



# Nahtlose Integration von Dosis-Wirkungs-basiertem Screening und Flusschemie: effiziente Erzeugung von Struktur-Aktivitäts-Beziehungen von $\beta$ -Sekretase(BACE1)-Hemmern\*\*

Michael Werner,\* Christoph Kuratli, Rainer E. Martin,\* Remo Hochstrasser, David Wechsler, Thilo Enderle, Alexander I. Alanine und Horst Vogel

**Abstract:** Die Arzneistoffentwicklung stellt ein vielfältiges Aufgabenfeld dar, welches als grundlegendes Element die Erzeugung von Struktur-Aktivitäts-Beziehungen (SAR) durch wiederholte chemische Synthese und biologische Aktivitätsbestimmung maßgeschneiderter Moleküle beinhaltet. Hier berichten wir über die Entwicklung eines Fluss-basierten biochemischen Assays und seine nahtlose Einbindung in ein vollautomatisiertes System, bestehend aus flusschemischer Synthese, Aufreinigung und Quantifizierung in serieller Abfolge. Diese neuartige Synthese-Screening-Plattform ermöglicht es, SAR-Daten von  $\beta$ -Sekretase-Hemmern in einer bisher unerreichten Durchlaufzeit von 1 Stunde anstelle mehrerer Tage zu erhalten. Die vollständige Automatisierung und Einbindung industrielle Prozesse hat seit jeher zu Produktivitätssteigerung und Kosteneinsparungen geführt. Diese Studie zeigt, wie diese Konzepte angewandt auf die Erzeugung von SAR-Daten, zu einem effizienteren Arzneistoffentwicklungsprozess führen können.

Das Auffinden von Leitstrukturen mittels iterativer Erzeugung von Struktur-Aktivitäts-Beziehungen (SAR) ist grundlegendes Element der frühen Arzneistoffentwicklung.<sup>[1]</sup> Ein vollständiger SAR-Durchlauf setzt sich aus der organischen Synthese des Wirkstoffs, seiner Aufreinigung sowie dessen Strukturnachweis und biologischer Aktivitätsbestimmung samt Datenauswertung zusammen. Dabei werden die verschiedenen Aufgaben zur Generierung von SAR-Daten üblicherweise in hochspezialisierten und räumlich getrennten Einrichtungen durchgeführt, was eine zeitaufwendige Logis-

tik und zahlreiche Transportschritte der synthetisierten Verbindungen bedingt. Ein weit verbreiteter Lösungsansatz für dieses Problem besteht in der Parallelisierung von chemischer Synthese und biologischem Assay, was jedoch aufgrund des Fehlens von Rückkopplungsinformationen in Echtzeit ein eher kostspieliges Konzept darstellt, da eine Vielzahl irrelevanter chemischer Strukturen erzeugt werden.<sup>[2]</sup> Es ist daher von großem Vorteil, die gesamten chemischen, analytischen und biologischen Arbeitsschritte in einem einzigen, kontinuierlichen Prozess zusammenzuführen, was zeitliche sowie räumliche Barrieren verringern und somit eine kosteneffizientere Identifizierung von Leitstrukturen ermöglichen würde.<sup>[3]</sup> Die hier vorliegende Studie hat daher zum Ziel, einen biologischen Assay zu entwickeln, der direkt in einen fluidischen Prozess eingebunden werden kann, um diesen schließlich nahtlos in ein vollautomatisiertes System zur Synthese, Aufreinigung und Quantifizierung von Wirkstoffen unter Durchflussbedingungen in serieller Abfolge zu integrieren. Diese vollintegrierte Synthese-Screening-Plattform ermöglicht es, SAR-Daten innerhalb von 60 Minuten, gerechnet ab dem Zeitpunkt der Injektion der Startmaterialien bis hin zur Erzeugung der mittleren inhibitorischen Konzentration ( $IC_{50}$ ), gegen ein bestimmtes Zielprotein zu generieren. Die Validierung unseres Ansatzes erfolgte über die Erzeugung von SAR-Daten für zwei verschiedene Anilin-Bausteine, welche mit ausgewählten Carbonsäuren gekuppelt wurden, um Wirkstoffe zur Hemmung von  $\beta$ -Sekretase herzustellen. Dieses Enzym nimmt eine Schlüsselstellung in der Alzheimerforschung ein. Aus diesem Grund ist eine Arzneistoffentwicklung gegen dieses Target von hoher Bedeutung, erweist sich aber auch als sehr anspruchsvoll, da Fortschritte in diesem Bereich hauptsächlich synthesegetrieben sind.<sup>[4]</sup>

Trotz jüngster Fortschritte in der Automatisierung und Integration chemischer und biologischer Prozesse<sup>[5–16]</sup> konnte sich ein nahtloser Synthese-Screening Prozess noch nicht herausbilden. Dies ist hauptsächlich der Tatsache geschuldet, dass es bisher keine Methode gab, die es erlaubte, unter Durchflussbedingungen die biologische Aktivität potenzieller Arzneistoffe über Dosis-Wirkungs-Beziehungen zu bestimmen.<sup>[2,17,18]</sup> Im Rahmen dieser Studie wurde daher in einem ersten Schritt ein Flussprozess entwickelt, um aus einer einzigen Injektion eines Wirkstoffkandidaten einen sich über sechs Größenordnungen erstreckenden Konzentrationsgradienten der Verbindung herzustellen und diesem Gradienten kontrolliert Assayreagentien zuzuführen. Die Ausprägung des Gradienten wurde dabei in einer Kapillare mittels Taylor-Dispersion<sup>[19]</sup> erreicht, ein fluidmechanischer Effekt, welcher

