

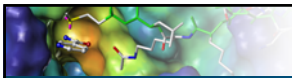


MARTIN-LUTHER-UNIVERSITÄT
HALLE-WITTENBERG



Screening nach neuen Wirkstoffen – was kann man von computer- basierten Methoden erwarten?

Prof. Dr. Wolfgang Sippl
Institut für Pharmazie
Martin-Luther-Universität
Halle-Wittenberg



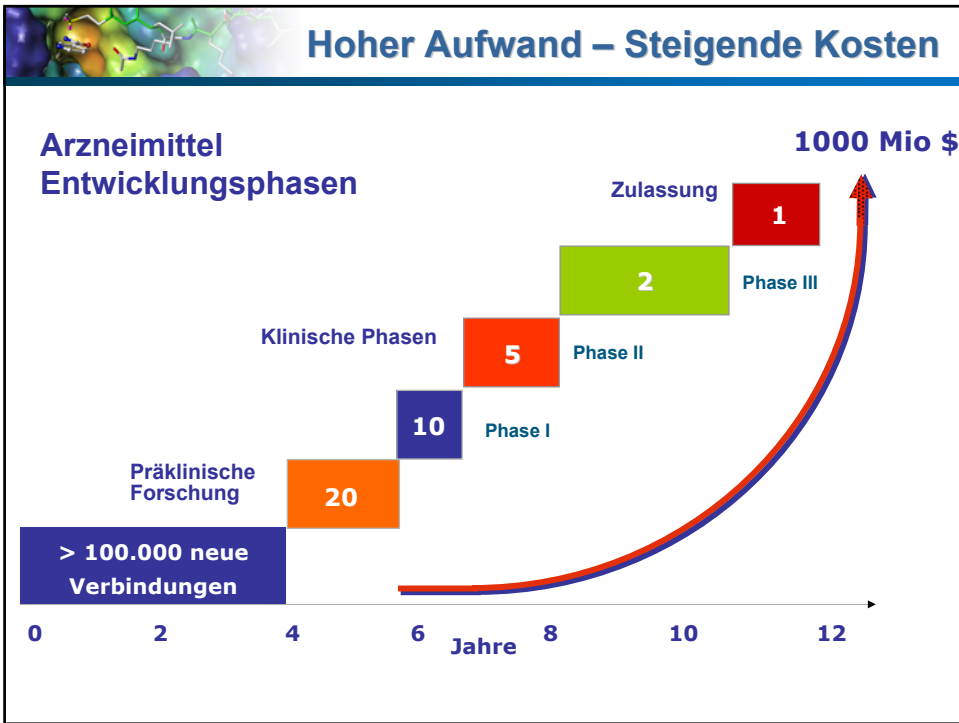
Wirkstoffforschung heute

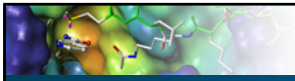
<http://www.roche.com> *

1,000,000,000 *US \$ investment*
1,000,874 *hours of work*
6,587 *experiments*
423 *researchers*
1 *drug*



- 1 An infinity of molecules
- 2 Finding the best compound
- 3 Developing new treatments
- 4 Clinical Trials
- 5 The Analysis of Clinical Trials
- 6 Official OK prior to launch
- 7 Grand scale drug production
- 8 The medicinal product

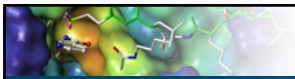




Eine Lösung?

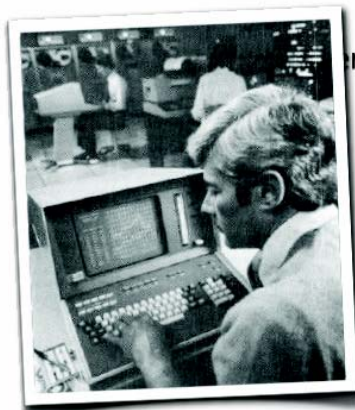
- **Computer-Aided Drug Design**

1970-1980 Erste Computer-Grafik Systeme
(Tektronix, Silico Graphics, ...)

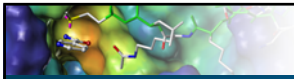


Eine Lösung?

- **Computer-Aided Drug Design**

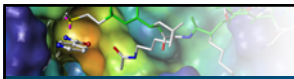


... Computer-Grafik Systeme
Graphics, ...)

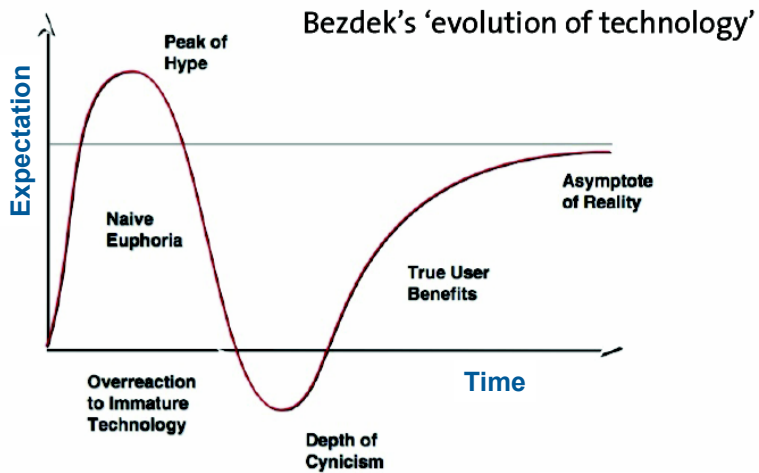


Eine Lösung?

