

sich die Frage, wie groß der Beitrag der einzelnen Enantiomere dazu ist. Entweder ist ein Enantiomer als reiner Ballast anzusehen, da es nicht bindet, oder beide Enantiomere tragen zur Bindung bei, jedoch nicht notwendigerweise in gleichem Ausmaß.^[1-5] Welcher Fall vorliegt, hängt stark von der Art der Wechselwirkung mit dem Protein und von der Bindungsgeometrie der Enantiomere ab. Für die rationale Optimierung eines Wirkstoffes ist entscheidend, wie Stereochemie und biologische Aktivität korreliert sind. Folglich ist die oft langwierige und aufwändige Enantiomerentrennung eine notwendige Voraussetzung für die gezielte Optimierung. Daher besteht Bedarf an einfachen Verfahren, mit denen die unterschiedliche Bindungsaffinität eines Enantiomerenpaares möglichst ohne Trennung des Racemats anhand einfacher Untersuchungen festgestellt werden kann. Ein solches Verfahren stellen wir hier vor.

Die isotherme Titrationskalorimetrie (ITC)^[6,7] eignet sich als vielseitige Methode zur Bestimmung von Dissoziationskonstanten für die Bindung von Liganden an Proteine. Eine gepufferte Lösung des Liganden wird zu der des Zielproteins titriert und die dabei umgesetzte Wärmemenge quantitativ vermessen. Mit steigender Konzentration des Liganden in der Proteinlösung wird das Protein abhängig von der Bindungskonstante zunehmend gesättigt. Der Grad der Sättigung mit dem Liganden spiegelt sich in der Titrationskurve wider, aus deren Verlauf die Bindungskonstante (oder als Kehrwert die Dissoziationskonstante) ermittelt werden kann.

Wir haben eine Serie racemischer Serinprotease-Inhibitoren (**1-7**) auf ihr Bindungsverhalten gegen Trypsin und Thrombin untersucht (Schema 1) und ihre Kristallstrukturen mit den entsprechenden Enzymen bestimmt. Zur Kristallisation wurden Lösungen der Racemate verwendet, dennoch zeigt die Differenzelektronendichte $|F_o| - |F_c|$ deutlich, dass nur ein Enantiomer gebunden wurde, höchstwahrscheinlich das mit der höheren Affinität. In vorangegangenen Untersuchungen war es Obst et al. gelungen,^[8-10] die Enantiomere von **1** zu trennen und ihre Bindungskonstanten durch photometrische Messungen zu bestimmen (Schema 1, Tabel-

Ligand-Protein-Bindung

DOI: 10.1002/ange.200502302

Ein einfaches Verfahren zur Abschätzung von Affinitätsunterschieden bei der Bindung von Enantiomeren an Targetproteine ohne vorherige Trennung der Racemate

