

# Chamäleon-artige Bindungsmodi in der Leitstrukturoptimierung: wechselnde Bindungsgeometrien bei Aspartylprotease-Inhibitoren\*\*

Maren Kuhnert, Helene Köster, Ruben Bartholomäus, Ah Young Park, Amir Shahim, Andreas Heine, Holger Steuber, Gerhard Klebe und Wibke E. Diederich\*

**Abstract:** Eine erfolgreiche strukturbasierte Leitstrukturoptimierung beruht auf der korrekten Interpretation der zugrundeliegenden Struktur-Wirkungs-Beziehungen, auf deren Grundlage üblicherweise die nächsten zu synthetisierenden Moleküle vorgeschlagen werden. Folglich stellt sich die Frage, wie oft ein experimentell bestimmter Bindungsmodus während der Optimierung überprüft werden muss, um sicherzustellen, dass man nicht aufgrund falscher Annahmen im weiteren Optimierungsprozess in die Irre geführt wird. Wie hier gezeigt wird, können bereits kleine, in der medizinischen Chemie jedoch überaus übliche Variationen eines Liganden zu einer drastischen Änderung der Bindungsgeometrien führen: Überraschenderweise wurden innerhalb einer Serie von acht Liganden vier verschiedene Bindungsmodi im Komplex mit der Aspartylprotease Endothiapepsin, die als Modellenzym für Renin und  $\beta$ -Sekretase dient, röntgenkristallographisch gefunden. Wir schlagen eine Methode vor, mit der ein erster Anhaltspunkt darüber gewonnen werden kann, wann eine experimentelle Überprüfung des ursprünglich gefundenen Bindungsmodus sinnvoll ist.

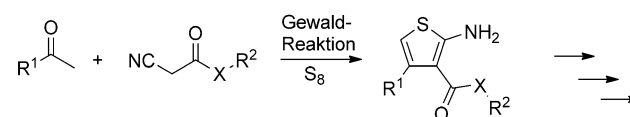
Das Konzept des strukturbasierten Wirkstoffdesigns im Optimierungsprozess vom ersten Screening-Treffer („Hit“) über die Leitstruktur zum klinischen Kandidaten und letztlich dem zugelassenen Arzneistoff wurde in den letzten drei Jahrzehnten erfolgreich etabliert.<sup>[1]</sup> Erfolge dieses Ansatzes reichen von der Entwicklung verschiedener Inhibitoren der HIV-1-Protease über das Design des Neuraminidase-Inhibitors Oseltamivir, den Kinase-Inhibitor Imatinib und diverser

HCV-Protease-Inhibitoren bis hin zu einer Vielzahl von aktuellen strukturgeleiteten Wirkstoffdesignprojekten.<sup>[2]</sup>

Ausgehend von einem oder mehreren Hits wird zunächst der Bindungsmodus eines repräsentativen Vertreters experimentell ermittelt, häufig mittels Röntgenkristallographie. Basierend auf diesem Ergebnis wird dann eine erste Serie von Derivaten des initialen Hits zum Zwecke der Optimierung synthetisiert, wobei die Aktivität der Verbindungen in der Regel mit einem geeigneten biologischen Assay bestimmt wird. Typischerweise werden dabei die chemischen Variationen der Leitstruktur unter der Annahme entworfen, dass der initial experimentell bestimmte Bindungsmodus durch die Variation nicht verändert wird. Aus den erhaltenen Ergebnissen werden erste Struktur-Aktivitäts-Beziehungen (SAR) und weitere Optimierungsvorschläge abgeleitet. Trotz der Erfolge der strukturbasierten Wirkstoffentwicklung wird nach wie vor kontrovers diskutiert, wie viel strukturbiochemische Unterstützung in einem Leitstrukturoptimierungsprozess nötig ist, um Änderungen der Bindungsgeometrie aufzuspüren und zuverlässige SAR ableiten zu können. Gibt es jenseits der Kristallographie Indikatoren, die auf einen gleichbleibenden oder geänderten Bindungsmodus des Grundgerüsts im Optimierungsprozess hinweisen? Hier gehen wir diesen Fragestellungen anhand eines etablierten Modellsystems nach und schlagen eine prädiktive Methode vor, welche Hinweise liefern kann, ob eine Validierung der Bindungsgeometrie, z. B. mittels Röntgenkristallographie, in Betracht gezogen werden sollte.

In der Wirkstoffentwicklung dient die Aspartylprotease Endothiapepsin (EP) gemeinhin als Modellenzym, unter anderem für die Entwicklung von Renin- und  $\beta$ -Sekretase-Inhibitoren.<sup>[3]</sup> Basierend auf der Gewald-Reaktion (Schema 1)<sup>[4]</sup> wurde eine Serie von substituierten 2-Aminothiophenen als EP-Inhibitoren synthetisiert, die Affinitäten im zweistelligen  $\mu$ M- bis submikromolaren Bereich aufweisen. Ausgehend von den zweistellig mikromolaren Inhibitoren **1** und **2** (Abbildung 1) unternahmen wir eine strukturgeleitete SAR-Studie dieser Ligandenserie.

