



# Chemoproteomik-basierte Identifikation von 4-Oxo- $\beta$ -lactamen als Inhibitoren der Dipeptidylpeptidasen 8 und 9

Luís A. R. Carvalho<sup>+</sup>, Breyan Ross<sup>+</sup>, Lorenz Fehr<sup>+</sup>, Oguz Bolgi, Svenja Wöhrle, Kenneth M. Lum, David Podlesainski, Andreia C. Vieira, Reiner Kiefersauer, Rita Félix, Tiago Rodrigues, Susana D. Lucas, Olaf Groß, Ruth Geiss-Friedlander, Benjamin F. Cravatt, Robert Huber, Markus Kaiser,\* und Rui Moreira\*

**Abstract:** Die Dipeptidylpeptidasen 8 und 9 (DPP8/9) sind aufgrund ihrer wichtigen Rolle in biologischen Prozessen wie der Immunität und Tumorgenese in den letzten Jahren in den Fokus der Wirkstoffforschung gerückt. Der individuelle Beitrag der jeweiligen Protease innerhalb dieser Prozesse ist bisher jedoch meistens noch unbekannt. Die Untersuchung ihrer individuellen Funktion kann dabei von der Verfügbarkeit Protease-selektiver und chemisch-diverser Hemmstoffe profitieren. In dieser Arbeit stellen wir die durch Anwendung von Aktivitäts-basiertem Protein-Profilung (ABPP) entdeckten 4-Oxo- $\beta$ -lactame als potente, nicht-Substrat-abgeleitete, nanomolare DPP8/9-Inhibitoren vor. Röntgenkristallographische Untersuchungen von Liganden-DPP-Komplexen offenbarten dabei unterschiedliche Ligandenbindungsmodi für DPP8 und DPP9, einschließlich einer neuartigen Adressierung einer erweiterten S2' (eS2')-Bindetasche in DPP8. Zusätzliche Assays bestätigten ihre Hemmwirkung sowohl auf biochemischer als auch auf zellulärer Ebene. Zusammenfassend führte unser kombinierter Ansatz aus chemischer Proteomik und strukturbasiertem Design somit zu der Entwicklung neuartiger DPP8/9-Inhibitoren mit einem alternativem molekularen Hemmmechanismus und einem bisher nicht erreichten Selektivitätsindex.

## Einleitung

Die Dipeptidylpeptidasen 8 und 9 (DPP8/9) gehören zu der Serinhydrolase-Subfamilie S9B, welche bevorzugt C-terminal zur Aminosäure Prolin N-terminale Dipeptide von Proteinsubstraten abspalten.<sup>[1]</sup> Beide Enzyme wurden ursprünglich als Homologe von DPP4 identifiziert, einer

biomedizinisch-relevanten Protease, welche durch die Regulierung der gastrointestinalen Inkretin-Hormone eine wichtige Rolle in der Glucosehomöostase einnimmt. Dementsprechend ist DPP4 ein wichtiges Zielprotein für die Entwicklung von Typ II Diabetes-Chemotherapien, für welche bereits eine Vielzahl von klinisch einsetzbaren Inhibitoren entwickelt wurden.<sup>[2]</sup> Während DPP4 extrazellulär

[\*] Dr. L. A. R. Carvalho,\* A. C. Vieira, R. Félix, Dr. T. Rodrigues, Dr. S. D. Lucas, Prof. Dr. R. Moreira  
Department of Pharmaceutical Sciences and Medicines,  
Research Institute for Medicines (iMed.Ulisboa), Faculdade de Farmácia, Universidade de Lisboa  
Lisboa, Av. Prof. Gama Pinto, 1649-003 Lisboa (Portugal)  
E-mail: rmoreira@ff.ulisboa.pt

Dr. B. Ross,\* Prof. Dr. R. Huber  
Max-Planck Institut für Biochemie  
82152 Planegg (Deutschland)

Dr. B. Ross,\* Dr. R. Kiefersauer  
Proteros Biostructures GmbH  
82152 Planegg (Deutschland)

Dr. L. A. R. Carvalho,\* Dr. K. M. Lum, Prof. Dr. B. F. Cravatt  
Department of Chemistry,  
The Scripps Research Institute  
La Jolla, California 92037 (USA)

O. Bolgi, Dr. R. Geiss-Friedlander  
Center of Biochemistry and Molecular Cell Research,  
Albert-Ludwigs-Universität  
79104 Freiburg (Deutschland)

L. Fehr,\* D. Podlesainski, Prof. Dr. R. Huber, Prof. Dr. M. Kaiser  
Fakultät für Biologie, Zentrum für Medizinische Biotechnologie,  
Universität Duisburg-Essen  
45117 Essen (Deutschland)  
E-mail: markus.kaiser@uni-due.de

Prof. Dr. R. Huber  
Fakultät für Chemie, Technische Universität München  
85747 Garching (Deutschland)

S. Wöhrle, Prof. Dr. O. Groß  
Institut für Neuropathologie, Universitätsklinikum Freiburg  
79106 Freiburg (Deutschland)

Prof. Dr. O. Groß  
Signalling Research Centres BIOSS and CIBSS, University of Freiburg  
79104 Freiburg (Deutschland)

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

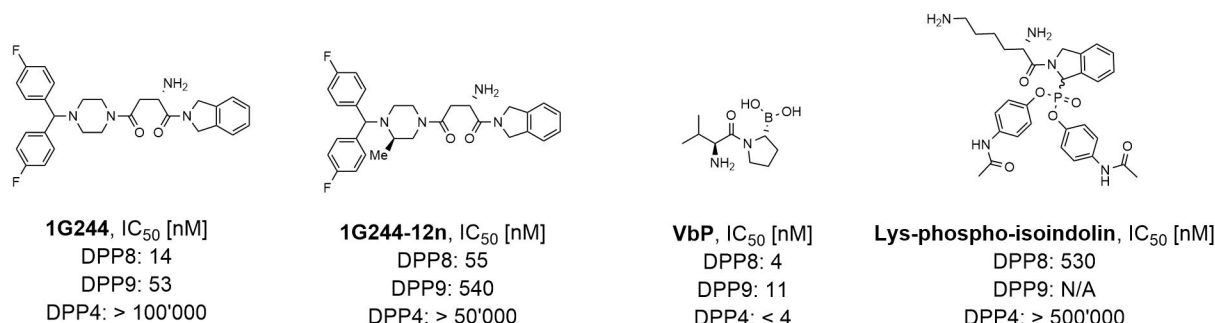
© 2022 Die Autoren. Angewandte Chemie veröffentlicht von Wiley-VCH GmbH. Dieser Open Access Beitrag steht unter den Bedingungen der Creative Commons Attribution Non-Commercial NoDerivs License, die eine Nutzung und Verbreitung in allen Medien gestattet, sofern der ursprüngliche Beitrag ordnungsgemäß zitiert und nicht für kommerzielle Zwecke genutzt wird und keine Änderungen und Anpassungen vorgenommen werden.

vorliegt, treten DPP8 bzw. DPP9 primär intrazellulär auf und übernehmen dort spezifische, nicht DPP4-assoziierte biologische Funktionen. So übernehmen sie z. B. Schlüsselrollen in der Immunantwort durch eine Regulation der Inflammasom- und Pyroptose-Aktivierung.<sup>[3]</sup>

Darüber hinaus scheinen sie auch in vielen weiteren biologischen Prozessen wie der Apoptose, der Adipogenese, der Spermatogenese, der Zellzyklusregulierung oder der Chemosensibilisierung im Rahmen der Chemotherapie von Leukämiezellen involviert zu sein.<sup>[4]</sup> Die Zuordnung der individuellen Funktion von DPP8 oder DPP9 in verschiedenen biologischen Prozessen ist dabei schwierig und Gegenstand aktueller Forschung. Während DPP8 z. B. als relevanter Faktor in der Behandlung multipler myelomer Krebserkrankungen erkannt wurde, wurde für DPP9 eine spezifische Rolle in der Zellproliferation, -migration und -invasion von nicht-kleinzelligen Lungenkarzinomen postuliert.<sup>[5]</sup> Des Weiteren wurde DPP9 sowohl als limitierender Faktor der Proteolyse von Prolin-haltigen zytosolischen Peptiden als auch als Modulator für die Präsentation Prolin-reicher Peptide durch das MHC-Klasse 1- System, als Regulator der B-Zell-Rezeptor-vermittelten Signaltransduktion und der DNA-Reparatur identifiziert.<sup>[6]</sup> In aktuellen Studien wurden ausgewählte DPP9-Allele überdies mit dem Auftreten schwerer Covid-19-Krankheitsverläufe in Verbindung gebracht.<sup>[7]</sup> Somit gilt es heute als sicher, dass DPP8 und DPP9 nicht nur redundante, sondern auch differenzierte biologische Funktionen innehaben. Dementsprechend sind chemische Inhibitoren mit spezifischer DPP8/9-Hemmwirkung vielversprechende chemische Werkzeuge und können als Startpunkt für die zukünftige Entwicklung selektiver DPP8/9 Chemotherapien dienen.

