

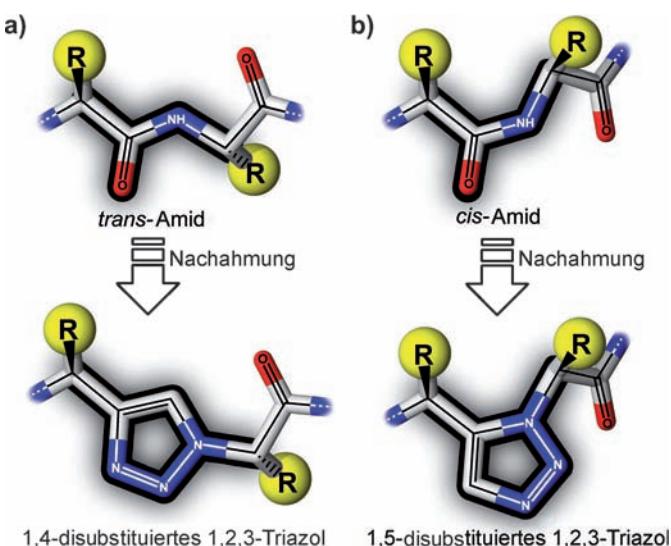
# Peptid in Ketten: Einblicke in die Struktur-Aktivitäts-Beziehungen von Proteaseinhibitormimetika mit fixierten Amidkonformationen\*\*

Marco Tischler, Daichi Nasu, Martin Empting, Stefan Schmelz, Dirk W. Heinz, Philipp Rottmann, Harald Kolmar, Gerd Bunkowsky,\* Daniel Tietze\* und Olga Avrutina\*

Die Architektur von Proteinmakromolekülen hängt fundamental von der sequenziellen Anordnung der Peptidbindungen in definierten Konformationen ab. Ausgehend von den drei Torsionswinkeln ( $\varphi$ ,  $\psi$  und  $\omega$ ) jedes Aminosäurerestes ist die Amidbindung ( $\omega$ ) aufgrund ihres partiellen Doppelbindungscharakters intrinsisch gehindert und beschränkt sich daher mehr oder weniger auf eine *cis*- oder *trans*-Konformation (Abbildung 1).<sup>[1]</sup> Im Allgemeinen nehmen Amidbindungen bevorzugt eine *trans*-Konformation ein, da diese ungünstige Wechselwirkungen mit benachbarten Aminosäuren minimiert.<sup>[1d]</sup> Nichtsdestotrotz sind *cis*-Amidbindungen, wenn sie auftreten, in der Regel unerlässlich für eine Biaktivität.<sup>[2]</sup>

Betrachtet man die *cis/trans*-Verteilung zwischen nicht-Prolyl-Peptidbindungen und Xaa-Pro-Motiven, so steigt der *cis*-Anteil drastisch von ca. 0.03 % auf ca. 6 %.<sup>[1a-c,e]</sup> Diese Eigenschaft resultiert direkt aus der für Prolin charakteristischen cyclischen und sterisch gehinderten Seitenkette und dem sich daraus ergebenden starken strukturellen Einfluss auf die vorangegangene Peptidbindung.<sup>[3]</sup>

Die *cis-trans*-Isomerisierung (CTI) erweitert biomolekulare Systeme über die strukturelle Besonderheit der *cis*-Amidbindung hinaus um eine kinetische Dimension. Tatsächlich handelt es sich bei der CTI nicht nur um einen der geschwindigkeitsbestimmenden Schritte für die Proteinfaltung,<sup>[4]</sup> sondern vielmehr ermöglicht die CTI auch eine zeitabhängige konformativ Schaltung und somit eine dynamische Modulierung von Struktur und Aktivität.<sup>[3]</sup>



**Abbildung 1.** Allgemeine Darstellung der eingebauten Triazolyl-Amid-Mimetika in einem Peptidrückgrat. a) *trans*-Amid-Mimetika durch 1,4-disubstituierte 1,2,3-Triazole, b) *cis*-Amid-Mimetika durch 1,5-disubstituierte 1,2,3-Triazole. Die Rückgrat-Atome sind als Stäbe und die Seitenketten als Kugeln dargestellt. Die Lewis-Struktur ist mit der entsprechenden Stereoinformation überlagert. N blau, C hellgrau, O rot, Seitenketten gelb; H-Atome wurden zur besseren Übersicht weggelassen. Die betrachteten *trans*- und *cis*-Amid-Bindungen, die den Diederwinkel definieren ( $\omega$ -Torsionswinkel), und die jeweiligen Triazol-basierten Mimetika sind durch schwarze Umrandungen hervorgehoben.

