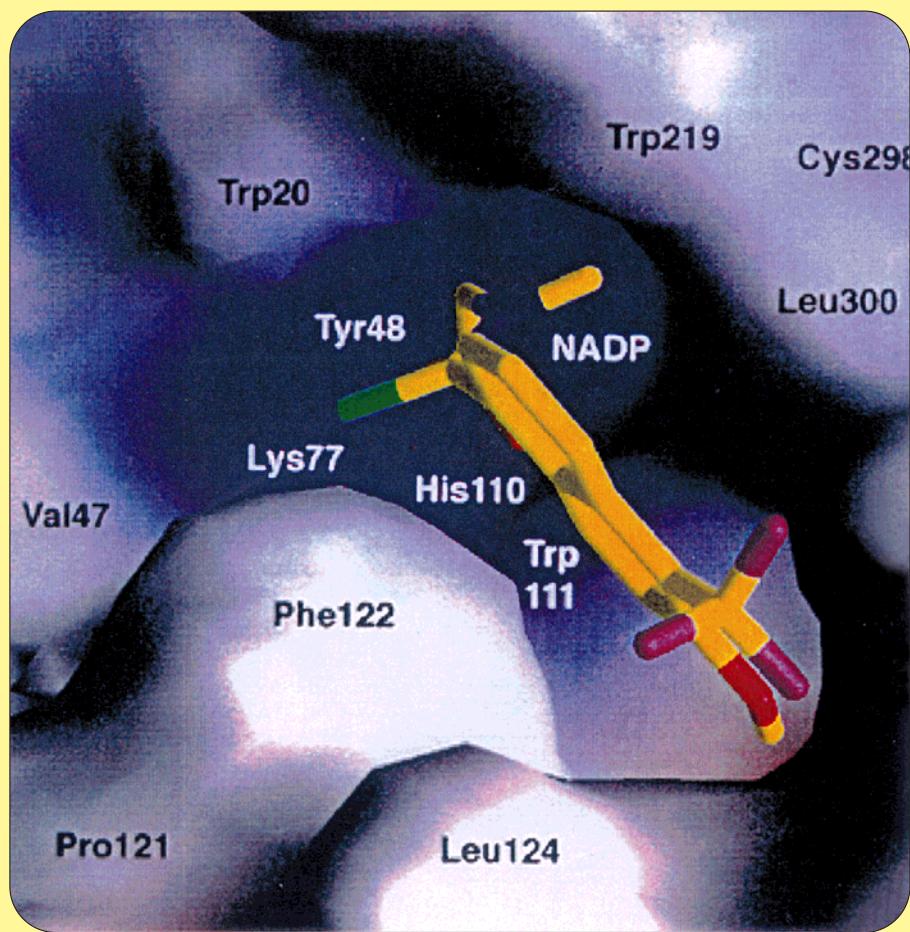


Die Kristallisation von Aldosereduktase mit den Inhibitoren Sorbinil (oben) und Tolrestat (unten) ergab, daß deren polare Gruppen in der Nähe des Coenzyms binden, daß aber ihre hydrophoben Teile um 90° zueinander geneigt sind. Sorbinil bindet unter geringen Änderungen der Enzymstruktur, während die Bindung von Tolrestat eine Verschiebung von Leu300 und Phe122 hervorruft. Diese Abbildung wurde mit freundlicher Genehmigung von Podjarny et al. angefertigt (*Structure* 1997, 5, 601).



Die Bedeutung der Balance von Wasserstoffbrückenbindungen und hydrophoben Wechselwirkungen im Wirkstoff-Rezeptor-Komplex

Andrew M. Davis und Simon J. Teague*

Warum führt die experimentelle Bestimmung der Struktur von Wirkstoff-Rezeptor-Komplexen so oft zu überraschenden Ergebnissen? Häufig unterscheidet sich die Orientierung eines Wirkstoffs bei der Bindung an seinen Rezeptor deutlich von der, die auf der Basis von Computersimulationen zu erwarten wäre. Hydrophobe Wechselwirkungen sind viel schwerer zu visualisieren als Wasserstoffbrücken, scheinen aber eine entscheidende Rolle bei der Bindung vieler Wirkstoffe an ihren Rezeptor zu spielen. In vielen Fällen, bei denen die Strukturen einer Reihe von Komplexen bestimmt wurden, wiesen Analoga mit optimierten hydrophoben Wechselwirkungen eine festere Bindung auf, auch wenn dies Wasserstoffbrückenbindungen kostete. Die Optimierung der hydrophoben Wechselwirkungen spielt auch bei der „induzierten Anpassung“ (induced fit)

von Rezeptoren an ihre Liganden eine wichtige Rolle. Eine Folge dieser Anpassung ist, daß mehrere Moleküle mit unterschiedlicher Molekülgestalt an denselben Teil eines bestimmten Rezeptors binden und sich gut an diesen anfügen können. Die Überbewertung der Wasserstoffbrückenbindungen hat häufig zu einer falschen Vorhersage der Bindungsorientierung bei einem Satz ähnlicher Liganden geführt. Das Problem der Balance zwischen Wasserstoffbrückenbindungen und hydrophoben Wechselwirkungen wird von Molecular-Modeling-Programmen in unterschiedlichem Ausmaß angegangen; die meisten Programme betrachten den Rezeptor als fast starr, und keines kann die Veränderungen voraussagen, die oft bei der experimentellen Bestimmung der Wirkstoff-Rezeptor-Komplexe beobachtet werden. Das „Andocken“ polarer Liganden wird

meistens besser simuliert als das hydrophobe Liganden. Für potentielle Wirkstoffe ist aber eine Ausgewogenheit zwischen den polaren und hydrophoben Eigenschaften notwendig. Eine feste Bindung der Wirkstoffe an den Rezeptor wird durch polare Wechselwirkungen und vor allem durch die Optimierung der *spezifischen* hydrophoben Wechselwirkungen erreicht. Die Eigenschaften von Wirkstoffmolekülen, die die pharmakokinetischen Eigenschaften steuern, werden hauptsächlich durch die polaren Gruppen bestimmt und durch die Lipophilie, die für die Verteilung in den Lipid-Doppelschichten notwendig ist.

Stichwörter: Hydrophobe Effekte • Molecular Modeling • Proteinstrukturen • Wasserstoffbrücken • Wirkstoff-Forschung

1. Einleitung

Der Erfolg der medizinischen Chemie hängt entscheidend vom Verständnis der Prinzipien der molekularen Erkennung ab. Der größte Erfolg bei der Erforschung der molekularen Erkennung war eine der ersten Arbeiten zu diesem Thema: die Entdeckung der Prinzipien, die der DNA-Struktur zu grunde liegen, durch Watson und Crick in den frühen 50er

Jahren.^[1] Die gegenseitige Erkennung der Basen Adenin (A) und Thymin (T) sowie Guanin (G) und Cytosin (C) ist auf komplementäre Wasserstoffbrückenbindungen und komplementäre Form zurückzuführen. Inzwischen haben Röntgenstrukturanalysen und NMR-Untersuchungen sehr viele Informationen über Proteinstrukturen geliefert. Dies ermöglichte, zusammen mit den Ergebnissen von Energieminimierungen und Docking-Untersuchungen bei Molecular-Modeling-Studien, Voraussagen über die Bindungsgeometrie von neuen Liganden, und das Konzept des rationalen Designs von Wirkstoffen wurde Realität. Obwohl es allgemein anerkannt ist, daß bei der Bindung eines Wirkstoffs an seinen Rezeptor ionische Wechselwirkungen, Wasserstoffbrückenbindungen, Dipol/Dipol-Wechselwirkungen, die Lipophilie und die Komplementarität der Raumstruktur eine Rolle spielen, weiß man erstaunlicherweise immer noch sehr wenig über den relativen Beitrag dieser Wechselwirkungen. Zwar wurde in vielen Studien versucht, diese Wechselwirkungen durch rechneri-

[*] Dr. S. J. Teague
Department of Medicinal Chemistry
Astra Charnwood, Bakewell Road
Loughborough, Leicester LE11 5RH (Großbritannien)
Fax: (+44) 1509-645571
E-mail: simon.teague@charnwood.gb.astra.com

Dr. A. M. Davis
Department of Physical and Metabolic Sciences
Astra Charnwood, Bakewell Road
Loughborough, Leicester LE11 5RH (Großbritannien)
E-mail: andy.davis@charnwood.gb.astra.com

sche Dekonvolution der Bindungsenergien^[2, 3] oder experimentell^[4, 5] zu quantifizieren, aber nur selten wurde versucht, den relativen Anteil dieser Wechselwirkungen unter den biologisch relevanten Bedingungen, d.h. in Wasser, experimentell zu analysieren.

Der Anteil der Wasserstoffbrückenbindung an den Wechselwirkungen zwischen Wirkstoff und Rezeptor variiert sehr stark. Es wird oft übersehen, daß die Bildung einer Wasserstoffbrückenbindung im Wirkstoff-Rezeptor-Komplex ein Austauschprozeß ist, wobei ähnliche Bindungen sowohl vom Wirkstoff als auch vom Rezeptor zu Wassermolekülen aufgebrochen werden müssen. Gleichzeitig werden neue Wasserstoffbrückenbindungen zwischen dem Wirkstoff und dem Rezeptor sowie zwischen den vorher an den Wirkstoff bzw. Rezeptor gebundenen Wassermolekülen und dem umgebenden Wasser gebildet. Ob die Wasserstoffbrückenbindungen zwischen Wirkstoff und Rezeptor begünstigt sind, hängt von der Energie ab, die für das Aufbrechen und die Bildung aller dieser Bindungen notwendig ist. In den Arbeiten von Fersht et al.^[6] und Williams et al.^[7] werden zwei wichtige und sich ergänzende Methoden beschrieben, um den Anteil der Wasserstoffbrückenbindungen an den Bindungswechselwirkungen zwischen Wirkstoff und Rezeptor zu quantifizieren, wobei strukturelle Veränderungen am Rezeptor bzw. am Wirkstoff untersucht werden. Fersht und seine Mitarbeiter haben die Kupplung von Tyrosin an ATP zu Tyrosyl-AMP (unter Abspaltung von Pyrophosphat) studiert – der erste Schritt bei der durch Tyrosyl-tRNA-Synthase katalysierten Übertragung von Tyrosin auf die tRNA.^[6] Durch gezielte Mutagenese wurden die energetischen Eigenschaften dieser Kupplung erforscht, indem der Effekt von Mutationen auf die Kinetik der Reaktion untersucht wurde. Da die Struktur des Komplexes im Kristall bekannt war, konnten die Mutationen direkt als Verlust von spezifischen Wasserstoffbrückenbindungen, Salzbrücken und hydrophoben Kontakten interpretiert werden. Durch eine Reihe von Punktmutationen konnte der Bindungsenergieanteil einer neutralen Wasserstoffbrückenbindung zu ca. 0.5–1.5 kcal mol⁻¹ bestimmt werden. Das

entspricht zwar einer 2–15fachen Affinitätssteigerung, eine ladungsverstärkte Wasserstoffbrückenbindung liefert aber einen Beitrag von bis zu 4.7 kcal mol⁻¹, was einer 3000fachen Affinitätssteigerung entspricht.

Williams et al. untersuchten NMR-spektroskopisch die Bindung von Modellpeptiden mit dem D-Ala-D-Ala-Ende des Peptidoglycangerüsts der Bakterienzellwand an das Antibiotikum Vancomycin.^[7] Eine strukturelle Modifikation des Peptids hatte Änderungen der Gesamtbindingssaffinität gegenüber Vancomycin zur Folge. Die NMR-Untersuchungen lieferten sowohl Informationen über die makroskopischen Bindungskonstanten als auch über individuelle Wechselwirkungen zwischen dem Peptid und Vancomycin. Williams et al. schätzten den Bindungsenergieanteil der neutralen Wasserstoffbrückenbindungen auf 0.5–1.5 kcal mol⁻¹, im Einklang mit den Ergebnissen von Fersht et al. Eine weitere Bestätigung dieses Schätzwertes für den Beitrag von Wasserstoffbrückenbindungen zur Wirkstoffbindung kann man in einer Studie über die Affinität von Fluorodesoxyzuckeranaloga gegenüber Glycogenphosphorylase finden. Dabei wurden die Hydroxygruppen reihenweise durch Fluoratome, die als H-Acceptor fungieren, ersetzt.^[8] Auch diese Studie führte zu dem Ergebnis, daß neutrale Wasserstoffbrückenbindungen mit ca. 1.5 kcal mol⁻¹ zur Bindungsenergie beitragen, was maximal einer 15fachen Bindungsverstärkung entspricht. Die Ergebnisse dieser Studien stimmen also bemerkenswert gut überein und werden ferner durch viele Beobachtungen aus Untersuchungen zur Wirkstoffentwicklung gestützt.^[9–11] Eine Wasserstoffbrückenbindung zwischen einem neutralen und einem geladenen Bindungspartner kann eine bis zu 3000fache Affinitätssteigerung bei der Bindung eines Wirkstoffs haben, doch beträgt dieser Faktor für eine Wasserstoffbrückenbindung zwischen neutralen Atomen weniger als 15. Erst kürzlich haben Williams und Westwell sogar diese recht geringen Anteile von Wasserstoffbrückenbindungen zwischen neutralen Atomen revidiert; sie würden den Autoren zufolge sehr stark überbewertet, und ihr tatsächlicher lokaler Bindungsanteil läge nahe bei Null!^[12] Sogar noch gängigere Ansichten

Simon Teague, geboren 1959 in Worcester, Großbritannien, erlangte seinen Doktortitel an der University of Nottingham in der Arbeitsgruppe von Professor G. Pattenden. Ein NATO-Stipendium ermöglichte ihm einen Aufenthalt als Postdoktorand bei Professor A. I. Meyers an der Colorado State University. Zur Zeit arbeitet er als Gruppenleiter für kombinatorische Chemie bei Astra Charnwood (Großbritannien). Seine Forschungsschwerpunkte sind das Design kombinatorischer Bibliotheken, die Leitstrukturentwicklung und die Untersuchung von Wirkstoff-Rezeptor-Wechselwirkungen.

