

## Hyperpolarisation

## Effektive Markierung von bioaktiven Peptiden mit PHIP-Markern zur Steigerung der Empfindlichkeit von NMR-Signalen\*\*

Grit Sauer, Daichi Nasu, Daniel Tietze,\* Torsten Gutmann, Simon Englert, Olga Avrutina, Harald Kolmar\* und Gerd Buntkowsky\*

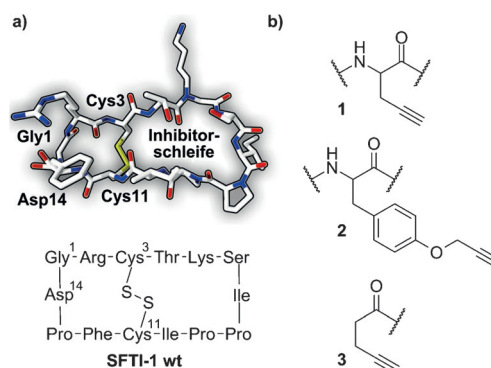
**Abstract:** Neuartige, bioaktive Derivate des Sunflower Trypsin Inhibitors-1 (SFTI-1), die für die Hyperpolarisation mittels Parawasserstoff-induzierter Kernspinpolarisation (PHIP) geeignet sind, wurden entwickelt. Die PHIP-Aktivität dieser Derivate wurde durch den Einbau der Marker L-Propargylglycin, O-Propargyl-L-tyrosin oder 4-Pentinsäure erreicht. In wässrigen Lösungen konnten  $^1\text{H}$ -NMR-Signalverstärkungen um bis zu 70 erzielt werden. Eine isolierte räumliche Lage der Dreifachbindung und die Zugänglichkeit des Markers für den Katalysator sind essenziell für den Grad der erreichbaren Signalverstärkung.

NMR-Spektroskopie ist eines der leistungsfähigsten Analyseverfahren für die Strukturaufklärung von Biomolekülen und ihren Wechselwirkungen mit therapeutisch relevanten Liganden oder Wirkstoffen.<sup>[1]</sup> Dabei limitiert vor allem die geringe Empfindlichkeit dieser Methode ihren Anwendungsbereich. Insbesondere bei der NMR-spektroskopischen Untersuchung der Bindung von Liganden an makromolekulare Targets erschweren die intensiven Hintergrundsignale des Targets die Interpretation der NMR-Spektren. In den letzten Jahren wurde die Anwendung von Hyperpolarisierungsverfahren, wie dynamische Kernspinpolarisation (DNP),<sup>[2]</sup> chemisch induzierte dynamische Kernspinpolarisation (CIDNP),<sup>[3]</sup> hyperpolarisierte Xenon-Biosensoren (HP/Xe),<sup>[4]</sup> Parawasserstoff-induzierte Kernspinpolarisation (PHIP)<sup>[5]</sup> und die verwandte SABRE-Technik,<sup>[6]</sup> als vielversprechendste Strategien zur Lösung dieses Problems erkannt. Diese Ansätze basieren auf der Übertragung der Spinpolarisation von einer hoch polarisierten Spinart auf Kernspins von geringerer Empfindlichkeit<sup>[6,7]</sup> oder auf der direkten

Untersuchung der hyperpolarisierten Kernspins<sup>[4]</sup> und zeigen als Folge dessen eine drastische Signalverstärkung gegenüber der im thermischen Gleichgewicht erzielten Signalstärke.

Ein wesentlicher Vorteil der PHIP-Methode ist, dass kein aufwendiger und teurer apparativer Aufbau erforderlich ist, um eine Hyperpolarisierung zu erzielen.<sup>[8]</sup> Dennoch ist bisher nur eine überraschend geringe Zahl einfacher biologisch relevanter Moleküle mit dieser Hyperpolarisationsmethode untersucht worden,<sup>[9]</sup> hauptsächlich weil eine ungesättigte Funktionalität im Zielmolekül vorhanden sein muss, in welche der para- $\text{H}_2$  paarweise, effektiv und innerhalb der Lebensdauer des hyperpolarisierten Zustandes übertragen werden kann. Dies kann durch den Einbau eines entsprechenden Bausteins, der als PHIP-Marker fungiert, erreicht werden. Allerdings müssen Art und Position dieses PHIP-Markers sorgfältig ausgewählt werden, um zum einen eine starke Hyperpolarisation zu gewährleisten und zum anderen die Bioaktivität der Verbindung zu erhalten.<sup>[7c,9a,f,10]</sup>

Kürzlich konnten wir in einer PHIP-Studie zeigen, dass mithilfe des Bausteins L-Propargylglycin (Pra, **1**; Abbildung 1b) Hyperpolarisation in kleinen, linearen, syntheti-



**Abbildung 1.** a) Struktur von SFTI-1; unterer Teil: als Dreibuchstaben-code (Disulfidbrücken exponiert); oberer Teil: als Stabmodell (blau N, rot O, gelb S, weiß C), wt = Wildtyp. b) Chemische Struktur der PHIP-Marker **1–3**.

