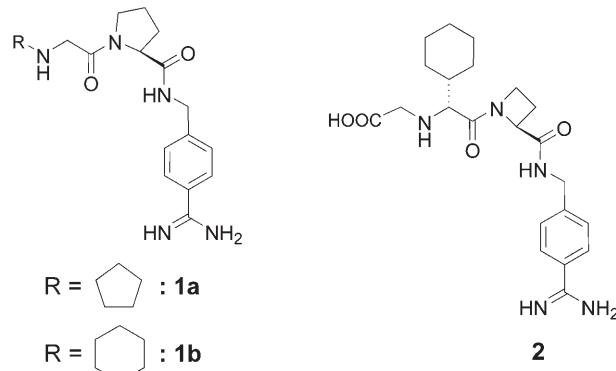


Thermodynamisches Inhibitionsprofil eines Cyclopentyl- und eines Cyclohexylderivats gegenüber Thrombin: gleich, jedoch aus unterschiedlichem Grund**

Christof Gerlach, Michael Smolinski, Holger Steuber, Christoph A. Sottriffer, Andreas Heine, David G. Hangauer und Gerhard Klebe*

In der modernen Wirkstoffforschung werden erfolgversprechende Leitstrukturen durch systematische Variationen von funktionellen Gruppen oder Seitenketten um ein Zentralfragment optimiert. Liegt eine Kristallstruktur des Protein-Ligand-Komplexes vor, kann diese unterstützend zu diesem Prozess herangezogen werden. Dadurch kann mit strukturbasierter Information die Auswahl der darauffolgenden Variationen der Leitstruktur getroffen werden. Für diesen Schritt greift man gerne auf einige Regeln zurück, die ein Abschätzen von Einzelgruppenbeiträgen zur Bindung ermöglichen. Diese Regeln ermöglichen eine grobe Abschätzung, wie groß der Anteil eines bestimmten Ligandfragments zur Affinität bei dessen Einführung in die Leitstruktur ausfallen sollte.^[1-3] So beträgt der Einzelbeitrag einer Methyleneinheit ca. 3–4 kJ mol⁻¹ zur freien Enthalpie,^[1,2] sodass bei einer schrittweisen Erweiterung einer Seitenkette um eine Methyleneinheit eine ansteigende Bindungsaffinität um diesen Betrag erwartet wird, sofern das Zielprotein die Erweiterung der Seitenkette toleriert.

Voraussetzung für einen stetigen Anstieg der Affinität durch hydrophobe Bindung pro hinzugefügter Methyleneinheit ist der gleiche Bindungsmodus für alle Vertreter der Ligandenserie im Komplex mit dem Protein. Zur Überprüfung dieses Prinzips haben wir ein homologes Paar von Thrombin-Inhibitoren (**1a** und **1b**) untersucht, die sich durch eine Methyleneinheit in einem Cycloalkylrest zum Ausfüllen der S3/S4-Spezifitätstasche unterscheiden (Schema 1). Beim Entwurf dieser Verbindungen orientierten wir uns an dem strukturell charakterisierten Bindungsmodus von Melagatran (**2**) im Komplex mit Thrombin, in dem die S3/S4-Tasche durch einen Cyclohexylring ausgefüllt wird.^[4] Wir haben einen



Schema 1: Strukturformeln der Derivate **1a** und **1b**, die durch isotherme Titrationskalorimetrie, Röntgenstrukturanalyse und MD-Simulation untersucht wurden. Zum Vergleich die Formel von Melagatran (**2**).

Cyclohexylrest und einen um eine Methyleneinheit kleineren Cyclopentylrest zum Ausfüllen der S3/S4-Spezifitätstasche verwendet.