Andy Davis, geboren 1961 in Wells, Somerset, Großbritannien, erlangte sein Bakkalaureat am Imperial College London und seinen Doktortitel an der University of Huddersfield bei Professor M. Page mit einer Arbeit über den Mechanismus von Umlagerungen bei Penicillinen. Zur Zeit arbeitet er als Gruppenleiter für physikalisch-organische Chemie bei Astra Charnwood. Seine Forschungsinteressen sind energetische Aspekte von Wirkstoff-Rezeptor-Wechselwirkungen, QSAR-Methoden sowie die Anwendung von Methoden der physikalisch-organischen und theoretischen Chemie bei der Wirkstoffentwicklung.



S. Teague



A. Davis

zur Bedeutung von Wasserstoffbrückenbindungen, etwa bei der Quervernetzung der 4-Hydroxyprolinreste von Kollagen, wurden kürzlich in Frage gestellt.^[13]

Der Beitrag hydrophober Wechselwirkungen an den gesamten Wechselwirkungen zwischen Wirkstoff und Rezeptor ist ausführlich beschrieben worden. Das Entfernen der hydrophoben Oberfläche aus dem Wasser durch Bindung an eine hydrophobe Region des Rezeptors macht im allgemeinen mindestens $28 \text{ cal Å}^{-2} \text{ mol}^{-1}$ aus, was $0.68 \text{ kcal mol}^{-1}$ oder einer 3.2fachen Erhöhung der Bindungskonstante pro Methylgruppe entspricht.^[14] Einen ähnlichen Energiegewinn liefert die Verteilung eines Wirkstoffs von Wasser auf ein hydrophobes Lösungsmittel wie *n*-Octanol.^[15] In einigen Fällen, bei denen die Komplementarität zwischen der hydrophoben Oberfläche des Wirkstoffs und der des Rezeptors besonders groß ist, kann der Beitrag an der Bindungsenergie deutlich größer sein.^[16] Die Wirkstoffmoleküle haben eine große Zahl an hydrophoben Bindungspartnern, und es ist offensichtlich, daß die Hydrophobie eine wesentliche Ursache für die Bindung zwischen Wirkstoff und Rezeptor ist. Diese Schlußfolgerung wird gestützt durch eine Betrachtung der Eigenschaften im Handel erhältlicher, oral zu verabreichen der Arzneimittel, die in der Physicians Desk Reference^[17] (ein Nachschlagewerk über alle zugelassenen Medikamente) aufgeführt sind. Dabei zeigt sich, daß Wirkstoffe im Durchschnitt nur ein bis zwei Donoratome und drei bis vier Acceptoratome aufweisen, während die durchschnittliche Zahl hydrophober Zentren in einem Wirkstoffmolekül 16 beträgt (Abbildung 1).

Diese Sichtweise der energetischen Aspekte von Wirkstoff-Rezeptor-Wechselwirkungen ist nicht neu, stößt aber ancheinend nicht immer auf allgemeine Zustimmung. Häufig wird angenommen, daß der Anteil der hydrophoben Wechselwirkungen für die Bindung zwar wichtig, aber nicht spezifisch ist. Ebenso werden Wasserstoffbrückenbindungen zwischen Wirkstoff und Rezeptor als bedeutender Bindungsbeitrag angesehen, die außerdem wegen ihrer Richtungsabhängigkeit wichtig für die Spezifität der Wirkstoff-Rezeptor-Bindung sind. Diese Schlußfolgerungen werden durch zahlreiche Röntgenstrukturanalysen von Protein-Inhibitor-Komplexen bekräftigt, bei denen Wasserstoffbrückenbindungen und Wechselwirkungen zwischen zwei geladenen Zentren nachgewiesen wurden. Aber das Visualisieren einer Wechselwirkung allein sagt uns nichts über ihren Bindungsanteil. In den letzten Jahren wurde manchmal die Struktur von Protein-Inhibitor-Komplexen für eine Reihe von Analoga bei Reihenuntersuchungen als Hilfsmittel für die Wirkstoffentwicklung genutzt, oftmals mit überraschenden Ergebnissen in bezug auf die relative Geometrie oder Orientierung der gebundenen Liganden. Einige wenige Beispiele wurden bereits beschrieben, und bei der rasch zunehmenden Zahl von Veröffentlichungen über Protein-Ligand-Komplexe^[18] treten solche überraschenden Ergebnisse immer häufiger auf. In diesem Aufsatz möchten wir einige dieser Beispiele herausstellen und damit die Hypothese stützen, daß die Balance zwischen polaren und hydrophoben Wechselwirkungen bei der molekularen Erkennung möglicherweise überdeckt werden muß. Die Bedeutung der Hydrophobie und der induzierten Anpassung für die gesamten Wechselwirkungen zwischen Wirkstoff und Protein sowie die Mängel der gegenwärtig zur

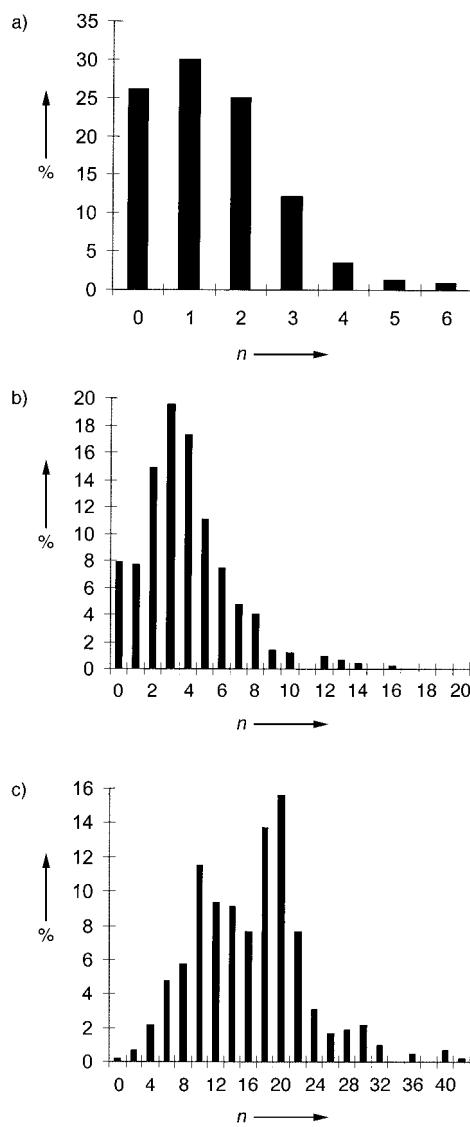
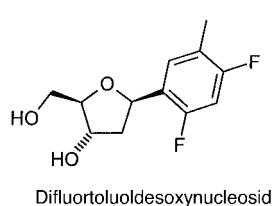
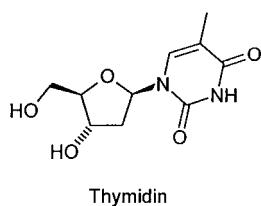


Abbildung 1. a) Häufigkeitsverteilung von Wasserstoffbrückendenoren in 415 Arzneimitteln, die in der Physicians Desk Reference aufgeführt sind. b) Entsprechende Häufigkeitsverteilung von Wasserstoffbrückenacceptoren. c) Entsprechende Häufigkeitsverteilung hydrophober Zentren. Ordinate: % Häufigkeit; Abszisse: Zahl *n* der jeweiligen Atome.

Voraussage verfügbaren Hilfsmittel werden in diesem Aufsatz besonders herausgestellt.

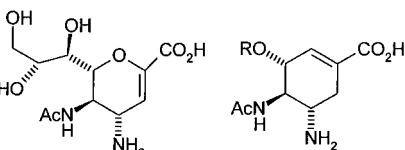
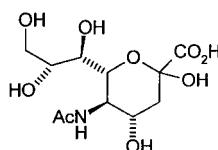
2. Hydrophobe Wechselwirkungen an Stelle von Wasserstoffbrückenbindungen

In vielen Veröffentlichungen wird dargelegt, daß hydrophobe Wechselwirkungen die Affinität sogar auf Kosten von Wasserstoffbrückenbindungen steigern können. Ein elegantes Beispiel für die Bedeutung der Gestaltanpassung bei der Enzym-Substrat-Erkennung liefert die Paarbildung von Adenin mit Difluortoluoldesoxynucleosid, die effizient und mit hoher Genauigkeit erfolgt, wenn dieses fluorhaltige Analogon in einen DNA-Strang eingebaut wurde.^[19] Die Effizienz ist nur viermal niedriger als mit Thymidin, und die Selektivität gegenüber Adenin beträgt 2.9–4.2 logarithmische Einheiten



in bezug auf den Einbau von C, T oder G. Die gegenwärtige Annahme, daß die Zahl und Stärke der Wasserstoffbrückenbindungen der Hauptfaktor für die Effizienz und Genauigkeit der DNA-Synthese sind, muß möglicherweise überprüft werden. Die Beteiligung einer unkonventionellen Wasserstoffbrückenbindung (C-F...H-N) zwischen dem fluorhaltigen Analogon und Adenin konnte selbst in so günstigen Lösungsmitteln wie Chloroform nicht nachgewiesen werden. In Abwesenheit von DNA-Polymerase konnte keine spezifische Paarungsselektivität beobachtet werden. Die resultierende Doppelhelix wird interessanterweise um 4–5 kcal destabilisiert gegenüber einer mit Thymidin in derselben Position. Somit sind Wasserstoffbrückenbindungen für den DNA-Duplex wichtig, aber diese Studie liefert auch Beweise dafür, daß sie für die Basenerkennung durch die DNA-Polymerase viel weniger Bedeutung haben, in einer Situation also, die den Wirkstoff-Rezeptor-Wechselwirkungen viel stärker gleicht.