Jasmine Fokkens und Gerhard Klebe*

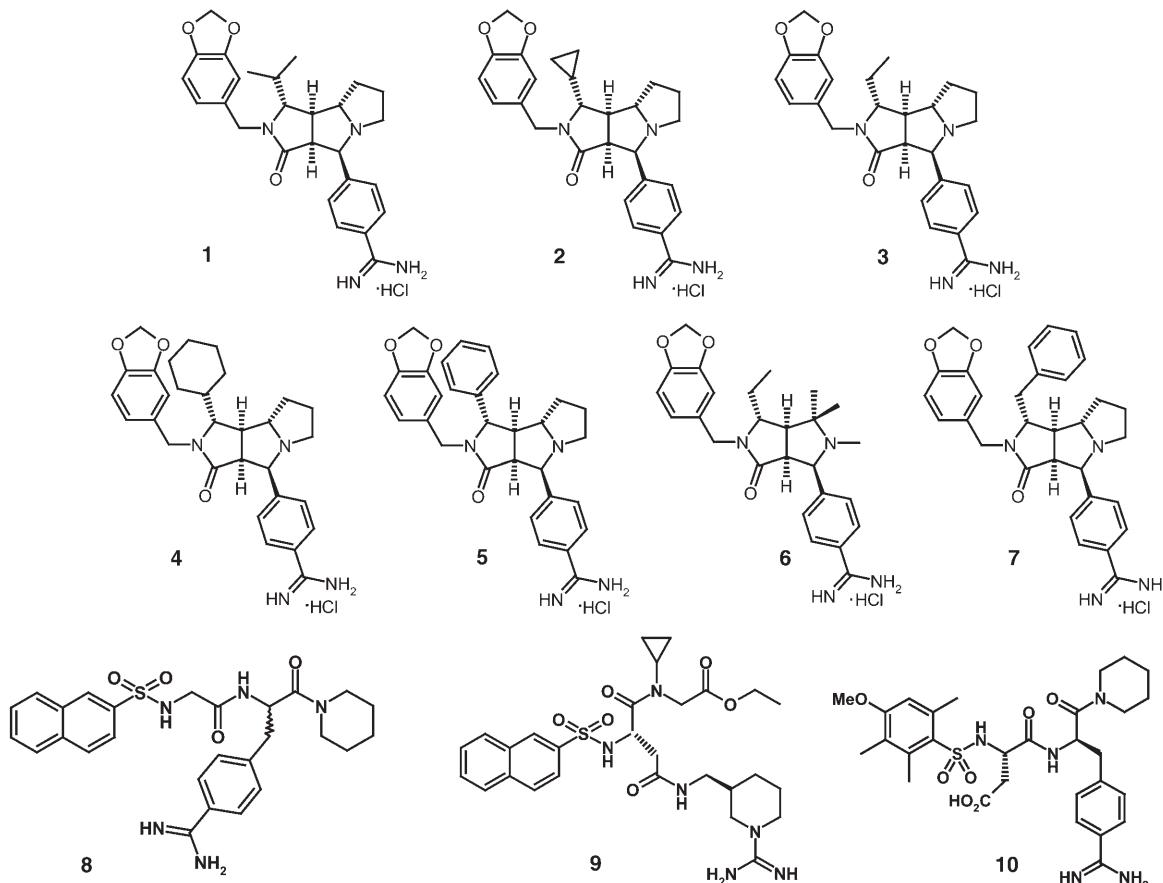
Bei der Suche nach neuen Wirkstoffen werden mögliche Leitstrukturen nach ihrer Synthese zunächst auf Aktivität an einem bestimmten Zielprotein getestet. Eindeutige Ergebnisse liefern nur enantiomerreine Verbindungen. Da aber die Trennung eines Racemats in seine Enantiomere mit erheblichem analytischem Aufwand verbunden ist, wird in ersten Screenings meist darauf verzichtet. Sobald biologische Aktivität eines racemischen Gemischs beobachtet wird, stellt

[*] Dr. J. Fokkens, Prof. G. Klebe
Institut für Pharmazeutische Chemie
Philipps-Universität Marburg
Marbacher Weg 6, 35032 Marburg (Deutschland)
Fax: (+49) 6421-282-8994
E-mail: klebe@mail.uni-marburg.de

Tabelle 1: Bindungskonstanten von **1-10** gegen Trypsin und Thrombin aus photometrischen Messungen.^[a]

Ligand	Bindungskonstante		Selektivität $K_i(\text{Trypsin})/K_i(\text{Thrombin})$
	Trypsin K_i [nM]	Thrombin K_i [nM]	
rac-1	9900	13	760
(+)- 1	5500	7	785
(-)- 1	120000	5600	21
rac-2	2300	10	230
rac-3	1680	8	210
rac-4	4420	1700	2.6
rac-5	5040	1400	3.6
rac-6	7315	95	77
rac-7	7700	1100	7
rac-8	690		
D-8	230		
L-8	35000		
9	30000		
10	400		

[a] $K_i = [\text{Enzym}][\text{Ligand}]/[\text{Enzym-Ligand}]$.



Schema 1. Strukturformeln der mikrokalorimetrisch und kristallographisch untersuchten Ligandenserie **1–7** (gezeigt sind die stärker bindenden Enantiomere). Zusätzlich wurden zur Überprüfung der Methode die Liganden *rac*-Napap (**8**), Napsagatranethylester (**9**) und CRC220 (**10**) verwendet (gezeigt sind ebenfalls die stärker affinen Isomere).

le 1). Interessanterweise bindet (+)-**1** um den Faktor 800 stärker an Thrombin als (–)-**1**, während die Bindungsaffinität von (+)-**1** zu Trypsin nur um den Faktor 22 größer ist als die des Stereoisomers (Tabelle 1). Für alle anderen Derivate der Serie sind nur Daten zur Bindung der Racemate vorhanden. Die Trennung der Enantiomere von *rac*-**1** wurde auf der Stufe eines Zwischenproduktes bei der Synthese durchgeführt und erforderte erheblichen Aufwand.^[8,9]