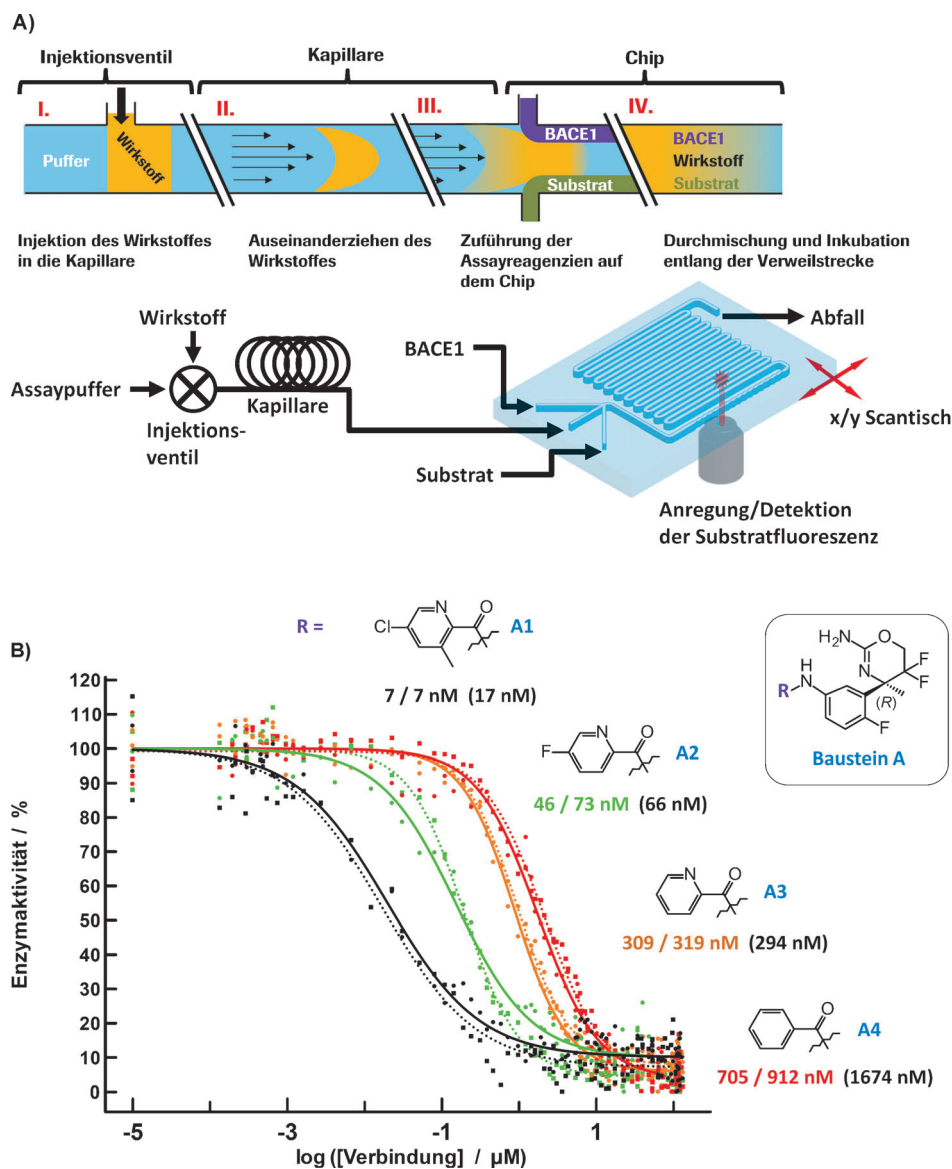
[\*] Dr. M. Werner, C. Kuratli, Dr. R. E. Martin, Dr. R. Hochstrasser, D. Wechsler, Dr. T. Enderle, Dr. A. I. Alanine  
Medicinal Chemistry, Small Molecule Research, Pharma Research & Early Development (pRED), F. Hoffmann-La Roche AG  
Grenzacherstrasse 124, 4070 Basel (Schweiz)  
E-Mail: michael.werner@roche.com  
rainer\_e.martin@roche.com

Prof. Dr. H. Vogel  
Institute of Chemical Sciences and Engineering, Swiss Federal Institute of Technology of Lausanne (EPFL)  
Station 6, 1015 Lausanne (Schweiz)

[\*\*] Wir danken Dr. Hans Hilpert für hilfreiche Diskussionen, Roland Humm für das Bereitstellen der Bausteine **A** und **B**, Daniel Zimmerli, Roger Werder und Tom Kissling für technische Unterstützung sowie Dr. Annie Moisan und Prof. Klaus Müller für das Korrekturlesen des Manuskripts.



Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.201309301> zu finden.



