

Fragmentverknüpfung und -optimierung von Hemmstoffen der Aspartylprotease Endothiapepsin: Fragmentbasiertes Wirkstoffdesign beschleunigt durch dynamische kombinatorische Chemie

Milon Mondal, Nedyalka Radeva, Hugo Fanlo-Virgos, Sijbren Otto, Gerhard Klebe und Anna K. H. Hirsch*

Abstract: Fragmentbasiertes Wirkstoffdesign (FBWD) führt zu pharmakologisch aktiven Substanzen für biologische Targets. Obwohl es zahlreiche Beispiele für FBWD anhand von Fragmentwachstum und -optimierung gibt, wird die Verknüpfung von Fragmenten nur selten verwendet. Dynamische kombinatorische Chemie (DKC) ist zu einer erfolgreichen Strategie für die Identifizierung von Hits für biologische Targets herangewachsen. Wir berichten hier über die synergistische Kombination von Fragmentverknüpfung und DKC, um Inhibitoren der Aspartylprotease Endothiapepsin zu identifizieren. Aufbauend auf Röntgenkristallstrukturen von Endothiapepsin im Komplex mit Fragmenten haben wir eine Bibliothek von Bisacylhydrazonen entworfen und DKC benutzt, um potente Hemmstoffe des Enzyms zu identifizieren: Der stärkste Hemmstoff besitzt einen IC_{50} -Wert von 54 nm, was eine 240-fache Steigerung der Affinität im Vergleich zu den Ausgangsstoffen darstellt. Anschließend hat die Röntgenkristallographie den vorhergesagten Bindungsmodus bestätigt und somit die Effizienz der Kombination aus Fragmentverknüpfung und DKC als Strategie für die Identifizierung von Hits unterstrichen. Die Methode kann für eine Reihe biologischer Targets Anwendung finden und sollte das Potenzial haben, die Optimierung eines Hits zu einer Leitstruktur zu vereinfachen.

In den letzten Jahrzehnten hat sich das fragmentbasierte Wirkstoffdesign (FBWD) als neues Konzept in der Wirkstoffsuche hervorgetan und ist auf eine zunehmende Zahl biologischer

Targets angewendet worden.^[1–3] FBWD erzielt höhere Trefferraten als Hochdurchsatz-Screening und ermöglicht es, den chemischen Raum mit kleineren Bibliotheken abzudecken.^[2] Seit Mitte der 90er Jahre^[4] hat FBWD einen enormen Zuschuss erfahren und viele pharmazeutische Unternehmen nutzen FBWD, sodass inzwischen mehr als 18 Wirkstoffkandidaten auf diesem Wege entwickelt wurden und in die klinischen Testung gelangt sind.^[5]

Nach der Entdeckung von Fragmenttreffern anhand verschiedener Techniken werden die aufgefundenen Hits durch schrittweises Vergrößern, Verknüpfen oder Vereinigen der Fragmente zu größeren Leitstrukturen und Wirkstoffkandidaten optimiert. Fragmentwachstum ist dabei zur beliebtesten und erfolgreichsten Optimierungstechnik herangereift,^[6,7] obwohl es mehrere iterative Zyklen aus Design, Synthese und Validierung des Bindungsmodus für jedes einzelne Derivat erfordert. Um diesen Nachteil zu überwinden, haben wir vor kurzem über die Kombination von Fragmentwachstum und dynamischer kombinatorischer Chemie (DKC) berichtet, was eine deutliche Beschleunigung der Wirkstoffentwicklung erlaubt.^[8] Fragmentverknüpfung ist hingegen wegen der möglichen „Super-Additivität“ (Verbesserung der Ligandenaffizienz (LE) statt diese nur konstant zu halten) ein besonders attraktives Vorgehen. Als erstes hatten Fesik und Mitarbeiter über eine solche überraschende „Super-Additivität“ bei der Fragmentverknüpfung berichtet.^[4,9] Seitdem gibt es nur wenige Studien in der Literatur, die eine Effizienz bei der Fragmentverknüpfung schwach-affiner Fragmente zu hochaffinen Liganden nachweisen.^[10,11] Die Herausforderung besteht darin, den Bindungsmodus der in benachbarten Taschen gebundenen Fragmente beizubehalten und einen perfekt passenden Linker zu identifizieren.^[12,13]

Neben FBWD, sind DKC^[14–18] und dynamisches Ligationscreening (DLS)^[19–22] leistungsfähige Strategien, um Hits für biologische Zielstrukturen zu identifizieren bzw. zu optimieren. In einer dynamischen kombinatorischen Bibliothek (DKB) sind die Bindungen zwischen den Bausteinen reversibel und werden im Gleichgewicht gebildet bzw. wieder gebrochen. Das Hinzufügen des Proteintargets führt zur Einstellung eines neuen Gleichgewichts, da einer oder mehrere Bibliotheksbestandteile von dem Protein abgefangen werden, was zu einer Amplifikation des/der stärksten Binder(s) der DKB führt. Im DLS ermöglicht die Ausbildung einer reversiblen, kovalenten Bindung zwischen einer dirigierenden Sonde und einem nukleophilen Fragment die Detektion schwach-affiner Liganden, sodass die Messung bei mikromolarer Konzentration durchgeführt werden kann.

