

# De-novo-Fragmententwurf für die Wirkstoffforschung und chemische Biologie

Tiago Rodrigues, Daniel Reker, Martin Welin, Michael Caldera, Cyrill Brunner, Gisela Gabernet, Petra Schneider, Björn Walse und Gisbert Schneider\*

**Abstract:** Automatisiertes De-novo-Moleküldesign führte zur Entdeckung eines neuartigen Inhibitors der Death-Associated Proteinkinase 3 (DAPK3). Eine erste Kristallstruktur der inaktiven DAPK3 als Homodimer im Komplex mit dem fragmentartigen Liganden zeigt dessen Bindung in der ATP-Bindetasche. Das verwendete maschinelle Lernverfahren hat neben DAPK3 weitere Targets korrekt vorhergesagt, sowohl für den entworfenen Liganden als auch für den strukturell verwandten und bereits auf dem Markt befindlichen Wirkstoff Azosemid. Die vorliegende Studie bestätigt das Konzept des computergestützten ligandenbasierten De-novo-Moleküldesigns als geeignet für die Erzeugung neuartiger Liganden und potentieller Startpunkte für die Wirkstofffindung.

Computerbasiertes De-novo-Design neuer chemischer Strukturen (new chemical entities, NCEs) unterstützt die medizinische Chemie bei der Generierung kleiner, synthetisch herstellbarer Moleküle mit gewünschten physikochemischen und pharmakologischen Eigenschaften.<sup>[1]</sup> Gleichzeitig stellen fragmentbasierte Ansätze eine Schlüsseltechnologie zur Findung und Optimierung von Liganden makromolekularer Wirkstofftargets dar.<sup>[2]</sup> Mit Hinblick auf die enorme Größe des wirkstoffartigen chemischen Raumes<sup>[3]</sup> bietet sich die Hilfe des Computers an, um ansatzweise den fragmentartigen Teilraum zu durchsuchen und Startpunkte für das rationale Wirkstoffdesign zu identifizieren.<sup>[4]</sup> Zudem lassen sich neue chemische Fragmente auch dafür nutzen, die Funktion und Struktur von Proteinen besser zu verstehen. Hier stellen wir ein Konzept der schnellen Prototypisierung von Fragmenten mittels ligandenbasiertem De-novo-Design im Zusammenspiel mit der computerbasierten Targetidentifizierung vor. Automatisierte Software ermöglichte hier die Identifizierung von fragmentartigen NCEs, welche die humane Death-Associated Proteinkinase 3 (DAPK3) inhibieren. Dieses Target wurde von der Computersoftware vorhergesagt und experimentell bestätigt. Eine erste Röntgenstruktur der inaktiven Form des DAPK3-Homodimers im

Komplex mit dem entworfenen Liganden bestätigte die theoretische Studie. Darüber hinaus identifizierten wir DAPK3 und Carboanhydrase IX als bislang unbekannte Targetproteine des Blutdrucksenkers Azosemid. Die chemische Struktur von Azosemid verkörpert eine Superstruktur des rechnerisch entworfenen DAPK3-Liganden. Die Ergebnisse dieser Studie zeigen, dass automatisches molekulares Design in Kombination mit computerbasierter Targetvorhersage und strukturbasierter Validierung eine schnelle Prototypisierung neuer chemischer Strukturen erlaubt und somit Potential zur Unterstützung der zukünftigen Wirkstofffindung und der chemischen Biologie hat. Durch dieses zukunftsweisende Vorgehen konnten wir erfolgreich einen kompletten Designzyklus durchlaufen, bestehend aus computergestütztem Ligandendesign und Targetvorhersage, chemischer Synthese, biochemischer Testung, und biophysikalischer Strukturbestimmung des Liganden-Protein-Komplexes.

