

1 Einleitung und Zielstellung

Die orale Applikation von Arzneistoffen ist für den Patienten eine relativ einfache Möglichkeit, Wirkstoffe aufzunehmen. Trotz intensiver Forschung bleibt die Entwicklung oral verfügbarer Arzneimittel eine große Herausforderung für die pharmazeutische Industrie. Dabei geht es nicht nur um das Einschleusen von Makromolekülen in den Organismus, sondern auch um die Verbesserung der Aufnahme kleiner hydrophiler Moleküle mit geringer Membranpermeabilität. Die Nutzung intestinaler Transporter ist eine bereits oft praktizierte Methode zur Verbesserung der oralen Verfügbarkeit von Wirkstoffen. Solche Transporter sind polytope Membranproteine, deren physiologische Bedeutung im spezifischen Transport verschiedener Stoffe, z. B. Metabolite und Nährstoffe, durch biologische Membranen besteht. In den letzten Jahren wurde deutlich, dass eine enorme Anzahl von Wirkstoffen über solche Nährstofftransporter transportiert werden kann. Es zeigte sich auch, dass einige Membrantransporter (z. B. P-Glycoprotein) die Absorption, Exkretion und Toxizität von Wirkstoffen indirekt kontrollieren.^{1,2} Die meisten Nährstofftransporter sind bezüglich ihrer dreidimensionalen Struktur bisher nur sehr wenig oder nicht charakterisiert. Interaktionen von Wirkstoffen und Transportern sind daher im Allgemeinen bisher nicht voraussagbar.

Es sind zwei Möglichkeiten bekannt, die orale Verfügbarkeit von Wirkstoffen durch Membrantransporter zu erhöhen. Zum einen können Verbindungen entwickelt werden, die die Struktur der endogenen Substrate der Transporter mimen, zum anderen können die Wirkstoffe mit Erkennungsstrukturen der Transporter konjugiert werden. Beide Möglichkeiten setzen jedoch ein detailliertes Wissen der dreidimensionalen Strukturen des Proteins und/oder der Substrate voraus. Die steigende Anzahl von Publikationen beweist, dass aufgrund der geringen Anzahl aufgeklärter dreidimensionaler Strukturen von Membranproteinen die Anwendung von *in silico*-Methoden interessant wird. Die meisten Veröffentlichungen dieser Art befassen sich mit Methoden, die auf einer Kombination von biologischen und Molecular Modelling Methoden zur Ableitung der dreidimensionalen Struktur-Wirkungsbeziehungen von Proteinen bzw. ihrer Substrate basieren (z. B. Homologiemodelling, dreidimensionale quantitative Struktur-Wirkungsuntersuchungen (3D-QSAR)). Solche Untersuchungen ermöglichen die Optimierung von Molekülen (Wirkstoffen) als Substrate bestimmter Target-Proteine. Das ligandenbasierte Wirkstoffdesign wurde bereits bei den Integrin-Rezeptor Antagonisten erfolgreich angewendet.³

In der vorliegenden Arbeit wurden Struktur-Wirkungsbeziehungen von Substraten zweier verschiedener membranständiger Peptidtransporter untersucht. PEPT1 und PEPT2 sind im Säugerorganismus für die Konservierung von peptidgebundenen Stickstoff und damit zur

Aufrechterhaltung des Proteingehaltes verantwortlich. Durch den intestinalen Peptidtransporter PEPT1 werden hauptsächlich kleine Peptide aus der Nahrung in den Organismus aufgenommen, PEPT2 hingegen entfernt kleine Peptide (z. B. Hydrolyseprodukte bestimmter Peptidasen) aus extrazellulären Flüssigkeiten.⁴⁻⁷ PEPT1 und PEPT2 sind multispezifisch. Geht man nur von ihren physiologischen Substraten, den Di- und Tripeptiden aus, die aus Kombinationen der 20 proteinogenen Aminosäuren aufgebaut sind, erhält man theoretisch mehr als 8000 verschiedene Di- und Tripeptide, die unterschiedliche physikochemische Eigenschaften aufweisen. Neben ihren natürlichen Substraten transportieren die Peptidtransporter Peptidmimetika, wie z. B. β -Lactam-Antibiotika, verschiedene ACE-Inhibitoren und Bestatin, aber keine Aminosäuren und Tetrapeptide.⁸ PEPT1 und PEPT2 weisen Gemeinsamkeiten bezüglich ihres Substratspektrums auf, sie unterscheiden sich jedoch in Struktur, Kapazität und Affinität.^{5,9,10} Die 3D-Strukturen der membranständigen Peptidtransporter PEPT1 und PEPT2 konnten bisher noch nicht aufgeklärt werden.