Die Synthese der Verbindungen **1a** und **1b** wird an anderer Stelle beschrieben.^[5] Die Inhibitionskonstanten im Komplex mit Thrombin wurden mithilfe eines photometrischen Kinetikassays bestimmt.^[6] Beide Inhibitoren zeigen überraschenderweise nahezu gleiche Bindungsaffinität zu Thrombin. Entgegen der oben vorgestellten Annahme bewirkt die zusätzlich eingeführte CH₂-Gruppe keine Verbesserung der Affinität um 3–4 kJ mol⁻¹ von **1b** im Vergleich zu **1a** (Tabelle 1). Zum besseren Verständnis dieses zunächst überraschenden Ergebnisses haben wir Röntgenstrukturen beider Derivate in Komplex mit Thrombin bestimmt (Abbildung 1). Die Differenzelektronendichte belegt eindeutig den erwarteten Bindungsmodus für das Cyclopentylderivat. Insbesondere der Bereich des fünfgliedrigen Rings ist durch die experimentell bestimmte Elektronendichte gut definiert.

Tabelle 1: Bindungskonstanten K_b und thermodynamische Daten (bestimmt durch isotherme Titrationskalorimetrie) für **1a** und **1b**.^[a]

Ligand	K_b [10 ⁶ L mol ⁻¹]	ΔG° [kJ mol ⁻¹]	ΔH° [kJ mol ⁻¹]	$-T\Delta S^\circ$ [kJ mol ⁻¹]
1a	1.54 ± 0.41	-35.40 ± 0.55	-16.88 ± 0.58	-18.52 ± 0.56
1b	2.18 ± 0.62	-36.16 ± 0.58	-10.50 ± 0.28	-25.66 ± 0.43

[a] Alle Messungen wurden bei 298 K durchgeführt.

[*] Dr. C. Gerlach, Dr. H. Steuber, Dr. A. Heine, Prof. Dr. G. Klebe
Institut für Pharmazeutische Chemie

Philipps-Universität Marburg
Marbacher Weg 6, 35032 Marburg (Deutschland)
Fax: (+49) 6421-282-8994

E-Mail: klebe@mail.uni-marburg.de

Dr. M. Smolinski, Prof. Dr. D. G. Hangauer
Department of Chemistry, University at Buffalo
The State University of New York
Buffalo, NY 14260-3000 (USA)

Prof. Dr. C. A. Sottriffer
Institut für Pharmazie und Lebensmittelchemie
Bayerische Julius-Maximilians Universität Würzburg
Am Hubland, 97074 Würzburg (Deutschland)

[**] Wir danken dem DFG-Graduiertenkolleg „Proteinfunktion auf atomarer Ebene“ (C.G. und H.S.) für die finanzielle Unterstützung.

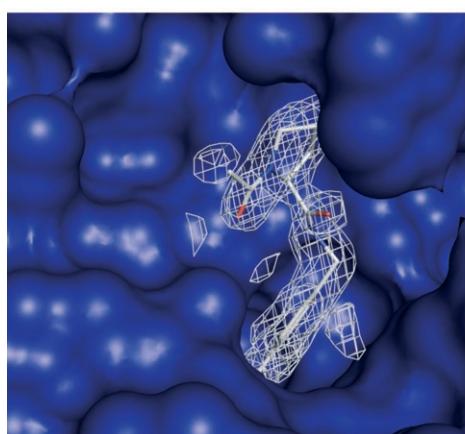
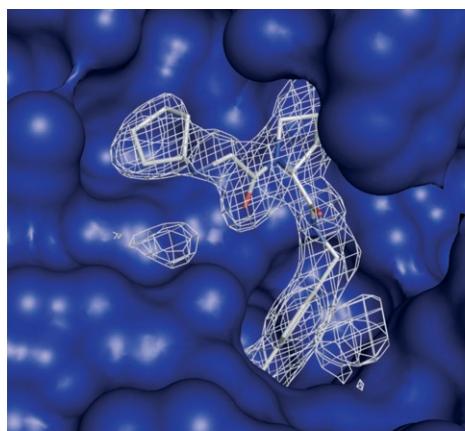