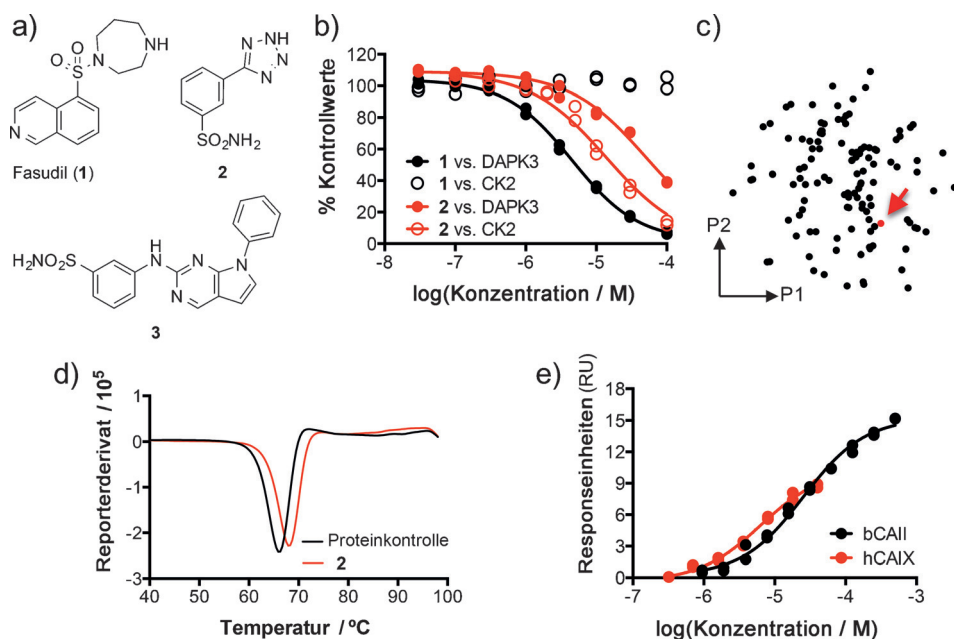
DAPK3 ist eine Serin/Threoninkinase, die in eine Vielzahl (patho)physiologischer Prozesse involviert ist.<sup>[5]</sup> Die selektive Kontrolle der Myosinphosphorylierung qualifiziert DAPK3 als potentielles Target für die Entwicklung neuer Wirkstoffe zur Behandlung von Bluthochdruck und Erkrankungen der glatten Muskulatur.<sup>[5a]</sup> Allerdings gibt es bisher nur wenig strukturelle Informationen für das Verständnis der Enzymdynamik und als Grundlage für das rationale Wirkstoffdesign. Bis heute wurden nur drei hochaufgelöste ( $\leq 2 \text{ \AA}$ ) DAPK3-Kristallstrukturen veröffentlicht.<sup>[6]</sup> Bekannte Daten lassen vermuten, dass die Phosphorylierung der Aminosäure Ser50 die Dimerisierung der katalytischen Domäne der DAPK3 reguliert.<sup>[6b]</sup> Unsere Erkenntnisse lassen nunmehr den Schluss zu, dass es eine inaktive Form der DAPK3 als Homodimer gibt, die sich durch einen Wirkstoff modulieren lässt.

Für das ligandenbasierte Wirkstoffdesign haben wir unsere Software DOGS (Design of Genuine Structures) verwendet. Die Software verfügt über einen Satz von 25 144 kommerziell erhältlichen Edukten, die mittels virtueller organischer Synthese mit bis zu 58 verschiedenen Reaktionen zu NCEs verknüpft werden, um den chemischen Raum schnell durchsuchen zu können.<sup>[7]</sup> Die vom Computer erzeugten Molekülstrukturen ähneln dabei einem vorgegebenen Referenzmolekül („Schablone“) hinsichtlich dessen Pharmakophormuster und Größe. Diese Methode zur Variation des Grundgerüsts eines Referenzmoleküls hat schon in einer Vielzahl von Projekten zur Entdeckung von NCEs mit den gewünschten biochemischen und pharmakologischen Eigenschaften geführt, wurde aber bisher noch nie zum De-novo-Design eines bioisosteren Fragments verwendet. Um unsere Designhypothese zu überprüfen, haben wir den bereits auf dem Markt befindlichen fragmentartigen Wirkstoff

[\*] Dr. T. Rodrigues,<sup>[†]</sup> D. Reker,<sup>[†]</sup> M. Caldera, C. Brunner, G. Gabernet, Dr. P. Schneider, Prof. Dr. G. Schneider  
Eidgenössische Technische Hochschule (ETH)  
Vladimir-Prelog-Weg 4, 8093 Zürich (Schweiz)  
E-Mail: gisbert.schneider@pharma.ethz.ch  
Dr. M. Welin, Prof. Dr. B. Walse  
SARomics Biostructures AB, Medicon Village  
22381 Lund (Schweden)

[†] Diese Autoren haben zu gleichen Teilen zu der Arbeit beigetragen.

Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.201508055> zu finden.