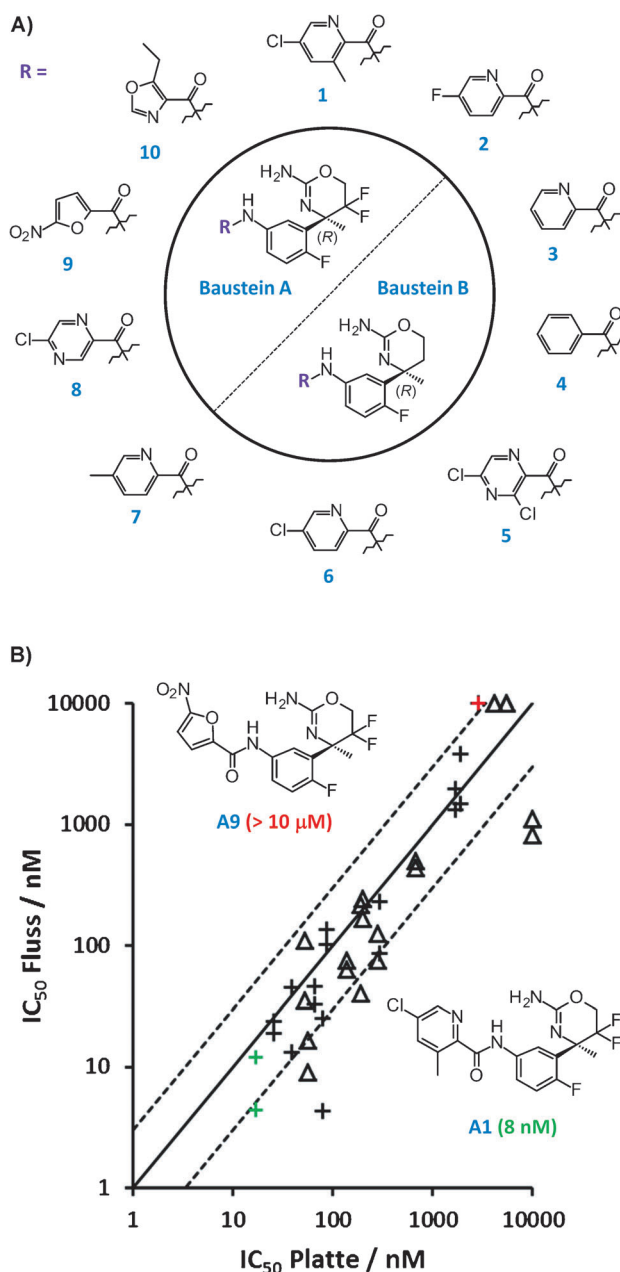
in der Vergangenheit in der Flussinjektionsanalyse seine Anwendung fand.<sup>[20]</sup> Zuführung der Assayreagentien (d.h. BACE1-Enzym und Substrat) zum Wirkstoffgradienten wurde in einem eigens entworfenen Glaschip erreicht (Abbildung 1 A), indem der den Wirkstoffgradienten enthaltende Fluss mit den entsprechenden Enzym- und Substrat-enthaltenden Flüssen in einem bestimmten Verhältnis zusammengeführt wurde. Die drei Ströme wurden daraufhin in einer speziell konstruierten Vermischungszone („split-and-recombine mixer“) homogenisiert. Alle Flüsse wurden angehalten, sobald sich die ansteigende Flanke des Wirkstoffgradienten vollständig über die Verweilstrecke zur Inkubation der Assayreaktion erstreckte. Der BACE1-Hemmtest basiert auf einer Verringerung der Fluoreszenzlöschung („Dequenching“, siehe Abbildung S2 in den Hintergrundinformationen

(SI)) und erweist sich aufgrund eines schmalen Assay-Fensters und einer niedrigen katalytischen Aktivität als anspruchsvoll.<sup>[21]</sup> Daher implementierten wir eine robuste kinetische Auslesemethode, indem das Ansteigen der Fluoreszenz an mehr als 100 Positionen, d.h. Wirkstoffkonzentrationen, entlang der Verweilstrecke zu 4 verschiedenen Zeitpunkten verfolgt wurde. Zur Bestimmung der  $IC_{50}$ -Werte musste die Wirkstoffkonzentration an jeder Abtaststelle kalibriert werden. In unserem System hing der Konzentrationsgradient in erster Linie von den Konvektionskräften, d.h. von dem vorherrschenden Flussprofil ab, wohingegen von der Wirkstoffstruktur abhängige Diffusionskräfte vernachlässigt werden konnten (SI 2.5). Entsprechend wurde der Konzentrationsgradient mit einer einzigen Vergleichssubstanz (Fluorescein, 10 mM) kalibriert, dessen Konzentration sich indirekt über laserinduzierte Fluoreszenz bestimmt ließ. Da Fluorescein unter sauren Bedingungen nur schwach fluoreszierend ist, wurden alle Pufferlösungen durch alkalischen Boratpuffer ersetzt, während die übrigen Einflussgrößen unverändert blieben (SI 2.6). Fluoreszenzintensitäten wurden nach Kalibrierung mit bekannten Fluoresceinkonzentrationen in die entsprechenden Konzentrationswerte umgerechnet. Ein durchschnittlicher Kalibrations-