- Computer-Aided Drug Design

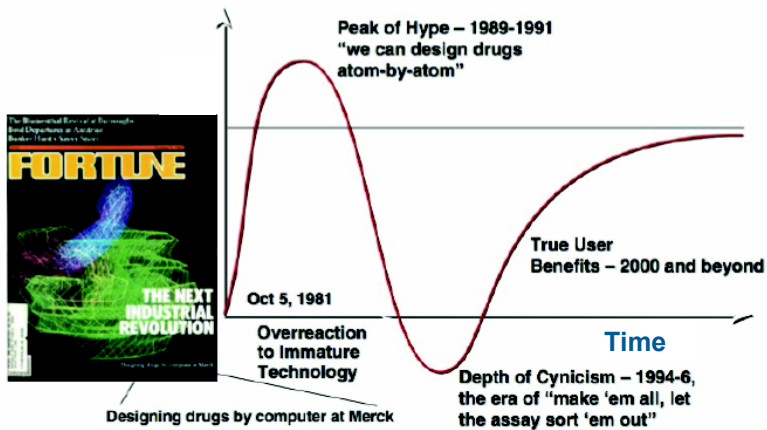


Neuer Hype in den 80ern: CADD



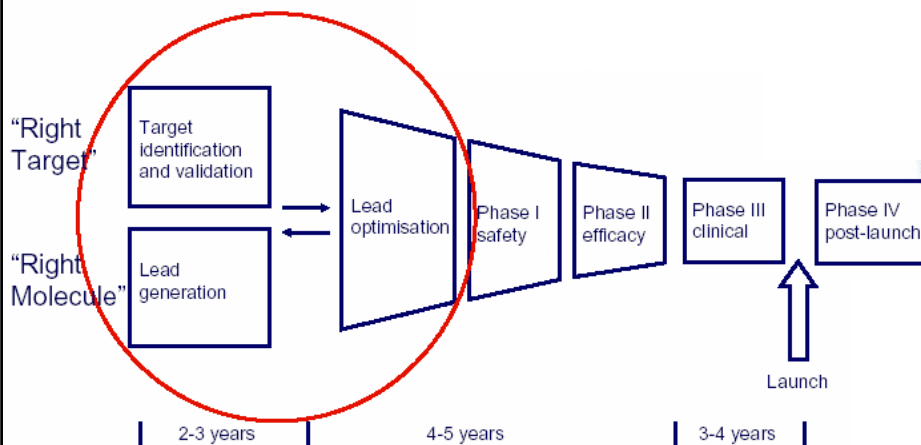
Fortune 1981: „Next industrial revolution“

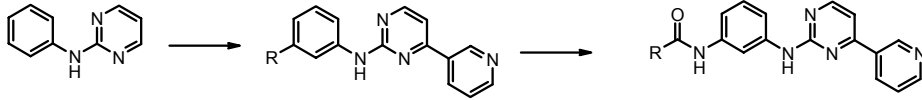
Bezdek's 'evolution of technology' applied to CADD



Van Drie, J Comput-Aided Mol Design, 21, 591-601 (2007)

Einsatz CADD heute

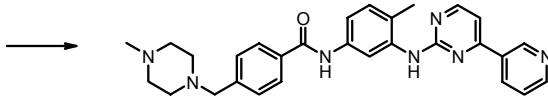




Hit PKC
ATP Mimic

Optimierter Hit - Leitstruktur

Amide

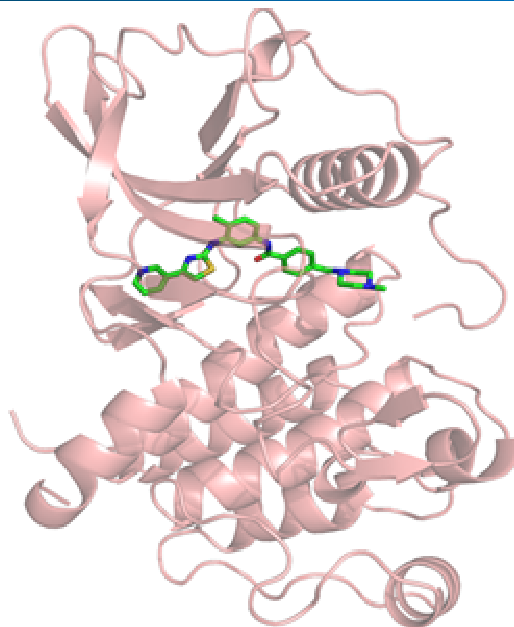


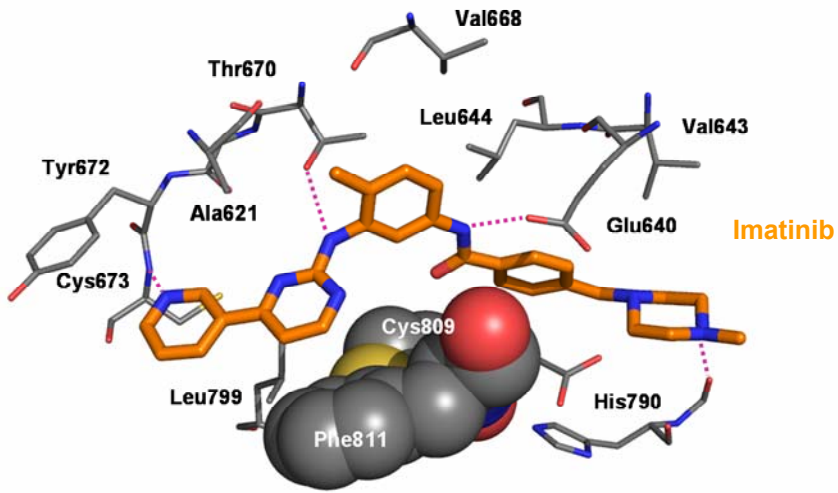
Imatinib (Glivec®)
BCR-ABL Tyrosin Kinase Inhibitor (u.a. PDGFR, c-KIT, ...)

Blockiert die **Tyrosin Kinase BCR-ABL** – die in - 90% aller chronischen myeloiden Leukämie Fälle überaktiv ist (Gendefekt, Philadelphia Chromosom)

Protein-Ligand Kristallstruktur

Die frühzeitige Aufklärung der 3D Struktur der cABL Kinase lieferte Hinweise für die Optimierung des Wirkstoffes



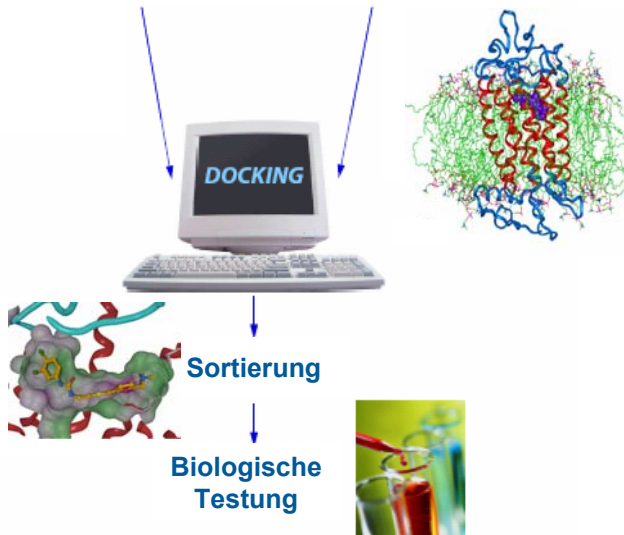


Wie lassen sich effizient neue Wirkstoffe mit computer-basierten Methoden finden?