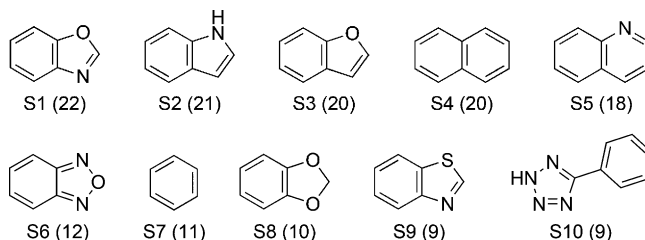


**Abbildung 1.** Biochemische und biophysikalische Profile von Fasudil und Verbindung **2**. a) Chemische Strukturen von Fasudil, der de novo entworfenen Verbindung **2**, und dem nächsten Nachbarn zu **2** (ChEMBL16 DAPK3-Inhibitor **3**). b)  $IC_{50}$ -Kurve von Fasudil und **2** gegen DAPK3 und CK2 ( $n=2$ ). DAPK3:  $IC_{50}$  (Fasudil) =  $4.5 \mu\text{M} \pm 0.03$  log-Einheiten,  $IC_{50}$  (**2**) =  $52 \mu\text{M} \pm 0.03$  log-Einheiten; CK2:  $IC_{50}$  (Fasudil) >  $100 \mu\text{M}$ ,  $IC_{50}$  (**2**) =  $15 \mu\text{M} \pm 0.05$  log-Einheiten. Kontrollen: DAPK3: Staurosporin  $IC_{50}$  =  $0.004 \mu\text{M}$  ( $n_{\text{Hill}}$  = 1.7), CK2: Heparin  $IC_{50}$  =  $0.001 \mu\text{M}$  ( $n_{\text{Hill}}$  = 1.9). c) 2D-Projektion der bekannten fragmentartigen DAPK3-Inhibitoren aus ChEMBL16 ( $K_i$  oder  $IC_{50} \leq 100 \mu\text{M}$ , schwarze Punkte) und Verbindung **2** (roter Punkt mit Pfeil). Die Projektion wurde mittels „stochastic neighbor embedding“ zur Reduktion der Dimensionalität basierend auf CATS2-topologischen Pharmakophordescriptoren durchgeführt (neue Koordinaten: P1, P2).<sup>[14]</sup> d) DSF-Assay von Verbindung **2** ( $500 \mu\text{M}$ ) gegen bovine Carboanhydrase II (bCAII,  $\Delta T_m$  =  $2.40 \pm 0.02$  K,  $n=3$ ). Kontrollen: Protein:  $T_m$  =  $65.93 \pm 0.02^\circ\text{C}$ , Acetazolamid ( $10 \mu\text{M}$ ):  $\Delta T_m$  =  $5.20 \pm 0.03$  K. e) SPR-Assay von Verbindung **2** gegen bCAII ( $K_D$  =  $25 \mu\text{M} \pm 0.04$  log-Einheiten,  $n=2$ ) und hCAIX ( $K_D$  =  $7 \mu\text{M} \pm 0.05$  log-Einheiten,  $n=2$ ). Kontrollen: CBS:  $K_D$  (bCAII) =  $0.95 \mu\text{M} \pm 0.06$  log-Einheiten, Acetazolamid:  $K_D$  (hCAIX) =  $0.018 \mu\text{M} \pm 0.12$  log-Einheiten.

Fasudil (**1**, Abbildung 1a) als Referenzmolekül für DOGS ausgewählt.

Fasudil ist ein potenter Inhibitor der *Rho*-assoziierten Proteinkinase 2 (ROCK2), besitzt aber auch eine hohe Ligandeneffizienz (LE)<sup>[8]</sup> als DAPK3-Inhibitor ( $K_i$  =  $1.2 \mu\text{M}$ , LE = 0.41),<sup>[9]</sup> und eignete sich daher als Ausgangspunkt für die Entwicklung von fragmentartigen DAPK3-Bindern. Die Software DOGS schlug insgesamt 521 potentielle DAPK3-Inhibitoren vor, von denen 357 fragmentartig sind (Molekulargewicht <  $300 \text{ g mol}^{-1}$ ) und aus zahlreichen, strukturell diversen, meist bicyclischen Systemen bestehen (Schema 1). Die entworfenen Moleküle wurden hinsichtlich des Auftretens von unerwünschten Substrukturen untersucht, entsprechend der PAINS-,<sup>[10]</sup> Rishton-<sup>[11]</sup> und Hann-Filterlisten.<sup>[12]</sup>

Die Priorisierung der Fragmente erfolgte mittels eigener Software zur Targetvorhersage (siehe Hintergrundinformationen). Dieses quantitative maschinelle Lernmodell basiert auf den Affinitätsdaten für kleine Moleküle, die in der ChEMBL16-Datenbank annotiert sind.<sup>[13]</sup> Die chemischen Verbindungen werden dabei durch physikochemische Eigenschaften und Morgan-Substruktur-Fingerprints ( $\text{radius} = 4$ , 2048 bit) codiert. Dies ergibt eine 2224-dimensionale Molekülrepräsentation, die zum Training eines „Random



**Schema 1.** Die am häufigsten vom Computer generierten alternativen Grundgerüste für die Referenzverbindung Fasudil. Die Zahlen in den Klammern geben die absoluten Häufigkeiten an.

( $pIC_{50}$  = 4.3, Abbildung 1b) mit einer exzellenten Ligandeneffizienz (LE = 0.40). Durch Lichtstreuungsmessungen konnten wir eine unspezifische Bindung durch kolloidale Aggregation von **2** bis zu einer Konzentrationen von  $500 \mu\text{M}$  ausschließen. Zellbasierte Assays ergaben eine vernachlässigbare Toxizität von **2** bei  $100 \mu\text{M}$  (Hintergrundinformationen). Unseres Wissens nach ist Verbindung **2** bislang noch nicht untersucht worden (SciFinder, American Chemical Society). Das Referenzmolekül Fasudil wurde parallel ebenfalls gegen DAPK3 getestet, mit einem  $IC_{50}$ -Wert von  $4.5 \mu\text{M} \pm$

Forest“-Regressionsmodells verwendet wurde. Die Vorhersage der Affinität ( $p\text{Affinity}$ ) für bis zu 980 Wirkstofftargets wurden mit der berechneten Standardabweichung korrigiert ( $p\text{Affinity} - \sigma$ ), um eine konservative Abschätzung der tatsächlichen Affinität zu erhalten. Aufgrund der vorhergesagten DAPK3-Affinität haben wir das de novo entworfene Molekül **2** für die Synthese und biochemische Tests ausgewählt, insbesondere wegen seiner fragmentartigen Größe und der hohen vorhergesagten Affinität (vierter Rang aller Moleküle-entwürfe nach Sortierung entsprechend der konservativen Affinitätsvorhersage für DAPK3,  $p\text{Affinity} - \sigma = 4.0$ ). Wir haben keine weiteren Kriterien zur Auswahl von Verbindung **2** einbezogen und zunächst auch keine Bindungshypothese für die Wechselwirkung mit der Zielkinase aufgestellt.