Abbildung 1. Fo-Fc-Differenzelektronendichte des Cyclopentylderivats **1a** (oben) und des Cyclohexylderivats **1b** (unten) in der Bindetasche von Thrombin. Die Differenzelektronendichte ist bei einem Konturniveau von 2σ gezeigt. Für den fünfgliedrigen Ring von **1a** kann eine gut definierte Elektronendichte erhalten werden, eine Positionsbestimmung des sechsgliedrigen Rings von **1b** gelingt dagegen nicht. Dies kann auf eine Restmobilität oder Verteilung über multiple statische Konfigurationen dieses Ligandenteils zurückgeführt werden. Die lösungsmittelzugängliche Oberfläche von Thrombin ist in Blau dargestellt.

Demgegenüber zeigt das Cyclohexylderivat für den sechs-gliedrigen Ring keine Elektronendichte im Bereich der S3/S4-Spezifitätstasche von Thrombin. Der übrige Teil des Liganden **1b** kann eindeutig in der Elektronendichte erkannt werden und zeigt einen zu **1a** analogen Bindungsmodus.

Da sich die Elektronendichte als gemitteltes Beugungsbild aller Moleküle im Kristallgitter ergibt, kann hier keine klare Zuordnung zu einer bzw. einiger weniger Konformationen oder Konfigurationen getroffen werden, sodass davon auszugehen ist, dass entweder im Raum verstreut multiple Anordnungen des Rings vorliegen oder eine dynamische Restmobilität des Cyclohexylringes auftritt. Beide Situationen führen zu unregelmäßig verteilten Atomanordnungen im Kristall und liefern keinen konstruktiven Beitrag zum Beugungsbild, sodass dort keine Elektronendichte zu beobachten ist.

Das unterschiedliche Bindungsverhalten von **1a** und **1b** wurde weiterhin durch isotherme Titrationskalorimetrie (ITC) charakterisiert.^[7] Die Bestimmung der freien Enthalpie

liefert ein nahezu gleiches Ergebnis für **1a** und **1b** (Tabelle 1), es können aber deutliche Unterschiede in der Aufspaltung der freien Enthalpie in enthalpische und entropische Beiträge beobachtet werden: Für das Cyclopentylderivat zeigen Bindungsenthalpie (ΔH) und Entropie ($-T\Delta S$) nahezu gleiche Werte. Die freie Enthalpie (ΔG) des Cyclohexylderivats wird dagegen vom entropischen Bindungsbeitrag dominiert, demzufolge liegt ein geringerer enthalpischer Beitrag vor (Tabelle 1).

Unter Annahme einer gewissen Restmobilität des Cyclohexylrings im gebundenen Zustand im Protein bzw. einer Streuung über mehrere Bindungsmodi für diesen Ligandenteil wird das unterschiedliche thermodynamische Verhalten im Hinblick auf die enthalpischen und entropischen Beiträge zur freien Enthalpie der beiden Liganden erklärbar und deckt sich mit den Resultaten der Röntgenstrukturanalyse. Das Cyclohexylderivat ist im Vergleich zum Cyclopentylderivat entropisch begünstigt, da durch die Bindung an Thrombin nicht so viele konformativale Freiheitsgrade verloren gehen.

