaktion vom Verhältnis der Gibbs-Energien des Enzym-Übergangszustands-Komplexes und der getrennten Enzym- und Substratmoleküle in Lösung bestimmt.<sup>[4b]</sup>



**Abbildung 20.** Verteilung der Enzym-Substrat-Komplexe auf Intervalle von  $-\lg K_M$  ( $K_a = 10^{3.7 \pm 1.3} \text{ M}^{-1}$ ).<sup>[39]</sup>

## 2.2.4. Komplexierung von Übergangszuständen und ihren Analogen durch Enzyme und Wirkstoff-Rezeptor-Bindung

Die Assoziationskonstanten der bislang beschriebenen Systeme liegen größtenteils im Bereich von  $10^1$  bis  $10^6 \text{ M}^{-1}$ , mit

einem Mittelwert von  $10^{3.5} \text{ M}^{-1}$ . Antikörper-Antigen-Komplexe, speziell solche mit Proteinen und Kohlenhydraten, sind Ausnahmen und weisen häufig größere Bindungskonstanten zwischen  $10^6$  und  $10^{12} \text{ M}^{-1}$  auf.

Für eine wirksame Katalyse müssen Übergangszustände stärker als Substrate oder stabile Moleküle gebunden werden.<sup>[4c]</sup> Für katalytische Antikörper gilt wie geschildert  $K_{tx}^{-1} = 10^{6.6 \pm 2.0} \text{ M}^{-1}$  (siehe Abbildung 16, Abschnitt 2.2.1),<sup>[3]</sup> während  $K_M^{-1} = 10^{3.5 \pm 1.0} \text{ M}^{-1}$  beträgt (Abbildung 15). Daraus ergibt sich eine mittlere Beschleunigung Antikörper-katalysierter Reaktionen um einen Faktor  $10^3$ .

In der BRENDA-Datenbank sind Tausende von  $k_{cat}$ -Werten für Enzyme verfügbar,<sup>[39]</sup>  $k_{uncat}$  wurde dagegen weitaus seltener bestimmt. Viele der dort hinterlegten Daten wurden von Wolfenden bestimmt und zusammengestellt, und die Berechnung der in Abbildung 21 dargestellten

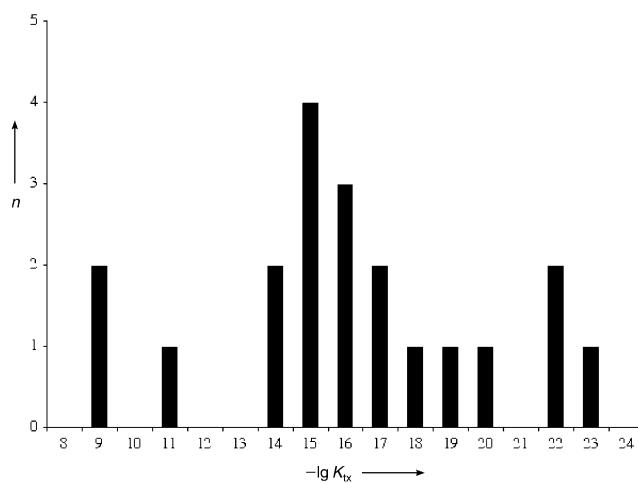


Abbildung 21. Verteilung der Enzym-Übergangszustands-Komplexe auf Intervalle von  $-\lg K_{tx}$  ( $K_a = 10^{16.0 \pm 4.0} \text{ M}^{-1}$ ).<sup>[40]</sup>

$K_{tx}^{-1}$ -Werte basieren größtenteils auf diesen Daten.<sup>[40]</sup> Der Mittelwert von  $K_{tx}^{-1}$  für Enzyme von  $10^{16.0 \pm 4.0} \text{ M}^{-1}$  entspricht einer mittleren Gibbs-Bindungsenergie von  $22 \text{ kcal mol}^{-1}$ , es treten aber Werte bis zu  $32 \text{ kcal mol}^{-1}$  auf.<sup>[34b, 40]</sup> Das Produkt  $k_{cat} k_{uncat}^{-1}$  kann durch  $K_M K_{tx}^{-1}$  ausgedrückt werden. Der Mittelwert für  $K_M$  ist  $10^{-3.7} \text{ M}$  (siehe oben). Der Mittelwert von  $k_{cat} k_{uncat}^{-1}$  von  $10^{12}$  entspricht daher einer um  $13 \text{ kcal mol}^{-1}$  höheren Gibbs-Energie der Bindung von Enzymen mit Übergangszuständen als mit Substraten. Auf die möglichen Ursachen dafür gehen wir in Abschnitt 5 ein.

Übergangszustands-Mimetika dienen als Enzym-Inhibitoren und können ebenfalls außerordentlich hohe Bindungsaffinitäten aufweisen. Abbildung 22 zeigt die kinetisch bestimmte Häufigkeitsverteilung der Dissoziationskonstanten von Enzym-Inhibitor-Komplexen,  $K_I$ . Die Daten wurden als Reziprokwerte  $K_I^{-1}$  eingesetzt, um die Assoziation der Inhibitoren mit Enzymen auszudrücken. Die Werte stammen aus einer Studie, in der besonders wirksame, hoch affine Inhibitoren eingesetzt wurden.<sup>[41a]</sup> Zahlreiche Inhibitoren mit niedrigeren Affinitäten wurden in das Diagramm nicht aufgenommen, daher liegt keine wahre statistische Verteilung

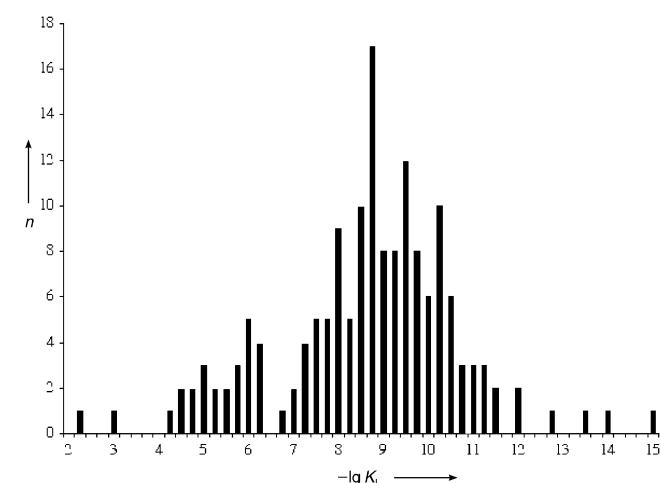


Abbildung 22. Verteilung der Enzym-Inhibitor-Komplexe auf Intervalle von  $-\lg K_I$  ( $K_a = 10^{8.6 \pm 2.1} \text{ M}^{-1}$ ).<sup>[41a]</sup> Die Werte wurden unter Verwendung der wirksamsten bekannten Inhibitoren einer Vielfalt von Proteinen erhalten.

vor. Die Verteilung spiegelt aber gut das Bindungsverhalten stabiler neutraler Substanzen wider, die Übergangszustände imitieren und an aktive Zentren binden. Der Mittelwert der Assoziationskonstanten dieser hoch wirksamen Inhibitoren beträgt  $10^{8.6 \pm 2.1} \text{ M}^{-1}$ , wobei 91 % der Komplexe im Bereich zwischen  $10^5$  und  $10^{13} \text{ M}^{-1}$  liegen. Kollman und Kuntz gaben an, dass die „maximale Affinität von Liganden“ (Wirkstoffen und Inhibitoren) für Rezeptoren und Enzyme einer Gibbs-Bindungsenergie  $\Delta G$  von etwa  $-15 \text{ kcal mol}^{-1}$  ( $K_I^{-1} = 10^{11} \text{ M}^{-1}$ ) entspricht. Sie stellten fest, dass bei Liganden mit bis zu zehn Schweratomen (Nichtwasserstoffatomen) ca.  $1.5 \text{ kcal mol}^{-1}$  an Gibbs-Bindungsenergie auf jedes Schweratom entfällt. Bei größeren Molekülen fällt der  $\Delta G$ -Wert pro Schweratom ab und erreicht ein Maximum von  $15 \text{ kcal mol}^{-1}$ . Es sind nur wenige Ausnahmen bekannt, die diesen Wert überschreiten, z. B. der erwähnte Biotin-Streptavidin-Komplex.<sup>[41a]</sup> Die Inhibitoren mit maximaler Affinität binden im Mittel  $10^6$ -mal schwächer an Enzyme als der Übergangszustand.

Gilli et al. bestimmten die thermodynamischen Daten der Bindung von 136 Wirkstoffen an 13 Rezeptoren (zehn Membranrezeptoren, zwei Enzyme und ein DNA-Molekül).<sup>[41b]</sup> Die aus diesen Daten erhaltene Häufigkeitsverteilung für 176 Rezeptor-Wirkstoff-Komplexe ist in Abbildung 23 wiedergegeben. Die mittlere Assoziationskonstante  $K_I^{-1}$  ist mit  $10^{7.3 \pm 1.5} \text{ M}^{-1}$  geringfügig niedriger als die von Kuntz et al. erhaltenen Werte. Gilli et al. wählen die Datensätze nach der Verfügbarkeit thermodynamischer Daten aus Van't Hoff-Diagrammen aus.

Eine Auftragung von  $\Delta H$  gegen  $\Delta S$  für diese Komplexe ist in Abbildung 24 wiedergegeben. Die mittlere Bindungsenthalpie der Wirkstoffe beträgt  $-9.5 \text{ kcal mol}^{-1}$ , entsprechend einem Wert für  $-\lg K_d$  von 7, bei einer Verteilung der Bindungsaffinitäten  $-\lg K_d$  zwischen 4 ( $\Delta G = -5.4 \text{ kcal mol}^{-1}$ ) und 11 ( $\Delta G = -15.0 \text{ kcal mol}^{-1}$ ). Gilli et al. postulierten, dass der maximal erreichbare Wert von  $K_d^{-1}$  aufgrund der Enthalpie-Entropie-Kompensation bei  $10^{-11} \text{ M}^{-1}$  liegt.<sup>[41b]</sup>

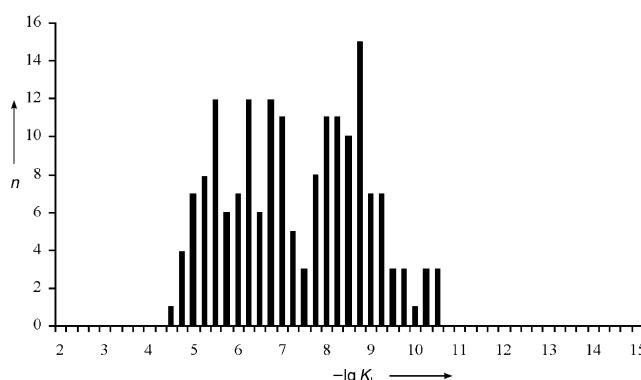


Abbildung 23. Verteilung der Rezeptor-Wirkstoff-Komplexe auf Intervalle von  $-\lg K_a$  ( $K_a = 10^{7.3 \pm 1.5} \text{ M}^{-1}$ ).<sup>[41b]</sup>

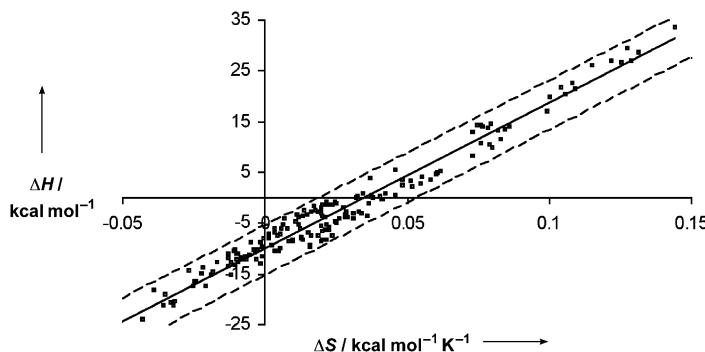


Abbildung 24. Auftragung der Standardenthalpien  $\Delta H$  gegen die Standardentropien  $\Delta S$  nach Gilli et al.<sup>[41b]</sup> Die Daten stammen aus Van't Hoff-Diagrammen der Bindungsgleichgewichte von 176 Rezeptor-Wirkstoff-Komplexen. Die beiden gestrichelten Linien geben die Punkte an, an denen die Dissoziationskonstanten  $K_d$  der Makromolekül-Ligand-Komplexe 10 pm und 100  $\mu\text{m}$  betragen; die durchgezogene Linie ist die Regressionsgerade ( $\Delta H = 285.6 (\pm 3.9) \Delta S - 9.9 (\pm 0.2)$ ) mit einer Korrelation von 0.981.<sup>[41b]</sup> Genehmigter Nachdruck aus *J. Phys. Chem.* 1994, 98, 1515–1518. Copyright 1994 American Chemical Society.

### 2.3. Bindungstärke von Wirt-Gast-Komplexen:

#### Zusammenfassung

##### 2.3.1. Trends in der Größe von Bindungskonstanten

Tabelle 1 fasst die Daten der Verteilungsdiagramme (Abbildungen 3, 5, 8, 11, 13, 15–17, 20–23) zusammen. Abbildung 25 zeigt eine überlagerte Darstellung dieser Diagramme, wobei die Daten für nichtwässrige Lösungsmittel (Abbildung 8) weggelassen wurden. Für alle Wirtstypen werden die Bindungskonstanten in Abbildung 25 durch idealisierte Normalverteilungen dargestellt. Die Fläche unter allen Kurven wurde normiert (die Maxima liegen beim Mittelwert von  $K_a$ ) und

die Breite der Kurven wurde aus den Standardabweichungen ermittelt.

Die Assoziationskonstanten der unterschiedlichen Wirtsklassen gruppieren sich in mehrere klar abgegrenzte Bereiche. Komplexe von Cyclodextrinen, synthetischen Wirten in Wasser, von katalytischen Antikörpern und Enzymen mit Substraten sowie von Albumin mit organischen Gastmolekülen weisen Dissoziationskonstanten zwischen  $10^{-2.4}$  und  $10^{-4.6} \text{ M}$  auf. Wir nennen diese Werte „millimolare Komplexbildner“. Die große Mehrzahl ihrer Komplexe mit neutralen organischen Molekülen haben dezimolare ( $10^{-1} \text{ M}$ ) bis mikromolare ( $10^{-6} \text{ M}$ ), im Mittel somit millimolare ( $10^{-3} \text{ M}$ ) Dissoziationskonstanten. Zur zweiten Gruppe von Komplexen mit Werten von  $10^{-6.6}$  bis  $10^{-8.6} \text{ M}$  gehören Komplexe katalytischer Antikörper mit Übergangszuständen, von Antikörpern mit kleinen organischen und Biomolekülen, Rezeptor-Wirkstoff-Komplexe und Enzym-Inhibitor-Komplexe. Ihre relativ starke Bindung äußert sich in mikromolaren bis nanomolaren Dissoziationskonstanten. Zweckmäßig werden die Antikörper-Hapten- und die Antikörper-Übergangszustands-Bindung als mikromolar und die Antikörper-Biomolekül- und Enzym-Inhibitor-Bindung als nanomolar klassifiziert, während die Rezeptor-Inhibitor-Bindung eine Zwischenstellung einnimmt. Die stärksten Bindungen treten bei den Enzym-Übergangszustands-Komplexen auf, die eine gesonderte Klasse bilden. Mit einer mittleren Assoziationskonstanten von  $10^{16 \pm 4} \text{ M}^{-1}$  weisen die meisten Enzym-Übergangszustands-Komplexe Dissoziationskonstanten im pikomolaren ( $10^{-12} \text{ M}$ ) bis zeptomolaren ( $10^{-21} \text{ M}$ ) Bereich auf. Wir nennen diese Klasse allgemein „femtomolar“ ( $10^{-15} \text{ M}$ ). Ihre erstaunlich großen Bindungskonstanten sind das Ergebnis von Milliarden Jahren Evolution effizienter Katalysatoren. Diese Bindungskonstanten spiegeln dynamische Prozesse wie die induzierte Anpassung<sup>[42]</sup> und starke elektrostatische Wechselwirkungen wider, die zur Bindung beitragen. Eine zeptomolare Bindung kann aber wahrscheinlich nicht aus ausschließlich nichtkovalenten Wechselwirkungen und dynamischen Prozessen resultieren. Vielmehr verstärken oft geladene Reste, Metall-Cofaktoren, Säure-Base-Effekte und kovalente Wechselwirkungen die Bindung zwischen Enzym und Übergangszustand.

Tabelle 1: Zusammenfassung der Bindungskonstanten der Komplexe aus synthetischen Wirten, Antikörpern, Proteinen und Enzymen mit neutralen organischen Verbindungen.