DPP8 und DPP9 sind mit einer Sequenzidentität von 58 % strukturell ähnliche Proteine. In ihrem aktiven Zentrum liegt dabei sogar eine 92 %ige Strukturhomologie vor.<sup>[8]</sup> Ihre grundsätzliche Struktur ähnelt weitgehend der von DPP4, da alle drei Enzyme über eine hochkonservierte C-terminale  $\alpha/\beta$ -globuläre Domäne, in welcher die katalytische Triade lokalisiert ist, als auch über eine N-terminale  $\beta$ -Propellerdomäne, welche die wichtigsten Ligandenbindestellen beinhaltet und die größte strukturelle Variation zwischen DPP4 und DPP8/9 aufweist, verfügen. Die S1-

Bindetasche ist in allen drei Enzymen stark konserviert. Dagegen unterscheidet sich die S2-Bindetasche deutlicher und ist im Falle von DPP8/9 räumlich stärker ausgeprägt. Die wenigen Unterschiede zwischen den aktiven Zentren von DPP8 und DPP9 basieren weitestgehend auf konservativen Aminosäureaustauschen und haben nur einen geringen Einfluss auf ihre Struktur und Reaktivität.<sup>[9]</sup> Im Gegensatz zu DPP4 bewirkt jedoch eine Ligandenbindung in DPP8 bzw. DPP9 eine strukturelle Neuordnung der R-Helix-Region, die Einfluss auf die Formgebung der Substratbindestelle nimmt. Ein struktureller Unterschied zwischen DPP8 und DPP9 findet sich im sogenannten R-Segment, einer Oberflächen-exponierten Proteinschleife, die in DPP9 zwei aufeinanderfolgende Histidine, in DPP8 jedoch Asparaginsäure und Tyrosin beinhaltet. Aufgrund der hohen strukturellen Ähnlichkeit sowie der erst seit kurzer Zeit verfügbaren kristallographischen Daten hat sich die Entwicklung selektiver DPP8- oder DPP9-Inhibitoren als eine anspruchsvolle Aufgabe erwiesen.<sup>[8b]</sup> Dennoch wurden bereits erfolgreich einige Substrat-abgeleitete Wirkstoffe entwickelt. Diese adressieren die S2–S1-Bindetaschen und finden regelmäßige Anwendung in biochemischen und biologischen Assays. Ein prominenter Vertreter dieser Wirkstoffe ist der reversibel und nicht-kovalent-wirkende DPP8/9-Inhibitor 1G244, der eine schwache Selektivität für DPP8 vs. DPP9 zeigt ( $\approx 4$ -fache Selektivität gegenüber DPP9, keine DPP4-Inhibition) und über eine Isoindolin-Struktur an der P1- und einen sterisch-anspruchsvollen Difluorobenzyl-Piperazinrest an der P2-Position verfügt (Abbildung 1).<sup>[10]</sup> Systematische Variationen von 1G244 führten dann zur Entwicklung von 1G244-12n mit einer  $\approx 10$ -fachen DPP8- zu DPP9-Selektivität.<sup>[11]</sup> Ein weiterer nicht-kovalenter DPP8/9-selektiver Inhibitor ist das Peptid SLRFLYEG, welches ebenfalls in einem substratähnlichen Modus an das aktive Zentrum bindet.<sup>[12]</sup> Ein Beispiel für einen reversiblen, aber kovalenten Hemmstoff ist der vielfach-eingesetzte DPP-Breitbandinhibitor ValboroPro (VbP), auch bekannt als Talabostat, der DPP4, -8 und -9 mit vergleichbarer Potenz hemmt.<sup>[13]</sup> Schließlich sind auch irreversibel-wirkende kovalente Inhibitoren wie z. B. ein Phosphonat-basiertes Isoindolin-Derivat (Lys-phospho-isoindolin) bekannt, welches eine ausgeprägte DPP8-vs. DPP4-Selektivität zeigt;<sup>[14]</sup> unglücklicherweise wurde des-



**Abbildung 1.** Die Entwicklung von DPP8/9-selektiven Inhibitoren bleibt eine Herausforderung. Eine Beispielübersicht der chemischen Strukturen und dem Hemmpotential ausgewählter Inhibitoren. Alle bisher bekannten DPP8/9-Inhibitoren adressieren dabei die S2–S1-Substratbindetaschen der Proteasen.

sen Selektivität gegenüber DPP9 jedoch bisher noch nicht bestimmt.

Auch wenn diese Arbeiten gezeigt haben, dass eine sorgfältige Ansteuerung der S2–S1-Bindetaschen in DPP8/9 Hemmstoffe mit einer Selektivität gegenüber DPP4 ermöglicht, erschwert die ausgeprägte strukturelle Homologie in diesen Regionen der Enzyme aber ein Design von DPP8- zu DPP9-selektiven Inhibitoren.<sup>[9]</sup> Kristallographische und CryoEM-Studien zu den Bindungsmodi von 1G244, VbP (beide an DPP8/9) und SLRFLYEG (an DPP8) ergaben in der Tat einen sehr ähnlichen *induced fit*-Bindungsmodus, der eine durch Ligandenbindung hervorgerufene strukturelle Neuordnung der R-Helix in der Nähe der  $\beta$ -Propellerdomäne beinhaltet.<sup>[4e,15]</sup> Um somit also DPP8- bzw. DPP9-selektive Inhibitoren zu erhalten, müssen Strategien zur Identifizierung von Inhibitoren mit alternativen Bindungsmodi und Hemmprofilen entwickelt werden. Ein Ansatz zur Auffindung und Charakterisierung der Inhibitionsprofile von chemischen Wirkstoffen ist das Aktivitäts-basierte Protein-Profiling (ABPP).<sup>[16]</sup> Beim ABPP werden chemische Sonden, auch bekannt als Aktivitäts-basierte Sonden (*activity-based probes*, ABPs), zur kovalenten Markierung von aktiven Zentren von Enzymen genutzt und liefern auf diese Weise dynamische Profile ihrer Aktivität in komplexen Proteomen.<sup>[17]</sup> ABPs sind größtenteils aus einer kovalentbindenden reaktiven Gruppe und einem Reporter-Tag aufgebaut und markieren nur katalytisch aktive Enzyme mit einem frei zugänglichen, nicht-besetzten aktiven Zentrum. Ihre Anwendung erlaubt das Überwachen von Enzymaktivitäten unter verschiedenen physiologischen Bedingungen, einschließlich der Vorinkubation mit potentiellen Inhibitoren, welche aktive Zentren besetzen und diese somit für die Bindung der ABP blockieren. Dieser "kompetitive" ABPP-Ansatz ermöglicht daher einen effizienten Inhibitorscreen auf Proteom-Ebene und liefert somit frühzeitig im Entwicklungsprozess Daten zur Potenz und Selektivität der Hemmstoffe.<sup>[16,18]</sup>

In dieser Studie untersuchten wir mit dieser Methode das Hemmprofil von *N*-Phenyl-4-oxo- $\beta$ -lactamen, da im Gegensatz zu ihrem bekannten Hemmpotential und ihrem kovalenten Bindemodus gegenüber Serinproteasen wie der menschlichen neutrophilen Elastase ihr Proteom-weites Selektivitätsprofil noch nicht bestimmt war.<sup>[19]</sup> Dabei fanden wir unerwarteterweise, dass *meta*-substituierte *N*-Aryl-Analoga potente DPP8/9-Inhibitoren darstellten. Anschließende Struktur-Wirkungsbeziehungs-Studien und kristallographische Analysen zeigten dann, dass die DPP8-Inhibition auf einem besonderen, nicht-Substrat-ähnlichen Bindungsmodus beruht, der Verbindungen mit dem bisher besten DPP8/9-Selektivitätsindex ermöglicht.

## Ergebnisse und Diskussion

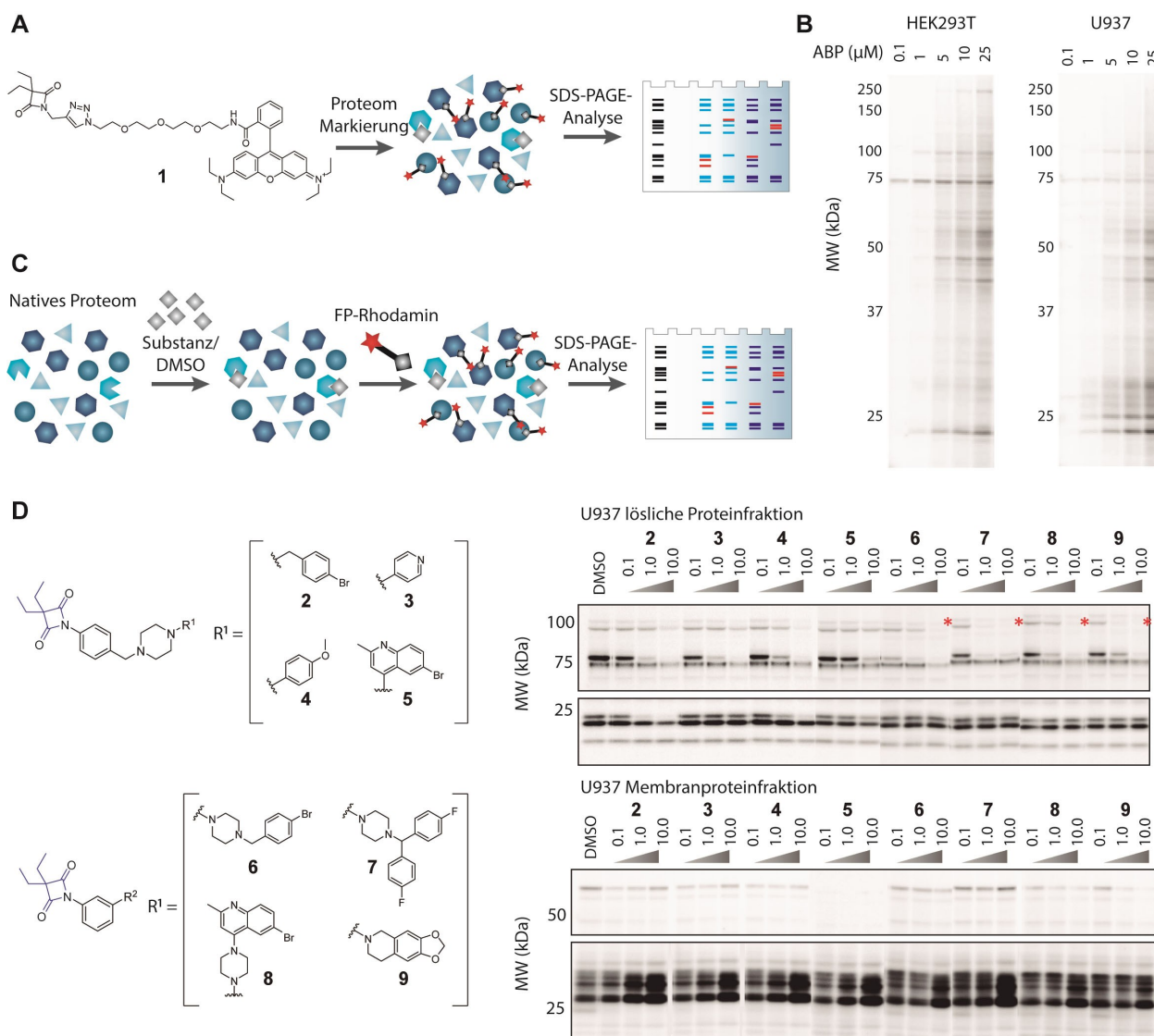
In einer ersten Versuchsreihe wurde eine Rhodamin-markierte 4-Oxo- $\beta$ -lactam-ABP-Sonde **1** in einem Gel-basierten ABPP-Ansatz mit HEK293T- und U937-Lysaten eingesetzt (Abbildung 2A, B).<sup>[20]</sup> Dabei konnte eine konzentrationsabhängige Markierung von spezifischen Proteinen beobachtet

