

# Affinitätsbestimmung durch kompetitive Bindung mit Fluor-19-hyperpolarisierten Liganden\*\*

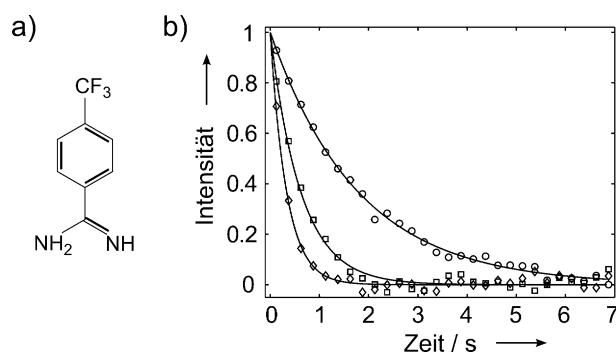
Yaewon Kim und Christian Hilty\*

**Abstract:** Fluor-19-NMR-Spektroskopie und -Hyperpolarisierung bilden eine leistungsfähige Kombination für die Suche nach pharmakologischen Wirkstoffen. Im kompetitiven Gleichgewicht mit einem ausgewählten fluorierten Reporterliganden ist die Dissoziationskonstante ( $K_D$ ) eines gewünschten Liganden durch einen einzelnen Scan eines Carr-Purcell-Meiboom-Gill(CPMG)-Experimentes messbar, ohne dass eine Titration notwendig ist. Diese Methode wird durch die Charakterisierung der Bindung dreier Liganden mit unterschiedlichen Affinitäten zur Serinprotease Trypsin demonstriert. Monte-Carlo-Simulationen zeigen, dass die größte Genauigkeit erreicht wird, wenn ungefähr die Hälfte des gebundenen Reporterliganden verdrängt wird. Diese Bedingung kann über einen großen Bereich von Affinitäten erreicht werden und ermöglicht die Untersuchung der Bindung nichtfluorierter Liganden in rascher Folge, wenn ein einzelner fluorierter Ligand für die gewünschte Bindungsstelle bekannt ist.

Fluoratome treten selten in der Biologie auf, werden aber in pharmazeutischen Wirkstoffen genutzt. Deshalb wird  $^{19}\text{F}$ -NMR-Spektroskopie oftmals für die Untersuchung von Protein-Ligand-Wechselwirkungen in der Pharmaforschung eingesetzt.<sup>[1-4]</sup> Die Aufnahme von  $^{19}\text{F}$ -NMR-Spektren wird durch die Abwesenheit von Protein- oder Lösungsmittel-bedingten Hintergrundsignalen vereinfacht. Die NMR-Empfindlichkeit ist wegen des hohen gyromagnetischen Verhältnisses und 100-prozentigen natürlichen Vorkommens des  $^{19}\text{F}$ -Isotops fast so groß wie für Protonen. Trotzdem wird eine relativ hohe Ligandenkonzentration benötigt, um ein ausreichendes S/N-Verhältnis für die Identifizierung der Protein-Ligand-Wechselwirkung zu erzielen. Wir haben gezeigt, dass die Schmelz-dynamische Kernpolarisation (Dissolution Dynamic Nuclear Polarization, D-DNP), eine Hyperpolarisierungsmethode zur Erhöhung der NMR-Empfindlichkeit um mehrere Größenordnungen,<sup>[5]</sup> für Affinitätsbestimmungen mit  $^{19}\text{F}$ -NMR-Spektroskopie anwendbar ist.<sup>[6]</sup>  $^{19}\text{F}$ -NMR-Spektroskopie ist auf fluorierte Wirkstoffkandidaten eingeschränkt. Falls jedoch für ein Protein ein passender fluorierter Ligand bekannt ist, kann dieser genutzt werden, um in einem kompetitiven Experiment die Bindung eines anderen, nicht fluorierten Liganden nachzuweisen. Solche Experimente

wurden bereits mit Protonen- oder Fluor-NMR-Spektroskopie<sup>[7-10]</sup> und mit hyperpolarisierten, langlebigen Kernspinszuständen<sup>[11]</sup> vollzogen. Falls sich der Reporterligand in schnellem Austausch mit dem Protein befindet, können, wie mit der „Fluorine Chemical Shift Anisotropy and Exchange for Screening“-Methode, Liganden mit verschiedenen Affinitäten identifiziert werden.<sup>[10]</sup> Hier demonstrieren wir die Bestimmung von Dissoziationskonstanten nichtfluorierter Liganden mithilfe der schnellen Messung der  $^{19}\text{F}$ -Spin-Spin-Relaxationsrate ( $R_2$ ) eines durch DNP hyperpolarisierten Reporterliganden in einem einzelnen Scan.<sup>[12]</sup>