In den letzten zehn Jahren wurde über den Einbau verschiedener Strukturmimetika für *cis*-Amide in Peptide und Proteine berichtet, darunter Pseudoproline,<sup>[2f,5]</sup> disubstituierte Tetrazole<sup>[6]</sup> und Triazole.<sup>[2a,e,7]</sup> So wurde beispielsweise eine Asn-*cis*-Pro-Bindung in boviner Pankreas-Ribonuclease (RNase A) durch eine Triazolyl-Einheit mittels Ligation exprimierter Proteine<sup>[8]</sup> ersetzt, ohne dass dabei die katalytische Aktivität verloren ging.<sup>[2e]</sup> Insgesamt zeigte sich, dass sich disubstituierte 1,2,3-Triazole, entsprechend ihres Substitutionsmusters, als funktionelle Surrogate sowohl für *cis*- als auch für *trans*-Amidbindungen eignen (Abbildung 1).<sup>[2e,9]</sup>

Unseres Wissens konnten bislang keine detaillierten Erkenntnisse über die molekulare Architektur und die strukturellen Anforderungen eines auf einer 1,5-disubstituierten 1,2,3-Triazolyl-Einheit basierenden, bioaktiven *cis*-Amid-Mimetikums während der Bindung an sein Zielenzym erhalten werden.

Hier demonstrieren wir die Anwendungsmöglichkeit modularer Triazol-basierter Peptidrückgrat-Elemente, um sowohl *cis*- als auch *trans*-Amide innerhalb der funktionellen

[\*] M. Tischler,<sup>[+]</sup> P. Rottmann, Prof. Dr. G. Bunkowsky, Dr. D. Tietze  
Eduard-Zintl-Institut für Anorganische und Physikalische Chemie  
Technische Universität Darmstadt

Petersenstraße 22, 64287 Darmstadt (Deutschland)  
E-Mail: Gerd.Bunkowsky@chemie.tu-darmstadt.de  
tietze@chemie.tu-darmstadt.de

Homepage: <http://www.tu-darmstadt.de/fb/ch/akbunkowsky>

D. Nasu,<sup>[+]</sup> M. Empting,<sup>[+]</sup> Prof. Dr. H. Kolmar, Dr. O. Avrutina  
Clemens-Schöpf-Institut für Organische Chemie und Biochemie  
Technische Universität Darmstadt

Petersenstraße 22, 64287 Darmstadt (Deutschland)

E-Mail: Avrutina@Biochemie-TUD.de

Dr. S. Schmelz, Prof. Dr. D. W. Heinz  
Abteilung Molekulare Strukturbioologie  
Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung (HZI)  
Inhoffenstraße 7, 38124 Braunschweig (Deutschland)

[+] Diese Autoren trugen zu gleichen Teilen zu dieser Arbeit bei.

[\*\*] Diese Forschung wurde durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft (Projektnr. Ko 1390/9-1) und LOEWE-Soft Control gefördert.

Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.201108983> zu finden.

Schleife eines Bowman-Birk-Proteaseinhibitors (BBI)<sup>[10]</sup> zu fixieren. Hochauflösende Kristallstrukturen zeigten sehr detailliert die strukturellen Besonderheiten von hochpotenten Peptidomimetika sowohl mit eingebauten *cis*- als auch *trans*-Triazolyl-Amid-Surrogaten bei der Bindung an bovinen Trypsin. Unsere Ergebnisse liefern neue Informationen über das Verhalten von Triazolyl-Einheiten in aktiven Biomolekülen und erlauben eine Neubewertung ihrer sterischen und elektronische Homologie zur nativen Peptidbindung.

Als Modellpeptid wurde der hochpotente Sunflower-Trypsininhitor 1 (SFTI-1) aus *Helianthus annuus* gewählt.<sup>[11]</sup> In der nativen Form ist seine 14 Aminosäuren lange Sequenz GRCKSIPPICFPD Cystin-verbrückt, Kopf-Schwanz-cyclisiert und enthält als essenziellen Bestandteil für seine Bioaktivität eine Ile-*cis*-Pro-Amid-Bindung.<sup>[12]</sup> Vor kurzem haben wir den Einfluss geringfügiger Veränderungen auf Struktur und Aktivität innerhalb der formgebenden Regionen, wie z. B. der Disulfidbrücke, untersucht und die Eignung der offenkettigen Variante (SFTI-1[1,14]) als Testsystem demonstriert.<sup>[13]</sup> Aufgrund der stark konservierten kanonischen Konformation der funktionellen Schleife von Proteaseinhibitoren haben schon sehr geringe sterische Veränderungen im sub-Ångström-Bereich die Bioaktivität der untersuchten Peptidomimetika deutlich beeinflusst.<sup>[13]</sup>

Neben dem Cystinmotiv ist die *cis*-Amidbindung zwischen Ile7 und Pro8 ein prominentes Strukturelement innerhalb der Inhibitorschleife von SFTI-1[1,14] und entscheidend für die Bioaktivität (Abbildung 2).<sup>[12]</sup> Demnach erschien der Austausch dieses konformativen Archetypus durch ein 1,5-disubstituiertes 1,2,3-Triazolmimetikum als ein vielverspre-

