



## **In der Silico-Repositionierung von Cannabigerol als neuartiger Inhibitor der Enoyl Acyl Carrier Protein (ACP) Reductase (InhA)**

Cannabigerol (CBG) und Cannabichromen (CBC) sind nicht psychoaktive Cannabinoide, die in den letzten Jahren auf zunehmendes Interesse gestoßen sind. Diese Verbindungen weisen eine gute Verträglichkeit und geringe Toxizität auf und stellen vielversprechende Kandidaten für die Neupositionierung von Medikamenten dar. Um neue potenzielle therapeutische Ziele für CBG und CBC zu identifizieren, wurde eine integrierte ligandenbasierte und strukturbasierte Studie durchgeführt. Die Ergebnisse der Analyse führten zur Identifizierung von CBG als niedermikromolaren Inhibitor des Enzyms Enoyl Acyl Carrier Protein (ACP) Reduktase (InhA).

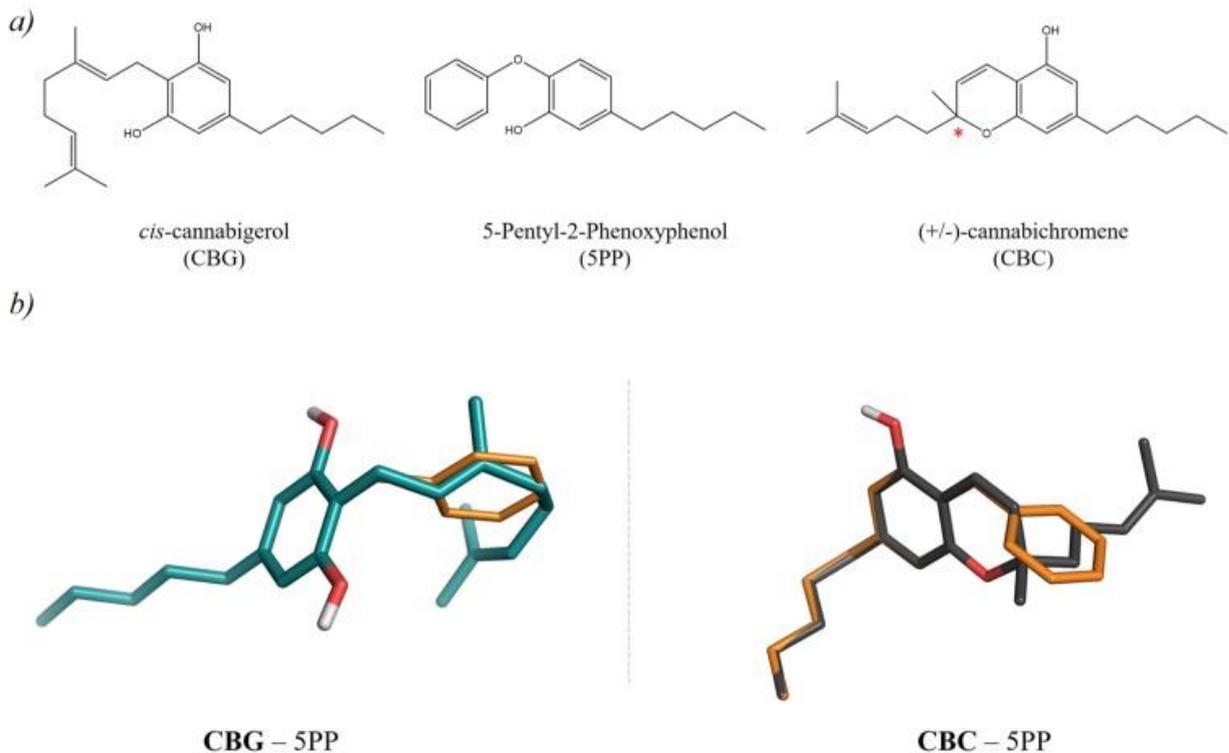
### **1. Einführung**

In den letzten Jahrzehnten wurden verstärkte Forschungsanstrengungen unternommen, um neue Medikamente auf der Grundlage unerforschter chemischer Gerüste zu identifizieren. Die Rate der Arzneimittelzulassungen ist jedoch stabil geworden, so dass nur eine geringe Anzahl der entwickelten chemischen Substanzen in den therapeutischen Einsatz oder sogar in klinische Studien eintritt[1,2,3,4]. Infolgedessen wurden Entdeckungsstrategien entwickelt, um Misserfolge, Zeitaufwand und Kosten zu reduzieren; in diesem Zusammenhang ist die Medikamentenwiederverwendung zu einer der erfolgreichsten Strategien geworden, um Misserfolge zu reduzieren, die typischerweise mit der Medikamentenentwicklung verbunden sind. Die Wiederverwendung von Arzneimitteln besteht darin, neue therapeutische Anwendungen für bereits zugelassene Arzneimittel und/oder klinische Kandidaten zu identifizieren, da sie es ermöglichen könnten, präklinische Optimierungsprobleme, wie beispielsweise unerwünschte toxikologische Profile, zu umgehen. Obwohl die meisten Erfolgsgeschichten über die Wiederverwendung von Arzneimitteln aus der Serendipity stammen, zielen die derzeitigen Bemühungen hauptsächlich darauf ab, die Wiederverwendung durch systematische Analyse von Bioaktivitätsdaten mit Hilfe von Rechenansätzen rational vorherzusagen. Tatsächlich wurden In-Silico-Methoden erfolgreich eingesetzt, um neue Möglichkeiten der Medikamentenwiederverwendung aufzuzeigen[5,6,7]. Zur Unterstützung von Drug Discovery Programmen stehen derzeit mehrere liganden- und strukturbasierte virtuelle Screening-Ansätze zur Verfügung. Allerdings konnte jede In-silico-Methode allein aufgrund intrinsischer Einschränkungen das komplexe Zusammenspiel zwischen Medikamenten und Targets nicht ausreichend modellieren[8]. Daher wird die Kombination von liganden- und strukturbasierten Methoden