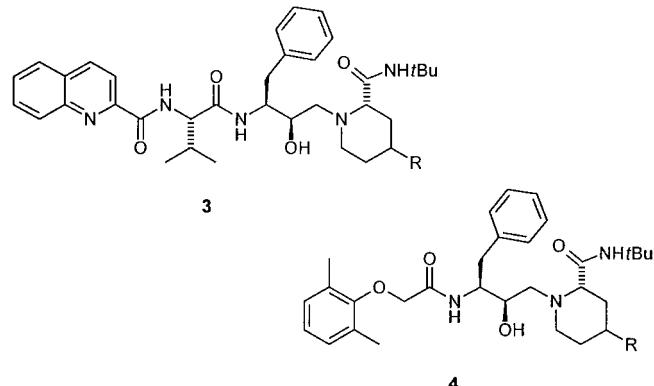
Die Entdeckung von Inhibitoren der Influenza-Neuramidase (NA) erbrachte ein Beispiel dafür, daß Wasserstoffbrückenbindungen durch zusätzliche hydrophobe Wechselwirkungen ersetzt werden können.^[20] Dabei wurden NA-Inhibitoren auf Basis von Übergangszustandsanaloga für die Abspaltung von Sialinsäure von Glykokonjugaten entdeckt. Röntgenstrukturuntersuchungen von Neu5Ac und seinen Analoga mit NA ergaben, daß die beiden endständigen Hydroxygruppen der Glycerinseitenkette eine zweizähnige Wasserstoffbrückenbindung mit Glu276 bilden. Der Austausch der Glycerinseitenkette gegen eine Hydroxygruppe



lieferte **1** ($\text{IC}_{50} = 6300 \text{ nM}$), was gut mit den von Fersht et al. ermittelten Werten für den Verlust einer Wasserstoffbrückenbindung zwischen einem geladenen und einem neutralen Zentrum übereinstimmt.^[6] Trotzdem wurde bei einer Serie von Alkylanaloga eine stetige Zunahme der Inhibitoraktivität beobachtet, die schließlich bei **2** ($\text{IC}_{50} = 1 \text{ nM}$) ihr Maximum erreichte. Die Röntgenstrukturanalyse des Komplexes von **2** mit NA ergab, daß die 3-Pentylgruppe an eine große hydrophobe Oberfläche gebunden ist, die von den CH-Seitenketten der polaren Aminosäuren Glu276, Arg224 und den hydrophoben Resten Ala246 und Ile222 erzeugt wird! Die Carboxylatgruppe von Glu276, an das die Hydroxygruppen des Glycerins in den Nuc5Ac-Analoga gebunden sind, wurde aus

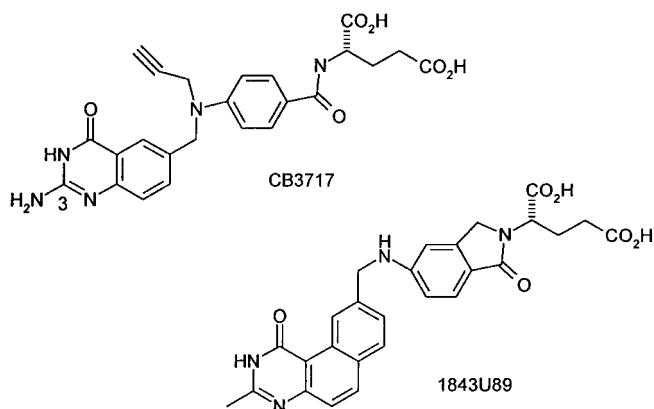
der hydrophoben Tasche herausgedrängt. Interessanterweise ging man vorher davon aus,^[21] daß Wasserstoffbrückenbindungen für die molekulare Erkennung aller Kohlenhydrate wichtig sind, wobei oftmals Wasserstoffbrückenbindungen zu jeder Hydroxygruppe des Zuckers existieren.

Die Untersuchung der Struktur-Aktivitäts-Beziehungen für die beiden Reihen von HIV-2-Proteaseinhibitoren des Typs **3** und **4** ergab,^[22] daß diese trotz des Austausches der P2- und P3-Substituenten in **3** gegen den lipophilen Dimethylphenoxy-substituenten in **4** sehr ähnliche Affinitäten aufweisen.



Der Röntgenstrukturanalyse des Protein-Inhibitor-Komplexes von **3** zufolge liegen Wasserstoffbrückenbindungen zwischen der Chinolinamideinheit und Asp29' sowie Gly48' vor. Beim Komplex mit **4** besteht eine induzierte Anpassung an die Dimethylphenoxygruppe über eine Verschiebung von Asp29' um 1 Å und eine Verschiebung der Seitenkette von Asp30' um 4 Å. Die Flap-Region (43'-48') vollzieht eine Konformationsänderung durch die Bindung an einen lipophileren Inhibitor.

Ein Vergleich der Komplexe von Thymidylatsynthetase (TS) und den Inhibitoren CB3717 sowie 1843U89 ($K_D = 0.1 \text{ nM}$) ergab,^[23] daß sich die beiden Inhibitoren in nahezu



identischen Positionen befinden, obwohl die Donorgruppe in Position 3 des Guanidinrestes von CB3717 bei 1843U89 fehlt; bei CB3717 besteht hier eine Wasserstoffbrückenbindung zu Ala263 (Abbildung 2). Die Glutamatreste besetzen recht unterschiedliche Positionen in den beiden Inhibitorkomplexen. Eine induzierte Anpassung an den Rezeptor ist schwierig, da 1843U89 wegen des zusätzlichen Arenrings 4 Å länger ist als CB3717. 1843U89 nimmt eine L-förmige Konformation an, wobei Ile79, das sich auf der Innenseite des „L“ befindet, sowohl zum Isoindolinonrest als auch zum Benzochinazolinon-

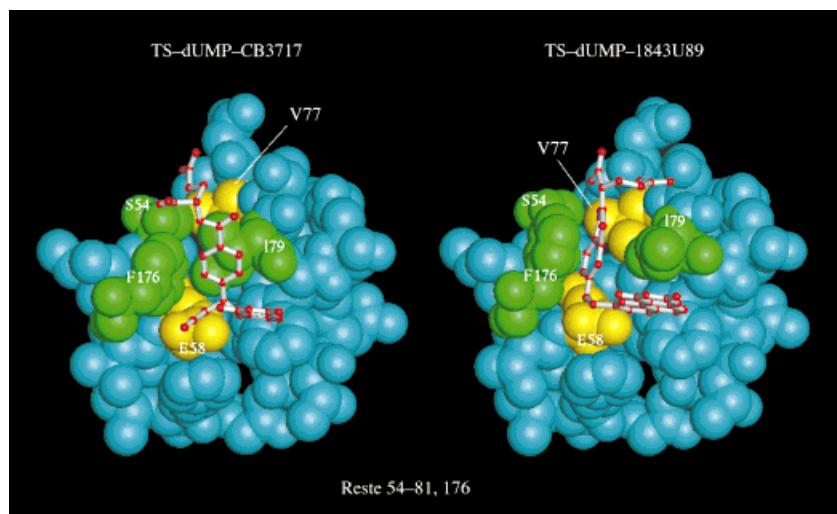
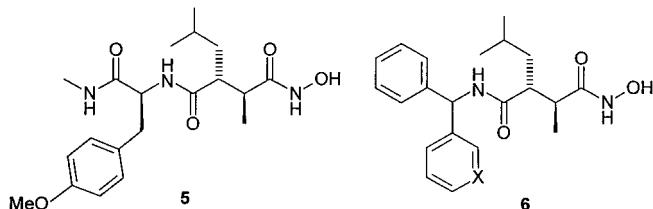


Abbildung 2. Die Bindung von CB3717 und 1843U89 an Thymidylat-Synthetase. Die Verschiebungen von Ile79 (I79) und Phe176 (F176) sind deutlich zu sehen. Diese Abbildung wurde mit freundlicher Genehmigung von Montfort und Weichsel angefertigt.^[23]

rest Kontakt hat. Phe176 bildet einen Kontakt mit dem Benzchinazolinrest auf der Außenseite. Die durch 1843U89 verursachte induzierte Anpassung ist sehr ausgeprägt; sie umfaßt fast das halbe Protein und schließt Reste auf allen Seiten der Bindungstasche ein. Die Atome der Hauptkette von Ile79 verschieben sich um ca. 1.5 Å und die Atome der Seitenkette um 2.0–6.6 Å zwischen den beiden Komplexen. Den Autoren nach hat die Entdeckung von 1843U89 „implications for drug design, as 1843U89 could not have been obtained from current structure-based approaches.“^[23]

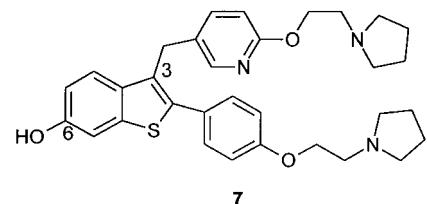
Die Komplexe von **5** und **6** ($X=CH$), Inhibitoren für Matrix-Metalloproteasen, mit Stromelysin (MMP-3) wurden verglichen (Abbildung 3).^[24] Der Austausch der P3'-Gruppe



von **5** durch einen Phenylring (\rightarrow **6**) war trotz des Verlustes von zwei Wasserstoffbrückenbindungen möglich. Der Komplex mit **6** wies eine unerwartete Verschiebung einer Schleife (Schleife 222–231) auf, wodurch die hydrophobe Bindung eines Leu-Restes zum Benzhydrylteil ermöglicht wurde. Nachdem die Autoren diese erstaunliche Entdeckung gemacht hatten, konnten sie die Strukturdaten und die neu erzeugte hydrophobe Umgebung in diesem Komplexbereich nutzen, um die Inhibitoren weiter zu verbessern. So wurde nach Einführen eines H-Acceptors ($X=N$) eine 16fache Affinitätssteigerung beobachtet, die mit der Bildung einer neutralen Wasserstoffbrückenbindung in Einklang ist.

Einige Gruppen von wirksamen Inhibitoren für das aktive Zentrum von Thrombin binden auf erstaunliche Weise an das Enzym.^[25–27] Diese zweibasigen Inhibitoren auf Benzo[b]thiophenbasis^[25] plazieren den hydrophoben Benzo[b]thiophenkern in die S₁-Bindungstasche des Enzyms, die Stelle, die normalerweise von der basischen Seitenkette des Arginins in

der Standardsequenz D-Phe-Pro-Arg besetzt wird. Bei **7** wurde eine Wasserstoffbrückenbindung von der Hydroxygruppe in der C6-Position des Benzo[b]thiophenrestes zu Asp189 beobachtet, wobei die C6-Desoxyverbindung eine viermal geringere Affinität aufwies. Die relative Bedeutung und



Spezifität der hydrophoben Wechselwirkungen zum Benzo[b]thiophen ließ sich dennoch zeigen, da der Austausch gegen

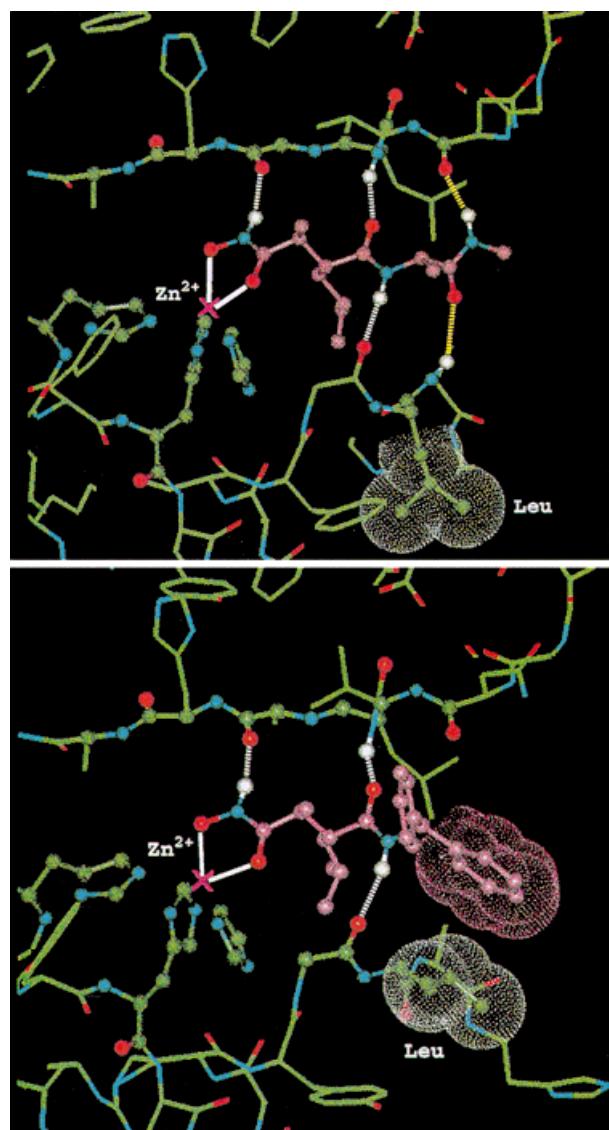
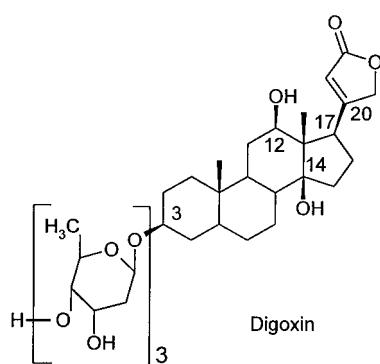


Abbildung 3. Die Komplexe zwischen **5** (oben) und **6** (unten) mit Stromelysin. Die hydrophobe Bindung eines Leucinrestes ersetzt zwei Wasserstoffbrückenbindungen. Diese Abbildung wurde mit freundlicher Genehmigung von Decicco und DeGrado et al. angefertigt.^[24]

Thiophen-, Benzofuran-, Indol- oder Naphthalinreste jedesmal zu einem viel geringeren Affinitätsabfall führte. Das Hochdurchsatz-Screening ist somit eine Möglichkeit, um auf eine neue Klasse von Inhibitoren zu stoßen. Eine Arbeitsgruppe bei Roche^[26] hat sehr geschickt und auf amüsante Weise ihre Versuche beschrieben, die relativen Affinitäten von Inhibitoranaloga basierend auf Strukturbestimmungen für den Komplex mit Thrombin und stellvertretende Verbindungen einer Gruppe abzuschätzen. Viele erfahrene medizinische Chemiker werden nachvollziehen können, auf welche Schwierigkeiten sie dabei gestoßen sind, und ihrer Schlußfolgerung zustimmen: „...it will continue to be important to critically examine the structure-activity relationships of any class of inhibitor for indications of unusual binding. The enzyme 'sees', binds and possibly adapts to the outside of the inhibitor folded in some low energy conformation, and is blissfully ignorant of the inhibitor's internal chemistry. The chemist on the other hand sees a compound as a core structure, decorated on the outside with interesting substituents. It is only fair to say that we must learn to look at inhibitors the way an enzyme does“.