Virtuelles Screening

Substanzdatenbanken

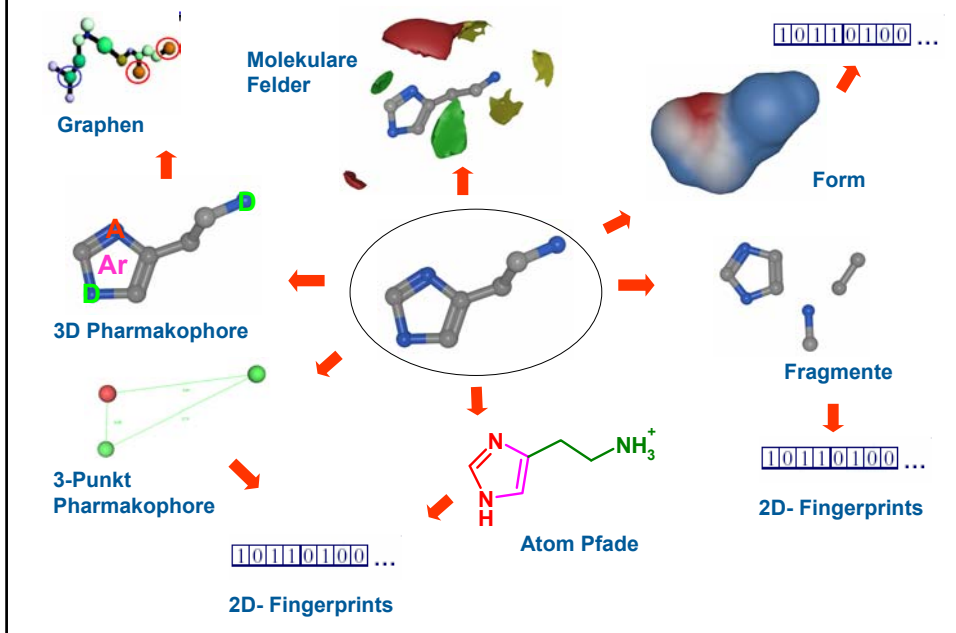
Protein 3D Struktur



Virtuelles Screening

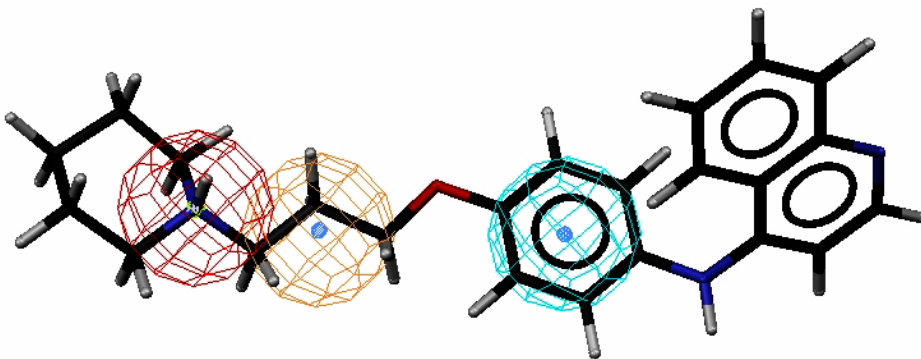
- Verwaltung großer Datenbanken mit verfügbaren Verbindungen
- Filterung Arzneistoff-ähnlicher Verb.
- Suche nach chemisch ähnlichen Verb. mit hoher Chance auf biol. Aktivität
- Suche nach Verb. mit Hilfe eines Pharmakophormodells
- Docking von Verb. in 3D Strukturen von Targetproteinen
- **Auswahl von Verb. für biol. Testung**

Suchmethoden für Moleküle



Pharmakophor Modelle

Chemische Features die für die Auslösung des biol. Effekts relevant sind

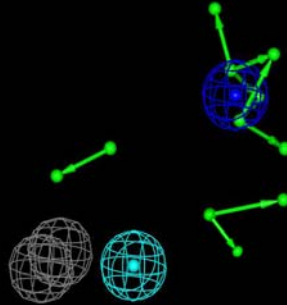
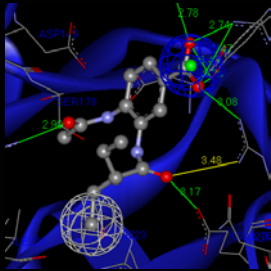


Ligand-basierte Pharmakophormodelle: Vergleich mehrerer Moleküle
Struktur-basierte Pharmakophormodelle

Struktur-basierter Pharmakophor

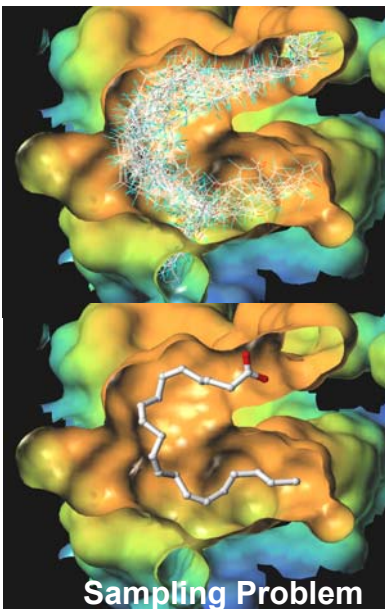
Anordnung von chemischen Features, die für die biol. Wirkung relevant sind