schen Peptiden und cyclischen Oligopeptiden induziert werden kann.<sup>[9e]</sup> Dieser Marker kann problemlos an jeder gewünschten Position der Peptidkette eingeführt werden, benötigt keine spezielle Schutzgruppe und ermöglicht eine gute Signalverstärkung. Diese Strategie haben wir auf das starre Peptidgerüst des Sunflower Trypsin Inhibitors-1 (SFTI-1; Abbildung 1) übertragen.<sup>[11]</sup> Dieses Tetradecapeptid findet Anwendung in der Entwicklung neuartiger Tumordiagnostika und -therapeutika. Es hat eine einzigartige, Kopf-zu-Schwanz-verknüpfte, makrocyclische Architektur, eine *cis*-

[\*] G. Sauer,<sup>[1]</sup> Dr. D. Tietze, Dr. T. Gutmann, Prof. Dr. G. Buntkowsky  
Eduard-Zintl-Institut für Anorganische und Physikalische Chemie  
Technische Universität Darmstadt  
Alarich-Weiss-Straße 4, 64287 Darmstadt (Deutschland)  
E-Mail: tietze@chemie.tu-darmstadt.de  
Gerd.Buntkowsky@chemie.tu-darmstadt.de

Homepage: <http://www.chemie.tu-darmstadt.de/buntkowsky/>

D. Nasu,<sup>[1]</sup> S. Englert, Dr. O. Avrutina, Prof. Dr. H. Kolmar  
Clemens-Schöpf-Institut für Organische Chemie und Biochemie  
Technische Universität Darmstadt  
Alarich-Weiss-Straße 4, 64287 Darmstadt (Deutschland)  
E-Mail: Kolmar@Biochemie-TUD.de  
Homepage: <http://www.chemie.tu-darmstadt.de/kolmar>

[†] Diese Autoren haben zu gleichen Teilen zu der Arbeit beigetragen.

[\*\*] Diese Forschung wurde unterstützt von der Deutschen Forschungsgemeinschaft unter dem Vertrag Bu-911-22-1.

Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.201404668> zu finden.

Peptidbindung und eine intramolekulare Disulfidbrücke zwischen Cys<sup>3</sup> und Cys<sup>11</sup>.<sup>[11e,12]</sup>

Die Verbindungen **1–3** wurden als potenzielle PHIP-Marker ausgewählt (Abbildung 1b), da sie verschiedene wichtige strukturelle und funktionelle Eigenschaften in sich vereinen. Allem voran zeigt die Alkylgruppe während der Hydrierung eine signifikante inhärente PHIP-Aktivität. Da die Anwendbarkeit von **1** als hyperpolarisierbare Komponente, sowohl als Einzelverbindung als auch eingebunden in kleinere Peptide,<sup>[7c,9e]</sup> bereits demonstriert wurde, wurde **1** als Referenzpunkt für die Studie verwendet (Abbildung 2, Peptid **5**).

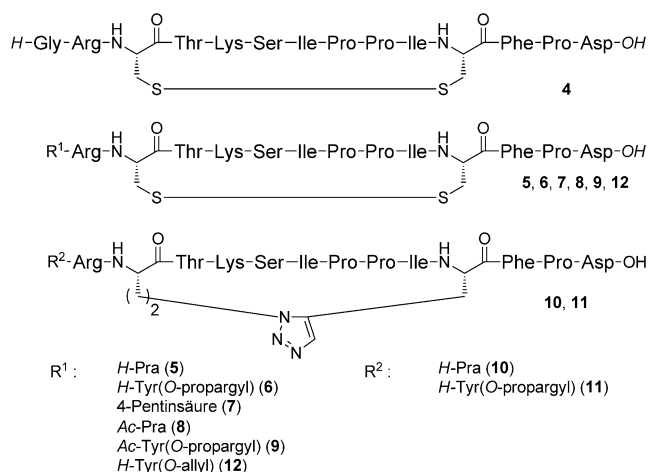


Abbildung 2. Chemische Strukturen von **4–12**.

Ein weiteres wichtiges Kriterium war die Zugänglichkeit der Dreifachbindung für den Homogenkatalysator. Funktionelle Gruppen der Seitenketten und des Peptidrückgrates, wie -OH, -SH, -COOH, -CONH<sub>2</sub>, -NH<sub>2</sub> und Imidazol, könnten als Koordinationsstellen für den Rhodiumkatalysator wirken und somit die Hydrierungseffizienz verringern oder auch zu einer Vergiftung des Katalysators führen. Es ist bekannt, dass Sauerstoff- und Schwefelspezies ebenso wie Amidbindungen den PHIP-Effekt stark reduzieren können.<sup>[9e]</sup> Das Tyrosinderivat **2** sollte den PHIP-Marker räumlich vom N-Terminus, dem Rückgrat und den funktionellen Gruppen des Peptides abgrenzen (Peptid **6**). Ein weiteres Untersuchungsobjekt war 4-Pentinsäure **3**. Zugleich diente dieser strukturell sehr kleine Marker zur Maskierung des freien N-Terminus des Peptids (Peptid **7**). Um den Einfluss der N-terminalen Aminfunktion weiter zu untersuchen, wurden Modellpeptide (Peptide **8** und **9**) mit acyliertem N-Terminus hergestellt.

