

Zusammenfassung

Ein zentrales Problem bei der Entwicklung neuer Wirkstoffe ist der Schritt von einer Pharmakophor-Hypothese zu einer geeigneten Leitstruktur. Liegt eine 3D-Rezeptorstruktur vor, werden üblicherweise *in silico docking*-Methoden⁹⁸ verwendet, andernfalls Methoden des *de novo design*¹¹ oder QSAR.⁸⁵

In der vorliegenden Arbeit wurde ein fragmentbasierter Ansatz mit Methoden des *de novo design*, der Pharmakophorsuche und des *docking* entwickelt, um den Prozess der Leitstruktursuche zu unterstützen. Ein besonderer Vorteil der hier entwickelten Methode liegt darin, dass sie auch angewendet werden kann, wenn keine Röntgenkristallstruktur des Rezeptors oder des Rezeptor-Ligand-Komplexes vorliegt. Häufig kann dennoch die Konformation des Liganden im gebundenen Zustand mit Hilfe der *transferred* NOESY-NMR-Spektroskopie, ermittelt werden. Das Bindungsepitop des Liganden kann mit der STD NMR Spektroskopie bestimmt werden. Basierend auf diesen beiden Informationen lässt sich ein ausschließlich Liganden-basiertes Verfahren konzeptionieren.

Aufbauend auf den Arbeiten von Bemis und Murcko²⁵ über die Bausteine heutiger Wirkstoffe wurden neun Ringsysteme und fünf aliphatische Brücken als Grundlage für die Konstruktion von 225 Ring-Brücke-Ring-Systemen (RBR) ausgewählt. Die Verknüpfung erfolgte automatisiert mit Hilfe eines Skriptes in der SYBYL-Skriptsprache SPL. An jedem Ringsystem wurden Ankerpunkte definiert, die für die weitere Verknüpfung dienen können. Information über Atomtypen wurde verworfen und vorerst nur die Geometrien der Gerüste betrachtet, da das erste Ziel die Erzeugung von geometrisch passenden Liganden ist. Um die Flexibilität dieser Moleküle zu berücksichtigen, wurde für jedes der Konformationsraum abgetastet. Hierfür wurde eine systematische Konformationssuche aller Torsionswinkel der Brückenbindungen in 10 Grad-Schritten durchgeführt. Alle so erzeugten 28.2 Millionen Rotamere wurden in einer Datenbank für die Leitstruktursuche abgelegt. Für jede Paarung interessanter Anker-Atome an einem Ring-Brücke-Ring-System wurde berechnet, welchen minimalen und maximalen Abstand diese beiden Atome in allen Rotameren dieses Systems einnehmen, deren Energie unterhalb eines Schwellenwertes lag. Hierfür wurde in der Programmiersprache C ein Programm entwickelt. Als günstigster Energieschwellenwert wurde 1 kcal/mol oberhalb der Energie des jeweils energiegünstigsten Rotamers ausgewählt. Für 3515 Paarungen von Ankeratomen an Ring-Brücke-Ring-Systemen wurden die so ermittelten günstigen Abstände in einer Datenbank erfasst. Um einen übersichtlichen Zugriff

auf diese Datenbank zu ermöglichen, wurden verschiedene Zugriffs-Skripte in UNIX-Shell-Skripten und in SPL geschrieben.

Um die Datenbank an einem realen Problem zu testen, wurde die Wechselwirkung zwischen dem menschlichen CD4 und dem GP120 des HIV modelliert. Die hierfür benötigten 3D-Koordinaten der Bindungspartner wurden, aufbauend auf einer von Kwong *et al.* veröffentlichten Röntgenstruktur¹⁸⁸ mit Methoden des *molecular modeling* bestimmt. Informationen über das die Bindung vermittelnde Epitop waren von Wülfken 2001 mit Hilfe der STD-NMR-Spektroskopie⁴² ermittelt worden.³⁴

Als Ankerpunkte der zu modellierenden Wechselwirkung wurde jeweils ein Wasserstoffatom des Lysins₄₂₉ und des Leucins₁₂₅ aus dem GP120 gewählt. Der zwischen diesen beiden Atomen gemessenen Distanz von 11.5 Ångström entsprachen 943 Bausteine aus der Datenbank. Durch eine Energiebewertung mit dem DOCK-Programmpaket²⁰⁶ konnten 283 der *hits* verworfen und für die restlichen 660 *hits* ein *ranking* erstellt werden.

Fünf der bestplatzierten Liganden des ersten *energy ranking* wurden *in silico* chemisch funktionalisiert. Nachdem die jeweils an einer Stelle funktionalisierten Liganden mit DOCK energiebewertet waren, wurden die energiegunstigsten Modifikationen in jeweils einem Molekül zusammengeführt. Diese Moleküle wurden *unconstrained* mit DOCK gegen CD4 gedockt und ihre Energie mit der der unfunktionalisierten *hits* verglichen.

Durch die Einführung funktioneller Gruppen konnten die Bindungsenergien der Liganden um bis zu 10 kcal/mol verbessert werden. Der Ligand mit der günstigsten Bindungsenergie (B2B5T2_L00K01) war hierbei zusammengesetzt aus einem Naphthalin-Ringsystem, das über eine Brücke mit zwei Bindungen mit einem 1H-Pyrrol verknüpft war, das mit einer Ethylaminogruppe funktionalisiert war. Die Bindungsenergie dieses Liganden im betrug im *unconstrained docking* -18 kcal/mol.

Die erzeugten Gerüste konnten erfolgreich so erzeugt und modifiziert werden, dass sie von DOCK so platziert wurden, dass sie in der Pharmakophorregion eine verbesserte Bindungsenergie erreichten.

Um diese sehr viel versprechenden *in silico* prognostizierten Bindungsenergien *in vitro* zu verifizieren und zu neuen, nicht-peptidischen CD4-Liganden zu kommen, werden im Arbeitskreis einige der hier vorgeschlagenen Verbindungen synthetisiert und untersucht werden.

Mit der in dieser Arbeit entwickelten Datenbank konnte erfolgreich ein neues Werkzeug zur *in silico*-Ideengenerierung in der Leitstruktursuche etabliert werden.