

INHIBITOREN FÜR CYSTEINPROTEASEN

– SYNTHESE, SCREENING UND METHODENENTWICKLUNG –

DISSERTATION

zur Erlangung des akademischen Grades eines Doktors der Naturwissenschaften
– Dr. rer. nat. –

vorgelegt von

Diplom Chemiker

SEBASTIAN LANGOLF

geboren in Würzburg

Institut für Organische Chemie

Universität Duisburg-Essen

2012

INHIBITOREN FÜR CYSTEINPROTEASEN

– SYNTHESE, SCREENING UND METHODENENTWICKLUNG –

Gutachter: Prof. Dr. Carsten Schmuck

Prof. Dr. Shirley Knauer

Prüfungsvorsitzender: PD Dr. Holger Somnitz

Tag der Disputation: 19. Juli 2012

INHALTSVERZEICHNIS

Inhaltsverzeichnis.....	V
1. Einleitung.....	1
Enzyme als Angriffspunkte für neue Wirkstoffe	1
2. Grundlagen und Methoden.....	7
2.1 Cysteinproteasen	7
2.1.1 Vorkommen und Bedeutung von Cysteinproteasen	7
2.1.2 Klassifizierung von Cysteinproteasen	10
2.1.3 Der Katalysemechanismus von Cysteinproteasen.....	15
2.2 Enzymkinetik, IC ₅₀ - und K _i -Wert-Bestimmung	18
2.3 Enzymassays – Messung der Umsatz-Zeit-Kurve bei enzymkatalysierten Reaktionen .	24
2.3.1 Substratassays in Lösung	24
2.3.2 Assays für Substrate am polymeren Träger	29
2.3.3 Inhibitorassays – Methoden mit und ohne harzgebundene Vertreter	32
2.4 Dynamische kombinatorische Chemie.....	35
2.4.1 Das Prinzip der dynamischen kombinatorischen Chemie.....	35
2.4.2 Gleichgewichtsreaktionen als Werkzeug dynamischer Bibliotheken	42
2.4.3 Das Prinzip der dynamischen Dekonvolution.....	49
3. Zielsetzung.....	53
3.1 Strukturoptimierung von Cysteinproteaseinhibitoren	54
3.2 Entwicklung einer Screeningmethode am Harz für die virale Protease HCoV 229E M ^{Pro}	57
3.3 Durchführung eines Screenings mittels dynamischer kombinatorischer Chemie an unterschiedlichen Cysteinproteasen	59
4. Durchführung und Diskussion	61
4.1 Optimierung von Inhibitoren gegen Rhodospain und Falcipain-2	61
4.1.1 Stand der Forschung.....	61
4.1.2 Entwicklung der neuen Inhibitorstrukturen	67
4.1.3 Synthese der neuen Inhibitorgeneration.....	70
4.1.4 Biologische Tests der Inhibitoren zweiter Generation.....	74
4.1.5 Enzymtests der neuen Inhibitorstrukturen.....	77
4.1.6 Zusammenfassung des Enzymscreenings und Ausblick.....	84
4.2 Methodenentwicklung für ein Screening „on bead“ an der Hauptprotease des humanen Coronavirus 229E.....	87

4.2.1	<i>Grundlagen und Vorarbeiten</i>	87
4.2.2	<i>Synthese der Festphasenbausteine</i>	94
4.2.3	<i>Vortests mit nicht ans Harz gebundenen Inhibitoren</i>	102
4.2.4	<i>Enzymtests der harzgebundenen Inhibitoren</i>	103
4.2.5	<i>Berechnete Peptidstrukturen als mögliche Substrate</i>	106
4.2.6	<i>Zusammenfassung der Ergebnisse des Festphasenscreenings</i>	115
4.3	Screening einer dynamischen Bibliothek an unterschiedlichen Cysteinproteasen.....	117
4.3.1	<i>Entwicklung der Screeningmethode</i>	117
4.3.2	<i>Synthese der Bibliotheksbausteine</i>	122
4.3.3	<i>Vorversuche zum dynamischen Screening</i>	124
4.3.4	<i>Durchführung und Ergebnisse des Screenings einer dynamischen kombinatorischen Bibliothek</i>	129
4.3.5	<i>Ergebnisübersicht des dynamischen Screenings</i>	150
5.	Zusammenfassung und Ausblick	153
5.1	Ergebnisse der Strukturoptimierung von Cysteinproteaseinhibitoren für die Proteasen Rhodensain und Falcipain-2.....	154
5.2	Die erfolgreiche Entwicklung einer Screeningmethode von harzgebundenen Inhibitoren für die HCoV 229E M ^{Pro}	158
5.3	Design einer dynamischen Bibliothek für die Untersuchung von Cysteinproteasen....	161
6.	Summary	165
6.1	Results of the structure optimization of cysteine protease inhibitors for the proteases rhodensain and falcipain-2.....	166
6.2	The successful development of an “on bead” screening method for HCoV 229E M ^{Pro}	170
5.3	Design of a dynamic combinatorial library for the investigation of cysteine proteases	173
7.	Experimenteller Teil	177
7.1	Allgemeine experimentelle Angaben	177
7.2	Synthesen.....	181
7.2.1	<i>Darstellung der Inhibitoren zweiter Generation</i>	181
7.2.2	<i>Darstellung der Festphaseninhibitoren</i>	198
7.2.3	<i>Synthese der Bausteine für die dynamische Bibliothek</i>	211
7.3	Durchführung der Enzymassays.....	225
7.3.1	<i>Pufferlösungen</i>	225
7.3.2	<i>Substrate</i>	227
7.3.3	<i>Enzyme</i>	227
7.3.4	<i>Einstellungen am Fluoreszenzspektrometer</i>	228

7.3.5	<i>Zugabereihenfolge der einzelnen Komponenten</i>	228
7.3.6	<i>Screening der pyrrol- und furanbasierten Inhibitoren</i>	229
7.3.7	<i>IC₅₀- und K_i-Wert Bestimmung</i>	230
7.3.8	<i>Screening der festphasengebundenen Inhibitoren</i>	230
7.3.9	<i>Screening der dynamischen Bibliothek</i>	231
7.3.10	<i>Edman-Abbau</i>	232
8.	Anhang	233
8.1	Literaturverzeichnis	233
8.2	Abkürzungsverzeichnis	241
8.3	Ergänzende experimentelle Daten.....	243
8.3.1	<i>HPLC-Daten</i>	243
8.3.2	<i>¹H-NMR Untersuchung der Wechselwirkung TRIS/Aldehyd</i>	246
8.3.3	<i>Fluorimetrische Daten</i>	247
8.4	Lebenslauf.....	259
8.5	Publikationsliste	261
8.6	Erklärung.....	263
8.7	Danksagung.....	265

1. EINLEITUNG

ENZYME ALS ANGRIFFPUNKTE FÜR NEUE WIRKSTOFFE

Proteasen, auch Peptidasen genannt, sind Enzyme, die zur Gruppe der Hydrolasen gehören. Sie katalysieren biochemische Reaktionen, insbesondere die Spaltung von makromolekularen Proteinen und oligomeren Peptiden. Man findet sie beim Menschen, sowie in nahezu jeder anderen Lebensform wieder. In Tieren und Pflanzen kommen sie ebenso vor wie in Viren, Bakterien oder Pilzen. Dort regulieren Proteasen die meisten physiologischen Prozesse (z.B. die Aktivierung und Synthese sämtlicher Proteine) und nehmen dadurch eine Schlüsselrolle im Lebenszyklus eines jeden Organismus ein. Auf diese Weise werden sie zu zentralen Regulatoren in Bezug auf alle Entwicklungsstadien eines Lebewesens, angefangen von Geburt über Wachstum bis hin zu Krankheit und Tod.¹

“[Proteases are the] Mother Nature’s Swiss army knife. They have many different functions, even though they often have nearly identical structures.”²

(J. McKerrow)

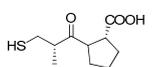
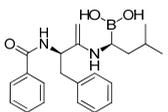
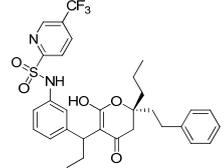
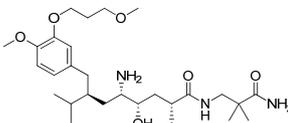
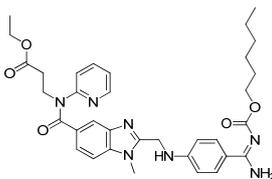
Im menschlichen Körper gibt es weit über 500 Proteasen mit den unterschiedlichsten Funktionen und Aufgaben. Sie machen insgesamt 2 % des menschlichen Genoms aus, bei Viren und Bakterien sind es sogar bis zu 5 %.³ Sie können in Form von kleinen Monomeren (10 kDa) bis hin zu multimeren Komplexen von mehreren 100 kDa auftreten.⁴ Jedoch erfüllen alle proteolytischen Enzyme die gleiche Aufgabe: sie

1. Einleitung

katalysieren die Hydrolyse von Peptidbindungen. Durch die evolutionäre Entwicklung haben sie sich an ein breites Spektrum von Bedingungen angepasst (pH-Wert, reduzierende bzw. oxidierende Umgebung, etc.). So haben sich auch unterschiedliche Hydrolysemechanismen entwickelt, die es erlauben, die Proteasen in sechs verschiedene Klassen zu unterteilen: Cystein-, Serin-, Aspartat-, Threonin-, Glutamin- und Metalloproteasen. Die Einteilung erfolgt dabei anhand der katalytischen Aminosäure im aktiven Zentrum des Enzyms. Darüber hinaus gibt es noch sogenannte undefinierte Proteasen, die aus Mischformen der oben Genannten bestehen. Von den Glutaminproteasen ist bis jetzt kein Vertreter bekannt, der bei Säugetieren vorkommt.

Basierend auf der Bedeutung der Proteasen für das (Über-)Leben eines Organismus stehen Enzyme seit einigen Jahren im Fokus der Wirkstoffforschung. Ziel hierbei ist es, biologisch relevante Signalwege durch spezifische Hemmstoffe (Inhibitoren) zu blockieren. Diese Stoffe sollen die Bindung eines natürlichen Substrats an ein bestimmtes Enzym verhindern, um so dessen Funktion zu beeinflussen oder auszuschalten. Dadurch kann zum Beispiel die Replikation eines Virus oder die Ausbreitung eines Tumors verhindert werden.

Tabelle 1: Beispiele für Inhibitoren, die als Medikamente auf dem Markt erhältlich sind.

Krankheit	Protease	Name (Firma)	Struktur	Markteinführung
Bluthochdruck	ACE	Captopril ⁵ (Capoten; Bristol-Myers Squibb)		1981
Krebs	Proteosom	Bortezomib ⁶ (Velcade; Millennium)		2003
HIV/AIDS	HIV-Protease	Tipranavir ⁷ (Aptivus; Pfizer/Boehringer Ingelheim)		2005
Bluthochdruck	Renin	Aliskiren ⁸ (Tekturna/Rasilez; Novartis/Speedel)		2007
Blutgerinnungsstörung	Thrombin	Dabigatran ⁹ (Rendix/Pradaxa; Boehringer Ingelheim)		2008

Das Prinzip der gezielten Enzymhemmung als Werkzeug für die Wirkstoffentwicklung wurde an einigen ausgewählten Proteasen bereits erfolgreich umgesetzt. Eine Reihe der

bis jetzt untersuchten Inhibitoren zeigen in vorklinischen und ersten klinischen Studien sehr gute therapeutische Wirkung gegen virale und parasitäre Infektionen (z.B. HIV/AIDS). Aber auch gegen Krebs, Diabetes und andere Krankheiten wie Bluthochdruck (z.B. ACE-Hemmer) werden Enzyminhibitoren als Wirkstoffe eingesetzt. Einige von ihnen sind bereits als Medikamente auf dem Markt erhältlich; *Tabelle 1* zeigt eine Auswahl.¹⁰

Die Methoden, solche Inhibitorstrukturen zu identifizieren, sind vielfältig. Zum Beispiel suchen Wissenschaftler in groß angelegten Screenings (Hochdurchsatz-Screening; engl.: High Throughput Screening) mit über 100 000 verschiedenen Substanzen nach Leitstrukturen, die dann optimiert und weiterentwickelt werden. Mit Hilfe von Computern können auch virtuelle Molekül-Bibliotheken berechnet werden, die dann mit Hilfe des sogenannten „Molekular Modelling“ nach neuen Strukturen durchsucht werden („Docking“ Experimente). Durch die Erforschung und Isolierung neuer bzw. unbekannter Enzyme und durch Aufklärung ihrer Sequenz, Struktur und Funktion können ebenfalls neue Ziele für Hemmstoffe gefunden werden. Auf diese Weise konnten schon zahlreiche Inhibitoren für eine ganze Reihe von Proteasen entwickelt werden.

Trotz der oben genannten vielversprechenden Beispiele gibt es verglichen mit der großen Anzahl der bisher entdeckten Inhibitorstrukturen relativ wenige Verbindungen, die die klinische Testphase erreicht haben. Dies ist unter anderem auf unzureichende Bioverfügbarkeit, mangelnde Selektivität oder zu hohe Toxizität der Substanzen zurückzuführen.¹¹ Aus diesem Grund stellt die Erforschung weiterer Verbindungen immer noch eine Herausforderung dar.

Auf der Suche nach neuen Ansatzpunkten sind in den letzten Jahren vor allem die Cysteinproteasen in den Fokus der Wissenschaft gerückt. Ihre weite Verbreitung in nahezu allen Lebewesen macht sie zu einem interessanten Ziel für neue Inhibitorstrukturen. Aus pharmazeutischer Sicht wurden sie lange Zeit wenig beachtet, weil man davon ausging, dass sie nur für den Abbau unspezifischer Proteine in Lysosomen verantwortlich sind. Jedoch stellte sich heraus, dass Cysteinproteasen in äußerst selektive extrazelluläre Prozesse wie z.B. den Matrixumsatz, die Antigenpräsentation sowie in die Signalverarbeitung eingebunden sind. Auf diese Weise wurden sie bei einer Vielzahl von Krankheiten zu Hauptzielen für die Wirkstoffforschung. Beispielsweise wurden Cysteinproteasen erforscht, welche bei Krankheiten wie Osteoporose, Arthritis, Krebs und einer Reihe parasitärer Infektionskrankheiten eine Rolle spielen.^{12,13}

Auch im Bereich der tropischen Infektionskrankheiten wurde die Entwicklung von Cysteinproteaseinhibitoren vorangetrieben. Gerade hier ist die Therapie aufgrund von Resistenzen der Erreger und der Giftigkeit gegenwärtiger Medikamente sehr schwierig geworden. Für viele der Tropenkrankheiten gibt es bis zum heutigen Tage noch keine adäquaten Wirkstoffe, so dass sie mit zu den häufigsten Todesursachen zählen. Laut Weltgesundheitsorganisation (WHO) infizieren sich jährlich 225 Millionen Menschen mit Malaria, von denen 800 000 an den Folgen sterben.¹⁴ Auch gegen den erst 2003 entdeckten SARS-Erreger (Severe Acute Respiratory Syndrom), der vor allem in China

1. Einleitung

und Hongkong mit einer Mortalitätsrate von 11 % zu einer Epidemie führte, gibt es kein Heilmittel.

Die Erforschung von Ansatzpunkten für neue Wirkstoffe gegen Infektionskrankheiten und die Entwicklung neuer Inhibitoren ist demnach dringend notwendig. In den letzten Jahren wurden daher parasitäre Cysteinproteasen intensiv untersucht. Sie sind bei Krankheiten wie der Afrikanischen Trypanosomiasis (Schlafkrankheit), der Chagas Krankheit, der Leishmaniose oder Malaria in grundlegende biologische Prozesse involviert.¹⁵ Die Parasiten dieser Krankheiten benutzen die Enzyme für die Invasion des Wirtes und für ihre Ernährung (durch Abbau von Wirtsproteinen).¹² Eine Inhibierung der Proteasen lässt den Erreger absterben, diese Tatsache schafft den Ansatzpunkt für die Entwicklung von Therapeutika.

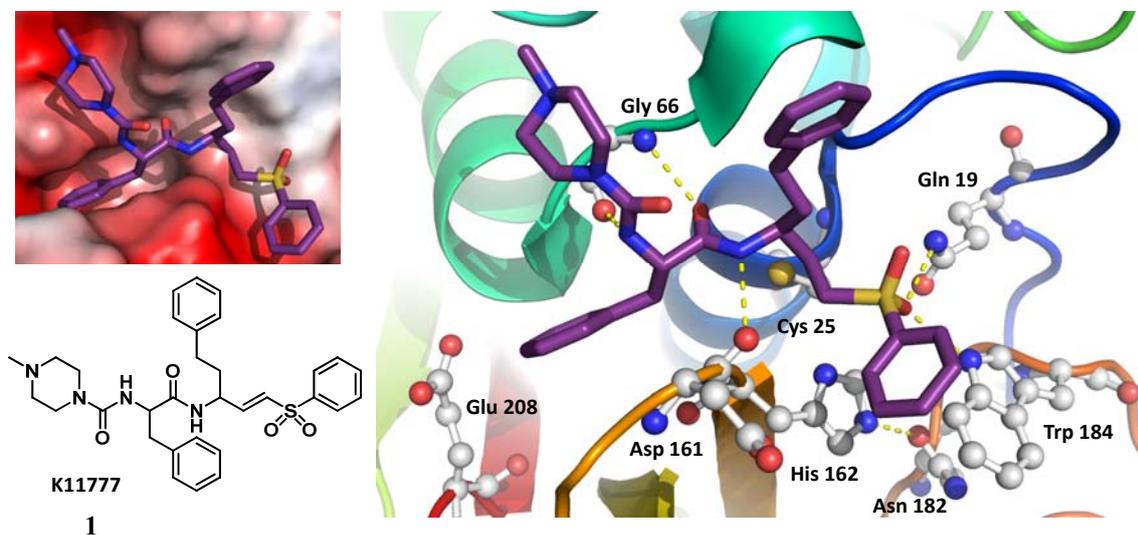


Abbildung 1: Struktur des Inhibitors K11777 (1). Die Cysteinprotease Cruzain aus *T. cruzi* (Chagas Krankheit) wird durch dieses Dipeptidylvinylsulfonderivat erfolgreich gehemmt. Der Inhibitor befindet sich in vorklinischen Tests. Links oben: Struktur des Inhibitors (lila) in der Bindungstasche des Enzyms. Die Oberfläche ist entsprechend des elektrostatischen Potentials eingefärbt (rot: negativ, blau: positiv). Rechts: Der Inhibitor wird durch Wasserstoffbrücken (gelbe gestrichelte Linien) von den umgebenden Aminosäuren (grau) in der Bindungstasche gebunden. Im Hintergrund ist die Tertiär- und Sekundärstruktur des Enzyms schematisch dargestellt

Aktuell gibt es allerdings noch keinen Cysteinproteaseinhibitor, der die klinischen Tests vollständig durchlaufen hat und als Medikament Verwendung findet. Einige Vertreter wie z.B. Inhibitor K11777¹⁶ (1, *Abbildung 1*) – ein Dipeptidylvinylsulfonderivat, welches das Enzym Cruzain aus *Trypanosoma cruzi* (Chagas Krankheit) hemmt, befindet sich in vorklinischen Tests. Nach wie vor gibt es keine auf dem Markt befindlichen Medikamente in Form von Inhibitoren gegen parasitäre oder virale Cysteinproteasen. Aufgrund dieser Tatsache ist man weiterhin auf der Suche nach potenten Strukturen, die sich als potentielle Wirkstoffe eignen.

Durch die Erforschung neuer Leitstrukturen, der Optimierung bestehender Inhibitoren und die (Weiter-)Entwicklung von Screeningmethoden wird versucht, dieses Ziel intensiv zu verfolgen. Cysteinproteasen sind dabei zu einem zentralen Aspekt der modernen Wirkstoffforschung geworden.

„There are plenty of targets in proteases to keep us busy for a long time“²
(*H. Gschwend*)

In der vorliegenden Arbeit sollen verschiedene Wege und Möglichkeiten zur Entwicklung und Optimierung von Enzyminhibitoren veranschaulicht werden. Dabei werden an konkreten Beispielen Methoden und zielführende Strategien erläutert und diskutiert. Der Fokus liegt dabei auf der Klasse der Cysteinproteasen.

2. GRUNDLAGEN UND METHODEN

2.1 CYSTEINPROTEASEN

2.1.1 VORKOMMEN UND BEDEUTUNG VON CYSTEINPROTEASEN

Es hat sich gezeigt, dass vor allem Cysteinproteasen ein besonders attraktives Ziel für die Wirkstoffentwicklung sind. Ihre fundamentale Rolle im Entwicklungsprozess von parasitären Infektionen haben sie zu interessanten Angriffspunkten für die Erforschung neuer Therapeutika gemacht.¹³ Die funktionale Vielfalt der Proteasen in biologischen Prozessen kann sowohl von der Anpassungsfähigkeit an verschiedene Substrate als auch von ihrer Stabilität in unterschiedlicher biologischer Umgebung abgeleitet werden.

Unter anderem werden von Erregern wie *Plasmodium falciparum* (Malaria), aber auch von Leishmanien und Trypanosomen, zu denen Erreger wie *Trypanosoma cruzi* (Chagas Krankheit), *Trypanosoma brucei rhodesiense* (*T. b. rhodesiense*, Afrikanische Trypanosomiasis) oder *Leishmania major* (*L. major*) gehören, eine Vielzahl von essentiellen Proteasen exprimiert. Diese große Anzahl von Enzymen dient der Entwicklung und Vermehrung der Erreger im Wirt. Ein Beispiel für diese Fülle an Proteasen ist *P. falciparum*. Der Erreger kodiert für 92 mögliche Proteasen, darunter allein 33 Cysteinproteasen. Mit ganz unterschiedlichen Aufgaben stellen diese Proteasen das Überleben des Parasiten sicher. Teilweise können sie sich, was ihre Aktivitäten und Aufgabenbereiche angeht, sogar gegenseitig kompensieren.¹⁷ Dennoch kann eine gezielte Hemmung einzelner Proteasen häufig zum Absterben des Erregers führen.

2. Grundlagen und Methoden

Tabelle 2: Auswahl medizinisch und pharmazeutisch relevanter Cysteinproteasen.

Herkunft	Protease	Funktion	Vorkommen/ Erkrankung
Pflanze			
<i>Carica papaya</i>	Papain	Schutz vor Schädlingen ¹⁸	Papaya-Frucht
Mensch			
<i>Homo sapiens</i>	Cathepsin B	Abbau extrazellulärer Matrix in pathogenen Prozessen	Krebs, Rheumatoide Arthritis ¹⁹
<i>Homo sapiens</i>	Cathepsin K	Tumorausbreitung	Brustkrebs, Knochenmark ²⁰
<i>Homo sapiens</i>	Calpain 2	Apoptose	Brustkrebs
<i>Homo sapiens</i>	Caspase 1	Apoptose	Pathogenese der Huntington-Krankheit
Parasit			
<i>T. b. rhodesiense</i>	Rhodesain	Replikation des Parasiten	Afrikanische Trypanosomiasis
<i>P. falciparum</i>	Falcipain-2	Hämoglobinabbau in den Trophozoiten	Malaria ²¹
<i>T. cruzi</i>	Cruzain	Ernährung des Parasiten ²²	Chagas-Krankheit
Virus			
Hepatitis A-Virus	Picornain 3C	Virale Replikation und Transkription	Hepatitis A
TGEV ^a (Schwein)	TGEV M ^{Pro}	Virale Replikation und Transkription	Durchfall-erkrankung (Schwein)
SARS ^b Coronavirus	SARS-CoV M ^{Pro}	Virale Replikation und Transkription	SARS
Humaner Coronavirus 229E	HCoV 229E M ^{Pro}	Virale Replikation und Transkription	Atemwegs-erkrankung

T. b.: *Trypanosoma brucei*; [a] TGEV: Transmissible Gastroenteritis Virus; M^{Pro}: Hauptprotease; [b] SARS: Severe Acute Respiratory Syndrom.

Auch viele Viren benötigen für ihre Replikation viruseigene Proteasen. Das durch Translation der viralen RNA entstandene Vorläuferprotein wird von den Proteasen in strukturelle (z.B. Capsinproteine, Hüllproteine) und nicht-strukturelle Proteine (Enzyme, RNA-Polymerase, etc.) zerlegt. Durch die Hemmung der Proteasen kann folglich eine Replikation des Virus verhindert werden.¹⁷ Dies ist beispielsweise bei der Inhibierung der Hauptprotease (M^{Pro}) des SARS-Coronavirus der Fall. Die Protease wird durch

autolytische Spaltung an den C- und N-terminalen Enden des Polyproteins generiert und verarbeitet das Polyprotein durch Spaltung in Nicht-Struktur-Proteine weiter. Sie hat somit eine wichtige Bedeutung für die Generierung des viralen Replikationskomplexes. Eine Hemmung der Protease lässt den Erreger absterben, da er sich nicht mehr replizieren kann. Aus diesem Grund eignet sie sich gut als Zielprotease für die Entwicklung von Wirkstoffen.^{23,24} Im Gegensatz zu parasitären Proteasen ist bei Viren oft nur eine einzige Protease für die Replikation essenziell. Auch existieren von den viralen Enzymen keine verwandten humanen Proteasen, wie das bei den parasitären Proteasen der Fall ist.¹⁷ Dadurch lassen sich leichter Hemmstoffe finden, die selektiv die viralen Proteasen ansprechen, ohne die humanen Proteasen ebenfalls zu hemmen.

Im menschlichen Organismus findet man ebenfalls eine Vielzahl unterschiedlicher Cysteinproteasen (z.B. Cathepsin K in Osteoklasten (Knochenmark), Cathepsine B und L in der Leber) mit fundamentalen Funktionen. Sie sind in physiologische und pathophysiologische Prozesse involviert, wie z.B. Metastasenbildung,²⁵ Wachstum von Tumoren,^{26,27} Alzheimer²⁸ und andere Erkrankungen. Hier ist vor allem die Familie der Cathepsine mit 11 humanen Vertretern zu nennen (Cathepsin B, C, F, H, K, L, O, S, V, W, X),²⁹ da sie eine der am häufigsten vorkommenden Cysteinproteasen im menschlichen Körper ist. In *Tabelle 2* ist eine Auswahl von pharmazeutisch relevanten – sowohl pflanzlichen, parasitären, viralen als auch humanen Cysteinproteasen aufgelistet.³⁰

Jede Protease besitzt eine selektive Affinität zu einem ganz bestimmten oder einer Gruppe von Substraten, die durch das Enzym gespalten werden. Das bedeutet, dass ihre Bindungsstelle nur für definierte Sequenzen von Aminosäuren zugänglich ist. Dieser Grad an Selektivität hängt stark von der biologischen Funktion der jeweiligen Protease ab. Zum einen gibt es Vertreter, die ein breites Spektrum von möglichen natürlichen Substraten spalten, obwohl sie über einen sehr hohen Präzisionsgrad bezüglich der katalytischen Reste, die bei der Bindungsspaltung involviert sind, verfügen. Ein Beispiel dafür ist Trypsin, das als Verdauungsenzym nach den basischen Aminosäuren Lysin und Arginin unterschiedliche Peptidsequenzen spalten kann.^{31,32} Auf der anderen Seite gibt es Proteasen wie den urokinaseähnlichen Plasminogenaktivator (U-pA), die sehr selektiv einige wenige physiologische Moleküle erkennen und spalten.³³ Diese Substratspezifität stellt bei der Funktion der Proteasen einen entscheidenden Aspekt dar, da auf diese Weise der Aktionsradius eines Enzyms eingegrenzt wird.

Im Folgenden wird nun auf die Klassifizierung und die evolutionäre Abstammung der Cysteinproteasen näher eingegangen.

2.1.2 KLASSIFIZIERUNG VON CYSTEINPROTEASEN

Cysteinproteasen gehören zu den Hydrolasen, d.h. sie spalten ein für sie spezifisches Substrat an einer ganz bestimmten Stelle. Man unterteilt in zwei Arten von Hydrolasen, in Endo- und Exopeptidasen. Das Kriterium dabei ist die Art und Weise wie das Substrat gespalten wird. Die Enzyme werden unterteilt in Aminopeptidasen, die Substrate vom N-Terminus aus spalten, in Carboxypeptidasen, die vom C-Terminus her spalten und Proteasen, die einen Peptidstrang in der Mitte der Kette spalten (sog. Endopeptidasen). In *Abbildung 2* ist dies an drei Cysteinproteasen (Cathepsin L, Cathepsin H und Cathepsin X) exemplarisch dargestellt.

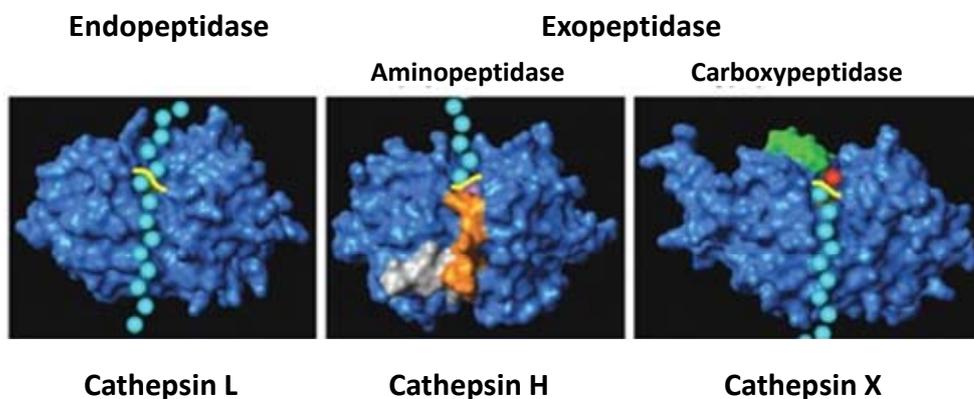


Abbildung 2: Arten der Substratspaltung von Peptidasen. (Substrat: hellblaue Kugeln; Enzym: dunkelblau; Schnittstelle: gelb). Bei Endopeptidasen liegt das Substrat mit der kompletten Länge in der Bindungstasche und wird in der Mitte gespalten. Bei Exopeptidasen wird die Lage des Substrats in der Bindungstasche erzwungen (Cathepsin H: kurze Aminosäuresequenz (orange), Cathepsin X: kleiner Loop (grün)) und der Peptidstrang am Ende entweder vom N-Terminus (Aminopeptidase) oder vom C-Terminus (Carboxypeptidase) an einer spezifischen Stelle gespalten. Die Bindung des positiven N-Terminus (cyan) wird durch negative (Cathepsin H) und die des negativen C-Terminus (rot) durch positive (Cathepsin X) Ladungen unterstützt (reprinted with permission).³

Endopeptidasen zeichnen sich dadurch aus, dass sie das Substrat in der Mitte zwischen zwei Aminosäuren spalten, welches über die gesamte Länge in der Bindungstasche des Enzyms liegt. Bei Exopeptidasen liegt das Substrat nur mit einem Ende in der Bindungstasche. Die Lage des Substrats im aktiven Zentrum wird durch kleine strukturelle Elemente wie kurze Loops (Cathepsin X) oder kleine Peptidsequenzen (Cathepsin H) erzwungen. Dabei tragen diese Strukturelemente in Exopeptidasen zusätzlich negative oder positive Ladungen, die das Substrat mit dem positiv geladenen N-Terminus (bei Aminopeptidasen), bzw. negativ geladenem C-Terminus (bei Carboxypeptidasen) besser binden.³ Auf diese Weise wird das Substrat an das aktive Zentrum hin dirigiert, wo es über nichtkovalente Wechselwirkungen gebunden wird um anschließend gespalten zu werden.

Eine weitere Einteilung der Cysteinproteasen erfolgt abhängig von charakteristischen Eigenschaften in Clans und Familien nach dem MEROPS-System.³⁴ Ausschlaggebend dafür sind die Ähnlichkeit der Aminosäuresequenz, das Vorkommen von gleichen Merkmalen in der Sekundärstruktur (integrierte Loops, Helices, etc.), die biochemische Spezifität gegenüber kleinen peptidischen Substraten und die evolutionäre Entwicklung. Proteasen, die sich in ihrer Aminosäuresequenz und damit auch in ihrer Tertiär- bzw. teilweise auch Quartärstruktur ähneln, werden in Familien zusammengefasst. Diese Familien werden wiederum, sofern sie von einem gemeinsamen „Urprotein“ abstammen, in Clans gruppiert, die teilweise nach dem „Prototyp“ benannt sind. Cysteinproteasen werden bislang in acht verschiedene Clans unterteilt: Papain-Clan (CA), Caspase-Clan (CD), Adenain-Clan (CE), Clan der Pyroglutamyl-Peptidase I (CF), Sortase-Clan (CL), Clan CM, Clan CN und Clan CO (*Abbildung 3*). Außerdem gibt es eine Reihe weiterer Cysteinproteasen, die keinem der genannten Clans zugeordnet werden können. Dem Papain-Clan gehören bislang die meisten der entdeckten Cysteinproteasen an.³⁰

Die erste Cysteinprotease wurde bereits 1879 aus dem Saft der Papaya Frucht (*Carica papaya*) isoliert³⁵ sowie charakterisiert und wurde daraufhin Papain genannt. Auch war sie die erste Cysteinprotease, deren Struktur 1968 aufgeklärt wurde.³⁶ Ab diesem Zeitpunkt wurde eine Vielzahl weiterer Cysteinproteasen entdeckt, welche eine ähnliche Struktur besitzen. Sie werden deshalb „papainähnliche“ (papain-like) Cysteinproteasen genannt und gehören dem CA Clan an. Die Cysteinproteasen von parasitären Organismen sind überwiegend im Clan CA aber auch im Caspase-Clan CD wiederzufinden.³⁷

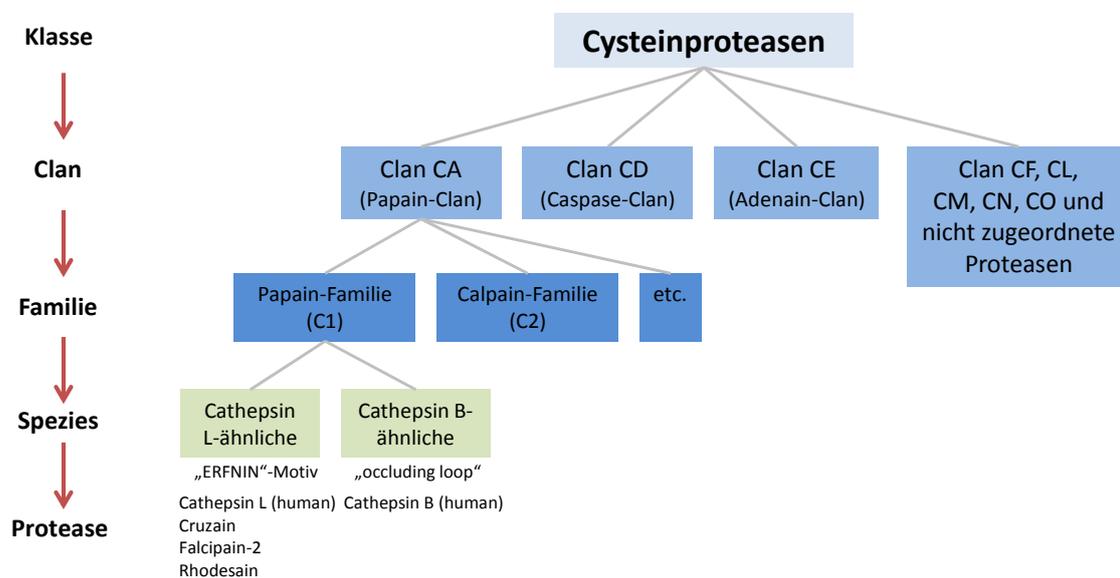


Abbildung 3: Einteilung der Cysteinproteasen in Clans, Familien und Spezies. Die Einteilung erfolgt nach dem MEROPS-System, bei dem die Proteasen auf Grund evolutionärer und damit auch struktureller Verwandtschaft in Clans und Familien zusammengefasst werden können.^{4,17,34,37}

Der Papain-Clan CA lässt sich in Familien weiter untergliedern. Dazu gehören beispielsweise die Papain-Familie C1 mit den Spezies der Cathepsin B- und der Cathepsin L-ähnlichen Cysteinproteasen ebenso wie die Calpain-Familie C2 (calpainähnliche Cysteinproteasen); sie zählen beide zu den wichtigsten parasitären Familien.^{4,34} Zwischen Cathepsin B- und Cathepsin L-ähnlichen Cysteinproteasen bestehen strukturelle und sequenzielle Unterschiede. Beispielsweise besitzen die Cathepsin L-ähnlichen Proteasen ein charakteristisches sogenanntes ERFNIN-Motiv (ERFNIN = Glu-Arg-Phe-Asn-Ile-Asn) in der Proregion des Enzyms. Cathepsin B-ähnlichen Cysteinproteasen dagegen fehlt diese Sequenz. Sie zeichnen sich jedoch durch einen sog. „occluding loop“ in der Nähe des katalytischen Zentrums aus. Diese integrierte Schleife blockiert die Bindungstasche auf einer Seite, so dass nur das C-terminale Ende des Substrats in der Tasche binden kann. Deshalb gehören die Cathepsin B-ähnlichen Proteasen zu den Exopeptidasen, genauer zu den Carboxypeptidasen und spalten ein Dipeptid vom Polypeptid ab (*Abbildung 4*, rechts). Im Gegensatz dazu fungieren die Cathepsin L-ähnlichen Proteasen als Endopeptidasen und spalten das Peptid in der Mitte einer Sequenz.

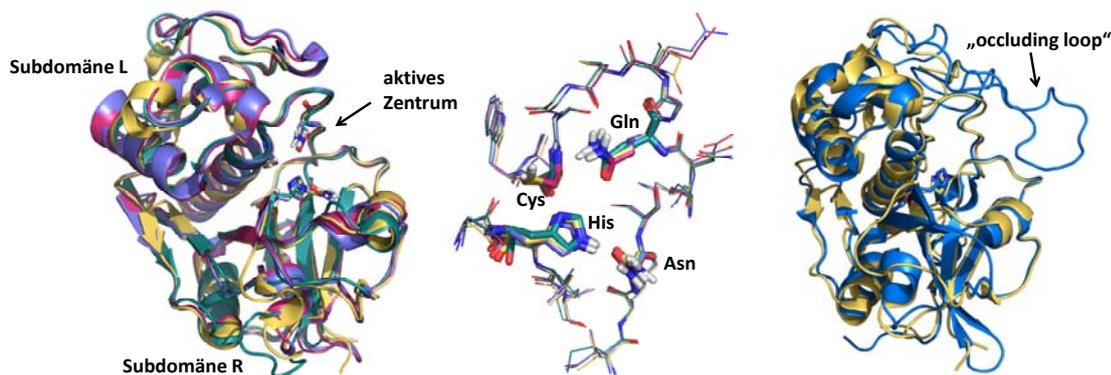


Abbildung 4: Links: Überlagerte Strukturen von Papain (türkis), Rhodesain (lila), Cathepsin L (gelb) und Cruzain (pink). Die beiden Subdomänen R und L bilden zwischen sich das aktive Zentrum. Mitte: katalytische Diade im aktiven Zentrum (Cys/His), die überlagerten Strukturen zeigen die stark konservierten Reste Cys, His, Gln und Asn (Papain (türkis), Rhodesain (lila), Cathepsin L (gelb), Cruzain (pink)). Rechts: Überlagerte Strukturen von Cathepsin B (blau) und Cathepsin L (gelb). Der „occluding loop“, der bei Cathepsin B-ähnlichen Proteasen vorhanden ist, blockiert auf einer Seite die Bindungstasche und macht die Proteasen dadurch zu Carboxypeptidasen, die ein Dipeptid abspalten können.

In den meisten Fällen werden die Proteasen vom Parasit als inaktives Vorläuferprotein synthetisiert und erst durch eine proteolytische Spaltung einer N-terminalen Proregion aktiviert.³⁸ Das fertige Enzym besteht dann aus zwei Subdomänen, einem L- und einem R-Bereich, die das aktive Zentrum des Enzyms formen.³⁹ Dabei ist die Helix, die das katalytische Cystein trägt, im L-Bereich zu finden. Die überlagerten Strukturen verwandter Enzyme zeigen deutlich die Homologie in Sekundär- und Tertiärstruktur, wie

hier am Beispiel von Papain, Rhodensain, Cathepsin L und Cruzain dargestellt ist (*Abbildung 4*, links). Alle vier Proteasen gehören zur Spezies der Cathepsin L-ähnlichen Cysteinproteasen (Clan CA, Familie C1). Auffallend ist auch das bei allen Enzymen dieser Spezies gleiche, hochkonservierte katalytische Zentrum. Die katalytische Diade besteht aus Cystein und Histidin, wobei sie gleichzeitig noch durch einen Glutamin- und einen Asparaginrest stabilisiert wird (*Abbildung 4*, Mitte). Dieser Familie gehören die meisten der in dieser Arbeit verwendeten Proteasen an.

In *Tabelle 3* ist eine Auswahl pharmazeutisch relevanter Cysteinproteasen nach ihren Clans und Familien vorgenommen und gleichzeitig das aktive Zentrum sowie die MEROPS-Klassifizierung mit angegeben.

Tabelle 3: Einteilung einiger pharmazeutisch relevanter Cysteinproteasen in ihre Clans und Familien. Die Sequenzen der aktiven Zentren, so wie die MEROPS-Nomenklatur sind entsprechend angegeben.

Clan	Familie	Protease	aktives Zentrum	MEROPS
CA	C1	Papain		C01.001
		Cathepsin K		C01.036
		Falcipain-2		C01.046
		Cathepsin B	Gln, Cys ⁻ , HisH ⁺ , Asn	C01.060
		Rhodensain		C01.072
		Cruzain		C01.075
	C2	Calpain 2		C02.002
CD	C14	Caspase 1	Cys ⁻ , HisH ⁺	C14.001
PA	C3A–G	Picornain 3C	His, Asp, Cys	C03.005
		TGEV M ^{Pro}		C30.001
		HCoV 229E M ^{Pro}	Cys, His	C30.003
		SARS-CoV M ^{Pro}		C30.005

Im Gegensatz zu den papainähnlichen Cysteinproteasen der Familie C1 gehören die Hauptprotease des SARS-Coronavirus (SARS CoV M^{Pro}) und die des humanen Coronavirus 229E (HCoV 229E M^{Pro}) nicht zum Papain-Clan CA. Sie besitzen zwar ebenfalls einen Cysteinrest im aktiven Zentrum, gehören damit also zur Klasse der Cysteinproteasen, aber nicht zum Clan CA, sondern zu einem „Misch-Clan“ PA, dem sog. Chymotrypsin-Clan. Sie werden auf Grund ihrer Faltung – und damit auch der evolutionären Abstammung – den chymotrypsinähnlichen Proteasen zugeordnet (*Abbildung 5*). Diese Einordnung geschieht allerdings unabhängig von ihrem

Katalysemechanismus. Chymotrypsin gehört zu den Serinproteasen und verfügt dadurch auch über ein anderes katalytisches Zentrum. Dadurch wird deutlich, dass trotz der strukturellen Verwandtschaft innerhalb der Familien und Clans unterschiedliche Klassen von Proteasen zusammengefasst werden können. Innerhalb der Clans können sich Cysteinproteasen in der Substratspezifität jedoch unterscheiden.¹⁷

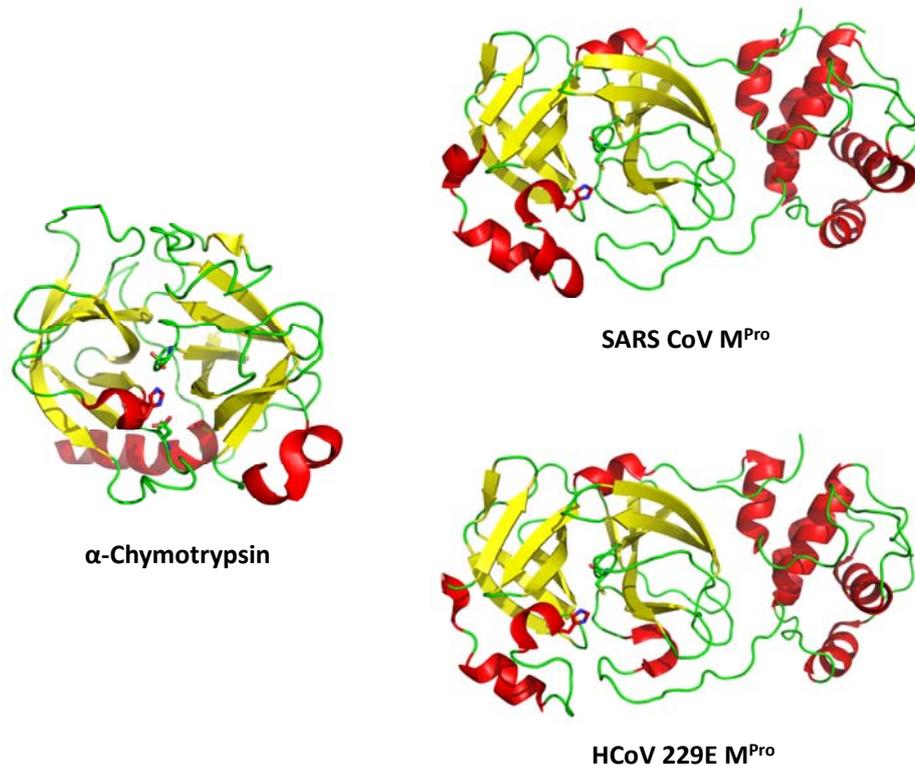


Abbildung 5: Die viralen Cysteinproteasen SARS CoV M^{Pro} und HCoV 229E M^{Pro} sind sich strukturell sehr ähnlich und werden auf Grund ihrer evolutionären Entwicklung und strukturellen Ähnlichkeit dem „Misch-Clan“ PA, den chymotrypsinähnlichen Proteasen zugeteilt.

Die Einteilung der Cysteinproteasen kann also nach der Art der Substratspaltung, der evolutionären Abstammung oder den katalytischen Eigenschaften erfolgen. Durch die Gruppierung in Clans, Klassen, Familien und Spezies kann eine Einordnung der Proteasen unter Berücksichtigung charakteristischer Merkmale erfolgen. Proteasen mit unterschiedlicher Struktur und Herkunft können trotz der Zugehörigkeit in verschiedene Clans den gleichen Katalysemechanismus aufweisen. Im Folgenden werden nun mechanistische Aspekte der Katalyse von Cysteinproteasen dargelegt.

2.1.3 DER KATALYSEMECHANISMUS VON CYSTEINPROTEASEN

Das wichtigste Merkmal aller Cysteinproteasen ist die Sequenzhomologie der Aminosäuren, die in der Umgebung des katalytischen Cysteins und Histidins liegen (siehe *Abbildung 4*, Mitte). Bei Cysteinproteasen ist dies eine katalytische Diade bestehend aus Cys/His (Clan CA) oder His/Cys (Clan CD).

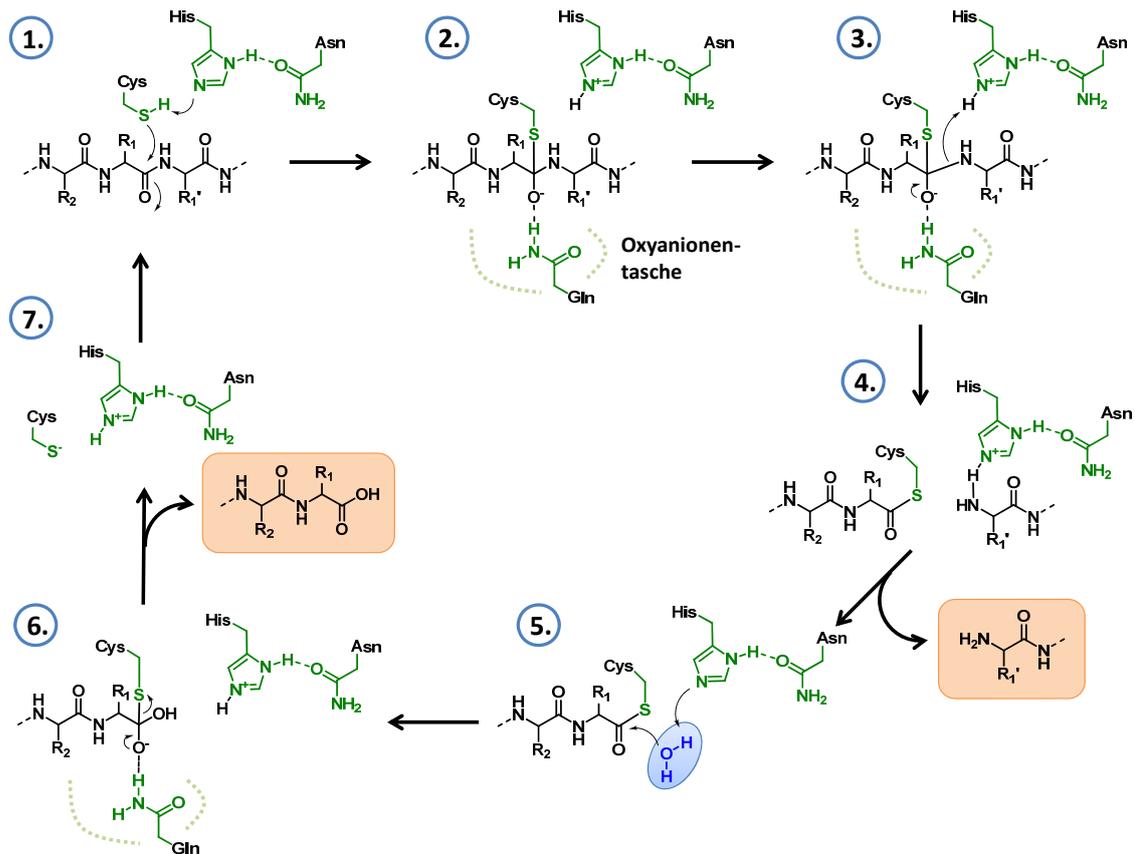


Abbildung 6: Katalysemechanismus von Cysteinproteasen; das Enzym (grün), das Peptid (schwarz), ein Wassermolekül (blau) und die abgespaltenen Fragmente (orangener Kasten) sind farblich gekennzeichnet.

Die Enzymklasse verwendet eine kovalente Katalyse, also die Knüpfung einer Atombindung zwischen Enzym und Substrat an der zu spaltenden Peptidbindung. Der Cysteinrest ist für die Hydrolyse der Substrate entscheidend, die Thiolgruppe fungiert als Nukleophil und greift den Carbonylkohlenstoff der zu spaltenden Bindung an. Dabei agiert das benachbarte Histidin zuerst als Protonenakzeptor und dann als Donor. Durch Protonenübertragung entsteht aus der SH-Gruppe des Cysteins und dem Imidazolring des Histidins das entscheidende Ionenpaar, die katalytische Diade. Im Fall der papainähnlichen Proteasen wird das aktive Zentrum durch einen Asparaginrest

komplementiert. Über eine Wasserstoffbrückenbindung zwischen dem Amid-Sauerstoff des Asparagins und dem Imidazolring des Histidins wird dieser optimal für die Hydrolyse vorkoordiniert (*Abbildung 6*, Nr. 1). Ein hoch konserviertes Glutamin formt zusätzlich (zusammen mit dem Rückgrat des Cysteins) das sogenannte „oxyanion hole“ (Oxyanionentasche), ein elektrophiles Zentrum, das den tetraedrischen Übergangszustand des Substrats während der Hydrolyse stabilisiert (*Abbildung 6*, Nr. 2).⁴⁰ Die Spaltung des Substrats im nächsten Schritt wird durch eine Drehung des Imidazolrings eingeleitet, der dadurch einen Protonentransfer vom Imidazol-Kation auf den Peptid-Stickstoff ermöglicht (*Abbildung 6*, Nr. 3). Das so entstandene Amin bleibt über Wasserstoffbrücken an den Imidazolring koordiniert, während das andere Substratfragment über die Carboxylfunktion als Thioester an das Cystein gebunden ist (*Abbildung 6*, Nr. 4). Abschließend reagiert ein Wassermolekül über einen erneuten tetraedrischen Übergangszustand mit dem Thioester zur Carbonsäure am Substrat und vervollständigt durch die Wiederherstellung des Enzyms den Katalysekreislauf (*Abbildung 6*, Nr. 5–7).³⁹ Aufgrund von Ionisierbarkeit und Stabilisierung der katalytischen Diade kann die Protease in einem breiten Spektrum verschiedener pH-Werte arbeiten (pK_S (Cys) 4.0, pK_S (His) 8.5). Als freie Aminosäure hat die Thiolgruppe eines Cysteins einen pK_S -Wert von ca. 8. Im aktiven Zentrum eingebettet sinkt der pK_S vermutlich durch die Wechselwirkung mit der α -Helix, an die das Cystein gebunden ist, auf einen Wert von 4.³⁰ Eine zusätzliche Stabilisierung erfährt das System durch die konservierte und geschützte Umgebung des aktiven Zentrums.⁴ Nach einem ähnlichen Mechanismus spalten auch Serinproteasen, ein Unterschied in der Reaktivität zu den Cysteinproteasen stellt jedoch die bessere Nukleophilie des Cysteinrests dar. Bedingt durch die größere Elektronendichte des Schwefels ist der Cysteinrest reaktiver als der Serinrest im aktiven Zentrum der Serinproteasen.

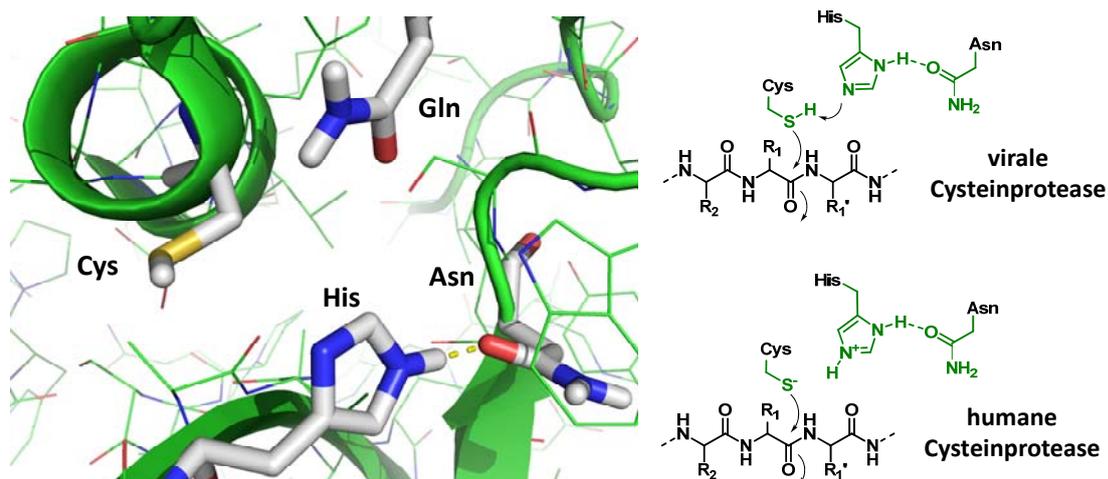


Abbildung 7: links: Katalytische Diade einer Cysteinprotease eingebettet in die konservierte enzymatische Umgebung. Die vorkoordinierende Wasserstoffbrücke zwischen His und Asn ist gelb eingezeichnet. Rechts: Erster Schritt des viralen und des humanen Katalysemechanismus. Bei humanen und parasitären Cysteinproteasen liegt die Diade präkatalytisch als Ionenpaar vor und erhöht so die Nukleophilie des Cysteinrests.

Beim Mechanismus der Katalyse durch Cysteinproteasen unterscheidet man zwei Varianten: eine für virale und eine für humane bzw. parasitäre Enzyme. Für virale Cysteinproteasen verläuft die Substratspaltung nach eben beschriebenenem Schema. Bei humanen und parasitären Cysteinproteasen liegt dagegen präkatalytisch die Diade bereits als Ionenpaar vor; das Proton der Thiolgruppe am Cystein wird auf das benachbarte Histidin übertragen. So entstehen ein deprotoniertes Cystein und ein protoniertes Histidin. Diese erhöhte Nukleophilie des aktiven Zentrums gegenüber anderen (Cystein)Proteasen kann auch für die Entwicklung von Hemmstoffen ausgenutzt werden (*Abbildung 7*).¹⁷

Die Umgebung eines aktiven Zentrums spielt für die Substratbindung eine wichtige Rolle. Sie entscheidet über Selektivität und Bindungspräferenzen des Enzyms. Die Nomenklatur der Bindungstaschen, die das aktive Zentrum umgeben, wird nach *Berger* und *Schechter*⁴¹ vorgenommen. Die Positionen am Enzym, in denen das Substrat (oder der Inhibitor) in einer Tasche liegt, werden mit S bezeichnet. Dabei wird ausgehend von der Spaltstelle in Richtung N-Terminus mit S1, S2, S3, ..., Sn („non-primed site“) und in Richtung C-Terminus mit S1', S2', S3', ..., Sn' („primed site“) fortlaufend nummeriert. Die Positionen des Substrats, die in den jeweiligen S-Taschen liegen, werden dementsprechend mit P1–Pn und P1'–Pn' bezeichnet (*Abbildung 8*).

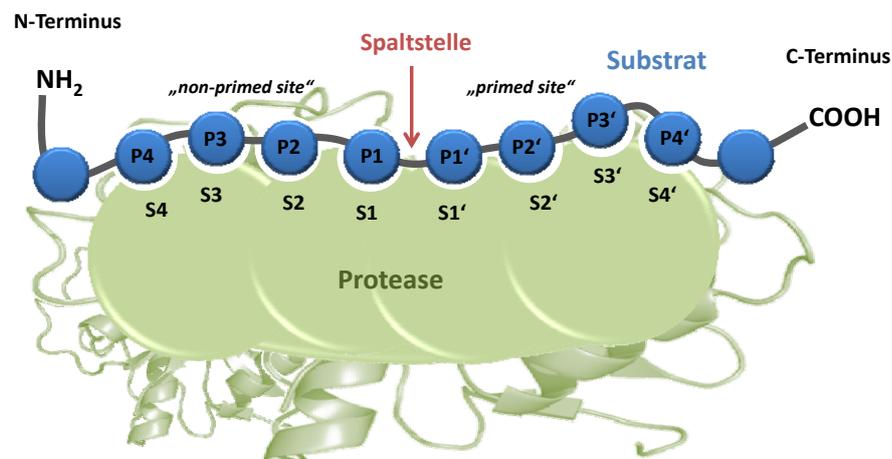


Abbildung 8: Schematische Darstellung der Nomenklatur der Substratbindung nach *Schechter* und *Berger*.⁴¹ Das Substrat (blau) wird von der Protease (grün) an der Spaltstelle (rot) getrennt.

Um den Katalysemechanismus einer Protease zu untersuchen, ist es notwendig die Kinetik von enzymatischen Reaktionen zu kennen. Im folgenden Kapitel werden die wichtigsten Grundprinzipien enzymkatalysierter Reaktionen sowie deren mathematische Grundlagen vorgestellt.

2.2 ENZYMKINETIK, IC_{50} - UND K_i -WERT-BESTIMMUNG

Das einfachste Modell, welches die Abläufe bei enzymkatalysierten Reaktionen sehr gut wiedergibt, wurde von *Michaelis* und *Menten* beschrieben. Aus Enzym und Substrat bildet sich ein Enzym-Substrat-Komplex (Michaelis-Komplex). In einem zweiten irreversiblen Schritt wird das Produkt gebildet und das Enzym liegt, wie bei Katalysatoren üblich, wieder in seiner ursprünglichen Form vor.



Aus den Geschwindigkeitskonstanten k_1 , k_{-1} und k_2 ergibt sich die Dissoziationskonstante (Michaelis-Menten-Konstante) K_m , welche nach Gleichung (2) beschrieben werden kann, wobei k_2 , also die Dissoziationsgeschwindigkeit des ES-Komplexes, als die Reaktionsgeschwindigkeit angesehen wird. Die Konstante K_m gibt die Affinität des Substrats zum Enzym an und ist bei definierten Bedingungen für jede Enzym-Substrat-Kombination charakteristisch und unabhängig von der Substratkonzentration.

$$K_m = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1} \quad (2)$$

Mit der Annahme einer sofortigen Gleichgewichtseinstellung zwischen $E + S$ und ES kann die Michaelis-Menten-Gleichung formuliert werden:

$$v_0 = \frac{V_{max} [S]}{K_m + [S]} \quad (3)$$

Durch diese Gleichung kann mit Kenntnis von K_m die Anfangsgeschwindigkeit v_0 in Abhängigkeit von der maximalen Reaktionsgeschwindigkeit V_{max} und der Substratkonzentration $[S]$ bestimmt werden. Dies kann beispielsweise über eine graphische Darstellung geschehen.

Die Auftragung von Reaktionsgeschwindigkeit und Substratkonzentration bei einer enzymkatalysierten Reaktion ergibt eine hyperbolische Kurve. Durch Linearisierung der Gleichung nach Lineweaver-Burk, mittels reziproker Darstellung beider Komponenten, erhält man eine Gerade. Aus dieser Darstellung können K_m und V_{max} direkt bestimmt werden (*Abbildung 9*).

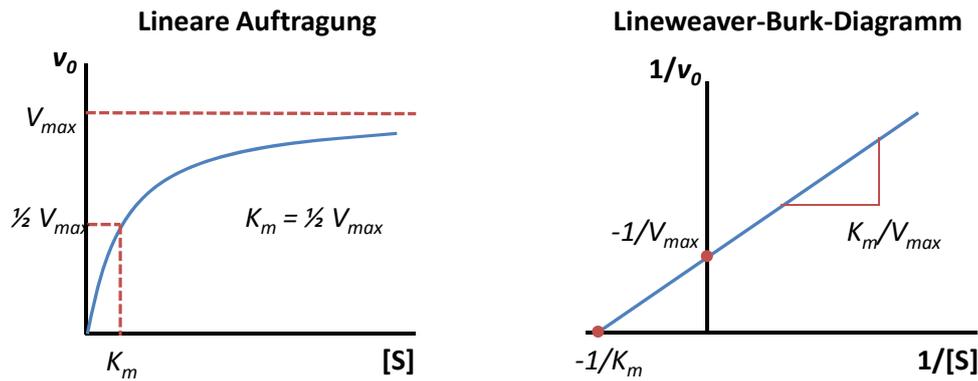


Abbildung 9: Links: Graphische Auftragung von v_0 gegen $[S]$. K_m entspricht $\frac{1}{2} V_{max}$. Rechts: Linearisierte Form der Michaelis-Menten-Gleichung nach Lineweaver-Burk. Durch Auftragung von $1/v_0$ gegen $1/[S]$ können K_m und V_{max} direkt durch die Achsenschnittpunkte bestimmt werden.

Durch Inhibitoren kann die Geschwindigkeit der Reaktion herabgesetzt werden. Wobei hier generell zwischen zwei möglichen Inhibitortypen unterschieden werden muss. Zum einen kann die Inhibierung des Enzyms nach einem **kompetitiven** Mechanismus ablaufen (Abbildung 10, links). Hier konkurrieren Substrat und Inhibitor um dieselbe Bindungsstelle am Enzym, d.h. es entsteht entweder ein Enzym-Substrat-Komplex oder ein Enzym-Inhibitor-Komplex. Für die Auftragung nach Lineweaver-Burk bedeutet das bei Anwesenheit eines Inhibitors einen Anstieg der Steigung der Geraden, aber einen gleichbleibenden Schnittpunkt mit der y-Achse. Die Geschwindigkeit der Reaktion steigt also langsamer bei Anwesenheit eines Inhibitors an, erreicht aber letztendlich denselben Maximalwert der Substrat-Kurve. Im zweiten Fall, dem **unkompetitiven** Mechanismus, konkurrieren Substrat und Inhibitor nicht um dieselbe Bindungsstelle, sondern der Inhibitor verändert durch sein Binden an den Enzym-Substrat-Komplex die katalytischen Eigenschaften so, dass kein Produktumsatz mehr stattfinden kann. Eine Bindung des Substrats an das Enzym ist aber weiterhin möglich. Die Steigung der Lineweaver-Burk-Geraden bleibt dadurch gleich, jedoch ändert sich der Schnittpunkt mit der y-Achse (Abbildung 10, Mitte). Die Inhibitor-Kurve steigt anfänglich mit gleicher Geschwindigkeit wie die Substratkurve an, erreicht aber ein niedrigeres Maximum.

Bei einem kompetitiven Mechanismus kann durch Erhöhung der Substratkonzentration $[S]$ die ursprüngliche Geschwindigkeit der Reaktion wieder hergestellt werden. Bei einem unkompetitiven Mechanismus gelingt dies nicht.

Treten beide dieser Inhibierungseffekte zusammen auf, spricht man von **nichtkompetitiver** Hemmung (Abbildung 10, rechts). Der Inhibitor kann sowohl an das Enzym als auch an den Enzym-Substrat-Komplex binden, da er nicht mit dem Substrat in Konkurrenz um das aktive Zentrum steht. Ein Produktumsatz ist aber in beiden Fällen nicht mehr möglich, da durch die Bindung des Inhibitors die katalytische Aktivität des Enzyms beispielsweise durch eine Konformationsänderung des aktiven Zentrums

2. Grundlagen und Methoden

verloren geht. Hierbei sind bei der reziproken Auftragung ein Anstieg der Geraden und ein gleichbleibender Schnittpunkt mit der x-Achse zu beobachten.

Die Auftragung nach Lineweaver-Burk bietet eine anschauliche Möglichkeit enzymkinetische Sachverhalte zu visualisieren. Allerdings führen kleine Abweichungen bei der Reaktionsgeschwindigkeit v_0 bei kleinen Substratkonzentrationen $[S]$ zu großen Ungenauigkeiten in der Auftragung. Auch bei anderen Linearisierungsverfahren wie z.B. der Methode nach Hanes-Woolf (Auftragung $v/[S]$ gegen $[S]$) oder mit einem Eadie-Hofstee-Diagramm (Auftragung v gegen $v/[S]$) können durch kleine Abweichungen große Fehler entstehen. Aus diesem Grund werden heutzutage hauptsächlich nichtlineare Kurvenregressions-Verfahren angewendet, um möglichst genaue Ergebnisse zu erhalten.⁴²

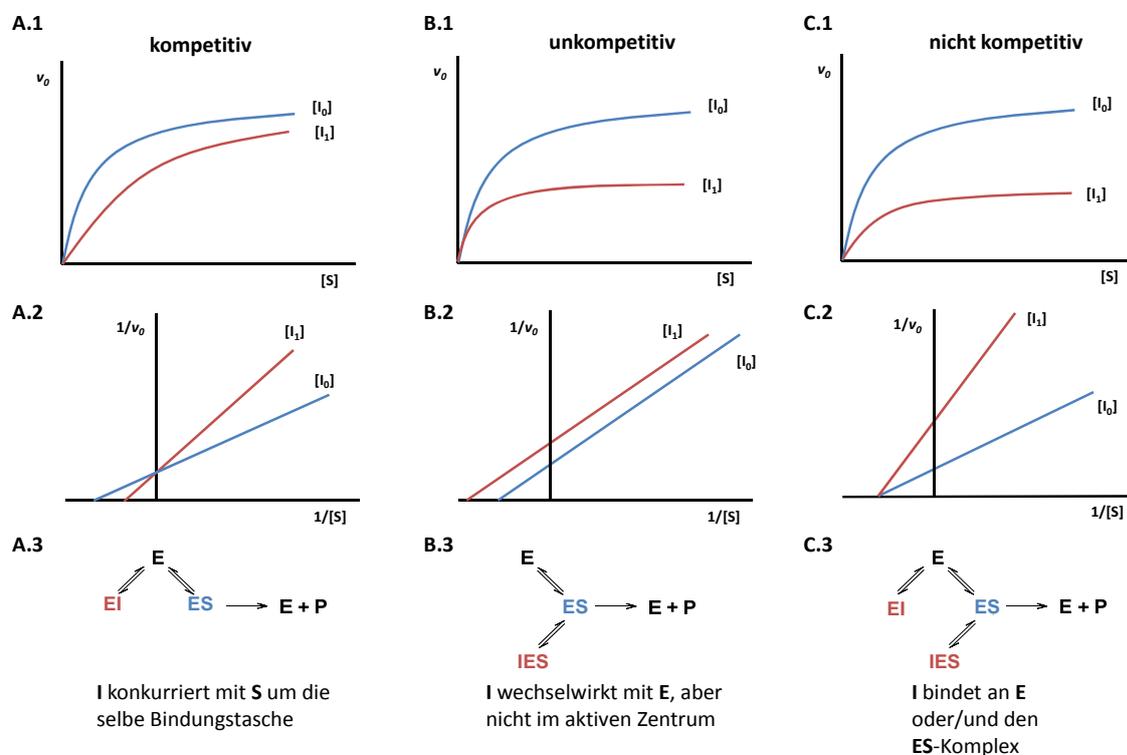


Abbildung 10: Arten der Enzymhemmung.⁴³ blau: Abwesenheit eines Inhibitors, rot: Enzymhemmung durch einen Inhibitor bestimmter Konzentration. Der kompetitive Mechanismus (A.1–A.3) wird mit dem unkompetitiven (B.1–B.3) und dem nicht kompetitiven Mechanismus (C.1–C.3) durch graphische Darstellung verglichen. A.1–C.1: Auftragung der Reaktionsgeschwindigkeit v_0 gegen die Substratkonzentration $[S]$. A.2–C.2: Doppelt reziproke Auftragung nach Lineweaver-Burk ($1/v_0$ gegen $1/[S]$). A.3–C.3: Schematische Darstellung der Wechselwirkungen zwischen Substrat (S), Inhibitor (I), Enzym (E) und Produkt (P).

Unabhängig von der eben beschriebenen Art der Enzymhemmung (kompetitiv, unkompetitiv, nicht kompetitiv) können beim Bindungsmodus des Inhibitors an das Enzym zwei Typen von Enzymhemmungen unterschieden werden: die reversible und die irreversible Hemmung. Wird ein Inhibitor kovalent an das Enzym gebunden und lässt

sich diese Bindung daraufhin nicht mehr lösen, wird dies als irreversible Hemmung bezeichnet. Bei einer Bindung durch schwächere Wechselwirkungen wie Wasserstoffbrücken, ionische, polare oder elektrostatische Wechselwirkungen bezeichnet man die Hemmung als reversibel, da der Enzym-Inhibitor-Komplex wieder aufgebrochen werden kann. Im Experiment erfolgt das meist durch Dialyse, Verdünnung, Zentrifugieren oder Gel- bzw. Ultrafiltration.

Die eben beschriebenen Inhibierungsarten können mit unterschiedlichen Messmethoden untersucht werden, durch die weitere Aussagen über den genauen Mechanismus getroffen werden können. Prinzipiell wird im Experiment der Produktumsatz und damit die Reaktionsgeschwindigkeit gemessen. Dies kann durch verschiedene Assays erreicht werden, z. B. durch einen Verdünnungsassay nach *Kitz* und *Wilson*⁴⁴ oder auch durch einen kontinuierlichen Assay nach *Tian* und *Tsou*.⁴⁵ In beiden Fällen wird bei steady-state-Bedingungen gearbeitet, was bedeutet, dass die Konzentration von Substrat und Inhibitor viel größer ist als die Enzymkonzentration ($[S] \gg [E]$ und $[I] \gg [E]$) und dadurch die steady-state-Geschwindigkeit nicht beeinflusst wird. Beim Verdünnungsassay wird ein Enzym mit einem Inhibitor inkubiert und in definierten Zeitintervallen eine Probe entnommen. Zu dieser Probe wird dann das Substrat gegeben und die Restaktivität des Enzyms zeitabhängig durch spektroskopische Methoden bestimmt. Beim kontinuierlichen Assay hingegen wird die Produktzunahme einer Mischung aus Enzym, Inhibitor und Substrat über eine bestimmte Zeit hinweg detektiert. Bei Anwesenheit eines Inhibitors sollte sich in letzterem Fall der Produktumsatz (P) asymptotisch einem Wert nähern (*Abbildung 11*). Während der Verdünnungsassay nur für irreversible Inhibitoren geeignet ist, können mit dem kontinuierlichen Assay auch reversible Inhibitoren untersucht werden. Aus diesem Grund wurde in der vorliegenden Arbeit nur der kontinuierliche Assay verwendet. Für die Reaktionsgeschwindigkeit einer Enzymreaktion kann wie in *Abbildung 11* zu erkennen eine Geschwindigkeitskonstante pseudo-erster Ordnung bestimmt werden, da die Konzentrationsänderung durch den großen Substrat- bzw. Inhibitorüberschuss vernachlässigt werden kann.

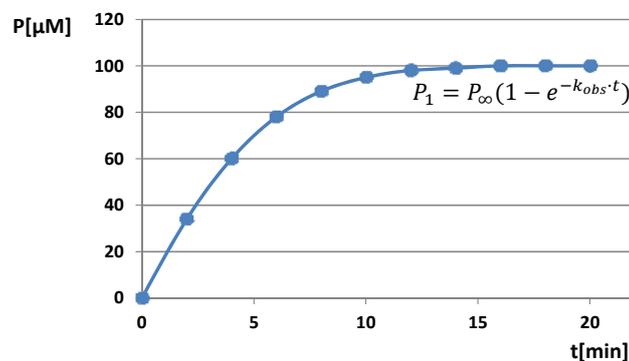


Abbildung 11: Bestimmung von k_{obs} (Geschwindigkeitskonstante). Umsatz-Zeit-Diagramm eines kontinuierlichen Assays nach *Tian* und *Tsou*⁴⁵ für eine bestimmte Inhibitorkonzentration. Der Produktumsatz (P) ist gegen die Zeit aufgetragen. Durch den großen Überschuss an Inhibitor bzw. Substrat kann eine Reaktion pseudo-erster Ordnung formuliert werden.

Ist es bei irreversiblen Inhibitoren der Fall, dass die Enzymhemmung sehr langsam von statten geht und sich die Umsatz-Zeit-Kurve nahezu als Gerade darstellt, kann keine Geschwindigkeitskonstante pseudo-erster Ordnung wie eben beschrieben bestimmt werden. In diesem Fall greift man auf die *Dixon-Gleichung*⁴⁶ zurück, die auch im Fall von reversiblen Inhibitoren verwendet wird (*Abbildung 12*).

$$\text{Dixon-Gleichung} \quad v_i = \frac{v_0}{1 + \frac{[I]}{K_i}} \quad (4)$$

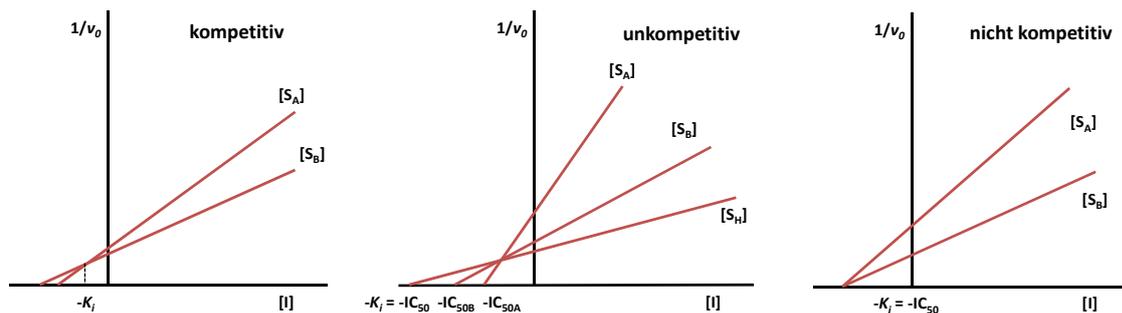


Abbildung 12: Auftragung des Dixon-Plots zur Bestimmung der IC_{50} und K_i -Werte. Kompetitiv: K_i ergibt sich aus dem Schnittpunkt der Geraden für zwei unterschiedliche Substratkonzentrationen (S_A und S_B). Unkompetitiv: für jede Substratkonzentration gibt es einen eigenen IC_{50} -Wert. Erst bei hohen Substratkonzentrationen (S_H) erreicht der IC_{50} den K_i -Wert. Nicht kompetitiv: sowohl für hohe als auch für geringe Substratkonzentrationen ist der IC_{50} -Wert gleich dem K_i -Wert.

Als Maß für die Güte eines Inhibitors wird der IC_{50} -Wert bestimmt. Dieser Wert gibt an, bei welcher Inhibitorkonzentration die Aktivität des Enzyms um die Hälfte abgenommen hat. Zusätzlich zum IC_{50} -Wert wird der K_i -Wert bestimmt. Dieser Wert gibt die Bindungsaffinität des Inhibitors zum Enzym an (je kleiner der Wert, umso stärker die Bindung). Trägt man den Produktumsatz gegen die Zeit wie in *Abbildung 11* auf, wird eine Umsatz-Zeit-Kurve erhalten. Durch die Auftragung dieser Kurve bei verschiedenen Inhibitorkonzentrationen kann man v_0 (Enzymaktivität ohne Inhibitor) und v_i (Enzymaktivität mit Inhibitor definierter Konzentration) berechnen. Durch die Auftragung von v_0/v_i gegen die Inhibitorkonzentration ergibt sich der *Dixon-Plot* in linearisierter Form, aus dessen Steigung sich der K_i -Wert bestimmen lässt. Mit Programmen wie GraFit[®] kann durch nichtlineare Regression der K_i und IC_{50} -Wert direkt aus den Rohdaten berechnet werden.

Liegt eine kompetitive Hemmung vor, sind der K_i - und der IC_{50} -Wert von der Substratkonzentration abhängig, da Substrat und Inhibitor um dieselbe Bindungsstelle konkurrieren. Um K_i unabhängig von der Substratkonzentration zu erhalten und so besser mit in der Literatur aufgeführten Werten vergleichen zu können, wird durch den Term (5) dividiert.

$$\left(1 + \frac{[S]}{K_m}\right) \quad (5)$$

So erhält man aus dem „scheinbaren“ (apparenten) K_i -Wert (K_i^{app}) die konzentrationsunabhängige Dissoziationskonstante, den „wahren“ K_i -Wert.*

$$K_i = \frac{K_i^{app}}{\left(1 + \frac{[S]}{K_m}\right)} \quad (6)$$

Um den Produktumsatz von Enzymen zu messen, sind geeignete Messmethoden notwendig. Im folgenden Kapitel werden gängige Arbeitsweisen und Enzymassays vorgestellt, welche es möglich machen, den Produktumsatz zu detektieren und so das Potenzial von natürlichen und künstlichen Substraten sowie Inhibitoren zu testen.

* Bei der Bestimmung der Dissoziationskonstanten wird nicht der wahre K_i -Wert bestimmt, sondern nur die apparente Dissoziationskonstante K_i^{app} . Grund hierfür ist die Konkurrenz von Inhibitor und Substrat um die Bindung im aktiven Zentrum des Enzyms. Um den K_i -Wert zu berechnen muss der Wert von K_i^{app} durch den Term $(1 + [S]/K_m)$ dividiert und so um die Substratkonzentration $[S]$ und die Affinität des Enzyms zum Substrat korrigiert werden. Die Michaelis-Menten-Konstante K_m wird dazu in einem gesondertem Experiment bestimmt und ist für das jeweilige Substrat-Enzym-Paar spezifisch.

2.3 ENZYMASSAYS – MESSUNG DER UMSATZ-ZEIT-KURVE BEI ENZYMKATALYSIERTEN REAKTIONEN

2.3.1 SUBSTRATASSAYS IN LÖSUNG

Enzymassays sind Analysemethoden, um die Aktivität von Enzymen sichtbar zu machen und zu messen. Vor allem im Bereich der industriellen Nutzung von Enzymen werden in High Throughput Screenings (Hochdurchsatz Screening, HTS) hunderttausend und mehr Proben am Tag mit Hilfe von Enzymassays getestet. Aber auch im Bereich der Wirkstoffforschung, der medizinischen Diagnostik, der Molekularbiologie, der Humangenetik und in Bereichen der Visualisierung von Zell- und Gewebestrukturen spielen sie eine tragende Rolle.⁴⁷ Hauptaufgabe eines solchen Assays ist es, isolierte Enzyme oder Enzymmischungen zu untersuchen. In den letzten Jahren hat sich eine Vielzahl von unterschiedlichen Arbeitsweisen entwickelt. Durch die Nutzung verschiedener analytischer Methoden, wie z.B. HPLC, GC, MS, NMR, UV/Vis oder IR haben sich eine Reihe unterschiedliche Arten von Assays etabliert. Anhand von ausgewählten Beispielen werden im Folgenden verschiedene Assaystrategien vorgestellt.

Werden Verbindungen untersucht, die Enzyme hemmen sollen, bestimmt man durch einen Assay die (Rest-)Aktivität der Proteasen, um eine Aussage über den Inhibitor und dessen Hemmstärke machen zu können. Der einfachste und praktikabelste Weg, Enzyme auf ihre Aktivität zu überprüfen, basiert auf synthetischen Substraten, die während der Reaktion mit dem Enzym einen farbigen oder fluoreszierenden Stoff freisetzen und so eine direkt messbare Veränderung hervorrufen. Das Substrat, das durch ein Enzym gespalten wird, ändert seine fluorimetrischen Eigenschaften. Auf diese Weise kann der Produktumsatz mittels eines Fluoreszenzspektrometers detektiert werden. Da die Enzyme unterschiedliche Substrate spalten, muss für jede Protease der Assay entsprechend angepasst werden, indem die jeweiligen enzymspezifischen Substrate gewählt werden.

Das Enzym setzt das Substrat zu einem Produkt um, welches durch spektroskopische Methoden untersucht werden kann. Ist das generierte Produkt im Assaypuffer löslich, so ist das Substrat für Assays geeignet, die auf der Verwendung von Mikrotiterplatten basieren. Löst sich das Spaltprodukt nicht im Reaktionsmedium, können damit Bakterienkulturen auf Agar-Platten untersucht werden. Die große Bandbreite dieser Substrate konzentriert sich dennoch auf eine relativ kleine Gruppe von Chromophoren und Fluorophoren, mit denen die künstlich hergestellten Substrate versehen (gelabelt) sind. Insbesondere Umbelliferone, Nitrophenole, Fluoresceine, Rhodamine und sogenannte BODIPY-Farbstoffe haben sich hier etabliert. Alle diese Vertreter besitzen größere aromatische Gruppen, welche das Bindungsverhalten am Enzym, die Reaktionsgeschwindigkeit gegenüber nicht-gelabelten Substraten oder die Löslichkeit der Substrate beeinflussen können. Sie müssen folglich mit Sorgfalt ausgewählt werden, um die

Reaktion nicht zu beeinflussen. Aus diesem Grund wird nach weiteren Substraten geforscht, die ohne diese großen aromatischen Reste auskommen.⁴⁸

Ein Vorbild aus der Natur für ein chromogenes Substrat ist das Glycosidase-Substrat Indican. Es kommt in Pflanzen wie dem Färberknöterich (*Polygonum tinctorum*) und dem Färberwaid (*Isatis tinctoria*) vor, welche zur Indigoherstellung verwendet werden. Bei der Fermentation wird die glycosidische Bindung im Indican durch die Glycosidase gespalten. Dadurch entsteht ein instabiles Hydroxyindolintermediat, welches dann zum Farbstoff Indigo dimerisiert (Abbildung 13).⁴⁹

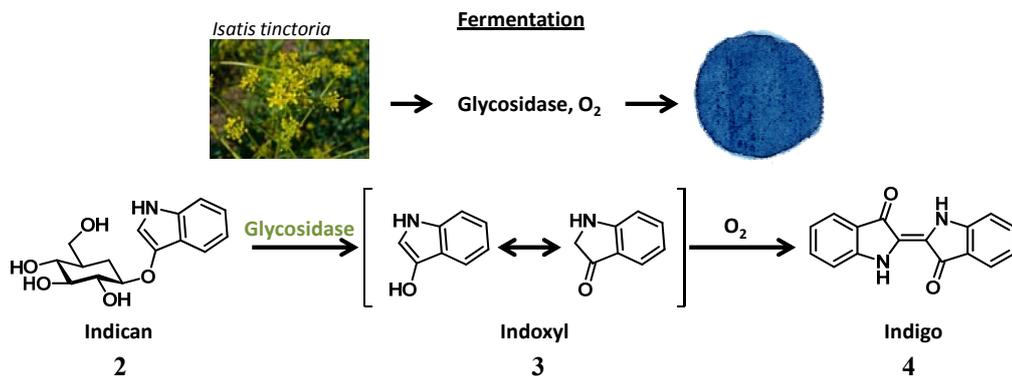


Abbildung 13: Fermentation von Färberwaid⁵⁰ (oben) als Beispiel für eine Reaktion mit einem chromogenen Substrat zur Identifizierung einer Enzymreaktion (unten). Indican (2) dimerisiert während der Fermentation katalysiert durch Glycosidase und Sauerstoff zum blauen Farbstoff Indigo (4).

Dieses Beispiel diente einer Reihe von Substraten als Modell. So wurden Glycoside von fluoreszierenden oder chromogenen Nitrophenolen als Substrate für diverse Glycosidasen verwendet (Abbildung 14, links). Nitrophenyl- β -galactosid **5** kann zur Aktivitätsmessung von β -Galactosidase verwendet werden, aber auch Lipase und Cytochrom P450⁵¹ werden mit dieser Art von Substraten untersucht.

Die Bandbreite der Substrate kann zusätzlich noch erhöht werden, in dem man einen indirekten Freisetzungsmechanismus nutzt. Ein Beispiel hierfür ist das Substrat **9** für die Alkoholdehydrogenase (Abbildung 14, rechts). Der chirale sekundäre Alkohol **9** wird durch das Enzym zum entsprechenden instabilen Keton oxidiert, welches in einer durch Serumalbumin (BSA) katalysierten β -Eliminierung in das blau fluoreszierende und detektierbare Umbelliferonanion **11** zerfällt.^{52,53} Diese Reaktion findet bei neutralem pH statt, da das Produkt dann als Anion vorliegt und nur in diesem Zustand Fluoreszenz zeigt. Mit dem gleichen Prinzip sind auch Substrate für aldolasekatalysierende Antikörper,^{54,55,56} prolinbasierte künstliche Aldolasen,⁵⁷ Transaldolasen,⁵⁸ Transketolasen^{58,59} und Lipasen⁶⁰ entwickelt worden.

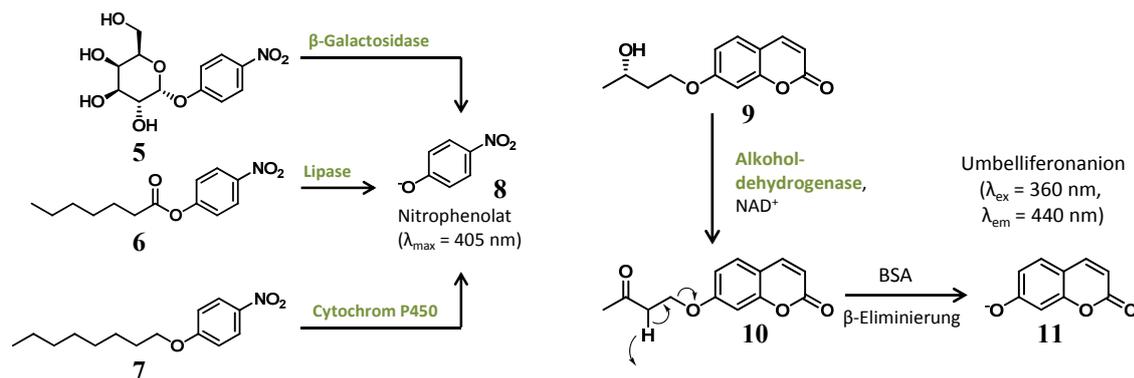


Abbildung 14: Links: Verwendung von Nitrophenolderivaten als chromogene Substrate. Die Spaltung der glycosidischen Bindung durch β -Galactosidase, Lipase oder Cytochrom P450 setzt das fluorogene Nitrophenolat (**8**) frei. Rechts: Reaktion eines chiralen Alkohols (**9**) mit Alkoholdehydrogenase zum fluorogenen Umbelliferon **11**. Erst nach einer durch BSA katalysierten Eliminierung entsteht die fluorogene Spezies.

Auch für diese Arbeit wurden synthetische, fluorogene Substrate gewählt, die als detektierbare Spezies ein Cumarinderivat tragen. Eines der Substrate, welches mit solch einem Chromophor versehen ist, ist beispielsweise Cbz-Phe-Arg-AMC (*N*-Benzoyloxy-carbonyl-(L)-Phenylalanin-(L)-arginyl-7-amino-4-methylcumarin) **12** (Abbildung 15). In ungespaltenem Zustand besitzt es nur sehr schwache Fluoreszenzeigenschaften; wird das Aminomethylcumarin (AMC) durch ein Enzym abgespalten, fluoresziert es bei einer Anregungswellenlänge von 380 nm und einem Maximum von 460 nm. Über die Intensität der Fluoreszenz kann der Produktumsatz mit Hilfe eines Fluorimeters direkt gemessen werden.

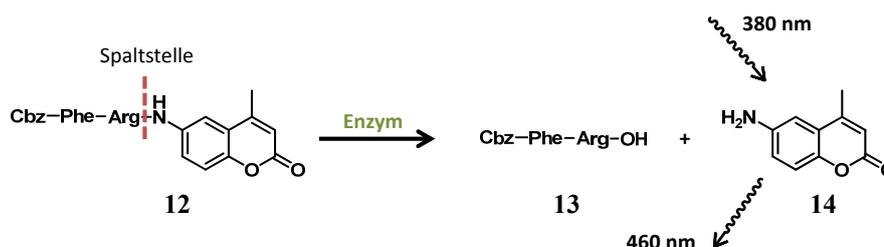


Abbildung 15: Spaltung eines fluorogenen Substrats. An der Spaltstelle wird das Substrat durch das Enzym getrennt. Nur das entstandene Cumarinderivat (**14**) emittiert Licht der Wellenlänge 460 nm und kann dadurch gezielt detektiert werden.

Ein weiteres Prinzip zur Detektion der Enzymaktivität für eine Reihe von Enzymassays basiert auf dem FRET-Mechanismus (**F**luoreszenz-**R**esonanz-**E**nergie-**T**ransfer). Die Funktionsweise eines FRET-Substrats beruht auf einem strahlungslosen Prozess, bei dem von einer Donorgruppe Energie zu einer Akzeptorgruppe übertragen wird. Donor und Akzeptor befinden sich jeweils an den Enden eines Moleküls oder einer Peptidsequenz. Durch die räumliche Nähe des Donor-Akzeptor-Paares wird die Fluoreszenz

intramolekular gequencht. Das FRET-Substrat wird durch ein Enzym chemisch verändert oder gespalten, so dass beispielsweise bei einem Bruch der Verbindung und der damit verbundenen größeren Entfernung zwischen Donor und Akzeptor die Auslöschung der Fluoreszenz nicht mehr möglich ist. Das Substrat emittiert nun Licht einer bestimmten Wellenlänge. Substrate dieser Art werden vor allem für Proteasen,^{61,62} Cellulasen⁶³ und Lipasen^{64,65,66} verwendet.

Ein Beispiel für ein solches FRET-Substrat, das nach der Spaltung durch eine Protease fluoresziert, ist in *Abbildung 16* gezeigt. Es wurde im Rahmen dieser Arbeit für die Aktivitätsbestimmung der Hauptprotease des humanen Coronavirus 229E verwendet.

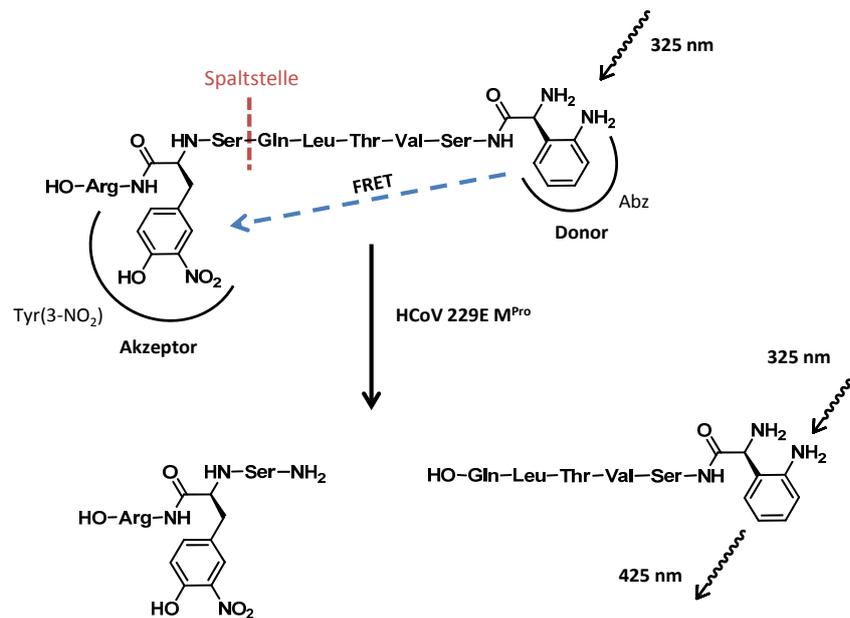


Abbildung 16: Spaltung eines FRET-Substrats durch die M^{Pro} des HCoV 229E. Die Trennung von Donor (Abz) und Akzeptor (Tyr(3-NO₂)) verhindert die Auslöschung der Fluoreszenz durch FRET. Eine Detektion des Substrats bei 425 nm wird so möglich.

Durch die Peptidsequenz zwischen Donor (2-Aminobenzoesäure, Abz) und Akzeptor (3-Nitro-L-tyrosin, Tyr(3-NO₂)) wird der Protease eine für sie spezifische Aminosäuresequenz geboten, die von ihr an der charakteristischen Stelle zwischen Serin und Glutamin gespalten wird. Dadurch wird die Verbindung zwischen Donor und Akzeptor getrennt und sie entfernen sich voneinander. Die Fluoreszenz wird nicht mehr gequencht und es wird Licht einer Wellenlänge von 425 nm emittiert. Auf diese Weise kann der Produktumsatz wie auch im vorangegangenen Beispiel über die Fluoreszenzintensität bestimmt werden.

Ein weiteres Beispiel für ein auf FRET basierendes Substrat ist in *Abbildung 17* dargestellt. In diesem Fall wird das Substrat nicht gespalten sondern durch die Enzymreaktion chemisch verändert. Es findet eine antikörperkatalysierte Aldoladdition durch eine Anlagerung eines Nukleophils an den Aldehyd statt. Durch diese Modifikation des Moleküls verringert sich die Größe des π -Systems und der intramolekulare

Quenchingeffekt geht verloren. Auf diese Weise kann beispielsweise die Bildung von Kohlenstoff-Kohlenstoff Bindungen in HTSs verfolgt werden.⁶⁷



Abbildung 17: Chemische Veränderung eines FRET-Substrates (15) durch einen Aldolase-Antikörper. Durch Addition eines Nukleophils an das Aldehyd geht das Fluoreszenzquenching verloren. Das Produkt (16) kann durch die intensive Fluoreszenz detektiert werden.

Die Methode der fluorogenen Substrate findet in ganz unterschiedlichen Bereichen Anwendung, ein Beispiel dafür ist das FACS (Fluorescence activated cell sorting, Fluoreszenz-Durchflusszytometrie). Bei diesem Verfahren werden Zellen (meist *E. coli*), welche Proteasen exprimieren, mit Fluoreszenzfarbstoffe angefärbt und mit Hilfe eines Mikroskops sortiert. Durch diesen Vorgang können z.B. Zellen, die aktive Proteasen exprimieren, von inaktiven unterschieden werden.

Die Grundprinzipien der chromogenen und fluorogenen Substrate wurden stetig weiterentwickelt und lassen sich in Methoden wie dem sogenannten Fingerprinting wiederfinden. Durch diesen Fortschritt konnten nun mehrere Substrate parallel analysiert und damit mehr Information in kürzerer Zeit gewonnen werden. Schon 1967 wurde ein System beschrieben (API ZYM), mit dem 19 bzw. 32 verschiedene Substrate für Lipasen und Esterasen, Aminopeptidasen, Chymotrypsin, Trypsin Phosphatasen, Sulfatasen und β -Galactasen in einem Multi-Titerplatten-Format zur Untersuchung von mikrobiellen Kulturen dienen.^{68,69} Die Analysemethoden lieferten Informationen über die verschiedenen Enzyme, die von Mikroorganismen in den Proben produziert wurden. Das half dabei, die Mikroorganismen zu identifizieren und bildet seither die Basis der mikrobiellen Stammidentifizierung beispielsweise in Krankenhäusern.

Enzymassays in Lösung bieten somit eine optimale Arbeitsmethode um die Aktivität von Enzymen zu testen. Desweiteren können durch die Assays Substrate gefunden werden, die von den untersuchten Proteasen gespalten werden. Dies ist vor allem für das Verständnis von Funktion und Wirkung der Enzyme in ihren biologischen Systemen von Bedeutung. Für die Vereinfachung der Screenings, insbesondere bei sehr großen Substratbibliotheken, wurden Methoden entwickelt, um Enzyme mit an polymere Träger gebundenen Substraten zu untersuchen. Auf diese Weise sollten sich Vorteile in der Substratsynthese durch Anwendung von kombinatorischer Chemie geschaffen werden. Eine Auswahl dieser Methoden wird im Folgenden vorgestellt werden.

2.3.2 ASSAYS FÜR SUBSTRATE AM POLYMEREN TRÄGER

Die kombinatorische Chemie hat in den letzten Jahren vor allem die medizinische Chemie und die Wirkstoffforschung revolutioniert.^{70,71} Durch immer sensiblere Messmethoden, ausgefeiltere und schnellere Techniken (split and mix)^{72,73} und die Weiterentwicklung der polymeren Träger können große Substanzbibliotheken in sehr kurzer Zeit hergestellt und gescreent werden. Das Prinzip macht man sich auch bei der Untersuchung von Substraten und Inhibitoren zu Nutze. Es wurden Methoden entwickelt, die synthetisierten Substanzen direkt am Harz („on bead“) zu vermessen.⁷⁴ Dieser Fortschritt spart vor allem Zeit, da aufwendige Reinigungsschritte nach dem Abspalten des Harzes ausbleiben. Mit dieser Methode ist sowohl die Identifizierung von neuen Substraten wie auch von neuen Inhibitoren möglich.