Die optimale Position für die Einführung des PHIP-Markers wurde aus der Kristallstruktur von **4** im Komplex mit Trypsin abgeleitet (Abbildung 3; PDB-Code: 1SFI).<sup>[13]</sup> Dabei erscheint das N-terminale Gly 1 als geeignetste Position für den Marker innerhalb der Sequenz des SFTI1 (Abbildung 3).<sup>[14]</sup>

Schwefelatome, die Disulfidbrücken bilden, sind starke Elektronendonoren und können daher einen Komplex mit dem Rhodiumkatalysator bilden.<sup>[15]</sup> Dies könnte Auswirkung

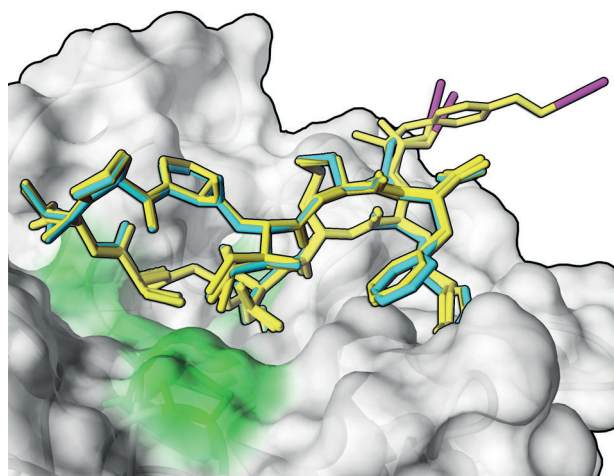


Abbildung 3. Strukturen und überlagerte Darstellungen der energienominierten 3D-Modelle der Varianten **4** (cyanblau),<sup>[13]</sup> **5**, **6** und **7** (gelb, Acetylgruppen sind in Magenta eingefärbt, das aktive Zentrum von Trypsin ist in Grün hervorgehoben) als Kokomplex mit Trypsin zur Visualisierung der räumlichen Position und Orientierung der PHIP-Marker.

gen auf die Hydrierungsreaktion haben, weshalb die intramolekulare Disulfidbrücke gegen das 1,5-disubstituierte 1,2,3-Triazolmimetikum ausgetauscht wurde.<sup>[16]</sup> Da bekannt ist, dass die Bioaktivität eines solchen Mimetikums mit der des natürlichen Peptides vergleichbar ist,<sup>[17]</sup> wurden die Peptidmimetika **10** und **11** hergestellt, um den Einfluss der Disulfidbrücke unter Beibehaltung der Bioaktivität auf die PHIP-Effizienz untersuchen zu können.

Nach der Synthese der linearen Vorstufen durch Mikrowellen-unterstützte Fluorenylmethoxycarbonyl(Fmoc)-Festphasenpeptidsynthese und der Abspaltung vom Trägerharz gelangt man durch Luftsauerstoff-vermittelte oxidative Peptidfaltung zu den disulfidverbrückten Peptiden **5–9**. Die Makrocyclisierung der Peptidmimetika **10** und **11** wurde durch die Bildung des 1,5-disubstituierten Triazols am Trägerharz mithilfe Ru<sup>II</sup>-katalysierter Azid-Alkin-Cycloaddition (RuAAC) erreicht (siehe Seite S4 der Hintergrundinformationen).<sup>[17]</sup>

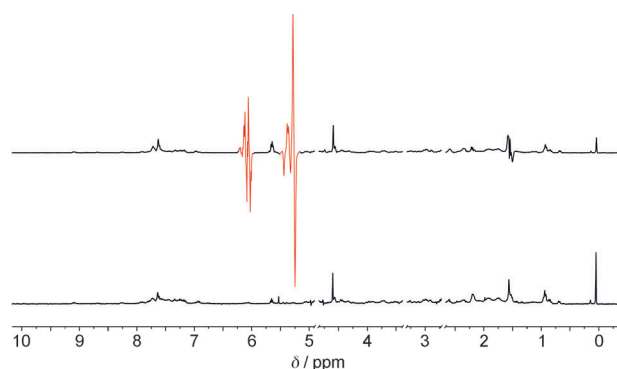
Anschließend wurde die Eignung der einzelnen Bausteine Fmoc-L-Tyr(propargyl)-OH (Fmoc-**2**-OH) und Pentinsäure (**3**-OH) sowie der Peptide **5–12** zur <sup>1</sup>H-Hyperpolarisation untersucht. Als Katalysator wurde [Rh(dppb)(cod)]BF<sub>4</sub> (COD = 1,5-Cyclooctadien, dppb = 1,4-Bis(diphenylphosphanyl)butan) eingesetzt. Die Reaktionen wurden mit ca. 50 % para-angereichertem H<sub>2</sub> bei 2 bar durchgeführt.<sup>[18]</sup> Para-H<sub>2</sub> wurde an Aktivkohle als Katalysator bei der Temperatur von flüssigem Stickstoff generiert. Nach der Zugabe von p-H<sub>2</sub> wurde die Reaktionsmischung 10 s im Erdmagnetfeld geschüttelt, und anschließend wurde das Probenröhrchen in das starke Magnetfeld des Spektrometers überführt (7 Tesla). Die Spektren der hyperpolarisierten Spezies wurden mit einem Single-Scan-Experiment detektiert (45° Anregungspuls). Die Produktsignale im thermischen Gleichgewicht, die für die Berechnung der Signalverstärkung benötigt werden, wurden mit mehrfacher Datenerfassung aufgezeichnet (typisch 256 Scans). Die erreichte Signalverstärkung (SE) wurde aus dem