* Dr. M. Mondal, Prof. Dr. A. K. H. Hirsch

Stratingh Institute for Chemistry, University of Groningen
Nijenborgh 7, 9747 AG Groningen (Niederlande)
E-Mail: A.K.H.Hirsch@rug.nl
Homepage: <http://www.rug.nl/research/chemical-biology/hirsch/>
N. Radeva, Prof. Dr. G. Klebe
Institute of Pharmaceutical Chemistry
Marbach Weg 6, 35032 Marburg (Deutschland)

Dr. H. Fanlo-Virgos, Prof. Dr. S. Otto
Centre for Systems Chemistry, Stratingh Institute for Chemistry,
University of Groningen
Nijenborgh 4, 9747 AG Groningen (Niederlande)

Hintergrundinformationen und die Identifikationsnummer (ORCID) der Autoren sind unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.201603074> zu finden.

© 2016 Die Autoren. Veröffentlicht von Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. Dieser Open Access Beitrag steht unter den Bedingungen der Creative Commons Attribution License, die jede Nutzung des Beitrages in allen Medien gestattet, sofern der ursprüngliche Beitrag ordnungsgemäß zitiert wird.

Wir haben daher die synergistische Kombination von Fragmentverknüpfung und DCK als effiziente Strategie für die Identifizierung und Optimierung von Enzyminhibitoren in Erwägung gezogen. Dabei kombinieren wir Fragmentverknüpfung mit Bisacylhydrazone-basierter DCK, um Inhibitoren für Endothiapepsin zu identifizieren, ein Enzym, das zu der bekanntermaßen schwierigen Familie pepsinartiger Aspartylproteasen gehört.^[23]

Aspartylproteasen kommen in Pilzen, Wirbeltieren, Pflanzen und in Retroviren wie dem HI-Virus vor. Diese Enzymklasse spielt eine ursächliche Rolle in wichtigen Krankheiten wie Malaria, Alzheimer, Bluthochdruck und AIDS.^[23] Dank seiner hohen Ähnlichkeit mit diesen Targets für eine Wirkstoffentwicklung, wurde Endothiapepsin immer wieder als Modellenzym für mechanistische Studien^[24–26] und für die Entwicklung von Hemmstoffen des Renins^[27] und der β -Secretase benutzt.^[28] Da Endothiapepsin ein sehr robustes Enzym ist, das über mehr als 20 Tage bei Raumtemperatur in Lösung aktiv bleibt, leicht in großen Mengen verfügbar und einfach zu kristallisieren ist, stellt es einen bestens geeigneten Vertreter der Aspartylproteasen für Modellstudien dar.^[18] Pepsinartige Aspartylproteasen sind als Monomer aktiv und bestehen aus zwei strukturell ähnlichen Untereinheiten, die jeweils einen Aspartylrest zur katalytischen Diade beitragen (D35 und D219 in Endothiapepsin). Sie spalten die Peptidbindung des Substrats durch nukleophilen Angriff eines katalytischen Wassermoleküls.

Obwohl über Bisacylhydrazone-basierte DCK berichtet wurde,^[29] gibt es keinen Bericht über Fragmentverknüpfung mithilfe von DCK. Wir beschreiben hier, wie sich Fragmentverknüpfung und Optimierung mit DCK kombinieren lässt, um auf effizientem Weg an Liganden zur Hemmung der Aspartylprotease Endothiapepsin zu gelangen.

Wir haben Röntgenkristallstrukturen von Endothiapepsin im Komplex mit den Acylhydrazenen **1** und **2** (PDB Code: 4KUP und 3T7P) als Startpunkt für die Fragmentverknüpfung gewählt (Abbildung 1). Mithilfe der synergistischen

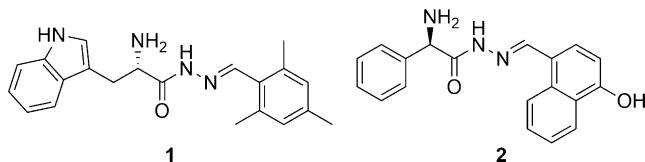


Abbildung 1. Strukturen der Treffer **1** und **2**.