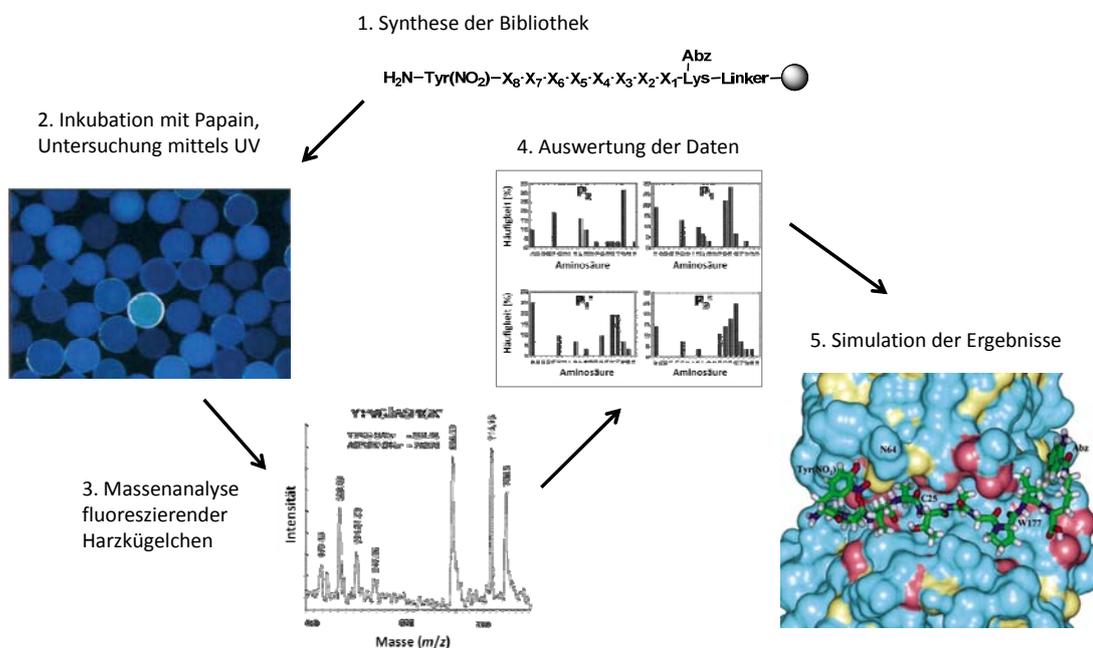


Abbildung 18: Durch den Einbau eines FRET-Paares (Tyr(3-NO₂)/Abz) in eine Peptidsequenz am Harz mittels kombinatorischer Chemie (1.) konnte durch Analyse der Fluoreszenzeigenschaften der Harzkügelchen unter dem Mikroskop (2.) und anschließender MS-Analyse (3.) unterschiedliche Substratsequenzen für Papain gefunden werden. Die Affinität jeder Bindungstasche konnte gesondert bestimmt (4.) und die Ergebnisse anschließend am Computer simuliert (5.) werden (reprinted with permission).⁷⁰

Bei der Suche nach neuen Substraten für Proteasen macht man sich auch das FRET-Prinzip zu Nutze. Es wurden Polypeptide mit Hilfe der Festphasensynthese synthetisiert, die am Anfang und Ende der Kette einen Donor oder Akzeptor trugen. Auf diese Weise konnte z.B. bei der Cysteinprotease Papain die Substratspezifität näher untersucht werden (Abbildung 18).⁷⁰ Dazu wurde eine Bibliothek konstruiert, die aus einer Sequenz von zehn Aminosäuren bestand, wobei N-terminal Tyr(3-NO₂) als Fluoreszenz-Akzeptor und

C-terminal Lys(Abz) als Donor, ähnlich wie bei oben erwähntem Substrat, eingebaut wurde. Das komplette Peptid wurde an PEGA-Harz synthetisiert, welches für diese Art von Enzymassays die günstigsten chemischen und physikalischen Eigenschaften besaß, da es sowohl in organischen als auch wässrigen Lösungsmitteln gute Quelleigenschaften aufweist und gegenüber den meisten Enzymen inert ist.⁷⁵ Durch den kombinatorischen Ansatz wurden acht Positionen mit einer Auswahl von natürlichen Aminosäuren willkürlich besetzt. So konnte eine Bibliothek mit insgesamt 270 000 Mitgliedern erhalten werden. Daraufhin wurde diese Bibliothek mit Papain inkubiert und anschließend unter einem UV-Mikroskop untersucht. Die Harzkügelchen, deren Peptid vom Enzym gespalten wurde, zeigten Fluoreszenz und konnten mit einer Pinzette aussortiert und separat untersucht werden. So gelangte man systematisch zu einem Bild, das die Substrateigenschaften von Papain widerspiegelt.

Dieses Beispiel zeigt sehr gut, wie die fluoreszierenden Eigenschaften der Substanzen gebunden an einen polymeren Träger die Suche nach spezifischen Substraten vereinfacht. Das Prinzip wurde auch schon bei einer Vielzahl von Cysteinproteasen, wie z.B. Cruzipain,⁷⁶ Cathepsine B und L⁷⁷ und Vertretern anderer Enzymklassen angewandt.

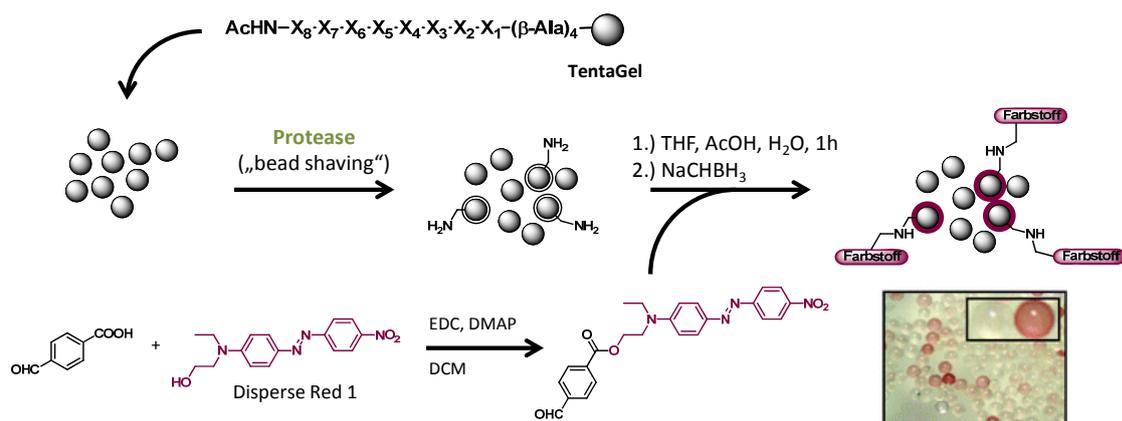


Abbildung 19: Identifizierung von harzgebundenen Substraten über einen Farbstoff. Die an Tenta Gel synthetisierte Bibliothek wurde mit verschiedenen Enzymen inkubiert. Dabei wurden selektiv bestimmte Peptidsequenzen gespalten und es entstand eine freie Aminofunktion am Harz („bead shaving“). Durch die Reaktion mit Disperse Red 1 über eine reductive Aminierung konnten die gespaltenen Substrate sichtbar gemacht, aussortiert und anschließender analysiert werden (in Anlehnung an Lit. 78).⁷⁸

Einen negativen Einfluss kann allerdings das integrierte Fluorophor haben, da es die Struktur des Substrates verändert und so Bindungsaffinitäten herabsetzt oder die Hydrolyse des Substrats sogar verhindert. Eine interessante Möglichkeit, wie man die Schwierigkeiten umgehen und gleichzeitig eine Bibliothek an verschiedenen Proteasen screenen kann, haben Kofoed *et al.* demonstriert (Abbildung 19). Dabei wurde zunächst eine peptidische Substratbibliothek an TentaGel synthetisiert (>65000 Mitglieder), wobei die N-terminalen freien Amine acetyliert wurden. Die mit dem Substrat beladenen

Harzkügelchen wurden nun mit dem Enzym inkubiert. Dabei fand eine Spaltung der enzymaffinen Substrate statt. Durch diese sogenannte Proteolyse des Enzyms an der Oberfläche des Harzes („bead shaving“) wurden wieder Aminofunktionen frei und es konnte über eine Reaktion mit dem Azofarbstoff Disperse Red 1 (*N*-Ethyl-*N*-(2-hydroxyethyl)-4-(4-nitrophenylazo)-anilin) gespaltene Substrate sichtbar gemacht werden. Dazu geht der mit einem Aldehyd modifizierte Farbstoff über eine reduktive Aminierung eine Bindung mit den freien Aminen der Substratfragmente ein und bindet sich so an das Harz.⁷⁸ Durch die Färbung der Harzkügelchen lassen sich die aktiven Substrate von den ungespaltenen trennen und charakterisieren.

Wichtig für die „on bead“-Methoden ist die Wahl des geeigneten polymeren Trägers. Das Harz sollte so beschaffen sein, dass es sowohl in organischen, als auch in wässrigen Medien gute Quelleigenschaften aufweist. Des Weiteren muss das Harz inert gegenüber den zu testenden Proteasen sein. Der Grad der Vernetzung der Polymere ist ebenfalls ausschlaggebend, damit die großen Biomoleküle die Substrate und Inhibitoren am Harz auch erreichen können.⁷⁹ Die gängigsten Harze hierfür sind PEG-funktionalisierte Harze, die aus Polyethylenglycolketten aufgebaut sind (z.B. PEGA-Harz)⁸⁰ und Polystyrol-Harze, wie z.B. TentaGel.⁸¹

2.3.3 INHIBITORASSAYS – METHODEN MIT UND OHNE HARZGEBUNDENE VERTRETER

Künstlich modifizierte Substrate spielen eine entscheidende Rolle bei der Erforschung von Enzymaktivitäten und Enzymselektivitäten. Die bis jetzt vorgestellten Enzymassays in Lösung und „on bead“ machen eine Aussage darüber, ob ein Substrat gespalten wird oder nicht – also eine Ja-Nein-Aussage. Zusätzlich kann, wie oben beschrieben, über die Fluoreszenzintensität der Produktumsatz bei enzymkatalysierten Reaktionen gemessen werden. Werden statt Substraten allerdings Inhibitoren von Proteasen untersucht, ist nicht nur die Fragestellung nach einer potentiellen Enzymhemmung entscheidend, sondern auch wie gut der Inhibitor die Enzymaktivität herabsetzt. Der Assay sollte also zusätzlich noch eine Aussage über die Qualität der Enzymhemmung liefern. In Assays, mit denen Inhibitoren in Lösung getestet werden, wird die Restaktivität des Enzyms über die Fluoreszenzaktivität des Substrats mittels Fluoreszenzspektrometer bestimmt.

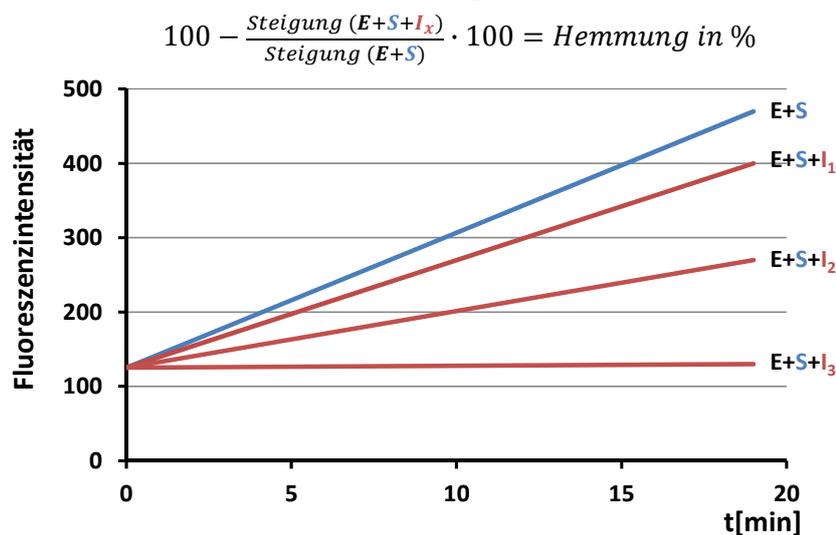


Abbildung 20: Auftragung der Fluoreszenzintensität gegen die Zeit. Über das Verhältnis der Geradensteigungen kann die prozentuale Hemmung der Inhibitoren ermittelt werden.

Für Enzymscreenings, bei denen alle verwendeten Komponenten in Lösung vorliegen, wird in einer Pufferlösung ein Enzym zusammen mit einem Inhibitor und dem Substrat auf einer Mikrotiterplatte gemischt und über eine bestimmte Zeit die Fluoreszenzzunahme verfolgt. Für die Bestimmung der prozentualen Hemmung wird eine Probe ohne sowie eine mit Inhibitor gemessen. Da, wie oben beschrieben, bei Anwesenheit eines Inhibitors die Reaktionsgeschwindigkeit und damit auch die Hydrolyse des Substrats herabgesetzt wird, steigt die Produktumsatzgerade weniger steil an als ohne Inhibitor. Setzt man die Steigungen der Geraden von Blindprobe (ohne Inhibitor) und Inhibitorprobe in Relation, so lässt sich die prozentuale Enzymhemmung über die in *Abbildung 20* angegebene

Gleichung berechnen. Um Messfehler gering zu halten, sollte bei dieser Methode immer im steady-state Bereich gemessen werden – aus diesem Grund ergeben sich bei der Auswertung auch Geraden anstelle von Kurven. In *Abbildung 20* ist ein Diagramm dargestellt, bei dem drei Inhibitoren unterschiedlicher Güte (I_1 – I_3 , rot) zusammen mit Enzym und Substrat inkubiert und vermessen wurden. Als Blindprobe und zugleich als Referenz diente eine Messung ohne Inhibitor (E+S, blau). Inhibitor I_3 ist in diesem Beispiel der effektivste Vertreter, da die zugehörige Gerade die geringste Steigung und das Enzym in Gegenwart des Inhibitors damit den kleinsten Produktumsatz besitzt.

Bei Enzymscreenings mit festphasengebundenen Inhibitoren, die nach dem „one bead, one compound“-Prinzip⁸² (eine Komponente pro Harzkügelchen) durchgeführt werden, ergeben sich andere Herangehensweisen. Wird eine Bibliothek untersucht, deren Komponenten am Harz selbst keine Fluorophore tragen, verwendet man fluoreszenzgelabelte Biomoleküle. Diese Moleküle binden sich bei potenten Inhibitoren an das Harz und können durch das Fluorophor unter einem Mikroskop von unwirksamen Inhibitoren getrennt werden. Anschließend folgen weitere analytische Methoden, wie z.B. massenspektroskopische Untersuchungen, um die bindende Inhibitorspezies zu identifizieren. Ein Beispiel ist in *Abbildung 21* gegeben, bei dem mit Biotin- und Texas Red-gelabeltem Calcineurin (Phosphatase, die bei der Regelung der Immunantwort eine Rolle spielt) und einer cyclischen Peptidyl-Inhibitorbibliothek gearbeitet wurde.⁸³

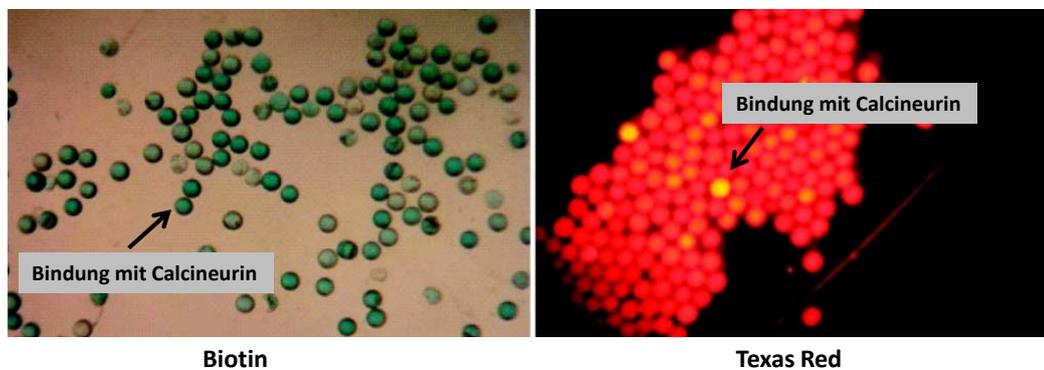


Abbildung 21: Biotin- und Texas Red-gelabeltes Calcineurin. Die Bindung an ein Harzkügelchen ist durch die Verfärbung unter dem Mikroskop erkennbar (reprinted with permission).⁸³

Aber auch andere indirekte Identifizierungsmethoden über Reporter-Gruppen, wie z.B. über Biomoleküle mit Radionuklid-Labeln,⁸⁴ Enzyme oder fluoreszierende Proben sind gängige Methoden.

Bei den genannten Beispielen können Aussagen darüber getroffen werden, ob eine festphasengebundene Substanz inhibiert oder nicht. Eine Einschätzung, wie potent sie ist, kann aus dem Screening nicht entnommen werden.

Hierfür muss ein Enzymassay verwendet werden, wie er beispielsweise von *Machon* beschrieben wurde.^{85,86} Im Grunde basiert er auf einem Screening, wie man es für Substanzen in Lösung verwendet, nur mit dem Unterschied, dass die Inhibitoren an das Harz gebunden bleiben und als isopyknische* Lösung im Assay vorliegen. Dazu wird das Enzym zusammen mit der Inhibitorlösung und dem passenden Substrat in einer wässrigen Pufferlösung mittels Fluoreszenzspektrometer vermessen. Genau wie bei den oben beschriebenen Beispielen kann nun über die Unterschiede in den Geradensteigungen auf die prozentuale Hemmung der Inhibitoren geschlossen werden. Es sind folglich nicht nur quantitative, sondern auch qualitative Aussagen möglich. Ein Problem bei der Anwendung dieses Assays kann die lange Inkubationszeit über mehrere Stunden (abhängig von Enzym und Temperatur) hervorrufen. Da der an das Harz gebundene Inhibitor mehr Zeit als freie Substanzen in Lösung benötigt, um mit dem Enzym wechselwirken zu können, ist diese verlängerte Inkubation nötig. Aufgrund des polymeren Trägers ist die Erreichbarkeit der gebundenen Substanzen eingeschränkt und das Enzym muss erst in das polymere Netz des Harzes eindringen. Untersucht man empfindliche Proteasen, kann es zu einem Aktivitätsverlust oder zur Denaturierung kommen, wodurch reproduzierbare Ergebnisse nicht mehr möglich sind. Es ist also entscheidend für eine erfolgreiche Durchführung, die geeigneten Messbedingungen zu finden, die individuell auf die Eigenschaften der zu untersuchenden Protease angepasst sind.

Wie gezeigt, ist die klassische kombinatorische Chemie ein hilfreiches Werkzeug zur Synthese von großen Substanzbibliotheken. Eine Weiterentwicklung dieses kombinatorischen Ansatzes stellt die dynamische kombinatorische Chemie dar. Prinzip und Anwendungsmöglichkeiten dieses Verfahrens in Bezug auf verschiedene Screeningmethoden werden im folgenden Kapitel beschrieben.

* Isopyknisch: Suspension aus Partikeln und Lösungsmittel, die in der Mischung die gleiche Dichte besitzt.

2.4 DYNAMISCHE KOMBINATORISCHE CHEMIE

2.4.1 DAS PRINZIP DER DYNAMISCHEN KOMBINATORISCHEN CHEMIE

Die dynamische kombinatorische Chemie stellt eine Methode dar, bei der unter Verwendung von reversiblen Reaktionen ein Gemisch unterschiedlicher Komponenten nach thermodynamisch stabilen Verbindungen untersucht wird. Dazu wird vorausgesetzt, dass sich alle Komponenten im Gleichgewicht befinden. Durch die reversible Reaktion können die einzelnen Komponenten miteinander reagieren und neue Verbindungen und Strukturen bilden. Diese Mischung aus unterschiedlichen Bausteinen nennt man Bibliothek. Die Zusammenstellung einer dynamischen kombinatorischen Bibliothek (DKB) wird durch die thermodynamische Stabilität eines jeden Bibliotheksmitglieds unter den jeweiligen Bedingungen beeinflusst. Aber auch durch äußere Einflüsse wie Temperatur, pH-Wert, Konzentration oder Zugabe eines Templats kann die Zusammensetzung einer Bibliothek verändert werden. Dadurch gelingt es, thermodynamische Minima zu identifizieren, beispielsweise bei der Bildung von Aggregaten, Komplexen, Foldameren, Rezeptor-Substrat-Komplexen, templatbasierten Synthesen oder anderen supramolekularen Spezies.⁸⁷

Der Unterschied gegenüber der klassischen kombinatorischen Chemie besteht in der Reversibilität der Reaktionen, welche die einzelnen Komponenten miteinander verbinden. Bei der klassischen Variante (*Abbildung 22, B*) wird beispielsweise durch Festphasensynthese eine Vielzahl unterschiedlicher Verbindungen hergestellt, die dann auf ihre Eigenschaften hin (z.B. die Bindung an ein Templat) untersucht werden. Eine nachträgliche Änderung der Zusammensetzung der Bibliothek ist nicht mehr möglich (statische Mischung), sie besteht aus einer definierten Menge an Komponenten. Bei der dynamischen kombinatorischen Chemie (*Abbildung 22, A*) findet ein kontinuierlicher Austausch der Bausteine zwischen den Bibliotheksmitgliedern statt, die Zusammensetzung der Bibliothek wird also durch die Thermodynamik bestimmt. Dadurch wird die dynamische Bibliothek flexibel und kann auf äußere Einflüsse reagieren (dynamische Mischung). Sie kann z.B. durch molekulare Erkennungsprozesse, pH-Wert-Änderung, oder andere Stimuli, welche die Bildung einer bestimmten Spezies begünstigen, verändert werden und passt sich den Gegebenheiten an. Das Gleichgewicht kann innerhalb der Bibliothek in Richtung der bevorzugt gebildeten Komponente verschoben werden. Dieses Prinzip macht man sich unter anderem bei der Identifizierung von stabilen Strukturen in einem Gemisch aus Komponenten mit unterschiedlichen konformellen Eigenschaften zunutze (Bsp.: Foldamere). Als Resultat werden die Strukturen mit den energetisch günstigsten, nicht-kovalenten Wechselwirkungen stabilisiert und bevorzugt gebildet.

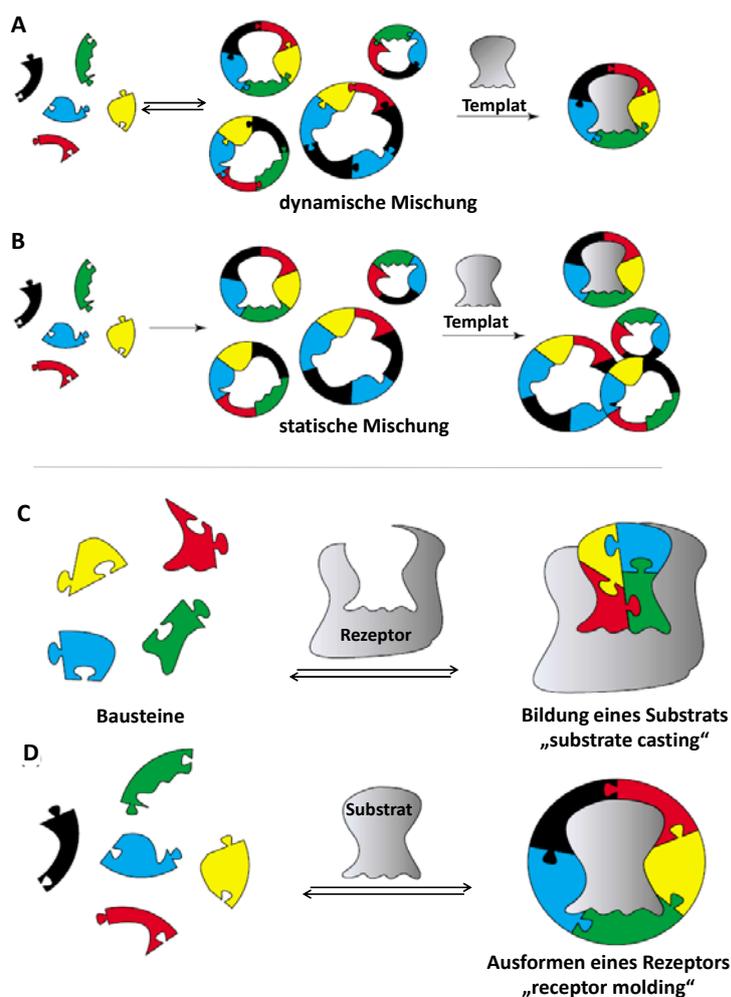


Abbildung 22: Gegenüberstellung der Prinzipien der dynamischen kombinatorischen Chemie (A) mit denen der klassischen kombinatorischen Chemie (B). Dynamische kombinatorische Bibliotheken können templatbasiert beispielsweise durch einen Rezeptor (C) oder durch Liganden bzw. Substrate (D) generiert werden. (reprinted with permission)⁸⁸

Die Stabilisierung von Bibliotheksmitgliedern kann sowohl durch intermolekulare, als auch intramolekulare, nicht-kovalente Wechselwirkungen erfolgen. Um die Bildung solcher Wechselwirkungen zu steuern, können Template eingesetzt werden, die diese Interaktionen dirigieren und so die Bildung einer ganz bestimmten Spezies bevorzugen. Eines der ersten Beispiele für solch eine templatbasierte dynamische Reaktion wurde von *Seidel* bereits 1927 beschrieben.⁸⁹ Es konnte gezeigt werden, dass die Bildung von definierten Strukturen, die reversibel miteinander reagierten, durch die Zugabe eines Templats gezielt gesteuert werden kann. *Seidel* zeigte dies anhand der Selbstkondensation von *ortho*-Aminobenzaldehyd **17**, welches ohne äußere Beeinflussung durch Reaktion des Amins mit dem Aldehyd lineare Trimere **17** ergibt (*Abbildung 23*). Findet die Reaktion bei Anwesenheit eines Templats, in diesem Fall von Metallionen wie z.B. Ni(II), Zn(II) oder Co(II) statt, bilden sich dagegen definierte cyclische Trimere oder Tetramere (**19**).⁹⁰

Durch die Koordination des Eduktes **17** an die Metallionen wird die Produktbildung gesteuert.

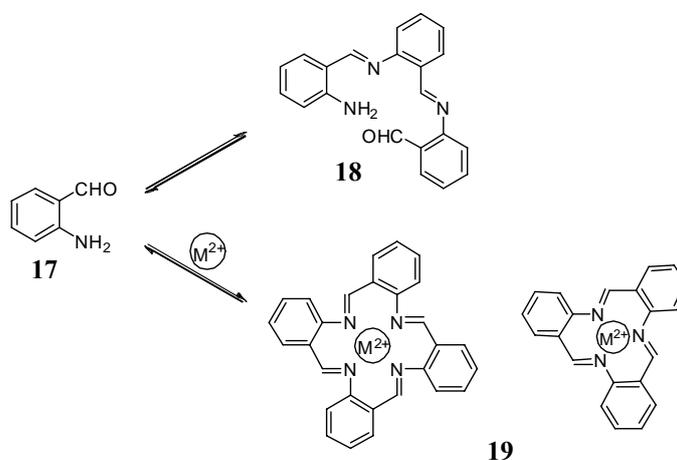


Abbildung 23: Eines der ersten Beispiele für eine thermodynamische templatbasierte Iminsynthese.^{89,90} Durch Anwesenheit von Metallionen werden definierte Drei- und Vierringe gebildet.

Die Produktbildung und damit auch die Bildung der gewünschten Strukturen kann durch die Wahl des Templats entscheidend beeinflusst werden. Die templatbasierte Synthese stellt somit einen wichtigen Punkt für die Methode der dynamischen Chemie dar. Aber nicht nur Metallionen können als Bindungspartner für Liganden fungieren. Beispielsweise werden Substrate oder auch Rezeptoren als Template genutzt, um die Bildung substrat- und rezeptorspezifischer Komponenten zu erhöhen (*Abbildung 22*, C und D). Die Bildung der gewünschten Komponenten wird auf Kosten der Nebenprodukte verstärkt. Diese Beeinflussung der Produktbildung kann teilweise so effizient sein, dass im präparativen Maßstab hohe Ausbeuten erreicht werden.

Aber nicht nur mit geeigneten Templaten, sondern auch mit der Wahl der einzelnen Komponenten und deren Beschaffenheit lassen sich Zusammensetzung der dynamischen Bibliothek und räumliche Struktur der Zielverbindungen sehr genau steuern. Hierbei hängt die Komplexität einer dynamischen Bibliothek von der Topologie (d.h. der räumlichen Anordnung der Teilstrukturen von Molekülen) der einzelnen Bausteine ab. Ist z.B. nur eine reversible Bindungsstelle vorhanden, werden aus den Komponenten unterschiedliche Dimere gebildet (*Abbildung 24*, A). Erhöht sich die Valenz (Anzahl der Bindungsstellen), steigt auch die Komplexität der Bibliothek in Bezug auf Raumstruktur und Kombinationsmöglichkeiten (*Abbildung 24*, B). Es ist also möglich durch die Wahl der Valenzen von Bibliotheksbausteinen die Topologie und damit die Beschaffenheit einer dynamischen Bibliothek maßgeblich zu beeinflussen. Dies ist ein entscheidender Vorteil der dynamischen Chemie gegenüber dem klassischen Ansatz.

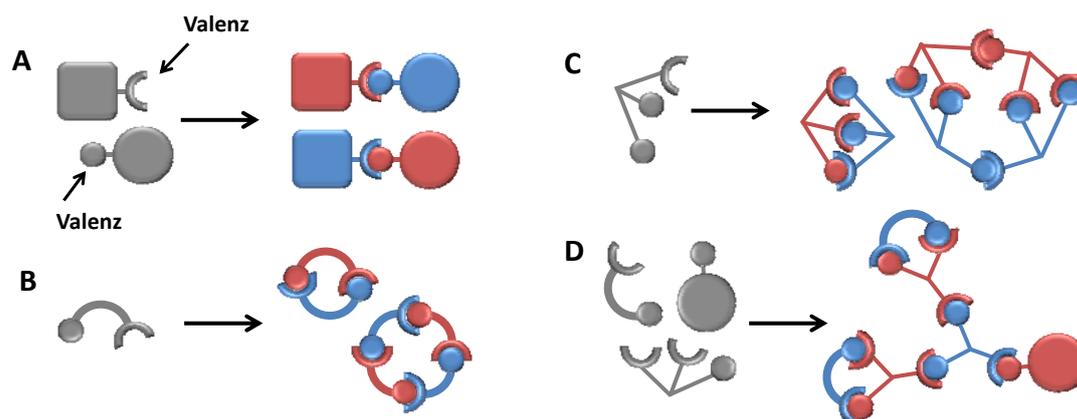


Abbildung 24: Bibliotheken bestehend aus Bausteinen mit unterschiedlich vielen funktionellen Gruppen, (Valenzen) die für die reversible Bindungsbildung zu Verfügung stehen. Eine Valenz bildet Dimere (A), zwei funktionelle Gruppen pro Baustein bilden Makrozyklen (B) und trifunktionalisierte Komponenten bilden Netzwerke und Kapseln (C). Mischt man eine unterschiedliche Anzahl an Valenzen, erweitert sich die Bandbreite möglicher Strukturen (D).

Neben den beschriebenen Vorteilen der dynamischen kombinatorischen Chemie gibt es einige Einschränkungen, die bei der Planung der Bibliothek mit berücksichtigt werden müssen. In *Tabelle 4* sind Vor- und Nachteile der klassischen und der dynamischen kombinatorischen Chemie gegenübergestellt. Das wichtigste Kriterium ist die Löslichkeit aller Mitglieder der Bibliothek. Die Unlöslichkeit einer oder mehrerer Komponenten bzw. Reaktionsprodukte im Reaktionsmedium würde die Gleichgewichtslage ungewollt verschieben und das Ergebnis verfälschen. Die zwingende Verwendung von reversiblen Reaktionen stellt ebenfalls einen limitierenden Faktor dar, da die Auswahl an geeigneten Reaktionen begrenzt ist (siehe *Abschnitt 2.4.2*). Desweiteren kann die Kontrolle der Reaktion nicht mit derselben Präzision geschehen wie bei der klassischen kombinatorischen Chemie, da sich die gesamte dynamische Bibliothek im Gleichgewicht befindet und dadurch keine der entstehenden Bindungen wirklich fixiert ist.

Viele der Techniken, die für eine klassische Bibliothek Verwendung finden (wie z.B. split and mix),^{73,91} können nicht auf eine DKB übertragen werden. Trotz dieser Nachteile ist die dynamische kombinatorische Chemie eine durchaus leistungsstarke Methode, vor allem in Fällen, bei denen molekulare Erkennung und Wechselwirkungen mit einem Templat dazu genutzt werden können, Bibliotheksmitglieder zu detektieren, zu stabilisieren und schließlich deren Bildung zu steigern.⁸⁸

Um während des Analyseprozesses eine erneute Gleichgewichtsveränderung zu vermeiden, muss es möglich sein, die Reaktion zu unterbrechen. Dies kann durch Reduktion, Oxidation, pH-Veränderung, Temperatur, etc. geschehen. Mit dieser Unterbrechung der Gleichgewichtseinstellung hat man die Möglichkeit, das Endergebnis des Screenings zu fixieren und mit Analysemethoden wie HPLC, NMR oder Massenspektrometrie zu analysieren.

Tabelle 4: Vergleich zwischen der klassischen und der dynamischen kombinatorischen Chemie (grün: Vorteile, rot: Nachteile).

Klassische kombinatorische Bibliothek	Dynamische kombinatorische Bibliothek
Konzentrationsunabhängig von Templat-Wechselwirkungen	Templat-Wechselwirkungen induzieren verstärkende Effekte
Ausgewählte Komponenten müssen einzeln synthetisiert werden	Ausgewählte Komponenten können aus der Bibliothek isoliert werden
Komplexe Topologien sind schwer zugänglich	Komplexe Topologien sind einfacher zugänglich
Viele irreversible Reaktionen verfügbar	Anzahl der geeigneten reversiblen Reaktionen ist begrenzt
Unlöslichkeit einiger Bibliotheksmitglieder bewirkt keine Störung des Systems	Alle Bibliotheksmitglieder müssen löslich sein
Stufenweise Kontrolle über alle individuellen Schritte	Eingeschränkte Kontrolle auf Grund der Reversibilität der Reaktionsschritte

Die bis jetzt genannten Kriterien stellen die Rahmenbedingen dar, welche notwendig sind, um Untersuchungen mit einer dynamischen kombinatorischen Bibliothek durchzuführen. Als nächstes werden jetzt konkrete Beispiel aufgeführt, die veranschaulichen, wie das Prinzip der dynamischen Chemie bei der Identifizierung von Inhibitorstrukturen unter Zuhilfenahme eines biologischen Templats angewandt werden kann.

Eine der ersten Studien, die sich mit dem Prinzip der dynamischen kombinatorischen Chemie beschäftigte und dabei ein Protein als Templat verwendet hat, wurde 1996 von *Swann* veröffentlicht. Als Grundlage diente eine dynamische Bibliothek aus Peptiden, die das Protein Fibrinogen und den monoklonalen Antikörper 3E7 als Zielstrukturen hatte. Der dynamische Austauschprozess der einzelnen Bausteine basierte auf der Bildung und dem Bruch von Peptidbindungen, was durch die Peptidase Thermolysin katalysiert wurde.⁹² Die beiden Zielstrukturen fungierten in diesem Fall als Template und begünstigten die Bildung bestimmter Peptidstrukturen durch nicht-kovalente Wechselwirkungen. Das wirkliche Potential und die charakteristischen Eigenschaften von DKBs mit Biomolekülen wurde von *Huc* und *Lehn* 1997, also ein Jahr später beschrieben.⁹³ Sie untersuchten die Aktivität einer Carboanhydrase mit Hilfe einer dynamischen Bibliothek (*Abbildung 25*). Hierbei wurde eine Bibliothek aus drei Aldehyden (**20–22**) und vier Amininen (**23–26**) zusammen mit einer Carboanhydrase als Templat entwickelt. Nach der Inkubation der Protease mit einer Mischung aus Aldehyden und Amininen wurde die Reaktion angehalten. Dies geschah durch die Reduktion der entstandenen Imine zu Amininen. Zur Kontrolle der Ergebnisse wurde zusätzlich eine Bibliothek ohne das Enzym hergestellt. Der anschließende Vergleich der templatbasierten

mit der nicht-templatbasierten Bibliothek mittels HPLC-Analyse zeigte eine vermehrte Bildung einiger Spezies in der Mischung, die zusätzlich das Enzym enthielt. Bestimmte Kombinationen von Amin und Aldehyd wurden demnach bei Anwesenheit der Protease bevorzugt gebildet. Diese vermehrt gebildeten Strukturen wurden identifiziert und isoliert. Mit dieser Methode konnte so ein potenter Inhibitor (**27**), der aus der Kombination von Aldehyd **22** und Amin **25** durch die templatbedingte Verschiebung des Gleichgewichts entstand, mittels DKB gefunden werden.

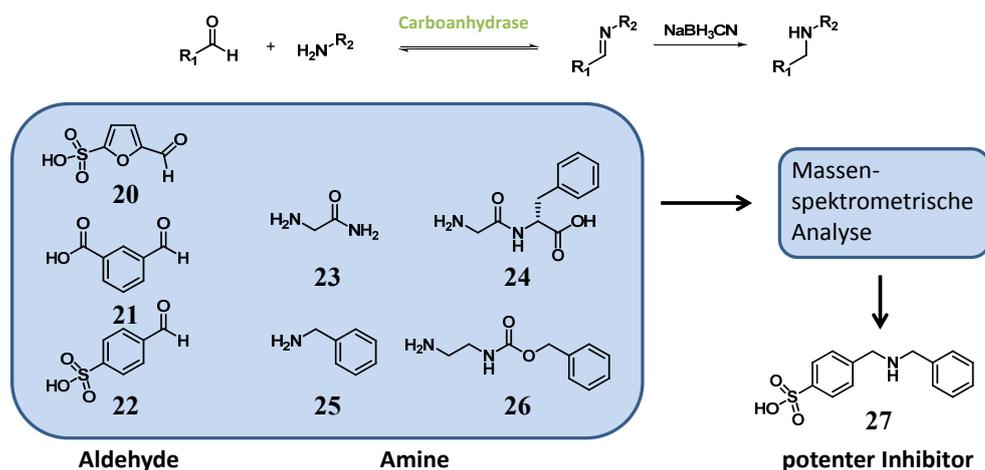


Abbildung 25: Dynamische kombinatorische Bibliothek, bestehend aus Iminen und Carboanhydrase als Templat. Die Imine bilden sich in einer reversiblen Reaktion aus Aminen und Aldehyden bei Anwesenheit der Carboanhydrase. Die Reaktion wird durch Reduktion mit NaBH_3CN gestoppt und die entstandenen Produkte mittels Massenspektrometrie analysiert. Die Kombination (**27**) aus Amin (**25**) und Aldehyd (**22**) wurde bei Anwesenheit des Enzyms vermehrt gebildet.

Bei der Wahl der Template ist man nicht auf eine bestimmte Art, Gattung oder Sorte von Substraten oder Rezeptoren festgelegt, lediglich die Methode muss auf das jeweilige Templat angepasst werden. Es können unterschiedliche Klassen von Biomolekülen für die Generierung einer Bibliothek als Template herangezogen werden (Lectine, Enzyme, Polynukleotide, etc.). Durch die Auswahl der unterschiedlichsten Bausteine, die aus nicht-natürlichen und natürlichen Fragmenten (Aminosäuren, Nukleotiden, Kohlenhydraten,...) aufgebaut sind, können die Bindungspartner gezielt adressiert werden. Unter Verwendung der entsprechenden reversiblen Reaktion, die eine Bildung der Bibliotheksmitglieder unterstützt, ist ein breites Anwendungsgebiet verfügbar. In *Tabelle 5* ist eine Auswahl von Anwendungsbeispielen der dynamischen kombinatorischen Chemie in Verbindung mit biologischen Systemen als Template aufgelistet. Der Einsatz unterschiedlicher Zielobjekte sowie die Wahl verschiedener Bibliotheksgrößen veranschaulichen das vielfältige Einsatzspektrum der Methode. Angefangen von Rezeptordesign und Inhibitorsynthese für Enzyme bis hin zur Erforschung neuer Liganden oder Strukturen zur DNA-Erkennung findet die dynamische Kombinatorik Anwendung.

Table 5: Auswahl von Anwendungen dynamischer Bibliotheken mit biologischen Zielobjekten als Template.⁹⁴ Die Übersicht veranschaulicht das breite Anwendungsspektrum der Methode.

Zielobjekt	Reversible Reaktion	Größe der Bibliothek	Treffer/Leitstruktur
Ac ₂ -L-Lys-D-Ala-D-Ala	Metathese/Disulfid-Austausch	36	Bis-Vancomycin
Acetylcholinesterase	Acyl-Hydrazon-Austausch	66	Bis-Pyridin
Anti-β-endorphin	Transamidierung	n.a.	Peptid (YGG-FL)
Carboanhydrase	Transaminierung	12	Sulfamoylbenzaldimin
Concanavalin A	Disulfid-Austausch	21	Bis-Mannosid
Concanavalin A	Acyl-Hydrazon-Austausch	484	Tris-Mannosid
DNA	Transaminierung	36	Bis-salicylaldimin-Zn(II) Komplex
GalNAc-spezifische Lectine	Metalkoordination	4	Tris-GalNAc
HPr Kinase	Acyl-Hydrazon-Austausch	440	Bis-Benzimidazol
Neuraminidase	Transaminierung	>40000	Tamiflu-Analoga
<i>S. aureus</i>	Disulfid-Austausch	3828	Psammaphin A Analoga
Trypsin	Alkohol-Boronsäureester-Austausch	n.a.	Tripeptidylboronat
β-Galactosidase	Transaminierung	8	N-Alkylpiperidin

n.a.: nicht angegeben; GalNAc: *N*-Acetylgalactosamin; HPr: "histidine containing phospho carrier protein".

Trotz der vielfältigen Anwendungsmöglichkeiten beschränkt sich die praktische Durchführung im Wesentlichen auf wenige Arbeitsschritte. Der dynamische Ansatz wird üblicherweise in drei unterschiedliche Prozesse untergliedert. So wird im ersten Schritt die Mischung der sich austauschenden Moleküle hergestellt. Im zweiten Abschnitt wird durch nichtkovalente Wechselwirkungen mit einem Templat die vermehrte Produktion der besten Bindungspartner forciert. Der dritte Arbeitsschritt ist dann die Detektion und Isolierung bzw. die Synthese der besten Vertreter. Die erfolgreiche Durchführung aller drei Prozesse ist maßgeblich vom Typ der reversiblen Reaktion abhängig, die dafür genutzt wird die einzelnen Bausteine miteinander zu verbinden.⁸⁸

Im folgenden Kapitel werden die beschriebenen Anforderungen an die reversiblen Reaktionen anhand von Beispielen erläutert. Die Auswahl der Beispiele beschränkt sich hierbei auf Ansätze mit biologisch relevanten Templaten.

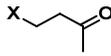
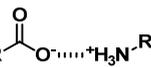
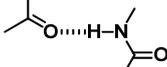
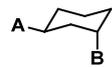
2.4.2 GLEICHGEWICHTSREAKTIONEN ALS WERKZEUG DYNAMISCHER BIBLIOTHEKEN

Ein fundamentales Element für die Entwicklung einer dynamischen Bibliothek stellt die Verwendung von reversiblen Prozessen dar, die sowohl auf kovalenten Bindungsbildungen, nicht kovalenten Wechselwirkungen oder reversiblen zwischenmolekularen Veränderungen basieren können. Idealerweise sollte die Reaktion unter milden Bedingungen ablaufen, vor allem wenn man mit einem biologischen System als Templat arbeitet. Sie sollte des Weiteren schnell ablaufen, gegenüber anderen funktionellen Gruppen tolerant sein und keine Nebenreaktionen eingehen. Zudem darf die Reaktion die Wechselwirkungen mit dem Templat nicht beeinflussen, um eine bestmögliche Interaktion der Bibliotheksmitglieder mit dem Templat zu gewährleisten. Zusätzlich dazu ist es von Vorteil, wenn man den Austauschprozess der Bausteine untereinander zu einem gewünschten Zeitpunkt an- bzw. abschalten kann. Dabei sollte dieser Eingriff das entstandene Gleichgewicht und die charakteristischen Eigenschaften der entstandenen Bibliotheksmitglieder nicht beeinflussen, da sie dadurch eventuell in Struktur und Bindungseigenschaften verändert werden.

Durch diese große Anzahl an Bedingungen wird die Auswahl der geeigneten Reaktion deutlich erschwert. Zumal zusätzlich die Bedingungen des Screenings (Temperatur, pH-Bereich, Lösungsmittel, etc.) mit berücksichtigt werden müssen. Es bedarf also für das jeweilige Experiment eine sorgfältige Auswahl des Reaktionstyps. Beispiele für Reaktionen, die sich besonders für die Verwendung in der dynamischen kombinatorischen Chemie bewährt haben, sind in *Tabelle 6* aufgeführt. Grundsätzlich kann zwischen reversiblen, kovalenten Bindungsbildungen (z.B. Iminbildung, Michael-Addition, Disulfidbrückenbildung, etc.), reversiblen Wechselwirkungen (Metallkoordination, Wasserstoffbrückenbindungen, etc.) und reversiblen intramolekularen Prozessen (Konfigurations-, Konformationsänderungen, etc.) unterschieden werden. Die Auswahl der Reaktionsart sollte individuell auf die erforderlichen Ansprüche und Reaktionsbedingungen erfolgen.

Zwei Reaktionstypen, der Disulfidaustausch und die Iminbildung, werden als Beispiel detaillierter vorgestellt. Dabei wird im Wesentlichen auf die Anwendung im Zusammenhang mit biologischen Systemen, der Eignung für dynamische Bibliotheken und der Relevanz für diese Arbeit eingegangen.

Tabelle 6: Beispiele dynamischer Prozesse, die potentiell in der dynamischen kombinatorischen Chemie Verwendung finden.⁹⁵

Kovalente Bindungsbildung			
Carbonylreaktionen			
Iminbildung		$\text{H}_2\text{N}^-\text{R}$	\rightleftharpoons  + H_2O
Hemiketalbildung		HO^-R	\rightleftharpoons 
Aldolreaktion			\rightleftharpoons 
Michael-Reaktion		H^-X	\rightleftharpoons 
Disulfidbrückenbildung		HS^-	$\xrightleftharpoons[\text{Red.}]{\text{Ox.}}$ 
Diels-Alder-Reaktion			\rightleftharpoons 
Reversible Wechselwirkungen			
Metalkoordination	M^{m+}	$n\text{L}$	\rightleftharpoons $[\text{ML}_n]^{m+}$
Elektrostatische Wechselwirkungen		$^+\text{H}_3\text{N}^-\text{R}$	\rightleftharpoons 
Wasserstoffbrückenbindung			\rightleftharpoons 
Donor-Akzeptor-Wechselwirkung	D	A	\rightleftharpoons [DA]
Reversible intramolekulare Prozesse			
Konfigurationsänderung			
<i>cis-trans</i> -Isomerisierung		\rightleftharpoons	
Konformationsänderung			
Ring-Inversion		\rightleftharpoons	
Strukturänderung			
Tautomerie		\rightleftharpoons	

D: Donor; A: Akzeptor; A, B: Substituenten; M: Metall; L: Ligand; R: Rest

Die Reaktion der Disulfidbrückenbildung bzw. des Disulfid-Austauschs ist in biologischen Systemen weit verbreitet. Sie spielt bei der Faltung von Proteinen und Enzymen,⁹⁶ aber auch in anderen biologischen Prozessen eine wichtige Rolle. Aufgrund ihrer biologischen Kompatibilität und der mechanistischen Reversibilität eignet sie sich für die Verwendung in dynamischen Bibliotheken. Über einen nukleophilen Angriff eines Thiolat-Anions wird ein Partner der Disulfid-Bindung verdrängt. Es findet ein Austausch der Bindungspartner statt (Abbildung 26 A).⁹⁷ Dieser Austausch benötigt ein

deprotoniertes Thiol und ist somit pH-abhängig. In einem pH-Bereich von 7–9 wird genügend Thiolat generiert, um folglich einen Austausch zu ermöglichen. Dieser Austauschprozess kann durch eine Absenkung des pH-Wertes angehalten werden, was bei einer DKB von Bedeutung ist. Für eine dynamische Bibliothek sind für diesen Reaktionstyp zwei verschiedene Startpunkte möglich, welche in *Abbildung 26* dargestellt sind: zum einen ausgehend von Thiolen die durch eine irreversible Oxidation mit der Luft und gleichzeitigem Disulfid-Austausch reagieren (*Abbildung 26*, B, a); zum anderen durch „freies Thiol“ (*Abbildung 26* B, b) oder katalytische Mengen eines Reduktionsmittels (Bsp.: Dithiothreitol (DTT), *Abbildung 26* B, c).⁸⁷ Alle Ansätze führen jedoch zur selben Zusammensetzung der Bibliothek.

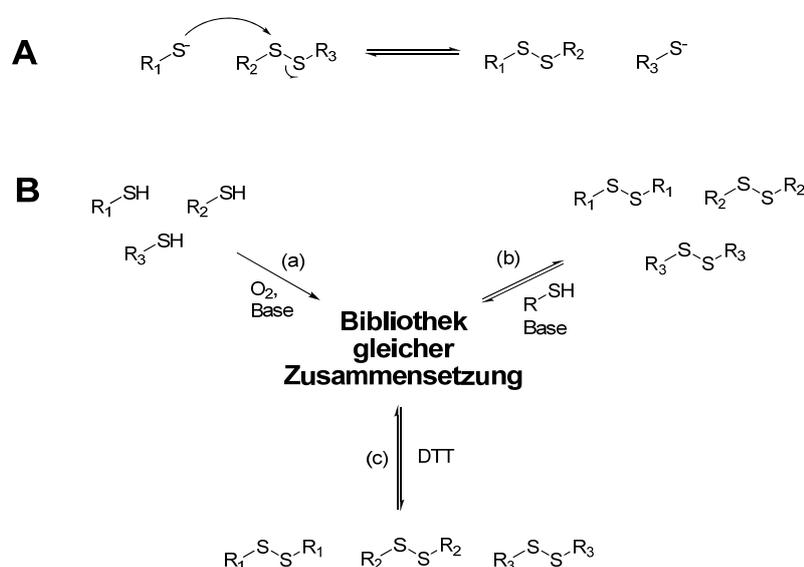
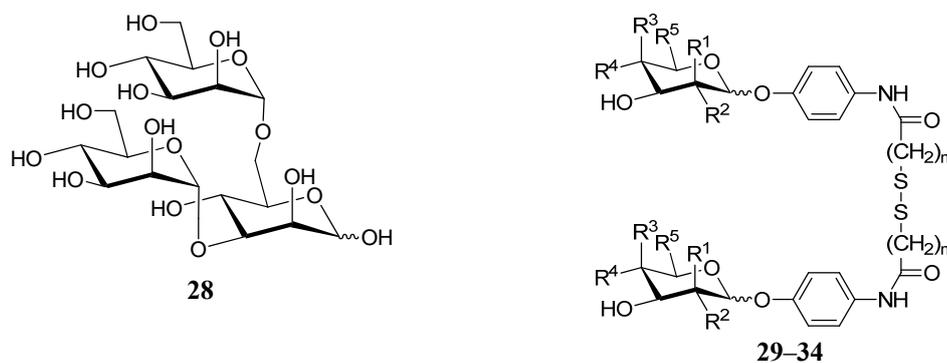


Abbildung 26: A: Reaktionsschema des Disulfid-Austauschs. B: Verschiedene Ansätze für eine dynamische Bibliothek mit Disulfiden; a) durch Oxidation mit der Luft, b) durch Reduktionsmittel oder c) durch „freies“ Thiol.

Anwendung findet der Disulfid-Austausch beispielsweise bei einer dynamischen Bibliothek aus verschiedenen Kohlenhydraten, die über eine Disulfidbrücke miteinander verknüpft sind (*Abbildung 27*). Als biologisches Templat wurde hier Concanavalin A (ConA) gewählt, ein pflanzliches Lectin (aus der Jackbohne, *Canavalia ensiformis*), das zur Klasse der Kohlenhydrat-bindenden Proteine zählt. Das natürliche, spezifische Substrat dieses Proteins besteht aus drei verzweigten Mannose-Einheiten **28**. Diese Struktur wurde mit verschiedenen Zuckermolekülen nachempfunden und über unterschiedliche Linker mit variabler Länge zu Dimeren verknüpft (**29–34**). Durch eine zweiwöchige Inkubation der Bibliothek mit den verschiedenen Dimeren und dem Enzym wurde das System ins Gleichgewicht gebracht. Durch Verringerung des pH-Wertes wurde daraufhin der Disulfid-Austausch gestoppt und es konnte die Di-Mannose-Verbindung **29** als favorisierte Verbindung detektiert werden. Dieses Ergebnis war aufgrund der Ähnlichkeit zum natürlichen Substrat erwartet worden. Verbindungen, die aus einer

Mannoseeinheit und einem anderen Zuckermolekül bestanden, wurden ebenfalls vermehrt gebildet, zeigten aber eine geringere Affinität zu ConA. Daraus konnte die selektive Affinität des Enzyms zu Mannose eindeutig abgeleitet werden. In diesem Experiment wurde die dynamische Chemie zur Veränderung der Geometrie, bzw. der Länge der Strukturen eingesetzt. Die Methode erfüllte alle wichtigen Anforderungen für eine dynamische Bibliothek und dies veranschaulicht das Potential der Methode.^{98,99}



		α/β	R^1	R^2	R^3	R^4	R^5	n
29	Man/Man	α	OH	H	H	OH	CH ₂ OH	3
30	Gal/Gal	β	H	OH	OH	H	CH ₂ OH	2
31	Gal/Gal	β	H	OH	OH	H	CH ₂ OH	3
32	Glc/Glc	β	H	OH	H	OH	CH ₂ OH	2
33	Ara/Ara	β	H	OH	OH	H	H	2
34	Xyl/Xyl	β	H	OH	H	OH	H	2

Man = D-Mannose; Gal = D-Galactose; Glc = D-Glucose; Ara = L-Arabinose;
Xyl = D-Xylose

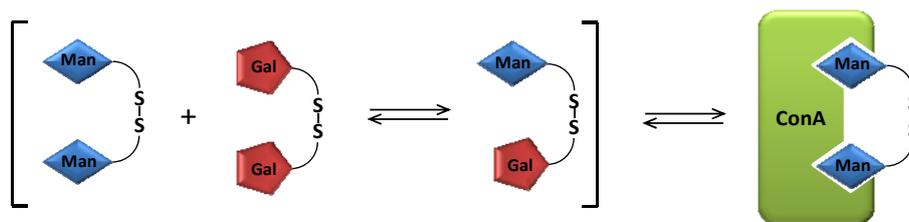


Abbildung 27: Links oben: verzweigtes Trimannosid **28**, natürliches Substrat des Concanavalin A. Rechts oben: Struktur der über ein Disulfid verlinkten Kohlehydrate (**29–34**). Mitte: Tabellarische Auflistung der eingesetzten Kohlehydratbausteine. Unten: Schematische Darstellung des Austauschprozesses in einer Mischung mehrerer Disulfide und der Bindung des besten Vertreters an den Rezeptor (ConA).

In einem zweiten Beispiel wurde mittels Disulfid-Austausch und Alken-Metathese zwei identische Bibliotheken synthetisiert, bei denen die Linkerlängen zwischen zwei

verbrückten Vancomycin* Molekülen variiert wurden. So wurde der optimale Abstand beider Moleküle für das Substrat L-Lys-D-Ala-D-Ala gefunden. Grundlage dieses Experiments war die Tatsache, dass Dimere eine höhere Bindungsaffinität gegenüber den Monomeren aufwiesen. Auffallend an diesem Beispiel war die Tatsache, dass die Bibliothek, deren Austauschreaktion auf Alkenmetathese beruhte, biokompatibler und sensibler war als der Disulfid-Austausch. Letzterer kann in Gegenwart von anderen Thiolat-Anionen oder Peptiden bzw. Proteinen, die reduzierte Cysteinreste enthalten, unerwünschte Nebenreaktionen eingehen.^{100,101}

Die beiden Beispiele veranschaulichen, dass der Disulfid-Austausch für Anwendungen mit biologisch relevanten Templaten unter Berücksichtigung der Screeningbedingungen und möglicher Nebenreaktionen geeignet ist. Durch variable Darstellungsmöglichkeiten besitzt die Reaktion gute Eigenschaften für die Konstruktion dynamischer Bibliotheken. Aufgrund der in dieser Arbeit untersuchten Cysteinproteasen und der Problematik der eben beschriebenen Nebenreaktion mit reduzierten Cysteinresten wurde jedoch eine alternative Reaktion gewählt. Unter allen reversiblen Reaktionen stößt die Reaktion von Carbonylverbindungen mit Aminen sowohl aus chemischer als auch aus biologischer Sicht auf besonderes Interesse. Diese Reaktion wird im Folgenden detaillierter betrachtet.

Die Kondensation von Carbonylkomponenten mit Aminen, bei denen Imine als Zwischenstufe auftreten, wurde bereits 1864 von *Schiff* entdeckt¹⁰² und wird seither in einem breiten Spektrum verschiedenster Prozesse angewandt. Meistens werden diese Kondensationen in unterschiedlichen organischen Lösungsmitteln durchgeführt, um das Gleichgewicht der Reaktion auf die Seite der Kondensationsprodukte zu verschieben. Die Anwendung der Iminbildung bei dynamischen Bibliotheken fordert aber auch die Reversibilität der Reaktion und die Durchführung in wässrigen Medien wie Pufferlösungen oder Mischungen mit organischen Lösungsmitteln (z.B. DMSO) und Wasser.¹⁰³ Der Grund dafür ist, dass bei der Untersuchung von Enzymen in der Regel unter physiologischen Bedingungen gearbeitet wird.

Die Abhängigkeit der Reaktion vom pH-Wert ist für die spätere Äquilibration einer dynamischen Bibliothek von Bedeutung, da die Reaktionsgeschwindigkeit und damit auch die effektive Bildung der Imine beeinflusst werden kann. In *Abbildung 28* ist die pH-Abhängigkeit der Iminbildung graphisch dargestellt. Die Reaktionsrate ist von zwei geschwindigkeitsbestimmenden Schritten abhängig: der Addition von Carbonylverbindung und Amin (im sauren Bereich <pH 4 geschwindigkeitsbestimmend) und der Dehydratation, die bei höheren pH-Werten die Reaktionsgeschwindigkeit bestimmt. Dieser Sachverhalt wird aus der Betrachtung der Reaktionsmechanismen und der Graphik in *Abbildung 28* deutlich. Die Dehydrierung benötigt saure, katalytische Bedingungen für die Abspaltung des Wassers und wird oberhalb eines pH-Wertes von 6 sehr langsam. Somit kann es z.B. bei einem höheren pH-Wert wesentlich länger dauern, bis das Gleichgewicht der Reaktion eingestellt ist. Die Iminbildung wird gewöhnlicher Weise

* Vancomycin ist ein Glycopeptid-Antibiotikum und wird gegen multiresistente Staphylokokken verwendet. Es wirkt als Inhibitor der Peptidoglycan-Vernetzung in der bakteriellen Zellwand, indem es mit der auf der Zellwand befindlichen Sequenz L-Lys-D-Ala-D-Ala einen Komplex bildet.¹⁶⁶

unter leicht sauren Bedingungen durchgeführt, sie findet aber auch im Neutralen statt. Für den Additions-Schritt der Carbonylverbindung an das Amin ist keine Säure notwendig, er wird sogar im stark Sauren durch die Protonierung desamins drastisch verlangsamt. Am schnellsten läuft die Iminbildung bei einem pH-Wert zwischen 4 und 6 ab. Unterhalb dieses Wertes ist die Protonenkonzentration zu hoch und zu viel Amin protoniert, oberhalb dieses Bereichs reicht die Protonenkonzentration nicht aus, um die Abgangsgruppe (OH) zu protonieren. Der Unterschied zu einer säure- oder basenkatalysierten Reaktion, wie z.B. der Esterhydrolyse ist zum Vergleich ebenfalls in *Abbildung 28* gezeigt. Die Geschwindigkeit der Esterhydrolyse verhält sich orthogonal zur Iminbildung. Sie wird ausgehend von einem pH-Wert von 7 sowohl mit steigendem als auch mit sinkendem pH-Wert schneller. Ähnlich wie viele biologische Prozesse ist die Iminbildung in der Nähe des Neutralpunktes am effektivsten.¹⁰⁴ Aus diesem Grund spielt die Reaktion in der dynamischen Chemie gerade bei der Verwendung biologischer Template und den damit verbundenen physiologischen Screeningbedingungen eine überaus wichtige Rolle.

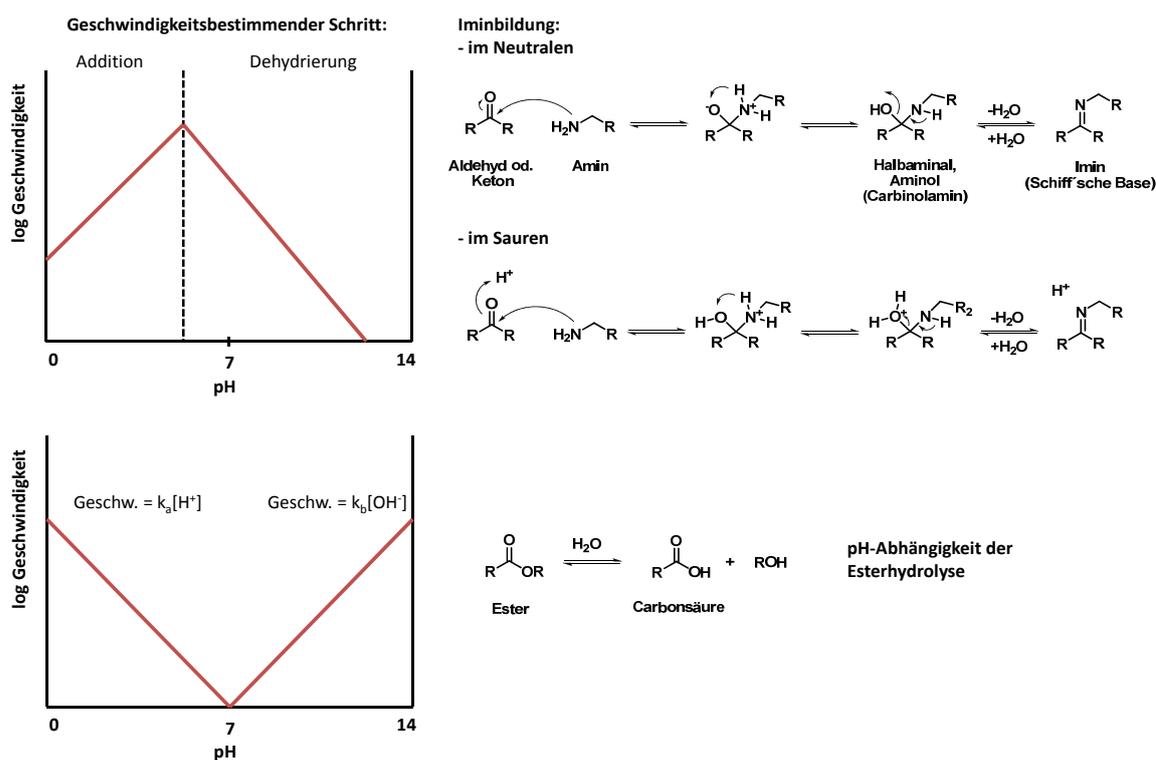


Abbildung 28: pH-Abhängigkeit der Iminbildung im Vergleich mit der Esterhydrolyse. Die Iminbildung ist bei leicht sauren pH-Werten am effektivsten, während die Esterhydrolyse durch Zugabe von Säure oder Base katalysiert und damit beschleunigt werden kann.¹⁰⁴

Die Analyse von Imin-Bibliotheken ist auf Grund der relativ instabilen Iminbindung durch Chromatographie schwierig. Deshalb werden entweder NMR-Methoden angewandt oder das Imin durch Umsetzung mit Reagenzien wie Natriumcyanoborhydrid

(NaBH_3CN) oder Tetrabutylammoniumcyanoborhydrid (TBC) zum Amin reduziert. Diese Reduktion erlaubt eine anschließende Analyse durch HPLC bzw. LC/MS und ist sowohl in organischen als auch wässrigen Lösungsmitteln möglich. Entscheidend ist hierbei, dass die verschiedenen Imine eine ähnliche Reaktivität gegenüber dem Reduktionsmittel besitzen. Das Gleichgewicht wird dadurch während der Reduktion nicht beeinflusst und die Verteilung der Amine nach der Reduktion spiegelt die ursprüngliche Verteilung der Imine in der Bibliothek wieder.⁹³

Wird die Iminbildung für eine dynamische Bibliothek mit einem biologischen Templat, wie z.B. einem Enzym oder Peptid verwendet, muss durch einen Überschuss an Amin sichergestellt werden, dass die Imine nicht bereits durch Reaktion mit dem Templat in Amine umgewandelt werden und dadurch das Ergebnis verfälschen.⁹³

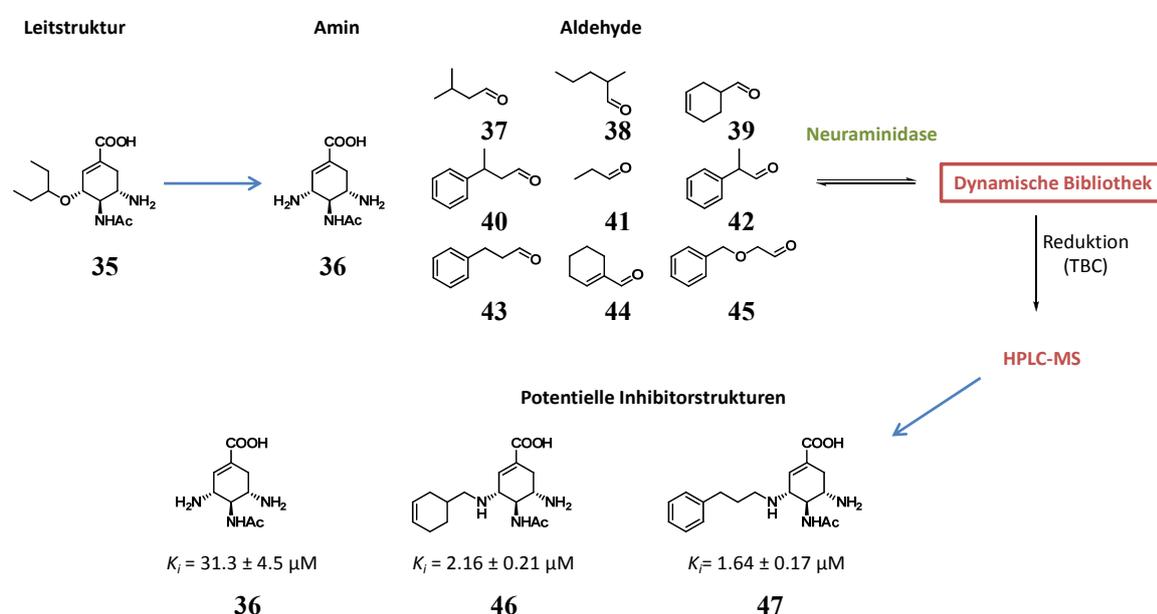


Abbildung 29: Zusammensetzung einer dynamischen Imin-Bibliothek mit Neuraminidase als Templat. Das aus einer Leitstruktur resultierende Amin wurde zusammen mit Aldehyden und Enzym inkubiert. Anschließende Reduktion und Analyse mittels HPLC-MS ergab neue Strukturen potentieller Inhibitoren.

Die Anwendung der Iminbildung in der dynamischen Chemie wird an einem Beispiel veranschaulicht (siehe *Abbildung 29*). In einer dynamischen Bibliothek mit Influenza A Virus Neuraminidase* als Templat und potentiell über 40 000 Mitgliedern wurden neue Inhibitoren identifiziert. Als zentrale Struktur für die Inhibitorbildung wurde Verbindung **36** verwendet. Sie wurde aus der Leitstruktur **35** entwickelt, die eine Variante des

* Die Neuraminidase des Influenza A Virus ist für die Vermehrung des Erregers verantwortlich. Das Enzym spaltet Glycoproteine in der Membran der Wirts- und Viruszelle, um sich nach der Replikation im Wirtskörper auszubreiten.

kommerziell erhältlichen Influenza-Wirkstoffs Tamiflu¹⁰⁵ darstellt. Die Carboxylatgruppe und das acetylierte Amin sind essentiell für die Hemmung. Studien haben gezeigt, dass neben dem aktiven Zentrum des Enzyms eine hydrophobe Tasche existiert, die von der Alkylkette des Ethers von **35** teilweise besetzt wird. Durch die Bildung neuer Strukturen über die reversible Reaktion der Iminbildung sollten die in der Bibliothek verwendeten Aldehyde (**37–45**) diese hydrophobe Region des Enzyms adressieren. Das Experiment wurde in einem wässrigen Imidazol/HCl Puffer bei einem pH-Wert von 7.8 durchgeführt. Durch Reduktion mit TBC nach einer Inkubationszeit von 12 h bei Raumtemperatur konnte mittels HPLC-MS die Bibliothek analysiert werden. Die Strukturen **46** und **47**, welche sich vermehrt gebildet hatten, konnten mit deutlich besseren Hemmeigenschaften ($K_i(\mathbf{46}) = 2.16 \pm 0.21 \mu\text{M}$; $K_i(\mathbf{47}) = 1.64 \pm 0.17 \mu\text{M}$) als Vergleichsverbindung **36** ($K_i = 31.3 \pm 4.5 \mu\text{M}$) identifiziert werden.¹⁰⁶ Es war in diesem Beispiel möglich, eine bestehende Leitstruktur mit Hilfe einer dynamischen Bibliothek aus Iminverbindungen noch zu optimieren.

Wie in den aufgeführten Beispielen gezeigt, ist es möglich, aus einer dynamischen kombinatorischen Bibliothek mit vielen potentiellen Strukturkombinationen gezielt aktive Inhibitoren zu isolieren. Die Wahl der geeigneten reversiblen Reaktion ist von den benötigten Screeningbedingungen und dem Templat abhängig. Für die Analyse der Screeningergebnisse können die gängigen Analysemethoden (HPLC, NMR, MS, etc.) genutzt werden. Mit steigender Größe der Bibliothek wird die Identifizierung von bevorzugt gebildeten Verbindungen aufgrund der Vielzahl von möglichen Strukturen immer komplizierter. Vor einer gezielten Analyse muss die Anzahl der in Frage kommenden Bausteine der Bibliothek eingegrenzt werden. Dies kann durch eine sogenannte Dekonvolutionsstrategie erfolgen. Dieses Prinzip wurde in der vorliegenden Arbeit zur Entwicklung einer Bibliothek für Cysteinproteasen genutzt und wird im folgenden Kapitel erläutert.

2.4.3 DAS PRINZIP DER DYNAMISCHEN DEKONVOLUTION

Dekonvolution bedeutet wörtlich übersetzt „Entfaltung“ (von *convolvere* (lat.) sich winden, zusammenrollen) und bezeichnet im eigentlichen Sinne einen Prozess oder eine Methode, in der Daten oder Signale durch Fragmentierung wiederhergestellt werden können. Bei der Dekonvolution werden in Zusammenhang mit der dynamischen Chemie aus einer Bibliothek einige Unterbibliotheken hergestellt, in denen eine oder auch mehrere Bausteine aus der Gesamtbibliothek fehlen. Auf diese Weise bekommt man genauere Informationen darüber, welche Mitglieder der Bibliothek an der Interaktion mit dem Templat beteiligt sind.

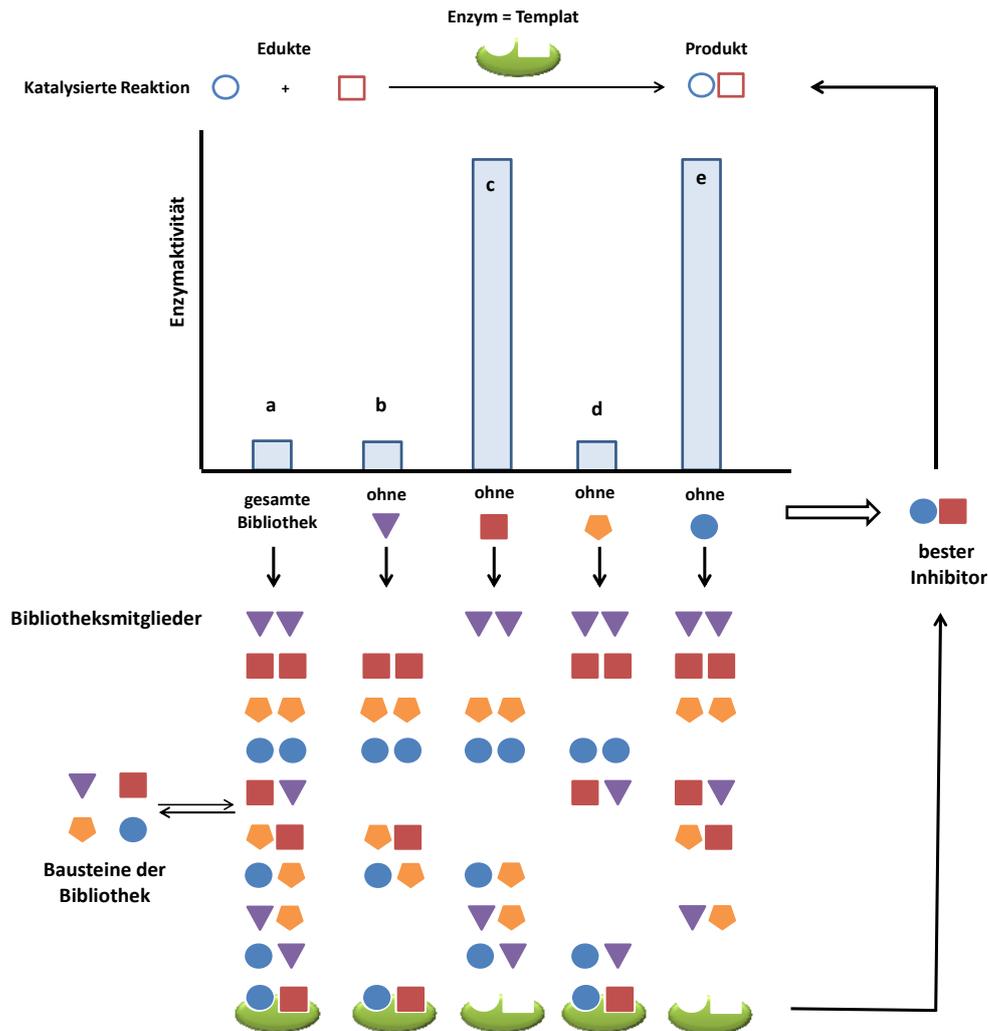


Abbildung 30: Schematische Darstellung des Prinzips der dynamischen Dekonvolution. Durch sukzessives Herauslassen einzelner Komponenten und anschließendem Screening kann man auf aktive Komponenten schließen.

In *Abbildung 30* ist das Prinzip der Dekonvolution an einer enzymatischen Reaktion schematisch veranschaulicht. Das Enzym (grün) katalysiert die Bildung eines Produkts aus zwei Bausteinen (katalysierte Reaktion). Diese Produktbildung soll durch einen Inhibitor unterbunden werden. Aus vier Bausteinen wird eine Bibliothek hergestellt und als komplette Mischung (a) am Enzym vermessen. Jede mögliche Kombination der einzelnen Mitglieder ist vorhanden; als Ergebnis zeigt sich eine deutliche Herabsetzung der Enzymaktivität. Durch sukzessives Herauslassen jeweils einer Komponente (b–e) in einer der hergestellten Unterbibliotheken erhält man differenziert Informationen darüber, welche Kombination der Komponenten das Enzym hemmt. Bei zwei Komponenten (Dreieck und Fünfeck) zeigt das Enzym trotz des Fehlens dieser Bausteine kaum Aktivität (b und d). Lässt man dagegen die beiden anderen Mitglieder aus der Bibliothek (Kreis und Viereck, c und e), ist eine Enzymaktivität vorhanden. Dies hat zum Ergebnis, dass nur wenn Kreis und Viereck sich gleichzeitig in der Mischung befinden, das Enzym

gehemmt wird; sie stellen also die aktiven Spezies dar.⁸⁷ Als Ergebnis erhält man durch Kombination zweier Komponenten eine neue Struktur, die das gewählte Enzym erfolgreich inhibiert.

Der Vorteil dieser Methode ist, dass keine aufwendige Analysemethoden wie HPLC, MS oder NMR benötigt werden, um potentiell aktive Komponenten zu ermitteln. Auch muss das Gleichgewicht nach der Inkubation nicht durch Reduktion, pH-Wert-Veränderung, oder vergleichbare Prozesse angehalten werden.

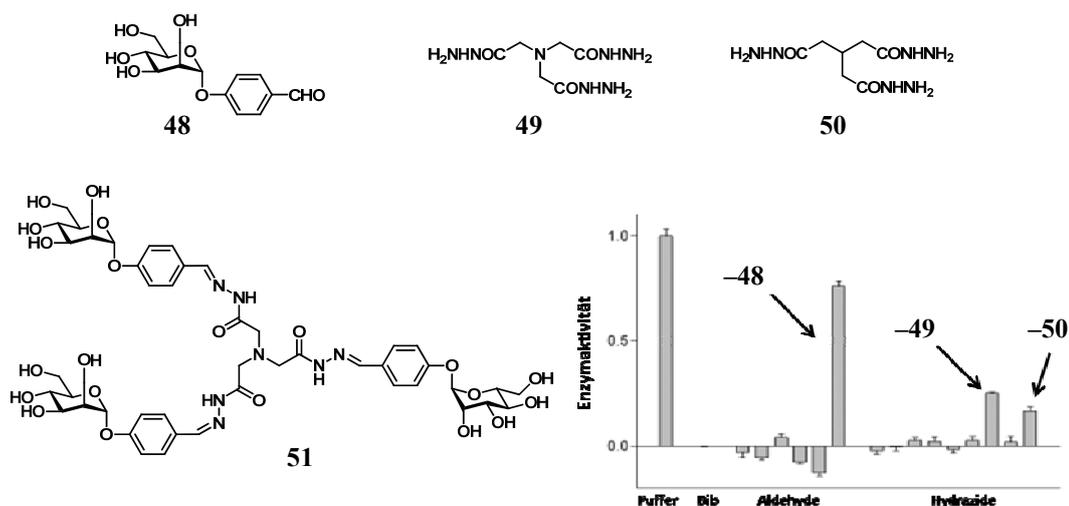


Abbildung 31: Oben: Strukturen der Bausteine, aus denen sich die beiden besten Vertreter der dynamischen Bibliothek zusammensetzen (48, 49 und 50). Unten: Struktur des besten Inhibitors 51, Balkendiagramm der dynamischen Bibliothek. Durch Pfeile sind die Unterbibliotheken gekennzeichnet, in denen die Komponenten 48, 49 und 50 fehlen. Als Referenz sind Puffer und die Gesamtbibliothek (Bib) angegeben. (reprinted with permission)¹⁰⁷

Das Prinzip der dynamischen Dekonvolution wurde zum Beispiel bei der Untersuchung des bereits im vorherigen Kapitel erwähnten ConA angewandt. Es wurde eine Bibliothek entworfen, die sechs verschiedene Kohlehydrate enthielt, die jeweils mit einem Aldehyd derivatisiert waren. Als Gerüstbaustein wurden verschiedene Hydrazide verwendet (ein Monohydrazid, fünf Dihydrazide und drei Trihydrazide), die reversibel mit den Zuckermolekülen zu Hydrazone reagierten. Es ergaben sich daraus theoretisch 474 verschiedene Spezies, die mit ConA in einer Gesamtbibliothek inkubiert wurden. Die Gesamtbibliothek zeigte einen ausgesprochen guten Hemmeffekt gegenüber ConA. Durch Unterbibliotheken, in denen jeweils eine Komponente herausgelassen wurde, konnten drei Strukturen (48–50) identifiziert werden, welche die Ursache für den Aktivitätsverlust des Enzyms waren (Abbildung 31). Durch eine weitere Verkleinerung der Bibliothek, in der nur noch der Mannosebaustein 48 und alle Hydrazide vorhanden waren, konnte die Wirkung der Komponenten bestätigt werden. Es zeigte sich, dass

Verbindung **49** in Kombination mit **48** den größten Hemmeffekt aufwies. Die Bestimmung des IC_{50} -Wertes der in Lösung synthetisierten Verbindung F ergab einen Wert von $22.0 \mu\text{M}$, was eine deutliche Steigerung verglichen mit der Referenzverbindung, dem Methyl- α -D-mannosid ($IC_{50} = 0.80 \text{ mM}$) war.^{87,107}

Dieses Beispiel zeigt sehr anschaulich, wie mittels dynamischer Chemie und einer Dekonvolutionsstrategie aus einer Bibliothek die entscheidenden Komponenten identifiziert werden können, ohne aufwändige analytische Verfahren heranziehen zu müssen. Diese Strategie wird auch in einem Abschnitt dieser Arbeit angewandt, um Inhibitorstrukturen aus einer dynamischen Bibliothek zu identifizieren.

3. ZIELSETZUNG

Im Rahmen dieser Arbeit sollten Methoden zur Identifizierung und Optimierung von Cysteinproteaseinhibitoren entwickelt werden. Dazu sollten unterschiedliche Strategien angewendet werden, die es erlauben, zum einen bestehende Inhibitorstrukturen zu optimieren und zum anderen neue Leitstrukturen durch geeignete Screeningmethoden zu identifizieren. Es wurden diesbezüglich drei verschiedene Ansätze ausgewählt:

1. **Strukturoptimierung** basierend auf bestehenden Inhibitorstrukturen für Cysteinproteasen
2. **Entwicklung einer Screeningmethode** für die Hauptprotease des humanen Coronavirus 229E, um harzgebundene Inhibitorstrukturen zu untersuchen (Screening „on bead“)
3. **Design einer dynamischen Bibliothek** mit anschließender Untersuchung an ausgewählten Cysteinproteasen

Diese drei unterschiedlichen Herangehensweisen werden nachfolgend detailliert erläutert.

3.1 STRUKTUROPTIMIERUNG VON CYSTEINPROTEASEINHIBITOREN

Durch Strukturoptimierung können die Eigenschaften bereits bekannter Inhibitorstrukturen verbessert werden. Mit Hilfe chemischer Modifikation der bestehenden Strukturen können z.B. die Hemmstärke, die Stabilität oder die Bioverfügbarkeit gezielt verändert werden. Außerdem können weitere Erkenntnisse über Struktur-Wirkungs-Beziehungen zwischen dem Hemmstoff und der Protease oder auch dem Erreger gewonnen werden. Auf diese Weise ist es möglich, Strukturelemente, die für die Inhibierung essentiell sind, zu identifizieren. In der vorliegenden Arbeit sollen die in einem früheren Projekt entdeckten Cysteinproteaseinhibitoren^{108,109} gegen *P. falciparum* (Malaria) und das zugehörige Enzym Falcipain-2, sowie *T. b. brucei* (Nagana) und das aus *T. b. rhodesiense* (Schlafkrankheit) stammende Enzym Rhodesain weiterentwickelt werden. Die bereits bekannten Inhibitoren dieser Klasse zeigten mit K_i -Werten im unteren mikromolaren bis oberen nanomolaren Bereich an beiden Enzymen (Rhodesain und Falcipain-2) und den Erregern (*T. b. brucei* und *P. falciparum*) gute Hemmeigenschaften.

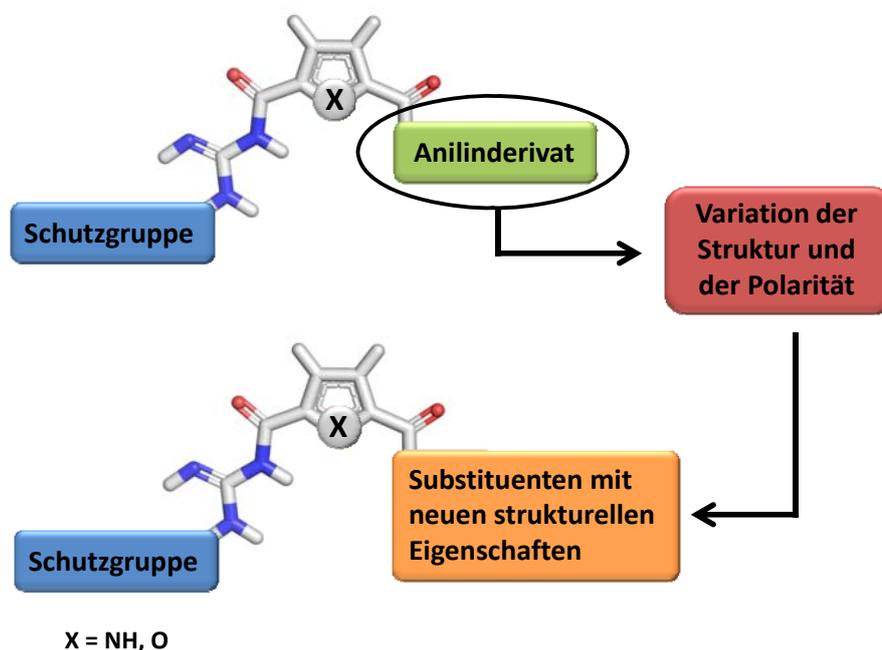


Abbildung 32: Schematische Darstellung der Cysteinproteaseinhibitoren. Die Leitstruktur besteht aus einem Furan- oder Pyrrolring, der mit N-geschütztem Guanidin und Anilinderivaten funktionalisiert ist. Durch Variation der Anilinseite sollen sowohl die Struktur als auch die Polarität verändert werden, um so zu Verbindungen mit neuen strukturellen Eigenschaften und damit auch modifizierten Hemmeigenschaften zu gelangen.

Der Aufbau der bisher entwickelten Inhibitoren basierte auf einem Grundgerüst aus einem Pyrrol- bzw. Furanring. Diese Heteroaromaten wurden mit *N*-geschützten Guanidinen auf der einen und Anilinderivaten auf der anderen Seite funktionalisiert. Daraus ergab sich der in *Abbildung 32* dargestellte schematische Aufbau der Inhibitoren der ersten Generation. Die Aufgabe war es, für die Optimierung der Inhibitor-Klasse die Anilinreste durch neue Strukturen zu ersetzen. Die Leitstruktur, das Grundgerüst aus Furan bzw. Pyrrol und dem geschützten Guanidin, wurde dafür beibehalten.

Für die Modifikation der bekannten Kernstruktur sollten sowohl heteroaromatische als auch aromatische Systeme verwendet werden. Insbesondere durch den Einsatz von Stickstoff-Heteroaromaten sollte die Möglichkeit erhöht werden, Wasserstoffbrücken und Salzbrücken zu bilden, die den Inhibitor im aktiven Zentrum fixieren. Durch eine größere Anzahl an Wechselwirkungen zwischen Enzym und Inhibitor steigt auch die Bindungsstärke eines Hemmstoffs. Dadurch lässt sich der Inhibitor nicht mehr so leicht durch ein konkurrierendes Substrat aus der Bindungstasche verdrängen. Folglich wird eine geringere Konzentration des Inhibitors benötigt, um das Enzym zu blockieren. Dies wiederum hat zur Folge, dass die Affinitätskonstante K_i kleiner wird. Die Voraussetzung für niedrigere K_i -Werte ist aber nicht nur die Ausbildung möglichst vieler Wechselwirkungen, sondern auch eine gute Passgenauigkeit in die Bindungstasche der Enzyme. Für die Inhibitoren der ersten Generation war aus Kraftfeldberechnungen mit den Proteasen bekannt, dass diese Strukturen die Möglichkeit haben, sich linear in der Bindungstasche der Enzyme anzuordnen. Exemplarisch ist in *Abbildung 33* am Enzym Rhodesain zu sehen, dass hier die Bindungstaschen S1, S3 und S1' durch diese Lage der Inhibitoren nicht besetzt werden können und eine Reihe an möglichen Bindungsstellen dadurch nicht in Kontakt mit den Verbindungen kommen. Durch die Anbringung von flexiblen und nichtlinearen Strukturelementen sollten die bisher freien Bindungstaschen (*Abbildung 33*, mit Pfeilen angedeutet) mit Hilfe einer neuen räumlichen Ausrichtung adressiert werden, um so die Bindungsaffinität zu steigern.

Gleichzeitig wurde darauf geachtet, durch eine geeignete Wahl der neuen Strukturelemente die Löslichkeit in polaren Medien (z.B. wässrigen Pufferlösungen) zu verbessern. Der Grund dafür war der unpolare Charakter von Vertretern der bereits synthetisierten Inhibitor-Klasse erster Generation und der damit verbundenen schlechten Löslichkeit in wässrigen Medien. Dadurch kam es stellenweise zu Problemen bei der Durchführung der Enzymassays, da die Substanzen ausfielen oder nicht in der gewünschten Konzentration in der Lösung vorlagen. Eine verminderte Wasserlöslichkeit kann auch für eine herabgesetzte Bioverfügbarkeit verantwortlich sein, die es schwierig macht, die bereits bekannten Inhibitoren an den Erregern und *in vivo* zu untersuchen. Durch die Auswahl und Funktionalisierung mit geeigneten Resten soll diesem hydrophoben Charakter entgegengewirkt werden.

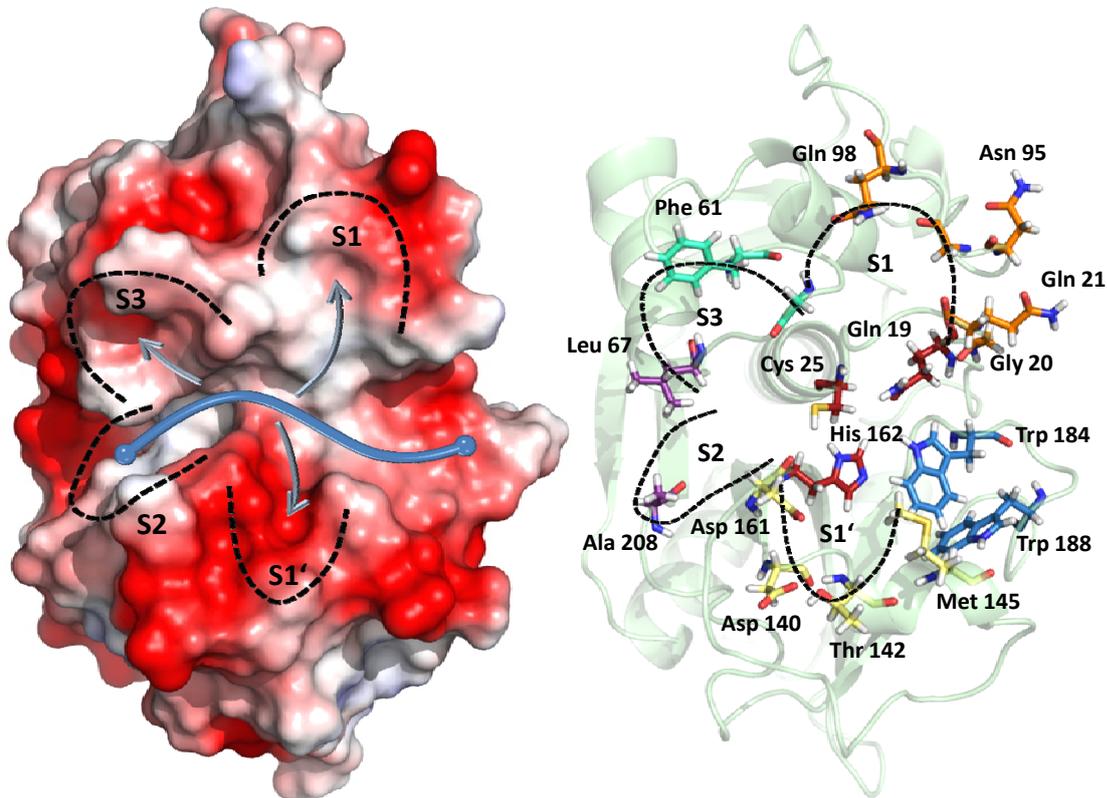


Abbildung 33: Links: Abbildung der Oberfläche von Rhodensain (PDB ID: 2P7U). Rotgefärbte Bereiche entsprechen einer negativ polarisierten Oberfläche. Die lineare Ausrichtung der Inhibitoren der ersten Generation ist schematisch durch die blaue Linie angedeutet. Durch eine Modifikation und eine Verzweigung (Pfeile) der Leitstruktur ist eine Anpassung an die Bindungstasche möglich. Rechts: Darstellung von Rhodensain mit den Aminosäureresten, die unter anderem für Wechselwirkungen mit dem Inhibitor rund um die Bindungstaschen zur Verfügung stehen.

Die abschließende fluorimetrische Untersuchung an den beiden Zielproteasen Rhodensain und Falcipain-2 soll Aufschluss über die Hemmaktivität in Bezug auf die Strukturveränderung der Inhibitoren geben. Dazu werden die neu hergestellten Verbindungen mit den bereits bekannten Resultaten der ersten Inhibitorgeneration verglichen und bezogen auf deren Qualität eingeordnet.

3.2 ENTWICKLUNG EINER SCREENINGMETHODE AM HARZ FÜR DIE VIRALE PROTEASE HCoV 229E M^{PRO}

Die kombinatorische Festphasenpeptidsynthese stellt eine zeitsparende und effiziente Synthesemethode dar, die es erlaubt, große Substanzbibliotheken unterschiedlicher Peptide in vergleichsweise kurzem Zeitrahmen herzustellen. Üblicherweise werden die so synthetisierten Substanzen vom Harz abgespalten und in Lösung für weitere Untersuchungen wie zum Beispiel Enzymaktivitätstests verwendet. Diese Vorgehensweise setzt intensive Reinigungsschritte der einzelnen Verbindungen voraus, um reproduzierbare Ergebnisse zu erhalten. Ein wesentlich zeitsparenderer Ansatz ist die Analyse der Substanzen „on bead“, also noch am Harz gebunden. Dadurch wird eine aufwändige Reinigung der Verbindungen umgangen. Für einige Enzyme haben sich bereits Methoden dieser Art etabliert.⁷⁴ Dennoch müssen die Bedingungen eines Screenings mit harzgebundenen Strukturen individuell an das biologische Zielsystem angepasst werden. Vor allem für empfindliche Proteasen ist die geeignete Auswahl von Puffersystemen und Substanz- sowie Harzeigenschaften notwendig. Im Falle von Enzymassays sind Parameter wie pH-Wert, Inkubationszeit, Proteasestabilität und Wechselwirkungen des Harzes mit der Protease Kriterien, die beachtet werden müssen.

Die Hauptprotease des SARS CoV (Clan PA, S30) stellt einen vielversprechenden Angriffspunkt für die Entwicklung von Inhibitoren dar. Dafür ist die Erforschung von Leitstrukturen notwendig, um geeignete Strukturen zu ermitteln, die Hemmeigenschaften an der Protease aufweisen. Dies sollte in einer vorangegangenen Arbeit über ein Screening einer großen Anzahl an harzgebundenen Substanzen geschehen. Aufgrund der unzureichenden Stabilität der Protease unter Laborbedingungen, die durch eine wesentlich längere Inkubationszeit mit harzgebundenen Substanzen verursacht wurde, konnten bei ersten Tests mit diesem Enzym keine reproduzierbaren Ergebnisse erzielt werden.¹¹⁰ Auch in der Literatur sind keine Beispiele bekannt, bei der eine Bibliothek „on bead“ an dieser Protease untersucht wurde. Es stellt sich also die Frage, ob es dennoch möglich ist, mit der Methode eines Festphasenscreenings neue Leitstrukturen für Inhibitoren der SARS CoV M^{Pro} zu entwickeln.

Einen möglichen Ausweg kann die Hauptprotease des humanen CoV 229E liefern. Strukturell gesehen sind beide Proteasen (SARS CoV M^{Pro} und HCoV 229 M^{Pro}) eng miteinander verwandt. Beide gehören der Klasse der chymotrypsinähnlichen Proteasen des Mischclans PA an und zählen wegen ihren katalytischen Eigenschaften zu den Cysteinproteasen. Aufgrund der evolutionären Verwandtschaft ist bekannt, dass Strukturen, die eine der beiden Proteasen inhibieren, auch einen Effekt auf das andere Enzym ausüben können. Für die HCoV 229E M^{Pro} gibt es bis zu diesem Zeitpunkt ebenfalls keine Anhaltspunkte in der Literatur, ob ein Screening „on bead“ mit Erfolg durchgeführt werden kann. Der Vorteil bei der M^{Pro} des humanen Vertreters ist die wesentlich bessere Stabilität unter Laborbedingungen. Desweiteren eignet sich das

3. Zielsetzung

Enzym auch, da es effizient in Zellkulturen gezüchtet werden kann und über längere Zeit bei der Lagerung und im Experiment stabil bleibt. Es besteht also die Möglichkeit, dass diese Protease die längere Inkubationszeit mit harzgebundenen Substanzen ohne Aktivitätsverlust oder Denaturierung überstehen würde.

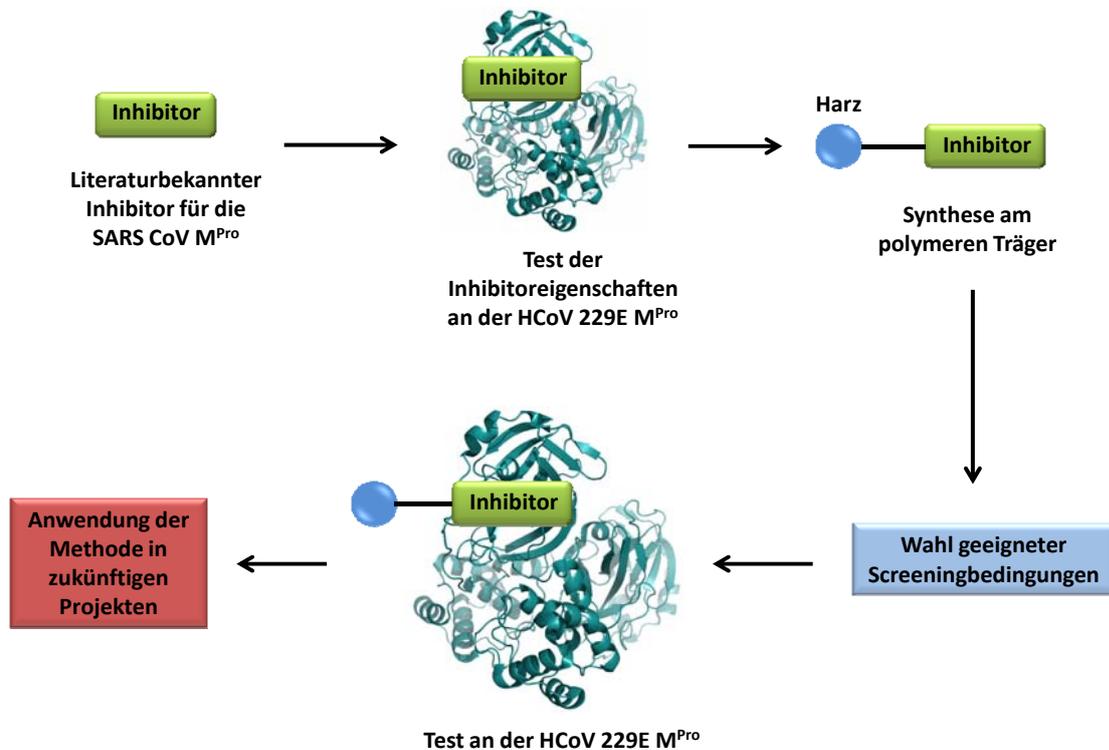


Abbildung 34: Schematische Darstellung der geplanten Vorgehensweise bei der Entwicklung eines harzgebundenen Inhibitors an der Hauptprotease des HCoV 229E.