Wirtstyp	Gasttyp	Mittelwert $\lg K_a$	Standardabweichung <sup>[a]</sup>	$-\Delta G$ [kcal mol $^{-1}$ ]
organischer Wirt <sup>[b]</sup>	organisches Molekül	2.2	1.6	$3.1 \pm 2.2$
Cyclodextrin	organisches Molekül	2.5	1.1	$3.5 \pm 1.4$
organischer Wirt <sup>[c]</sup>	organisches Molekül	3.4	1.6	$4.6 \pm 2.1$
katalytischer Antikörper	Substrat	3.5	1.0	$4.8 \pm 1.3$
Enzym	Substrat	3.7	1.3	$5.1 \pm 1.7$
Albumin	organisches Molekül	4.6	0.9	$6.3 \pm 1.3$
katalytischer Antikörper	Übergangszustand	6.6	2.0	$9.0 \pm 2.7$
Rezeptor	Wirkstoff	7.3	1.5	$9.5 \pm 2.1$
Antikörper	Antigen	8.1	2.0	$11.1 \pm 2.7$
Enzym	Inhibitor	8.6	2.1	$11.7 \pm 2.8$
Enzym	Übergangszustand	16.0	4.0	$21.9 \pm 5.4$

[a] In Einheiten von  $\lg K_a$ ; 68 % der Komplexe liegen innerhalb einer Standardabweichung vom Mittelwert, 95 % innerhalb von zwei Standardabweichungen einer Normalverteilung. [b] In nichtwässrigen Lösungsmitteln. [c] In wässriger Lösung.

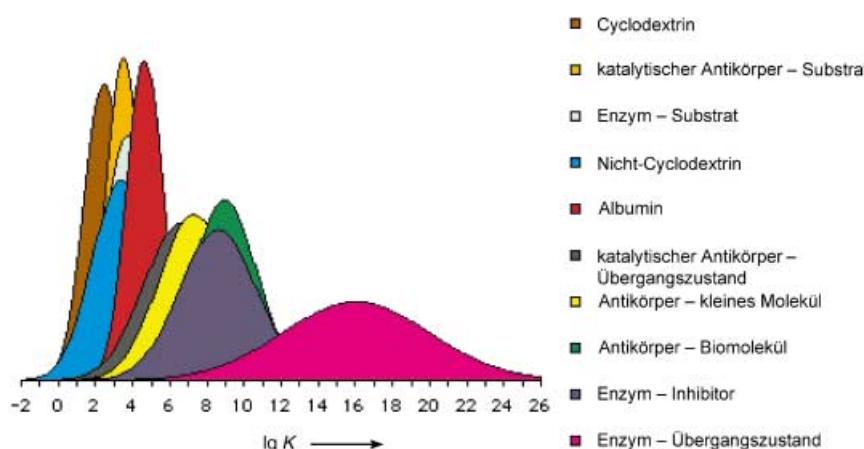


Abbildung 25. Zusammenfassung der mittleren Bindungskonstanten von Wirt-Gast-Komplexen.

Ein gutes Beispiel für die sehr hohen Bindungsenergien, die aus einer kovalenten Verknüpfung von Substrat und Protein resultieren, sind die von Meares et al. beschriebenen „Antikörper mit unendlicher Affinität“.<sup>[43]</sup>

### 2.3.2. Selektivität der Bildung von Wirt-Gast-Komplexen

Auf die relativ schmalen Bindungskonstantenintervalle unterschiedlicher Klassen von Wirten und Proteinen haben wir bereits deutlich hingewiesen. Innerhalb dieser Bereiche ist dennoch eine beträchtliche Selektivität möglich. Zu berücksichtigen ist, dass eine Vielzahl von Molekülen gar keinen Komplex mit einem gegebenen Wirtsmolekül bildet. Diese Fälle wurden von unserer Statistik nicht erfasst. Wirte bevorzugen im Allgemeinen einen begrenzten Satz von Gästen, die in den Hohlraum des Wirts hineinpassen. Bei Gastmolekülen, die diese Bedingung erfüllen, würde eine Bindungsenergiedifferenz von nur 1.7 kcal mol<sup>-1</sup> zwischen dem Zielmolekül und dem nächstbesten Komplexbildner bei Raumtemperatur eine 95:5-Selektivität für den besseren Gast liefern. Die meisten Wirtsklassen weisen ein Intervall von  $K_a$ -Werten von wenigstens 10<sup>4</sup> M<sup>-1</sup> auf, sodass eine sehr hohe Selektivität zwischen den am stärksten und am schwächsten gebundenen Komplexen einer Klasse vorliegt. Solche Selektivitätseigenschaften werden in Hinblick auf Anwendungen von selektiven Sensoren, Katalysatoren und Inhibitoren derzeit intensiv erforscht. Daneben ist das Verständnis dieser winzigen, aber chemisch außerordentlich wichtigen Energiedifferenzen eine Herausforderung an die Theorie. Unsere allgemeinen Aussagen über Bindungskonstanten eröffnen zwar einen einfachen Zugang zur näherungsweisen Vorhersage der Bindungsaffinitäten von Gastmolekülen mit zahlreichen Wirtstypen, die geringen, aber subtilen Differenzen, die zu Selektivität führen, werden durch diese Faustregeln aber nicht erfasst.

## 3. Ursachen und Grenzwerte von Bindungsaffinitäten

### 3.1. Allgemeine Überlegungen

Zwei Ergebnisse unserer Bindungsdatenanalyse sind besonders eindrucksvoll: Die Mittelwerte der Bindungskonstanten sind relativ klein, und im Allgemeinen fallen 95% der Bindungskonstanten in ein Wertebereich von etwa 10<sup>4</sup> M<sup>-1</sup>. Für Komplexe von Cyclodextrinen, synthetischen Wirten, Antikörpern und Enzymen mit kleinen organischen Molekülen kann in Wasser für alle wasserlöslichen organischen Gastmoleküle, die in den Hohlraum des Wirts passen, eine Bindungskonstante von 10<sup>3.5±2.5</sup> M<sup>-1</sup> vorhergesagt werden.

Wie Kuntz et al. in ihrer Arbeit über maximale Bindungsaffinitäten von Liganden berichtet haben, gibt es experimentelle Grenzen für die Messung von Bindungsaffinitäten.<sup>[41a]</sup> Die Wahl der Molekülarten, die als Gäste infrage kommen, ist durch experimentelle Faktoren eingeschränkt. So wurden Gase mit gewöhnlich niedrigem Molekulargewicht, für die sehr kleine Bindungsaffinitäten erwartet werden, selten untersucht. Auf der anderen Seite sind Stoffe mit sehr hohem Molekulargewicht oft unlöslich und entziehen sich einer Untersuchung. Generell liegen für sehr kleine oder sehr große Gastmoleküle, für die sehr niedrige Bindungskonstanten zu erwarten sind, nur wenige Daten vor. Des Weiteren können experimentelle Nachweisgrenzen auftreten, oder aber die Gleichgewichtsdaten wurden nur in einfach zugänglichen Messbereichen erhalten. Die geringe Verteilungsbreite in einigen der Diagramme in Abschnitt 2 könnte auf diese Faktoren zurückzuführen sein. Andererseits belegt die mit zunehmender Größe des Wirts beobachtete Verschiebung der mittleren Komplexstabilität hin zu höheren Werten die Wirkung eines fundamentalen Prinzips bei der Wirt-Gast-Komplexierung.

### 3.2. Enthalpie-Entropie-Kompensation

Eine Enthalpie-Entropie-Kompensation tritt häufig und bei zahlreichen Arten von Wirt-Gast-Komplexen auf.<sup>[44]</sup> In den in Abschnitt 2 gezeigten Enthalpie-Entropie-Diagrammen sind die Korrelationen unterschiedlich stark ausgeprägt, aber alle sind konsistent mit einer zunehmend negativen Komplexierungsentropie bei zunehmend negativer Komplexierungsenthalpie. Diese Korrelation könnte auf eine extra-thermodynamische Beziehung zurückgeführt werden, wonach eine stärkere Bindung zu einem stärker negativen  $\Delta H$  (günstig) und einem stärker negativen  $\Delta S$  (ungünstig) führt. Alternativ dazu könnten experimentelle Unsicherheiten bei der zur Bestimmung von  $\Delta H$  und  $\Delta S$  eingesetzten Van't Hoff-Diagramme zu zufälligen Korrelationen ohne statistische Signifikanz führen.

Zahlreiche Autoren haben angemerkt, dass bei einer stärkeren Bindung des Gastes – und damit verbunden einer stärker negativen Enthalpie – die Bewegungen des Wirts eingeschränkt werden, sodass die Entropie abnimmt.<sup>[44a]</sup> Die These ist zwar im Prinzip stimmig, allerdings gibt es keinen thermodynamischen Grund, weshalb diese Beziehung linear sein sollte. Wenn es tatsächlich eine lineare (oder eine andere funktionale) Korrelation gibt, dann hat sie daher extrathermodynamische und keine fundamental-thermodynamischen Ursachen.

Eine Reihe funktionaler Beziehungen zwischen Bindungsenthalpie und -entropie wurde vorgeschlagen. Dunitz beschrieb die Enthalpie-Entropie-Kompensation in Form thermodynamischer Funktionen, wobei er die Assoziation im Sinne einer Erhöhung der Kraftkonstanten der Wechselwirkung behandelte.<sup>[45]</sup> Demnach können die Translation und Rotation zweier Moleküle relativ zueinander als Schwingungen mit sehr niedrigen Kraftkonstanten betrachtet werden. Bei der Assoziation der Moleküle werden diese Kraftkonstanten zunehmend größer und die Entropie auf funktionale Weise stärker negativ.

Williams et al. schlugen eine allgemeine Beziehung zwischen der Exothermie einer Assoziationsreaktion ( $\Delta H^\circ$ ) und dem entropischen Aufwand ( $-298\Delta S^\circ$ ) der Assoziation vor. Diese Beziehung ist in Abbildung 26 wiedergegeben;<sup>[46b]</sup> sie basiert auf qualitativen thermodynamischen Überlegungen, die mit den Dunitzschen Ableitungen verwandt sind.<sup>[45]</sup> Die von Williams et al. analysierten Daten gehören zum gleichen Datensatz, der unseren Abbildungen 7 und 10 zugrunde liegt.

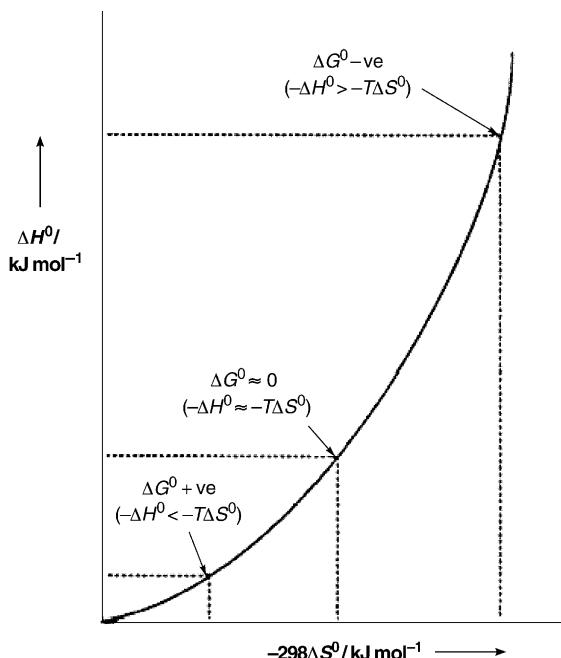
Das idealisierte Diagramm in Abbildung 26 verdeutlicht, dass bei sehr schwachen Wechselwirkungen (z. B. bei Van-der-Waals-Komplexen)  $\Delta H^\circ$  langsam negativer wird, die Entropie sich durch das Wegfallen der Translationsbewegung aber schnell ändert. In diesem Bereich gilt insgesamt  $\Delta G^\circ > 0$ . Für Zwischenbereiche gilt  $\Delta H^\circ \approx T\Delta S^\circ$ , eine lineare Beziehung also, die in zahlreichen Diagrammen augenscheinlich hervortritt. Wird die Assoziation schließlich sehr stark, wie bei der Bildung kovalenter Bindungen, ändert sich  $\Delta S^\circ$  nur noch geringfügig mit zunehmender Bindungsenthalpie  $\Delta H^\circ$ . Der praktische Nutzen dieser Beziehung wurde bei einer Analyse der Wechselwirkung von Makrocyclen mit neutralen Molekülen demonstriert, bei der die Beiträge von  $\Delta H^\circ$  und  $\Delta S^\circ$  zur Bindung separat gemessen wurden.<sup>[46a,b]</sup>

Nach dieser Hypothese nimmt die Entropie schwacher, nichtkovaleter Bindungen, ausgedrückt durch  $T\Delta S$ , bei Raumtemperatur durch die gehinderte Translation und Rotation um bis zu 10 e.u. oder  $3 \text{ kcal mol}^{-1}$  ab. Bei der für bimolekulare Reaktionen charakteristischen Bildung kovalenter Bindungen kann die Entropie zusätzlich um 30–40 e.u. (oder  $9–12 \text{ kcal mol}^{-1}$ ) sinken. Bei der Assoziation werden drei Translations- und drei Rotationsfreiheitsgrade des Wirtmoleküls plus eines Gastmoleküls in Schwingungsfreiheitsgrade umgewandelt. Bei schwacher Assoziation weisen diese Schwingungen sehr niedrige Frequenzen auf, und die Entropien sind immer noch groß. Beispielsweise ändert sich die Entropie bei der Bildung eines Van-der-Waals-Komplexes aus einem Wirt mittlerer Größe und einem Gast um ca.  $-10 \text{ e.u.}$  Bei kovalenten Bindungen, die sehr große Kraftkonstanten aufweisen, ändert sich  $\Delta S$  typischerweise um etwa  $-45 \text{ e.u.}$ <sup>[46c]</sup> Die Situation wird durch die mögliche Änderung der Solvationsentropie verkompliziert. Eine insgesamt positive Assoziationsentropie kann resultieren, wenn Lösungsmittelmoleküle im Hohlraum des Wirtes bei der Bindung des Gastmoleküls freigesetzt werden und den Entropieverlust der Wirt-Gast-Assoziation überkompensieren.

Williams und Mitarbeiter schlossen in ihrer Betrachtung der Enthalpie-Entropie-Kompensation des Weiteren Effekte einer positiven und negativen Kooperativität mit ein.<sup>[7,47]</sup>

Gilli et al. untersuchten die Thermodynamik der Wirkstoffbindung durch Rezeptoren und schlugen aufgrund der Enthalpie-Entropie-Kompensation einen Grenzwert für  $K_d$  von 10 pm vor (Abbildung 24).<sup>[41b]</sup> Eine Fehleranalyse führte zu dem Schluss, dass die  $\Delta H$ - $\Delta S$ -Beziehung statistisch nicht signifikant ist, weil die Kompensationstemperatur oder Steigung ( $286(\pm 4) \text{ K}$ ) sowohl bei Gilli et al.<sup>[41b]</sup> wie auch in unserer Darstellung ihrer Daten in Abbildung 24) zu nahe bei der mittleren Messtemperatur (290 K) liegt. Es wurde jedoch vorgeschlagen, dass ein verbreiteter Bindungstyp – speziell die Wasserstoffbrückenbindung – zur Korrelation beiträgt, da stärkere Wasserstoffbrücken zu weniger Bewegungsfreiheit und niedrigerer Entropie führen.<sup>[46]</sup>

Eine Enthalpie-Entropie-Beziehung kann durch Messfehler vorgetäuscht werden, insbesondere wenn  $\Delta H$  und  $\Delta S$  aus Van't-Hoff-Diagrammen bestimmt und in einem schmalen Temperaturbereich gemessen wurde. Solche Messungen beruhen auf der Annahme, dass  $\Delta H$  und  $\Delta S$  in diesem Bereich konstant sind. Darüber hinaus wird oft von nur zwei



**Abbildung 26.** Allgemeiner Zusammenhang zwischen der Exothermie  $\Delta H^\circ$  der Assoziation  $A+B \rightarrow A-B$  und des Entropieaufwands  $\Delta S^\circ$  bei 298 K. Es existiert ein Grenzwert des Entropieaufwands (wegen des Verlusts von Translations- und Rotationsfreiheitsgraden), der erreicht wird, bevor die Bindungsstärke typische Werte kovalenter Bindungen annimmt.<sup>[46b]</sup> Nachdruck mit Genehmigung der Royal Society of Chemistry.

möglichen Zuständen bei den Messungen ausgegangen, gebunden und ungebunden, obwohl Zwischenzustände möglich sind, und auch eine Änderung des Protonierungsgrads kann die Bestimmung von  $\Delta H$  und  $\Delta S$  verfälschen. Nach Exner ist bei der Verwendung von  $\Delta H-T\Delta S$ -Diagrammen wegen systematischer und zufälliger Messfehler Vorsicht geboten, insbesondere was die Ableitung physikalischer Ursachen solcher Korrelationen betrifft.<sup>[48]</sup>

Sharp konnte kürzlich aufzeigen, wie die Aussagekraft von  $\Delta H-\Delta S$ -Diagrammen beurteilt werden kann.<sup>[49a]</sup> Gemäß einem mehr als 25 Jahre alten statistischen Test<sup>[50]</sup> sind  $\Delta H-\Delta S$ -Darstellungen statistisch nicht signifikant (bei 95 % Konfidenzniveau), wenn die mittlere Experimentaltemperatur  $T$  innerhalb des 95 %-Konfidenzbereichs ( $\pm 2\sigma$ ) von  $T_C$  liegt ( $T_C$  ist die Steigung der Ausgleichsgeraden im  $\Delta H-\Delta S$ -Diagramm). Anders ausgedrückt ist es unwahrscheinlich, dass die Korrelation signifikant ist, wenn  $T_C$  innerhalb eines 20 %-Intervalls der mittleren Messtemperatur liegt.