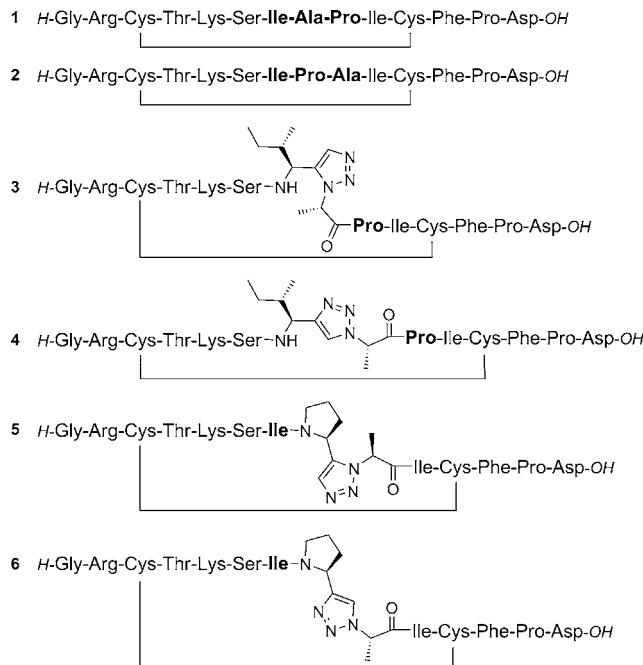
chendes Konzept, obwohl vorhergehende Versuche, dieses spezielle Motiv durch nichtnatürliche Surrogate zu ersetzen, nicht erfolgreich waren.<sup>[14]</sup> Folglich sollte ein *cis*-Amid-Mimetikum nicht nur die vorgegebenen sterischen Anforderungen genau erfüllen, sondern auch eine vergleichbare chemische Umgebung erzeugen.

Untersuchungen zeigten, dass die Substitution von Pro8 durch ein Alanin (Abbildung 2, Substanz **1**) zu einem drastischen Verlust der inhibitorischen Aktivität gegenüber Trypsin führte.<sup>[12]</sup> Dies wurde offensichtlich durch die konformative Heterogenität und den Verlust des stabilisierenden *cis*-Amid-Effekts des Prolins verursacht. Zur Validierung und um die Konsistenz unserer Ergebnisse abzusichern, bezogen wir die entsprechenden Pro→Ala-Mutanten **1** und **2** mit in diese Arbeit ein.

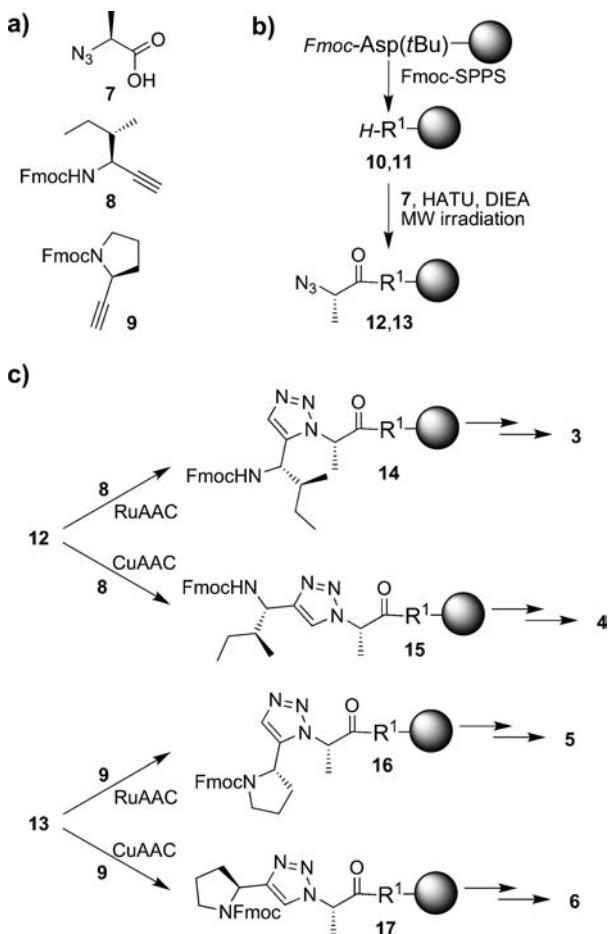
Zusätzlich ersetzten wir noch die nachfolgende *trans*-Amidbindung durch ein entsprechendes 1,4-disubstituiertes Gegenstück **6** und synthetisierten überdies SFTI-1[1,14]-Derivate mit entsprechend falschem Substitutionsmuster des Triazols (**4** und **5**). Zum besseren Verständnis verwenden wir für die eingeführten Dipeptid-Surrogat einen Dreibuchstabencode, der den Einbuchstabencode der nachgeahmten Aminosäuresequenz benutzt. Die Konformation der Amidbindung, die durch das Triazol fixiert wird, wird durch ein „c“ oder „t“ symbolisiert.