Im Hinblick auf die Affinitäten von (+)/(-)-**1** ist interessanterweise zu beobachten, dass bei beiden Enzymen nur das potentere (+)-Enantiomer in der Kristallstruktur beobachtet wird. Für die weitere Optimierung wäre es aber wünschenswert, auch die Enantioselektivität der anderen Liganden aus der Serie zu kennen. Dazu wurden ITC-Messungen mit den racemischen Mischungen durchgeführt. In einigen Fällen ergaben sich eindeutig zweistufige Titrationskurven (Abbildung 1). Bei genauerer Betrachtung der übrigen Kurven, die auf den ersten Blick dem typischen Verlauf für die Bindung eines einzelnen Liganden entsprachen, zeigte sich jedoch eine leichte Schulter entweder zu Beginn oder gegen Ende der Titration, was einen zweistufigen Bindungsprozess vermuten lässt. Diese Abweichungen vom einfachen sigmoidalen Kurvenverlauf interpretieren wir als gegenseitige Verdrängung oder kompetitive Bindung beider Enantiomere an das Protein. Der konkrete Verlauf der Titrationskurve

hängt vom Affinitätsunterschied beider Enantiomere zum Rezeptor ab.

Wir gehen von folgendem Modell für die Bindung aus: Das racemische Gemisch wird in die Proteinlösung titriert. Solange noch keine 1:1-Stöchiometrie zwischen Racemat und Protein erreicht ist, findet jedes Molekül des hinzutitrierten Liganden eine unbesetzte Bindungsstelle. Anschließend überlagern sich zwei kompetitive Gleichgewichte, wobei die Geschwindigkeiten der Assoziation und Dissoziation von den Bindungsaffinitäten der beiden Enantiomere zum Protein abhängen. Das stärker bindende Enantiomer bleibt durchschnittlich länger gebunden, das schwächer bindende Enantiomer wird schneller ausgetauscht. Dementsprechend wird die Form der aufgenommenen Titrationskurve zu Beginn des Experiments durch die durchschnittliche Bindungskonstante des Racemats bestimmt, deren Wert die Steigung der Kurve festlegt. Sobald eine 1:1-Stöchiometrie in der Proteinlösung vorhanden ist, ersetzt das stärker bindende Enantiomer schrittweise das schwächer bindende. Dies geschieht solange, bis das gesamte Protein nahezu mit dem stärker bindenden Isomer gesättigt ist und die Titrationskurve einen sigmoidalen Sättigungsverlauf annimmt. Ist der Affinitätsunterschied zwischen beiden Isomeren nicht sehr groß, muss sich das stärker bindende Enantiomer erst in der Lösung anreichern, bevor es das schwächer bindende Enantiomer messbar ver-

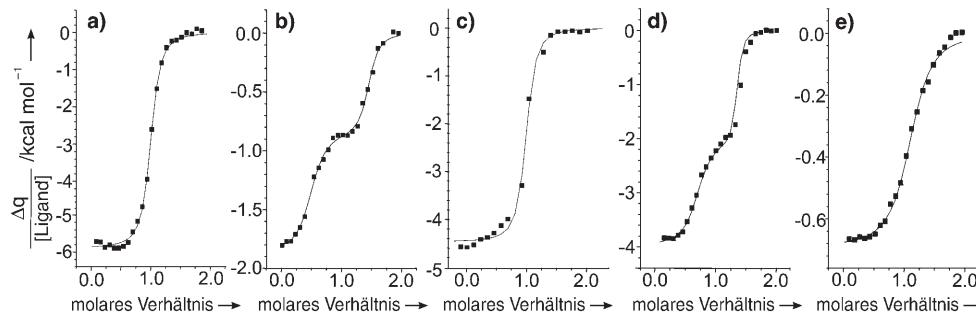


Abbildung 1. Titrationskurven von racemischen und enantiomerenreinen Liganden gegen Trypsin und Thrombin: a) Titration von d-Napap (8) gegen Trypsin; es ergibt sich eine einstufige sigmoidale Kurve, die Titrationskurve des optischen Antipoden hat eine sehr ähnliche Form, lediglich mit geringerer Steigung (hier nicht abgebildet). b) Titration von rac-Napap (8) gegen Trypsin; man erhält eine zweistufige Titrationskurve mit zwei sigmoidalen Hälften. c) Titration von rac-1 gegen Thrombin; die Enantiomere unterscheiden sich in ihrer Affinität um den Faktor 800, daher wird die zweistufige Titrationskurve nur zu Beginn der Messung andeutungsweise beobachtet. d) Titration von rac-2 gegen Thrombin; eine deutlich zweistufige Kurve lässt auf einen Unterschied in der Affinität der Enantiomere zu Thrombin von etwa einem Faktor 100 schließen. e) Titration von rac-1 gegen Trypsin; beide Enantiomere binden um den Faktor 22 unterschiedlich an Trypsin, daher wird nur gegen Ende des Experiments die Andeutung einer zweistufigen Titrationskurve sichtbar.