Verhältnis der Integrale der hyperpolarisierten Signale und der entsprechenden Signale im thermischen Gleichgewicht berechnet (siehe Seite S8 der Hintergrundinformationen). Anzumerken ist, dass die hyperpolarisierten Signale bei  $\delta = 5.8, 2.2$  und  $1.5$  ppm durch die Hydrierung des Cyclooctadienliganden des Katalysators verursacht werden.<sup>[19]</sup>

Die Hydrierung der Dreifachbindung von Fmoc-2-OH ergibt die Alken-funktionalisierte Verbindung Fmoc-L-Tyr-(allyl)-OH und führt zu hyperpolarisierten Protonensignalen bei  $\delta = 5.2$ – $5.5$  ppm mit  $SE \approx 200$ . Diese Verstärkung ist vergleichbar mit der SE, die bei der Hydrierung von Fmoc-L-Propargylglycin (Fmoc-1-OH) erreicht wird.<sup>[9e]</sup> Interessanterweise führt die Hydrierung von Pentinsäure (3-OH) zur entsprechenden Pentensäure zu einer 4–5-fach größeren Signalverstärkung ( $SE = 900$ ) als im Fall von Fmoc-1-OH und Fmoc-2-OH. Die Signalverstärkung für den zweiten Hydrierungsschritt, der zu vollgesättigten Produkten führt, ist in der Regel sehr gering oder nicht beobachtbar (siehe Seite S9, Tabelle T2, der Hintergrundinformationen). Zum Vergleich der SE der Verbindungen wurden die Relaxationszeiten  $T_1$  der Protonen der neugebildeten  $CH_2$ -Gruppe ( $H^a/H^b$ ) der Doppelbindung bestimmt ( $\delta = 5.0$ – $5.3$  ppm; siehe Seite S9, Tabelle T3, der Hintergrundinformationen). Die längste  $T_1$ -Zeit zeigte 3-OH, das auch die größte Signalverstärkung aufweist.

Für alle SFTI-1-Varianten (6–11; Tabelle 1) konnten charakteristische Antiphasensignale beobachtet werden, die auf das Vorhandensein der PHIP-Marker 1–3 zurückzuführen sind. Für Peptid 5, das aus dem Pra-Marker in Verbindung mit einem freien  $\alpha$ -Amin besteht, und Peptid 12 konnten keine Hydrierungsprodukte detektiert werden.

Die größte Signalverstärkung von 70, die in dieser Studie erreicht werden konnte, wurde für das Peptid 6 mit dem Propargyltyrosinmarker beobachtet. Abbildung 4 zeigt beispielhaft ein  $^1H$ -NMR-Spektrum von Peptid 6 nach der Hydrierung mit para-angereichertem Wasserstoff.



**Abbildung 4.** Oben:  $^1H$ -NMR-Spektrum der Reaktionsmischung aus **6** und  $[Rh(cod)(dppb)]BF_4$  in  $[D_4]Methanol$ , ca. 34 s nach der Hydrierung mit para-angereichertem Wasserstoff aufgenommen. Die hyperpolarisierten  $^1H$ -Signale von **6** sind rot hervorgehoben. Unten:  $^1H$ -NMR-Spektrum nach der Relaxation der polarisierten Spinzustände.

Die  $^1H$ - $T_1$ -Zeit der entstandenen  $CH_2$ -Gruppe ( $H^a/H^b$ ) in Peptid 6 beträgt 2.8 s. Im Unterschied dazu konnte in Peptid 7 nur eine schwache Signalverstärkung beobachtet werden, obwohl die  $^1H$ - $T_1$ -Zeit der gebildeten  $CH_2$ -Gruppe in der gleichen Größenordnung liegt (2.5 s). Dies ist überraschend, da die ungebundene Pentinsäure (3-OH) die größte SE und die längste Relaxationszeit  $T_1$  zeigte. Da die  $T_1$ -Zeiten der untersuchten Verbindungen alle in der gleichen Größenordnung liegen, nehmen wir an, dass die signifikanten Unterschiede in den beobachteten Signalverstärkungen der Bausteine und ihrer zugehörigen, in das SFTI eingebundenen Derivate nicht nur über das Relaxationsverhalten der Spinzustände erklärt werden können – stattdessen muss die Effizienz der Substrathydrierung während des Rh-katalysierten Reaktionszyklus für den Grad der Signalverstärkung entscheidend sein. Der Hydrierungsprozess besteht einerseits aus der Bindung von  $H_2$  am Rh-Zentrum zur Bildung des Dihydridokomplexes, gefolgt vom Einbau der H-Atome in den ungesättigten Bindungen; andererseits ist die Koordination der entsprechenden Mehrfachbindung an den Katalysator ein komplexer kinetischer Prozess. Dies lässt darauf schließen, dass der Grad der Signalverstärkung vom Hydridtransfer zwischen ungesättigter Verbindung und Metalion, der  $T_1$ -Relaxation und den konkurrierenden Koordinationsstellen in Biomolekülen abhängt.