Ein  $\text{CF}_3$ -funktionalisierter Ligand, TFBC, wird als Reporterligand für die Serinprotease Trypsin von *B. taurus* verwendet (Abbildung 1a). Die Bindung eines zweiten, nichtfluorierten Liganden verursacht eine Veränderung des An-



**Abbildung 1.** a) Struktur des Reporterliganden 4-(Trifluormethyl)benzol-1-carboximidamid (TFBC). b) Einzelscan-CPMG-Spinechointensitäten mit Mittelung über 128 Messungen von 100  $\mu\text{M}$  TFBC ohne Hyperpolarisierung, ohne (○) und mit (◇) 1.8  $\mu\text{M}$  Trypsin sowie mit 1.8  $\mu\text{M}$  Trypsin und 40  $\mu\text{M}$  Benzamidin (□). Jeder aufgetragene Datenpunkt ist der Mittelwert von 581 aufeinanderfolgenden Punkten, die in einem Zeitabstand von 420  $\mu\text{s}$  gemessen wurden.  $R_2$ -Relaxationsraten wurden durch Regression einer einfachen Exponentialfunktion bestimmt;  $R_{2,r}^{(f)} = 0.60 \text{ s}^{-1}$  (○),  $R_{2,r}^{(nc)} = 3.00 \text{ s}^{-1}$  (◇),  $R_{2,r}^{(c)} = 1.61 \text{ s}^{-1}$  (□).

teils von gebundenem Reporterliganden, was sich in einer Veränderung von  $R_2$  niederschlägt und mit einem Einzelscan-CPMG-Experiment beobachtet werden kann. Zur Veranschaulichung sind Spinechointensitäten von TFBC ohne Hyperpolarisierung in Abbildung 1b dargestellt. Eine Messung unter kompetitiver Bindung mit Benzamidin, einem Inhibitor von Trypsin, ist kombiniert mit zwei Referenzexperimenten.

Die Relaxationsrate unter kompetitiver Bindung ( $R_{2,r}^{(c)}$ ) liegt zwischen den Raten des freien Reporterliganden ( $R_{2,r}^{(f)}$ ) und des Reporterliganden nur in Gegenwart von Protein ( $R_{2,r}^{(nc)}$ ). Die Dissoziationskonstante des gewünschten Liganden ( $K_{D,c}$ ) kann von den gemessenen  $R_2$ -Werten, die vom

[\*] Y. Kim, Prof. Dr. C. Hilty

Department of Chemistry, Texas A&M University  
College Station, TX 77843 (USA)  
E-Mail: chilty@tamu.edu

[\*\*] Wir danken den National Institutes of Health (Grant 5R21GM107927) für finanzielle Unterstützung.

Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.201411424> zu finden.

Anteil des gebundenen Reporterliganden  $p_{b,r} = [RP]/[R]_{\text{tot}}$  abhängen, und einem Modell für kompetitive Bindung zu einer einzelnen Bindungsstelle bestimmt werden (Konzentrationen  $[RP]$  = Reporterligand-Protein-Komplex und  $[R]_{\text{tot}}$  = Reporterligand gesamt).<sup>[13–15]</sup> Für kleine  $p_{b,r}$ -Werte ist  $R_{2,r}$  ein mit  $p_{b,r}$  gewichteter Mittelwert der Relaxationsraten des freien und gebundenen Liganden (siehe Hintergrundinformationen).<sup>[11]</sup> In der Praxis ist es zweckmäßig, einen Parameter einzuführen, der von den Differenzen der gemessenen Relaxationsraten abhängt [Gl. (1)], was ebenfalls den Einfluss der paramagnetischen freien Radikale, die bei der DNP genutzt werden, aufhebt. Der oben genannten Annahme folgend entspricht  $\alpha$  der Proportionalität zwischen den Anteilen von gebundenem Reporterliganden mit und ohne kompetitive Bindung ( $p_{b,r}^{(c)}$  und  $p_{b,r}^{(nc)}$ ) [Gl. (2)].