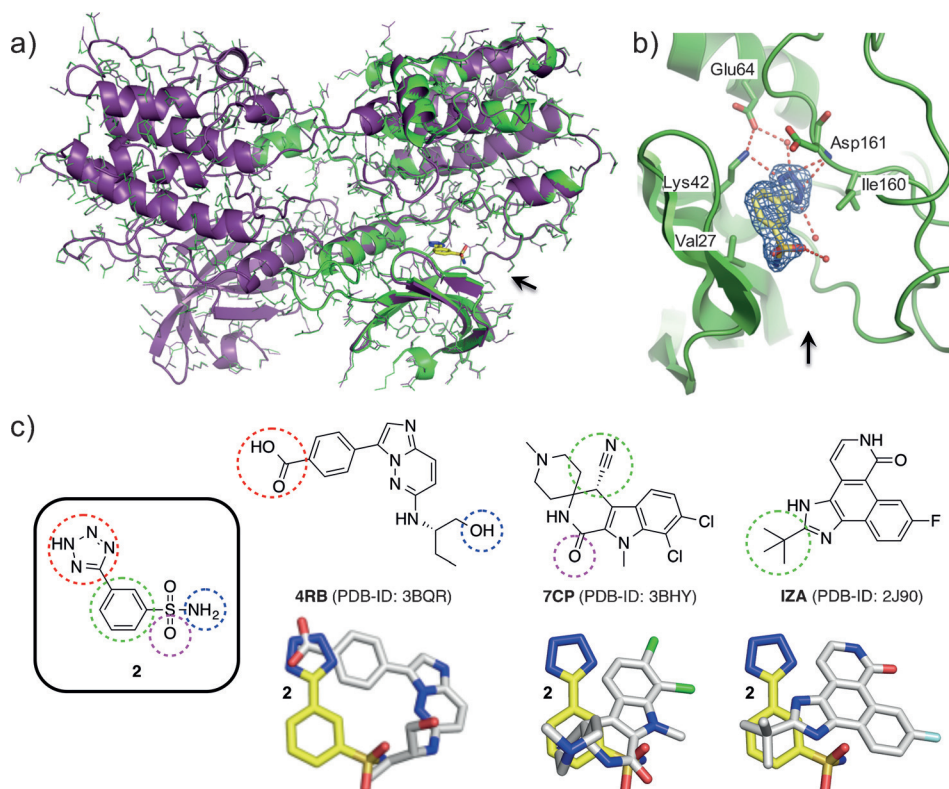
In voller Übereinstimmung mit dem Regressionsmodell ergab die experimentelle Bestimmung der DAPK3-Affinität von Substanz **2** einen  $IC_{50}$ -Wert von  $52 \mu\text{M} \pm 0.03$  log-Einheiten

0.03 log-Einheiten (Abbildung 1 b). Diese Ergebnisse attestieren die „Scaffold-Hopping“-Fähigkeiten der DOGS-Software. Fasudil und die entworfene Verbindung **2** sind sich zwar strukturell unähnlich (Tanimoto-Ähnlichkeit = 0.16; Morgan-Fingerprints,  $\text{radius} = 2$ , 2048 bit), aber sie zeigen eine vergleichbare inhibierende Funktion. Der strukturell ähnlichste bekannte DAPK3-Inhibitor, der in ChEMBL annotiert ist, zeigt auch nur eine geringe Ähnlichkeit (ChEMBL1988163,<sup>[9a]</sup> **3**, Tanimoto-Ähnlichkeit = 0.28, Abbildung 1 a). Dies legt die Vermutung nahe, dass konventionelle, ausschließlich auf Substrukturen beruhende Ähnlichkeitssuchen in virtuellen kombinatorischen Bibliotheken wohl nicht geeignet gewesen wären, um **2** als DAPK3-Inhibitor zu identifizieren. Eine zweidimensionale Projektion der bekannten fragmentartigen DAPK3-Inhibitoren zusammen mit **2** bestätigt die Präsenz von gemeinsamen Pharmakophormustern trotz ihrer Substrukturunterschiede (Abbildung 1 c). Wir testeten Verbindung **2** zusätzlich gegen ein Panel von 27 repräsentativen Serine/Threoninkinasen, von denen nur die Caseinkinase 2 (CK2) in der selben Größenordnung wie DAPK3 inhibiert wurde ( $\text{IC}_{50} = 15 \mu\text{M} \pm 0.05$  log-Einheiten;  $\text{LE} = 0.45$ ; Abbildung 1 b). Diese Kinaseselektivität des entworfenen Fragments (Gini-Koeffizient = 0.70)<sup>[15]</sup> ist überraschend, wenn man bedenkt, dass geometrisch „flache“ Moleküle häufig als promiskuitive Binder gelten.<sup>[16]</sup>