Der freie N-Terminus kann eine geeignete Koordinationsstelle für den Katalysator zur Verfügung stellen. Deshalb wurden die acylierten Peptide 8 und 9 synthetisiert. Charakteristische, aber sehr schwache Antiphasensignale konnten für das Pra-markierte Peptid 8 beobachtet werden. Das N-terminal geschützte Peptid 9 zeigte eine Rest-SE von 68, ähnlich der für die nicht acylierte Variante 6. Überraschenderweise ergab der Einbau der Pentinsäure, die keine freie Aminfunktion am N-Terminus aufweist, in Peptid 7 eine moderate SE von 5, was darauf schließen lässt, dass für eine gute Signalverstärkung keine N-terminale Derivatisierung notwendig ist.

In guter Übereinstimmung mit den erzielten Ergebnissen der entsprechenden Disulfid-verbrückten Peptide 5 und 6 zeigte das Propargyltyrosinmarker tragende 11 eine signifikant größere SE als das entsprechende Pra tragende Peptid

**Tabelle 1:** Zusammenfassung der berechneten  $K_i$ - und SE-Werte für 4–12.

| Nr. | Marker       | Makrocyclisierung | N-Terminus | SE <sup>[a]</sup> | $K_i$ [nM] <sup>[b]</sup> |
|-----|--------------|-------------------|------------|-------------------|---------------------------|
| 4   | –            | Cystin            | H-         | –                 | $0.28 \pm 0.02$           |
| 5   | 1            | Cystin            | H-         | n.h.              | $1.53 \pm 0.28$           |
| 6   | 2            | Cystin            | H-         | 70                | $1.41 \pm 0.27$           |
| 6'  | 2            | Cystin            | H-         | 74                | –                         |
| 6'' | 2            | Cystin            | H-         | 66                | –                         |
| 7   | 3            | Cystin            | kein       | 5                 | $0.20 \pm 0.03$           |
| 8   | 1            | Cystin            | Ac-        | n.h.              | $0.21 \pm 0.04$           |
| 8a  | 1            | –                 | Ac-        | n.a.              | –                         |
| 9   | 2            | Cystin            | Ac-        | 68                | $0.21 \pm 0.03$           |
| 9a  | 2            | –                 | Ac-        | 65                | –                         |
| 10  | 1            | Triazol           | H-         | n.a.              | $7.21 \pm 0.90$           |
| 11  | 2            | Triazol           | H-         | 35                | $4.33 \pm 0.61$           |
| 12  | Tyr(O-allyl) | Cystin            | H-         | n.h.              | $1.27 \pm 0.20$           |

[a] Wert wurde berechnet, wie auf Seite S8 der Hintergrundinformationen beschrieben. [b] Fehler wurde berechnet aus der Fehlerfortpflanzung  $K_i^{ppp}$  und  $K_M$  (siehe Seiten S5–7 der Hintergrundinformationen). 6'-SE wurde in einer Wasser/ $[D_4]Methanol$ -Mischung (1:1, v/v) bei 333 K und 6''-SE in einer Wasser/ $[D_4]Ethanol$ -Mischung (1:1, v/v) bei 333 K untersucht. 8a und 9a sind die reduzierten Dithiolpeptide (siehe Seite S3 der Hintergrundinformationen); n.h.: keine Hydrierung wurde beobachtet; n.a.: nicht auswertbar, Produktsignale waren vernachlässigbar klein.



dmimetikum **10**. Überraschenderweise war die SE für **11** nur halb so groß wie die von Peptid **6**, das eine intramolekulare Disulfidbrücke enthält. Daraus lässt sich schließen, dass die Triazolylfunktion den Hydrierungsprozess beeinflusst. Der Grund hierfür liegt vermutlich in den freien Stickstoff-Elektronenpaaren der Triazoleinheit, die eine konkurrierende Koordinationsstelle für den Rh-Katalysator ist. Da für die schwefelhaltigen Derivate **6**, **9** und **9a** (reduziertes Dithiol-peptid) die höchste SE beobachtet wurde, haben die schwefelhaltigen Einheiten anscheinend keinen ausgeprägten Einfluss auf die Koordination mit dem Katalysator, was wiederum auf die besondere Architektur der untersuchten Verbindungen zurückzuführen sein kann.

Wegen der möglichen Biokompatibilitätsprobleme beim Gebrauch organischer Lösungsmittel wurden PHIP-Experimente in wässrigen Systemen, nämlich in Wasser/Methanol und Wasser/Ethanol (1:1), durchgeführt (siehe Seite S8 und Seite S15, Abbildungen F12 und F13, der Hintergrundinformationen). Diese Untersuchung erforderte eine Erhöhung der Temperatur, um die Katalysatoraktivität zu steigern. Bei 333 K ergab sich eine SE von 74 für **6** in Wasser/MeOH und von 66 in Wasser/EtOH. Damit liegen die Ergebnisse im selben Bereich wie diejenigen in reinem Methanol. Ferner wird unter diesen Bedingungen die strukturelle Integrität von **6**, und somit dessen Aktivität, nicht verschlechtert (siehe Seite S26 der Hintergrundinformationen).<sup>[20]</sup>

Generell legen die Befunde nahe, dass funktionelle Gruppen in der Nähe der Dreifachbindung des PHIP-Markers die erreichbare Signalverstärkung einschränken, da sie als Liganden agieren und an den Katalysator koordinieren können. Daher müssen zwei Faktoren berücksichtigt werden, um eine ausgeprägte Signalverstärkung erreichen zu können: 1) die Zugänglichkeit der Dreifachbindung während des Katalysezyklus und (2) ihre räumliche Entfernung vom Peptidrückgrat.