$$\alpha = \frac{R_{2,r}^{(c)} - R_{2,r}^{(f)}}{R_{2,r}^{(nc)} - R_{2,r}^{(f)}} \quad (1)$$

$$p_{b,r}^{(c)} = \alpha p_{b,r}^{(nc)} \quad (2)$$

Demnach kann  $p_{b,r}^{(c)}$  bestimmt werden aufgrund der Resultate der Messungen von  $R_2$  in Kombination mit Gleichung (3), die nur von bekannten Größen abhängt (Dissoziationskonstante von Reporter,  $K_{D,r}$ , und Gesamtkonzentrationen von Protein,  $[P]_{\text{tot}}$ , und Reporter,  $[R]_{\text{tot}}$ ).<sup>[16]</sup> Durch Lösung der Gleichungen für Bindungsgleichgewichte kann zuerst eine scheinbare Dissoziationskonstante  $K_{D,\text{app}}$  des kompetitiven Liganden bestimmt werden [Gl. (4)].<sup>[7]</sup>

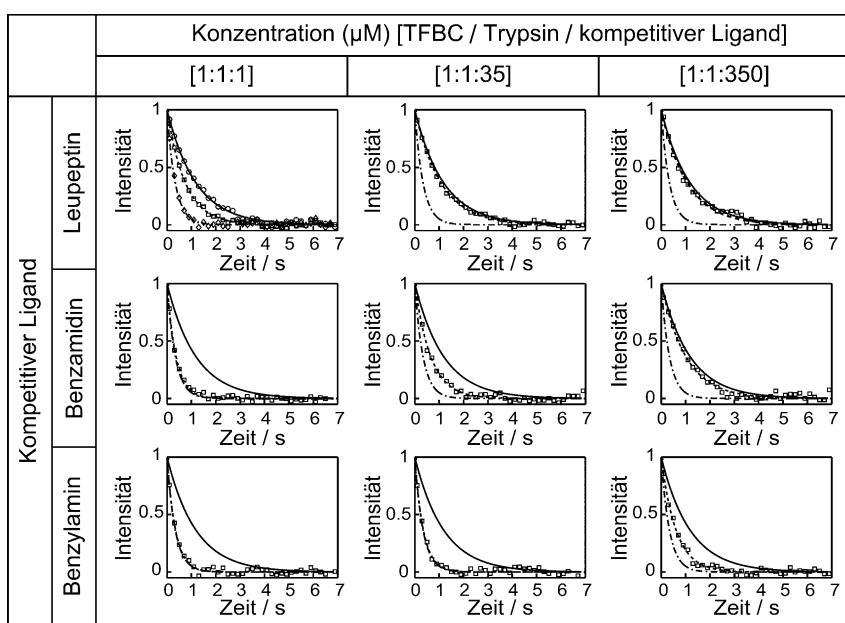
$$p_{b,r}^{(nc)} = \frac{[R]_{\text{tot}} + [P]_{\text{tot}} + K_{D,r} - \sqrt{([R]_{\text{tot}} + [P]_{\text{tot}} + K_{D,r})^2 - 4[R]_{\text{tot}}[P]_{\text{tot}}}}{2[R]_{\text{tot}}} \quad (3)$$

$$K_{D,\text{app}} = [P]_{\text{tot}} \left( \frac{1}{p_{b,r}^{(c)}} - 1 \right) [R]_{\text{tot}} \left( 1 - p_{b,r}^{(c)} \right) \quad (4)$$

Dieser Ausdruck kann als Funktion der Konzentration von ungebundenem kompetitivem Liganden  $[C]$  (vgl. Formel S17 in den Hintergrundinformationen) geschrieben und für die Dissoziationskonstante des kompetitiven Liganden gelöst werden [Gl. (5)]. Die Daten der Messung ohne Hyperpolarisierung in Abbildung 1b, zusammen mit dem bekannten  $K_{D,r} = 142 \mu\text{M}$ ,<sup>[6]</sup> ergeben  $K_{D,c} = (15.7 \pm 1.9) \mu\text{M}$  für Benzamidin.

$$K_{D,c} = \frac{[C]K_{D,r}}{K_{D,\text{app}} - K_{D,r}} \quad (5)$$

Unter Anwendung von D-DNP wurden  $^{19}\text{F}$ -NMR-Signalerhöhungen um einen Faktor > 1000 erreicht. Hyperpolarisierte Liganden wurden zu Mischungen von kompetitiven