werden. Bei niedrigen, biologisch-relevanten Konzentrationen (0.1–10  $\mu$ M) wurden dabei nur wenige Proteine, z. B. mit Molekulargewichten von ca. 25, 75 oder 100 kDa, markiert. Dies weist auf eine vielversprechende Zielenzym-Selektivität der Verbindungen hin und rechtfertigt somit eine weitere Evaluierung der Verbindungen.

Anschließend wurde der Einfluss von Derivatisierungen an der *N*-Phenylgruppe der reaktiven 4-Oxo- $\beta$ -lactame untersucht. Hierzu wurde ein kompetitiver ABPP-Ansatz mit einer fokussierten Bibliothek an *N*-Phenyl-4-oxo- $\beta$ -lactamen mit chemisch-diversen Substitutionen an der *para*-, *meta*- und *ortho*-Position durchgeführt (Abbildung 2C, D). U937-Zelllysate wurden mit verschiedenen Konzentrationen der 4-Oxo- $\beta$ -lactam-Derivate vorinkubiert und im Anschluss deren Einfluss auf Serinhydrolasen mit der ABP Fluorophosphonat-Rhodamin (FP-Rh) analysiert.<sup>[21]</sup> Unter diesen experimentellen Bedingungen kann eine konzentrationsabhängige Reduktion der Intensitäten der markierten Enzyme direkt auf eine 4-Oxo- $\beta$ -lactam-vermittelte Serinhydrolasen-Inhibition zurückgeführt werden. Im Gegensatz zu den Verbindungen **2–5** traten bei den *meta*-substituierten Analoga **6–9** eine Reduzierung der Intensität einer Bande auf einer Höhe von ca. 100 kDa auf, welche in früheren Studien mit FP-basierten ABPs bereits als DPP9 (98 kDa) annotiert wurde.<sup>[22]</sup> Es ist zu beachten, dass die Bande von DPP8 (103 kDa) auf einer ähnlichen Laufhöhe anzutreffen wäre, jedoch ist die Expressionsrate für dieses Enzym in der gewählten Zelllinie wesentlich niedriger, sodass ein direkter Nachweis in diesem System kaum möglich ist. Insgesamt zeigte der kompetitive Gel-basierte ABPP-Ansatz somit, dass *meta*-substituierte *N*-Phenyl-4-oxo- $\beta$ -lactame im Gegensatz zu *ortho*- oder *para*-substituierten Analoga auch in Gegenwart eines vollständigen Proteoms DPP9 mit einer hohen Potenz und signifikanter Selektivität adressieren.

Ein massenspektrometrischer (MS) ABPP-Ansatz, welcher stabile Isotopenmarkierung mit Aminosäuren in Zellkulturen (SILAC) zur Protein-Quantifizierung nutzt, wurde mit der ABP **10** (Abbildung 3A), einer Biotin-markierten Variante von **1**, in U937-Zelllysaten durchgeführt. Dieser Ansatz konnte eine Vielzahl von Serinhydrolasen als direkte 4-Oxo- $\beta$ -lactam-Zielenzyme auffinden, z. B. Mitglieder der DPP4-Aktivitäts-und/oder Strukturhomolog (DASH)-Familie wie das Fibroblasten-Aktivierungsprotein- $\alpha$  (FAP), die Dipeptidylpeptidase 7 (DDP7), DPP9, sowie die Prolylendopeptidase (PREP), die Acylaminoacyl-Peptidhydrolase (APEH), die Lysophospholipasen 1 & 2 (LYPLA1/2), die Serincarboxypeptidase 1 (SCPEP1) und die Prolylcarboxypeptidase (PRCP) (Abbildung 3A). In Ergänzung zu den bereits genannten DPP-assoziierten Funktionen spielen diese Enzyme z. B. wichtige Rollen im Lipidmetabolismus (LYPLA1 und 2), dem Abbau von beschädigten Proteinen (APEH), dem Hormon- und Neuropeptidmetabolismus (PREP), der Blutdruckregulation (PRCP und SCPEP1) und vielen weiteren Prozessen.<sup>[23]</sup> Bemerkenswert ist dabei, dass alle Zielproteine aus der Familie der Serinhydrolasen stammen.

Zur Validierung der Ergebnisse des kompetitiven Gel-basierten ABPP-Experiments und zur Quantifizierung der Zielproteine wurde im nächsten Schritt ein weiteres kompe-



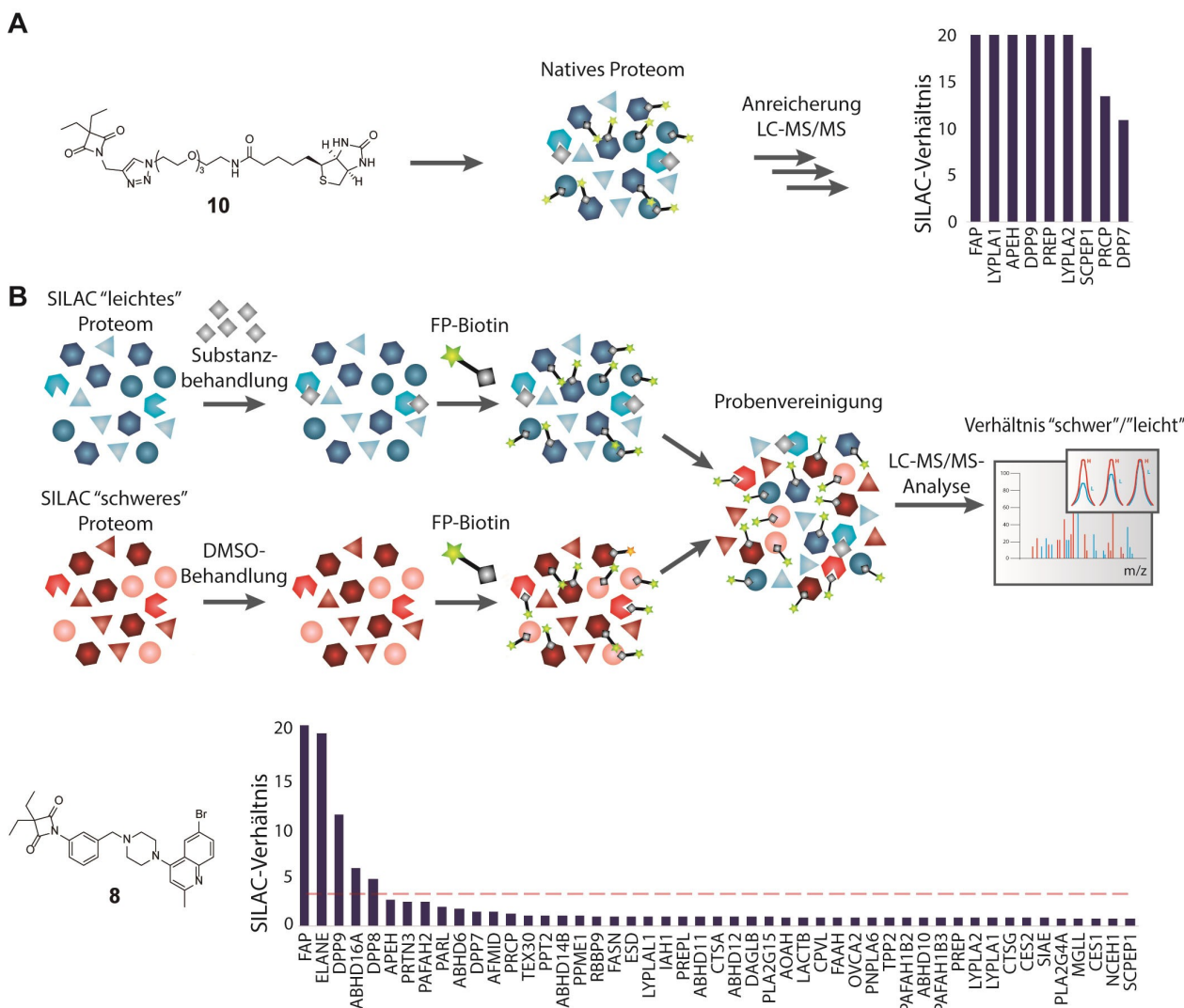
**Abbildung 2.** ABPP-Profiling mit 4-Oxo-β-lactam-basierten Sonden. A) Die Rhodamin-markierte 4-Oxo-β-lactam-ABP **1** wurde in einem komparativen ABPP-Ansatz verwendet. B) Eine Gel-basierte ABPP-Analyse von HEK293T- und U937-Lysaten mit der ABP **1** zeigte konzentrationsabhängige, selektive Proteinmarkierungen. C) Allgemeines Schema des verwendeten kompetitiven ABPP-Workflows. Native Proteome werden unter Berücksichtigung einer DMSO-Kontrolle mit den 4-Oxo-β-lactam-Derivaten **2–9** behandelt und im Anschluss aktive Serinproteasen mit der ABP FP-Rhodamin markiert. Eine schwächere Intensität einer Bande nach Präinkubation der Sonde weist auf eine Bindung der 4-Oxo-β-lactame an das aktive Zentrum der entsprechenden Serinhydrolase hin. D) Ergebnisse des Gel-basierten ABPP-Kompetitionsexperimentes unter Verwendung der 4-Oxo-β-lactame **2–9** und fraktionierten U937-Zellysaten. Die Verringerung des Fluoreszenzsignals im Bereich von ca. 100 kDa (durch ein Sternchen markiert) in der löslichen Fraktion deutet auf eine Wirkstoff-vermittelte Inhibition von DPP8/9 hin.