Ausgehend von diesem Sachverhalt sollten in dieser Arbeit geeignete Screeningbedingungen entwickelt werden, die es erlauben, harzgebundene Inhibitoren an der HCoV 229E M^{Pro} zu untersuchen. Dafür sollte eine bereits literaturbekannte Verbindung ausgesucht werden, die gute Hemmeigenschaften an beiden Proteasen (SARS CoV M^{Pro} und HCoV 229E M^{Pro}) aufweist. Der ausgewählte Inhibitor soll chemisch so funktionalisiert werden, dass er an einen polymeren Träger gebunden werden kann, ohne seine Hemmeigenschaften gegenüber den Enzymen zu verlieren. Dieser Sachverhalt soll in einem Screening überprüft werden. Desweiteren war geplant, diesen festphasengebundenen Inhibitor als Testsubstanz zu verwenden, um die entwickelte Screeningmethode auf ihre Anwendbarkeit hin zu überprüfen. Durch die Untersuchung der Hemmeigenschaften an der M^{Pro} des HCoV 229E sollte eine Standardmethode für ein Festphasenscreening an dieser Protease erarbeitet werden.

Letztlich sollte die Durchführbarkeit des Enzymassays an der HCoV 229E M^{Pro} getestet werden. Dazu war geplant, ausgewählte peptidische Strukturen zu synthetisieren und mit dem entworfenen Assay auf ihre Aktivität an der M^{Pro} zu testen.

3.3 DURCHFÜHRUNG EINES SCREENINGS MITTELS DYNAMISCHER KOMBINATORISCHER CHEMIE AN UNTERSCHIEDLICHEN CYSTEINPROTEASEN

Die dynamische kombinatorische Chemie kann als Methode für die Identifizierung von Enzyminhibitoren genutzt werden. Verschiedene Bausteine werden dazu durch eine reversible Reaktion ins Gleichgewicht gebracht und durch die Zugabe eines Templates – im Fall der Untersuchung von Inhibitoren z.B. ein Enzym – wird die Bildung von thermodynamisch begünstigten Verbindungen verstärkt. Auf diese Weise lassen sich effektiv potentielle Inhibitorstrukturen finden (*Abbildung 35*).

Die zentrale Herausforderung in diesem Projekt besteht darin, durch die Entwicklung einer dynamischen Bibliothek unterschiedliche Cysteinproteasen zu untersuchen. Dadurch können Hinweise auf mögliche neue Leitstrukturen erhalten oder Selektivitäten zwischen verschiedenen Proteasen ermittelt werden.

Zu Beginn soll eine Auswahl an Enzymen getroffen werden, die eine evolutionäre Verwandtschaft aufweisen; dadurch soll sich die Möglichkeit ergeben, die Ergebnisse zwischen strukturell ähnlichen Proteasen zu vergleichen. Auf diese Weise können Unterschiede beim Inhibierungsverhalten einer dynamischen Bibliothek festgestellt und Selektivitäten innerhalb einer Enzymklasse identifiziert werden. Nach der Auswahl der Proteasen soll eine geeignete reversible Reaktion gewählt werden, die auf alle ausgesuchten Proteasen angewendet werden kann, ohne dass das Screening beeinflusst wird. Es muss darauf geachtet werden, dass die Reaktion für alle Proteasen einsetzbar ist und keine Nebenreaktionen mit den Enzymen auftreten. Dazu müssen Vorversuche bei unterschiedlichen Bedingungen durchgeführt werden. Die Kompatibilität der Reaktion bezogen auf die Assaybedingungen (pH-Wert, Löslichkeitsverhalten im wässrigen Medium, Temperatur, etc.) soll ebenso untersucht werden wie die Eignung gegenüber den einzelnen Enzymen.

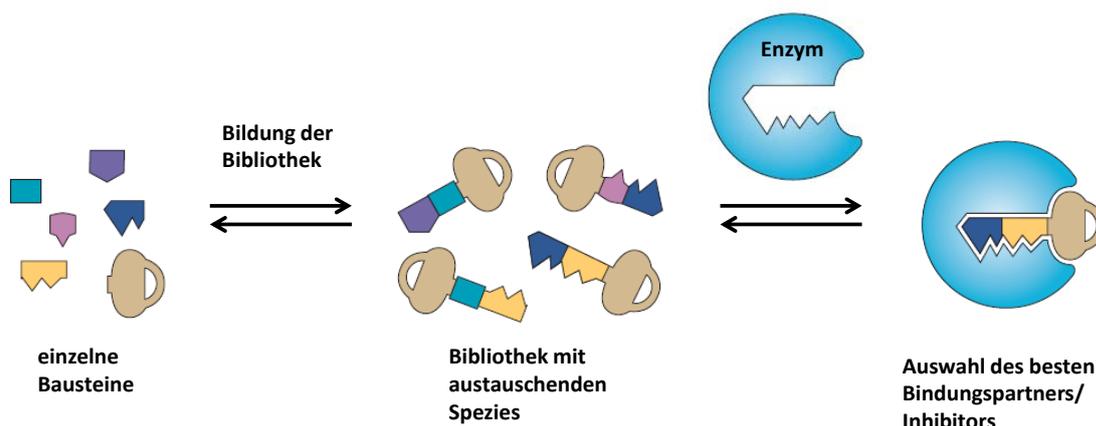


Abbildung 35: Entstehung und Anwendung einer dynamischen kombinatorischen Bibliothek. Durch die Auswahl einzelner Bausteine, die durch eine reversible Reaktion miteinander im Gleichgewicht stehen, wird eine Bibliothek gebildet. Bei Anwesenheit eines Enzyms als Templat bildet sich der beste Bindungspartner (bzw. Inhibitor) vermehrt und kann identifiziert werden (reprinted with permission).⁹⁸

Für die Herstellung der dynamischen Bibliothek sollen anhand von Literaturdaten und Erfahrungen aus früheren Projekten^{108,109} Verbindungen mit unterschiedlichen Strukturen und Funktionalitäten ausgewählt werden. Dabei war geplant, vornehmlich kleine Molekülstrukturen ($M < 500$ g/mol) einzusetzen, um die Variation der Bausteine in einem definierten Rahmen von Molekülgrößen zu halten. Die Verbindungen werden dann unter Berücksichtigung der benötigten funktionellen Gruppen in Bezug auf die reversible Reaktion synthetisiert. Die Größe der Bibliothek soll im mittleren Bereich, also einer Anzahl von ca. 20 Substanzen liegen. Dadurch soll eine handhabbare Größe und zugleich eine genügende Diversität erreicht werden.

Anschließend ist es notwendig, die Screeningbedingungen sowohl an die Enzyme als auch an die dynamische Bibliothek anzupassen. Parameter wie pH-Wert, Inkubationszeit und Puffersystem müssen auf das System abgestimmt werden, um reproduzierbare Ergebnisse zu erhalten. Dabei sollen die Resultate der Vortests als Grundlage dienen. An diesem Punkt wird sich zeigen, ob die Auswahl der Proteasen mit der gewählten reversiblen Reaktion und den Screeningbedingungen vereinbar ist.

Für die Identifizierung der aktiven Spezies innerhalb der dynamischen Bibliothek ist geplant das Prinzip der Dekonvolution anzuwenden (siehe *Kapitel 2.4.3*). Im Hinblick auf die geplante Größe der Bibliothek ist diese Methode durchführbar und bietet den Vorteil, dass aufwändige Untersuchungen der Gesamtbibliothek mittels MS, HPLC und NMR umgangen werden können. Die erhaltenen Ergebnisse sollen dann in Bezug auf mögliche Leitstrukturen für Inhibitoren, Struktur-Wirkungs-Beziehungen oder Selektivitäten ausgewertet werden. Dabei sollen die verschiedenen Proteasen nicht nur einzeln betrachtet werden, sondern auch mit verwandten Vertretern aus dem Screening verglichen werden.

4. DURCHFÜHRUNG UND DISKUSSION

4.1 OPTIMIERUNG VON INHIBITOREN GEGEN RHODESAIN UND FALCIPAIN-2

4.1.1 STAND DER FORSCHUNG

Die Tropenkrankheiten Malaria (Erreger: *P. falciparum*) und Afrikanische Trypanosomiasis (Erreger: *T. b. rhodesiense*) stellen auch im 21. Jahrhundert immer noch eine ernste Bedrohung für die Bevölkerung der betroffenen Gebiete dar. Nach wie vor gibt es für beide Erreger keinen wirksamen Impfstoff. Zudem haben viele Erregerstämme gerade bei Malaria bereits Resistenzen entwickelt, wodurch eine wirkungsvolle Therapie immer schwieriger wird. Medikamente gegen die Afrikanische Trypanosomiasis (Schlafkrankheit) sind zum Teil mit starken Nebenwirkungen verbunden. Bei Melarsoprol, einem Arzneistoff, der im Endstadium der Krankheit verabreicht wird, sterben 2–10 % der Patienten bereits an den Nebenwirkungen der giftigen Arsenverbindung. Eine Verbesserung dieser unzureichenden Situation in Bezug auf Malaria und Schlafkrankheit können neue Wirkstoffe herbeiführen, die andere Ansatzpunkte als die bisherigen Therapeutika besitzen. Auf der Suche nach biologischen Zielstrukturen gerieten die Cysteinproteasen der Erreger zunehmend in den Fokus der Forschung.

4. Durchführung und Diskussion

Die Entwicklung von Inhibitoren für parasitäre Cysteinproteasen sowie die Anzahl der gefundenen Strukturen von potentiellen Hemmstoffen stiegen in den letzten Jahren stark an. Von kleinen Molekülen über nichtpeptidische¹¹¹ oder peptidomimetische^{112,113} Strukturen, metallbasierte Hemmstoffe¹¹⁴ bis hin zu großen Peptid- und Proteinstrukturen beinhaltet die Zahl der gefundenen Strukturen eine große Bandbreite an Funktionalitäten und Stoffklassen.^{11,12,13,21,115} In Bezug auf Malaria und die Afrikanische Trypanosomiasis eignen sich zwei Cysteinproteasen besonders für die Entwicklung von Inhibitoren.

Die Cysteinproteasen Rhodesain (*T. b. rhodesiense*) und Falcipain-2 (*P. falciparum*) spielen in der Entwicklung und Vermehrung der Erreger eine entscheidende Rolle¹¹⁶ und stellen dadurch einen interessanten Angriffspunkt auf der Suche nach neuen Therapeutika dar. Es konnte bereits im Experiment gezeigt werden, dass die Hemmung von Cysteinproteasen sowohl *in vitro* als auch *in vivo* zum Absterben von Trypanosomen führt.¹¹⁷

Sowohl Rhodesain als auch Falcipain-2 gehören zur Familie der papainähnlichen Cysteinproteasen (CA, C1) und besitzen daher eine ähnliche Struktur (Abbildung 36, links). Es existiert eine Vielzahl von Inhibitoren, die beide Enzyme (und auch andere Cysteinproteasen) hemmen können. Beispielsweise konnte aus dem Pilz *Aspergillus japonicus* das Epoxid **52** (E-64; Abbildung 36, rechts) isoliert werden,^{118,119} das mittlerweile als Standardinhibitor in Experimenten für fast alle Cysteinproteasen verwendet wird.

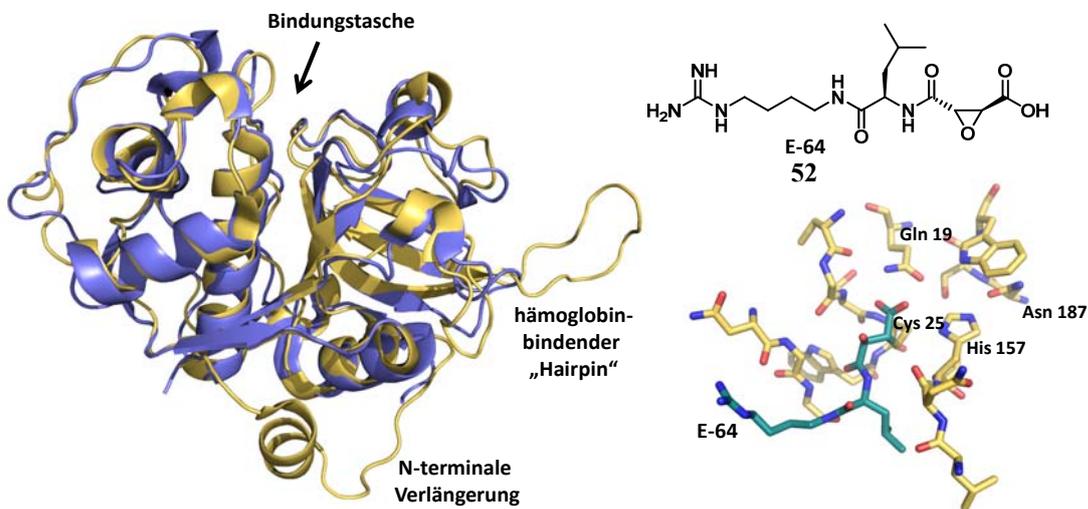


Abbildung 36: links: Überlagerte Strukturen von Falcipain-2 (gelb) und Rhodesain (lila). Das aktive Zentrum ist bei beiden Enzymen stark konserviert. Falcipain-2 besitzt zusätzlich eine Haarnadelstruktur um an Hämoglobin zu binden und eine N-terminale Verlängerung der Aminosäuresequenz. Rechts: Struktur von E-64 (52; oben). Kristallstruktur der Bindungstasche von Falcipain-2 (gelb) mit E-64 (grün) (unten).

Der Hemmmechanismus hängt maßgeblich von der Stoffklasse der Inhibitoren ab. So sind viele der Inhibitoren irreversibel und binden kovalent an das Enzym. Dies wird unter anderem durch elektrophile Angriffspunkte am Inhibitor erreicht, die vom nukleophilen Schwefel des katalytischen Cysteinrestes angegriffen werden können. Inhibitoren mit dieser Eigenschaft besitzen funktionelle Gruppen wie z.B. kleine Ringe (Epoxide, Aziridine, Thiirane, Cyclopropane, β -Lactame und β -Lactone),¹¹⁸ Michaelssysteme,¹²⁰ Säuren, Ester, Amide, Diketone, Disulfide,¹¹⁵ Vinylsulfone¹⁶ und weitere Vertreter. Reversible Inhibitoren sind nur wenige bekannt, peptidische Aldehyde wie Leupeptine und Chymostatine können zu dieser Inhibitorklasse gezählt werden, aber auch Methylketone, Trifluormethylketone, Nitrile und lysosomale Basen.¹¹⁵

In dieser Arbeit wird die Weiterentwicklung einer neu entdeckten Verbindungsklasse von Inhibitoren für *T. b. brucei* (Nagana) und *P. falciparum* (Malaria), bzw. für die Enzyme Rhodesain (*T. b. rhodesiense*) und Falcipain-2 (*P. falciparum*) vorgestellt. Diese Strukturen erster Generation basieren in ihrem Grundgerüst auf *N*-geschützten Guanidino-Pyrrolen und -Furanen. Durch die Veränderung der Inhibitorstrukturen sollen Erkenntnisse über Struktur-Wirkungs-Beziehungen gewonnen werden und die Hemmeigenschaften verbessert werden.

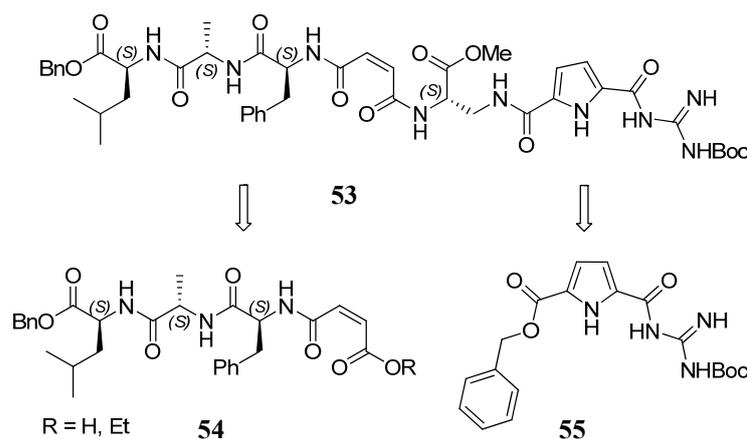


Abbildung 37: Durch ein Screening an Aspartat- und Cysteinproteasen wurde die Aktivität der Strukturen **53–55** gegenüber Falcipain-2 entdeckt. Verbindung **53** $IC_{50}(FP-2) = 3.1 \mu M$, $IC_{50}(P.f.) = 1.7 \mu M$; Verbindung **54** für $R = Et$: $IC_{50}(FP-2) = 34.0 \mu M$, $IC_{50}(P.f.) = 29.0 \mu M$; Verbindung **55** $IC_{50}(FP-2) = 33.0 \mu M$. Aus Verbindung **55** wurde eine Leitstruktur für weitere Verbindungen entwickelt.

Die gezielte Synthese und Optimierung dieser pyrrol- und furanbasierten Cysteinproteaseinhibitoren ging von dem Pyrrol-Guanidinderivat **53** (Abbildung 37) aus, das in einem Übersichts-Screening an Aspartat- und Cysteinproteasen eine gute Hemmeigenschaft gegenüber Falcipain-2 zeigte ($IC_{50}(FP-2) = 3.1 \mu M$, $IC_{50}(P.f.) = 1.7 \mu M$).^{85,109} Diese sehr komplexe Struktur wurde in einen peptidischen (**54**) und einen nichtpeptidischen Teil (**55**) zerlegt und beide Fragmente separat an Falcipain-2 untersucht. Ausgehend von Verbindung **55** (Abbildung 37) mit einem IC_{50} -Wert an

4. Durchführung und Diskussion

Falcipain-2 von 33.0 μM wurden dann in vorangegangenen Projekten unterschiedliche Vertreter synthetisiert und sowohl an den Erregern *P. falciparum* und *T. b. brucei* als auch an den isolierten Enzymen Rhodesain und Falcipain-2 getestet.^{108,109}

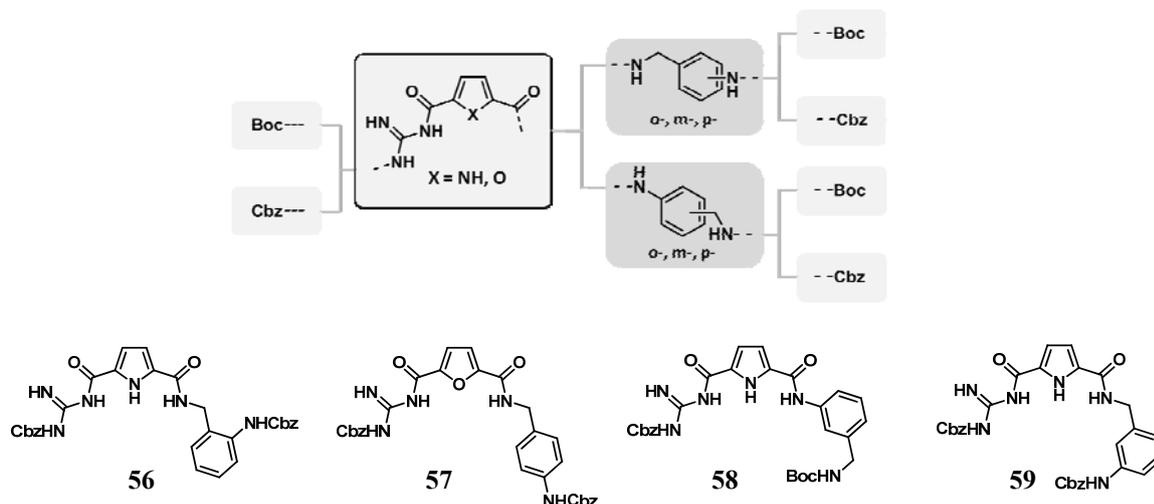


Abbildung 38: Oben: Schematischer Aufbau der Inhibitoren auf Pyrrol- und Furanbasis. Unten: Vier Vertreter von Inhibitoren, die aufgrund der entwickelten Leitstruktur in einer früheren Arbeit synthetisiert und an den Erregern, sowie den isolierten Enzymen und Säugetierzellen auf ihre Aktivität getestet wurden.^{108,109}

Tabelle 7: IC_{50} - und K_i -Werte, an den Erregern *P. falciparum* und *T. b. brucei* sowie den Enzymen Falcipain-2 und Rhodesain für die besten vier Vertreter der bereits synthetisierten ersten Inhibitorgeneration (56–59).^{108,109}

Nr.	Erreger (IC_{50} , μM)		Enzyme (K_i , μM)		Zytotoxizität (IC_{50} , μM)
	<i>P. falciparum</i>	<i>T. b. brucei</i>	Falciapin-2	Rhodesain	J774.1 ^[e]
56	4.18 ^a	1.23	0.52 ^c	0.11	>100
57	1.06 ^b	5.65	1.08 ^c	0.08	54.9
58	1.38 ^a	0.22	0.62 ^d	0.11	18.7
59	3.38 ^b	2.32	1.22 ^d	0.10	>86

[a] Erregerstamm W2; [b] Erregerstamm FCBR; [c] Substratkonzentration: 25 μM ; [d] Substratkonzentration: 40 μM ; [e] Säugetier-Makrophagenstamm J774.1.

Es wurden verschiedene Verbindungen hergestellt, die nach dem in *Abbildung 38* (oben) schematisch dargestellten Strukturmuster aufgebaut waren. Sie bestanden aus

heterocyclischen Kernen (Pyrrol oder Furan), die auf einer Seite mit Boc- bzw. Cbz-geschütztem Guanidin und auf der anderen Seite mit Anilinderivaten substituiert waren. Diese Strukturen wiesen sowohl bei Tests an den Erregern als auch im Enzymscreening Hemmeigenschaften im mikromolaren Bereich auf. Vier Vertreter dieser Verbindungsklasse (**56–59**) sind in *Abbildung 38* (unten) dargestellt. Zu diesen Verbindungen gehören die in *Tabelle 7* aufgelisteten Werte. An den Erregern zeigten diese Substanzen mit Werten von $IC_{50}(\mathbf{57}) = 1.06 \mu\text{M}$ bis $IC_{50}(\mathbf{56}) = 4.18 \mu\text{M}$ an *P. falciparum* und $IC_{50}(\mathbf{58}) = 0.22 \mu\text{M}$ bis $IC_{50}(\mathbf{59}) = 1.22 \mu\text{M}$ an *T. b. brucei* sehr gute Resultate. Auch an den isolierten Enzymen Falcipain-2 mit dem besten Vertreter **56** ($IC_{50} = 0.52 \mu\text{M}$) und Verbindung **59** bei Rhodesain ($IC_{50} = 0.11 \mu\text{M}$) konnten sie überzeugen. Zugleich wiesen sie eine geringe bis moderate Zytotoxizität von Werten zwischen $IC_{50}(\mathbf{58}) = 18.7 \mu\text{M}$ und über $100 \mu\text{M}$ für **56** an Makrophagen auf.^{108,109} Dieser Sachverhalt ist für eine spätere Untersuchung in *in vivo*-Experimenten von Bedeutung.

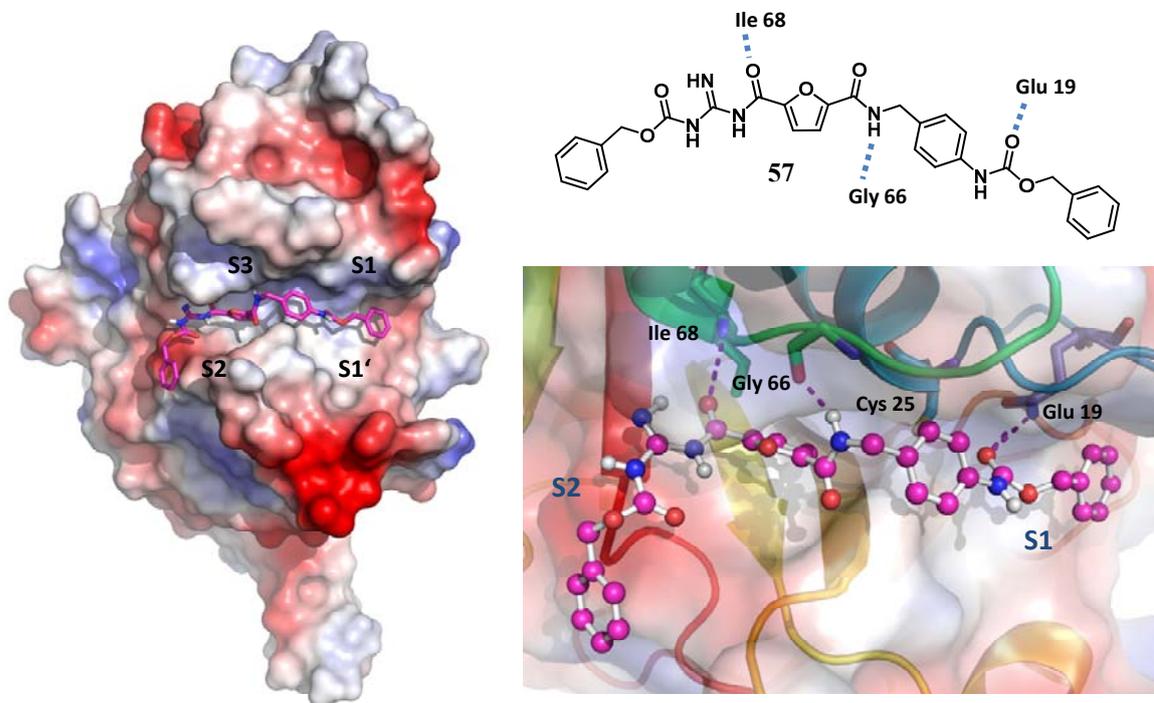


Abbildung 39: Links: Kristallstruktur von Falcipain-2 (PDB ID: 1YVB) mit berechnetem Inhibitor **57** im aktiven Zentrum des Enzyms. Die Bindungstaschen S1 und S2 werden durch den Inhibitor besetzt. Die Farben der Proteinoberfläche entsprechen dem elektrostatischen Potential (blau: positiv, rot: negativ). Rechts: Darstellung der Inhibitorstruktur mit den zugehörigen Wasserstoffbrückenbindungen (gestrichelte, lila Linien) zu Glu 19, Gly 66 und Ile 68. Das Cbz-geschützte Guanidin passt in die hydrophobe S2-Tasche, zusätzlich wird das katalytische Cys 25 vom Furan- und Anilinring abgeschirmt.

Mit dieser neuen Klasse von nichtpeptidischen Inhibitoren konnten erste Erkenntnisse über Struktur-Wirkungs-Beziehungen gewonnen werden. Auch zeigten Kraftfeldrechnungen an Falcipain-2 (*Abbildung 39*) und Rhodesain (*Abbildung 40*), dass die

Inhibitoren eine gute Passform und Affinität zu den jeweiligen Bindungstaschen der beiden Enzyme besaßen.¹⁰⁹ Durch eine lineare Struktur konnte durch den Inhibitor **57** am Beispiel von Falcipain-2 und die Verbindung **59** die Bindungstaschen S2 und partiell auch S1 beider Enzyme besetzt werden. Diese ersten Erkenntnisse stellten die Grundlage für eine Weiterentwicklung der Inhibitorklasse erster Generation dar.

Weitere Kraftfeldrechnungen mit dem Programm Autodock an beiden Enzymen und die entsprechende Visualisierung ergaben, dass innerhalb der Bindungstasche noch Freiräume – wie z.B. die S1' und die S3 Tasche – vorliegen, die nicht oder nur teilweise durch die bis jetzt synthetisierten Inhibitoren ausgefüllt werden (*Abbildung 40*). Da durch eine bessere Anpassung der Strukturen an die Bindungstasche eine gewisse Selektivität beispielsweise gegenüber anderen Cysteinproteasen erreicht werden könnte, soll nun eine weitere Generation von Inhibitoren entwickelt werden, die ausgehend von den bisher bekannten Verbindungen Modifikationen auf der Anilinseite beinhaltet. Durch diese Strukturveränderung könnte eine Verbesserung der bisher erreichten Ergebnisse erzielt werden.

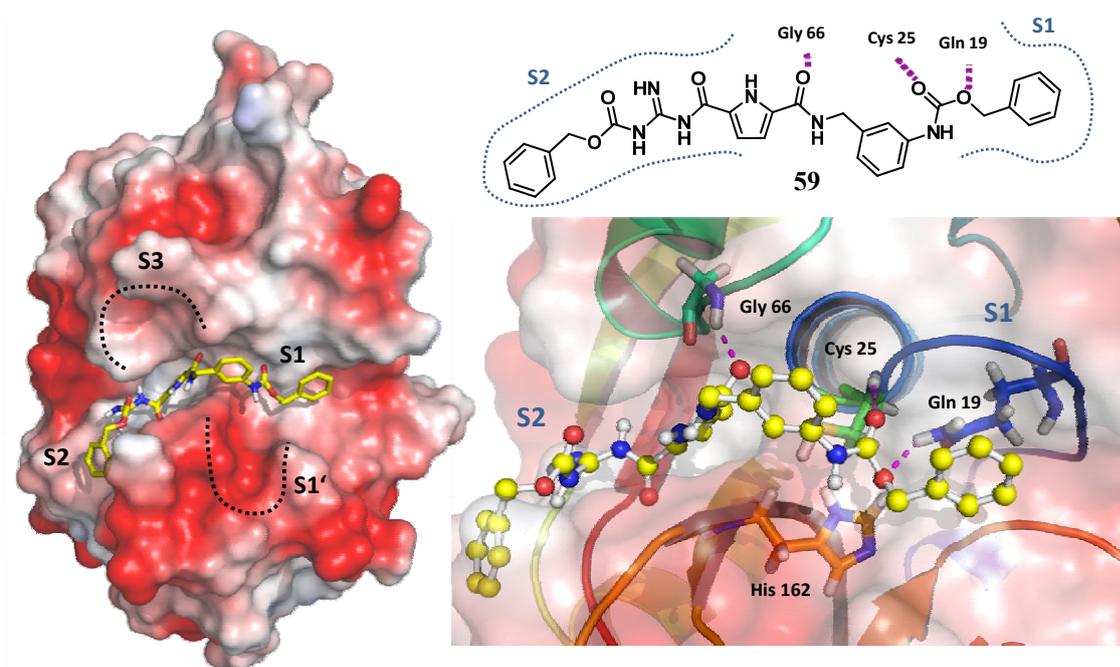


Abbildung 40: Berechnete Struktur des Inhibitors **59** im aktiven Zentrum von Rhodesain (PDB ID: 2P7U). Die Farben der Proteaseoberfläche entsprechen dem elektrostatischen Potential (blau: positiv, rot: negativ). Links: Die Bindungstaschen S1 und S2 werden vom Inhibitor besetzt, S1' und S3 (als schwarze gestrichelte Linien angedeutet) bleiben dagegen leer und bieten Raum für die Modifikation der Inhibitoren. Rechts: Darstellung der Inhibitorstruktur mit den zugehörigen Wasserstoffbrückenbindungen (gestrichelte, lila Linien) zu Glu 19, Gly 66 und Cys 25. Das Cbz-geschützte Guanidin liegt in der hydrophoben S2-Tasche, zugleich wird das katalytische Cys 25 vom Pyrrol- und Anilinring abgeschirmt. (reprinted with permission)¹⁰⁹

4.1.2 ENTWICKLUNG DER NEUEN INHIBITORSTRUKTUREN

Zunächst wurde anhand der Strukturen der ersten Inhibitorgeneration nach Ansatzpunkten für die Modifikation der neuen Verbindungen gesucht. Ähnlich wie bei der Leitstruktur wurde es als sinnvoll erachtet, bevorzugt aromatische Komponenten zu wählen, da sich die Bindungstaschen S1 und S2 des Enzyms im Falle von Falcipain-2 und Rhodesain als überwiegend unpolar darstellten. Zudem wurde diese Präferenz bereits in einem vorangegangenen Projekt¹⁰⁸ mit vergleichbaren Verbindungen bestätigt. Ausgehend von den schon bekannten Strukturen sollten mit den neuen Inhibitoren die Bindungstasche S1 besser ausgefüllt werden und zusätzlich weitere Möglichkeiten für Wechselwirkungen am Inhibitor geboten werden.

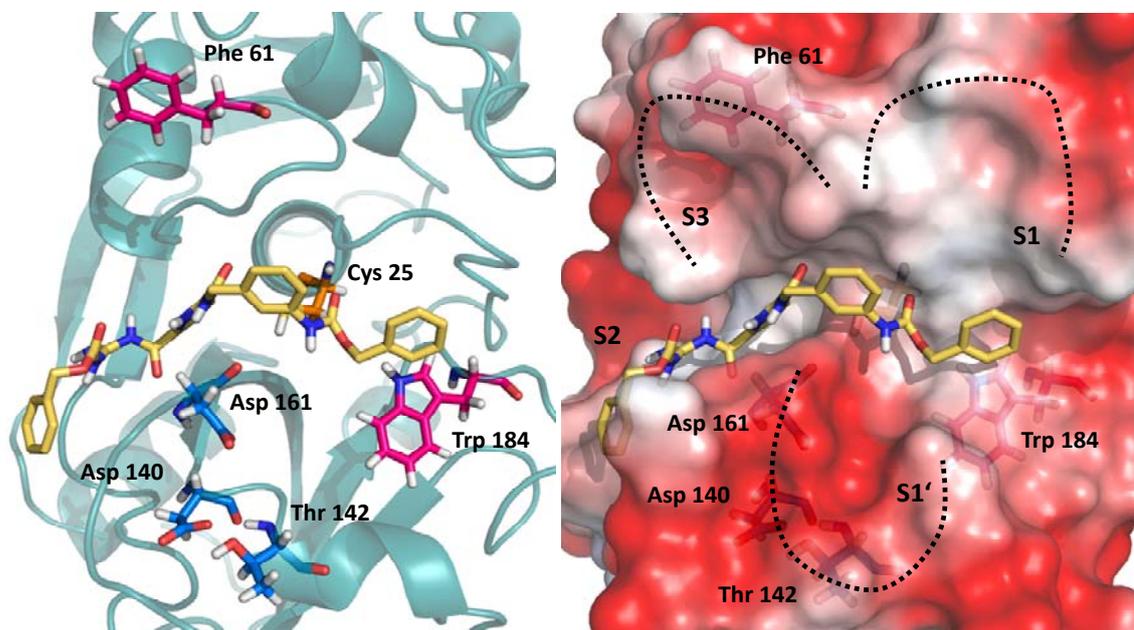


Abbildung 41: Struktur von Rhodesain (PDB ID: 2P7U; grün) mit Aminosäuren, die sich für mögliche Wechselwirkungen bei verzweigten Inhibitorstrukturen eignen. Links: Die berechnete Struktur des Inhibitors 59 (gelb) liegt in der S1 und S2 Tasche. Aromatische Reste können über π - π -Wechselwirkungen mit Phe 61 in der S3 und Trp 184 (magenta) gebunden werden. Für polare Wechselwirkungen stünden die Aminosäuren Asp 140, Thr 142 und Asp 161 der S1' Tasche zur Verfügung. Rechts: Darstellung der Oberfläche des Enzyms, um die Kavität der Bindungstaschen besser sichtbar zu machen. Die Farben der Proteaseoberfläche entsprechen dem elektrostatischen Potential (blau: positiv, rot: negativ). Es ist zu erkennen, dass S1, S3 und S1' unbesetzt bleiben.

Die Analyse der Aminosäuren, die das aktive Zentrum umgeben, zeigte Ansatzpunkte sowohl über polare Wechselwirkungen, als auch über elektrostatische Wechselwirkungen mit der Protease zu interagieren (Abbildung 41). In der Bindungstasche S1' liegen zwei Asparaginsäurereste (Asp 140, Asp 161) und ein Threoninrest (Thr 141) eng beieinander und bilden einen Angriffspunkt für polare Wechselwirkungen. Ein Phenylalanin (Phe 61)

in der S3 Bindungstasche und ein Tryptophan (Trp 184), welches dicht am aktiven Cystein (Cys 25) liegt, können durch π - π -Wechselwirkungen als Bindungspartner für den Inhibitor fungieren. Die neuen Inhibitoren müssen folglich die Eigenschaft besitzen, Wasserstoffbrücken, bzw. polare und zugleich aromatische Wechselwirkungen ausbilden zu können. Dies sollte durch die Verwendung von Heteroaromaten wie z.B. Tryptophan, Histidin und Pyridin ermöglicht werden. Gleichzeitig sollte man durch eine verzweigtere Struktur dem Anspruch gerecht werden, die noch unbesetzten Bindungstaschen durch eine flexiblere Struktur gezielt zu adressieren.

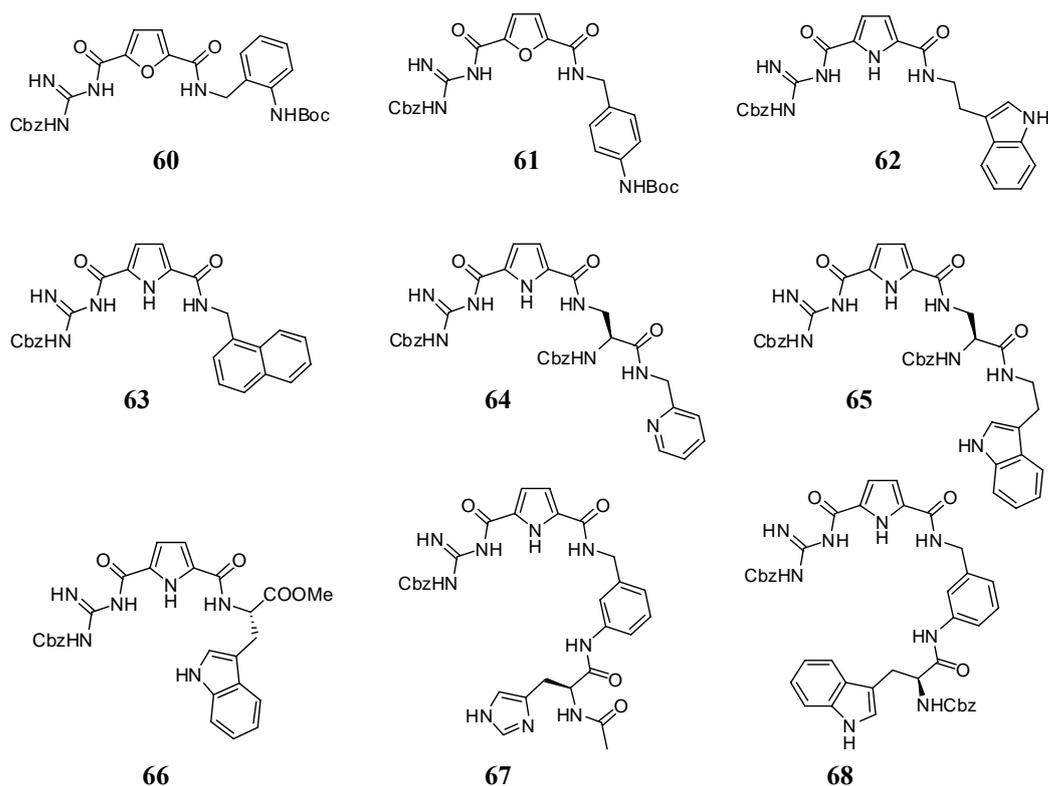


Abbildung 42: Übersicht der entwickelten Strukturen der neuen Inhibitorgeneration für Falcipain-2 und Rhodesain. Die Variation zur ersten Generation besteht in der Verwendung von aromatischen Resten, die fähig sind Wasserstoffbrückenbindungen und zugleich π - π -Wechselwirkungen über (hetero-)aromatische Systeme einzugehen.

Unter diesen Gesichtspunkten wurden die in *Abbildung 42* gezeigten Verbindungen entwickelt. Die Furanverbindungen **60** und **61** unterschieden sich von Vertretern der ersten Generation lediglich durch die Schutzgruppe (Boc statt Cbz am Anilinrest). Diese Variation sollte zeigen, in wie weit die Art der Schutzgruppe am Anilinrest für eine effektive Inhibierung der Protease von Bedeutung ist. Die anderen Verbindungen wurden auf Pyrrolbasis mit unterschiedlichen Resten entworfen. Verbindung **63** besitzt als einzige Pyrrolverbindung keinen weiteren Heteroaromaten. Dadurch sollte es möglich sein, die Notwendigkeit dieses Strukturelementes beispielsweise im Vergleich zu Verbindung **62**

zu testen. Durch den Einsatz eines chiralen Bausteins mit einer Cbz-Schutzgruppe am Amin unterschieden sich Verbindung **64** und **65** von den übrigen Molekülen. Struktur **67** und **68** bestehen beide aus einem *meta*-substituierten Anilinderivat, das im Fall von **67** mit einem acetylierten Histidin und bei **68** mit einem Cbz-geschützten Tryptophan substituiert war. Es wurde also einmal eine hydrophobe und einmal eine basische Aminosäure gewählt. Der Vergleich der Verbindungen **62** und **66** lässt erkennen, dass sie sich nur durch einen Methylester unterscheiden. Bei **62** wurde Tryptamin und bei **66** der Methylester des Tryptophans eingebaut.

Aus den Daten der ersten Generation ging nicht eindeutig hervor, welche Strukturmerkmale auf der Seite des Anilinrestes vorhanden sein müssen, um eine gute Hemmwirkung zu erzielen. Beispielsweise war die Substitution des Anilinringes nicht primär für eine effektive Hemmwirkung von Bedeutung. Aus diesem Grund wurden die neuen Verbindungen in ihrer Beschaffenheit in einem breiteren Strukturspektrum variiert, um dadurch eindeutigere Resultate in ihrer Wirkung zu erhalten. Dennoch lässt sich beim Vergleich der Strukturen gut die durchaus gewollte Ähnlichkeit der Verbindungen erkennen. Dadurch sollten bei einer Gegenüberstellung der Ergebnisse Aussagen über die Relevanz bestimmter Strukturelemente möglich sein.

Im folgenden Kapitel wird die Synthese der hier vorgestellten zweiten Generation von Inhibitoren erläutert.

4. Durchführung und Diskussion

4.1.3 SYNTHESE DER NEUEN INHIBITORGENERATION

4.1.3.1 Darstellung der Verbindungen 60 und 61

Für die Synthese der Verbindungen **60** und **61** wurde zunächst der Furan-Guanidin-Baustein **72** hergestellt. Dabei wurde auf eine in der Literatur bekannte und in einer früheren Arbeit weiterentwickelte Synthese zurückgegriffen.^{85,121}

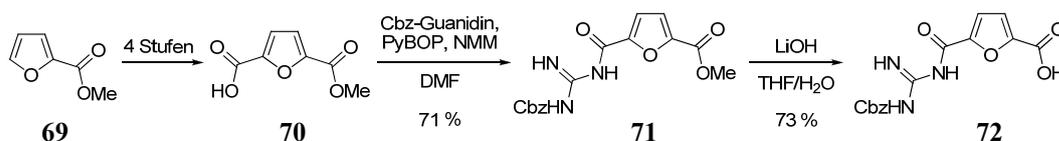


Abbildung 43: Syntheseroute für den Furanbaustein **72**, der als Basis für die Darstellung von Verbindungen **60** und **61** verwendet wurde.

Zunächst wurde Verbindung **70** nach Vorschrift¹²¹ hergestellt und anschließend mit Cbz-Guanidin, dem Kupplungsreagenz PyBOP und *N*-Methylmorpholin (NMM) als Base in DMF zum gewünschten Produkt **71** umgesetzt. Die anschließende Verseifung des Methylesters mit LiOH in einem THF/Wasser-Gemisch ergab den Furanbaustein **72** mit einer Ausbeute von 73 %.

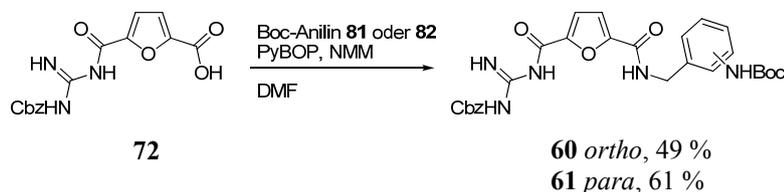
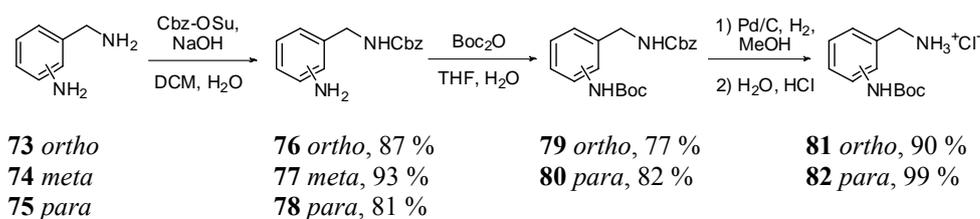


Abbildung 44: Oben: Synthese der Boc-geschützten Anilinderivate **81** und **82**. Unten: Kupplungsreaktion der Verbindung **72** mit den Bausteinen **81** oder **82** zu den Inhibitorstrukturen **60** und **61**.

Mit Hilfe von orthogonalen Schutzgruppen wurden aus zwei konstitutionsisomeren Aminobenzylaminen (**73** und **75**) die Boc-geschützten Vertreter **81** und **82** synthetisiert. Die Cbz-geschützte *meta*-Verbindung **77** wurde für die Synthese der Verbindung **67** benötigt und ist hier aufgrund der identischen Synthesebedingungen mit aufgeführt. Im ersten Schritt wurden die Aminobenzylamine **73–75** unter basischen Bedingungen mit N_α -(Benzyloxycarbonyloxy)-succinimid (Cbz-OSu) umgesetzt (**76–78**). Daraufhin folgten die Reaktion mit Di-*tert*-butylpyrocarbonat (Boc_2O) und anschließend die Entfernung der Cbz-Schutzgruppe durch Hydrogenolyse mit Palladium auf Aktivkohle und Wasserstoff. Die Furanverbindung **72** wurde dann zusammen mit dem jeweiligen Boc-geschützten Anilinderivat **81** bzw. **82**, PyBOP und NMM in abs. DMF zur Reaktion gebracht. Die anschließende wässrige Aufarbeitung ergab nach säulenchromatographischer Reinigung die beiden gewünschten Produkte **60** und **61** in Ausbeuten von 49 % und 61 %.¹⁰⁹

4.1.3.2 Synthese der pyrrolbasierten Verbindungen **62** bis **68**

Nach erfolgter Synthese der Furanverbindungen folgte nun die Darstellung der Inhibitoren auf Pyrrolbasis. Die entwickelten Inhibitorstrukturen **62** bis **68** gingen alle vom identischen Pyrrolbaustein **83** aus. Diese Verbindung wurde nach einer in der Literatur etablierten 5-stufigen Synthesemethode ausgehend von Trichloracetylchlorid hergestellt.¹²² Für die Synthese der Inhibitoren **62** und **63** wurde Verbindung **83** mit Tryptamin oder 1-(Aminomethyl)naphthalin zusammen mit PyBOP, NMM und 4-Dimethylaminopyridin (4-DMAP) gekuppelt. Nach wässriger Aufarbeitung und säulenchromatographischer Reinigung an Silicagel konnten die gewünschten Produkte mit Ausbeuten von 40 % (**62**) und 56 % (**63**) isoliert werden.

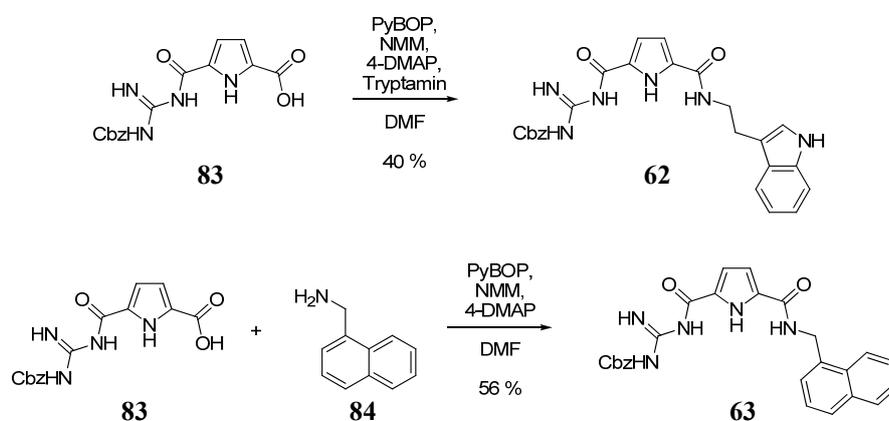


Abbildung 45: Herstellung der Inhibitoren **62** und **63** durch Kupplungsreaktionen von **83** mit Tryptamin und 1-Naphthalinmethylamin **84**.

4. Durchführung und Diskussion

Die Herstellung der Verbindung **86** erfolgte über eine Kupplungsreaktion von Verbindung **83** mit einem Azaserinderivat **85**, das aus *N*_α-Cbz-L-Asparagin in einer zweitstufigen Synthese gewonnen wurde.¹²³ Als Kupplungsreagenzien wurden PyBOP, NMM und 4-DMAP verwendet. Nach erfolgreicher Reinigung mittels Säulenchromatographie konnte die Komponente **86** mit einer Ausbeute von 89 % erhalten werden. Ausgehend von dieser Verbindung wurden die Inhibitoren **64** und **65** hergestellt. Dazu wurde Verbindung **86** mit LiOH in einem THF/H₂O Gemisch behandelt, um den Methylester zu verseifen. Die so synthetisierte Verbindung **87** wurde nun sowohl mit 2-(Aminomethyl)pyridin als auch mit Tryptamin in einer Kupplungsreaktion umgesetzt. Die Zielverbindungen **64** und **65** konnten nach mehrmaliger säulenchromatographischer Reinigung an Silicagel mit Ausbeuten von 25 % und 44 % erhalten werden. Die moderaten Ausbeuten wurden durch ein chromatographisches Trennproblem verursacht.

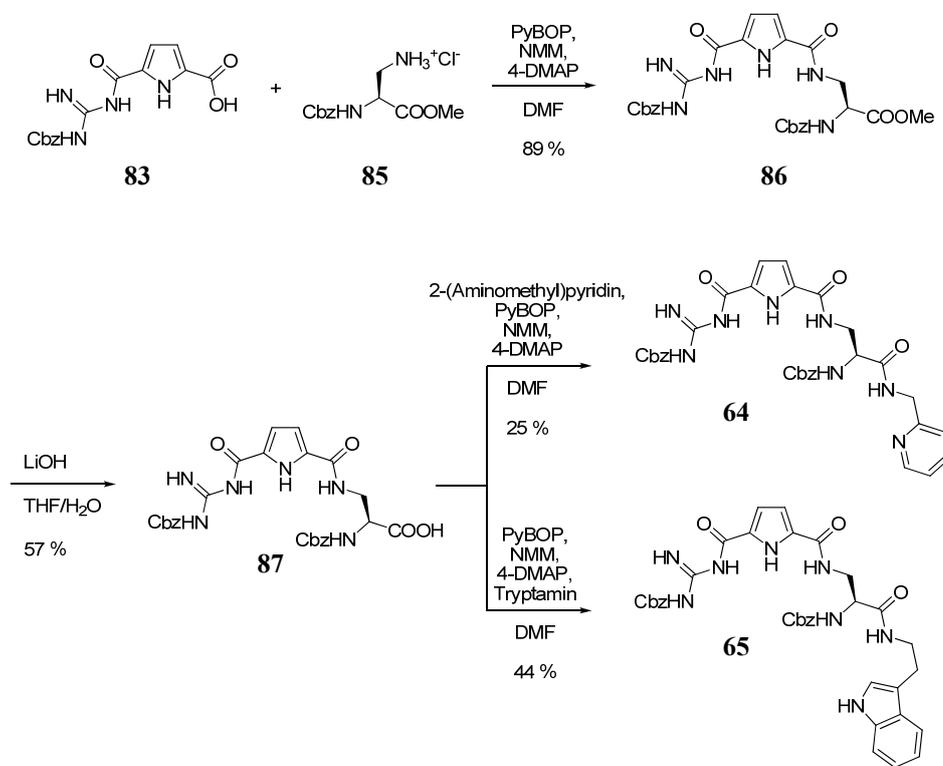


Abbildung 46: Syntheseroute für die Zielverbindungen **64** und **65**. Mit der Herstellung der Verbindung **87** wurde ein Azaserinbaustein **85** eingefügt, an den anschließend durch eine Kupplungsreaktion 2-(Aminomethyl)-pyridin oder Tryptamin angebracht wurde.

Als eine weitere Verbindung wurde **66** ebenfalls durch eine Kupplungsreaktion von **83** mit dem Tryptophanmethylester **89** umgesetzt. Dieser wurde durch die Reaktion von Tryptophan mit Thionylchlorid in absolutem Methanol erhalten.

Für den Inhibitor **67** wurde ein Anilin-Histidin-Derivat synthetisiert, welches durch eine Kupplungsreaktion von Cbz-geschützten Aminobenzylamin **77** mit acetyliertem Histidin (Ac-His-OH) zu **90** und anschließender Hydrierung zu Verbindung **91** hergestellt wurde.

Die darauf folgende Reaktion mit PyBOP, NMM und 4-DMAP lieferte das gewünschte Produkt **67** mit 84 % Ausbeute (*Abbildung 47*).

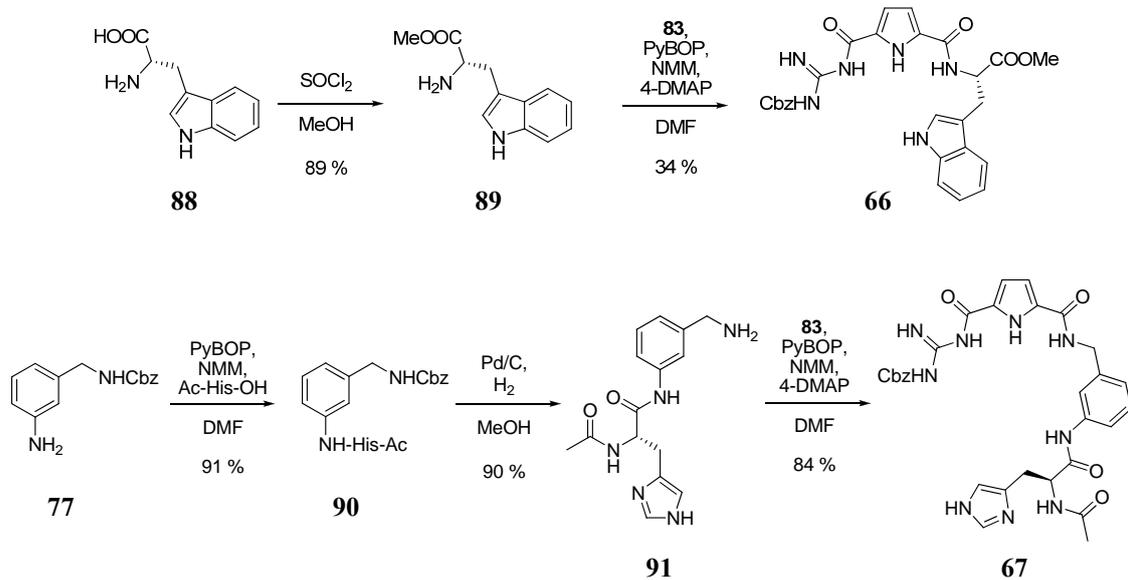


Abbildung 47: Oben: Synthese der Verbindung **66** durch die Kupplung von Verbindung **83** mit dem aus Tryptophan hergestellten Tryptophanmethylester **89**. Unten: Synthese des Histidinderivats **91** mit anschließender Kupplungsreaktion zu Molekül **67**.

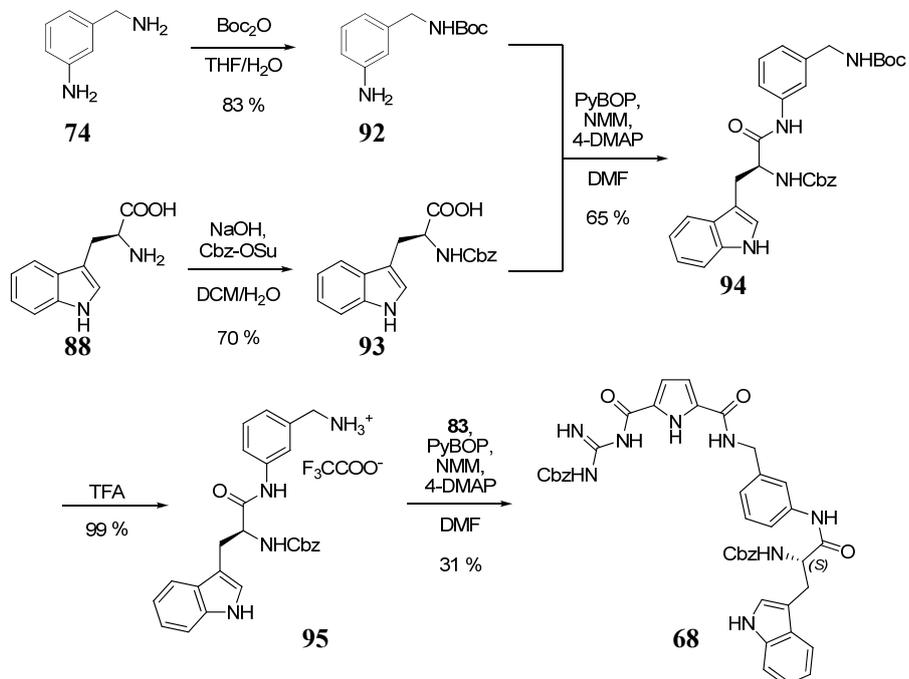


Abbildung 48: Für die Darstellung von Zielverbindung **68** wurde aus dem 3-Aminobenzylamin **74** und Tryptophan **88** über eine zweistufige Synthese Verbindung **94** hergestellt, die nach einer Boc-Entschützung an den Grundbaustein **83** gekuppelt wurde.

Ähnlich wie Verbindung **67** wurde auch Verbindung **68** ausgehend von einem in diesem Fall allerdings Boc-geschützten Anilinderivat (**92**) hergestellt. In Kombination mit Cbz-geschütztem Tryptophan (**93**) und anschließender Entschützung des Amins mit TFA (**94**) wurde Verbindung **95** erhalten, die im letzten Schritt mit PyBOP, NMM und 4-DMAP zum fertigen Inhibitor **68** umgesetzt werden konnte (*Abbildung 48*).

Die so erhaltenen neun Inhibitoren zweiter Generation (**60–68**) konnten nun weiteren Untersuchungen unterzogen werden. Als nächstes folgten Tests an den Erregern *T. b. brucei* und *P. falciparum*, sowie den Enzymen Rhodesain aus *T. b. rhodesiense* und Falcipain-2. Die Ergebnisse dieser Tests sind in den folgenden Kapiteln aufgeführt.

4.1.4 BIOLOGISCHE TESTS DER INHIBITOREN ZWEITER GENERATION

Die neu hergestellten Inhibitoren wurden zunächst an den Erregern der Nagana* (*T. b. brucei*) sowie an den Malariaerregern (*P. falciparum*) getestet. Zusätzlich wurde die Wirkung an Leishmanien (*Leishmania major*) untersucht und Tests an Makrophagen der Zelllinie J774.1 durchgeführt, um die Zellgiftigkeit der Verbindungen zu kontrollieren. Diese Untersuchungen wurden an der Universität Würzburg von *Katzowitsch* und *Rath* vorgenommen.

Die Tests an den Plasmodien wurden am Institut für Zoologie in Kiel durchgeführt. Die Wirkung gegenüber *P. falciparum* wurde über die Anzahl der überlebenden Erreger bestimmt. Daraus konnte die prozentuale Überlebensrate (Viabilität) ermittelt werden und hierdurch dann der IC₅₀-Wert der jeweiligen Verbindung.¹²⁴ Zum Vergleich sind die Inhibitoren **56–59** der ersten Generation mit in die Diskussion aufgenommen (*Tabelle 8*). Die Messergebnisse an *T. b. brucei* und *P. falciparum* zeigten, dass alle neu synthetisierten Vertreter einen Effekt an den Erregern haben. An den Trypanosomen wiesen beide Furan-Komponenten die höchste Effektivität mit 3.21 µM (**60**) und 3.26 µM (**61**) auf. Von den Pyrrolkomponenten hatte **63** (3.31 µM) einen ähnlich guten Wert im Vergleich zu den Furanverbindungen, gefolgt von **64** (3.44 µM) und **68** (3.53 µM). Für die Plasmodien hoben sich die Werte etwas deutlicher von denen der ersten Generation ab. Sie lagen im Bereich zwischen 7.07 µM (**66**) und 27.9 µM (**63**). Auffallend ist das Ergebnis von Verbindung **67**, die auch bei einer Konzentration von 40 µM keinen Effekt an den Trypanosomen zeigte, wohl aber an *P. falciparum*. Sie lag zwar mit 13.2 µM nur im Mittelfeld, allerdings zeigte keiner der übrigen Inhibitoren ein so stark divergentes Verhalten. Eine umgekehrte Tendenz wie **67** zeigten **60** und **63**, die niedrige IC₅₀ Werte bei den Trypanosomen und die höchsten bei den Plasmodien aufwiesen. Die übrigen Inhibitoren verhielten sich wesentlich unspezifischer und hatten geringere Unterschiede

* Nagana ist eine Tierseuche, die durch Trypanosomen verursacht wird. Sie wird von der Tsetsefliege übertragen und ist beispielsweise für Pferde und Esel tödlich.

zwischen *T. b. brucei* und *P. falciparum*. Den wohl signifikantesten Wert wies Verbindung **63** beim Test an *Leishmania major* auf ($IC_{50} = 14.7 \mu\text{M}$). Diese Verbindung zeigte als einzige eine sehr gute Hemmung an diesem Erregerstamm, während bei allen anderen auch über $100 \mu\text{M}$ kein Effekt zu erkennen war. Gleichzeitig ergaben aber auch die Untersuchungen an humanen Makrophagen, dass **63** die höchste Zytotoxizität ($IC_{50} = 37.1 \mu\text{M}$) aufweist. Allerdings lag Verbindung **62** mit einem Wert von $42.5 \mu\text{M}$ in diesem Test ebenfalls in vergleichbarer Größenordnung. Da **62** aber keine auffallend niedrigeren Werte an den Leishmania-Erregern zeigte, kann davon ausgegangen werden, dass der Hemmeffekt der Inhibitoren nicht auf zytotoxische Effekte, sondern vielmehr auf die tatsächliche Wirkung gegen den Parasiten zurückzuführen ist.

Die aus der ersten Generation zum Vergleich stammenden Daten der Inhibitoren **56** bis **59** weisen insgesamt etwas niedrigere Werte als die neue Folgegeneration auf. Verbindung **58** zeichnet sich zwar durch einen sehr guten Wert an *P. falciparum* und *T. b. brucei* aus, allerdings ist sie von allen getesteten Substanzen auch die mit der größten Zytotoxizität.

Tabelle 8: IC_{50} -Werte der Inhibitoren zweiter Generation an *P. falciparum*, *T. b. brucei* und *L. major* im Vergleich zu Vertretern der ersten Generation und Zytotoxizitätswerten an Makrophagen.

Nr.	Erreger			Zytotoxizität
	<i>T. b. brucei</i> ^a	<i>L. major</i>	<i>P. falciparum</i> ^b	Makrophagen J774.1 ^d
	IC_{50} (μM)	IC_{50} (μM)	IC_{50} (μM)	IC_{50} (μM)
60	3.21 ± 0.29	>100	24.4 ± 2.90	>91.2
61	3.26 ± 0.42	>100	7.30 ± 2.78	>100
62	8.49 ± 1.71	>100	9.41 ± 1.72	42.5
63	3.31 ± 0.55	14.7	27.9 ± 5.59	37.1
64	3.44 ± 0.52	>100	11.4 ± 3.44	>100
65	4.25 ± 0.45	>100	17.6 ± 4.19	>100
66	7.59 ± 1.22	>100	7.07 ± 1.98	73.3
67	>40	>100	13.2 ± 1.42	>100
68	3.53 ± 0.82	>100	7.64 ± 2.08	>100
56	1.23	-	4.18^c	>100
57	5.65	-	1.06	54.9
58	0.22	-	1.38^c	18.7
59	2.32 ± 0.42	>100	3.38 ± 0.23	>86

[a] IC_{50} nach 48 h, [b] Erregerstamm FCBR; [c] Erregerstamm W2; [d] Säugetier-Makrophagenstamm J774.1; - = nicht bestimmt.

4. Durchführung und Diskussion

Durch vorangegangene Arbeiten^{85,108,109,125} wurden die beiden Cysteinproteasen Falcipain-2 und Rhodesain der Erreger *P. falciparum* und *T. b. rhodesiense* bereits als mögliche Angriffspunkte der Inhibitoren identifiziert. Wie oben beschrieben zeigten Versuche an den isolierten Enzymen in Kombination mit computergestützten Modellversuchen, dass ein Zusammenhang zwischen Inhibierung der Proteasen und Wirkung gegen den Erreger wahrscheinlich ist.

Im Folgenden werden die Ergebnisse der Untersuchung an den isolierten Enzymen diskutiert.

4.1.5 ENZYMTTESTS DER NEUEN INHIBITORSTRUKTUREN

Für die Testungen an den isolierten Zielenzymen wurde auf die Methode eines fluorimetrischen Enzymassays zurückgegriffen.¹²⁶ Das Prinzip bezieht sich auf die in *Kapitel 2.3* veranschaulichten Grundlagen.

Die Messungen mit Falcipain-2 wurden am Zoologischen Institut zu Kiel von *Evers* und am Institut für Pharmazie und Lebensmittelchemie der Universität Würzburg von *Heindl* durchgeführt.

Der Assay wurde für beide Enzyme in einem Acetat-Puffer bei einem pH-Wert von 5.5 durchgeführt. Zusätzliche Inhaltsstoffe waren NaCl, Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) und DTT, um physiologische Bedingungen zu simulieren und ungewollte Oxidation der Enzyme zu unterbinden. Für beide Enzyme wurde das fluorogene Substrat Cbz-Phe-Arg-AMC verwendet. Sowohl vom Substrat als auch den unterschiedlichen Inhibitoren wurden Stammlösungen in DMSO hergestellt. Die Pufferlösung, das jeweilige Enzym und ein Inhibitor wurden gemischt und anschließend mit dem Substrat versetzt. Die Konzentration des Inhibitors lag bei $c_{\text{final}} = 100 \mu\text{M}$ und die Gesamtkonzentration von DMSO bei $<10\%$. Als negative Referenz wurde eine Blindprobe ohne Inhibitor gemessen. Für die positive Vergleichsmessung wurde der Standardinhibitor E-64 (**52**) ($c_{\text{final}} = 100 \mu\text{M}$) verwendet. Über die Zunahme der Fluoreszenzintensität wurde, wie in *Kapitel 2.3* beschrieben, die prozentuale Hemmung im Vergleich zu der negativen Blindprobe gemessen. Zur Auswertung wurden die ersten fünf Minuten der Messung herangezogen, dadurch konnte gewährleistet werden, dass die Reaktion noch im steady-state Bereich abläuft. Von den Verbindungen, die bei dieser Konzentration einen Hemmeffekt $> 80\%$ zeigten, wurde der IC_{50} -Wert und der K_i -Wert bestimmt. Dazu wurde von jedem Inhibitor die Hemmaktivität bei unterschiedlichen Konzentrationen gemessen (100, 80, 60, 40, 20, 10 und $1 \mu\text{M}$). Mit den Programmen *GraFit*[®] und *Microsoft Excel* wurden die Steigungen der Geraden und die prozentualen Enzymaktivitäten sowie die IC_{50} - und K_i -Werte bestimmt. Zur Berechnung wurden auch die substratspezifischen K_m -Werte für Falcipain-2 ($21.5 \mu\text{M}$)¹²⁷ und Rhodesain (826.5 nM)¹²⁸ verwendet.

Die Ergebnisse der Untersuchungen, wie in *Tabelle 9* zu sehen, liegen für alle Inhibitoren der zweiten Generation bei den K_i -Werten im niedrigen mikromolaren und mittleren nanomolaren Bereich, mit Ausnahme von Verbindung **67**. Bei dieser Verbindung konnte, wie schon beim Test gegen *T. b. brucei*, kein Effekt bei Rhodesain und lediglich eine Hemmung von 7% bei einer Konzentration von $20 \mu\text{M}$ gegenüber Falcipain-2 festgestellt werden. Die Tatsache, dass **67** allerdings bei *P. falciparum* Wirkung zeigte ($\text{IC}_{50}(\text{P. f.}) = 13.2 \mu\text{M}$), lässt vermuten, dass in diesem Fall ein alternativer Wirkmechanismus in Erwägung gezogen werden muss.

Alle weiteren Verbindungen zeigten bei beiden Enzymen sehr gute Hemmeigenschaften. Sie lagen allesamt im unteren mikromolaren (Falcipain-2) und mittleren nanomolaren

(Rhodesain) Bereich. Zum Vergleich mit Vertretern der ersten Generation sind auch hier in *Tabelle 9* die Werte für **56–59** mit angegeben. Hervorzuheben sind dabei Verbindung **65** und **68**, die mit K_i -Werten bei Rhodesain von 90.0 nM und 110 nM die besten Werte zeigten. Damit liegen sie im Bereich der aktivsten Vertreter der ersten Generation ($K_i(\mathbf{59}) = 100$ nM). Offenbar spielt eine gewisse Verzweigung des Inhibitors gepaart mit großen aromatischen Resten eine Rolle bei der Enzymhemmung, da beide Vertreter als Substituenten mit einem Cbz-geschützten Tryptophanrest versehen sind. Verbindung **66**, die mit dem Methylester des Tryptophans derivatisiert ist, zeigt hingegen einen um den Faktor 5 höheren K_i -Wert ($K_i(\mathbf{66}) = 540$ nM). Es besteht die Möglichkeit, dass die zusätzlichen Aromaten der Cbz-Gruppe und des Anilinderivates der beiden Verbindungen **65** und **68** positiv zur Hemmung des Enzyms beitragen. Ein weiterer Grund könnten die länglichen Strukturen der tryptophanhaltigen Reste sein, da sie flexibel sind und sich besser in die langgezogene unpolare Bindungstasche des Rhodesains einfügen.

Tabelle 9: IC_{50} - und K_i -Werte der zweiten Inhibitorgeneration für Rhodesain und Falcipain-2. Die Viabilität bezieht sich auf die Wirkung gegen *P. falciparum*. Zum Vergleich sind Daten der ersten Generation (**56–59**) mit angegeben.

Nr.	Rhodesain		Falcipain-2		
	IC_{50} (μ M)	K_i (nM)	Viabilität (100 μ M)	IC_{50} (μ M) ^a	K_i (μ M)
60	23.0	470	-	11.2	3.92
61	22.5	460	-	7.57	2.71
62	25.9	530	0	7.05	2.47
63	10.1	200	8.3	2.42	0.85
64	44.8	910	0	- ^b	-
65	4.40	90.0	1.5	2.11	0.73
66	26.7	540	0	6.04	2.11
67	k. E.	k. E.	-	- ^c	-
68	5.65	110	29	1.62	0.57
56	5.37	110	-	1.12	0.52
57	4.04	80.0	-	2.34	1.08
58	5.20	110	-	2.62	0.62
59	5.15	100	-	3.50	1.22

k. E. = kein Effekt; - = nicht bestimmt; [a] Werte von *Heindl*; [b] 29 % Hemmung bei 20.0 μ M; [c] 7 % Hemmung bei 20.0 μ M.

Auffallend ist der Unterschied von Verbindung **65** zu Verbindung **64**, sie besitzt statt einem Tryptophan ein Pyridin als Substituent des Cbz-geschützten C1-Bausteins (**87**), zeigt aber einen 10-fach höheren K_i -Wert an Rhodesain ($K_i(\mathbf{64}) = 910 \text{ nM}$). Dies lässt darauf schließen, dass nicht nur die Möglichkeit zur Bildung von zusätzlichen Wasserstoffbrücken, sondern auch die Größe des Aromaten eine Rolle spielt. Die beiden Furanverbindungen **60** und **61** konnten mit K_i -Werten von 470 nM (**60**) und 460 nM (**61**) am Rhodesain ihre gute Hemmwirkung an den Trypanosomen nicht bestätigen. Auch an Falcipain-2 zeigten sie beide moderate Werte (K_i -Wert: 3.92 μM (**60**), 2.71 μM (**61**)). Im Vergleich zu den Verbindungen **56** und **57**, die sich nur durch die Schutzgruppe bzw. den Pyrrolbaustein unterscheiden, ist ihre Hemmwirkung deutlich herabgesetzt. Dies spricht für einen entscheidenden Einfluss der Cbz-Schutzgruppe am Anilin auf die inhibitorische Wirkung an den Proteasen.

Vergleicht man die Werte der Inhibitoren von Rhodesain mit denen von Falcipain-2, so kann man einen direkten strukturellen Zusammenhang zwischen aktiven und weniger aktiven Inhibitoren erkennen. Generell lässt sich sagen, dass alle Inhibitoren (**67** ausgenommen) eine ähnlich gute Hemmung auch an Falcipain-2 zeigten. Die K_i -Werte finden sich aufgrund der höheren Michaeliskonstante ($K_m = 21.5 \mu\text{M}$) im Vergleich zu Rhodesain im niedrigen mikromolaren Bereich wieder. Abweichend von allen anderen Vertretern zeigte **64** einen zu geringen Hemmeffekt (29 % bei 20 μM), so dass unter den gewählten Messbedingungen kein IC_{50} - und damit auch kein K_i -Wert bestimmt werden kann. Vor allem die Verbindungen **63**, **65** und **68** lieferten mit K_i -Werten von 0.85 μM (**63**), 0.73 μM (**65**) und 0.57 μM (**68**) vergleichbare Ergebnisse wie Vertreter der ersten Generation (**56–59**).

Betrachtet man die Strukturelemente, in denen sich die Inhibitoren unterscheiden und korreliert sie mit den Werten aus den Enzymtests, so findet man Tendenzen wieder, die bereits bei der ersten Inhibitorgeneration den Hemmeffekt beeinflusst haben.^{85,108} Wie oben beschrieben werden beispielsweise in der S2 Tasche von Rhodesain unpolare, hydrophobe und aromatische Reste bevorzugt. Dies würde erklären, warum Verbindung **67** mit der polaren Aminosäure Histidin als Substituent so viel schlechter an beiden getesteten Enzymen hemmt als alle übrigen Vertreter. Desweiteren spielt anscheinend die Länge des Inhibitors eine Rolle. Eine lange Kette kann sich besser in der Furche platzieren, in der das aktive Zentrum des Enzyms liegt. Vergleicht man die Länge von **65**, **66** und **68** mit den zugehörigen Werten, wird dieser Effekt deutlich. Auch der Anteil aromatischer Komponenten beeinflusst den Hemmeffekt. Bei der Betrachtung von Verbindungen **64** und **65** ist zu erkennen, dass sie sich lediglich durch ein Pyridin bei **64** und ein Tryptamin bei **65** als Substituent unterscheiden. Zudem ist **65** um eine CH_2 -Einheit länger und damit flexibler, was auch eine Rolle spielen kann.

Durch Simulationen mit Autodock wurde visualisiert, wie gut die Inhibitoren in das aktive Zentrum von Rhodesain passen. Die erhaltenen Ergebnisse wurden in Bezug auf die Lage des Inhibitors im aktiven Zentrum untersucht, sowie auf die Möglichkeit Bindungen (Wasserstoffbrücken oder elektrostatische Wechselwirkungen) einzugehen.

Ziel dieser Analyse war es, Anhaltspunkte zu finden, die es erlauben, Aussagen über den Zusammenhang zwischen Struktur und Hemmaktivität der Verbindungen zu machen.

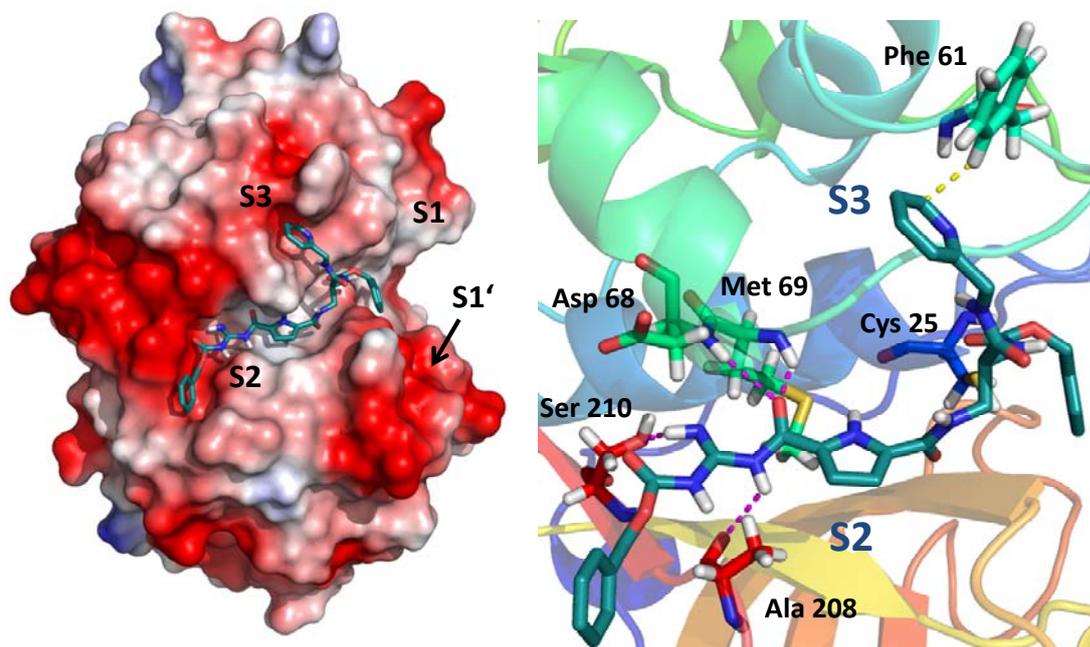


Abbildung 49: Darstellung des Inhibitors **64** ($K_i(\text{Rhod}) = 910 \text{ nM}$, berechnete Struktur) in der Bindungstasche von Rhodensain. Links: Darstellung der Proteinoberfläche, die Farben entsprechen dem elektrostatischen Potential (blau: positiv, rot: negativ). Rechts: Wechselwirkungen der Inhibitorstruktur mit Aminosäuren des Peptidrückgrats. Es sind vier Wasserstoffbrücken (magenta) und eine elektrostatische Wechselwirkung (gelb) des Phenylrings von Phe 61 und dem Pyridinrest zu erkennen. Die Bindungstaschen S2 und S3 sind sehr gut durch den Inhibitor besetzt.

Betrachtet man beispielsweise Inhibitor **64** (Abbildung 49), so erkennt man, dass ein Teil der berechneten Struktur sehr gut in die S2 Tasche des Enzyms passt. Das Cbz-geschützte Guanidin liegt zusammen mit dem Pyrrolring in dieser Furche. Des Weiteren wird der Pyridinrest durch eine „edge to face“-Wechselwirkung mit Phe 61 in der S3 Tasche koordiniert. Die verbleibende zweite Cbz-Gruppe kommt über dem Cys 25 zu liegen. Der Inhibitor bindet also in dieser Berechnung nur in S2 und S3, deckt aber dennoch die katalytische Triade nicht hinreichend ab. Im Experiment zählte er mit einem K_i -Wert von 910 nM bei Rhodensain zu den schlechtesten Vertretern. Dieser Wert könnte sich damit erklären lassen, dass er leicht vom Substrat aus seiner Position verdrängt werden kann, weil nur ein Teil des aktiven Zentrums blockiert ist.

Die Berechnung des Inhibitors **67** (Abbildung 50) ergab für die Anordnung im aktiven Zentrum eine der Länge nach ausgerichtete Orientierung in der Furche. Durch vier Wasserstoffbrücken zu den Aminosäuren Asp 18, Cys 20 und Asp 161 ließe sich die Struktur an das Enzym binden. Aus rein visuellen Gründen sollte die Verbindung **67** bei dieser Anordnung eigentlich einen messbaren Hemmeffekt am Enzym zeigen. Die experimentellen Ergebnisse sprachen allerdings gegen diese Berechnung. Hier zeigte die Verbindung keine Aktivität an Rhodensain und Falcipain-2, dafür aber Wirkung am

Malariaerreger (*P. falciparum*) mit einem IC_{50} -Wert von $13.2 \mu\text{M}$. Eine denkbare Erklärung für die Unwirksamkeit am Enzym könnte der pK_S -Wert des Histidins sein. Im Assay lag ein pH-Wert von 5.5 vor. Da der Imidazolring einen pK_S von 6.0 hat, liegt er bei diesen Bedingungen protoniert vor, wodurch die positive Ladung im Ring über unterschiedliche Grenzstrukturen verteilt wird. Aus vorangegangenen Projekten ist bekannt, dass geladene Verbindungen keinen oder nur einen sehr geringen Effekt auf Rhodesain ausüben.^{85,108} Diese Tatsache kann dazu führen, dass Verbindung **67** am Enzym keinen Hemmeffekt zeigt. Die Wirkung am Erreger wäre dann auf einen anderen Hemmmechanismus zurückzuführen, der beispielsweise pH-Wert unabhängig ist und nicht über die Inhibierung von Falcipain-2 stattfindet.

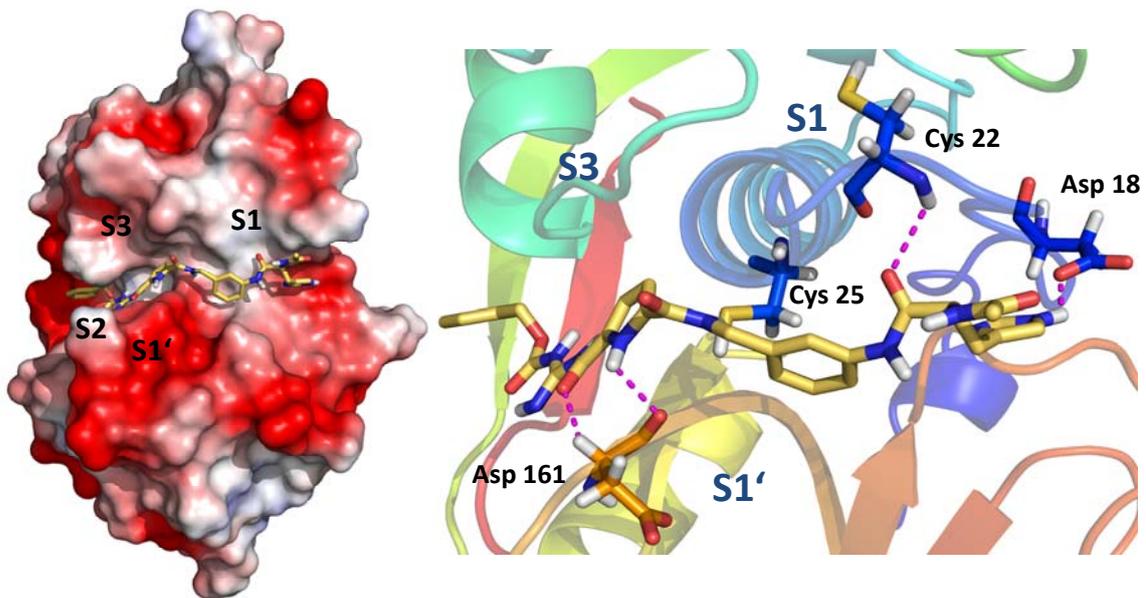


Abbildung 50: Darstellung des Inhibitors **67** (berechnete Struktur) in der Bindungstasche von Rhodesain. Links: Darstellung der Proteinoberfläche, die Farben entsprechen dem elektrostatischen Potential (blau: positiv, rot: negativ). Rechts: Wechselwirkungen der Inhibitorstruktur mit den Aminosäuren des Peptidrückgrats. Es sind vier Wasserstoffbrücken (magenta) zu erkennen. Auffallend ist hier die langgestreckte Lage in der Furche der Bindungstasche. Lediglich die S2 Tasche wird durch den Inhibitor besetzt. Eine Wechselwirkung zwischen dem Histidin NH des Inhibitors und Asp 18, sowie Cys 22 und einem Sauerstoff dürfte diese Lage begünstigen. Im Experiment zeigte diese Struktur keinen Hemmeffekt an Rhodesain, jedoch an *P. falciparum* ($IC_{50} = 13.2 \mu\text{M}$).

Aus den Kraftfeldrechnungen für Inhibitor **63** ging hervor, dass er anders als die Mehrzahl der Verbindungen in der Bindungstasche der Enzyme lag. Die Orientierung erfolgte mit dem geschützten Guanidin in Richtung S1 Tasche und nicht in S2, wo sich der große aromatische Rest platzierte. Im Experiment wies diese Verbindung einen K_i -Wert von 200 nM auf und zählte damit zu den besten Vertretern am Rhodesain. Für die guten Hemmwerte auch am Falcipain-2 ($K_i = 0.85 \mu\text{M}$) könnten der aromatische Charakter und die Abschirmung des Cys 22 sprechen. Interessanterweise waren sich die berechneten Strukturen in diesem Fall für beide Enzyme sehr ähnlich. Bei keiner der anderen Strukturen glichen sich die räumlichen Orientierungen bei Rhodesain und

Falcipain-2 in den Bindungstaschen so wie bei Verbindung **63** (Abbildung 51). Bei diesem Beispiel lässt sich das im Experiment erzielte Verhalten mit den Resultaten der Berechnungen gut erklären. Es zeigt sich aber auch, dass es auf Grund des theoretischen Ergebnisses anscheinend keine definierte Orientierung gibt, mit der die Strukturen bevorzugt an die Enzyme binden. Der Beweis für den tatsächlichen Bindungsmodus am Enzym lässt sich nur anhand einer Kristallstruktur aufklären.

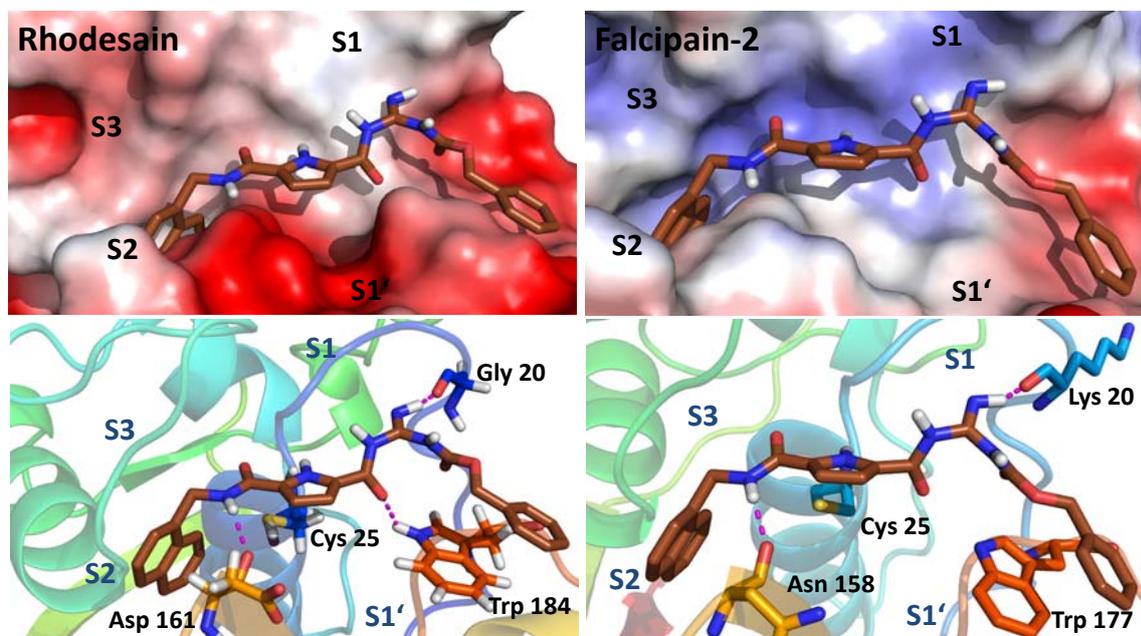


Abbildung 51: Links: Lage des Inhibitors **63** im aktiven Zentrum von Rhodesain (links) und Falcipain-2 (rechts). Die S2 Bindungstasche wird durch den großen Aromaten gefüllt, alle anderen Taschen (S1, S3 und S1') werden kaum besetzt ($K_i(\text{Rhod}) = 200 \text{ nM}$; $K_i(\text{FP-2}) = 0.85 \text{ }\mu\text{M}$).

Ein weiteres Beispiel, bei dem die Simulation nicht mit den experimentellen Ergebnissen übereinstimmte, stellte Verbindung **65** dar (Abbildung 52). Hier lag der Großteil der berechneten Struktur ohne gute Passgenauigkeit außerhalb der Bindungstasche S2. Drei der aromatischen Reste der Verbindung deuteten zwar in die hydrophobe Furche, der Rest der Struktur wölbte sich aber aus der S2 Tasche heraus. Dies wird durch Interaktionen zwischen den Aminosäuren Gln 159, Leu 160 und Gln 207 und dem Inhibitor, so wie einer intramolekularen Wechselwirkung (hellblau) begünstigt. Beim Screening wurden für Inhibitor **65** sehr gute Werte an Rhodesain ($K_i = 90.0 \text{ nM}$) und für Falcipain-2 ($K_i = 0.73 \text{ }\mu\text{M}$) ermittelt. Die Visualisierung des Inhibitors in Verbindung mit dem Enzym kann in diesem Fall durch die schlechte Anpassung an die Bindungsfurche keinen Hinweis auf einen guten Hemmeffekt geben. Dies steht im Gegensatz zu den guten ermittelten Werten im Experiment. Ein Rückschluss von den berechneten Ergebnissen auf die experimentellen Daten ist nicht möglich.

Generell könnte in allen der gezeigten Fälle nur eine Kristallstruktur des Enzyms in Kombination mit dem Inhibitor Aufschluss über den Inhibierungsmechanismus und die

tatsächliche Lage der Struktur im aktiven Zentrum geben. Auch die Berechnungen der übrigen Verbindungen (**62**, **66**, **68**) ergaben keine eindeutigen Hinweise.

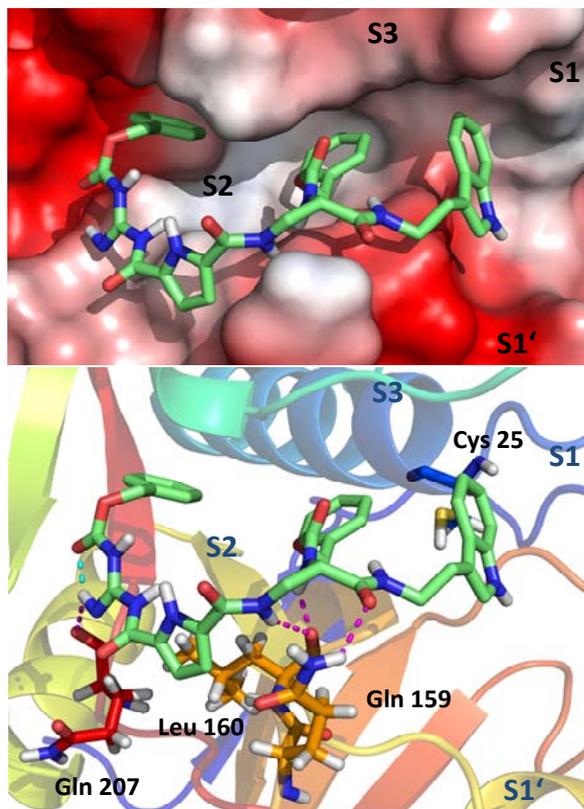


Abbildung 52: Darstellung der berechneten Struktur von Verbindung **65** im aktiven Zentrum von Rhodesain. Durch das Zusammenspiel von inter- (hellblau) und intramolekularen (magenta) Wechselwirkungen wird diese Lage erreicht ($K_i(\text{Rhod}) = 90.0 \text{ nM}$).

Aussage über die tatsächliche Enzymaktivität der Verbindungen machen zu können. In wie weit sich die berechneten Ergebnisse auf die Praxis übertragen lassen bzw. welche Kriterien dabei berücksichtigt werden müssen, wird in einem weiterführenden Projekt untersucht werden.¹²⁹

Im vorliegenden Fall wurden die Inhibitoren **65** und **68** als beste Vertreter der zweiten Generation an beiden Enzymen identifiziert. In der Simulation ergab die visuelle Analyse allerdings keine eindeutige Übereinstimmung mit den experimentellen Ergebnissen. Dennoch geben die Resultate der Berechnungen einen Eindruck davon, in wie weit räumliche Struktur und Größe der Inhibitoren zu den Bindungstaschen von Rhodesain und Falcipain-2 passen. Über das Verhalten der Substituenten und ihre Eigenschaft, das Hemmverhalten der Inhibitoren zu verändern, kann durch die Berechnungen allein aber keine Aussage gemacht werden. Trotzdem können die theoretischen Resultate zusammen mit

den experimentellen Ergebnissen neue Ansatzpunkte ergeben, um weitere Optimierungen und Anpassungen der Inhibitorstrukturen vorzunehmen. Es bleibt aber dennoch nicht aus, die kalkulierten Strukturen auch im Experiment zu überprüfen, um eine

4. Durchführung und Diskussion

4.1.6 ZUSAMMENFASSUNG DES ENZYMSCREENINGS UND AUSBLICK

Die Inhibitoren der zweiten Generation haben durch ihre strukturelle Varianz erneute Erkenntnisse über die Struktur-Wirkungs-Beziehung in Bezug auf die Cysteinproteasen Falcipain-2 und Rhodesain geliefert. So konnten die bereits in vorangegangenen Projekten postulierten Tendenzen bestätigt werden (1. Unpolare und ungeladene Strukturelemente haben bessere Hemmeigenschaften als Polare und Geladene; 2. Der geschützte Guanidinrest ist essentiell für eine effektive Inhibierung der Cysteinproteasen; 3. Furan und Pyrrol als Kernfragment begünstigen den Hemmeffekt).⁸⁵ Insgesamt ergab sich zwar keine entscheidende Verbesserung der Hemmaktivität gegenüber der ersten Generation, dennoch sind die K_i -Werte an beiden Enzymen ebenfalls in der Größenordnung der vorangegangenen Inhibitoren.

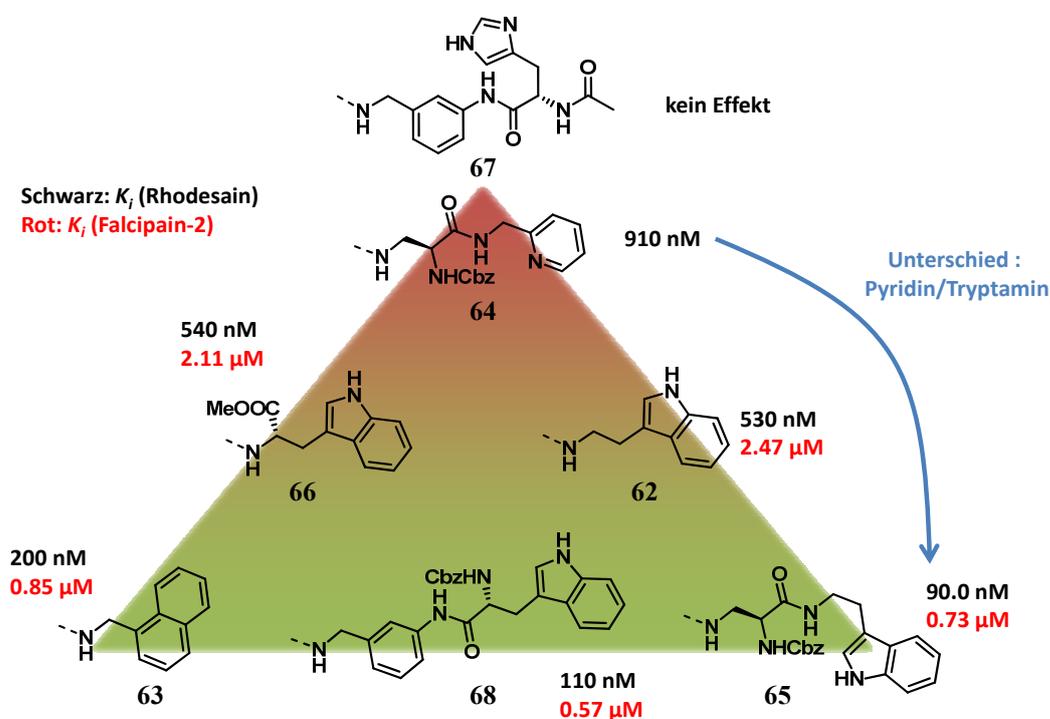


Abbildung 53: Graphische Darstellung der Enzymmessungen an Falcipain-2 und Rhodesain, wobei sich die Anordnung nur auf die experimentellen Daten der Pyrrolverbindungen bezieht. Abgebildet sind nur die Strukturelemente, in denen sich die Inhibitoren unterscheiden. Sie sind von oben nach unten mit steigender Hemmaktivität geordnet. Die Zahlenwerte geben die K_i -Werte an Rhodesain (schwarz) und Falcipain-2 (rot) an.