gradient wurde aus drei unabhängigen Experimenten ermittelt, indem von jeder Ausleseposition das arithmetische Mittel berechnet wurde. Der dynamische Bereich ist einerseits durch das Detektionslimit (ca. 100 pM) und andererseits durch das Sättigungslimit (ca. 100 μM) festgelegt (Abbildung S3). Der Chip-basierte Enzymhemmttest wurde mit vier verschiedenen BACE1-Hemmstoffen validiert (Abbildung 1 B), welche jeweils im Duplikat gemessen wurden. Zur Einschätzung der Genauigkeit der gemessenen Chip-basierten Aktivitäten wurde die Streuung von Replikaten um ihren Durchschnittswert (bis zu einem Faktor 3) berücksichtigt, welche typischerweise für diesen Assaytyp in 384-Mikrotiterplatten (15-fache Verdünnungsreihe) beobachtet werden kann. Dementsprechend geben die erhaltenen durchschnittlichen Wirksamkeiten gut die mittels klassischer Screening-

methoden ermittelten Wirksamkeiten wieder, während ungefähr vier mal weniger Material pro Datenpunkt verbraucht wurde. Erwähnenswert ist, dass sich der hier vorgestellte Assay herkömmlichen Fluss-basierten Assays, welche einen nur begrenzten Dosisbereich abdecken oder mit hydrophoben Assaybestandteilen unverträglich sind, als überlegen erweist. So deckt unser Bioassay erstmals einen Dosisbereich über sechs Größenordnungen ab, wobei er prinzipiell auf alle fluoreszenzbasierten Screeningassays anwendbar ist.<sup>[22–25]</sup>

Der Bioassay wurde anschließend mit einer Flusschemie-Anlage verbunden, welche es ermöglicht, in serieller Abfolge und unter Durchflussbedingungen hergestellte Wirkstoffe über präparative HPLC aufzureinigen, über LC-MS zu identifizieren und über einen kalibrierten Lichtstreuendetektor (ELSD) zu quantifizieren. In einem ersten Ansatz wurden die Produktfraktionen aus der LC-MS in einem offenen Fraktionsbehälter gesammelt (SI 3.1.1). Diese halb-integrierte, jedoch vollständig automatisierte Anordnung ermöglichte es, die Genauigkeit der Kalibrierung des Lichtstreuendetektors zu ermitteln, indem jede Produktfraktion zusätzlich mittels gravimetrischer Analyse (GA) und <sup>1</sup>H-NMR-Analyse quantifiziert wurde. Der Ansatz wurde mittels einer diversen Substanzbibliothek validiert. Ausgehend von zwei unterschiedlichen Anilinbausteinen (**A** und **B**) wurden 20 verschiedene BACE1-Hemmer synthetisiert, indem jede der beiden Strukturen mit 10 verschiedenen Carbonsäuren (Abbildung 2A) gekuppelt wurde. Die entsprechenden Seitenketten **1–10** wurden anhand kürzlich veröffentlichter BACE1-Hemmwerte mit dem Ziel ausgewählt, den gesamten Wirksamkeitsbereich von hochaktiven ( $IC_{50} < 100$  nm) bis hin zu mittelaktiven ( $IC_{50} = 0.1–1$   $\mu$ m) und schwach aktiven Substanzen ( $IC_{50} > 1$   $\mu$ m) abzudecken.<sup>[4,26]</sup> Die Amidierungsreaktionen wurden auf einem „flow synthesizer“ (Vapourtec R4) in Verbindung mit einer Flüssigkeitsbehandlungsstation (Gilson) für automatischen Probentransfer durchgeführt. Der Einsatz von 4-(4,6-Dimethoxy-1,3,5-triazin-2-yl)-4-morpholinium-tetrafluoroborat (DMTMMT) als Kupplungsreagens begünstigte die bevorzugte Bildung des Amids an dem Anilinstickstoff anstatt an der nicht erwünschten, aufgrund seiner höheren Basizität jedoch intrinsisch reaktiveren Aminooxazol-Gruppe.<sup>[4]</sup> Die aufgereinigten Verbindungen **A1–A10** und **B1–B10** wurden mittels einer Flüssigkeitsbehandlungsstation isoliert, wobei typischerweise 4–5 mL an Produkt mit Konzentrationen im Bereich von 0.2 mM bis 2.1 mM (über <sup>1</sup>H-NMR-Analyse ermittelt) gesammelt wurden. Aliquots der Wirkstoffe wurden anschließend durch dieselbe Flüssigkeitsbehandlungsstation zur Reinheitsbestimmung über LC-MS sowie zur Ermittlung des  $IC_{50}$ -Wertes gegen BACE1 entnommen. Zusätzliche Teilproben wurden von Hand zur Konzentrationsbestimmung mittels GA und <sup>1</sup>H-NMR-Analyse entnommen. Im Vergleich zu letztgenannten Konzentrationsbestimmungsverfahren weist die Quantifizierung über Lichtstreuung einen durchschnittlichen Fehler von ungefähr  $\pm 30$  % (bzgl. GA) bzw.  $\pm 40$  % (bzgl. <sup>1</sup>H-NMR) auf (Tabelle S1). Da der Lichtstreuendetektor mittels strukturell diverser Vergleichssubstanzen kalibriert wurde und dementsprechend auf vielfältige Wirkstoffklassen angewandt werden kann, sind diese Fehlergrenzen weitgehend akzeptabel. Die gemessenen  $IC_{50}$ -Werte stimmen gut mit den aus klassischen Methoden