Mit dem Ziel, mögliche weitere makromolekulare Targets von **2** zu identifizieren, wendeten wir unsere Vorhersage-Software auf alle humanen Wirkstofftargets an, für die wir ausreichend Bindungsdaten in ChEMBL zur Modellbildung fanden. Eine hohe Bindungsaffinität wurde für einige Carboanhydrase-Isoformen vorhergesagt, was aufgrund der aromatischen Sulfonamidgruppe in **2** nicht allzu sehr überrascht. Daher haben wir gemäß der Rangliste der höchstvorhergesagten Targets (Hintergrundinformationen) Verbindung **2** gegen die Carboanhydrase II (*Bos taurus*, bCAII) als Ersatz für das humane Protein getestet ( $\text{pAffinität} - \sigma = 6.0$ ). Mittels Differential-Scanning-Fluorimetrie wurde eine Verschiebung des Schmelzpunkts von bCAII um  $2.40 \pm 0.02$  K nach Inkubation mit  $500 \mu\text{M}$  von **2** gemessen (Abbildung 1 d). Als weiterer unabhängiger Assay wurde ein Oberflächenplasmo-

nenresonanz(SPR)-Experiment durchgeführt, das die Proteinbindung mit einem  $K_D$ -Wert von  $25 \mu\text{M} \pm 0.04$  log-Einheiten bestimmte (Abbildung 1 e). Zusätzlich wurde die Affinität zur tumorassoziierten<sup>[17]</sup> humanen Carboanhydrase IX (hCAIX, Vorhersage:  $\text{pAffinität} - \sigma = 6.5$ ) untersucht. Die Bindung an hCAIX (Abbildung 1 e) konnte ebenfalls mit einer Affinität im Bereich des vorhergesagten Wertes bestätigt werden ( $K_D = 6 \mu\text{M} \pm 0.05$  log-Einheiten). Dies lässt vermuten, dass **2** auch als Ausgangspunkt für die Entwicklung neuer hCAIX-Inhibitor-basierter Therapeutika oder diagnostischer Tools dienen könnte. Fasudil zeigte keine Bindungsaffinität gegenüber hCAIX, in Übereinstimmung mit der Computer-Vorhersage.

DAPK3 ist ein pro-apoptotisches Protein und spielt eine wichtige Rolle als Tumor-Suppressor.<sup>[5b,18]</sup> Die Blockade der inaktiven Form von DAPK3 würde vermutlich deren Tumor unterdrückende Aktivität aufheben. Dennoch ist Verbindung **2** aufgrund ihrer ungewöhnlichen Kinaseselektivität ein geeigneter Startpunkt, um eine chemische Testverbindung zur Untersuchung von DAPK3-abhängigen zellulären Signalwegen zu entwickeln. Bemerkenswert ist auch, dass DAPK3



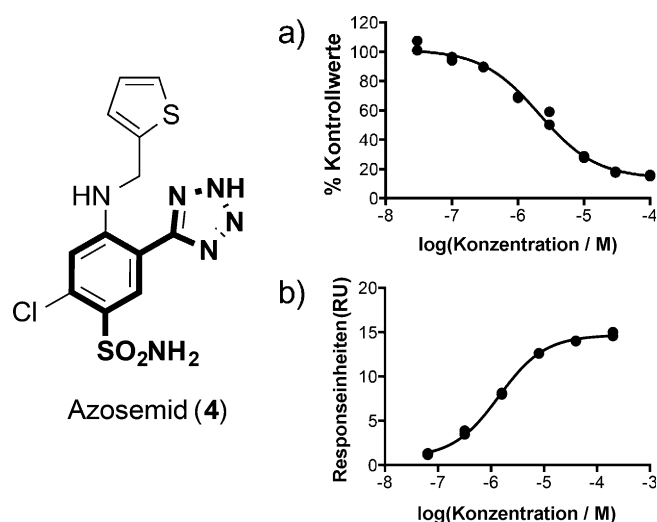
**Abbildung 2.** Röntgenstrukturdaten und Analyse. a) Liganden-freie apo-Struktur (violett) und Liganden-gebundener Komplex (grün) zwischen DAPK3 und Verbindung **2**. Die Strukturen wurden mit der „align“-Funktion in PyMOL (v1.7) ausgerichtet, resultierend in einer nahezu perfekten Superpositionierung ( $\text{RMSD} = 0.14 \text{ \AA}$ ) der apo- und der Liganden-gebundenen Konformere. Kleine strukturelle Unterschiede sind nur in der Liganden-bindenden Domäne erkennbar. b) Die Bindungsstelle von DAPK3 im Komplex mit Verbindung **2** (gelbe Stäbchen) und Wassermolekülen (rote Kugeln). Interagierende Seitengruppen (grüne Stäbchen) und Wasserstoffbrücken (gestrichelte rote Linien) sind hervorgehoben. Das blaue Netz umrahmt die beobachteten Elektrondichten der  $2m|F_o| - d|F_c|$  Karte bis zum Abstand  $1.0\sigma$  um Verbindung **2**. c) Pharmakophorvergleich zwischen **2** und den DAPK3-Inhibitoren der PDB-IDs 2BQR, 3BHY und 2J90. Die farbigen gestrichelten Kreise unterstreichen die jeweiligen isosteren Paare. Die Strukturausrichtung entspricht den Ligandenbindungsposen im jeweiligen überlagerten Kinase-Ligand-Komplex.