erwartet: (i) zuverlässigere Ergebnisse liefern; (ii) dazu beitragen, intrinsische Einschränkungen einzelner Ansätze zu überwinden, und (iii) sich gegenseitig in einem Drug Discovery Workflow ergänzen[8,9,10]. Interessanterweise wurde die Kombination von liganden- und strukturbasierten Ansätzen bereits erfolgreich eingesetzt, um molekulare Targets für phänotypische Hits der *Mycobacterium tuberculosis* zu identifizieren[11].

Derzeit basieren die meisten Studien zur Medikamentenwiederverwendung auf der Analyse von Bioaktivitätsdaten von Verbindungen, die aus der chemischen Synthese stammen. Andere wertvolle Möglichkeiten könnten sich jedoch aus Naturprodukten ergeben[12,13,14]. Naturprodukte zeichnen sich durch eine große strukturelle Vielfalt aus und können neuartige chemische Substanzen liefern, die bei der Wirkstofffindung richtig optimiert werden können. In diesem Zusammenhang sind Cannabinoide, die Terpenophenole sind, die in verschiedenen Sorten von *Cannabis sativa* L. weit verbreitet sind, eine sehr interessante Klasse von bioaktiven Verbindungen[15]. Insbesondere das pharmakologische Profil der nicht-psychoactiven Cannabinoide macht sie zu den Hauptakteuren der überwiegenden Mehrheit der wissenschaftlichen Arbeiten über die Fasertyp-Sorte, die allgemein als industrieller Hanf oder Hanf bekannt ist[16]. Unter diesen Verbindungen stellt Cannabidiol (CBD) das aus pharmazeutischer Sicht bekannteste Beispiel dar, das antioxidative, entzündungshemmende, antibakterielle, antiproliferative, neuroprotektive und antikonvulsive Eigenschaften besitzt[15,16]. Cannabigerol (CBG) und Cannabichromen (CBC) sind weitere nicht-psychoactiven Cannabinoide (Abbildung 1a), die in *C. sativa*-Blütenständen vorkommen; sie zeichnen sich beide durch antibakterielle Aktivität sowie entzündungshemmende und antiproliferative Eigenschaften aus[17].

Da die oben genannten Verbindungen gute Kandidaten für die Neupositionierung von Medikamenten darstellen, war es das Ziel dieser Arbeit, ein integriertes liganden- und strukturbasiertes *in silico*-Verfahren zu entwickeln und anzuwenden, um mögliche biologische Ziele von nicht-psychoactiven Cannabinoiden aufzudecken, die in zukünftigen Wirkstoffkampagnen verwendet werden sollen.