tives, diesmal jedoch MS-basiertes ABPP-Experiment mit Verbindung **8** durchgeführt (Abbildung 3B). Hierzu wurden SILAC U937-Zellysate unter Berücksichtigung einer DMSO-Kontrolle mit **8** behandelt und im Anschluss eine Breitband-Serinhydrolase-Markierung mit Fluorophosphonat-Biotin (FP-Biotin) durchgeführt. Die entsprechenden SILAC-Proben wurden kombiniert, mittels LC-MS/MS analysiert und die entsprechenden SILAC-Verhältnisse berechnet. Auf diese Weise konnten nicht nur die Ergebnisse des kompetitiven Gel-basierten Screens bestätigt werden, sondern zusätzlich **8** als Inhibitor einer kleinen Untergruppe von Serinhydrolasen, darunter FAP, die menschliche neut-

rophile Elastase (ELANE), DPP9, ABHD16A und DPP8 (alle mit einem SILAC-Markierungsverhältnis >3) identifiziert werden.

Besonders hervorzuheben ist das vielversprechende DPP8- und DPP9-Hemmprofil der 4-Oxo-β-lactame. Dies veranlasste uns, den Fokus auf den zugrundeliegenden Inhibitionsmechanismus zu setzen und zu untersuchen, inwiefern dieser Mechanismus Inhibitoren mit verbesserter DPP8- zu DPP9-Selektivität ermöglicht. Unsere Proteomik-Studien zeigten jedoch auch, dass diese Verbindungen ebenfalls das Potential zur Inhibition von anderen Enzymen wie FAP, ELANE oder ABDH16A besitzen, was bei der Verwendung





**Abbildung 3.** Identifikation von 4-Oxo- $\beta$ -lactam-Zielenzymen durch Massenspektrometrie (MS)-basiertes ABPP. A) Struktur der verwendeten biotinylierten 4-Oxo- $\beta$ -lactam-ABP **10** und ihre Nutzung in einem komparativen ABPP-Ansatz. Die Anreicherung von direkten Zielenzymen der Verbindung **10** (10  $\mu$ M) (Ergebnisse gefiltert nach SILAC-Verhältnis > 3; Verhältnis = Signalintensität DMSO/Signalintensität in Gegenwart von Verbindung **10**) bestätigt die Adressierung einiger DPP-Enzyme wie z. B. DPP8 und DPP9. B) Schema des verwendeten kompetitiven MS-basierten ABPP-Arbeitsablaufs (oberer Bildteil). (Unterer Bildteil) Kompetitives ABPP unter Einsatz von Verbindung **8** (10  $\mu$ M) und FP-Biotin (10  $\mu$ M) bestätigt DPP8 und DPP9 neben anderen Enzymen wie z. B. FAP und HNE (Genname ELANE) als primäre Zielproteine von **8** (Ergebnisse gefiltert nach Serinhydrolasen und SILAC-Verhältnis > 3; Verhältnis = Signalintensität DMSO/Signalintensität in Gegenwart von Verbindung **8**).

der Moleküle in biologischen Experimenten berücksichtigt werden muss. Da bisher keine 4-Oxo- $\beta$ -lactame als DPP8/9-Inhibitoren bekannt waren, wurde zuerst untersucht, ob Teilstrukturen das Strukturgerüst Ähnlichkeiten mit bereits beschriebenen DPP8/DPP9-Inhibitoren aufwiesen. Während einige unserer Verbindungen bereits bekannte DPP8/DPP9-Inhibitions-Erkennungsmotive besitzen (z. B. das Bisbenzyl-System in **7**, welches auch in 1G244 zu finden ist), konnten wir keine Hinweise auf 4-Oxo- $\beta$ -lactam-verwandte DPP8/9-Inhibitoren wie z. B. andere viergliedrige Ringchemotypen finden. Wir untersuchten daher die strukturellen Ähnlichkeiten unserer Verbindungen zu bekannten DPP8/9-Inhibitoren, welche bereits in ChEMBL v27 hinterlegt sind, durch t-dispergierte stochastische Nachbarschafts-implantation (t-SNE). Die Nutzung eines ECFP4-artigen

Fingerabdruck (Radius 2, 2048 Bits) lieferte einen durchschnittlichen Tanimoto-Index von unter 0.13 für die Verbindungen **6–9** im Vergleich zu vorherigen DPP8/9-Referenzliganden. In allen Fällen wurde für den nächstgelegenen Nachbar stets eine Tanimoto-Ähnlichkeit kleiner als 0.34 erhalten, was deutlich unter dem gewöhnlichen Grenzwert von 0.85 für ähnliche Liganden liegt (ein Tanimoto-Index von 1.0 kennzeichnet zwei identische Moleküle, während ein Wert von 0 eine vollständige Unterschiedlichkeit bezeichnet).<sup>[24]</sup> Diese Daten belegen somit, dass 4-Oxo- $\beta$ -lactame neue Chemotypen für den Bereich der DPP8/9-Inhibitoren darstellen, der aus einer ungewöhnlichen Anordnung topologischer Pharmakophor-Merkmale resultiert und graphisch durch die isolierte Position im DPP8/9-Inhibitor-Cluster

verdeutlicht wird (Hintergrundinformationen Abbildung S1.4.).

Durch den Einsatz von konzentrationsabhängigen kompetitiven Markierungsexperimenten mit der ABP FP-Rh in Zellen, welche ausgewählte Hydrolasen der DASH-Familie überexprimierten, konnten dann die  $IC_{50}$ -Werte der Hemmung der Verbindungen **6–8** in Zellen bestimmt werden (Tabelle 1). Die getesteten Verbindungen inhibierten DPP8 und DPP9 potent im nanomolaren Bereich (**8** inhibierte DPP9 im niedrigen mikromolaren Bereich), wobei Verbindung **6** die effizienteste Hemmung zeigte. In allen Fällen wurde DPP8 stärker als DPP9 gehemmt ( $IC_{50}$  von 137 nM vs. 409 nM für **6**, 393 nM vs. 950 nM für **7**, 292 nM vs. 1033 nM für **8**). DPP4 wurde dagegen etwa 10-mal weniger effizient inhibiert und für DPP7 konnte bei keiner der getesteten Konzentrationen eine inhibitorische Wirkung gemessen werden. Insgesamt verdeutlichen diese ABPP-Experimente die hohe DPP8/9-Hemmpotenz der Verbindungen **6–8**.

Während kompetitive ABPP-Experimente unverzichtbar für einen frühen Einblick in die Hemm- und Selektivitätseigenschaften von chemischen Inhibitoren in komplexen Pro-

teomen sind, kann die systematische Bestimmung der für die Inhibition notwendigen strukturellen Determinanten durch verschiedene Faktoren, wie z.B. den unterschiedlichen Enzym-Expressionsraten von DPP8 und DPP9 in Zellen, erschwert werden.

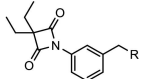
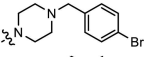
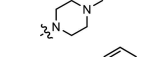
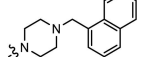
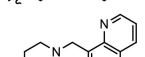
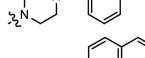
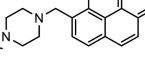
Um jedoch Einblicke in die molekulare Basis der DPP8- oder DPP9-Inhibition zu gewinnen, wurden daher ausgewählte 4-Oxo- $\beta$ -lactam-Derivate synthetisiert und in biochemischen Inhibitions-Assays getestet. Die entsprechenden Ergebnisse sind in Tabelle 2 und in den ergänzenden Informationen in der Tabelle S1.5 hinterlegt. In diesem Zusammenhang wurde zuerst die durch **6** hervorgerufene potente, nanomolare Hemmung von DPP8 (26.3 nM) und eine ca. 7-fach geringere, dennoch immer noch nanomolare Inhibition von DPP9 (184 nM) durch Bestimmung der  $K_i'$ -Hemmwerte bestätigt. Im Folgenden wurde der Einfluss der terminalen Arylgruppe auf die Hemmung untersucht (Verbindung **11**, Tabelle 2). Dabei zeigte **11** einen schwächeren  $K_i'$  von 528 nM im Falle von DPP8 und war im getesteten Konzentrationsbereich sogar inaktiv gegenüber DPP9. Interessanterweise führte eine weitere strukturelle Reduktion durch Entfernung des Piperazin-Rests innerhalb der Assaybedingungen zu einer vollständig inaktiven Verbindung (Hintergrundinformationen Tabelle S1.5).