ein neues kardiovaskuläres pharmazeutisches Target ist. Die Blockade von DAPK3 führt zu vaskulärer Umstrukturierung, die bereits für die Unterdrückung der Neointimalhyperplasie *in vivo* gezeigt werden konnte.<sup>[19]</sup>

Nachdem wir biochemisch bestätigen konnten, dass Verbindung **2** DAPK3 inhibiert, entwickelten wir ein Strukturmodell, um die biochemischen Daten besser zu verstehen und ein Hit-to-Lead-Programm zu initiieren. Eine Röntgenstruktur des inaktiven DAPK3-Homodimers als Komplex mit **2** konnte mit einer Auflösung von 1.7 Å gelöst werden (Hintergrundinformationen). Elektronendichteverteilungen aus Messungen von DAPK3-Kristallen, die in Lösungen mit der Verbindung **2** getränkt wurden („soaking“), zeigen eindeutig die Bindung des Fragments in der ATP-Bindestelle, bei sehr geringen Konformationsänderungen des Proteins im Vergleich zur apo-DAPK3-Struktur (Abbildung 2a). Verbindung **2** sitzt nahezu im rechten Winkel in der Bindetasche im Vergleich zur regulären Nucleotid-Bindungspose (Abbildung 2b). Der Tetrazolring bildet eine doppelte Wasserstoffbrücke zum Rückgrat-Amid von Asp161 (das „D“ des „DFG-Motivs“) und eine zusätzliche Wasserstoffbrücke zur Seitenkette von Lys42, welches selbst eine charakteristische Salzbrücke zu Glu64 in der C-Helix eingeht. Der Phenylrest von **2** liegt zwischen Val27 der N-Subdomäne und Ile160 der C-Subdomäne der Kinase. Der Sulfonamidteil sitzt in dem lösungsmittelzugänglichen Teil der Bindetasche nahe dem Eingang. Es ist nicht bekannt, ob Fasudil in DAPK3 tatsächlich eine ähnliche oder eine ganz andere Bindungspose einnimmt, wenn man die Unterschiede in der Struktur und den physikochemischen Eigenschaften im Vergleich zu Verbindung **2** betrachtet. In der PDB fanden sich insgesamt vier Kristallstrukturen der humanen DAPK3 (IDs: 3BHY<sup>[6a]</sup> [Auflösung: 1.24 Å], 3BQR<sup>[6b]</sup> [1.75 Å], 2J90 [2.0 Å], 1YRP [3.1 Å]). Wir haben unsere neue Struktur des Komplexes mit den drei hochaufgelösten Strukturen (RMS unter 1 Å) überlagert, die alle nahezu identische Faltungen der Hauptketten besitzen. Ein Vergleich der Bindungsmodi der jeweils enthaltenen Liganden zeigt jedoch unterschiedliche Muster der Liganden-Rezeptor-Interaktion (Abbildung 2c). Verbindung **2** teilt sich mit allen drei Referenzinhibitoren nur einzelne Pharmakophorpunkte. Das ähnlichste Muster findet man zu Verbindung 4RB (PDB-ID: 3BQR) mit zwei gleichen Pharmakophorpunkten, die über einen jeweils umgekehrt positionierten Mittelteil der Strukturen verknüpft sind. Der *de novo* entworfene Ligand verfügt über eine Tetrazol-Kopfgruppe als isosteren Ersatz zur Carboxylfunktion in 4RB, die jeweils mit Lys42 der Kinase interagieren. Das nicht-substituierte Tetrazol als Motiv zur Bindung in der Hinge-Region wurde unseres Wissens nach bisher noch nicht in Kinaseinhibitoren verwendet.

Aufbauend auf der Kenntnis der strukturellen Wechselwirkung von **2** mit DAPK3 vermuteten wir, dass Azosemid (**4**, Abbildung 3) DAPK3 in ähnlicher Weise inhibieren könnte, da es **2** als Substruktur enthält. Zusätzlich besitzt Azosemid jedoch eine Seitenkette, die einen weiteren Teil der Bindetasche ausfüllen und somit die Bindung an DAPK3 verstärken könnte. So ermöglichte uns Azosemid die Simulation des Wachsens unseres Fragments **2** in der Bindetasche. Azosemid ist bereits pharmakologisch validiert und in Japan als Medi-



**Abbildung 3.** Biochemisches und biophysikalisches Profil von Azosemid (**4**). Die Substruktur des entworfenen Fragments **2** ist hervorgehoben. a) IC<sub>50</sub>-Kurve von Azosemid gegen DAPK3 ( $n=2$ ). IC<sub>50</sub>=2.1 µM ± 0.06 log-Einheiten. Kontrolle: Staurosporin IC<sub>50</sub>=0.015 µM ( $n_{\text{Hill}}=1.3$ ). b) SPR-Assay der Azosemid-Bindung an hCAIX ( $n=2$ , K<sub>D</sub>=1.4 µM ± 0.03 log-Einheiten). Kontrolle: Acetazolamid: K<sub>D</sub>=0.018 µM ± 0.12 log-Einheiten.