Um den Einfluss der PHIP-Marker auf die Funktion des Inhibitors zu untersuchen, wurde ihre Bioaktivität in kinetischen Untersuchungen unter Verwendung von Rindertrypsin und Boc-Gln-Ala-Arg-4-Nitroanilid (Boc = *tert*-Butoxycarbonyl) als chromogenes Substrat bestimmt (siehe Seiten S5–S7 der Hintergrundinformationen).<sup>[16e,17,21]</sup> Die substratunabhängigen Inhibitionskonstanten  $K_i$  von **5–12** wurden berechnet (Tabelle 1) und liegen im einstelligen nm und sub-nm Bereich. Den Peptiden **7–9** fehlt der freie N-Terminus. Sie hatten eine bessere Inhibitionswirkung als **5** und **6**, die ein N-terminales Amin tragen. Dies bestätigt die bereits bekannten Daten der Bioaktivität von SFTI-Systemen.<sup>[12b,22]</sup> Das Computermodell (Abbildung 3) zeigt, dass die Seitenkette von **2** die Bindungsstelle des Enzyms nicht beeinträchtigt. Daher wird die Bioaktivität der untersuchten Verbindungen nicht durch die Marker beeinflusst, und alle Varianten haben einen  $K_i$ -Wert im Bereich von sehr stark bindenden Inhibitoren.

Zum ersten Mal wurde die Parawasserstoff-induzierte Kernspinpolarisation in bioaktiven Peptidsystemen mit einem eingeführten terminalen Alkinmarker untersucht. Hierfür wurden die Bausteine L-Propargylglycin (**1**), O-Propargyl-L-Tyrosin (**2**) und 4-Pentinsäure (**3**) verwendet. Ausgestattet mit einer ausgeprägten Hyperpolarisationsfähigkeit (SE = 200–900) und mit einer geringen Beeinflussung der

Bioaktivität von synthetischen Proteaseinhibitoren ermöglichen diese Marker eine signifikante Signalverstärkung im <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum (SE bis zu 70). Die Acylierung des freien, terminalen Amins hat keine Auswirkung auf die Hyperpolarisationsfähigkeit, während der Ersatz der Disulfidbrücke durch eine 1,2,3-Triazoleinheit die SE halbiert, vermutlich bedingt durch die Fähigkeit zur Koordination mit dem Rhodiumkatalysator.

Während die beobachtete Signalverstärkung groß ist, sind die gemessenen  $T_1$ -Zeiten eher kurz. Eine einfache Strategie zur  $T_1$ -Zeitenverlängerung ist die Übertragung der hyperpolarisierten Kernspins in langlebige Kernspin-Singulett-Zustände, wie bereits von Levitt gezeigt wurde,<sup>[23]</sup> oder durch Polarisationstransfer auf Nachbarheteroatome wie <sup>13</sup>C.<sup>[24]</sup> Alternativ könnte die Single-Shot-MR-Bildgebung auf hyperpolarisierten Proben mit schneller Detektion<sup>[25]</sup> oder das konstante Generieren von Hyperpolarisation<sup>[26]</sup> für 2D-NMR-Experimente angewendet werden, um die Untersuchung von Protein-Ligand-Studien zu ermöglichen.

Unsere Befunde lassen darauf schließen, dass die  $T_1$ -Zeiten der hyperpolarisierten Protonen nicht die einzige Ursache für die beobachteten Unterschiede in der SE sein können. Es ist davon auszugehen, dass die räumlich abgegrenzte Lage der Dreifachbindung und somit ihre Zugänglichkeit für den Hydrierungskatalysator die bestimmenden Faktoren für den Grad der Signalverstärkung sind.

Die SE wird innerhalb der untersuchten Serie der PHIP-markierten SFTI-Varianten entsprechend der Länge der Alkin-tragenden Seitenkette größer. Diese Seitenkette trennt die Dreifachbindung von den funktionellen Gruppen des Peptides und erreicht somit den maximalen Wert der SE für das O-Propargyl-L-tyrosinderivat.

Nach unserem Wissen ist dies die erste systematische Untersuchung eines vielfältig funktionalisierten bioaktiven Peptids mittels PHIP. Es kann angenommen werden, dass die Propargyltyrosineinheit als ein effizienter, strukturell kleiner und nicht invasiver Baustein allgemein einsetzbar ist, um selektiv PHIP in bioaktiven Peptiden zugänglich zu machen, besonders in wässrigen Systemen. Wir nehmen an, dass unser Ansatz auf eine große Zahl von biomolekularen Systemen übertragbar ist. Darüber hinaus sind SFTI-Derivate<sup>[11a,f]</sup> mögliche Inhibitoren für Tumor-assoziierte Proteasen. Damit hat die Markierung mit PHIP-Markern das Potenzial, neue Wege in der Kernspintomographie aufzuzeigen.