Sharp untermauerte seinen Ansatz durch die Analyse authentischer Beispiele für eine Enthalpie-Entropie-Kompensation. So existiert eine Korrelation zwischen  $\Delta H$  und  $\Delta S$  für die Solvatisierung von Alkanen in Wasser.<sup>[49b]</sup> In diesen Experimenten war die mittlere Messtemperatur 298 K,  $T_C$  betrug aber  $163 \pm 6$  K und  $\Delta G = 7 \pm 2.5$  kcal mol<sup>-1</sup>. Bei hydrophober Solvatisierung tritt somit eine signifikante Korrelation zwischen  $\Delta H$  und  $\Delta S$  auf.<sup>[49c]</sup> Die  $\Delta H-\Delta S$ -Korrelationen in den Abbildungen 4, 7, 10, 14 und 24 könnten durch diesen Typ von Solvationseffekt beeinflusst sein.

Aus den  $\Delta H-T\Delta S$ -Diagrammen in den Abbildungen 4 (Cyclodextrine), 7 (nichtcyclodextrinische organische Wirt), 10 (organische Wirt in nichtwässrigen Lösungsmitteln), 14 (Antikörper-Antigen-Komplexe) und 24 (Rezeptor-Wirkstoff-Komplexe von Gilli) betragen die Werte von  $T_C \pm 2\sigma$ :  $282 \pm 8$ ,  $311 \pm 66$ ,  $230 \pm 22$ ,  $297 \pm 56$  und  $286 \pm 8$  K.<sup>[41b]</sup> Die Gleichgewichtskonstanten wurden nahe der Raumtemperatur (298 K), bei den Daten von Gilli darunter, gemessen. Gemäß dem Sharp-Kriterium zeigen die Diagramme für Cyclodextrine in Wasser (Abbildung 4) und organische Wirt in nichtwässrigen Lösungsmitteln (Abbildung 10) Korrelationen mit leichter extrathermodynamischer Signifikanz. Die Achsenabschnitte der Regressionsgeraden betragen  $-3.3$ ,  $-3.3$ ,  $-3.2$ ,  $-10.5$  und  $-9.9$ , was ungefähr den aus den Häufigkeitsverteilungen abgeleiteten und auch zu erwarten den mittleren Gibbs-Assoziationsenergien entspricht.

Der statistische Test fußt auf der Tatsache, dass ein Zufallssatz von  $\Delta H$ - und  $\Delta S$ -Werten, der als Randbedingung nur einen nahezu konstanten Wert von  $\Delta G$  bei einer beliebigen Temperatur bilden muss, eine lineare Korrelation liefert, die keinerlei physikalische Signifikanz hat. Cornish-Bowden demonstrierte die Gültigkeit dieses Prinzips anhand von Aktivierungsparametern.<sup>[51]</sup> Für die von uns untersuchten Systeme kann die gleiche Analyse angewendet werden. Dazu wurde ein Zufallssatz von 100 Wertepaaren mit einheitlicher Verteilung von  $E_a$  und  $\ln k$  erzeugt (Abbildung 27a).<sup>[51]</sup> Aus

den  $E_a$ - und  $\ln k$ -Werten wurde dann mithilfe von Arrhenius-Diagrammen  $\Delta H^\ddagger$  und  $\Delta S^\ddagger$  abgeleitet. Es wurde eine bemerkenswert gute Enthalpie-Entropie-Kompensation der 100 gestreuten Punkte beobachtet (Abbildung 27b). Der

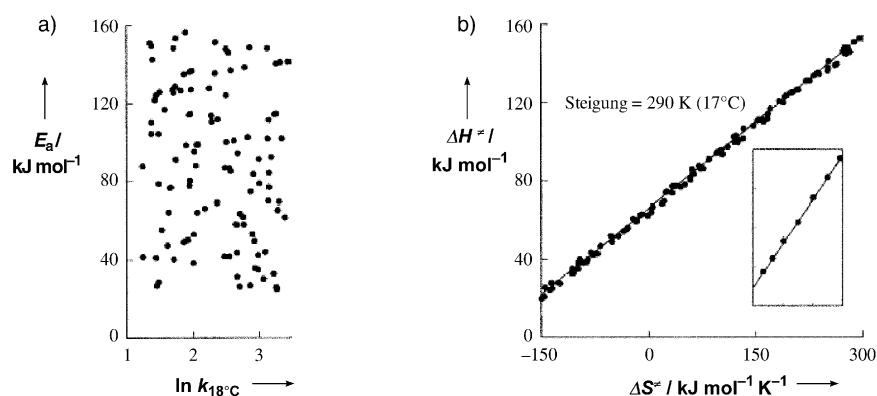


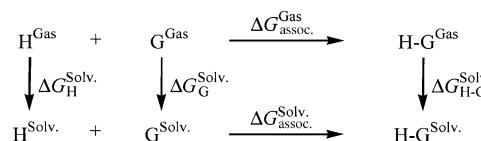
Abbildung 27. a) Zufallssatz von 100  $E_a$ - $\ln k$ -Wertepaaren ( $\ln k_{18^\circ\text{C}} = 2.3 \pm 1.15$ ,  $E_a = 30$ – $160$  kJ mol<sup>-1</sup>); b) Diagramm der Enthalpie-Entropie-Kompensation: Die  $\Delta H^\ddagger$ - und  $\Delta S^\ddagger$ -Werte für jeden der Punkte in (a) wurden aus einem Arrhenius-Diagramm ermittelt.<sup>[51]</sup> Genehmigter Nachdruck aus *J. Biosci.* 2002, 27, 121–126. Copyright 2002 Indian Academy of Science.

analoge Test mit  $\Delta G$ - und  $\lg K_a$ -Werten und einer Auswertung durch Van't Hoff-Diagramme würde eine analoge zufällige Korrelation von  $\Delta H$ - und  $\Delta S$ -Werten liefern.

Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass die beobachtete Enthalpie-Entropie-Kompensation nicht Ursache, sondern vielmehr Resultat eines ungefähr konstanten  $\Delta G$ -Werts für einen gegebenen Typ von Wirt-Gast-Komplexen ist. Das heißt, wenn  $\Delta G$  konstant ist, dann gilt wegen  $\Delta G = \Delta H - T_C \Delta S$  die Beziehung  $\Delta H = T_C \Delta S + \text{Konstante}$  mit  $T_C$  als Steigung der Korrelationsgeraden. Eine lineare Beziehung zwischen  $\Delta H$  und  $\Delta S$  sagt in solchen Fällen also lediglich aus, dass  $\Delta G$  eine Konstante ist.

### 3.3. Modelle zur quantitativen Berechnung der Wirt-Gast-Bindung

Die Gibbs-Energie der Wirt-Gast-Komplexbildung in Lösung,  $\Delta G_{\text{H+G}}^{\text{Solv}}$ , kann in einem thermodynamischen Kreisprozess aus den Bindungsenergien in der Gasphase  $\Delta G^{\text{Gas}}$  und den Solvationsenergien  $\Delta G^{\text{Solv}}$  von Wirt (H), Gast (G) und Wirt-Gast-Komplex (H-G) berechnet werden (Schema 1). Mit diesem Kreisprozess lassen sich Wirt-Gast-Wechselwirkungen und der Einfluss der Solvatisierung auf die Komplexierung direkt analysieren. Mit quantenmechanischen Methoden



Schema 1. Kreisprozess zur Analyse von Wirt(H)-Gast(G)-Wechselwirkungen.

ist die quantitative Untersuchung der Komplexierung relativ kleiner Moleküle in der Gasphase möglich. Die Genauigkeit moderner Verfahren erlaubt die Bestimmung der Wechselwirkungsenergien in der Gasphase bis auf wenige Zehntel kcal mol<sup>-1</sup>, ein Wert, der innerhalb typischer experimenteller Fehlergrenzen liegt.<sup>[52]</sup> Allerdings sind nur selten Systeme mit mehr als zehn Schweratomen mit solchen hochgenauen Verfahren untersucht worden, eine Anwendung auf die großen Systeme, über die wir hier berichten, ist derzeit ausgeschlossen.

Die Berechnung von Gibbs-Bindungsenergien großer flexibler Wirte und Gäste erfordert nicht nur die Bestimmung des Energieminimums eines Komplexes, sondern auch die Mittelwertbildung über alle zugänglichen Konformationen von Wirt und Wirt-Gast-Komplex. Dieses statistische Problem verschärft sich bei Einbeziehung der Solvatation, weil eine große Zahl möglicher Solut-Solvans-Konfigurationen berücksichtigt werden muss. Jüngste Rechnungen lassen die künftigen Möglichkeiten erahnen,<sup>[53]</sup> und direkte quantodynamische Verfahren wie die Car-Parrinello-Methode werden immer häufiger auf Lösungssphänomene angewendet.<sup>[54]</sup> Dennoch ist die exakte quantenmechanische Behandlung von Wirt-Gast-Komplexen in Lösung gegenwärtig unmöglich.

Zur Berechnung der Solvatation und der Wirt-Gast-Komplexierung wurde aber eine Reihe von Näherungsverfahren entwickelt. So wird das Problem, Dutzende bis Millionen von Lösungsmittelmolekülen berücksichtigen zu müssen, bei den Modellen des polarisierbaren Kontinuums (PCM) umgangen.<sup>[55]</sup> Der gelöste Stoff wird hierbei von einem Kontinuum mit definierter Dielektrizitätskonstante umgeben, das er entsprechend seiner Ladungsverteilung polarisiert. Für zahlreiche Systeme sind damit ausgezeichnete Ergebnisse erhalten worden.

Zur quantitativen Untersuchung von Wirt-Gast-Komplexen wurden empirische Kraftfeldmethoden mit statistischer Mechanik kombiniert. Empirische Kraftfelder sind klassische Beschreibungen der Wechselwirkungsenergien, die so parametrisiert wurden, dass sie experimentelle Daten wiedergeben. Die am häufigsten auf Wirt-Gast-Wechselwirkungen angewendeten Verfahren sind AMBER von Kollman et al.<sup>[56]</sup> und OPLS von Jorgensen et al.<sup>[57]</sup> Die intermolekularen Wechselwirkungen werden bei solchen Kraftfeldern aus Van-der-Waals- und Coulomb-Effekten gemäß Gleichung (1) quantifiziert.

$$\Delta E_{\text{inter}} = \sum_{i,j} (A/r_{ij}^{12} - B/r_{ij}^6) + \sum_{i,j} q_i q_j / r_{ij} \quad (1)$$

Der erste Summand in Gleichung (1) ist das Lennard-Jones-Potential für die Van-der-Waals-Anziehung und -Abstoßung zwischen den Atomen  $i$  und  $j$ .  $A$  und  $B$  sind für ein gegebenes Paar von Atomen Konstanten, die die repulsiven bzw. attraktiven Anteile des Van-der-Waals-Potentials beschreiben. Der zweite Summand entspricht dem Coulomb-Gesetz und berücksichtigt die Energiebeiträge aus elektrostatischen Wechselwirkungen. Die Größen  $q_i$  und  $q_j$  sind die Partialladungen der Atome  $i$  und  $j$  und  $r_{ij}$  ihr Abstand.

Mithilfe dieser intermolekularen Potentiale können die Komplexgeometrien optimiert werden. Eine näherungsweise

Berechnung der Energien in Lösung unter Berücksichtigung der Solvationsenergie ist mit Lösungsmittel-Hohlraum-Modellen wie dem GB/SA-Modell möglich (GB/SA = generalized Born/solvent accessible surface area). Dieses Modell liefert auf empirischer Basis Gibbs-Solvationsenergien.<sup>[58]</sup> Mit den empirischen Potentialen können bei den Berechnungen auch explizite Lösungsmittelmoleküle behandelt werden.

Jorgensen et al. verwendeten Monte-Carlo-Rechnungen mit dem OPLS-Kraftfeld zur Untersuchung von Komplexen in Lösung,<sup>[59]</sup> während Kollman et al. organische Komplexe in Lösung und Protein-Inhibitor-Komplexe mit AMBER und Moleküldynamikmethoden untersuchten.<sup>[60]</sup>

Intermolekulare Wechselwirkungen setzen sich hauptsächlich aus elektrostatischen, dispersiven und induktiven Wechselwirkungen sowie Beiträgen der Austauschabstoßung zusammen, die in der Summe die Strukturen und Energien von Komplexen bestimmen. Mithilfe von Rechnungen, einschließlich quantenmechanischen und Kraftfeldrechnungen, lassen sich Informationen über die Größe und die Art der Wechselwirkungsenergien erhalten.<sup>[61a]</sup> Zahlreiche Arbeitsgruppen haben daneben empirische Funktionen entwickelt, mit denen die Wechselwirkungsenergien zwischen Gruppen auf der Oberfläche von Wirt und Gast berechnet werden. Mit diesen Ansätzen sollen Art und Größe von Wechselwirkungen aufgeklärt werden, die die Komplexstabilität in Lösung beeinflussen.

Bahnbrechende Arbeiten zur empirischen Analyse der Bindungskonstanten von Peptid-Rezeptor-Komplexen in wässriger Lösung gehen auf Williams et al. zurück. Ausgehend von den Peptidkomplexen mit dem Antibiotikum Vancomycin wurden die relativen Stärken der von Williams als signifikant eingestuften Wechselwirkungen abgeleitet [Gl. (2)].<sup>[61b,c]</sup> Die Gleichung ist für solche empirischen Ansätze repräsentativ.

$$\Delta G = \Delta G_{\text{t+r}} + \Delta G_r + \Delta G_{\text{conf}} + \sum \Delta G_p + \Delta G_{\text{vdw}} + \Delta G_h \quad (2)$$

$\Delta G_{\text{t+r}}$  ist der energetisch ungünstige Beitrag der Gibbs-Energie, der sich aus der Einschränkung der Translation und Rotation von Wirt und Gast durch die Komplexbildung ergibt,  $\Delta G_r$  ist die Änderung der Gibbs-Energie durch die Einschränkung der inneren Rotation,  $\Delta G_{\text{conf}}$  ist der Aufwand an Gibbs-Energie für Konformationsänderungen, die vor der Komplexbildung notwendig sind,  $\sum \Delta G_p$  ist die Gibbs-Energie polarer Wechselwirkungen wie Wasserstoffbrücken und ionischer Wechselwirkungen,  $\Delta G_{\text{vdw}}$  umfasst die Änderung der Van-der-Waals-Beiträge der Gibbs-Energie und  $\Delta G_h$  ist die Gibbs-Energie der hydrophoben Bindung.