drängt. Daher flacht in diesem Fall die Titrationskurve in ihrem mittleren Teil etwas ab. Die Form der zweiten Stufe in der Kurve wird hauptsächlich von der Bindungskonstanten des stärker bindenden Enantiomers bestimmt, das das schwächer bindende verdrängt. Dieser Teil der Titration ähnelt dem Fall einer häufig angewendeten Variante, bei der die Affinität eines sehr stark bindenden Liganden ermittelt wird, indem man das Zielprotein zuvor mit einem schwächer bindenden Liganden inkubiert.^[11] Allerdings muss berücksichtigt werden, dass bei unseren Experimenten mit den Racematen auch die Konzentration des schwächer bindenden Liganden während der Titration ständig ansteigt. Es liegt somit eine kompliziertere Überlagerung der Assoziationsgleichgewichte vor.

Um dieses Modell zu überprüfen, führten wir Titrationen mit dem Racemat sowie den getrennten Enantiomeren von Napap (8) gegen Trypsin durch. Entsprechend zuvor veröffentlichter kinetischer Daten unterscheiden sich die beiden Enantiomere um den Faktor 152 in der Bindung an Trypsin (d-Napap: $K_i = 0.23 \mu\text{M}$, L-Napap: $K_i = 35 \mu\text{M}$, rac-Napap: $K_i = 0.69 \mu\text{M}$).^[12,13] Die Titration mit den einzelnen Enantiomeren ergab K_d -Werte ($1/K_i$) für d-Napap von $(43.9 \pm 4.4) \times 10^5 \text{ M}^{-1}$, für L-Napap von $(0.2 \pm 0.1) \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ sowie für rac-Napap von $14.5 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$.

Aus der ITC-Messung mit dem Racemat ergab sich $K_d = (12.4 \pm 2.1) \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ für die erste Stufe und $(40.57 \pm 13.8) \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ für die zweite Stufe.^[14] Dieses Ergebnis stimmt sehr gut überein mit der Annahme, dass die erste Stufe der Titrationskurve die durchschnittliche Bindungskonstante des Racemates annähert, während die zweite Stufe der Bindungskonstanten des stärker bindenden Isomers entspricht. Als weiteres Testsystem wurde von uns eine 1:1-Mischung von enantiomerenreinem Napsagatranelylester (9)^[15] und CRC220 (10)^[16] als Liganden für Trypsin untersucht. Beide unterscheiden sich in ihrer Affinität um den Faktor 75.^[17] Gleichzeitig wurden Messungen mit den einzelnen Komponenten durchgeführt. Wiederum ergab sich bei der Titration

des Gemisches eine zweistufige Titrationskurve, deren getrennte Auswertung für die einzelnen Stufen^[14] eine gute Übereinstimmung mit den Bindungskonstanten des Gemisches und des stärker bindenden Liganden CRC220 zeigte. Für die Ligandenserie 1–7 konnten wir zweistufige Titrationskurven für rac-2, rac-3 und rac-6 bei der Titration gegen Thrombin beobachten. Ist der Kurvenverlauf deutlich in zwei sigmoidale Hälften geteilt, so deutet das auf einen Unterschied in den Bindungskonstanten um den Faktor 50 bis 200 hin.^[18] Bei der Titration von Thrombin mit rac-1 zeigt sich eine leichte Verformung am Beginn der Kurve (Abbildung 1c), was gut mit dem photometrisch gemessenen Unterschied der Bindungskonstanten um den Faktor 800 übereinstimmt.^[10] Die

Titrationskurven für rac-4, rac-5 und rac-7 gegen Thrombin und die für alle Racemate gegen Trypsin deuten gegen Ende geringe Abweichungen vom exakt einstufigen sigmoidalen Verlauf an. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass beide Enantiomere mit ähnlicher Affinität an das Protein binden.