Die mit einer Auflösung von 1.3 Å erhaltene Kristallstruktur von **1** im Komplex mit EP zeigt, dass der Tryptamin-Rest des Inhibitors die S<sub>1</sub>-Tasche adressiert, während der



**Schema 1.** Synthesesequenz zum Aufbau des 2-Aminothiophen-Grundgerüsts mithilfe der Gewald-Reaktion.

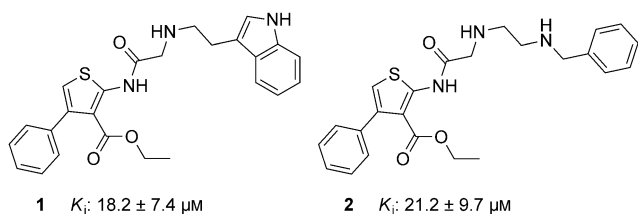
[\*] M. Kuhnert, A. Shahim, Prof. Dr. W. E. Diederich  
Institut für Pharmazeutische Chemie, Philipps-Universität Marburg  
Hans-Meerwein-Straße 3, 35032 Marburg (Deutschland)  
E-Mail: wibke.diederich@staff.uni-marburg.de

Dr. H. Köster, Dr. R. Bartholomäus, Dr. A. Y. Park, Prof. Dr. A. Heine,  
Prof. Dr. G. Klebe  
Institut für Pharmazeutische Chemie, Philipps-Universität Marburg  
Marbacher Weg 6, 35032 Marburg (Deutschland)  
Dr. H. Steuber<sup>[†]</sup>  
LOEWE-Zentrum für Synthetische Mikrobiologie  
Philipps-Universität Marburg  
Hans-Meerwein-Straße, 35032 Marburg (Deutschland)

[†] Derzeitige Adresse: Bayer Pharma AG, Lead Discovery Berlin,  
Structural Biology (Deutschland)

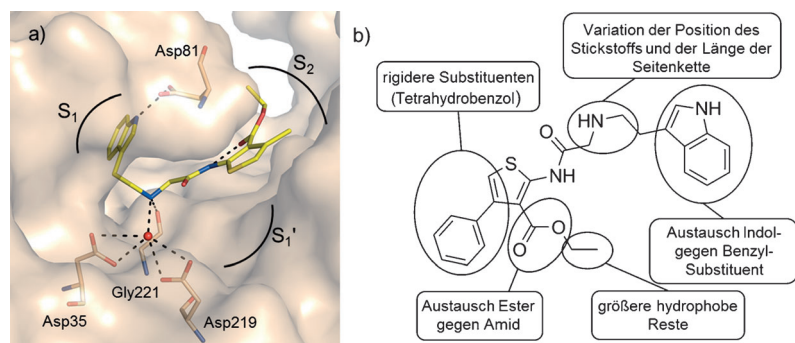
[\*\*] Wir danken den Wissenschaftlern der Beamline BESSY II (Berlin),  
der Beamline Petra III (Hamburg) und der SLS Villigen (Schweiz)  
für ihre Hilfe sowie dem Helmholtz-Zentrum für Materialien und  
Energie (Berlin) für die Übernahme der Reisekosten.

Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter  
<http://dx.doi.org/10.1002/ange.201411206> zu finden.



**Abbildung 1.** Strukturformeln von **1** und **2** und ihre Affinitätsdaten gegen EP.

Thiophenring zwischen der  $S_1'$ - und  $S_2$ -Tasche platziert wird (Abbildung 2a). Die katalytische Diade (Asp35 und Asp219) wechselwirkt über das lytische Wassermolekül vermittelt mit dem  $sp^3$ -hybridisierten Stickstoff. Darüber hinaus fungiert dieses wahrscheinlich protonierte Amin als Donor für eine weitere H-Brücke zur Carbonylgruppe von Gly221. Der Indolstickstoff adressiert mittels einer ladungsunterstützten H-

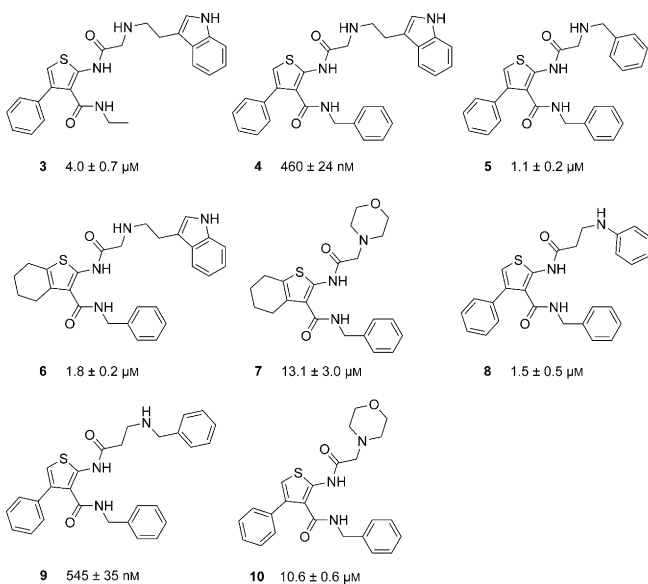


**Abbildung 2.** a) Bindungsmodus von **1** im Komplex mit EP. Dargestellt sind die wichtigsten Wasserstoffbrücken (gestrichelte Linien) sowie die daran beteiligten Aminosäuren. Eine Darstellung des vollständigen Wasserstoffbrückennetzwerks findet sich in den Hintergrundinformationen, Abbildung S5. b) Chemische Modifikationen von **1**, abgeleitet vom Bindungsmodus.