Auch die Tests an den Erregern lieferten sehr gute Ergebnisse, da alle der synthetisierten Strukturen Wirkung zeigten. Verbindung **61** und **68** wiesen dabei die besten Werte auf. Bei sehr guten Hemmeigenschaften am Erreger (IC_{50} (**61**): 3.26 μM (*T. b. b.*), 7.30 μM (*P. f.*); IC_{50} (**68**): 3.53 μM (*T. b. b.*), 7.64 μM (*P. f.*)) und einem IC_{50} -Wert von >100 μM beim Test auf Zytotoxizität besitzen beide das Potential durch weitere Optimierung zu

vielversprechenden Inhibitoren gegen Malaria und Nagana, bzw. Afrikanische Trypanosomiasis zu werden. Verbindung **63**, die sowohl sehr gute Hemmeigenschaften an den Enzymen als auch an den Erregern und als einzige auch an *L. major* ($IC_{50} = 14.7 \mu\text{M}$) aufweist, sollte in zukünftigen Testreihen gerade wegen der unerwarteten Aktivität gegen Leishmanien durch biologische Tests weiter untersucht werden. In *Abbildung 53* sind die Ergebnisse der Enzymtests graphisch aufbereitet und die Tendenzen veranschaulicht. Die synthetisierten Verbindungen lassen sich aufgrund ihrer Hemmeigenschaften in eine Reihenfolge bringen und sind nach steigender Aktivität geordnet. Die Inhibitoren **63**, **65** und **68** wiesen beim Test an den isolierten Enzymen die besten Hemmwerte auf (K_i -Werte Falcipain-2: $0.85 \mu\text{M}$ (**63**), $0.73 \mu\text{M}$ (**65**), $0.57 \mu\text{M}$ (**68**); K_i -Werte Rhodesain: 200 nM (**63**), 90.0 nM (**65**), 110 nM (**68**)). Durch die Berechnung der Inhibitoren am Enzym konnte die Passgenauigkeit in Bezug auf die Größe der Strukturen untersucht werden. Eine Korrelation zwischen berechneten Strukturen und experimenteller Hemmwirkung konnte jedoch nur bedingt festgestellt werden.

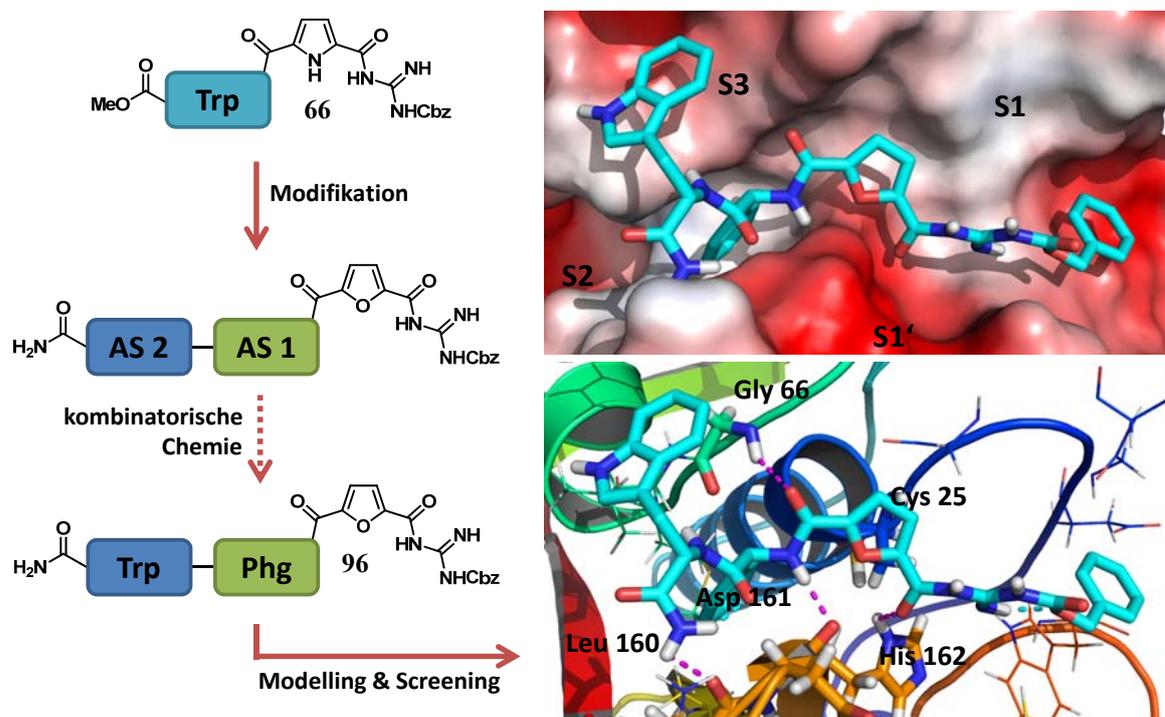


Abbildung 54: Links: Modifikation der Struktur **66** durch kombinatorische Festphasensynthese zu neuen Inhibitorstrukturen mit einem Dipeptidfragment und Furan als Kernbaustein. Rechts: Darstellung einer berechneten Struktur des Dipeptid-Furan-Inhibitors **96** mit der Sequenz Tryptophan-Phenylglycin (Trp-Phg) als Beispiel für die neuen Strukturen.

In einem neuen Projekt soll weiterführend untersucht werden, in wie weit sich Kombinationen von verschiedenen Aminosäuren als Substituenten des Furan- bzw. Pyrrolrings eignen. Durch Berechnung von Leitmotiven und anschließender kombinatorischer Festphasensynthese soll hier eine Optimierung der Verbindungen

erreicht werden.¹²⁹ Ausgangspunkt war hier Verbindung **66**, wobei das Pyrrolgrundgerüst durch ein Furan ersetzt wurde. Diese Struktur sollte nun zusätzlich zum Tryptophanrest um eine Aminosäure auf kombinatorische Weise erweitert und die Hemmeigenschaften an Rhodesain getestet werden. Ein Schema der so konstruierten Verbindungen und die berechnete Struktur eines dieser Vertreter (**96**) sind in *Abbildung 54* dargestellt. Die erzielten Ergebnisse können nun in weiterführenden Projekten eingesetzt werden, um diese Klasse der Enzyminhibitoren weiter zu optimieren und neue Erkenntnisse über Struktur-Wirkungsbeziehungen zu gewinnen.

4.2 METHODENENTWICKLUNG FÜR EIN SCREENING „ON BEAD“ AN DER HAUPTPROTEASE DES HUMANEN CORONAVIRUS 229E

4.2.1 GRUNDLAGEN UND VORARBEITEN

Die Festphasensynthese hat mit ihren kombinatorischen Verfahren in den letzten Jahren vor allem die medizinische Chemie und die Wirkstoffforschung revolutioniert.^{70,71} Es wurden Methoden entwickelt, die es erlauben, die synthetisierten Substanzen direkt am Harz zu untersuchen.⁷⁴ Dieser Fortschritt macht nicht nur eine große Bandbreite an Verbindungen durch zeitsparende Syntheseverfahren zugänglich, sondern vereinfacht auch die Aufarbeitung der Verbindungen, da aufwendige Reinigungsschritte nach dem Abspalten des Harzes ausbleiben. Mit diesem Verfahren ist sowohl die Identifizierung von neuen Substraten als auch von neuen Inhibitoren möglich. Solch ein „on bead“-Assay zur Identifizierung von Inhibitoren an Rhodensin und Falcipain-2 wurde beispielsweise von *Machon* mit an PEGA-Harz gebundenen peptidischen Michaelssystemen entwickelt.^{85,86}

Im Grunde basiert ein „on bead“-Assay auf einem Screeningverfahren, wie man es für Substanzen in Lösung verwendet, nur mit dem Unterschied, dass harzgebundene Inhibitoren eingesetzt werden. Dazu wird das Enzym zusammen mit dem Inhibitor und dem passenden Substrat in einer wässrigen Pufferlösung mittels Fluoreszenzspektrometer untersucht. Wie bei den in *Kapitel 2.3* beschriebenen Beispielen kann über die Unterschiede der Geradensteigungen die prozentuale Hemmung der Inhibitoren ermittelt werden. Es sind nicht nur qualitative, sondern auch quantitative Aussagen über die Hemmeigenschaften möglich.

Ein Problem bei der Anwendung eines Festphasenassays kann jedoch durch die Inkubationszeit über mehrere Stunden (abhängig von Enzym und Temperatur) hervorgerufen werden. Da der an das Harz gebundene Inhibitor für das Enzym nicht so leicht zugänglich ist wie Substanzen in Lösung, ist eine längere Inkubation (über mehrere Stunden) nötig. Untersucht man empfindliche Proteasen, kann es zu einem Aktivitätsverlust oder zur Denaturierung kommen, reproduzierbare Ergebnisse sind dann nicht mehr möglich. Es ist also entscheidend für eine erfolgreiche Durchführung die geeigneten Messbedingungen zu finden.

Machon gelang es, aus 150 verschiedenen Substanzen einer Bibliothek effiziente Inhibitoren gegen Rhodensin und Falcipain-2 zu identifizieren. Die besten Vertreter wurden anschließend in Lösung synthetisiert und die am Harz erzielten Ergebnisse verifiziert.⁸⁶ In diesem Fall konnten die besten Assaybedingungen für die Enzyme Rhodensin und Falcipain-2 bei einer Inkubationszeit von 12 h bei 9 °C ermittelt werden.⁸⁵

Die Vorgehensweise für ein Screening „on bead“ sollte nach dem Vorbild von *Machon* an einer viralen Cysteinprotease, der SARS CoV M^{Pro} (Severe Acute Respiratory Syndrom Coronavirus Mainprotease) getestet werden. Jedoch zeigten sich bei der Inkubation der harzgebundenen Inhibitoren von *Machon* mit dem isolierten Enzym Schwierigkeiten in der Stabilität der Protease unter Laborbedingungen. Das Screening der von *Machon* synthetisierten Bibliothek am Zielenzym lieferte keine reproduzierbaren Ergebnisse. Aufgrund der nicht ausreichenden Stabilität der SARS CoV M^{Pro} war unter den gewählten Bedingungen ein Screening „on bead“ nicht möglich. Dennoch sollte ein Lösungsweg entwickelt werden, der es erlaubt, ein Screening am Harz zur Entwicklung von Inhibitoren für die SARS CoV M^{Pro} durchzuführen.

Eine Möglichkeit könnte ein Weg über die Hauptprotease des humanen Coronavirus 229E (HCoV 229E) darstellen. Sie ist mit der M^{Pro} des SARS Virus eng verwandt und könnte als Testprotease im Labor dienen. Vorteil dieser Vorgehensweise ist, dass die HCoV 229E M^{Pro} unter Laborbedingungen stabil ist und effizient in Zellkulturen gezüchtet werden kann.¹³⁰ Dadurch ist sie besser für ein Screening „on bead“ geeignet. So könnten auf Grund der Ähnlichkeit der beiden Proteasen die Ergebnisse von einer auf die andere übertragen werden, um eine Leitstruktur zu entwickeln und dann weitere Optimierungen der besten Inhibitoren durchzuführen. Auf diese Weise sollen Vertreter identifiziert werden, die als Inhibitoren für die SARS CoV M^{Pro} in Lösung weiterentwickelt werden können. In vorangegangenen Experimenten war eine Testung mit kurzer Inkubationszeit (wenige Minuten) und Inhibitoren, die nicht an ein Harz gebunden waren, bei der SARS CoV M^{Pro} möglich.^{131,132}

4.2.1.1 Die Zielproteasen SARS CoV M^{Pro} und HCoV 229E M^{Pro} im Vergleich

Die Zielproteasen SARS CoV M^{Pro} und HCoV 229E M^{Pro} stammen aus Coronaviren, die zur Familie der *Coronaviridae* zählen und behüllte Einzel(+)-Strang-RNA-Viren sind. Coronaviren lösen bei Menschen, Säugetieren und Vögeln teils heftige Erkältungskrankheiten aus. Auch der Ausbruch des schweren akuten Atemwegssyndrom (SARS) 2003 ist auf einen Coronavirus zurückzuführen. Der Virus breitet sich durch Tröpfcheninfektion über die Luft aus. Im Wirtsorganismus wird die (+)Strang-RNA des Virus in der Zelle, in die der Virus eindringt, direkt in zwei Polyproteine übersetzt. An dieser Stelle entstehen auch die Hauptproteasen, die dafür verantwortlich sind, die Polyproteine weiter in Nichtstrukturproteine zu verarbeiten (Proteolyse). Sowohl die SARS CoV M^{Pro} als auch die HCoV 229E M^{Pro} haben eine Masse von 33.3 kDa und gehören zum Clan PA und der Familie C30, den chymotrypsinähnlichen Proteasen. Die Hauptproteasen sind an entscheidender Stelle in den Entwicklungszyklen beider Proteasen für die Replikation des Virus mitverantwortlich und bieten sich aus diesem Grund als möglichen Angriffspunkt für Inhibitoren an (*Abbildung 55*).

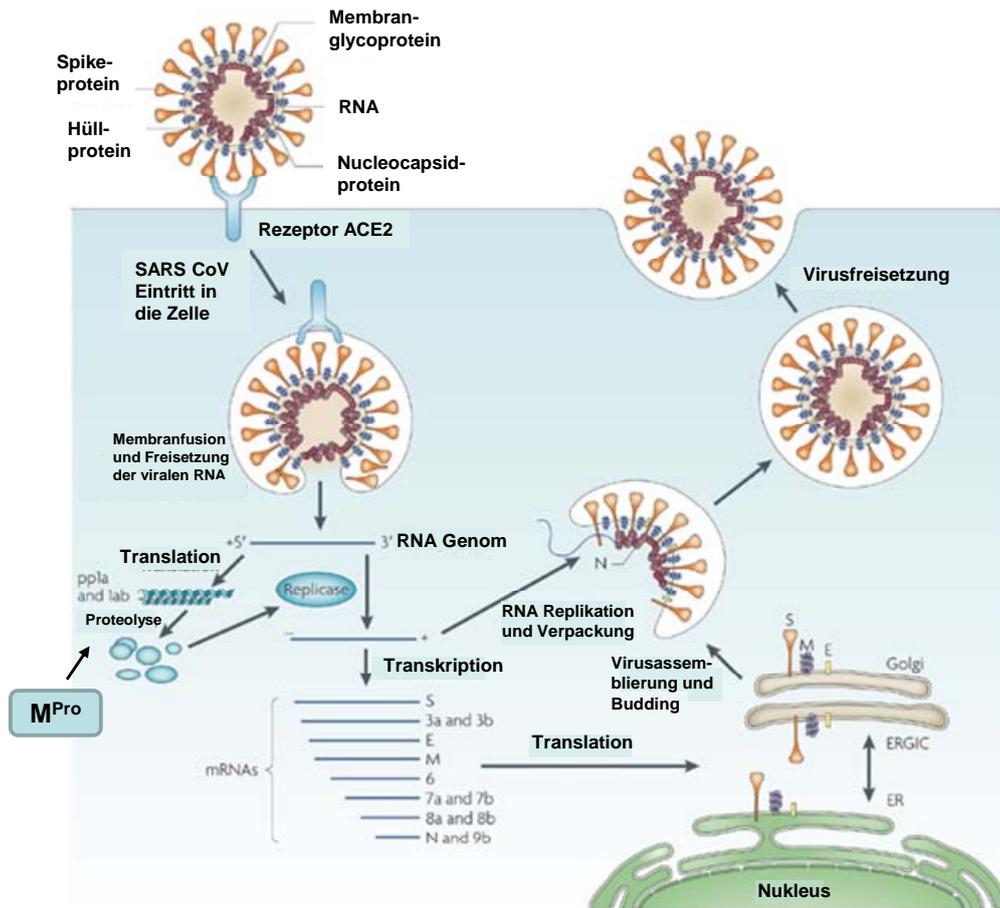


Abbildung 55: Lebenszyklus des SARS Coronavirus. Die M^{Pro} spielt bei der Proteolyse des Virus eine entscheidende Rolle (reprinted with permission).¹³³

Vergleicht man beide M^{Pro} ausgehend von ihrer Sequenz und Struktur, so erkennt man eine starke Kongruenz. Die Strukturen der beiden Proteasen weisen eine ähnliche Sequenz (Primär-, Sekundär- und Tertiärstruktur) auf. Auch die Tatsache, dass sie beide als Homo-Dimere vorliegen, also auch die Quartärstruktur teilen, zeigt die enge Verwandtschaft. Ein Vergleich der Sequenz und der Struktur beider Proteasen ist in *Abbildung 56* gegeben und verdeutlicht die Übereinstimmung. Die Monomere beider Proteasen lassen sich in drei Domänen unterteilen (I–III), von denen die Domänen I und II – wie andere virale chymotrypsinähnliche Proteasen auch eine antiparallele β -Faltblattstruktur besitzen. Zwischen diesen beiden Domänen liegt auch das aktive Zentrum des Enzyms. Domäne III besteht aus fünf α -Helix Einheiten, ihr wird bei der Dimerbildung eine besondere Bedeutung zugeschrieben.^{134,135} Die katalytische Diade besteht in beiden Fällen aus einem Histidin und einem Cystein, die wie bei Cysteinproteasen üblich über einen Stickstoff im Histidinring und den Schwefel des Cysteins ein Ionenpaar bilden.

4. Durchführung und Diskussion

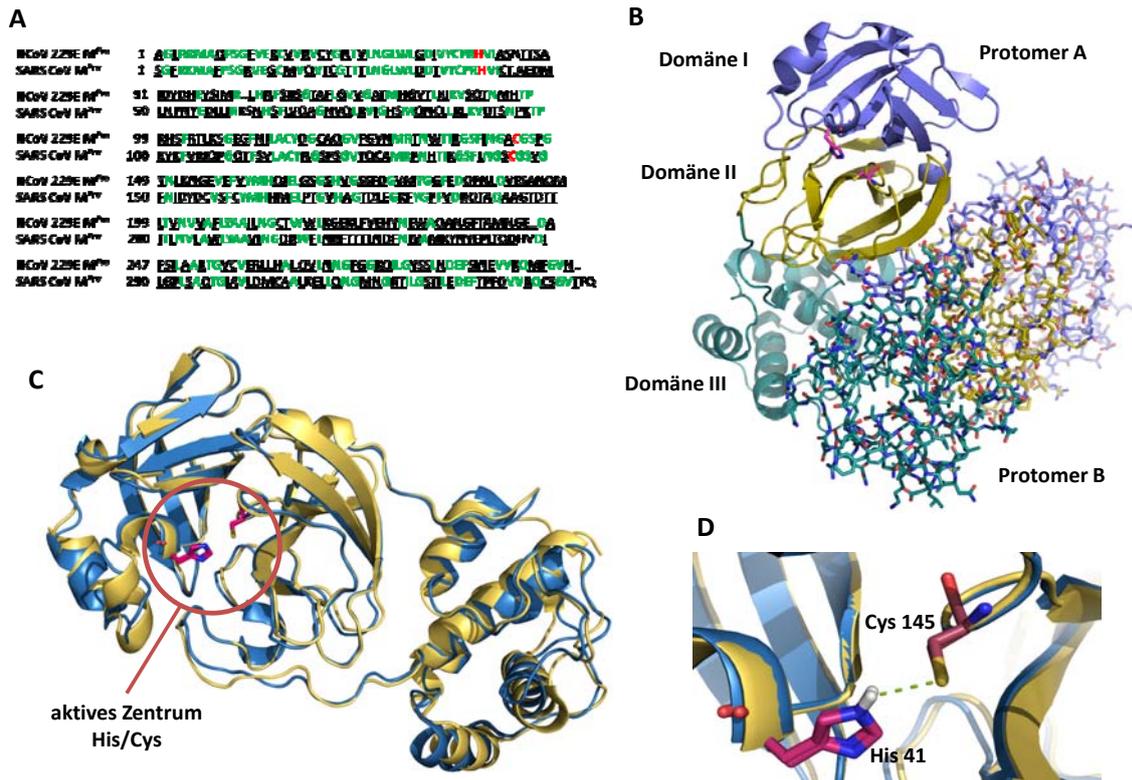


Abbildung 56: A: Vergleich der Sequenzen von HCoV 229E M^{Pro} und SARS CoV M^{Pro}. Gleiche Aminosäuren sind in grün, unterschiedliche in schwarz gekennzeichnet. Die katalytische Diade ist in rot markiert. B: Dimer der SARS CoV M^{Pro}. Die Protomere sind in unterschiedlicher Darstellung gezeigt (Cartoon und Linien). Jedes Protomer unterteilt sich in drei Domänen. Das aktive Zentrum liegt zwischen der Domäne I und II (magentafarbene Aminosäuren His und Cys). C: Überlagerte Strukturen eines Protomers der SARS CoV M^{Pro} (blau) und der HCoV 229E M^{Pro} (gelb). Die Homologie der Strukturen ist gut zu erkennen. D: Katalytische Diade beider Proteasen in überlagelter Darstellung. Das aktive Zentrum zeichnet sich durch seine hoch konservierte Struktur in dieser Region aus. Die Protonenübertragung zwischen Cys 145 und His 41 ist durch die grün gestrichelte Linie angedeutet.

Die beiden Hauptproteasen sind nur als Dimere zur Katalyse fähig und haben ihr pH-Maximum im Bereich von 7.3 bis 8.5. Unter physiologischen Bedingungen bei einem pH-Wert von 6 ist nur ein Protomer aktiv, dies liegt vermutlich an einer pH-bedingten Konformationsänderung in einer der Bindungstaschen.¹³⁴

Es gibt bereits Ansätze, die Hauptprotease als Zielenzym für die Entwicklung von Inhibitoren zu nutzen. Anand verglich Daten der M^{Pro} von HCoV 229E mit einer berechneten homologen Struktur von SARS CoV M^{Pro} und dem TEGV (Transmissible Gastroenteritis Virus). Letztere lag als Kristallstruktur mit einem Hexapeptidylchloromethylketon (CMK) als Inhibitor vor. Durch Überlagerung der Strukturen konnte festgestellt werden, dass die Bindungstasche der M^{Pro} sich als sehr konservierte Region auszeichnet. Dadurch ist dieser Bereich verschiedener M^{Pro} von gleicher Gestalt. Die Übertragbarkeit von Leitstrukturen von einer M^{Pro} auf die andere und die dadurch

bedingte Inhibierung von unterschiedlichen CoV M^{Pro} sollte also auch im Experiment möglich sein.¹³⁰

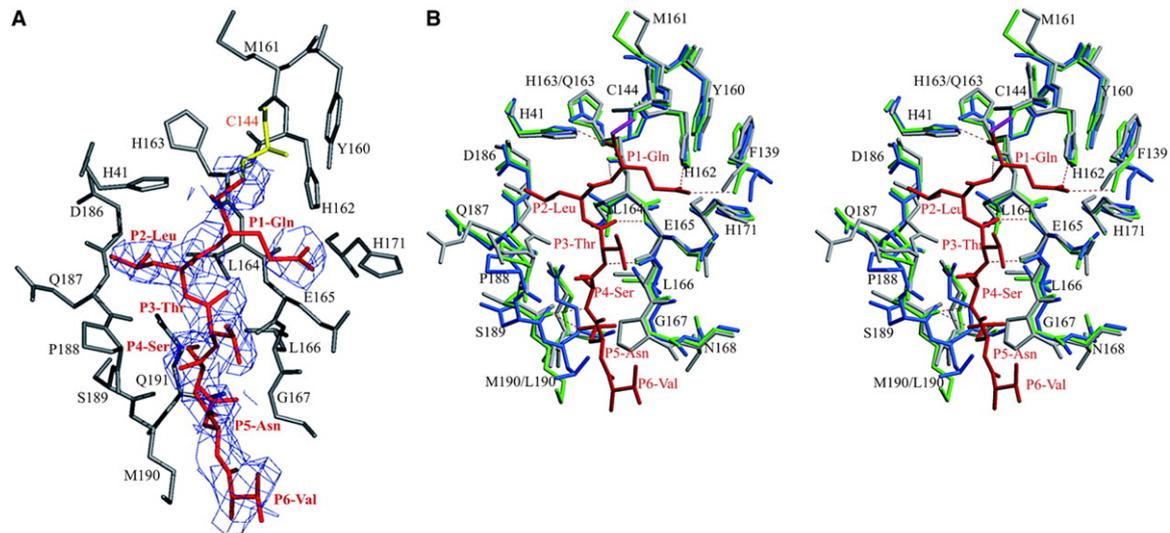


Abbildung 57: (A) Modell des CMK Inhibitors, dargestellt in einer Elektronenhülle, gebunden an die TGEV M^{Pro}. Inhibitor rot, Protein grau, Cystein gelb. (B) Inhibitoren können an verschiedene Coronavirus M^{Pro}'s in ähnlicher Weise binden. Dargestellt ist ein Stereobild der substratbindenden Region als überlagerte Struktur von HCoV 229E M^{Pro} (blau), SARS CoV M^{Pro} (grau) und TEGV M^{Pro} (grün). Der Inhibitor (rot) bindet kovalent (lila) an das Cystein der TEGV-MPro. (reprinted with permission)¹³⁰

Beginnend mit der SARS-Epidemie 2003 wurde die Forschung nach Inhibitoren gegen die Hauptprotease des Erregers intensiviert und in den letzten Jahren fanden sich eine Reihe von neuen Strukturen. Durch virtuelle Screenings wurden eine Reihe von Hemmstoffen gefunden, die sich auch im Experiment als potentielle Kandidaten erwiesen haben.^{136,137} Durch Hochdurchsatz-Screenings und Inhibitoroptimierung konnten ebenfalls Inhibitorstrukturen gefunden werden. Einige Beispiele für potentielle HCoV M^{Pro} Hemmstoffe sind in *Abbildung 58* dargestellt.¹³⁸

In der Literatur ist allerdings sowohl für die SARS CoV M^{Pro} als auch für die HCoV 229E M^{Pro} kein Screening zu finden, bei dem die Inhibitoren direkt am Harz vermessen wurden. Die Hochdurchsatz-Screenings finden alle mit in Lösung befindlichen Substanzen statt. Auch bei Substratspezifitätsscreenings werden die synthetisierten Strukturen vorher abgespalten und dann vermessen. Aus diesem Grund sollte ein Screening für die Hauptprotease des HCoV 229E entwickelt werden, welches es erlaubt, eine Bibliothek von harzgebundenen Inhibitoren mit einem Fluoreszenzassay auf Aktivität zu testen. Dadurch werden aufwändige Reinigungsschritte der einzelnen Komponenten umgangen und es können direkt Aussagen über die Stärke eines Hemmstoffes gemacht werden.

4. Durchführung und Diskussion

Um eine Bestätigung für eine gelungene Inhibierung des Enzyms zu erhalten, sollte zuerst ein Testinhibitor entworfen werden, der es ermöglicht, als positive Kontrolle im Experiment die korrekte Durchführung des Screenings zu kontrollieren.

Im Folgenden werden nun die Entwicklung und die Synthese dieses Testinhibitors beschrieben.

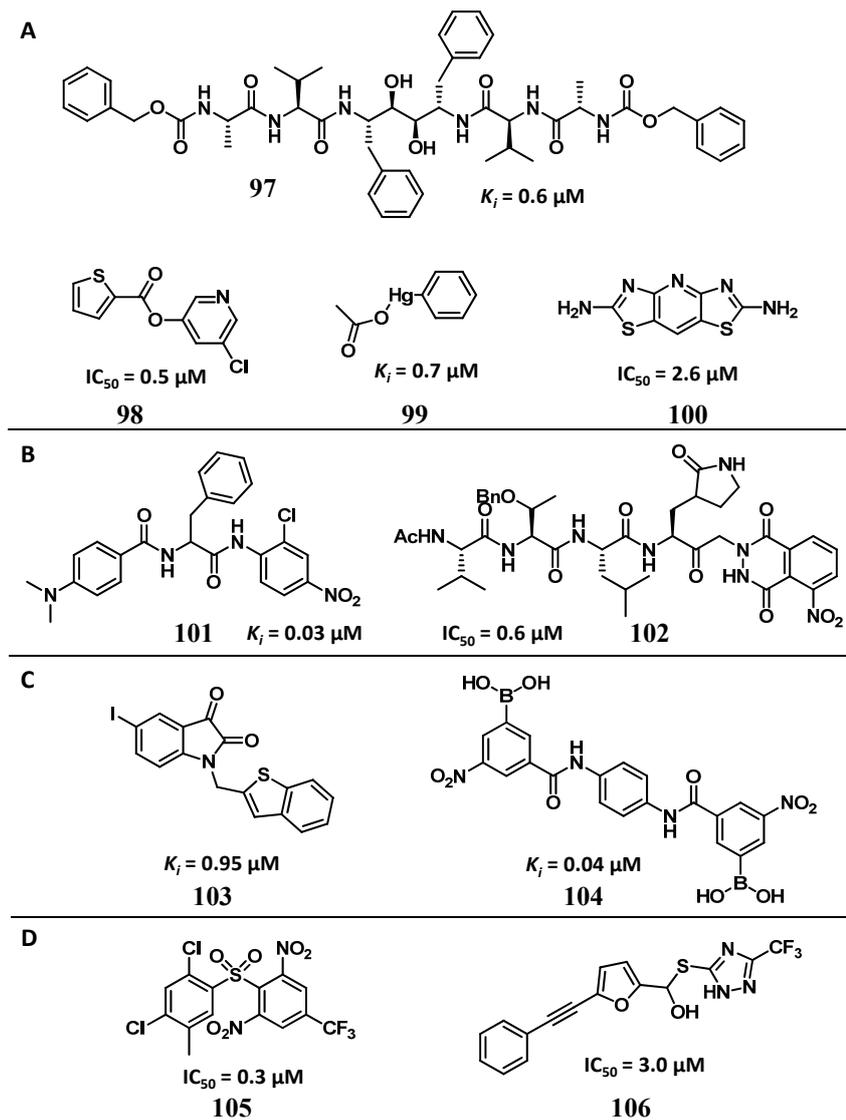


Abbildung 58: Auswahl verschiedener SARS CoV M^{Pro} Inhibitoren. A: Inhibitoren aus High Throughput Screenings (97–100). B: Peptidomimetische Inhibitoren (101, 102). C: Nicht-peptidomimetische Strukturen (103, 104). D: Inhibitoren basierend auf Computer-Modelling (105, 106).¹³⁸

4.2.1.2 Die Entwicklung eines Testinhibitors

Für die Entwicklung des Testinhibitors wurde in der Literatur nach kleinen Molekülen recherchiert, die eine sehr gute Hemmwirkung an den beiden Zielenzymen zeigen und gleichzeitig synthetisch auf einfachem Weg zugänglich sind. Zugleich musste die Struktur des Inhibitors so geschaffen sein, dass sie durch partielle Modifikation mit einer funktionellen Gruppe versehen werden kann, die es möglich macht, den Baustein an einen polymeren Träger zu binden. Im Test sollte dann festgestellt werden, ob die gewählte Struktur auch in harzgebundenem Zustand eine Inhibierung der Proteasen zeigt und als Testinhibitor und positive Kontrolle einsetzbar ist. Bei der Recherche fiel auf, dass die meisten Inhibitoren für die SARS CoV M^{Pro} synthetisiert und an ihr getestet wurden, nicht aber an der HCoV 229E M^{Pro}. So war anfangs nicht klar, ob ein Hemmeffekt des ausgewählten Testinhibitors auf die HCoV 229E M^{Pro} übertragbar sein würde. Zwar können beide Proteasen mit dem gleichen FRET-funktionalisierten Substrat untersucht werden, was bedeutet, dass sie die gleiche Aminosäuresequenz spalten. Ob diese Kompatibilität allerdings auch für die festphasengebundenen Inhibitoren galt, war zu diesem Zeitpunkt noch unklar.

Die Wahl der Leitstruktur fiel auf die Klasse der von Zhang untersuchten heteroaromatischen Pyridylester.¹³⁹ Sie zeichnen sich durch ihre verhältnismäßig kleinen Molekülmassen und ihre gute Wirkung gegenüber der SARS CoV M^{Pro} aus. Zudem sollte es möglich sein, sie am Heteroaromaten so zu funktionalisieren, dass eine Bindung an die Festphase möglich ist. Für diese Arbeit wurde aus der Gruppe der Pyridylester der Furanpyridinylester (**107**) ausgewählt. In *Abbildung 59* ist die gewählte Struktur von Zhang sowie ein Schema des geplanten Festphaseninhibitors gezeigt.

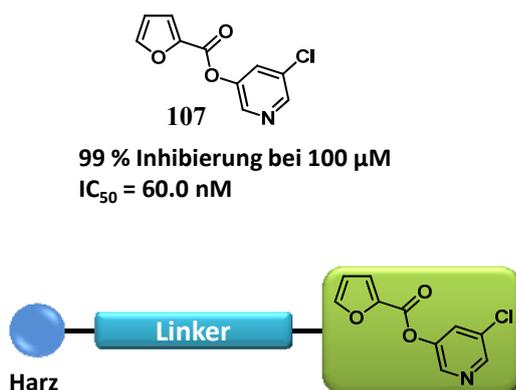


Abbildung 59: Inhibitorstruktur **107** nach Zhang¹³⁹ als Leitstruktur für den Entwurf eines Festphaseninhibitors (oben). Schematischer Aufbau des geplanten Festphaseninhibitors (unten).

Im folgenden Abschnitt wird nun auf die Synthese der Leitstruktur und der Grundbausteine sowie auf die Darstellung des festphasengebundenen Inhibitors eingegangen.

4.2.2 SYNTHESE DER FESTPHASENBAUSTEINE

4.2.2.1 *Synthese des Furan-pyridinylesters 107*

Zunächst sollte Verbindung **107** hergestellt werden, um den Inhibitor an der HCoV 229E M^{Pro} zu testen. Durch die Kupplung der beiden Substanzen Furan-2-carbonsäure **108** und 5-Chloro-3-hydroxypyridin **109** unter Verwendung der Kupplungsreagenzien 6-Chloro-1-Hydroxy-1*H*-Benzotriazol (Cl-HOBt) und Diisopropylcarbodiimid (DIC) in absolutem DMF konnte das gewünschte Produkt **107** in einer Ausbeute von 46 % erhalten werden. Der elektronenarme Pyridinring und die damit verbundene Herabsetzung der Reaktivität der Hydroxygruppe, sowie die geringe Reaktivität der Furancarbonsäure **108** kann in diesem Fall für die moderate Ausbeute verantwortlich sein.

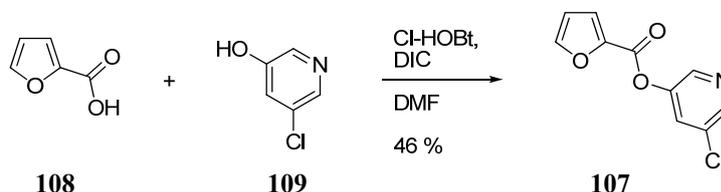


Abbildung 61: *Synthese der Verbindung 107, die bereits erfolgreich als Inhibitor an der SARS HCoV M^{Pro} getestet und zum Vergleich für das Screening an der HCoV 229E M^{Pro} verwendet wurde.*

Für die Synthese des festphasengebundenen Inhibitors sollte der Furanring an Position 5 modifiziert werden. Dies schien sinnvoll, da der in der Literatur postulierte Inhibierungsmechanismus der Protease von einer Spaltung des Esters durch das nukleophile Cystein des aktiven Zentrums ausgeht (*Abbildung 60*).¹³⁹ Aus diesem Grund sollte eine Modifikation des Furanrings ohne Einfluss auf den Inhibierungsmechanismus möglich sein.

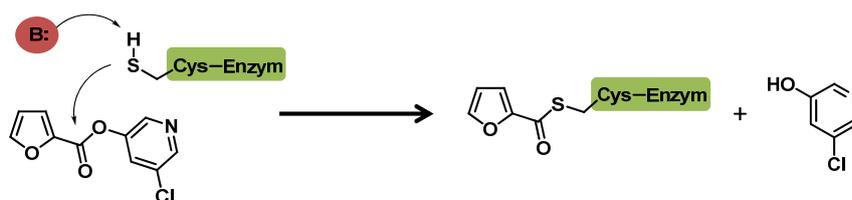


Abbildung 60: Postulierter Inhibierungsmechanismus der SARS M^{Pro} durch Pyridinylester-Inhibitoren. Durch eine Base (rot) wird der Cysteinrest (grün) des aktiven Zentrums deprotoniert. Der Schwefel kann nun die Esterbindung spalten und das Pyridinderivat verlässt das Molekül als Abgangsgruppe. Enzym und Furanrest gehen eine kovalente Bindung ein.

Es war geplant, den Inhibitor **107** über eine Carbonsäure am C4 des Furanrings an die Festphase zu kuppeln. Durch die freie Säure an dieser Stelle sollte eine Vorgehensweise mittels Festphasen-Fmoc-Strategie¹⁴⁰ gelingen.

Ausgangspunkt für diese Synthese war der Furan-2-carbonsäuremethylester **110**, welcher in einer dreistufigen, literaturbekannten Synthese¹²¹ zu Verbindung **111** umgesetzt werden konnte. Durch eine Swern-Oxidation mit Dimethylsulfoxid (DMSO), Oxalylchlorid und Triethylamin (NEt_3) in DCM wurde Verbindung **112** in nahezu quantitativer Ausbeute erhalten.

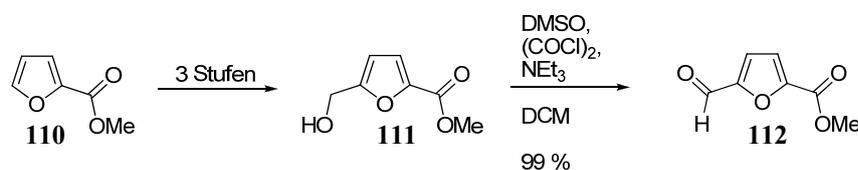


Abbildung 63: Synthese des Furanbausteins **112** als Vorstufe für den festphasengebundenen Inhibitor.

Die weitere Umsetzung erfolgte durch eine Verseifung des Methylesters **112** mit Lithiumhydroxid und anschließender saurer Aufarbeitung. Dieser Reaktionsschritt bereitete anfänglich Probleme, da nach Zugabe des LiOH zum THF/Wasser Gemisch bei Raumtemperatur und einer Reaktionszeit von 30 min lediglich ein Gemisch aus einem Furanalkohol **113**, der Di-Furansäure **114** und geringe Mengen des Eduktes **112** isoliert werden konnten.

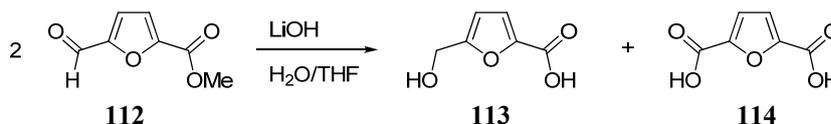


Abbildung 64: Nebenreaktion des Furanbausteins **112**. Bei zu hoher Konzentration des Edukts findet eine unerwünschte Cannizzaro Reaktion statt.

4. Durchführung und Diskussion

Grund dafür war die als Nebenreaktion ablaufende Cannizzaro-Reaktion, in der zwei Aldehyde unter basischen Bedingungen zu Carbonsäure und sekundärem Alkohol disproportionieren. Durch eine Reihe von Versuchen konnten die Konzentration des LiOH und des Furanaldehyd-Edukts **112** so eingestellt werden, dass die Reaktion nun mit über 90 % Ausbeute verlief ($c(\mathbf{112}) < 125 \text{ mmol/l}$, LiOH 1.1 Äq). Es waren nur noch Spuren der Nebenprodukte vorhanden, welche aber mittels Säulenchromatographie entfernt werden konnten.

Im nächsten Schritt wurde das so gewonnene Edukt **115** mit 5-Chloro-3-hydroxypyridin **109** und den Kupplungsreagenzien Cl-HOBt und DIC zu Verbindung **116** gekuppelt. Die Ausbeute für diesen Reaktionsschritt betrug 80 %.

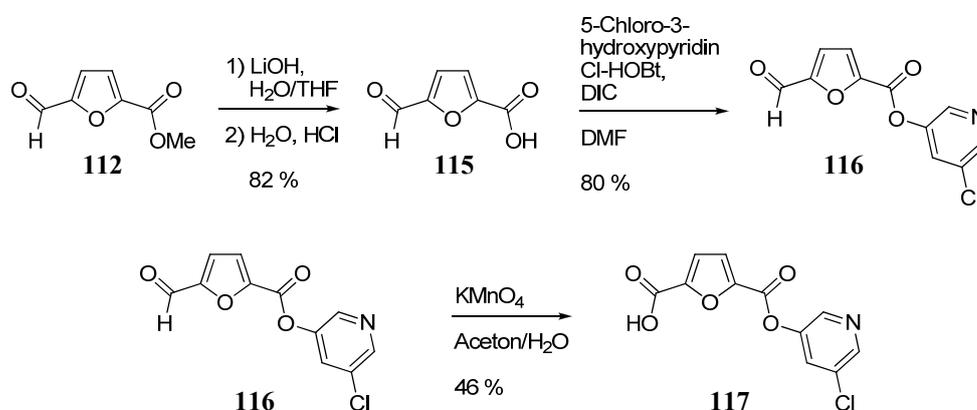


Abbildung 65: Oben: Verseifung der Verbindung **112** durch LiOH und anschließender Kupplung mit 5-Chloro-3-hydroxypyridin zu Verbindung **116**. Unten: Oxidation der Verbindung **116** mit KMnO₄ zur Zielverbindung **117**, die nun als Baustein für die Festphasensynthese verwendet werden kann.

Die Oxidation des Aldehyds **116** zur Carbonsäure **117** wurde mit Kaliumpermanganat (KMnO₄) durchgeführt. Anfangs wurden allerdings nur sehr geringe Ausbeuten erzielt, so dass hier eine Optimierung der Reaktionsbedingungen notwendig war. Durch eine Variation des Lösungsmittelgemisches, der Temperatur und der Reaktionsdauer, wie in *Tabelle 10* angegeben, konnte die Ausbeute auf 46 % gesteigert werden. Der Einsatz von Pyridiniumchlorochromat (PCC) als Oxidationsmittel ergab keine weitere Verbesserung des Produktumsatzes. Grund für die moderate Ausbeute kann eine Zersetzung des Edukts während der Reaktion sein, da aus dem Reaktionsgemisch neben 5-Chlor-3-hydroxypyridin **109** keine Ausgangssubstanz mehr isoliert werden konnte. Die Reaktion wurde demnach mit 3.0 Äq KMnO₄ bei 40 °C in eine Aceton/Wasser-Gemisch (9/1) und einer Reaktionszeit von 1 h durchgeführt.

Tabelle 10: Variation der Reaktionsbedingungen für die Oxidation von Verbindung **116** zu Produkt **117**.

Ansatz	Oxidationsmittel	Äq.	Lösungsmittel (v/v)	T	Zeit	Ausbeute
1	KMnO ₄	6.0	Aceton/ KH ₂ PO ₄ -Puffer ^a (1.25/1)	RT	30 min	34 %
2	KMnO ₄	3.0	Aceton/ H ₂ O (1/1)	65 °C	1 h	-
3	KMnO ₄	3.0	Aceton/ KH ₂ PO ₄ -Puffer ^a (10/3)	0 °C	10 min	-
4	KMnO ₄	2.4	Aceton/ H ₂ O (5/3)	0 °C–RT	1.5 h	22 %
5	KMnO ₄	3.0	Aceton	40 °C	1.5 h	40 %
6	KMnO ₄	3.0	Aceton/H ₂ O (9/1)	40 °C	1 h	46 %
7	PCC ¹⁴¹	4.0	-	RT	2 h	-
8	PCC ¹⁴²	1.5	DMF	RT	4 h	-
9	PCC/H ₅ IO ₆ ¹⁴³	2 mol % ^b	ACN	0 °C–RT	6.5 h	Spuren

[a] c(KH₂PO₄) = 1.25 M, pH 5.5; [b] PCC: 2 mol %, H₅IO₆: 1.1 Äq.

Die erhaltene Furancarbonsäure **117** stellt den zentralen Baustein für die Synthese eines festphasengebundenen Testinhibitors dar. Zunächst wurde aber noch ein weiteres Derivat synthetisiert, um auch in Lösung testen zu können, ob sich eine Substitution am Furanring auf die Inhibierung der HCoV M^{Pro} auswirkt. Größere Substituenten könnten die Hemmung an dieser Stelle beeinflussen. Deshalb wurde der Furanbaustein zunächst mit Glycinbenzylester Hydrochlorid **118** zu Verbindung **119** umgesetzt.

Für die Kupplung wurden Cl-HOBt und DIC in absolutem DMF als Kupplungsreagenzien eingesetzt. Verbindung **119** konnte so in einer Ausbeute von 45 % erhalten werden.

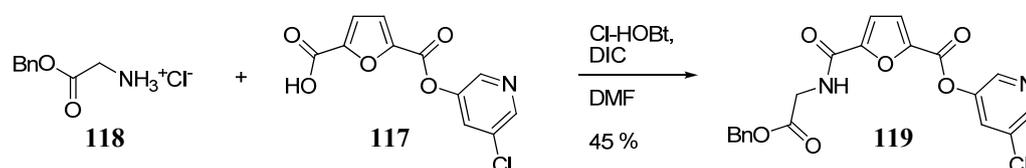


Abbildung 66: Darstellung der Verbindung **119** über eine Kupplung von Glycinbenzylester Hydrochlorid **118** mit Furancarbonsäure **117**.

Für die Synthese des festphasengebundenen Inhibitors wurde PEGA-Harz verwendet. PEGA-Harz zeichnet sich vor allem durch seine guten Quelleigenschaften in wässrigen Lösungsmittelgemischen aus und ist inert gegenüber vielen biologischen Systemen. Durch die Verwendung dieses Harzes sollte eine Beeinflussung des Enzyms später im

4. Durchführung und Diskussion

Assay vermieden werden. Des Weiteren wurde, wie im vorherigen Kapitel beschrieben, ein Linker zwischen Harz und Furanbaustein eingefügt (*Abbildung 59*, unten). So sollte gewährleistet werden, dass der Inhibitor für das Enzym zugänglich ist und nicht durch die Struktur des Harzes abgeschirmt wird. Da unklar war, ob die Länge und Eigenschaft des Linkers einen Einfluss auf die Hemmeigenschaften hat, wurden unterschiedliche Vertreter geplant. Als Linker sollte einmal eine Alkylkette (6-Aminohexansäure) und einmal Ethylenglycolketten in unterschiedlicher Länge als Abstandhalter zwischen Harz und Inhibitor eingesetzt werden. Durch die Wahl dieser beiden Strukturelemente kann nach dem Test mit der Protease entschieden werden, ob die unterschiedliche Polarität und die Solvatationseigenschaft der Linker eine Rolle bei der Inhibierung spielt.

Zunächst wurden die Ausgangssubstanzen für die Linker mit Fmoc-Schutzgruppen versehen. Der Alkyllinker **121** wurde durch Umsetzung von 6-Aminohexansäure **120** mit Fmoc-Cl und Na₂CO₃ in einem Dioxan/Wasser Gemisch in 95 % Ausbeute erhalten. Für den Ethylenglycollinker **123** wurde 2,2'-(Ethylendioxy)bis(ethylamine) **122** in Dioxan mit Fmoc-Cl zur Reaktion gebracht und das Produkt mit 70 % Ausbeute isoliert.

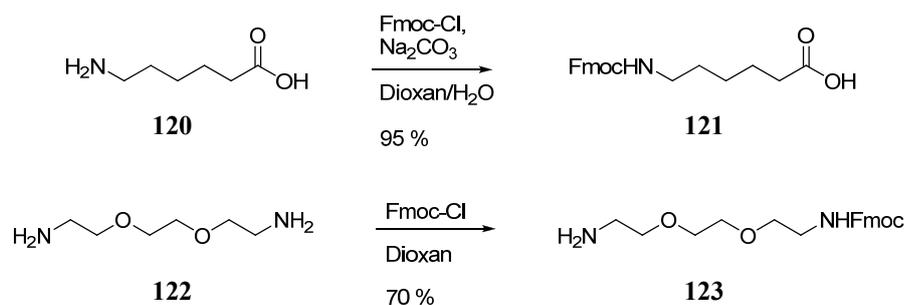


Abbildung 67: Darstellung der unterschiedlichen Linker für die Festphasensynthese. Umsetzung von 6-Aminohexansäure **120** zu Alkyllinker **121** und 2,2'-(Ethylendioxy)bis(ethylamine) **122** zu Ethylenglycollinker **123**.

Nach der Herstellung der Grundbausteine konnte die Synthese der Inhibitoren an der Festphase durchgeführt werden. Die Darstellung wurde nach der Fmoc-Strategie mit Hilfe einer Synthesemikrowelle durchgeführt.¹⁴⁰ Auf diese Weise konnte die Reaktionszeit entscheidend verkürzt und die Temperatur der Reaktionslösung exakt kontrolliert werden. Als Kupplungsreagenzien wurden PyBOP und NMM in absolutem DMF verwendet. Die Fmoc-Schutzgruppe wurde im basischen mit einer 20%igen Piperidin/DMF Lösung abgespalten. Mit einem Farbttest auf freie Aminogruppen (Kaisertest)¹⁴⁴ und einem, der freie Carboxylatgruppen anzeigt (Malachitgrün-Test),¹⁴⁵ konnte nach jedem Syntheseschritt die Vollständigkeit der Reaktion überprüft werden. Grundsätzlich wurde jede Kupplung zweimal durchgeführt.

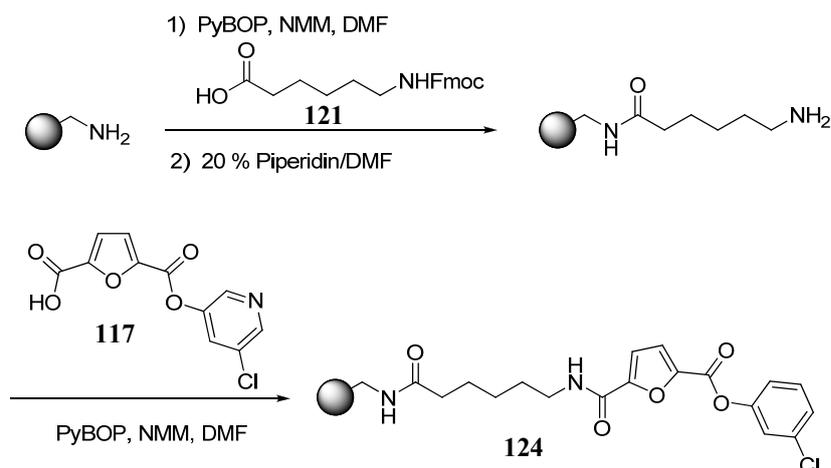


Abbildung 68: Synthese der festphasengebundenen Verbindung **124** unter Verwendung des Alkyllinkers **121** und der Furanverbindung **117**.

Für den Inhibitor **124** wurde im ersten Schritt der Alkyllinker **121** mit eben beschriebener Methode an das Harz gekuppelt. Anschließend konnte der Furanbaustein **117** unter gleichen Bedingungen angebracht werden. Das Harz wurde gründlich gewaschen und anschließend im Vakuum getrocknet.

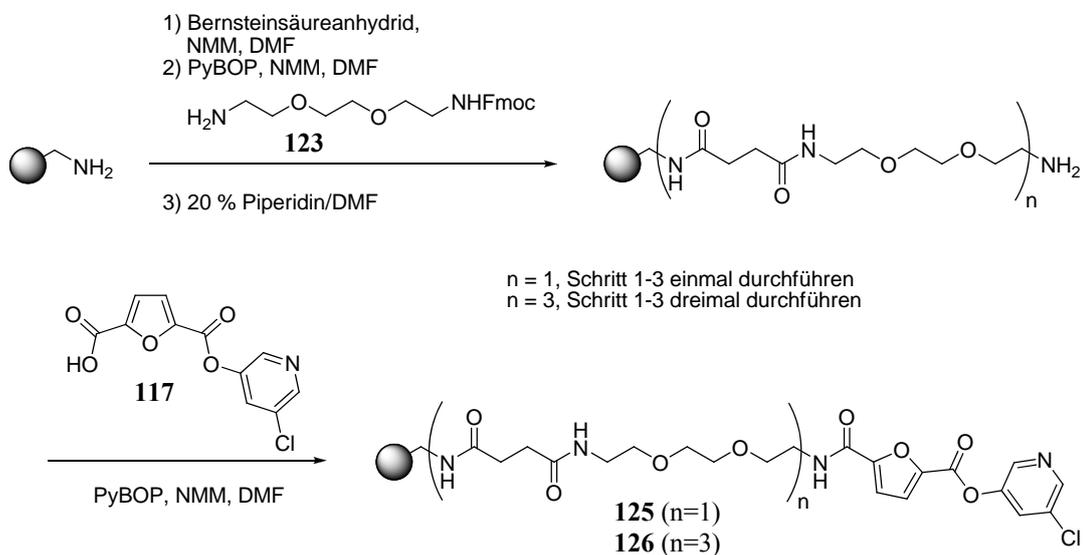


Abbildung 69: Darstellungen der Testinhibitoren **125** und **126**. Als Linker zwischen Harz und Furankomponente **117** wurde Verbindung **123** einmal (**125**) bzw. dreimal (**126**) im Wechsel mit Bernsteinsäureanhydrid eingebaut.

Bei der Synthese der Inhibitoren mit Ethylenglycollinker wurde das Harz zuerst mit Bernsteinsäureanhydrid und NMM umgesetzt, um eine freie Carboxylatfunktion am

polymeren Träger zu erhalten. Daraufhin wurde der Fmoc-geschützte Linker **123** wie oben beschrieben angebracht, nach erläuterter Methode entschützt und anschließend mit dem Furanbaustein **117** gekuppelt. Eine Verlängerung des Linkers wurde durch mehrmaliges, abwechselndes Kuppeln von Bernsteinsäureanhydrid und dem Ethylenglycollinker **123** mit anschließender Entschützung erreicht. Abschließend wurde das Harz gewaschen und im Vakuum getrocknet.

4.2.2.3 Synthese des FRET-Substrats für den Enzymassay

Nach der Synthese der Testinhibitoren am Harz (**124–126**) und den Vertretern in Lösung (**107** und **119**) wurde das Substrat **127** für den Enzymassay hergestellt. Dabei handelt es sich wie in *Kapitel 2.3* beschrieben um ein auf dem FRET-Prinzip basierendes Substrat, welches dem natürlichen Substrat der Protease nachempfunden ist.^{132,146} Als Donor wurde 2-Aminobenzoesäure (Abz) und als Akzeptor 3-Nitro-L-tyrosin (Tyr(3-NO₂)) an die Enden der Peptidsequenz platziert.

Die Synthese erfolgte an einem mit Fmoc-Arg(Pbf) vorbeladenem Wang-Harz. Da die tatsächliche Beladung des Harzes nicht bekannt war, musste diese vor Beginn der Synthese mittels einer UV-Eichgeraden bestimmt werden, um im weiteren Verlauf Edukte und Reagenzien richtig dosieren zu können. Es wurde von einer definierten Menge Fmoc-Arg(Pbf) die Fmoc-Gruppe abgespalten. Mittels UV-Spektroskopie wurde über das Absorptionsmaximum des Dibenzofulven-Piperidin-Addukts (300 nm) bei variabler Konzentration eine Kalibriergerade erstellt.¹⁴⁰ Durch die Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe von einer bekannten Menge des vorbeladenen Harzes und durch die Korrelation zwischen Extinktion und Konzentration der zuvor gemessenen Eichgeraden konnte die tatsächliche Beladung des Harzes berechnet werden. Im Fall des hier verwendeten Wang-Harzes lag sie bei 0.69 mmol/g.

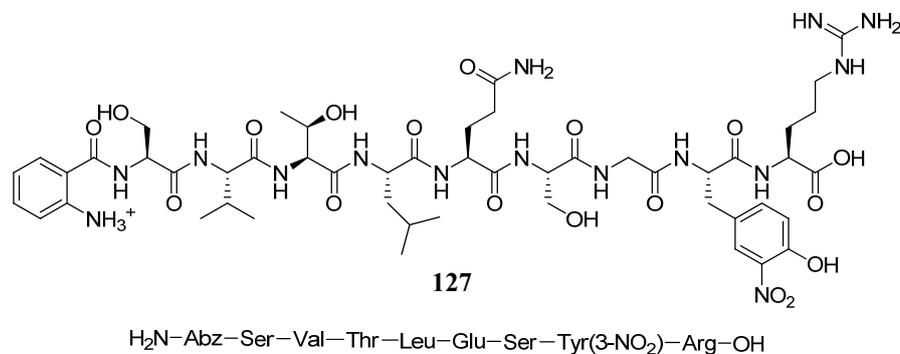


Abbildung 70: Struktur des FRET-Substrats, das für das Screening der HCoV 229E M^{Pro} synthetisiert und verwendet wurde.

Eingesetzt wurden für die Synthese immer 3.0 Äq der Aminosäuren, sowie 3.0 Äq PyBOP und 4.0 Äq NMM, darüber hinaus DMF in dem Maße, dass die Gesamtkonzentration zwischen 0.18 und 0.2 mmol/l lag. Nach der letzten Kupplung an der Synthesemikrowelle wurde das Harz gründlich gewaschen und in einen Schüttelkolben überführt, in dem das Peptid mit einer Lösung aus DCM, TFA und Triisopropylsilan (TIS) abgespalten und die verbleibenden Schutzgruppen entfernt wurden. Nach Reinigung über HPLC und MPLC konnte das gewünschte Produkt mit einer Ausbeute von 22 % (entspricht 85 % pro Kupplung) und 96 % Reinheit erhalten werden.

Nach der erfolgreichen Synthese der Inhibitoren am PEGA-Harz, sowie den Verbindungen **107** und **119**, konnten die Verbindungen anschließend mit Hilfe des Substrats am isolierten Enzym auf ihre Hemmeigenschaften getestet werden. Die Ergebnisse des Screenings werden im folgenden Kapitel diskutiert.

4.2.3 VORTESTS MIT NICHT ANS HARZ GEBUNDENEN INHIBITOREN

Die Inhibitoren, die nicht am PEGA-Harz gebunden waren, wurden zuerst untersucht, um sicherzustellen, dass die vorgenommene Modifikation am Furanring keinen Einfluss auf die Hemmaktivität hat. Zudem musste festgestellt werden, ob der gewählte SARS CoV M^{Pro} Inhibitor **107** auch die verwandte Protease des HCoV 229E hemmen kann. Dies sollte in einer Testreihe mit den Verbindungen **107**, **116**, **117** und **119** überprüft werden.

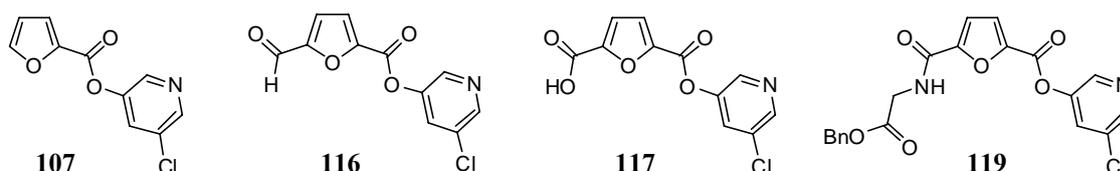


Abbildung 71: Strukturen der Verbindungen, die an der HCoV 229E M^{Pro} getestet wurden, um den Einfluss der Substitution am Furanring auf die Hemmstärke der Inhibitoren zu untersuchen.

Das Enzym wurde von der Arbeitsgruppe *Kisker* (Universität Würzburg) bereitgestellt. Es wurde rekombinant als Fusionsprotein, bestehend aus der Hauptprotease und einem N-terminalen Maltose-Binding-Protein (MBP) von *E. coli* Bakterien exprimiert.^{147,148} Durch das MBP konnte das Zielenzym über eine Amylose-Affinitäts-Chromatographiesäule isoliert und gereinigt werden. In vorangegangenen Tests konnte das gesamte Fusionsprotein (MBP-M^{Pro}) für die Enzymassays von in Lösung befindlichen Inhibitoren verwendet werden, da das MBP die Aktivität der Protease nicht beeinflusste.

Der Enzymassay für die HCoV 229E M^{Pro} wurde in einem 20.0 mM TRIS-Puffer bei pH 7.5 mit 200 mM NaCl und 100 μ M EDTA durchgeführt. Zusätzlich befand sich das Tensid Brij 35[®] (0.005 %) und DTT (1.00 mM) in der Lösung. Das Substrat ($c_{\text{final}} = 50.0 \mu\text{M}$) und die Inhibitoren ($c_{\text{final}} = 100 \mu\text{M}$) wurden in DMSO gelöst dazugegeben und die Inkubationszeit betrug jeweils eine Minute. Die Restaktivität des Enzyms konnte (wie bereits oben beschrieben) über die Fluoreszenzzunahme ermittelt werden.

Tabelle 11: Aktivitäten in %, sowie IC_{50} - und K_i -Werte der Inhibitoren in Lösung an der HCoV 229E M^{Pro}.

Verb.	Inhibierung bei 20.0 μ M	IC_{50} (μ M)	K_i (μ M)
107	51 %	19.0	14.9
116	47 %	-	-
117	3 %	-	-
119	70 %	6.00	4.70

- = nicht bestimmt

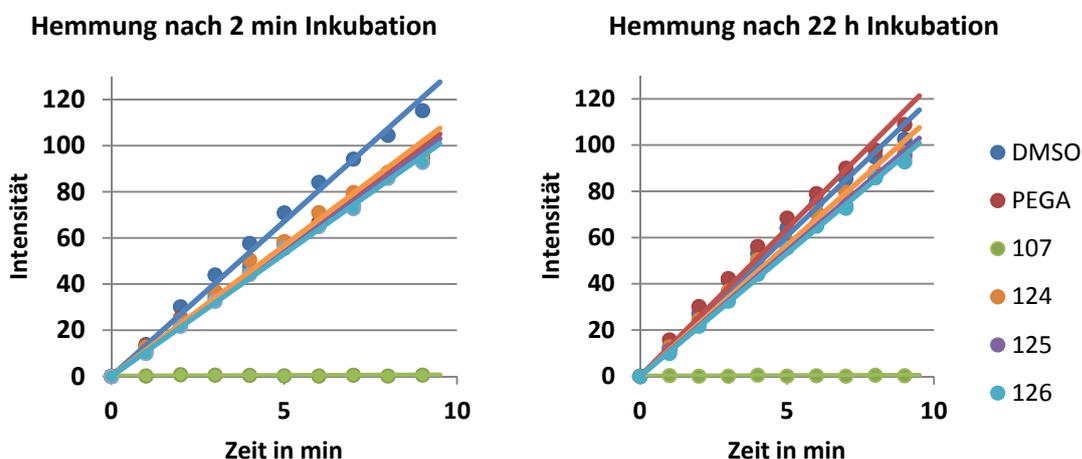
Aus *Tabelle 11* ist zu sehen, dass drei der vier getesteten Verbindungen (**107**, **116** und **119**) an der HCoV 229E M^{Pro} Wirkung zeigten. Die literaturbekannte Verbindung **107** hemmte mit einem $IC_{50} = 19.0 \mu\text{M}$ ($K_i = 14.9 \mu\text{M}$), dieser Wert lag zwar über dem Literaturwert an der SARS CoV M^{Pro} ($IC_{50} = 60.0 \text{ nM}$)¹³⁹, reichte aber dennoch aus, um die Struktur als Testinhibitor zu verwenden. Verbindung **116** zeigte eine vergleichbare Aktivität wie **107**. Durch die Carbonsäure bei Verbindung **117** nimmt die Hemmaktivität allerdings drastisch ab. Wahrscheinlich spielt hier die Polarität der Verbindung eine Rolle, da die Bindungstasche der Protease eher unpolare Reste bevorzugt. Durch die Substitution des Furanrings mit dem Benzylglycin (Verbindung **119**) wird dagegen ein deutlich niedrigerer K_i -Wert erreicht ($4.70 \mu\text{M}$). Damit zeigt sich, dass der unpolare Rest im Vergleich zu der Ausgangsverbindung **107** die Hemmung eher noch verstärkt. Verbindung **119** zeigt beim Vergleich dieser vier Verbindungen die beste Affinität. Eine Bindung der Struktur an die Festphase über die Position 5 des Furanrings sollte bei gleichzeitiger Aufrechterhaltung der Hemmaktivität also möglich sein.

4.2.4 ENZYMTTESTS DER HARZGEBUNDENEN INHIBITOREN

Für die Enzymtests der festphasengebundenen Inhibitoren wurde unter gleichen Bedingungen wie in Lösung gemessen, mit Ausnahme der Inkubationszeit. Es war bekannt, dass die Zeit, in der das Enzym mit dem Inhibitor wechselwirkt, aufgrund des polymeren Trägers länger sein musste als bei einem Screening in Lösung.⁸⁶ Um die Dauer der Inkubation herauszufinden, wurden Proben nach unterschiedlicher Zeit untersucht. Dafür wurden zunächst isopyknische Lösungen sowohl der gebundenen Inhibitoren als auch mit reinem PEGA-Harz in DMSO hergestellt. Auf diese Weise konnte über das Volumen eine definierte Menge an Harz in die Mikrotiterplatten mit einer Pipette überführt werden. Da die Konzentration der ans Harz gebundenen Inhibitoren aufgrund der Beladung des polymeren Trägers und des Verdünnungseffekts wesentlich geringer war als die der Verbindungen in Lösung, musste hier mit einer höheren Konzentration

4. Durchführung und Diskussion

gearbeitet werden. Eine Konzentration wie beim vorangegangenen Screening von $c_{\text{final}} = 20.0 \mu\text{M}$ war nicht ausreichend, um die Protease adäquat zu inhibieren. Für die Messungen der harzgebundenen Spezies wurde aus diesem Grund für alle weiteren Messungen standardmäßig eine Konzentration von $c_{\text{final}} = 1.00 \text{ mM}$ (bezogen auf die theoretische Beladung des Harzes) gewählt. Nun wurde das Enzym zusammen mit den Inhibitoren am Harz, reinem PEGA-Harz und Verbindung **107** als Vergleich einmal für 5 min und einmal für 22 h bei 4 °C inkubiert. Nach dieser Zeit wurde das Substrat zugegeben, gut durchmischt und die Restaktivität des Enzyms fluorimetrisch bestimmt. Wie in *Abbildung 72* zu erkennen ist, zeigte keiner der gebundenen Inhibitoren sowohl nach 5 min als auch nach 22 h eine nennenswerte Wirkung am Enzym. Lediglich der Vergleichsinhibitor **107** ($c_{\text{final}} = 100 \mu\text{M}$) konnte das Enzym vollständig inhibieren. Ein positiver Nebeneffekt dieser Tests war die Tatsache, dass das Enzym auch nach 22 h nahezu unveränderte Aktivität zeigte und auch von PEGA-Harz nicht beeinflusst wurde. Die Protease überstand die gewählten Bedingungen für die Inkubation, ohne sich zu zersetzen oder Aktivität zu verlieren. Die Unwirksamkeit der gebundenen Inhibitoren sollte also nicht an den Wechselwirkungen zwischen Enzym und dem Harz oder der Inhibitorstruktur liegen, da letztere mit der in Lösung verwendeten Struktur **107** bis auf die Bindung zum Harz identisch war. Selbst bei einer herabgesetzten Aktivität der gebundenen Inhibitoren war davon auszugehen, dass aufgrund der Vortests mit den Verbindungen **107**, **116**, **117** und **119** bei der gewählten Konzentration ein Hemmeffekt erkennbar sein müsste.



*Abbildung 72: Fluorimetrische Messung der Enzymaktivität nach einer Inkubationszeit von 5 min und 22 h. Eine Hemmung der festphasengebundenen Inhibitoren konnte nicht festgestellt werden. PEGA-Harz beeinflusst die Enzymaktivität nicht. Verbindung **107** hemmt das Enzym bei einer Konzentration von $100 \mu\text{M}$ vollständig.*

Eine Ursache für die nicht vorhandene Aktivität der Verbindungen könnte die Verwendung des Fusionsproteins, also MBP-M^{Pro}, sein. Da die M^{Pro} nur als Dimer aktiv

ist, beträgt die Masse des Fusionsprotein-Dimers etwa 152 kDa (2×42 kDa (MBP) + 2×34 kDa (M^{Pro})). Die Größe der Protease verhindert, dass sie auch in die verzweigte Struktur der Harzkügelchen eindringen kann und die innenliegenden Inhibitoren erreicht. Zudem ist anzunehmen, dass der Linker zu kurz ist, so dass sich der Inhibitor nicht in der Bindungstasche platzieren kann, das Fusionsprotein wird aufgrund seiner Größe vom polymeren Träger sozusagen „abgeblockt“.

Mit Hilfe der Faktor Xa Protease* wurde in der Arbeitsgruppe Kisker das MBP vom Fusionsprotein abgespalten, so dass nur noch die M^{Pro} übrig blieb.¹⁴⁷ Dadurch wurde die Masse des Enzyms auf 68 kDa (2×34 kDa) verringert. Nun sollte gewährleistet sein, dass die Protease in die Netzstruktur des Harzes gelangen und mit dem Inhibitor wechselwirken kann.

Mit der so präparierten M^{Pro} wurde die Testreihe wiederholt und zudem die Inkubationszeit und die Temperatur erneut variiert.

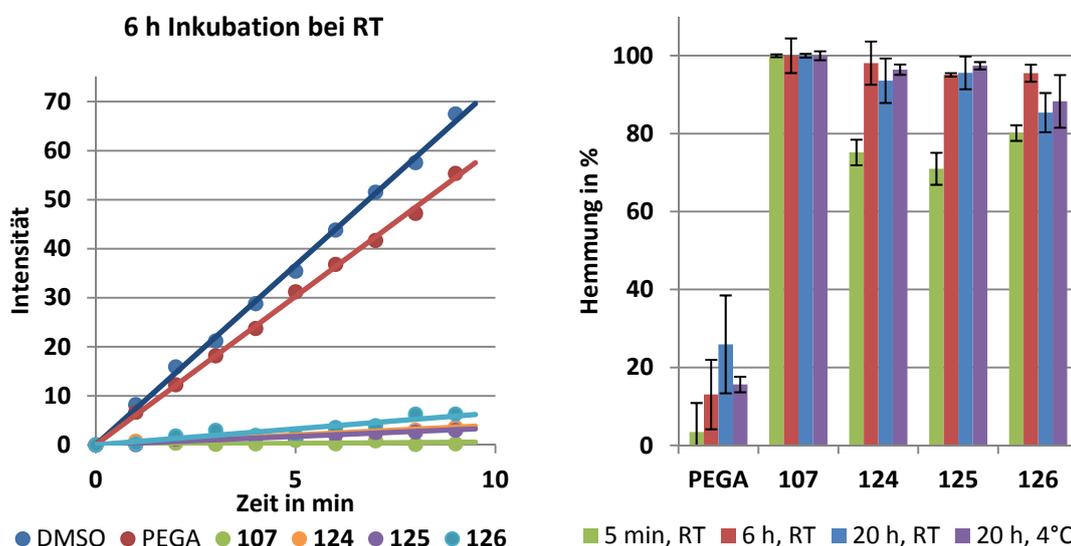


Abbildung 73: Links: Umsatz-Zeit-Diagramm der Festphaseninhibitoren (124–126) im Vergleich mit PEGA und 107 nach 6 h Inkubationszeit bei RT. Rechts: Gegenüberstellung der unterschiedlichen Screeningbedingungen.

Wie in *Abbildung 73* zu sehen ist, war bei dieser Messreihe für alle Inhibitoren ein Hemmeffekt festzustellen. Das PEGA-Harz allein hemmte je nach Zeit und Temperatur zwischen 3 und 25 %. Die Festphaseninhibitoren zeigen sogar nach der kurzen Inkubationszeit von 5 min eine deutliche Wirkung (71–80 %). Nach 6 h bei Raumtemperatur erreicht die Hemmung ihr Maximum von 95 bis 98 %. Auch nach 20 h bei RT ist das Enzym noch stabil, was sich positiv auf die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse auswirkt. Verbindung 107 erreichte das Maximum an Hemmung bereits nach

* Faktor Xa Protease ist ein Enzym, welches selektiv nach Arg in der Sequenz Ile-Glu/Asp-Gly-Arg spaltet. Es wird dazu benutzt Protein-Tags vom Zielprotein abzuspalten.

5 min. Dies macht den Unterschied zwischen Inhibitoren am polymeren Träger und in Lösung deutlich und unterstrich die Wichtigkeit einer längeren Inkubationszeit. Der Hemmeffekt, der vom reinen PEGA-Harz ausging spielte im Vergleich zum Effekt der Inhibitoren eine untergeordnete Rolle. Die Wirkung des Harzes kann vernachlässigt werden, solange mit ausreichender Konzentration der Festphaseninhibitoren gemessen wird und die Differenz des prozentualen Werts zwischen PEGA-Harz und Inhibitor groß genug ist. Im vorliegenden Fall konnte davon ausgegangen werden, dass der Hemmeffekt auf die Wirkung des Inhibitors und nicht des Harzes zurückzuführen ist. Des Weiteren konnte festgestellt werden, dass die Länge und die Beschaffenheit des Linkers unter diesen Bedingungen keinen nennenswerten Einfluss auf die Hemmung hatte. Dies stand in guter Korrelation zu den Ergebnissen von *Machon*, der ebenfalls einen Linker-unabhängigen Hemmeffekt an Rhodococcin feststellen konnte.^{85,86}

Auf diese Weise ist es gelungen, Testinhibitoren herzustellen und geeignete Bedingungen für ein Screening „on bead“ an der HCoV 229E M^{Pro} zu ermitteln. Die Inhibitorstruktur **107** konnte so modifiziert werden, dass eine Synthese der festphasengebundenen Verbindungen mittels Fmoc-Strategie möglich war. In Experimenten mit der Protease konnte die Aktivität der synthetisierten Testverbindungen **124–126** bestätigt werden. Durch die Wahl verschiedener Linker wurde eine Beeinflussung der Hemmaktivität aufgrund des Linkers ausgeschlossen. Die besser handhabbare Synthese des Alkyllinkers von Verbindung **124** war der Grund, sie als Standard-Testinhibitor für weitere Experimente zu nutzen. Für das Screening wurde eine Inkubationszeit von 6 h bei Raumtemperatur als idealer Parameter ermittelt.

Im Anschluss daran wurden der Testinhibitor und die gefundenen Assaybedingungen in einem Screening zusammen mit anderen peptidischen Strukturen getestet. Im folgenden Kapitel sind die Durchführung und die Ergebnisse diskutiert.

4.2.5 BERECHNETE PEPTIDSTRUKTUREN ALS MÖGLICHE SUBSTRATE

Für die Durchführung eines Screenings „on bead“ an der HCoV 229E M^{Pro} wurde auf berechnete Peptidstrukturen der Arbeitsgruppe *Hofmann* (Universität Duisburg-Essen) zurückgegriffen. Durch computergestützte Verfahren wurden aus allen natürlichen Aminosäuren Tripeptide berechnet, die bedingt durch ihre dreidimensionale Struktur die Bindungstasche der SARS-CoV M^{Pro} im Bereich des aktiven Cysteins ausfüllen. Drei der Rechenergebnisse sollten synthetisiert und in einem Screening „on bead“ an der HCoV 229E M^{Pro} getestet werden. Dabei wurden drei unterschiedliche Sachverhalte untersucht. Die Tripeptide konnten entweder als Inhibitor oder als Substrat eine Reaktion mit der Protease eingehen oder keinen Effekt am Enzym zeigen. Bei einer peptidischen Struktur muss in Erwägung gezogen werden, dass sie von der Protease gespalten werden kann und

nicht als Inhibitor sondern als Substrat fungiert. Für das fluorimetrische Experiment würde das bedeuten, dass keine Abnahme der Enzymaktivität gemessen wird. Deshalb sollte in einem weiteren Versuch herausgefunden werden, ob die Protease diese Tripeptide spaltet oder ob keinerlei Interaktion stattfindet. Für das Screening wurden drei Tripeptide mit den folgenden Sequenzen ausgewählt: HO-Tyr-His-Phe-NH₂ (**128**), HO-Gln-Asp-Arg-NH₂ (**129**) und HO-Glu-Glu-Ser-NH₂ (**130**).

4.2.5.1 Synthese der Tripeptide 128–130

Für die Synthese der berechneten Strukturen wurde wie bereits bei den Testinhibitoren das PEGA-Harz gewählt. Die Synthese lief, wie zuvor beschrieben, nach der Fmoc-Strategie unter Zuhilfenahme einer Synthesemikrowelle ab. Als Kupplungsreagenzien wurden PyBOP und NMM in DMF, sowie 3.0 Äq an entsprechender Aminosäure und dem Linker **121** eingesetzt. Zum Abspalten der Schutzgruppen an den Seitenketten der Aminosäuren wurde das Harz in einen Schüttelkolben überführt und mit einer Lösung aus TFA (95 %), H₂O (2.5 %) und TIS (2.5 %) für insgesamt 4 h behandelt. Anschließend folgten gründliche Waschgänge mit DMF, Dichlormethan, Methanol und Diethylether und das Trocknen im Vakuum. In nachfolgender *Abbildung 74* sind die drei Synthesen der drei Verbindungen schematisch dargestellt.

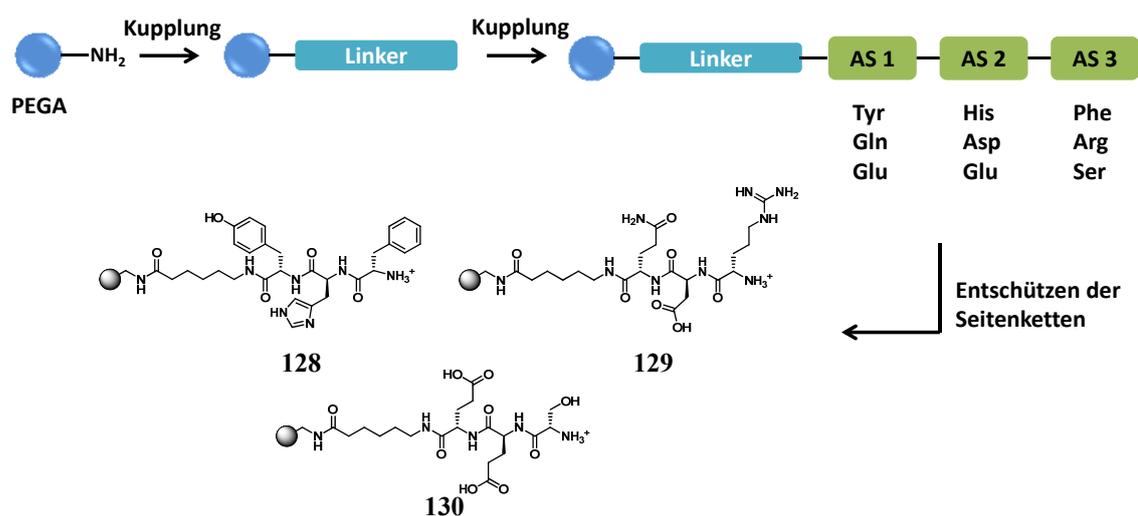
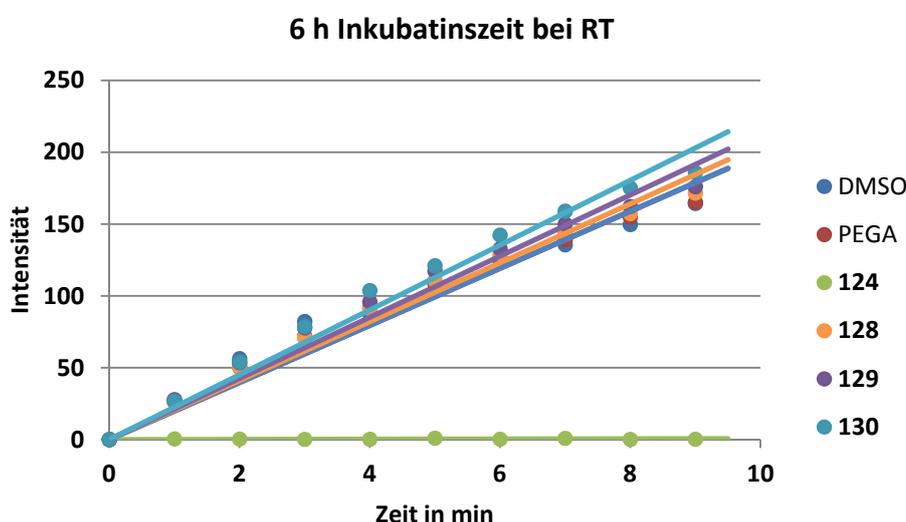


Abbildung 74: Schematische Darstellung der Tripeptidsynthesen. Nach der Kupplung des Linkers **121** an das Harz wurde das jeweilige Tripeptid aufgebaut. Eine anschließende Entschützung mit TFA entfernte die Boc- und t-Bu-Schutzgruppen an den Seitenketten.

Nach erfolgter Synthese wurden die Tripeptide (**128–130**) zusammen mit dem Testinhibitor **124** am Enzym vermessen. Die Ergebnisse sind in nachfolgendem Kapitel beschrieben.

4.2.5.2 Screening der Tripeptide **128–130** an der HCoV 229E M^{Pro}

Das Screening der Tripeptide **128–130** wurde nach bereits beschriebenem Schema durchgeführt. Die Inkubationszeit wurde aufgrund der Vortests mit den Testinhibitoren auf 6 h bei RT festgesetzt. Die Konzentrationen der Inhibitoren (c_{final}) betragen 1.00 mM, bezogen auf die theoretische Beladung des Harzes. In *Abbildung 75* ist das Umsatz-Zeit-Diagramm der Messung zu sehen.



*Abbildung 75: Umsatz-Zeit-Diagramm der Verbindungen **128**, **129** und **130**, sowie **124** und PEGA-Harz zum Vergleich.*

Wie anhand des Diagramms in *Abbildung 75* zu erkennen ist, zeigten die Tripeptide eine vergleichbare Geradensteigung wie das PEGA-Harz. Daraus ist abzulesen, dass die Protease nicht gehemmt wurde. Der Testinhibitor **124** als positive Referenz inhibierte das Enzym vollständig. Die synthetisierten Tripeptide zeigten demnach keinen inhibitorischen Effekt am Enzym. Es blieb aber die Möglichkeit, dass die Tripeptide Substrate darstellen und von der HCoV 229E M^{Pro} gespalten werden. Um dies zu untersuchen, wurde ein *Edman-Abbau*¹⁴⁹ der harzgebundenen Strukturen durchgeführt. Die Durchführung dieser Untersuchung wird nachfolgend erläutert.

4.2.5.3 Durchführung des Edman-Abbaus

Der *Edman-Abbau* ist eine Methode, um die Sequenz von Aminosäuren in Peptiden zu untersuchen. Durch Reaktion der letzten N-terminalen Aminosäure mit Phenylisothiocyanat **131** (Ph-NCS) kann diese abgespalten werden, ohne dass andere Peptidbindungen der Sequenz beeinträchtigt werden. Die abgespaltene Aminosäure kann im Anschluss über Massenspektrometrie, Chromatographie oder Elektrophorese identifiziert werden. So lässt sich die genaue Reihenfolge von Oligopeptiden bestimmen, indem der Syntheseschritt mehrere Male hintereinander wiederholt wird. Dadurch spielt der *Edman-Abbau* eine wichtige Rolle, vor allem bei der Strukturaufklärung von Enzymen und Proteinen.

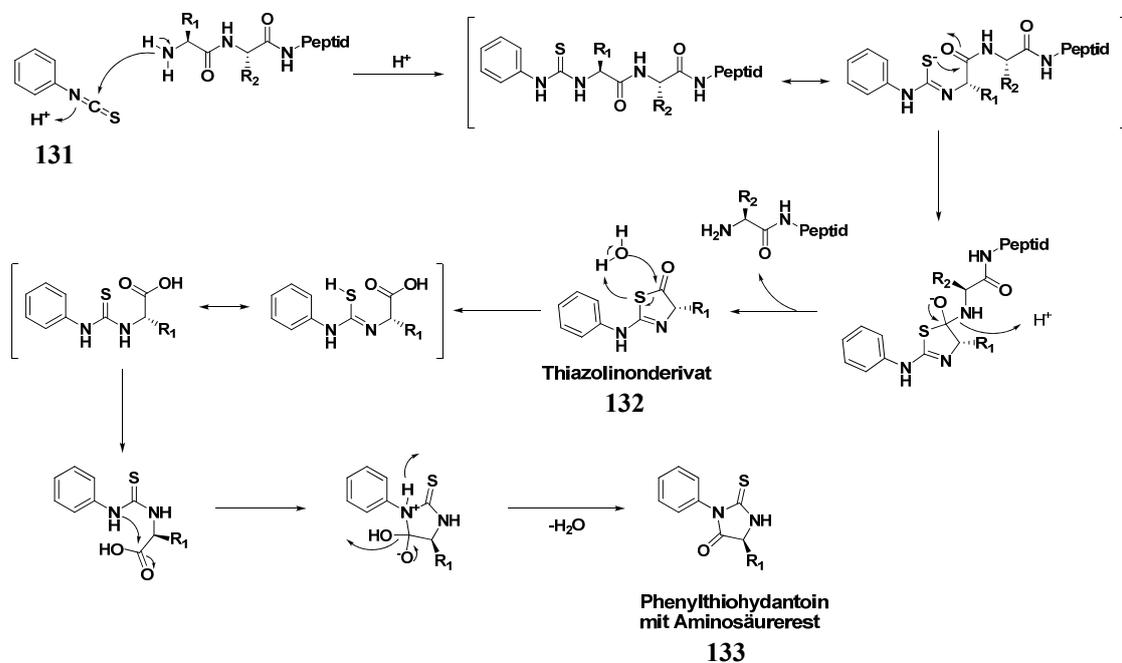


Abbildung 76: Allgemeiner Reaktionsmechanismus des Edman-Abbaus. Das Peptid reagiert mit Ph-NCS **131** unter sauren Bedingungen und Abspaltung des Rest-Peptids zu einem zyklischen Thiazolinonderivat **132**. Dann wird es weiter zum Phenylthiohydantoin-Derivat **133**, das die N-endständige Aminosäure trägt, umgesetzt und anschließend isoliert und analysiert.

Um die Methode den Versuchsbedingungen anzupassen, wurde ein Testpeptid mit der Sequenz Phe-Leu (**134**) an PEGA-Harz synthetisiert.¹⁵⁰ Das harzgebundene Dipeptid (1.00 mM in Bezug auf die theoretische Beladung) wurde mit Ph-NCS (6.00 Äq), Diisopropylethylamin (DIEA, 1.00 Äq) und *N*-Methyl-2-pyrrolidon (NMP) bei RT gerührt und anschließend Wasser zugegeben. Die Menge des Harzes in der Lösung entsprach dabei der des späteren Enzymassays. Dann wurde das Lösungsmittel entfernt

4. Durchführung und Diskussion

und der Rückstand mit TFA versetzt. Die Suspension wurde erhitzt und daraufhin das Harz abfiltriert. Das Filtrat, welches nun das Thiazolinonderivat (**132**) enthalten sollte, wurde mit einer äquivalenten Menge Wasser gemischt und erhitzt, so dass sich das Molekül zum Phenylthiohydantoinderivat (**133**) umlagern konnte (*Abbildung 76*). Anschließend wurde das Lösungsmittel wieder entfernt und der Rückstand in DCM aufgenommen. Ohne weitere Reinigung wurde die so gewonnene Lösung massenspektrometrisch untersucht. Es konnte das Phenylthiohydantoin (**133**) mit Leucin als Rest (**135**) detektiert werden (*Abbildung 78, A*). Durch das positive Ergebnis des Vorversuchs wurden diese Bedingungen für die Untersuchung der Tripeptide übernommen.

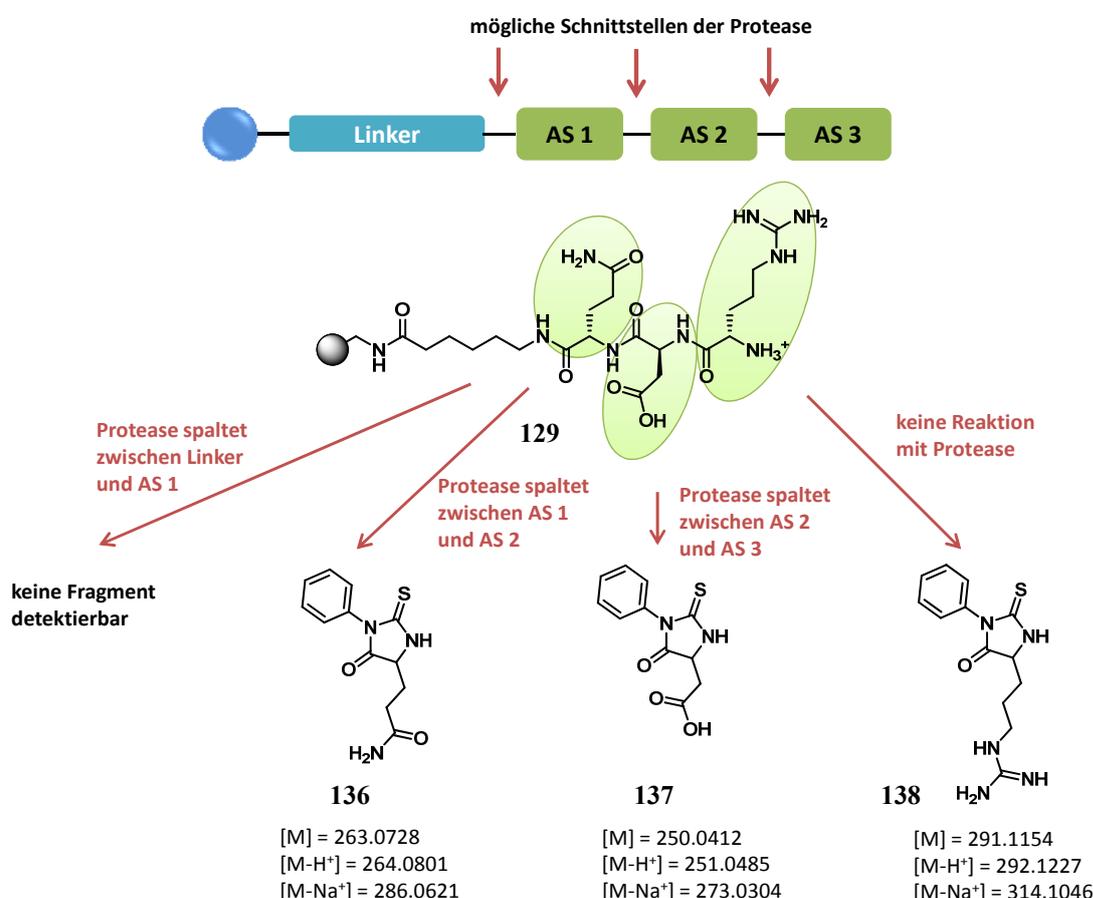


Abbildung 77: Schematische Darstellung möglicher Produkte nach dem Edman-Abbau von Verbindung 129. Das Tripeptid kann an drei unterschiedlichen Stellen von der Protease gespalten werden, daraus resultieren auch unterschiedliche Produkte nach der Umsetzung mit Ph-NCS.

Mit den ermittelten Bedingungen wurde der *Edman*-Abbau an den Tripeptiden **128–130** durchgeführt. Dazu wurde das jeweilige Peptid ($c_{\text{final}} = 1.00 \text{ mM}$) zusammen mit dem Enzym ($c_{\text{final}} = 0.12 \text{ nM}$) über 24 h bei RT in einem TRIS-Puffer inkubiert. Die verlängerte Inkubationszeit und die doppelte Enzymkonzentration im Vergleich zum

Fluoreszenzassay zuvor sollte bei einer ablaufenden Reaktion eine möglichst vollständige Umsetzung gewährleisten.

Um die Tripeptide nach der Reaktion massenspektrometrisch untersuchen zu können, musste das Harz zunächst vom Puffer befreit werden, da dieser, wie ein vorangegangener Test zeigte, die Massenspektrometrie störte. Dazu wurde die Suspension aus Puffer, Harz und Enzym zentrifugiert. Die überstehende Lösung wurde entfernt und der Rückstand wieder in Wasser aufgenommen. Dieser Vorgang wurde dreimal wiederholt. Danach wurde das Harz getrocknet, mit Ph-NCS, DIEA und NMP versetzt und bei RT gerührt. Nun wurde, wie beim Testpeptid **134** beschrieben, verfahren und nach Erhitzen und erneutem Lösen in Dichlormethan die Tripeptide massenspektrometrisch ebenfalls ohne weitere Reinigung untersucht.

Da die HCoV 229E M^{Pro} zu den Endopeptidasen gehört, spaltet sie einen Peptidstrang in der Mitte. Im Fall der Tripeptide bedeutet das, dass die Protease nach der ersten, zweiten oder dritten Aminosäure des Peptids spaltet. Aus diesem Grund müssen auch für die Auswertung der Massenspektren diese drei Möglichkeiten in Betracht gezogen werden. Es sollte jeweils die Aminosäure detektiert werden, die nach der Reaktion mit dem Enzym am Harz verbleibt. In *Abbildung 77* sind die vier unterschiedlichen Möglichkeiten am Beispiel der Verbindung **129** veranschaulicht. Die Vorgehensweise kann analog auf die Verbindungen **128** und **130** übertragen werden. Würde die Protease zwischen dem Linker und der ersten Aminosäure (AS 1, Gln) spalten wäre keine weitere freie Aminosäure am Harz übrig. Der *Edman*-Abbau kann mit dem Linker allein nicht stattfinden und es würde kein Fragment des Peptids im Massenspektrum erkennbar sein. Greift die Protease zwischen Aminosäure eins (AS 1, Gln) und zwei (AS 2, Asp) an, verbleibt Aminosäure eins am Harz und könnte so mittels *Edman*-Abbau abgespalten und detektiert werden (Verbindung **136**). Analog dazu könnte bei Spaltung zwischen Asp und Arg (AS 2 und AS 3) Komponente **137** nach dem *Edman*-Abbau erhalten werden. Geht die Protease keine Reaktion mit dem Tripeptid ein, so ist Arg die letzte Aminosäure in der Kette und wird durch Umsetzung mit Ph-NCS in das Derivat **138** überführt. Eine anschließende Massenanalyse kann in allen vier Fällen Aufschluss über die Reaktion mit der Protease geben, je nachdem welche der Fragmente identifiziert werden können.

Von den drei Lösungen mit den jeweiligen Peptiden (**128–130**) wurden Massenspektren (pos. ESI) aufgenommen und auf Fragmente des *Edman*-Abbaus hin überprüft. Durch die Reaktion mit Ph-NCS sollte das Phenylthiohydantoin (PTH) mit der jeweiligen Aminosäure als Rest in der Lösung zu finden sein. Bei Verbindung **128** (Tyr-His-Phe) konnten die Massen des Aminosäurederivats **139** (PTH-Phe) der dritten Position (AS 3) nach dem *Edman*-Abbau detektiert werden (*Tabelle 12* und *Abbildung 78*, B). Es fand sich sowohl die protonierte Spezies [M-H⁺] als auch das Natrium-Addukt [M-Na⁺] im Spektrum wieder. Das Peptid war also vor dem *Edman*-Abbau noch in voller Länge vorhanden gewesen, was darauf schließen lässt, dass in diesem Fall keine Reaktion mit der Protease stattfand. Alle anderen möglichen PTH-Derivate fanden sich nicht im Spektrum wieder, also ist auch eine unvollständige Spaltung des Tripeptids auszuschließen.

Bei Verbindung **129** (Gln-Asp-Arg) konnte das PTH-Asp-Derivat **137** im Massenspektrum nachgewiesen werden. Das Signal bei einer Masse von $m/z = 251.0670$ entspricht dem protonierten Derivat $[M-H^+]$ und bei $m/z = 273.0570$ der Verbindung mit einem Natriumion (*Tabelle 12, Abbildung 78, C*). Das bedeutet, dass sich die dritte Aminosäure (Arg) nicht mehr am Harz befand. Das Arg musste also durch die Reaktion mit der HCoV 229E M^{Pro} abgespalten worden sein. Die Masse des möglichen PTH-Arg-Derivates, sowie die PTH-Derivate der ersten Aminosäure (Gln) waren im Massenspektrum nicht erkennbar. Dieser Sachverhalt ließ darauf schließen, dass das Tripeptid **129** mit seiner Sequenz Gln-Asp-Arg die Eigenschaft besaß als Substrat zu fungieren. Die Verbindung passt sich demnach so in die Bindungstasche ein, dass der Cysteinrest der katalytischen Diade die Peptidbindung zwischen Arg und Asp nukleophil angreifen kann. Das Tripeptid **129** wurde auf diese Weise von der M^{Pro} gespalten, wobei gleichzeitig das Dipeptid Gln-Asp am Harz verblieb. Dieses wurde dann durch den *Edman-Abbau* um eine weitere Aminosäure (Asp) verkürzt und mittels massenspektrometrischer Analyse nachgewiesen.

Tabelle 12: Mögliche Fragmente der Tripeptide 128–130 nach dem Edman-Abbau. Die grün hinterlegten Werte wurden in der Lösung nach der Reaktion mit der Protease mittels Massenspektrometrie detektiert.

Nr.	Sequenz	Fragmente		
128	-Tyr-His-Phe	PTH-Tyr	PTH-His	PTH-Phe
	$[M-H^+]$	299.0849	273.0805	283.0900
	$[M-Na^+]$	321.3488	295.0624	283.3676
129	-Gln-Asp-Arg	PTH-Gln	PTH-Asp	PTH-Arg
	$[M-H^+]$	264.0801	251.0485	292.1227
	$[M-Na^+]$	286.0621	273.0304	314.1046
130	-Glu-Glu-Ser	PTH-Glu	PTH-Glu	PTH-Ser
	$[M-H^+]$	264.0801	264.0801	223.0536
	$[M-Na^+]$	286.0621	286.0621	245.3550

PTH: Phenylthiohydantoin

Beim dritten Tripeptid **130** (Glu-Glu-Ser) konnte die Masse des Serinderivats **140** zwar detektiert werden, allerdings mit einer sehr geringen Intensität. Zwei Sachverhalte wären hier denkbar. Zum einen kann das Tripeptid **130** keine Reaktion mit der Protease eingegangen sein und das Serinderivat **140** aufgrund schlechter Ionisierbarkeit nur ein schwaches Signal im Massenspektrum zeigen. Denkbar wäre aber auch, dass das Peptid bereits nach dem Linker von der Protease gespalten wird. Das Signal des Serin-Derivates könnte dann vom Edukt stammen, das von der Protease nicht vollständig umgesetzt wurde. In diesem Fall müsste beispielsweise die Enzymkonzentration weiter erhöht werden, um eine quantitative Umsetzung zu gewährleisten.