Um die sehr unterschiedlichen Mobilitäten der Cycloalkylseitenketten von **1b** und **1a** zu untersuchen, haben wir Moleküldynamiksimulationen der Protein-Ligand-Komplexe durchgeführt.^[9] Die Analyse der erhaltenen Trajektorien, die über eine Zeitspanne von einer 1 ns gesammelt wurden, zeigt beträchtliche Unterschiede. In den Abbildungen 2 und 3a,b sind die Abstände zwischen dem Ligandatom C11 des Cyclopentyrlings und dem Proteinatom CD1 von Leu 99 und CG1 von Ile 174 gezeigt. Demnach wechselt der Abstand systematisch zwischen 4 und 6.5 Å. Dieses Verhalten verweist auf eine Sprungrotation des Cyclopentyrlings. Es erfolgt eine 180°-Drehung um die Bindung zwischen N3 und dem ersten Kohlenstoffatom des fünfgliedrigen Rings. Die vergleichbaren Abstände des Cyclohexylrings von **1b** zwischen den flankierenden Aminosäureresten und dem Ligandatom C11 zeigen dagegen ein anderes Verhalten (Abbildungen 2 und 3a,b): Der eine Abstand (C11-CG1) verbleibt während der ganzen Zeit oberhalb von 5 Å, und der gegenüberliegende zweite Abstand (C11-CD1) fluktuiert ungleichmäßig zwischen 4.5 und 7 Å. Dies unterstreicht die höhere Mobilität des sechsgliedrigen Rings innerhalb der S3/S4-Spezifitätstasche. Eine genaue Betrachtung des Abstands zwischen Ligandatom N3 und der Carbonylgruppe der benachbarten Aminosäure Gly 216 ermöglicht weitere Rückschlüsse (Abbildung 3c). Für Verbindung **1a** zeigt sich entlang der gesamten Trajektorie ein Abstand über 5 Å. Eine Wasserstoffbrücke wird somit nicht gebildet. Für das Cyclohexylderivat kommt es temporär zu Abständen zwischen dem Ligandatom N3 und Gly 216CO, die auf eine Wasserstoffbrückenbildung schließen lassen. Diese Beobachtung unterstreicht weiter die erhöhte Restmobilität des Cyclohexylrings inner- und außerhalb der S3/S4-Spezifitätstasche von Thrombin. Die MD-Simulationen untermauern somit die experimentell durch ITC und Röntgenstrukturanalyse erhaltenen Ergebnisse für **1a** und **1b**.

Die Sprungrotation des fünfgliedrigen Ringes in der S3/S4-Spezifitätstasche ist im Einklang mit der gut definierten Elektronendichte für diesen Komplex. Der Teil des Ligandengerüsts wechselt zwischen zwei geometrisch identischen Anordnungen des Kohlenstoffgerüsts. Die beiden Positionen des Rings führen zu einer gut definierten Elektronendichte.

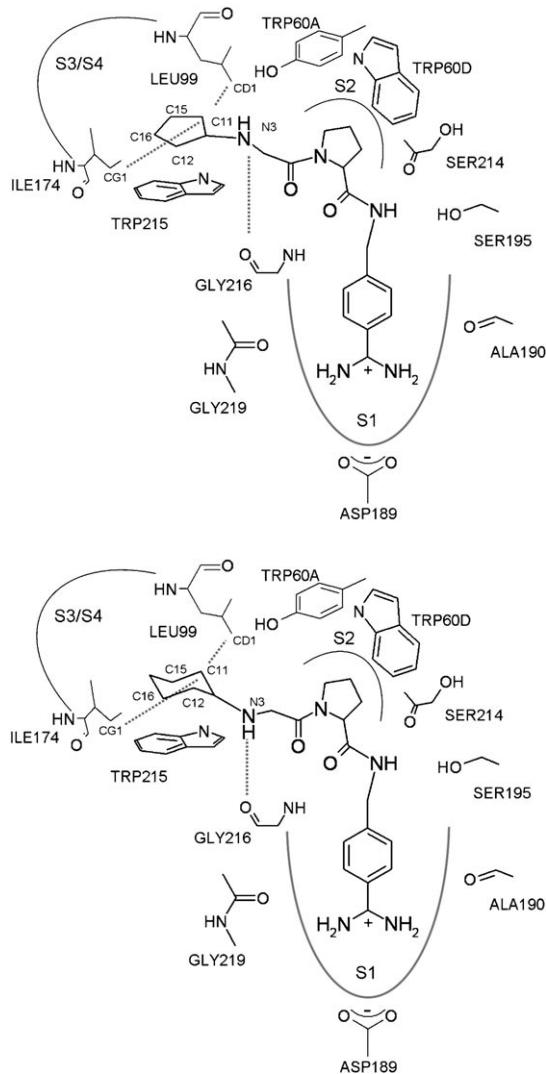


Abbildung 2. Darstellung der Bindungsmodi für das Cyclopentylderivat **1a** (oben) und das Cyclohexylderivat **1b** (unten). Die Abstände, die in den Moleküldynamiksimulationsen aufgezeichnet wurden und in Abbildung 3 gezeigt sind, sind als gestrichelte Linien dargestellt.