- Chemische Features:
- Electrostatische WW
 - H-Brücken
 - Hydrophobe WW



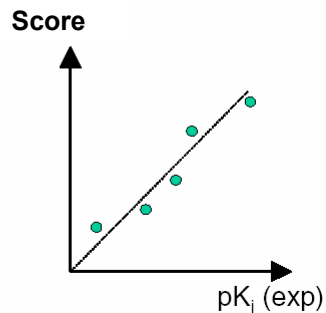
LigandScout, Inteligand

Protein-Ligand Docking/Scoring



Ligand Docking und Scoring

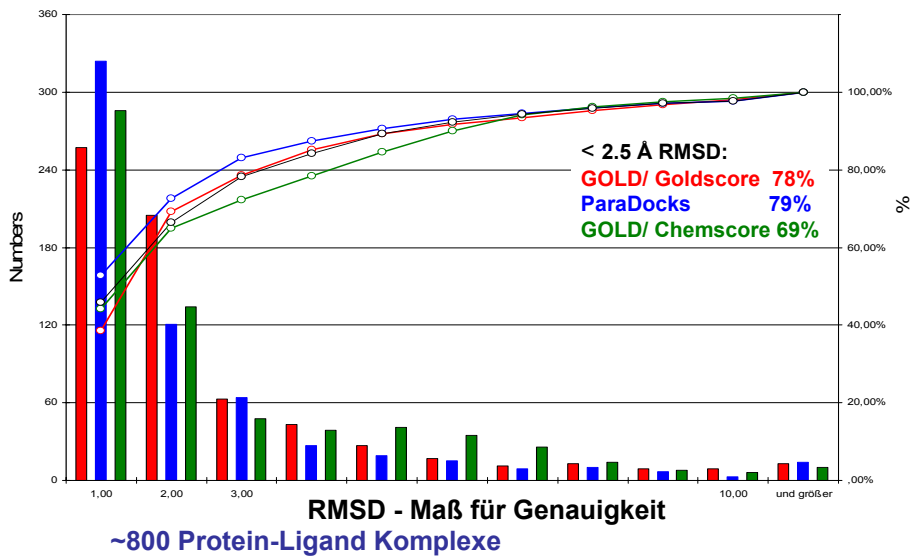
Bindungsstärke?



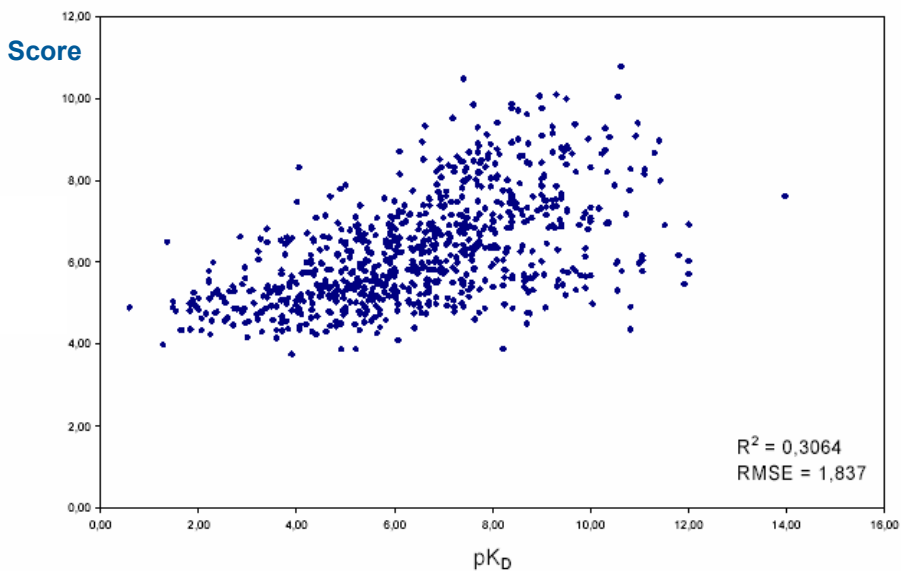
Scoring Problem

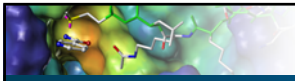
Genauigkeit Docking

Reproduktion der experimentell bestimmten Ligand-Struktur



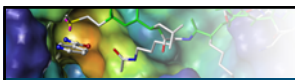
Vorhersage der Bindungsstärke





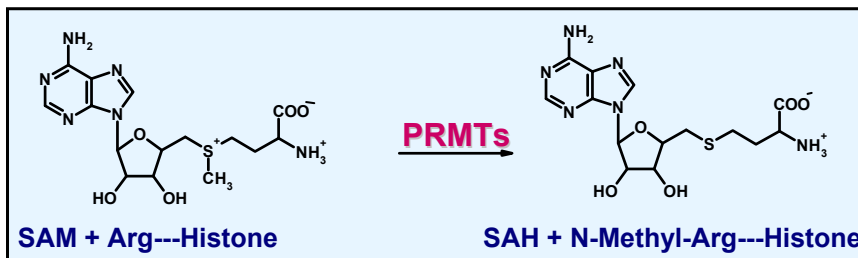
Virtuelles Screening als effiziente Methode zur Auffindung erster biologisch aktiver Verbindungen