Kombination von strukturbasiertem De-novo-Design und DCK hatten wir zuvor **1** und **2** als Hits in einer Acylhydrazone-basierten DKB entdeckt.^[18] Unsere Treffer **1** und **2** besitzen IC₅₀-Werte von 12.8 μ M und 14.5 μ M bzw. LEs von 0.27 und 0.29 gegen Endothiapepsin. Beide Treffer nehmen unterschiedliche Bindungsmodi mit der katalytischen Diade ein: Entweder erfolgt eine über Wasser vermittelte oder eine direkte Wechselwirkung unter Verdrängung des katalytischen Wassermoleküls. Fragmente **1** und **2** belegen mit ihren Seitenketten die S1- und S2- oder die S1- und S2'-Taschen (Abbildung 2a).

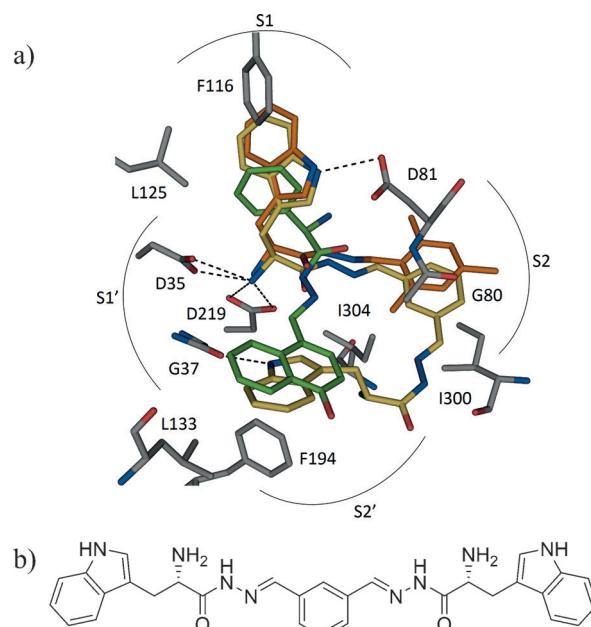
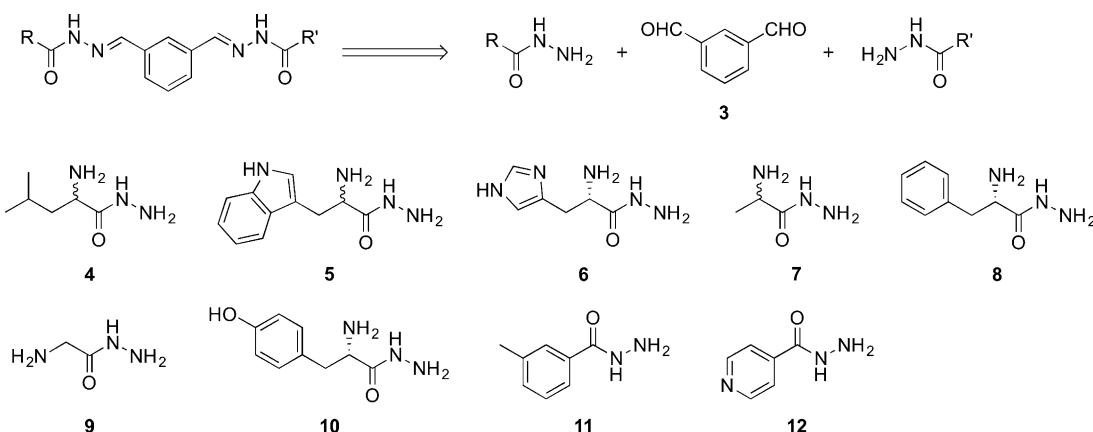


Abbildung 2. a) Überlagerung der mittels Röntgenkristallographie bestimmten Bindungsmodi von **1** (C: orange) und **2** (C: grün) (PDB Code: 4KUP und 3T7P) mit einem modellierten Bisacylhydrazon-Hemmstoff (C: gelb), b) Chemische Struktur des entworfenen Bisacylhydrazons, das in Abbildung 2a dargestellt ist.^[33]