Einige Wirkstoffe haben mehrere Hydroxygruppen und polare Gruppen, die in vielen Diskussionen über die Wirkstoff-Rezeptor-Wechselwirkungen als „interaktiv“ bezeichnet wurden. Die Annahme der „Interaktivität“ wird aber nicht immer bestätigt, wenn die Struktur des Wirkstoff-Rezeptor-Komplexes experimentell ermittelt wird. Ein Beispiel dafür ist die Bindung von Digoxin an 26-10 Fab, einen monoklonalen Antikörper,^[28] der fast ausschließlich hydrophobe Wechselwirkungen aufweist, obwohl interaktive Gruppen vorhanden sind.



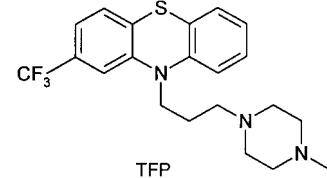
Bei diesem Komplex wird deutlich, wie effektiv und spezifisch die Komplementarität der Raumstruktur und die hydrophoben Wechselwirkungen sind. Der Antikörper bindet mit einer Affinität von 0.1 nm an den Wirkstoff, obwohl keine Wasserstoffbrückenbindungen oder Wechselwirkungen zwischen geladenen Gruppen beteiligt sind. Die Bindung von Digoxin erfolgt so, daß der Lactonring in einer tiefen Tasche unten an der Bindungsstelle verborgen ist und die Kohlenhydratgruppen größtenteils dem umhüllenden Lösungsmittel ausgesetzt sind. Der Lactonring im Komplex ist gegenüber dem des ungebundenen Digoxins im Kristall um 180° um die C17-C20-Bindung gedreht. Der Wirkstoff ist sandwichartig zwischen den aromatischen Ringen der V_H-Domäne (Tyr33, Tyr47, Tyr50 und Trp100) eingeschoben, die die Bindungstasche bilden. Die Komplementarität der Oberflächen ist am

Lacton- und am Steroid-D-Ring am größten, nimmt in Richtung auf die Peripherie der Bindungsstelle ab und hat zwischen den Oberflächen um die Hydroxygruppen an C12 und C14 signifikante Lücken. Der Antikörper bindet auch Digitoxigenin, das keine 12- β -OH-Gruppe aufweist, mit gleicher Affinität.

2.1. Das Scheitern der Hypothese vom starren Rezeptor

Hydrophobe Wechselwirkungen werden oftmals mit Konformationsänderungen des Rezeptors in Verbindung gebracht. Die Konformationsänderung im Rezeptor bei der Bindung des Liganden wird üblicherweise als induzierte Anpassung bezeichnet. Solche Veränderungen können durch polare oder hydrophobe Wechselwirkungen zwischen Rezeptor und Liganden bedingt sein; die Beispiele in der Literatur sind aber mit überwältigender Mehrheit das Ergebnis von hydrophoben Wechselwirkungen. In diesen Fällen könnte man sich die Konformationsänderung genauso gut als „Zusammenklappen“ des Rezeptors um den Liganden vorstellen, bedingt durch hydrophobe Wechselwirkungen. Das relative Übergewicht von Beispielen für hydrophobe Bindungen könnte man als deutliches Zeichen für die relative Stärke von hydrophoben Wechselwirkungen im Vergleich zu polaren ansehen.

Trifluoperazin (TFP) ist ein Inhibitor für Ca²⁺-Calmodulin (Ca²⁺-CaM).^[29] Die Bindung von TFP induziert eine größere Konformationsänderung im Protein von einer verlängerten Hantel zu einer kompakten Form, die nicht mehr mit dem Zielenzym interagieren kann. In der Kristallstruktur des Komplexes liegen vier TFP-Moleküle pro Ca²⁺-CaM vor. Man geht davon aus, daß die positive Nettoladung eher zur Stabilisierung der resultierenden kugelförmigen Konformation dient, als daß sie zur Bindung befähigt. Mehrere Bindungsarten wurden vorher für TFP vorausgesagt, aber keine war mit der beobachteten Komplexstruktur im Einklang. Das lag an der starken Konformationsänderung, die durch die Bindung erfolgte, an unerwarteten hydrophoben Wechselwirkungen zwischen zweien der TFP-Moleküle, daran, daß mehr als eine Proteinregion an der Bildung einer speziellen TFP-Bindungsstelle beteiligt war und daß viele der beteiligten Proteinregionen mit mehr als einem TFP-Molekül interagierten.



Ein Hochdurchsatz-Screening führte zur Entdeckung von Bay W1807, einem starken Inhibitor der Glycogenphosphorylase (GP) (Abbildung 4).^[30] Bay W1807 bindet an eine allosterische Bindungsstelle, an die viele endogene, phosphorylierte Moleküle wie AMP und Glucose-6-phosphat (Glc-6-P) binden. Ein Vergleich der GP-Komplexe von Bay W1807 und Glc-6-P ergab, daß beide mit ihren geladenen Gruppen an die Argininreste in der Bindungstasche (Arg309 und Arg310) binden, daß aber die höhere Affinität (im nm-Bereich) von Bay W1807 im Vergleich zu der von Glc-6-P (im μ m-Bereich) vor allem das Resultat von zusätzlichen hydrophoben Wechselwirkungen ist.

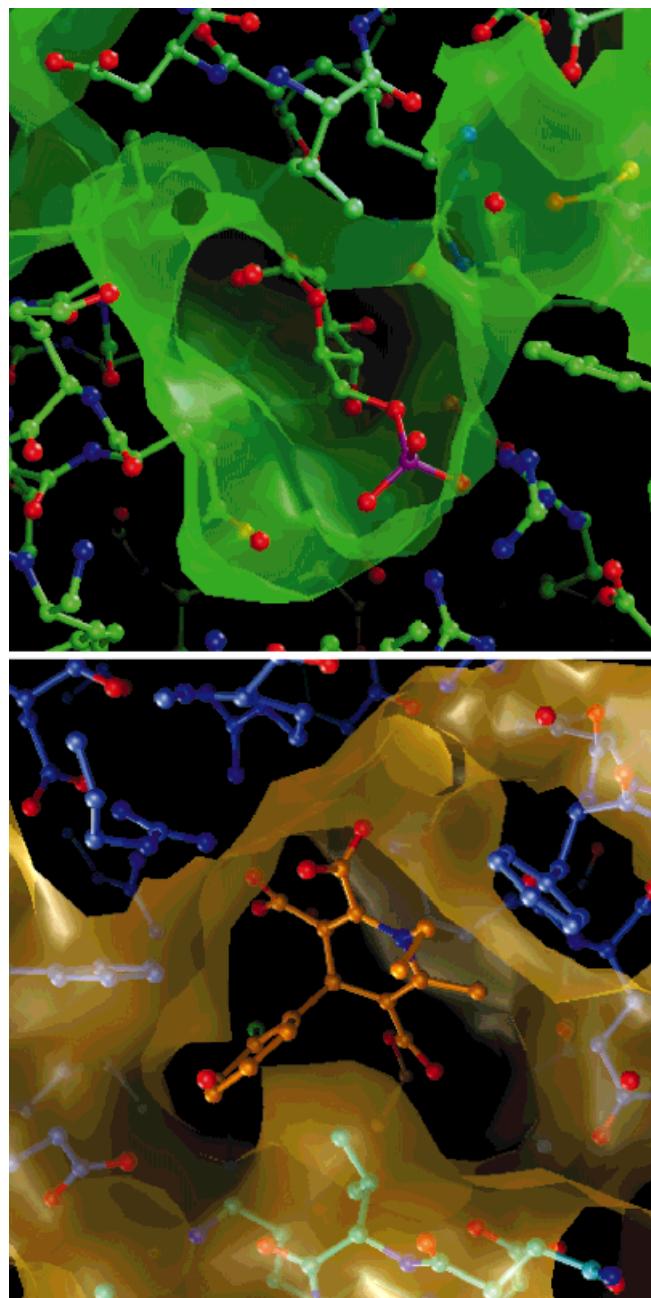
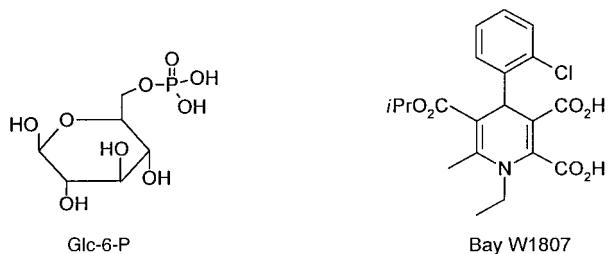
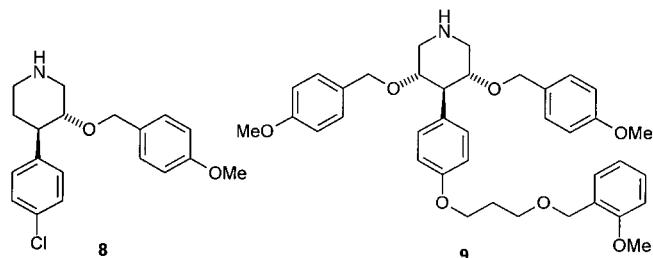


Abbildung 4. Oben: Der Komplex von Glycogenphosphorylase b mit Glucose-6-phosphat. Unten: Induzierte Anpassung des Rezeptors an W1807. Diese Abbildung wurde mit freundlicher Genehmigung von Johnson et al. angefertigt.^[30]

Der Chlorphenylring liegt sandwichartig zwischen Phe196 und Val45', wobei der Chlorsubstituent in van-der-Waals-Kontakt mit den aliphatischen Resten von Arg193 und Asp227 steht. Begünstigende Wechselwirkungen bestehen

zwischen Tyr75 und der N-Ethylgruppe sowie zwischen der 2-Propylgruppe, Trp67, Ile68 und dem aliphatischen Rest von Arg193. Eine größere Konformationsänderung der allosterischen Bindungsstelle erfolgt bei der Bindung von Bay W1807, wobei sowohl Verschiebungen bei Phe196 in der Seitenkette von bis zu 2.9 Å als auch Verschiebungen von 1.2 Å bei Val45' auftreten. Bay W1807 wird fast vollständig eingehüllt, so daß nur 7 % seiner Oberfläche für das umgebende Lösungsmittel zugänglich sind. Die Autoren kommentieren das so: „Screening for effective ligand binding has identified high-affinity ligands that, by chance, are able to generate conformational changes that lead to high affinity, selective binding. Although such changes are easy to detect and rationalize in terms of the crystal structure they are much less easy to predict in a way that would facilitate structure-based drug design.“^[30]

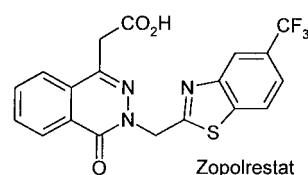
Viele peptidische Renin-Inhibitoren wurden durch das rationale Design basierend auf Übergangszustandsanaloga des spaltbaren Leu-Val-Teils vom menschlichen Angiotensinogen entdeckt. Ein Hochdurchsatz-Screening^[31] führte zum 3,4-disubstituierten Piperidin **8** ($IC_{50} = 50 \mu\text{M}$). Die nachfolgende Optimierung führte zu einer bemerkenswerten Steigerung der Affinität; das Maximum wurde mit **9** erreicht ($IC_{50} = 0.47 \text{ nm}$). Die Kristallstrukturbestimmungen bei einer Serie



von Verbindungen, die während des Optimierungsprozesses erhalten wurden, ergaben eine induzierte Anpassung der Rezeptortasche zur Unterbringung der Substituenten in 3-, 4- und 5-Stellung des Piperidinrings. Bei den Verbindungen wurde in Tierversuchen eine ausgezeichnete metabolische Stabilität, eine moderate biologische Verfügbarkeit und eine gute Aktivitätsdauer festgestellt.

Der Strukturvergleich der menschlichen Aldosereduktase mit und ohne Bindung des Inhibitors Zopolrestat (3 nm) führte zur Entdeckung einer hydrophoben Bindungstasche am aktiven Zentrum, in die der Wirkstoff vorzüglich paßt.^[32] Die Bildung dieser Tasche wird auf Klappbewegungen zurückgeführt, die durch den Liganden induziert werden.