Die Gibbs-Funktion (2) enthält Beiträge intermolekulare Wechselwirkungen ( $\sum \Delta G_p$ ,  $\Delta G_{\text{vdw}}$ ), Solvationsanteile ( $\Delta G_h$ ) und Beiträge, die die Zwangsbedingungen des Reaktanten zur Anpassung an die Komplexgeometrie beschreiben ( $\Delta G_r$  und  $\Delta G_{\text{conf}}$  für innere Restriktionen und  $\Delta G_{\text{t+r}}$  für den Zusammenschluss von Wirt und Gast zu einem Molekülkomplex). Die Einbeziehung von  $\Delta G_r$ ,  $\Delta G_{\text{conf}}$  und  $\Delta G_{\text{t+r}}$  ist ein Ansatz, den entropischen Folgen der Komplexierung eines flexiblen Gasts in einer spezifischen Konformation Rechnung zu tragen. Ähnliche empirische Gibbs-Funktionen wurden

durch andere Arbeitsgruppen beschrieben,<sup>[59,60]</sup> z.B. entwickelte Böhm eine häufig verwendete Funktion, die im Programm LUDI implementiert ist [Gl. (3)].<sup>[62]</sup>

$$\begin{aligned}\Delta G_{\text{binding}} = & \Delta G_{\text{o}} + \Delta G_{\text{hb}} f_1(\Delta R) f_2(\Delta\alpha) \\ & + \Delta G_{\text{ionic}} \sum_{\text{ionic int.}} f_1(\Delta R) f_2(\Delta\alpha) + \Delta G_{\text{lipo}} \\ & + \Delta G_{\text{rotNROT}}\end{aligned}\quad (3)$$

$\Delta G_{\text{o}}$  ist die energetisch ungünstige Änderung der Gibbs-Energie durch die Entropieabnahme bei der Verknüpfung von zwei Molekülen zu einem.  $\Delta G_{\text{hb}}$  ist die Gibbs-Energie der Wasserstoffbrücke; diese erhält einen Maximalwert bei idealer Wechselwirkungsgeometrie zweier Gruppen und nimmt bei Abweichungen von den Idealabständen ( $\Delta R$ ) und/oder -winkeln ( $\Delta\alpha$ ) ab.  $\Delta G_{\text{ionic}}$  schließt ionische Wechselwirkungen ein und wird um  $f_1$  und  $f_2$  verringert, wenn Abstände oder Winkel von den Idealwerten abweichen.  $\Delta G_{\text{lipo}}$  steht für lipophile (oder hydrophobe) Wechselwirkungen von Kohlenwasserstoffresten und ist eine Funktion der Größe der lipophilen Oberflächen von Wirt und Gast.  $\Delta G_{\text{rot}}$  ist der Anteil der Gibbs-Energie, der mit dem Einfrieren von NROT freien Rotationen des Wirts zusammenhängt. Im Programm LUDI werden Kontaktpunkte für die funktionellen Gruppen des Proteins definiert und damit die Stärke der Wechselwirkungen bestimmt. Das Programm wird zum De-novo-Design von Wirkstoffen eingesetzt und liefert im Allgemeinen vernünftige Werte der Gesamtwechselwirkungsenergien.<sup>[62]</sup>

Die Idealwerte der  $\Delta G$ -Parameter von Protein-Ligand-Komplexen sind:

- $\Delta G_{\text{o}} = +1.3 \text{ kcal mol}^{-1}$  für den Entropieverlust durch Assoziation (entsprechend  $\Delta S = -4 \text{ e.u.}$  bei  $25^\circ\text{C}$ ).
- $\Delta G_{\text{hb}} = -1.2 \text{ kcal mol}^{-1}$  für eine ideale Wasserstoffbrücke mit  $\text{H}\cdots\text{O/N} = 1.9 \text{ \AA}$ ,  $\alpha = 180^\circ$ .
- $\Delta G_{\text{ionic}} = -2 \text{ kcal mol}^{-1}$  für eine ideale ionische Wechselwirkung, z.B. eine Salzbrücke.
- $\Delta G_{\text{lipo}} = -0.04 \text{ kcal mol}^{-1} \text{ \AA}^{-2}$  für das Entfernen von Umgebungswasser von einer Kohlenwasserstoff-Oberfläche.
- $\Delta G_{\text{rot}} = +0.3 \text{ kcal mol}^{-1}$  pro drehbarer Bindung, die im Komplex fixiert wird. Messungen an einer Reihe von Verbindungen lieferten ähnliche Werte für  $\Delta G_{\text{rot}}$ .<sup>[63]</sup>

Diese Parameter wurden mit Inhibitionskonstanten  $K_{\text{i}} = 10^{-1.5} \text{--} 10^{-13.5} \text{ M}$  (d.h. kinetisch bestimmten Dissoziationskonstanten) von 45 Komplexen aus Proteinen und kleinen Molekülen kalibriert. Die vorhergesagten Werte wiesen eine Standardabweichung von  $\pm 10^{1.4}$  oder  $2 \text{ kcal mol}^{-1}$  zu den Werten der Testreihe auf.

Charakteristisch für die LUDI-Potentialfunktion ist der relativ kleine Wert der Bindungsenergiebeiträge aus ionischen Wechselwirkungen und Wasserstoffbrücken (ca. 2 bzw.  $1 \text{ kcal mol}^{-1}$ ). Dies entspricht in etwa dem lipophilen Beitrag einer Fläche eines Benzolrings bzw. einer Methylgruppe. Grund dafür ist, dass das Entfernen von Ionen oder H-verbrückten Gruppen aus Wasser durch bindende Wechselwirkungen kaum kompensiert wird. Kleine funktionelle Gruppen tragen daher unabhängig von ihrer Natur stets  $1\text{--}2 \text{ kcal mol}^{-1}$  zur Bindungsenergie bei. Dies ist einer der

Gründe dafür, dass die Bruttogröße der bei der Komplexierung vergrabenen Oberfläche ein brauchbares Maß für die Bindungskonstante liefert, ohne dass die Atomtypen spezifiziert werden müssten.

Zahlreiche Autoren haben die Bindungsenergien von Wirt-Gast-Komplexen als Summe von hydrophoben, elektrostatischen, Van-der-Waals- und Wasserstoffbrückenwechselwirkungen ausgedrückt [Gl. (4)].<sup>[42,64]</sup>

$$\Delta G = \Delta\Delta G_{\text{hydrophobic}} + \Delta G_{\text{H-bonding}} + \Delta G_{\text{electrostatic}} + \Delta G_{\text{vdw}} \quad (4)$$

Die Solvatation durch Wasser ist hier im Term  $\Delta\Delta G_{\text{hydrophobic}}$  enthalten. Unterschiedliche Komplexe weisen unterschiedliche Werte der verbleibenden Terme der Wasserstoffbrücken-, elektrostatischen und Van-der-Waals-Wechselwirkungen zwischen Wirt und Gast auf. Die Auf trennung ist etwas willkürlich, weil beide, Wirt und Gast, Wasserstoffbrücken-, elektrostatische und Van-der-Waals-Wechselwirkungen mit Wassermolekülen eingehen.

Ein noch einfacheres empirisches Modell zur Vorhersage der Gleichgewichtskonstanten der Komplexierung organischer Moleküle durch Cyclodextrine wurde von Connors entwickelt.<sup>[8a]</sup> Das Modell beruht auf der phänomenologischen Gleichung (5).

$$\lg K_{\text{a}} = -1.74 - [\text{Z}] - 0.032(\Delta\text{SAHSA}_{\text{H}}) \quad (5)$$

In  $[\text{Z}]$  sind die Solvens-Solut- und Wirt-Gast-Wechselwirkungsenergien aufgrund spezifischer Wasserstoffbrücken und elektrostatischer Wechselwirkungen enthalten.  $\text{SAHSA}_{\text{H}}$  ist die Größe der Lösungsmittel-zugänglichen hydrophoben Oberfläche (solvent accessible hydrophobic surface area) des Wirts, und  $\Delta\text{SAHSA}_{\text{H}}$  ihre Änderung bei der Aufnahme des Gastes. Das Vorzeichen ist negativ, weil die Lösungsmittel-zugängliche Oberfläche bei der Komplexierung kleiner wird. Dieses Modell trennt die direkte Wechselwirkung von Wirt- und Gastatomen von anderen Effekten, die ausschließlich mit der Oberflächengröße zusammenhängen.<sup>[8a]</sup>

Bei Cyclodextrinen sagt das Connors-Modell die  $K_{\text{a}}$ -Werte bei 95 % der untersuchten 569 Fälle bis auf eine Größenordnung genau voraus.<sup>[8]</sup> In nahezu allen Fällen ist  $[\text{Z}]$  eine Größenordnung kleiner als  $0.032 \Delta\text{SAHSA}_{\text{H}}$  und im Allgemeinen kleiner als  $1 \text{ kcal mol}^{-1}$ .<sup>[8]</sup>

Eine Reihe anderer Korrelationen von Komplexbindungsenergien mit der Oberflächengröße wurde abgeleitet. Eisenberg et al. schlugen z.B. eine Hydrophobie-Funktion vor, mit der anhand der Größe der zugänglichen Oberfläche von Proteinen die Proteinfaltung und -komplexierung in Lösung vorhergesagt werden kann.<sup>[65a,b]</sup>

Luque und Freire entwickelten eine empirische Beziehung zwischen den Bindungsenthalpien von Inhibitoren der HIV-1-Protease [Gl. (6)] und den Größen der vergrabenen

$$\begin{aligned}\Delta H_{\text{binding}} = & 5.9(\pm 1.3) - 0.007(\pm 0.002) \Delta \text{ASA}_{\text{nonpolar}} \\ & + 0.031(\pm 0.006) \Delta \text{ASA}_{\text{polar}}\end{aligned}\quad (6)$$

Oberflächen. Sie berechneten damit die Bindungsenergien von sechs unterschiedlichen Proteinen.<sup>[65c]</sup> Die Konstanten

enthalten die Energiebeiträge der zur Komplexierung notwendigen konformativen Änderungen von Protein und Substrat.  $\Delta\text{ASA}_{\text{nonpolar}}$  und  $\Delta\text{ASA}_{\text{polar}}$  beziehen sich auf die Größenänderung der Lösungsmittel-zugänglichen Oberfläche der unpolaren bzw. polaren Teile der Oberfläche. Triebkraft der Komplexbildung ist hauptsächlich das Vergraben der unpolaren Oberfläche, energetisch ungünstig sind dagegen die konformationsbedingten Energieänderungen und das Vergraben der polaren Oberfläche.

### 3.4. Hydrophobe Effekte

Hydrophobe Wechselwirkungen wird oft eine Hauptrolle bei der Stabilität von Wirt-Gast-Komplexen organischer Spezies in Wasser zugeschrieben.<sup>[66,67]</sup> Der hydrophobe Effekt beschreibt die Tatsache, dass unpolare Stoffe in Wasser schlechter löslich sind als in organischen Lösungsmitteln. Einfach ausgedrückt meiden unpolare organische Stoffe Wasser und bevorzugen eine unpolare Umgebung. Das Konzept wurde ursprünglich aus der Beobachtung abgeleitet, dass Kohlenwasserstoffmoleküle in wässriger Lösung spontan aggregieren, um so die Lösungsmittel-exponierte Oberfläche zu minimieren. Der hydrophobe Effekt wird als einer der wichtigsten Faktoren bei der Steuerung der Proteinfaltung angesehen.<sup>[65,68]</sup>

Im Allgemeinen wird der hydrophobe Effekt bei Raumtemperatur in erster Linie Entropieeffekten zugeschrieben.<sup>[64,69]</sup> Die Gesamtentropie eines unpolaren Stoffs ist in Wasser ungünstiger als in einem unpolaren Lösungsmittel.<sup>[64]</sup> Dies wird oft damit erklärt, dass Wassermoleküle in der Volumenphase weniger geordnet sind als in der Umgebung eines unpolaren gelösten Stoffs. In der Umgebung eines solchen unpolaren Moleküls ordnen sich die Wassermoleküle zu „Eisbergen“.

Der hydrophobe Effekt tritt bei allen Temperaturen auf, bei höheren Temperaturen sind aber Enthalpie- und nicht mehr Entropieeffekte die Ursache,<sup>[70]</sup> weil das Einbringen eines unpolaren gelösten Stoffs in Wasser von einer stark positiven Änderung der Wärmekapazität  $\Delta C_p$  begleitet wird. Wie die Beziehung zwischen der Wärmekapazität und  $\Delta H$  oder  $\Delta S$  verdeutlicht [Gl. (7)], nimmt der enthalpische Beitrag zur Gibbs-Solvationsenergie bei steigender Temperatur zu, während der entropische Anteil  $-T\Delta S$  abnimmt, weil  $\Delta S$  zu Beginn negativ ist und nun weniger negativ wird.

$$\Delta C_p = (d\Delta H/dT)_p = T(d\Delta S/dT)_p \quad (7)$$

Eine Vielfalt von Modellen zum hydrophoben Effekt wurde entwickelt und quantitativ überprüft. Eine allgemeine Darstellung, die wir im Folgenden aufgreifen wollen, findet sich bei Southall et al.<sup>[70]</sup>

Wenn kleine unpolare Moleküle in Wasser gebracht werden, öffnet sich ein Hohlraum, um den sich die Wassermoleküle ordnen. Die Hohlraumbildung ist in allen Lösungsmitteln mit einem Energieaufwand verbunden. In heißem Wasser nimmt die Ordnung der Wassermoleküle um den Hohlraum ab und die Entropie zu. Dadurch wird die Enthalpie der Wechselwirkung von Wasser mit dem unpolaren Solut zur dominanten Größe, während die Wechselwirkung mit anderen Wassermolekülen nur eine untergeordnete Rolle spielt.<sup>[70]</sup> Große Solutmoleküle stören die Wasserstoffbrücken zwischen Wassermolekülen besonders effektiv, was zu einem zusätzlichen Enthalpiebeitrag zum hydrophoben Effekt führt. Bei Raumtemperatur „müssen ca. 25 cal mol<sup>-1</sup> Å<sup>-2</sup> aufgewendet werden, um kleine Öl moleküle in Wasser einzubringen“, während der Energieaufwand für die Bildung einer Öl-Wasser-Grenzfläche (pro Oberflächeneinheit) dreimal so groß ist.<sup>[70]</sup> Die Abhängigkeit des hydrophoben Effekts von der Größe der Oberfläche des gelösten Stoffs ist demzufolge nichtlinear.

Hydrophobe oder allgemein solvophile Effekte können durch zwei Faktoren ausgedrückt werden: 1) durch die Kavitationsenergie, die aufgebracht werden muss, um einen Hohlraum im Lösungsmittel zu erzeugen; 2) durch die Wechselwirkungsenergie zwischen gelöstem Stoff und Lösungsmittel, die aufgebracht werden muss, um die Solutmoleküle in Hohlräume geeigneter Größe unterzubringen. Beide Faktoren hängen direkt mit der Oberflächengröße der Gastmoleküle zusammen, sodass der hydrophobe Effekt generell mit der Größenänderung der exponierten Oberfläche bei der Komplexbildung korreliert [Gl. (8)].

$$\Delta\Delta G_{\text{hydrophobic}} = \gamma\Delta\text{SAHSA}_{\text{H+G}} \quad (8)$$

$\gamma$  ist der Koeffizient der Gibbs-Energie bezogen auf die Oberflächengröße und  $\Delta\text{SAHSA}_{\text{H+G}}$  die Differenz zwischen der Größe der zugänglichen hydrophoben Oberfläche des Wirt-Gast-Komplexes und der der getrennten Wirt- und Gastmoleküle. Für  $\gamma$  wird häufig ein Wert von 0.025 kcal mol<sup>-1</sup> Å<sup>-2</sup> angesetzt,<sup>[69]</sup> der in manchen Fällen auf die Größe der hydrophoben Oberfläche (C- oder CH-Gruppen auf der Oberfläche), in anderen auf die gesamte Oberfläche bezogen wird. Es sind aber auch zahlreiche andere Werte für  $\gamma$  publiziert worden (Tabelle 2).<sup>[61b,c]</sup> Je nach Messverfahren und

**Tabelle 2:** Abhängigkeit des Koeffizienten  $\gamma$  (Gibbs-Energie bezogen auf die Oberflächengröße) von der Messmethode.<sup>[61b,c]</sup>

Messverfahren	$\gamma$ [kcal <sup>-1</sup> mol <sup>-1</sup> Å <sup>-2</sup> ]
Lösungsmitteltransfer	0.02–0.05
Ligandenbindung	0.03–0.06
Protein-Engineering	0.02–0.2
Rechnung	0.02–0.03

der Methode zur Berechnung der Oberflächengröße variieren die  $\gamma$ -Werte von 0.02 bis 0.2 kcal mol<sup>-1</sup> Å<sup>-2</sup>. Das entspricht einer Belegung von 7 bis 50 Å<sup>2</sup> hydrophober Oberfläche pro kcal mol<sup>-1</sup> Bindungsenergie. Aus Lösungsmitteltransferdaten, einem direkten Maß für die Differenz zwischen den Gibbs-Solvationsenergien in Wasser und einem Kohlenwasserstoff, wurden Werte für  $\gamma$  von 0.02 bis 0.05 erhalten. Dabei wurde die Größe der Gesamtoberfläche des gelösten Stoffs für  $\Delta\text{SAHSA}_{\text{H+G}}$  eingesetzt. Die Werte aus Ligandenbindungs-Experimenten und Protein-Engineering stammen aus Messungen der Änderung der Bindungsenergie bei Änderung der Größe der hydrophoben Oberfläche eines Liganden oder

eines Proteins. Beispielsweise nimmt die Größe der Oberfläche um 22–35 Å<sup>2</sup> zu, wenn ein Wasserstoffatom durch eine Methylgruppe ersetzt wird;  $\gamma$  kann dann aus der messbaren Änderung der Gibbs-Bindungsenergie bestimmt werden.