Wir hatten uns vorgenommen, **1** und **2** so zu verknüpfen, dass ein Hemmstoff erhalten wird, der die S1-, S1'-, S2- und S2'-Taschen des Endothiapepsins ausfüllt und eine Vielzahl von Protein-Ligand-Wechselwirkungen eingeht, wodurch die LE beibehalten oder verbessert wird. Mithilfe des Molecular-Modeling-Programms Moloc^[30] haben wir den Mesitylsubstituenten von **1** über einen Acylhydrazonlinker an den Naphthylrest von **2** angeknüpft, der an der Schnittstelle zwischen den S2- und S2'-Taschen liegt und als ein geeigneter Linker erschien. Acylhydrazone-basierte DCK ist attraktiv für Projekte in der Medizinalchemie, da die gebildeten Produkte sowohl über H-Brücken-Donoren als auch -Akzeptoren verfügen und unter sauren wie physiologischen Bedingungen ausreichend stabil als Wirkstoffkandidaten sind. In unseren vorangegangenen Studien haben wir gezeigt, dass Endothiapepsin Acylhydrazone-basierte DCK toleriert.^[8,18] Visuelle Auswertung der bekannten Kokristallstrukturen von Endothiapepsin^[31] und eine „Hotspot“-Analyse^[32] des aktiven Zentrums legten nahe, dass sowohl aromatische als auch aliphatische Substituenten in der S2'-Tasche aufgenommen werden können, da sie hydrophobe Wechselwirkungen mit den Resten G37, L133 und F194 eingehen können. Aufgrund unserer Modellierungen und Auswertung der synthetischen Zugänglichkeit, haben wir einen Satz Bisacylhydrazone-basierter Hemmstoffe des Endothiapepsins entworfen und optimiert. Eine Überlagerung eines entworfenen Bisacylhydrazone-basierten Hemmstoffs mit den ursprünglichen Fragmenten ist in Abbildung 2 gezeigt. Alle Bisacylhydrazone gehen H-Brückenbindungen mit der katalytischen Diade ein und die meisten belegen die S1-, S2-, S1'- und S2'-Taschen, wobei der Bindungsmodus der Fragmente **1** und **2** beibehalten wird.



Schema 1. Strukturen und retrosynthetische Analyse der entworfenen Bisacylhydrazone-Hemmstoffe sowie die entsprechenden Aldehyd- (**3**) und Hydrazid-Vorstufen (**4–12**).

Retrosynthese aller entworfener Bisacylhydrazone führt zu Isophthalaldehyd (**3**) und neun Hydrazidbaustein **4–12** für DKB (Schema 1). Während der Bisaldehyd **3** und die Hydrazide **10–12** kommerziell erhältlich sind, haben wir die Hydrazide **4–9** ausgehend von den entsprechenden Methyl-estern durch Behandlung mit Hydrazin-Monohydrat hergestellt (60–90% Ausbeute, siehe Schema S1 in den Hintergrundinformationen).

Wir haben eine DKB mit Bisaldehyd **3** und neun Hydraziden **4–12** entwickelt, die zu 78 möglichen Bisacylhydrazenen (exklusive *E/Z*-Isomeren) und 12 Monoacylhydrazenen führt. Um die Analyse der Umsetzungsprodukte zu vereinfachen, haben wir die Bibliothek in zwei Teilbibliotheken unterteilt. Wir haben Umkehrphasen-HPLC und LC-MS eingesetzt, um die DKBs zu analysieren und die besten Binder zu identifizieren. Dabei verwendeten wir Anilin als nukleophilen Katalysator, da sich in Gegenwart dieses Moleküls das Gleichgewicht schneller als ohne Katalysator einstellt.

Die erste Bibliothek, DKB-1, bestand aus den vier Hydraziden **5**, **6**, **10** und **12** (jeweils 100 µM) sowie dem Bisaldehyd **3** (50 µM) in Anwesenheit von 10 mM Anilin und 2% DMSO in 0.1M Natriumacetat-Puffer bei pH 4.6, was im Gleichgewicht mit diesen Ausgangsbaustein zur Bildung von 15 möglichen Homo- und Heterobisacylhydrazenen (exklusive der *E/Z*-Isomere) und fünf Monoacylhydrazenen führt. Wir konnten alle Homo- und Heterobisacylhydrazone mittels LC-MS-Analyse nachweisen. Nach Hinzufügung von Endothiapepsin beobachteten wir eine Amplifikation der Bisacylhydrazone **13** und **14** um das mehr als Dreifache im Vergleich zur Reaktion ohne Enzymzusatz (Abbildung 3 und Abbildung S1 in den Hintergrundinformationen). Wir generierten eine zweite Bibliothek, DKB-2, mit den fünf Hydraziden **4**, **7**, **8**, **9** und **11** (jeweils 100 µM) und dem Bisaldehyd **3** (50 µM) unter denselben Bedingungen, was zur Bildung von 28 möglichen Homo- und Heterobisacylhydrazenen (exklusive der *E/Z*-Isomere) und sieben Monoacylhydrazenen im Gleichgewicht mit diesen Baustein führt. Nach Hinzufügen des Proteins wurden die Bisacylhydrazone **15** und **16** um mehr als den Faktor zwei im Vergleich zur Reaktion ohne Enzym gebildet (Abbildung 3 und Abbildung S2 in den Hinter-

grundinformationen). Wir setzten auch eine größere Bibliothek ein, DKB-3, die unter Verwendung aller neun Hydrazide **4–12** und Bisaldehyd **3** erstellt wurde und zur Amplifikation der schon zuvor beobachteten Bisacylhydrazone **13**, **14** und **16** sowie **17** und **18** führte (Abbildung 3 und S3 in den Hintergrundinformationen). Insgesamt haben wir auf diesem Weg