Im gebundenen Zustand hat Zopolrestat eine zugängliche Oberfläche von 12.7 Å^2 , nur 6.4 % von der des ungebundenen Inhibitors. Der Benzothiazolring ist zwischen Trp111 und Leu300 sandwichartig eingeschoben und der Phthalazinonring zwischen Trp20 und Phe122. Die Bindung des Liganden geht mit einer Verschiebung von Leu300 zur Bindungstasche und einer Bewegung der Schleife 121–135 einher, so daß Phe122 an der Bindung in der Tasche teilnehmen kann. Der



Carboxylatrest spielt dabei keine Rolle, da er über eine Salzbrücke mit His110 verknüpft ist, wobei ein Sauerstoffatom das Sauerstoffatom in der Carbonylgruppe des Substrats nachahmt. Dennoch lautet der Kommentar der Autoren: „The hydrophobic residues are the major determinants of molecular recognition. The marked preference of the enzyme for hydrophobic substrates (e.g. steroids) is consistent with this mode of binding the inhibitor.“ Die zusätzliche Verschiebung von mindestens sechs geordneten Wassermolekülen kann einen Entropieanteil von bis zu 2 kcal mol^{-1} pro Wassermolekül an der gesamten Bindungsenergie ausmachen.^[33]

Die Kristallisation von Tolrestat und Sorbinil mit Aldose-reduktase (AR) ergab, daß die beiden polaren Gruppen in der Nähe des Coenzyms binden, daß aber ihre hydrophoben Teile um 90° zueinander geneigt sind (Abbildung 5).^[34] Sorbinil bindet unter geringen Änderungen der Enzymstruktur, während die Bindung von Tolrestat eine Verschiebung von

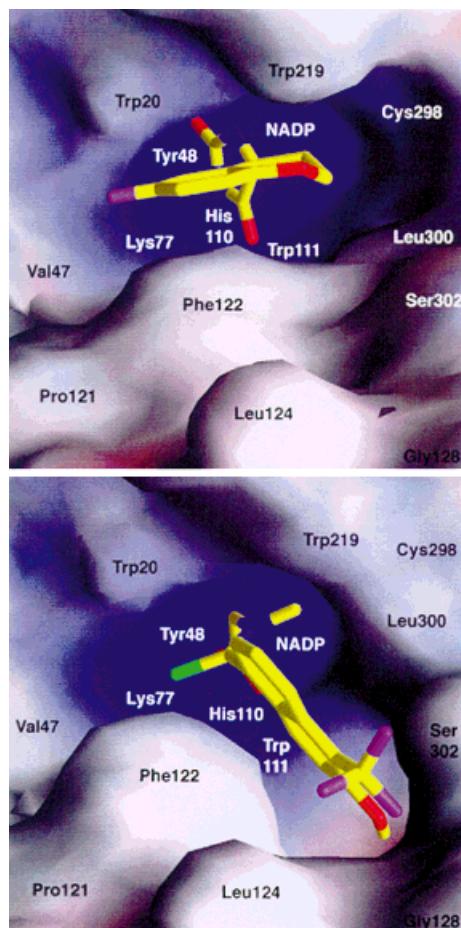
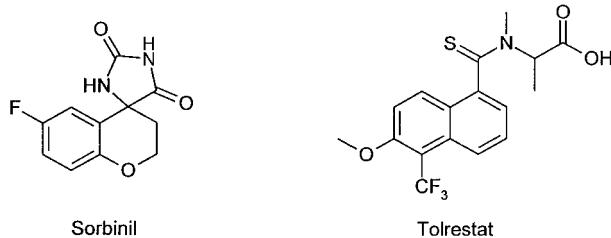


Abbildung 5. Induzierte Anpassung der Aldosereduktase an die Inhibitoren Sorbinil (oben) und Tolrestat (unten). Diese Abbildung wurde mit freundlicher Genehmigung von Podjarny et al. angefertigt.^[34]

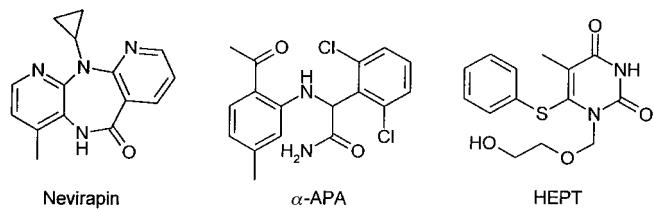
Leu300 und Phe122 induziert. Die erhaltenen IC_{50} -Werte für die beiden Inhibitoren sind dennoch sehr ähnlich.

Eine Konformationsänderung als Folge von hydrophoben Wechselwirkungen wird sowohl mit Cofaktoren als auch mit Wirkstoffen beobachtet.^[35] Beim Enzym Isopropylmalatdehydrogenase (IMDH) induziert der Cofaktor NAD⁺ einen Schleifen-Ringschluß. Fünf Schleifen aus verschiedenen Abschnitten der Primärsequenz bewegen sich um bis zu 2.5 Å, um vorwiegend hydrophobe Wechselwirkungen mit dem Cofaktor einzugehen. Auch wenn die Meinung vorherrscht, Adenin weise „interaktive“ Stickstoffatome auf, so ist das möglicherweise nicht immer der Fall. Die Strukturbestimmung von Glutamin-5-phosphoribosyl-1-pyrophosphat (PRPP), dem Regulationsenzym bei der Biosynthese der Purinucleotid, ergab, daß der Adeninrest von AMP an der C-Seite sandwichartig zwischen den Seitenketten von Tyr242 und Val349 liegt, aber keine Wasserstoffbrückenbindungen zum Protein bestehen.^[36]

2.2. Formbarkeit des Rezeptors und Vielfältigkeit der Liganden

Gibt es viele stруктурell verschiedene Liganden für einen Rezeptor, so wird das manchmal als ausreichender Beweis für mehrere unterschiedliche Bindungsstellen angesehen. Das muß aber nicht unbedingt der Fall sein. Die Tatsache, daß die induzierte Anpassung und die hydrophoben Wechselwirkungen so wichtig für die Rezeptor-Liganden-Bindung sind, hat als logische Konsequenz, daß viele stруктурell unterschiedliche Liganden mit einem biologischen Zielmolekül in ähnlichen Orientierungen und an derselben Bindungsstelle interagieren können. Die Strukturbestimmung der HIV-Revertase (HIV-1-RT) im Komplex mit Nichtnukleosid-Inhibitoren liefert ein Beispiel dafür (Abbildung 6).^[37]

Ein detaillierter Strukturvergleich zwischen den Komplexen von HIV-1-RT mit den vier Inhibitoren Nevirapin, dessen nah verwandtem Analogon 1051U91 sowie den strukturell andersartigen Verbindungen α -APA und HEPT ergab, daß alle vier einen gemeinsamen Bindungsmodus zum Enzym aufweisen! Die häufigsten Bindungsmerkmale sind hydrophobe Wechselwirkungen, hervorgerufen durch die Induktion



einer Strukturanzässigung, die durch gegenseitige Konformationsumwandlungen sowohl im Enzym als auch in den Verbindungen erreicht wird. Leu100, Tyr181 und Tyr188 sind an umfangreichen hydrophoben Kontakten zu allen vier Inhibitoren beteiligt. Elektrostatische Wechselwirkungen spielen hingegen eine untergeordnete Rolle, wobei die polaren Wechselwirkungen zwischen dem Rezeptor und den Liganden stark variieren. Vergleicht man die Struktur mit

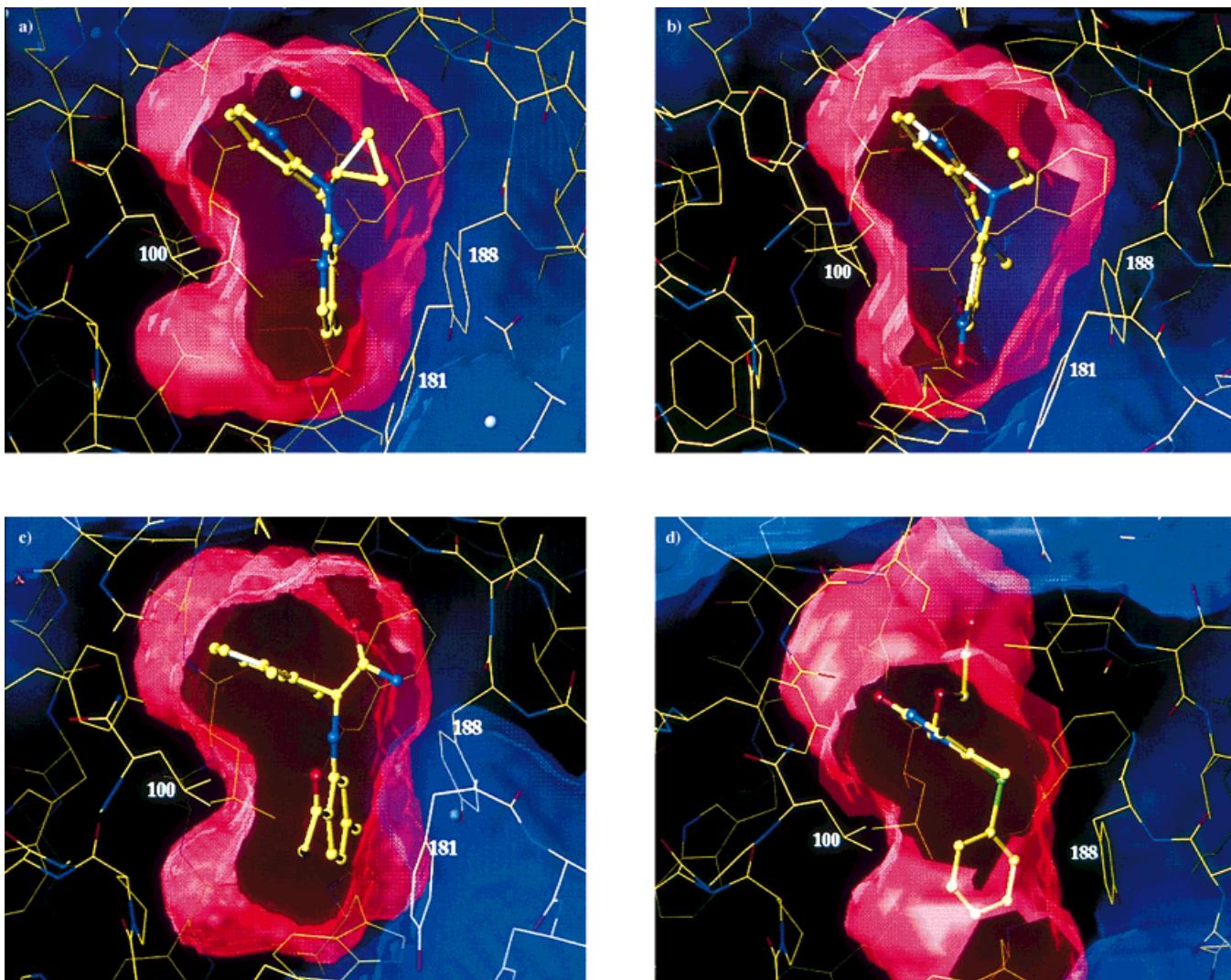
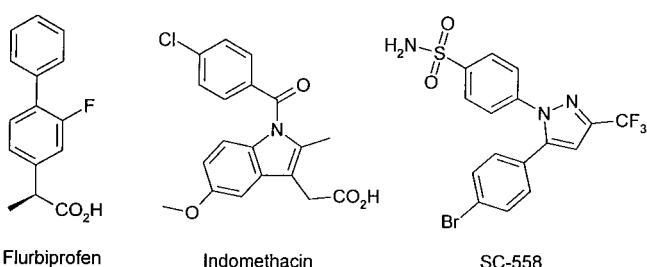


Abbildung 6. Die Bindung von a) Nevirapin, b) 1051U91, c) α -APA und d) HEPT an HIV-1-RT. Die pinkfarbene Oberfläche umschreibt die Bindungstasche und entspricht dem Raum, der einem kleinen Substrat (1.4 Å Breite) zugänglich ist. Die Anpassungen der Bindungstasche an die Liganden sind deutlich sichtbar. Diese Abbildung wurde mit freundlicher Genehmigung von Ren, Stuart und Stammers et al. angefertigt.^[37]

einer „Konsensus-Struktur“, so wird keine der Ca -Positionen an den Enzymresten um mehr als 2.7 Å verschoben. Dennoch stimmen die beobachteten Änderungen genau mit den Variationen bei den Inhibitorsubstituenten überein. Die Bildung resisternter Virusstämme, die meistens Reste mit kleineren hydrophoben Seitenketten wie Tyr181Cys und Tyr188Cys an der Bindungsstelle aufweisen, unterstreicht die Bedeutung von hydrophoben Wechselwirkungen an der Bindungsstelle.