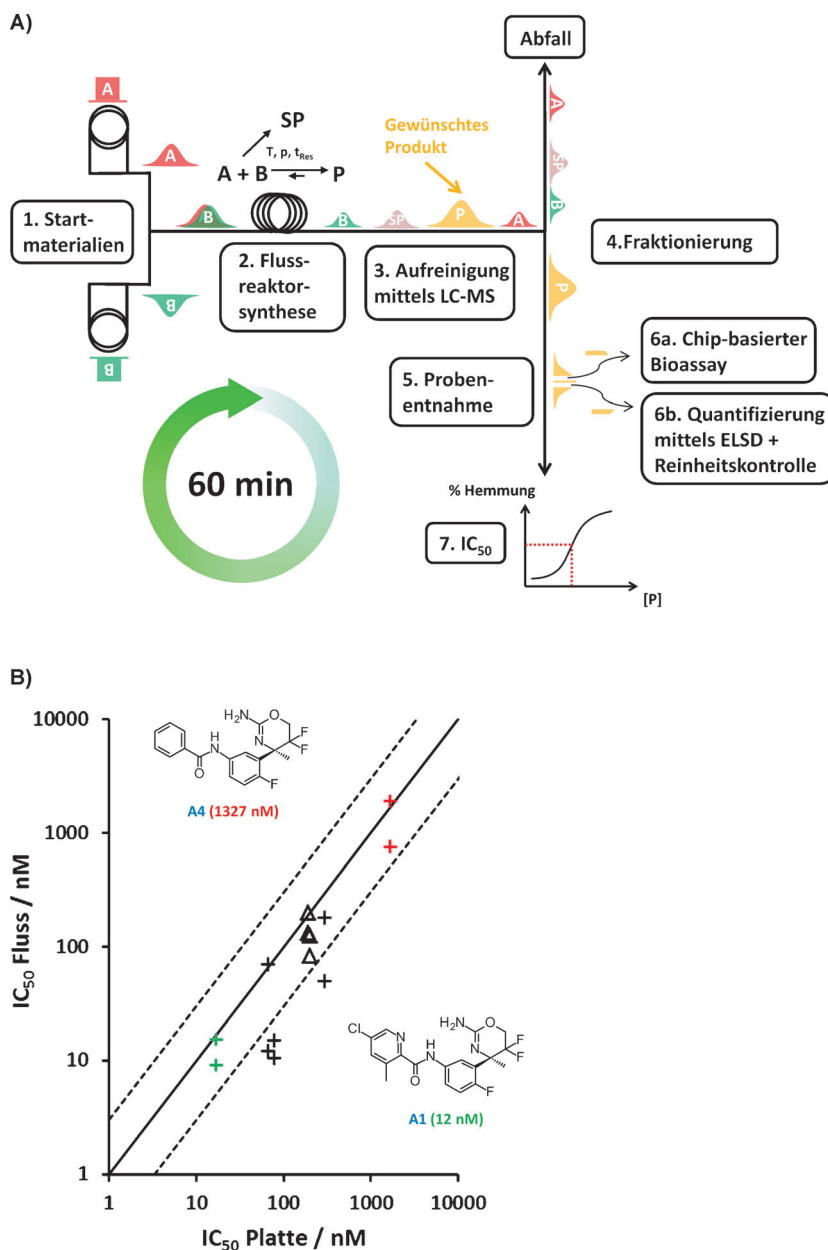


**Abbildung 2.** A) Chemische Strukturen zweier Substanzbibliotheken von BACE1-Hemmern (jeweils 10 Verbindungen), welche zur Validierung der halb- und voll-integrierten Anlage ausgewählt wurden. B) Hemmwirksamkeiten der mit der halb-integrierten Anlage gescreenten Substanzbibliothek gegen BACE1.  $IC_{50}$ -Werte sind gegen die entsprechenden klassisch, d.h. mittels Batchsynthese und Mikrotiterplatten-basiertem Screening ermittelten Werte aufgetragen, (+ **A1–A10**; Δ **B1–B10**). Die chemischen Strukturen der wirksamsten Hemmsubstanz (grüne Markierungen) als auch einer der inaktiven Substanzen (rote Markierungen) sind hervorgehoben. Gestrichelte Linien:  $\pm 300\%$  Intervalle, welche die typische, für klassisches Mikrotiterplatten-basiertes Screening beobachtete Streuung von Replikaten um ihre Durchschnittswerte eingrenzen.