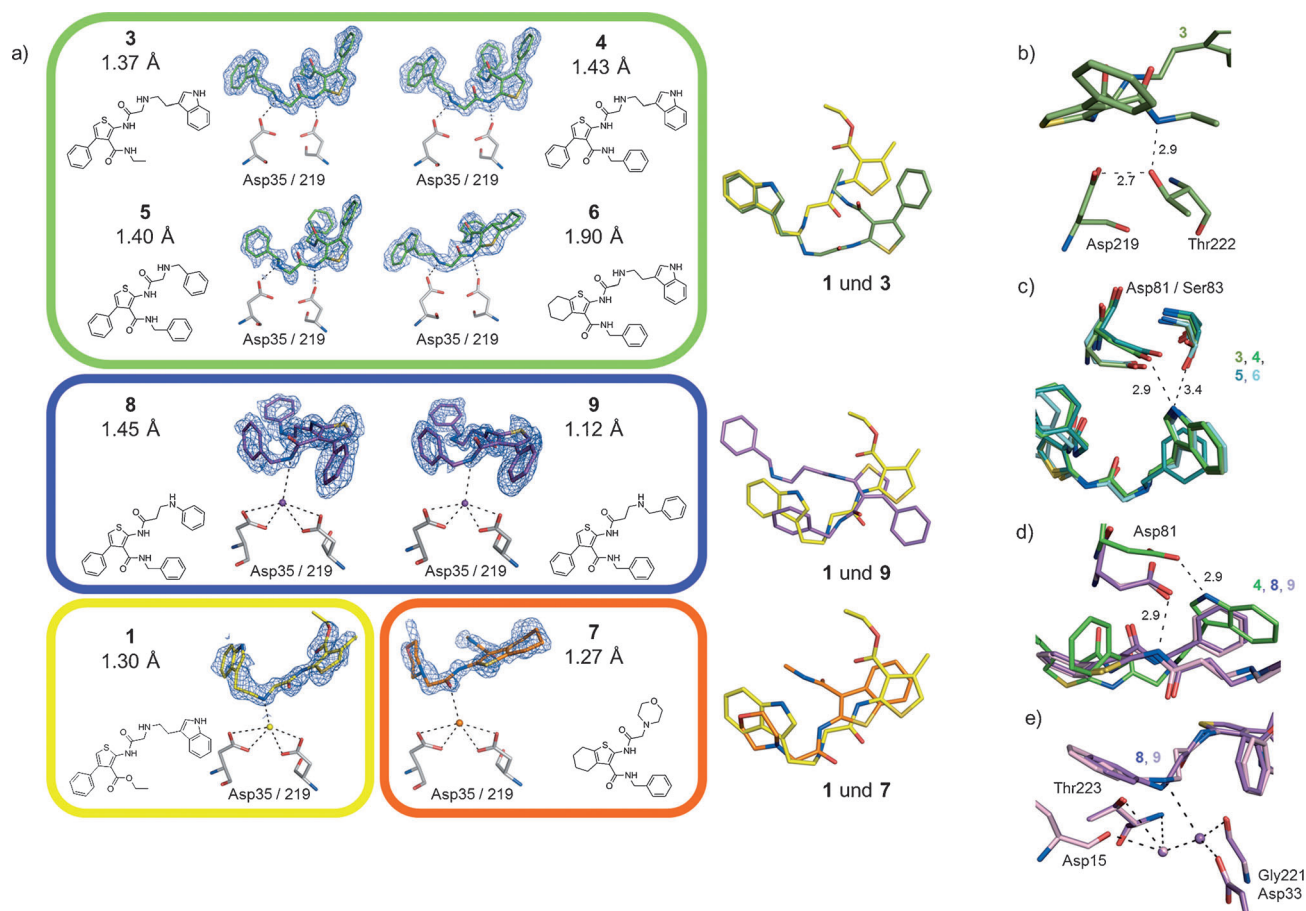
Brücke Asp81, welches an der Spitze der Flap-Region lokalisiert ist. Für den Phenylring des Inhibitors konnte keine definierte Differenzelektronendichte erhalten werden, was auf eine Verteilung über mehrere Konformationen hindeutet, sodass dieser nicht in das Strukturmodell eingefügt wurde. Interessanterweise bilden das Amid-NH und der Carbonylsauerstoff des Esters eine intramolekulare Wasserstoffbrücke, wobei die Ester- und die Thiophen-Ebene nahezu koplanar zueinander angeordnet sind (Torsionswinkel  $\approx 18^\circ$ ) und die geräumigen Substituenten (Ethylester und Phenylring) eine gegenseitig ekliptische Konformation einnehmen. Um die SAR dieses Grundgerüsts zu untersuchen, wurde basierend auf dem Bindungsmodus von **1** eine Serie von Verbindungen mit verschiedenen strukturellen Modifikationen entworfen und synthetisiert (Abbildung 2b). Eine Verlängerung des Ethylester-Restes mit größeren hydrophoben Resten zur Adressierung der hydrophoben  $S_2/S_4$ -Tasche ließ dabei einen Affinitätsgewinn erwarten. Um die elektronischen Eigenschaften der intramolekularen H-Brücke zu modulieren, sollte der Einfluss des Austauschs der Estergruppe gegen eine

entsprechende Amidfunktionalität untersucht werden. Eine Drehung der Carbonylgruppe könnte zusätzlich einen polaren Kontakt zu Tyr226 ermöglichen (Abbildung S1 in den Hintergrundinformationen). Des Weiteren wurden die Länge der Tryptamin-Seitenkette und die Position des basischen Stickstoffs variiert. Der Austausch des Indol- gegen einen Morpholin-Rest sollte zudem die Löslichkeit der Liganden erhöhen. Da der Phenylring in **1** in der Kristallstruktur nicht definiert ist, wurde zusätzlich ein rigideres Grundgerüst, ein anelliertes Tetrahydrobenzothiophen, in die Untersuchung miteinbezogen.