Konformativ eingeschränkte nicht-Prolyl-Peptidrückgratmotive sind leicht durch Festphasenpeptidsynthese zugänglich. Alle Peptide und Peptidomimetika wurden an der festen Phase unter Verwendung von kommerziell erhältlichen Synthesebausteinen oder synthetischen Vorstufen hergestellt (Schema 1 und Hintergrundinformationen). (S)-2-Azidopropansäure (**7**) und die Fmoc-geschützten Alkin-Komponenten **8** und **9** wurden nach Literaturvorschrift hergestellt.<sup>[15]</sup>

Zuerst wurde Azid **7** in Position 8 oder 9 der wachsenden Peptidkette unter Anwendung von In-situ-Aktivierung in DMF unter milder Mikrowelleneinstrahlung eingebracht. Die nachfolgende Synthese der 1,4- oder 1,5-disubstituierten 1,2,3-Triazole **14–17** wurde durch Kupfer(I)- oder Ruthenium(II)-katalysierte Azid-Alkin-Cycloaddition (CuAAC bzw. RuAAC) an der festen Phase erreicht.<sup>[2a, 7b, 13, 16]</sup> Die mikrowellengestützte Fmoc-SPPS wurde fortgeführt, bis die Peptidsequenz vervollständigt war. Die cyclischen Peptide und Peptidomimetika **1–6** wurden nach acidolytischer Spaltung, Fällung, Oxidation durch DMSO oder Luft und chromatographischer Aufreinigung im Multimilligramm-Maßstab erhalten. Um Einblicke in die räumlichen Aspekte der Konformation der reaktiven Schleife während der Bindung an eine Serin-Protease zu erhalten, wurden Computerstudien (Hintergrundinformationen) und kristallographische Analysen entsprechend einer durch uns modifizierten Literaturvorschrift<sup>[17]</sup> durchgeführt. Letztere führten zu hochauflösten Kristallstrukturen der Komplexe von bovinem Trypsin mit [*IcA*<sup>7,8</sup>]SFTI-1[1,14] (**4**) und [*PtA*<sup>8,9</sup>]SFTI-1[1,14] (**6**) (Abbildung 3). Das Inhibitionsvermögen aller synthetisierten SFTI-Derivate wurde in enzymkinetischen Studien mit Aktivzentrum-titriertem Trypsin unter Verwendung des chromogenen Substrats *Boc*-QAR-*pNA* bestimmt. Die effektiven und Substrat-unabhängigen Inhibitionskonstanten ( $K_{i,app}$  und  $K_i$ ) wurden wie bereits früher berichtet bestimmt.<sup>[10b, 13]</sup> Wie in