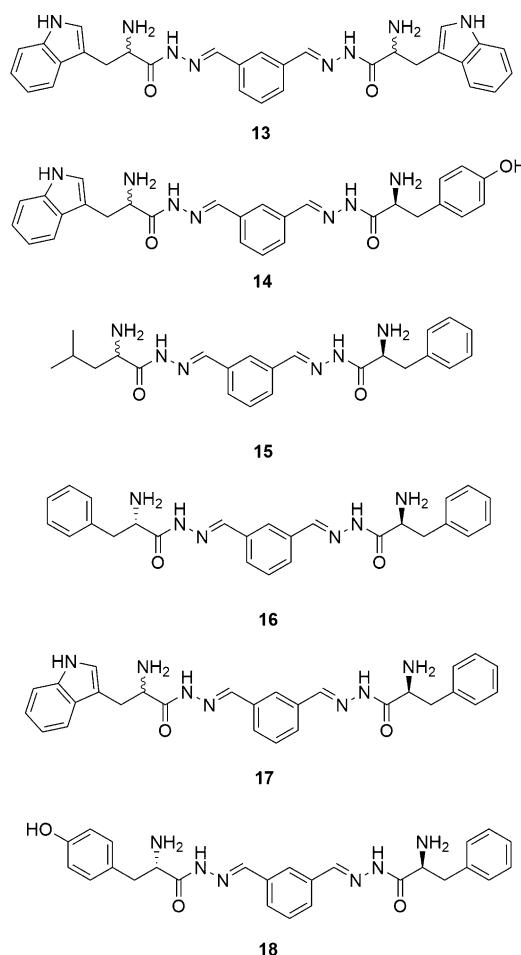


Abbildung 3. Chemische Strukturen der in den drei DKBs mittels LC-MS-Analyse identifizierten Bisacylhydrazone.

zwei Homo- (**13** und **16**) und vier Heterobisacylhydrazone (**14**, **15**, **17** und **18**) aus den drei Bibliotheken DKB-1, DKB-2 und DKB-3 identifiziert (Abbildung 3).

Um in einem Hemmassay die biochemische Aktivität der amplifizierten Bisacylhydrazone zu bestimmen, haben wir die zwei Homo-Bisacylhydrazone **13** und **16** ausgehend von den entsprechenden Hydraziden **5** und **8** und dem Bisaldehyd **3** synthetisiert (siehe Schema S2 und S3, Hintergrundinformationen). Anschließend haben wir ihre Hemmwirkung mit einem fluoreszenzbasiertem Assay bestimmt, der in Analogie zu einem HIV-Proteaseassay entwickelt wurde.^[34] Die biochemische Auswertung bestätigte die Resultate unserer DKC-Experimente, die wir mit LC-MS analysiert hatten. Bisacylhydrazone **13** und **16** hemmen das Enzym mit IC_{50} -Werten von $0.054 \mu\text{M}$ und $2.1 \mu\text{M}$ (siehe Abbildungen 4 sowie S4 und S5 in den Hintergrundinformationen). Die Aktivität des besten Hemmstoffs ist im Vergleich zu den Ausgangs-

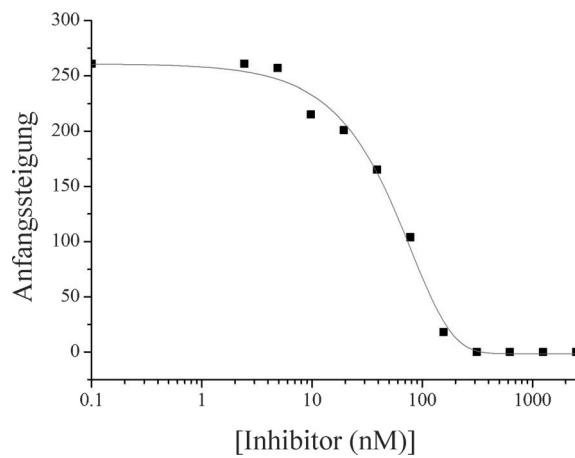


Abbildung 4. Hemmwirkung des Bisacylhydrazons **13** ($IC_{50}=54.5 \pm 0.5 \text{nM}$). Die Messpunkte wurde in jeweils zwei Einzelmessungen ermittelt, Fehler sind als Standardabweichung (SD) angegeben.

Tabelle 1: Die IC_{50} -Werte, Ligandeffizienzen (LEs), berechnete und experimentelle freie Gibbs-Bindungsenergien (ΔG) der ursprünglichen Fragmente und Bisacylhydrazon-Hemmstoffe.