Die synthetisierten Verbindungen und ihre Hemmwerte sind in Abbildung 3 dargestellt, wobei **4** und **9** die aktivsten Verbindungen dieser Serie sind (460 und 545 nM). Allerdings gestaltet sich die Interpretation der zugrundeliegenden SAR basierend auf dem Bindungsmodus von **1** schwierig. Überraschenderweise führt der einfache Austausch des Ester-Restes gegen eine Amidgruppe zu einer Affinitätssteigerung um den Faktor 5 (**3**,  $4.0 \mu\text{M}$ ). Ist dieser Affinitätsgewinn alleine auf eine veränderte Interaktion des Amids zurückzuführen und welche Auswirkung hat dies auf die intramolekulare H-Brücke? Ersetzt man die Ethylgruppe in **3** gegen einen Benzylsubstituenten, so resultiert dies in dem affinsten Liganden dieser Serie (**4**), der einen  $K_i$ -Wert von 460 nM und somit eine Affinitätssteigerung um eine Zehnerpotenz aufweist. Die Anellierung eines Tetrahydrobenzols an die [b]-Seite des Thiophenrings anstelle des 4-Phenyl-Substituenten (**6**) führt hingegen zu einer etwa vierfachen Verringerung der Affinität, obwohl der Phenylsubstituent in der Struktur von **1** ungeordnet ist und somit nicht zu erwarten war, dass er eine gerichtete Interaktion zum Protein ausbildet. Der Austausch des Indolrings in **4** gegen einen Benzylsubstituenten (**5**) führt



**Abbildung 3.** Strukturformeln der synthetisierten Inhibitoren **3–10** und ihre Affinitätsdaten gegen EP.



**Abbildung 4.** a) Links: Bindungsmodi der synthetisierten Verbindungen und Zuordnung zu den Bindungsmodus-Klassen, gekennzeichnet durch einen grünen, violetten, gelben oder orangenen Rahmen. Auflösungen der Kristallstrukturen sind in Å angegeben.  $2F_o - F_c$ -Elektronendichten sind blau bei  $1\sigma$  dargestellt. Rechts: Überlagerung von **1** (gelb) mit jeweils einem Vertreter jeder Bindungsmodus-Klasse im aktiven Zentrum. b) H-Brücke des Amid-NH von **3** zu Thr222-O $\gamma$ . Wahrscheinlich bildet Thr222 eine H-Brücke als H-Brücken-Donor zu Asp219 aus und kann dadurch nur noch als H-Brücken-Akzeptor gegenüber dem Liganden fungieren. c) H-Brücke des Indol-NH von **3**, **4** und **6** zu Asp81 und Ser83. Diese Wechselwirkung ist für **5** nicht möglich, da **5** anstelle des Indols mit einer Benzylgruppe substituiert ist. d) Die ladungsunterstützte H-Brücke zu Asp81, die in der grünen Klasse (hier für **4** gezeigt) mit dem Indol-NH gebildet wird, wird in **8** und **9** von deren Amid-NH in 2-Position des Thiophens ausgeübt. e) H-Brücken Netzwerk des Anilin-NH bzw. Benzyl-NH von **8** und **9**. Beteiligte Wassermoleküle sind als Kugeln dargestellt.

wiederum zu einer ca. zweifachen Affinitätsverringering (1.1  $\mu\text{M}$ ), was wahrscheinlich durch den Verlust der ladungsunterstützten Wasserstoffbrücke zum Asp81 zustande kommt. Die Verschiebung des als Donor an der Wechselwirkung zum lytischen Wassermolekül beteiligten basischen Stickstoffs resultierte in Verbindung **8** und praktisch unveränderter Affinität (1.5  $\mu\text{M}$ ), während die Verbindung **9**, die eine um ein Kohlenstoff verlängerte Seitenkette aufweist, mit 545 nm unerwarteterweise nahezu die gleiche Affinität zeigt wie **4**. Aufgrund dieser weitgehend inkongruenten SAR führten wir eine umfassende strukturelle Untersuchung der zugrundeliegenden Bindungsmodi mittels Röntgenstrukturanalyse durch.