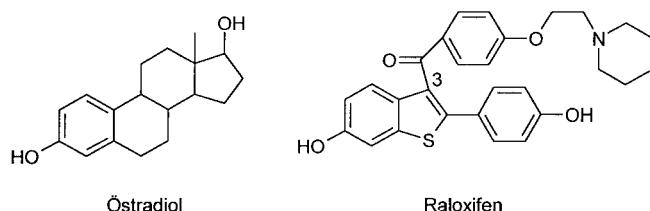
Mehrere strukturell unterschiedliche Inhibitoren der Cyclooxygenase-2 (COX-2) binden an sehr ähnliche Positionen des Enzyms.^[38] So überlappt der endständige Ring von Flurbiprofen mit dem Bromphenylring von SC-558, und der Pyrazolring von SC-558 liegt über dem Fluorphenylring von Flurbiprofen. Der endständige Phenylring von Flurbiprofen besetzt einen ähnlichen Bereich wie der Benzoylring von Indometacin, und ihre Carboxylatsalze binden beide an Arg120. Dennoch bindet der Carboxylatrest von Flurbiprofen in demselben Hohlraum wie die hydrophobe Trifluormethylgruppe von SC-558! Der Phenylsulfonamidsubstituent von SC-558, der so wichtig für die Selektivität von COX-2 ist, hat



einen von hydrophoben Resten umgebenen Phenylring, und der Sulfonamidrest ragt in eine relativ polare Region nahe der Enzymoberfläche.

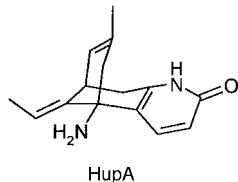
Ein Vergleich der Strukturen des freien Enzyms und des Enzyms im Komplex bestätigt die Konformationsänderungen, die bei der Bindung des Liganden auftreten und von denen viele anhand der Enzymstruktur erklärbar sind. Kinetische Untersuchungen zur geringen Bindungsgeschwindigkeit von Inhibitoren wie Indomethacin haben ergeben, daß große Konformationsänderungen mit der Bindung der Liganden einhergehen. Viele Programme für die Wirkstoffentwicklung

konzentrieren sich eher auf die Selektivität zwischen verwandten Rezeptoren als auf die Wirkung an sich. So wird die Forderung an das rationale Wirkstoffdesign immer wichtiger, Liganden zu erzeugen, die bevorzugt nur an eine bestimmte Bindungsstelle und nicht an eine strukturell ähnliche Stelle binden.



3. Fehler bei der Voraussage der Bindungsorientierung

Es gibt viele Beispiele dafür, daß die Überbewertung der Rolle polarer Bindungsstellen bei potentiellen Liganden zu einer falschen Voraussage für die Bindungsorientierung führt. Versucht man die Orientierung von bekannten Liganden zu einem Rezeptor ohne experimentelle Beobachtungen vorauszusagen, so ist die relative Bedeutung von hydrophoben und polaren Wechselwirkungen besonders wichtig. Schwächen der Computerprogramme beim Umgang mit Konformationsänderungen des Rezeptors und die Vernachlässigung von hydrophoben Wechselwirkungen in den verfügbaren Kraftfeldern können zu wenig glaubwürdigen Ergebnissen führen. Die Literatur ist mit Beispielen übersät, bei denen solche Schwierigkeiten aufraten.



(-)-Huperazin (HupA) ist ein wirksamer Inhibitor ($K_i = 6 \text{ nM}$) für Acetylcholinesterase (AChE). Unter Berücksichtigung seiner pharmakophoren Gruppen ergab sich eine parallele Anordnung von HupA zum Acetylcholin-Molekül als plausible Orientierung.^[39] Die

nachfolgende Strukturbestimmung ergab, daß HupA in der Furche des aktiven Zentrums senkrecht zur erwarteten Orientierung ausgerichtet war, und von drei möglichen Wasserstoffbrückenbindungen wurde nur eine gefunden. Die Bindung von HupA an AChE erfolgt über Wechselwirkungen zwischen der geladenen Aminogruppe und den aromatischen Ringen von Trp84 und Phe330 sowie mehrere hydrophobe Kontakte zu Trp84, His440 und den Resten Gly118 bis Ser122. Beim Vergleich mit der ursprünglichen, nicht gebundenen AChE werden Konformationsänderungen in den Seitenketten einiger dieser aromatischen Reste aufgedeckt, besonders bei Trp84 und Phe330. Interessanterweise fehlen HupA potentiell erschwerende, muscarinische Effekte, was zeigt, wie hydrophobe Wechselwirkungen für die Rezeptorselektivität genutzt werden können.

1997 wurde über die Bedeutung der Induzierung einer Konformation für die Signaltransduktion berichtet.^[40] 17 β -Östradiol und der Östrogen-Antagonist Raloxifen binden an dieselbe Bindungsstelle, aber auf unterschiedliche Weise (Abbildung 7). Es werden deutlich verschiedene Rezeptorkonformationen induziert, die einen Anhaltspunkt für den Wirkungsmechanismus des Antagonisten liefern. Man ist versucht, die phenolische Hydroxygruppe des A-Rings von Östradiol mit der OH-Gruppe in Position 6 des Benzothiophenrings in Übereinstimmung zu bringen und die Hydroxygruppe in Position 17 von Östradiol auf die Hydroxygruppe des 2-Phenylsubstituenten am Benzothiophenring. Ein Ver-

gleich der beiden Komplexe ergibt, daß die letzten beiden Hydroxygruppen aber um 5.1 Å gegeneinander versetzt sind. Raloxifen geht mit dem C3-Substituenten zahlreiche hydrophobe Kontakte sowie eine Wasserstoffbrückenbindung über das Piperidinstickstoffatom zu Asp351 ein. Die Helix 12 wird verschoben und die Transaktivierung von Genen durch den Steroidkomplex unterbrochen.

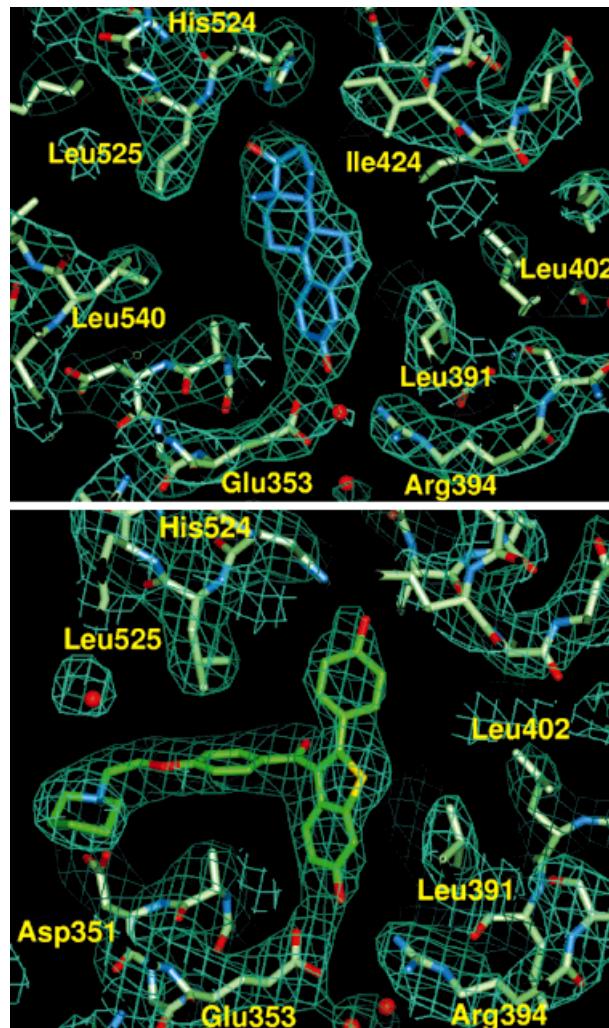
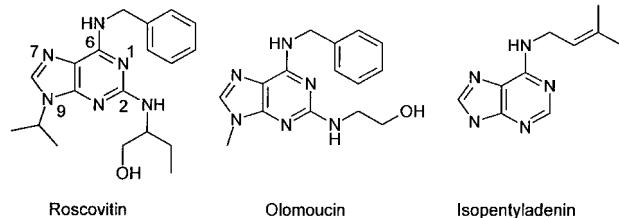


Abbildung 7. Östrogen in der Bindungsdomäne des Östrogenrezeptors (oben) und induzierte Anpassung bei der Bindung von Raloxifen (unten). Diese Abbildung wurde mit freundlicher Genehmigung von Pike und Hubbard et al. angefertigt.^[40]

Die ATP-Rezeptoren von Kinasen bieten ein hervorragendes Beispiel dafür, wie mehrere auf den ersten Blick ähnliche Moleküle an die Adeninbindungsstelle in völlig unterschiedlichen Orientierungen binden. Bei der Bindung von Rosco-

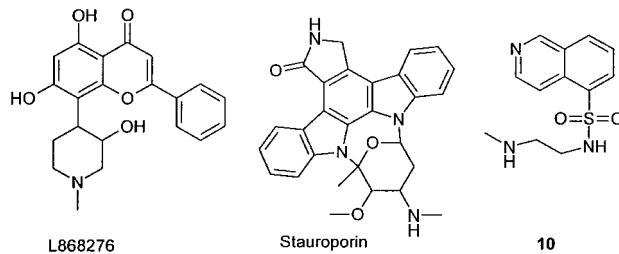
vitin ist der Purinring genau umgedreht im Vergleich zu dem im ATP-Komplex;^[41] N7 befindet sich in der Nähe der Stelle, an der N1 im ATP-Komplex liegt. Der Substituent an C2



befindet sich in der „Ribosetasche“. Zu den Wechselwirkungen zwischen Roscovitin und der Kinase gehören umfangreiche hydrophobe Wechselwirkungen, wobei Kontakte zu Ile10, Leu83 und Leu134 dominieren. Die N⁶-Benzylgruppe geht hydrophobe Kontakte mit Ile10, Phe82 und His84 ein. Beim Vergleich der beiden Komplexe lassen sich Unterschiede in der induzierten Anpassung erkennen, die für den Liganden spezifisch sind, z.B. eine Umorientierung des His84-Restes. Die Umorientierung des Purinrings führt zu Ergebnissen, die ohne die experimentelle Strukturbestimmung recht erstaunlich wären. So führt z.B. die Substitution an N9, an dem sich bei ATP der Ribosephosphatteil befindet, durch hydrophobe Reste zu den aktivsten Verbindungen. Olomoucin bindet in einer sehr ähnlichen Orientierung wie Roscovitin.^[42] Die Seitenkette von Ile10 ist um 120° gegenüber der Orientierung der Seitenkette im ATP-Komplex gedreht. Beim Inhibitor Isopentyladenin^[41] wird noch ein anderer Bindungsmodus deutlich, bei dem der Purinring um 180° um die Achse durch N3 und N7 gedreht ist und der Substituent an N⁶ die Ribosetasche besetzt.

Die Flexibilität der Kinasen und die Dominanz der hydrophoben Wechselwirkungen in der Adenintasche wirken möglicherweise zusammen, um eine anpassungsfähige Bindungsstelle zu erzeugen. Diese akzeptiert eine Reihe von planaren Heterocyclen, von denen viele durch Hochdurchsatz-Screening entdeckt wurden.

Die Bindung von L868276 an die Adenintasche von CDK2 erfolgt über den Benzopyranring.^[43] Das bicyclische Ring-System befindet sich in derselben Ebene wie das Adenin im ATP-Komplex, ist aber im Vergleich dazu um 60° gedreht. Bei der Bindung von L868276 kann man signifikante Verschiebungen bei den Seitenketten beobachten, wobei sich Asp145 und Lys89 von der Tasche weg bewegen und Ala144 näher an sie heranrückt. Viele Kontakte zum Phenylsubstituenten werden deutlich, und man kann sich deren mögliche Bedeutung für die Selektivität vorstellen.



Stauroporin verwendet seinen Indolylcarbazolrest im Komplex mit cAPK^[44] und CDK2.^[45] Die Positionen von nahezu

allen Resten, mit denen Stauroporin in seinem Komplex mit cAPK interagiert, werden verändert, um sich dem gegenüber ATP deutlich größeren Liganden anzupassen. Es gibt kein Äquivalent für die Wasserstoffbrückenbindung zwischen Thr183 und N7 von ATP im Stauroporin-Komplex, und die Seitenkette von Phe327 ist gedreht, um eine günstige π - π -Wechselwirkung mit einem der Indolringe einzugehen. Im Stauroporin-CDK2-Komplex ist die Seitenkette von Gln131 von der Bindungstasche weggerückt. Im Komplex von **10** mit cAPK^[46] befindet sich der Isochinolinrest in der Purintasche mit einer im Vergleich zum ATP-Komplex erhöhten Zahl an hydrophoben Kontakten zu den Resten Ala70, Tyr122, Val123, Leu173 und Phe327. Nur eine Gruppe, die als Wasserstoffacceptor dient und zu N1 von ATP äquivalent ist, bleibt bei allen bisher bestimmten Inhibitor-Kinase-Komplexen erhalten. Die vorhandene Flexibilität des Rezeptors und die anpassungsfähige lipophile Bindungstasche räumen zusammen die anfänglichen Vorbehalte aus dem Weg, die gemeinsame ATP-Bindungsstelle in Kinasen sei kein guter Angriffspunkt für die Entwicklung von selektiven Inhibitoren.