(Batchsynthese, Screening in Mikrotiterplatten) ermittelten Werten überein, was sich darin zeigt, dass 70 % der Wirksamkeitswerte weniger als Faktor drei von den klassisch ermittelten Werten abweichen (Abbildung 2B). Ebenfalls wei-



chen 95 % der Replikate weniger als Faktor drei von ihren zugehörigen durchschnittlichen  $IC_{50}$ -Werten ab. Dies zeigt, dass sich die Reproduzierbarkeit der halb-integrierten Anlage mit klassischen Methoden durchaus vergleichen lässt. Vergleicht man die mittels der halb-integrierten Anlage erlangten  $IC_{50}$ -Werte mit den auf klassische Weise ermittelten Werten, so lässt sich eine leichte Überbewertung der Wirksamkeiten feststellen, was weniger problematisch ist als eine entsprechende Unterbewertung derselben, da letzteres zu einem vorzeitigen Ausschluss interessanter Leitstrukturen führen würde. Erst kürzlich wurden ähnliche halb-integrierte Synthese- und Screening-Anlagen vorgeschlagen: So hatten Guetzoyan et al. kontinuierliche flusschemische Synthese mit einem säulenbasierten Affinitätstest gekoppelt,<sup>[17]</sup> während Desai et al. sowie Czechtizky et al. einen kommerziellen Durchflussreaktor mit klassischen Mikrotiterplatten-basierten biochemischen Assays kombiniert hatten.<sup>[2,18]</sup> In diesen Studien wurden chemische Synthese und biologischer Aktivitätstest entweder von Hand oder über komplexe und teure robotische Flüssigkeitsbehandlungstationen miteinander koordiniert. Für die Arzneistoffentwicklung böte ein nahtloser und fließender Übergang jedoch beträchtliche Vorteile weit über den Gebrauch von einfacheren, fernsteuerbaren Geräten hinaus, wie z.B. der unmittelbare Transfer von Wirkstoffen, die Eindämmung hoher Materialkosten, die Begrenzung von Kontaminationsquellen, sowie die sichere Behandlung gesundheitsgefährdender Verbindungen. Daher wurde in einem nächsten Schritt der Fluss-basierte Bioassay vollständig integriert, um einen nahtlosen Prozess von Synthese, Aufreinigung und Screening zu ermöglichen (Abbildung 3 A, SI 3.1.2). Hierbei wurde eine gegebene Produktfraktion nach erfolgter Reinigung unverzüglich in einer einzelnen Kapillare gesammelt und soweit vorgeschoben, dass das Konzentrationsmaximum der Fraktion über die Einspritzschleifen für die analytische LC-MS/ELSD-Einheit bzw. für den Bioassay zu liegen kam. Somit wiesen die Teilproben sowohl für die Quantifizierung als auch für die Erzeugung des  $IC_{50}$ -Wertes eine nahezu identische chemische Zusammensetzung auf. Zur Validierung der voll-integrierten Anlage wurden SAR-Daten für einen Teil der in Abbildung 2 A dargestellten Substanzbibliothek generiert. Aufgrund der Teilprobenentnahme am Ort der höchsten Produktkonzentration war es möglich, die Menge an Anilin-Baustein auf 2.5 mg herabzusetzen. Es ist bemerkenswert,



**Abbildung 3.** A) Arbeitsschritte der voll-integrierten Synthese-Screening-Anlage. In einem einzigen kontinuierlichen Arbeitsablauf werden Verbindungen hergestellt, aufgereinigt, quantifiziert und ihre biologische Aktivität gegen BACE1 bestimmt (Durchlaufzeit: 60 min). B) Mittels der voll-integrierten Anlage erhaltenen Hemmwirksamkeiten eines Teilsatzes der in Abbildung 2 A beschriebenen Substanzbibliothek gegen BACE1.  $IC_{50}$ -Werte sind gegen die entsprechenden klassisch, d.h. mittels Batchsynthese und Mikrotiterplatten-basiertem Screening ermittelten Werte, aufgetragen (+ A1–A5;  $\Delta$  B2 und B7). Die chemischen Strukturen der am wirksamsten (grüne Markierungen) als auch der am schwächsten wirksamen Hemmsubstanz (rote Markierungen) sind hervorgehoben. Gestrichelte Linien:  $\pm 300\%$  Intervalle entsprechend Abbildung 2 B.

dass 71 % der erzeugten  $IC_{50}$ -Werte weniger als Faktor drei von den klassisch erzeugten Wirksamkeitswerten abweichen. Ebenso streuen 93 % der  $IC_{50}$ -Werte der Replikate weniger als Faktor drei um die entsprechenden Durchschnittswerte (Abbildung 3 B). Somit liefert die voll-integrierte Anlage reproduzierbare SAR-Daten in guter Übereinstimmung mit aus klassischen Methoden gewonnenen Daten. Es ist zudem

wichtig zu erwähnen, dass mit einem durchschnittlichen  $IC_{50}$ -Wert von 12 nM die Verbindung **A1** richtigerweise als die am stärksten wirksame BACE1-Hemmsubstanz der Bibliothek eingestuft wurde. Die Synthese und Aufreinigung einer Verbindung dauerte in etwa 30 min und benötigte somit die gleiche Zeit wie der biologische Hemmtest. Da der wiederverwendbare Glas-Chip nach jeder Messung etwa 30 min lang gereinigt wurde, lag die gesamte Durchlaufzeit für den Synthese-Aufreinigung-Bioassay-Prozess bei etwa 60 min. Nach bestem Wissen ist dies das erste Mal, dass SAR-Daten zur Identifizierung und Optimierung von Leitstrukturen in solch rascher Abfolge erzeugt wurden.