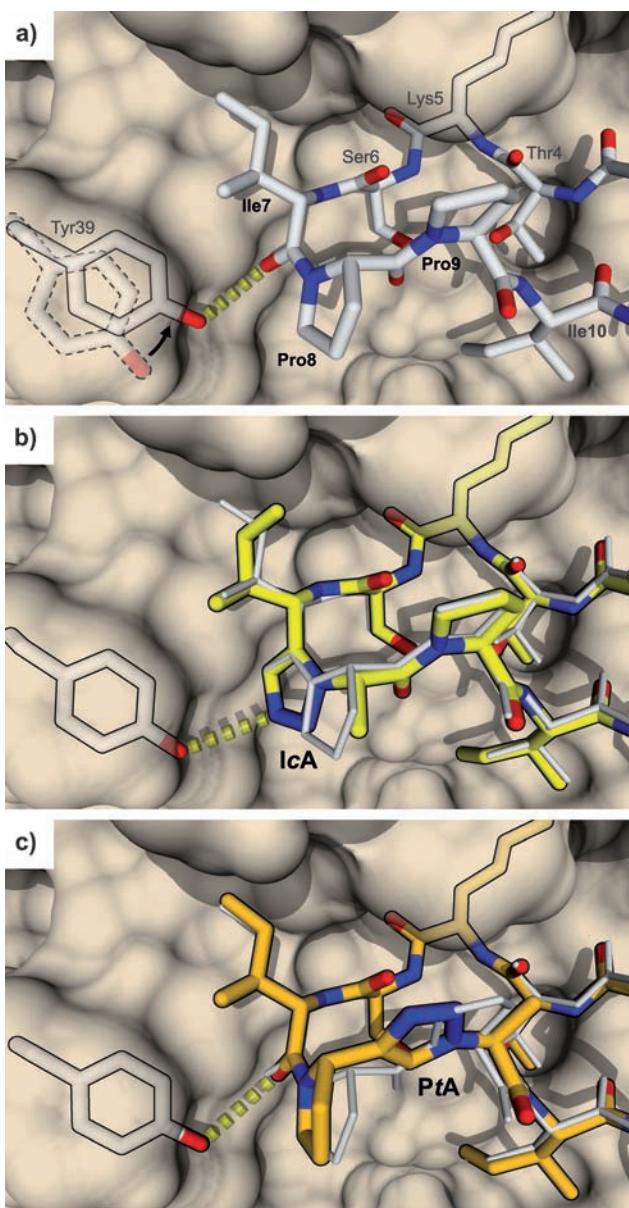


**Abbildung 2.** Übersicht der synthetisierten Substanzen: [*Ala*<sup>8</sup>]SFTI-1[1,14] (**1**), [*Ala*<sup>9</sup>]SFTI-1[1,14] (**2**), [*IcA*<sup>7,8</sup>]SFTI-1[1,14] (**3**), [*ItA*<sup>7,8</sup>]SFTI-1[1,14] (**4**), [*PcA*<sup>8,9</sup>]SFTI-1[1,14] (**5**), [*PtA*<sup>8,9</sup>]SFTI-1[1,14] (**6**). Die untersuchten *cis*- (zwischen Ile7 und Pro8) und *trans*-Amide (zwischen Pro8 und Pro9) sind fett hervorgehoben.



**Schema 1.** a) Azid- und Alkin-Bausteine (2S)-2-Azidopropansäure (7), (2S,3S)-N-(9-Fluorenylmethyloxycarbonyl)-1-ethinyl-2-methylbutylamin (8) und (2S)-N-(9-Fluorenylmethyloxycarbonyl)-2-ethinylpyrrolidin (9). b) Kupplung der Azidoaminosäure an das Harz 12 und 13. c) Synthese der oxidierten Peptidomimetika 3–6. Fmoc-SPPS: Fmoc-gestützte Festphasenpeptidsynthese; HATU: 2-(1H-7-Azabenzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-Tetramethyluronium-hexafluorophosphat; DIEA: N,N-Diisopropylethylamin; MW: Mikrowellen; RuAAC: Ruthenium(II)-katalysierte Azid-Alkin-Cycloaddition mit  $[\text{Cp}^*\text{Ru}(\text{cod})\text{Cl}]$  ( $\text{Cp}^* = \text{C}_5\text{Me}_5$ , cod = Cyclooctadien) als Katalysator; CuAAC: Kupfer(I)-katalysierte Azid-Alkin-Cycloaddition mit  $\text{CuSO}_4$ , Natriumascorbat und DIEA zur Katalyse; mehrfache Reaktionspfeile am Ende der Synthesesequenz: Fmoc-SPPS, acyldiytische Spaltung, Fällung, DMSO- oder Luft-vermittelte Oxidation und chromatographische Aufreinigung.

Tabelle 1 zu sehen ist, führte die „falsche“ Konformation an beiden untersuchten Positionen zu einem drastischen Verlust der Inhibitorkaktivität. So führte der Austausch des Alanins an Position 8 (SFTI-Derivat **1**) zum Verlust des *cis*-stabilisierenden Effekts von Prolin und damit zu einer dynamischen Unordnung der Inhibitorschleife. Das Fixieren der *trans*-Konformation an dieser Position durch ein 1,4-disubstituiertes 1,2,3-Triazol hatte einen noch drastischeren Effekt: Peptidomimetikum **4** besaß die geringste Aktivität aller untersuchter Verbindungen. Umgekehrt zeigte die Variante mit einer festen *cis*-Konformation unter Verwendung eines 1,5-



**Abbildung 3.** Vergleich der Inhibitorschleifen von SFTI-1 und den Peptidomimetika **3** und **6** in den zugehörigen Protease-Inhibitor-Komplexen. Strukturen wurden an Lys5 der Inhibitoren ausgerichtet. Dargestellt sind die Orientierungen der Seitenkette von Tyr39 des Trypsins (Oberfläche) vor (gestrichelte Außenlinien) und nach Energieminimierung (durchgängig) und die gebildeten Wasserstoffbrücken (Software: YASARA structure, Kraftfeld: AMBER03, Grafik: POVRay). Inhibitoren sind als Stäbe dargestellt; N blau, O rot; H-Atome wurden zur besseren Übersicht weggelassen. a) natives bicyclisches SFTI-1 (C weiß, PDB-ID-Code: 1SFI). b) [ $\text{IcA}^{7,8}\text{SFTI-1[1,14]}$ ] (**3**; durchgängige Umrandung, C citronengelb, PDB-ID-Code: 4ABJ) in Überlagerung mit 1SFI (dünn, weiß). c) [ $\text{PtA}^{3,9}\text{SFTI-1[1,14]}$ ] (**6**; durchgängige Umrandung, C orange, PDB-ID-Code: 4ABI) in Überlagerung mit 1SFI (dünn, weiß).

substituierten Triazolyl-Bausteins zwischen Ile7 und Ala8 (Substanz **3**) eine deutliche Steigerung der Bioaktivität im Vergleich zu Substanz **1**, wenn auch nicht im Bereich des Ausgangspeptids SFTI-1[1,14]. Dies lässt sich durch die Kristallstrukturen des Wildtyp-Inhibitors und **3** im Komplex mit Trypsin (Abbildung 3) erklären. Daraus geht hervor, dass

**Tabelle 1:** Inhibitorische Aktivitäten der Substanzen **1–6** und monocyclischem SFTI-1[1,14] (Wildtyp, wt).<sup>[13]</sup>