Die Kristallstrukturen von EP im Komplex mit **1** sowie **3–9** konnten erfolgreich bestimmt werden. Überraschenderweise wurden dabei mit den acht hergestellten Verbindungen vier verschiedene Bindungsmodi erhalten, von denen unsere Ausgangsverbindung **1** den einzigen Vertreter ihres Bindungsmodus darstellt. Abbildung 4a zeigt die erhaltenen Kristallstrukturen, die Zuordnung der Inhibitoren zu den vier

verschiedenen Klassen von Bindungsmodi sowie die Überlagerung der Ausgangsverbindung **1** mit jeweils einem Vertreter der anderen Bindungsmodus-Klassen. Das Protein weist unter den acht Kristallstrukturen, die alle die gleiche Kristallpackung aufweisen, eine nahezu identische Konformation auf: Die rmsd-Werte (root-mean-square deviation) für die Überlagerung aller Atome liegen unter 0.5 Å, bei der Überlagerung der Rückgratatom unter 0.3 Å.<sup>[5]</sup> Die unterschiedlichen Bindungsmodi werden somit weder durch unterschiedliche Konformationen des Proteins noch durch eine unterschiedliche Kristallpackung verursacht. Erstaunlicherweise zeigen die beiden affinsten Inhibitoren dieser Serie unterschiedliche Bindungsmodi. Die größte Klasse (grün) besteht aus vier Verbindungen (**3**, **4**, **5** und **6**), gefolgt von der zweigliedrigen Klasse (**8** und **9**). Bei den Verbindungen **1** und **7** handelt es sich jeweils um die einzigen Vertreter des jeweiligen Bindungsmodus. Bemerkenswert ist, dass zwischen den vier Klassen sowohl die Interaktion mit der katalytischen Diade als auch die Taschenbesetzung deutliche Unterschiede aufweist. Dabei kommt dem lytischen Wassermolekül eine



besondere Rolle zu: Es fungiert entweder als Wasserstoffbrücken-Donor oder -Akzeptor, oder es kann sogar durch den Liganden aus der Bindetasche verdrängt werden. **1** adressiert die Aspartate 35 und 219 mit seinem  $sp^3$ -Stickstoff über das lytische Wasser, welches in diesem Fall als H-Brücken-Akzeptor fungiert (Abbildung 4a). In den Strukturen von **8** und **9** (violette Klasse) bildet der Benzyl-substituierte Amidstickstoff einen polaren Kontakt zu dem lytischen Wasser aus, wobei die Geometrie für eine typische H-Brücke eher ungünstig ist. **7** interagiert mit dem Morpholinomethylen-substituierten Carbonylsauerstoff über das lytische Wassermolekül mit den katalytischen Aspartaten. In diesem Fall nimmt dieses allerdings die Rolle als H-Brücken-Donor ein. Alle Verbindungen der grünen Klasse wechselwirken hingegen direkt mit der katalytischen Diade, das lytische Wasser wird verdrängt. Diese deutlich unterschiedlichen Bindungsmodi führen in der Folge zu verschiedenen Wasserstoffbrückennetzwerken der Inhibitoren zum Protein, welche für jede Klasse in den Hintergrundinformationen (Abbildungen S3–S6) dargestellt sind.

Der Bindungsmodus von **1** wird offensichtlich von der vorhandenen Ester-Funktionalität dominiert, wohingegen das Amid-Derivat (**3**) einen anderen Bindungsmodus einnimmt. Die in **1** beobachtete intramolekulare H-Brücke (Abbildung 2a) bricht auf, und der Ethyl-substituierte Amidstickstoff bildet stattdessen eine H-Brücke zum  $O_\gamma$  des Thr222. Wieso führt eine so kleine Modifikation wie der Ester-Amid-Austausch zu einer so drastischen Änderung des Bindungsmodus? In allen EP-Kristallstrukturen dieser Studie wird ein gleichbleibendes Interaktionsmuster zwischen dem Thr222- $O_\gamma$  und der Asp219-Carboxylgruppe (2.7 Å) beobachtet: Vermutlich ist das Proton des Thr222- $O_\gamma$  in Richtung der Carboxylgruppe von Asp219 gerichtet und somit an einer proteininternen H-Brücke beteiligt (Abbildung 4b). Diese Beobachtung legt nahe, dass Thr222- $O_\gamma$  nur dann günstige Wechselwirkungen zum Liganden ausbilden kann, wenn es mit einem H-Brücken-Donor von der Ligandenseite aus adressiert wird. Dies ist jedoch unmöglich für den Ethylester in **1**, dessen Sauerstoff nur als H-Brücken-Akzeptor dienen kann, sodass dieser stattdessen den polaren Kontakt mittels der intramolekularen H-Brücke eingeht. Der Austausch des Sauerstoffs durch Stickstoff (Ester zu Amid, **3**) ermöglicht jedoch nun eine Interaktion von Thr222- $O_\gamma$  mit einem H-Brücken-Donor, der der intramolekularen H-Brücke vorgezogen wird, während das ungesättigte Glycinamid-NH sich seinerseits um ca. 100° dreht und eine Wasserstoffbrücke zum katalytischen Asp219 ausbildet (Abbildung 4a).