kament gegen Bluthochdruck zugelassen. Auch wenn dessen Wirkort an der Henle'schen Schleife belegt ist, sind die direkten molekularen Targets unseres Wissens nach unbekannt.<sup>[21]</sup> Die Testung von Azosemid gegen DAPK3 zeigte eine konzentrationsabhängige reversible Inhibition mit hoher Ligandeneffizienz (IC<sub>50</sub>=2.1 µM ± 0.06 log-Einheiten, LE=0.35, Abbildung 3a). Damit ist DAPK3 das erste veröffentlichte direkte molekulare Target von Azosemid, wenngleich die DAPK3-Inhibition nur teilweise dessen blutdrucksenkende Wirkung erklären könnte. Azosemid zeigte auch Bindungsaffinität an hCAIX (K<sub>D</sub>=1.4 µM ± 0.03 log-Einheiten, Abbildung 3b), was nahelegt, dass es als Leitstruktur für die Entwicklung hCAIX-basierender Therapeutika ebenso geeignet sein könnte. Es ist bekannt, dass Azosemid teratogene Effekte hat.<sup>[22]</sup> Wenn man die seit langem vermutete Ursache von Teratogenität durch Carboanhydrase-Inhibitoren bedenkt,<sup>[23]</sup> können das Ergebnis unserer Studie eine Hypothese für den zugrundeliegenden molekularen Mechanismus liefern.

Sowohl die Wirkstofffindung als auch die chemische Biologie profitieren von schnellen Methoden zur Findung von NCEs. Diese Notwendigkeit kann durch computerbasiertes molekulares Design von synthetisch zugänglichen bioaktiven Verbindungen und die zuverlässige Vorhersage von makromolekularen Targets bedient werden. Mit dieser Arbeit haben wir ein prototypisches Vorgehen dafür präsentiert. Die Ergebnisse unserer Studie zeigen ebendiese Möglichkeiten des ligandenbasierten *De-novo*-Designs auf, nämlich die Erzeugung synthetisch zugänglicher fragmentartiger Ausgangsverbindungen, die zu innovativen und effektiven Leitstrukturen „heranwachsen“ können.

## Danksagung

Die Studie wurde durch die ETH Zürich und die OPO Stiftung, Zürich, Schweiz finanziell unterstützt. Wir danken Mirjam Menzi und Moritz Stoltz für technische Unterstützung sowie Dr. Jörg Scheuermann und Dr. Moreno Wichert für die Bereitstellung von humaner Carboanhydrase IX. P.S. und G.S. sind die Gründer der inSili.com GmbH, Zürich, Schweiz.

**Stichwörter:** Chemische Biologie · Computerchemie · Kinasen · Moleküldesign · Targetvorhersage

**Zitierweise:** *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, *54*, 15079–15083  
*Angew. Chem.* **2015**, *127*, 15294–15298