In einer kürzlich publizierten Übersicht von Meyer, Castellano und Diederich wurde der apolaren Komplexierung in wässriger Lösung eine hohe enthalpische Triebkraft zugeschrieben, die teilweise durch eine ungünstige Komplexbildungsentropie kompensiert wird („nichtklassischer hydrophober Effekt“).<sup>[44a,b]</sup> Der nichtklassische hydrophobe Effekt spielt normalerweise bei der Bindung von Arenen an Cyclodextrine, synthetische Wirte und biologische Rezeptoren (Enzyme und DNA) eine Rolle. Anhand kalorimetrischer Studien identifizierten die Autoren günstige Änderungen der Kohäsionswechselwirkungen des Lösungsmittels und eine erhöhte Dispersionswechselwirkung als Ursache des nichtklassischen hydrophoben Effekts.

#### 4. Beziehung zwischen Bindungskonstante und vergrabener Oberfläche

Die Größe der bei der Komplexierung vergrabenen hydrophoben Oberfläche wird oft für empirische Berechnungen von Bindungsenergien herangezogen. Für die in Abschnitt 2 diskutierten Typen von Wirt-Gast-Komplexen wurde mit den nachfolgend beschriebenen Verfahren die Größe der Lösungsmittel-zugänglichen Oberfläche des Gastes, die bei der Komplexierung vergraben wird, berechnet oder bestimmt.

Die Größe der vergrabenen Gesamt-oberfläche (d.h. nicht nur des hydrophoben Teils) eines Gasts ist gleich der Differenz zwischen der Größe der Lösungsmittel-zugänglichen Oberfläche des freien und des komplexierten Gasts. Die zugängliche Gesamtoberfläche der Gastmoleküle und der Wirt-Gast-Komplexe wurde in den meisten Fällen mit einem Sonderradius von 1.4 Å, etwa dem Radius eines Wassermoleküls, berechnet. Schmale Zwischenräume, in die die Sonde nicht eindringen kann, tragen nicht zur Größe der Oberfläche bei. Im Unterschied zu anderen Analysen von Bindungsenergien und Oberflächen beschränken sich unsere Rechnungen nicht auf hydrophobe oder unpolare Teile der Oberfläche. Die Rechnungen wurden mit den Programmen NACCESS oder GRASP an röntgenographisch erhaltenen Kristallstrukturen<sup>[71]</sup> oder, falls keine Kristallstrukturdaten verfügbar waren, an AMBER-optimierten Strukturen ausgeführt<sup>[56]</sup>.

Tabelle 3 gibt die Größen der Lösungsmittel-zugänglichen Oberflächen von 20

kleinen organischen Gastmolekülen wieder (frei und im Komplex mit  $\alpha$ -Cyclodextrin) sowie die Größe der vergrabenen Oberfläche nach der Komplexierung.<sup>[72]</sup> Die mittlere Größe der vergrabenen Oberfläche der Gastmoleküle beträgt  $170 \pm 18 \text{ Å}^2$ , die  $\lg K_a$ -Werte liegen zwischen 0.7 und 3.8.

Tabelle 4 enthält die Größen der Lösungsmittel-zugänglichen Oberflächen von neun Gastmolekülen (frei und im Komplex mit  $\beta$ -Cyclodextrin) und die Größe der vergrabenen Oberfläche. Die mittlere Größe der vergrabenen Oberfläche beträgt  $192 \pm 19 \text{ Å}^2$ , die  $\lg K_a$ -Werte liegen zwischen 0.7 und 2.7. Die mittlere vergrabene Oberfläche von Gastmolekülen in  $\beta$ -Cyclodextrin ist etwas größer als in  $\alpha$ -Cyclodextrin.

Tabelle 5 führt die Größen der zugänglichen und der vergrabenen Oberflächen von 73 Gastmolekülen in Albu-minkomplexen auf, deren Kristallstrukturdaten bekannt sind.<sup>[73]</sup> Die Bindungskonstanten dieser Komplexe sind nicht publiziert. Die in Abbildung 25 enthaltenen Bindungsenergien und Standardabweichungen können mit den Oberflächengrößen verglichen werden.

**Tabelle 3:** Lösungsmittel-zugängliche Oberflächen (SASA, in Å<sup>2</sup>) freier und in  $\alpha$ -Cyclodextrin komplexierten Gastmoleküle und vergrabene Oberflächen ( $\Delta$ SASA) der komplexierten Gäste.

Gast	SASA, komplexiert	SASA, frei	$\Delta$ SASA	exp. Bindungskonstante ( $\lg K_a$ )
Ethanol	27.7	172.5	145	0.83
1-Propanol	52.2	199.8	148	1.46
1-Butanol	74.9	225.9	151	1.22
1-Pentanol	89.9	251.2	161	2.5
1-Hexanol	92.8	275.5	183	2.96
Hexansäure	72.4	276.8	204	2.91
Cyclobutanol	57.1	205.5	148	1.2
Cyclopentanol	68.1	223.8	156	1.56
Cyclohexanol	91.0	245.2	154	2.7
Benzol	39.9	222.6	183	1.5
Phenol	58.0	235.8	178	1.57
Pyridine	37.6	218.7	181	2.2
Benzoësäure	79.2	266.4	187	2.4
2-Chlorphenol	90.9	263.9	173	2.3
3-Chlorphenol	84.2	265.7	188	2.3
4-Chlorphenol	77.5	267.0	190	2.4
3-Nitrophenol	96.5	277.7	181	2.1
4-Nitrophenol	99.3	278.5	179	2.6
4-Methylphenol	77.8	261.6	194	1.75
Essigsäure	26.4	180.8	154	3.8
Acetonitril	32.5	173.8	141	0.72

**Tabelle 4:** Lösungsmittel-zugängliche Oberflächen (SASA, in Å<sup>2</sup>) freier und in  $\beta$ -Cyclodextrin komplexierten Gastmoleküle und vergrabene Oberflächen der komplexierten Gäste.

Gast	SASA, komplexiert	SASA, frei	$\Delta$ SASA	exp. Bindungskonstante ( $\lg K_a$ )
1-Propanol	42.8	197.5	155	0.65
1-Butanol	50.1	223.8	174	1.22
1-Hexanol	85.9	279.5	194	2.34
Cyclohexanol	54.0	245.0	191	2.7
Benzol	40.6	225.1	185	2.23
Benzoësäure	54.1	267.0	213	2.4
4-Methylphenol	61.3	264.0	203	2.4
3-Nitrophenol	67.9	277.6	210	2.44
2-Chlorphenol	62.2	264.0	202	2.3

**Tabelle 5:** Lösungsmittel-zugängliche Oberflächen (SASA, in Å<sup>2</sup>) freier und in Albumin komplexierter Gastmoleküle und vergrabene Oberflächen (ΔSASA) der komplexierten Gäste.

PDB-Code	Summenformel des Gastes <sup>[a]</sup>	SASA, komplexiert	SASA, frei	ΔSASA
1E7A	C <sub>12</sub> O	97	363	266
	C <sub>12</sub> O	106	367	261
1E7B	C <sub>2</sub> F <sub>3</sub> ClBr	74	209	135
	C <sub>2</sub> F <sub>3</sub> ClBr	64	210	146
	C <sub>2</sub> F <sub>3</sub> ClBr	65	211	146
1E7C	C <sub>11</sub> O <sub>2</sub>	88	420	332
	C <sub>11</sub> O <sub>2</sub>	102	426	324
	C <sub>11</sub> O <sub>2</sub>	108	427	319
	C <sub>13</sub> O <sub>2</sub>	124	472	348
	C <sub>14</sub> O <sub>2</sub>	144	505	361
	C <sub>2</sub> F <sub>3</sub> ClBr	68	209	141
	C <sub>2</sub> F <sub>3</sub> ClBr	71	209	138
	C <sub>2</sub> F <sub>3</sub> ClBr	79	209	130
	C <sub>2</sub> F <sub>3</sub> ClBr	59	210	151
	C <sub>2</sub> F <sub>3</sub> ClBr	68	210	142
	C <sub>2</sub> F <sub>3</sub> ClBr	54	211	157
	C <sub>2</sub> F <sub>3</sub> ClBr	98	211	113
	C <sub>2</sub> F <sub>3</sub> ClBr	104	211	107
1E7E	C <sub>7</sub> O <sub>2</sub>	102	316	214
	C <sub>8</sub> O <sub>2</sub>	107	343	236
	C <sub>9</sub> O <sub>2</sub>	138	367	229
	C <sub>9</sub> O <sub>2</sub>	98	369	271
	C <sub>9</sub> O <sub>2</sub>	101	373	272
	C <sub>10</sub> O <sub>2</sub>	97	396	299
	C <sub>10</sub> O <sub>2</sub>	138	397	259
	C <sub>10</sub> O <sub>2</sub>	101	398	297
	C <sub>8</sub>	92	312	220
	C <sub>10</sub>	68	351	283
1E7F	C <sub>11</sub> O <sub>2</sub>	142	420	278
	C <sub>11</sub> O <sub>2</sub>	116	425	309
	C <sub>11</sub> O <sub>2</sub>	120	425	305
	C <sub>12</sub> O <sub>2</sub>	117	440	323
	C <sub>12</sub> O <sub>2</sub>	128	446	318
	C <sub>12</sub> O <sub>2</sub>	137	449	312
	C <sub>10</sub>	110	366	256
	C <sub>12</sub>	96	382	286
1E7G	C <sub>11</sub> O <sub>2</sub>	93	423	330
	C <sub>11</sub> O <sub>2</sub>	104	424	320
	C <sub>12</sub> O <sub>2</sub>	124	447	323
	C <sub>14</sub> O <sub>2</sub>	136	502	366
	C <sub>14</sub> O <sub>2</sub>	142	502	360
	C <sub>14</sub> O <sub>2</sub>	147	502	355
	C <sub>10</sub>	91	367	276
	C <sub>12</sub>	100	413	313
1E7H	C <sub>11</sub> O <sub>2</sub>	109	419	310
	C <sub>15</sub> O <sub>2</sub>	142	507	365
	C <sub>15</sub> O <sub>2</sub>	162	533	371
	C <sub>16</sub> O <sub>2</sub>	160	552	392
	C <sub>16</sub> O <sub>2</sub>	133	556	423
	C <sub>16</sub> O <sub>2</sub>	137	558	421
	C <sub>10</sub>	94	358	264
1E7I	C <sub>13</sub> O <sub>2</sub>	128	461	333
	C <sub>17</sub> O <sub>2</sub>	162	550	388
	C <sub>17</sub> O <sub>2</sub>	156	580	424

**Tabelle 5: (Fortsetzung)**

PDB-Code	Summenformel des Gastes <sup>[a]</sup>	SASA, komplexiert	SASA, frei	ΔSASA
	C <sub>17</sub> O <sub>2</sub>	146	586	440
	C <sub>18</sub> O <sub>2</sub>	293	608	315
	C <sub>18</sub> O <sub>2</sub>	180	609	429
	C <sub>18</sub> O <sub>2</sub>	302	609	307
	C <sub>11</sub>	86	386	300
1H9Z	C <sub>14</sub> O <sub>2</sub>	124	477	353
	C <sub>14</sub> O <sub>2</sub>	120	483	363
	C <sub>14</sub> O <sub>2</sub>	133	492	359
	C <sub>14</sub> O <sub>2</sub>	134	502	368
	C <sub>14</sub> O <sub>2</sub>	148	502	354
	C <sub>14</sub> O <sub>2</sub>	98	506	408
	C <sub>19</sub> O <sub>4</sub>	161	508	347
1H9Z	C <sub>14</sub> O <sub>2</sub>	140	478	338
	C <sub>14</sub> O <sub>2</sub>	126	484	358
	C <sub>14</sub> O <sub>2</sub>	140	490	350
	C <sub>14</sub> O <sub>2</sub>	130	502	372
	C <sub>14</sub> O <sub>2</sub>	148	504	356
	C <sub>14</sub> O <sub>2</sub>	117	509	392
	C <sub>19</sub> O <sub>4</sub>	151	494	343

[a] Ohne H-Atome.

Tabelle 6 gibt die Lösungsmittel-zugänglichen Oberflächen von 15 Gastmolekülen (frei und im Komplex mit katalytischen Antikörpern) und die vergrabenen Oberflächen der komplexierten Gäste wieder (siehe auch Abbildung 28).<sup>[74]</sup> Die mittlere Größe der vergrabenen Oberfläche beträgt  $420 \pm 80 \text{ Å}^2$  und ist damit mehr als doppelt so groß wie bei der Komplexierung durch  $\alpha$ - und  $\beta$ -Cyclodextrin. Für elf dieser Komplexe sind die  $K_d$ -Werte des gebundenen Gastes im Kristall bekannt. Die Größe der mittleren komplexierten Oberfläche der Gäste beträgt hier  $400 \pm 79 \text{ Å}^2$ . Es wurde angenommen, dass diese 15 Verbindungen die Substrate katalytischer Antikörper gut repräsentieren und mit den oben genannten Bindungskonstanten ( $10^{3.5 \pm 1.0} \text{ M}^{-1}$ ) verglichen werden können. Aus der Übersicht über Kristallstrukturen von Padlan wurde verallgemeinernd für Antikörper-Hapten-Komplexe eine Kontaktfläche von 190 bis  $350 \text{ Å}^2$  abgeleitet. Bei Antikörper-Komplexen mit Protein-Antigenen ist die Kontaktfläche weitaus größer ( $400$ – $900 \text{ Å}^2$ ).<sup>[75]</sup>

Es liegen umfangreiche thermodynamische Daten zu Protein-Substrat-Komplexen vor, die Größe der zugänglichen Oberflächen ist aber nicht systematisch klassifiziert. Nach Jones und Thornton beträgt die Größe der vergrabenen Lösungsmittel-zugänglichen Oberfläche (SASA =  $[\Delta \Sigma \text{ASA}_H + \Delta \Sigma \text{ASA}_G]/2$ ) im Mittel  $777 \pm 135 \text{ Å}^2$  in Enzym-Inhibitor-Komplexen und  $785 \pm 75 \text{ Å}^2$  in Antikörper-Protein-Komplexen.<sup>[76]</sup> Tabelle 7 fasst die mittleren vergrabenen Oberflächen und die mittleren Bindungskonstanten für  $\alpha$ - und  $\beta$ -Cyclodextrine, katalytische Antikörper, Enzym-Inhibitor- und Antikörper-Protein-Komplexe zusammen. Die Bandbreite der vergrabenen Oberflächen und der Bindungsenergien einer gegebenen Wirtsklasse gehen auch aus Abbildung 29 hervor, in der die Bindungsaffinität gegen die vergrabene Oberfläche aufgetragen ist.

**Tabelle 6:** Lösungsmittel-zugängliche Oberflächen (SASA, in Å<sup>2</sup>) freier und mit katalytischen Antikörpern komplexierter Gastmoleküle und vergrabene Oberflächen (ΔSASA) der komplexierten Spezies (Haptene oder Produkte; siehe Abbildung 28).