Beispiel: Histon-Arginin Methyltransferase PRMT1



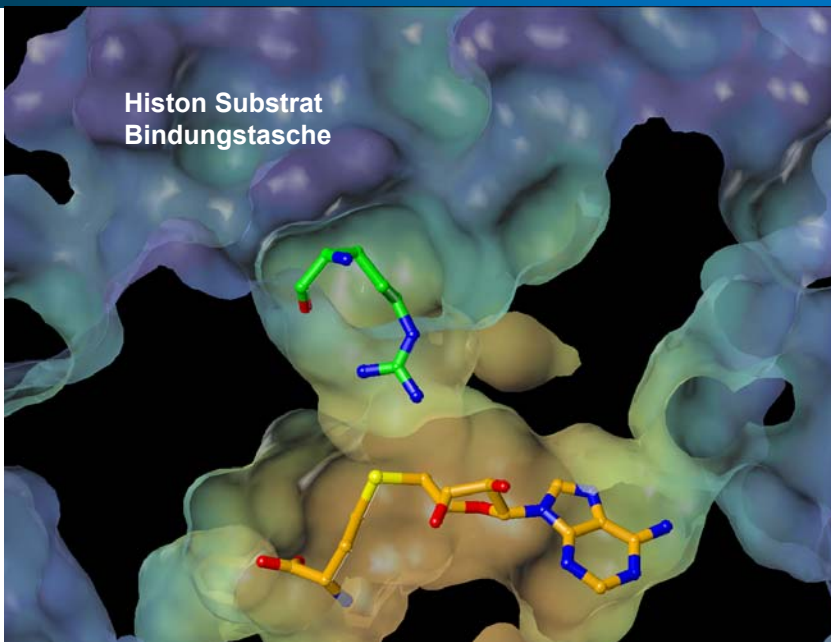
Histon-Methyltransferasen

- Arg/Lys Methylierung reguliert die Interaktion der Histone mit der DNA und steuert die epigenetische Regulation
- Histone Arginine Methyltransferases (PRMT)
- PRMTs sind SAM abhängige Enzyme
- Methylieren Histone und Nicht-Histonproteine



hPRMT1 mit Kofaktor SAM und Arg

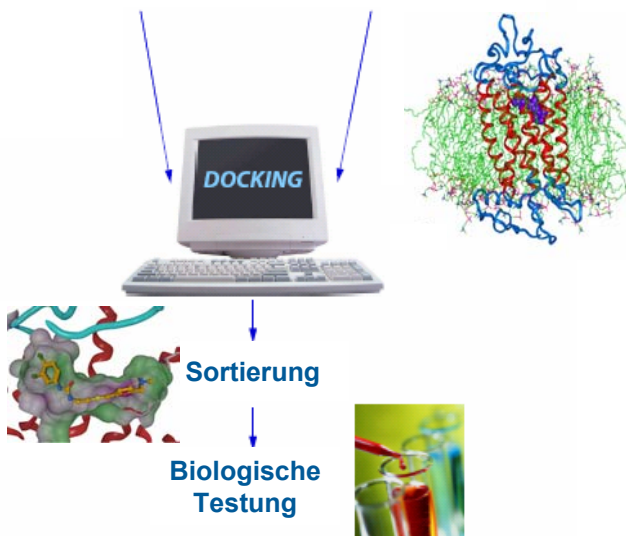
Histon Substrat
Bindungstasche



Virtuelles Screening

Substanzdatenbanken

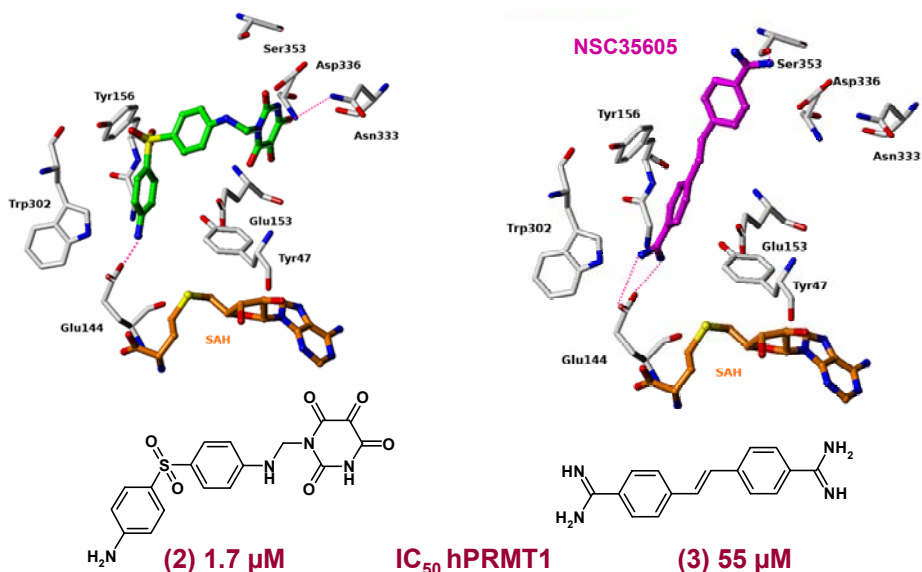
Protein 3D Struktur



- **Verwendete Datenbanken**
 - NCI Diversity Datenbank ~2 000 Verbindungen
 - Chembridge Datenbank ~400 000 Verbindungen
- **Verwendung von 3D Strukturen**
 - Stereoisomere, Tautomere, Protonierung, Konformationen
- **Arzneistoff-Filter**
 - Drug-likeness, ADME Filter
- **Ligand Docking**
 - 3D Struktur der Substratbindungstasche PRMT1
 - Visuelle Auswertung Bindungsmodus
- **Auswahl von 36 Verbindungen**
 - In vitro Testung humane PRMT1
 - 7 Inhibitoren mit IC_{50} 1.7 – 76 μ m

Spannhoff A, et al., J Med Chem 50, 2319, 2007

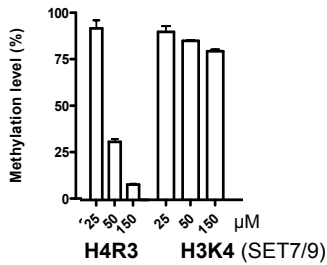
PRMT1 Inhibitoren



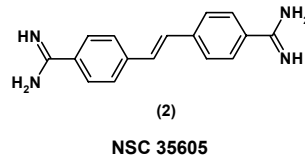
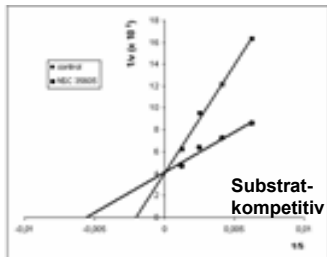
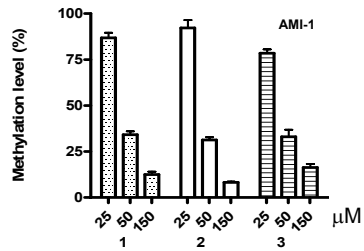
Spannhoff A, et al., J Med Chem. 50, 2319, 2007