**Bild: Chemische Strukturen und ligandenbasierte Ausrichtungen von CBG und CBC, die mit ROCS[25] vorhergesagt wurden. Konkret berichtet (a) über die Strukturen von CBG, 5PP und CBC. Das chirale Zentrum im CBC ist mit einem roten Stern markiert. (b) berichtet über die formbasierte Ausrichtung, die für CBG (dunkle Teestäbchen) und das S-**

**Stereoisomer von CBC (dunkelgraue Stäbchen) mit der 5PP (orange dünnere Stäbchen) Verbindung erhalten wurde.**

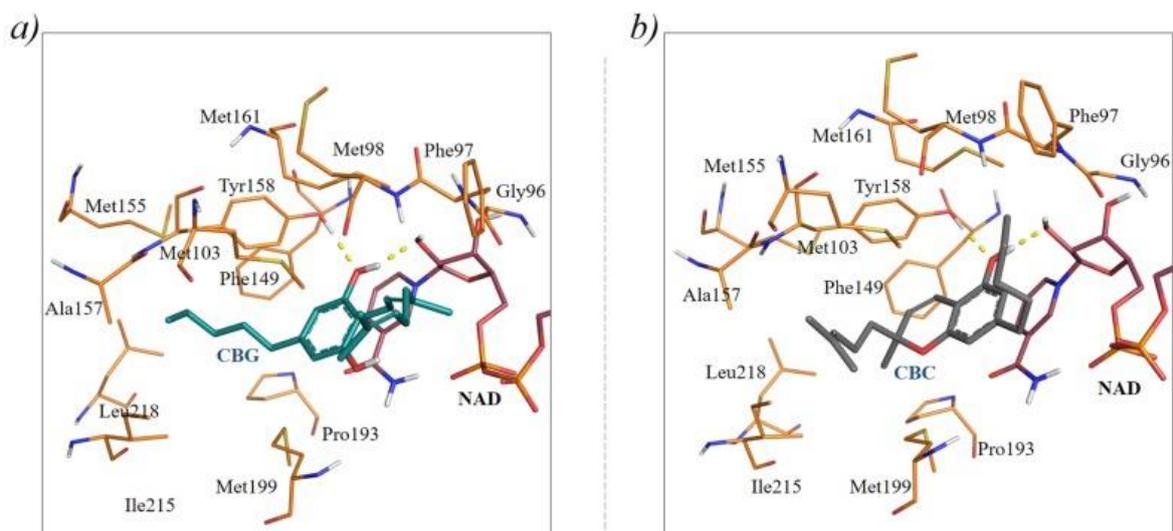
## 2. Ergebnisse und Diskussion

Um potenzielle Ziele von CBG und CBC zu identifizieren, die von therapeutischem Interesse sein könnten, wurde zunächst ein 3D ligandenbasiertes virtuelles Screening innerhalb der DrugBank-Datenbank durchgeführt[18]. Tatsächlich hat dieser Ansatz bereits bewiesen, dass er wertvolle Ergebnisse für die Wiederverwendung von Arzneimitteln liefert und die Identifizierung von strukturell unabhängigen Verbindungen mit ähnlichen Bioaktivitäten ermöglicht[19]. Unter den verfügbaren Datenbanken wurde die DrugBank ausgewählt, weil sie eine umfassende Liste zugelassener und klinischer Medikamente mit vertrauensvollen Anmerkungen zur Bioaktivität zu relevanten therapeutischen Zielen bereitstellt. Die DrugBank wurde zunächst für die 3D ligandenbasierte Ähnlichkeitsanalyse vorbereitet (Details siehe Abschnitt "Materialien und Methoden"). Anschließend wurden die DrugBank-Verbindungen einem 3D Ähnlichkeitsscreening gegen die generierten CBG- und CBC-Multikonformerabfragen unterzogen. Diese Analyse ermöglichte es, potenzielle therapeutische Ziele nach dem Grad der Ähnlichkeit von CBG und CBC in Bezug auf die DrugBank-Verbindungen zu priorisieren. Die visuelle Inspektion der vorhergesagten Ausrichtungen ermöglichte die Identifizierung des Enzyms Enoylacyl Carrier Protein (ACP) Reductase (InhA) als potenzielles Ziel für CBG und CBC. Tatsächlich ergaben die beiden Cannabinoide nach den Ausrichtungen der Liganden ähnliche Eigenschaften wie 5-Pentyl-2-phenoxyphenol (5PP, DrugBank ID: DB07178) (Abbildung 1b), das ein kleiner Molekulargewichtsinhibitor von InhA[20] ist. Ligandenähnlichkeiten sind in Tabelle S1 der Begleitinformationen aufgeführt. Insbesondere nach den erhaltenen Ausrichtungen überlappte der 5-Pentyl-1,3-dihydroxyphenylrest von CBG gut mit der 5-Pentyl-2-phenoxy-Gruppe von 5PP, während der 3,7-Dimethylocta-2,6-dienylrest von CBG eine lockere Überlagerung mit der Phenylgruppe von 5PP ermöglicht. In Bezug auf CBC lieferte die n-Pentyl-Chromen-5-ol-Gruppe eine weniger günstige Überlappung mit der 5-Pentyl-2-phenoxy-Gruppe von 5PP, wobei dieser Teil ein deutlich größeres Volumen im Vergleich zur Hydroxyphenyl-Gruppe von 5PP einnahm.