Ein ähnliches Verhalten zeigt z.B. die Kristallstruktur von Benzol: Dort kommt es zu einer gut definierten Elektronendichte des aromatischen Rings trotz schneller Rotationen um die sechszählige Drehachse.^[10,11]

Im Vergleich zum freien Zustand des Liganden in Lösung kommt es bei einer Komplexbildung zum Verlust von molekularen Freiheitsgraden, trotz der bestehenden Sprungrotation. Der Cyclohexytring von **1b** zeigt hingegen eine höhere Restmobilität als der Cyclopentytring, die sich in einer unkorrelierten Bewegung in und aus der S3/S4-Tasche dokumentiert. Die kurzzeitige Bildung einer Wasserstoffbrücke im Komplex trägt nicht wesentlich zur Bindungsaffinität bei, da die H-Brücke stark zum umgebenden Lösungsmittel expandiert wird. Die bestehende Restmobilität für **1b** ist jedoch entropisch begünstigt: Bei der Komplexbildung müssen im Vergleich zu **1a** nicht so viele Freiheitsgrade aufgegeben werden.

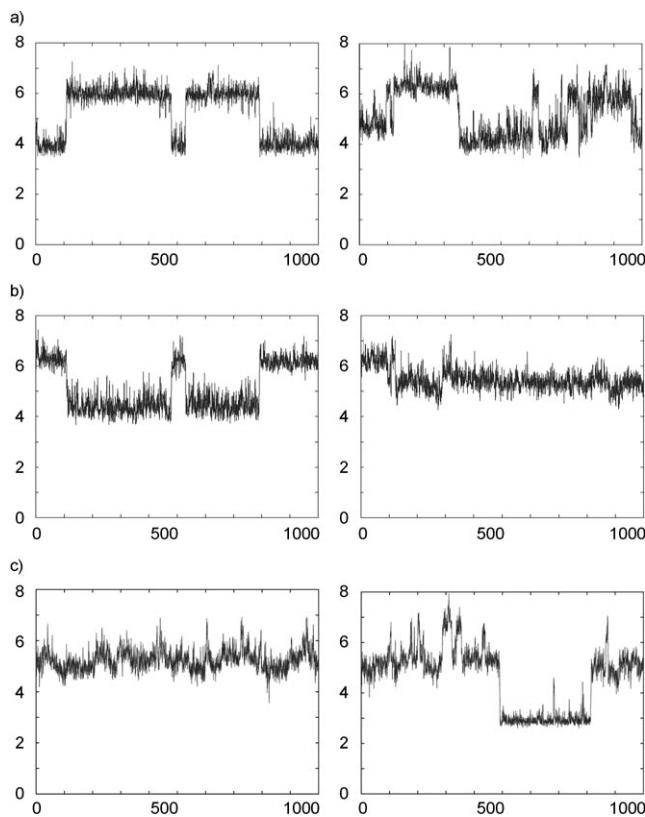


Abbildung 3. Bestimmung ausgewählter Abstände [\AA], die während der MD-Simulation für die Komplexe des Cyclopentylderivats **1a** (links) und des Cyclohexylderivats **1b** (rechts) detektiert wurden. Waagrechte Achsen: t [ps]. Folgende Abstände sind dargestellt: a) C11 zu CD1 von Leu99, b) C11 zu CG1 von Ile174, c) N3 zu Gly216CO.