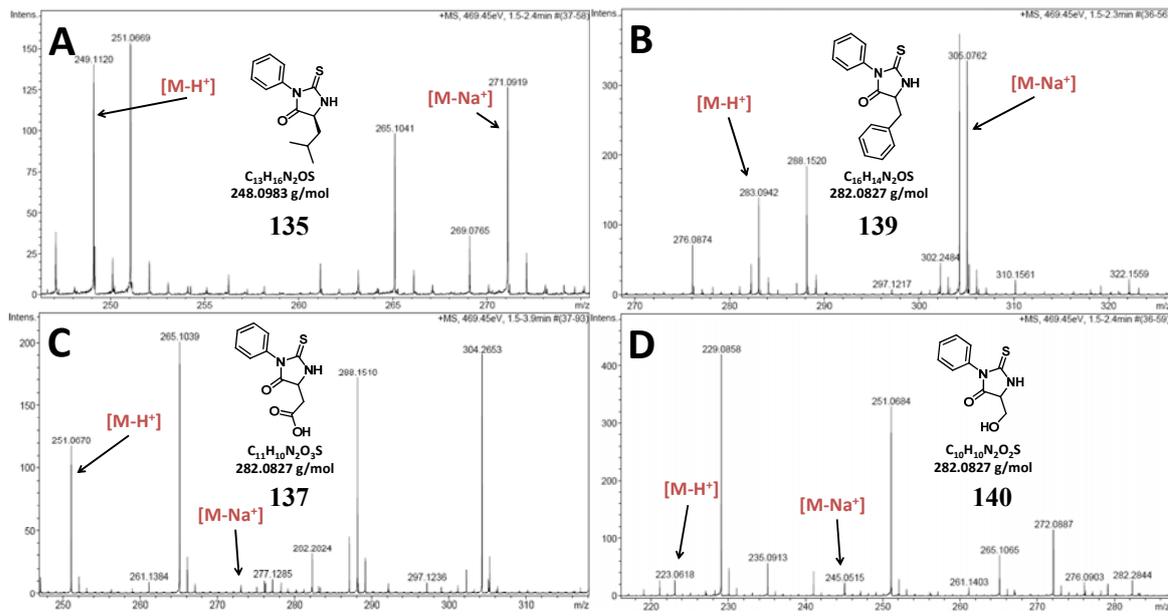


Abbildung 78: Ausschnitte der Massenspektren nach dem Edman-Abbau. **A:** Das Leucin-Derivat **135** konnte nach dem Abspalten vom Testpeptid identifiziert werden. **B** und **D:** Die Massen der dritten AS-Derivate **139** und **140** deuten auf keine Reaktion mit dem Enzym hin. **C:** Die zweite Aminosäure (Gln) des Tripeptids **129** konnte als Derivat **137** detektiert werden, und fungiert somit als Substrat, welches von der Protease gespalten werden kann.

In der Literatur findet man für die HCoV M^{Pro} (und auch für die SARS CoV M^{Pro}) eine Spezifität der Bindungstaschen für Gln (P1) und Ser (P1').^{151,152,153} Anstelle von Serin werden aber auch kleine Reste anderer Aminosäuren geduldet. Die P2 Bindungstasche beispielsweise lässt hydrophobe Aminosäuren ohne Verzweigung in β -Position wie z.B. Leucin zu. P2' hingegen hat keine Präferenz gegenüber einer bestimmten Aminosäure. In Bezug auf die Ergebnisse des *Edman*-Abbaus ist es also durchaus möglich, dass die synthetisierten Strukturen von der Protease gespalten werden können, auch wenn sie nicht von ihrer Sequenz her dem idealen Substrat entsprechen. Die natürlichen Substrate bestehen aus einer längeren Kette von Aminosäuren und müssen deshalb eine wesentlich bessere Affinität zum Enzym haben und exakt in die Bindungstasche passen. Die getesteten Peptide bestehen dahingegen nur aus drei Aminosäuren. Sie sollten sich daher einfacher an das aktive Zentrum annähern können, da sie flexibler in ihrer räumlichen Ausrichtung innerhalb der Bindungstasche sind. Es könnte durchaus möglich sein, dass eine nicht dem natürlichen Substrat entsprechende kurze Aminosäuresequenz aus diesem Grund ebenfalls von der Protease gespalten werden kann. Gleichzeitig ist es aber auch möglich, dass eine Sequenz, welche enzymaffine Aminosäuren beinhaltet, aber sich nicht passgenau in der Bindungstasche platzieren kann, vom Enzym nicht angegriffen wird. Letzteres könnte beispielsweise bei Tripeptid **130** der Fall sein, zumal hier Ser als M^{Pro}-affine Aminosäure auftaucht.

Die Ergebnisse des *Edman*-Abbaus zeigten, dass es möglich war, unter den gewählten Bedingungen ein Screening am Harz mit der Hauptprotease des HCoV 229E durchzuführen. Es konnte eine Wechselwirkung für eins der drei Tripeptide mit dem Enzym nachgewiesen werden. Für eine qualitative Aussage über das Spaltverhalten der Protease reichen die erhaltenen Ergebnisse allerdings noch nicht aus. Es müsste eine Bibliothek mit mehreren hundert Komponenten synthetisiert und in einem Screening an dem Enzym getestet werden, um gezielte Aussagen über die Affinität einzelner Aminosäuren machen zu können. Mit den durchgeführten Versuchen sollte lediglich die Eignung der entwickelten Methode untersucht werden. Durch das eben beschriebene Experiment und die erlangten positiven Resultate konnte diese auch bestätigt werden.

4.2.6 ZUSAMMENFASSUNG DER ERGEBNISSE DES FESTPHASENSCREENINGS

Mit der Synthese des Furanderivats **117** konnte die Basis für die Entwicklung eines festphasengebundenen Testinhibitors geschaffen werden. Es konnte durch das Screening von vier Furankomponenten (**107**, **116**, **117** und **119**) an der HCoV 229E M^{Pro} gezeigt werden, dass eine Funktionalisierung des Furanrings an C5 keinen negativen Einfluss auf den Hemmeffekt der Protease hat (Tabelle 13).

Tabelle 13: Strukturen der Verbindungen **107**, **116**, **117** und **119** zusammen mit den Aktivitäten in % bei $c = 20 \mu\text{M}$, sowie den IC_{50} -Werten der Inhibitoren in Lösung an der HCoV 229E M^{Pro}

Nr.	107	116	117	119
Hemmung	51 %	47 %	3 %	70 %
IC_{50} (μM)	19.0	-	-	6.00

Auch die Übertragbarkeit der Ergebnisse von den literaturbekannten Strukturen, die eigentlich als SARS CoV M^{Pro}-Inhibitoren identifiziert wurden, auf die HCoV 229E M^{Pro}, ist ein grundlegender Schritt auf dem Weg zur Entwicklung neuer Hemmstoffe. Durch die Herstellung der ans Harz gebundenen Strukturen mit unterschiedlichen Linkern konnten drei Prototypen von Testinhibitoren (**124–126**, Abbildung 79) entwickelt werden.

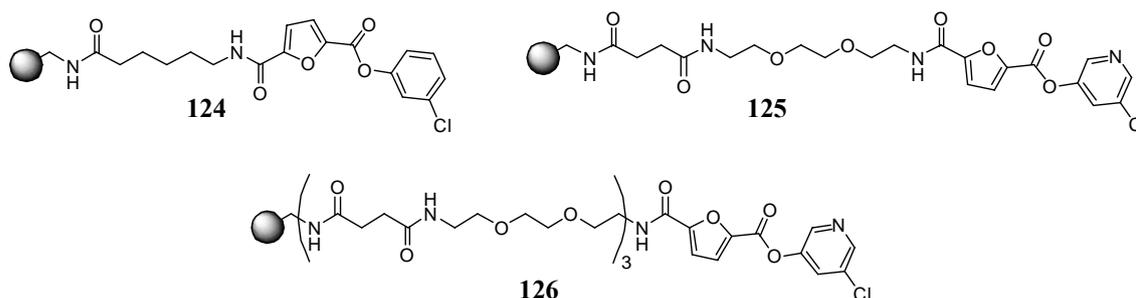


Abbildung 79: Strukturen der festphasengebundenen Testinhibitoren **124–126**.

Die anfänglichen Probleme während des Assays der festphasengebundenen Inhibitoren durch die Verwendung des Fusionsproteins (MBP-M^{Pro}) haben dazu beigetragen, geeignete Screeningbedingungen und Informationen über die Stabilität der Protease zu erhalten. In einem ersten Screening konnte der Testinhibitor sein Potential zeigen. Er kann ohne Probleme als positive Kontrolle in einem Enzym Assay für die HCoV 229E

4. Durchführung und Diskussion

M^{Pro} eingesetzt werden. Das im Anschluss an die Testinhibitorentwicklung durchgeführte Testscreening mit den drei Tripeptiden **128–130** (Abbildung 80) konnte die Anwendungseignung der Testsubstanz bestätigen. Zudem konnte eine Wechselwirkung der Protease mit einem der drei Peptidstrukturen festgestellt werden. Zwar zeigte keines der Tripeptide einen Hemmeffekt an der HCoV 229E M^{Pro}, jedoch konnte mit Hilfe des *Edman*-Abbaus im Anschluss an die Enzymreaktion eine Spaltung von Verbindung **129** beobachtet werden. Dies lässt darauf schließen, dass sie als Substrat fungieren kann. Eine Wechselwirkung mit Verbindung **128** war nicht zu beobachten. Bei Verbindung **130** konnte eine Reaktion mit der Protease nicht eindeutig belegt werden. Für eine eindeutige Aussage über das selektive Spaltverhalten der Protease reichen die erhaltenen Ergebnisse nicht aus. Mit den in diesem Kapitel diskutierten Versuchen konnte jedoch die Eignung der entwickelten Methode bestätigt werden. Um gezielte Aussagen über die Enzymaffinität einzelner Aminosäuren machen zu können, müsste eine Bibliothek mit mehreren hundert Mitgliedern synthetisiert und an der Protease getestet werden. Die Anwendung des *Edman*-Abbaus ist für die Untersuchung der Enzym-Wechselwirkungen einer großen Peptid-Bibliothek allerdings ungeeignet, da er die Analyse jeder einzelnen Verbindung im Anschluss an die Enzymreaktion fordert. Für die Entwicklung einer Substratbibliothek stellen peptidische Strukturen mit einem integrierten Fluorophor eine bessere Alternative dar. Auf diese Weise kann direkt über ein spektroskopisches Verfahren die Interaktion mit der Protease untersucht werden.

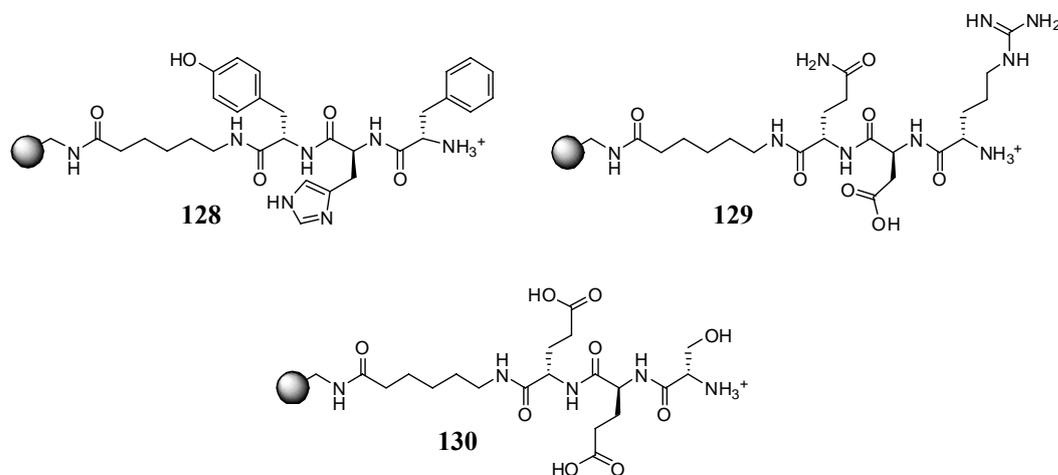


Abbildung 80: Strukturen der an PEGA-Harz synthetisierten Tripeptide.

Mit diesem Projekt konnte der Grundstein für die Entwicklung, die Synthese und das Screening einer festphasengebundenen Bibliothek an der HCoV 229E M^{Pro} gelegt werden. Es ist anzunehmen, dass die besten Vertreter aus einer Bibliothek auf Grund der Homologie der Proteasen auch an der SARS CoV M^{Pro} in Lösung Wirkung zeigen werden. Auf diese Weise ist es möglich, eine Leitstruktur zu entwickeln, die als Grundlage für die Synthese von Wirkstoffen gegen den SARS-Erreger dienen kann.

4.3 SCREENING EINER DYNAMISCHEN BIBLIOTHEK AN UNTERSCHIEDLICHEN CYSTEINPROTEASEN

4.3.1 ENTWICKLUNG DER SCREENINGMETHODE

Die dynamische Chemie stellt die Grundlage des folgenden Kapitels dar. Mit Hilfe einer dynamischen kombinatorischen Bibliothek sollten Screeningbedingungen und Inhibitorstrukturen für unterschiedlichen Cysteinproteasen ermittelt werden. Die Herausforderung bestand darin, für verschiedene Cysteinproteasen in unterschiedlichen Puffersystemen eine geeignete Methode zu entwickeln, um unter analogen Screeningbedingungen zu arbeiten und die Ergebnisse miteinander zu vergleichen. Zusätzlich wurde eine Dekonvolutionsstrategie angewandt, um potentielle Inhibitorstrukturen zu identifizieren. So sollten Erkenntnisse über Aktivität und Selektivität der einzelnen Proteasen gewonnen werden.

4.3.1.1 Auswahl der Proteasen

Die dynamische Bibliothek sollte an verschiedenen Cysteinproteasen gescreent werden. Es war ein Ziel herauszufinden, ob sich Selektivitäten der unterschiedlichen Proteasen erkennen lassen. Anhand der Bibliothekskomponenten sollten sich potentielle Inhibitorstrukturen oder Präferenzen der Enzyme bezüglich Struktur und Beschaffenheit (Polarität, Größe, etc.) der Bibliotheksbausteine in den Ergebnissen widerspiegeln.

Diese Auswahl der Proteasen wurde aufgrund mehrerer Kriterien getroffen. Es spielten sowohl die evolutionäre Verwandtschaft als auch die Substratspezifität und der Katalysemechanismus eine Rolle. Zum einen wurden Enzyme ausgewählt, die bereits mit anderen Methoden im Rahmen dieser Arbeit untersucht wurden. Zum anderen wurden noch weitere verwandte Proteasen für die Untersuchungen herangezogen. Die Cathepsine B, K und L sowie Rhodesain und Falcipain-2 gehören derselben Familie an, den papainähnlichen Cysteinproteasen (Clan CA, C1). Cathepsin L, Cathepsin K, Falcipain-2 und Rhodesain sind strukturell zu den Cathepsin L-ähnlichen Cysteinproteasen zu zählen, während Cathepsin B zur Spezies der Cathepsin B-ähnlichen gehört. Die virale Protease HCoV 229E M^{Pro} ist wie oben beschrieben ebenfalls eine Cysteinprotease (Clan PA), besitzt also ein Cystein im aktiven Zentrum. Strukturell ist sie jedoch eher zu den chymotrypsinähnlichen Proteasen zu zählen. Aus diesem Grund wurde Chymotrypsin mit in die Auswahl aufgenommen. Chymotrypsin ist eine Serinprotease und dem Trypsin

4. Durchführung und Diskussion

(ebenfalls eine Serinprotease) sehr ähnlich. Letzteres wurde ebenfalls zum Vergleich herangezogen. Die Auswahl an Enzymen deckt so einen Bereich an struktureller, substratspezifischer und evolutionärer Varianz ab. Jedes Enzym hat mindestens einen verwandten Vertreter innerhalb der gewählten Enzymgruppe bezogen auf den Katalysemechanismus, auf die Abstammung oder auf die Struktur (*Tabelle 14*). Ein Vergleich der Ergebnisse untereinander bezogen auf die einzelnen Enzyme hinsichtlich ihrer Selektivität und Aktivität sollte so möglich werden.

Tabelle 14: Auswahl der Proteasen für das Screening der dynamischen Bibliothek.

Clan	Familie	Spezies	Protease	aktives Zentrum	Masse (kDa)	Spezifität
CA	C1	CatB-ähnlich	Cathepsin B	Gln, Cys ⁻ , HisH ⁺ , Asn	28.1	L/FR XX
			Cathepsin L		24.2	
		CatL-ähnlich	Cathepsin K	Gln, Cys ⁻ , HisH ⁺ , Asn	23.5	S2: lipophil, Leu, Phe
			Rhodesain		22.9	
			Falcipain-2		27.2	
PA	C30	ChT-ähnlich	HCoV 229E M ^{Pro}	Cys, His	33.3	LQ A/S
	S1		Chymotrypsin	His, Asp,	25.3	XY/F/L XX
			Trypsin	Ser	24.7	XK/R XX

||: Spaltstelle im Peptid;

4.3.1.2 Auswahl der Bausteine

Für die Entwicklung der dynamischen Bibliothek wurde eine reversible Reaktion ausgewählt, die den Anforderungen des Screenings gerecht werden kann. Wie in *Kapitel 2.4.2* beschrieben, gibt es eine Reihe von reversiblen Reaktionen, die sich für ein Screening in wässrigem Medium unter physiologischen Bedingungen mit einem biologischen Templat eignen. Besonders viele Vorteile weist die Reaktion von Aldehyd und Amin zum Imin auf. Sie läuft sowohl unter leicht sauren, unter neutralen also auch unter leicht basischen Bedingungen ab. Die Reaktion ist gegenüber vielen anderen funktionellen Gruppen tolerant und kann bei Bedarf durch eine Reduktion des Imins zum Amin angehalten werden. Sie läuft bei Raumtemperatur ab und kann auch in wässrigem Medium durchgeführt werden. Diese Vorteile machen sie zu einer geeigneten Reaktion für die Entwicklung einer dynamischen Bibliothek. Aldehyde können zwar als Nebenreaktion mit dem Cystein im aktiven Zentrum der Proteasen reagieren, jedoch ist

diese Reaktion ebenfalls reversibel. Die Möglichkeit, dass einzelne Aldehydkomponenten eine Protease aufgrund dieser Nebenreaktion hemmen, besteht zwar, sollte aber durch die Verwendung eines großen Überschusses an Amin bezogen auf die eingesetzten Proteasen weitestgehend unterdrückt werden. Die Möglichkeit einer einfachen Synthese wurde ebenfalls mit bei der Planung der Bibliotheksbausteine berücksichtigt. Peptidische Strukturen mit einem freien Amin lassen sich an der Festphase oder in Lösung zugänglich machen. Eine nachträgliche Funktionalisierung musste infolge der gewählten reversiblen Reaktion nicht vorgenommen werden. Durch die Wahl der Reaktionsart und der Synthesemethoden wurden nun die entsprechenden Bausteine mit der jeweiligen funktionellen Gruppe ausgewählt.

Bezüglich der Beschaffenheit der ausgewählten Proteasen und in Anlehnung an vorangegangene Projekte (*Kapitel 4.1* und *4.2*) wurden die Strukturen anhand folgender Kriterien gewählt:

- Unpolare Reste sollten die hydrophobe Bindungstasche (S2) der Enzyme ansprechen^{109,115,154}
- Strukturelemente von bereits bekannten Inhibitoren wurden mit einbezogen^{86,109,139,155}
- die Substratspezifität der Proteasen wurde berücksichtigt^{155,156}
- es wurde bei den Verbindungen auf unterschiedliche Polarität, Funktionalität und Größe geachtet
- es sollten mono-, di- und trivalente Aldehyde verwendet werden
- die Auswahl der Amine sollte peptidische und (hetero-)aromatische Verbindungen umfassen
- die Bibliothek sollte sich auf kleine Molekülstrukturen beschränken

Die Größe der Bibliothek ergibt sich aus der Anzahl der Aldehyde und Amine sowie der unterschiedlichen Valenz der Aldehyde. Di- und Trialdehyde können mit mehreren gleichen oder unterschiedlichen Aminen eine Verbindung bilden. Dadurch sind mehr Kombinationsmöglichkeiten als bei einer Bibliothek mit ausschließlich monovalenten Aldehyden möglich. Die Größe der Bibliothek kann mit folgender Gleichung (7) berechnet werden.⁹⁴

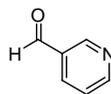
$$N_{Sym} = \sum \left[\frac{m_p}{p!} \prod_{i=0}^{p-1} (n + i) \right] \quad (7)$$

N_{Sym} = Anzahl der Kombinationen (Größe der Bibliothek); n = Anzahl der Amine; m_p = Anzahl der Aldehyde; p = Anzahl Funktionalitäten des Aldehyds.

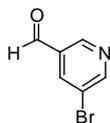
4. Durchführung und Diskussion

In *Abbildung 81* sind die genutzten Verbindungen dargestellt. Bei der Auswahl der Bausteine wurde zusätzlich darauf geachtet, weitere funktionelle Gruppen so zu wählen, dass sie nach Möglichkeit nicht mit den Enzymen wechselwirken oder eine Nebenreaktion eingehen.

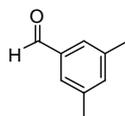
Aldehyde



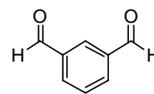
141



142



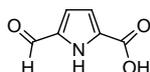
143



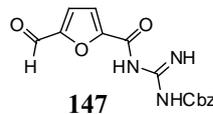
144



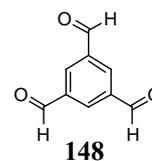
145



146

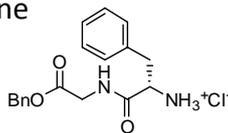


147

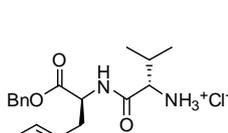


148

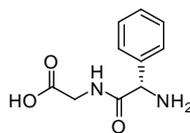
Amine



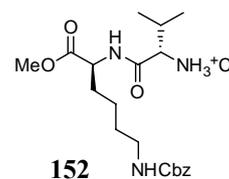
149



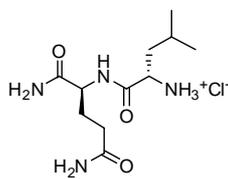
150



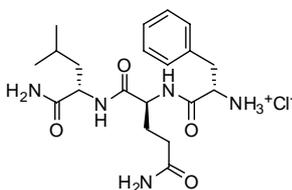
151



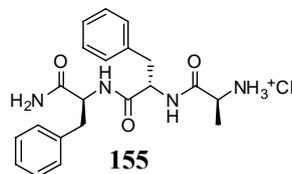
152



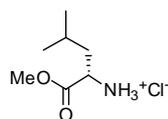
153



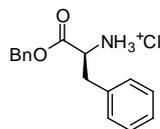
154



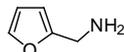
155



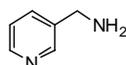
156



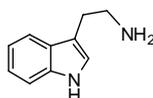
157



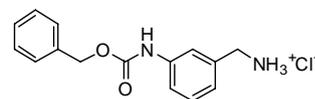
158



159



160



161

Abbildung 81: Auswahl der Bausteine, aus denen die dynamische Bibliothek zusammengesetzt ist. Es wurden acht Aldehyde, darunter sechs Mono-, ein Di- und ein Trialdehyd eingesetzt. Die 13 Amine besitzen jeweils ein freies Amin und haben eine peptidische oder (hetero-)aromatische Struktur unterschiedlicher Größe und Polarität.

Bei 13 Aminen, sechs Monoaldehyden, einem Di- und einem Trialdehyd ergeben sich 624 verschiedene Kombinationsmöglichkeiten für die Bildung eines Imins. Mit diesem Wert liegt die geplante dynamische Bibliothek im mittleren Größenordnungsbereich. In der Literatur sind bei der Verwendung von biologischen Templaten häufig nur kleine dynamische Bibliotheken beschrieben, die eine schon vorhandene Leitstruktur weiter optimieren sollen. Im vorliegenden Fall soll jedoch versucht werden, neue Leitstrukturen zu identifizieren. Die Anzahl an Iminen, die gebildet werden können, sollte demnach groß genug sein, um eine breite Strukturvarianz abdecken zu können. Deswegen wurde eine Bibliothek dieser Größenordnung gewählt.

Anhand der genannten Kriterien konnten die in *Abbildung 81* gezeigten Bausteine für die dynamische Bibliothek entwickelt werden. Im anschließenden Kapitel wird die Synthese der einzelnen Komponenten erläutert.

4. Durchführung und Diskussion

4.3.2 SYNTHESE DER BIBLIOTHEKSBAUSTEINE

Die Synthesen der fünf Dipeptide wurden bis auf Verbindung **153** in Lösung durchgeführt. Dazu wurden die entsprechenden Aminosäuren mit PyBOP und NMM in DMF gekuppelt. Die Entschützung des jeweiligenamins erfolgte durch Behandlung mit TFA in DCM (*Abbildung 82*). Anschließend wurden die Produkte mittels MPLC und HPLC gereinigt. Das darauffolgende Umsalzen durch Gefriertrocknung mit verdünnter HCl_{aq} ergab die Chlorid-Salze in sehr guten Ausbeuten.

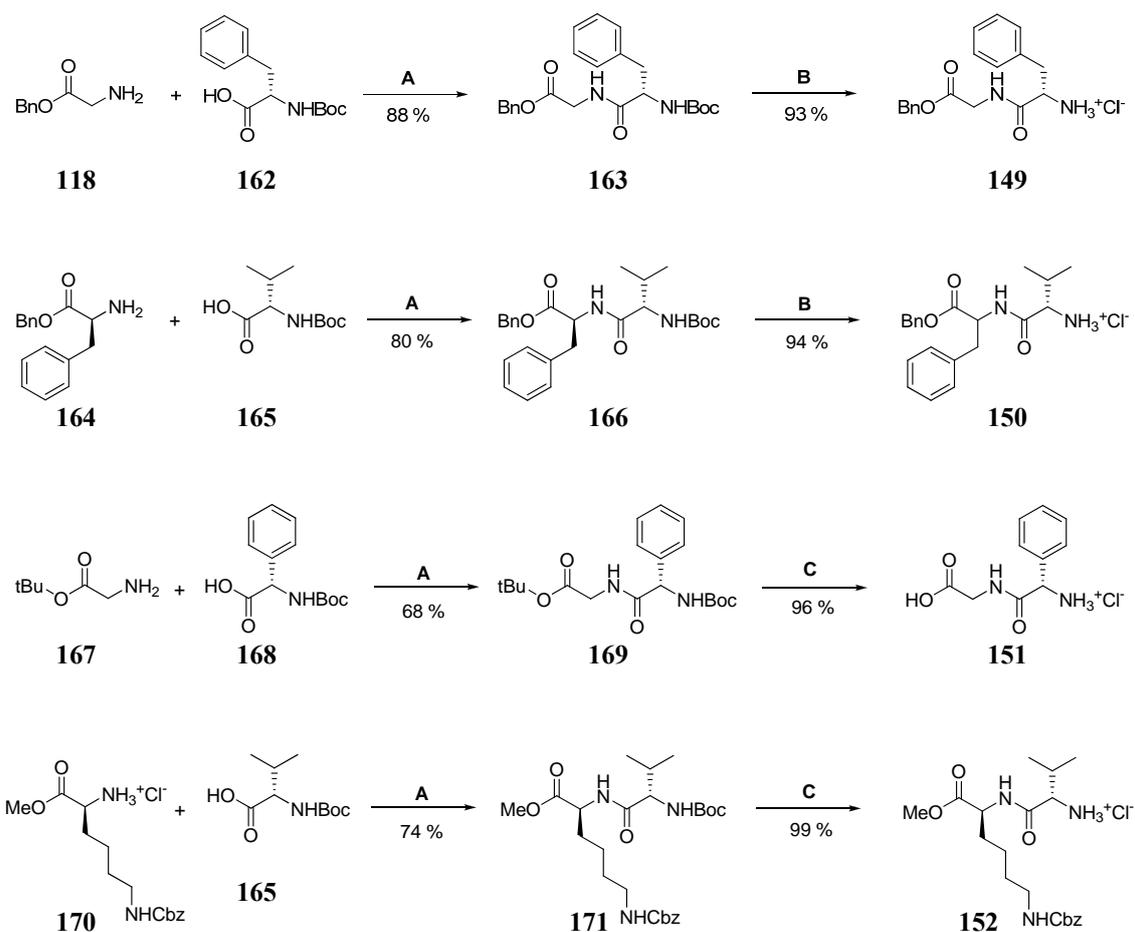
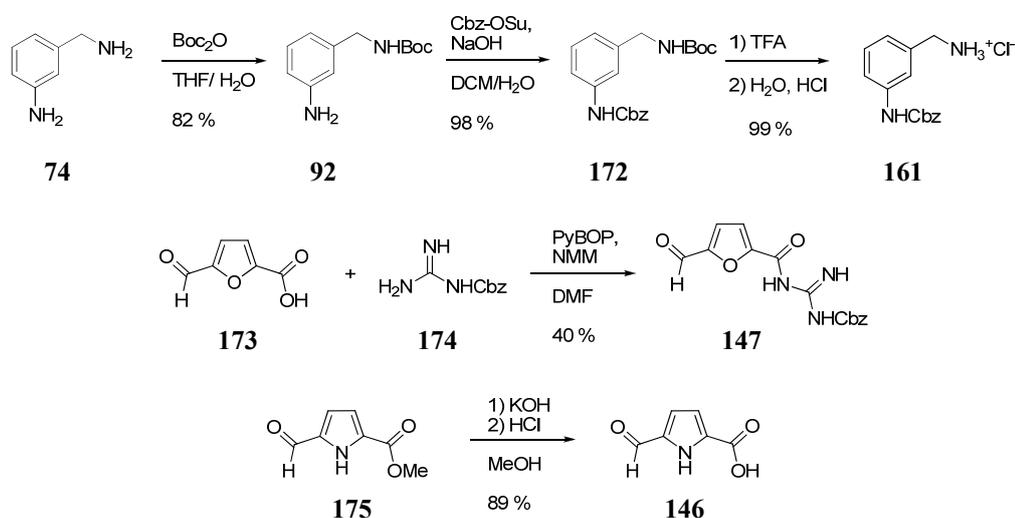


Abbildung 82: Synthesen der dipeptidischen Bibliothekskomponenten **149–152**. Methode **A**: PyBOP, NMM, DMF; Methode **B**: 1) 10 % TFA, DCM, 2) H_2O , HCl; Methode **C**: 1) 50 % TFA, DCM, 2) H_2O , HCl.

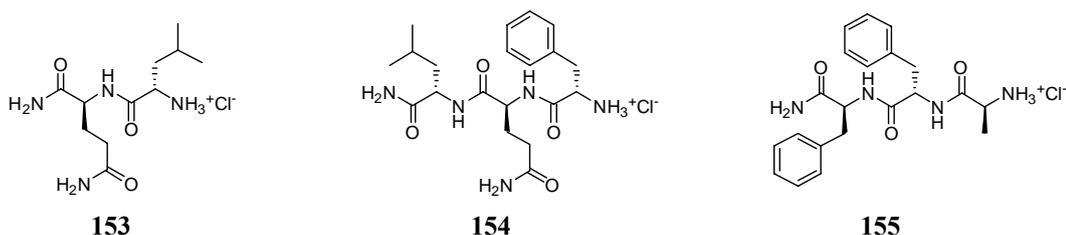
Das Cbz-geschützte 3-Aminobenzylamin **161** wurde mit Hilfe orthogonaler Schutzgruppen hergestellt. Dazu wurde zuerst das reaktivere allylische Amin von 3-Aminobenzylamin **74** mit einer Boc-Gruppe geschützt. Anschließend konnte das aromatische Amin mit Cbz-OSu umgesetzt und dann die Boc-Gruppe mit TFA wieder

abgespalten werden. Durch Umsalzen mit HCl_{aq} wurde das Chlorid-Salz **161** mit 99 % Ausbeute erhalten (*Abbildung 83*).



*Abbildung 83: Synthese des Anilinderivates **161** und der beiden Aldehydkomponenten **146** und **147**.*

Für die Synthese der Furan-Aldehydkomponente **147** wurde auf Baustein **173** zurückgegriffen. Dieser wurde mit Cbz-Guanidin (**174**), PyBOP und NMM in DMF zur Reaktion gebracht. Mit einer Ausbeute von 40 % konnte das Produkt **147** isoliert werden. Die literaturbekannte Verbindung **175**¹²² wurde nach Vorschrift hergestellt und war Edukt für die Synthese der Pyrrol-Komponente **146**. Durch eine Verseifung des Methylesters mit KOH in MeOH wurde hier die Carbonsäure **146** erhalten (*Abbildung 83*).



*Abbildung 84: Verbindungen **153–155** wurden mittels Festphasensynthese nach der Fmoc-Strategie an Rink Amid AM Harz hergestellt.*

Die beiden Tripeptide **154** und **155** sowie das Dipeptid **153** (*Abbildung 84*) wurden mittels Festphasensynthese an Rink Amid AM Harz hergestellt. Dazu wurden die entsprechenden Aminosäuren nach Fmoc-Strategie mit PyBOP und NMM in DMF gekuppelt. Die Abspaltung erfolgte mit einer Mischung aus 95 % TFA, 2,5 % H_2O und

2.5 % TIS. Nach der chromatographischen Reinigung und dem Umsalzen mit verdünnter HCl_{aq} wurden die Produkte als Chlorid-Salze erhalten.

Die übrigen Bibliothekskomponenten konnten käuflich erworben werden und wurden ohne weitere Reinigung eingesetzt.

4.3.3 VORVERSUCHE ZUM DYNAMISCHEN SCREENING

4.3.3.1 Wahl der Screeningbedingungen

Die ausgewählten Proteasen mussten aufgrund der pH-Abhängigkeit ihrer Aktivität auch bei unterschiedlichen pH-Werten im Assay vermessen werden (*Tabelle 15*). Für die Enzyme Rhodesain, Falcipain-2 und Cathepsin K wurde ein Acetatpuffer bei einem pH-Wert von 5.5 verwendet. Die Cathepsine B und L wurden in einem Phosphatpuffer bei einem pH-Wert von 6.5, die virale Protease HCoV 229E M^{Pro} sowie die Aspartatproteasen Trypsin und Chymotrypsin bei einem pH-Wert von 7.5 gescreent. Abweichend vom in der Literatur beschriebenen Screening-Protokoll¹⁴⁷ und den in *Kapitel 4.2* beschriebenen Tests der festphasengebundenen Inhibitoren an der HCoV 229E M^{Pro} konnte hier kein TRIS-Puffer verwendet werden. Als tertiäres Amin stört das Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS) die reversible Iminbildung, da es ebenfalls mit den Aldehyden reagiert (siehe *Anhang 8.3.2*).

Tabelle 15: Screeningbedingungen der ausgewählten Proteasen.

Protease	Puffer	pH	Substrat	c_{final} (μM) Substrat
Cathepsin K				25.0
Rhodesain	Acetatpuffer	5.5	Cbz-Phe-Arg-AMC	25.0
Falcipain-2				25.0
Cathepsin B	Phosphatpuffer	6.5	Cbz-Phe-Arg-AMC	80.0
Cathepsin L				6.25
HCoV 229E			FRET-Substrat 127	50.0
Trypsin	Phosphatpuffer	7.5	Cbz-Phe-Arg-AMC	50.0
Chymotrypsin			Suc-Leu-Tyr-AMC	50.0

Für die Inkubation der Proteasen mit der dynamischen Bibliothek wurde auf Erfahrungswerte aus vorangegangenen Screenings zurückgegriffen (*Kapitel 4.2.4*) und eine Dauer von 6 h bei 4 °C festgelegt. Diese Zeit sollten alle eingesetzten Proteasen ohne signifikanten Verlust der Aktivität bei gleichzeitiger Reproduzierbarkeit der Ergebnisse überstehen. Die Dauer der Gleichgewichtseinstellung bzw. der Iminbildung wurde zusätzlich noch in einem gesonderten Experiment überprüft, welches im folgenden Abschnitt beschrieben wird.

4.3.3.2 NMR-Studie zur Iminbildung

Die Reaktion eines Aldehyds mit einem Amin zum Imin kann mit einem ^1H -NMR-Experiment überprüft werden. Bei der Bildung des Imins verschieben sich die Signale der Ausgangsverbindungen aufgrund der neuen chemischen Umgebung und es entsteht ein weiteres Signal für das Proton der ($-\text{N}=\text{CH}-$)-Gruppe, bei gleichzeitiger Abnahme des Aldehyd-Signals. Durch das Verhältnis zwischen diesen beiden Signalen kann auf die Verteilung von Aldehyd und neu gebildetem Imin geschlossen werden. In der Literatur ist ein Beispiel gezeigt, in dem das Amin **176** mit dem Aldehyd **177** in unterschiedlichen Konzentrationsverhältnissen gemischt und mittels ^1H -NMR-Messungen untersucht wurde.¹⁰³ Als Lösungsmittel wurde hier D_2O und ein pH-Wert von 7.6 gewählt. Durch die Steigerung der Aminkonzentration konnte das chemische Gleichgewicht der Reaktion auf die Produktseite des Imins verschoben werden. Bei den in *Abbildung 85* dargestellten NMR-Spektren kann man diesen Verlauf anhand der Signal-Intensitäten von Aldehyd-Proton (10.75 ppm) und Imin-Proton (8.80 ppm) deutlich erkennen. Während die Signalintensität des Aldehydsignals abnimmt, entsteht ein neues, dem Imin zugehöriges Signal. Die Verschiebung der übrigen Protonensignale ist hier nicht mit abgebildet.

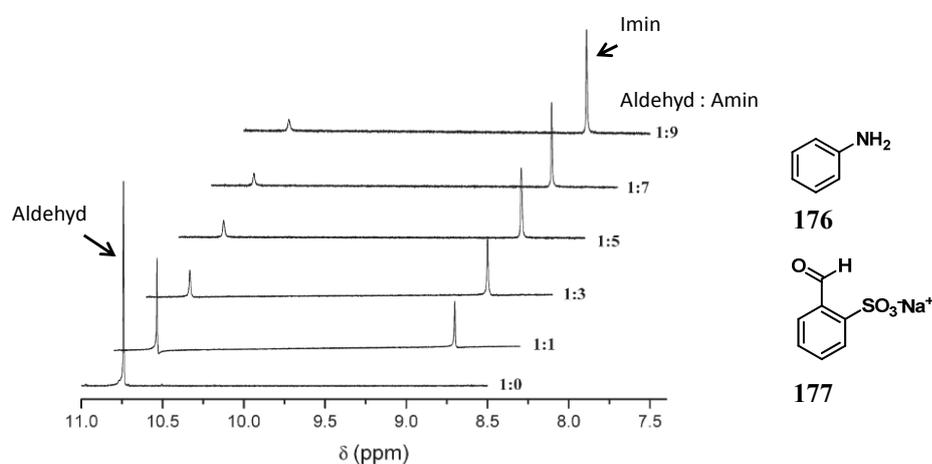


Abbildung 85: ^1H -NMR Spektrum in D_2O des Aldehyds **177** mit zunehmendem Anteil an Amin **176** bei einem pH-Wert von 7.6. Die Bildung des Imins steigt mit zunehmender Aminkonzentration. (reprinted with permission)¹⁰³

Auch für die Durchführung des in dieser Arbeit geplanten Screenings der dynamischen Bibliothek musste zunächst sichergestellt werden, ob die reversible Reaktion zwischen Aldehyden und Aminen unter den notwendigen Assaybedingungen generell durchführbar ist. Hierzu wurde ähnlich wie im genannten Literaturbeispiel vorgegangen.

Tabelle 16: Zusammensetzung der NMR-Proben, die für die Untersuchung der Iminbildung unter Assaybedingungen hergestellt wurden. Es sind die Konzentrationsverhältnisse von Verbindung **145** und **158** angegeben.

Nr.	Puffer	Äquivalente		c _{final} (mM)	
		145	158	145	158
1		1		44.5	
2			1		44.5
3	Acetatpuffer pH 5.5	1	1	44.5	44.5
4		1	2	44.5	89.0
5		1	4	44.5	178
6		1	1	44.5	44.5
7	Phosphatpuffer pH 7.5	1	2	44.5	89.0
8		1	4	44.5	178

Dazu wurden aus der Bibliothek exemplarisch das Amin **145** und das Aldehyd **158** ausgewählt. Für das Experiment wurden die Verbindungen mit einer Ausgangskonzentration von 44.5 mM (= 1.0 Äq) in 630 µl des entsprechenden Puffergemischs (siehe *Tabelle 16*) zusammen mit 10 % deuteriertem DMSO (= 70 µl) gelöst. Diese Zusammensetzung der Probenlösung von Puffer und DMSO entsprach auch der, die während der Assays vorlag. In zwei weiteren Proben wurden Aldehyd und Amin im Verhältnis von 1:2 und 1:4 gemischt (*Tabelle 16*). Durch die Iminbildung sollte die Intensität des Aldehyd-Signals im ¹H-NMR-Spektrum abnehmen und sich gleichzeitig ein Signal für das Proton der Imin-Gruppe bilden. Mit dieser Methode wurde untersucht, bei welchem Verhältnis der Reaktanden das Gleichgewicht überwiegend auf der Produktseite liegt. Die Messungen wurden an einem 400 MHz-Gerät bei Raumtemperatur durchgeführt. Durch die Verwendung von DMSO-d₆ konnte auf das DMSO-Signal (2.50 ppm) kalibriert werden. Im Experiment wurde ohne Unterdrückung des Wassersignals gemessen, da die relevanten Signale im Bereich zwischen δ = 6.00 und δ = 9.50 lagen und so nicht vom Signal des Wassers (δ = 3.00–5.00) verdeckt wurden.

Zusätzlich zu den Proben, in denen Aldehyd und Amin vorhanden waren, wurden zum Vergleich die Spektren der einzelnen Verbindungen **145** und **158** aufgenommen. In *Abbildung 86* sind die NMR-Spektren der Proben für die Messungen in Acetatpuffer bei einem pH-Wert von 5.5 (A) und in Phosphatpuffer bei einem pH-Wert von 7.5 (B) abgebildet. In beiden Fällen waren deutliche Unterschiede zwischen den Spektren der Verbindungen **145** und **158** und den Spektren der Mischproben zu erkennen. Bei einem Substanzverhältnis von 1:1 nahm das Aldehydsignal (a) bei δ = 9.3 in seiner Intensität ab und ein neues Signal (b) bei δ = 8.1 ist zu erkennen. Desweiteren verschoben sich die

Signale der aromatischen Furanprotonen des Aldehyds **145** (c, d und e) zum Hochfeld und des Amins **158** (f, g und h) zum Tieffeld hin (siehe *Abbildung 86*).

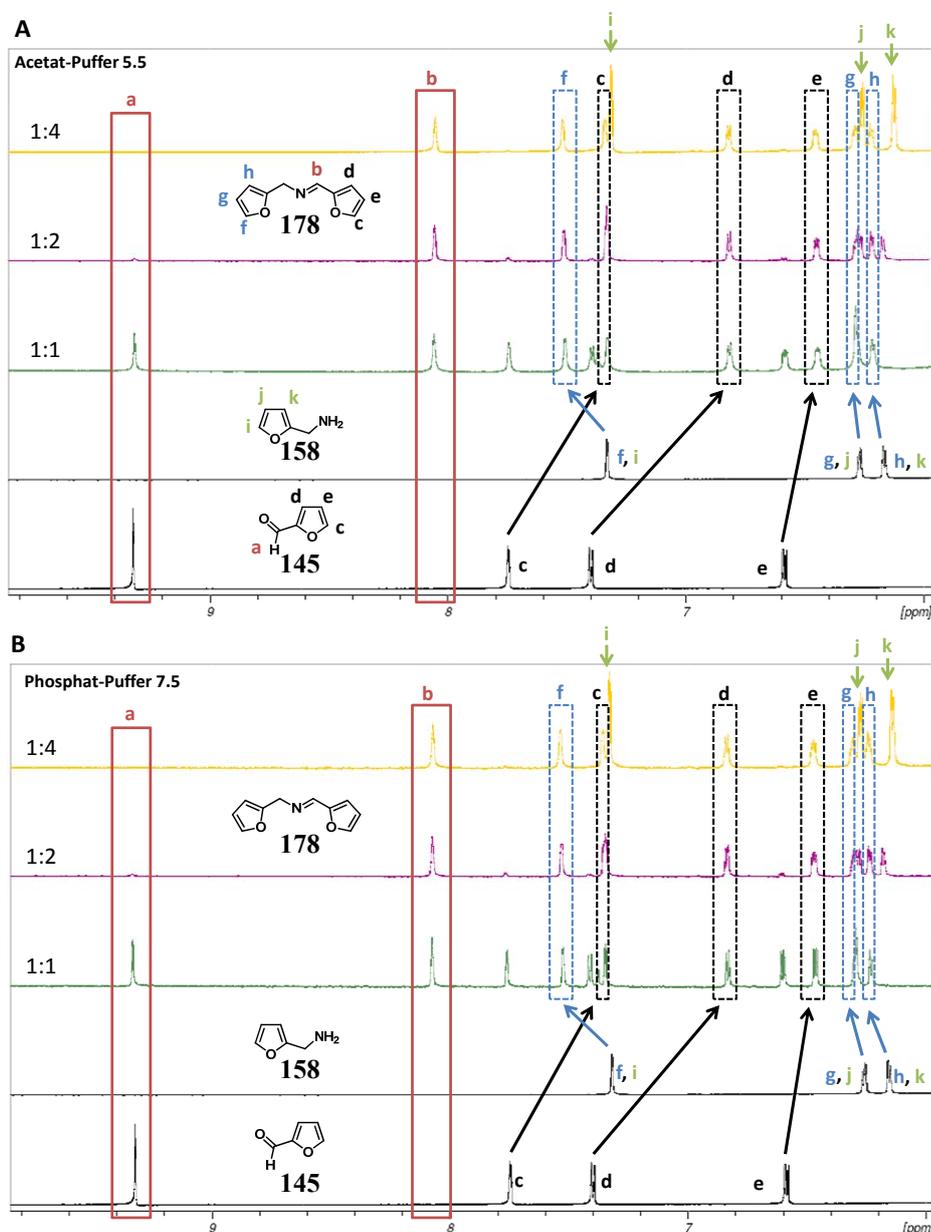


Abbildung 86: ¹H-NMR-Untersuchung zur Iminbildung. Die Bildung des Imins wurde durch Mischen von Aldehyd **145** und Amin **158** in Verhältnissen von 1:1, 1:2 und 1:4 unter Assaybedingungen (A: Acetatpuffer, pH 5.5; B: Phosphatpuffer, pH 7.5) mittels ¹H-NMR-Spektroskopie untersucht. Bei einer Zusammensetzung von einem Teil Aldehyd und vier Teilen Amin wurde das Aldehyd vollständig zum Imin **178** umgesetzt. Die Signale der CH₂-Gruppen von den Verbindungen **158** und **178** befinden sich außerhalb des angegebenen Bereichs und wurden nicht in die Interpretation mit einbezogen.

Die einsetzende Iminbildung beeinflusst die chemische Umgebung der Protonen und führt so zu der Verschiebung der Signale. Das neu entstandene Signal bei $\delta = 8.10$ ist dem Imin ($-\text{N}=\text{CH}-$) zuzuordnen. Dennoch befand sich das Gleichgewicht bei diesem Verhältnis nicht vollständig auf der Produktseite, da noch freies Aldehyd in der Lösung vorhanden war (Verhältnis der Integrale: Aldehyd/Imin = 0.8/1.0). Bei einer weiteren Erhöhung der Konzentration desamins **158** auf zwei Äquivalente reduzierte sich das Integral des Aldehydsignals auf ein Hundertstel des Iminsignals (Aldehyd/Imin = 0.01/1.0). In der Reaktionsmischung lagen also fast ausschließlich das Imin **178** und das Amin **158** vor. Bei einem Verhältnis von 1:4 war kein Aldehyd mehr nachweisbar, das Gleichgewicht lag ganz auf der Produktseite. Neben den Protonen des im Überschuss vorliegendenamins (i, j und k) sind nur noch die Signale des Imins **178** (b–h) zu erkennen. Dieses Verhalten ist für beide pH-Werte zu beobachten. Die Iminbildung erfolgt demnach sowohl unter leicht sauren (pH-Wert = 5.5) als auch unter leicht basischen Bedingungen (pH-Wert = 7.5).

Für die Entwicklung der Bibliothek bedeutete dieses Ergebnis, dass die Amine verglichen mit den Aldehyden von vornherein im Überschuss eingesetzt werden müssen. Dadurch sollte erreicht werden, dass das chemische Gleichgewicht schon in der dynamischen Bibliothek ohne Templat eher auf der Produktseite, d.h. bei den Iminen liegt. Aufgrund des durchgeführten Experiments wurde ein Verhältnis von einem Teil Aldehyd zu zwei Teilen Amin gewählt. Zwar war die Umsetzung zum Imin bei diesem Verhältnis noch nicht vollständig, sollte aber für die Durchführung des Screenings ausreichend sein. Zusätzlich konnte noch gewährleistet werden, dass freie Aldehyde im Assay vorhanden waren. Ein zu großer Überschuss an Amin könnte die Lage des Gleichgewichts innerhalb der Bibliothek beeinflussen.

Ein weiterer Aspekt, der mit den durchgeführten ^1H -NMR-Experimenten untersucht werden konnte, war die Dauer der Gleichgewichtseinstellung zwischen Amin und Aldehyd. Die Messungen der gleichen Proben bestehend aus Amin **158** und Aldehyd **145** nach 30 min, 2 h und 4 h zeigten keine Veränderung in den Intensitäten der Signale. Die Einstellung des Gleichgewichts dauerte demnach weniger als 30 min. Eine Inkubationszeit mit den Proteasen von 6 h sollte ausreichen, um eine Gleichgewichtseinstellung zwischen Aldehyd, Amin, Imin und Templat zu gewährleisten.

Mit den so gewonnenen Erkenntnissen konnte nun das Screening der dynamischen Bibliothek an den verschiedenen Proteasen, wie in folgendem Kapitel beschrieben, durchgeführt werden.

4.3.4 DURCHFÜHRUNG UND ERGEBNISSE DES SCREENINGS EINER DYNAMISCHEN KOMBINATORISCHEN BIBLIOTHEK

Für das Screening der dynamischen Bibliothek wurde eine allgemeine Vorgehensweise entworfen. In *Abbildung 87* ist das fünfstufige Schema dargestellt, nach dem in dieser Arbeit vorgegangen wurde. Zuerst wurden die einzelnen Komponenten an jeder der gewählten Proteasen getestet, um festzustellen, ob bereits einer der Bausteine Aktivität an einem Enzym zeigt. Im zweiten Schritt wurde dann die Gesamtbibliothek an den unterschiedlichen Enzymen gescreent. Dabei sollte festgestellt werden, welchen Hemmeffekt die komplette dynamische Bibliothek auf die Enzyme hat. Zeigte die Gesamtbibliothek eine Aktivität an einer oder mehreren Proteasen, wurde eine Dekonvolutionsbibliothek* (vgl. *Kapitel 2.4.3*) als dritter Schritt hergestellt, die Aufschluss über die aktiven Spezies in der Gesamtbibliothek geben sollte. Konnten aus der Dekonvolutionsbibliothek nicht direkt die aktiven Mitglieder identifiziert werden, wurde die Anzahl der Komponenten (Schritt 4) in einer Selektionsbibliothek eingegrenzt (siehe *Abschnitt 4.3.4.3*). Auf diese Weise konnten die Möglichkeiten an aktiven Komponenten eingegrenzt werden und als Konsequenz im letzten Schritt aktive Vertreter aus der Bibliothek identifiziert werden.



Abbildung 87: Vorgehensweise in fünf Schritten, die für das Screening einer dynamischen Bibliothek entworfen wurde.

Wie diese Vorgehensweise im Einzelnen an den ausgewählten Enzymen angewandt und das Screening durchgeführt wurde, wird im nächsten Abschnitt näher erläutert.

* Aus der Gesamtbibliothek wurden Unterbibliotheken hergestellt, in denen jeweils ein Baustein fehlte. So kann man genauere Informationen darüber bekommen, welche Bibliotheksmitglieder an der Interaktion mit dem Enzym beteiligt sind. Diese Unterbibliotheken bilden zusammen die Dekonvolutionsbibliothek.

4.3.4.1 Screening der Einzelkomponenten

Im Einzelkomponenten-Screening wurde jede Bibliothekskomponente einzeln mit jedem der Enzyme auf die Aktivität hin getestet. Zu Beginn der Untersuchung wurden von den einzelnen Substanzen Stammlösungen in DMSO hergestellt ($c = 44 \text{ mM}$). Für das Einzelkomponenten-Screening wurde von jedem Baustein eine Lösung mit einer Konzentration von $c = 4.00 \text{ mM}$ durch Mischen von $10.0 \mu\text{l}$ Stammlösung mit $210 \mu\text{l}$ DMSO hergestellt, was einer finalen Konzentration im Assay von $c_{\text{final}} = 100 \mu\text{M}$ entsprach. Anschließend wurde eine definierte Menge* der verdünnten Stammlösung im jeweiligen Puffer mit einem Enzym und dem passenden Substrat nach 5 min Inkubationszeit mittels Fluoreszenzspektroskopie untersucht. Die Inkubationszeit konnte in diesem Fall im Vergleich zum darauffolgenden Screening der Bibliothek kurz gehalten werden, da keine Gleichgewichtseinstellung stattfinden musste. Aus drei unabhängigen Messungen wurde als Mittelwert die prozentuale Hemmung jeder einzelnen Komponente bestimmt. Die Ergebnisse des Einzelkomponenten-Screenings sind in *Abbildung 88* als Balkendiagramme nach Proteasen geordnet dargestellt. Negative Werte sind auf Schwankungen der Enzymaktivität bezogen auf die Standardprobe mit DMSO zurückzuführen. Um eine Richtlinie zu haben, welche Substanzen als enzymhemmend gelten und welche nicht, wurde folgende selbstgewählte Einstufung vorgenommen: alle Komponenten, welche einen Wert von unter 10 % Hemmung lieferten, wurden als nicht hemmend gewertet; Substanzen mit Werten zwischen 11 % und 60 % als mäßig und Komponenten über 60 % als gut hemmend.

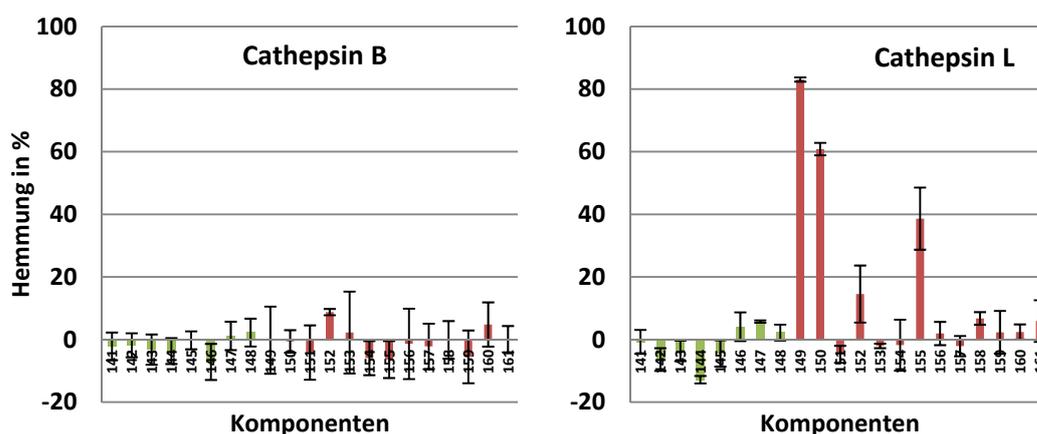


Abbildung 88: Fortsetzung siehe nächste Seite.

* Da für jedes Enzym unterschiedliche Mengen an Puffer, Enzym, Substrat und Inhibitor nötig waren, sind hier keine konkreten Werte angegeben. Die genauen Mengenangaben finden sich im Experimentalteil (*Kapitel 7.3.9*).

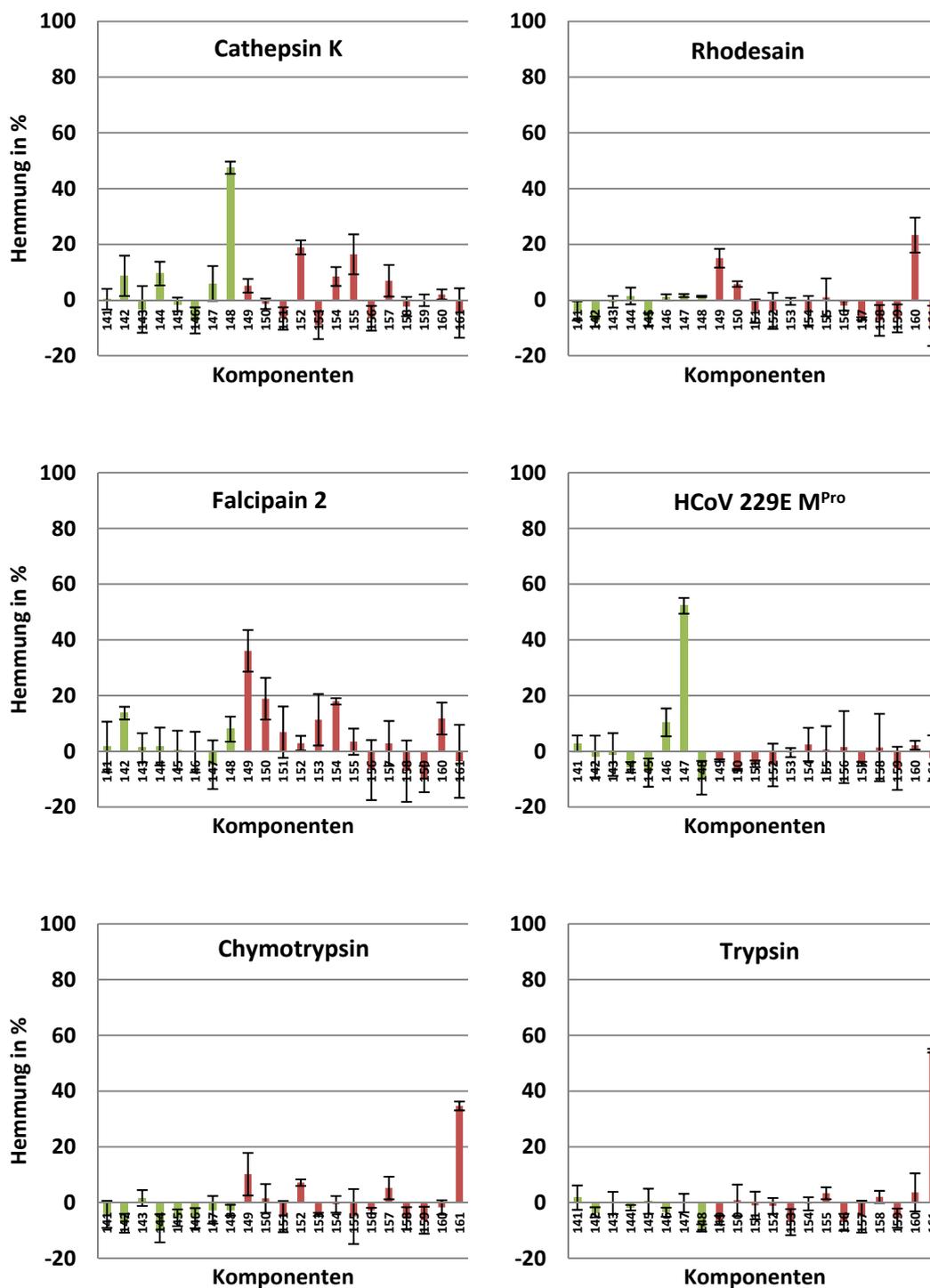
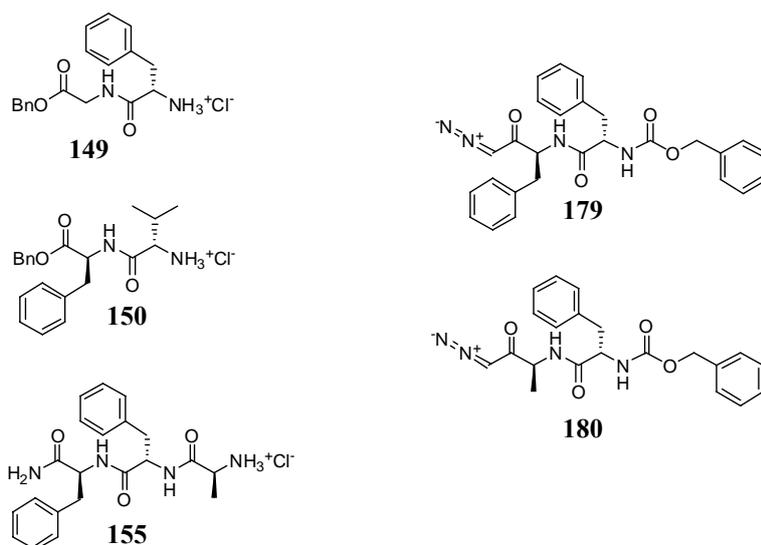


Abbildung 88: Balkendiagramme des Einzelkomponenten-Screenings. Für die Proteasen sind die prozentualen Hemmungen jeder einzelnen Komponente ($c_{\text{final}} = 100 \mu\text{M}$) angegeben (Aldehyde: grün, Amine: rot).

Die Proteasen zeigten gegenüber den Einzelkomponenten ein unterschiedlich ausgeprägtes Verhalten. Bei Cathepsin B lag Verbindung **152** mit 9% als aktivste Komponente noch unterhalb der gewählten Grenze von 10%. Daraus folgte, dass in

diesem Fall keine der Einzelkomponenten als mäßig oder gut hemmend eingestuft werden konnte. Beim Screening an Cathepsin L dagegen inhibierten die Komponenten **149** (83 %) und **150** (61 %) das Enzym, sie wurden als gut hemmend gewertet. Diese beiden sehr hohen Werte müssen beim späteren Screening der dynamischen Bibliothek explizit berücksichtigt werden, da sie die Messungen an dieser Protease maßgeblich beeinflussen können. Die Verbindungen **152** (15 %) und **155** (39 %) wiesen mäßiges Hemmverhalten auf. Die inhibitorische Wirkung der Komponenten **149**, **150** und **155** ist durchaus nicht unerwartet. Es ist bekannt, dass Strukturen mit aromatischen Resten, wie Phenylalanin oder Benzylester Cathepsin L hemmen können. In der Literatur sind peptidische Diazomethanderivate bekannt, die als Inhibitoren für diese Protease fungieren (*Abbildung 89*).^{157,158} Sie bestehen aus Phenylalanin, Alanin und einer Cbz-Schutzgruppe, die den peptidischen Teil des Inhibitors bilden. Zusätzlich dazu besitzen die literaturbekannten Inhibitoren jeweils eine Diazomethylgruppe, die einen nukleophilen Angriffspunkt für die Protease darstellt. Im Vergleich mit den in der Bibliothek verwendeten Bausteinen **149**, **150** und **155** ist eine Ähnlichkeit der Struktur deutlich zu erkennen, wodurch der ermittelte Hemmeffekt der Verbindungen ausgelöst werden kann.



*Abbildung 89: Gegenüberstellung der Einzelkomponenten **149**, **150** und **155** mit den Strukturen der literaturbekannten Inhibitoren **179** und **180**.*^{157,158}

Bei allen übrigen Komponenten blieben die Hemmwerte für Cathepsin L unter der 10 %-Grenze. Das dem Cathepsin L sehr ähnliche Enzym Cathepsin K wurde dagegen von den Molekülen **148** (38 %), **152** (19 %) und **155** (16 %) mäßig gehemmt. Alle übrigen Verbindungen lagen unter 10 %. Aufgrund der engen strukturellen Verwandtschaft zu Cathepsin L wäre hier zusätzlich noch eine Hemmung der Bausteine **149** und **150** zu erwarten gewesen. Beide Komponenten zeigten allerdings an Cathepsin K keinen nennenswerten Effekt. Diese Selektivität kann auf die Spezifität der Bindungstasche von Cathepsin K zurückzuführen sein. Hier werden Leucin, Isoleucin und

Prolin (P2), sowie Arginin und Lysin (P1) im Gegensatz zu großen aromatischen Resten bevorzugt.

Bei Rhodesain konnte Komponente **149** mit einer geringen Aktivität von 15 % und Verbindung **160** mit 23 % Hemmung detektiert werden. Im Vergleich dazu wies das eng verwandte Enzym Falcipain-2 einen deutlich höheren – wenn auch immer noch mäßigen – Hemmeffekt bei Verbindung **149** (36 %), aber einen geringeren bei **160** (12 %) auf. Zudem zeigten die Komponenten **142** (12 %), **150** (19 %), **153** (17 %) und **154** (11 %) an Falcipain-2 eine Hemmung über 10 %.

Für die HCoV 229E M^{Pro} wurde Verbindung **147** mit einem Hemmwert von 52 % als einzige aktive Spezies identifiziert. Der Grund für die Herabsetzung der Enzymaktivität durch die Furanverbindung könnte eine Reaktion des Aldehyds mit dem Schwefel des katalytischen Cysteins sein. Für Cysteinproteasen ist bekannt, dass sie mit Aldehydderivaten wechselwirken. So gibt es Strukturen, die Aldehyde am Ende einer Peptidstruktur tragen, welche als sogenannte „war-heads“ (Angriffspunkte) für die Protease dienen (z.B. Leupeptine und Chymostatine).¹¹⁵ Der gleiche Mechanismus könnte auch bei Komponente **147** ablaufen. Bemerkenswert ist jedoch, dass diese Verbindung nur bei der HCoV 229E M^{Pro} aktiv ist, obwohl alle anderen Proteasen, aufgrund ihres aktiven Zentrums, ebenfalls mit einem Aldehyd wechselwirken könnten. Demnach scheint Verbindung **147** eine Selektivität für die Bindungstasche der M^{Pro} zu besitzen. Die übrigen 20 Komponenten zeigten an der HCoV 229E M^{Pro} keinen Hemmeffekt über 10 %.

Im Falle von Chymotrypsin und Trypsin konnte Verbindung **161** als mäßig hemmende Komponente mit Werten von 35 % (Chymotrypsin) und 55 % (Trypsin) ermittelt werden. Diese doch recht deutliche Selektivität gegenüber den anderen getesteten Komponenten ist für Trypsin und Chymotrypsin eher ungewöhnlich. In ihrer Funktion als Verdauungsenzyme ist es ihre Aufgabe, eine Vielzahl natürlicher Substrate zu spalten. Dies gelingt nur, wenn das aktive Zentrum eine größere Bandbreite an unterschiedlichen Strukturen toleriert. In der Literatur finden sich allerdings Strukturen, die der Inhibitorkomponente **161** strukturell durchaus ähneln, was wiederum den Hemmeffekt erklären könnte. Beispiele hierfür sind Benzylamin¹⁵⁹, Nafamostat¹⁶⁰ und p-NPGB¹⁶¹ (p-Nitrophenyl-p'-guanidinobenzoat), wie in *Abbildung 90* veranschaulicht.

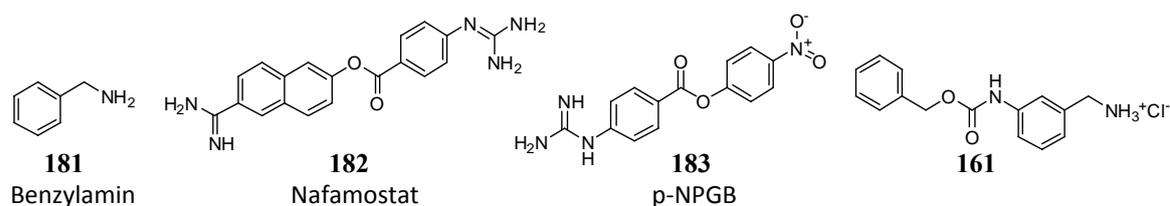


Abbildung 90: Strukturen der literaturbekannten Trypsininhibitoren 181, 182 und 183 im Vergleich mit Verbindung 161.

4. Durchführung und Diskussion

Table 17: Ergebnisse des Screenings der Einzelkomponenten an den unterschiedlichen Proteasen.

Clan	Familie	Spezies	Protease	Spezifität	gut/mäßig hemmende Komponenten ^a
CA	C1	Cat B-ähnlich	Cathepsin B	L/FR XX	-
			Cathepsin L		149, 150, 152, 155
		Cat L-ähnlich	Cathepsin K	S2: lipophil, Leu, Phe	148, 152, 155
			Rhodesain		149, 160
			Falcipain-2		142, 149, 150, 153, 154, 160
PA	C30	ChT-ähnlich	HCoV 229E M ^{Pro}	LQ A/S	147
			Chymotrypsin	XY/F/L XX	161, 149
	S1	Trypsin	XK/R XX	161	

||: Spaltstelle im Peptid; [a] Aldehyde: **141–148**; Amine: **149–161**.

In *Table 17* sind die Ergebnisse dieses Einzelkomponenten-Screenings zusammengefasst. Betrachtet man die nach MEROPS vorgenommene Einteilung der Proteasen und die Substratspezifität, so lassen sich bereits an diesem Punkt, wie zuvor beschrieben, Gemeinsamkeiten und Selektivitäten der Enzyme anhand des Screenings feststellen. Auffallend war, dass bei den beiden Cathepsin L-ähnlichen Proteasen Cathepsin L und Cathepsin K die Komponenten **152** und **155** eine Hemmwirkung zeigten, diese traten sonst bei keinem anderen Enzym auf. Gleiches galt für Rhodesain, das eng mit Falcipain-2 verwandt ist und für Komponente **160** eine Übereinstimmung als aktive Spezies besaß. Für Chymotrypsin und Trypsin, die beide dem Clan PA und der Familie S1 angehören, hatte sich Verbindung **161** als aktivste erwiesen. Die beiden Proteasen Cathepsin B und HCoV 229E M^{Pro} stehen alleine in ihrer Klasse und wurden im Fall von Cathepsin B von keiner Einzelkomponente und im Fall von HCoV 229E M^{Pro} von **147** gehemmt. Komponente **147** wies bei keinem anderen Enzym einen inhibitorischen Effekt auf. Es zeigte sich also bereits nach diesem Screening, dass die Proteasen Affinität zu verschiedenen Strukturen und damit selektives Verhalten erkennen ließen.

Im ersten Schritt des Screenings (*Screening der Einzelkomponenten*) konnten durch die Untersuchung der Wirkung einzelner Komponenten bereits bei Cathepsin L gut hemmende und bei den übrigen Proteasen, mit Ausnahme von Cathepsin B, mäßig aktive Einzelkomponenten identifiziert werden. Als nächstes folgte der zweite Schritt der Durchführung (*Screening der Gesamtbibliothek*), in dem die gesamte Bibliothek an den unterschiedlichen Enzymen getestet wurde, um Unterschiede in der Hemmaktivität bezogen auf die Einzelkomponenten festzustellen.

4.3.4.2 Screening der gesamten dynamischen Bibliothek

Die dynamische Bibliothek musste zunächst aus den hergestellten Stammlösungen gemischt werden. Dabei wurde das im $^1\text{H-NMR}$ -Experiment festgelegte Konzentrationsverhältnis zwischen Aldehyd und Amin (1:2) berücksichtigt. Es wurden jeweils 5.00 μl Aldehydlösung und 10.0 μl Aminlösung gleicher Konzentration mit 270 μl DMSO gemischt. In dieser Mischung der 21 Komponenten (= Gesamtbibliothek) lagen nun die Aldehyde mit einer Konzentration von $c = 1.00 \text{ mM}$ und die Amine mit $c = 2.00 \text{ mM}$ vor (*Abbildung 91*). Die Konzentration des Di- und Trialdehyds bezog sich in diesem Fall nicht auf das Molekül, sondern auf die Aldehydfunktion ($c(\mathbf{144}) = 0.50 \text{ mM}$, $c(\mathbf{148}) = 0.33 \text{ mM}$). Durch die weitere Verdünnung im Assay mit entsprechender Pufferlösung führte das bei den Aldehyden zu den endgültigen Konzentrationen von $c_{\text{final}} = 25.0 \mu\text{M}$ und bei den Aminen von $c_{\text{final}} = 50.0 \mu\text{M}$.

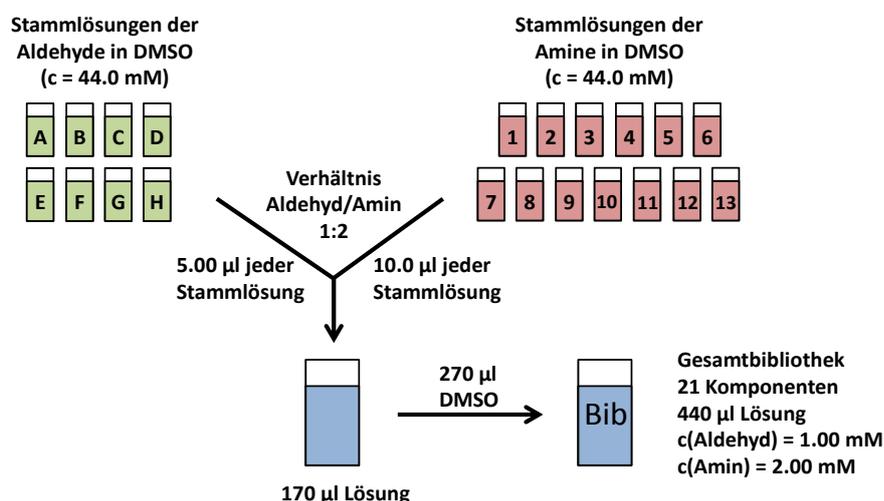


Abbildung 91: Vorgehensweise bei der Herstellung der dynamischen Gesamtbibliothek. Die Stammlösungen der Aldehyde (grün, A–H) und der Amine (rot, 1–13) werden im Verhältnis 1/2 gemischt und mit DMSO auf die gewünschte Konzentration von $c(\text{Aldehyd}) = 1.00 \text{ mM}$ und $c(\text{Amin}) = 2.00 \text{ mM}$ verdünnt. Für den di- und trivalenten Aldehyd beziehen sich die Konzentrationen auf deren Valenz.

Die Gesamtbibliothek wurde daraufhin jeweils mit einem Enzym im entsprechenden Puffer für 6 h bei $4 \text{ }^\circ\text{C}$ inkubiert. In dieser Zeit sollte sich das Gleichgewicht zwischen den Proteasen und den Einzelkomponenten bzw. den sich bildenden Iminverbindungen einstellen. Nach der Inkubationszeit ließ man 1 h auf Raumtemperatur erwärmen, gab dann das entsprechende Substrat zu und ermittelte die Enzymaktivität mittels Fluoreszenzspektroskopie. Durch drei unabhängige Messungen wurde der Mittelwert der prozentualen Hemmung der Gesamtbibliothek ermittelt. Ein wesentlicher Unterschied, der bei der Interpretation der Ergebnisse berücksichtigt werden musste, ist der Konzentrationsunterschied zwischen den Komponenten im Einzelscreening und der

Gesamtbibliothek. Im Einzelscreening besaßen die Teilnehmer eine finale Konzentration von $c_{\text{final}} = 100 \mu\text{M}$. In der Bibliothek wurden die Konzentrationen verringert und lagen für die Aldehyde bei einem Viertel der Konzentration ($c_{\text{final}} = 25.0 \mu\text{M}$) und für die Amine bei $c_{\text{final}} = 50.0 \mu\text{M}$, also der Hälfte.* Diese Maßnahme war notwendig, um die vollständige Löslichkeit der eingesetzten Substanzen zu gewährleisten. Aus diesem Grund ließen sich die ermittelten Werte nicht direkt mit dem Screening der einzelnen Komponenten vergleichen. Eine Abschätzung, ob der Hemmeffekt allein von einer Einzelkomponente stammt oder von einer Kombination mehrerer Verbindungen, war aber dennoch möglich. Nimmt die Hemmung der Gesamtbibliothek gegenüber dem höchsten Wert der Einzelkomponenten zu, obwohl die Konzentration der Bibliotheksmitglieder, wie eben erläutert, niedriger ist, kann der Effekt nicht ausschließlich von der einzelnen Komponente verursacht werden. Sinkt dagegen die prozentuale Hemmung der Gesamtbibliothek, ist es wahrscheinlich, dass überwiegend die jeweilige Einzelkomponente für den Hemmeffekt verantwortlich ist. Der Rückgang des Hemmeffektes würde dann auf die geringere Konzentration der Einzelkomponenten zurückzuführen sein.

In *Abbildung 92* sind die prozentualen Hemmwerte für das Screening der Gesamtbibliothek an den verschiedenen Enzymen in einem Balkendiagramm dargestellt. Wie zu erkennen ist, wurden alle Proteasen in ihrer Aktivität von der Gesamtbibliothek beeinflusst. Cathepsin L und Trypsin wurden mit Werten von 64 % (Cathepsin L) und 63 % (Trypsin) am stärksten gehemmt.

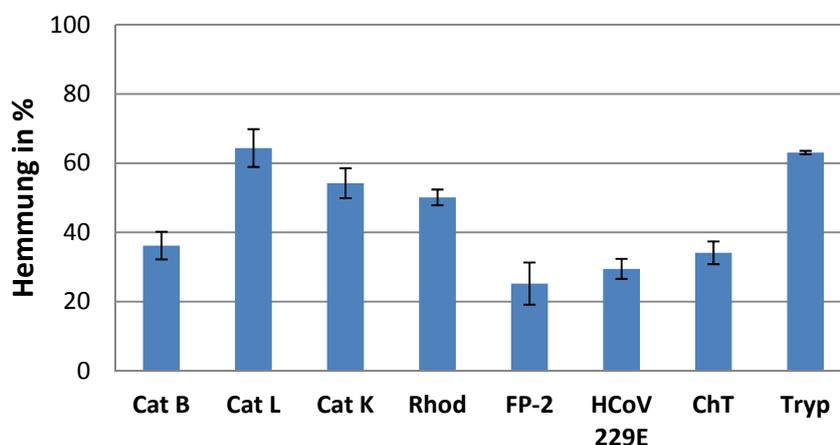


Abbildung 92: Prozentuale Hemmung der Gesamtbibliothek an den ausgewählten Proteasen.

Vergleicht man die prozentuale Hemmung der Gesamtbibliothek mit den Aktivitäten aus dem Einzelkomponenten-Screening, werden die Unterschiede deutlich erkennbar. Bei

* Die angegebenen Konzentrationen der Aldehyde und Amine sind die realen Konzentrationen jeder einzelnen Komponente in der Gesamtbibliothek während des Assays.

Cathepsin B zeigte keine der Einzelkomponenten einen signifikanten Effekt auf das Enzym, die Gesamtbibliothek dagegen hemmte das Enzym mit 36 %. Diese deutliche Erhöhung der Hemmung musste also auf die Wechselwirkung der Protease mit der Bibliothek zurückzuführen sein. Wodurch und in welcher Form diese Hemmung verursacht wurde, kann zu diesem Zeitpunkt noch nicht bestimmt werden.

Die Aktivität von Cathepsin L wurde gleich von vier verschiedenen Einzelsubstanzen reduziert (**149**, **150**, **152**, **155**). Bei Verbindung **149** lag der Wert sogar bei 83 % und bei Verbindung **150** bei 61 %. Die Abnahme der Hemmung der Gesamtbibliothek auf 64 % lässt darauf schließen, dass keine Iminverbindung innerhalb der Bibliothek gebildet wurde, die das Enzym effektiver hemmt als eine der Einzelkomponenten. Hätte sich eine Iminverbindung mit größerem Inhibierungsvermögen als eine der Einzelbausteine gebildet, wäre mit einer zunehmenden bzw. einer gleichbleibenden Hemmungstärke der Gesamtbibliothek zu rechnen gewesen. Dies ist jedoch nicht der Fall und die Verringerung der Enzymaktivität ist wahrscheinlich auf den Effekt der Einzelkomponenten zurückzuführen.

Für Cathepsin K ist ein Anstieg der Hemmung im Vergleich zum Screening der Einzelkomponenten zu verzeichnen. Gegenüber der Verbindung **148** die bei 100 μM einen Wert von 38 % erreichte, konnte die Gesamtbibliothek das Enzym mit 54 % hemmen. Unter Berücksichtigung der 4-fach geringeren Konzentration von **148** in der Bibliothek lässt diese Tatsache auf einen Effekt der Gesamtbibliothek schließen.

Ein vergleichbares Verhalten zeigte die Gesamtbibliothek auch an Rhodesain. Hier nahm die Hemmung der Gesamtbibliothek (50 %) im Vergleich zu der aktivsten einzelnen Komponente **160** mit 23 % deutlich zu.

Bei Falcipain-2 nahm die Hemmung der Gesamtbibliothek bezogen auf den ermittelten Einzelwert von **149** (36 %) auf einen Wert von 25 % ab. Vermutlich überwiegt hier wieder der Effekt der Einzelkomponente.

Eine Abnahme der Hemmaktivität war auch bei HCoV 229E M^{Pro} zu beobachten. Die Hemmung der Gesamtbibliothek verringert sich auf 29 % im Vergleich zur Einzelkomponente **147** mit 52 %.

Chymotrypsin zeigte beim Test der Gesamtbibliothek einen nahezu gleichen Wert (34 %) wie beim Screening der Einzelkomponenten (Komponente **161**: 35 %). Durch die Reduzierung der Aminkonzentration um die Hälfte sollte eine Abnahme der Hemmwirkung zu beobachten sein, sofern die Wirkung nur auf diese Verbindung zurückzuführen war. Da die prozentuale Hemmung in diesem Fall gleich blieb, war davon auszugehen, dass noch ein anderer Effekt, beispielsweise die Bildung einer weiteren Komponente eine Rolle spielte. Ebenso verhält es sich bei Trypsin, bei dem Komponente **161** mit 55 % die aktivste Einzelverbindung war, und die Hemmung der Gesamtbibliothek auf 63 % anstieg.

Die erhaltenen Ergebnisse sind in *Tabelle 18* zusammengefasst.

Table 18: Zusammenfassung der Ergebnisse aus dem Screening Einzelkomponenten und der Gesamtbibliothek

Protease	Hemmung beste Einzelkomponente ($c_{\text{final}} = 100 \mu\text{M}$)		Tendenz	Hemmung Gesamtbibliothek
	Komponente ^a	Hemmung		
Cathepsin B	152	9 %	↗	36 %
Cathepsin L	149	83 %	↘	64 %
Cathepsin K	148	38 %	↗	54 %
Rhodesain	160	23 %	↗	50 %
Falcipain-2	149	36 %	↘	25 %
HCoV 229E M^{Pro}	147	52 %	↘	29 %
Chymotrypsin	161	35 %	→	34 %
Trypsin	161	55 %	↗	63 %

Prozentuale Hemmung gegenüber der Einzelkomponenten nimmt zu (↗), ab (↘) oder bleibt gleich (→); [a] Aldehyde: 141–148; Amine: 149–161.

Vergleicht man die Hemmung der Gesamtbibliothek bei den unterschiedlichen Proteasen miteinander, so lassen sich auch deutliche Unterschiede zwischen den Enzympaaren Rhodesain/Falcipain-2 und Chymotrypsin/Trypsin erkennen. Aufgrund der ähnlichen evolutionären Abstammung der Proteasenpaare wurde eigentlich auch ein ähnliches Verhalten im Screening erwartet. Dies konnte aber nur bei Cathepsin L und Cathepsin K bestätigt werden, welche mit Werten von 54 % und 64 % nahe beieinander liegen. Eine mögliche Erklärung für das unterschiedliche Verhalten der erstgenannten Proteasenpaare wäre die enzymbedingte Verwendung unterschiedlicher Substratkonzentrationen. Diese könnten die Hemmung der Enzyme aufgrund der Konkurrenz zu den Inhibitoren beeinflusst haben. Deshalb wurde bei den Vergleichen der Proteasen untereinander in erster Linie nicht die absolute Hemmung (der höchste Hemmwert), sondern die Differenz der prozentualen Hemmung zwischen Einzelsubstanzen und den Proteasen untereinander diskutiert.

Durch das Screening der Gesamtbibliothek konnten erste Tendenzen in Bezug auf die Wechselwirkung zwischen den Proteasen und den Komponenten der Bibliothek gewonnen werden. Um die erhaltenen Resultate genauer zu untersuchen, wurde eine Dekonvolutionsbibliothek der Komponenten hergestellt. Mit diesem Vorgehen sollte im Folgenden festgestellt werden, ob der bestimmte Hemmeffekt der Gesamtbibliothek nur von den Einzelkomponenten ausgelöst wurde, oder ob er auf eine Kombination von zwei oder mehr Bibliotheksmitgliedern zurückzuführen war.

4.3.4.3 Screening der Dekonvolutionsbibliothek

Um herauszufinden, welche der Einzelkomponenten den Hemmeffekt bei den Proteasen auslösen, wurde eine Dekonvolutionsbibliothek aus den insgesamt 21 verwendeten Einzelsubstanzen hergestellt. Dazu wurden 21 unterschiedliche Unterbibliotheken angelegt, in denen immer jeweils eine andere Komponente aus der Mischung herausgelassen wurde. Eine Unterbibliothek bestand demnach aus 20 verschiedenen Bausteinen. Das fehlende Volumen wurde durch die entsprechende Menge DMSO ersetzt, wodurch man wie auch schon in der Gesamtbibliothek für die einzelnen Komponenten finale Konzentrationen von 25.0 μM für die Aldehyde und 50.0 μM für die Amine erhielt. Die Dekonvolutionsbibliothek wurden analog zur Gesamtbibliothek gescreent und anschließend ausgewertet, dazu wurde die prozentuale Hemmung der einzelnen Unterbibliotheken bestimmt. Geht man davon aus, dass sich der Inhibitor aus mindestens zwei Komponenten (Aldehyd und Amin) zusammensetzt, dann sollte in der Dekonvolutionsbibliothek mindestens eine Probe, bei der ein Amin und eine Probe, bei der ein Aldehyd fehlt, verminderte Hemmwirkung zeigen. Wie in den Grundlagen (Kapitel 2.4.3) bereits beschrieben, würde eine Absenkung der Hemmwirkung (bzw. Anstieg der Enzymaktivität) auf die an der Inhibierung beteiligten Bausteine hindeuten. Die Kombination aus betreffendem Aldehyd und Amin würde dann die aktive Iminverbindung darstellen. Da in der Bibliothek auch ein di- und ein trivalenter Aldehyd vorhanden waren, musste nicht unbedingt nur ein Amin an der Iminbildung beteiligt sein. Eine unsymmetrische Kombination aus zwei oder drei verschiedenen Aminen mit einem Aldehyd war ebenfalls möglich.

Die prozentuale Hemmung der einzelnen Unterbibliotheken ist in nachfolgenden Abbildungen mit Balkendiagrammen wiedergegeben. Durch Schwankungen der Enzymaktivität kam es allerdings vor, dass die Gesamtbibliothek nicht in allen Fällen den höchsten Hemmwert aufwies – wie es eigentlich zu erwarten wäre. Die Werte der Unterbibliotheken befanden sich aber im Vergleich zur Gesamtbibliothek im Bereich der Messtoleranz von 10 %, was bei der Auswertung mit berücksichtigt wurde.

Zunächst werden die Ergebnisse für die Proteasen Cathepsin L, Falcipain-2 und HCoV 229E M^{Pro} diskutiert, bei denen die Hemmung der Gesamtbibliothek verglichen mit den Werten des Einzelkomponenten-Screenings zurückging.

Cathepsin L, Falcipain-2 und HCoV 229E M^{Pro}

Bei Cathepsin L war Komponente **149** mit 83 % im Einzelkomponenten-Screening die aktivste Verbindung. Dies spiegelt sich auch im Screening der Dekonvolutionsbibliothek wieder. Die Unterbibliothek ohne Verbindung **149** (im Diagramm als **-149** angegeben) zeigte den geringsten Hemmeffekt, was an der Abnahme der prozentualen Hemmung zu erkennen war (*Abbildung 93*). Das bedeutet, dass die Komponente **149** maßgeblich an der

Inhibierung der Protease beteiligt war. Die übrigen Unterbibliotheken, in denen **149** vorhanden war, wiesen höhere Aktivität gegenüber der Protease auf. Dieser Sachverhalt lässt auf eine Beteiligung von **149** am Hemmeffekt schließen. Zusätzlich dazu waren geringere Hemmwerte für die Bibliotheken ohne die Komponenten **150**, **152**, **154** und **155** zu verzeichnen. Mit diesen Komponenten zeigten ausschließlich Aminverbindungen einen Effekt an der Protease, eine Iminbildung konnte als Grund für die Inhibierung ausgeschlossen werden. Problematisch bei der Interpretation der Werte war zusätzlich die Tatsache, dass im Einzelscreening gleich vier verschiedene Spezies mäßige bis gute Effekte gegenüber der Protease zeigten. Dadurch kam es zu einer undefinierten Überlagerung der Hemmeffekte. Es konnte nicht eindeutig aus der Dekonvolutionsbibliothek herausgelesen werden, ob eine Iminverbindung in der gleichen Größenordnung wie Verbindung **149** hemmte. Ähnliche Schwierigkeiten gab es bei HCoV 229E M^{Pro}. Hier konnte auch die Unterbibliothek, in der Verbindung **147** (Einzelscreening 52 %) fehlte, als diejenige mit dem geringsten Hemmwert identifiziert werden. Die übrigen Unterbibliotheken variieren stark in ihrem Inhibierungsgrad und es lässt sich keine eindeutige Tendenz herauslesen (*Abbildung 93*). Es könnte eine Vielzahl von Molekülkombinationen mit der Protease wechselwirken – jedoch ist der Unterschied zur Gesamtbibliothek nicht groß genug, um qualitative Aussagen zu treffen. Vermutlich war die Hemmwirkung jedoch überwiegend auf die im Einzelverbindungs-Screening identifizierte Verbindung **147** zurückzuführen. Bei Falcipain-2 stimmen die Ergebnisse der Dekonvolutionsbibliothek nicht mit denen des Einzelscreenings überein (*Abbildung 93*). Verglichen mit den anderen Proteasen war hier die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse unter den gewählten Bedingungen nur begrenzt möglich. Wahrscheinlich lässt die Aktivität des Enzyms über die lange Inkubationszeit zu stark nach oder denaturiert bei Anwesenheit der Bibliothekskomponenten. Deswegen können in diesem Fall keine konkreten Aussagen über Selektivitäten oder Hemmwirkungen der Dekonvolutionsbibliothek getroffen werden. In den beiden ersten Fällen konnte jedoch durch das Dekonvolutionscreening die bereits im Einzelkomponenten-Screening ermittelten Tendenzen der Bausteine **147** und **149** bestätigt werden. Ausgehend von diesen Ergebnissen könnten die ermittelten Strukturen beispielsweise als Grundlage für Docking-Experimente zur Entwicklung neuer Leitstrukturen dienen.

Cathepsin B, Cathepsin K, Rhodesain und Trypsin

Für die Enzyme Cathepsin B, Cathepsin K, Rhodesain und Trypsin nahm die Hemmung zwischen dem Screening der Einzelkomponenten und der Gesamtbibliothek zu. Dies lässt darauf schließen, dass nicht nur die ermittelten Einzelbausteine die Hemmung verursachen. Die Ergebnisse des Dekonvolutionscreenings wurden mit dem vorangegangenen Einzelkomponenten-Screening verglichen und es wurde versucht, aktive Spezies unter den Bibliothekskomponenten zu identifizieren. Bei nicht eindeutigen Ergebnissen des Screenings wurden die aktivsten Komponenten noch einmal in einer neuen, kleineren Dekonvolutionsbibliothek (Selektionsbibliothek) gemischt und erneut untersucht. Auf diese Weise wurde die Gesamtmenge an Verbindungen innerhalb der

Bibliothek verringert und Nebeneffekte von anderen Komponenten reduziert. Aus dem Ergebnis sollte sich dann eine Einschätzung über Potential und Art der Komponente bzw. des Inhibitors ableiten lassen.

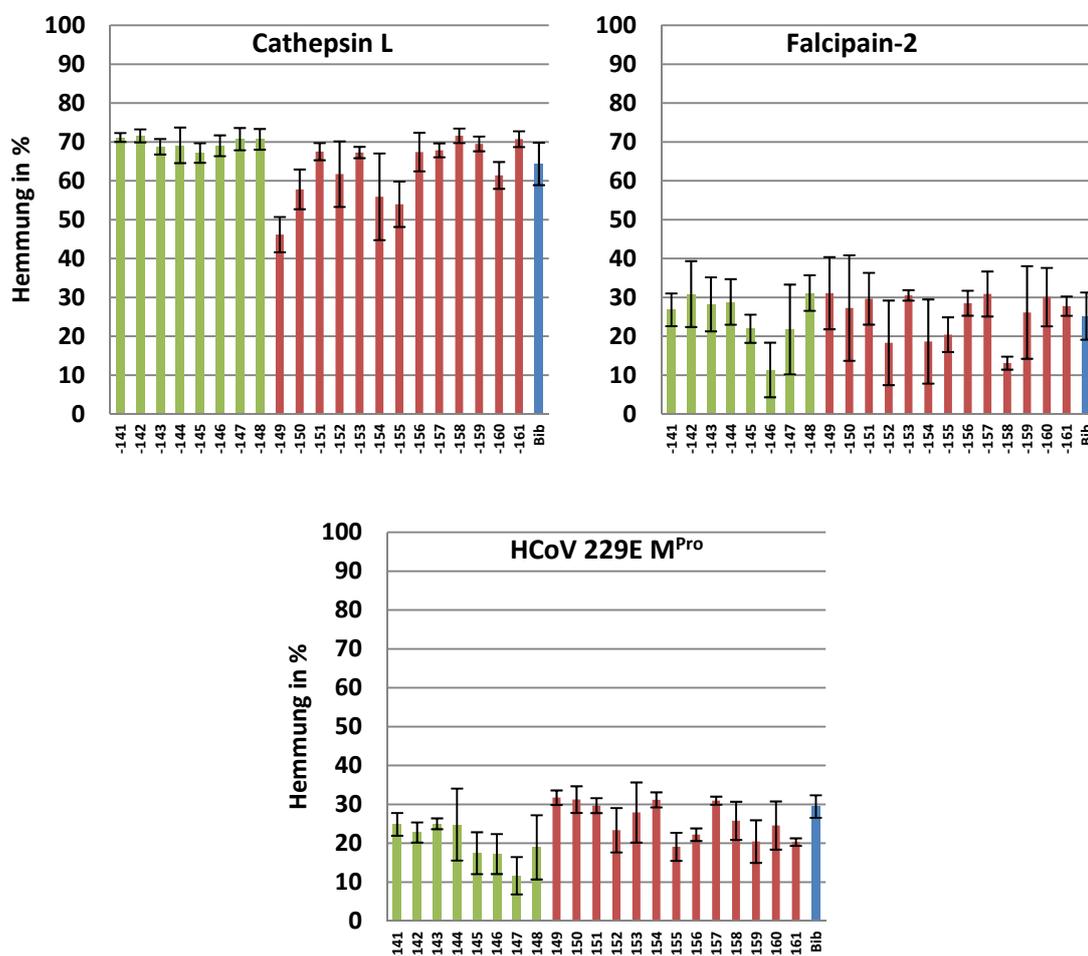


Abbildung 93: In diesen Balkendiagrammen ist die prozentuale Hemmung der Unterbibliotheken des Dekonvolutionsscreenings (Aldehyde: grün, Amine: rot) sowie die Aktivität der Gesamtbibliothek (Bib: blau) an Cathepsin L, Falcipain-2 und HCoV 229E M^{Pro} angegeben.

Cathepsin B

Bei Cathepsin B zeigte Verbindung **152** mit 9 % im Einzelscreening den höchsten Wert, die Hemmung der Gesamtbibliothek lag bei 36 %. Im Dekonvolutionsscreening übten mehrere Komponenten einen Effekt auf das Enzym aus, dabei konnte beim Fehlen des Aldehyds **146** der größte Abfall der Hemmleistung ermittelt werden. Zudem waren bei den Aminen **156**, **158**, **159** und **160** ebenfalls eine deutliche Verringerung im Vergleich zur Gesamtbibliothek zu erkennen (*Abbildung 94*). In diesen Fällen konnte auf eine Beteiligung der Komponenten an der Enzymhemmung geschlossen werden. Es war also möglich, dass eine Kombination aus dem Aldehyd **146** mit einem der Amine **156**, **158**, **159** oder **160** Strukturen bildete, die das Enzym inhibierten. Es ist jedoch nicht auszuschließen, dass es noch andere Iminspezies gibt, die zu einer Herabsetzung der

Enzymaktivität führen, da es zusätzlich dazu noch weitere Amine und Aldehyde gibt, die den Hemmeffekt zwar nicht so deutlich, aber dennoch beeinflussen (z.B.: **144**, **147**, **152**, **153**, **161**).

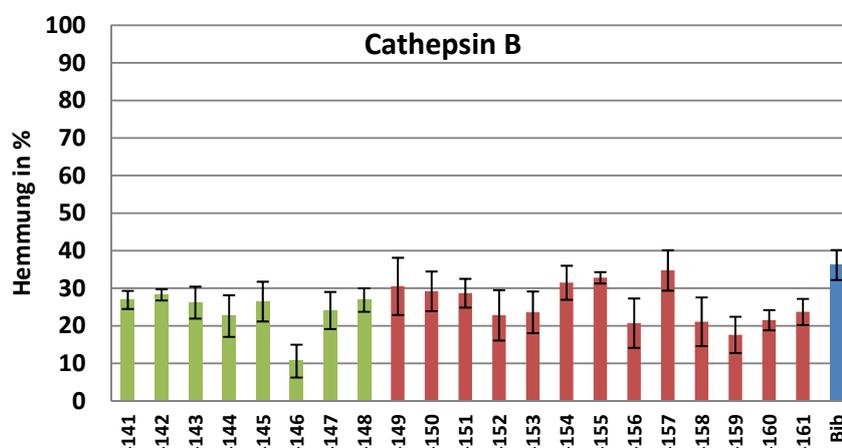


Abbildung 94: Das Balkendiagramm gibt die prozentuale Hemmung der Unterbibliotheken des Dekonvolutionsscreenings bei Cathepsin B an (Aldehyde: grün, Amine: rot, Gesamtbibliothek: blau).

Um den Hemmeffekt der aktivsten Verbindungen noch einmal eindeutiger hervorzuheben, wurde eine Selektionsbibliothek (Sel-Bib) zusammengestellt, in der gezielt nur die aktiven Spezies mit dem Prinzip der Dekonvolution untersucht wurden. Hierzu wurden die Verbindungen **144**, **146**, **147**, **152**, **153**, **156**, **159** und **160** zu einer Bibliothek gemischt und am Enzym getestet. Die Konzentrationen der einzelnen Komponenten wurden dabei wie auch schon in der Dekonvolutionsbibliothek mit $c_{\text{final}}(\text{Aldehyd}) = 25.0 \mu\text{M}$ und $c_{\text{final}}(\text{Amin}) = 50.0 \mu\text{M}$ gewählt.