**Abbildung 2.** CPMG-Spinechointensitäten von 1  $\mu\text{M}$  hyperpolarisiertem TFBC ( $p_{b,r}^{(nc)} = 0.7\%$ ). Die Datenpunkte der Referenzexperimente mit TFBC ohne ( $\circ$ ) und mit ( $\diamond$ ) 1  $\mu\text{M}$  Trypsin sind nur in der ersten Tafel aufgetragen, die Regressionskurven sind jedoch in allen Tafeln enthalten. Die Datenpunkte von hyperpolarisiertem TFBC in den kompetitiven Experimenten sind in allen Tafeln enthalten. Jeder aufgetragene Datenpunkt ist ein Mittelwert von 465 aufeinanderfolgenden Punkten, die im Zeitabstand von 420  $\mu\text{s}$  gemessen wurden. Das Hintergrundsignal des NMR-Probenkopfes wurde subtrahiert, und Daten vor 42.4 ms wurden nicht berücksichtigt.

Liganden und Protein eingespritzt, gefolgt von einer Messung der Einzelscan-CPMG-Daten. Die endgültigen Reporter- und Proteinkonzentrationen konnten deutlich auf 1  $\mu\text{M}$  reduziert werden. Abbildung 2 zeigt Daten für drei Liganden bei drei verschiedenen Konzentrationen.

Informationen über die Bindung können in zwei verschiedenen Bereichen erhalten werden. Wenn der Reporterligand vollständig verdrängt wird, kann durch  $R_{2,r}^{(c)} \approx R_{2,r}^{(f)}$  bestätigt werden, dass Bindung erfolgt (Tafeln in der oberen rechten Ecke in der Abbildung). Ein numerischer Wert für  $K_{D,c}$  kann im Falle von teilweiser Verdrängung berechnet werden, wenn  $R_{2,r}^{(nc)} > R_{2,r}^{(c)} > R_{2,r}^{(f)}$  (Tafeln auf Diagonalen von links oben nach rechts unten). Die  $R_2$ - und  $K_{D,c}$ -Werte, die durch die Experimente bestimmt wurden, sind in Tabelle 1 zusammengefasst. Zur Validierung wurden Einzelscan- (Tabelle 1 sowie Tabelle S1 der Hintergrundinformationen) und Mehrfachscan-CPMG-Experimente (Abbildung S1 und Tabelle S2 der Hintergrundinformationen) ohne Hyperpolarisierung bei höherer Konzentration durchgeführt. Die DNP-NMR-spektroskopischen Messungen stimmen mit diesen und ebenfalls mit Literaturwerten unter ähnlichen, aber nicht identischen Bedingungen überein (Leupeptin 0.031–0.4  $\mu\text{M}$ ; Benzamidin und Benzylamin 18  $\mu\text{M}$  und 300  $\mu\text{M}$  bei 100 mM Tris, pH 8.0, 298 K).<sup>[17–19]</sup> Nach Verringerung der endgültigen Konzentration von Protein und kompetitivem Liganden auf 0.5  $\mu\text{M}$  wurden immer noch  $K_{D,c}$ -Werte innerhalb der Fehlergrenzen von Tabelle 1 erhalten (Abbildung S6 der Hintergrundinformationen).

Während bei NMR-Spektroskopie ohne Hyperpolarisierung kalibrierte Signalintensitäten aus einzelnen NMR-

Tabelle 1: Bestimmung von  $R_{2,r}$  und  $K_{D,c}$ .

kompetitiver Ligand	$R_{2,r}^{(c)}/s^{-1}$ [ $[R]_{tot} = [P]_{tot} = 1 \mu\text{M}$ ]			$K_{D,c}/\mu\text{M}$	NMR <sup>[c]</sup>
	$[C]_{tot} = 1 \mu\text{M}$	$[C]_{tot} = 35 \mu\text{M}$	$[C]_{tot} = 350 \mu\text{M}$		
Leupeptin	$1.39 \pm 0.08$ (3) <sup>[b]</sup>	0.94, 0.93 (2)	0.93, 0.94 (2)	$0.09 \pm 0.03$	$0.08 \pm 0.02$ (3)
Benzamidin	2.75, 2.53 (2)	$1.52 \pm 0.03$ (3)	0.99, 0.94 (2)	$16.3 \pm 1.6$	$15.7 \pm 1.9$ (3)
Benzylamin	2.54, 2.90 (2)	2.86, 2.53 (2)	$1.73 \pm 0.11$ (3)	$258.1 \pm 56.6$	$217.9 \pm 43.1$ (3)