Obwohl die gesamte SAR-Interpretation ohne strukturelle Daten nicht nachvollziehbar wäre, zeigt die SAR innerhalb der einzelnen Klassen von Bindungsmodi ein schlüssiges Bild, welches im Folgenden exemplarisch diskutiert wird: In der grünen Klasse weist **3** mit einer Ethylgruppe als  $P_2$ -Substituent die geringste Affinität auf (4.0  $\mu\text{M}$ ), was sich wahrscheinlich auf die weniger ausgeprägten hydrophoben Wechselwirkungen im Vergleich zu den Verbindungen mit einem Benzylrest an gleicher Position zurückführen lässt. Des Weiteren können **3** und **6** keine intramolekulare  $\pi$ - $\pi$ -Interaktion eingehen, die in **4** und **5** zu beobachten ist, was zu einem Verlust der Präorganisation der gebundenen Ligan-

denkonformation führt. Verbindung **5**, die anstelle des Indolrestes eine Benzylgruppe trägt, kann folglich nicht mehr die H-Brücke zu Asp81 der Flap-Region sowie die schwache polare Wechselwirkung zu Ser83 eingehen, die in **3**, **4** und **6** ausgebildet werden (Abbildung 4c). In **4**, dem affinsten Inhibitor der grünen Klasse (460 nM), scheinen die Substituenten innerhalb der untersuchten Variationen optimal gewählt: Der Indolrest bildet eine H-Brücke zu Asp81 und der Benzylsubstituent eine  $\pi$ - $\pi$ -Wechselwirkung zu Tyr226. **8** (violette Klasse) unterscheidet sich von **5** (grüne Klasse) nur in der Position des basischen Stickstoffs in  $P_1$ -Position. Basierend auf der Kristallstruktur von **5** würde man für **8** eine geringere Affinität erwarten, da die Adressierung der katalytischen Aspartate durch den verlängerten Abstand weniger effizient erfolgen sollte. Allerdings bleibt die Affinität nahezu gleich (1.1  $\mu\text{M}$  (**5**) bzw. 1.5  $\mu\text{M}$  (**8**)). Die Kristallstruktur von **8** liefert eine Erklärung für diesen zunächst überraschenden Befund: Der geänderte Bindungsmodus zwischen **5** und **8** scheint vor allem durch den Verlust der Wechselwirkung zu Asp35, den man bei einem unveränderten Bindungsmodus erwarten würde, hervorgerufen zu werden. Der Thiophenring, der vorher in der  $S_1'$ -Tasche (grüne Klasse) zu liegen kam, ist in der Struktur von **8** um ca. 180° gedreht und besetzt nun die  $S_2$ -Tasche. Auch Verbindung **9** mit einer um ein Kohlenstoffatom verlängerten  $P_1$ -Seitenkette weist diesen neuen Bindungsmodus auf, der **8** und **9** trotz des Fehlens des Indolrests ermöglicht, die ladungsunterstützte Wasserstoffbrücke zu Asp81, nun allerdings mit ihrem Amid-NH in 2-Position des Thiophens, einzugehen (Abbildung 4d). Der rund dreifache Affinitätsunterschied zwischen **8** und **9** dürfte durch die unterschiedlichen  $pK_a$ -Werte des Anilin- bzw. Benzyl-Stickstoffs bedingt sein, die in den beiden Strukturen an nahezu identischen Positionen liegen. Die Benzyl-NH-Funktion kann erwartungsgemäß durch ihren stärkeren basischen Charakter eine effizientere ladungsunterstützte H-Brücke zum Wassermolekül eingehen, welches seinerseits eine H-Brücke zu Asp33 und Gly221 vermittelt (Abbildung 4e).

Innerhalb dieser Inhibitorserie wurden auch weniger aktive und inaktive Verbindungen synthetisiert, die sonst für eine SAR-Interpretation ebenfalls essentiell sind. Eine Interpretation dieser Daten ist jedoch nahezu unmöglich, da über die Zugehörigkeit dieser Liganden zu einem der beobachteten Bindungsmodi nur spekuliert werden kann.

Das hier beschriebene Beispiel unterstreicht eindrucksvoll die Komplexität des Bindungsgeschehens von Liganden an ein Zielprotein und dessen Abhängigkeit von kleinsten chemischen Veränderungen am Substitutionsmuster einer Leitstruktur. Dass **1**, **7**, **8** und **9** nicht den gleichen Bindungsmodus annehmen wie Vertreter der grünen Klasse, kann retrospektiv erklärt werden. Eine Vorhersage solch gravierender Änderungen des Bindungsmodus ist äußerst schwierig. Selbst wenn diese gelänge, wäre die experimentelle Bestätigung unabdingbar, um der Vorhersage die nötige Glaubwürdigkeit zu verleihen.

Solche unerwarteten Änderungen der Bindungsgeometrie nach Modifikationen im Substitutionsmuster einer Leitstruktur wurden auch in der Vergangenheit vereinzelt beobachtet, wobei dies jedoch meist auf Zufallsentdeckungen be-

ruhte.<sup>[6]</sup> Da die im Allgemeinen angenommene Hypothese, dass ähnliche Liganden in ähnlicher Weise binden,<sup>[7]</sup> offensichtlich nicht immer zutreffend ist, stellt sich die Frage, wie oft eine Revalidierung eines angenommenen Bindungsmodus während des Optimierungsprozesses erforderlich ist. Gibt es Hinweise, die eine z. B. röntgenkristallographische Überprüfung eines als Arbeitsgrundlage angenommenen Bindungsmodus im laufenden Prozess der Leitstrukturoptimierung nahelegen können?

In Ergänzung zur Affinitätsbestimmung mittels eines fluoreszenzbasierten Enzymassays ( $K_i$ -Werte) wurde ein Thermal-Shift-Assay (TSA), der oft zur Leitstrukturfindung und zum Affinitätsranking von Inhibitoren verwendet wird, durchgeführt,<sup>[8,9]</sup> um zu untersuchen, ob sich aufgrund der voneinander stark abweichenden Bindungsmodi der Liganden Unterschiede in der Stabilisierung des Proteins ergeben. Die Ergebnisse für unsere Inhibitorserie (Tabelle 1) zeigen

**Tabelle 1:** TSA-Daten sortiert nach absteigenden  $\Delta T_m$ -Werten sowie die entsprechenden  $K_i$ -Werte. Die Zugehörigkeit zu den verschiedenen Bindungsmodi ist farblich gekennzeichnet.