Zur Untersuchung des zugrundeliegenden molekularen Mechanismus der Inhibition wurden daraufhin Röntgenstrukturanalysen von DPP8 in Komplex mit **6** und **11** durchgeführt. Die auf diese Art erhaltenen Strukturen enthielten zwei Protomere in ihrer asymmetrischen Einheit mit einer finalen Auflösung von 2.6 Å im Falle von **6** bzw. 2.8 Å für **11**. Die vorliegenden Elektronendichten zeigten eindeutig das Vorliegen einer kovalenten Bindung zwischen den verschiedenen Liganden und DPP8 durch eine Acylierung der S755-Aminosäure. Interessanterweise zeigte die Bindung von **6** an DPP8 einen neuartigen Bindungsmodus (Abbildung 4A): Anstatt die S2–S1-Bindetaschen zu belegen, welche von Substrat-abgeleiteten Inhibitoren wie VbP oder 1G244 besetzt werden, ragte die endständige Aryleinheit von **6** in eine bisher von keinem Liganden besetzte hydrophobe Bindetasche, welche in räumlicher Nähe zur S2'-Bindetasche lokalisiert ist (im Folgenden erweiterte S2' (eS2')-Bindetasche genannt). Zusätzlich erfolgte keine Konformationsänderung des R-Segmentes, wogegen ein stark ungeordnetes H865-Segment (Abbildung 4A, mit einem Pfeil markiert), sowie eine unterbrochene SUBA-Domäne (SUMO-bindender Arm zur Aktivierung von DPP8/9) beobachtet werden konnte.<sup>[25]</sup> Die Bedeutung der endständigen Aryleinheit für diesen neuartigen Bindungsmodus wurde durch die Co-Kristallstruktur mit **11** demonstriert (Abbildung 4B): Abwesenheit dieser Molekülgruppe resultierte in einer kompletten Rotation der Bindungsorientierung in die S2–S1-Bindetaschen, zusammen mit einer partiellen Ordnung des R-Segments, dem Auftreten eines strukturierten H865-Segments und einer intakten SUBA-Domäne. Ein geordnetes H865-Segment ist generell Voraussetzung für die Substratbindung und spielt eine Schlüsselrolle in der strukturellen Ordnung der katalytischen Triade (S755-H865-D833). Die Ergebnisse lassen somit darauf schließen, dass **6** eine katalytisch-inaktive Konformation

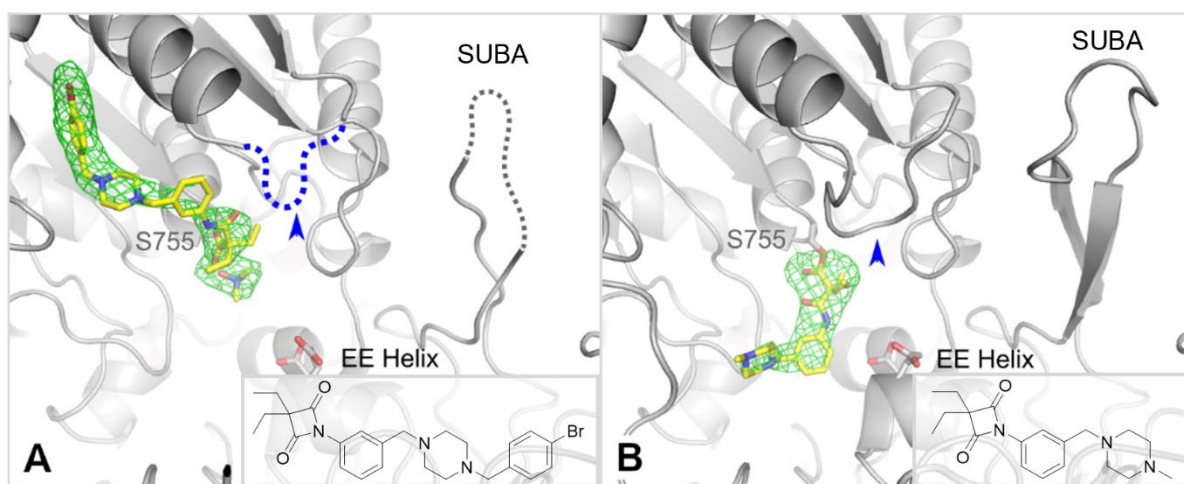
**Tabelle 1:** Durch kompetitives ABPP bestimmte  $IC_{50}$  Hemmwerte [nM] der 4-Oxo- $\beta$ -lactame **6–8**.

	<b>6</b>	<b>7</b>	<b>8</b>
DPP8	137 ± 40	393 ± 55	292 ± 42
DPP9	409 ± 78	950 ± 297	1033 ± 225
DPP4	1398 ± 298	1182 ± 444	2699 ± 617
DPP7	> 10 000	> 10 000	> 10 000

**Tabelle 2:** Biochemisches Inhibitionsprofil der 4-Oxo- $\beta$ -lactame.

		$K_i'$ [nM] <sup>[a]</sup>		DPP8/DPP9-Selektivität
		DPP8	DPP9	
<b>6</b>		26.3 ± 2.6	184 ± 38.4	7 ×
<b>11</b>		52 ± 175.5	> 2000	> 4 ×
<b>12</b>		95.0 ± 15.5	> 2000	> 21 ×
<b>13</b>		174 ± 55.3	34.2 ± 30	0.2 ×
<b>14</b>		> 2000	> 2000	n.a.
<b>9</b>		2.7 ± 0.6	11.4 ± 3.5	4 ×

[a] Die gezeigten  $K_i'$ -Werte ( $K_i'$ ) wurden mittels Enzymkinetik-Analysen in Gegenwart verschiedener Inhibitorkonzentrationen und unter Anwendung der Morrison-Gleichung bestimmt. Diese Gleichung findet gewöhnlich Anwendung für *tight-binding*-Hemmung und ist daher eine geeignete Approximation für die Hemmwirkung kovalenter Inhibitoren. Die Tabelle gibt den Fehler unter Berücksichtigung des 95%-Konfidenzintervalls an.



**Abbildung 4.** Die Röntgenstrukturanalyse von **6** (PDB ID: 7OZ7) und **11** (PDB ID: 7A3L) im Komplex mit DPP8 offenbart zwei verschiedene Bindungsmodi. Die Elektronendichteverteilung ( $F_o - F_c$ ) für die Liganden wird in  $3\sigma$  dargestellt. A) Verbindung **6** besetzt die S1'- und eine eS2'-Bindetasche. Die Bindung geht mit einer Umordnung des H865-Segmentes (blauer Pfeil) und der SUBA-Domäne einher. B) Im Gegensatz bindet **11** an die S2-S1-Bindetaschen, welche häufig von klassischen DPP8-Inhibitoren besetzt werden. Das entsprechende H865-Segment (blauer Pfeil) und die SUBA-Domäne bleiben hier in ihrer Grundordnung.

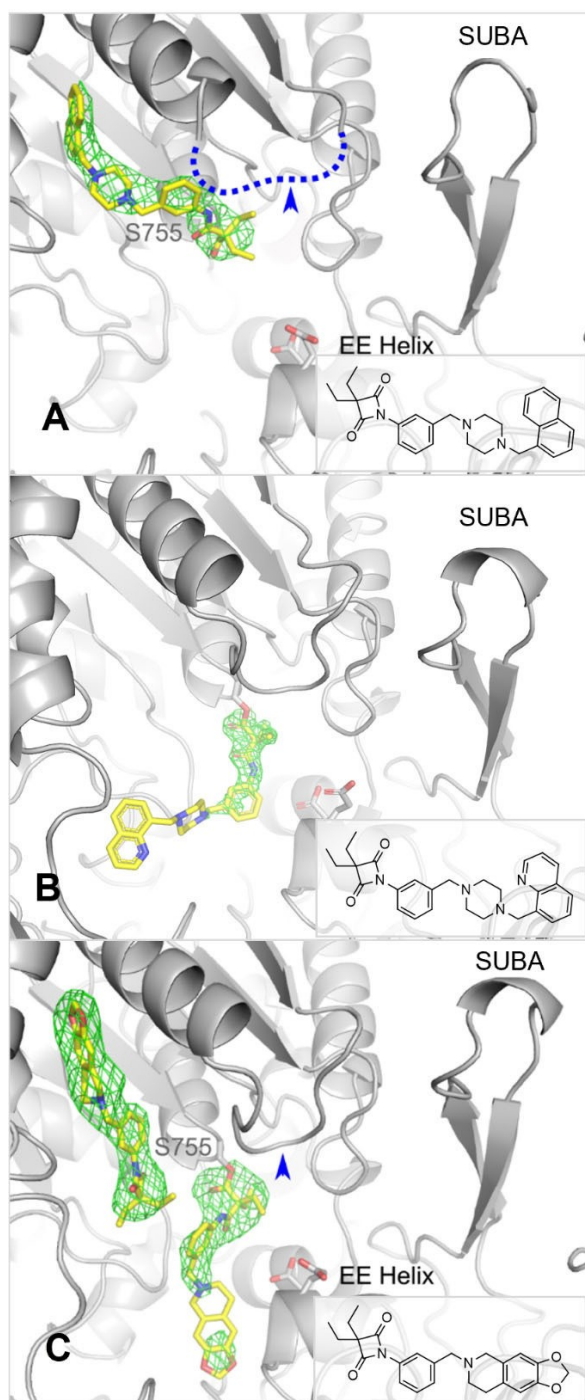
induziert, während **11** in einer klassischen Substrat-ähnlichen Weise DPP8 bindet. Dies bedeutet, dass 4-Oxo- $\beta$ -lactame zwei verschiedene Bindungsmodi, einen Substrat- bzw. einen nicht-Substrat-ähnlichen Modus einnehmen können. Dabei wird der nicht-Substrat-ähnliche Bindemodus durch eine geeignete Derivatisierung an der Piperazineinheit induziert.