Es stellte sich die Frage, ob diese Beobachtungen anhand der kristallographisch bestimmten Bindungsgeometrien der (+)-Enantiomere an Trypsin und Thrombin gedeutet werden können.^[19] Zunächst soll die Bindung dieser Antipoden diskutiert werden. Alle Liganden unterscheiden sich in der Größe ihrer C1-Substituenten (Schema 1 und Abbildung 2). Diese hydrophobe Gruppe wurde eingeführt, um die S2-Tasche des Thrombins zu besetzen, die räumlich durch die 60er-Schleife begrenzt wird (Abbildung 2b). In Trypsin ist dieser Bereich der Bindetasche frei solvenszugänglich. Daher erhöht eine optimale Ausfüllung der S2-Tasche die Selektivität gegenüber Thrombin. Dieser Effekt ist tatsächlich bei den (+)-Enantiomeren von 1, 2, 3 und 6 zu beobachten, die stärker an Thrombin und schwächer an Trypsin gebunden werden. Noch sperrigere Substituenten an dieser Position, wie bei 4, 5 und 7, wirken sich nachteilig auf die Thrombinbindung aus, da sie offensichtlich weniger gut in die S2-Tasche passen. Die Affinität dieser Liganden gegen Trypsin korreliert dagegen nur geringfügig mit der Gestalt ihrer Substituenten an C1 (Tabelle 1). Dieses kann leicht mit der weit geöffneten, kaum strukturierten Bindetasche des Trypsins in dieser Region erklärt werden (Abbildung 2a).

Interessanterweise binden alle (–)-Enantiomere der vorliegenden Ligandenserie mit ähnlicher Affinität an Trypsin wie ihre optischen Antipoden. Bei der Bindung an Thrombin zeigen auch die schwächer bindenden Liganden (–)-4, (–)-5 und (–)-7 mit einem voluminöseren C1-Substituenten vergleichbare Affinitäten wie ihre (+)-Antipoden. Es weisen also nur bei Thrombin die einzelnen Enantiomere von 1, 2, 3 und 6 einen ausgeprägten Unterschied in ihren Bindungsaffinitäten auf. Durch Modellierung kann gezeigt werden, dass die Inversion der Konfiguration von 1–7 zu einer Geometrie