Hemmstoff	$IC_{50} [\mu\text{M}]$	$K_i [\mu\text{M}]$	$\Delta G^{[a]} [\text{kJ mol}^{-1}]$	LE ^[a]
1	12.8 ± 0.4	6 ± 0.2	-30	0.27
2	14.5 ± 0.5	7 ± 0.2	-30	0.29
13	0.054 ± 0.0005	0.0254 ± 0.0002	-49	0.29
16	2.1 ± 0.1	0.98 ± 0.05	-34	0.25

[a] Die Gibbs-Bindungsenergien (ΔG) und die Ligandeffizienzen (LEs) wurden von den experimentell bestimmten IC_{50} -Werten abgeleitet.

treffern 240-fach verbessert. Die experimentellen Gibbs-Bindungsenergien (ΔG) und LEs, die mithilfe der Cheng-Prusoff-Gleichung aus den experimentellen IC_{50} -Werten berechnet wurden,^[35] liegen bei $\Delta G(\mathbf{13}) = -49 \text{ kJ mol}^{-1}$, $\Delta G(\mathbf{16}) = -34 \text{ kJ mol}^{-1}$ und $\text{LE}(\mathbf{13}) = 0.29$, $\text{LE}(\mathbf{16}) = 0.25$. Im Vergleich zu den Ausgangsfragmenten stellt dies eine Verbesserung der ΔG -Werte unter Erhaltung der LEs dar (Tabelle 1).

Um den vorhergesagten Bindungsmodus der verknüpften Fragmente zu validieren, haben wir den stärksten Hemmstoff **13** in Endothiapepsinkristalle eindiffundieren lassen und die Kristallstruktur im Komplex mit dem Enzym bei 1.36\AA Auflösung bestimmt (PDB Code: 5HCT). **13** bindet in den S1-, S1'- und S2-Taschen und bildet über seine α -C-Aminogruppe ein H-Brücke mit der katalytischen Diade (Abbildung 5a). Ein Teil dieses Bisacylhydrazons ist in der Elektronendichtekarte nicht sichtbar, was auf eine Unordnung dieses Substituenten über mehrere Konfigurationen in der Bindetasche hinweist und folgendermaßen mit unseren Modellierungsstudien in Einklang zu bringen wäre. In zwei plausiblen Bindungsposen könnte der kristallographisch nicht aufgelöste Teil des Bisacylhydrazons **13** in Richtung der S2'- und S6-Taschen orientiert sein oder er verbliebe exponiert zum umgebenden Lösungsmittel (Abbildung 5b).

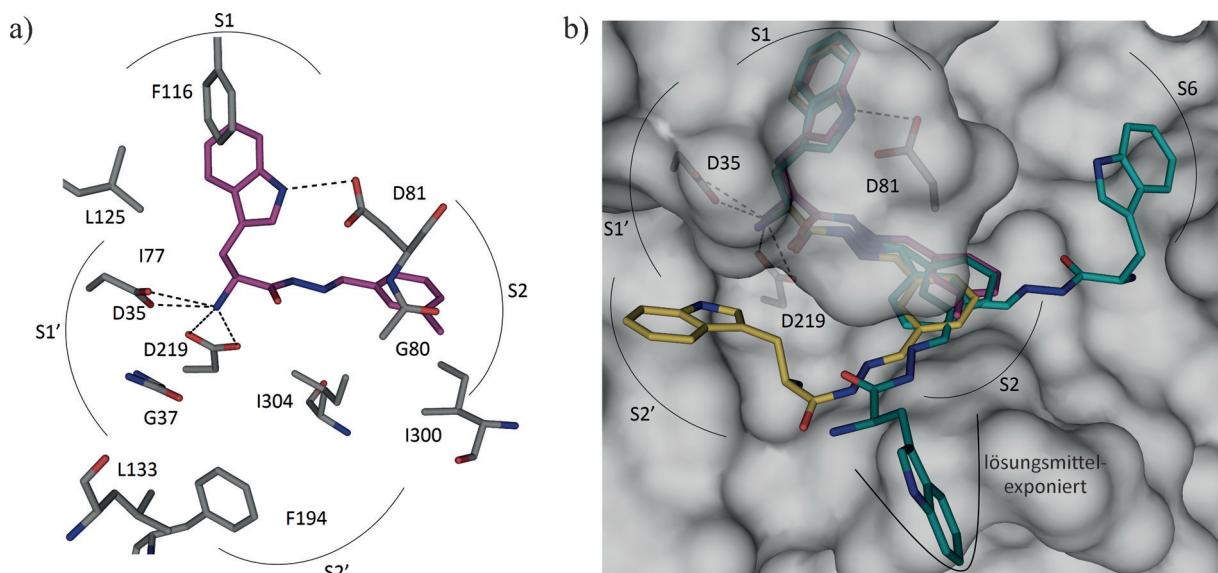


Abbildung 5. a) Röntgenkristallstrukturen des Endothiapepsins im Kokristall mit Bisacylhydrazon **13** (PDB: 5HCT). b) Überlagerung der Kristallstruktur (violett) mit der berechneten Struktur (gelb und türkis) von **13**.^[33]