Der Einfluss der terminalen Arylgruppe auf die Hemmwirkung wurde im weiteren Verlauf durch den Austausch des Bromphenyl-Restes durch eine Naphthalen- oder Chinolineinheit untersucht (Tabelle 2, Verbindungen **12–13**). Von allen synthetisierten Verbindungen (Tabelle 2 und Hintergrundinformationen Tabelle S1.5.) zeigte das Naphthalen-Derivat **12** die größte Selektivität gegenüber DPP8, mit einem  $K_i'$  von 95 nM bei gleichzeitiger Inaktivität gegenüber DPP9 innerhalb der getesteten Konzentrationen ( $K_i' > 2000$  nM, entsprechend einer mindestens 21-fachen Selektivität). Die Kristallstruktur von **12**:DPP8 zeigte ein ähnliches Ligand-Protein-Interaktionsmuster wie **6** (Abbildung 5A), was erneut die Bedeutsamkeit der eS2'-Tasche für die DPP8-Inhibition hervorhebt. Im Gegensatz dazu erwies sich die Chinolinverbindung **13**, welche sich von **12** nur durch die Anwesenheit eines Stickstoff-Heteroatoms im aromatischen Ringsystem unterscheidet, als potenter DPP9-Inhibitor (DPP9  $K_i' = 34.2$  nM vs. DPP8  $K_i' = 174$  nM, 5-fache DPP9-Selektivität). Der zugrundeliegende molekulare Mechanismus wurde anhand einer Röntgenstrukturanalyse eines **13**:DPP9-Komplexes untersucht. Diese Analyse offenbarte, dass **13** im Gegensatz zum Bindungsmodus von **12** in DPP8 in einer klassischen Substrat-ähnlichen Art und Weise bindet und unter anderem die S2-S1-Bindetaschen von DPP9 besetzt (Abbildung 5B), obwohl eine entsprechende eS2'-Bindetasche auch in DPP9 vorliegt. Aus diesem Grund kann nur spekuliert werden, warum die eS2'-Tasche in DPP9 nicht durch **13** angesteuert wird. Eine Erklärung könnte die leichte Verschiebung der Orientierung von Arginin R843

(R868 in DPP8) sein, welche eventuell zu einer verringerten Zugänglichkeit der eS2'-Bindetasche führt. Unabhängig von dem genauen Auswahlmechanismus, der zur Ausprägung des jeweiligen Bindungsmodus führt, deuten diese Ergebnisse darauf hin, dass die Inhibitoransteuerung der eS2'-Bindetasche in DPP8 zu einer begünstigten DPP8- vs. DPP9-Selektivität führen könnte. Die eS2'-Bindetasche scheint dabei bestimmte strukturelle Determinanten vorzuweisen, die z.B. beim Austausch der Naphthalen-Gruppe durch einen sterisch-anspruchsvolleren Pyren-Substituenten (Verbindung **14**) in einer inaktiven Verbindung resultiert und somit eine limitierte sterische Toleranz offenbart. Dagegen führt die Einführung eines flacheren und konformationell weniger flexiblen TDIQ-Substituenten in **9** zu dem potentesten Inhibitor dieser Studie ( $K_i' = 2.7$  nM für DPP8 und 11.4 nM für DPP9). Die DPP8- vs. DPP9-Selektivität war jedoch in diesem Falle geringer und die kristallographische Analyse des Bindungsmodus zeigte ein komplexes Bindungsmuster mit zwei simultan angeordneten Ligand-Molekülen in der Bindetasche (Abbildung 5C). Zwar ist ein Ligand kovalent an die S755-Aminosäure gebunden und in einer Substrat-ähnlichen Weise zur EE-Helix ausgerichtet; der andere Ligand belegte jedoch die eS2'-Tasche über nicht-kovalente Interaktionen. Dieser "duale Bindungsmodus" in Kombination mit den vorherigen Erkenntnissen legt nahe, dass Bindung sowohl an die S2-S1-Bindetasche als auch an die hydrophobe DPP8-Tasche in einer vergleichbaren Bindungsaffinität resultiert. Andererseits scheint die Selektivität durch bevorzugtes Binden an die S1'-eS2'-Bindetasche gesteuert zu sein.

Insgesamt gehen wir davon aus, dass die unterschiedlichen Bindungsmodi und die Spezifität dieser Liganden von feinen strukturellen Variationen zwischen DPP8 und DPP9 abhängig sind. Insbesondere das aktive Zentrum in DPP8 kann die beobachtete zwei-Liganden-Konfiguration, welche durch die gezielte Ansteuerung der eS2'-Tasche eine hohe





**Abbildung 5.** Röntgenstrukturanalyse von **12** (PDB ID: 7A3J) und **9** (PDB ID: 7A3G) im Komplex mit DPP8 und **13** (PDB ID: 7ZXS) im Komplex mit DPP9 offenbart drei verschiedene Bindungsmodi. Die Elektronendichte ( $F_o - F_c$ ) für die Liganden wird in  $3\sigma$  dargestellt. A) **12** zeigt die ausgeprägteste DPP8-Selektivität. Der Bindungsmodus dieser Verbindung gleicht dem bereits beobachteten Modus von **6** und deutet darauf hin, dass subtile Wechselwirkungen am Ende der Bindetasche die Selektivität von DPP8 gegenüber DPP9 bestimmen. B) Die **13**: DPP9-Struktur zeigt die klassische Substrat-ähnliche Inhibitorausrichtung unter Belegung der S2–S1-Bindetasche. C) **9** ist der potenteste DPP8- und DPP9-Inhibitor aus der Gruppe der getesteten Verbindungen. Dessen Bindungsmodus ist komplexer und besteht aus einer Anordnung von zwei Liganden in der Region des aktiven Zentrums; ein Ligand bindet in die S2–S1-Bindetaschen, während der andere die S1'–eS2' Region besetzt.

Angew. Chem. 2022, 134, e202210498 (8 of 11)

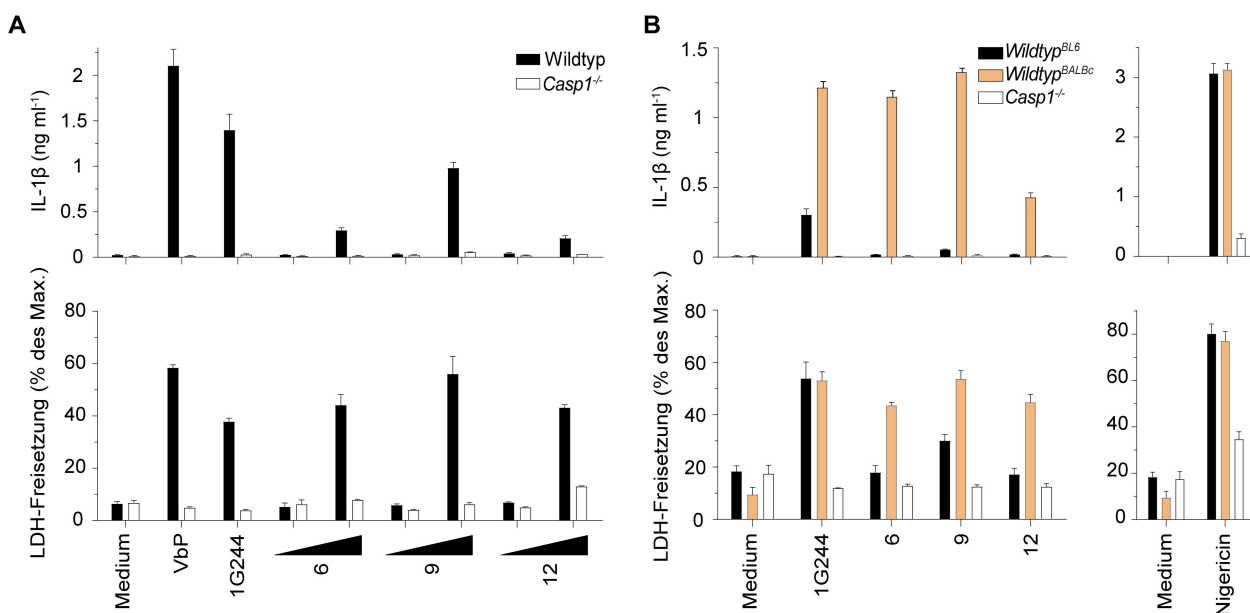
strukturelle Instabilität in DPP8 erwirkt, einfacher ermöglichen. Gegenätzlich dazu besitzt DPP9 einen strikteren Liganden-Bindungsmodus, welcher die Orientierung der Moleküle zu einem Substrat-ähnlichen Typ beschränkt. Darüber hinaus sind im Falle von DPP9 keine Zeichen von struktureller Instabilität zu erkennen und die R-Helix, sowie andere strukturelle Motive sind im Kontrast zu den DPP8-Ligand-gebundenen Strukturen eindeutig durch ihre Elektronendichte definiert. Es ist anzumerken, dass diese Ergebnisse durch die Synthese und Strukturanalyse weiterer 4-Oxo- $\beta$ -lactam-Derivate bestätigt wurden; in diesen Fällen bevorzugten selektivere Inhibitoren stets die Bindung der S1'–eS2'-Bindetasche von DPP8 (Hintergrundinformationen Tabelle S1.5 und Hintergrundinformationen Abbildung S1.6).

Bisher beschränken sich die vielversprechenden DPP8/9-inhibitorischen Eigenschaften der 4-Oxo- $\beta$ -lactame auf biochemische Assaydaten. Auf zellulärer Ebene induzieren DPP8- und DPP9-Inhibitoren wie VbP und 1G244 die Aktivierung des NLRP1-Inflammasoms. Diese geht mit der Sekretion von pro-inflammatorischen Cytokinen wie IL-1 $\beta$  oder IL-18, gefolgt von der Pyroptose, einer speziellen Form des lytischen Zelltods, einher.<sup>[4d,e,13]</sup> Um die Wirkung der 4-Oxo- $\beta$ -lactame auch in lebenden Zellen zu demonstrieren, wurde daher im nächsten Schritt die Substanz-induzierte Inflammasomaktivierung in myeloischen Zellen bestimmt. Zu diesem Zweck wurden die Spiegel von IL-1 $\beta$  und der Lactatdehydrogenase (LDH) als Maß für den lytischen Zelltod in dendritischen Zellen aus dem Knochenmark von Mäusen (BMDCs) nach Behandlung mit den 4-Oxo- $\beta$ -lactamen **6**, **9** und **12** als auch der Positivkontrollen VbP und 1G244 quantifiziert (Abbildung 6A). Alle drei 4-Oxo- $\beta$ -lactame, mit Verbindung **9** als aktivste Substanz, lösten die Caspase-1-abhängige Freisetzung von IL-1 $\beta$ , sowie Pyroptose in einer konzentrations-abhängigen Art und Weise aus. Jedoch waren alle drei Verbindungen weniger aktiv als die Kontrollverbindungen VbP oder 1G244.