Inhibitor [100 $\mu$ M]	$T_m$ [°C]	$\Delta T_m$ [°C]	$K_i$
DMSO	58.7 $\pm$ 0.2		
<b>4</b>	63.3 $\pm$ 0.2	4.6	460 $\pm$ 24 nM
<b>9</b>	62.5 $\pm$ 0.0	3.8	545 $\pm$ 35 nM
<b>6</b>	61.9 $\pm$ 0.1	3.2	1.8 $\pm$ 0.2 $\mu$ M
<b>3</b>	61.5 $\pm$ 0.2	2.8	4.0 $\pm$ 0.7 $\mu$ M
<b>5</b>	60.9 $\pm$ 0.1	2.2	1.1 $\pm$ 0.2 $\mu$ M
<b>1</b>	59.4 $\pm$ 0.2	0.7	18.2 $\pm$ 7.4 $\mu$ M
<b>8</b>	59.1 $\pm$ 0.1	0.4	1.5 $\pm$ 0.5 $\mu$ M
<b>7</b>	58.8 $\pm$ 0.1	0.1	13.1 $\pm$ 3.0 $\mu$ M

deutlich, dass die Verschiebungen der Schmelztemperatur ( $\Delta T_m$ ) nicht mit den entsprechenden  $K_i$ -Werten korrelieren. Allerdings können innerhalb einer Bindungsmodus-Klasse die Inhibitoren in der richtigen Reihenfolge sortiert werden, mit Ausnahme von **5**: dies ist wahrscheinlich auf den Verlust der bedeutenden Wasserstoffbrücke zu Asp81 durch das Fehlen des Indolrestes, den alle anderen Vertreter dieser Klasse aufweisen, zurückzuführen.

Diese Beobachtung ist im Einklang mit dem Konzept von TSA-Messungen, dass Liganden für ein korrektes Affinitätsranking ähnliche Bindungsenthalpien aufweisen sollten.<sup>[9]</sup> Doch wie verhalten sich die TSA-Daten für Liganden eines sehr ähnlichen Grundgerüsts mit ähnlichen Affinitäten, jedoch abweichendem Bindungsmodus? Für solch einen Vergleich eignen sich nur zwei der vier hier beschriebenen Bindungsmodus-Klassen, da **1** und **7** aufgrund ihrer zu geringen Affinitäten herausfallen. Interessanterweise weichen die TSA-Daten der nahezu gleichaffinen Liganden der grünen und violetten Klassen deutlich voneinander ab: Die

beiden affinsten Verbindungen dieser Serie, **4** und **9**, weisen mit 460 nM bzw. 545 nM ähnliche Affinitäten auf, jedoch unterscheiden sich die  $\Delta T_m$ -Werte um 0.8°C (4.6 bzw. 3.8°C), was mehr als der dreifachen Standardabweichung der Messung entspricht. Analog verhalten sich **5**, **6** und **8** zueinander. Alle drei Verbindungen besitzen mit 1.1, 1.8 und 1.5  $\mu$ M ähnliche Affinitäten, jedoch weist **8** lediglich eine relativ kleine Verschiebung des Schmelzpunktes um 0.4°C auf, während **5** und **6** mit 2.2 und 3.2°C eine deutliche Schmelzpunktverschiebung hervorrufen (wobei **5** den oben beschriebenen Ausreißer in der grünen Klasse darstellt). Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass die Stabilisierung des Proteins durch den jeweiligen Liganden nicht nur von der Affinität des Liganden abhängig ist, sondern außerdem vom Wechselwirkungsmuster zum Protein. Dies trifft ebenfalls auch für den Vergleich von **1** und **8** zu: beide weisen eine ähnliche Schmelzpunktverschiebung auf (0.7 bzw. 0.4°C), jedoch liegen die Affinitäten beider Liganden weit auseinander (18 bzw. 1.5  $\mu$ M), was auf ein unterschiedliches Interaktionsmuster, mit dem sie jeweils das Targetprotein stabilisieren, hindeutet.

Diese Beobachtungen lassen die Schlussfolgerung zu, dass Abweichungen der eigentlich innerhalb einer Ligandenserie zu erwartenden Korrelation zwischen Affinitäts- und TSA-Daten einen Hinweis auf potentielle Änderung der Bindungsgeometrie liefern und insbesondere solche „Ausreißer“-Liganden als Kandidaten zur Überprüfung des angenommenen Bindungsmodus in Betracht gezogen werden sollten.