Zelluläre Aktivität / Selektivität

Selektivität für Histon H4R3



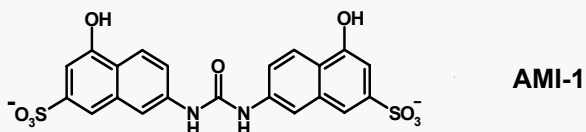
Hypomethylierung in HepG2 Zellen

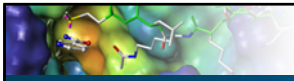


High-Throughput-Screening

High-Throughput Screening

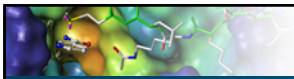
- Biol. Testung von 9 000 strukturell diversen Verbindungen (Chembridge Diversity) lieferte 9 aktive Inhibitoren – meist SAM Analoge (Hit Rate ~0.1 %)
- Nur eine Nicht-SAM Verbindung mit Selektivität gegenüber PRMT1 identifiziert





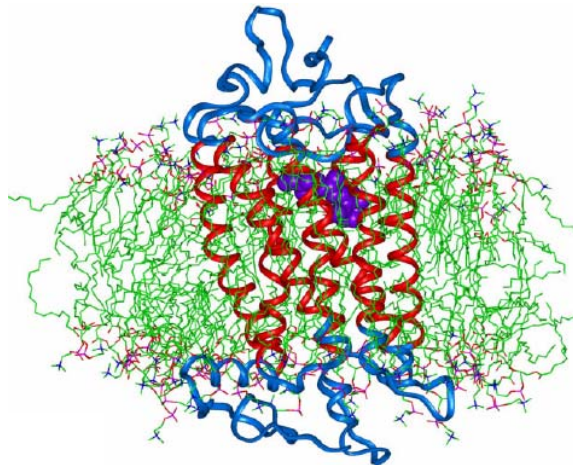
Suche nach Wirkstoffen wenn keine 3D Struktur des Targetproteins verfügbar ist

Beispiel: Suche nach neuartigen Histamin H₃-Antagonisten



H₃ Rezeptor

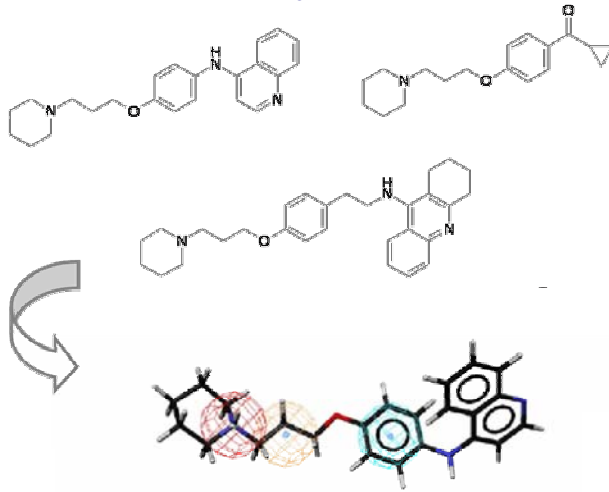
- Keine 3D Struktur des H₃ Rezeptors verfügbar
- GPCR
- Membranprotein
- Wichtiger Auto/Hetero Rezeptor im ZNS
- Antagonisten zur Steigerung kognitiver Funktionen



Homologiemodell des H₃ Rezeptors

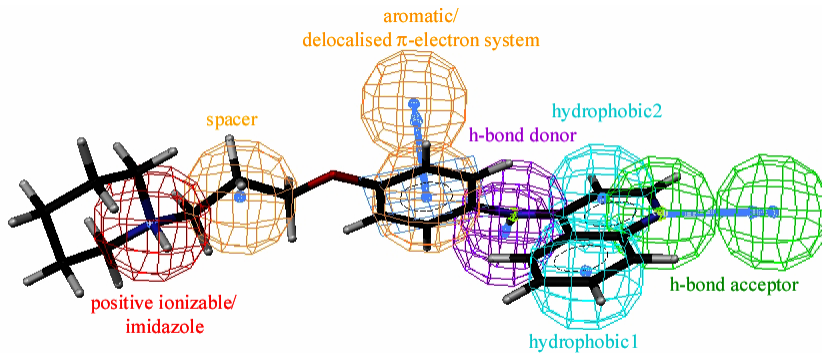
Pharmakophor Modellierung

Datensatz mit aktiven H₃ Antagonisten



H₃ Pharmakophor Modell

Pharmakophor Modell

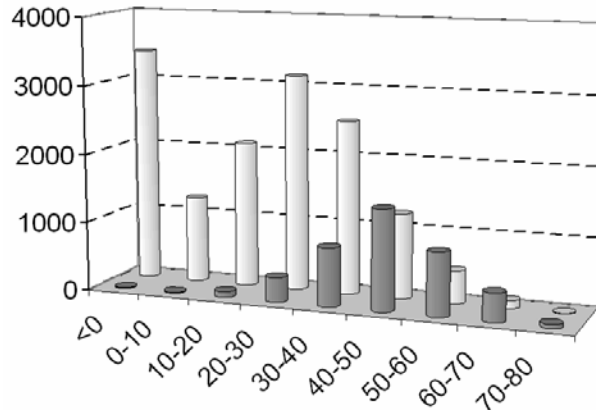


Validierung anhand aktiver Antagonisten (~400)
Diskriminierung aktiver und inaktiver Verbindungen

CATALYST

Wie sensitiv ist der Pharmakophor?

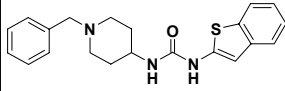
Datenbank mit 13 000
Verb. versus
H₃ Antagonisten



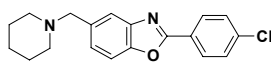
Virtuelles Screening

- **Datenbank**
 - Maybridge Database ~55 000 Verbindungen
- **3D Strukturen (~13000)**
 - Stereoisomere, Auswahl von basischen Verbindungen
- **Pharmakophor Modell - CATALYST**
 - Validiert an 418 aktiven Liganden
- **Ligand Docking GOLD (~1700)**
 - Visuelle Analyse des Bindungsmodus
- **Auswahl von 7 Verbindungen für die biologische Testung**