Verbindung	Sequenz	$K_i$ [nM] <sup>[a]</sup>	Relative Aktivität
<b>1</b>	GRCTKSIAPICFPD	178 ± 25	1 <sup>[b]</sup>
<b>2</b>	GRCTKSIPAIICFPD	3.2 ± 0.5	1 <sup>[c]</sup>
<b>3</b>	GRCTKS[ <b>cA</b> ]PICFPD	34 ± 5	0.2 <sup>[b]</sup>
<b>4</b>	GRCTKS[ <b>tA</b> ]PICFPD	302 ± 50	1.7 <sup>[b]</sup>
<b>5</b>	GRCTKS[ <b>PcA</b> ]ICFPD	255 ± 42	80 <sup>[c]</sup>
<b>6</b>	GRCTKS[ <b>PtA</b> ]ICFPD	6.3 ± 1.8	2 <sup>[c]</sup>
wt	GRCTKSIPICFPD	0.2 ± 0.03	—

[a] Die Fehler von  $K_i^{app}$  und  $K_M$  wurden durch Fehlerfortpflanzung ermittelt (siehe Hintergrundinformationen). Die relativen Aktivitäten wurden als Verhältnis des  $K_i$ -Wertes der jeweiligen Verbindung bezogen auf [b] **1** oder [c] **2** berechnet.

SFTI-1 in der Lage ist, über den Carbonyl-Sauerstoff von Ile7 eine Wasserstoffbrücke mit der phenolischen Hydroxygruppe von Tyr39 nahe der Bindungstasche der Protease zu bilden. Diese Erkenntnis wird durch Computerstudien gestützt, da eine auf die Kristallstruktur (pdb: 1SFI) angewendete Energieminimierung (AMBER-Kraftfeld) zur Bildung der entsprechenden Wasserstoffbrücke führte, die zur Bindungsenthalpie von SFTI-1[1,14] beitragen kann. Weiterhin wurden für die Atome N2 und N3 in 1,2,3-Triazolen Wasserstoffbrückenakzeptoreigenschaften gefunden,<sup>[18]</sup> die teilweise die fehlenden natürlichen Interaktionen kompensieren könnten.

Gemäß unserer Erwartungen hatten sowohl der Austausch des Alanins an Position 9 (**2**) als auch das Fixieren der *trans*-Konformation mithilfe des 1,4-disubstituierten 1,2,3-Triazols zwischen Pro8 und Ala9 (**6**) keinen ausgeprägten Einfluss auf die Bioaktivität. Dies lässt sich anhand der Tatsache erklären, dass bei diesen Verbindungen kaum signifikante Veränderungen im Vergleich zur nativen Konformation stattfanden und in diesem Bereich auch keine für die Aktivität essenziellen Wechselwirkungen zwischen Position 9 und Trypsin in der Kristallstruktur beobachtet werden konnten (Abbildung 3c). Demgegenüber bewirkte das gezielte Einführen konformativer Störungen (**5**) einen drastischen Verlust der Bindungsaaffinität.

Allerdings muss erwähnt werden, dass das 1,4-disubstituierte 1,2,3-Triazol, bedingt durch seine intrinsische Architektur, als *trans*-Amid-Element den Abstand zwischen den  $\alpha$ -Kohlenstoffen der angrenzenden Aminosäurereste um 1.3 Å vergrößert. Dagegen bleiben im Fall des 1,5-disubstituierten 1,2,3-Triazolyl-*cis*-Amid-Mimetikums die Bindungslänge und die räumliche Anordnung nahezu vollständig erhalten (Zunahme des Abstands der  $\alpha$ -Kohlenstoffe: 0.376 Å). Interessanterweise zeigte die Kristallstruktur des Peptidomimetikums **6**, dass die Hauptorientierung des eingebauten 1,4-disubstituierten 1,2,3-Triazols signifikant von der Geometrie des erwarteten Wasserstoffbrückenprofils abweicht (siehe Hintergrundinformationen).<sup>[9b]</sup>

Zusammenfassend konnten wir zeigen, dass 1,4- und 1,5-disubstituierte 1,2,3-Triazole als funktionsfähige Surrogate zur Erzeugung fixierter *trans*- oder *cis*-Konformationen in die Sequenz synthetischer Peptide eingeführt werden können. Nur Peptidomimetika, die den nativen Amid-Isomeren entsprechen, zeigten ein hohes Inhibitionsvermögen (zweistelli-

ge nanomolare  $K_i$ ). Unser Ansatz ermöglicht die Einführung der eher ungewöhnlichen *cis*-Konformation in empfindliche und strukturgebende Bereiche der funktionellen Schleife des Bowman-Birk-Inhibititors SFTI-1 durch den Einbau von nicht-Prolyl-Rückgrateinheiten. Der Austausch des Prolins, das für die Bildung der essenziellen *cis*-Amidbindung wichtig ist, durch eine andere der 19 natürlichen Aminosäuren, führt für gewöhnlich zur Bildung des ungewünschten *trans*-Isomers. Die gezeigte Synthesestrategie ermöglicht es prinzipiell, jede gewünschte Seitenkette zu integrieren, ohne dabei die Rückgratstruktur zu zerstören, was einen Zugang zu maßgeschneiderten *cis*-Amid-Mimetika erlaubt, die vorher vom rationalen Design ausgeschlossen waren.