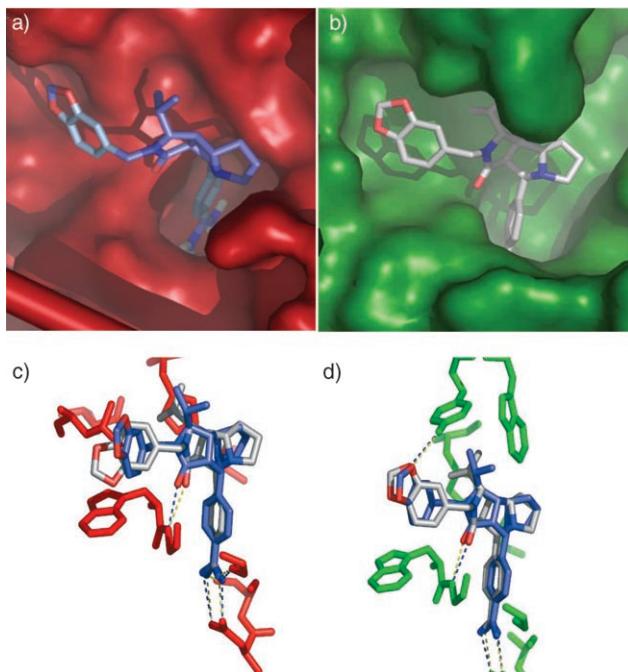


Abbildung 2. Kristallographisch bestimmte oder modellierte Bindungsmodi in Trypsin und Thrombin: a) Struktur von (+)-1 im Komplex mit Trypsin; neben dem Isopropylsubstituenten öffnet sich die S2-Tasche nahezu ungehindert dem Solvens. b) Struktur von (+)-1 im Komplex mit Thrombin;^[10] der Isopropylsubstituent wird mit idealer Passform in der deutlich begrenzten S2-Tasche des Thrombins aufgenommen, die durch Trp 60A und Trp 60D der 60er-Schleife nach oben hin verschlossen wird. c, d) Kristallographisch bestimmter Bindungsmodus von (+)-1 (weiß) und modellierter Bindungsmodus von (-)-1 (blau) in der Bindungsstelle von Trypsin (c) und Thrombin (d). In beiden Enzymen nimmt der invertierte (-)-Ligand eine sehr ähnliche Form an, und es kann ein vergleichbarer Bindungsmodus für beide Enantiomere vermutet werden. Die Isopropylgruppe ist in der offenen S2-Tasche des Trypsins in Richtung des Lösungsmittels orientiert (c). In Thrombin (d) findet die Isopropylgruppe optimale Anpassung an das Protein bei (+)-1 (weiß), während bei dem inversen (-)-1 (blau) die Unterbringung weniger optimal erscheint. Während eine Methylgruppe in der Nähe der S2-Kavität platziert wird, steht die andere Methylgruppe in engem ungünstigem Kontakt mit dem benachbarten Indolring von Trp 60D. Höchstwahrscheinlich ist diese sterische Hinderung der Ligandenbindung abträglich, woraus der Affinitätsverlust um den Faktor 800 im Vergleich zu (+)-1 resultiert.

des Grundgerüstes führt, die leicht in der Bindetasche sowohl von Trypsin als auch Thrombin eingepasst werden kann (Abbildung 2c). Abgesehen vom C1-Substituenten sind die Kontakte beider Enantiomere mit dem Protein vergleichbar. Trypsin hat eine offene Bindetasche in der Nähe des C1-Substituenten, daher treten hier keine Unterschiede in Abhängigkeit von der Orientierung dieses Substituenten auf. Offensichtlich ebenfalls aufgrund schlechter Anpassung führen die sperrigen C1-Substituenten von **4**, **5** und **7** nicht zu einer unterschiedlich starken Thrombinbindung beider Enantiomere. Für die Liganden **1**, **2**, **3** und **6** mit kleineren C1-Substituenten liegt jedoch eine andere Situation vor: Hier tritt eine signifikante Diskriminierung zwischen beiden Enantiomeren auf (ca. Faktor 50–200 für **2**, **3** und **6**; 800 für

1). Diese Tatsache ist höchstwahrscheinlich Folge der vorteilhafteren sterischen Anpassung an die S2-Tasche des Thrombins, wobei die Isopropylgruppe von (+)-**1** eine optimale Füllung der S2-Tasche erreicht. Die Ausrichtung der Isopropylgruppe im invertierten (-)-**1** erweist sich als ungünstiger und wird vom Protein ähnlich wie die sperrigen Reste der (-)-Enantiomere von **4**, **5** und **7** erkannt. Für **2**, **3** und **6** ist der Affinitätsunterschied beider Enantiomere weniger ausgeprägt, vermutlich weil der schlankere Cyclopropylrest von **2** und die konformativ flexiblen Ethylgruppen von **3** und **6** bei den (-)-Derivaten besser vergleichbar zu den Antipoden in die enge S2-Tasche des Thrombins passen (Abbildung 2d).

Die vorgestellten Untersuchungen verweisen auf ein einfaches Verfahren, mit dem die unterschiedliche Bindungsaffinität eines Enantiomerenpaares auch ohne Trennung des Racemats unter Verwendung der isothermen Titrationskalorimetrie abgeschätzt werden kann. Prinzipiell kann jede durch ITC messbare Ligandenbindung mit dem Verfahren ausgewertet werden. Die Empfindlichkeit der ITC hängt stark vom produzierten Wärmesignal ab.^[18] Dieses wird durch den enthalpischen Beitrag zur Bindung, die Löslichkeit der Bindungspartner und die gewählte Messtemperatur beeinflusst. Das Fenster für die Beobachtung einer gut ausgeprägten zweistufigen Titrationskurve liegt bei Affinitätsunterschieden von ca. 50–200. Weisen die Enantiomere einen großen Affinitätsunterschied (≈ 1000 fach) auf, so erscheint eine kleine Schulter am Anfang der sigmoidalen Kurve. Ist der Unterschied nur gering (< 50 fach), wird gegen Ende des Experiments eine Schulter beobachtet. Eine Serie von gleichartigen Liganden, die sich lediglich in der Größe eines Substituenten unterscheiden, wurde untersucht, um zu zeigen, dass die beobachteten Unterschiede im Bindungsverhalten der Enantiomere auf Unterschiede bei der strukturellen Anpassung der Isomere an zwei verwandte Serinproteasen zurückgeführt werden können. So wird deutlich, wie die Diskriminierung von Enantiomeren bestimmt wird, was zur Entwicklung von selektiveren Liganden beitragen kann. Diese Informationen über die Stereochemie sind von herausragender Bedeutung bei der Optimierung eines Liganden während der Wirkstoffentwicklung.