Was können wir aus diesem Beispiel lernen? Liganden werden üblicherweise durch geringe Strukturvariationen schrittweise optimiert. Das Erweitern von Ligandgruppen soll eine Affinitätssteigerung erzielen, z.B. von $3\text{--}4 \text{ kJ mol}^{-1}$ beim Austausch eines fünf- gegen einen sechsgliedrigen Ring.^[1,2] Selbst sehr ähnliche Liganden können sehr unterschiedliches Bindungsverhalten aufzeigen, was das Aufstellen einer simplen Struktur-Wirkungs-Beziehung erschwert.

In unserem Beispiel nimmt der fünfgliedrige Ring zwei definierte Positionen in der S3/S4-Spezifitätstasche von Thrombin ein, die ihm gute enthalpische Bindungsbeiträge ermöglichen. In einem solchen Fall sollte eine Vergrößerung der hydrophoben Oberfläche zu einer Verbesserung der Bindungsaffinität führen. Das Cyclohexylderivat zeigt jedoch für den hydrophoben Ligandenteil eine höhere Restmobilität. Demzufolge können in der S3/S4-Tasche nicht die erwarteten guten hydrophoben Wechselwirkungen gebildet werden. Dieses überraschende Bindungsverhalten sollte somit keinen Vorteil durch Erweiterung der hydrophoben Oberfläche im Hinblick auf die Bindungsaffinität liefern.

Beim Vergleich der freien Enthalpien der beiden Verbindungen sind nahezu keine Unterschiede festzustellen. Der Verlust enthalpischer Bindungsbeiträge wird aber dank entropisch günstiger Bindungsbeiträge kompensiert.^[12] Es fragt sich, ob das unterschiedliche Bindungsverhalten von **1a** und **1b** rein auf einen Solvatationseffekt zurückzuführen ist, denn

für reines Cyclopentan und Cyclohexan wurden nahezu identische freie Hydrationsenthalpien bestimmt.^[13] Wir schließen diese Erklärung aus, da sie nicht das unterschiedliche Verhalten in den Röntgenstrukturanalysen und den MD-Simulationen deuten kann. Weiterführende Rechnungen mit neueren Methoden, die in der Lage sind, Entropieänderungen bei Komplexbildung in Konformations- und Vibrationsbeiträge aufzuteilen, sollen aufgegriffen werden, um eine genauere Analyse der thermodynamischen Daten vorzunehmen.^[14]

Das vorliegende Beispiel von zwei Liganden mit minimalem Unterschied in ihrer Molekülstruktur unterstreicht, dass das Bindungsverhalten von kleinen Liganden an Proteine ein komplexes Zusammenspiel von Struktur und Dynamik darstellt. Weiterhin wird deutlich, dass eine auf den ersten Blick trivial erscheinende Struktur-Wirkungs-Beziehung nicht unbedingt den simplen Annahmen folgt. Zu einer ähnlichen Schlussfolgerung kommen auch Krishnamurthy et al. bei der Untersuchung einer Serie *para*-substituierter Sulfonamide im Komplex mit Carboanhydrase II. Die Autoren unterstreichen ebenfalls, dass Wechselwirkungen und die zugrunde liegenden biophysikalischen Phänomene zwischen Proteinen und niedermolekularen Liganden bisher nur unzureichend verstanden sind.^[15]

Eingegangen am 16. März 2007,
veränderte Fassung am 20. Juli 2007
Online veröffentlicht am 27. September 2007

Stichwörter: Isotherme Titrationskalorimetrie · Leitstrukturoptimierung · Thermodynamik · Thrombin · Wirkstoffdesign

- [1] P. R. Andrews, D. J. Craik, J. L. Martin, *J. Med. Chem.* **1984**, *27*, 1648.
- [2] I. D. Kuntz, K. Chen, K. A. Sharp, P. A. Kollman, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1999**, *96*, 9997.
- [3] P. H. Olesen, *Curr. Opin. Drug Discov. Devel.* **2001**, *4*, 471.
- [4] F. Dullweber, M. T. Stubbs, D. Musil, J. Stürzebecher, G. Klebe, *J. Mol. Biol.* **2001**, *313*, 593.
- [5] M. P. Smolinski, Dissertation, University at Buffalo, Buffalo, NY, USA, **2006**.
- [6] J. Stürzebecher, U. Stürzebecher, H. Vieweg, G. Wagner, J. Hauptmann, F. Markwardt, *Thromb. Res.* **1989**, *54*, 245.