Im Gegensatz zum Menschen besitzen Mäuse mehrere NLRP1-Paraloga, von denen eines, NLRP1b, in C57bl/6 Mäusen fehlt. Entsprechend der Aktivierung mehrerer NLRP1-Paraloga durch DPP8/9-Inhibitoren führte die Behandlung von Zellen aus Balb/c-Mäusen mit den 4-Oxo- $\beta$ -lactamen **6**, **9** und **12**, sowie der Kontrollsubstanz 1G244 zu einer wesentlich stärkeren Inflammasom-Reaktion als eine analoge Behandlung von Zellen aus C57bl/6-Mäusen (Abbildung 6B). Dabei waren die 4-Oxo- $\beta$ -lactame **6** und **9** in Zellen von Balb/c-Mäusen aktiver als **12**. In Übereinstimmung mit einer NLRP3-vermittelten Inflammasom-Aktivierung war die Nigericin-Kontrollbehandlung in Zellen beider Mauslinien gleichwertig wirksam. Die Spaltung der Inflammasom-Effektorprotease Caspase-1 und ihr Poren-bildendes Substrat Gasdermin D als zusätzliche Indikatoren für die Inflammasomaktivierung wurden durch Western-Blot-Analysen bestätigt (Hintergrundinformationen Abbildung S1.7). Es gilt wichtigerweise anzumerken, dass die potentiellen erweiterten Zielproteine (*off-targets*), welche in den MS-basierten Assays identifiziert wurden, nicht mit der DPP8/9-vermittelten Inflammasomaktivierung und Pyroptose assoziiert werden und deswegen nicht mit dem verwendeten

© 2022 Die Autoren. Angewandte Chemie veröffentlicht von Wiley-VCH GmbH





**Abbildung 6.** Inflammation-Aktivierung durch DPP8/9-Inhibitoren. A) Wildtyp- und Caspase 1-defiziente BMDCs wurden mit LPS stimuliert und anschließend für 16 Stunden mit 5  $\mu$ M Nigericin, 10  $\mu$ M VbP, 10  $\mu$ M 1G244 oder mit verschiedenen Konzentrationen von **6**, **9** und **12** (10 und 100  $\mu$ M) behandelt. B) Wildtyp- C57Bl/6-, Balb/c- und Caspase 1-defiziente BMDCs wurden mit LPS stimuliert und anschließend für 16 Stunden mit 5  $\mu$ M Nigericin, 10  $\mu$ M VbP, 10  $\mu$ M 1G244 oder 100  $\mu$ M von **6**, **9** oder **12** behandelt. Die Freisetzung von IL-1 $\beta$  und LDH in den Überstand wurde jeweils durch ELISA und einem kolorimetrischen Assay bestimmt.

ten Assay interferieren sollten. Zwar ist FAP in der Regulation des Zelltods involviert und ABHD16A wird mit LysoPS, sowie Lipopolysaccharid-induzierter Cytokinproduktion assoziiert,<sup>[23,26]</sup> jedoch stehen beide Enzyme nicht in direkter Verbindung zur Inflammation-Aktivierung. ELANE wurde kürzlich in den Zusammenhang mit Neutrophil-spezifischen Signalwegen unterhalb der Inflammation-Aktivierung gebracht und der entsprechende Signalweg kann auch mit IL-1 $\beta$ -Freisetzung assoziiert werden. Es handelt sich dabei aber um einen Pyroptose-unabhängigen, nicht-lytischen Weg, der zu keinem Anstieg der LDH-Freisetzung führt.<sup>[27]</sup> Zusammenfassend weisen somit die Ergebnisse auf eine Inflammation-Aktivierung hin und zeigen damit eine DPP8/9-vermittelte Zielaktivierung in primären Immunzellen.

## Zusammenfassung

Die Suche nach selektiven Inhibitoren von DPP8 und DPP9 ist ein aktuelles Thema der chemischen Biologie. Deren Wirkstoffdesign ist aufgrund der hohen Strukturähnlichkeit und einer geteilten Substratspezifität der beiden Enzyme eine hohe wissenschaftliche Herausforderung.

In dieser Arbeit konnten wir durch die Nutzung einer integrierten Gel- und Massenspektrometrie-basierten ABPP-Plattform die bisher unbekannte Pharmakologie der 4-Oxo- $\beta$ -lactame aufklären und *meta*-substituierte *N*-Aryl-4-oxo- $\beta$ -lactame als potente und strukturell-diverse DPP8- und DPP9-Inhibitoren mit vielversprechender Potenz und Selektivität auffinden. Durch die Kombination von Proteomik, chemischer Synthese, Strukturbiologie und bioinformatischer Analyse wurden die 4-Oxo- $\beta$ -lactame dann als inno-

vativer Chemotyp für die DPP8-Modulation entwickelt. Die rational entworfenen 4-Oxo- $\beta$ -lactame erreichten dabei eine hohe DPP8/9-Selektivität, wie z. B. im Falle der Verbindungen **12** (> 21-fache Selektivität gegen DPP8) oder **13** (> 5-fache Selektivität gegen DPP9). Die anschließende Aufklärung der Ligand-Protein-Kristallstruktur dieser Verbindungen mit entweder DPP8 oder DPP9 offenbarte anschließend die Präsenz einer bisher weitestgehend unbeachteten eS2'-Bindetasche in DPP8, die durch das Ansteuern mit Inhibitoren zu einer DPP8- vs. DPP9-Selektivität führen kann.

Unsere Arbeit legt daher nahe, dass eine rationale Modifikation von "klassischen" Substrat-ähnlichen Inhibitoren mit strukturellen Gruppen, die auf die beschriebene eS2'-Tasche abzielen, der Schlüssel zu wirksameren und selektiveren DPP8-Inhibitoren sein könnte. Diese wertvollen strukturellen Daten fehlten in vorherigen DPP8/9-Inhibitorentwicklungsstudien und waren in der vorliegenden Arbeit eine große Hilfe zur Entwicklung von Inhibitoren mit dem bisher besten DPP8/9-Selektivitätsindex. Wir glauben, dass sie auch für das zukünftige Inhibitor-Design hilfreich sein werden. Dabei ist jedoch zu beachten, dass auch wenn die ABPP-Experimente eine gute Targetselektivität innerhalb der Serinhydrolasefamilie vermuten lassen, bei der Verwendung dieser Inhibitoren zur Untersuchung der DPP8/9-Funktion in biologischen Tests immer geeignete Kontrollen angewendet werden müssen, da andere *Off-Target*-Effekte dieser Verbindungen nicht vollständig ausgeschlossen werden können. Alles in allem ermöglicht die leistungsstarke und integrierte Plattform aus der Kombination von ABPP-Techniken und klassischem Wirkstoffdesign frühen Zugang zu Daten bezüglich der Potenz und Selektivität von Leitstrukturen und ist aus diesem Grund unerlässlich.

lich zur Vermeidung von späteren Fallstricken im Verlauf der Arzneimittelentwicklung.

## Danksagung

Diese Arbeit wurde unterstützt durch Fundação para a Ciência e a Tecnologia (FCT, Portugal) mittels der Projekte PTDC/MED-CAR/31322/2017, SAICTPAC/0019/2015, PTDC/MED-QUI/30021/2017, und UID/DTP/04138/2019, Stipendium SFRH/BD/100400/2014 (L.A.R.C.), und dem Struktur- und Investitionsfonds der Europäischen Union im Rahmen der Programmförderung LISBOA-01-0145-FEDER-016405. L.A.R.C. wurde durch ein vom FCT finanziertes Fulbright-Stipendium gefördert. R.G.-F. dankt der Finanzierung durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG) Förderung 2234/1-3 und der DFG GRK2606 (Project ID 423813989). B.R. war Stipendiat der Peter und Traudl Engelhorn Stiftung. Die Arbeit im Labor von O.G. wird von der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG) durch den SFB 1160 (Project ID 256073931), SFB/TRR 167 (Project ID 259373024), SFB 1425 (Project ID 422681845), SFB 1479 (Project ID 441891347), GRK2606 (Project ID 423813989) und durch die Deutsche Exzellenz-Strategie (CIBSS – EXC-2189 – Project ID 390939984), sowie durch den Europäischen Forschungsrat (ERC) durch den Proof-of-Concept Grant 966687 und dem Marie Skłodowska-Curie Grant 101034170 (Cofund: EURIdoc) unterstützt. M.K. dankt der Unterstützung durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft (SFB1430). B.F.C. dankt für Unterstützung durch den NIH R35 CA231991 Grant. Die Autoren danken Ulrike Möller für ihre technische Unterstützung.

## Interessenkonflikt

Die Autoren erklären, dass keine Interessenkonflikte vorliegen.

## Erklärung zur Datenverfügbarkeit

Die Daten, die die Ergebnisse dieser Studie unterstützen, sind in den Hintergrundinformationen zu diesem Artikel verfügbar.