4. Strukturbezogenes Design und Wirkstoff-Rezeptor-Wechselwirkungen

Das strukturbezogene Design spielt heute in der medizinischen Chemie eine wichtige Rolle. Die Identifizierung von Pharmakophoren für eine Datenbankrecherche oder für das Design der Liganden sowie die Verwendung von experimentell erhaltenen oder homolog aufgebauten Rezeptoren in Docking-Studien und bei Datenbankrecherchen sind nur zwei Beispiele. Durch Molecular-Modeling-Experten, medizinische Chemiker und viele Docking-Progammre wurde bisher ein Schwerpunkt auf das Ausrichten von funktionellen Gruppen für Wasserstoffbrückenbindungen und ihre Richtungsabhängigkeit beim Erkennen von Pharmakophoren gelegt.^[47, 48] Obwohl viele erfolgreiche Validierungen und Anwendungen für das Andocken in der Literatur zu finden sind,^[47-51] lassen neuere Arbeiten darauf schließen, daß die Parametrisierung einiger Kraftfelder stärker auf die Hydrophobie statt auf Wasserstoffbrückenbindungen ausgerichtet werden muß.^[47, 52, 53] Heute ist anscheinend der rechnerische Aufwand, um die Solvatisierung angemessen zu erfassen, das Hauptproblem für die korrekte Behandlung der hydrophoben Wechselwirkungen bei Verwendung dieser Kraftfelder. Die größte Validierung, die bis jetzt für ein Docking-Programm durchgeführt wurde, war die für das Programm GOLD.^[47] In dieser Studie wurden Voraussagen zur Bindungsgeometrie für das „Zurückdicken“ von 100 Liganden, die von ihren jeweiligen Proteinen entfernt worden waren, im Detail mit den Strukturdaten aus der Brookhaven-Datenbank abgeglichen. Das Programm konnte 71 % der untersuchten Liganden in guter Übereinstimmung mit den Ergebnissen aus der Datenbank einpassen. Die Analyse der gut und nicht gut übereinstimmenden Datensätze machte die Schwierigkeiten deutlich, mit denen man bei vielen Docking-Programmen konfrontiert ist. Das Programm war beim Modellieren des Andockens polarer Liganden erfolgreich und versagte leicht bei hydrophoberen (wirkstoffähnlichen) Liganden. Es lieferte

die besten Ergebnisse, wenn der Ligand durch etliche Wasserstoffbrückenbindungen an die Rezeptorstelle gebunden war. Obwohl GOLD eine vollständige Flexibilität der Liganden berücksichtigt, wird für den Rezeptor nur eine sehr begrenzte Flexibilität zugelassen (Drehung um die endständigen Bindungen, z. B. die Drehung einer Hydroxygruppe, um eine Wasserstoffbrückenbindung zu optimieren). Eine solche Studie läßt leicht solche Beispiele außer acht, bei denen sich die Struktur des Apo-Rezeptors stark von der des Rezeptors im Komplex unterscheidet. Einige der in diesem Aufsatz genannten Beispiele dürften es in Zukunft erschweren, die häufige Annahme zu akzeptieren, jede signifikante induzierte Anpassung des Proteins bei der Bindung des Liganden sei wahrscheinlich konstant bei einem gegebenen Satz ähnlicher Liganden. Bei der Weiterentwicklung des Programms GRID,^[54] das kleine molekulare Sonden verwendet, um die Bindungsstellen in den Proteinstrukturen zu identifizieren, hat man versucht, diese Probleme durch Einbeziehung einer empirischen hydrophoben Sonde (DRY-Sonde) anzugehen. Diese wird neben den anderen molekularen Sonden für die Wasserstoffbrückenbindung, ionische Wechselwirkungen und Dipolwechselwirkungen verwendet. Es ist von großer Bedeutung, daß die neueste Version von GRID auch eine vollständige Flexibilität der Rezeptorseitenketten zuläßt.^[55] Dies ist ein großer Schritt nach vorn, um Probleme der hier beschriebenen Art zu lösen. Wie erfolgreich dieser Ansatz sein wird, muß sich noch zeigen.

Die in diesem Aufsatz aufgeführten Beispiele lassen erkennen, wie wichtig die induzierte Anpassung für die Wirkstoff-Protein-Wechselwirkungen ist. Die induzierte Anpassung scheint oftmals durch hydrophobe Wechselwirkungen ausgelöst zu werden und kann als „Zusammenklappen“ des Rezeptors um den Liganden betrachtet werden. Die Flexibilität äußert sich nicht immer durch Drehungen in der Bindungsdomäne, sondern manchmal auch durch geringfügige Anpassungen von Positionen spezifischer Reste, um sperrige Liganden unterzubringen und hydrophobe Kontakte herzustellen. Die Veränderungen sind nicht immer durch die Bestimmung der Proteinkonformation (durch Circular dichroismus-Spektroskopie) ersichtlich, sondern sie ergeben sich manchmal aus kinetischen Messungen zum Zeitverlauf der Inhibition. Es könnte hilfreich sein, wenn solche Untersuchungen zum zeitlichen Verlauf in Verbindung mit Modeling-Studien durchgeführt würden. Sie könnten sogar zur Selektion solcher Fälle genutzt werden, die effektiv modelliert werden können. Verschiedene Methoden stehen zur Verfügung, um bewegliche Segmente von Proteinen zu identifizieren, z. B. Bestimmung der *B*-Faktoren und NMR-Relaxationszeitmessungen.^[56] Es wäre möglich, daß diese die Grundlage für die Einführung einer Strategie der begrenzten molekularen Dynamik in das Schema einer Wirkstoffentwicklung bilden. Solch eine Strategie könnte auf hydrophobe Schnittstellen zwischen beweglichen Proteinteilen ausgerichtet sein. Dabei sollte man aber zwischen der Beweglichkeit einer Proteinschleife in ihrer nativen Form und ihrer absoluten Fähigkeit unterscheiden, mehr als eine Konformation anzunehmen.^[57] Im gebundenen Zustand kann die Konformation möglicherweise sowohl thermodynamisch als auch kinetisch nur in Gegenwart des Liganden angenommen werden.

Folglich kann die induzierte Anpassung einen produktiven Modus ermöglichen ohne den Entropieaufwand für die Immobilisierung einer flexiblen Schleife.

Man sollte sich auch in Erinnerung rufen, daß die beobachtete Bindungsaffinität eine Funktion der Stabilität des Gesamtkomplexes gegenüber dem freien Liganden und dem Apo-Rezeptor ist. So kann die Bildung von neuen Bindungen zwischen den Aminosäuren des Rezeptors bei der Bindung des Liganden einen wesentlichen Effekt haben, wie es kürzlich bei Dihydropyran-carboxamiden, die Derivate von Zanamivir sind, beobachtet wurde.^[58]

5. Wirkstoffentwicklung und die Balance der interaktiven Kräfte

Das Wissen über die relative Bedeutung der Lipophilie und der induzierten Anpassung im Vergleich zu der von Wasserstoffbrückenbindungen könnte eine neue Denkweise in der Wirkstoffentwicklung zur Folge haben. Eine Möglichkeit besteht darin, daß medizinische Chemiker bei der Suche nach einer gesteigerten Wirkung und Spezifität nicht unbedingt die Funktionalitäten und Richtungsabhängigkeit von Wasserstoffbrückenbindungen beibehalten oder einfügen, sondern *spezifische* hydrophobe Wechselwirkungen maximieren. Wenn die anfänglichen Liganden recht polare Moleküle sind, kann die Wegnahme von Wasserstoffbrückenbindungen bildenden Gruppen viele günstige Effekte haben. Sialinsäure, NADPH, ATP und die meisten peptidischen Inhibitoren fallen in diese Klasse. Bei diesen besteht eine Neigung zu schlechter Resorption und zu schneller Ausscheidung. Die Einführung von lipophilen Gruppen führt häufig zu einer erhöhten Wirksamkeit, zur Entfernung von Gruppen für die Biokonjugation und zur Erhöhung der Halbwertszeit im Plasma (aufgrund einer besseren Verteilung). Manchmal ist der Weg zu einem geeigneten Wirkstoff ausgehend von einer polaren Verbindung sehr lang; viele Firmen sind z. B. zu Thrombin und Renin zurückgekehrt und haben Ausgangsverbindungen verwendet, die durch das Hochdurchsatz-Screening erzeugt wurden, um dieses Problem anzugehen. Verbindungen, die durch das Screening erhalten werden, konfrontieren den medizinischen Chemiker oftmals mit dem entgegengesetzten Problem, der Einführung von polaren Gruppen in recht lipophile Moleküle. Wenn polare Gruppen dort eingeführt werden, wo sie vom Rezeptor toleriert werden, ist es wichtig, ob eine Affinitätssteigerung resultiert oder nicht. Bei dieser üblichen, medizinisch-chemischen Optimierung ist das Ziel häufig, molekulare Modifikationen zu finden, die den gesamten $\lg P$ -Wert einer Verbindungsserie verringern, während die wichtigen hydrophoben Muster erhalten bleiben (P = Verteilungskoeffizient). So kann z. B. die Einführung eines aliphatischen Ethers in einen potentiellen Wirkstoff an Stelle einer Methylengruppe mehrere Auswirkungen haben: Die Wirksamkeit kann fast gar nicht oder bis zum 15fachen verändert werden, wenn der Ether als Acceptor für einen neutralen Donor im Rezeptor fungieren kann. Die Substitution würde aber den $\lg P$ -Wert um $\Delta(\lg P) = -2$ verringern, die Löslichkeit um das 100fache steigern (folglich die Absorption verbessern) und den Meta-

bolismus des Wirkstoffs sowie die pharmakodynamischen Eigenschaften verbessern. Interessanterweise können die derzeit gebräuchlichen Molecular-Modeling-Programme die Bindung von polaren Molekülen besser vorhersagen als die von Verbindungen mit einer Balance zwischen polaren und lipophilen Wechselwirkungen wie bei Wirkstoffen.^[47] Die Balance dieser Eigenschaften ist wichtig für die Wirkstoffentwicklung. Eine feste Bindung des Wirkstoffs an den Rezeptor wird durch polare Wechselwirkungen erreicht und vor allem durch die Optimierung von spezifischen hydrophoben Wechselwirkungen. Die Eigenschaften der Wirkstoffe, die die Löslichkeit, die Absorption, den Metabolismus und die pharmakokinetischen Eigenschaften steuern, werden hauptsächlich durch Verwendung polarer Gruppen erreicht, zusammen mit der Lipophilie, die für die Verteilung in den Lipid-Doppelschichten notwendig ist. Bei der Firma Pfizer^[59] aufgestellte Regeln ($M_r < 500$, $\lg P < 5$, $\Sigma(\text{Donoren}) < 5$, $\Sigma(\text{N,O}) < 10$) drücken auf elegante Weise aus, wie die Steuerung der Zahl der Wasserstoffbrückenacceptoren und -donoren mit der Notwendigkeit, den gesamten $\lg P$ -Wert zu begrenzen, zusammenspielt, um eine Aktivität bei oraler Aufnahme über den üblichen, passiven Mechanismus zu erreichen.

6. Zusammenfassung und Ausblick

Der Beitrag der Wasserstoffbrückenbindungen zu Wirkstoff-Rezeptor-Wechselwirkungen ist sehr schwer vorherzusagen. Ladungsverstärkte Wasserstoffbrückenbindungen können eine bis zu 3000fache Affinitätssteigerung ausmachen, neutrale Wasserstoffbrückenbindungen gar keine oder eine bis zu 15fache. Wasserstoffbrückenbindungen können in Wirkstoff-Rezeptor-Komplexen identifiziert und leicht beschrieben werden, was dazu führen kann, daß ihre Bedeutung im Verhältnis zu anderen Bindungswechselwirkungen überbewertet wird. Allein das Identifizieren einer Wasserstoffbrückenbindung sagt noch nichts über ihren Anteil zur Substratbindung aus. Hydrophobe Wechselwirkungen führen mindestens zu einer 3.2fachen Bindungsverstärkung pro Methylgruppe. Sie spielen eine große Rolle für die Affinität der meisten Wirkstoffe gegenüber ihren Rezeptoren. Dies wird aus der Zahl der hydrophoben Gruppen im Verhältnis zu der der Acceptoren und Donoren in oral zu verabreichenden Arzneimitteln deutlich (siehe Physicians Desk Reference^[17]). Hydrophobe Wechselwirkungen scheinen die Haupttriebkraft für die induzierte Anpassung von Rezeptoren an ihre Wirkstoffe zu sein. Das Scheitern der Hypothese vom starren Rezeptor kann auch mit dem „Zusammenklappen“ des Rezeptors um einen Wirkstoff beschrieben werden. Eine gesteigerte Affinität der Liganden kann manchmal unter Nutzung hydrophober Wechselwirkungen und induzierter Anpassung sogar auf Kosten von Wasserstoffbrückenbindungen erreicht werden. Die induzierte Anpassung kann es ermöglichen, daß günstige hydrophobe Wechselwirkungen bei Wirkstoffen mit unterschiedlicher Gestalt an derselben Bindungstasche eines Rezeptors auftreten. Die derzeit gängigen Molecular-Modeling-Programme arbeiten nur mit einer geringen Balance zwischen Wasserstoffbrückenbindungen

und lipophilen Wechselwirkungen und berücksichtigen Veränderungen in der Rezeptorstruktur nicht in ausreichendem Maße. Die Nutzung spezifischer hydrophober Wechselwirkungen kann eine sehr wirksame Methode zur Affinitäts- und Selektivitätssteigerung gegenüber einem Rezeptor sein. Die hier beschriebenen Beobachtungen liefern ebenso überzeugende Argumente dafür, daß in der Wirkstoffentwicklung neben dem rationalen Design auch die physikochemischen Eigenschaften – und Glück – weiterhin eine Rolle spielen.