Eingegangen am 1. Juli 2005,
veränderte Fassung am 2. September 2005
Online veröffentlicht am 22. Dezember 2005

Stichwörter: Enantioselektivität · Kalorimetrie · Ligandeneffekte · Proteinstrukturen · Wirkstoff-Design

- [1] A. H. Becket in *Progress in Drug Research*, Vol. 1 (Hrsg.: E. Juaker), Birkhäuser, Basel, **1959**, S. 455–530.
- [2] P. S. Portoghesi, *Annu. Rev. Pharmacol.* **1970**, 10, 51–76.
- [3] M. Simonyi, *Med. Res. Rev.* **1984**, 4, 359–413.
- [4] M. Eichelbaum, B. Testa, A. Somogyi, *Stereochemical Aspects of Drug Action and Disposition*, Springer, Berlin, **2003**.
- [5] G. W. Mellin, M. Katzenstein, *N. Engl. J. Med.* **1962**, 267, 1184–1244.
- [6] G. A. Holdgate, *Biotechniques* **2001**, 31, 164–166.
- [7] L. Indyk, H. F. Fisher, *Methods Enzymol.* **1998**, 295, 350–364.

- [8] U. Obst, P. Betschmann, C. Lerner, P. Seiler, F. Diederich, V. Gramlich, L. Weber, D. Banner, W. P. Schönholzer, *Helv. Chim. Acta* **2000**, *83*, 855–909.
 - [9] U. Obst, ETH-Dissertation Nr.12037, Zürich, **1997**.
 - [10] U. Obst, D. Banner, L. Weber, F. Diederich, *Chem. Biol.* **1997**, *4*, 287–295.
 - [11] B. W. Sigurskjold, *Anal. Biochem.* **2000**, *277*, 260–266.
 - [12] A. Bergner, M. Bauer, H. Brandstetter, J. Stürzebecher, W. Bode, *J. Enzyme Inhib.* **1995**, *9*, 101–111.
 - [13] T. Steinmetzer, A. Schweinitz, S. Künzel, P. Wikström, J. Hauptmann, J. Stürzebecher, *J. Enzyme Inhib.* **2001**, *16*, 241–249.
 - [14] Zur Auswertung der zweistufigen Titrationskurve als zwei getrennt ablaufende einstufige Vorgänge wurde eine künstliche Basislinie durch den mittleren Kurventeil gelegt. Anschließend wurden beide Kurvenhälften getrennt nach dem üblichen Verfahren ausgewertet.
 - [15] K. Hilpert, J. Ackermann, D. W. Banner, A. Gast, K. Guberman, P. Hadvary, L. Labler, K. Müller, G. Schmid, T. B. Thschopp, H. van de Waterbeemd, *J. Med. Chem.* **1994**, *37*, 3889–3901.
 - [16] M. Reers, R. Koschinsky, G. Dickneite, D. Hoffmann, J. Czech, W. Stüber, *J. Enzyme Inhib.* **1995**, *9*, 61–72.
 - [17] F. Dullweber, M. T. Stubbs, J. Stürzebecher, D. Musil, G. Klebe, *J. Mol. Biol.* **2001**, *313*, 593–614.
 - [18] Nach unserer Erfahrung ergeben sich gut aufgelöste zweistufige Titrationskurven bei Unterschieden in K_d von etwa Faktor 50–200. Allerdings muss festgehalten werden, dass die Intensität des beobachteten ITC-Signals durch die aufgenommene oder abgegebene Wärme bestimmt wird, die mit dem enthalpischen Bindungsbeitrag korreliert. Nur wenn beide Enantiomere ein ähnliches Verhältnis von enthalpischem und entropischem Beitrag zur Bindungsaaffinität aufweisen, ist so ein direkter Zusammenhang mit der Bindungskonstanten zu erwarten. Dieses vergleichbare Verhalten beider Enantiomere ist jedoch nicht notwendigerweise gegeben.
 - [19] Die Strukturdaten der diskutierten Kristallstrukturen sind unter den Kennziffern 1Y3U, 1Y3V, 1Y3W, 1Y3X und 1Y3Y bei der Protein Data Bank (PDB) hinterlegt.
-