Gute ligandenbasierte Ausrichtungen von CBC und CBG mit anderen Cannabinoiden, die in der DrugBank-Datenbank aufgeführt sind, wurden ebenfalls gefunden (siehe Tabelle S1 in den unterstützenden Informationen), wie beispielsweise Cannabidiol (DrugBank ID: DB09061) und Dronabinol (DrugBank ID: DB00470), die kürzlich zur Behandlung von Epilepsie bei Kindern und Übelkeit im Zusammenhang mit Krebschemotherapie zugelassen wurden[21,22]. Wir haben uns jedoch entschieden, unsere Aufmerksamkeit auf das InhA-Enzym zu richten, das ein validiertes Ziel bekannter Antituberkulosemittel ist[23,24].

Obwohl CBC und CBG eine gute Formähnlichkeit mit dem 5PP-Inhibitor aufwiesen, wurden die beiden Verbindungen auch in der InhA-Kristallstruktur (PDB-Code: 2B36)[20] andockt, wie im Abschnitt "Material und Methoden" beschrieben. Mit dieser Analyse konnte beurteilt werden, ob die untersuchten Verbindungen auch eine gute sterische und elektrostatische Komplementarität mit der InhA-Bindungsstelle aufweisen. Die Kristallstruktur 2B36 wurde unter anderem für InhA bevorzugt, da das Enzym in Komplex mit 5PP[20] vorliegt. Tatsächlich gehört die Auswahl geeigneter Rezeptorkonformationen für das Andocken durch die Ähnlichkeit zwischen dem kristallographischen und dem Screening-Liganden zu den am häufigsten verwendeten Methoden zur Verbesserung strukturbasierter virtueller Screening-Ergebnisse[9,26]. Die Andockanalysen wurden mit Glide und dem mit der Schrödinger Suite 2018-3,[27,28] verfügbaren Induced Fit Docking Protokoll durchgeführt. In diesem Stadium der

Analyse wurden verschiedene Andockprotokolle, d.h. starr (Glide) und flexibel (Induced Fit), durchgeführt, um zu untersuchen, ob kleine strukturelle Veränderungen, z.B. aufgrund der Rezeptorflexibilität von InhA, die Ligandenbindung beeinflussen können[29]. Um die Fähigkeit des Andockprotokolls zur Reproduktion der nativen Orientierung des kristallographischen Liganden zu beurteilen, wurde zunächst das Redocking von 5PP in eine eigene 2B36-Kristallstruktur als Kontrolle durchgeführt (siehe Abbildung S1 in den unterstützenden Informationen), wobei die bewertete Root Mean Square Deviation (RMSD) unter 2,0 Å lag. Anschließend wurde das Andocken von CBG und CBC durchgeführt. Eine visuelle Inspektion der Andockkomplexe mit der besten mit Glide vorhergesagten Punktzahl ergab, dass CBG sich in die InhA-Bindungsstelle einfügen konnte, indem es eine ähnliche Ausrichtung wie bei 5PP annahm (Abbildung 2a). Interessanterweise ist eine der Hydroxylgruppen von CBG an einem H-Bindungsnetzwerk von Wechselwirkungen mit Tyr158 und der 2'-Hydroxylgruppe von NADH beteiligt, ähnlich wie 5PP[20]. Diese Wechselwirkungen gelten als besonders wichtig für die katalytische Aktivität von InhA[20,30]. Der Phenolring ermöglicht Stapelwechselwirkungen mit dem Nicotinamidring von NADH. Es wurde vorhergesagt, dass der 3,7-Dimethylocta-2,6-dienylrest zwischen den Resten Phe97, Met103 und Ala198 untergebracht werden könnte, während die n-Pentylgruppe in der Nähe der Reste Phe149, Met155, Tyr158 und Leu218 bindet und hydrophobe Kontakte herstellt.