[a]  $R_{2,r}^{(c)}$  sind Resultate von Regressionen einzelner Exponentialfunktionen zu DNP-NMR-Echointensitäten, verarbeitet wie in Abbildung 2. Mittelwerte und Standardabweichungen von  $K_{D,c}$  stammen von Rechnungen mit allen möglichen Kombinationen der gemessenen  $R_2$ -Werte. Referenzwerte,  $R_{2,r}^{(f)} = (0.85 \pm 0.03) \text{ s}^{-1}$  und  $R_{2,r}^{(nc)} = (2.92 \pm 0.12) \text{ s}^{-1}$ , wurden von je drei DNP-NMR-Messungen bestimmt. [b] In Klammern ist die Anzahl der Versuchswiederholungen gegeben. [c] Einzelscan-CPMG-Experimente ohne Hyperpolarisierung von Proben mit  $[R]_{tot}, [P]_{tot}, [C]_{tot} = [100, 1, 1] \mu\text{M}$  für Leupeptin,  $[100, 1.8, 40] \mu\text{M}$  für Benzamidin und  $[100, 1.8, 400] \mu\text{M}$  für Benzylamin.

Spektren für die Bestimmung von  $K_D$  herangezogen werden können,<sup>[10]</sup> scheinen die hier angewendeten Einzelscan-CPMG-Experimente ideal für D-DNP. Die Datenerfassung erfolgt rasch, und die Messung von Echointensitäten erfordert keine scharfen Linien, sodass die Shimm-Prozeduren, die bei D-DNP vor der Einspritzung der Probe erfolgen müssen, vereinfacht werden.

Im Unterschied zu manchen anderen Methoden für die  $K_D$ -Bestimmung benötigt dieses Experiment im Falle von kompetitiver Bindung an eine einzelne Bindungsstelle auch keine Titration. Für diese Bindungsart ist die Kenntnis von  $K_{D,r}$  und  $p_{b,r}^{(c)}$  ausreichend für die Bestimmung von  $K_{D,c}$ . Kompliziertere Modelle, wie solche unter Beteiligung von Kooperativität oder allosterischen Wechselwirkungen, können ebenfalls evaluiert werden. In diesem Fall wäre es notwendig, den Anteil von gebundenem Liganden bei verschiedenen Konzentrationen zu bestimmen.

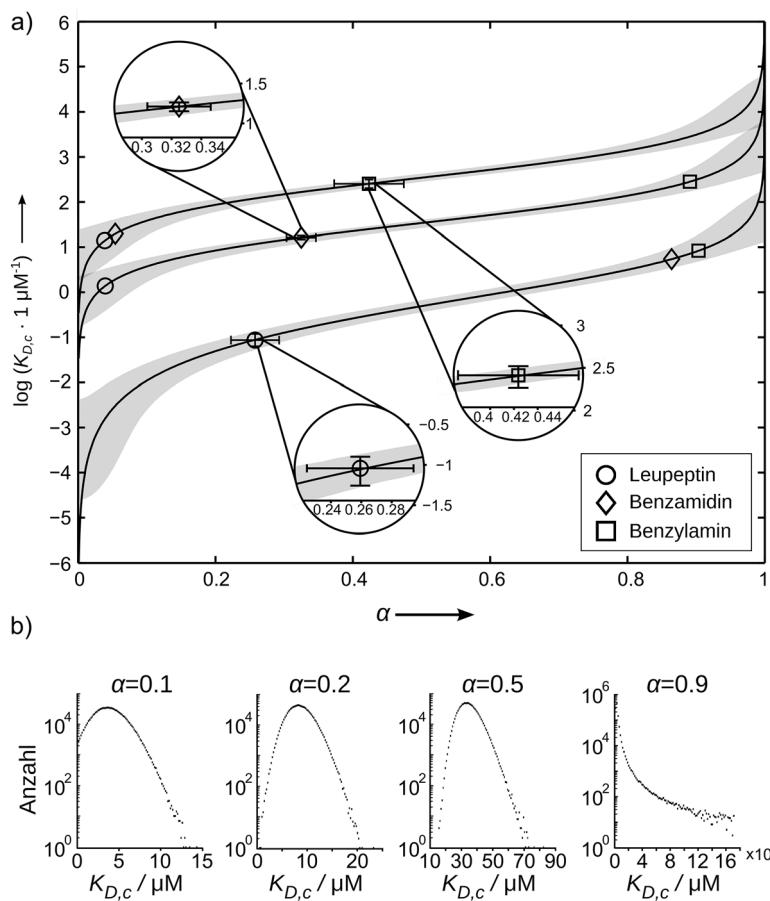
Weil sich der Reporterligand in schnellem Austausch zwischen freiem und gebundenem Zustand befindet, können sogar gewünschte Liganden mit starker Bindung untersucht werden, die in anderen Experimenten, wo Liganden im Überschuss beobachtet werden, Schwierigkeiten bereiten können. Für diese Anwendung könnten Mischungen verschiedener gewünschter Liganden verwendet werden, um den Durchsatz weiter zu erhöhen. Zur effektiven Bestimmung von  $K_{D,c}$  sollte jedoch ein einzelner kompetitiver Ligand zusammen mit dem Reporter eingesetzt werden, und vor der Datenerfassung muss ein kinetischer Gleichgewichtszustand vorhanden sein. Numerische Lösungen der Ratengleichungen ergeben unter der Annahme von  $k_{on} = 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ,<sup>[20]</sup> dass eine für D-DNP typische Stabilisierungszeit von 400 ms für die hier aufgezeigten Liganden ausreichend ist. Unter denselben Annahme für  $k_{on}$  können  $K_{D,c}$ -Werte bis hinunter zu 10 nm mit einer Stabilisierungszeit von 1 s bestimmt werden, was noch ohne übermäßige Relaxationsverluste in den DNP-Experimenten möglich ist (Abbildungen S2–S5 der Hintergrundinformationen).