Das hier dargestellte Beispiel zeigt eindrucksvoll, dass kleinste strukturelle Änderungen innerhalb einer Ligandenserie, wie der Austausch eines Esters gegen ein Amid oder die Insertion eines einzelnen Kohlenstoffatoms, das Auftreten zusätzlicher Bindungsmodi hervorrufen kann. Unstimmigkeiten zwischen klassischen Affinitäts- und TSA-Daten können als ein Hinweis auf Kandidaten dienen, für die eine Überprüfung des Bindungsmodus lohnenswert sein könnte, auch wenn ein vermeintlich zugrundegelegter Bindungsmodus bekannt zu sein scheint. Ohne das Vorhandensein solcher struktureller Daten ist eine sinnvolle Interpretation von Substituenteneffekten oder eines bioisosteren Austauschs an einem zur Optimierung gewählten Grundgerüst nicht möglich und kann den Prozess der Leitstrukturoptimierung kostenintensiv in die falsche Richtung führen. Wir erwarten, dass die hier präsentierte Fallstudie und die Anwendung des vorgestellten Validierungsprotokolls Wirkstoffdesigner ermutigt, chemisch attraktive Leitstrukturen trotz einer auf den ersten Blick inkongruenten SAR weiterzuverfolgen und genauer zu untersuchen. Dies sollte mit einem weiterführenden Verständnis und einer steigenden Zahl von Startoptionen für die weitere Leitstrukturoptimierung belohnt werden.

## Experimentelles

Hier verwendete PDB-Codes: **1** (3T7Q), **3** (4L6B), **4** (3PSY), **5** (3WZ6), **6** (3WZ7), **7** (3T7X), **8** (3WZ8), **9** (4LAP).

Eingegangen am 19. November 2014  
Online veröffentlicht am 4. Februar 2015

**Stichwörter:** Enzyminhibitoren · Kristallstrukturanalyse · Ligand-Enzym-Bindung · Thermal-Shift-Assay (TSA) · Wirkstoffentwicklung

- 
- [1] a) *Structure-Based Drug Discovery* (Hrsg.: R. E. Hubbard), Royal Society of Chemistry, Cambridge, **2006**; b) A. C. Anderson, *Chem. Biol.* **2003**, *10*, 787–797.
- [2] a) A. Wlodawer, J. Vondrasek, *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **1998**, *27*, 249–284; b) M. von Itzstein, *Nat. Rev. Drug Discovery* **2007**, *6*, 967–974; c) S. Venkatraman, *Trends Pharmacol. Sci.* **2012**, *33*, 289–294; d) A. K. Ghosh, *Structure-based Design of Drugs and Other Bioactive Molecules. Tools and Strategies*, Wiley-VCH, Weinheim, **2014**.
- [3] a) T. L. Blundell, J. Cooper, S. I. Foundling, D. M. Jones, B. Atrash, M. Szelke, *Biochemistry* **1987**, *26*, 5585–5590; b) S. Geschwindner, L.-L. Olsson, J. S. Albert, J. Deinum, P. D. Edwards, T. de Beer, R. H. A. Folmer, *J. Med. Chem.* **2007**, *50*, 5903–5911.
- [4] K. Gewald, E. Schinke, H. Böttcher, *Chem. Ber.* **1966**, *99*, 94–100.
- [5] a) A. Martin, <http://www.bioinf.org.uk/software/profit/>; b) A. D. McLachlan, *Acta Crystallogr. Sect. A* **1982**, *38*, 871–873.
- [6] a) G. Chi, A. Manos-Turvey, P. D. O'Connor, J. M. Johnston, G. L. Evans, E. N. Baker, R. J. Payne, J. S. Lott, E. M. M. Bulloch, *Biochemistry* **2012**, *51*, 4868–4879; b) S. H. Reich, M. Melnick, J. F. Davies II, K. Appelt, K. K. Lewis, M. A. Fuhry, M. Pino, A. J. Trippe, D. Nguyen, H. Dawson, B.-W. Wu, L. Musick, M. Kosa, D. Kahil, S. Webber, D. K. Gehlhaar, D. Andrada, B. Shetty, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1995**, *92*, 3298–3302; c) H. Steuber, M. Zentgraf, C. La Motta, S. Sartini, A. Heine, G. Klebe, *J. Mol. Biol.* **2007**, *369*, 186–197; d) C. P. Mpamhanga, D. Spinks, L. B. Tulloch, E. J. Shanks, D. A. Robinson, I. T. Collicie, A. H. Fairlamb, P. G. Wyatt, J. A. Frearson, W. N. Hunter et al., *J. Med. Chem.* **2009**, *52*, 4454–4465.
- [7] J. Boström, A. Hogner, S. Schmitt, *J. Med. Chem.* **2006**, *49*, 6716–6725.
- [8] a) M. W. Pantoliano, E. C. Petrella, J. D. Kwasnoski, V. S. Lobanov, J. Myslik, E. Graf, T. Carver, E. Asel, B. A. Springer, P. Lane et al., *J. Biomol. Screening* **2001**, *6*, 429–440; b) R. Zhang, F. Monsma, *Curr. Opin. Drug Discovery Dev.* **2010**, *13*, 389–402; c) E. V. Bobkova, M. J. Weber, Z. Xu, Y.-L. Zhang, J. Jung, P. Blume-Jensen, A. Northrup, P. Kunapuli, J. N. Andersen, I. Kariv, *J. Biol. Chem.* **2010**, *285*, 18838–18846; d) P. Śledź, S. Lang, C. J. Stubbs, C. Abell, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 7680–7683; *Angew. Chem.* **2012**, *124*, 7800–7803.
- [9] M.-C. Lo, A. Aulabaugh, G. Jin, R. Cowling, J. Bard, M. Malamas, G. Ellestad, *Anal. Biochem.* **2004**, *332*, 153–159.
-