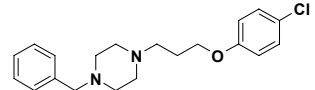
Getestete Verbindungen



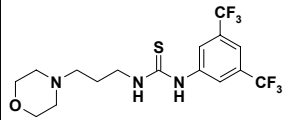
HTS-07217



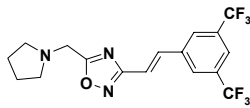
PD-00043



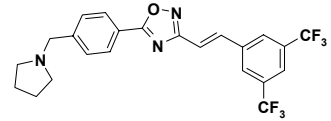
RJC-03033



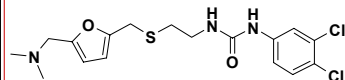
BTB-12683



CD-04850



CD-06177

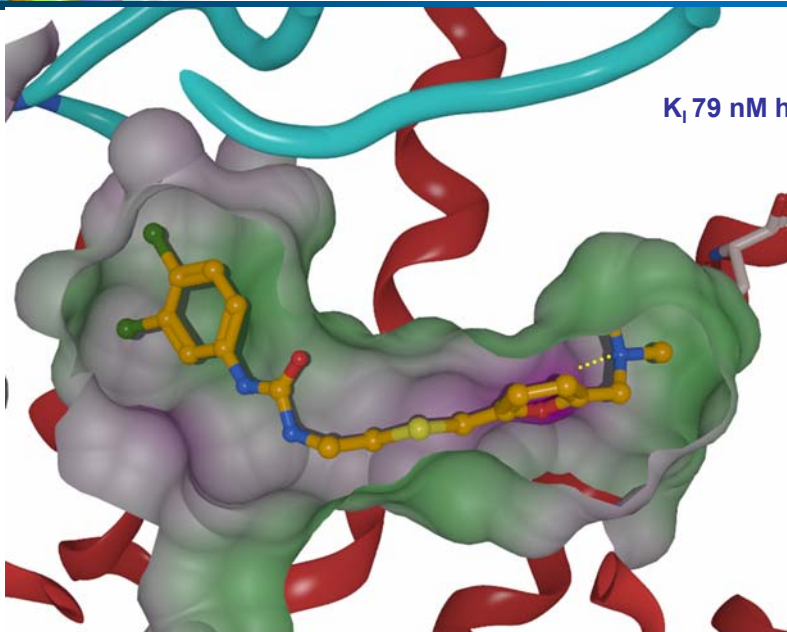


BTB-08079

- Alle 7 aktive Antagonisten mit K_i zwischen 79 nM – $6 \text{ }\mu\text{M}$
- 2 Potente Antagonisten (nM) mit neuem Chemotyp

BTB-08079

K_i 79 nM hH3





Ähnlichkeit zu bekannten Antagonisten

Chemische Ähnlichkeit

Compound	K_i (nM)	GoldScore	Tanimoto Coefficient
HTS-07217	2459	72.89	0.45
PD-00043	1024	79.21	0.55
RJC-03033	383	81.10	0.59
BTB-12683	3655	65.97	0.51
CD-04850	6258	60.13	0.47
CD-06177	2958	82.21	0.56
BTB-08079	79	87.89	0.45



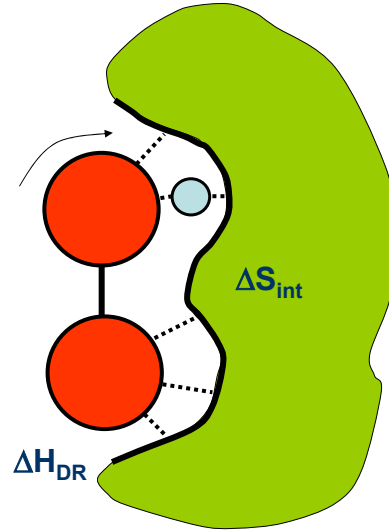
**Wie lassen sich Wirkstoffe mit Hilfe von
computer-basierten Methoden
optimieren?**