Durch die Kombination eines breiten Substratspektrums und einer hohen Transportrate ist der intestinale Peptidtransporter PEPT1 besonders gut für die orale Wirkstoffzuführung in den Organismus geeignet. Seit bekannt ist, dass peptidmimetische Wirkstoffe über PEPT1 in den Organismus eingebracht werden können, wurde mit großem Einsatz nach Erkennungsstrukturen gesucht, um den intestinalen Peptidtransporter als so genannte Schleuse für weitere Arzneistoffe zu verwenden. Es konnte bereits gezeigt werden, dass durch die Konjugation von Wirkstoffen mit Aminosäuren Prodrugs gebildet werden konnten, die aktiv von PEPT1 durch das Dünndarmepithel transportiert werden, z. B. Valaciclovir, Valganciclovir, L-DOPA-Phe.¹¹ Nach dem Einschleusen in den Organismus erfolgt die Abspaltung der Aminosäuren, wodurch der Wirkstoff freigesetzt wird. Über das Blut erfolgt der Transport der Pharmazeutika zu den jeweiligen Wirkorten. Die Rückresorption von peptidartigen Verbindungen in der Niere erfolgt geringfügig durch PEPT1, hauptsächlich jedoch durch den nierenspezifischen Peptidtransporter PEPT2. Dieser kommt neben dem Nierenepithel auch in anderen Geweben und Organen vor, darunter Lunge und Gehirn. Durch die Expression in den Bronchien ist PEPT2 möglicherweise ein viel versprechender Angriffspunkt für zukünftige aerosolisch applizierbare peptidähnliche Wirkstoffe bei pulmonaren Krankheiten.¹²

Einige Molecular Modelling Studien zur Erklärung unterschiedlicher biologischer Aktivitäten von Substraten der Peptidtransporter und zur Ableitung von Erkennungsstrukturen sind bereits durchgeführt worden.¹³ Diese Studien basieren jedoch meistens auf Datensätzen mit einer geringen Anzahl von PEPT1/PEPT2-Liganden (Substrate/Inhibitoren), oder beruhen auf biologischen Daten, die mit unterschiedlichen Methoden an verschiedenen Expressionssystemen der Peptidtransporter ermittelt wurden. Solche Daten sind mitunter schwer vergleichbar. Eine 3D-QSAR Studie, deren Grundlage ein Datensatz mit 76 Dipeptiden und Dipeptid-

Derivaten ist, war bereits in der Arbeitsgruppe durchgeführt worden und bildet den Ausgangspunkt der vorliegenden Arbeit.¹⁴

Ein Ziel der Arbeit war es, ein 3D-QSAR Modell zu entwickeln, um vor allem Bindungsaffinitäten der β -Lactam-Antibiotika zu erklären und Erkennungsstrukturen von PEPT1 und PEPT2 abzuleiten. Ein weiteres Ziel war es, Unterschiede in der Substraterkennung von PEPT1 und PEPT2 mit Hilfe von 3D-QSAR Modellen zu erklären. Außerdem sollten sich diese Modelle für die Voraussage unbekannter Verbindungen eignen, da dies beim Design neuer Wirkstoffe hilfreich ist. Da β -Lactam-Antibiotika strukturverwandt mit Tripeptiden sind, war es notwendig, diverse Tripeptide in den Datensatz aufzunehmen. Systematische Studien zur Erkennung und zum Transport von Tripeptiden durch PEPT1 waren zu Beginn der Arbeiten zur vorliegenden Dissertation nicht bekannt. Für PEPT2 wurden bisher nur wenige biologische Daten (Bindungsaffinitäten) von Substraten/Inhibitoren ermittelt. Bindungsaffinitäten der Tripeptidmimetika, z. B. β -Lactam-Antibiotika, konnten bislang weder erklärt noch vorausgesagt werden. In der vorliegenden Arbeit wurde daher von experimentellen und theoretischen Ansätzen ausgegangen:

- Für die Generierung eines repräsentativen Datensatzes zur Durchführung von 3D-QSAR Untersuchungen von PEPT1-Substraten war es zunächst erforderlich, Bindungsaffinitäten einer Vielzahl von Tripeptiden an PEPT1 zu messen. Anschließend wurden umfangreiche Konkurrenzexperimente mit natürlichen PEPT2-Substraten durchgeführt.
- Im theoretischen Teil der Arbeit wurden repräsentative Trainingsdatensätze für Liganden von PEPT1 und PEPT2 generiert, die für nachfolgende CoMSIA (engl.: comparative molecular field indices analysis) Untersuchungen geeignet waren. Die Validierung der Modelle erfolgte durch die Ermittlung der Voraussagekraft für einen Testdatensatz. Essenzielle Strukturmuster hochaffiner Substrate beider Peptidtransporter wurden abgeleitet und ein Pharmakophormodell entwickelt, das als Basis für ein rationales Wirkstoffdesign verwendet werden kann. Ziel der Arbeit war es außerdem, die Bioverfügbarkeit von niedermolekularen Peptidwirkstoffen und Peptidmimetika zu verbessern. Dies wurde durch Untersuchungen an 2-Aminothiazol-4-essigsäure (ATAA) und deren Derivaten realisiert. Die daraus gewonnenen Erkenntnisse bilden die Grundlage für weiterführende Untersuchungen mit Wirkstoffkandidaten.