Das Screening der Selektionsbibliothek zeigte, dass Aldehyd **146** gegenüber **144** und **147** einen größeren Hemmeffekt auf das Enzym ausübte (*Abbildung 95*). Gleichzeitig waren die Verbindungen **156**, **159** und **160** ebenfalls an der Inhibierung beteiligt. Dies konnte durch die verminderte Hemmung der einzelnen Selektionsbibliotheken ermittelt werden. Die Verbindungen **152** und **153** schienen in dieser Zusammenstellung deutlich geringeren Einfluss auf die Hemmung der Protease zu haben. Im Screening nahm die Wirkung der Selektionsbibliothek verglichen zu der Gesamtbibliothek auf 13 % ab. Bei dieser geringen Hemmleistung ist auf Grund des einkalkulierten Messfehlers von ca. 10 % ein reproduzierbares Ergebnis nahezu nicht mehr möglich. Zudem war die Aktivität der Komponenten zu gering, um von einer effektiven Inhibierung der Protease zu sprechen. Dennoch konnten in diesem Fall mit Hilfe der Selektionsbibliothek die Tendenzen für Komponenten **146**, **156**, **159** und **160**, die auch schon in der Dekonvolutionsbibliothek zu erkennen waren, bestätigt werden. Auffallend ist, dass es im Vergleich zu den übrigen Bausteinen recht kleine Komponenten sind. In Anbetracht der Präferenz der Protease für die Aminosäuren Leu und Phe in der S2 Tasche stehen die gefundenen Komponenten strukturell durchaus in Verbindung mit den ermittelten Tendenzen. Auf eine gesonderte

Synthese der identifizierten Imine, um sie anschließend an der Protease separat zu testen, wurde in diesem Projekt aufgrund der geringen Aktivität verzichtet.

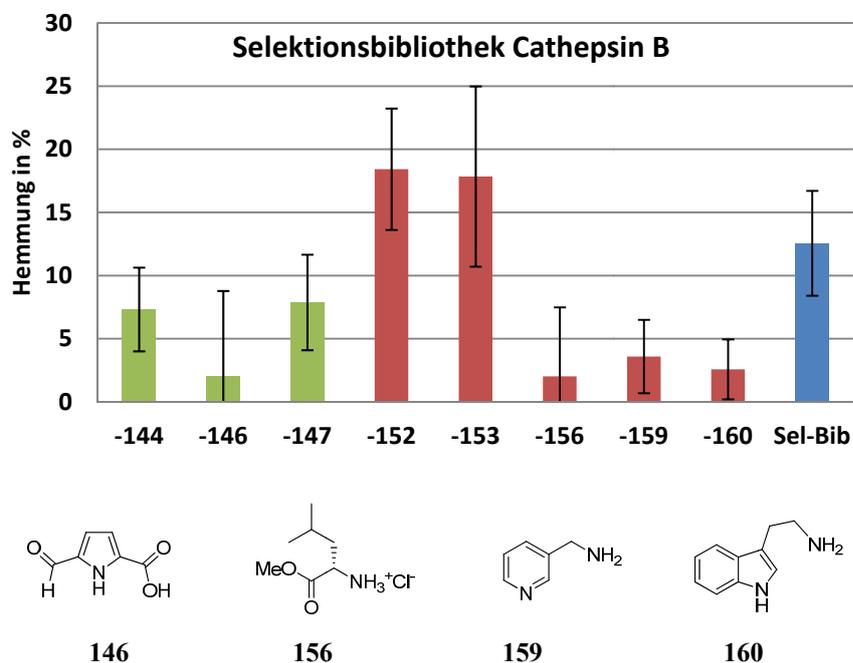


Abbildung 95: Selektionsscreening ausgewählter Komponenten am Enzym Cathepsin B. Die prozentuale Hemmung ist in einem Balkendiagramm angegeben (Aldehyde: grün, Amine: rot, Selektionsbibliothek: blau). Als aktivste Verbindungen wurden die Bausteine **146**, **156**, **159** und **160** identifiziert.

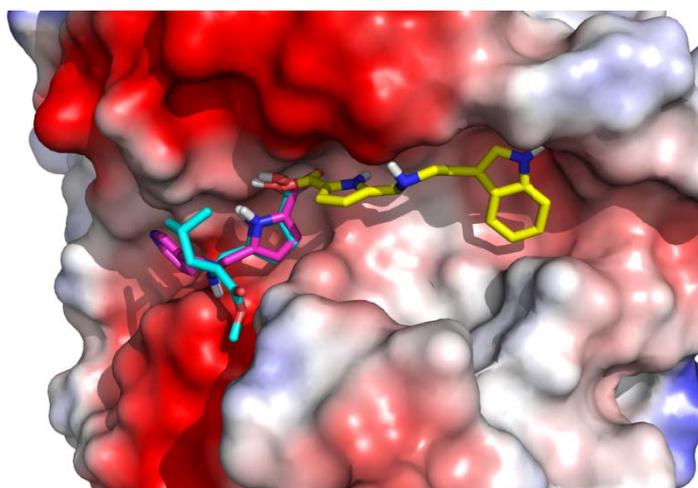


Abbildung 96: Überlagerte Strukturen der ermittelten Verbindungen im aktiven Zentrum von Cathepsin B. Abgebildet sind jeweils die zum Amin reduzierten Kombinationen aus **146** und **156** (hellblau), **146** und **159** (magenta) und **146** und **160** (gelb). Diese Verbindungen können als Grundlage für die Berechnung neuer Leitstrukturen dienen.

Die erhaltenen Strukturen könnten aber durchaus für weitere Untersuchung an Cysteinproteasen herangezogen werden, beispielsweise bei der Berechnung neuer Leitstrukturen. Kraftfeldrechnungen haben eine gute Passform der ermittelten Strukturen in der Bindungstasche von Cathepsin K ergeben (*Abbildung 96*).

Cathepsin K

Bei der Protease Cathepsin K hatte sich nach dem Screening der Einzelkomponenten ein Hemmeffekt für den Aldehyd **148**, sowie die Amine **152** und **155** abgezeichnet. Dieses Verhalten konnte die Dekonvolutionsbibliothek allerdings nicht eindeutig bestätigen. Beim Screening der Unterbibliotheken ohne die Komponenten **148**, **152** und **155** zeigte sich keine signifikante Reduzierung der Hemmleistung (*Abbildung 97*). Am deutlichsten ist dieser Effekt bei Komponente **148** zu beobachten. Dagegen zeigten die Unterbibliotheken ohne Verbindungen **154** und **155**, verglichen mit der Gesamtbibliothek, den geringsten Wert. Dieses Ergebnis ließ vermuten, dass es zu einer Akkumulation von verschiedenen Hemmeffekten und Wechselwirkungen der Bausteine mit dem Enzym kam, die keine eindeutige Identifizierung eines Aldehyd-Amin-Paares zuließen.

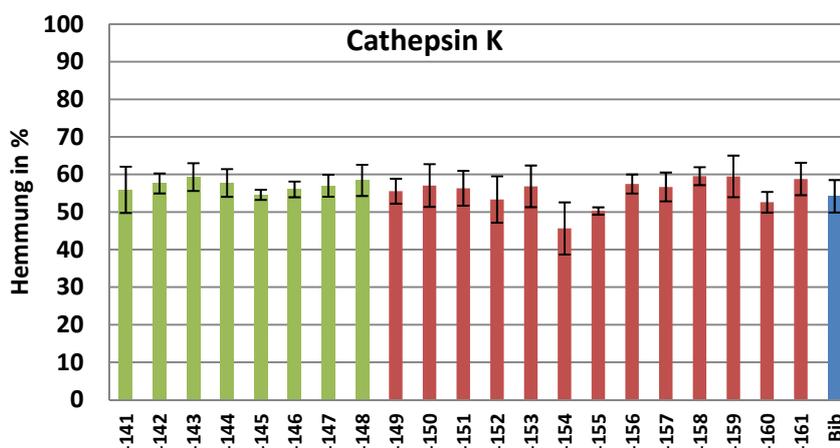


Abbildung 97: Das Balkendiagramm gibt die prozentuale Hemmung der Unterbibliotheken des Dekonvolutionsscreenings bei Cathepsin K an (Aldehyde: grün, Amine: rot, Gesamtbibliothek: blau).

Um Nebeneffekte von den übrigen nicht aktiven Komponenten auszuschließen, wurde auch hier eine Selektionsbibliothek hergestellt. Dafür wurden die Komponenten **142**, **144**, **148**, **152**, **154**, **155** und **160** ausgewählt. Die fluorimetrischen Untersuchungen ergaben eine deutliche Abnahme der Aktivität beim Fehlen von Amin **152** und **160**. Das Aldehyd **148** zeigte einen geringeren Effekt auf die Protease als anfangs durch das Einzelkomponenten-Screening vermutet (*Abbildung 98*). Für die anderen Verbindungen ist die Tendenz aufgrund der Aktivitätsschwankung des Enzyms nicht eindeutig

festzulegen. Eine Identifizierung einer oder zwei aktiver Komponenten ist auch in diesem Fall schwierig. Ausgehend von dieser Selektionsbibliothek könnte eine Kombination von Aldehyd **148** mit Amin **152** oder **160** zu einer Iminverbindung führen, die eine gewisse Hemmleistung gegenüber Cathepsin K aufweist.

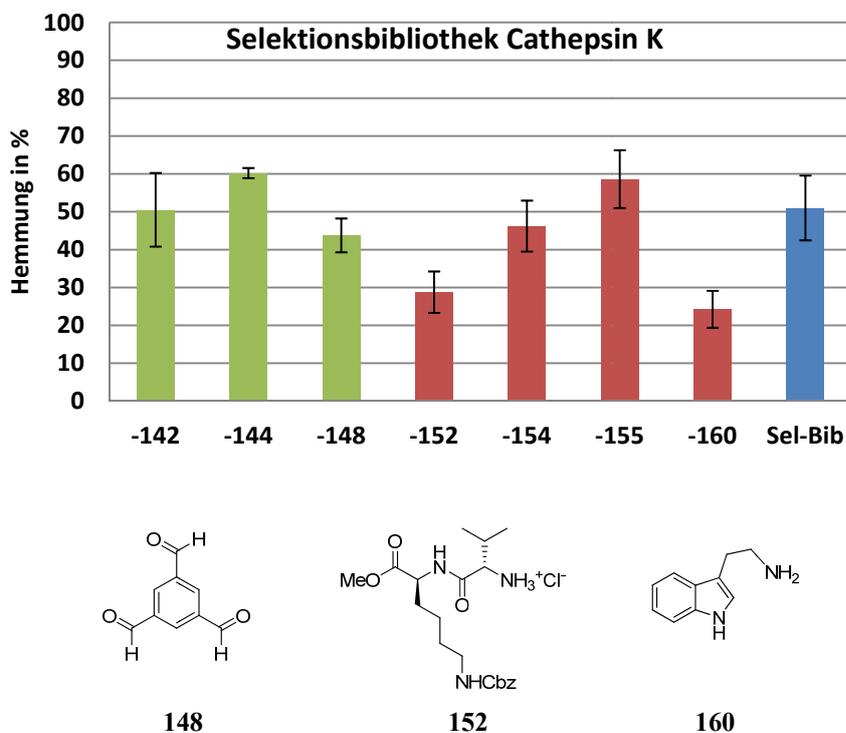


Abbildung 98: Balkendiagramm des Selektionsscreenings an der Protease Cathepsin K (Aldehyde: grün, Amine: rot, Selektionsbibliothek: blau) und Darstellung der Komponenten **148**, **152** und **160**, die als potente Strukturen identifiziert werden konnten.

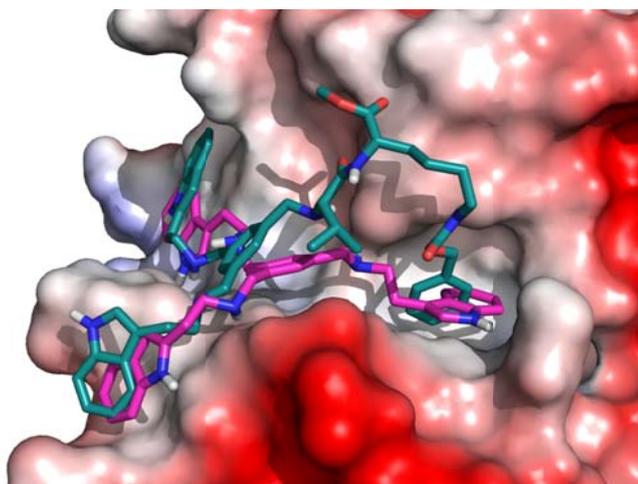


Abbildung 99: Berechnete Strukturen der Bausteinkombinationen **148–152–2×160** (dunkelgrün) und **148–3×160** (magenta) im aktiven Zentrum von Cathepsin K. Vor allem die symmetrische Verbindung mit drei Tryptophanresten (magenta) liegt passgenau in der Bindungstasche des Enzyms.

Die trivalente Aldehydverbindung **148** kann gleichzeitig mit unterschiedlichen Aminen Imine bilden. Deshalb war es zu diesem Zeitpunkt nicht möglich, eine Aussage darüber zu machen, welche Kombinationen zwischen **148**, **152** und **160** zu einer Hemmung führten. Statistisch gesehen gibt es vier verschiedene Möglichkeiten, ein Produkt aus der Kombination dieser drei Komponenten zu bilden: **148-3×152**, **148-2×152-160**, **148-152-2×160** und **148-3×160**. Zusätzlich ist in der Selektionsbibliothek der bivalente Aldehyd **144** vorhanden, der strukturell gesehen zu ähnlichen Verbindungen führt und somit einen Einfluss auf ein eindeutiges Ergebnis haben könnte. Die Affinität der Protease für lipophile Strukturen in der S2 Tasche könnte zu der Präferenz dieser Komponenten geführt haben. Tryptamin (**160**) besitzt einen unpolaren Charakter, ebenso wie das Cbz-geschützte Lysin zusammen mit Valin (**152**). Auch das Aldehyd **148** ist durch seinen aromatischen Kern von hydrophobem Charakter. In ersten Kraftfeldrechnungen konnte auch an dieser Protease die gute strukturelle Affinität zum aktiven Zentrum gezeigt werden. Diese Ergebnisse unterstreichen die experimentellen Daten. Am Beispiel der Kombinationen aus **148-152-2×160** und **148-3×160** ist der Sachverhalt in *Abbildung 99* zu erkennen. Die Strukturen können auch in diesem Fall als Basis für die Entwicklung und Optimierung neuer Inhibitoren dienen.

Rhodesain

Die Messung der Dekonvolutionsbibliothek bei Rhodesain zeigte einen deutlich größeren Hemmeffekt als die aktivsten Einzelkomponenten (Anstieg von 23 % auf 50 %). Am signifikantesten ist die Abnahme der Hemmung bei der Unterbibliothek ohne Aldehyd **146** und **147** sowie Amin **153** und **158**. Die einzelnen Werte der anderen Unterbibliotheken lagen allerdings alle in einem sehr engen Bereich in der Nähe dieser Verbindungen, d.h. es gab keinen Vertreter der explizit aus der Reihe herausstach (*Abbildung 100*). Mit der Annahme, dass es eine Kombination aus einem Amin und einem Aldehyd gibt, die den größeren Hemmeffekt gegenüber den Einzelkomponenten **149** (15 %) und **160** (23 %) ausmacht, war es dennoch nicht möglich, sie aus dieser Dekonvolutionsbibliothek zu identifizieren. Auch hier war eine Überlagerung nicht nur eines Hemmeffektes wahrscheinlich. Kommt es zu einer Kombination mehrerer Iminverbindungen, die das Enzym inhibieren, lässt sich aufgrund der zu geringen Tendenzunterschiede keine Aussage über die Zusammensetzung der Verbindung machen. Auf eine erneute Messung ausgewählter Vertreter durch eine Selektionsbibliothek wurde aufgrund der geringen Differenzen in der Hemmstärke bei allen Unterbibliotheken verzichtet. Auffallend war in der durchgeführten Messreihe jedoch, dass bei den aktiveren Strukturen drei der vier Pyrrol- und Furanverbindungen auftauchten und zusätzlich dazu in Verbindung **153** ein Leucin als Rhodesain-affine Aminosäure vorhanden war. Dieses Ergebnis konnte auch mit den Verbindungen aus *Kapitel 4.1*, den Rhodesaininhibitoren zweiter Generation in Zusammenhang gebracht werden. Sie bestehen in ihrer Leitstruktur ebenfalls aus einem Pyrrol- bzw. Furangerüst, das mit einem *N*-geschützten Guanidin substituiert ist. Es konnte demnach der Zusammenhang zwischen bereits bekannten Inhibitoren und den neuen Komponenten aus dem dynamischen Screening hergestellt

werden. Diese Erkenntnis kann nun in beiden Entwicklungsmethoden zur Optimierung der Inhibitoren herangezogen werden.

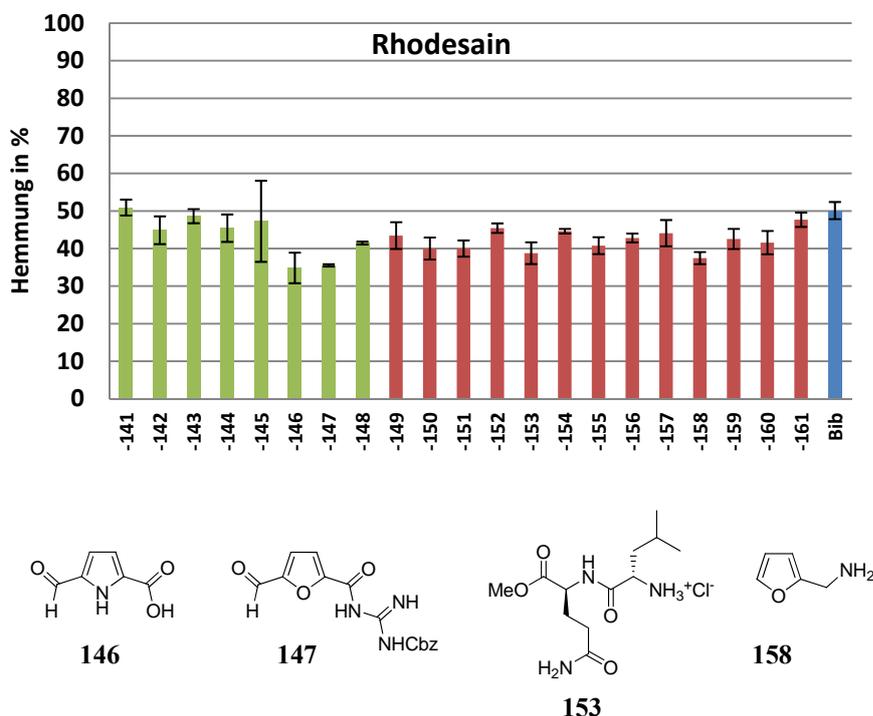


Abbildung 100: Das Balkendiagramm gibt die prozentuale Hemmung der Unterbibliotheken des Dekonvolutionsscreenings bei Cathepsin K an (Aldehyde: grün, Amine: rot, Gesamtbibliothek: blau). Unten sind die Komponenten angegeben, die beim Dekonvolutionsscreening mit Rhodesain den größten Effekt an der Protease zeigten.

Trypsin und Chymotrypsin

Die Protease Trypsin hatte im Screening der Einzelkomponenten schon eine deutliche Abnahme der Aktivität durch Verbindung **161** gezeigt. Dieser Effekt konnte auch in der Dekonvolutionsbibliothek reproduziert werden. Verbindung **161** zeigte hier einen signifikanten Unterschied zur Gesamtbibliothek (*Abbildung 101*). Des Weiteren fiel Verbindung **150** durch eine Reduzierung der Hemmaktivität der entsprechenden Unterbibliothek auf. Bei der Gruppe der Aldehyde gab es keinen deutlichen Hinweis darauf, dass das Fehlen einer der Aldehydkomponenten einen Einfluss auf die Inhibierung des Enzyms hatte. Die Enzymhemmung schien also nicht auf eine Iminverbindung zurückgeführt werden zu können. Eine Selektionsbibliothek, die aus den Komponenten **146**, **147**, **150** und **161** bestand, wurde zur Bestätigung des gefundenen Ergebnisses hergestellt und untersucht (*Abbildung 102*). In diesem Fall ist die Aktivität der Verbindung **161** deutlich durch die herabgesetzte prozentuale Hemmung der Unterbibliothek ohne **161** zu erkennen. Verbindung **150** hingegen scheint keinen größeren Einfluss auf das Enzym zu haben, ebenso die beiden Aldehyde **146** und **147**.

4. Durchführung und Diskussion

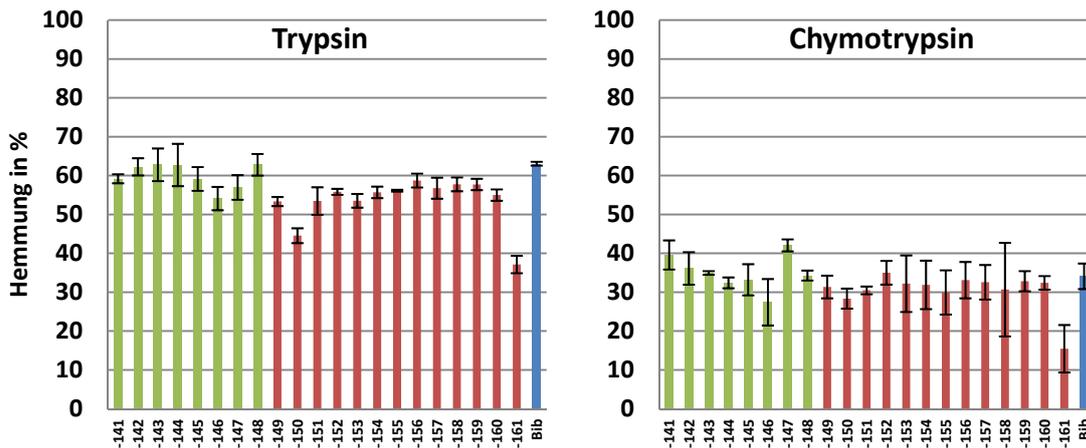
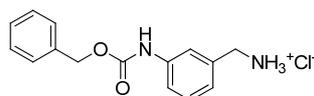
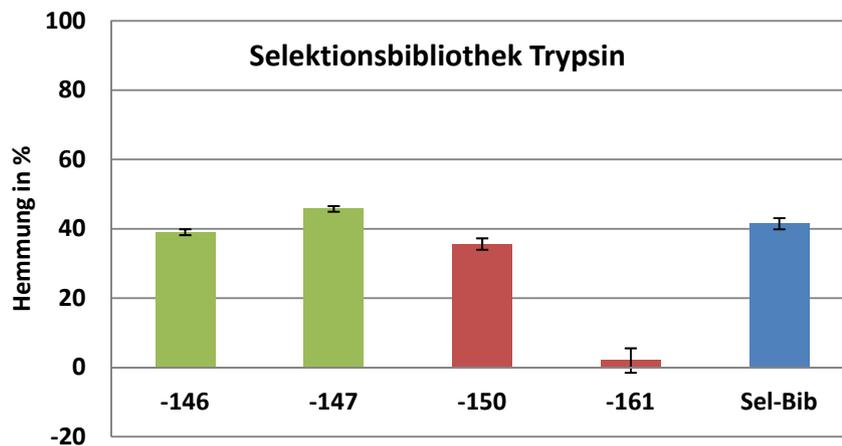


Abbildung 101: Die Balkendiagramme geben die prozentuale Hemmung der Unterbibliotheken des Dekonvolutionsscreenings bei Trypsin und Chymotrypsin an.



161

Abbildung 102: Prozentuale Hemmung der aufgrund des Dekonvolutionsscreenings ausgewählten Verbindungen. Komponente 161 zeigt den signifikantesten Effekt an Trypsin und Chymotrypsin.

Vergleicht man die Dekonvolutionsbibliothek von Trypsin mit der von Chymotrypsin, erkennt man ein ganz ähnliches Muster. Wie bei Trypsin zeigte sich auch bei Chymotrypsin eine Aktivität von Verbindung 161, allerdings mit deutlich geringerer prozentualer Hemmung. Zudem ist die verminderte Aktivität bei den Proben ohne 146 und 150 bei beiden Proteasen zu erkennen.

Das Ergebnis des Screenings an Trypsin und Chymotrypsin lässt vermuten, dass Verbindung 161 allein für die Inhibierung der Proteasen verantwortlich war. Eine

Kombination mit einem Aldehyd ist aus den Daten nicht zu erkennen gewesen. Die prozentuale Hemmwirkung der Gesamtbibliothek stieg zwar im Fall von Trypsin verglichen mit dem Einzelkomponenten-Screening an, was eigentlich für einen zusätzlichen Effekt einer Iminkomponente sprechen würde, aus der Untersuchung der Dekonvolutionsbibliothek ließen sich aber keine Verbindungen identifizieren, die dafür eindeutig verantwortlich sein könnten. Unter Umständen beeinflusste Komponente **161** die Hemmwirkung anderer Bausteine, bzw. überlagerte die Hemmeffekte. Eine weitere denkbare Ursache kann auch die längere Inkubationszeit sein (verglichen mit der Reaktionszeit im Einzelkomponenten-Screening). Sollte die Verbindung nur recht langsam mit der Protease reagieren, würde dies einen Anstieg der Hemmaktivität nach längerer Reaktionszeit bedeuten. Ein ähnlicher Sachverhalt wurde auch bei Chymotrypsin gefunden, bei dem die aktive Komponente **161** für die Inhibierung verantwortlich war. Aufgrund dieses Ergebnisses, der Analogie zu Trypsin sowie der schwächeren prozentualen Hemmung der Gesamtbibliothek an Chymotrypsin wurde auf die Herstellung einer Selektionsbibliothek verzichtet. Das Screening der Dekonvolutionsbibliothek brachte demnach in diesen beiden Fällen keine neuen Erkenntnisse, die auf weitere Strukturen mit inhibitorischer Wirkung hindeuteten. Verbindung **161** konnte allerdings als aktive Komponente bestätigt werden und bietet einen Ansatzpunkt für Optimierungen, um den Hemmeffekt zu verbessern.

4.3.5 ERGEBNISÜBERSICHT DES DYNAMISCHEN SCREENINGS

Die Methode der dynamischen kombinatorischen Chemie sollte in diesem Projekt als Werkzeug für die Identifizierung von neuen Inhibitorstrukturen an Cysteinproteasen verwendet werden. Dazu konnten erfolgreich Messbedingungen gefunden werden, die es erlauben, eine dynamische Bibliothek an mehreren unterschiedlichen Cysteinproteasen zu untersuchen. Die Auswahl der Bibliothekskomponenten erfolgte in diesem Fall durch Erfahrungswerte aus vorangegangenen Arbeiten und mit Hilfe von Literaturdaten. Auch die Verwendung der Iminbildung als reversibler Prozess innerhalb der Bibliothek zeigte sich mit den ausgewählten Assaybedingungen als kompatibel. Durch einfache Vorversuche, wie die Untersuchung der Iminbildung mittels $^1\text{H-NMR}$ -Spektroskopie in wässrigem, gepuffertem Medium, konnte die Eignung dieser Reaktion für die Enzymassays bei entsprechenden pH-Werten bestätigt werden.

Die Vorgehensweise, welche in fünf Abschnitte unterteilt werden kann (siehe *Abbildung 87*), hat sich als sinnvolle und effiziente Strategie erwiesen. Es konnte nach jedem abgeschlossenen Screening individuell auf die Ergebnisse an der jeweiligen Protease reagiert werden und so aktive Spezies durch die schrittweise Untersuchung der Einzelkomponenten und der Gesamtbibliothek identifiziert werden. Die Synthese aller möglichen 624 Kombinationsmöglichkeiten wäre nicht zu leisten gewesen, zumal die Strukturen nicht mit der klassischen kombinatorischen Chemie (z.B. split and mix) zugänglich sind. Die Ergebnisse der Screeningreihe sind in *Tabelle 19* zusammengefasst.

Tabelle 19: Zusammenfassung der Ergebnisse aus dem Screening der Einzelkomponenten, der Gesamtbibliothek und dem Dekonvolutionsscreening.

Protease	Hemmung beste Einzelkomponente ($c_{\text{final}} = 100 \mu\text{M}$)		Hemmung Gesamtbibliothek	Dekonvolutionsbibliothek	
	Verb.	Hemmung		Aldehyd	Amin
Cathepsin B	152	9 %	36 %	146	156, 159, 160
Cathepsin L	149	83 %	64 %	-	149
Cathepsin K	148	38 %	54 %	148	152, 160
Rhodesain	160	23 %	50 %	146, 147	153, 158
Falcipain-2	149	36 %	25 %	-	-
HCoV 229E M^{Pro}	147	52 %	29 %	147	-
Chymotrypsin	161	35 %	34 %	-	161
Trypsin	161	55 %	63 %	-	161

- : Verbindungen zeigten keinen Hemmeffekt oder waren nicht eindeutig zuzuordnen. Grün hinterlegte Spalten: Sowohl Aldehyde als auch Amine konnten als aktive Komponenten identifiziert werden. Rote Spalten: Nur eine Komponente war für die Hemmung der Protease verantwortlich.

Es wurde herausgefunden, dass sich die Proteasen Cathepsin B, K und L sowie Rhodesain und Falcipain-2 trotz ihrer evolutionär gleichen Abstammung (Clan PA, C1) durch selektives Verhalten bezogen auf die aktivsten Verbindungen unterschieden. Cathepsin L zeigte bei Verbindung **149** den größten Aktivitätsverlust, während für Cathepsin B eine Kombination aus dem Aldehyd **146** und den Aminen **156**, **159** und **160** als möglicher Inhibitor fungiert. Der Aldehyd **146** spielte auch bei der verwandten Protease Rhodesain in Kombination mit den Aminen **153** und **158** eine Rolle. Zusätzlich könnte in diesem Fall auch noch der Aldehyd **147** für einen Hemmeffekt verantwortlich gewesen sein. Beim Enzym Cathepsin K wurden die Verbindungen **148**, **152** und **160** als Inhibitoren identifiziert. Gemeinsamkeiten konnten bei den Serinproteasen Trypsin und Chymotrypsin gefunden werden, die beide von Verbindung **161** gehemmt wurden (*Abbildung 103*).

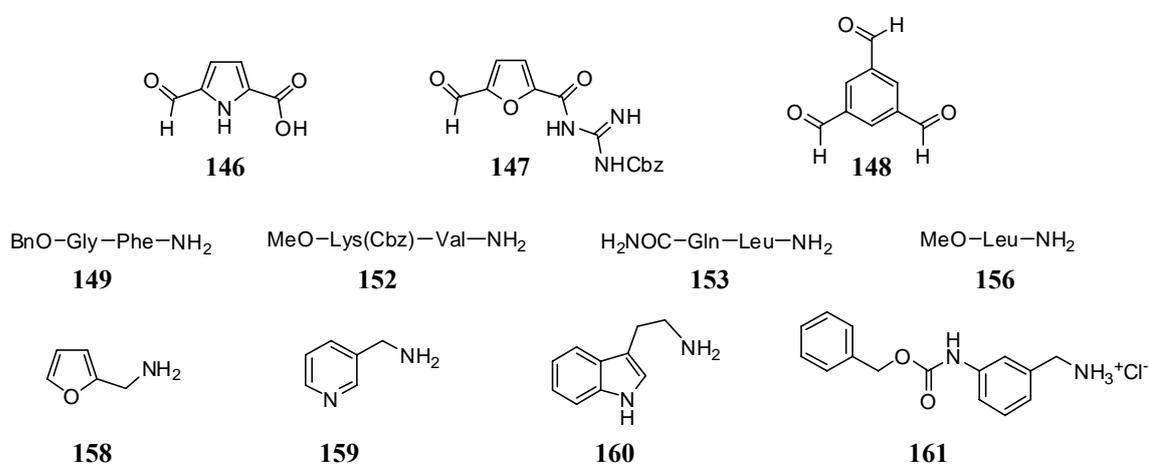


Abbildung 103: Strukturen der Bibliotheksbausteine, die während des Screenings der dynamischen Bibliothek als aktive Komponenten identifiziert werden konnten.

Die Ergebnisse haben gezeigt, dass die Methode nicht auf alle Proteasen übertragbar ist. Durch die längere Inkubationszeit müssen die Enzyme unter den gewählten Bedingungen eine notwendige Stabilität besitzen. Des Weiteren ist es für zukünftige Projekte sinnvoll, sich mit der Auswahl der Bibliotheksbausteine noch enger an Leitstrukturen von potentiellen Inhibitoren zu orientieren. Dadurch wird eine gewisse Voroptimierung der Bibliothek erreicht, welche es ermöglicht, aus vielen guten Inhibitoren mit Hilfe einer dynamischen Methode die besten zu identifizieren. Vermutlich waren in der verwendeten Bibliothek die Strukturvarianz und dadurch auch die Anzahl der in Summe gebildeten Verbindungen zu gering, um qualitativ hochwertige Inhibitoren zu generieren. Dennoch konnten durch das Screening der dynamischen Bibliothek an verschiedenen Proteasen unterschiedliche Hemmeffekte beobachtet werden, die einen ersten Hinweis auf Strukturpräferenzen der einzelnen Enzyme geben. Es konnte gezeigt werden, dass die einzelnen Komponenten auch bei eng verwandten Proteasen nicht die gleichen Hemmeffekte aufwiesen, was ein Hinweis auf bestehende Selektivitäten oder einen abweichenden Hemmmechanismus darstellte. Durch die Verwendung von mehreren

4. Durchführung und Diskussion

artverwandten Proteasen mit ein und derselben dynamischen Bibliothek können demnach Erkenntnisse für eine Optimierung bekannter oder neuer Leitstrukturen erhalten werden.

5. ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK

Ziel dieser Arbeit war es, durch die Anwendung unterschiedlicher Methoden und Strategien, Inhibitoren für verschiedene Cysteinproteasen zu entwickeln. Die Herangehensweise an die Problemstellungen erfolgte durch die Anwendung von geeigneten Synthesetechniken, Screeningbedingungen und Analysemethoden. Untergliedert wurde die Arbeit in drei Abschnitte, die sich jeweils mit einer gezielten Fragestellung beschäftigten. Im ersten Teil bildete die definierte Strukturoptimierung einer literaturbekannten Inhibitor-Klasse für Falcipain-2 (*P. falciparum*) sowie Rhodesain (*T. b. rhodesiense*) den zentralen Aspekt. Durch die Veränderung der Inhibitorstrukturen wurde versucht, die Hemmeigenschaften der Verbindungen zu optimieren und neue Erkenntnisse über Struktur-Wirkungs-Beziehungen zu erlangen. Im zweiten Teil stand die Entwicklung einer Screeningmethode im Vordergrund, welche es in Zukunft erlauben soll, die Hauptprotease des HCoV 229E mit Hilfe von harzgebundenen Verbindungen in einem „on bead“ Screening zu untersuchen. Ziel des dritten Projekts war die Identifizierung von Inhibitorstrukturen mit Hilfe einer dynamischen kombinatorischen Bibliothek. Für diese Aufgabe wurde eine Screeningmethode entwickelt, d.h. geeignete Bedingungen ermittelt unter denen ausgewählte Enzyme getestet werden konnten. Des Weiteren wurde die dynamische Bibliothek von Grund auf mit allen zu berücksichtigenden Eigenschaften entworfen.

Die Vorgehensweise und die Resultate dieser drei Projekte sind in den folgenden Abschnitten zusammengefasst.

5.1 ERGEBNISSE DER STRUKTUROPTIMIERUNG VON CYSTEINPROTEASEINHIBITOREN FÜR DIE PROTEASEN RHODESAIN UND FALCIPAIN-2

Bei einer Strukturoptimierung von Enzyminhibitoren geht man von bereits bekannten Verbindungen aus, die dann durch eine gezielte Modifikation in ihrer Struktur verändert werden. Dadurch sollen neue Erkenntnisse über den Zusammenhang zwischen der Wirkung auf das Enzym und der Struktur des Inhibitors erhalten werden und im Idealfall die Hemmeigenschaften der ursprünglichen Verbindungen verbessert werden.

Im ersten Teil dieser Arbeit war geplant, die in einem früheren Projekt entdeckten Cysteinproteaseinhibitoren^{108,109} in ihren Hemmeigenschaften noch zu verbessern und Informationen über den Zusammenhang zwischen der Wirkung sowohl am Erreger als auch an den isolierten Zielenzymen und der Struktur der Inhibitoren zu erhalten. Bei den zu optimierenden Strukturen handelte es sich um Verbindungen, die ein Pyrrol- bzw. Furangrundgerüst beinhalten, das auf der einen Seite mit einem Cbz-geschützten Guanidin substituiert ist (*Abbildung 104*). Auf der anderen Seite des heteroaromatischen Rings waren in einer ersten Generation unterschiedliche Anilinderivate angebracht worden. Für diese Verbindungsklasse waren *P. falciparum* (Malaria) und das zugehörige Enzym Falcipain-2, sowie *T. b. brucei* (Nagana) und das aus *T. b. rhodesiense* (Afrikanische Trypanosomiasis) stammende Enzym Rhodesain als biologische Angriffspunkte identifiziert worden.

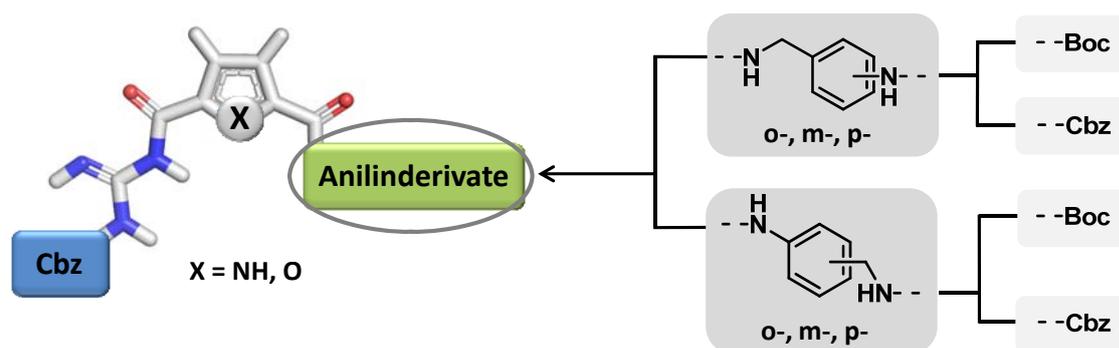


Abbildung 104: Schematische Darstellung der Cysteinproteaseinhibitoren. Die Leitstruktur besteht aus einem Furan- oder Pyrrolring, der mit N-geschütztem Guanidin und Anilinderivaten funktionalisiert ist.

Für die Modifikation der bekannten Kernstruktur wurden dazu, wie in *Abbildung 105* (A) gezeigt, sowohl heteroaromatische als auch aromatische Systeme entworfen und synthetisiert (**60–68**). Insbesondere durch den Einsatz von Stickstoff-Heteroaromaten

sollte die Möglichkeit erhöht werden, Wasserstoffbrücken und Salzbrücken zu bilden, die den Inhibitor im aktiven Zentrum fixieren. Gleichzeitig wurde dadurch die Löslichkeit in polaren Medien erhöht, was sowohl bei den Enzymassays als auch bei zukünftigen *in vitro* und *in vivo* Experimenten von Vorteil ist. An Rhodesain ist in *Abbildung 105* (B) schematisch gezeigt, dass hier die Bindungstaschen S1, S3 und S1' durch die lineare Struktur der Inhibitoren erster Generation nicht besetzt werden können. Durch die Anbringung von flexiblen Strukturelementen wurde versucht, die bisher freien Bindungstaschen mit Hilfe einer neuen räumlichen Ausrichtung zu adressieren, um die Bindungsaffinität zu steigern.

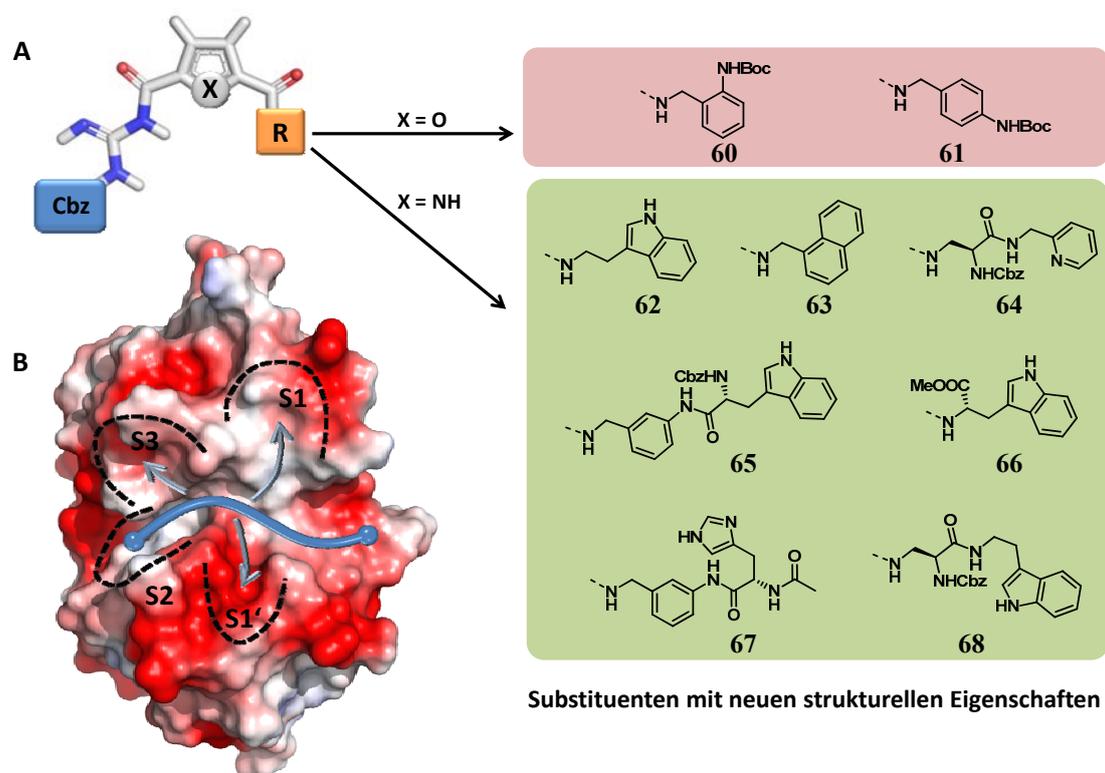


Abbildung 105: Durch Variation der Anilinsseite sollen sowohl die Struktur als auch die Polarität verändert werden, um so zu Verbindungen mit neuen strukturellen Eigenschaften und damit auch modifizierten Hemmeigenschaften zu gelangen.

Die hergestellten Verbindungen wurden an den Erregern der Malaria (*P. falciparum*) und der Nagana (*T. b. brucei*) sowie an den isolierten Enzymen Falciapin-2 (aus *P. falciparum*) und Rhodesain (aus *T. b. rhodesiense*) auf ihre Hemmeigenschaften getestet. In *Tabelle 20* ist eine Übersicht der erhaltenen Ergebnisse aufgeführt.

Die Untersuchung der neuen Inhibitorgeneration an den Erregern lieferte sehr gute Ergebnisse, da alle der synthetisierten Strukturen Wirkung zeigten. Verbindung **61** und **68** wiesen dabei die besten Werte auf (IC_{50} (**61**): 3.26 μ M (*T. b. b.*), 7.30 μ M (*P. f.*);

IC₅₀ (**68**): 3.53 μ M (*T. b. b.*), 7.64 μ M (*P. f.*). Beide Inhibitoren zeichnen sich zudem durch ihre geringe Zytotoxizität (>100 μ M) aus.

Die Inhibitoren **63**, **65** und **68** wiesen beim Test an den isolierten Enzymen die besten Hemmwerte auf (K_i -Werte Falcipain-2: 0.85 μ M (**63**), 0.73 μ M (**65**), 0.57 μ M (**68**); K_i -Werte Rhodesain: 200 nM (**63**), 90.0 nM (**65**), 110 nM (**68**)). Durch die Berechnung der Inhibitoren am Enzym konnte die Passgenauigkeit in Bezug auf die Größe der Strukturen untersucht werden. Eine Korrelation zwischen berechneten und experimentellen Hemmeigenschaften konnte jedoch nur bedingt festgestellt werden.

Tabelle 20: Hemmwirkung der Inhibitoren zweiter Generation (**60–68**) an den Erregern und den isolierten Enzymen sowie die Daten der Zytotoxizitätstests. Farblich gekennzeichnet sind die aktivsten Vertreter an den Erregern und den Enzymen.

Erreger		Zytotoxizität	Enzyme		
Nr.	<i>T. b. brucei</i> ^a	<i>P. falciparum</i> ^b	Makrophagen J774.1 ^c	Rhodesain	Falcipain-2
	IC ₅₀ (μ M)	IC ₅₀ (μ M)	IC ₅₀ (μ M)	K_i (nM)	K_i (μ M)
60	3.21 \pm 0.29	24.4 \pm 2.90	>91.2	470	3.92
61	3.26 \pm 0.42	7.30 \pm 2.78	>100	460	2.71
62	8.49 \pm 1.71	9.41 \pm 1.72	42.5	530	2.47
63	3.31 \pm 0.55	27.9 \pm 5.59	37.1	200	0.85
64	3.44 \pm 0.52	11.4 \pm 3.44	>100	910	- ^d
65	4.25 \pm 0.45	17.6 \pm 4.19	>100	90.0	0.73
66	7.59 \pm 1.22	7.07 \pm 1.98	73.3	540	2.11
67	>40	13.2 \pm 1.42	>100	k. E.	- ^e
68	3.53 \pm 0.82	7.64 \pm 2.08	>100	110	0.57

[a] IC₅₀ nach 48 h, [b] Erregerstamm FCBR; [c] Säugetier-Makrophagenstamm J774.1; [d] 29 % Hemmung bei 20.0 μ M; [e] 7 % Hemmung bei 20.0 μ M; - = nicht bestimmt; k. E. = kein Effekt.

Die Inhibitoren der zweiten Generation haben durch ihre strukturelle Varianz erneute Erkenntnisse über die Struktur-Wirkungs-Beziehung in Bezug auf die Cysteinproteasen Falcipain-2 und Rhodesain geliefert. So konnten die bereits in vorangegangenen Projekten postulierten Tendenzen bestätigt werden (1. Unpolare und ungeladene Strukturelemente haben bessere Hemmeigenschaften als Polare und Geladene; 2. Der geschützte Guanidinrest ist essentiell für eine effektive Inhibierung der Cysteinproteasen; 3. Furan und Pyrrol als Kernfragment begünstigen den Hemmeffekt). Insgesamt ergab sich zwar keine entscheidende Verbesserung der Hemmaktivität gegenüber den Strukturen der ersten Generation, dennoch sind die K_i -Werte an beiden Enzymen ebenfalls in der Größenordnung der vorangegangenen Inhibitoren. Auch die Wirkung an den Erregern liegt im mikromolaren Bereich der ersten Generation. Zudem konnte gezeigt werden, dass der Einsatz von heteroaromatischen Elementen einen positiven Effekt auf

die Löslichkeit in polaren Lösungsmitteln ausübt, ohne die Hemmwirkung drastisch zu mindern.

In einem weiterführenden Projekt soll nun untersucht werden, in wie weit sich Kombinationen von verschiedenen Aminosäuren als Substituenten des Furan- bzw. Pyrrolrings eignen. Durch Berechnung von Leitmotiven und anschließender kombinatorischer Festphasensynthese soll hier eine Optimierung der Verbindungen erreicht werden.¹²⁹ Ausgangspunkt war hier Verbindung **66**, wobei das Pyrrolgrundgerüst durch ein Furan ersetzt wurde. Diese Struktur sollte nun zusätzlich zum Tryptophanrest um eine Aminosäure auf kombinatorische Weise erweitert und die Hemmeigenschaften an Rhodesain getestet werden. Ein Schema der so konstruierten Verbindungen und die berechnete Struktur eines dieser Vertreter (**96**) sind in *Abbildung 106* dargestellt.

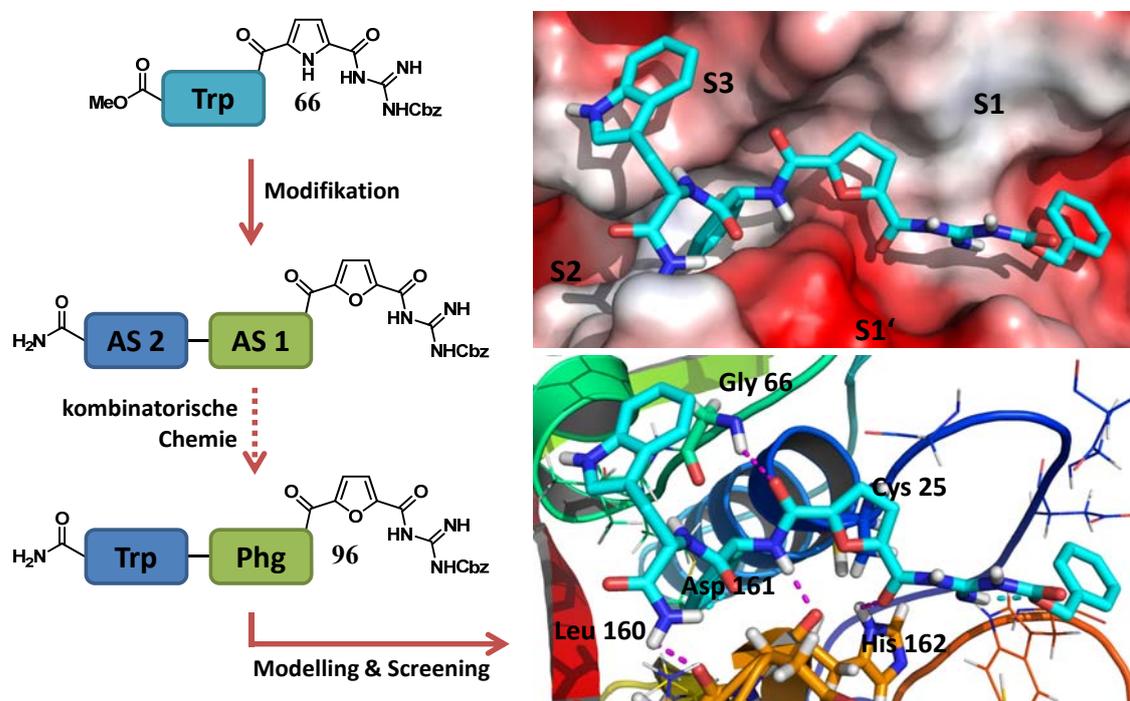


Abbildung 106: Links: Modifikation der Struktur **66** durch kombinatorische Festphasensynthese zu neuen Inhibitorstrukturen mit einem Dipeptidfragment und Furan als Kernbaustein. Rechts: Darstellung einer berechneten Struktur des Dipeptid-Furan-Inhibitors **96** mit der Sequenz Tryptophan-Phenylglycin (Trp-Phg) als Beispiel für die neuen Strukturen.

Wie beschrieben kann nun in zukünftigen Projekten auf die Ergebnisse dieser Arbeit zurückgegriffen werden, um weitere Strukturoptimierungen zu untersuchen. Die hier erzielten Resultate tragen dazu bei, gezielte Elemente und Funktionalitäten der bereits bekannten Inhibitorstrukturen dieser Stoffklasse zu variieren und ergebnisorientiert einzusetzen.

5.2 DIE ERFOLGREICHE ENTWICKLUNG EINER SCREENINGMETHODE VON HARZGEBUNDENEN INHIBITOREN FÜR DIE HCoV 229E M^{PRO}

Ein effizienter Ansatz bei der Durchführung von Enzymscreenings ist die Analyse der Inhibitorstrukturen „on bead“, also noch am Harz gebunden. Durch eine kombinatorische Festphasenpeptidsynthese können große Substanzbibliotheken unterschiedlicher Verbindungen in vergleichsweise kurzem Zeitrahmen hergestellt werden. Ein Ziel dieser Arbeit war es, durch die Wahl geeigneter Assaybedingungen und harzgebundener Verbindungen eine Screeningmethode an der viralen Cysteinprotease HCoV 229E M^{Pro} zu entwickeln. Das Zielenzym stellt einen vielversprechenden Angriffspunkt für die Entwicklung von Inhibitoren dar. Durch die enge strukturelle und evolutionäre Verwandtschaft mit der Hauptprotease des SARS CoV können die Ergebnisse auch für die Entwicklung von Inhibitoren an dieser Protease genutzt werden. Dafür ist die Erforschung von Leitstrukturen notwendig, um geeignete Strukturen zu ermitteln, die Hemmeigenschaften an der Protease aufweisen. Der Vorteil bei der M^{Pro} des humanen Vertreters (HCoV 229E) ist die gute Stabilität unter Laborbedingungen. Des Weiteren eignet sich das Enzym für Enzymassays, da es effizient in Zellkulturen gezüchtet werden kann und bei der Lagerung und im Experiment über längere Zeit stabil bleibt.

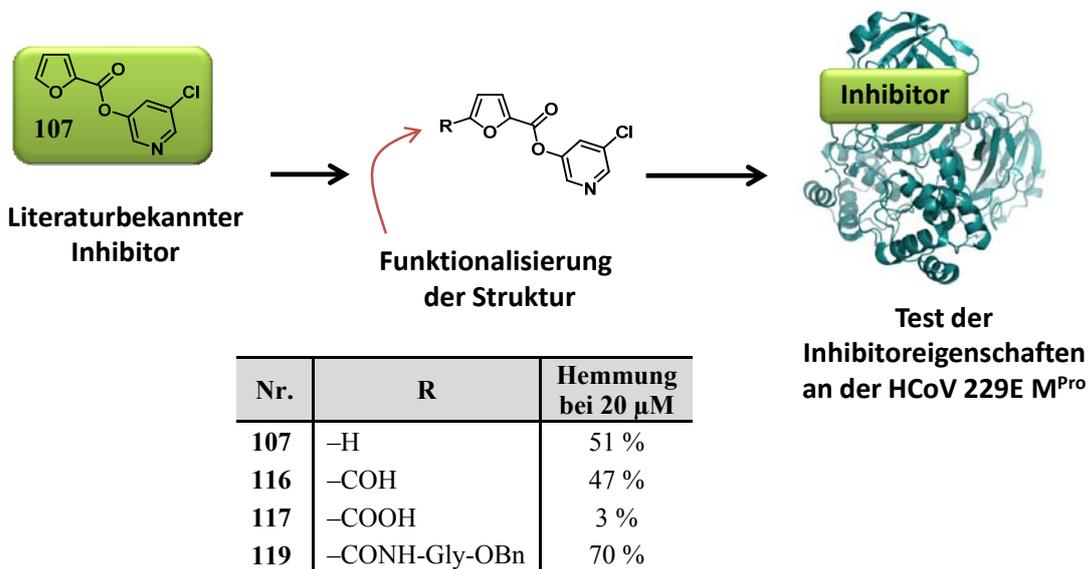


Abbildung 107: Der literaturbekannte Inhibitor **107** wurde an Position 4 des Furanrings modifiziert und an der Protease HCoV 229E M^{Pro} getestet. Es konnte festgestellt werden, dass eine Substitution an dieser Stelle eine Hemmung der Protease weiterhin zulässt.

Für die Entwicklung eines „on bead“ Screenings wurde zunächst ein Testinhibitor (**107**) aus der Literatur gewählt (*Abbildung 107*), der an der HCoV 229E M^{Pro} erfolgreich auf

Hemmaktivität getestet werden konnte. Durch die Synthese von vier funktionalisierten Vertretern dieses Strukturtyps (**116**, **117** und **119**) und einem anschließenden Screening an der Protease konnte gezeigt werden, dass eine Substitution am C4 des Furanrings keinen negativen Einfluss auf den Hemmeffekt hat. Für die Darstellung von harzgebundenen Vertretern dieser Inhibitorklasse wurden ausgehend von Verbindung **117** drei Prototypen (**124–126**) mit verschiedenen Linkern zwischen Harz und Inhibitor erfolgreich synthetisiert (*Abbildung 108*). Während **124** mit einem Alkyllinker versehen wurde, besaßen **125** und **126** Ethylenglycollinker unterschiedlicher Länge.

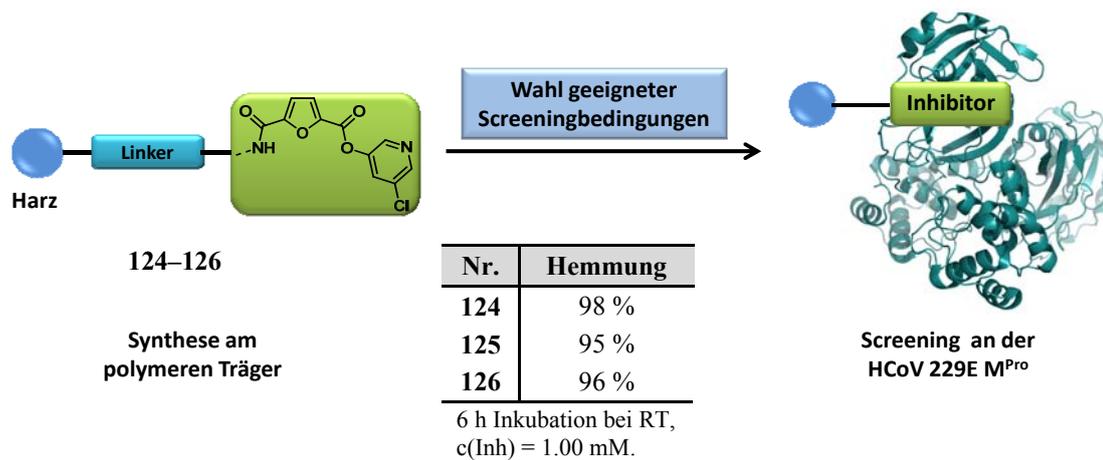


Abbildung 108: Mit den festphasengebundenen Inhibitoren **124–126** konnten in mehreren Testreihen die idealen Screeningbedingungen gefunden werden und die Protease erfolgreich gehemmt werden.

Die anfänglichen Probleme während des darauffolgenden Assays mit den festphasengebundenen Inhibitoren durch die Verwendung des Fusionsproteins aus einem Maltose-Binding-Protein und der HCoV 229E M^{Pro} (MBP-M^{Pro}) konnten durch die Abspaltung des MBP behoben werden. Durch Testreihen mit unterschiedlichen Inkubationszeiten und Temperaturen wurden die Idealbedingungen ermittelt, bei denen der Assay durchgeführt werden kann. Während dieser Testscreenings wurde herausgefunden, dass die Protease mit einer Stabilität bei RT von mehr als 22 h für ein Screening „on bead“ geeignet ist (*Abbildung 108*).

Es konnte ebenfalls gezeigt werden, dass die hergestellten Inhibitorstrukturen als positiv-Kontrolle in zukünftigen „on bead“ Screenings an der HCoV 229E M^{Pro} verwendet werden können. Um dies in einem kleinen Pilot-Projekt zu untersuchen wurden drei Tripeptide (**128–130**) synthetisiert. Die Tripeptide zeigten keinen Hemmeffekt an der HCoV 229E M^{Pro}, jedoch wurden die Inhibitorstrukturen nach der Reaktion mit dem Enzym weiter untersucht. Mit Hilfe des *Edman*-Abbaus war es möglich herauszufinden, ob eine Reaktion mit der Protease stattfand. Durch eine Analyse mittels Massenspektrometrie konnte eine Spaltung von Verbindung **129** durch das Enzym beobachtet werden. Dies lässt darauf schließen, dass die Sequenz von **129**

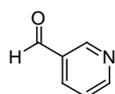
Substrateigenschaften besitzt. Eine Wechselwirkung mit Verbindung **128** war durch die Analyse nicht zu beobachten. Bei Verbindung **130** konnte eine Reaktion mit der Protease nicht eindeutig belegt werden. Die Ergebnisse der massenspektrometrischen Untersuchung lieferten keine eindeutigen Resultate.

Mit diesem Projekt konnte der Grundstein für die Entwicklung und das Screening einer festphasengebundenen Bibliothek an der HCoV 229E M^{Pro} gelegt werden. Durch die erfolgreiche Synthese von drei Testinhibitoren und der anschließenden Ausarbeitung geeigneter Screeningbedingungen kann die Methode nun als Standard verwendet werden. Zudem kann aufgrund der Homologie der beiden Proteasen HCoV 229E M^{Pro} und der SARS CoV M^{Pro} angenommen werden, dass die besten Vertreter einer zukünftigen „on bead“ Bibliothek für die HCoV 229E M^{Pro} auch an der SARS CoV M^{Pro} Wirkung zeigen werden. Diesen Sachverhalt kann man sich dann für die Optimierung der gefundenen Inhibitorstrukturen zu Nutze machen. Auf diese Weise ist es möglich, eine Leitstruktur zu entwickeln, die als Grundlage für die Synthese von Wirkstoffen gegen den SARS-Erreger dienen kann.

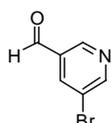
5.3 DESIGN EINER DYNAMISCHEN BIBLIOTHEK FÜR DIE UNTERSUCHUNG VON CYSTEINPROTEASEN

Die dynamische kombinatorische Chemie wurde im dritten Teil der Arbeit als Methode für die Identifizierung von Enzyminhibitoren genutzt. Verschiedene Bausteine wurden dazu durch eine reversible Reaktion ins Gleichgewicht gebracht und durch die Zugabe eines Templats – im vorliegenden Fall vorwiegend Cysteinproteasen – die Bildung von thermodynamisch begünstigten Verbindungen verstärkt. Auf diese Weise lassen sich potentielle Inhibitorstrukturen finden. Die zentrale Herausforderung in diesem Projekt bestand sowohl in der Auswahl der Bibliothekszusammensetzung, der Synthese der Komponenten, als auch der Durchführung und Anpassung der Screeningmethode an die Assaybedingungen.

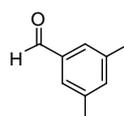
Aldehyde



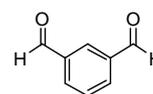
141



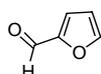
142



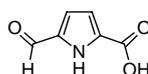
143



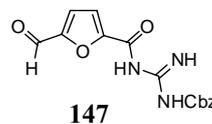
144



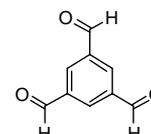
145



146

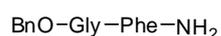


147



148

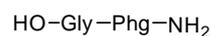
Amine



149



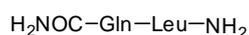
150



151



152



153



154



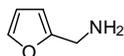
155



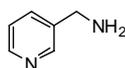
156



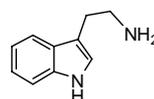
157



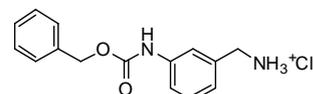
158



159



160



161

Abbildung 109: Auswahl der Bausteine, aus denen die dynamische Bibliothek zusammengesetzt ist. Es wurden acht Aldehyde, darunter sechs Mono-, ein Di- und ein Trialdehyd eingesetzt. Die 13 Amine besitzen jeweils ein freies Amin und haben eine peptidische oder (hetero-)aromatische Struktur unterschiedlicher Größe und Polarität.

Zu Beginn wurde eine Auswahl an Enzymen getroffen, die eine evolutionäre Verwandtschaft aufwiesen. Es wurden die papainähnlichen Cysteinproteasen Cathepsin B, K und L sowie Rhodospain und Falcipain-2, die chymotrypsinähnliche Cysteinprotease HCoV 229E M^{Pro} und die Serinproteasen Trypsin und Chymotrypsin ausgewählt. Dadurch ergab sich die Möglichkeit, die Ergebnisse zwischen strukturell ähnlichen Proteasen zu vergleichen. Als reversible Reaktion wurde die Iminbildung aus Aminen und Aldehyden gewählt. Aufgrund von positiv verlaufenen Vorversuchen unter Screeningbedingungen wurde sie als geeignet erachtet, da sie mit den im Assay vorliegenden Parametern (pH-Wert, Löslichkeitsverhalten im wässrigen Medium, Temperatur, etc.) am besten vereinbar war.

Für die Herstellung der dynamischen Bibliothek wurden anhand von Literaturdaten und Erfahrungen aus früheren Projekten^{108,109} Verbindungen mit unterschiedlichen Strukturen und Funktionalitäten ausgewählt (*Abbildung 109*). Dabei wurden vornehmlich kleine Molekülstrukturen ($M < 500$ g/mol) eingesetzt, um die Variation der Bausteine in einem definierten Rahmen von Molekülgrößen zu halten. Unter diesen Kriterien fiel die Wahl auf acht Aldehyde (**141–148**) und 13 Amine (**149–161**). Die Verbindungen wurden dann unter Berücksichtigung der benötigten funktionellen Gruppen in Bezug auf die reversible Reaktion synthetisiert. Aus der vorhandenen Anzahl an Funktionalitäten ergaben sich für die Bibliothek 624 Kombinationsmöglichkeiten von potentiellen Inhibitorstrukturen. Damit besaß sie eine handhabbare Größe und zugleich eine genügende Diversität für die Durchführung der Screenings.

Es gelang, die Screeningbedingungen für jede der ausgewählten Proteasen durch die Wahl eines geeigneten Puffersystems und den pH-Wert für das Screening der dynamischen Bibliothek entsprechend anzupassen. Für die Identifizierung der aktiven Spezies innerhalb der dynamischen Bibliothek wurde das Prinzip der Dekonvolution angewendet. In Bezug auf die Größe der Bibliothek war diese Methode gut durchführbar.



Abbildung 110: Vorgehensweise beim Screening einer dynamischen Bibliothek in fünf Schritten.

Die Vorgehensweise, welche in fünf Abschnitte unterteilt werden kann (siehe *Abbildung 110*), hat sich als sinnvolle und effiziente Strategie erwiesen. Es konnte nach jedem abgeschlossenen Screening individuell auf die Ergebnisse an der jeweiligen Protease reagiert werden und so aktive Spezies durch die schrittweise Untersuchung der Einzelkomponenten und der Gesamtbibliothek identifiziert werden. Die Synthese aller möglichen 624 Kombinationsmöglichkeiten wäre nicht zu leisten gewesen, zumal die Strukturen nicht mit der klassischen kombinatorischen Chemie (z.B. split and mix) zugänglich sind. Die Ergebnisse der Screeningreihe sind in *Tabelle 21* zusammengefasst. Es wurde herausgefunden, dass sich die Proteasen Cathepsin B, K und L sowie Rhodesain und Falcipain-2 trotz ihrer evolutionär gleichen Abstammung (Clan PA, C1) durch selektives Verhalten bezogen auf die aktivsten Verbindungen unterschieden. Cathepsin L zeigte bei Verbindung **149** den größten Aktivitätsverlust, während für Cathepsin B eine Kombination aus dem Aldehyd **146** und den Aminen **156**, **159** und **160** als möglicher Inhibitor fungiert haben könnte. Das Aldehyd **146** spielte bei der verwandten Protease Rhodesain in Kombination mit den Aminen **153** und **158** eine Rolle. Zusätzlich könnte in diesem Fall auch noch das Aldehyd **147** für einen Hemmeffekt verantwortlich gewesen sein. Beim Enzym Cathepsin K wurden die Verbindungen **148**, **152** und **160** als Inhibitoren identifiziert. Gemeinsamkeiten konnten bei den Serinproteasen Trypsin und Chymotrypsin gefunden werden, die beide von Verbindung **161** gehemmt wurden.

Tabelle 21: Zusammenfassung der Ergebnisse aus dem Screening der Einzelkomponenten, der Gesamtbibliothek und dem Dekonvolutionsscreening.

Protease	Hemmung beste Einzelkomponente (C _{final} = 100 µM)		Hemmung Gesamtbibliothek	Dekonvolutionsbibliothek	
	Verb.	Hemmung		Hemmung	Aldehyd
Cathepsin B	152	9 %	36 %	146	156, 159, 160
Cathepsin L	149	83 %	64 %	-	149
Cathepsin K	148	38 %	54 %	148	152, 160
Rhodesain	160	23 %	50 %	146, 147	153, 158
Falcipain-2	149	36 %	25 %	-	-
HCoV 229E M^{Pro}	147	52 %	29 %	147	-
Chymotrypsin	161	35 %	34 %	-	161
Trypsin	161	55 %	63 %	-	161

- : Verbindungen zeigten keinen Hemmeffekt oder waren nicht eindeutig zuzuordnen. Grün hinterlegte Spalten: Sowohl Aldehyde als auch Amine konnten als aktive Komponenten identifiziert werden. Rote Spalten: Nur eine Komponenten war für die Hemmung der Protease verantwortlich.

Durch das Screening der dynamischen Bibliothek an verschiedenen Proteasen konnten unterschiedliche Hemmeffekte beobachtet werden, die einen ersten Hinweis auf Strukturpräferenzen der einzelnen Enzyme gaben. Es konnte gezeigt werden, dass die einzelnen Komponenten auch bei eng verwandten Proteasen nicht die gleichen

Hemmeffekte aufwies, was ein Anzeichen auf bestehende Selektivitäten oder einen abweichenden Hemmmechanismus darstellte. In einigen Fällen konnten die ermittelten Verbindungen im Vergleich zu bereits bekannten Inhibitoren strukturelle Ähnlichkeiten aufweisen, was für eine zielorientierte Anwendbarkeit dieser Methode spricht.

Das Screening an mehreren artverwandten Proteasen mit einer dynamischen Bibliothek, die aus strukturell verschiedenen Bausteinen besteht, kann genutzt werden, um Erkenntnisse für eine Weiterentwicklung von Inhibitoren zu erhalten. Die in diesem Projekt ermittelten Strukturen, sowohl von aktiven Einzelkomponenten, als auch von Kombinationen verschiedener Aldehyde und Amine, konnten in ersten Kraftfeldrechnungen ihr Potential zeigen. Sie können sowohl für die Optimierung bestehender, als auch die Entwicklung neuer Leitstrukturen herangezogen werden.

6. SUMMARY

The aim of this study was to develop Inhibitors for various cysteine proteases with the use of different methods and strategies. The approach includes the application of appropriate synthesis techniques, screening conditions and analytical methods. Subdivided into three sections, each part of the work focused on different questions or tasks. In the first part the central aspect was the defined structure optimization of a class of inhibitors known from literature for falcipain-2 (*P. falciparum*) and rhodesain (*T. b. rhodesiense*). By modifying the structure of the inhibitors it was an attempt to optimize the inhibitory properties of the compounds and to gain new insights into structure-activity relationships. The development of a screening method for the mainprotease of HCoV 229E was in the spotlight of the second part. With this method it should be possible to screen and to analyze compounds during an “on bead” screening. The aim of the third project was the identification of inhibitors with the help of a dynamic combinatorial library. For this task a screening method was generated, which means the determination of appropriate conditions the enzymes could be investigated. Concerning this matter a bottom-up design of a dynamic library with all incorporated properties was necessary.

The proceedings and the results of all three parts are summarized in the following chapters.

6.1 RESULTS OF THE STRUCTURE OPTIMIZATION OF CYSTEINE PROTEASE INHIBITORS FOR THE PROTEASES RHODESAIN AND FALCIPAIN-2

The structure optimization of enzyme inhibitors starts with known compounds, which are then changed by a specific modification in their structure. Thus, new insights into the relationship between the effect on the enzyme and the structure of the inhibitor should be received and, preferably, the inhibitory properties of the original compound are improved.

The plan for the first part of this work was to optimize cysteine protease inhibitors known from a former project and get information about the relationship between the effect at the pathogen respectively at the isolated enzyme and the structure of the inhibitor. The compounds which should be optimized contained a pyrrol or a furan core fragment, which was substituted with a Cbz-protected guanidine on one side (*figure 111*). On the other side of the heteroaromatic ring aniline derivatives were attached to the compound in a first generation of this inhibitor class. As biological targets for this compound class *P. falciparum* (Malaria) and the corresponding enzyme falcipain-2, as well as *T. b. brucei* (Nagana) and the enzyme rhodesain from *T. b. rhodesiense* (African Trypanosomiasis) were identified.

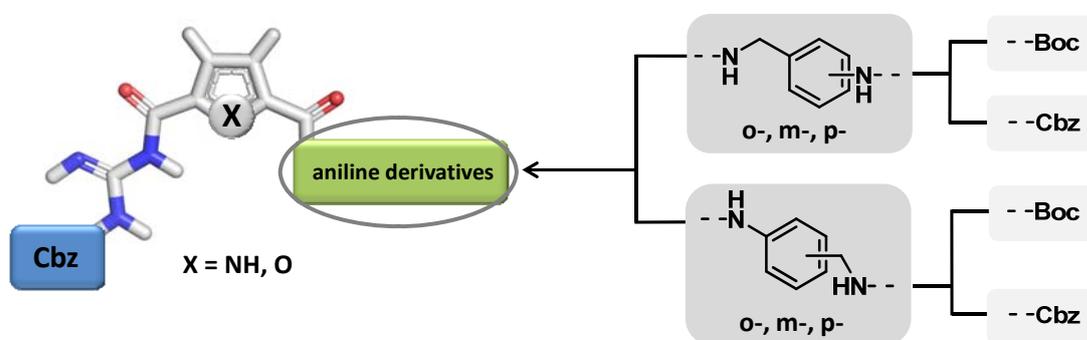


Figure 111: Schematic representation of the cysteine protease inhibitors. The chemical lead consists of a pyrrol or furan core fragment, which is substituted with an *N*-protected guanidine and aniline derivatives.

For the modification of the known core fragment heteroaromatic and aromatic systems were designed and synthesized (see *figure 112 A*, **60–68**). In particular, by using nitrogen heteroaromatics, the possibility should be raised to form hydrogen bonds and salt bridges, which fix the inhibitor in the active site of the enzymes. At the same time the water solubility should be increased in polar media. This would be an advantage for the enzyme assays and for *in vitro* experiments in the future.

For the first generation of inhibitors it is shown in *figure 112* (B) schematically, that the binding pockets S1, S3 and S1' could not be filled with the linear structure of this compounds. It was tried to make the inhibitors more flexible to get the free binding pockets of the enzyme occupied by parts of the structure. With the new orientation the binding affinity should be increased.

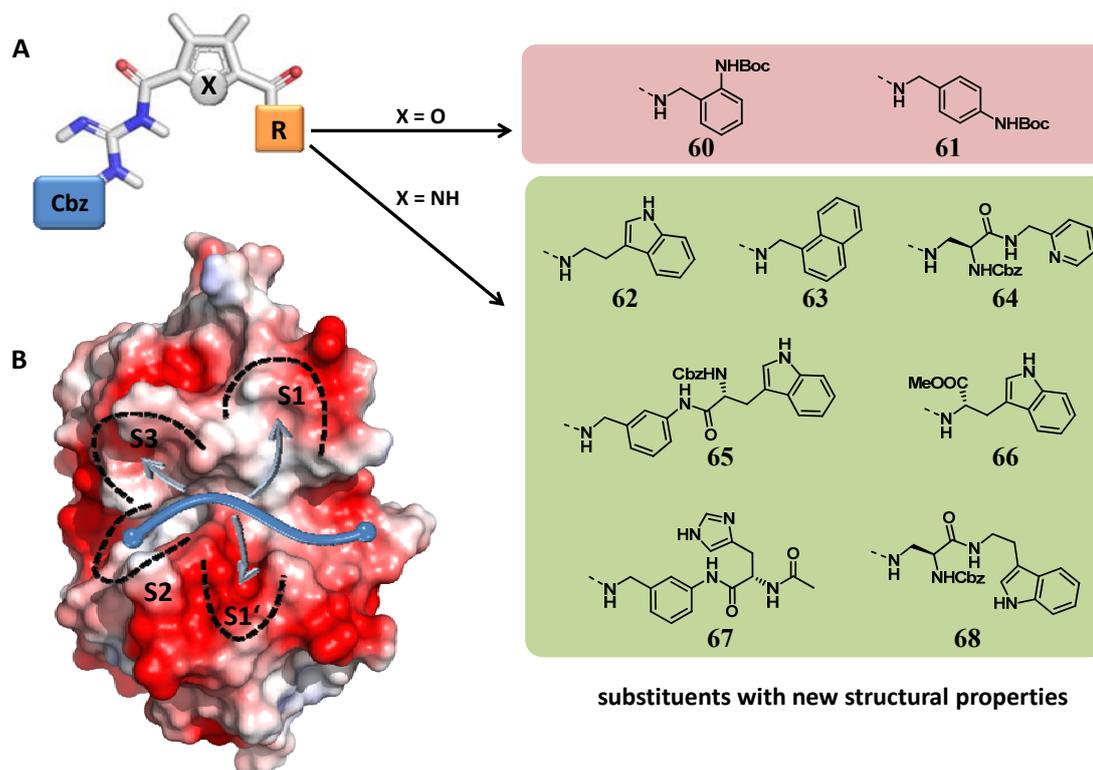


Figure 112: With the variation of the aniline part the structure and the polarity of the molecules have been changed. Thus, new compounds of a second generation with modified structural properties and inhibition qualities should be obtained.

The synthesized compounds were tested at the pathogens of Malaria (*P. falciparum*) and Nagana (*T. b. brucei*), as well as at the isolated enzymes falcipain-2 (from *P. falciparum*) and rhodesain (from *T. b. rhodesiense*). *Table 22* gives an overview of the received results.

The investigation of the new inhibitor-generation leads to excellent results at the pathogens, all synthesized compounds showed remarkable activity. Compound **61** and **68** showed in this case the best values (IC_{50} (**61**): 3.26 μ M (*T. b. b.*), 7.30 μ M (*P. f.*); IC_{50} (**68**): 3.53 μ M (*T. b. b.*), 7.64 μ M (*P. f.*)). Also both inhibitors have additionally a very low cytotoxicity (>100 μ M).

The inhibitors **63**, **65** and **68** showed the best values at the tests with the isolated enzymes (K_i -value falcipain-2: 0.85 μM (**63**), 0.73 μM (**65**), 0.57 μM (**68**); K_i -value rhodesain: 200 nM (**63**), 90.0 nM (**65**), 110 nM (**68**)). With computational calculations the best fit of the inhibitors concerning size and structure could be investigated. But a correlation between calculated and experimental inhibitory effects was found only in some cases.

Table 22: Inhibition of the second generation inhibitors (60–68) at the pathogens and the isolated enzymes, as well as the cytotoxicity results. The most active compounds are marked in green.

no.	pathogen		cytotoxicity	enzymes	
	<i>T. b. brucei</i> ^a	<i>P. falciparum</i> ^b	macrophages J774.1 ^c	rhodesain	falcipain-2
	IC ₅₀ (μM)	IC ₅₀ (μM)	IC ₅₀ (μM)	K_i (nM)	K_i (μM)
60	3.21 \pm 0.29	24.4 \pm 2.90	>91.2	470	3.92
61	3.26 \pm 0.42	7.30 \pm 2.78	>100	460	2.71
62	8.49 \pm 1.71	9.41 \pm 1.72	42.5	530	2.47
63	3.31 \pm 0.55	27.9 \pm 5.59	37.1	200	0.85
64	3.44 \pm 0.52	11.4 \pm 3.44	>100	910	- ^d
65	4.25 \pm 0.45	17.6 \pm 4.19	>100	90.0	0.73
66	7.59 \pm 1.22	7.07 \pm 1.98	73.3	540	2.11
67	>40	13.2 \pm 1.42	>100	k. E.	- ^e
68	3.53 \pm 0.82	7.64 \pm 2.08	>100	110	0.57

[a] IC₅₀ after 48 h, [b] strain FCBR; [c] mammalian macrophage strain J774.1; [d] 29 % inhibition at 20.0 μM ; [e] 7 % inhibition at 20.0 μM ; - = not determined; k. E. = no effect.

Through their structural variation, the second-generation inhibitors have given new insights on the structure-activity relationship with respect to the cysteine proteases falcipain-2 and rhodesain. Already it was possible to confirm postulated trends from previous projects (1. Non-polar and uncharged structural elements have better inhibitory properties than polar and charged ones; 2. The protected guanidine residue is essential for effective inhibition of cysteine proteases; 3. Furan and pyrrole as key fragment favor the inhibitory effect). Overall, no significant improvement of the inhibitory activity in comparison to the structures of the first generation was obtained, but the K_i -values for both enzymes are also in the range of the previous inhibitors. The activity of the compounds is in the micromolar range of the first generation. In addition, it was shown that the use of heteroaromatic elements has a positive effect on the solubility in polar solvents, but does not reduce the inhibitory effect drastically.

In a further project it is now investigated how far different combinations of amino acids are suitable as substituents of the furan and pyrrole. By calculation of a chemical lead and a subsequently combinatorial solid-phase synthesis an optimization of the compounds

should be obtained.¹²⁹ Starting point was compound **66**, wherein the pyrrole fragment was replaced by a furan. This structure should now be extended in a combinatorial manner with an amino acid additional to the tryptophan residue. Then the inhibitory properties are tested on rhodesain. A scheme and the calculated structure of one of these compounds (**96**) are shown in *figure 113*.

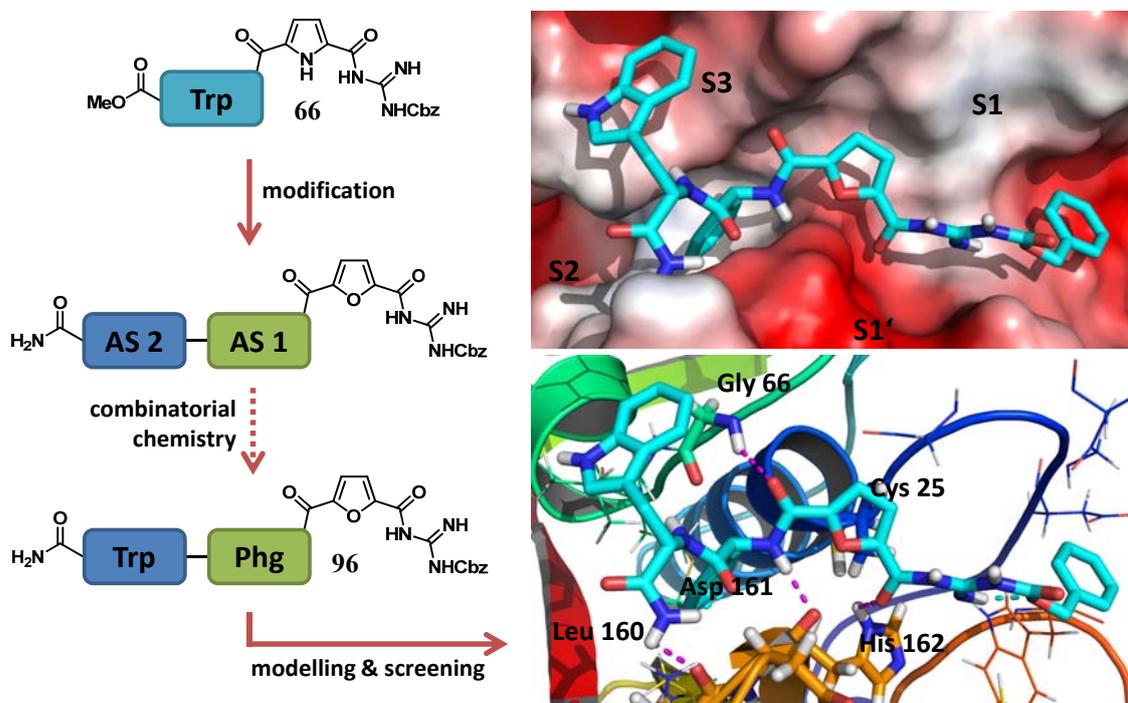


Figure 113: Left: Modification of structure **66** to new inhibitor structures through a combinatorial solid phase peptide synthesis with furan as new core fragment and a dipeptidic building block. Right: Picture of an calculated dipeptid-furan-inhibitor **96** with the sequence of tryptophan-phenylglycine (Trp-Phg) as example for a new structure.

As described, the results of this work can now be used in future projects to investigate further structural optimization to achieve better inhibitors. The broad knowledge obtained here can help to vary the specific elements and functions of the already known inhibitors of this class.

6.2 THE SUCCESSFUL DEVELOPMENT OF AN “ON BEAD” SCREENING METHOD FOR HCoV 229E M^{Pro}

An efficient approach for the performance of enzyme screenings is the analysis of enzyme inhibitor structures "on bead", that means that they are still bound to the resin. With a combinatorial solid-phase peptide synthesis large compound libraries of different structures can be made in a relatively short time frame. One goal of this study was to develop a screening method for the viral cysteine protease HCoV 229E M^{Pro} with the choice of appropriate assay conditions and resin-bound compounds. This enzyme represents a promising target for the design and development of inhibitors. Due to the close structural and evolutionary relationship with the mainprotease of SARS CoV, the results from HCoV 229E M^{Pro} can be used for the SARS protease to create inhibitors. For the exploration of lead structures it is necessary to determine appropriate structures that show inhibitory properties at the protease. The advantage of the M^{Pro} of the human version (HCoV 229E) is the good stability under laboratory conditions. Furthermore, the enzyme is suitable for enzyme assays, because it can be grown efficiently in cell cultures and it is stable for a long time during storage and in the experiment.

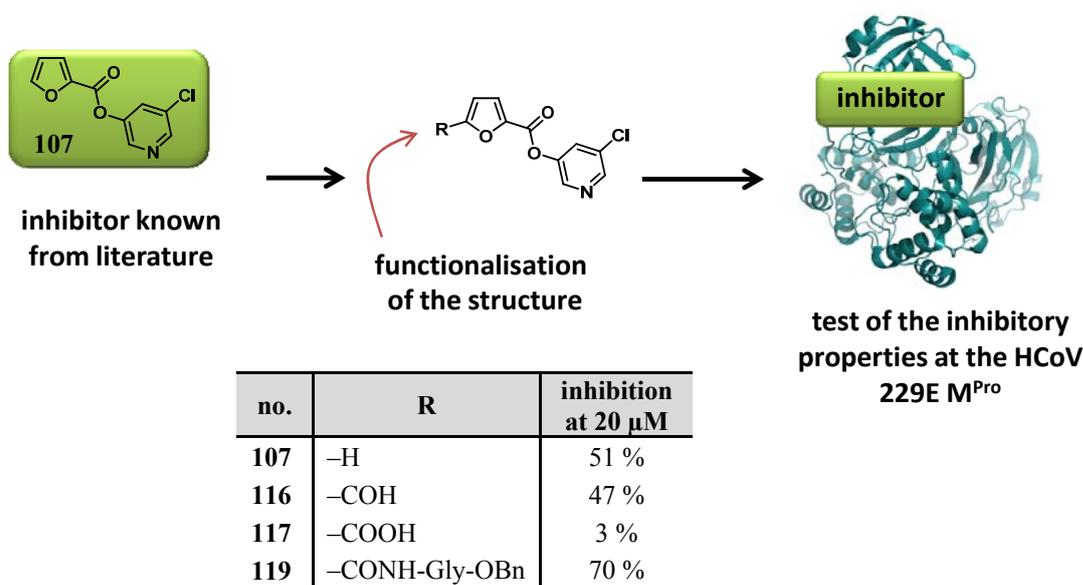
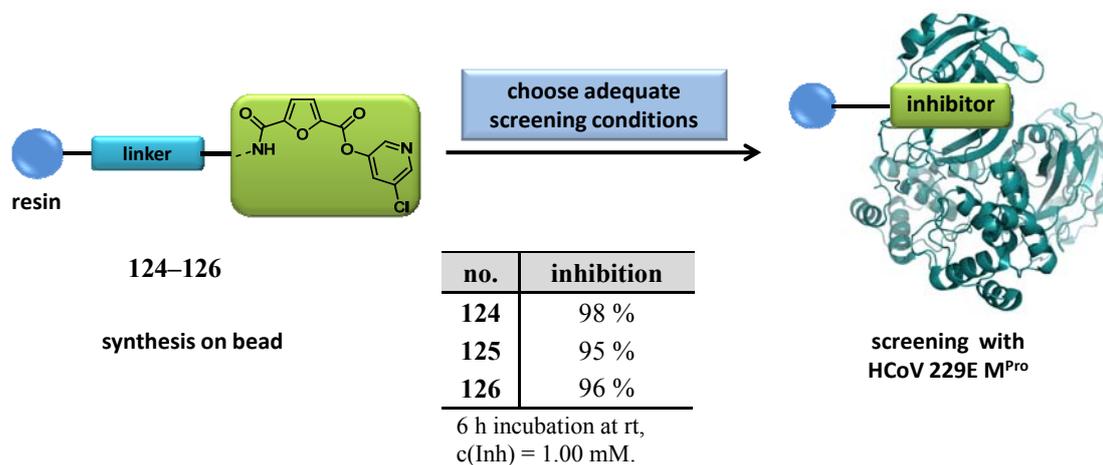


Figure 114: The literature known inhibitor **107** was modified at position 4 of the furan ring and tested at the protease HCoV 229E M^{Pro}. It could be demonstrated, that a substitution at this point did not affect the inhibition of the enzyme.

For the development of a "on bead" screening at first a test inhibitor (**107**), selected from the literature (*figure 114*), could be successfully tested for inhibitory activity at the HCoV 229E M^{Pro}. With the synthesis of four functionalized candidates of this structure type

(**116**, **117** and **119**), followed by a screening with the protease it has been shown that substitution at C4 of the furan ring does not have any negative influence on the inhibitory effect. For the design of resin-bound members of this inhibitor class based on compound **117** three prototypes (**124–126**) were synthesized successfully with different linkers between resin and inhibitor (*figure 115*). While **124** was synthesized with an alkyl linker, **125** and **126** had an ethyleneglycol-linker of different length.



*Figure 115: With the inhibitors **124–126** bound on bead, the ideal screening conditions could be established in several series of tests.*

The initial problems during the subsequent assay with the resin-bound inhibitors by the use of the fusion protein from a maltose-binding protein and HCoV 229E M^{Pro} (MBP-M^{Pro}) could be resolved by cleavage of the MBP. In test series with different incubation times and temperatures, the ideal conditions for the assay performance was determined. During this test screening it has although been found that the protease is suitable for a screening "on bead" with a stability at room temperature of more than 22 h (*figure 115*).

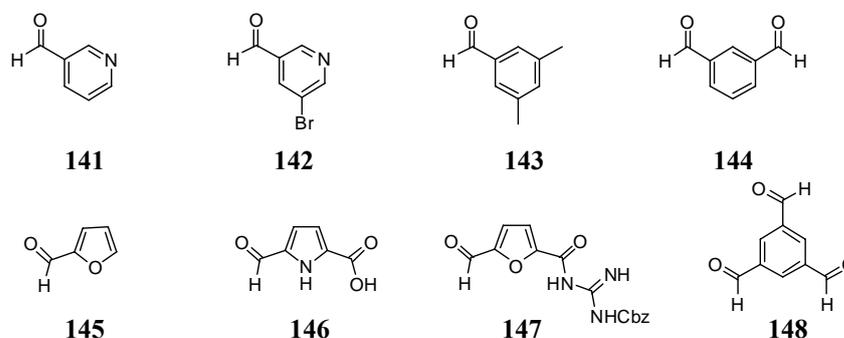
It could also be shown that the produced inhibitor structures can act as positive control in "on bead" screening for the HCoV 229E M^{Pro} in the future. To investigate this in a small pilot project, three tripeptides (**128–130**) were synthesized. The tripeptides showed no inhibitory effect on the HCoV 229E M^{Pro}. However, the inhibitor structures were examined after the reaction with the enzyme. With the help of *Edman* degradation, it was possible to find out whether a reaction took place with the protease. With mass spectrometry a cleavage of compound **129** by the enzyme could be observed. This suggests that the sequence of **129** has substrate characteristics. An interaction with compound **128** was not observed. With compound **130** a reaction with the protease was not clearly established. The results of mass spectrometric analysis gave no definite results for **128** and **130**.

This project represents the cornerstone for the development and screening of a “on bead” library for the HCoV 229E M^{Pro} could be placed. With the successful synthesis of three test inhibitors and the subsequent development of appropriate screening conditions, the method could now be used as a standard. In addition, it can be assumed due to the homology of the two proteases HCoV 229E M^{Pro} and SARS CoV M^{Pro} that the best representatives of an "on bead" library for the HCoV 229E M^{Pro} will also have an effect on the SARS CoV M^{Pro}. These facts can then be used for the optimization of the found inhibitor structures. Thus, it is possible to develop a chemical lead that can serve as a basis for the synthesis of drugs against the SARS virus.

5.3 DESIGN OF A DYNAMIC COMBINATORIAL LIBRARY FOR THE INVESTIGATION OF CYSTEINE PROTEASES

Dynamic combinatorial chemistry has been used in the third part of this work as a method for the identification of enzyme inhibitors. Several molecules were brought to equilibrium by a reversible reaction and the addition of a template, which enhances the formation of thermodynamically favored compounds. In this case mainly cysteine proteases were used. In this way, potential inhibitor structures can be found. The main challenge in this project included the development of the library composition, the synthesis of the components, as well as the implementation and adaptation of the screening method to the assay conditions.

aldehydes



amines

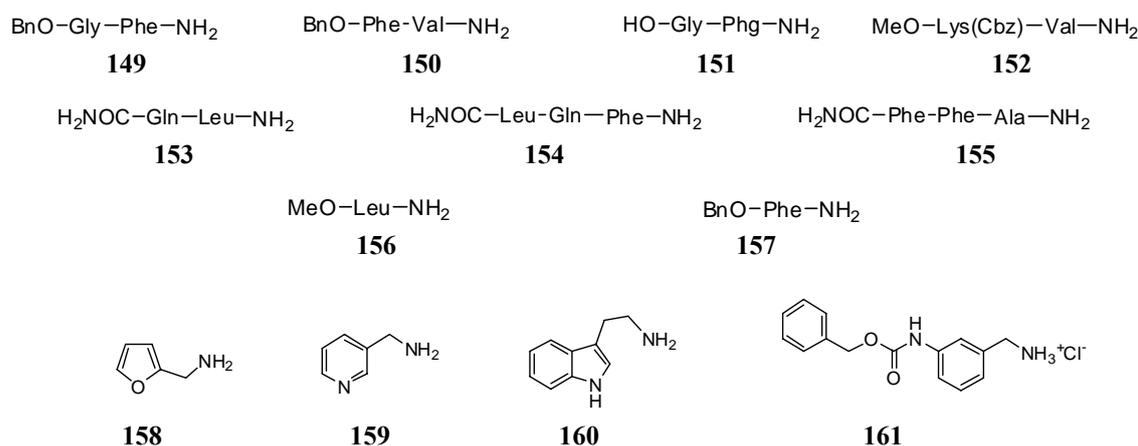


Figure 116: Selection of building blocks from which the dynamic library is build. There were eight aldehydes used, including six mono-, one di- and one trialdehyde. The 13 amines in each case have a free amine and a peptidic or (hetero) aromatic structure of different size and polarity.

Initially, a selection of enzymes was made which showed an evolutionary relationship. The papain-like cysteine proteases cathepsin B, K and L as well as rhodesain and falcipain-2, the chymotrypsin-like cysteine protease HCoV 229E M^{Pro} and the serine proteases trypsin and chymotrypsin were selected. This made it possible to compare the results between structurally similar proteases. As a reversible reaction, the imine formation from aldehydes and amines was chosen. Due to positive pre-tests under screening conditions, the reaction was considered as appropriate, because it was most compatible with the parameters in the assay (pH, solubility in aqueous medium, temperature, etc.).

For the design of the dynamic library compounds with different structures and functions were selected based on literature data and experience from previous projects (*figure 116*).^{108,109} In this case mainly small molecule structures ($M < 500$ g/mol) were used to keep the variation of the building blocks within a defined framework of molecular sizes. Under these criteria, the choice fell on eight aldehydes (**141–148**) and 13 amines (**149–161**). The compounds were then synthesized under consideration of the required functional groups with respect to the reversible reaction. Calculated with the available number of functionalities, the library consists of in total 624 possible combinations of potential inhibitor structures. So it presented a manageable size and also a adequate diversity for the implementation of screenings.

It was possible to adapt the conditions for the screening of the dynamic library for each of the selected proteases by the choice of a suitable buffer system and the pH accordingly. For the identification of the active species within the dynamic library, the principle of deconvolution has been applied. With regard to the size of the library, this method was workable.

The procedure, which can be divided into five sections (*figure 117*), has been proved as a useful strategy. By a step by step investigation of the individual components and the total library active species could be identified. The results of the screening series are summarized in *table 23*. It has been found out, that the proteases cathepsin B, K and L as well as rhodesain and falcipain-2, despite their evolutionary same origin (clan PA, C1) distinguish between the most active compounds by selective behavior. Cathepsin L showed with compound **149** the greatest loss of activity, while it could be possible for cathepsin B that a combination of the aldehyde **146** and the amines **156**, **159** and **160** can act as a potential inhibitor. The aldehyde **146** played also a role in the related protease rhodesain in combination with the amines **153** and **158**. Additionally in this case the aldehyde **147** could also be responsible for an inhibitory effect. For cathepsin K, the compounds **148**, **152** and **160** were identified as inhibitors. Similarities could be found at the serine proteases trypsin and chymotrypsin, both were inhibited by compound **161**.

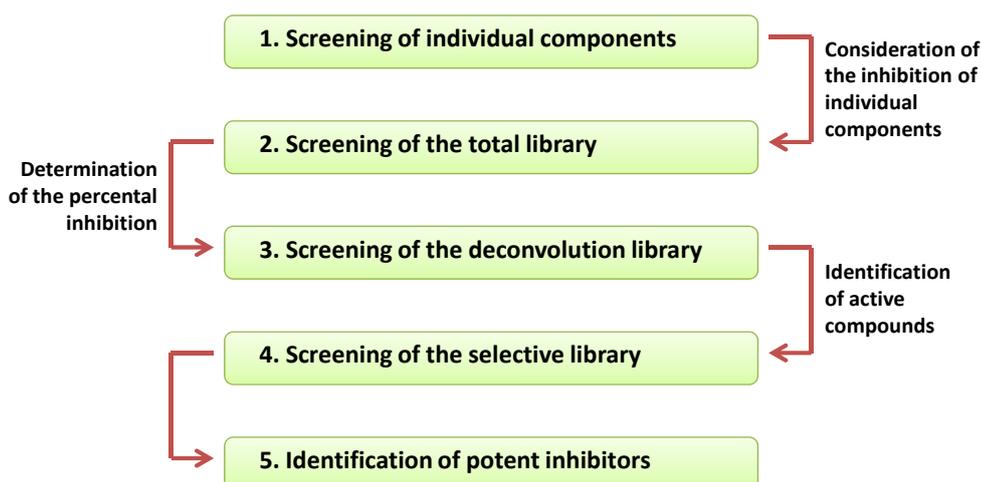


Figure 117: Procedure for screening a dynamic library in five steps.

By screening the dynamic library against various proteases different inhibitory effects could be observed, which gave a first indication of structural preferences of the individual enzymes. It was shown that the individual components did not display the same inhibitory effect also at closely related proteases, which was a sign on a different mechanism of inhibition or existing selectivities. In some cases, the identified compounds showed structural similarities compared to known inhibitors, suggesting a target-oriented applicability of this method.