Eingegangen am 24. April 2014,

veränderte Fassung am 29. Juli 2014

Online veröffentlicht am 8. Oktober 2014

**Stichwörter:** Inhibitoren · Kernspin-Hyperpolarisation · NMR-Spektroskopie · PHIP · Signalverstärkung

- [1] a) P. J. Hajduk, R. P. Meadows, S. W. Fesik, *Q. Rev. Biophys.* **1999**, 32, 211–240; b) M. Pellecchia, D. S. Sem, K. Wuthrich, *Nat. Rev. Drug Discovery* **2002**, 1, 211–219; c) Y. Lee, H. Zeng, A. Mazur, M. Wegstroth, T. Carlomagno, M. Reese, D. Lee, S. Becker, C. Griesinger, C. Hilty, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, 51, 5179–5182; *Angew. Chem.* **2012**, 124, 5269–5272.

- [2] a) A. W. Overhauser, *Phys. Rev. Lett.* **1953**, 92, 411–415; b) R. A. Wind, J.-H. Ardenkjær-Larsen, *J. Magn. Reson.* **1999**, 141, 347–354; c) J. Ardenkjær-Larsen, S. Macholl, H. Jóhannesson, *Appl. Magn. Reson.* **2008**, 34, 509–522.
- [3] a) J. Bargon, H. Fischer, *Z. Naturforsch. A* **1967**, 22, 1556–1562; b) L. Kuhn, in *Topics in Current Chemistry*, Vol. 338 (Hrsg.: L. T. Kuhn), Springer, Berlin **2013**, S. 229–300; c) J. H. Lee, Y. Okuno, S. Cavagnero, *J. Magn. Reson.* **2014**, 241, 18–31.
- [4] M. M. Spence, S. M. Rubin, I. E. Dimitrov, E. J. Ruiz, D. E. Wemmer, A. Pines, S. Q. Yao, F. Tian, P. G. Schultz, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2001**, 98, 10654–10657.
- [5] a) T. C. Eischenschmid, R. U. Kirss, P. P. Deutsch, S. I. Hommeltoft, R. Eisenberg, J. Bargon, R. G. Lawler, A. L. Balch, *J. Am. Chem. Soc.* **1987**, 109, 8089–8091; b) C. R. Bowers, D. P. Weitekamp, *J. Am. Chem. Soc.* **1987**, 109, 5541–5542; c) M. G. Pravica, D. P. Weitekamp, *Chem. Phys. Lett.* **1988**, 145, 255–258.
- [6] R. W. Adams, J. A. Aguilar, K. D. Atkinson, M. J. Cowley, P. I. Elliott, S. B. Duckett, G. G. Green, I. G. Khazal, J. Lopez-Serrano, D. C. Williamson, *Science* **2009**, 323, 1708–1711.
- [7] a) T. Gutmann, T. Ratajczyk, S. Dillenberger, Y. Xu, A. Grünberg, H. Breitke, U. Bommerich, T. Trantzsche, J. Bernarding, G. Buntkowsky, *Solid State Nucl. Magn. Reson.* **2011**, 40, 88–90; b) A. Thomas, M. Haake, F. W. Grevels, J. Bargon, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1994**, 33, 755–757; *Angew. Chem.* **1994**, 106, 820–822; c) T. Trantzsche, J. Bernarding, M. Plaumann, D. Lego, T. Gutmann, T. Ratajczyk, S. Dillenberger, G. Buntkowsky, J. Bargon, U. Bommerich, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2012**, 14, 5601–5604.
- [8] I. V. Koptug, *Mendeleev Commun.* **2013**, 23, 299–312.
- [9] a) S. Aime, W. Dastru, R. Gobetto, A. Viale, *Org. Biomol. Chem.* **2005**, 3, 3948–3954; b) S. Glöggler, J. Colell, S. Appelt, *J. Magn. Reson.* **2013**, 235, 130–142; c) S. Glöggler, R. Müller, J. Colell, M. Emondts, M. Dabrowski, B. Blumich, S. Appelt, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2011**, 13, 13759–13764; d) J. B. Hovener, N. Schwaderlapp, T. Lickert, S. B. Duckett, R. E. Mewis, L. A. Highton, S. M. Kenny, G. G. Green, D. Leibfritz, J. G. Korvink, J. Hennig, D. von Elverfeldt, *Nat. Commun.* **2013**, 4, 2946; e) M. Körner, G. Sauer, A. Heil, D. Nasu, M. Empting, D. Tietze, S. Voigt, H. Weidler, T. Gutmann, O. Avrutina, H. Kolmar, T. Ratajczyk, G. Buntkowsky, *Chem. Commun.* **2013**, 49, 7839–7841; f) F. Reineri, D. Santelia, A. Viale, E. Cerutti, L. Poggi, T. Tichy, S. S. D. Premkumar, R. Gobetto, S. Aime, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, 132, 7186–7193; g) M. Roth, A. Koch, P. Kindervater, J. Bargon, H. W. Spiess, K. Münnemann, *J. Magn. Reson.* **2010**, 204, 50–55; h) P. C. Soon, X. Xu, B. Y. Zhang, F. Gruppi, J. W. Canary, A. Jerschow, *Chem. Commun.* **2013**, 49, 5304–5306; i) F. Gruppi, X. Xu, B. Y. Zhang, J. A. Tang, A. Jerschow, J. W. Canary, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, 51, 11787–11790; *Angew. Chem.* **2012**, 124, 11957–11960.