Generell stellt SFTI-1 ein wertvolles Grundgerüst zur Entwicklung selektiver Proteaseinhibitoren mit diagnostischer und therapeutischer Relevanz dar.<sup>[11a,19]</sup> Da alle BBIs ein konserviertes *cis*-Pro-Motiv in ihrer funktionellen Schleife aufweisen, können die für SFTI-1-Derivate erhaltenen Daten und strukturellen Erkenntnisse für die gesamte Inhibitorfamilie angewendet werden.<sup>[20]</sup> Da sich jedoch andere Trypsin-artige Proteasen von pharmazeutischer Relevanz in ihrer Aminosäurenzusammensetzung in räumlicher Nähe zur Enzymsbindungstasche unterscheiden können, sollte der Verlust der Bindungsaaffinität für das *cis*-Amid-Mimetikum **3**, der mutmaßlich durch Veränderungen im intermolekularen Wasserstoffbrückenmuster bewirkt wird, kein generelles Problem sein.

Die Verwendung von Triazol-basierten Peptidomimetika kann für verschiedene biochemische Anwendungen von Nutzen sein, da sie, anders als native Amidbindungen, nicht für proteolytische Hydrolyse zugänglich sind. Dadurch kann eine verbesserte metabolische Stabilität erwartet werden.<sup>[21]</sup> Die gesammelten kristallographischen Daten liefern zudem grundlegende Informationen für die weiterführende Forschung zur Verbesserung von peptidomimetischen Proteaseinhibitoren durch Einführung von nichtnatürlichen (Triazol)-Einheiten in ihren aktivitätsdefinierenden Regionen.

Eingegangen am 20. Dezember 2011  
Online veröffentlicht am 28. Februar 2012

**Stichwörter:** Amidmimetika · Bowman-Birk-Inhibitoren · Kristallstrukturanalyse · Proteaseinhibitoren

- [1] a) J. Song, K. Burrage, Z. Yuan, T. Huber, *BMC Bioinf.* **2006**, *7*, 124; b) A. Jabs, M. S. Weiss, R. Hilgenfeld, *J. Mol. Biol.* **1999**, *286*, 291–304; c) D. Pal, P. Chakrabarti, *J. Mol. Biol.* **1999**, *294*, 271–288; d) E. Stewart, A. Sarkar, J. E. Wampler, *J. Mol. Biol.* **1990**, *214*, 253–260; e) M. S. Weiss, A. Jabs, R. Hilgenfeld, *Nat. Struct. Biol.* **1998**, *5*, 676.
- [2] a) W. S. Horne, C. A. Olsen, J. M. Beierle, A. Montero, M. R. Ghadiri, *Angew. Chem.* **2009**, *121*, 4812–4818; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 4718–4724; b) K. P. Exarchos, T. P. Exarchos, G. Rigas, C. Papaloukas, D. I. Fotiadis, *BMC Bioinf.* **2011**, *12*, 142; c) C. Freund, P. Gehrig, A. Baici, T. A. Holak, A. Plückthun, *Folding Des.* **1998**, *3*, 39–49; d) M. Keller, C. Boissard, L. Patiny, N. N. Chung, C. Lemieux, M. Mutter, P. W. Schiller, *J. Med. Chem.* **2001**, *44*, 3896–3903; e) A. Tam, U. Arnold, M. B. Soellner, R. T. Raines, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 12670–