**Bild: Andocken von CBG und CBC in die mit Glide vorhergesagte Kristallstruktur 2B36. Insbesondere (a,b) berichten die vorhergesagten Bindungsmodi von CBG (dark teal sticks) und dem S-Enantiomer von CBC (dark grey sticks) in den InhA-Rezeptor. NADH wird als Himbeerstäbchen bezeichnet.**

Verschiedene Ergebnisse wurden für CBC erzielt, für die strukturbasierte Vorhersagen nicht mit der ligandenbasierten Ausrichtung übereinstimmten. Insbesondere wurde dem S-Stereoisomer von CBC, das die beste Punktzahl in den Andockberechnungen lieferte, vorhergesagt, InhA mit einem Bindungsmodus zu binden, der im Vergleich zu dem von 5PP in der Kristallstruktur gegenläufig ist (Abbildung 2b und Abbildung S2). Der unterschiedliche Bindungsmodus stammt wahrscheinlich aus der sterischen Abstoßung des 2-(4-Methylpent-3-enyl)-Teils von CBC mit dem NADH-Cofaktor. In diesem Bindungsmodus ist das S-Stereoisomer von CBC an H-Bindungen sowohl mit Tyr158 als auch mit der 2'-Hydroxylgruppe von NADH beteiligt, wie beispielsweise

5PP[20]. Im Gegenteil, das Andocken des R-Enantiomers von CBC an die 2B36-Kristallstruktur lieferte eine Bindungsposition, die keine relevanten H-Bindungswechselwirkungen mit den InhA-Bindungsresten oder NADH herstellte; daher wurde dieses Stereoisomer nicht weiter berücksichtigt. Um die mit Glide erzielten Ergebnisse weiter zu verfeinern, wurde mit BEAR[31] eine Neubewertung der vorhergesagten Andockpositionen durchgeführt. Tatsächlich hat BEAR bereits in einer Vielzahl von virtuellen Screening-Kampagnen und retrospektiven Validierungen, darunter auch das Enoyl ACP-Reduktase-Ziel[32,33,34,35], nachgewiesen, dass die Andockergebnisse verbessert werden. Daher stellt es einen wertvollen Ansatz zur Verfeinerung der Andockergebnisse dar. Interessanterweise lieferte BEAR MM-PBSA freie Bindungsenergien eindeutig zu Gunsten von Cannabigerol, wobei die bewerteten freien Energiewerte  $-28 \text{ Kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$  und  $-20 \text{ Kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$  für CBG bzw. CBC (S Stereoisomer) waren.

Induced Fit Docking-Experimente bestätigten die Glide-Ergebnisse. Tatsächlich posiert das Andocken mit der besten Punktzahl, die durch das Induced Fit-Protokoll vorhergesagt wird, das gut mit denen von Glide überlagert ist, was zeigt, dass die vorhergesagten CBC- und CBG-Bindungsmodi nicht durch die Rezeptorflexibilität von InhA beeinträchtigt wurden (siehe Abbildung S3 der unterstützenden Informationen).