Mesempfindlichkeit und Durchsatz könnten durch Verbesserungen der Polarisierung im Festkörper sowie der Probeneinspritzung weiter optimiert werden. Aktuelle Entwicklungen bei der D-DNP, wie ein Polarisator mit Doppelzentraltrenmagnet,<sup>[21]</sup> die Erhöhung des Magnetfeldes für die Polarisierung<sup>[22]</sup> oder für den Probentransfer<sup>[11]</sup> oder auch ein Multiplexbetrieb,<sup>[23]</sup> könnten unter Umständen angewendet werden. Die  $^{19}\text{F}$ -NMR-Detektionsempfindlichkeit könnte

erhöht werden, und Hintergrundsignale des Probenkopfes könnten sich verringern lassen. Ein spezieller, tiefkalter Probenkopf bei 14.1 T<sup>[24]</sup> zusammen mit DNP anstelle des hier eingesetzten Breitbandkopfes bei 9.4 T würde alleine durch Verbesserungen bei Rauschen, Füllfaktor der NMR-Spule sowie Magnetfeld die Nachweisgrenze mindestens 7-fach verringern.

Der Einfluss der Ligandenkonzentration auf die beobachteten Werte ist in Abbildung 3a illustriert. Der Zusammenhang zwischen  $K_{D,c}$  und  $\alpha$  ist für die drei hier genutzten Konzentrationen zusammen mit den experimentellen Datenpunkten aufgetragen. Die höchste Genauigkeit wird dort erwartet, wo die Steigungen der Kurven am kleinsten sind, was bei teilweiser Verdrängung des Reporterliganden eintritt. Die Genauigkeit bei der Bestimmung von  $K_{D,c}$  wurde im Weiteren durch Monte-Carlo-Simulationen in Abhängigkeit von Unsicherheiten in  $\alpha$  untersucht. Normalverteilungen von  $\alpha$  wurden aus  $10^6$  Zufallswerten mit einer Standardabweichung von 0.04 erstellt, wovon unphysikalische Werte außerhalb von  $0 < \alpha < 1$  entfernt wurden.  $\alpha$  wäre exakt normalverteilt für normalverteilte  $R_2$ -Werte im Zähler und genau bekannten Nenner. Die Annahme einer höheren Genauigkeit des Nenners scheint sinnvoll, da dieser aus Referenzwerten besteht, die für eine ganze Reihe von Experimenten gültig sind. Der Bereich, der 80 % der resultierenden  $K_{D,c}$ -Werte enthält, ist in Abbildung 3a schattiert dargestellt und zeigt, dass  $K_{D,c}$  am wenigsten von einem Fehler in  $\alpha$  betroffen ist, wenn  $\alpha$  in der Nähe von 0.5 liegt. Resultate der Simulation für vier Werte von  $\alpha$  sind als Histogramme in Abbildung 3b gezeigt. Die langen Ausläufer in den Verteilungen, wo der Mittelwert von  $\alpha$  nahe bei 1 liegt, sowie die nichtverschwindende Wahrscheinlichkeit für  $K_{D,c} = 0$ , wenn der Mittelwert von  $\alpha$  auf 0 zugeht, können die größere Unsicherheit unter diesen Bedingungen verursachen.