**Stichwörter:** 4-Oxo- $\beta$ -lactame · Aktivitäts-basiertes Protein Profiling (ABPP) · Dipeptidylpeptidasen 8/9 · Proteomics · Röntgenstrukturanalyse

- [1] H. Zhang, Y. Chen, F. M. Keane, M. D. Gorrell, *Mol. Cancer Res.* **2013**, *11*, 1487–1496.
- [2] a) C. A. Abbott, D. M. T. Yu, E. Woollatt, G. R. Sutherland, G. W. McCaughan, M. D. Gorrell, *Eur. J. Biochem.* **2000**, *267*, 6140–6150; b) C. Olsen, N. Wagtmann, *Gene* **2002**, *299*, 185–193; c) B. Ahrén, *Front. Endocrinol.* **2019**, *10*, 376.
- [3] M. C. Okondo, D. C. Johnson, R. Sridharan, E. B. Go, A. J. Chui, M. S. Wang, S. E. Poplawski, W. Wu, Y. Liu, J. H. Lai,

- D. G. Sanford, M. O. Arciprete, T. R. Golub, W. W. Bachovchin, D. A. Bachovchin, *Nat. Chem. Biol.* **2017**, *13*, 46–53.
- [4] a) D. C. Johnson, C. Y. Taabazuing, M. C. Okondo, A. J. Chui, S. D. Rao, F. C. Brown, C. Reed, E. Peguero, E. de Stanchina, A. Kentsis, D. A. Bachovchin, *Nat. Med.* **2018**, *24*, 1151–1156; b) M. C. Okondo, S. D. Rao, C. Y. Taabazuing, A. J. Chui, S. E. Poplawski, D. C. Johnson, D. A. Bachovchin, *Cell Chem. Biol.* **2018**, *25*, 262–267; c) N. M. de Vasconcelos, G. Vliegen, A. Gonçalves, E. De Hert, R. Martín-Pérez, N. Van Opdenbosch, A. Jallapally, R. Geiss-Friedlander, A.-M. Lambeir, K. Augustyns, P. Van der Veken, I. De Meester, M. Lamkanfi, *Life Sci. Alliance* **2019**, *2*, e201900313; d) K. Gai, M. C. Okondo, S. D. Rao, A. J. Chui, D. P. Ball, D. C. Johnson, D. A. Bachovchin, *Cell Death Dis.* **2019**, *10*, 587; e) L. R. Hollingsworth, H. Sharif, A. R. Griswold, P. Fontana, J. Mintseris, K. B. Dagbay, J. A. Paulo, S. P. Gygi, D. A. Bachovchin, H. Wu, *Nature* **2021**, *592*, 778–783; f) C. Lu, J. U. Tilan, L. Everhart, M. Czarnecka, S. J. Soldin, D. R. Mendu, D. Jeha, J. Hanafy, C. K. Lee, J. Sun, E. Izycka-Swieszezewska, J. A. Toretzky, J. Kitlinska, *J. Biol. Chem.* **2011**, *286*, 27494–27505; g) R. Han, X. Wang, W. Bachovchin, Z. Zukowska, J. W. Osborn, *Sci. Rep.* **2015**, *5*, 12348; h) V. Dubois, C. V. Ginneken, H. D. Cock, A.-M. Lambeir, P. Van der Veken, K. Augustyns, X. Chen, S. Scharpé, I. D. Meester, *J. Histochem. Cytochem.* **2009**, *57*, 531–541; i) P. A. Spagnuolo, R. Hurren, M. Gronda, N. MacLean, A. Datti, A. Basheer, F. H. Lin, X. Wang, J. Wrana, A. D. Schimmer, *Leukemia* **2013**, *27*, 1236–1244.
- [5] a) T. Sato, A. Tatekoshi, K. Takada, S. Iyama, Y. Kamihara, P. Jawaid, M. U. Rehman, K. Noguchi, T. Kondo, S. Kajikawa, K. Arita, A. Wada, J. Murakami, M. Arai, I. Yasuda, N. H. Dang, R. Hatano, N. Iwao, K. Ohnuma, C. Morimoto, *Sci. Rep.* **2019**, *9*, 18094; b) Z. Tang, J. Li, Q. Shen, J. Feng, H. Liu, W. Wang, L. Xu, G. Shi, X. Ye, M. Ge, X. Zhou, S. Ni, *Int. J. Cancer* **2017**, *140*, 1620–1632.
- [6] a) R. Geiss-Friedlander, N. Parmentier, U. Moller, H. Urlaub, B. J. Van den Eynde, F. Melchior, *J. Biol. Chem.* **2009**, *284*, 27211–27219; b) D. Justa-Schuch, M. Silva-Garcia, E. Pilla, M. Engelke, M. Kilisch, C. Lenz, U. Möller, F. Nakamura, H. Urlaub, R. Geiss-Friedlander, *eLife* **2016**, *5*, e16370; c) O. Bolgi, M. Silva-Garcia, B. Ross, E. Pilla, V. Kari, M. Killisch, M. Spitzner, N. Stark, C. Lenz, K. Weiss, L. Donzelli, M. D. Gorrell, M. Grade, J. Riemer, H. Urlaub, M. Döbelstein, R. Huber, R. Geiss-Friedlander, *EMBO Rep.* **2022**, e54136.
- [7] M. Sharif-zak, M. Abbasi-jorjandi, G. Asadikaram, Z. A. Ghoreishi, M. Rezazadeh-Jabalbarzi, A. Afsharipur, H. Rashidinejad, F. Khajepour, A. Jafarzadeh, N. Arefinia, A. Kheyrk-hah, M. Abolhassani, *Immunobiology* **2022**, *227*, 152184.
- [8] a) J. R. Bjelke, J. Christensen, P. F. Nielsen, S. Branner, A. B. Kanstrup, N. Wagtmann, H. B. Rasmussen, *Biochem. J.* **2006**, *396*, 391–399; b) B. Ross, S. Krapp, M. Augustin, R. Kierfersauer, M. Arciniega, R. Geiss-Friedlander, R. Huber, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2018**, *115*, 1437–1445.
- [9] L. Heirbaut, S. van Goethem, K. Jansen, H. de Winter, N. Lamoën, J. Joossens, J. Cheng, X. Chen, A.-M. Lambeir, I. de Meester, K. Augustyns, P. Van der Veken, *MedChemComm* **2016**, *7*, 433–438.
- [10] a) W.-T. Jiaang, Y.-S. Chen, T. Hsu, S.-H. Wu, C.-H. Chien, C.-N. Chang, S.-P. Chang, S.-J. Lee, X. Chen, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2005**, *15*, 687–691; b) J.-J. Wu, H.-K. Tang, T.-K. Yeh, C.-M. Chen, H.-S. Shy, Y.-R. Chu, C.-H. Chien, T.-Y. Tsai, Y.-C. Huang, Y.-L. Huang, C.-H. Huang, H.-Y. Tseng, W.-T. Jiaang, Y.-S. Chao, X. Chen, *Biochem. Pharmacol.* **2009**, *78*, 203–210.
- [11] S. van Goethem, V. Matheeußen, J. Joossens, A.-M. Lambeir, X. Chen, I. De Meester, A. Haemers, K. Augustyns, P. Van der Veken, *J. Med. Chem.* **2011**, *54*, 5737–5746.

- [12] E. Pilla, M. Kilisch, C. Lenz, H. Urlaub, R. Geiss-Friedlander, *J. Biol. Chem.* **2013**, 288, 32787–32796.
- [13] T. A. Kelly, J. Adams, W. W. Bachovchin, R. W. Barton, S. J. Campbell, S. J. Coutts, C. A. Kennedy, R. J. Snow, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, 115, 12637–12638.
- [14] P. Van der Veken, A. Soroka, I. Brandt, Y.-S. Chen, M.-B. Maes, A.-M. Lambeir, X. Chen, A. Haemers, S. Scharpé, K. Augustyns, I. De Meester, *J. Med. Chem.* **2007**, 50, 5568–5570.
- [15] B. Ross, S. Krapp, R. Geiss-Friedlander, R. Huber, *Acta Crystallogr. Sect. A* **2018**, 74, e228.
- [16] M. J. Niphakis, B. F. Cravatt, *Annu. Rev. Biochem.* **2014**, 83, 341–377.
- [17] B. F. Cravatt, A. T. Wright, J. W. Kozarich, *Annu. Rev. Biochem.* **2008**, 77, 383–414.
- [18] a) W. P. Heal, T. H. T. Dang, E. W. Tate, *Chem. Soc. Rev.* **2011**, 40, 246–257; b) D. Leung, C. Hardouin, D. L. Boger, B. F. Cravatt, *Nat. Biotechnol.* **2003**, 21, 687–691.
- [19] J. Mulchande, R. C. Guedes, W.-Y. Tsang, M. I. Page, R. Moreira, J. Iley, *J. Med. Chem.* **2008**, 51, 1783–1790.
- [20] E. F. Ruivo, L. M. Goncalves, L. A. Carvalho, R. C. Guedes, S. Hofbauer, J. A. Brito, M. Archer, R. Moreira, S. D. Lucas, *ChemMedChem* **2016**, 11, 2037–2042.
- [21] Y. Liu, M. P. Patricelli, B. F. Cravatt, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1999**, 96, 14694–14699.
- [22] D. A. Bachovchin, T. Ji, W. Li, G. M. Simon, J. L. Blankman, A. Adibekian, H. Hoover, S. Niessen, B. F. Cravatt, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2010**, 107, 20941–20946.
- [23] J. Z. Long, B. F. Cravatt, *Chem. Rev.* **2011**, 111, 6022–6063.
- [24] J. J. Irwin, D. Duan, H. Torosyan, A. K. Doak, K. T. Ziebart, T. Sterling, G. Tumanian, B. K. Shoichet, *J. Med. Chem.* **2015**, 58, 7076–7087.
- [25] E. Pilla, U. Möller, G. Sauer, F. Mattioli, F. Melchior, R. Geiss-Friedlander, *J. Biol. Chem.* **2012**, 287, 44320–44329.
- [26] S. S. Kamat, K. Camara, W. H. Parsons, D. H. Chen, M. M. Dix, T. D. Bird, A. R. Howell, B. F. Cravatt, *Nat. Chem. Biol.* **2015**, 11, 164–171.
- [27] M. Karmakar, M. Minns, E. N. Greenberg, J. Diaz-Aponte, K. Pestonjamas, J. L. Johnson, J. K. Rathkey, D. W. Abbott, K. Wang, F. Shao, S. D. Catz, G. R. Dubyak, E. Pearlman, *Nat. Commun.* **2020**, 11, 2212.
- Manuskript erhalten: 18. Juli 2022  
Akzeptierte Fassung online: 11. September 2022  
Endgültige Fassung online: 28. Oktober 2022