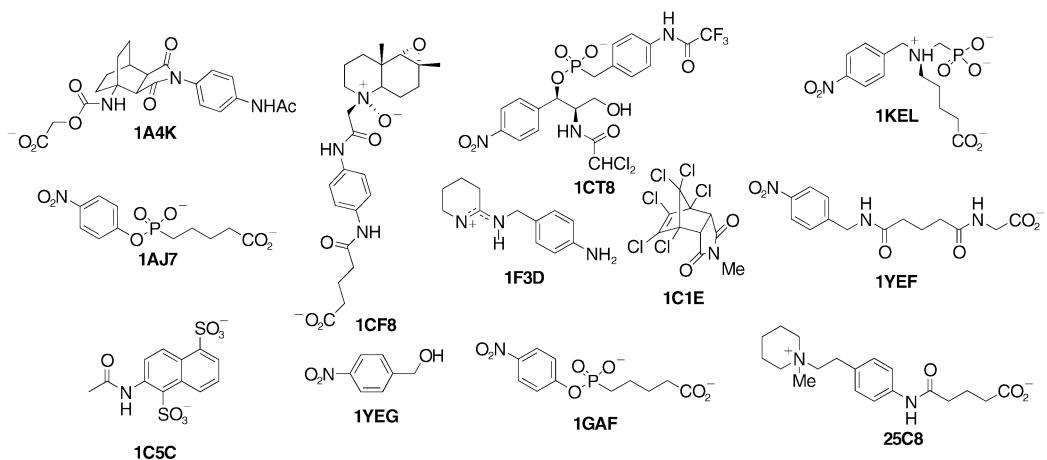
PDB-Code	Antikörper	SASA, komplexiert	SASA, frei	ΔSASA	$K_d$
1a4k	39A11	222.8	638.1	415	10 nM
1aj7	48G7 <sup>[a]</sup>	93.9	489.1	395	135 μM
1c5c	21D8	75.1	469.4	394	110 nM
1cf8	HA5-19A4	209.9	708.3	498	1.4 μM
1cle	1E9	38.4	442.6	404	1 nM
1ct8	7C8	327.2	794.3	467	0.3 μM
1f3d	4B2	41.7	403.6	362	n.a. <sup>[b]</sup>
1gaf	48G7 <sup>[c]</sup>	78.5	484.1	406	45 nM
1kel	28B4	110.5	519.4	409	52 nM
1yef	D2.3	60.3	549.3	489	n.a.
1yeg	D2.3	27.3	303.4	276	50 μM
25c8	5C8	75.4	588.0	513	n.a.
35c8	5C8	74.4	580.0	506	n.a.
3fct	7G12	349.4	842.7	493	49 μM <sup>[d]</sup>
43ca	43C9	23.4	270.9	248	1 μM

[a] Keimbahn-Antikörper. [b] Nicht angegeben. [c] Reifer Antikörper. [d]  $K_m$ .

Die Korrelation zwischen vergrabener Oberfläche der Gäste und den Bindungsaffinitäten ist offensichtlich. Die Regressionsgerade hat eine Steigung von 0.011, entsprechend einem  $\gamma$ -Wert von 0.007 kcal mol<sup>-1</sup> Å<sup>-2</sup> in der Gleichung  $\Delta G = \gamma \Delta \Sigma \text{SASA}$ . Das bedeutet, dass das Vergraben von 67 Å<sup>2</sup> zugänglicher Oberfläche des Gastmoleküls einer Bindungsenergie von 1 kcal mol<sup>-1</sup> entspricht. Dies wiederum entspricht 90 Å<sup>2</sup> pro Einheit von  $\lg K_a$ . Beispielsweise ergibt sich für  $\alpha$ -Cyclodextrine mit ca. 200 Å<sup>2</sup> vergrabener Oberfläche eine mittlere Bindungskonstante von etwa 10<sup>2.2</sup> M<sup>-1</sup>. Bei

Enzym-Inhibitor-Komplexen beträgt  $\Delta \text{SASA}$  rund 800 Å<sup>2</sup>, entsprechend einem  $K_a$ -Wert von etwa 10<sup>9</sup> M<sup>-1</sup>. Der  $\gamma$ -Wert von 0.007 ist wesentlich niedriger als die zuvor genannten Werte (0.02–0.15 kcal mol<sup>-1</sup> Å<sup>-2</sup>; am häufigsten wird ein Wert von  $\gamma = 0.025$  kcal mol<sup>-1</sup> Å<sup>-2</sup> für  $\Delta \text{HSASA}$  angesetzt<sup>[69]</sup>). Die meisten Literaturwerte sind allerdings nur auf die vergrabene *hydrophobe* Oberfläche bezogen, während in Abbildung 29 die Bindungsenergie mit der *gesamten* vergrabenen Oberfläche des Gastmoleküls korreliert. Den gleichen  $\gamma$ -Wert hatten Luque und Freire bei der Berechnung von  $\Delta H$  aus der

Größe der unpolaren Oberfläche erhalten.<sup>[65c]</sup> Außerdem lassen unsere Ergebnisse auf eine Korrelation zwischen der vergrabenen hydrophoben Oberfläche und der gesamten vergrabenen Oberfläche des Gastes schließen. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass die mittleren Bindungskonstanten von Wirt-Gast-Komplexen in Wasser auf die relativ kleinen Oberflächen zurückzuführen sind, die bei der Komplexbildung aus der Wasserphase herausgenommen werden und Wirt-Gast-Wechselwirkungen eingehen.

**Abbildung 28.** Strukturen der Haptene der in Tabelle 6 aufgeführten katalytischen Antikörper.**Tabelle 7:** Mittlere vergrabene Oberflächen der Gäste (ΔSASA, in Å<sup>2</sup>) und  $\lg K_a$  für Klassen von Wirt-Gast-Komplexen in Wasser.

System	Mittelwert ΔSASA	$\sigma(\Delta \text{SASA})$	Quelle	Mittelwert $\lg K_a$	$\sigma(\lg K_a)$	Quelle
$\alpha$ -Cyclodextrin-organischer Gast	170	18	Tabelle 3	2.0	0.8	Tabelle 3
$\beta$ -Cyclodextrin-organischer Gast	192	19	Tabelle 4	2.1	0.7	Tabelle 4
katalytischer Antikörper-Substrat	418	80	Tabelle 6	3.5	1.0	Tabelle 1
katalytischer Antikörper-Inhibitor	400	79	Tabelle 6	6.3	1.6	Tabelle 6
Albumin-organischer Gast	300	85	Tabelle 5	4.6	0.9	Tabelle 5
Enzym-Inhibitor	777	135	[64]	8.6	2.1	Tabelle 1
Antikörper-Protein	785	75	[76]	8.9	1.7	Tabelle 1

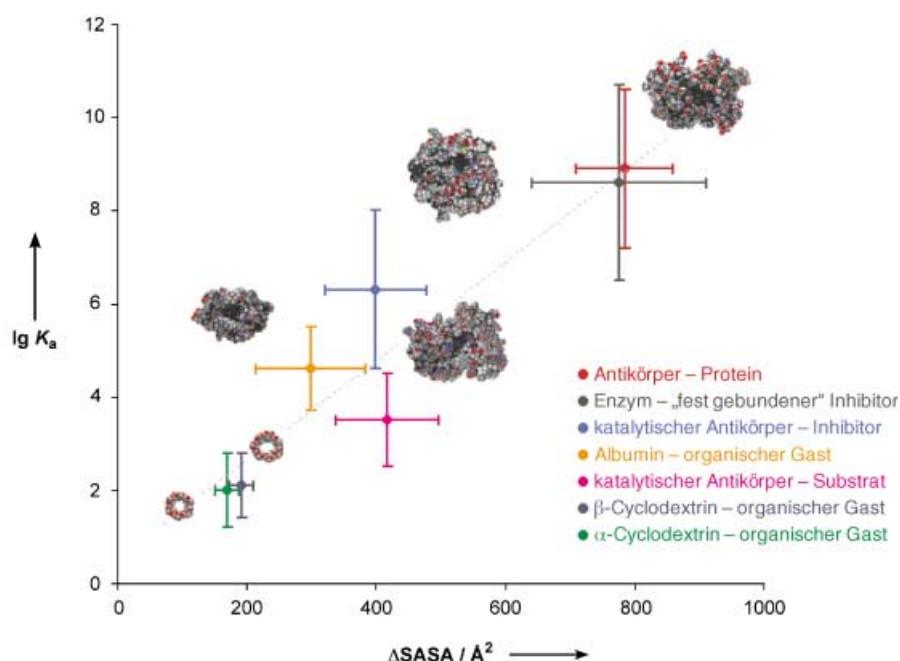


Abbildung 29. Auftragung von gemittelten  $\lg K_d$ -Werten gegen gemittelte vergrabene Lösungsmittelzugängliche Oberflächen.

Die hinreichend belegte Korrelation zwischen  $\Delta\text{SASA}$  und Bindungskonstanten in Wasser weist auf die Vorhersagbarkeit der mittleren Assoziationskonstanten ausgehend von der Größe des Hohlraums des Wirts und der Oberfläche des Gasts hin. Dies unterstreicht die Bedeutung des hydrophoben Effekts für die Komplexbildung. Allerdings erfordert die Verteilung der Bindungskonstanten eine detailliertere Betrachtung. Sie kann variierenden direkten Wirt-Gast-Wechselwirkungen zugeschrieben werden, d.h. spezifischen Wasserstoffbrücken, elektrostatischen und Van-der-Waals-Wechselwirkungen. Diese Faktoren steuern die Selektivität eines hydrophoben Hohlraums und führen zu bedeutenden Abweichungen von der einfachen Oberflächenbeziehung. Eine Reihe weiterer Faktoren wurde zur Erklärung der Selektivität herangezogen, z.B. ein Zusammenhang zwischen der Komplexstabilität und der Mobilität des Gastmoleküls innerhalb des Wirts.<sup>[77]</sup>

Die wichtigsten theoretischen und empirischen Ansätze zur Vorhersage der Bindungsaffinitäten von Enzymen und Proteinrezeptoren wurden von Gohlke und Klebe zusammengefasst.<sup>[78a]</sup> Die Standardabweichungen bei Regressionsmethoden (empirischen Scoring-Funktionen) liegen normalerweise zwischen 0.5 und 2.5  $\text{kcal mol}^{-1}$ , bei einer mittleren Standardabweichung von 1.3  $\text{kcal mol}^{-1}$ , die etwa einem Drittel der Standardabweichung einer einfachen  $\Delta\text{SASA}$ -Korrelation von 3.5  $\text{kcal mol}^{-1}$  entspricht. Eine neuartige Scoring-Funktion, die aus mehreren Funktionen kombiniert wurde, liefert eine Standardabweichung von 2.2  $\text{kcal mol}^{-1}$ .<sup>[78b]</sup> Gemäß einer kürzlich publizierten Übersicht von Davis et al.<sup>[78c]</sup> beträgt die mittlere quadratische Abweichung (RMSE) einer wissensbasierten Scoring-Funktion, SmoG2001, 1.69 lg-Einheiten und die RMSE von SCORE1 (LUDI) 3.47 lg-Einheiten. Dieser Vergleich lässt darauf

schließen, dass unsere Korrelation zwischen  $\Delta\text{SASA}$  und der Bindungskonstanten in Wasser eine einfache und halbquantitative Methode bereitstellt, Bindungsaffinitäten ausschließlich anhand der vergrabenen Oberfläche bei der Komplexierung vorherzusagen.

Eine wichtige Ausnahme von den einfachen  $\Delta G$ - $\Delta\text{SASA}$ -Beziehungen wird bei Enzymen beobachtet: Die Bindungskonstante von Enzym-Substrat-Komplexen beträgt  $10^{3.7 \pm 1.3} \text{ M}^{-1}$ , die von Enzym-Übergangszustands-Komplexen  $10^{16.0 \pm 4.0} \text{ M}^{-1}$ , obwohl sich die Größen der Oberflächen von Substrat und Übergangszustand nicht allzu gravierend unterscheiden können. Enzym-Substrat-Komplexe verhalten sich regulär und weisen die gleiche  $\Delta G$ - $\Delta\text{SASA}$ -Charakteristik auf wie Komplexe aus katalytischen Antikörpern und Substraten. Die mittlere vergrabene Oberfläche beträgt

etwa 420  $\text{Å}^2$ , die Bindungskonstanten betragen etwa  $10^{3.5} \text{ M}^{-1}$  und die Gibbs-Bindungsenergie ist etwa 5  $\text{kcal mol}^{-1}$ . Trotz ähnlicher Größe der vergrabenen Oberfläche werden Übergangszustände weitaus fester gebunden.

## 5. Warum binden Übergangszustände fester an Enzyme als Substrate?

Die Dissoziationskonstanten von Enzym-Substrat-Komplexen haben Werte von  $K_M^{-1} = 10^{3.7 \pm 1.3} \text{ M}^{-1}$ , die von Enzym-Übergangszustands-Komplexen von  $K_{tx}^{-1} = 10^{16.0 \pm 4.0} \text{ M}^{-1}$ . Zur Erklärung dieses katalytischen Effekts wurden viele Faktoren herangezogen, von denen die stichhaltigsten nachstehend genannt werden sollen.

### 5.1. Chemische Effekte

- Ein augenfälliger Faktor ist die Tatsache, dass die reversible Bildung von Wirt-Gast-Komplexen auf nichtkovalenten Wechselwirkungen beruht, während die katalytische Wirkung der meisten, wenn nicht aller Enzyme auf kovalente, Metall-Ligand- oder Säure-Base-Wechselwirkungen zurückgeht. Kovalente Wechselwirkungen können weitaus stärker sein als die nichtkovalenten Effekte, die bei zahlreichen Wirt-Gast-Komplexen eine Rolle spielen.
- Das Auftreten von Ladungen im Übergangszustand kann Coulomb-Wechselwirkungen verstärken, die Bindungsstärke typischer neutraler Substrate ist im Vergleich weitaus niedriger. Warshel wies auf die Bedeutung spezifisch orientierter Dipole in der Bindungsstelle natür-

licher Substrate zur Stabilisierung des Übergangszustands hin.<sup>[79]</sup> Die notwendige Energie, die die zum Übergangszustand komplementäre Ausrichtung der Dipole erfordert, wird von der Proteinfaltung aufgewendet.

- c) Zu Phosphat und anderen polaren Gruppen, die in der Reaktion nur eine sekundäre Rolle zu spielen scheinen, können im Übergangszustand sehr starke Bindungen gebildet werden. Für ODCase bestimmten Wolfenden et al. einen Wert von  $17 \text{ kcal mol}^{-1}$  für die Bindung von Phosphat.<sup>[80]</sup> Nach Aymes et al. stammen  $14 \text{ kcal mol}^{-1}$  des Energiegewinns des Übergangszustands bei der Einwirkung von Triosephosphatisomerase aus der bevorzugten Bindung von Phosphat im Übergangszustand.<sup>[81]</sup> Eine solche Mehrzentrenbindung kann zum Circe-Effekt führen.<sup>[34b]</sup>

## 5.2. Auswirkungen der Komplementarität von Enzym und Übergangszustand

- d) Gemäß dem Koshland-Mechanismus der induzierten Anpassung ändert der Katalysator seine Struktur so, dass er komplementär zum Übergangszustand wird.<sup>[42,82]</sup> Dies führt höchstens zu einem kleinen Anstieg von  $\Delta\text{ASA}$ , könnte spezifische elektrostatische Wechselwirkungen aber verstärken.
- e) Großräumige Bewegungen von Proteinschläufen können zu einem Einschluss des Übergangszustandes führen oder die bindende Oberfläche vergrößern.
- f) Eine dynamische Kopplung zwischen Proteinfluktuationen und der Bewegung von Atomen des Übergangszustands kann zu einer Reaktionsbeschleunigung führen. Dieses Phänomen ist in letzter Zeit intensiv untersucht worden, sofern kein Tunneleffekt auftritt ist der Einfluss gewöhnlich aber klein.<sup>[83]</sup>
- g) Die Freisetzung von Wasser aus der Bindungstasche bei Bildung des Übergangszustands ist entropisch günstig. Dies spielt zwar auch bei der Komplexierung des Grundzustands des Substrats eine Rolle, könnte sich aber auf den Übergangszustand wesentlich stärker auswirken.<sup>[84]</sup>

Sehr wahrscheinlich spielen einige oder alle diese Effekte bei spezifischen Typen von Übergangszuständen eine Rolle.<sup>[85]</sup> Zahlreiche Arbeitsgruppen, einschließlich der unseren, versuchen gegenwärtig die Bedeutung der einzelnen Faktoren für die enzymatische Katalyse zu quantifizieren.

## 6. Zusammenfassung und Ausblick

Die Bindungskonstanten von Komplexen neutraler Liganden in Wasser mit einer Vielzahl von Wirten können anhand der hier vorgestellten Korrelationen in einem mehrere Größenordnungen umfassenden Bereich abgeschätzt werden. Dazu bedarf es nur der Kenntnis der Größe des Hohlraums des Wirts und der Oberfläche des Gasts. Bessere quantitative Methoden dürften genauere Vorhersagen liefern, erfordern aber weitaus mehr Rechenleistung und Zeit.

Die Stärke nichtkovalerter Bindungen in Wasser und ihre Schwankungsbreite wird durch hydrophobe Effekte und

deren Verhältnis zur Oberfläche bestimmt. Der Ursprung der mittleren Bindungsenergien ist nun bekannt, die Quantifizierung von Einzel- und Sonderfällen aber bleibt eine bedeutende Herausforderung.