Der detaillierte Bindungsmodus des verbleibenden Teils des Bisacylhydrazons **13** ist in Abbildung 5a dargestellt. Der sichtbare Teil von **13** behält den Bindungsmodus des ursprünglichen Hits **1** bei und geht mit seiner α -C-Aminogruppe vier ladungsunterstützte H-Brücken mit der katalytischen Diade ein. Weiterhin interagiert er mit der Carboxylatgruppe von D81 über die NH-Gruppe des Indolylsubstituenten, der in der S1-Tasche gebunden ist und eine verschobene π - π - und eine CH- π -Wechselwirkung mit F116 und L125 eingeht. Der Phenylrest von **13** ist in der S2-Tasche gebunden und geht hydrophobe Wechselwirkungen mit I300 und I304 ein. Wie die Mesitylgruppe von **1** geht die Phenylgruppe von **13** auch eine Amid- π -Wechselwirkung mit der Peptidbindung ein, die die Aminosäuren G80 und D81 verknüpft. Der Phenylsubstituent in **13** ist über zwei Iminfunktionalitäten verknüpft, was den aromatischen Ring elektronenverarmt und vermutlich die Amid- π -Wechselwirkung im Vergleich zum elektronenreichen Mesitylring in **1** verstärkt.^[36]

Mit dieser Studie haben wir zum ersten Mal gezeigt, dass die synergistische Kombination von Fragmentverknüpfung und DKC eine leistungsfähige und effiziente Strategie darstellt, um beschleunigt Treffer zu identifizieren und zu optimieren, die zu potenteren Hemmstoffen der Aspartylprotease Endothiapepsin führen. Wir haben eine LC-MS-Analyse verwendet, um die besten Binder direkt aus den DKBs zu identifizieren. Der stärkste Hemmstoff besitzt einen IC₅₀-Wert von 54 nm, was einer 240-fachen Verbesserung der Affinität im Vergleich zu dem Ausgangstreffer aus dem ersten Optimierungszyklus entspricht. Anschließend hat die Röntgenkristallographie unsere In-silico-Fragmentverknüpfung bestätigt. Unsere strategische Kombination aus computerbasierten und analytischen Methoden hat das Potenzial, die Wirkstoffentwicklung für die anspruchsvolle Klasse der Aspartylproteasen zu beschleunigen, um so zu neuen Leitstrukturkandidaten zu kommen. Möglicherweise lässt sich dieses Konzept auf eine große Anzahl anderer Proteintargets übertragen.

Danksagung

Wir danken der Netherlands Organisation for Scientific Research (NWO-CW, VIDI-Grant an A.K.H.H.) und dem Dutch Ministry of Education, Culture, Science (Gravitation Program 024.001.035) für Fördermittel.

Stichwörter: Dynamische kombinatorische Chemie · Endothiapepsin · Fragmentbasierte Wirkstoffentwicklung · Hemmstoffe · Röntgenkristallographie

Zitierweise: *Angew. Chem. Int. Ed.* **2016**, *55*, 9422–9426
Angew. Chem. **2016**, *128*, 9569–9574

- [1] D. A. Erlanson, R. S. McDowell, T. O. Brien, *J. Med. Chem.* **2004**, *47*, 3463–3482.
- [2] P. J. Hajduk, J. Greer, *Nat. Rev. Drug Discovery* **2007**, *6*, 211–219.
- [3] H. Chen, X. Zhou, A. Wang, Y. Zheng, Y. Gao, J. Zhou, *Drug Discovery Today* **2015**, *20*, 105–113.