Basierend auf diesen Ergebnissen erwies sich CBG als der beste Kandidat für die Hemmung von InhA. Obwohl CBC nach den ligandenbasierten Analysen strukturell ähnlich dem 5PP-Inhibitor ausfiel, konnte er nicht so gut wie CBG im InhA-Enzym mit Docking untergebracht werden. Um diese Vorhersage zu testen, wurden CBG und CBC von Sigma-Aldrich (Mailand, Italien) gekauft und dann auf die Hemmung der InhA-Enzymaktivität getestet, wie im Abschnitt "Material und Methoden"[36] beschrieben. Insbesondere bestätigten die Experimente, dass CBG InhA mit niedriger mikromolarer hemmender Aktivität hemmt, wobei das bewertete  $\text{IC}_{50}$   $5,2 \pm 0,1 \mu\text{M}$  betrug (siehe Tabelle 1 und Abbildung S4 in den unterstützenden Informationen). Im Gegenteil, CBC erwies sich als inaktiv oder kaum aktiv (Tabelle 1), in Übereinstimmung mit den strukturbasierten Ergebnissen.

Schließlich wurden Andockkomplexe verwendet, um vorzuschlagen, welche strukturellen Veränderungen der CBG die Aktivität dieses Cannabinoids möglicherweise verbessern könnten. Insbesondere die Substitution des 3,7-Dimethylocta-2,6-dienylteils von CBG durch aromatische Ringe, die in die von Met98, Phe97, Pro99, Gln100, Met103 und Ala198 ausgekleidete Tasche passen, könnte die Bindung an InhA[20,37,38] verbessern. Ebenso würden Substitutionen des n-Pentylteils von CBG durch zyklische aliphatische oder Arylgruppen zusätzliche van der Waals-Kontakte mit den Phe149-, Met155-, Pro193-, Ile215- und Leu218-Resten ermöglichen, von denen erwartet wird, dass sie eine verbesserte Aktivität für InhA liefern, wie bereits bei anderen InhA-Inhibitoren[39] beobachtet.

## 3. Material und Methoden

### 3.1. Ligandenbasiertes virtuelles Screening auf der DrugBank-Datenbank

Verbindungen mit zugehörigen bioaktiven Annotationen wurden zunächst aus der DrugBank-Datenbank ([www.drugbank.ca](http://www.drugbank.ca), Zugriff am 20. April 2018) abgerufen[18]. Dann wurden Verbindungen mit anerkannten toxischen und reaktiven funktionellen Gruppen oder Übergangsmetallen und einem Molekulargewicht von weniger als 150 oder mehr als 850 Da entfernt, was zu einer Datenbank mit 6014 einzigartigen Verbindungen führte. Für die Filterberechnungen wurde die FILTER-Software (OpenEye, Santa Fe, Mexiko) verwendet[40]. Anschließend wurden alle Kombinationen von Stereoisomeren, Ionisationszuständen und Tautomeren, die möglicherweise bei neutralem pH-Wert vorhanden sind, sowohl für die untersuchten Cannabinoide als auch für die gefilterten DrugBank-Liganden mit Hilfe der

Quacpac Python-Toolkits[41] erzeugt. Vordefinierte Chiralitäten wurden unverändert gehalten und vorbehandelte Strukturen entsprechend dem MMFF-Kraftfeld[42] minimiert. Schließlich wurden bis zu 10 bzw. 600 Konformatoren für die untersuchten Cannabinoide bzw. die gefilterten DrugBank-Verbindungen erzeugt. Ein Cutoff von 0,5 Å bei RMSD und ein Energiefenster von 10 kcal/mol wurden als Parameter verwendet, um Konformatoren während der Konformationsprüfung mit der OMEGA-Software zu akzeptieren[40,43].

Ein multi-conformer versus multi-conformer 3D Shape-based Virtual Screening wurde durchgeführt, um das Ähnlichkeitsprofil der untersuchten Cannabinoide in Bezug auf die gefilterten DrugBank-Verbindungen zu bewerten. Die ROCS-Software (Version 3.2.1.4) wurde als Motor für die Ähnlichkeitsberechnungen verwendet[25,44]. Schließlich wurden die Ligandenausrichtungen visuell überprüft und die Aktivitätsannotationen der DrugBank-Verbindungen sorgfältig analysiert.