*Wir danken dem National Institute of General Medical Sciences der National Institutes of Health für finanzielle Unterstützung. A.G.L. dankt der Fulbright Commission und AstraZeneca für ein Stipendium. Weiter danken wir Dr. Jiangang Chen für Diskussionsbeiträge und Techniken zur Berechnung von Oberflächengrößen und den Professoren François Diederich, Dudley H. Williams, William L. Jorgenson, Hans-Jörg Schneider, Ronald K. Castellano sowie Dr. W. Bruce Turnbull für hilfreiche Diskussionen. Prof. D. Schomburg, Köln, wird für die Unterstützung bei der Beschaffung der  $K_M$ -Werte von Enzymen gedankt.*

Eingegangen am 4. Dezember 2002 [A565]  
Übersetzt von Dr. Jürgen Eckwert, Seeheim-Jugenheim

- [1] a) F. Vögtle, *Supramolecular Chemistry*, Wiley, New York, **1991**; b) J. M. Lehn, *Supramolecular Chemistry*, VCH, Weinheim, **1995**; c) *Comprehensive Supramolecular Chemistry*, Bd. 11 (Hrsg.: J. L. Atwood, J. E. D. Davies, D. D. MacNicol, F. Vögtle), Pergamon, Oxford, **1996**; d) H.-J. Schneider, *Angew. Chem.* **1991**, *103*, 1419–1439; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1991**, *30*, 1417–1436; e) H.-J. Schneider, A. Yatsimirsky, *Principles and Methods in Supramolecular Chemistry*, Wiley, Chichester, **2000**; f) C. A. Schalley, J. Rebek in *Stimulating Concepts in Chemistry* (Hrsg.: F. Vögtle, J. F. Stoddart, M. Shibaasaki), Wiley-VCH, Weinheim, **2000**, S. 199–210; g) M. C. T. Fyfe, J. F. Stoddart, *Acc. Chem. Res.* **1997**, *30*, 393–401; h) J. H. Hartley, T. D. James, C. J. Ward, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* **2000**, 3155–3184; i) T. H. Webb, C. S. Wilcox, *Chem. Soc. Rev.* **1993**, *22*, 383–395; j) J. C. Ma, D. A. Dougherty, *Chem. Rev.* **1997**, *97*, 1303–1324; k) S. L. McKay, B. Haptonstall, S. H. Gellman, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 1244–1245.
- [2] J. S. Huston, M. N. Margolies, E. Haber in *Advances in Protein Chemistry*, Bd. 49 (Hrsg.: F. M. Richards, D. E. Eisenberg, P. S. Kim), Academic Press, San Diego, **1996**, S. 330–450.
- [3] a) G. M. Blackburn, A. Datta, H. Denham, P. Wentworth, Jr., *Adv. Phys. Org. Chem.* **1998**, *31*, 249–392; b) J.-L. Reymond, *Top. Curr. Chem.* **1999**, *200*, 59–93.
- [4] a) A. R. Fersht, *Structure and Mechanism in Protein Science*, Freeman, New York, **2000**; b) T. C. Bruice, S. J. Benkovic, *Biochemistry* **2000**, *39*, 6267–6274; c) der Begriff „gebunden“ muss näher erläutert werden, weil einige Autoren, speziell Bruice und Benkovic, gegen seine Verwendung Einwände vorgebracht haben.<sup>[4b]</sup> Wir verwenden diesen Begriff hier, um die niedrigere Gibbs-Energie des Enzym-Übergangszustands-Komplexes ( $E \cdot S^\ddagger$ ) gegenüber dem isolierten Enzym plus dem Übergangszustand in Wasser ( $E + S^\ddagger$ ), entsprechend der Konstante  $K_{tx}$  von Wolfenden, zum Ausdruck zu bringen. Der Einwand röhrt daher, dass die Bindungsenergie des Übergangszustandes nicht direkt gemessen werden kann und der Übergangszustand der unkatalysierten Reaktion in Wasser häufig anders zusammengesetzt ist als der am Enzym.
- [5] a) A. J. Kennan, H. W. Whitlock, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 3027–3028, zit. Lit.; b) J. Suh, *Adv. Supramol. Chem.* **2000**, *6*, 245–286; c) Y. Murakami, J. Kikuchi, Y. Hisaeda, O. Hayashida, *Chem. Rev.* **1996**, *96*, 721–758.
- [6] P. J. Gane, P. M. Dean, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2000**, *10*, 401–404.

- [7] C. T. Calderone, D. H. Williams, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 6262–6267, zit. Lit.
- [8] a) K. A. Connors, *Chem. Rev.* **1997**, *97*, 1325–1357; b) K. A. Connors, *J. Pharm. Sci.* **1995**, *84*, 843–848.
- [9] *Chem. Rev.* **1998**, *98*, 1741–2076, Themenheft zu Cyclodextrinen.
- [10] a) K. Harata, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1977**, *50*, 1416–1424; b) K. Harata, *Bioorg. Chem.* **1981**, *10*, 388–398.
- [11] M. V. Rekharsky, Y. Inoue, *Chem. Rev.* **1998**, *98*, 1875–1917.
- [12] a) D. H. Macartney, A. W. Roszak, K. C. Smith, *Inorg. Chim. Acta* **1999**, *291*, 354–371; b) S. Nepogodiev, J. F. Stoddart, *Chem. Rev.* **1998**, *98*, 1959–1976; c) Y. Inoue, K. Yamamoto, T. Wada, S. Everitt, X. Gao, Z. Hou, L. Tong, S. Jiang, H. Wu, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2* **1998**, 1807–1816; d) Y. Liu, B. Han, S. Sun, T. Wada, Y. Inoue, *J. Org. Chem.* **1999**, *64*, 1487–1493; e) A. Abou-Hamdan, P. Bugnon, C. Saudan, P. G. Lye, A. E. Merbach, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 592–602; f) G. Castronuovo, V. Elia, A. Iannone, M. Niccolai, F. Velleca, *Carbohydr. Res.* **2000**, *325*, 278–286; g) J. C. Morales, D. Zurita, S. Penadés, *J. Org. Chem.* **1998**, *63*, 9212–9222; h) M. Rekharsky, Y. Inoue, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 10949–10955.
- [13] a) K. Kobayashi, Y. Asakawa, Y. Kato, Y. Aoyama, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 10307–10313; b) K. Kobayashi, M. Tominaga, Y. Asakawa, Y. Aoyama, *Tetrahedron Lett.* **1993**, *34*, 5121–5124.
- [14] a) D.-R. Ahn, T. W. Kim, J.-I. Hong, *Tetrahedron Lett.* **1999**, *40*, 6045–6048; b) M. H. B. Grote Gansey, F. K. G. Bakker, M. C. Feiters, H. P. M. Geurts, W. Verboom, D. N. Reinhoudt, *Tetrahedron Lett.* **1998**, *39*, 5447–5450; c) R. Yanagihara, M. Tominaga, Y. Aoyama, *J. Org. Chem.* **1994**, *59*, 6865–6867; d) T. Haino, D. M. Rudkevich, A. Shivanyuk, K. Rissaanen, J. Rebek, Jr., *Chem. Eur. J.* **2000**, *6*, 3797–3805.
- [15] a) S. B. Ferguson, E. M. Sanford, E. M. Seward, F. Diederich, *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 5410–5419; b) F. Diederich, K. Dick, D. Griebel, *Chem. Ber.* **1985**, *118*, 3588–3619; c) S. B. Ferguson, E. M. Seward, F. Diederich, E. M. Sanford, A. Chou, P. Inocencio-Szweda, C. B. Knobler, *J. Org. Chem.* **1988**, *53*, 5593–5595; d) F. Diederich, K. Dick, *Tetrahedron Lett.* **1982**, *23*, 3167–3170; e) F. Diederich, K. Dick, *Chem. Ber.* **1985**, *118*, 3817–3829; f) K. Koga, K. Odashima, *J. Inclusion Phenom. Mol. Recognit. Chem.* **1989**, *7*, 53–60; g) K. Odashima, T. Soga, K. Koga, *Tetrahedron Lett.* **1981**, *22*, 5311–5314; h) F. Diederich, K. Dick, *Angew. Chem.* **1984**, *96*, 789–790; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1984**, *23*, 810–812; i) H.-J. Schneider, D. Güttes, U. Schneider, *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, *110*, 6449–6454; j) H.-J. Schneider, D. Güttes, U. Schneider, *Angew. Chem.* **1986**, *98*, 635–636; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1986**, *25*, 647–649; k) F. Diederich, D. Griebel, *J. Am. Chem. Soc.* **1984**, *106*, 8037–8046; l) F. Diederich, K. Dick, *J. Am. Chem. Soc.* **1984**, *106*, 8024–8036; m) F. Diederich, K. Dick, D. Griebel, *J. Am. Chem. Soc.* **1986**, *108*, 2273–2286; n) M. R. Hester, M. A. Uyeki, F. Diederich, *Isr. J. Chem.* **1989**, *29*, 201–212; o) Y. Murakami, J. Kikuchi, T. Ohno, O. Hayashida, M. Kojima, *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 7672–7681; p) O. Manabe, K. Asakura, T. Nishi, S. Shinkai, *Chem. Lett.* **1990**, 1219–1222; q) D. R. Carcanague, F. Diederich, *Angew. Chem.* **1990**, *102*, 836–838; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1990**, *29*, 769–771; r) B. R. Peterson, P. Wallmann, D. R. Carcanague, F. Diederich, *Tetrahedron* **1995**, *51*, 401–421; s) F. Diederich, *Angew. Chem.* **1988**, *100*, 372–396; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1988**, *27*, 362–386.
- [16] a) Y. Murakami, J.-I. Kikuchi, T. Ohno, T. Hirayama, *Chem. Lett.* **1989**, 881–884; b) Y. Murakami, J.-I. Kikuchi, *Pure Appl. Chem.* **1988**, *60*, 549–554; c) R. Fornasier, F. Reniero, P. Scrimin, U. Tonellato, *J. Inclusion Phenom.* **1988**, *6*, 175–181; d) Y. Murakami, T. Ohno, O. Hayashida, Y. Hisaeda, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1991**, 950–952; e) Y. Murakami, J.-I. Kikuchi, T. Ohno, T. Hirayama, Y. Hisaeda, H. Nishimura, J. P. Snyder, K. Steliou, *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 8229–8242; f) Y. Hisaeda, T. Ihara, T. Ohno, Y. Murakami, *Tetrahedron Lett.* **1990**, *31*, 1027–1030; g) Y. Murakami, T. Ohno, O. Hayashida, Y. Hisaeda, *Chem. Lett.* **1991**, 1595–1598; h) J. Franke, F. Vögtle, *Angew. Chem.* **1985**, *97*, 224–225; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1985**, *24*, 219–222; i) S. Kumar, H.-J. Schneider, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2* **1989**, 245–250.
- [17] a) H.-J. Schneider, R. Kramer, I. Theis, M.-Q. Zhou, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1990**, 276–278; b) H. Kawakami, O. Yoshino, K. Odashima, K. Koga, *Chem. Pharm. Bull.* **1985**, *33*, 5610–5613; c) K. Odashima, H. Kawakami, A. Miwa, I. Sasaki, K. Koga, *Chem. Pharm. Bull.* **1989**, *37*, 257–259; d) H.-J. Schneider, J. Pöhlmann, *Bioorg. Chem.* **1987**, *15*, 183–193; e) H.-J. Schneider, T. Blatter, S. Simova, I. Theis, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1989**, 580–581; f) H.-J. Schneider, I. Theis, *Angew. Chem.* **1989**, *101*, 757–759; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1989**, *28*, 753–754.
- [18] a) C. J. van Stavern, V. M. L. J. Aarts, P. D. J. Crootenhuis, W. J. H. Droppers, J. van Eerden, S. Harkema, D. N. Reinhoudt, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 8134–8144; b) S. G. Mairanovskii, S. K. Erbekov, R. U. Vakhobova, *Elektrokhimiya* **1990**, *26*, 88–90; c) E. Kimura, A. Watanabe, M. Kodama, *J. Am. Chem. Soc.* **1983**, *105*, 2063–2066; d) E. Kimura, T. Koike, M. Kodama, *Chem. Pharm. Bull.* **1984**, *32*, 3569–3578; e) E. Kimura, *J. Inclusion Phenom. Mol. Recognit. Chem.* **1989**, *7*, 183–191; f) O. V. Kulikov, I. V. Terekhova, *Russ. J. Coord. Chem.* **1998**, *24*, 821–823; g) D. Sun, J. Chen, W. Lu, X. Zheng, *J. Solution Chem.* **1998**, *27*, 1097–1107.
- [19] a) S. Shinkai, *J. Inclusion Phenom. Mol. Recognit. Chem.* **1989**, *7*, 193–201; b) C. D. Gutsche, I. Alam, *Tetrahedron* **1988**, *44*, 4689–4694; c) C. D. Gutsche, I. Alam, M. Iqbal, T. Mangiafico, K. C. Nam, J. Rogers, K. A. See, *J. Inclusion Phenom. Mol. Recognit. Chem.* **1989**, *7*, 61–72; d) I. Alam, C. D. Gutsche, *J. Org. Chem.* **1990**, *55*, 4487–4489; e) S. Shinkai, H. Koreishi, S. Mori, T. Sone, O. Manabe, *Chem. Lett.* **1985**, 1033–1036; f) S. Shinkai, *Pure Appl. Chem.* **1986**, *58*, 1523–1528; g) S. Shinkai, S. Mori, H. Koreishi, T. Tsubaki, O. Manabe, *J. Am. Chem. Soc.* **1986**, *108*, 2409–2416; h) S. Shinkai, H. Kawabata, T. Arimura, T. Matsuda, H. Satoh, O. Manabe, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* **1989**, 1073–1074; i) L. Zhang, A. Macías, T. Lu, J. I. Gordon, G. W. Gokel, A. E. Kaifer, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1993**, 1017–1019; j) G. Arena, A. Casnati, A. Contino, F. G. Gulino, D. Sciotto, R. Ungaro, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2* **2000**, 419–423; k) R. Castro, L. A. Godínez, C. M. Criss, A. E. Kaifer, *J. Org. Chem.* **1997**, *62*, 4928–4935; l) G. Arena, A. Casnati, A. Contino, G. G. Lombardo, D. Sciotto, R. Ungaro, *Chem. Eur. J.* **1999**, *5*, 738–744; m) S. Shinkai, K. Araki, T. Matsuda, O. Manabe, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1989**, *62*, 3856–3862.
- [20] a) T. H. Webb, H. Suh, C. S. Wilcox, *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 8554–8555; b) D. A. Stauffer, R. E. Barrans, Jr., D. A. Dougherty, *J. Org. Chem.* **1990**, *55*, 2762–2767; c) T. J. Sheppard, M. A. Petti, D. A. Dougherty, *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, *110*, 1983–1985; d) P. C. Kearney, L. S. Mizoue, R. A. Kumpf, J. E. Forman, A. McCurdy, D. A. Dougherty, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 9907–9919; e) A. McCurdy, L. Jimenez, D. A. Stauffer, D. A. Dougherty, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 10314–10321.
- [21] C. S. Wilcox, M. D. Cowart, *Tetrahedron Lett.* **1986**, *27*, 5563–5566.
- [22] E. M. Seward, R. B. Hopkins, W. Sauerer, S.-W. Tam, F. Diederich, *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 1783–1790.
- [23] K. Kano, T. Hayakawa, S. Hashimoto, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1991**, *64*, 778–784.
- [24] a) B.-L. Poh, L.-S. Koay, *Tetrahedron Lett.* **1990**, *31*, 1911–1914; b) B.-L. Poh, C. S. Lim, L.-S. Koay, *Tetrahedron* **1990**, *46*, 6155–6160.
- [25] S. Claude, J.-M. Lehn, F. Schmidt, J.-P. Vigneron, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1991**, 1182–1185.