- 12671; f) S. Chierici, M. Jourdan, M. Figuet, P. Dumy, *Org. Biomol. Chem.* **2004**, *2*, 2437–2441.
- [3] K. P. Lu, G. Finn, T. H. Lee, L. K. Nicholson, *Nat. Chem. Biol.* **2007**, *3*, 619–629.
- [4] a) R. L. Stein, *Adv. Protein Chem.* **1993**, *44*, 1–24; b) F. X. Schmid, L. M. Mayr, M. Mücke, E. R. Schönbrunner, *Adv. Protein Chem.* **1993**, *44*, 25–66.
- [5] a) Y. Che, G. R. Marshall, *Biopolymers* **2006**, *81*, 392–406; b) M. Keller, C. Sager, P. Dumy, M. Schutkowski, G. S. Fischer, M. Mutter, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 2714–2720.
- [6] a) J. Zabrocki, G. D. Smith, J. B. Dunbar, H. Iijima, G. R. Marshall, *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, *110*, 5875–5880; b) G. D. Smith, J. Zabrocki, T. A. Flak, G. R. Marshall, *Int. J. Pept. Protein Res.* **1991**, *37*, 191–197; c) J. Zabrocki, J. B. Dunbar, K. W. Marshall, M. V. Toth, G. R. Marshall, *J. Org. Chem.* **1992**, *57*, 202–209; d) R. J. Nachman, J. Zabrocki, J. Olczak, H. J. Williams, G. Moyna, A. Ian Scott, G. M. Coast, *Peptides* **2002**, *23*, 709–716.
- [7] a) Y. Hitotsuyanagi, S. Motegi, H. Fukaya, K. Takeya, *J. Org. Chem.* **2002**, *67*, 3266–3271; b) D. Tietze, M. Tischler, S. Voigt, D. Imhof, O. Ohlenschläger, M. Görlich, G. Buntkowsky, *Chem. Eur. J.* **2010**, *16*, 7572–7578.
- [8] T. W. Muir, *Annu. Rev. Biochem.* **2003**, *72*, 249–289.
- [9] a) M. Nahrwold, T. Bogner, S. Eissler, S. Verma, N. Sewald, *Org. Lett.* **2010**, *12*, 1064–1067; b) E. Valverde, F. Lecaillé, G. Lalmanach, V. Aucagne, F. Delmas, *Angew. Chem.* **2012**, *124*, 742–746; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 718–722.
- [10] a) A. Clemente, G. Sonnante, C. Domoney, *Curr. Protein Pept. Sci.* **2011**, *12*, 358–373; b) J. D. McBride, A. B. Brauer, M. Nievo, R. J. Leatherbarrow, *J. Mol. Biol.* **1998**, *282*, 447–458.
- [11] a) P. Li, S. Jiang, S. L. Lee, C. Y. Lin, M. D. Johnson, R. B. Dickson, C. J. Michejda, P. P. Roller, *J. Med. Chem.* **2007**, *50*, 5976–5983; b) U. C. Marx, M. L. Korsinczky, H. J. Schirra, A. Jones, B. Condie, L. Otvos, Jr., D. J. Craik, *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 21782–21789; c) M. L. Korsinczky, H. J. Schirra, K. J. Rosengren, J. West, B. A. Condie, L. Otvos, M. A. Anderson, D. J. Craik, *J. Mol. Biol.* **2001**, *311*, 579–591; d) M. L. Korsinczky, H. J. Schirra, D. J. Craik, *Curr. Protein Pept. Sci.* **2004**, *5*, 351–364.
- [12] A. B. E. Brauer, G. J. Domingo, R. M. Cooke, S. J. Matthews, R. J. Leatherbarrow, *Biochemistry* **2002**, *41*, 10608–10615.
- [13] M. Empting, O. Avrutina, R. Meusinger, S. Fabritz, M. Reinwarth, M. Biesalski, S. Voigt, G. Buntkowsky, H. Kolmar, *Angew. Chem.* **2011**, *123*, 5313–5317; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 5207–5211.
- [14] D. Scarpi, E. G. Occhiato, A. Trabocchi, R. J. Leatherbarrow, A. B. Brauer, M. Nievo, A. Guarna, *Bioorg. Med. Chem.* **2001**, *9*, 1625–1632.
- [15] a) H. D. Dickson, S. C. Smith, K. W. Hinkle, *Tetrahedron Lett.* **2004**, *45*, 5597–5599; b) J. T. Lundquist IV, J. C. Pelletier, *Org. Lett.* **2001**, *3*, 781–783; c) S. Ohira, *Synth. Commun.* **1989**, *19*, 561–564.
- [16] a) K. Holland-Nell, M. Meldal, *Angew. Chem.* **2011**, *123*, 5310–5312; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 5204–5206; b) M. Roice, I. Johannsen, M. Meldal, *QSAR Comb. Sci.* **2004**, *23*, 662–673; c) B. C. Boren, S. Narayan, L. K. Rasmussen, L. Zhang, H. Zhao, Z. Lin, G. Jia, V. V. Fokin, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 8923–8930.
- [17] S. Luckett, R. S. Garcia, J. J. Barker, A. V. Konarev, P. R. Shewry, A. R. Clarke, R. L. Brady, *J. Mol. Biol.* **1999**, *290*, 525–533.
- [18] a) M. Juricek, P. H. J. Kouwer, A. E. Rowan, *Chem. Commun.* **2011**, *47*, 8740–8749; b) R. M. Meudtner, M. Ostermeier, R. Goddard, C. Limberg, S. Hecht, *Chem. Eur. J.* **2007**, *13*, 9834–9840.
- [19] C. Yuan, L. Chen, E. J. Meehan, N. Daly, D. J. Craik, M. Huang, J. C. Ngo, *BMC Struct. Biol.* **2011**, *11*, 30.
- [20] A. B. Brauer, J. D. McBride, G. Kelly, S. J. Matthews, R. J. Leatherbarrow, *Bioorg. Med. Chem.* **2007**, *15*, 4618–4628.
- [21] O. Hartley, H. Gaertner, J. Wilken, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2004**, *101*, 16460–16465.