### **3.2. Strukturbasiertes virtuelles Screening auf Enoyl Acyl Carrier Protein (ACP) Reduktase**

Die InhA-Kristallstruktur (PDB-Code: 2B36) wurde zunächst heruntergeladen und mit dem Modul Protein Preparation Wizard vorverarbeitet, das in der Schrödinger Suite 2018-3[20,45] verfügbar ist. Insbesondere Atomtypen und Bindungskonnektivitätsprobleme in der heruntergeladenen Kristallstruktur wurden behoben. Außerdem wurden fehlende Seitenketten mit Prime (Version 5.3)[46] wieder aufgebaut. Anschließend wurden den vorbehandelten Kristallstrukturen Wasserstoffatome hinzugefügt und ihre Koordinaten energieminiert. Schließlich wurden Ionen, Lösungsmittel und Wassermoleküle entfernt.

Die Andockberechnungen wurden sowohl mit Glide (Version 8.0.0.012) als auch mit dem in der Schrödinger Suite (New York, NY, USA) 2018-3[27,28] verfügbaren Induced Fit Docking Protokoll durchgeführt. Der NADH-Kofaktor wurde in die Andockberechnungen einbezogen und als Teil des Rezeptors betrachtet. Im Falle von Glide wurden Rezeptorgitter um die Koordinaten der gebundenen Liganden herum generiert (äußerer Kasten von 10 Å × 10 Å × 10 Å × 10 Å × 10 Å), wobei starre Andockberechnungen mit Standardeinstellungen durchgeführt wurden. Sowohl die Rückstände, die die Proteinbindungsstelle als auch den NADH-Kofaktor auskleiden, wurden in den Glide-Berechnungen als starre Elemente betrachtet, während der "flexible"

Probenahmemodus für den Liganden zur Bestimmung der optimalen Ligandenkonformation und -orientierung (Standardeinstellungen) verwendet wurde. Für jeden Liganden wurde nur die Pose mit dem besten Andockwert beibehalten und visuell überprüft. Im Falle des Induced Fit Docking wurden die Standardeinstellungen für die Generierung des Rezeptorgitters verwendet, während die Berechnungen für das Andocken der Liganden an die Kristallstruktur 2B36 wie folgt durchgeführt wurden. Zuerst wurden die van der Waals-Radien von Protein und Ligand um den Faktor 0,8 skaliert, danach wurden die Verbindungen mit dem Standard-Glide SP-Protokoll an das Protein angedockt. Dann wurde Prime verwendet, um die Proteinseitenketten um den Liganden herum vorherzusagen und zu optimieren. In dieser Phase der Verfeinerung wurden die Rückstände innerhalb von 5 Å jeder Ligandenposition optimiert, während der NADH-Cofaktor starr gehalten wurde. Andere Parameter wurden auf den Standard gesetzt. Schließlich wurden die Posen mit dem Glide XP-Protokoll neu angedockt und anschließend bewertet. Zwanzig Posen mit den besten Ergebnissen wurden für jeden Liganden im letzten Schritt der Andockberechnungen aufbewahrt, um sie visuell zu überprüfen.

Das Andockverfahren wurde validiert, indem der co-crystallized 5PP-Ligand vor dem Cannabigerol- (CBG) und Cannabichromen- (CBC) Screening in seine Kristallstruktur umdockt wurde. Anschließend wurden CBG und CBC mit LigPrep für die Andockberechnungen vorbereitet[47]. Insbesondere wurden alle Kombinationen von Stereoisomeren, Ionisationszuständen und Tautomeren, die bei physiologischem pH-Wert in wässriger Lösung möglicherweise vorhanden sind, zunächst erzeugt und dann gemäß dem Kraftfeld

OPLS\_2005[48] minimiert. Schließlich wurden die Verbindungen an der aktiven InhA-Stelle angedockt. Darüber hinaus wurde das BEAR-Tool, das molekulardynamische und bindende Schätzungen der freien Energie mit dem Ziel der Verfeinerung von Liganden-Protein-Komplexen und der Schätzung der bindenden Energetik integriert, eingesetzt, um die mit Glide erzielten Andockergebnisse weiter zu verfeinern[31,32,33,33,34,35]. Die Standardeinstellungen wurden verwendet, um die Docking-Posen mit BEAR[31] neu zu bewerten. Ein letzter Schritt der visuellen Inspektion der erzeugten Posen bestätigte die Auswahl von CBG und CBC als potenzielle Kandidaten-Inhibitoren, die ausgemustert werden sollen.