- [4] S. B. Shuker, P. J. Hajduk, R. P. Meadows, S. W. Fesik, *Science* **2013**, *341*, 1531–1534.
- [5] D. A. Erlanson, *Top. Curr. Chem.* **2011**, *317*, 1–32.
- [6] G. Chessari, A. J. Woodhead, *Drug Discovery Today* **2009**, *14*, 668–675.
- [7] G. E. de Kloet, D. Bailey, R. Leurs, I. J. P. de Esch, *Drug Discovery Today* **2009**, *14*, 630–646.
- [8] M. Mondal, D. E. Groothuis, A. K. H. Hirsch, *MedChemComm* **2015**, *6*, 1267–1271.
- [9] P. J. Hajduk, G. Sheppard, D. G. Nettlesheim, E. T. Olejniczak, S. B. Shuker, R. P. Meadows, D. H. Steinman, G. M. Carrera, P. A. Marcotte, J. Severin, et al., *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 5818–5827.
- [10] A. W. Hung, H. L. Silvestre, S. Wen, A. Ciulli, T. L. Blundell, C. Abell, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 8452–8456; *Angew. Chem.* **2009**, *121*, 8604–8608.
- [11] N. Howard, C. Abell, W. Blakemore, G. Chessari, M. Congreve, S. Howard, H. Jhoti, C. W. Murray, L. C. A. Seavers, R. L. M. Van Montfort, *J. Med. Chem.* **2006**, *49*, 1346–1355.
- [12] D. C. Rees, M. Congreve, C. W. Murray, R. Carr, *Nat. Rev. Drug Discovery* **2004**, *3*, 660–672.
- [13] S. Chung, J. B. Parker, M. Bianchet, L. M. Amzel, J. T. Stivers, *Nat. Chem. Biol.* **2009**, *5*, 407–413.
- [14] M. Demetriades, I. K. H. Leung, R. Chowdhury, M. C. Chan, M. A. McDonough, K. K. Yeoh, Y.-M. Tian, T. D. W. Claridge, P. J. Ratcliffe, E. C. Y. Woon, et al., *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 6672–6675; *Angew. Chem.* **2012**, *124*, 6776–6779.
- [15] V. T. Bhat, A. M. Caniard, T. Luksch, R. Brenk, D. J. Campopiano, M. F. Greaney, *Nat. Chem.* **2010**, *2*, 490–497.
- [16] O. Ramström, J.-M. Lehn, *Nat. Rev. Drug Discovery* **2002**, *1*, 26–36.
- [17] M. Mondal, A. K. H. Hirsch, *Chem. Soc. Rev.* **2015**, *44*, 2455–2488.
- [18] M. Mondal, N. Radeva, H. Köster, A. Park, C. Potamitis, M. Zervou, G. Klebe, A. K. H. Hirsch, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53*, 3259–3263; *Angew. Chem.* **2014**, *126*, 3324–3328.
- [19] M. F. Schmidt, A. Isidro-Llobet, M. Lisurek, A. El-Dahshan, J. Tan, R. Hilgenfeld, J. Rademann, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 3275–3278; *Angew. Chem.* **2008**, *120*, 3319–3323.
- [20] M. F. Schmidt, A. El-Dahshan, S. Keller, J. Rademann, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 6346–6349; *Angew. Chem.* **2009**, *121*, 6464–6467.
- [21] E. Burda, J. Rademann, *Nat. Commun.* **2014**, *5*, 5170.
- [22] M. I. Fernández-Bachiller, A. Horatscheck, M. Lisurek, J. Rademann, *ChemMedChem* **2013**, *8*, 1041–1056.
- [23] J. B. Cooper, *Curr. Drug Targets* **2002**, *3*, 155–173.
- [24] L. Coates, P. T. Erskine, S. Mall, R. Gill, S. P. Wood, D. A. Myles, J. B. Cooper, *Eur. Biophys. J.* **2006**, *35*, 559–566.
- [25] L. Coates, P. T. Erskine, S. P. Wood, D. A. Myles, J. B. Cooper, *Biochemistry* **2001**, *40*, 13149–13157.
- [26] L. Coates, H.-F. Tuan, S. Tomanicek, A. Kovalevsky, M. Mustyakimov, P. Erskine, J. Cooper, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 7235–7237.
- [27] J. Cooper, W. Quail, C. Frazao, S. I. Foundling, T. L. Blundell, C. Humblet, E. A. Lunney, W. T. Lowther, B. M. Dunn, *Biochemistry* **1992**, *31*, 8142–8150.
- [28] S. Geschwindner, L. L. Olsson, J. S. Albert, J. Deinum, P. D. Edwards, T. De Beer, R. H. A. Folmer, *J. Med. Chem.* **2007**, *50*, 5903–5911.
- [29] A. J. Clipson, V. T. Bhat, I. McNaughton, A. M. Caniard, D. J. Campopiano, M. F. Greaney, *Chem. Eur. J.* **2012**, *18*, 10562–10570.
- [30] P. R. Gerber, K. Müller, *J. Comput.-Aided Mol. Des.* **1995**, *9*, 251–268.
- [31] H. Köster, T. Craan, S. Brass, C. Herhaus, M. Zentgraf, L. Neumann, A. Heine, G. Klebe, *J. Med. Chem.* **2011**, *54*, 7784–7796.

- [32] H. Gohlke, M. Hendlich, G. Klebe, *Perspect. Drug Discovery Des.* **2000**, *20*, 115–144.
- [33] PyMOL(TM) Molecular Graphics System, Warren L. DeLano, <http://www.pymol.org/>, version 1.4.1.
- [34] M. V. Toth, G. R. Marshall, *Int. J. Pept. Protein Res.* **1990**, *36*, 544–550.
- [35] H. C. Cheng, *J. Pharmacol. Toxicol. Methods* **2001**, *46*, 61–71.
- [36] M. Harder, B. Kuhn, F. Diederich, *ChemMedChem* **2013**, *8*, 397–404.

Eingegangen am 29. März 2016,
veränderte Fassung am 5. Mai 2016
Online veröffentlicht am 12. Juli 2016