**Beispiel: Berechnung der freien
Bindungsenergie von Protein-Ligand
Komplexen mit Moleküldynamik
Simulationen**

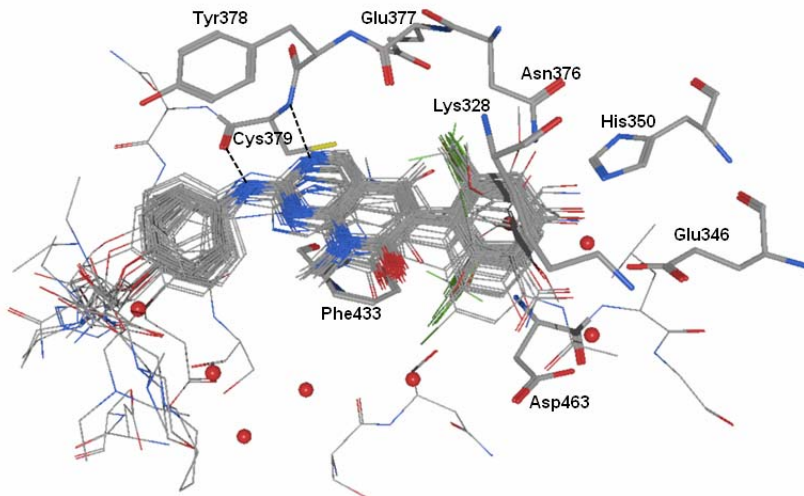
Freie Bindungsenergie

Ligand-protein Komplex

Wassermoleküle

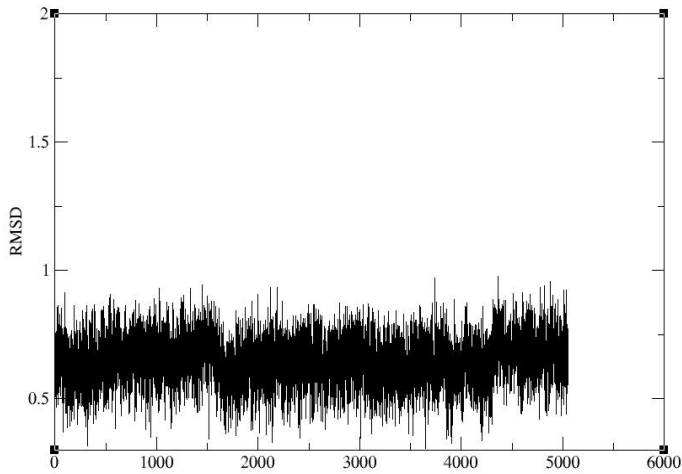


Wee1 Kinase

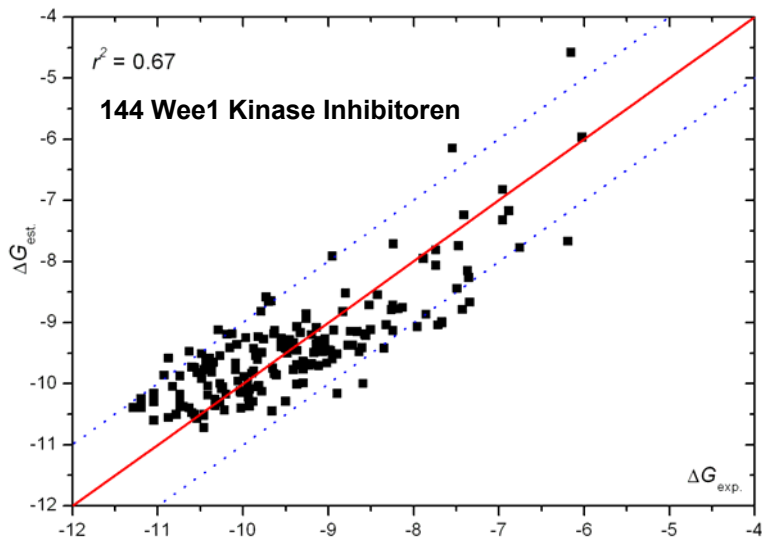


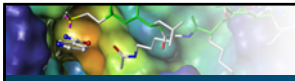
Moleküldynamik Simulation

Betrachtung der Protein-Ligand Interaktion mittels Moleküldynamik Simulation

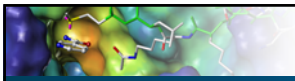
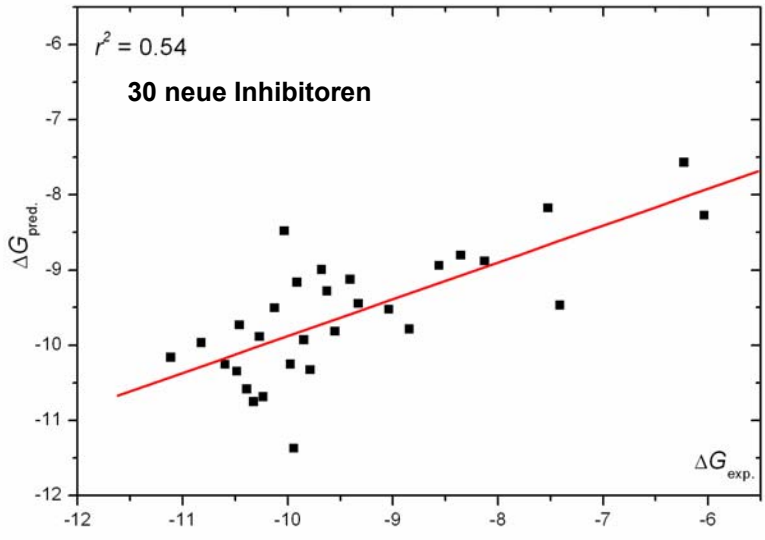


MM-PBSA



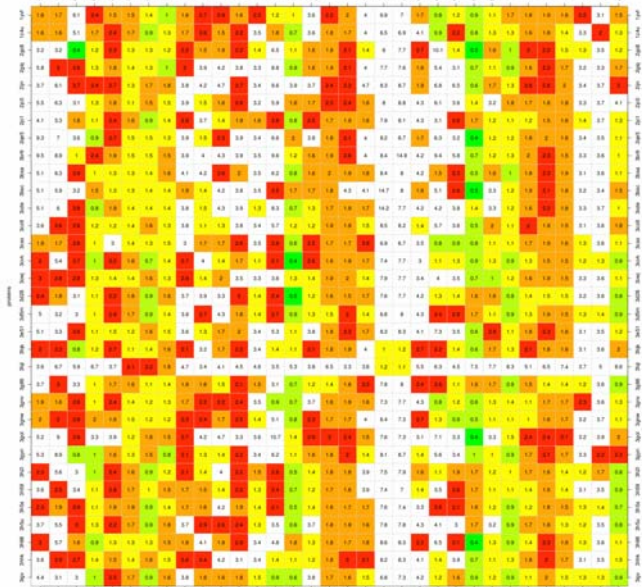


Vorhersage



Ziel: Selektivitätsplots für Kinasen

Selektivitätsplots für verschiedene Inhibitoren an verwandten Kinasen



Zusammenfassung

- **Computer-basierte Methoden als essentieller Bestandteil der präklinischen Wirkstoffforschung**
- **Wichtig als Ideengenerator für die Synthese und Testung**
- **Virtuelles Screening liefert oft komplementäre Treffer zum HTS**
- **Ziel: Schnelle Vorhersage der Profile von Wirkstoffen (Selektivitäten, Anti-Target Effekte, ADME)**

Acknowledgements



Martin-Luther-Universität
Halle-Wittenberg

- Dr. Sonja Schlimme
- Dr. Rene Meier
- Urszula Uciechowska
- German Erlenkamp
- Martin Pippel
- Kanin Wichapong

- Suhaib Shekfeh
- Luca Carlino
- Ralf Heinke



Albert-Ludwigs-Universität
Freiburg

- Prof. Manfred Jung
- Dr. Astrid Spannhoff
- Jörg Schemies
- Martin Schmitt
- Dr. Robert Neugebauer



Heinrich-Heine-Universität
Düsseldorf

- Prof. H.-D. Höltje
- Dr. Birgit Schlegel



Leopold-
Franzens-
Universität
Innsbruck

- Prof. Thierry Langer
- Dr. Gerhard Wolber
- Dr. Christian Laggner

Universität Regensburg

- Prof. R. Seifert
- David Schnell

Johann-Wolfgang-Goethe
Universität Frankfurt

- Prof. H. Stark

Funding: EU FP7, DFG, Krebshilfe, Sander Stiftung, Land Sachsen-Anhalt