- [26] F. M. Menger, M. Takeshita, J. F. Chow, *J. Am. Chem. Soc.* **1981**, *103*, 5938–5939.
- [27] R. Neugebauer, W. Knoche, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2* **1998**, 529–534.
- [28] a) J. Rao, J. Lahiri, R. M. Weis, G. M. Whitesides, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 2698–2710; b) eine allgemeine Übersicht zu polyvalenten Wechselwirkungen: M. Mammen, S.-K. Choi, G. M. Whitesides, *Angew. Chem.* **1998**, *110*, 2908–2953; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, *37*, 2754–2794.
- [29] R. M. Izatt, J. S. Bradshaw, K. Pawlak, R. L. Brening, B. J. Tarbet, *Chem. Rev.* **1992**, *92*, 1261–1354.
- [30] A. J. Portmann, S. A. Levison, W. B. Dandliker, *Immunochemistry* **1975**, *12*, 461–466.
- [31] a) F. Schwesinger, R. Ros, T. Strunz, D. Anselmetti, H.-J. Güntherodt, A. Honegger, L. Jermutus, L. Tiefenauer, A. Plückthun, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2000**, *97*, 9972–9977; b) O. Siiman, A. Burshteyn, *Cytometry* **2000**, *40*, 316–326; c) E. T. Boder, K. S. Midelfort, K. D. Wittrup, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2000**, *97*, 10701–10705; d) H. Torigoe, T. Nakayama, M. Imazato, I. Schimada, Y. Arata, A. Sarai, *J. Biol. Chem.* **1995**, *270*, 22218–22222; e) J. B. Pitner, W. F. Beyer, T. M. Venetta, C. Nycz, M. J. Mitchell, S. L. Harris, J. R. Mariño-Albernas, F.-I. Auzanneau, F. Forooghian, B. M. Pinto, *Carbohydr. Res.* **2000**, *324*, 17–29; f) D. M. Shaw, M. J. Embleton, C. Westwater, M. G. Ryan, K. A. Myers, S. M. Kingsman, M. W. Carroll, P. L. Stern, *Biochim. Biophys. Acta* **2000**, *1524*, 238–246; g) J. E. Smallshaw, F. Georges, J. S. Lee, E. B. Waygood, *Protein Eng.* **1999**, *12*, 623–630; h) D. A. Dougan, R. L. Malby, L. C. Gruen, A. A. Kortt, P. J. Hudson, *Protein Eng.* **1998**, *11*, 65–74; i) K. Dill, C. Poteras, C. Fraser, D. G. Hafemann, J. C. Owicki, J. D. Olson, *Anal. Biochem.* **1994**, *217*, 127–138; j) N. H. H. Heegaard, O. J. Bjerrum, *Anal. Biochem.* **1991**, *195*, 319–326; k) N. V. Visser, I. E. Smit-Kingma, *Spectrochim. Acta Part A* **1999**, *55*, 2271–2279; l) „Thermodynamic Data for Protein-Ligand Interaction“: H. Wiesinger, H.-J. Hinz in *Thermodynamic Data for Biochemistry and Biotechnology* (Hrsg.: H.-J. Hinz), Springer, New York, **1986**, S. 211–226.
- [32] J. Xu, Q. Deng, J. Chen, K. N. Houk, J. Bartek, D. Hilvert, I. A. Wilson, *Science* **1999**, *286*, 2345–2348.
- [33] a) I. A. Wilson, R. L. Stanfield, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **1993**, *3*, 113–118; b) R. L. Stanfield, I. A. Wilson, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **1995**, *5*, 103–113.
- [34] a) J. Foote, H. N. Eisen, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1995**, *92*, 1254–1256; b) B. G. Miller, R. Wolfenden, *Annu. Rev. Biochem.* **2002**, *71*, 847–885.
- [35] a) A. Mazzini, P. Cavatorta, M. Iori, R. Favilla, G. Sartor, *Biophys. Chem.* **1992**, *42*, 101–109; b) J. L. Sohl, A. G. Splitgerber, *J. Chem. Educ.* **1991**, *68*, 262–264; c) K. Murakami, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1993**, *66*, 2808–2813; d) K. Murakami, *Biophys. Chem.* **1991**, *41*, 253–261; e) N. Okabe, M. Hozake, *Chem. Pharm. Bull.* **1991**, *39*, 478–480; f) N. Okabe, Y. Sagimori, M. Hozake, *Chem. Pharm. Bull.* **1991**, *39*, 2115–2116; g) I. N. Bojesen, E. Bojesen, *J. Lipid Res.* **1994**, *35*, 770–778; h) S. Watanabe, T. Sato, *Biochim. Biophys. Acta* **1996**, *1289*, 385–396.
- [36] S. Curry, P. Brick, N. P. Franks, *Biochim. Biophys. Acta* **1999**, *1441*, 131–140.
- [37] a) M. J. Swamy, *Biochem. Mol. Biol. Int.* **1995**, *36*, 219–225; b) B. Kuhn, P. A. Kollman, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 3909–3916.
- [38] a) L. B. Moore, B. Goodwin, S. A. Jones, G. B. Wisely, C. J. Serabjit-Singh, T. M. Willson, J. L. Collins, S. A. Skiewer, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2000**, *97*, 7500–7502; b) R. E. Watkins, G. B. Wisely, L. B. Moore, J. L. Collins, M. H. Lambert, S. P. Williams, T. M. Willson, S. A. Kliewer, M. R. Redinbo, *Science* **2001**, *292*, 2329–2333.
- [39] BRENDA-Onlinedatenbank mit Enzymdaten: <http://www.brenda.uni-koeln.de> (Recherchedatum: Februar 2001).
- [40] a) A. Radzicka, R. Wolfenden, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 6105–6109; b) R. Wolfenden, X. Lu, G. Young, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 6814–6815; c) A. Radzicka, R. Wolfenden, *Science* **1995**, *267*, 90–93; d) E. A. Taylor, D. R. J. Palmer, J. A. Gerlt, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 5824–5825; e) R. A. R. Bryant, D. E. Hansen, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 5498–5499.
- [41] a) I. E. Kuntz, K. Chen, K. A. Sharp, P. A. Kollman, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1999**, *96*, 9997–10002; b) P. Gilli, V. Ferretti, G. Gilli, P. A. Borea, *J. Phys. Chem.* **1994**, *98*, 1515–1518.
- [42] D. E. Koshland, Jr., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1958**, *44*, 98–104.
- [43] A. J. Chmura, M. S. Orton, C. F. Meares, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2001**, *98*, 8480–8484.
- [44] a) E. A. Meyer, R. K. Castellano, F. Diederich, *Angew. Chem.* **2003**, *115*, 1244–1287; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42*, 1210–1250; b) E. Grunwald, C. Steel, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 5687–5692; c) 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.
- [45] J. D. Dunitz, *Chem. Biol.* **1995**, *2*, 709–712.
- [46] a) M. S. Westwell, M. S. Searle, J. Klein, D. H. Williams, *J. Phys. Chem.* **1996**, *100*, 16000–16001; b) D. H. Williams, M. S. Westwell, *Chem. Soc. Rev.* **1998**, *27*, 57–63; c) M. I. Page, W. P. Jencks, *Gazz. Med. Ital.* **1987**, *117*, 455–460.
- [47] D. H. Williams, C. T. Calderone, D. P. O. Brien, R. Zerella, *Chem. Commun.* **2002**, *12*, 1266–1267.
- [48] O. Exner, *Prog. Phys. Org. Chem.* **1973**, *10*, 411–482.
- [49] a) K. Sharp, *Protein Sci.* **2001**, *10*, 661–667; b) A. Ben-Naim, Y. Marcus, *J. Chem. Phys.* **1984**, *81*, 2016; c) N. T. Southall, K. A. Dill, A. D. J. Haymet, *J. Phys. Chem. B* **2002**, *106*, 521–533.
- [50] a) R. Krug, W. Hunter, R. Grieger, *Nature* **1976**, *261*, 566–567; b) R. Lumry, S. Rajender, *Biopolymers* **1970**, *9*, 1125–1227.
- [51] A. Cornish-Bowden, *J. Biosci.* **2002**, *27*, 121–126.
- [52] a) L. A. Curtiss, K. Raghavachari, P. C. Redfern, G. S. Kedziora, J. A. Pople, *J. Phys. Chem. A* **2001**, *105*, 227–228; b) J. A. Montgomery, M. J. Frisch, J. W. Ochterski, G. A. Petersson, *J. Chem. Phys.* **1999**, *110*, 2822–2827; c) J. M. L. Martin, G. de Oliveira, *J. Chem. Phys.* **1999**, *111*, 1843–1856.
- [53] S. Raugei, M. L. Klein, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 9484–9485.
- [54] M. C. Payne, M. P. Teter, D. C. Allan, *J. Chem. Soc. Faraday Trans.* **1990**, *86*, 1221–1226.
- [55] J. Tomasi, R. Cammi, B. Mennucci, *Int. J. Quantum Chem.* **1999**, *75*, 783–803.
- [56] W. D. Cornell, P. Cieplak, C. I. Bayly, I. R. Gould, K. M. Merz, Jr., D. M. Ferguson, D. C. Spellmeyer, T. Fox, J. W. Caldwell, P. A. Kollman, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 5179–5197.
- [57] W. L. Jorgensen, D. S. Maxwell, J. Tirado-Rives, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 11225–11236.
- [58] a) D. Qiu, P. S. Shenkin, F. P. Hollinger, W. C. Still, *J. Phys. Chem. A* **1997**, *101*, 3005–3014; b) W. C. Still, A. Tempczyk, R. C. Hawley, T. Hendrickson, *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 6127–6129.
- [59] a) R. C. Rizzo, J. Tirado-Rives, W. L. Jorgensen, *J. Med. Chem.* **2001**, *44*, 145–154; b) M. L. P. Price, W. L. Jorgensen, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 9455–9466.
- [60] a) C. M. Reyes, R. Nifosi, A. D. Frankel, P. A. Kollman, *Biophys. J.* **2001**, *80*, 2833–2842; b) 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.
- [61] a) K. S. Kim, P. Tarakeshwar, J. Y. Lee, *Chem. Rev.* **2000**, *100*, 4145–4185; b) D. H. Williams, B. Bardsley, *Perspect. Drug Discovery Des.* **1999**, *17*, 43–59; c) M. S. Searle, D. H. Williams, U. Gerhard, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 10697–10704.
- [62] H.-J. Böhm, *J. Comput.-Aided Mol. Des.* **1994**, *8*, 243–256, 623–632.

- [63] a) F. Eblinger, H.-J. Schneider, *Angew. Chem.* **1998**, *110*, 821–824; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, *37*, 826–829; b) A. Hossain, H.-J. Schneider, *Chem. Eur. J.* **1999**, *5*, 1284–1290.
- [64] K. A. Dill, *J. Biol. Chem.* **1997**, *272*, 701–704.
- [65] a) D. Eisenberg, A. D. McLachlan, *Nature* **1986**, *319*, 199–203; b) L. Wesson, D. Eisenberg, *Protein Sci.* **1992**, *1*, 227–235; c) I. Luque, E. Freire, *Proteins Struct. Funct. Genet.* **2002**, *49*, 181–190.
- [66] a) C. Tanford, *The Hydrophobic Effect: Formation of Micelles and Biological Membranes*, Wiley, New York, **1980**; b) W. Blokzijl, J. B. F. N. Engberts, *Angew. Chem.* **1993**, *105*, 1610–1648; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1993**, *32*, 1545–1579; c) T. Lazaridis, *Acc. Chem. Res.* **2001**, *34*, 931–937.
- [67] Lit. [15s].
- [68] K. A. Dill, *Biochemistry* **1990**, *29*, 7133–7155.
- [69] Siehe z.B.: T. M. Raschke, J. Tsai, M. Levitt, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2001**, *98*, 5965–5969.
- [70] Lit. [49c].
- [71] a) R. Hubbard, J. Thornton, NACCESS, **1993**, Department of Biochemistry and Molecular Biology, University College London; b) A. Nicholls, K. A. Sharp, B. Honig, *Proteins Struct. Funct. Genet.* **1991**, *11*, 281–296.
- [72] Weil die Größe der vergrabenen Oberfläche von der Art der Bindung abhängt, wurde zunächst mit dem Programm Macro-Model und dem AMBER\*-Kraftfeld eine Konformationsanalyse durchgeführt. Für Nitrophenol wurde das molekulare Merck-Kraftfeld eingesetzt, weil keine geeigneten AMBER\*-Parameter gefunden wurden. Die energieärmste Konformation wurde als Startpunkt für die NACCESS-Rechnungen gewählt.<sup>[71a]</sup>
- [73] a) A. Bhattacharya, T. Grüne, S. Curry, *J. Mol. Biol.* **2000**, *303*, 721–732; b) I. Petipas, A. A. Bhattacharya, S. Twine, M. East, S. Curry, *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 22804–22809; c) A. A. Bhattacharya, S. Curry, N. P. Franks, *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 38731–38738.
- [74] a) F. E. Romesberg, B. Spiller, P. G. Schultz, R. C. Stevens, *Science* **1998**, *279*, 1929–1933; b) G. J. Wedemayer, P. A. Patten, L. H. Wang, P. G. Schultz, R. C. Stevens, *Science* **1997**, *276*, 1665–1669; c) K. Hotta, H. Lange, D. J. Tantillo, K. N. Houk, D. Hilvert, I. A. Wilson, *J. Mol. Biol.* **2000**, *302*, 1213–1225; d) C. M. Paschal, J. Hasserodt, T. Jones, R. A. Lerner, K. D. Janda, D. W. Christianson, *Angew. Chem.* **1999**, *111*, 1859–1864; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, *38*, 1743–1747; e) J. Hasserodt, K. D. Janda, R. A. Lerner, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 5993–5998; f) B. Gigant, T. Tsumuraya, I. Fujii, M. Knossow, *Structure* **1999**, *7*, 1385–1393; g) B. Golinelli-Pimpaneau, O. Gonçalves, T. Dintinger, D. Blanchard, M. Knossow, C. Tellier, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2000**, *97*, 9892–9895; h) P. A. Patten, N. S. Gray, P. L. Yang, C. B. Marks, G. J. Wedemayer, J. J. Boniface, R. C. Stevens, P. G. Schultz, *Science* **1996**, *271*, 1086–1091; i) L. C. Hsieh-Wilson, P. G. Schultz, R. C. Stevens, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1996**, *93*, 5363–5367; j) B. Gigant, J.-B. Charbonnier, Z. Eshhar, B. S. Green, M. Knossow, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1997**, *94*, 7857–7861; k) K. Gruber, B. Zhou, K. N. Houk, R. A. Lerner, C. G. Shelvin, I. A. Wilson, *Biochemistry* **1999**, *38*, 7062–7074; l) F. E. Romesberg, B. D. Santarsiero, B. Spiller, J. Yin, D. Barnes, P. G. Schultz, R. C. Stevens, *Biochemistry* **1998**, *37*, 14404–14409; m) A. G. Cochran, P. G. Schultz, *Science* **1990**, *249*, 781–783; n) M. M. Thayer, E. H. Olender, A. S. Arvai, C. K. Koike, I. L. Canestrelli, J. D. Stewart, S. J. Benkovic, E. D. Getzoff, V. A. Roberts, *J. Mol. Biol.* **1999**, *291*, 329–345.
- [75] E. A. Padlan, *Adv. Protein Chem.* **1990**, *49*, 57–133.
- [76] S. Jones, J. M. Thornton, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1996**, *93*, 13–20.
- [77] a) H.-J. Schneider, T. Blatter, S. Simova, *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 1996–2000; b) L. Garel, B. Lozach, J.-P. Dutasta, A. Collet, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 11652–11653.
- [78] a) H. Gohlke, G. Klebe, *Angew. Chem.* **2002**, *114*, 2764–2798; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 2644–2676; b) R. Wang, L. Lai, S. Wang, *J. Comput.-Aided Mol. Des.* **2002**, *16*, 11–26; c) A. M. Davis, S. J. Teague, G. J. Kleywegt, *Angew. Chem.* **2003**, *115*, 2822–2841; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42*, 2718–2736.
- [79] A. Warshel, *Computer Modeling of Chemical Reactions in Enzymes and Solutions*, Wiley, New York, **1991**.
- [80] B. G. Miller, M. J. Snider, S. A. Short, R. Wolfenden, *Biochemistry* **2000**, *39*, 8113–8118.
- [81] T. L. Aymes, A. C. O'Donoghue, J. P. Richard, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 11325–11326.
- [82] a) D. E. Koshland, Jr., *Angew. Chem.* **1994**, *106*, 2467–2472; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1994**, *33*, 2375–2378; b) D. Herschlag, *Bioorg. Chem.* **1988**, *16*, 62–96.
- [83] a) A. Cohen, J. P. Klinman, *Chem. Biol.* **1999**, *6*, R191–R198; b) W. R. Cannon, S. J. Benkovic, *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 26257–26260; c) E. Y. Lau, T. C. Bruice, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 12387–12394; d) J. L. Radkiewicz, C. L. Brooks III, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 225–231; e) M. Karplus, *J. Phys. Chem. B* **2000**, *104*, 11–27.
- [84] G. Ujaque, D. J. Tantillo, Y. Hu, K. N. Houk, K. Hotta, D. Hilvert, *J. Comput. Chem.* **2002**, *24*, 98–110.
- [85] M. J. Field, *J. Comput. Chem.* **2000**, *23*, 48–58.