Mithilfe der maßgeblichen Signalerhöhung von  $^{19}\text{F}$ -DNP-NMR-Spektroskopie wurden  $R_2$ -Relaxationsraten eines fluorierten Reporterliganden aus Einzelscan-CPMG-Experimenten verwendet, um die Dissoziationskonstanten von kompetitiven Liganden zu bestimmen. Monte-Carlo-Simulationen können für die Festlegung von Bedingungen für die Experimente herangezogen werden. Diese DNP-gestützte Methode könnte von Interesse für das Screening in der Pharmaforschung sein, da der Nachweis der Bindung eines Liganden sowie die Bestimmung von  $K_D$  aus einem einzelnen und raschen Experiment hervorgehen.



**Abbildung 3.** a)  $\log(K_{D,c})$  als Funktion von  $\alpha$  für  $[[R]_{tot}, [P]_{tot}, [C]_{tot}] = [1, 1, 1] \mu\text{M}$  (unterste Kurve),  $[1, 1, 35] \mu\text{M}$  (mittlere Kurve) und  $[1, 1, 350] \mu\text{M}$  (oberste Kurve) und  $K_{D,c} = 142 \mu\text{M}$ . Punkte zeigen die Werte der DNP-NMR-Messungen aus Tabelle 1. Schattierte Bereiche enthalten 80% der  $K_{D,c}$ -Werte der Monte-Carlo-Simulationen. b) Logarithmische Histogramme von  $K_{D,c}$  aus den Monte-Carlo-Simulationen für ausgewählte Werte von  $\alpha$  auf der mittleren Kurve in (a).

### Experimentelles

Experimente ohne Hyperpolarisierung wurden mit 100  $\mu\text{M}$  TFBC (TFBC-HCl·H<sub>2</sub>O; Maybridge), 1.8  $\mu\text{M}$  Trypsin (AMRESCO, Solon) und 40  $\mu\text{M}$  Benzamidin (Sigma Aldrich, St. Louis) in Puffer (50 mM Tris, 100 mM NaCl und 5 mM CaCl<sub>2</sub>, pH 8.0) durchgeführt. NMR-Daten wurden mit einem Breitbandprobenkopf (BBO), der auf dem <sup>1</sup>H-Kanal auf <sup>19</sup>F abgestimmt werden kann, auf einem 400-MHz-Spektrometer (Bruker Biospin, Billerica) aufgenommen. Für D-DNP-Experimente wurden 8  $\mu\text{L}$  von 0.134 mM TFBC und 2  $\mu\text{L}$  von 150 mM 4-Hydroxy-2,2,6,6-tetramethylpiperidin-1-oxyl (Sigma Aldrich, St. Louis) in 80%  $[\text{D}_6]\text{Dimethylsulfoxid}$  und 20%  $\text{D}_2\text{O}$  (v/v) in einem HyperSense-DNP-Polarisator (Oxford Instruments, Abingdon) mit 100 mW Mikrowellenleistung bei 94.005 GHz innerhalb von 30 min bei  $T = 1.4 \text{ K}$  bestrahlt. Die hyperpolarisierte Probe wurde mithilfe von 4 mL vorgeheizten Puffern aufgelöst und in ein 5-mm-NMR-Röhrchen eingespritzt,<sup>[25,26]</sup> das vorab mit 25  $\mu\text{L}$  Puffer, Trypsinlösung oder einer Mischung von Trypsin und nichtfluoriertem Liganden gefüllt worden war. Das Endvolumen der NMR-Probe betrug 500  $\mu\text{L}$ . NMR-Spektren wurden 400 ms nach Einspritzung bei  $T = 304 \text{ K}$  aufgenommen. Die Konzentration von Trypsin wurde mittels UV-Spektrophotometrie und diejenige von TFBC durch <sup>19</sup>F-NMR-Spektroskopie bestimmt. Die Probenverdünnung während der Auflösung (im Mittel 1:100) wurde NMR-spektroskopisch unter Verwendung eines bekannten Referenzstandards bestimmt. Einzelscan-

CPMG-Experimente nahmen 16384 Datenpunkte in Zeitabständen von 420  $\mu\text{s}$  auf. Das Hintergrundsignal des NMR-Probenkopfes wurde getrennt gemessen und subtrahiert. Der Einfluss des Hintergrundsignals wurde weiter durch die Berücksichtigung von Daten erst nach einer Laufzeit von 42.4 ms verringert. Monte-Carlo-Simulationen wurden mit Matlab (MathWorks, Natick) durchgeführt.