Zusammenfassend kann man sagen, dass die Arzneistoffentwicklung ein vielfältiges Aufgabenfeld darstellt, welches als grundlegendes Element die iterative chemische Synthese und biologische Aktivitätsbestimmung maßgeschneiderter Moleküle beinhaltet. Hier zeigen wir zum ersten Mal, wie beide Welten nahtlos miteinander verschmolzen werden können. Industrielle Prozesse haben schon immer von einer vollständigen Integrierung ihrer einzelnen Bestandteile profitiert, insbesondere durch die einhergehende Effizienzsteigerung und die damit verbundenen Kosteneinsparungen. Diese Studie zeigt, wie diese Konzepte angewandt auf die Erzeugung von SAR-Daten zu einer Beschleunigung des Synthese-Aufreinigung-Bioassay-Prozesses und damit letztlich zu einer rascheren und effizienteren Arzneistoffentwicklung führen können. Für die pharmazeutische Industrie, die nach immer höherer Produktivität strebt, ist das hier vorgestellte integrierte Konzept daher von großer Bedeutung.<sup>[27–29]</sup>

### Experimentelles

Chip-basierter Enzymhemmtest: Das Experiment wurde gestartet, indem die Schleife (inneres Volumen = 70  $\mu$ L) eines softwaregesteuerten Injektionsventils mit dem zu messenden Wirkstoff geladen wurde. Zur Validierung des Chip-basierten Assays wurde dieser Schritt von Hand ausgeführt. Für die von der halb- oder voll-integrierten Anlage ausgeführten Experimente wurden die Verbindungen von einer Flüssigkeitsbehandlungsstation injiziert bzw. direkt von der präparativen HPLC übergeben. Dem Chip wurde anschließend die Enzym-(90 nM), Substrat-(0.9  $\mu$ M) und Assaypufferlösung zugeführt, jeweils zu einer Flussrate von 0.8 mL min<sup>-1</sup>. Nach 2 min wurde ohne Anhalten der Flüsse der Wirkstoff in die Dispersionskapillare (innerer Radius = 375  $\mu$ m, Länge = 40 cm) injiziert und entlang der Kapillare durch die Assaypufferlösung auseinandergezogen. Der resultierende Konzentrationsgradient des Wirkstoffs floss durch den Mittelkanal in den Chip ein und wurde dort mit den Enzym- und Substratlösungen vereinigt. Ein „split-and-recombine“-Mischer in Nähe zu den Einlasskanälen führte zur vollständigen Durchmischung von Wirkstoff, Enzym und Substrat. Alle Flüsse wurden 46 s nach Injektion der Verbindung angehalten. Die Mischung wurde schließlich 30 min lang inkubiert, währenddessen das Ansteigen der Substratfluoreszenz an 107 Stellen entlang der Verweilstrecke in vier Durchgängen aufgezeichnet wurde. Die räumliche Verteilung der Abtastpositionen wurde dabei der Form des Gradienten angepasst, indem bei flachem Gradientenanstieg der Abstand zwischen zwei Abtastpunkten groß und bei steilem Gradientenanstieg der Abstand klein gewählt wurde. Dieser Abtastmodus ermöglichte eine regelmäßige Verteilung der Datenpunkte über den gesamten Dosisbereich. Nach jedem experimentellen Durchlauf wurde der Chip 30 min lang gereinigt. Zur Erstellung der Dosis-Wirkungskurven wurde die

Steigung des zeitlichen Fluoreszenzanstiegs für jede der 107 Positionen berechnet und in entsprechende %-Werte Enzymaktivität umgewandelt. Dabei wurde angenommen, dass die größte beobachtete Steigung des Fluoreszenzanstiegs von der vollen Enzymaktivität hervorgerufen wird, während die geringste beobachtete Steigung des Fluoreszenzanstiegs vom vollständig gehemmten Enzym stammt. Unter Ausnutzung der Gradientenkalibration (SI 2.5) wurden die Enzymaktivitäten gegen die entsprechenden Fluoreszenzkonzentrationen aufgetragen und die sich daraus ergebende Dosis-Wirkungskurve an eine 4-Parameter-Hill-Gleichung angepasst. Die erhaltenen Wirksamkeitswerte  $IC_{50}^0$  wurden schließlich für die Diskrepanz zwischen den ursprünglichen Konzentrationen der getesteten Wirkstoffe  $C_i^C$  und der ursprünglichen Konzentration der Vergleichssubstanz Fluorescein  $C_i^F$  über folgende Beziehung korrigiert:

$$IC_{50} = IC_{50}^0 (C_i^C / C_i^F) \quad (1)$$

Eingegangen am 24. Oktober 2013

**Stichwörter:** Biochemischer Assay · Flusschemie · Leitstruktur · Medizinalchemie · Mikrofluidik

- [1] K. Bleicher, H. J. Böhm, K. Müller, A. I. Alanine, *Nat. Rev. Drug Discovery* **2003**, 2, 369–378.
- [2] B. Desai, K. Dixon, E. Farrant, Q. Feng, K. R. Gibson, W. P. van Hoorn, J. Mills, T. Morgan, D. M. Parry, M. K. Ramjee, C. N. Selway, G. J. Tarver, G. Whitlock, A. G. Wright, *J. Med. Chem.* **2013**, 56, 3033–3047.
- [3] S. Y. F. W. Hawkes, M. J. V. Chapela, M. Montebault, *QSAR Comb. Sci.* **2005**, 24, 712–721.
- [4] H. Hilpert, W. Guba, T. J. Woltering, W. Wostl, E. Pinard, H. Mauser, A. V. Mayweg, M. Rogers-Evans, R. Humm, D. Krummenacher, T. Muser, C. Schneider, H. Jacobsen, L. Ozmen, A. Bergadano, D. W. Banner, R. Hochstrasser, A. Kuglstat, P. David-Pierson, H. Fischer, A. Polara, R. Narquizian, *J. Med. Chem.* **2013**, 56, 3980–3995.
- [5] C. Wiles, P. Watts, *Future Med. Chem.* **2009**, 1, 1593–1612.
- [6] M. Baumann, I. R. Baxendale, S. V. Ley, *Mol. Diversity* **2011**, 15, 613–630.
- [7] P. Watts, *Micro Reaction Technology in Organic Synthesis*, CRC, Boca Raton, **2011**.
- [8] L. Malet-Sanz, F. Susanne, *J. Med. Chem.* **2012**, 55, 4062–4098.
- [9] I. R. Baxendale, *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **2013**, 88, 519–552.
- [10] V. Hessel, D. Kralisch, N. Kockmann, T. Noel, Q. Wang, *ChemSusChem* **2013**, 6, 746–789.
- [11] S. G. Newman, K. F. Jensen, *Green Chem.* **2013**, 15, 1456–1472.
- [12] J. Hong, J. B. Edel, A. J. deMello, *Drug Discovery Today* **2009**, 14, 134–146.
- [13] L. Y. Yeo, H. C. Chang, P. P. Chan, J. R. Friend, *Small* **2011**, 7, 12–48.
- [14] M. L. Kovarik, P. C. Gach, D. M. Orloff, Y. Wang, J. Balowski, L. Farrag, N. L. Allbritton, *Anal. Chem.* **2012**, 84, 516–540.
- [15] P. Neuzi, S. Giselbrecht, K. Lange, T. J. Huang, A. Manz, *Nat. Rev. Drug Discovery* **2012**, 11, 620–632.
- [16] M. L. Kovarik, D. M. Orloff, A. T. Melvin, N. C. Dobes, Y. Wang, A. J. Dickinson, P. C. Gach, P. K. Shah, N. L. Allbritton, *Anal. Chem.* **2013**, 85, 451–472.
- [17] L. Guetzoian, N. Nikbin, I. R. Baxendale, S. V. Ley, *Chem. Sci.* **2013**, 4, 764–769.
- [18] W. Czechtizky, J. Dedio, B. Desai, K. Dixon, E. Farrant, Q. X. Feng, T. Morgan, D. M. Parry, M. K. Ramjee, C. N. Selway, T. Schmidt, G. J. Tarver, A. G. Wright, *ACS Med. Chem. Lett.* **2013**, 4, 768–772.
- [19] G. Taylor, *Proc. R. Soc. London Ser. A* **1953**, 219, 186–203.
- [20] J. Ruzicka, *Anal. Chem.* **1983**, 55, 1040–1053.

- [21] F. Gruninger-Leitch, D. Schlatter, E. Kung, P. Nelbock, H. Dobeli, *J. Biol. Chem.* **2002**, 277, 4687–4693.
  - [22] J. Pihl, J. Sinclair, E. Sahlin, M. Karlsson, F. Petterson, J. Olsson, O. Orwar, *Anal. Chem.* **2005**, 77, 3897–3903.
  - [23] L. F. Cai, Y. Zhu, G. S. Du, Q. Fang, *Anal. Chem.* **2012**, 84, 446–452.
  - [24] O. J. Miller, A. E. Harrak, T. Mangeat, J. C. Baret, L. Frenz, B. E. Debs, E. Mayot, M. L. Samuels, E. K. Rooney, P. Dieu, M. Galvan, D. R. Link, A. D. Griffiths, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2012**, 109, 378–383.
  - [25] Y. Chen, A. Wijaya Gani, S. K. Tang, *Lab Chip* **2012**, 12, 5093–5103.
  - [26] D. Banner, W. Guba, H. Hilpert, H. Mauser, A. V. Mayweg, R. Narquizian, E. Pinard, E. Power, M. Rogers-Evans, T. J. Woltering, W. Wostl, WO 2011/069934A1, **2011**.
  - [27] F. Pammolli, L. Magazzini, M. Riccaboni, *Nat. Rev. Drug Discovery* **2011**, 10, 428–438.
  - [28] M. E. Bunnage, *Nat. Chem. Biol.* **2011**, 7, 335–339.
  - [29] S. M. Paul, D. S. Mytelka, C. T. Dunwiddie, C. C. Persinger, B. H. Munos, S. R. Lindborg, A. L. Schacht, *Nat. Rev. Drug Discovery* **2010**, 9, 203–214.
-