- [10] a) R. V. Shchepin, A. M. Coffey, K. W. Waddell, E. Y. Chekmenev, *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, 134, 3957–3960; b) R. V. Shchepin, E. Y. Chekmenev, *J. Labelled Compd. Radiopharm.* **2013**, 56, 655–662.
- [11] a) H. Fittler, O. Avrutina, B. Glotzbach, M. Empting, H. Kolmar, *Org. Biomol. Chem.* **2013**, 11, 1848–1857; b) M. L. Korsinczky, H. J. Schirra, D. J. Craik, *Curr. Protein Pept. Sci.* **2004**, 5, 351–364; c) M. L. J. 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) 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; e) U. C. Marx, M. L. J. Korsinczky, H. J. Schirra, A. Jones, B. Condie, L. Otvos, D. J. Craik, *J. Biol. Chem.* **2003**, 278, 21782–21789; f) H. Fittler, O. Avrutina, M. Empting, H. Kolmar, *J. Pept. Sci.* **2014**, 20, 415–420.
- [12] a) M. L. Colgrave, M. J. Korsinczky, R. J. Clark, F. Foley, D. J. Craik, *Biopolymers* **2010**, 94, 665–672; b) M. L. J. Korsinczky, R. J. Clark, D. J. Craik, *Biochemistry* **2005**, 44, 1145–1153; c) J. D. McBride, E. M. Watson, A. B. E. Brauer, A. M. Jaulent, R. J. Leatherbarrow, *Pept. Sci.* **2002**, 66, 79–92.
- [13] 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.
- [14] a) J. Austin, R. H. Kimura, Y. H. Woo, J. A. Camarero, *Amino Acids* **2010**, 38, 1313–1322; b) N. L. Daly, Y. K. Chen, F. M. Foley, P. S. Bansal, R. Bharathi, R. J. Clark, C. P. Sommerhoff, D. J. Craik, *J. Biol. Chem.* **2006**, 281, 23668–23675.
- [15] C. H. Bartholomew, P. K. Agrawal, J. R. Katzer in *Advances in Catalysis*, Vol. 31 (Hrsg.: H. P. D. Eley, B. W. Paul), Academic Press, New York, **1982**, S. 135–242.
- [16] a) G. Appendino, S. Bacchiega, A. Minassi, M. G. Cascio, L. De Petrocellis, V. Di Marzo, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, 46, 9312–9315; *Angew. Chem.* **2007**, 119, 9472–9475; b) W. S. Horne, C. A. Olsen, J. M. Beierle, A. Montero, M. R. Ghadiri, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, 48, 4718–4724; *Angew. Chem.* **2009**, 121, 4812–4818; c) A. Tam, U. Arnold, M. B. Soellner, R. T. Raines, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, 129, 12670–12671; d) D. Tietze, M. Tischler, S. Voigt, D. Imhof, O. Ohlenschläger, M. Görlach, G. Buntkowsky, *Chem. Eur. J.* **2010**, 16, 7572–7578; e) M. Tischler, D. Nasu, M. Empting, S. Schmelz, D. W. Heinz, P. Rottmann, H. Kolmar, G. Buntkowsky, D. Tietze, O. Avrutina, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, 51, 3708–3712; *Angew. Chem.* **2012**, 124, 3768–3772.
- [17] M. Empting, O. Avrutina, R. Meusinger, S. Fabritz, M. Reinwarth, M. Biesalski, S. Voigt, G. Buntkowsky, H. Kolmar, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, 50, 5207–5211; *Angew. Chem.* **2011**, 123, 5313–5317.
- [18] T. Gutmann, M. Sellin, H. Breitke, A. Stark, G. Buntkowsky, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2009**, 11, 9170–9175.
- [19] S. Aime, D. Canet, W. Dastru, R. Gobetto, F. Reineri, A. Viale, *J. Phys. Chem. A* **2001**, 105, 6305–6310.
- [20] a) L. M. Simon, M. Kotormán, A. Szabó, G. Garab, I. Laczkó, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2004**, 317, 610–613; b) P. D. Compton, R. J. Coll, A. L. Fink, *J. Biol. Chem.* **1986**, 261, 1248–1252.
- [21] R. A. Copeland in *Evaluation of Enzyme Inhibitors in Drug Discovery*, Wiley, Hoboken, **2013**, S. 245–285.
- [22] O. Avrutina, H. Fittler, B. Glotzbach, H. Kolmar, M. Empting, *Org. Biomol. Chem.* **2012**, 10, 7753–7762.
- [23] M. H. Levitt, *Annu. Rev. Phys. Chem.* **2012**, 63, 89–105.
- [24] L. Kuhn, J. Bargon in *In situ NMR Methods in Catalysis*, Vol. 276 (Hrsg.: J. Bargon, L. Kuhn), Springer, Berlin, **2007**, S. 25–68.
- [25] R. Schmidt, C. Laustsen, J. N. Dumez, M. I. Kettunen, E. M. Serrao, I. Marco-Rius, K. M. Brindle, J. H. Ardenkjær-Larsen, L. Frydman, *J. Magn. Reson.* **2014**, 240, 8–15.
- [26] M. Roth, P. Kindervater, H. P. Raich, J. Bargon, H. W. Spiess, K. Münnemann, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, 49, 8358–8362; *Angew. Chem.* **2010**, 122, 8536–8540.