Table 23: Summary of results from the screening of the individual components, of the total library and the deconvolution library.

protease	inhibition of the best single component ($c_{\text{final}} = 100 \mu\text{M}$)		inhibition of the total library	deconvolution library	
	comp.	inhibition		aldehyde	amine
Cathepsin B	152	9 %	36 %	146	156, 159, 160
Cathepsin L	149	83 %	64 %	-	149
Cathepsin K	148	38 %	54 %	148	152, 160
Rhodesain	160	23 %	50 %	146, 147	153, 158
Falcpain-2	149	36 %	25 %	-	-
HCoV 229E M^{Pro}	147	52 %	29 %	147	-
Chymotrypsin	161	35 %	34 %	-	161
Trypsin	161	55 %	63 %	-	161

- : Compounds showed no inhibitory effect or were not clearly distinguished. Highlighted in green columns: aldehydes and amines were identified as active components. Red column: Only one compound was responsible for the inhibition of the protease.

6. Summary

The screening of several similar types of proteases with a dynamic library, which consists of structurally different building blocks, can be used to obtain insights for further development of inhibitors. The structures determined in this project, active components, as well as various combinations of aldehydes and amines, were able to show their potential in force field calculations. They can be used for the optimization of existing, as well as the development of new lead compounds.

7. EXPERIMENTELLER TEIL

7.1 ALLGEMEINE EXPERIMENTELLE ANGABEN

Lösungsmittel und Reagenzien

Alle verwendeten Lösungsmittel wurden destilliert. Wasserfreie Lösungsmittel wurden wie folgt erhalten: THF und Et₂O wurden mit Natrium und Benzophenon als Indikator unter Rückfluss erhitzt und anschließend destilliert. DCM, NMM und Et₃N wurden mit CaCl₂ unter Rückfluss erhitzt und anschließend destilliert. DMF wurde mit CaH₂ unter vermindertem Druck zum Sieden erhitzt, wobei etwa 20 Volumenprozent als Vorfraktion verworfen wurden. MeOH wurde mit Magnesiumspänen und Iod zum Sieden erhitzt und anschließend destilliert. Hochreines Wasser für Chromatographie wurde mittels MicroPure Wasseraufbereitungssystem der Firma TKA durch Behandlung von vollentsalztem Wasser erzeugt.

Bei den eingesetzten Reagenzien handelt es sich um kommerziell erhältliche Chemikalien der Firmen Merck, Sigma-Aldrich, Fluka, Lancaster, GLBiochem, Aldrich, Acros Organics, TCI-Europe oder Alfa Aesar die, soweit nicht anders vermerkt ohne weitere Reinigung eingesetzt wurden. Die deuterierten Lösungsmittel wurden von der Firma Deutero bezogen. Enzyme wurden bei den Firmen NovaBiochem, Enzo Life Science und Calbiochem erhalten oder von Kooperationspartnern bereitgestellt.

Schutzgas

Als Schutzgas wurde Argon (99.998 %) oder Stickstoff (99.996 %) der Firma *Aire Liquide* verwendet, welche zuvor über CaCl_2 und Orangegel getrocknet wurden.

Lyophilisation

Die Gefriertrocknung von Feststoffen erfolgte an der Anlage Alpha 1–4 LD plus der Firma *Christ*.

Dünnschichtchromatographie (DC)

Es wurden Kieselgel-Fertigfolien des Typs POLYGRAM® SIL G/UV254 mit einer Schichtdicke von 0.2 mm der Firma *Macherey-Nagel* verwendet. Laufmittelgemische sind in Volumenanteilen (v/v) angegeben. Die Detektion erfolgte mittels UV-Licht bei $\lambda = 254$ nm. Nicht UV-aktive Substanzen wurden durch Behandlung in einer Jodkammer oder durch Besprühen mit einer Ninhydrin-Lösung (90 ml Ethanol, 10 ml Essigsäure, 500 mg Ninhydrin, 1 ml TFA) sichtbar gemacht.

Säulenchromatographie

Für die Säulenchromatographie wurde Kieselgel des Typs MP-Silica 32–63, 60 Å der Firma *MP Biomedicals GmbH* oder MN-Kieselgel 60 M (0.04–0.063 mm) der Firma *Macherey-Nagel* verwendet. Die jeweiligen Lösungsmittelgemische sind in Volumenanteilen (v/v) angegeben. Die Säulenlänge und -dicke wurde dem Trennproblem individuell angepasst. Das zu reinigende Produkt wurde entweder als Lösung im jeweiligen Laufmittelgemisch oder als auf Silicagel aufgezogener Feststoff aufgetragen.

Zentrifuge

Zum Zentrifugieren wurde eine Rotofix 32 Zentrifuge der Firma *Hettich* verwendet.

Mikrowelle

Die mikrowellengestützte Peptidsynthese wurde in einem Discover SPS Gerät der Firma *CEM* durchgeführt. Temperaturkontrolle erfolgte über einen optischen Fiberglassensor.

Schmelzpunktbestimmung

Die Schmelzpunkte wurden in offenen Glaskapillaren an einem Melting Point B-450 Gerät der Firma *Büchi* bestimmt. Die angegebenen Schmelzpunkte sind nicht korrigiert.

pH-Messung:

Die Messung der pH-Werte erfolgte an einem pH-Meter 766 Calimatic der Firma *Knick*. Die Kalibrierung der pH-Elektrode erfolgte durch kommerziell erhältliche Pufferlösungen (pH = 4.00 und pH = 7.00).

Kernmagnetische Resonanzspektroskopie (NMR-Spektroskopie)

300 MHz und 500 MHz ^1H -NMR-Spektren, sowie 75 MHz und 125 MHz ^{13}C -NMR-Spektren wurden mit einem DMX 300 bzw. DRX 500 Spektrometer der Firma *Bruker* bei 25 °C aufgenommen. Die Angaben der chemischen Verschiebungen beziehen sich auf deuterierte Lösungsmittel (DMSO- d_6 , CDCl_3) als internen Standard und sind als δ -Werte in ppm angegeben. Kopplungskonstanten sind in Hz angegeben. Für die Signalmultiplizitäten wurden folgende Abkürzungen verwendet: s = Singulett, br.s = verbreitertes Singulett, d = Dublett, dd = Dublett von Dubletts, t = Triplett, q = Quartett und m = Multiplett. Die Spektren wurden nach erster Ordnung interpretiert, wobei die Zuordnung der ^1H - und ^{13}C -Signale mittels Literatur¹⁶² oder Vergleich mit Spektren ähnlicher Verbindungen erfolgte.

Präparative automatisierte Flashchromatographie (MPLC)

Die Reinigung polarer Substanzen und schwer trennbarer Produktgemische erfolgte an der Liquid Chromatography Flash Anlage der Firma *Armen Instrument*. Als Säulen standen RP18-Säulen (reversed Phase) der Firma *RediSep* mit 13 g, 43 g und 130 g, Kieselgelsäulen der Firma *Macherey-Nagel* mit 15 g, 40 g und 80 g, sowie selbstgepackte Kieselgel- und RP18-Säulen unterschiedlicher Länge zur Verfügung. Als Laufmittel wurden destillierte Lösungsmittel verwendet. Die Lösungsmittelgemische sind in Volumenanteilen (v/v) angegeben. Das zu reinigende Produkt wurde entweder als Lösung im jeweiligen Laufmittelgemisch oder als auf RP18-Material oder Kieselgel aufgezogener Feststoff aufgetragen. Die Detektion erfolgte mittels UV-Detektor bei einer dem Produkt angepassten Wellenlänge.

Analytische Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie (HPLC)

Es wurde eine HPLC-Anlage der Firma *Dionex* mit den folgenden Komponenten verwendet: P680 HPLC-Pumpe, ASI-100 Automated Sample Injector und UVD 340U-Detektor. Für die Normalphasenchromatographie des Typs LC-SI wurde eine Nucleosil-Säule (25 cm × 4.0 mm, 7 µm) von *Macherey-Nagel* und für die Reversed-Phase-Chromatographie des Typs LC-18 eine YMC ODS-A Säule (15 cm × 3.0 mm, 5 µm) von *YMC* verwendet. Als Lösungsmittel wurden neben hochreinem Wasser ausschließlich Lösungsmittel speziell für die Chromatographie (HPLC-Qualität) verwendet. Die Detektion erfolgte mittels UV-Detektor bei unterschiedlichen Wellenlängen.

Fourier-Transformations-Infrarotspektroskopie (FT-IR-Spektroskopie)

Die Infrarotspektren wurden an einem FT-IR 430 der Firma *Jasco* gemessen. Die Angaben zu den Lagen der Banden erfolgten in Wellenzahlen (Einheit: cm^{-1}). Die Bandenintensitäten wurden mit s = strong, m = medium, w = weak angegeben.¹⁶²

Massenspektrometrie (MS)

Die ESI-Massenspektren wurden mit einem *Bruker* microTOF focus oder einem BioTOF III-Spektrometer der Firma *Bruker* aufgenommen.

Fluorimetrische Messungen

Die fluorimetrischen Messungen wurden einem Cary Eclipse Spektrometer mit Microplate Reader für 96-Mikrotiterplatten der Firma *Varian Instruments* durchgeführt, dazu wurden weiße 96er-Mikrotiterplatten der Firma *Nunc* verwendet.

UV/Vis-Spektroskopie

UV/Vis-Spektren wurden mit einem Cary 300 Bio Spektrometer, ausgestattet mit einem 6×6 Multicell Block Peltier Series II der Firma *Varian Instruments* aufgenommen.

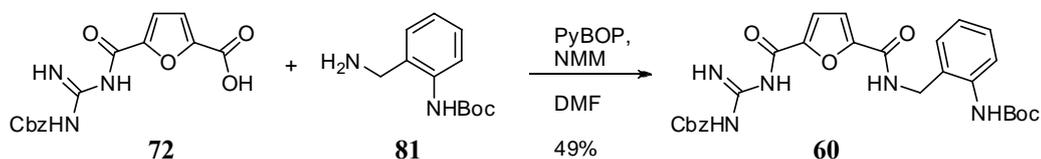
7.2 SYNTHESSEN

7.2.1 DARSTELLUNG DER INHIBITOREN ZWEITER GENERATION

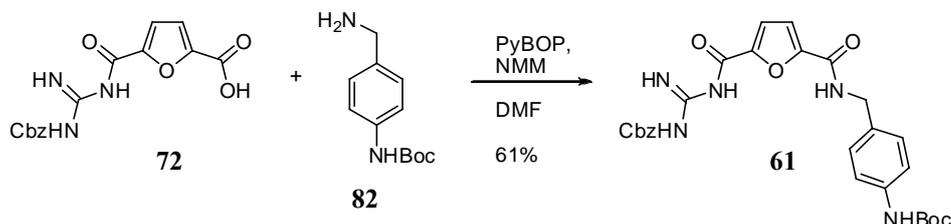
Darstellung der Inhibitoren 60 und 61

Die Furansäure **72** (100 mg, 302 μmol , 1.0 $\text{\AA}q$) wurde zusammen mit dem jeweiligen Anilinderivat **81** oder **82** (302 μmol , 1.0 $\text{\AA}q$), PyBOP (157 mg, 302 μmol , 1.0 $\text{\AA}q$) und NMM (156 mg, 1.51 mmol, 5.0 $\text{\AA}q$) in abs. DMF (2 ml) gelöst und 16 h bei RT gerührt. Anschließend wurde H_2O (5 ml) zugegeben, im Eisbad gekühlt und der entstandene Niederschlag abfiltriert. Der so erhaltene Feststoff wurde erneut in DMF (1 ml) gelöst und durch Wasserzugabe wieder ausgefällt. Nach anschließender Filtration wurde der Feststoff mit H_2O nachgewaschen, mittels Säulenchromatographie gereinigt (SiO_2 , Cy/EE/*i*-Pr, 4/1/0.5) und abschließend lyophilisiert.

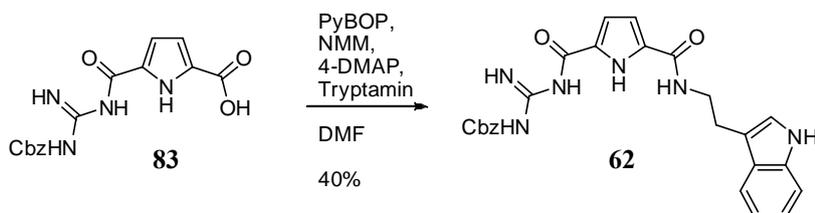
Inhibitor 60



Ausbeute: 49 % (78.4 mg, 146 μmol). **Smp:** 105 °C. **$^1\text{H-NMR}$** (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ = 1.46 (s, 9H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 4.41 (d, 2H, $^3J_{\text{HH}} = 6.0$ Hz, CH_2NH), 5.17 (s, 2H, Cbz-CH_2), 7.08–7.40 (m, 12H, Ar-CH , Cbz-CH , Fu-CH , NH), 8.82 (br.s, 1H, NH), 8.95 (s, 1H, NH), 9.17 (br.s, 1H, NH), 9.52 (br.s, 1H, NH) ppm. **$^{13}\text{C-NMR}$** (75 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ = 28.0 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 38.1 (CH_2NH), 66.5 (Cbz-CH_2), 78.9 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 115.0 (Fu-CH), 124.2, 127.2, 127.6, 127.9, 128.3 (Ar-CH , Fu-CH , Cbz-CH), 131.3, 135.9, 148.8, 153.4, 157.6, 158.7 (C_q) ppm. **FT-IR:** $\tilde{\nu}$ = 3259 (w), 1631 (m), 1525 (m), 1450 (m), 1367 (m), 1214 (s), 1154 (s), 1048 (m), 1023 (m), 908 (m), 743 (s) cm^{-1} . **HR-MS** (pos. ESI) berechnet für $\text{C}_{27}\text{H}_{29}\text{N}_5\text{NaO}_7^+$ [M-Na^+] 558.1959; gefunden 558.1972; berechnet für $\text{C}_{27}\text{H}_{30}\text{N}_5\text{O}_7^+$ [M-H^+] 536.2140; gefunden 536.2146.

Inhibitor 61

Ausbeute: 61 % (98.6 mg, 184 μmol). **Smp:** 115 °C. **$^1\text{H-NMR}$** (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ = 1.45 (s, 9H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 4.38 (d, 2H, $^3J_{\text{HH}} = 5.2$ Hz, CH_2NH), 5.18 (s, 2H, Cbz-CH_2), 7.18–7.40 (m, 12H, Ar-CH , Cbz-CH , Fu-CH , NH), 8.79 (br.s, 1H, NH), 9.07 (br.s, 1H, NH), 9.29 (s, 1H, NH), 11.14 (br.s, 1H, NH) ppm. **$^{13}\text{C-NMR}$** (75 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ = 28.0 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 41.5 (CH_2NH), 66.4 (Cbz-CH_2), 78.8 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 114.6 (Fu-CH), 118.0 (Fu-CH), 127.6, 127.6, 127.9, 128.3 (Ar-CH , Cbz-CH), 132.5, 138.3, 149.2, 153.6, 157.1, 158.7 (C_q) ppm. **FT-IR:** $\tilde{\nu}$ = 3235 (w), 1631 (m), 1523 (m), 1412 (m), 1367 (m), 1215 (s), 1156 (s), 1052 (m), 1016 (m), 907 (m), 754 (m) cm^{-1} . **HR-MS** (pos. ESI) berechnet für $\text{C}_{27}\text{H}_{29}\text{N}_5\text{NaO}_7^+$ [M-Na^+] 558.1959; gefunden 558.1982; berechnet für $\text{C}_{27}\text{H}_{30}\text{N}_5\text{O}_7^+$ [M-H^+] 536.2140; gefunden 536.2159.

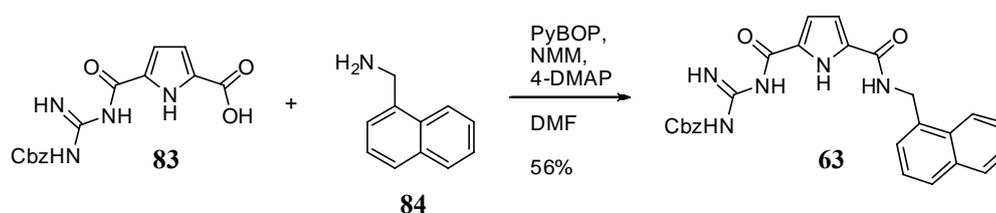
Darstellung von Inhibitor 62

Eine Lösung aus Verbindung **83** (100 mg, 303 μmol , 1.0 Äq), PyBOP (315 mg, 606 μmol , 2.0 Äq), NMM (122 mg, 1.21 mmol, 4.0 Äq) und 4-DMAP (kat.) in DMF (2 ml) wurde 15 min bei RT gerührt. Dann wurde Tryptamin (97.10 mg, 606 μmol , 2.0 Äq) zugegeben und 16 h bei RT gerührt. Anschließend wurde mit H_2O (30 ml) hydrolysiert, der ausfallende Niederschlag abfiltriert und mittels Säulenchromatographie gereinigt (SiO_2 , EE/Cy, Gradient). Das Produkt konnte mit einer Ausbeute von 40 % (55.0 mg, 116 μmol) erhalten werden.

Ausbeute: 40 % (55.0 mg, 116 μmol). **Smp:** 181 °C (Zersetzung). **$^1\text{H-NMR}$** (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ = 2.92 (t, 2H, $^3J_{\text{HH}} = 7.3$ Hz, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}$), 3.51 (q, 2H, $^3J_{\text{HH}} = 7.0$ Hz,

CH₂CH₂NH), 5.13 (s, 2H, Cbz-CH₂), 6.79 (dd, 1H, ³J_{HH} = 3.6 Hz, Ar-CH), 6.94–7.08 (m, 3H, Ar-CH), 7.16 (d, 1H, ³J_{HH} = 2.2 Hz, Ar-CH), 7.29–7.39 (m, 6H, Cbz-CH, NH), 7.56 (d, 1H, ³J_{HH} = 7.8 Hz, NH), 8.51 (t, 1H, ³J_{HH} = 5.6 Hz, CH₂NH), 8.79 (br.s, 1H, NH), 9.36 (br.s, 1H, NH), 10.80 (d, 1H, ³J_{HH} = 1.8 Hz, CHNH), 11.13 (br.s, 1H, NH) ppm. ¹³C-NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 25.1 (CH₂), 39.6 (CH₂), 66.0 (CH₂), 111.3 (CH), 111.6 (CH), 111.6 (C_q), 118.1 (CH), 120.8 (CH), 122.6 (CH), 127.1 (C_q), 127.5 (CH), 127.8 (CH), 128.3 (CH), 136.0, 159.3 (C_q) ppm. **FT-IR:** $\tilde{\nu}$ = 3387 (w), 3272(w), 2941 (w), 1735 (m), 1621 (s), 1529 (s), 1456 (s), 1265 (s), 1204 (s), 1133 (m), 1081 (m), 930 (m), 848 (m), 739 (s), 696 (s) cm⁻¹. **HR-MS** (pos. ESI) berechnet für C₂₅H₂₄N₆NaO₄⁺ [M-Na⁺] 495.1751; gefunden 495.1761; berechnet für C₂₅H₂₅N₆O₄⁺ [M-H⁺] 473.1932; gefunden 473.1940.

Darstellung von Inhibitor **63**

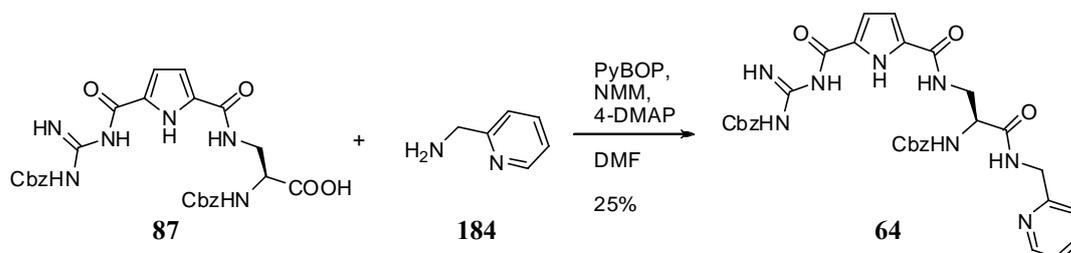


Eine Lösung aus Verbindung **83** (100 mg, 303 μ mol, 1.0 Äq), PyBOP (315 mg, 606 μ mol, 2.0 Äq), NMM (122 mg, 1.21 mmol, 4.0 Äq) und 4-DMAP (kat.) in DMF (3 ml) wurde 15 min bei RT gerührt. Dann wurde 1-(Aminomethyl)naphthalin **84** (95.2 mg, 606 μ mol, 2.0 Äq) zugegeben und 16 h bei RT gerührt. Anschließend wurde mit H₂O (20 ml) hydrolysiert, der ausgefallene Niederschlag abfiltriert, in wenigen ml MeOH erneut aufgenommen und durch Zugabe von H₂O (20 ml) ausgefällt. Nach Filtration und Lyophilisation konnte das Produkt **63** mit einer Ausbeute von 56 % (80.0 mg, 170 μ mol) erhalten werden.

Ausbeute: 56 % (80.0 mg, 170 μ mol). **Smp:** 217 °C. ¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 4.93 (d, 2H, ³J_{HH} = 5.5 Hz, NHCH₂), 5.13 (s, 2H, Cbz-CH₂), 6.89 (d, 1H, ³J_{HH} = 3.8 Hz, NH), 7.32–7.58 (m, 14H, Cbz-CH, Py-CH, NH, Ar-CH), 7.86–7.89 (m, 1H, Ar-CH), 7.95–7.98 (m, 1H, Ar-CH), 8.12–8.15 (m, 1H, NH), 8.78 (br.s, 1H, NH) 8.91 (t, 1H, ³J_{HH} = 5.4 Hz, CH₂NH), 8.35 (br.s, 1H, NH), 11.14 (br.s, 1H, NH) ppm. ¹³C-NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 40.3 (CH₂), 66.0 (CH₂), 112.1 (CH), 123.4 (CH), 125.3 (CH), 125.7 (CH), 125.7 (CH), 126.2 (CH), 127.5 (CH), 127.6 (CH), 127.8 (CH), 128.3 (CH), 128.4 (CH), 130.8, 133.2, 134.2, 159.2 (C_q) ppm. **FT-IR:** $\tilde{\nu}$ = 3423 (w), 3390 (w), 3355 (w), 3271 (w), 3221 (w), 1681 (m), 1642 (m), 1621 (m), 1527 (m), 1287 (m), 1258 (s), 1136 (m), 1079 (m), 1015 (m), 746 (m) cm⁻¹. **HR-MS** (pos. ESI) berechnet für

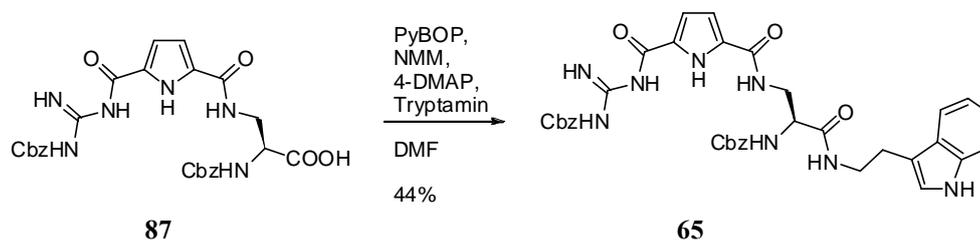
$C_{26}H_{23}N_5NaO_4^+$ [$M-Na^+$] 492.1642; gefunden 492.1680; berechnet für $C_{26}H_{24}N_5O_4^+$ [$M-H^+$] 470.1823; gefunden 470.1859.

Darstellung von Inhibitor **64**



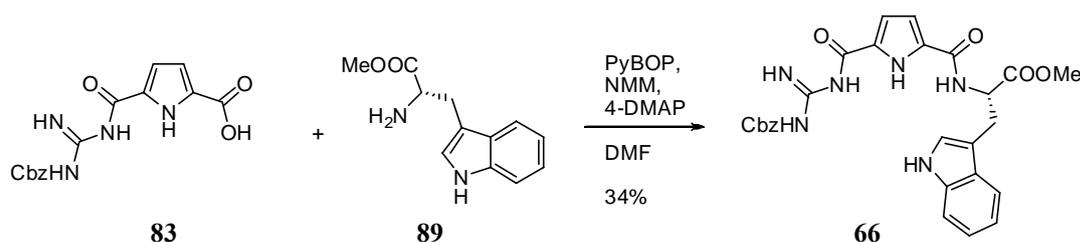
Eine Lösung aus Verbindung **87** (100 mg, 182 μ mol, 1.0 Äq), PyBOP (236 mg, 454 μ mol, 2.5 Äq), NMM (73.0 mg, 726 μ mol, 4.0 Äq) und 4-DMAP (kat.) in DMF (2 ml) wurde 15 min bei RT gerührt. Dann wurde 2-(Aminomethyl)pyridin **184** (50.0 mg, 454 μ mol, 2.5 Äq) zugegeben und 16 h bei RT gerührt. Anschließend wurde mit H_2O (10 ml) hydrolysiert, mit EE extrahiert (3×30 ml), die vereinigten organischen Phasen mit ges. NaCl-Lösung (20 ml) gewaschen und über $MgSO_4$ getrocknet. Anschließend wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und der Rückstand mittels Säulenchromatographie gereinigt (RP-18, $H_2O/MeOH$, 3/7). Das Produkt **64** konnte mit einer Ausbeute von 25 % (29.0 mg, 45.0 μ mol) erhalten werden.

Ausbeute: 25 % (29.0 mg, 45.0 μ mol). **Smp:** 157 °C (Zersetzung). **1H -NMR** (500 MHz, $DMSO-d_6$): δ = 3.57 (t, 2H, $^3J_{HH}$ = 5.4 Hz, $NHCH_2CH$), 4.29 (q, 1H, $^3J_{HH}$ = 6.6 Hz, $NHCH_2CH$), 4.59 (d, 2H, $^3J_{HH}$ = 5.8 Hz, CH_2NH), 5.04 (d, 2H, $^2J_{HH}$ = 12.5 Hz, $Cbz-CH_2$), 5.14 (s, 2H, $Cbz-CH_2$), 6.87 (q, 1H, $^3J_{HH}$ = 3.8 Hz, NH), 7.19–7.40 (m, 14H, $Cbz-CH$, $Py-CH$, NH , $Pyr-CH$), 7.54–7.62 (m, 2H, NH), 8.24 (d, 1H, $^3J_{HH}$ = 7.5 Hz, $CHNH$), 8.54 (t, 1H, $^3J_{HH}$ = 5.5 Hz, CH_2NH), 8.92 (t, 1H, $^3J_{HH}$ = 5.6 Hz, CH_2NH), 9.50 (br.s, 1H, NH), 9.99 (br.s, 1H, NH), 12.40 (br.s, 1H, NH) ppm. **^{13}C -NMR** (125 MHz, $DMSO-d_6$): δ = 40.4 (CH_2), 41.3 (CH_2), 46.1 (CH_2), 54.8 (CH), 65.6 (CH_2), 67.6 (CH_2), 112.7, 112.8, 115.9 (CH), 123.6 (C_q), 123.6 (CH), 126.3 (C_q), 127.6, 127.7, 127.7 (CH), 127.9 (C_q), 128.1, 128.2, 128.3, 128.5, 128.6, 128.7 (CH), 136.7, 137.6, 155.4, 155.9, 159.6, 170.7 (C_q) ppm. **FT-IR:** $\tilde{\nu}$ = 3289 (w), 1689 (m), 1653 (s), 1535 (m), 1435 (m), 1397 (m), 1238 (s), 1191 (s), 1141 (m), 1026 (m), 906 (m), 821 (m), 752 (s), 696 (s), 610 (s) cm^{-1} . **HR-MS** (pos. ESI) berechnet für $C_{32}H_{32}N_8NaO_7^+$ [$M-Na^+$] 663.2286; gefunden 663.4507; berechnet für $C_{32}H_{33}N_8O_7^+$ [$M-H^+$] 641.2467; gefunden 641.2505.

Darstellung von Inhibitor **65**

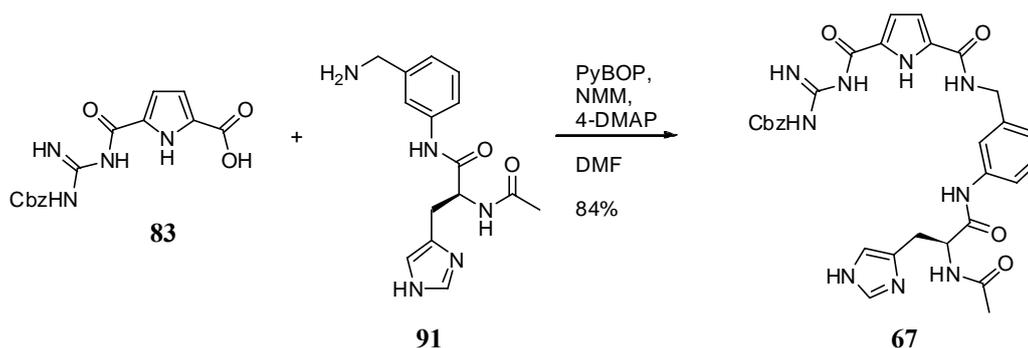
Eine Lösung aus Verbindung **87** (100 mg, 182 μmol , 1.0 \AA q), PyBOP (94.7 mg, 455 μmol , 1.0 \AA q), NMM (73.6 mg, 728 μmol , 4.0 \AA q) und 4-DMAP (kat.) in DMF (2 ml) wurde 15 min bei RT gerührt. Dann wurde Tryptamin (66.5 mg, 415 μmol , 2.3 \AA q) zugegeben und 16 h bei RT gerührt. Anschließend wurde mit H_2O (20 ml) hydrolysiert, mit EE extrahiert (4×10 ml), die vereinigten organischen Phasen mit H_2O und ges. NaCl-Lösung (je 10 ml) gewaschen und über MgSO_4 getrocknet. Anschließend wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und der Rückstand mittels Säulenchromatographie gereinigt (RP-18, $\text{H}_2\text{O}/\text{MeOH}$, 2/8). Das Produkt **65** konnte mit einer Ausbeute von 44 % (55.0 mg, 79.0 μmol) erhalten werden.

Ausbeute: 44 % (55.0 mg, 79.0 μmol). **Smp:** 136 $^\circ\text{C}$ (Zersetzung). **$^1\text{H-NMR}$** (500 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ = 2.75–2.79 (m, 2H, CHCH_2), 3.27–3.38 (m, 2H, CH_2CH_2), 3.47–3.57 (m, 2H, CH_2CH_2), 4.20 (q, 1H, $^3J_{\text{HH}} = 7.4$ Hz, CH_2CH), 5.03 (q, 2H, Cbz- CH_2), 5.14 (s, 2H, Cbz- CH_2), 6.08 (s, 1H, NH), 6.94–6.98 (m, 1H, Tryp-CH), 7.03–7.07 (m, 1H, Tryp-CH), 7.12 (s, 1H, CH), 7.29–7.39 (m, 13H, Cbz-CH, Py-CH, NH, Tryp-CH), 7.50 (d, 1H, $^3J_{\text{HH}} = 8.0$ Hz, CHNH), 8.09 (t, 1H, $^3J_{\text{HH}} = 5.5$ Hz, CH_2NH), 8.46 (t, 1H, $^3J_{\text{HH}} = 5.7$ Hz, CH_2NH), 8.79 (br.s, 1H, NH), 9.36 (br.s, 1H, NH), 10.79 (s, 1H, NH), 11.17 (br.s, 1H, NH) ppm. **$^{13}\text{C-NMR}$** (125 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ = 25.0 (CH_2), 39.5 (CH_2), 40.7 (CH_2), 54.9 (CH), 65.5 (CH_2), 111.2 (CH), 111.6 (C_q), 112.1, 2×118.1 , 120.8, 122.5 (CH), 127.0, 127.5, 2×127.6 (C_q), 127.6, 127.7 (CH), 127.7, 127.8, 128.2 (C_q), 128.2, 2×128.3 (CH), 136.1, 136.8, 155.7, 159.9, 169.5 (C_q) ppm. **FT-IR:** $\tilde{\nu}$ = 3380 (m), 3289 (m), 2944 (w), 1629 (s), 1523 (s), 1455 (s), 1262 (s), 1206 (s), 1130 (m), 1025 (m), 850 (m), 738 (s), 695 (s) cm^{-1} . **HR-MS** (pos. ESI) berechnet für $\text{C}_{36}\text{H}_{36}\text{N}_8\text{NaO}_7^+$ [M-Na^+] 715.2599; gefunden 715.2624; berechnet für $\text{C}_{36}\text{H}_{37}\text{N}_8\text{O}_7^+$ [M-H^+] 693.2780; gefunden 693.2785.

Darstellung von Inhibitor **66**

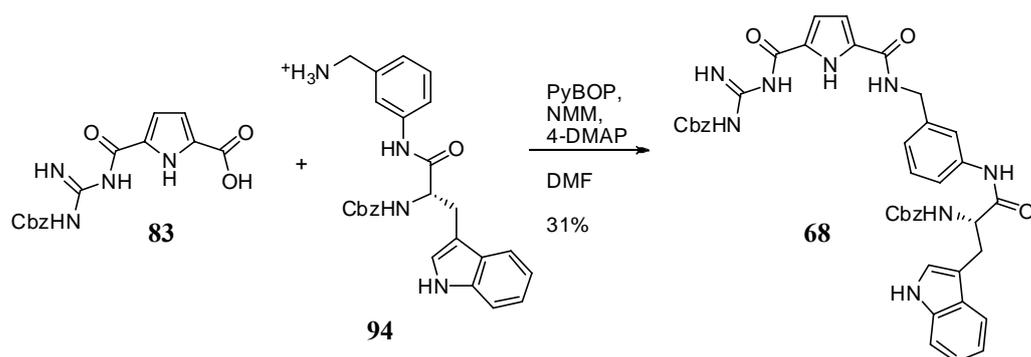
Eine Lösung aus Verbindung **83** (100 mg, 303 μmol , 1.0 $\text{\AA}q$), PyBOP (315 mg, 606 μmol , 2.0 $\text{\AA}q$), NMM (122 mg, 1.21 mmol, 4.0 $\text{\AA}q$) und 4-DMAP (kat.) in DMF (3 ml) wurde 15 min bei RT gerührt. Dann wurde Verbindung **99** (132 mg, 606 μmol , 2.0 $\text{\AA}q$) zugegeben und 16 h bei RT gerührt. Anschließend wurde mit H_2O (30 ml) hydrolysiert, der ausfallende Niederschlag abfiltriert und mittels Säulenchromatographie gereinigt (RP-18, $\text{H}_2\text{O}/\text{MeOH} + 0.01\%$ TFA, Gradient). Das Produkt **66** konnte mit einer Ausbeute von 34 % (55.0 mg, 104 μmol) erhalten werden.

Ausbeute: 34 % (55.0 mg, 104 μmol). **Smp:** 149 °C (Zersetzung). **$^1\text{H-NMR}$** (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ = 3.12–3.31 (m, 2H, CH_2CH), 3.62 (s, 3H, CH_3), 4.67–4.75 (m, 1H, CH_2CH), 5.15 (s, 2H, Cbz- CH_2), 6.85 (dd, 1H, $^3J_{\text{HH}} = 3.8$ Hz, Ar- CH), 6.96–7.09 (m, 3H, Ar- CH), 7.17 (d, 1H, $^3J_{\text{HH}} = 2.3$ Hz, Ar- CH), 7.32–7.40 (m, 6H, Cbz- CH , NH), 7.54 (d, 1H, $^3J_{\text{HH}} = 7.8$ Hz, CHNH), 8.80 (d, 1H, $^3J_{\text{HH}} = 7.6$ Hz, CHNH), 8.85 (br.s, 1H, NH), 9.43 (br.s, 1H, NH), 10.85 (d, 1H, $^3J_{\text{HH}} = 1.8$ Hz, NH), 11.98 (br.s, 1H, NH) ppm. **$^{13}\text{C-NMR}$** (125 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ = 26.9 (CH_2), 51.9 (CH_3), 53.1 (CH), 109.5 (C_q), 111.4 (CH), 112.7 (CH), 117.9 (CH), 118.3 (CH), 120.9 (CH), 123.6 (CH), 126.9 (C_q), 127.5 (CH), 127.8 (CH), 128.3 (CH), 136.0, 159.3, 172.3 (C_q) ppm. **FT-IR:** $\tilde{\nu}$ = 3387 (w), 3320 (w), 2953 (w), 1731 (m), 1626 (s), 1539 (s), 1457 (m), 1434 (m), 1332 (m), 1273 (s), 1199 (s), 1178 (s), 1134 (m), 1099 (m), 1045 (m), 905 (w), 850 (m), 739 (s), 695 (m) cm^{-1} . **HR-MS** (pos. ESI) berechnet für $\text{C}_{27}\text{H}_{26}\text{N}_6\text{NaO}_6^+$ [M-Na^+] 553.1806; gefunden 553.1825; berechnet für $\text{C}_{27}\text{H}_{27}\text{N}_6\text{O}_6^+$ [M-H^+] 531.1987; gefunden 531.2003.

Darstellung von Inhibitor **67**

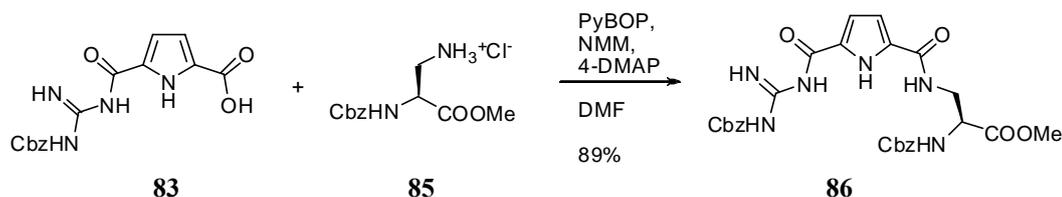
Eine Lösung aus Verbindung **83** (79.6 mg, 241 μmol , 1.0 $\text{\AA}q$), Verbindung **91** (100 mg, 241 μmol , 1.0 $\text{\AA}q$), PyBOP (125 mg, 241 μmol , 1.0 $\text{\AA}q$), NMM (73.1 mg, 723 μmol , 3.0 $\text{\AA}q$) und 4-DMAP (kat.) in abs. DMF (2 ml) wurde 24 h bei RT gerührt. Anschließend wurde H_2O (10 ml) zugegeben und die Reaktionsmischung lyophilisiert. Danach wurde der Rückstand mittels Säulenchromatographie gereinigt (RP-18, $\text{H}_2\text{O}/\text{MeOH} + 0.05\%$ TFA, 1/1) und man erhielt das Produkt **67** in einer Ausbeute von 84 % (124 mg, 171 μmol).

Ausbeute: 84 % (124 mg, 171 μmol). **Smp:** 240 $^\circ\text{C}$ (Zersetzung). **$^1\text{H-NMR}$** (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): $\delta = 1.85$ (s, 3H, CH_3), 3.06 (dd, 2H, $^3J_{\text{HH}} = 6.8$ Hz, CH_2CH), 4.43 (d, 2H, $^3J_{\text{HH}} = 6.1$ Hz, $\text{CH}_2\text{NH-Cbz}$), 4.72 (q, 1H, $^3J_{\text{HH}} = 8.2$ Hz, CH_2CH), 5.24 (s, 2H, Cbz- CH_2), 6.92–7.55 (m, 13H, Ar- CH , Py- CH , NH, His- CH), 8.41 (d, 1H, $^3J_{\text{HH}} = 8.0$ Hz, CHNH), 9.00 (s, 1H, NH), 9.04 (t, 1H, $^3J_{\text{HH}} = 5.8$ Hz, CH_2NH), 9.32 (br.s, 1H, NH), 9.84 (br.s, 1H, NH), 10.24 (s, 1H, NH), 12.34 (br.s, 1H, NH) ppm. **$^{13}\text{C-NMR}$** (75 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): $\delta = 22.4$ (CH_3), 26.9 (CH_2CH), 42.1 (CH_2NH), 52.3 (CH_2CH), 66.2 (Cbz- CH_2), 111.9, 112.1, 116.6, 118.1, 118.2, 122.3, 127.6, 127.8, 128.0, 128.2, 128.3, 128.4, 128.6 (Ar- CH , Py- CH), 129.2 (C_q), 133.7 (Ar- CH), 135.5, 138.5, 139.9, 157.9, 158.1, 159.3, 168.9, 169.4 (C_q) ppm. **FT-IR:** $\tilde{\nu} = 3326$ (w), 3025 (w), 1754 (m), 1689 (m), 1650 (m), 1589 (m), 1555 (s), 1477 (m), 1435 (m), 1288 (m), 1236 (s), 1186 (s), 904 (m), 814 (m), 763 (s), 695 (s) cm^{-1} . **HR-MS** (pos. ESI) berechnet für $\text{C}_{30}\text{H}_{31}\text{N}_9\text{NaO}_6^+$ [M-Na^+] 636.2290; gefunden 636.2315; berechnet für $\text{C}_{30}\text{H}_{32}\text{N}_9\text{O}_6^+$ [M-H^+] 614.2470; gefunden 614.2498.

Darstellung von Inhibitor **68**

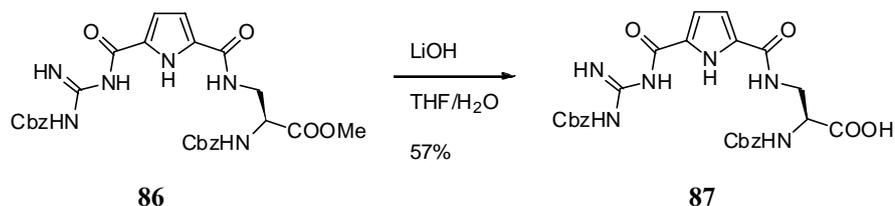
Eine Lösung aus Verbindung **83** (100 mg, 303 μmol , 1.0 Äq), PyBOP (394 mg, 758 μmol , 2.5 Äq), NMM (122 mg, 1.21 mol, 4.0 Äq) und 4-DMAP (kat.) in DMF (2 ml) wurde 15 min bei RT gerührt. Dann wurde Verbindung **94** (170 mg, 303 μmol , 1.0 Äq) zugegeben und erst 1 h bei 45 °C, dann 16 h bei RT gerührt. Anschließend wurde mit H₂O (19 ml) hydrolysiert, der Niederschlag abfiltriert und mittels Säulenchromatographie gereinigt (SiO₂, EE/Cy, Gradient). Das Produkt konnte mit einer Ausbeute von 31 % (71.0 mg, 94.0 μmol) erhalten werden.

Ausbeute: 31 % (71.0 mg, 94.0 μmol). **Smp:** 130 °C (Zersetzung). **¹H-NMR** (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 2.97–3.15 (m, 2H, CH₂CHNH), 4.44–4.48 (m, 3H, CH₂CHNH, CH₂NH), 4.96 (dd, 2H, ⁴J_{HH} = 12.6 Hz, Cbz-CH₂), 5.14 (s, 2H, Cbz-CH₂), 6.88 (s, 1H, Ar-CH), 6.96–7.07 (m, 4H, Ar-CH), 7.18 (d, 1H, ³J_{HH} = 2.0 Hz, Ar-CH), 7.26–7.39 (m, 12H, Cbz-CH, NH), 7.55–7.59 (m, 3H, NH), 7.68 (d, 1H, ³J_{HH} = 7.9 Hz, NH), 8.79 (br.s, 1H, NH), 8.92 (t, 1H, ³J_{HH} = 4.6 Hz, CH₂NH), 9.37 (br.s, 1H, NH), 10.16 (s, 1H, CHNH), 10.81 (s, 1H, CHNH), 11.16 (br.s, 1H, NH) ppm. **¹³C-NMR** (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 26.2 (CH₂), 27.7 (CH₂), 42.1 (CH₂), 56.0 (CH), 65.2 (CH₂), 109.8 (C_q), 111.2, 111.9, 117.9, 118.0, 118.1, 118.5, 120.8, 122.3, 123.8 (CH), 127.1 (C_q), 127.5, 127.6, 127.7, 128.2, 128.3, 128.6 (CH), 135.9, 136.8, 139.0, 155.8, 159.4, 170.9 (C_q) ppm. **FT-IR:** $\tilde{\nu}$ = 3287 (w), 1628 (s), 1533 (s), 1455 (m), 1339 (m), 1263 (s), 1213 (s), 1132 (m), 1048 (m), 908 (m), 740 (s), 695 (s) cm⁻¹. **HR-MS** (pos. ESI) berechnet für C₄₁H₃₈N₈NaO₇⁺ [M-Na⁺] 777.2756; gefunden 777.2757; berechnet für C₄₁H₃₉N₈O₇⁺ [M-H⁺] 755.2936; gefunden 755.2950.

Darstellung von Verbindung **86**

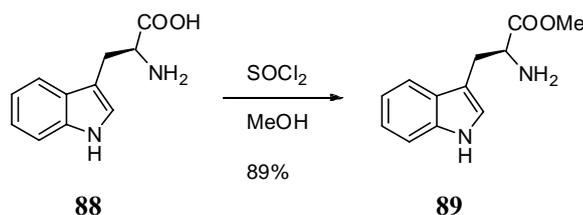
Eine Lösung aus Verbindung **83** (1.00 g, 3.03 mmol, 1.0 Äq), PyBOP (3.94 g, 7.57 mmol, 2.5 Äq), NMM (1.22 g, 12.1 mmol, 4.0 Äq) und 4-DMAP (kat.) in abs. DMF (10 ml) wurde 10 min bei RT gerührt. Dann wurde Verbindung **85** (2.19 g, 7.57 mmol, 2.5 Äq) zugegeben und die Reaktionsmischung 16 h bei RT gerührt. Anschließend wurde H₂O (70 ml) und EE (120 ml) zugegeben und die Phasen getrennt. Die wässrige Phase wurde mit EE (3 × 50 ml) extrahiert, die vereinigten organischen Phasen, mit H₂O und ges. NaCl-Lösung (je 50 ml) gewaschen, über MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Die säulenchromatographische Reinigung (SiO₂, EE/Hex, 4/1) ergab das Produkt **86** in einer Ausbeute von 98 % (1.67 g, 2.96 mmol).

Ausbeute: 98 % (1.67 g, 2.96 mmol). **Smp:** 92 °C (Zersetzung). **¹H-NMR** (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 3.50–3.66 (m, 5H, CHCH₂NH, COOCH₃), 4.30 (q, 1H, ³J_{HH} = 7.2 Hz, CHCH₂NH), 5.04 (s, 2H, Cbz-CH₂), 5.14 (s, 2H, Cbz-CH₂), 6.79–6.81 (m, 1H, Py-CH), 6.79 (q, 1H, ³J_{HH} = 3.7 Hz, Py-CH), 6.97 (br.s, 1H, NH), 7.30–7.40 (m, 10H, 10 × Cbz-CH), 7.74 (d, 1H, ³J_{HH} = 7.8 Hz, CHNH), 8.51 (t, 1H, ³J_{HH} = 5.7 Hz, CH₂NH), 8.78 (br.s, 1H, NH), 8.37 (br.s, 1H, NH), 11.12 (br.s, 1H, NH), 11.81 (br.s, 1H, NH) ppm. **¹³C-NMR** (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 40.0 (CHCH₂NH), 52.0 (COOCH₃), 53.7 (CHCH₂NH), 65.6 (Cbz-CH₂), 66.1 (Cbz-CH₂), 112.1(Py-CH), 112.0 (Py-CH), 127.6, 127.7, 127.8, 128.3, 128.3 (CH), 136.7, 155.9, 160.0, 171.0 (C_q) ppm. **FT-IR:** $\tilde{\nu}$ = 3380 (w), 3285 (w), 2953 (w), 1723 (m), 1687 (m), 1626 (s), 1522 (s), 1455 (m), 1435 (m), 1262 (s), 1204 (s), 1132 (m), 1025 (m), 835 (s), 747 (s), 695 (s) cm⁻¹. **HR-MS** (pos. ESI) berechnet für C₂₇H₂₈N₆NaO₈⁺ [M-Na⁺] 587.1861; gefunden 587.1887; berechnet für C₂₇H₂₉N₆O₈⁺ [M⁺] 565.2041; gefunden 565.2086.

Darstellung von Verbindung 87

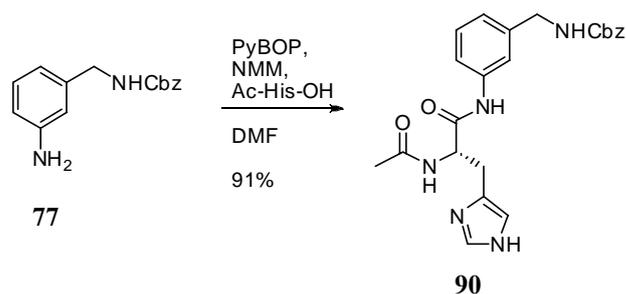
In einem Gemisch aus THF und H₂O (4/1, 15 ml) wurde Verbindung **86** (1.67 g, 2.96 mmol, 1.0 Äq) und LiOH (177 mg, 7.40 mmol, 2.5 Äq) gelöst und 30 min bei RT gerührt. Mittels DC-Kontrolle wurde die Vollständigkeit der Reaktion überprüft. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und der Rückstand in H₂O (10 ml) aufgenommen. Mit HCl_{aq} (3N) wurde die Lösung angesäuert, der ausgefallene Feststoff abfiltriert und lyophilisiert. Das Produkt **87** konnte mit einer Ausbeute von 57 % (929 mg, 1.69 mmol) erhalten werden.

Ausbeute: 57 % (929 mg, 1.69 mmol). **Smp:** 231 °C. **¹H-NMR** (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 3.47–3.70 (m, 2H, CHCH₂NH), 4.20–4.27 (m, 1H, CHCH₂NH), 5.03 (s, 2H, Cbz-CH₂), 5.14 (s, 2H, Cbz-CH₂), 6.79–6.81 (m, 1H, Py-CH), 6.97–6.98 (m, 1H, Py-CH), 7.28–7.39 (m, 10H, Cbz-CH), 7.60 (d, 1H, ³J_{HH} = 8.2 Hz, CHNH), 8.54 (t, 1H, ³J_{HH} = 5.6 Hz, CH₂NH; br.s, 1H, NH), 8.79 (br.s, 1H, NH), 9.38 (br.s, 1H, NH), 11.85 (br.s, 1H, NH) ppm. **¹³C-NMR** (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 40.0 (CHCH₂NH), 54.9 (CHCH₂NH), 65.5 (Cbz-CH₂), 66.1 (Cbz-CH₂), 112.1(Py-CH), 114.7 (Py-CH), 127.6, 127.6, 127.7, 127.8, 128.3, 128.3 (CH), 130.0, 136.5, 136.8, 155.9, 158.8, 159.9, 171.9 (C_q) ppm. **FT-IR:** $\tilde{\nu}$ = 3343 (w), 3063 (w), 1685 (s), 1649 (s), 1539 (s), 1248 (s), 1243 (s), 1190 (s), 1043 (m), 746 (s), 726 (s), 693 (s) cm⁻¹. **HR-MS** (neg. ESI) berechnet für C₂₆H₂₅N₆O₈⁻ [M⁻] 549.1739; gefunden 549.1753.

Darstellung von Verbindung 89

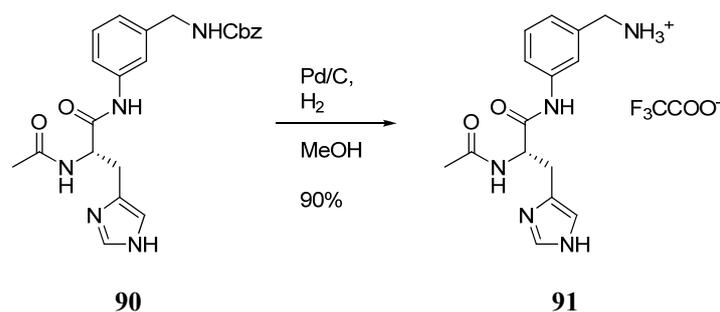
In einem Eis-Salz-Bad wurde abs. MeOH (20 ml) vorgelegt, SOCl_2 (2.33 g, 19.6 mmol, 2.0 Äq) über 10 min hinweg zugetropft und dann 15 min gerührt. Anschließend wurde L-Tryptophan **88** (2.00 g, 9.79 mmol, 1.0 Äq) zugegeben, die Mischung auf RT gebracht und 5 h gerührt. Zum Schluss wurde 5 min zum Sieden erhitzt und anschließend das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde in siedendem EtOH (25 ml) gelöst, leicht abgekühlt und dann soviel Et_2O zugegeben bis sich erste Kristalle bildeten. Die Lösung wurde für 16 h auf 4 °C gekühlt, die entstandenen Kristalle abfiltriert und mit Et_2O nachgewaschen. Der Feststoff wurde in H_2O (50 ml) gelöst und mit NaHCO_3 ein pH-Wert von 7–8 eingestellt. Die wässrige Phase wurde nun mit EE (3 × 50 ml) gewaschen, anschließend mit HCl_{aq} (3N) bis zur neutralen Reaktion versetzt und dann lyophilisiert. Das Produkt **89** wurde in einer Ausbeute von 89 % (1.90 g, 8.73 mmol) erhalten.

Ausbeute: 89 % (1.90 g, 8.73 mmol). **Smp:** 232 °C. **$^1\text{H-NMR}$** (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ = 3.26–3.41 (m, 2H, CH_2CH), 3.62 (s, 3H, CH_3), 4.16 (t, 1H, $^3J_{\text{HH}} = 6.2$ Hz, CH_2CH), 6.97–7.10 (m, 2H, Ar-CH), 7.26 (d, 1H, $^3J_{\text{HH}} = 2.4$ Hz, Ar-CH), 7.37 (d, 1H, $^3J_{\text{HH}} = 8.0$ Hz, Ar-CH), 7.52 (d, 1H, $^3J_{\text{HH}} = 7.8$ Hz, Ar-CH), 8.78 (br.s, 3H, NH_3^+), 11.19 (br.s, 1H, Ar-NH) ppm. **$^{13}\text{C-NMR}$** (125 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ = 26.0 (CH_2), 52.5 (CH_3), 52.6 (CH), 106.3 (C_q), 111.5 (CH), 118.0 (CH), 118.5 (CH), 121.0 (CH), 124.9 (CH), 126.9, 136.2, 169.7 (C_q) ppm. **FT-IR:** $\tilde{\nu}$ = 3380 (w), 2845 (w), 1747 (s), 1577 (m), 1434 (m), 1351 (m), 1285 (m), 1210 (m), 1108 (m), 982 (m), 946 (m), 889 (m), 820 (m), 757 (m), 729 (s) cm^{-1} . **HR-MS** (pos. ESI) berechnet für $\text{C}_{12}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{NaO}_2^+$ [M-Na^+] 241.0947; gefunden 241.0975; berechnet für $\text{C}_{12}\text{H}_{15}\text{N}_2\text{O}_2^+$ [M-H^+] 219.1128; gefunden 219.1175.

Darstellung von Verbindung 90

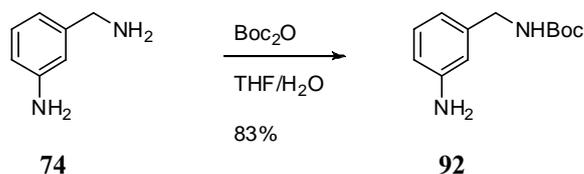
Acetyl-L-Histidin (168 mg, 780 μmol , 2.0 Äq) wurde zusammen mit PyBOP (406 mg, 780 μmol , 2.0 Äq), NMM (157 mg, 1.56 mmol, 4.0 Äq) und 4-DMAP (kat.) in abs. DMF (2 ml) gelöst und für 30 min bei RT gerührt. Dann wurde Verbindung **77** (100 mg, 390 μmol , 1.0 Äq) zugegeben und für 16 h bei RT gerührt. Anschließend wurde H_2O zugegeben (10 ml) und die Mischung lyophilisiert. Nach anschließender Reinigung mittels Säulenchromatographie (RP-18, $\text{H}_2\text{O}/\text{MeOH} + 0.1\%$ TFA, Gradient) konnte das Produkt **90** als weißer Feststoff in einer Ausbeute von 91 % (155 mg, 356 μmol) erhalten werden.

Ausbeute: 91 % (155 mg, 356 μmol). **Smp:** 122 °C. **$^1\text{H-NMR}$** (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): $\delta = 1.87$ (s, 3H, CH_3), 3.06 (dd, 2H, $^3J_{\text{HH}} = 7.1$ Hz, CH_2CH), 4.17 (d, 2H, $^3J_{\text{HH}} = 6.1$ Hz, $\text{CH}_2\text{NH-Cbz}$), 4.72 (q, 1H, $^3J_{\text{HH}} = 7.5$ Hz, CH_2CH), 5.04 (s, 2H, Cbz-CH_2), 6.97 (d, 1H, $^3J_{\text{HH}} = 7.3$ Hz, Ar-CH), 7.23–7.50 (m, 11H, Ar-CH, His-CH, Cbz-CH), 7.85 (t, 1H, $^3J_{\text{HH}} = 6.2$ Hz, CH_2NH), 8.37 (d, 1H, $^3J_{\text{HH}} = 7.9$ Hz, CHNH), 8.98 (s, 1H, NH), 10.12 (s, 1H, NH) ppm. **$^{13}\text{C-NMR}$** (75 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): $\delta = 22.4$ (CH_3), 27.0 (CH_2CH), 43.8 (CH_2NH), 52.4 (CH_2CH), 65.3 (Cbz-CH_2), 116.6, 118.0, 118.2, 122.3, 2×127.7 , 128.3, 128.6 (Ar-CH), 129.3 (C_q), 133.7 (Ar-CH), 137.1, 138.5, 140.3, 156.3, 158.0, 158.5, 168.5, 169.5 (C_q) ppm. **FT-IR:** $\tilde{\nu} = 3297$ (w), 1666 (s), 1540 (m), 1430 (m), 1381 (m), 1251 (m), 1204 (s), 1129 (s), 1054 (m), 905 (m), 834 (m) cm^{-1} . **HR-MS** (pos. ESI) berechnet für $\text{C}_{23}\text{H}_{25}\text{N}_5\text{NaO}_4^+$ [M-Na^+] 458.1799; gefunden 458.1806; berechnet für $\text{C}_{23}\text{H}_{26}\text{N}_5\text{O}_4^+$ [M-H^+] 436.1979; gefunden 436.1991.

Darstellung von Verbindung **91**

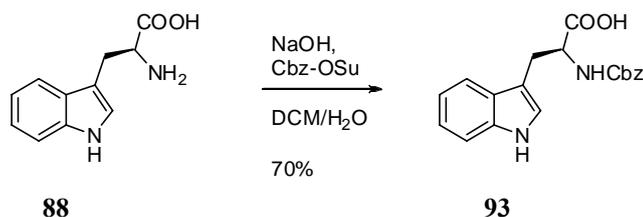
In Methanol (15 ml) wurde Verbindung **90** (48.0 mg, 110 μmol) gelöst, Palladium/Aktivkohle (5 mg, 10 %ig) zugegeben und für 4 h H_2 durch die Suspension geleitet. Mittels DC-Kontrolle wurde die Reaktion auf Vollständigkeit überprüft. Die Aktivkohle wurde abfiltriert, das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und der Rückstand mittels Säulenchromatographie gereinigt (RP-18, $\text{H}_2\text{O}/\text{MeOH} + 0.1\%$ TFA, Gradient). Das Produkt **91** konnte mit einer Ausbeute von 90 % (41.0 mg, 98.7 μmol) erhalten werden.

Ausbeute: 90 % (41.0 mg, 98.7 μmol). **Smp:** 75 °C. **$^1\text{H-NMR}$** (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): $\delta = 1.86$ (s, 3H, CH_3), 2.90 (dd, 2H, $^3J_{\text{HH}} = 7.2$ Hz, CH_2CH), 3.99 (s, 2H, CH_2NH_3^+), 4.72 (q, 1H, $^3J_{\text{HH}} = 8.1$ Hz, CH_2CH), 7.17 (d, 1H, $^3J_{\text{HH}} = 7.6$ Hz, Ar-CH), 7.34–7.39 (m, 2H, Ar-CH, NH), 7.52 (d, 1H, $^3J_{\text{HH}} = 8.5$ Hz, Ar-CH), 7.73 (s, 1H, Ar-CH), 8.25 (br.s, 3H, NH_3^+), 8.42 (d, 1H, $^3J_{\text{HH}} = 7.9$ Hz, CHNH), 8.99 (s, 1H, NH), 10.23 (s, 1H, NH) ppm. **$^{13}\text{C-NMR}$** (75 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): $\delta = 22.4$ (CH_3), 29.4 (CH_2CH), 42.4 (CH_2NH_3^+), 53.5 (CH_2CH), 119.4, 119.8, 123.6, 128.9, 134.3, 134.5 (Ar-CH, His-CH), 139.1, 157.7, 158.0, 169.2, 170.4 (C_q) ppm. **FT-IR:** $\tilde{\nu} = 3263$ (w), 3030 (w), 2869 (w), 2641 (w), 1661 (s), 1621 (s), 1541 (m), 1430 (m), 1380 (m), 1294 (w), 1178 (s), 1126 (s), 980 (w), 834 (s), 796 (s), 720 (s) cm^{-1} . **HR-MS** (pos. ESI) berechnet für $\text{C}_{15}\text{H}_{19}\text{N}_5\text{NaO}_2^+$ [M-Na^+] 324.1431; gefunden 324.1449; berechnet für $\text{C}_{15}\text{H}_{20}\text{N}_5\text{O}_2^+$ [M-H^+] 302.1612; gefunden 302.1625.

Darstellung von Verbindung 92

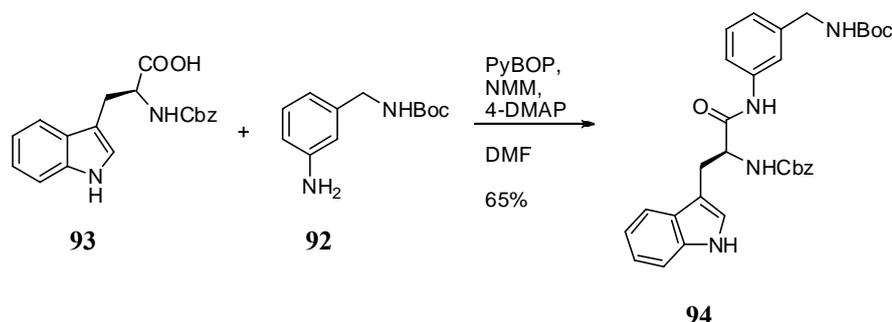
Zu einer Lösung aus 3-Aminobenzylamin **74** (5.35 g, 43.8 mmol, 1.0 Äq) in einem THF/H₂O-Gemisch (2/1, 75 ml) wurde Boc₂O (10.5 g, 48.2 mmol, 1.1 Äq) gegeben und bei RT 12 h gerührt. Die Lösung wurde eingengt und der wässrige Rückstand mit EE (70 ml) aufgenommen. Es wurde mit H₂O (2 × 20 ml) und ges. NaCl-Lösung (1 × 20 ml) gewaschen und über MgSO₄ getrocknet. Das Lösungsmittel wurde entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch gereinigt (SiO₂, Hex/EE, 2/1). Das Produkt wurde mit einer Ausbeute von 83 % (8.06 g, 36.3 mmol) erhalten.

Ausbeute: 83 % (8.06 g, 36.3 mmol). **Smp:** 39 °C. **¹H-NMR** (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 1.39 (s, 9H, C(CH₃)₃), 3.97 (d, ³J_{HH} = 6.2 Hz, 2H, CH₂NH), 5.10 (br.s, 2H, NH₂), 6.37–6.43 (m, 3H, Ar-CH), 6.93 (t, ³J_{HH} = 7.6 Hz, 1H, Ar-CH), 7.21 (br.t, ³J_{HH} = 5.7 Hz, 1H, NH) ppm. **¹³C-NMR** (100 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 28.3 (C(CH₃)₃), 43.6 (CH₂), 77.5 (C(CH₃)₃), 112.3, 112.4, 114.4, 128.6 (Ar-CH), 140.7 (Ar-C_q-CH₂), 148.5 (Ar-C_q-NH₂), 155.7 (C_qOO^tBu) ppm. **FT-IR** (KBr Pressling): $\tilde{\nu}$ = 3380 (s), 3221 (m), 2981 (s), 2927 (m), 1687 (s), 1610 (s), 1535(s), 1510 (s), 1365 (s), 1271 (s), 1247 (s), 1166 (s), 865 (s), 786 (s) cm⁻¹. **HR-MS** (pos. ESI) berechnet für C₁₂H₁₈N₂NaO₂⁺ [M-Na⁺] 245.1260; gefunden 245.1288.

Darstellung von Verbindung **93**

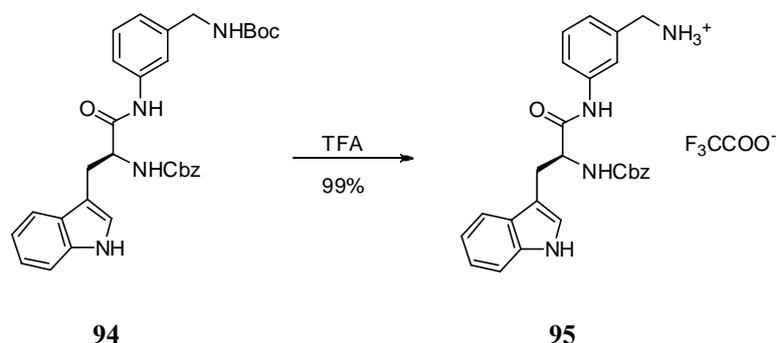
L-Tryptophan (1.00 g, 4.90 mmol, 1.0 Äq) wurde in DCM (10 ml) gelöst und eine Lösung aus NaOH (235 mg, 5.88 mmol, 1.2 Äq) und H₂O (10 ml) zugegeben. Diese Emulsion wurde 30 min kräftig gerührt. Dann wurde Cbz-OSu (2.45 g, 9.83 mmol, 2.0 Äq) in kleinen Portionen über 15 min hinweg zugegeben und 16 h bei RT gerührt. Der entstandene Niederschlag wurde abfiltriert, mit DCM gewaschen und anschließend lyophilisiert. Das Produkt konnte in einer Ausbeute von 70 % (1.16 g, 3.43 mmol) erhalten werden.

Ausbeute: 70 % (1.16 g, 3.43 mmol). **Smp:** 137 °C. **¹H-NMR** (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 2.96–3.24 (m, 2H, CH₂CHNH), 4.12–4.21 (m, 1H, CH₂CHNH), 4.97 (s, 2H, Cbz-CH₂), 6.95–7.34 (m, 10H, Ar-CH, Cbz-CH), 7.54 (d, 1H, ³J_{HH} = 7.8 Hz, CH₂CHNH), 10.82 (s, 1H, Ar-NH) ppm. **¹³C-NMR** (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 27.0 (CH₂CHNH), 55.3 (CH₂CHNH), 65.0 (Cbz-CH₂), 110.4 (C_q), 111.2 (CH), 118.2 (CH), 120.6 (CH), 123.5 (CH), 127.3 (C_q), 127.4 (CH), 127.6 (CH), 128.2 (CH), 136.0, 137.0, 155.7, 173.7 (C_q) ppm. **FT-IR:** $\tilde{\nu}$ = 3436 (w), 3324 (w), 1694 (s), 1538 (m), 1456 (m), 1246 (m), 1071 (m), 1048 (m), 1011 (m), 735 (s), 698 (s), 668 (s) cm⁻¹. **HR-MS** (pos. ESI) berechnet für C₁₉H₁₉N₂NaO₄⁺ [M-Na⁺] 361.1159; gefunden 361.1174.

Darstellung von Verbindung 94

Eine Lösung aus Cbz-Tryptophan **93** (300 mg, 887 μmol , 1.0 Äq), PyBOP (922 mg, 1.77 mmol, 2.0 Äq), NMM (358 mg, 3.55 mol, 4.0 Äq) und 4-DMAP (kat.) in DMF (2 ml) wurde 15 min bei RT gerührt. Dann wurde Verbindung **92** (394 mg, 1.77 μmol , 2.0 Äq) zugegeben und 16 h bei RT gerührt. Anschließend wurde mit H_2O (15 ml) hydrolysiert, der Niederschlag abfiltriert und in wenigen Millilitern Methanol aufgenommen. Mit H_2O wurde das Produkt wieder ausgefällt, der Niederschlag abfiltriert, in H_2O suspendiert und an der Lyophile getrocknet. Anschließend wurde der Rückstand mittels Säulenchromatographie gereinigt (RP-18, $\text{H}_2\text{O}/\text{MeOH}$, Gradient). Das Produkt konnte mit einer Ausbeute von 65 % (313 mg, 577 μmol) erhalten werden.

Ausbeute: 65 % (313 mg, 577 μmol). **Smp:** 96 °C. **$^1\text{H-NMR}$** (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ = 1.40 (s, 9H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 2.96–3.18 (m, 2H, CH_2CHNH), 4.10 (d, 2H, CH_2NH), 4.44–4.51 (m, 1H, CHCH_2), 4.97 (dd, 2H, $^4J_{\text{HH}} = 12.6$ Hz, Cbz- CH_2), 6.92–7.60 (m, 16H, Ar-CH, Cbz-CH, CH_2NH), 7.70 (d, 1H, $^3J_{\text{HH}} = 7.8$ Hz, CH_2CHNH), 10.15 (s, 1H, C_qNH), 10.81 (s, 1H, Ar-NH) ppm. **$^{13}\text{C-NMR}$** (75 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ = 27.7 (CH_2), 28.2 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 43.4 (CH_2), 56.1 (CH), 65.2 (CH_2), 77.7 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 109.8 (C_q), 111.2, 117.7, 117.9, 118.1, 118.5, 120.8, 121.9, 123.9 (CH), 127.1 (C_q), 127.5, 127.6, 128.2, 128.4 (CH), 135.9, 136.8, 140.7, 155.7, 155.8, 170.8 (C_q) ppm. **FT-IR:** $\tilde{\nu}$ = 3399 (m), 3299 (m), 2976 (w), 2932 (w), 1672 (s), 1614 (m), 1509 (s), 1489 (s), 1441 (s), 1364 (m), 1245 (s), 1160 (s), 1048 (m), 738 (s), 694 (s), cm^{-1} . **HR-MS** (pos. ESI) berechnet für $\text{C}_{31}\text{H}_{34}\text{N}_4\text{NaO}_5^+$ [M- Na^+] 565.2421; gefunden 565.2457.

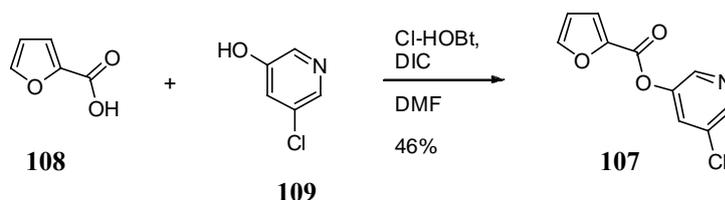
Darstellung von Verbindung **95**

Verbindung **94** (200 mg, 368 μmol) wurde in eisgekühlter TFA (2 ml) 1 h lang bei 0 °C gerührt. Mittels DC-Kontrolle wurde die Vollständigkeit der Reaktion überprüft und anschließend die überschüssige TFA im Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde in H_2O aufgenommen und lyophilisiert. Verbindung **95** konnte als TFA-Salz mit einer Ausbeute von 99 % (203 mg, 365 μmol) erhalten werden.

Ausbeute: 99 % (203 mg, 365 μmol). **Smp:** 110 °C. **$^1\text{H-NMR}$** (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ = 2.99–3.17 (m, 2H, CH_2CHNH), 4.00 (d, 2H, $^3J_{\text{HH}} = 5.3$ Hz, CH_2NH_3^+), 4.46–4.51 (m, 1H, CHCH_2), 4.97 (dd, 2H, $^4J_{\text{HH}} = 12.6$ Hz, Cbz- CH_2), 6.97–7.39 (m, 11H, Ar- CH , Cbz- CH), 7.54 (d, 1H, $^3J_{\text{HH}} = 8.1$ Hz, Ar- CH), 7.62 (d, 1H, $^3J_{\text{HH}} = 7.9$ Hz, Ar- CH), 7.69 (d, 1H, $^3J_{\text{HH}} = 7.9$ Hz, Ar- CH), 7.81 (br.s, 1H, NH), 8.19 (s, 3H, NH_3^+), 10.28 (s, 1H, NH), 10.85 (s, 1H, NH) ppm. **$^{13}\text{C-NMR}$** (75 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ = 27.7 (CH_2), 42.4 (CH_2), 56.1 (CH), 65.3 (CH_2), 109.7 (C_q), 111.2 (CH), 118.1 (CH), 118.5 (CH), 119.5 (CH), 119.9 (CH), 120.8 (CH), 123.7 (CH), 123.9 (CH), 127.5 (C_q), 127.5 (CH), 127.7 (CH), 128.2 (CH), 129.0 (CH), 134.4, 135.9, 136.8, 139.1, 155.9, 171.1 (C_q) ppm. **FT-IR:** $\tilde{\nu}$ = 3279 (m), 3041 (m), 2905 (w), 1667 (s), 1616 (m), 1517 (m), 1444 (m), 1339 (w), 1199 (s), 1184 (s), 1130 (s), 835 (m), 793 (m), 736 (s), 722 (s), 696 (s), 620 (s) cm^{-1} . **HR-MS** (pos. ESI) berechnet für $\text{C}_{26}\text{H}_{27}\text{N}_4\text{O}_3^+$ [M-H^+] 443.2078; gefunden 443.2133.

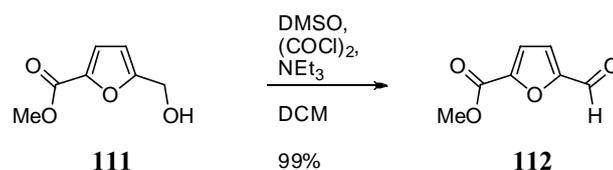
7.2.2 DARSTELLUNG DER FESTPHASENINHIBITOREN

7.2.2.1 Synthesen der Furanverbindungen für die Festphasensynthese

Darstellung von Verbindung 107

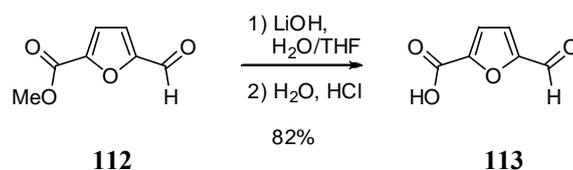
Furan-2-carbonsäure **108** (100 mg, 892 μmol , 1.0 $\text{\AA}q$) wurde zusammen mit Cl-HOBT (227 mg, 1.34 mmol, 1.5 $\text{\AA}q$), DIC (169 mg, 1.34 mmol, 1.5 $\text{\AA}q$) und 5-Chloro-3-hydroxypyridin **109** (231 mg, 1.78 mmol, 2.0 $\text{\AA}q$) in abs. DMF (3 ml) gelöst und für 7 h auf 60 °C erhitzt. Anschließend wurde noch weitere 16 h bei RT gerührt. Nach der Zugabe von H₂O (10 ml) wurde 15 min weiter gerührt, EE (20 ml) zugegeben und die Phasen getrennt. Die wässrige Phase wurde mit EE extrahiert (3 \times 20 ml), die vereinigten organischen Phasen über MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der resultierende Feststoff wurde säulenchromatographisch gereinigt (SiO₂, DCM/Cy/EE, 5/3/2). Das Produkt wurde als farbloser Feststoff mit einer Ausbeute von 46 % (91.0 mg, 407 μmol) erhalten.

Ausbeute: 46 % (91.0 mg, 407 μmol). **Smp:** 92 °C. **¹H-NMR** (300 MHz, CDCl₃): δ = 6.63 (dd, 1H, ³J_{HH} = 1.7 Hz, 3.6 Hz, Fu-CH (C4)), 7.43 (t, 1H, ³J_{HH} = 3.5 Hz, ⁴J_{HH} = 0.8 Hz, Fu-CH (C3)), 7.68 (q, 1H, ⁴J_{HH} = 2.2 Hz, Ar-CH), 7.72 (dd, 1H, ³J_{HH} = 1.7 Hz, ⁴J_{HH} = 0.8 Hz, Fu-CH (C5)), 8.46 (d, 1H, ⁴J_{HH} = 2.3 Hz, Ar-CH), 8.50 (d, 1H, ⁴J_{HH} = 2.0 Hz, Ar-CH) ppm. **¹³C-NMR** (75 MHz, CDCl₃): δ = 112.5 (Fu-CH), 120.7 (Fu-CH), 129.6 (Ar-CH), 131.9 (C_q), 141.1 (Ar-CH), 142.8 (C_q), 146.0 (Ar-CH), 146.8 (C_q), 147.9 (Ar-CH), 155.7 (C_q) ppm. **FT-IR:** $\tilde{\nu}$ = 3135 (w), 3107 (w), 3067 (w), 3046 (w), 1737 (s), 1566 (m), 1469 (m), 1424 (m), 1392 (m), 1294 (s), 1231 (m), 1176 (m), 1083 (s), 1029 (s), 892 (s), 764 (s), 691 (m) cm⁻¹. **HR-MS** (pos. ESI) berechnet für C₁₀H₇ClNO₃⁺ [M-H⁺] 224.0109; gefunden 224.0137.

Darstellung von Verbindung 112

Frisch destilliertes Oxalylchlorid (894 mg, 7.04 mmol, 1.1 Äq) wurde in abs. DCM (20 ml) vorgelegt und auf unter $-60\text{ }^{\circ}\text{C}$ gekühlt. Dann wurde DMSO (1.20 g, 15.4 mmol, 2.4 Äq) so zugetropft, dass die Temperatur nicht über $-60\text{ }^{\circ}\text{C}$ anstieg. Anschließend wurde 10 min gerührt und dann der Furanalkohol **111** (1.00 g, 6.40 mmol, 1.0 Äq), gelöst in abs. DCM (10 ml) über 10 min hinweg zugetropft. Danach wurden weitere 25 min gerührt und daraufhin Et_3N (3.24 g, 32.0 mmol, 5.0 Äq) über 10 min hinweg zugetropft. Anschließend wurde das Kältebad entfernt und man ließ auf RT erwärmen. Jetzt wurde H_2O (25 ml) zugegeben und 15 min Rühren gelassen. Die Phasen wurden getrennt und die wässrige Phase mit DCM extrahiert ($4 \times 15\text{ ml}$). Die organischen Phasen wurden vereinigt, das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und der überbleibende Feststoff säulenchromatographisch gereinigt (SiO_2 , DCM/Cy/EE, 5/4/1). Das Produkt konnte mit einer Ausbeute von 99 % (984 mg, 6.38 mmol) erhalten werden.

Ausbeute: 99 % (984 mg, 6.38 mmol). **Smp:** $96\text{ }^{\circ}\text{C}$. **$^1\text{H-NMR}$** (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): $\delta = 3.88$ (s, 3H, OCH_3), 7.49 (d, 1H, $^3J_{\text{HH}} = 3.7\text{ Hz}$, Fu-CH), 7.62 (d, 1H, $^3J_{\text{HH}} = 3.7\text{ Hz}$, Fu-CH), 9.75 (s, 1H, COH) ppm. **$^{13}\text{C-NMR}$** (75 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): $\delta = 52.4$ (OCH_3), 119.0 (Fu-CH), 122.0 (Fu-CH), 146.6, 153.4, 157.9 (C_q), 180.0 (CHO) ppm. **FT-IR:** $\tilde{\nu} = 3156$ (w), 3138 (w), 3120 (w), 2957 (w), 1723 (s), 1678 (s), 1567 (m), 1507 (m), 1437 (m), 1294 (m), 1252 (m), 1207 (m), 1140 (m), 1018 (s), 963 (s), 831 (m), 763 (s) cm^{-1} . **HR-MS** (pos. ESI) berechnet für $\text{C}_7\text{H}_6\text{NaO}_4^+$ $[\text{M-Na}^+]$ 177.0158; gefunden 177.0179.

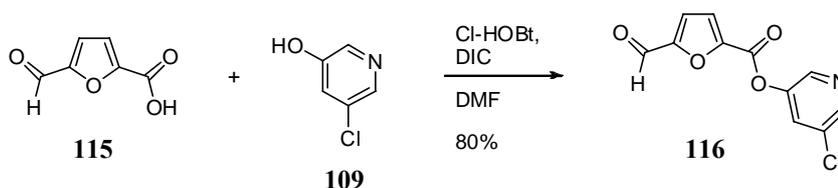
Darstellung von Verbindung 113

Furanaldehyd **112** (2.00 g, 13.0 mmol, 1.0 Äq) wurde in einem Gemisch aus THF und H_2O (175 ml, 4/1) gelöst. Dann wurde LiOH (341 mg, 14.3 mmol, 1.1 Äq) zugegeben und bei RT 15 min gerührt. Anschließend wurden 150 ml H_2O zugegeben und das THF

im Vakuum entfernen. Zu der wässrigen Lösung wurde dann HCl_{aq} (3N) gegeben (14.3 mmol, 1.1 Äq) und das Gemisch gefriergetrocknet. Der Feststoff wurde anschließend säulenchromatographisch gereinigt (RP-18, $\text{H}_2\text{O}/\text{MeOH}$, Gradient). Das Produkt wurde als farbloser Feststoff in einer Ausbeute von 91 % (1.66 g, 11.8 mmol) erhalten.

Ausbeute: 91 % (1.66 g, 11.8 mmol). **Smp:** 194 °C (Zersetzung). **$^1\text{H-NMR}$** (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ = 7.37 (d, 1H, $^3J_{\text{HH}} = 3.7$ Hz, Fu-CH), 7.59 (d, 1H, $^3J_{\text{HH}} = 3.7$ Hz, Fu-CH), 9.72 (s, 1H, COH) ppm. **$^{13}\text{C-NMR}$** (75 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ = 118.3 (Fu-CH), 122.3 (Fu-CH), 148.4, 153.1, 158.9 (COOH, C_q), 179.8 (COH) ppm. **FT-IR:** $\tilde{\nu}$ = 3409 (br.w), 3138 (w), 3103 (w), 2874 (w), 2620 (w), 1723 (s), 1636 (s), 1566 (m), 1513 (m), 1415 (m), 1248 (s), 1207 (s), 1157 (s), 957 (s), 834 (s), 768 (s) cm^{-1} . **HR-MS** (neg. ESI) berechnet für $\text{C}_6\text{H}_3\text{O}_4^-$ [M^-] 139.0037; gefunden 139.0037.

Darstellung von Verbindung 116

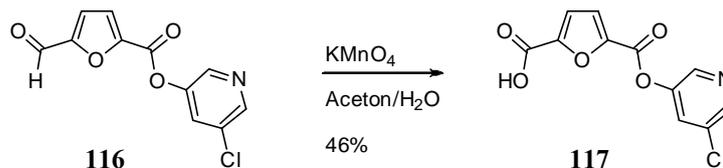


Furancarbonsäure **115** (500 mg, 3.57 mmol, 1.0 Äq) wurde zusammen mit Cl-HOBt (910 mg, 5.35 mmol, 1.5 Äq), DIC (675 mg, 5.35 mmol, 1.5 Äq) und 5-Chloro-3-hydroxypyridin **109** (925 mg, 7.15 mmol, 2.0 Äq) in DMF (10 ml) gelöst und 2 h auf 60 °C erhitzt. Anschließend wurde die Reaktionsmischung auf RT abgekühlt und weitere 3.5 h bei RT gerührt. Dann wurde H_2O (30 ml) zugegeben und 15 min gerührt, danach EE (30 ml) zugegeben und die Phasen getrennt. Die wässrige Phase wurde mit EE extrahiert (3×30 ml), die organischen Phasen vereinigt, mit MgSO_4 getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Der Rückstand wurde mittels Säulenchromatographie gereinigt (SiO_2 , $\text{DCM}/\text{Cy}/\text{EE}$, 5/3/2) und das Produkt **116** als farbloser Feststoff in einer Ausbeute von 80 % (719 mg, 2.86 mmol) erhalten.

Ausbeute: 80 % (719 mg, 2.86 mmol). **Smp:** 119 °C. **$^1\text{H-NMR}$** (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ = 7.72 (d, 1H, $^3J_{\text{HH}} = 3.8$ Hz, Fu-CH), 7.78 (d, 1H, $^3J_{\text{HH}} = 3.8$ Hz, Fu-CH), 8.16 (t, 1H, $^4J_{\text{HH}} = 2.2$ Hz, Ar-CH), 8.64 (q, 2H, $^4J_{\text{HH}} = 2.2$ Hz, Ar-CH), 9.82 (s, 1H, COH) ppm. **$^{13}\text{C-NMR}$** (75 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ = 121.2 (Fu-CH), 122.1 (Fu-CH), 130.0 (CH), 130.8 (C_q), 141.9 (CH), 145.2 (C_q), 146.2 (CH), 146.4 (C_q), 154.0 (C_q), 155.5 (C_q), 180.1

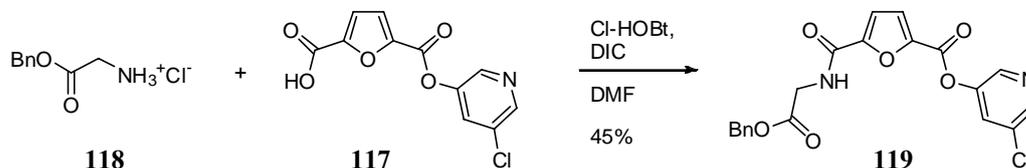
(COH) ppm. **FT-IR:** $\tilde{\nu}$ = 3139 (w), 3105 (w), 3033 (w), 2868 (w), 1742 (s), 1681 (s), 1560 (m), 1422 (m), 1293 (m), 1240 (s), 1038 (s), 961 (s), 847 (s), 756 (s), 687 (s) cm^{-1} . **HR-MS** (pos. ESI) berechnet für $\text{C}_{11}\text{H}_6\text{ClNNaO}_4^+$ $[\text{M}-\text{Na}^+]$ 273.9878; gefunden 273.9911; berechnet für $\text{C}_{11}\text{H}_7\text{ClNO}_4^+$ $[\text{M}-\text{H}^+]$ 252.0058; gefunden 252.0103.

Darstellung von Verbindung **117**



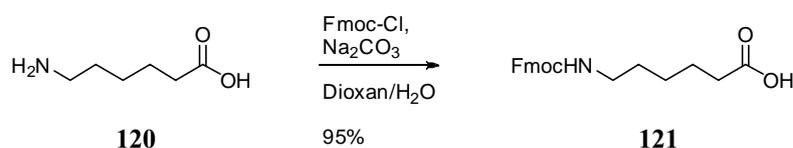
Verbindung **116** (500 mg, 1.99 mmol, 1.0 Äq) wurde in einem Gemisch aus Aceton und H_2O (20 ml, 9/1) gelöst und auf 40 °C erwärmt. Dann wurde KMnO_4 (940 mg, 5.96 mmol, 3.0 Äq) auf einmal zugegeben und 1 h gerührt. Anschließend wurde die Lösung mit H_2O (15 ml) verdünnt, der Braunstein abfiltriert und mit H_2O nachgewaschen. Die Waschlösung wurde mit konz. HCl angesäuert und der ausfallende Feststoff abfiltriert, welcher anschließend an der Lyophile getrocknet wurde. Das Produkt konnte in einer Ausbeute von 46 % (241 mg, 904 μmol) erhalten werden.

Ausbeute: 46 % (241 mg, 904 μmol). **Smp:** 207 °C. **$^1\text{H-NMR}$** (300 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ = 7.44 (d, 1H, $^3J_{\text{HH}} = 3.7$ Hz, Fu-CH), 7.71 (d, 1H, $^3J_{\text{HH}} = 3.7$ Hz, Fu-CH), 8.16 (t, 1H, $^4J_{\text{HH}} = 2.2$ Hz, Ar-CH), 8.63 (d, 2H, $^4J_{\text{HH}} = 2.2$ Hz, Ar-CH), 8.64 (d, 2H, $^4J_{\text{HH}} = 2.0$ Hz, Ar-CH), 13.89 (s, 1H, COOH) ppm. **$^{13}\text{C-NMR}$** (75 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ = 118.5 (Fu-CH), 121.2 (Fu-CH), 130.0 (CH), 130.7 (C_q), 141.9 (CH), 144.1 (C_q), 146.1 (CH), 146.4 (C_q), 148.3 (C_q), 155.3 (C_q), 158.5 (COOH) ppm. **FT-IR:** $\tilde{\nu}$ = 3133 (w), 3074 (w), 2464 (br.w), 1756 (m), 1739 (s), 1711 (m), 1571 (m), 1420 (m), 1279 (s), 1266 (s), 1217 (s), 1092 (s), 1023 (s), 957 (s), 902 (m), 890 (m), 746 (s), 684 (s) cm^{-1} . **HR-MS** (neg. ESI) berechnet für $\text{C}_{11}\text{H}_5\text{ClNO}_5^-$ $[\text{M}]^-$ 265.9862; gefunden 265.9852.

Darstellung von Verbindung 119

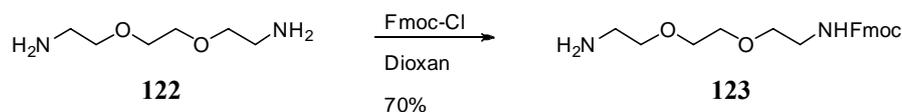
Verbindung **117** (20.0 mg, 75.0 μmol , 1.0 \AA q) wurde zusammen mit Cl-HOBt (14.2 mg, 113 μmol , 1.5 \AA q), DIC (19.1 mg, 113 μmol , 1.5 \AA q) und H-Gly-OBn \cdot HCl **118** (30.3 mg, 150 μmol , 2.0 \AA q) in abs. DMF (2 ml) gelöst und für 2 h auf 60 °C erhitzt. Anschließend wurde noch weitere 3 h bei RT gerührt. Nach Zugabe von H₂O (10 ml) wurde 15 min weiter gerührt, EE (10 ml) zugegeben und die Phasen getrennt. Die wässrige Phase wurde mit EE extrahiert (3 \times 10 ml), die vereinigten organischen Phasen über MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der resultierende Feststoff wurde mittels Säulenchromatographie gereinigt (SiO₂, DCM/EE/Cy, 5/3/2). Das Produkt wurde als farbloser Feststoff mit einer Ausbeute von 45 % (14.0 mg, 34.0 μmol) erhalten.

Ausbeute: 45 % (14.0 mg, 34.0 μmol). **Smp:** 168 °C. **¹H-NMR** (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 4.10 (d, 2H, ³J_{HH} = 6.0 Hz, NHCH₂), 5.17 (s, 2H, Bn-CH₂), 7.33–7.42 (m, 6H, Bn-CH, Fu-CH), 7.72 (d, 1H, ³J_{HH} = 3.7 Hz, Fu-CH), 8.16 (t, 1H, ⁴J_{HH} = 2.2 Hz, Ar-CH), 8.64 (q, 2H, ⁴J_{HH} = 2.3 Hz, Ar-CH), 9.21 (t, 1H, ³J_{HH} = 6.0 Hz, NHCH₂) ppm. **¹³C-NMR** (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 40.7 (NHCH₂), 65.9 (Bn-CH₂), 115.3 (Fu-CH), 121.6 (Fu-CH), 127.8, 128.0, 128.3 (Bn-CH), 130.1 (Ar-CH), 130.7 (*C*_q), 135.7 (*C*_q), 142.0 (Ar-CH), 143.1 (*C*_q), 146.1 (Ar-CH), 146.5, 150.6, 155.3, 157.1, 169.2 (*C*_q) ppm. **FT-IR:** $\tilde{\nu}$ = 3242 (br.w), 3053 (w), 2936 (w), 1742 (s), 1652 (s), 1495 (m), 1422 (m), 1288 (s), 1212 (s), 1095 (s), 1024 (s), 906 (m), 846 (m), 733 (m), 691 (s) cm⁻¹. **HR-MS** (pos. ESI) berechnet für C₂₀H₁₅ClN₂NaO₆⁺ [M-Na⁺] 437.0511; gefunden 437.0543.

Darstellung von Verbindung 121

In H₂O (50 ml) wurde 6-Aminohexansäure **120** (1.00 g, 7.62 mmol, 1.0 Äq) und Na₂CO₃ (3.23 g, 30.5 mmol, 4.0 Äq) gelöst, auf 0 °C gekühlt und Dioxan (10 ml) zugegeben. Dann wurde Fmoc-Cl (1.97 g, 7.62 mol, 1.0 Äq) gelöst in Dioxan (25 ml) über 2 min hinweg zugetropft und anschließend 2 h bei 0 °C dann 2 h bei RT gerührt. Daraufhin wurde die Reaktionsmischung in H₂O (150 ml) gegossen und mit Et₂O (4 × 60 ml) extrahiert. Die wässrige Phase wurde dann erneut auf 0 °C gekühlt und mit konz. HCl angesäuert. Anschließend wurde EE (100 ml) zugegeben, die Phasen getrennt und die wässrige Phase mit EE (3 × 100 ml) extrahiert. Die vereinten organischen Phasen wurden über MgSO₄ getrocknet, das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und der zurückbleibende Feststoff über Phosphorpentoxid getrocknet. Das Produkt **121** wurde mit einer Ausbeute von 95 % (2.57 g, 7.27 mmol) erhalten.

Ausbeute: 95 % (2.57 g, 7.27 mmol). **Smp:** 125 °C. **¹H-NMR** (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 1.20–1.28 (m, 2H, CH₂), 1.34–1.53 (m, 4H, CH₂), 2.18 (t, 2H, ³J_{HH} = 7.3 Hz, NHCH₂), 2.95 (q, 2H, ³J_{HH} = 6.6 Hz, CH₂COOH), 4.17–4.29 (m, 3H, CHCH₂, CHCH₂), 7.25 (t, 1H, ³J_{HH} = 7.2, NHCH), 7.31 (t, 2H, ³J_{HH} = 7.4 Hz, Fmoc-CH), 7.40 (t, 2H, ³J_{HH} = 7.1 Hz, Fmoc-CH), 7.67 (d, 2H, ³J_{HH} = 7.4 Hz, Fmoc-CH), 7.87 (d, 2H, ³J_{HH} = 7.3 Hz, Fmoc-CH), 11.98 (s, 1H, COOH) ppm. **¹³C-NMR** (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 24.4, 25.9, 29.4, 34.1, 40.0 (CH₂), 46.8 (Fmoc-CH₂CH), 109.7 (CHCH₂), 120.0, 121.3, 127.3, 128.9 (Fmoc-CH), 137.4, 139.4, 142.6, 157.1, 174.8 (C_q) ppm. **FT-IR:** $\tilde{\nu}$ = 3338 (m), 2950 (w), 2874 (w), 2656 (w), 1686 (s), 1529 (s), 1449 (m), 1269 (s), 1252 (s), 1236 (s), 1130 (m), 1100 (m), 995 (m), 936 (m), 759 (m), 736 (s) cm⁻¹. **HR-MS** (pos. ESI) berechnet für C₂₁H₂₃NNaO₄⁺ [M-Na⁺] 376.1519; gefunden 376.1562; berechnet für C₂₁H₂₄NO₄⁺ [M-H⁺] 354.1700; gefunden 354.1732.

Darstellung von Verbindung 123

Zu einer Lösung aus 2,2'-(Ethylenedioxy)bis(ethylamine) **122** (11.46 g, 77.4 mmol, 10.0 Äq) und Dioxan (40 ml) wurde Fmoc-Cl (2.00 g, 7.74 mmol, 1.0 Äq) gelöst in Dioxan (80 ml) über 5 h hinweg zugetropft. Die Reaktionsmischung wurde 16 h bei RT gerührt und anschließend das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde in DCM (100 ml) gelöst und mit H₂O (3 × 100 ml) extrahiert. Die wässrige Phase wurde noch einmal mit DCM gewaschen (100 ml), die vereinten organischen Phasen über Na₂SO₄ getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Mittels Säulenchromatographie (SiO₂, DCM/MeOH + 0.05 % TFA, 8/2) wurde der Rückstand gereinigt und man erhielt das Produkt **123** mit einer Ausbeute von 70 % (1.99 g, 5.37 mmol).

Ausbeute: 70 % (1.99 g, 5.37 mmol). **¹H-NMR** (300 MHz, CDCl₃): δ = 2.94–3.98 (m, 3H, NH₃⁺), 3.48–3.62 (m, 14H, CH₂CH, CH₂CH₂), 4.32 (t, 1H, ³J_{HH} = 6.4 Hz, CH₂CH), 7.33 (t, 2H, ³J_{HH} = 7.4 Hz, Fmoc-CH), 7.40 (t, 2H, ³J_{HH} = 7.1 Hz, Fmoc-CH), 7.65 (d, 2H, ³J_{HH} = 7.0 Hz, Fmoc-CH), 7.73 (d, 2H, ³J_{HH} = 7.1 Hz, Fmoc-CH) ppm. **¹³C-NMR** (75 MHz, CDCl₃): δ = 39.7 (CH₂), 45.3 (Fmoc-CH₂CH), 49.0, 51.0, 66.2, 66.5, 69.8, 70.0 (CH₂), 120.4, 124.9, 127.8, 128.4 (CH), 141.3, 143.1, 161.9 (C_q) ppm. **FT-IR:** $\tilde{\nu}$ = 3432 (br.w), 2885 (br.w), 1670 (s), 1450 (m), 1428 (m), 1199 (s), 1176 (s), 1123 (s), 834 (m), 798 (m), 720 (s) cm⁻¹. **HR-MS** (pos. ESI) berechnet für C₂₁H₂₆N₂NaO₄⁺ [M-Na⁺] 393.1785; gefunden 393.2519.

7.2.2.2 Allgemeine Vorgehensweisen bei der Festphasensynthese

Alle Festphasensynthesen wurden mit Hilfe einer Mikrowelle bei 20 W Leistung und 60 °C durchgeführt, wobei die jeweilige Reaktionszeit für Abspaltung und Kupplung variierte.

Fmoc-Abspaltung

Die Fmoc-Schutzgruppe wurde mit einer Piperidin/DMF-Lösung (20 %) abgespalten (2×5 ml, 1 und 5 min). Daraufhin folgten 4–6 Waschgänge mit DMF (10 ml) um Piperidinrückstände vollständig zu entfernen. Mit einem Kaiser-Test wurde die Vollständigkeit der Reaktion überprüft.

Farb-Tests:

Detektion freier Aminogruppen am Harz (Kaiser-Test)¹⁴⁴

Der Kaiser-Test dient zur Detektion von freien Aminogruppen. Dazu wurden zwei Lösungen bestehend aus Ninhydrin (1.00 g) in EtOH (10 ml) und Phenol (40.0 g) in EtOH (10 ml) separat angesetzt. Jeweils 0.2 ml beider Lösungen wurden zu einigen Harzkügelchen gegeben und für 2–3 min auf 100 °C erhitzt. Befanden sich freie Aminogruppen ($-\text{NH}_2$) auf dem Polymer verfärbten sich die Kügelchen rot bis dunkel blau, andernfalls blieben sie farblos und durchsichtig.