**Stichwörter:** Hyperpolarisierung · NMR-Spektroskopie · Pharmaforschung · Protein-Ligand-Wechselwirkungen

**Zitierweise:** *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, *54*, 4941–4944  
*Angew. Chem.* **2015**, *127*, 5023–5027

- [1] A. Vulpetti, U. Hommel, G. Landrum, R. Lewis, C. Dalvit, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 12949–12959.
- [2] C. Dalvit, E. Ardini, G. P. Fogliatto, N. Mongelli, M. Veronesi, *Drug Discovery Today* **2004**, *9*, 595–602.
- [3] C. Dalvit, E. Ardini, M. Flocco, G. P. Fogliatto, N. Mongelli, M. Veronesi, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 14620–14625.
- [4] B. G. Jenkins, *Life Sci.* **1991**, *48*, 1227–1240.
- [5] J. H. Ardenkjær-Larsen, B. Fridlund, A. Gram, G. Hansson, L. Hansson, M. H. Lerche, R. Servin, M. Thaning, K. Golman, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2003**, *100*, 10158–10163.
- [6] Y. Lee, H. Zeng, S. Ruedisser, A. D. Gossert, C. Hilti, *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 17448–17451.
- [7] C. Dalvit, M. Flocco, S. Knapp, M. Mostardini, R. Perego, B. J. Stockman, M. Veronesi, M. Varasi, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 7702–7709.
- [8] R. E. Heath, G. M. Dykes, H. Fish, D. K. Smith, *Chem. Eur. J.* **2003**, *9*, 850–855.
- [9] W. Jahnke, P. Floersheim, C. Ostermeier, X. Zhang, R. Hemmig, K. Hurth, D. P. Uzunov, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 3420–3423; *Angew. Chem.* **2002**, *114*, 3570–3573.
- [10] C. Dalvit, P. E. Fagerness, D. T. A. Hadden, R. W. Sarver, B. J. Stockman, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 7696–7703.
- [11] R. Buratto, A. Bornet, J. Milani, D. Mammoli, B. Vuichoud, N. Salvi, M. Singh, A. Laguerre, S. Passemard, S. Gerber-Lemaire, S. Jannin, G. Bodenhausen, *ChemMedChem* **2014**, *9*, 2509–2515.
- [12] S. Meiboom, D. Gill, *Rev. Sci. Instrum.* **1958**, *29*, 688–691.
- [13] T. J. Swift, R. E. Connick, *J. Chem. Phys.* **1962**, *37*, 307–320.
- [14] R. R. Ernst, G. Bodenhausen, A. Wokaun, *Principles of Nuclear Magnetic Resonance in One and Two Dimensions*, Clarendon Press, Oxford, **1990**.
- [15] B. W. Dubois, A. S. Evers, *Biochemistry* **1992**, *31*, 7069–7076.
- [16] L. Fielding, *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* **2007**, *51*, 219–242.
- [17] I. V. Kurinov, R. W. Harrison, *Protein Sci.* **1996**, *5*, 752–758.
- [18] M. Krieger, L. M. Kay, R. M. Stroud, *J. Mol. Biol.* **1974**, *83*, 209–230.
- [19] N. Chen, J. Zou, S. Wang, Y. Ye, Y. Huang, G. Gadda, J. J. Yang, *Biochemistry* **2009**, *48*, 3519–3526.
- [20] G. C. K. Roberts in *BioNMR Drug Res.* (Hrsg.: O. Zerbe), Wiley-VCH, Weinheim, **2002**, S. 309–319.
- [21] J. Leggett, R. Hunter, J. Granwehr, R. Panek, A. J. Perez-Linde, A. J. Horsewill, J. McMaster, G. Smith, W. Köckenberger, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2010**, *12*, 5883–5892.
- [22] H. Jóhannesson, S. Macholl, J. H. Ardenkjær-Larsen, *J. Magn. Reson.* **2009**, *197*, 167–175.

- [23] M. Batel et al., *J. Magn. Reson.* **2012**, *214*, 166–174.
- [24] C. Dalvit, N. Mongelli, G. Papeo, P. Giordano, M. Veronesi, D. Moskau, R. Kümmerle, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 13380–13385.
- [25] S. Bowen, C. Hilty, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2010**, *12*, 5766–5770.
- [26] S. Bowen, C. Hilty, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 5235–5237; *Angew. Chem.* **2008**, *120*, 5313–5315.

Eingegangen am 25. November 2014  
Online veröffentlicht am 20. Februar 2015

---