Eingegangen am 23. Juni 1998 [A 287]
International Edition: *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, *38*, 736–749
Übersetzt von Dr. Karin Gumbiowski, Wallenhorst

- [1] J. D. Watson, F. H. C. Crick, *Nature* **1953**, *171*, 737.
- [2] P. R. Andrews, D. J. Craik, J. L. Martin, *J. Med. Chem.* **1984**, *27*, 1648–1657.
- [3] H.-J. Böhm, *J. Comput.-Aided Mol. Design* **1994**, *8*, 243–256.
- [4] M. H. Abraham, P. P. Duce, D. V. Prior, D. G. Barratt, J. J. Morris, P. J. Taylor, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2* **1989**, 1355–1375.
- [5] A. P. Bisson, C. A. Hunter, J. C. Morales, K. Young, *Chem. Eur. J.* **1998**, *4*, 845–851.
- [6] A. R. Fersht, J.-P. Shi, J. Knill-Jones, D. M. Lowe, A. J. Wilkinson, D. M. Blow, P. Brick, P. Carter, M. M. Y. Waye, G. Winter, *Nature* **1985**, *314*, 235–238.
- [7] D. H. Williams, M. S. Searle, J. P. Mackay, U. Gerhard, R. A. Maplestone, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1993**, *90*, 1172–1178.
- [8] I. P. Street, C. R. Armstrong, S. G. Withers, *Biochemistry* **1986**, *25*, 6021–6027.
- [9] P. A. Bartlett, C. K. Marlowe, *Science* **1987**, *235*, 569–571.
- [10] U. Obst, D. W. Banner, L. Weber, F. Diederich, *Chem. Biol.* **1997**, *4*, 287–295.
- [11] B. P. Morgan, J. M. Sholtz, M. D. Ballinger, I. D. Zipkin, P. A. Bartlett, *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 297–307.
- [12] D. H. Williams, M. S. Westwell, *Chem. Soc. Rev.* **1998**, *27*, 57–63.
- [13] S. K. Holmgren, K. M. Taylor, L. E. Bretscher, R. T. Raines, *Nature* **1998**, *392*, 666–667.
- [14] a) C. Hansch, *Acc. Chem. Res.* **1993**, *26*, 147–153; b) C. Hansch, D. Hoekman, H. Gao, *Chem. Rev.* **1996**, *96*, 1045–1075.
- [15] C. Tanford in *The Hydrophobic Effect*, 2. Aufl., Wiley, New York, **1980**.
- [16] a) V. N. Dorovska, S. D. Varfolomeev, N. F. Kazanskaya, A. A. Klesov, K. Martinek, *FEBS Lett.* **1972**, *23*, 122–124; b) A. R. Fersht, J. S. Shindler, W.-C. Tsui, *Biochemistry* **1980**, *19*, 5520–5524.
- [17] Physicians Desk Reference, Medical Ergonomics Data Production Company, Montvale, NJ, USA, **1995**.
- [18] H.-J. Böhm, G. Klebe, *Angew. Chem.* **1996**, *108*, 2750–2778; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1996**, *35*, 2588–2614.
- [19] S. Moran, R. X.-F. Ren, S. Rumney IV, E. T. Kool, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 2056–2057.
- [20] C. U. Kim, W. Lew, M. A. Williams, H. Liu, L. Zhang, S. Swaminathan, N. Bischofberger, M. S. Chen, D. B. Mendel, C. Y. Tai, W. G. Laver, R. C. Stevens, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 681–690.
- [21] N. Yao, S. Trakhanov, F. A. Quiocco, *Biochemistry* **1994**, *33*, 4769–4779.
- [22] L. Tong, S. Pav, S. Mui, D. Lamarre, C. Yoakim, P. Beaulieu, P. C. Anderson, *Structure* **1995**, *3*, 33–40.
- [23] A. Weichsel, W. R. Montfort, *Nat. Struct. Biol.* **1995**, *2*, 1095–1101.
- [24] A. Rockwell, M. Melden, R. A. Copeland, K. Hardman, C. P. Decicco, W. F. DeGrado, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 10337–10338.
- [25] D. J. Sall, J. A. Bastian, S. L. Briggs, J. A. Buben, N. Y. Chirgadze, D. K. Clawson, M. L. Denney, D. D. Giera, D. S. Gifford-Moore, R. W. Harper, K. L. Hauser, V. J. Klimkowski, T. J. Kohn, H.-S. Lin, J. R. McCowan, A. D. Palkowitz, G. F. Smith, K. Takeuchi, K. J. Thrasher, J. M. Tinsley, B. G. Utterback, S.-C. B. Yan, M. Zhang, *J. Med. Chem.* **1997**, *40*, 3489–3493.
- [26] D. Banner, J. Ackermann, A. Gast, K. Gubernator, P. Hadvary, K. Hilpert, L. Labler, K. Müller, G. Schmid, T. Tschopp, H. Van de Wa-

- terbeemd, B. Wirz in *Perspectives in Medicinal Chemistry*, VHCA, Basel, **1993**, S. 27–43.
- [27] R. A. Engh, H. Brandstetter, G. Sucher, A. Eichinger, U. Baumann, W. Bode, R. Huber, T. Poll, R. Rudolph, W. von der Saal, *Structure* **1996**, *4*, 1353–1362.
- [28] P. D. Jeffery, R. K. Strong, L. C. Sieker, C.-Y. Y. Chang, R. L. Campbell, G. A. Petsko, E. Haber, M. N. Margolies, S. Sheriff, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1993**, *90*, 10310–10314.
- [29] M. Vandonselaar, R. A. Hickie, J. W. Quail, L. T. J. Delbaere, *Nat. Struct. Biol.* **1994**, *1*, 795–801.
- [30] S. E. Zographos, N. G. Oikonomakos, K. E. Tsitsanou, D. D. Leonidas, E. D. Chrysina, V. T. Skamnaki, H. Bischoff, S. Goldmann, K. A. Watson, L. N. Johnson, *Structure* **1997**, *5*, 1413–1425.
- [31] H. P. Märki, W. Fischli, A. Binggeli, V. Breu, D. Bur, J. P. Clozel, A. D'Arcy, F. Grüninger, R. Güller, G. Hirth, T. Lave, S. Mathews, M. Müller, C. Oefner, H. Stadler, E. Vieira, M. Wilhelm, W. Wostl, *9th RSC-SCI Medicinal Chemistry Symposium*, Cambridge, Großbritannien, **1997**.
- [32] D. K. Wilson, I. Tarle, J. M. Petrush, F. A. Quiocho, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1993**, *90*, 9847–9851.
- [33] J. D. Dunitz, *Science* **1994**, *264*, 670.
- [34] A. Urzhumtsev, F. Tête-Favier, A. Mitschler, J. Barbanton, P. Barth, L. Urzhumtseva, J.-F. Biellmann, A. D. Podjarny, D. Moras, *Structure* **1997**, *5*, 601–612.
- [35] J. H. Hurley, A. M. Dean, *Structure* **1994**, *2*, 1007–1016.
- [36] J. L. Smith, E. J. Zaluzec, J.-P. Wery, L. Niu, R. L. Switzer, H. Zalkin, Y. Satow, *Science* **1994**, *264*, 1427–1433.
- [37] J. Ren, R. Esnouf, E. Garman, D. Somers, C. Ross, I. Kirby, J. Keeling, G. Dardy, Y. Jones, D. Stuart, D. Stammers, *Nat. Struct. Biol.* **1995**, *2*, 293–302.
- [38] R. G. Kurumbail, A. M. Stevens, J. K. Gierse, J. J. McDonald, R. A. Stegeman, J. Y. Pak, D. Gildehaus, J. M. Miyashiro, T. D. Penning, K. Seibert, P. C. Isakson, W. C. Stallings, *Nature* **1996**, *384*, 644–648.
- [39] M. L. Raves, M. Harel, Y.-P. Pang, I. Silman, A. P. Kozikowski, J. L. Sussman, *Nat. Struct. Biol.* **1997**, *4*, 57–63.
- [40] A. M. Brzozowski, A. C. W. Pike, Z. Dauter, R. E. Hubbard, T. Bonn, O. Engström, L. Öhman, G. L. Greene, J.-Å. Gustafsson, M. Carlquist, *Nature* **1997**, *389*, 753–758.
- [41] W. F. De Azevedo, S. Leclerc, L. Meijer, L. Havlicek, M. Strnad, S.-H. Kim, *Eur. J. Biochem.* **1997**, *243*, 518–526.
- [42] U. Schulze-Gahmen, J. Brandsen, H. D. Jones, D. O. Morgan, L. Meijer, J. Vesely, S.-H. Kim, *Proteins: Struct. Funct. Gen.* **1995**, *22*, 278–391.
- [43] W. Filgueira de Azevedo, Jr., H.-J. Müller-Dieckmann, U. Schulze-Gahmen, P. J. Worland, E. Sausville, S.-H. Kim, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1996**, *93*, 2735–2740.
- [44] L. Prade, R. A. Engh, A. Girod, V. Kinzel, R. Huber, D. Bossemeyer, *Structure* **1997**, *5*, 1627–1637.
- [45] A. M. Lawrie, M. E. M. Noble, P. Tunnah, N. R. Brown, L. N. Johnson, J. A. Endicott, *Nat. Struct. Biol.* **1997**, *4*, 796–801.
- [46] R. A. Engh, A. Girod, V. Kinzel, R. Huber, D. Bossemeyer, *J. Biol. Chem.* **1996**, *271*, 26157–26164.
- [47] G. Jones, P. Willett, R. C. Glen, A. R. Leach, R. Taylor, *J. Mol. Biol.* **1997**, *267*, 727–748.
- [48] I. D. Kuntz, J. M. Blaney, S. J. Oatley, R. Langridge, T. E. Ferrin, *J. Mol. Biol.* **1982**, *161*, 269–288.
- [49] M. Rarey, B. Kramer, T. Lengauer, G. Klebe, *J. Mol. Biol.* **1996**, *261*, 470–89.
- [50] W. Welch, J. Ruppert, A. N. Jain, *Chem. Biol.* **1996**, *3*, 449–62.
- [51] S. Makino, I. D. Kuntz, *J. Comput. Chem.* **1997**, *18*, 1812–1825.
- [52] A. Checa, A. R. Ortiz, B. de Pascual-Teresa, F. Gago, *J. Med. Chem.* **1997**, *40*, 4136–4145.
- [53] R. H. Head, M. L. Smythe, T. I. Oprea, C. L. Waller, S. M. Green, G. R. Marshall, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 3959–3969.
- [54] P. J. Goodford, *J. Med. Chem.* **1985**, *28*, 849–57; GRID Version 16, Molecular Discovery Ltd., **1998**.
- [55] P. Goodford in *Rational Molecular Design in Drug Research*, Alfred Benzon Symp. **1998**, *42*, 215–226.
- [56] A. G. Palmer III, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **1997**, *7*, 732–737.
- [57] J. M. Rini, U. Schulze-Gahmen, I. A. Wilson, *Science* **1992**, *255*, 959–965.
- [58] N. R. Taylor, A. Cleasby, O. Singh, T. Skarzynski, A. J. Wonacott, P. W. Smith, S. L. Sollis, P. D. Howes, P. C. Cherry, R. Bethell, P. Colman, J. Varghese, *J. Med. Chem.* **1998**, *41*, 798–807.
- [59] C. A. Lipinski, F. Lombardo, B. W. Dominy, P. J. Feeney, *Adv. Drug. Deliv. Rev.* **1997**, *23*, 3–25.