- [1] a) G. Schneider, U. Fechner, *Nat. Rev. Drug Discovery* **2005**, *4*, 649–663; b) J. Besnard, G. F. Ruda, V. Setola, K. Abecassis, R. M. Rodriguiz, X. P. Huang, S. Norval, M. F. Sassano, A. I. Shin, L. A. Webster, F. R. Simeons, L. Stojanovski, A. Prat, N. G. Seidah, D. B. Constam, G. R. Bickerton, K. D. Read, W. C. Wetsel, I. H. Gilbert, B. L. Roth, A. L. Hopkins, *Nature* **2012**, *492*, 215–220; c) B. Spänkuch, S. Keppner, L. Lange, T. Rodrigues, H. Zettl, C. P. Koch, M. Reutlinger, M. Hartenfeller, P. Schneider, G. Schneider, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52*, 4676–4681; *Angew. Chem.* **2013**, *125*, 4774–4779; d) T. Rodrigues, T. Kudoh, F. Roudnicky, Y. F. Lim, Y. C. Lin, C. P. Koch, M. Seno, M. Detmar, G. Schneider, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52*, 10006–10009; *Angew. Chem.* **2013**, *125*, 10190–10193; e) M. Reutlinger, T. Rodrigues, P. Schneider, G. Schneider, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53*, 4244–4248; *Angew. Chem.* **2014**, *126*, 4330–4334; f) T. Rodrigues, N. Hauser, D. Reker, M. Reutlinger, T. Wunderlin, J. Hamon, G. Koch, G. Schneider, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, *54*, 1551–1555; *Angew. Chem.* **2015**, *127*, 1571–1575.
- [2] a) C. W. Murray, D. C. Rees, *Nat. Chem.* **2009**, *1*, 187–192; b) M. Baker, *Nat. Rev. Drug Discovery* **2013**, *12*, 5–7.
- [3] R. S. Bohacek, C. McMartin, W. C. Guida, *Med. Res. Rev.* **1996**, *16*, 3–50.
- [4] C. Sheng, W. Zhang, *Med. Res. Rev.* **2013**, *33*, 554–598.
- [5] a) T. A. Haystead, *Cell. Signalling* **2005**, *17*, 1313–1322; b) J. Brognard, Y. W. Zhang, L. A. Puto, T. Hunter, *Cancer Res.* **2011**, *71*, 3152–3161; c) G. Page, D. Kogel, V. Rangnekar, K. H. Scheidtmann, *Oncogene* **1999**, *18*, 7265–7273.
- [6] a) K. Huber, L. Brault, O. Fedorov, C. Gasser, P. Filippakopoulos, A. N. Bullock, D. Fabbro, J. Trappe, J. Schwaller, S. Knapp, F. Bracher, *J. Med. Chem.* **2012**, *55*, 403–413; b) A. C. Pike, P. Rellos, F. H. Niesen, A. Turnbull, A. W. Oliver, S. A. Parker, B. E. Turk, L. H. Pearl, S. Knapp, *EMBO J.* **2008**, *27*, 704–714.
- [7] M. Hartenfeller, H. Zettl, M. Walter, M. Rupp, F. Reisen, E. Proschak, S. Weggen, H. Stark, G. Schneider, *PLoS Comput. Biol.* **2012**, *8*, e1002380.
- [8] A. L. Hopkins, C. R. Groom, A. Alex, *Drug Discovery Today* **2004**, *9*, 430–431.
- [9] a) N. Ono-Saito, I. Niki, H. Hidaka, *Pharmacol. Ther.* **1999**, *82*, 123–131; b) Y. Wang, T. Suzeck, J. Zhang, J. Wang, S. He, T. Cheng, B. A. Shoemaker, A. Gindulyte, S. H. Bryant, *Nucleic Acids Res.* **2014**, *42*, D1075–1082.
- [10] J. B. Baell, G. A. Holloway, *J. Med. Chem.* **2010**, *53*, 2719–2740.
- [11] G. M. Rishton, *Drug Discovery Today* **1997**, *2*, 382–384.
- [12] M. Hann, B. Hudson, X. Lewell, R. Lifely, L. Miller, N. Ramsden, *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* **1999**, *39*, 897–902.
- [13] A. P. Bento, A. Gaulton, A. Hersey, L. J. Bellis, J. Chambers, M. Davies, F. A. Kruger, Y. Light, L. Mak, S. McGlinchey, M. Nowotka, G. Papadatos, R. Santos, J. P. Overington, *Nucleic Acids Res.* **2014**, *42*, D1083–D1090.
- [14] a) M. Reutlinger, C. P. Koch, D. Reker, N. Todoroff, P. Schneider, T. Rodrigues, G. Schneider, *Mol. Inf.* **2013**, *32*, 133–138; b) M. Reutlinger, W. Guba, R. E. Martin, A. I. Alanine, T. Hoffmann, A. Klenner, J. A. Hiss, P. Schneider, G. Schneider, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 11633–11636; *Angew. Chem.* **2011**, *123*, 11837–11840.
- [15] P. P. Graczyk, *J. Med. Chem.* **2007**, *50*, 5773–5779.
- [16] a) I. Nobeli, A. D. Favia, J. M. Thornton, *Nat. Biotechnol.* **2009**, *27*, 157–167; b) P. A. Clemons, N. E. Bodycombe, H. A. Carinski, J. A. Wilson, A. F. Shamji, B. K. Wagner, A. N. Koehler, S. L. Schreiber, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2010**, *107*, 18787–18792.
- [17] M. Wichert, N. Krall, W. Decurtins, R. M. Franzini, F. Pretto, P. Schneider, D. Neri, J. Scheuermann, *Nat. Chem.* **2015**, *7*, 241–249.
- [18] T. Kawai, M. Matsumoto, K. Takeda, H. Sanjo, S. Akira, *Mol. Cell. Biol.* **1998**, *18*, 1642–1651.
- [19] T. Usui, T. Sakatsume, R. Nijima, K. Otani, K. Kazama, T. Morita, S. Kameshima, M. Okada, H. Yamawaki, *Clin. Sci.* **2014**, *127*, 539–548.
- [20] V. B. Chen, W. B. Arendall III, J. J. Headd, D. A. Keedy, R. M. Immormino, G. J. Kapral, L. W. Murray, J. S. Richardson, D. C. Richardson, *Acta Crystallogr. Sect. D* **2010**, *66*, 12–21.
- [21] O. K. Suh, S. H. Kim, M. G. Lee, *Biopharm. Drug Dispos.* **2003**, *24*, 275–297.
- [22] I. Hayasaka, K. Uchiyama, K. Murakami, Z. Kato, F. Tamaki, T. Shibata, T. Sugawara, M. Hayashi, *Congenital Anomalies* **1984**, *24*, 111–121.
- [23] J. G. Wilson, T. H. Maren, K. Takano, A. Ellison, *Teratology* **1968**, *1*, 51–60.

Eingegangen am 27. August 2015  
Online veröffentlicht am 21. Oktober 2015