[7] Vorherige Studien zu Melagatran durch ITC und Röntgenstrukturanalyse und dazugehörige Berechnungen der pK_s -Werte^[4,8] ergaben keine Änderungen in den Protonierungszuständen der Leitstrukturen bei Komplexbildung; demnach kann eine Änderung der Protonierungszustände ausgeschlossen werden.

- [8] P. Czodrowski, C. A. Sotriffer, G. Klebe, *J. Mol. Biol.* **2007**, *367*, 1347.
- [9] Die Protein-Ligand-Komplexe wurden mit ca. 7400 TIP3P-Wassermolekülen in einer Box solvatisiert. Zur Parametrisierung der Liganden wurde das Kraftfeld Amber gaff verwendet; die Benzamidingeruppe wurde mit Zusatzparametern (L. M. McDowell et al., *J. Med. Chem.* **1999**, *42*, 3910) beschrieben. Die Atomladungen der Liganden wurden durch Anpassen an das mit HF/6-31G* berechnete elektrostatische Potential mit Gaussian98 für die Konformation in der Kristallstruktur erhalten (Programm RESP). Die Moleküldynamik wurde durch Aufheizen des Lösungsmittels auf 300 K für 20 ps und anschließendes Abkühlen auf 100 K über einen Zeitraum von 5 ps gestartet. Dabei wurden Protein- und Ligandatome innerhalb der Wasserbox fixiert. Danach wurde das Gesamtsystem schrittweise über 25 ps auf 300 K aufgeheizt. Die Simulation wurde dann 1050 ps bei konstanter Temperatur und Druck (NPT) durchgeführt, wobei periodische Randbedingungen (Amber 8.0) angewendet wurden. Für die spätere Analyse wurden alle zehn Zeitschritte die Energiewerte des Systems, alle 0.5 ps die Koordinaten des Protein-Ligand-Komplexes und alle 5 ps jede Lösungsmittelkoordinate gespeichert. Alle gezeigten Analyseergebnisse beziehen sich auf die 1 ns dauernde Trajektorie, wobei die ersten 100 ps, die das Anpassen der Gesamttemperatur des Systems und das Erlangen des Gleichgewichts umfassen, ausgeschlossen wurden. Die dadurch erhaltenen Daten wurden mit Programmen des Amber-Pakets 7.0 analysiert. VMD (W. Humphrey, A. Dalke, K. Schulten, *J. Mol. Graph.* **1996**, *14*, 33) und PYMOL (<http://www.pymol.org>) dienten zur visuellen Analyse der Trajektorie.
- [10] E. R. Andrew, R. G. Eades, *Proc. R. Soc. London Ser. A* **1953**, *218*, 537.
- [11] G. E. Bacon, W. A. Curry, S. A. Wilson, *Proc. R. Soc. London Ser. A* **1964**, *279*, 98.
- [12] J. Dolenc, R. Baron, C. Oostenbrink, J. Koller, W. F. van Gunsteren, *Biophys. J.* **2006**, *91*, 1460.
- [13] E. Gallicchio, M. M. Kubo, R. M. Levy, *J. Phys. Chem. B* **2000**, *104*, 6271.
- [14] C. A. Chang, W. Chen, M. K. Gilson, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2007**, *104*, 1534.
- [15] V. M. Krishnamurthy, B. R. Bohall, V. Semetey, G. M. Whitesides, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 5802.