### **3.3. In Vitro-Test der Verbindungen am InhA-Enzym**

CBG, CBC, NADH und die Triclosan-Standardsteuerung wurden von Sigma-Aldrich gekauft. Die Stammlösungen der untersuchten Verbindungen wurden in DMSO so hergestellt, dass ihre Endkonzentration 5% v/v beträgt, in einem Endvolumen von 1 mL für alle kinetischen Reaktionen. Kinetische Assays wurden unter Verwendung des trans-2-Dodecenoyl-Coenzym A (DDCoA) und des Wildtyps InhA durchgeführt, wie bereits beschrieben[49]. Kurz gesagt, wurden die Reaktionen bei 25 °C in einem wässrigen Puffer (30 mM PIPES und 150 mM NaCl pH: 6,8) durchgeführt, der zusätzlich 250 µM Cofaktor (NADH), 50 µM Substrat (DDCoA) und die getestete Verbindung (bei 50 µM oder 10 µM) enthält. Die Reaktionen wurden durch Zugabe von InhA (50 nM final) eingeleitet und die NADH-Oxidation bei 340 nm verfolgt. Die inhibitorische Aktivität jedes Derivats wurde als prozentuale Hemmung der InhA-Aktivität (Anfangsgeschwindigkeit der Reaktion) in Bezug auf die Kontrollreaktion ohne Inhibitor ausgedrückt. Triclosan wurde als Positivkontrolle verwendet. Alle Aktivitätsassays wurden in dreifacher Ausführung durchgeführt. Für die stärkste Verbindung wurden die IC50-Werte mit Hilfe der 4-Parameter-Kurvenanpassungssoftware XLfit (IDBS) mit mindestens sechs Punkten bestimmt.

## **4. Schlussfolgerungen**

Zusammenfassend beschrieben wir die Anwendung eines integrierten ligandenbasierten und strukturbasierten in silico Repositionierungsansatzes, um potenzielle Targets von nicht-psychoactiven Cannabinoiden zu identifizieren. Das Potenzial des vorgeschlagenen Ansatzes wurde an Cannabigerol (CBG) und Cannabichromen (CBC) getestet, was zur Identifizierung von CBG als niedrigmolekularem Inhibitor des InhA-Enzyms führte. Tatsächlich ist bekannt, dass natürlich vorkommende Cannabinoide eine antibakterielle Aktivität in verschiedenen Bakterienstämmen besitzen[17,50], aber nach unserem besten Wissen wurden ihre biologischen Ziele nie identifiziert. Unsere Studie zeigt, dass CBG ein InhA-Hemmer ist. Interessanterweise ist CBG eine Verbindung mit geringem Molekulargewicht und einem guten Sicherheitsprofil. Damit stellt es einen wertvollen Ausgangspunkt für die Entwicklung neuer synthetischer Derivate mit verbesserter Aktivität dar und ebnet den Weg zu neuen interessanten Möglichkeiten der Behandlung von Infektionskrankheiten. Schließlich zeigte unsere Studie, dass die Integration von struktur- und ligandenbasierten Methoden zu genaueren Vorhersagen über bioaktive Verbindungen führen kann[8]. Dieser Ansatz kann angewendet werden, um jeden natürlichen und synthetischen Liganden effizient in Richtung anderer interessanter therapeutischer Ziele umzuwandeln.

## **Ergänzende Materialien**

Die folgenden Informationen sind online unter <https://www.mdpi.com/1420-3049/24/14/2567/s1> verfügbar. Abbildung S1: Überlagerung der von Glide vorhergesagten 5PP-Bindungsmodi und der Induced Fit-Protokolle mit ihrer kristallographischen Konformation; Abbildung S2: Überlagerung der vorhergesagten ligandenbasierten und strukturbasierten (mit Glide) Posen von CBC; Abbildung S3: CBG- und CBC-Bindungsmodi, die durch das Induced Fit Docking-Protokoll vorhergesagt werden; Abbildung S4: die Dosis-Wirkungs-Kurve von CBG auf InhA; Tabelle S1: Ähnlichkeitswerte, die mit ROCS von CBC und CBG in Bezug auf die DrugBank-Liganden erhalten wurden.

Quelle: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6680637/>