Detektion freier Carboxylatgruppen am Harz (Malachitgrün-Test)¹⁴⁵

Der Malachitgrün-Test zeigt festphasengebundene Carboxylatgruppen ($-\text{COOH}$) an. Dazu wurde eine Lösung aus Malachitgrün (125 mg) in EtOH (50 ml) hergestellt und 0.2 ml der Lösung zusammen mit einem Tropfen Et_3N zu einigen Harzkügelchen gegeben. Nach 2 min bei RT wurde die überstehende Lösung abdekantiert und das Harz solange mit EtOH nachgewaschen bis die Lösung farblos blieb. Freie Carboxylatfunktionen wurden durch eine intensive Grünfärbung der Kügelchen angezeigt.

*Abspalten der *t*-Butyl- und Boc-Schutzgruppen*

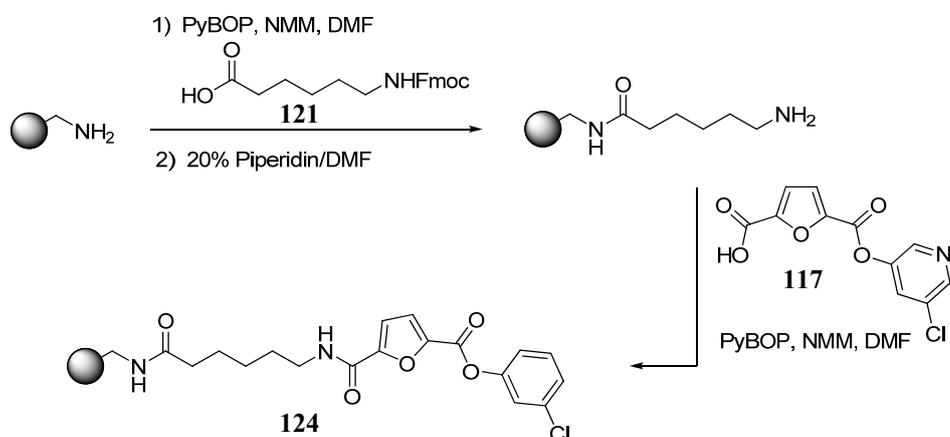
Zum Entfernen der *t*-Butyl- und Boc-Schutzgruppen wurde das Harz in einen Schüttelkolben überführt, mit einer Lösung aus TFA (95 %), H_2O (2.5 %) und TIS

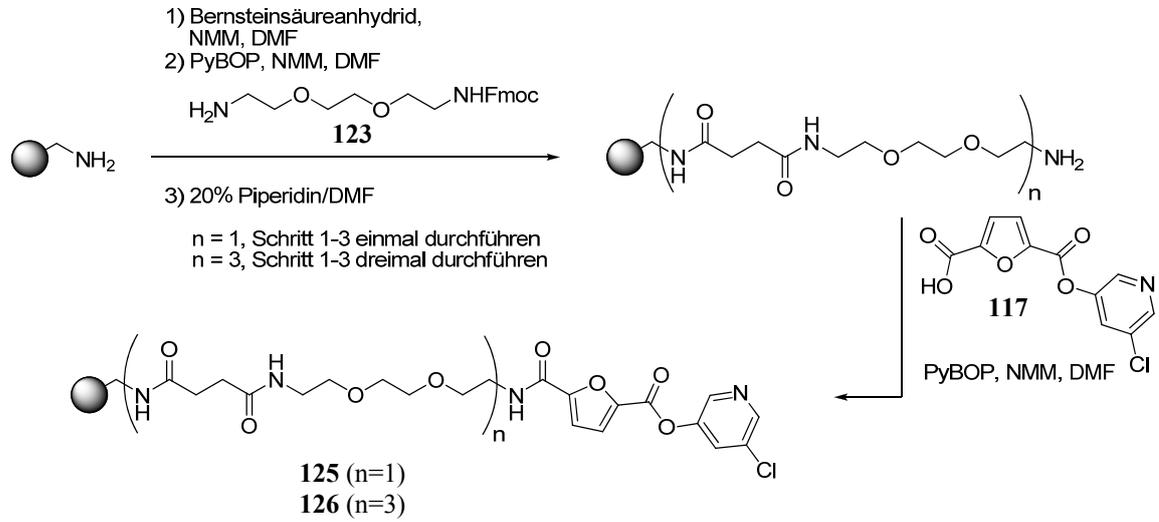
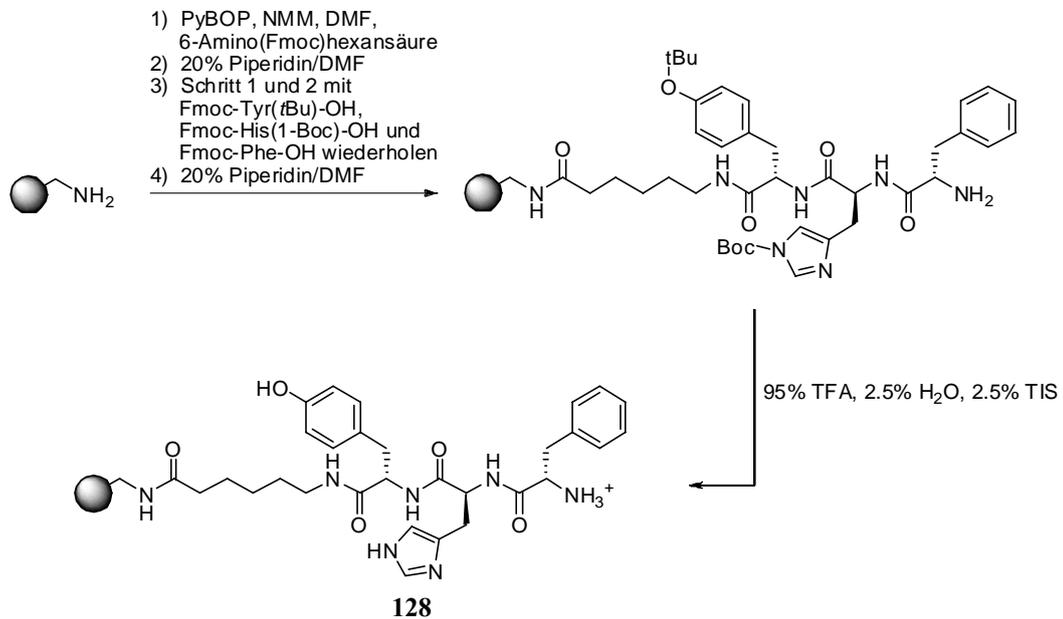
(2.5 %) (5 ml) versetzt und bei RT geschüttelt (2×2 h). Das Harz wurde abfiltriert, mit DCM (3×10 ml) MeOH (3×10 ml) und DCM (3×10 ml) gründlich gewaschen und anschließend gefriergetrocknet.

7.2.2.3 Synthese der Testinhibitoren **124**, **125** und **126** und der Tripeptide **128**, **129** und **130**

Zu Beginn wurde das in EtOH vorgequollene PEGA-Harz (1.00 g) in EtOH (15 ml) suspendiert und jeweils 1.5 ml (entspricht ca. 100 mg Harz) der isopyknischen Lösung in ein Reaktionsgefäß überführt. Das Lösungsmittel wurde mittels Membranpumpe entfernt und mit DMF (3×10 ml) nachgewaschen. Alle folgenden Kupplungsschritte wurden zweimal durchgeführt, um eine möglichst vollständige Umsetzung zu gewährleisten. Die Reaktionszeit für jede Kupplung betrug 20 min. Als Kupplungsreagenz wurde PyBOP (3.0 Äq) und als Base NMM (4.0 Äq), bei Bernsteinsäureanhydrid nur NMM (4.0 Äq) verwendet. Nach jedem Kupplungs- und Abspaltungsschritt wurde ein Kaiser-Test und/oder Malachitgrün-Test (siehe *Abschnitt 7.2.2.2*) durchgeführt. Die Fmoc-geschützten Aminosäuren bzw. Kupplungsbausteine wurden in 3-fachem Überschuss eingesetzt, wobei das Volumen der Reaktionslösung nach Möglichkeit so angepasst wurde, dass eine Konzentration zwischen 0.18–0.20 mmol vorlag. Nach der letzten Kupplung wurde mit DMF (3×10 ml), DCM (3×10 ml), MeOH (3×10 ml), Et₂O (2×10 ml) und DCM (3×10 ml) gründlich gewaschen und das Harz im Vakuum getrocknet.

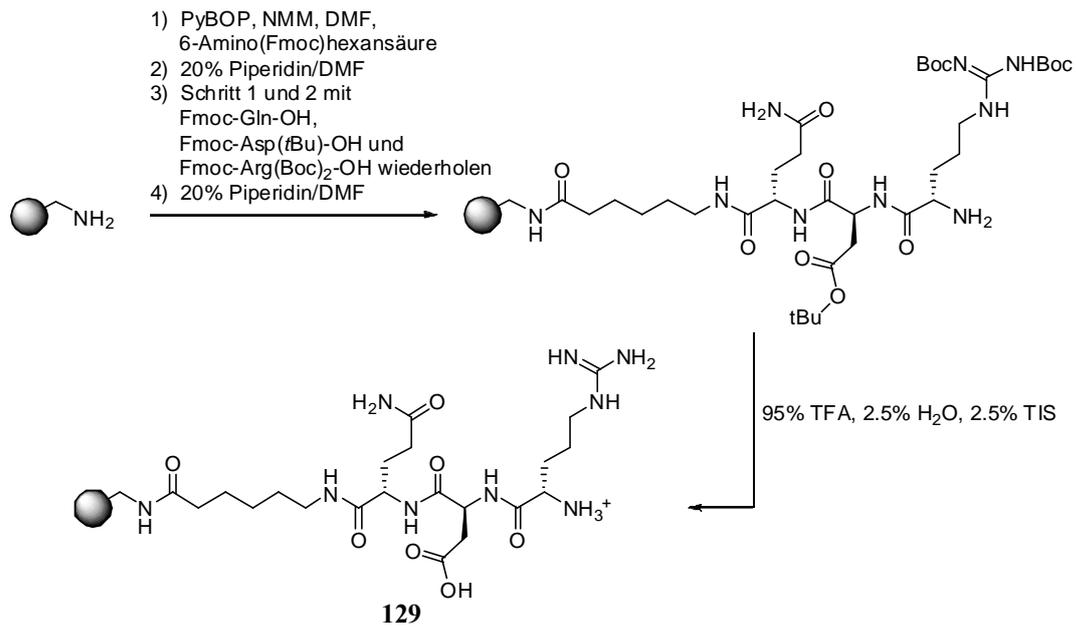
Verbindung **124**



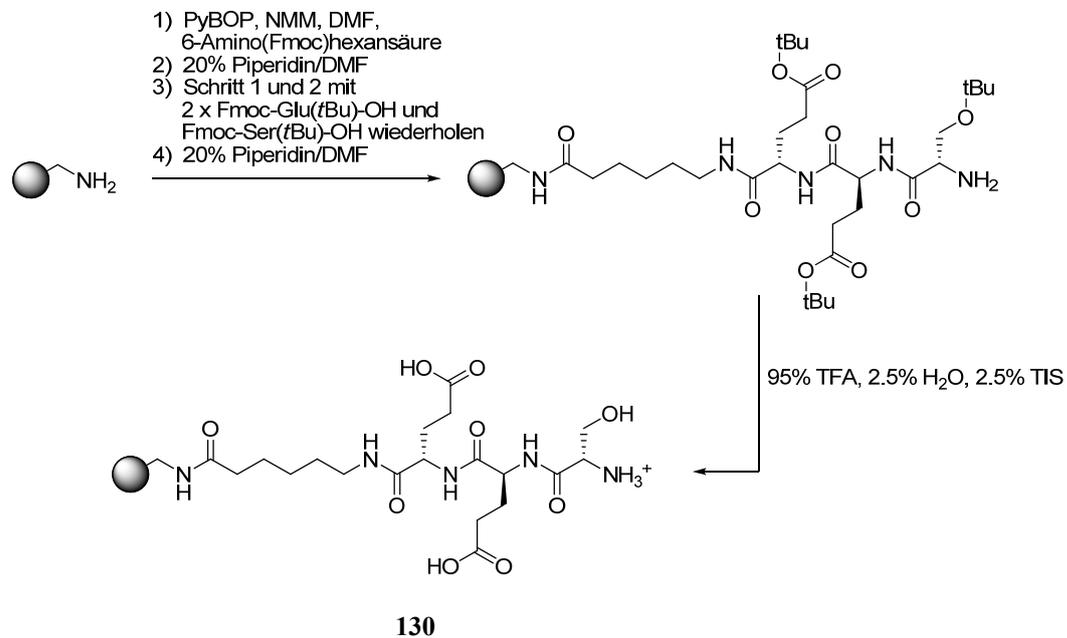
Verbindungen 125 und 126Tripeptid 128

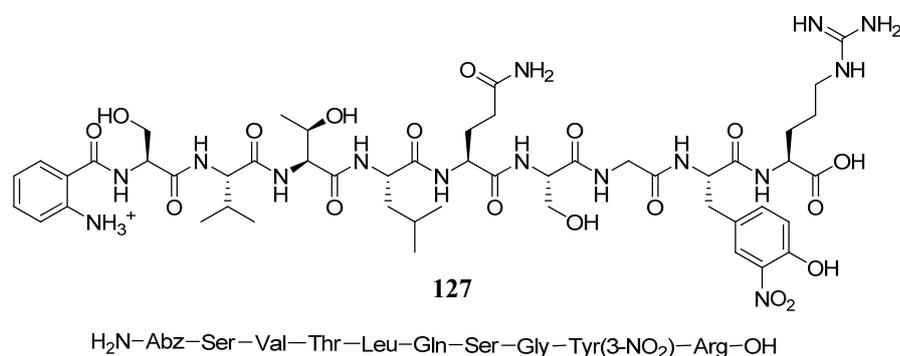
7. Experimenteller Teil

Tripeptid **129**



Tripeptid **130**



7.2.2.4 Synthese des FRET-Substrats **127**

In ein Reaktionsgefäß wurde Fmoc-Arg(Pbf)-Wang Harz (500 mg, Beladung 0.69 mmol/g) eingewogen und 1 h in DMF (10 ml) quellen gelassen. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und mit DMF (3 × 10 ml) nachgewaschen. Anschließend wurde die Fmoc-Schutzgruppe abgespalten (s.o.). Alle folgenden Kupplungsschritte wurden zweimal durchgeführt, um eine möglichst vollständige Umsetzung zu gewährleisten. Die Reaktionszeit für jede Kupplung betrug 20 min. Als Kupplungsreagenz wurde PyBOP (3.0 Äq) und als Base NMM (4.0 Äq) verwendet. Nach jedem Kupplungs- und Abspaltungsschritt wurde ein Kaiser-Test (s.o.) durchgeführt. Die Fmoc-geschützten Aminosäuren wurden in 3-fachem Überschuss eingesetzt, wobei das Volumen der Reaktionslösung nach Möglichkeit so angepasst wurde, dass eine Konzentration zwischen 0.18–0.20 mmol/l vorlag. Nach der letzten Kupplung wurde mit DMF (3 × 10 ml), DCM (3 × 10 ml), MeOH (3 × 10 ml), Et₂O (2 × 10 ml) und DCM (3 × 10 ml) gründlich gewaschen und das Harz im Vakuum getrocknet. Zum Abspalten des Peptids wurde das Harz in einen Schüttelkolben überführt und mit einer Lösung aus DCM, TFA (1/1, 10 ml) und 2.5 % TIS bei RT geschüttelt (2 × 2 h). Die Abspaltlösungen wurden gesammelt, im Vakuum bis auf wenige ml eingengt und mit kaltem Et₂O versetzt. Der ausfallende Feststoff wurde abfiltriert, mit Et₂O nachgewaschen und mittels Säulenchromatographie gereinigt (RP-18, H₂O/MeOH + 0.05 % TFA, Gradient). Das Produkt **127** wurde in einer Ausbeute von 22 % (96.0 mg, 74.5 μmol) als TFA-Salz erhalten.

Eingesetzte Aminosäuren:

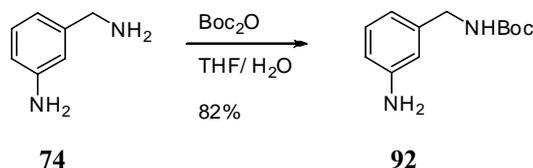
Fmoc-Tyr(3-NO₂)-OH (464 mg, 1.04 mmol, 3.0 Äq), Fmoc-Gly-OH (307 mg, 1.04 mmol, 3.0 Äq), Fmoc-Ser(O*t*Bu)-OH (396 mg, 1.04 mmol, 3.0 Äq), Fmoc-Gln(Trt)-OH (632 mg, 1.04 mmol, 3.0 Äq), Fmoc-Leu-OH (365 mg, 1.04 mmol, 3.0 Äq), Fmoc-Thr(O*t*Bu)-OH (411 mg, 1.04 mmol, 3.0 Äq), Fmoc-Val-OH (351 mg, 1.04 mmol, 3.0 Äq), Fmoc-Ser(O*t*Bu)-OH (396 mg, 1.04 mmol, 3.0 Äq), Fmoc-Abz-OH (371 mg, 1.04 mmol, 3.0 Äq)

Fmoc-Arg(Pbf)-Wang Harz (500 mg, Beladung 0.69 mmol/g), PyBOP (539 mg, 1.04 mmol, 3.0 Äq), NMM (140 mg, 1.38 mmol, 4.0 Äq)

HPLC: H₂O/MeOH + 0.05 % TFA, 45/55; Reinheit 96 %

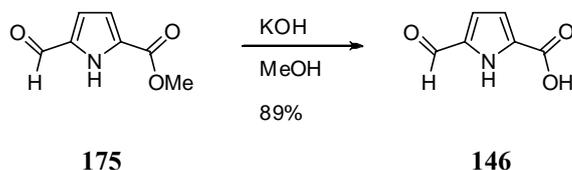
Ausbeute: 22 % (96 mg, 74.5 μ mol). **Smp:** 192 °C. **¹H-NMR** (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 0.80–0.86 (m, 12H, 4 \times (CH(CH₃))), 1.03 (d, 3H, ³J_{HH} = 6.3 Hz, CHCH₃), 1.45 (t, 2H, ³J_{HH} = 7.3 Hz, CH₂), 1.49–1.54 (m, 2H, CH₂), 1.57–1.64 (m, 2H, 2 \times CH), 1.69–1.92 (m, 3H, CH₂, CH), 1.98–2.02 (m, 1H, CH(CH₃)₂), 2.07–2.11 (m, 2H, CH₂CONH₂), 2.70 (dd, 1H, ²J_{HH} = 13.7 Hz, C_qCH₂CH), 2.98 (dd, 1H, ²J_{HH} = 13.9 Hz, C_qCH₂CH), 3.11 (q, 2H, ³J_{HH} = 6.8 Hz, CH₂NHCNH), 3.23–3.27 (m, 1H, CHCH₂), 3.46–3.77 (m, 10H, CH, CH₂), 3.92–3.94 (m, 2H, CHCH₃), 4.20–4.25 (m, 4H, CHNH), 4.27–4.31 (m, 2H, CHNH), 4.50–4.56 (m, 2H, CHNH), 6.54–6.57 (m, 1H, C_qCHCHCH), 6.71 (dd, 1H, ³J_{HH} = 8.2 Hz, COC_qCH), 6.76 (br.s, 1H, OH), 7.02 (d, 1H, ³J_{HH} = 8.5 Hz, COHCHCH), 7.15–7.18 (m, 1H, C_qCHCHCH), 7.22 (br.s, 1H, OH), 7.41 (dd, 1H, ³J_{HH} = 8.6 Hz, COHCHCH), 7.48 (t, 1H, ³J_{HH} = 5.7 Hz, CH₂NHCNH), 7.60 (dd, 1H, ³J_{HH} = 8.0 Hz, CHCHCNH₃⁺), 7.81 (d, 1H, ⁴J_{HH} = 2.1 Hz, C_qCHCNO₂), 7.82–7.86 (m, 2H, 2 \times NH), 7.89 (d, 1H, ³J_{HH} = 7.9 Hz, CHNH), 7.98 (d, 1H, ³J_{HH} = 7.7 Hz, CHNH), 8.06–8.10 (m, 2H, 2 \times CHNH), 8.38 (d, 1H, ³J_{HH} = 7.8 Hz, CHNH), 10.76 (br.s, 1H, COOH) ppm. **¹³C-NMR** (125 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 17.8 (CH(CH₃)₂), 19.0 (CH(CH₃)₂), 19.6 (CHCH₃), 21.4 (CH(CH₃)₂), 23.0 (CH(CH₃)₂), 23.9 (CH(CH₃)₂), 25.1 (CH₂), 27.6 (CH₂), 28.1 (CH), 30.6 (CH), 31.3, 36.4, 36.4, 40.2, 40.5 (CH₂), 41.8 (CH), 51.0, 51.4, 52.1, 53.5, 55.7, 57.4, 58.1 (CHNH), 61.5 (CH₂OH), 61.6 (CH₂OH), 66.4 (CH), 114.7 (C_q), 114.7 (Ar-CH), 116.4 (Ar-CH), 117.3 (C_q), 118.8 (Ar-CH), 125.3 (Ar-CH), 128.4 (Ar-CH), 128.8 (C_q), 131.8 (Ar-CH), 136.0 (C_q), 136.5 (Ar-CH), 150.8, 156.5, 157.9, 158.2, 168.5, 168.7, 169.8, 170.2, 170.7, 170.8, 171.1, 171.9, 173.1, 173.8 (C_q) ppm. **FT-IR:** $\tilde{\nu}$ = 3689 (w), 1620 (s), 1539 (s), 1428 (w), 1327 (w), 1183 (m), 1132 (m), 1070 (w), 799 (w) cm⁻¹. **HR-MS** (pos. ESI) berechnet für C₅₀H₇₅N₁₅NaO₁₈⁺ [M-Na⁺] 1196.5307; gefunden 1196.5284; berechnet für C₅₀H₇₆N₁₅O₁₈⁺ [M-H⁺] 1174.5487; gefunden 1174.5487.

7.2.3 SYNTHESE DER BAUSTEINE FÜR DIE DYNAMISCHE BIBLIOTHEK

Darstellung von Verbindung 92

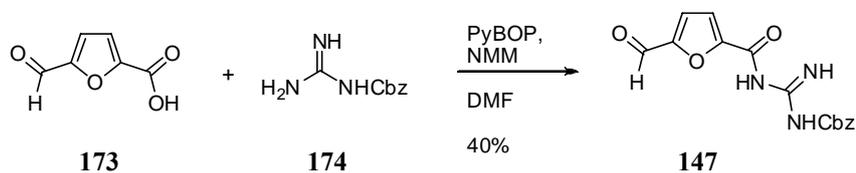
3-Aminobenzylamin **74** (5.35 g, 43.8 mmol, 1.0 Äq) wurde in einer Mischung aus THF und H₂O (50 ml, 2/1) gelöst, Boc₂O (10.5 g, 48.2 mmol, 1.1 Äq) zugegeben und die Mischung 16 h bei RT gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt, der Rückstand in EE (120 ml) aufgenommen und dann mit H₂O (2 × 50 ml) und ges. NaCl-Lösung (50 ml) gewaschen. Die organische Phase wurde über MgSO₄ getrocknet, das Lösungsmittel entfernt und das Rohprodukt anschließend mittels Säulenchromatographie (SiO₂, EE/Hex, 2/1) gereinigt. Das Produkt **92** wurde mit einer Ausbeute von 83 % (8.06 g, 36.3 mmol) erhalten.

Ausbeute: 83 % (8.06 g, 36.3 mmol). **Smp:** 39 °C. **¹H-NMR** (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 1.39 (s, 9H, C(CH₃)₃), 3.97 (d, ³J_{HH} = 6.2 Hz, 2H, CH₂NH), 5.10 (br.s, 2H, NH₂), 6.37–6.43 (m, 3H, Ar-CH), 6.93 (t, ³J_{HH} = 7.6 Hz, 1H, Ar-CH), 7.21 (br.t, ³J_{HH} = 5.7 Hz, 1H, NH) ppm. **¹³C-NMR** (100 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 28.3 (C(CH₃)₃), 43.6 (CH₂), 77.5 (C(CH₃)₃), 112.3, 112.4, 114.4, 128.6 (Ar-CH), 140.7 (Ar-C_q-CH₂), 148.5 (Ar-C_q-NH₂), 155.7 (C_qOO^tBu) ppm. **FT-IR** (KBr Pressling): $\tilde{\nu}$ = 3380 (s), 3221 (m), 2981 (s), 2927 (m), 1687 (s), 1610 (s), 1535 (s), 1510 (s), 1365 (s), 1271 (s), 1247 (s), 1166 (s), 865 (s), 786 (s) cm⁻¹. **HR-MS** (pos. ESI) berechnet für C₁₂H₁₈N₂NaO₂⁺ [M-Na⁺] 245.1260; gefunden 245.1288.

Darstellung von Verbindung 146

Der Methylester **175** (10.0 g, 65.6 mmol, 1.0 Äq) wurde in einem MeOH/H₂O-Gemisch (125 ml, 2/1) gelöst, KOH (18.8 g, 328 mmol, 5.0 Äq) zugegeben und 3 h unter Rückfluss erhitzt. Nach beendeter Reaktion wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt, der Rückstand mit wenig H₂O gelöst und mit konz. HCl angesäuert. Der ausgefallene Feststoff wurde abfiltriert, mit H₂O und HCl (5 %ig) gewaschen, in H₂O suspendiert und an der Lyophile getrocknet. Man erhielt das Produkt **146** in einer Ausbeute von 89 % (8.20 g, 58.9 mmol).

Ausbeute: 89 % (8.20 g, 58.9 mmol). **Smp:** 209 °C (Zersetzung). **¹H-NMR** (400 MHz, CDCl₃): δ = 6.82–6.84 (m, 1H, CH), 6.93–6.95 (m, 1H, CH), 9.69 (s, 1H, CHO), 12.86 (br.s, 1H, NH), 13.05 (br.s, 1H, COOH) ppm. **¹³C-NMR** (100 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 115.3, 116.2 (CH), 128.9, 135.2 (C_q), 161.3 (COOH), 181.2 (COH) ppm. **FT-IR:** $\tilde{\nu}$ = 3129 (br. w), 3069 (br. w), 2810 (w), 2706 (w), 2594 (w), 1686 (m), 1645 (s), 1549 (m), 1401 (m), 1266 (s), 1234 (s), 1145 (m), 820 (s) cm⁻¹. **HR-MS** (neg. ESI) berechnet für C₆H₄NO₃⁻ [M⁻] 138.0197; gefunden 138.0194.

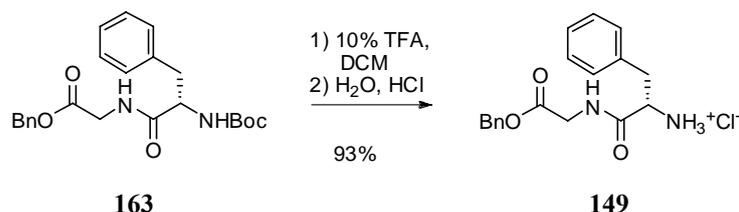
Darstellung von Verbindung 147

Furanaldehyd **173** (500 mg, 3.57 mmol, 1.0 Äq) wurde zusammen mit PyBOP (3.72 g, 4.28 mmol, 2.0 Äq) und NMM (1.44 g, 14.28 mmol, 4.0 Äq) in abs. DMF (10 ml) gelöst und 5 min bei RT gerührt. Dann wurde Cbz-Guanidin **174** (827 mg, 4.28 mmol, 1.2 Äq) zugegeben und bei RT 16 h gerührt. Anschließend wurde H₂O (70 ml) und EE (100 ml) zugegeben, die Phasen getrennt und die wässrige Phase mit EE (3 × 70 ml) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit ges. NaCl-Lösung (100 ml) gewaschen, über

MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde mittels Säulenchromatographie gereinigt (SiO₂, EE/Cy, 1/1). Das Produkt **147** konnte mit einer Ausbeute von 40 % (450 mg, 1.43 mmol) erhalten werden.

Ausbeute: 40 % (450 mg, 1.43 mmol). **Smp:** 162 °C. **¹H-NMR** (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 5.22 (s, 2H, Cbz-CH₂), 7.25 (d, 1H, Fu-CH), 7.35–7.55 (m, 5H, Cbz-CH), 7.56 (d, 1H, Fu-CH), 8.78 (br.s, 1H, NH), 9.69 (s, 1H, COH), 9.70 (br.s, 1H, NH), 11.29 (br.s, 1H, NH) ppm. **¹³C-NMR** (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 67.0 (CbzCH₂), 116.7 (Fu-CH), 122.9 (Fu-CH), 127.9, 128.2, 128.5 (Ar-CH), 135.6, 152.6, 159.0 (C_q), 179.6 (COH) ppm. **FT-IR:** $\tilde{\nu}$ = 3352 (m), 3184 (w), 3003 (w), 1731 (m), 1625 (s), 1560 (s), 1457 (m), 1312 (s), 1224 (s), 748 (s) cm⁻¹. **HR-MS** (pos. ESI) berechnet für C₁₅H₁₃N₃NaO₅⁺ [M-Na⁺] 338.0747; gefunden 338.0779; (neg. ESI) berechnet für C₁₅H₁₂N₃O₅⁻ [M⁻] 314.0771; gefunden 314.0816.

Darstellung von Verbindung 149

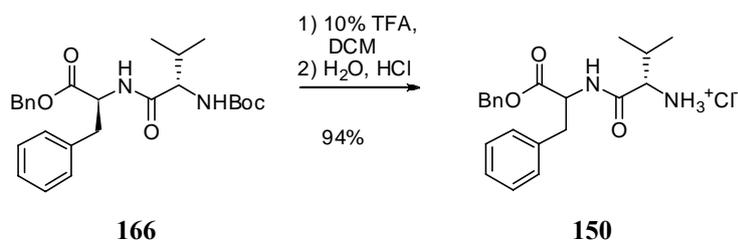


Verbindung **163** (400 mg, 968 μmol) wurde in DCM (9 ml) gelöst, dann TFA (1 ml) zugegeben und 2 h bei RT gerührt. Mittels DC-Kontrolle wurde die Vollständigkeit der Reaktion überprüft. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt, der Rückstand in H₂O (10 ml) aufgenommen und lyophilisiert. Mittels Säulenchromatographie wurde das Rohprodukt gereinigt (RP-18, H₂O/MeOH + 0.01 % TFA, Gradient). Das Produkt **149** konnte nach Umsalzen mit HCl_{aq} (3N) als Cl⁻-Salz in einer Ausbeute von 93 % (315 mg, 903 μmol) erhalten werden.

Ausbeute: 93 % (315 mg, 903 μmol). **Smp:** 75 °C. **¹H-NMR** (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 2.94–3.16 (m, 2H, CHCH₂), 3.96–4.07 (m, 2H, CH₂NH), 4.08–4.11 (m, 1H, CH₂CH), 5.16 (s, 2H, OCH₂), 7.26–7.39 (m, 10 H, Ar-CH), 8.30 (br.s, 3H, NH₃⁺), 9.18 (t, 1H, ³J_{HH} = 5.8 Hz, CH₂NH) ppm. **¹³C-NMR** (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 36.7 (CHCH₂), 40.6 (NHCH₂), 53.2 (CHCH₂), 65.9 (OCH₂), 127.0, 127.9, 128.0, 128.3, 129.5 (Ar-CH), 134.8, 135.7, 168.6, 169.1 (C_q) ppm. **FT-IR:** $\tilde{\nu}$ = 3203 (br. m), 3031 (w), 2929 (br. w), 1739 (m), 1672 (s), 1558 (m), 1497 (m), 1193 (s), 696 (s) cm⁻¹. **HR-MS** (pos. ESI)

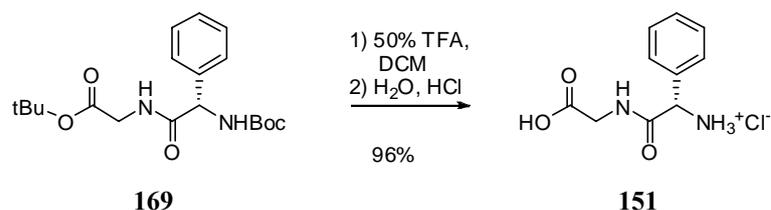
berechnet für $C_{18}H_{20}N_2NaO_3^+$ $[M-Na^+]$ 335.1366; gefunden 335.1437; berechnet für $C_{18}H_{21}N_2O_3^+$ $[M-H^+]$ 313.1547; gefunden 313.1603.

Darstellung von Verbindung 150



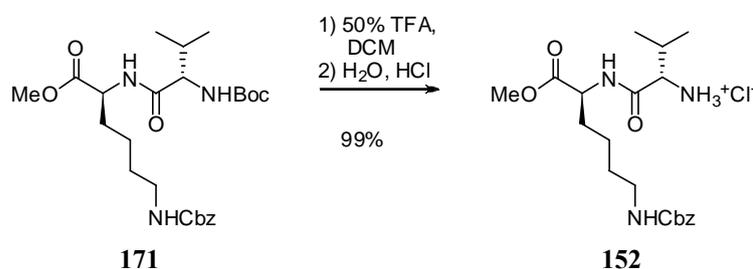
Verbindung **166** (400 mg, 880 μ mol) wurde in DCM (10 ml) gelöst, dann TFA (1 ml) zugegeben und 2 h bei RT gerührt. Mittels HPLC wurde die Vollständigkeit der Reaktion überprüft. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt, der Rückstand in H_2O (10 ml) aufgenommen und lyophilisiert. Mittels Säulenchromatographie wurde das Rohprodukt gereinigt (RP-18, $H_2O/MeOH + 0.01\%$ TFA, Gradient). Das Produkt **150** konnte als Cl^- -Salz in einer Ausbeute von 94 % (322 mg, 824 μ mol) erhalten werden.

Ausbeute: 94 % (322 mg, 824 μ mol). **Smp:** 200 °C. **1H -NMR** (300 MHz, $DMSO-d_6$): $\delta = 0.84$ (d, 3H, $^3J_{HH} = 6.9$ Hz, $CH(CH_3)_2$), 0.91 (d, 3H, $^3J_{HH} = 6.9$ Hz, $CH(CH_3)_2$), 2.03–2.13 (m, 1H, $CH(CH_3)_2$), 2.96–3.13 (m, 2H, CH_2CH), 3.62 (d, 1H, $^3J_{HH} = 4.6$ Hz, $CHCHNH_3^+$), 4.62 (q, 1H, $^3J_{HH} = 7.2$ Hz, $NHCHCH_2$), 5.07 (dd, 2H, $^4J_{HH} = 12.4$ Hz, $Bn-CH_2$), 7.23–7.36 (m, 10H, Ar-CH), 8.06 (br.s, 3H, $CHNH_3^+$), 8.89 (d, 1H, $^3J_{HH} = 7.2$ Hz, $CHNH$) ppm. **^{13}C -NMR** (125 MHz, $DMSO-d_6$): $\delta = 16.9$ ($CH(CH_3)_2$), 18.1 ($CH(CH_3)_2$), 29.7 ($CH(CH_3)_2$), 36.4 ($CHCH_2$), 53.8 ($CHCH_2$), 57.0 ($CHCHNH$), 66.2 ($Bn-CH_2$), 126.6, 127.9, 128.0, 128.2, 128.2, 128.9 (Ar-CH), 135.3, 136.5, 168.0, 170.6 (C_q) ppm. **FT-IR:** $\tilde{\nu} = 3309$ (m), 2963 (w), 2871 (w), 2626 (w), 1789 (w), 1718 (m), 1686 (m), 1656 (s), 1545 (m), 1495 (m), 1263 (m), 1200 (s), 956 (m), 909 (m), 755 (s), 699 (s) cm^{-1} . **HR-MS** (pos. ESI) berechnet für $C_{21}H_{27}N_2O_3^+$ $[M-H^+]$ 355.2016; gefunden 335.2041.

Darstellung von Verbindung 151

Verbindung **169** (100 mg, 274 μmol) wurde in DCM (2 ml) gelöst, dann TFA (2 ml) zugegeben und 2.5 h bei RT gerührt. Mittels DC-Kontrolle wurde die Vollständigkeit der Reaktion überprüft. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt, der Rückstand in H_2O (10 ml) aufgenommen und lyophilisiert. Mittels Säulenchromatographie wurde das Rohprodukt gereinigt (RP-18, $\text{H}_2\text{O}/\text{MeOH} + 0.01\%$ TFA, Gradient). Das Produkt **151** konnte nach Umsalzen mit HCl_{aq} (3N) als Cl^- -Salz in einer Ausbeute von 96 % (64.0 mg, 262 μmol) erhalten werden.

Ausbeute: 96 % (64.0 mg, 262 μmol). **Smp:** 82 °C. **$^1\text{H-NMR}$** (500 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): $\delta = 3.82$ (d, 2H, $^3J_{\text{HH}} = 5.8$ Hz, CH_2NH), 5.05 (m, 1H, CHNH_3^+), 7.41–7.57 (m, 5H, Ar-CH), 8.78 (br.s, 3H, NH_3^+), 8.91 (t, 1H, $^3J_{\text{HH}} = 5.8$ Hz, CH_2NH) ppm. **$^{13}\text{C-NMR}$** (75 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): $\delta = 40.8$ (CH_2NH), 55.1 (CHNH_3^+), 128.0, 128.6, 129.0 (Ar-CH), 133.8 (Ar- C_q), 167.5, 170.3 (C_q) ppm. **FT-IR:** $\tilde{\nu} = 3203$ (br.w), 2911 (br.w), 2616 (br.w), 1727 (m), 1673 (s), 1544 (m), 1492 (s), 1407 (m), 1188 (s), 1027 (m), 696 (s) cm^{-1} . **HR-MS** (pos. ESI) berechnet für $\text{C}_{10}\text{H}_{13}\text{N}_2\text{O}_3$ [M^+] 209.0921; gefunden 209.0937; (neg. ESI) berechnet für $\text{C}_{10}\text{H}_{11}\text{N}_2\text{O}_3^-$ [M^-] 207.0775; gefunden 207.0787.

Darstellung von Verbindung 152

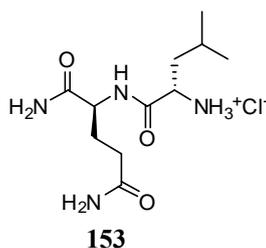
Verbindung **171** (500 mg, 1.01 mmol) wurde in DCM (3 ml) gelöst, dann TFA (3 ml) zugegeben und 2 h bei RT gerührt. Mittels DC-Kontrolle wurde die Vollständigkeit der Reaktion überprüft. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt, der Rückstand in H_2O

(10 ml) aufgenommen und lyophilisiert. Mittels Säulenchromatographie wurde das Rohprodukt gereinigt (RP-18, H₂O/MeOH + 0.01 % TFA, Gradient). Das Produkt **152** konnte als Cl⁻-Salz in einer Ausbeute von 99 % (430 mg, 1.00 mmol) erhalten werden.

Ausbeute: 99 % (430 mg, 1.00 mmol). **Smp:** 136 °C. **¹H-NMR** (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 0.94 (d, 3H, ³J_{HH} = 6.9 Hz, CH(CH₃)₂), 0.96 (d, 3H, ³J_{HH} = 6.9 Hz, CH(CH₃)₂), 1.25–1.44 (m, 4H, CHCH₂CH₂, CH₂CH₂NH), 1.60–1.77 (m, 2H, CHCH₂), 2.05–2.16 (m, 1H, ³J_{HH} = 6.9 Hz, CH(CH₃)₂), 2.98 (q, 2H, ³J_{HH} = 6.7 Hz, NHCH₂CH₂), 3.63 (m, 4H, CHCHNH₃⁺, OCH₃), 4.23–4.30 (m, 1H, NHCHCH₂), 5.00 (s, 2H, Cbz-CH₂), 7.26 (t, 1H, ³J_{HH} = 5.7 Hz, NHCH₂), 7.30–7.38 (m, 5H, Ar-CH), 8.08 (br.s, 3H, NH₃⁺), 8.71 (d, 1H, ³J_{HH} = 7.0 Hz, CH₂CHNH) ppm. **¹³C-NMR** (125 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 17.3 (CH(CH₃)₂), 18.1 (CH(CH₃)₂), 22.5 (CHCH₂CH₂), 29.0 (NHCH₂CH₂), 29.8 (CH(CH₃)₂), 30.3 (NHCHCH₂), 40.0 (NHCH₂CH₂), 51.9 (OCH₃), 52.1 (NHCHCH₂), 57.1 (CHCHNH₃⁺), 65.1 (Cbz-CH₂), 127.7 (2 × Ar-CH), 128.3 (Ar-CH), 137.2, 156.0, 168.0, 171.8 ppm. **FT-IR:** $\tilde{\nu}$ = 3220 (br.w), 2941 (br.m), 1737 (m), 1673 (s), 1522 (s), 1456 (m), 1250 (s), 1210 (s), 1174 (s), 1136 (s), 1024 (m), 737 (m), 696 (s) cm⁻¹. **HR-MS** (pos. ESI) berechnet für C₂₀H₃₂N₃NaO₅⁺ [M-Na⁺] 416.2156; gefunden 416.2212; berechnet für C₂₀H₃₂N₃O₅⁺ [M-H⁺] 394.2336; gefunden 394.2374.

Synthese der Verbindungen **153**, **154** und **155**

In ein Reaktionsgefäß wurde Rink Amid AM Harz (500 mg, Beladung 0.94 mmol/g) eingewogen und 1 h in DMF (10 ml) quellen gelassen. Das Lösungsmittel wurde entfernt und mit DMF (3 × 10 ml) nachgewaschen. Anschließend wurde die Fmoc-Schutzgruppe abgespalten (s.o.). Alle folgenden Kupplungsschritte wurden zweimal durchgeführt, um eine möglichst vollständige Umsetzung zu gewährleisten; die Reaktionszeit für jede Kupplung betrug 20 min. Als Kupplungsreagenz wurde PyBOP (3.0 Äq) und als Base NMM (4.0 Äq) verwendet. Nach jedem Kupplungs- und Abspaltungsschritt wurde ein Kaiser-Test (s.o.) durchgeführt. Die Fmoc-geschützten Aminosäuren, wurden in 2-fachem Überschuss eingesetzt, wobei das Volumen der Reaktionslösung nach Möglichkeit so angepasst wurde, dass eine Konzentration zwischen 0.18–0.2 mmol vorlag. Nach der letzten Kupplung wurde mit DMF (3 × 10 ml), DCM (3 × 10 ml), MeOH (3 × 10 ml), Et₂O (2 × 10 ml) und DCM (3 × 10 ml) gründlich gewaschen und das Harz im Vakuum getrocknet. Zum Abspalten des Peptids wurde das Harz in einen Schüttelkolben überführt und in einer Mischung aus 95 % TFA, 2.5 % H₂O und 2.5 % TIS bei RT geschüttelt (2 × 2 h). Die Abspaltlösungen wurden gesammelt, im Vakuum bis zur Trockne eingengt und der Rückstand mittels Säulenchromatographie gereinigt (RP-18, H₂O/MeOH + 0.05 % TFA, Gradient). Durch mehrmaliges Lyophilisieren und Zusatz einiger Tropfen HCl_{aq} (3N) wurden die Produkte als Cl⁻-Salze erhalten.

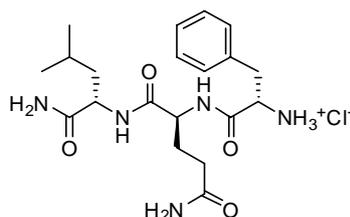
Verbindung 153

Eingesetzte Aminosäuren:

Fmoc-Gln-OH (346 mg, 940 μmol , 2.0 Äq), Fmoc-Leu-OH (332 mg, 940 μmol , 2.0 Äq)

Rink Amide AM Harz (500 mg, Beladung 0.94 mmol/g), PyBOP (734 mg, 1.41 mmol, 3.0 Äq), NMM (190 mg, 1.88 mmol, 4.0 Äq)

Ausbeute: 77 % (135 mg, 360 μmol). **$^1\text{H-NMR}$** (300 MHz, DMSO- d_6): δ = 0.89 (t, 6H, $^3J_{\text{HH}} = 6.3$ Hz, $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 1.45–1.57 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{CHNH}_3^+$), 1.59–1.70 (m, 1H, $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 1.75–1.93 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}$), 2.09–2.14 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}$), 3.79–3.85 (m, 1H, $\text{CH}_2\text{CHNH}_3^+$), 4.25 (dd, 1H, $^3J_{\text{HH}} = 7.7$ Hz, CH_2CHNH), 6.79 (s, 1H, CONH_2), 7.09 (s, 1H, CONH_2), 7.29 (s, 1H, CONH_2), 7.46 (s, 1H, CONH_2), 8.09 (s, 3H, $\text{CH}_2\text{CHNH}_3^+$), 8.59 (d, 1H, $^3J_{\text{HH}} = 8.0$ Hz, CH_2CHNH) ppm. **$^{13}\text{C-NMR}$** (75 MHz, DMSO- d_6): δ 21.8 ($\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 22.6 ($\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 23.4 ($\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 28.0 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}$), 31.2 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}$), 40.2 (CHCH_2CH), 50.7 (CHCH_2CHNH), 52.1 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}$), 168.6, 172.3, 173.5 (CO) ppm. **FT-IR:** $\tilde{\nu}$ = 3170 (w), 2957 (w), 1657 (s), 1549 (m), 1495 (m), 1406 (m), 1263 (m), 1232 (m), 1180 (m), 1128 (m) cm^{-1} . **HR-MS** (pos. ESI) berechnet für $\text{C}_{11}\text{H}_{22}\text{N}_4\text{NaO}_3^+$ [M-Na^+] 281.1584; gefunden 281.1582; berechnet für $\text{C}_{11}\text{H}_{23}\text{N}_4\text{O}_3^+$ [M-H^+] 259.1765; gefunden 259.1758.

Verbindung 154

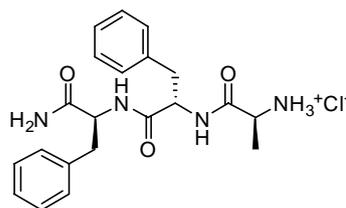
154

Eingesetzte Aminosäuren:

Fmoc-Leu-OH (332 mg, 940 μmol , 2.0 \AA q), Fmoc-Gln-OH (346 mg, 940 μmol , 2.0 \AA q),
Fmoc-Phe-OH (364 mg, 940 μmol , 2.0 \AA q)

Rink Amide AM Harz (500 mg, Beladung 0.94 mmol/g), PyBOP (734 mg, 1.41 mmol,
3.0 \AA q), NMM (190 mg, 1.88 mmol, 4.0 \AA q)

Ausbeute: 91 % (190 mg, 430 μmol). **Smp:** 255 °C. **$^1\text{H-NMR}$** (500 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ = 0.86 (d, 3H, $^3J_{\text{HH}} = 6.5$ Hz, $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 0.89 (d, 3H, $^3J_{\text{HH}} = 6.6$ Hz, $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 1.41–1.51 (m, 2H, CHCH_2CH), 1.56–1.64 (m, 1H, $\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 1.74–1.92 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CHNH}$), 2.07–2.17 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CHNH}$), 2.91 (dd, 1H, $^3J_{\text{HH}} = 7.8$ Hz, $\text{CH}_2\text{CHNH}_3^+$), 3.09 (dd, 1H, $^3J_{\text{HH}} = 5.3$ Hz, $\text{CH}_2\text{CHNH}_3^+$), 4.08 (br.s, 1H, $\text{CH}_2\text{CHNH}_3^+$), 4.23–4.28 (m, 1H, CHCH_2CHNH), 4.32–4.37 (m, 1H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CHNH}$), 6.79 (s, 1H, CONH_2), 6.98 (s, 1H, CONH_2), 7.23–7.32 (m, 6H, 1 \times CONH_2 , 5 \times Ar-CH), 7.39 (s, 1H, CONH_2), 8.08 (d, 1H, $^3J_{\text{HH}} = 8.3$ Hz, CHCH_2CHNH), 8.12 (br.s, 3H, CHNH_3^+), 8.67 (d, 1H, $^3J_{\text{HH}} = 8.0$ Hz, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CHNH}$) ppm. **$^{13}\text{C-NMR}$** (125 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ = 21.5 ($\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 22.9 ($\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 24.2 ($\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 28.3 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}$), 31.2 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}$), 36.8 ($\text{CH}_2\text{CHNH}_3^+$), 40.9 (CHCH_2CH), 50.7 (CHCH_2CHNH), 52.1 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}$), 53.1 ($\text{CH}_2\text{CHNH}_3^+$), 127.0 (Ar-CH), 128.4 (Ar-CH), 129.4 (Ar-CH), 134.7, 167.6, 170.2, 173.6, 173.8, (C_q) ppm. **FT-IR:** $\tilde{\nu}$ = 3187 (m), 3045 (m), 2959 (m), 1661 (s), 1578 (m), 1541 (s), 1413 (w), 1110 (w), 757 (s), 699 (s) cm^{-1} . **HR-MS** (pos. ESI) berechnet für $\text{C}_{20}\text{H}_{31}\text{N}_5\text{NaO}_4^+$ [M-Na^+] 428.2268; gefunden 428.2300; berechnet für $\text{C}_{20}\text{H}_{32}\text{N}_5\text{O}_4^+$ [M-H^+] 406.2449; gefunden 406.2475.

Verbindung 155

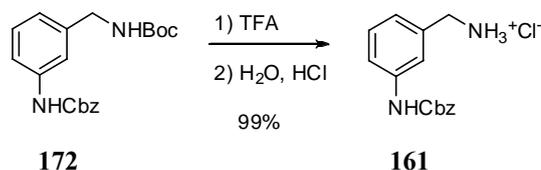
155

Eingesetzte Aminosäuren:

2 × Fmoc-Phe-OH (364 mg, 940 μmol, 2.0 Äq), Fmoc-Ala-OH (293 mg, 940 μmol, 2.0 Äq)

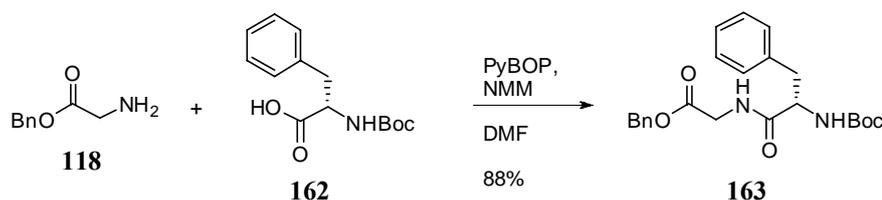
Rink Amide AM Harz (500 mg, Beladung 0.94 mmol/g), PyBOP (734 mg, 1.41 mmol, 3.0 Äq), NMM (190 mg, 1.88 mmol, 4.0 Äq)

Ausbeute: 15 % (69.0 g, 139 μmol). **Smp:** 241 °C. **¹H-NMR** (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 1.18 (t, 1H, ³J_{HH} = 7.3 Hz, CH), 1.27 (d, 3H, ³J_{HH} = 6.9 Hz, CHCH₃), 2.73–2.84 (m, 2H, CHCH₂), 2.99–3.03 (m, 2H, CHCH₂), 3.72–3.77 (m, 1H, CHCH₃), 4.43–4.48 (m, 1H, COCHCH₂), 4.53–4.58 (m, 1H, COCHCH₂), 7.10–7.31 (m, 12H, Ar-CH, 2 × NH), 7.98 (br.d, 3H, ³J_{HH} = 4.1 Hz, NH₃⁺), 8.19 (d, 1H, ³J_{HH} = 8.2 Hz, NH), 8.52 (d, 1H, ³J_{HH} = 8.3 Hz, NH) ppm. **¹³C-NMR** (125 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 17.2 (CHCH₃), 37.4 (CHCH₂), 37.6 (CHCH₂), 47.8 (CHCH₃), 53.6 (CHCH₂), 54.1 (CHCH₂), 126.2, 126.3, 128.0, 128.1, 129.1 (Ar-CH), 137.4, 137.6, 157.6, 157.8, 169.2, 170.2, 172.4 (C_q) ppm. **FT-IR:** $\tilde{\nu}$ = 3285 (w), 3205 (w), 2968 (w), 1669 (m), 1638 (s), 1543 (m), 1201 (m), 1132 (m), 699 (s) cm⁻¹. **HR-MS** (pos. ESI) berechnet für C₂₁H₂₆N₄NaO₃⁺ [M-Na⁺] 405.1897; gefunden 405.1953; berechnet für C₂₁H₂₇N₄O₃⁺ [M-H⁺] 383.2078; gefunden 383.2130.

Darstellung von Verbindung 161

N-Boc-Aminomethyl-*N*-Cbz-anilin **172** (5.00 g, 14.0 mmol) wurde in TFA (20 ml) bei 0 °C gelöst und 1 h bei RT gerührt. Dann wurde die TFA im Vakuum entfernt, H₂O (10 ml) und HCl_{aq} (3N, 10 Tropfen) zugegeben und an der Lyophile getrocknet. Das Produkt **161** konnte mit einer Ausbeute von 99 % (4.06 g, 13.9 mmol) erhalten werden.

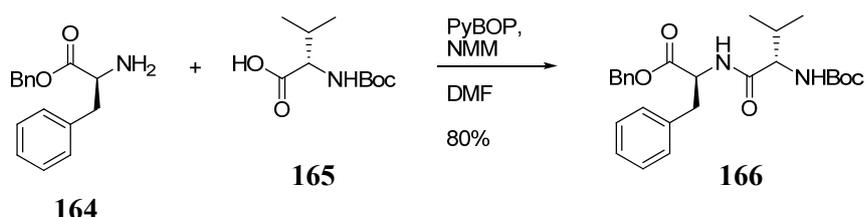
Ausbeute: 99 % (4.06 g, 13.9 mmol). **Smp:** 145 °C. **¹H-NMR** (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 3.94 (s, 2H, CH₂NH₃⁺), 5.16 (s, 2H, Cbz-CH₂), 7.16 (d, ³J_{HH} = 7.6 Hz, 1H, Ar-CH), 7.30–7.43 (m, 7H, Ar-CH), 7.59 (s, 1H, Ar-CH), 8.47 (br.s, 3H, NH₃⁺), 9.91 (br.s, 1H, NH) ppm. **¹³C-NMR** (100 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 42.3 (CH₂NH₃⁺), 65.7 (Cbz-CH₂), 118.4, 118.7, 123.0, 128.0, 128.4, 129.0 (Ar-CH), 134.6, 136.6, 139.3 (Ar-C_q), 153.4 (C=O) ppm. **FT-IR** (KBr-Pressling): $\tilde{\nu}$ = 3282 (w), 3143 (w), 1719 (m), 1659 (m), 1601 (m), 1560 (m), 1453 (m), 1250 (m), 1183 (s), 1130 (s), 1065 (m), 693 (s) cm⁻¹. **HR-MS** (pos. ESI) berechnet für C₁₅H₁₇N₂O₂⁺ [M-H⁺] 257.1285; gefunden 257.1313.

Darstellung von Verbindung 163

Boc-Phe-OH **162** (500 mg, 1.88 mmol, 1.0 Äq) wurde zusammen mit PyBOP (1.96 g, 3.76 mmol, 2.0 Äq) und NMM (760 mg, 7.52 mmol, 4.0 Äq) in abs. DMF (8 ml) gelöst und 5 min bei RT gerührt. Dann wurde BnO-Gly-NH₂ · HCl **118** (374 mg, 2.26 mmol, 1.2 Äq) zugegeben und bei RT 16 h gerührt. Anschließend wurde H₂O (70 ml) zugegeben. Der entstandene Niederschlag wurde abfiltriert und mittels Säulenchromatographie gereinigt (RP-18, H₂O/MeOH, Gradient). Das Produkt **163** konnte mit einer Ausbeute von 88 % (682 mg, 1.65 mmol) erhalten werden.

Ausbeute: 88 % (682 mg, 1.65 mmol). **Smp:** 137 °C. **¹H-NMR** (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 1.28 (s, 9H, C(CH₃)₃), 2.67–2.75 (dd, 1H, ²J_{HH} = 13.8 Hz, CH₂CH), 2.95–3.01 (dd, 1H, ²J_{HH} = 13.8 Hz, ³J_{HH} = 3.8 Hz, CH₂CH), 3.85–4.03 (m, 2H, ³J_{HH} = 5.8 Hz, CH₂NH), 4.17–4.25 (m, 1H, ³J_{HH} = 3.8 Hz, CH₂CH), 5.14 (s, 2H, CH₂Bn), 6.94 (d, 1H, ³J_{HH} = 8.7 Hz, CHNH), 7.16–7.89 (m, 10H, Ar-CH), 8.42 (t, 1H, ³J_{HH} = 5.8 Hz, CH₂NH) ppm. **¹³C-NMR** (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 28.0 (C(CH₃)₃), 37.3 (CHCH₂), 40.7 (CH₂NH), 55.4 (CH₂CH), 65.7 (CH₂Bn), 77.8 (C(CH₃)₃), 126.0, 127.8, 127.9, 127.9, 128.3, 129.0 (Ar-CH), 135.8, 138.1, 155.1, 169.6, 172.3 (C_q) ppm. **FT-IR:** $\tilde{\nu}$ = 3320 (m), 2970 (w), 1740 (m), 1689 (m), 1649 (s), 1521 (s), 1392 (m), 1249 (s), 1200 (m), 1166 (s), 698 (s) cm⁻¹. **HR-MS** (pos. ESI) berechnet für C₂₃H₂₈N₂NaO₅⁺ [M-Na⁺] 435.1890; gefunden 435.1934.

Darstellung von Verbindung **166**

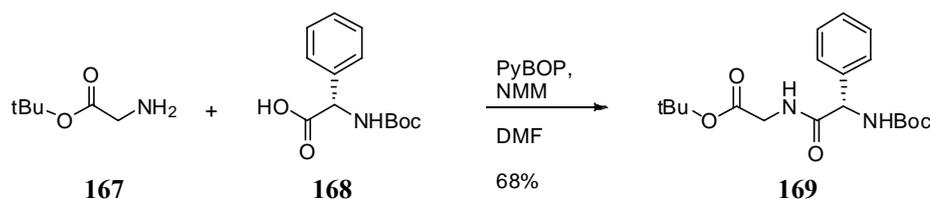


Boc-L-Val-OH **165** (500 mg, 2.30 mmol, 1.0 Äq) wurde zusammen mit PyBOP (2.39 g, 4.60 mmol, 2.0 Äq) und NMM (930 mg, 9.20 mmol, 4.0 Äq) in abs. DMF (10 ml) gelöst und 5 min bei RT gerührt. Dann wurde H-Phe-OBn · HCl **164** (805 mg, 2.76 mmol, 1.2 Äq) zugegeben und bei RT 16 h gerührt. Anschließend wurde H₂O (70 ml) zugegeben. Der entstandene Niederschlag wurde abfiltriert und mittels Säulenchromatographie gereinigt (RP-18, H₂O/MeOH, Gradient). Das Produkt **166** konnte mit einer Ausbeute von 80 % (834 mg, 1.84 mmol) erhalten werden.

Ausbeute: 80 % (834 mg, 1.84 mmol). **Smp:** 118 °C. **¹H-NMR** (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 0.73 (d, 3H, CH(CH₃)₂), 0.75 (d, 3H, CH(CH₃)₂), 1.37 (s, 9H, C(CH₃)₃), 1.78–1.89 (m, 1H, CH(CH₃)₂), 2.91–3.08 (m, 2H, CHCH₂), 3.81 (dd, 1H, ³J_{HH} = 7.3 Hz, CHCHNH), 4.51 (dd, 1H, ³J_{HH} = 7.8 Hz, CHCH₂), 5.04 (dd, 2H, CH₂Bn), 6.54 (d, 1H, ³J_{HH} = 9.3 Hz, CHCHNH), 7.20–7.38 (m, 10H, Ar-CH), 8.31 (d, 1H, ³J_{HH} = 7.4 Hz, CH₂CHNH) ppm. **¹³C-NMR** (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 18.0 (CH(CH₃)₂), 19.1 (CH(CH₃)₂), 28.1 (C(CH₃)₃), 30.5 (CH(CH₃)₂), 36.7 (CHCH₂), 53.5 (CHCH₂), 59.4 (CHCHNH), 66.0 (Bn-CH₂), 78.0 (C(CH₃)₃), 126.5, 127.9, 128.0, 128.2, 128.3, 129.0 (Ar-CH), 135.6, 155.2, 171.2, 171.4 (C_q) ppm. **FT-IR:** $\tilde{\nu}$ = 3331 (m), 3295 (w), 1973 (w), 2870 (w), 1736 (s), 1663 (s), 1523 (s), 1367 (m), 1243 (m), 1171 (s), 1017 (m), 755 (m), 695 (s) cm⁻¹. **HR-MS** (pos. ESI)

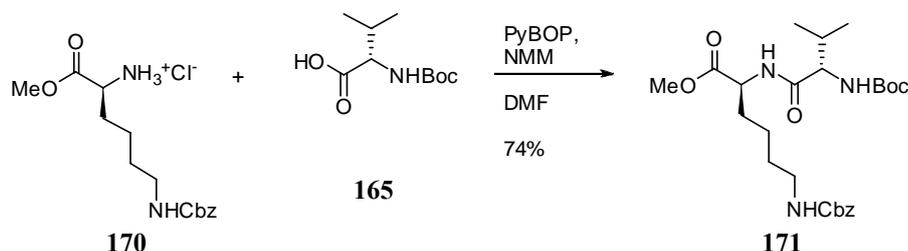
berechnet für $C_{26}H_{34}N_2NaO_5^+$ $[M-Na^+]$ 477.2360; gefunden 477.2415; berechnet für $C_{26}H_{35}N_2O_5^+$ $[M-H^+]$ 455.2540; gefunden 455.2597.

Darstellung von Verbindung 169



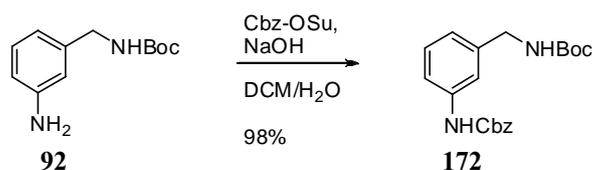
Boc-Phg-OH **168** (500 mg, 1.99 mmol, 1.0 Äq) wurde zusammen mit PyBOP (2.07 g, 3.98 mmol, 2.0 Äq) und NMM (805 mg, 7.96 mmol, 4.0 Äq) in abs. DMF (8 ml) gelöst und 5 min bei RT gerührt. Dann wurde H-Gly-O*t*Bu · HCl **167** (400 mg, 2.39 mmol, 1.2 Äq) zugegeben und bei RT 16 h gerührt. Anschließend wurde H₂O (70 ml) und EE (50 ml) zugegeben, die Phasen getrennt und die wässrige Phase mit EE (3 × 50 ml) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde mittels Säulenchromatographie gereinigt (RP-18, H₂O/MeOH, Gradient). Das Produkt **169** konnte mit einer Ausbeute von 68 % (496 mg, 1.36 mmol) erhalten werden.

Ausbeute: 68 % (496 mg, 1.36 mmol). **Smp:** 60 °C. **¹H-NMR** (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 1.35 (s, 9H, C(CH₃)₃), 1.38 (s, 9H, C(CH₃)₃), 3.71 (d, 2H, ³J_{HH} = 5.9 Hz, CH₂NH), 5.23 (d, 1H, ³J_{HH} = 8.8 Hz, CHNH), 7.24–7.44 (m, 6H, Ar-CH, CHNH), 8.50 (t, 1H, ³J_{HH} = 5.7 Hz, CH₂NH) ppm. **¹³C-NMR** (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 27.5 (C(CH₃)₃), 28.0 (C(CH₃)₃), 41.5 (CH₂NH), 57.4 (CH), 78.3 (C(CH₃)₃), 80.5 (C(CH₃)₃), 127.1, 127.3, 128.1 (Ar-CH), 138.7, 154.7, 168.5, 170.3 (C_q) ppm. **FT-IR:** $\tilde{\nu}$ = 3308 (br. w), 2978 (w), 2933 (w), 1660 (m), 1496 (m), 1365 (m), 1243 (m), 1151 (s), 847 (m), 697 (m) cm⁻¹. **HR-MS** (pos. ESI) berechnet für C₁₉H₂₈N₂NaO₅⁺ $[M-Na^+]$ 387.1890; gefunden 387.1973; berechnet für C₁₉H₂₉N₂O₅⁺ $[M-H^+]$ 365.2071; gefunden 365.2160.

Darstellung von Verbindung **177**

Boc-L-Val-OH **165** (500 mg, 2.30 mmol, 1.0 Äq) wurde zusammen mit PyBOP (2.39 g, 4.60 mmol, 2.0 Äq) und NMM (930 mg, 9.20 mmol, 4.0 Äq) in abs. DMF (10 ml) gelöst und 5 min bei RT gerührt. Dann wurde H-Lys(Cbz)-OMe · HCl **170** (913 mg, 2.76 mmol, 1.2 Äq) zugegeben und bei RT 16 h gerührt. Anschließend wurde H₂O (70 ml) zugegeben. Es wurde vom entstandenen schleimigen Niederschlag abdekantiert, der Rückstand mit Et₂O (70 ml) versetzt und bei RT solange gerührt, bis ein flockiger Niederschlag entstand. Der entstandene Niederschlag wurde abfiltriert und mittels Säulenchromatographie gereinigt (RP-18, H₂O /MeOH, Gradient). Das Produkt konnte mit einer Ausbeute von 74 % (835 mg, 1.69 mmol) erhalten werden.

Ausbeute: 74 % (835 mg, 1.69 mmol). **Smp:** 70 °C. **¹H-NMR** (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 0.81 (d, 3H, ³J_{HH} = 6.7 Hz, CH(CH₃)₂), 0.85 (d, 3H, ³J_{HH} = 6.7 Hz, CH(CH₃)₂), 1.13–1.33 (m, 2H, CHCH₂CH₂), 1.33–1.41 (m, 11H, NHCH₂CH₂, C(CH₃)₃), 1.58–1.68 (m, 2H, CHCH₂), 1.88–1.95 (m, 1H, CH(CH₃)₂), 2.95–2.98 (m, 2H, NHCH₂), 3.60 (s, 3H, OCH₃), 3.79–3.84 (m, 1H, CHCHNH), 4.17–4.24 (m, 1H, NHCHCH₂), 5.00 (s, 2H, Cbz-CH₂), 6.62 (d, 1H, ³J_{HH} = 8.9 Hz, CHCHNH), 7.22 (t, 1H, ³J_{HH} = 5.4 Hz, NHCH₂), 7.20–7.37 (m, 5H, Cbz-CH), 8.14 (d, 1H, ³J_{HH} = 7.2 Hz, CH₂CHNH) ppm. **¹³C-NMR** (125 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 18.0 (C(CH₃)), 19.0 (C(CH₃)), 22.4 (CHCH₂CH₂), 28.1 (C(CH₃)₃), 28.8 (CH₂), 30.3 (CHCHNH), 30.4 (CHCH₂), 40.0 (CH₂NH), 51.6 (OCH₃), 51.7 (CH₂CHNH), 59.3 (CHCHNH), 65.0 (Cbz-CH₂), 77.9 (C(CH₃)), 127.6 (Cbz-CH), 128.2 (Cbz-CH), 137.1, 155.3, 156.0, 171.5, 172.3 (C_q) ppm. **FT-IR:** $\tilde{\nu}$ = 2232 (m), 2956 (w), 1740 (m), 1686 (s), 1651 (s), 1521 (s), 1247 (s), 1168 (s), 1019 (m) cm⁻¹. **HR-MS** (pos. ESI) berechnet für C₂₅H₃₉N₃NaO₇⁺ [M-Na⁺] 516.2680; gefunden 516.2758; berechnet für C₂₅H₄₀N₃O₇⁺ [M-H⁺] 494.2861; gefunden 494.2942.

Darstellung von Verbindung 172

Verbindung **92** (8.00 g, 36.0 mmol, 1.0 Äq) wurde in DCM (50 ml) gelöst, NaOH (1.73 g, 43.2 mmol, 1.2 Äq) gelöst in H₂O (50 ml) zugegeben und auf 0 °C gekühlt. Dann wurde Cbz-OSu (16.2 g, 64.8 mmol, 1.8 Äq) in kleinen Portionen zugegeben und für 24 h bei RT gerührt. Anschließend wurden die Phasen getrennt, die wässrige Phase mit DCM (50 ml) extrahiert, das Lösungsmittel entfernt und das Rohprodukt mittels Säulenchromatographie (SiO₂, EE/Hex, 1/2) gereinigt. Das Produkt **172** wurde mit einer Ausbeute von 95 % (12.2 g, 34.2 mmol) erhalten.

Ausbeute: 95 % (12.2 g, 34.2 mmol). **Smp:** 89 °C. **¹H-NMR** (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 1.39 (s, 9H, C(CH₃)₃), 4.07 (d, 2H, ³J_{HH} = 6.0 Hz, CH₂NHBoc), 5.14 (s, 2H, Cbz-CH₂), 6.86 (d, 1H, ³J_{HH} = 7.6 Hz, Ar-CH), 7.20 (t, 1H, ³J_{HH} = 7.8 Hz, Ar-CH), 7.31–7.43 (m, 9H, 8 × Ar-CH; NHBoc), 9.73 (br.s, 1H, NHCbz) ppm. **¹³C-NMR** (100 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 28.2 (C(CH₃)₃), 43.8 (CH₂NHBoc), 65.6 (Cbz-CH₂), 77.7 (C(CH₃)₃), 116.6, 116.7, 121.0, 126.4, 128.0, 128.4, 128.6 (Ar-CH), 136.7, 140.9, 139.0 (Ar-C_q), 153.3, 155.8 (C=O) ppm. **FT-IR** (KBr-Pressling): $\tilde{\nu}$ = 3355 (s), 3328 (s), 3096 (w), 3069 (w), 3035 (w), 3008 (w), 2990 (m), 2969 (m), 2942 (m), 2877 (m), 1701 (s), 1686 (s), 1599 (s), 1543 (s), 1512 (s), 1448 (m), 1250 (s), 1177 (s) cm⁻¹. **HR-MS** (pos. ESI) berechnet für C₂₀H₂₄N₂NaO₄ [M-Na⁺] 379.1628; gefunden 379.1650.

7.3 DURCHFÜHRUNG DER ENZYMASSAYS

7.3.1 PUFFERLÖSUNGEN

Für die Durchführung der Enzymassays sind unterschiedliche Pufferlösungen notwendig. In den folgenden Tabellen sind die jeweiligen Pufferzusammensetzungen und die entsprechenden pH-Werte angegeben. Der Enzympuffer dient dazu, die unterschiedlichen Enzyme auf ihre gewünschte Konzentration zu verdünnen. Im Assaypuffer werden alle Komponenten gemischt und vermessen.

Rhodesain, Falcipain-2 und Cathepsin K

Acetat-Puffer

Assaypuffer (pH = 5.5)	
Reagenz	Menge
NaCl	200 mM, 5.84 g
NaOAc	50.0 mM, 2.08 g
EDTA	5.00 mM, 930 mg
Brij 35	0.005 %, 25.0 mg
H ₂ O	500 ml

Enzympuffer (pH = 5.5)	
Reagenz	Menge
NaCl	200 mM, 1.17 g
NaOAc	50.0 mM, 416 mg
EDTA	5.00 mM, 186 mg
DTT	2.00 mM, 38.9 mg
H ₂ O	100 ml

Cathepsin B und L

Phosphat-Puffer

Assaypuffer (pH = 6.5)	
Reagenz	Menge
NaCl	200 mM, 5.84 g
Na ₂ HPO ₄	50.0 mM, 3.55 g
EDTA	5.00 mM, 930 mg
Brij 35	0.005 %, 25.0 mg
H ₂ O	500 ml

Enzympuffer (pH = 6.5)	
Reagenz	Menge
NaCl	200 mM, 1.17 g
Na ₂ HPO ₄	50.0 mM, 416 mg
EDTA	5.00 mM, 186 mg
DTT	5.00 mM, 77.3 mg
H ₂ O	100 ml

HCoV 229E M^{Pro}, Trypsin und Chymotrypsin

Phosphat-Puffer

Assaypuffer (pH = 7.5)	
Reagenz	Menge
NaCl	200 mM, 5.84 g
Na ₂ HPO ₄	50.0 mM, 3.55 g
EDTA	5.00 mM, 930 mg
Brij 35	0.005 %, 25.0 mg
H ₂ O	500 ml

Enzympuffer (pH = 7.5)	
Reagenz	Menge
NaCl	200 mM, 1.17 g
Na ₂ HPO ₄	50.0 mM, 416 mg
EDTA	5.00 mM, 186 mg
DTT	5.00 mM, 77.3 mg
H ₂ O	100 ml

TRIS-Puffer

Assaypuffer (pH = 7.5)	
Reagenz	Menge
NaCl	200 mM, 5.84 g
TRIS	20.0 mM, 1.21 g
EDTA	100 μM, 14.6 mg
Brij 35	0.005 %, 25.0 mg
H ₂ O	500 ml

Enzympuffer (pH = 7.5)	
Reagenz	Menge
NaCl	200 mM, 1.17 g
TRIS	20.0 mM, 242 mg
EDTA	100 μM, 2.92 mg
DTT	1.00 mM, 15.4 mg
H ₂ O	100 ml

7.3.2 SUBSTRATE

Für das Screening wurden verschiedene Stammlösungen der Substrate Cbz-Phe-Arg-AMC, Suc-Leu-Tyr-AMC und FRET-Substrat **127** hergestellt. Die unterschiedlichen Konzentrationen sind abhängig von den jeweiligen Enzymen, da bei zu hoher Substratkonzentration teilweise ein unerwünschter Hemmeffekt auftreten kann.

Substrat	Enzym	Stammlösung	c_{final}
Cbz-Phe-Arg-AMC	Cathepsin B	3.20 mM	80.0 μM
	Cathepsin K	1.00 mM	25.0 μM
	Cathepsin L	250 μM	6.25 μM
	Falcipain-2	1.00 mM	25.0 μM
	Rhodesain	1.00 mM	25.0 μM
	Trypsin	2.00 mM	50.0 μM
Suc-Leu-Tyr-AMC	Chymotrypsin	2.00 mM	50.0 μM
FRET-Substrat 127	HCoV 229E M ^{Pro}	1.00 mM	50.0 μM

7.3.3 ENZYME

Enzym	Masse (kDa)	c_{final}	K_m -Wert	pdb
Cathepsin B	28.1	0.06 nM	252 μM ¹⁶³	3AI8
Cathepsin K	23.5	0.50 nM	47.7 μM ^a , 58.0 μM ²⁰	1TU6
Cathepsin L	24.2	8.62 nM	2.40 μM ¹⁶⁴	2XU1
Chymotrypsin	25.3	500 nM	22.0 μM ¹⁶⁵	1YPH
Falcipain-2	27.2	-	21.5 μM	3BPF
HCoV 229E M ^{Pro}	33.3	0.06 nM	183 μM	1P9S
Rhodesain	22.9	0.03 nM	827 nM	2P7U
Trypsin	24.7	25.0 nM	18.5 μM	1FXY

[a] experimentell bestimmt, - = nicht bekannt

7. Experimenteller Teil

7.3.4 EINSTELLUNGEN AM FLUORESZENZSPEKTROMETER

Die Durchführung der Messreihen erfolgte mit folgenden Einstellungen am Fluoreszenzspektrometer:

Spektrometereinstellungen		
	Rhod, FP-2, Tryp, ChT, Cat K, Cat B, Cat L	HCoV 229E M^{Pro}
Anregungswellenlänge	380 nm	325 nm
Detektionswellenlänge	460 nm	425 nm
Spaltbreite der Anregung	10 nm	10 nm
Spaltbreite der Detektion	20 nm	20 nm
Detektor	450 V	450 V
Temperatur	RT	RT
Messintervall	eine Messung pro Minute	eine Messung pro Minute
Messzeit	15 min	15 min

7.3.5 ZUGABEREIHENFOLGE DER EINZELNEN KOMPONENTEN

Puffer, Enzym, DMSO bzw. Inhibitorlösung und Substrat wurden in folgender Reihenfolge mit den angegebenen Volumina gemischt:

Reihenfolge der Zugaben		
	Rhod, FP-2, Tryp, ChT, Cat K, Cat B, Cat L	HCoV 229E M^{Pro}
Assaypuffer	180 µl	175 µl
Enzym	5.00 µl	5.00 µl
DMSO/Inhibitor	10.0 µl	10.0 µl
Substrat	5.00 µl	10.0 µl
Gesamtvolumen	200 µl	200 µl

7.3.6 SCREENING DER PYRROL- UND FURANBASIERTEN INHIBITOREN

Für das Screening der pyrrol- und furanbasierten Inhibitoren wurden Acetatpufferlösungen mit einem pH-Wert von 5.5 hergestellt. Jeder Inhibitor wurde drei Mal gemessen und aus dem Ergebnis der Mittelwert bestimmt. Als Referenz diente eine Blindprobe mit DMSO. Die einzelnen Komponenten wurden zunächst bei einer finalen Konzentration von $c_{\text{final}} = 100 \mu\text{M}$ gescreent. Zur Auswertung wurden die Messwerte der ersten 5 Minuten herangezogen, um zu gewährleisten, dass die Reaktion im steady-state Bereich abläuft. Von den Verbindungen, die bei dieser Konzentration einen Hemmeffekt größer 80 % zeigten, wurden der IC_{50} -Wert und der K_i -Wert bestimmt. Dazu wurde von jedem Inhibitor die Hemmaktivität bei unterschiedlichen Konzentrationen gemessen (100, 80, 60, 40, 20, 10, 1 μM). Mit den Programmen *GraFit* und *Microsoft Excel* wurden die Steigungen der Geraden und die prozentualen Enzymaktivitäten sowie die IC_{50} - und K_i -Werte bestimmt.

Acetat-Puffer

Assaypuffer (pH = 5.5)	
Reagenz	Menge
NaCl	200 mM, 5.84 g
NaOAc	50.0 mM, 2.08 g
EDTA	5.00 mM, 930 mg
H ₂ O	500 ml

Enzympuffer (pH = 5.5)	
Reagenz	Menge
NaCl	200 mM, 1.17 g
NaOAc	50.0 mM, 416 mg
EDTA	5.00 mM, 186 mg
H ₂ O	100 ml

Reihenfolge der Zugaben	
Assaypuffer	215 μl
Enzym	10.0 μl
DMSO/Inhibitor	20.0 μl
Substrat	5.00 μl
Gesamtvolumen	250 μl

7.3.7 IC₅₀- UND K_I-WERT BESTIMMUNG

Von den Verbindungen, die bei einer Konzentration von $c_{\text{final}} = 100 \mu\text{M}$ einen Hemmeffekt größer 80 % zeigten, wurden der IC₅₀-Wert und der K_I-Wert bestimmt. Dazu wurde von jedem Inhibitor die Hemmaktivität bei unterschiedlichen Konzentrationen gemessen (100, 80, 60, 40, 20, 10, 1 μM). Mit den Programmen *GraFit*[®] und *Microsoft Excel* wurden die Steigungen der Geraden und daraus die prozentuale Enzymaktivitäten sowie die IC₅₀- und K_I-Werte bestimmt.

7.3.8 SCREENING DER FESTPHASENGEBUNDENEN INHIBITOREN

Für das Screening der festphasengebundenen Inhibitoren musste der Assay in abgewandelter Form durchgeführt werden. Dies bezog sich hauptsächlich auf die Inkubationszeit der Inhibitoren mit dem Enzym (HCoV 229E M^{Pro}). Während bei Messungen von Inhibitoren in Lösung zwischen Mischen und Messung nur 5 min lagen, wurde die festphasengebundenen Inhibitoren zwischen 6 und 22 h inkubiert. Somit sollte gewährleistet werden, dass Enzym und gebundener Inhibitor in Wechselwirkung treten konnten. Die Inkubationszeit hing darüber hinaus auch von der Stabilität des Enzyms ab. In diesem Fall schien für die Inkubation eine Temperatur von 4 °C am günstigsten, da der Fehler der Messung im Bereich der Messtoleranz von 10 % lag. Das PEGA-Harz besaß eine Beladung von 0.35 mmol/g.

Für die Messungen wurden verschiedene isopyknische Stammlösungen hergestellt:

Verbindung	Einwaage (mg)	Zugabe DMSO (ml)	c _{Stamm} (mM)	c _{final} (mM)
PEGA-Harz	55.70	0.976	20.0	1.00
107	0.500	1.18	2.00	0.100
124	81.21	1.42	20.0	1.00
125	68.27	1.20	20.0	1.00
126	84.03	1.47	20.0	1.00
128	83.70	1.46	20.0	1.00
129	69.20	1.21	20.0	1.00
130	39.40	0.689	20.0	1.00

Das Screening wurde in TRIS-Puffer bei einem pH-Wert von 7.5 durchgeführt. Die Zugabe der einzelnen Komponenten erfolgte wie bereits beschrieben. Das Substrat wurde

allerdings erst nach der Inkubationszeit zugegeben, anschließend gut gemischt und dann vermessen.

Reihenfolge der Zugaben	
HCoV 229E M ^{Pro}	
Assaypuffer	175 μ l
Enzym	5.00 μ l
DMSO/Inhibitor	10.0 μ l
→ <i>Inkubation</i>	6–22 <i>h</i>
Substrat	10.0 μ l
Gesamtvolumen	200 μ l

7.3.9 SCREENING DER DYNAMISCHEN BIBLIOTHEK

Von allen Inhibitoren wurden Stammlösungen mit einer Konzentration von 44.0 mM in DMSO hergestellt. Für die Tests der einzelnen Komponenten wurden daraus jeweils 10 μ l entnommen und mit 210 μ l DMSO verdünnt, um eine Konzentration von 4.00 mM zu erreichen. Mit dieser verdünnten Stammlösung wurden die Messungen durchgeführt ($c_{\text{final}} = 100 \mu\text{M}$).

In der Bibliothek sollten die Amine die doppelte Konzentration wie die Aldehyde aufweisen. Aus diesem Grund wurde die Gesamtbibliothek wie folgt hergestellt: Aus den Aldehyd-Stammlösungen wurden jeweils 5.00 μ l und aus den Amin-Stammlösungen jeweils 10.0 μ l entnommen und gemischt. Durch Zugabe der entsprechenden Menge DMSO wurde auf 220 μ l aufgefüllt und so die Aldehyde auf 2.00 mM und die Amine auf 4.00 mM verdünnt. Diese Lösung wurde nun im Verhältnis 1/1 mit DMSO weiter verdünnt, wodurch eine finale Konzentration im Screening von 25.0 μ M (Aldehyd) und 50.0 μ M (Amin) erreicht wurde.

Auch die Selektionsbibliotheken wurden mit den Konzentrationen von 25.0 μ M (Aldehyd) und 50.0 μ M (Amin) hergestellt. Jede fehlende Komponente wurde durch die entsprechende Menge DMSO ersetzt.

7.3.10 EDMAN-ABBAU

Für die Durchführung des *Edman*-Abbaus mit den Komponenten **128**, **129** und **130** zusammen mit der HCoV 229E M^{Pro} wurde eine Stammlösung aus harzgebundenem Peptid (20.0 mM bezogen auf die theoretische Beladung) und H₂O hergestellt. Von dieser Lösung wurden 400 µl in ein HPLC-Vial überführt und das Lösungsmittel durch Lyophilisation entfernt. Dazu wurden 1.8 ml Phosphatpuffer (siehe *Kapitel 7.3.1*) und 330 µl Enzymlösung gegeben und 24 h inkubiert. Anschließend wurde das Lösungsmittel entfernt, die Harzkügelchen mehrmals mit H₂O gewaschen und an der Lyophile getrocknet. Dann wurden Ph-NCS **131** (12.9 mg, 95.3 µmol, 11.4 µl, 6.00 Äq), DIEA (2.13 mg, 2.80 µl, 16.5 µmol, 1.00 Äq) und NMP (400 µl) zugegeben und bei RT 1.5 h gerührt. Daraufhin wurde die Lösung im Vakuum eingeengt, H₂O (500 µl) zugegeben und lyophilisiert. Das getrocknete Harz wurde mit TFA (600 µl) versetzt und für 15 min bei 50 °C gerührt. Im Anschluss daran wurde das Harz abfiltriert, die so gewonnene Lösung zum gleichen Teil mit H₂O (600 µl) verdünnt und für 2 h bei 70 °C gerührt. Dann wurde das Lösungsmittel entfernt, der Rückstand mit H₂O versetzt und gefriergetrocknet. Der überbleibende Feststoff wurde daraufhin in DCM gelöst und massenspektrometrisch untersucht.

Für die Untersuchung des Testpeptids **134** wurde keine Inkubation mit dem Enzym durchgeführt und die Harzkügelchen nach der Überführung in ein HPLC-Vial und der Entfernung des Lösungsmittel direkt mit Ph-NCS, DIEA und NMP in oben angegebenen Mengen versetzt.

8. ANHANG

8.1 LITERATURVERZEICHNIS

- (1) Abbenante, G.; Fairlie, D. P. *Medicinal Chemistry* **2005**, *1*, 71–104.
- (2) Seife, C. *Science* **1997**, *277*, 1602–1603.
- (3) Turk, B. *Nature Reviews. Drug Discovery* **2006**, *5*, 785–799.
- (4) Sajid, M.; McKerrow, J. H. *Molecular and Biochemical Parasitology* **2002**, *120*, 1–21.
- (5) Smith, C. G.; Vane, J. R. *The FASEB Journal* **2003**, *17*, 788–789.
- (6) Adams, J.; Kauffman, M. *Cancer Investigation* **2004**, *22*, 304–311.
- (7) Flexner, C.; Bate, G.; Kirkpatrick, P. *Nature Reviews. Drug Discovery* **2005**, *4*, 955–956.
- (8) Jensen, C.; Herold, P.; Brunner, H. R. *Nature Reviews. Drug Discovery* **2008**, *7*, 399–410.
- (9) Eriksson, B. I.; Smith, H.; Yasothan, U.; Kirkpatrick, P. *Nature Reviews. Drug Discovery* **2008**, *7*, 557–558.
- (10) Drag, M.; Salvesen, G. S. *Nature Reviews. Drug Discovery* **2010**, *9*, 690–701.
- (11) Leung, D.; Abbenante, G.; Fairlie, D. P. *Journal of Medicinal Chemistry* **2000**, *43*, 305–341.
- (12) Lecaille, F.; Kaleta, J.; Brömme, D. *Chemical Reviews* **2002**, *102*, 4459–4488.
- (13) McKerrow, J.; Engel, J. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **1999**, *7*, 639–644.
- (14) WHO World malaria report 2010 *World Health Organisation* **2010**.
- (15) Guido, R. V. C.; Oliva, G. *Current Topics in Medicinal Chemistry* **2009**, *9*, 824–843.

- (16) Kerr, I. D.; Lee, J. H.; Farady, C. J.; Marion, R.; Rickert, M.; Sajid, M.; Pandey, K. C.; Caffrey, C. R.; Legac, J.; Hansell, E. *Journal of Biological Chemistry* **2009**, *284*, 25697–25703.
- (17) Schirmeister, T.; Welker, A. *Pharmazie in unserer Zeit* **2009**, *38*, 564–574.
- (18) Konno, K.; Hirayama, C.; Nakamura, M.; Tateishi, K.; Tamura, Y.; Hattori, M.; Kohno, K. *The Plant Journal* **2003**, *37*, 370–378.
- (19) Mueller-Stainer, S.; Zhou, Y.; Arai, H.; Roberson, E. D.; Sun, B.; Chen, J.; Wang, X.; Yu, G.; Esposito, L.; Mucke, L.; Gan, L. *Neuron* **2006**, *51*, 703–714.
- (20) Bossard, M. J.; Tomaszek, T. A.; Thompson, S. K.; Amegadzie, B. Y.; Hanning, C. R.; Jones, C.; Kurdyla, J. T.; McNulty, D. E.; Drake, F. H.; Gowen, M. *Journal of Biological Chemistry* **1996**, *271*, 12517–12524.
- (21) Ettari, R.; Bova, F.; Zappalà, M.; Grasso, S.; Micale, N. *Medicinal Research Reviews* **2010**, *30*, 136–167.
- (22) Cazzulo, J. J.; Stoka, V.; Turk, V. *Current Pharmaceutical Design* **2001**, *7*, 1143–1156.
- (23) Li, C.; Qi, Y.; Teng, X.; Yang, Z.; Wei, P.; Zhang, C.; Tan, L.; Zhou, L.; Liu, Y.; Lai, L. *The Journal of Biological Chemistry* **2010**, *285*, 28134–28140.
- (24) Xu, T.; Ooi, A.; Lee, H. C.; Wilmouth, R.; Liu, D. X.; Lescar, J. *Acta Crystallographica. Section F, Structural Biology and Crystallization Communications* **2005**, *61*, 964–966.
- (25) Chambers, A. F.; Matrisian, L. M. *Journal of the National Cancer Institute* **1997**, *89*, 1260–1270.
- (26) Yan, S.; Sameni, M.; Sloane, B. F. *Biological Chemistry* **1998**, *379*, 113–123.
- (27) DeClerck, Y. A.; Imren, S.; Montgomery, A. M. P.; Mueller, B. M.; Reisfeld, R. A.; Laug, W. E. *Advances in Experimental Medicine and Biology* **1997**, *425*, 89–97.
- (28) Bernstein, H. G.; Kirschke, H.; Wiederanders, B.; Pollak, K. H.; Zipress, A.; Rinne, A. *Molecular and Chemical Neuropathology* **1996**, *27*, 225–247.
- (29) Kirschke, H.; Barrett, A. J.; Rawlings, N. D. *Protein Profile* **1995**, *2*, 1581–1620.
- (30) Schulz, F. *Dissertation, Universität Würzburg* **2006**.
- (31) Diamond, S. L. *Current Opinion in Chemical Biology* **2007**, *11*, 46–51.
- (32) Gillmor, S. A.; Craik, C. S.; Fletterick, R. J. *Protein Science* **1997**, *6*, 1603–1611.
- (33) Wensing, A. M. J.; Van Maarseveen, N. M.; Nijhuis, M. *Antiviral Research* **2010**, *85*, 59–74.
- (34) Rawlings, N. D.; Barrett, A. J.; Bateman, A. *Nucleic acids research* **2010**, *38*, 227–233.
- (35) Wittmak, L. *Biedermann's Zentralblatt* **1879**, 475.
- (36) Drenth, J.; Jansonius, J. N.; Koekoek, R.; Swen, H. M.; Wothers, B. G. *Nature* **1968**, *218*, 929–932.
- (37) Rawlings, N. D.; Barrett, A. J. *The Biochemical Journal* **1993**, *290*, 205–218.
- (38) Groves, M. R.; Coulombe, R.; Jenkins, J.; Cygler, M. *Proteins* **1998**, *32*, 504–514.
- (39) Rzychon, M.; Chmiel, D.; Stec-Niemczyk, J. *Acta Biochimica Polonica* **2004**, *51*, 861–873.
- (40) Menard, R.; Carriere, J.; Laflamme, P.; Plouffe, C. *Biochemistry* **1991**, 8924–8928.
- (41) Schechter, I.; Berger, A. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **1967**, *27*, 157–162.
- (42) Jones, M. E. *The Biochemical Journal* **1992**, *288*, 533–538.
- (43) Ault, A. *Journal of Chemical Education* **1974**, *51*, 381–386.
- (44) Kitz, R.; Wilson, I. B. *Journal of Biological Chemistry* **1962**, *237*, 3245–3249.
- (45) Tian, W. X.; Tsou, C. L. *Biochemistry* **1982**, *21*, 1028–1032.

- (46) Dixon, M. *The Biochemical Journal* **1953**, *55*, 170–171.
- (47) Hertzberg, R. P.; Pope, A. *Current Opinion in Chemical Biology* **2000**, *4*, 445–451.
- (48) Reymond, J.-L.; Fluxà, V. S.; Maillard, N. *Chemical Communications* **2009**, 34–46.
- (49) Oberthür, C.; Graf, H.; Hamburger, M. *Phytochemistry* **2004**, *65*, 3261–3268.
- (50) Wikipedia; Zell, H. <http://de.wikipedia.org/wiki/Färberwaid> **2012**.
- (51) Çelik, A.; Roberts, G. A.; White, J. H.; Chapman, S. K.; Turner, N. J.; Flitsch, S. L. *Chemical Communications* **2006**, 4492–4494.
- (52) Klein, G.; Reymond, J.-L. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **1998**, *8*, 1113–1116.
- (53) Klein, G.; Reymond, J.-L. *Helvetica Chimica Acta* **1999**, *82*, 400–407.
- (54) Jourdain, N.; Carlón, R. P.; Reymond, J. L. *Tetrahedron Letters* **1998**, *39*, 9415–9418.
- (55) Pérez Carlón, R.; Jourdain, N.; Reymond, J. L. *Chemistry* **2000**, *6*, 4154–4162.
- (56) List, B.; Barbas, C. F.; Lerner, R. a *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1998**, *95*, 15351–15355.
- (57) Kofoed, J.; Darbre, T.; Reymond, J.-L. *Organic & Biomolecular Chemistry* **2006**, *4*, 3268–3281.
- (58) González-García, E.; Hélaïne, V.; Klein, G.; Schuermann, M.; Sprenger, G. A.; Fessner, W.-D.; Reymond, J.-L. *Chemistry* **2003**, *9*, 893–899.
- (59) Sevestre, A.; Hélaïne, V.; Guyot, G.; Martin, C.; Hecquet, L. *Tetrahedron Letters* **2003**, *44*, 827–830.
- (60) Leroy, E.; Bensel, N.; Reymond, J. L. *Advanced Synthesis & Catalysis* **2003**, *345*, 859–865.
- (61) Hennig, A.; Roth, D.; Enderle, T.; Nau, W. M. *ChemBioChem* **2006**, *7*, 733–737.
- (62) Sahoo, H.; Nau, W. M. *ChemBioChem* **2007**, *8*, 567–573.
- (63) Boyer, V.; Fort, S.; Frandsen, T. P.; Schüleïn, M.; Cottaz, S.; Driguez, H. *Chemistry* **2002**, *8*, 1389–1394.
- (64) Zandonella, G.; Haalck, L.; Spener, F.; Faber, K.; Paltauf, F.; Hermetter, A. *Chirality* **1996**, *8*, 481–489.
- (65) Duque, M.; Graupner, M.; Stütz, H.; Wicher, I.; Zechner, R.; Paltauf, F.; Hermetter, A. *Journal of Lipid Research* **1996**, *37*, 868–876.
- (66) Yang, Y.; Babiak, P.; Reymond, J.-L. *Organic & Biomolecular Chemistry* **2006**, *4*, 1746–1754.
- (67) Tanaka, F.; Thayumanavan, R.; Barbas, C. F. *Journal of the American Chemical Society* **2003**, *125*, 8523–8528.
- (68) Humble, M. W.; King, A.; Phillips, I. *Journal of Clinical Pathology* **1977**, *30*, 275–277.
- (69) García-Martos, P.; Marín, P.; Hernández-Molina, J. M.; García-Agudo, L.; Aoufi, S.; Mira, J. *Mycopathologia* **2001**, *150*, 1–4.
- (70) St Hilaire, P. M.; Willert, M.; Juliano, M. A.; Juliano, L.; Meldal, M. *Journal of Combinatorial Chemistry* **1999**, *1*, 509–523.
- (71) Meldal, M.; Svendsen, I.; Breddam, K.; Auzanneau, F. I. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **1994**, *91*, 3314–3318.
- (72) Jung, G.; Beck-Sickinger, A. G. *Angewandte Chemie* **1992**, *104*, 375–391.
- (73) Balkenhohl, F.; von dem Bussche-Hünnefeld, C.; Lansky, A.; Zechel, C. *Angewandte Chemie (Int. Ed.)* **1996**, *35*, 2288–2337.
- (74) Lam, K. S.; Salmon, S. E.; Hersh, E. M.; Hruby, V. J.; Kazmierski, W. M.; Knapp, R. J. *Nature* **1991**, *354*, 82–84.

- (75) Leon, S.; Quarrell, R.; Lowe, G. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **1998**, *8*, 2997–3002.
- (76) Nery, E. D.; Juliano, M. A.; Meldal, M.; Svendsen, I.; Scharfstein, J.; Walmsley, A.; Juliano, L. *The Biochemical Journal* **1997**, *323*, 427–433.
- (77) Meldal, M.; Svendsen, I. B.; Juliano, L.; Juliano, M. A.; Nery, E. D.; Scharfstein, J. *Journal of Peptide Science* **1998**, *4*, 83–91.
- (78) Kofoed, J.; Reymond, J.-L. *Chemical Communications* **2007**, 4453–4455.
- (79) St Hilaire P. M.; Meldal, M. *Angewandte Chemie (Int. Ed.)* **2000**, *39*, 1162–1179.
- (80) Meldal, M. *Tetrahedron Letters* **1992**, *33*, 3077–3080.
- (81) Bayer, E. *Angewandte Chemie* **1991**, *103*, 117–133.
- (82) Meldal, M. *QSAR & Combinatorial Science* **2005**, *24*, 1141–1148.
- (83) Liu, T.; Qian, Z.; Xiao, Q.; Pei, D. *ACS Combinatorial Science* **2011**, *13*, 537–546.
- (84) Kassarijian, A.; Schellenberger, V.; Turck, C. *Peptide Research* **1993**, *6*, 129–133.
- (85) Machon, U. *Dissertation, Universität Würzburg* **2008**.
- (86) Machon, U.; Büchold, C.; Stempka, M.; Schirmeister, T.; Gelhaus, C.; Leippe, M.; Gut, J.; Rosenthal, P. J.; Kisker, C.; Leyh, M.; Schmuck, C. *Journal of Medicinal Chemistry* **2009**, *52*, 5662–5672.
- (87) Corbett, P. T.; Leclaire, J.; Vial, L.; West, K. R.; Wietor, J.-L.; Sanders, J. K. M.; Otto, S. *Chemical Reviews* **2006**, *106*, 3652–3711.
- (88) Otto, S.; Furlan, R. L. E.; Sanders, J. K. M. *Drug Discovery Today* **2002**, *7*, 117–125.
- (89) Seidel, F.; Dick, W. *Berichte der Deutschen Chemischen Gesellschaft* **1927**, *60*, 2018–2023.
- (90) Melson, G.; Busch, D. *Journal of the American Chemical Society* **1964**, *2*, 4834–4837.
- (91) Frobel, K.; Krämer, T. *Chemie in unserer Zeit* **1996**, *30*, 270–285.
- (92) Swann, P. G.; Casanova, R. A.; Desai, A.; Frauenhoff, M. M.; Urbancic, M.; Slomczynska, U.; Hopfinger, A. J.; Le Breton, G. C.; Venton, D. L. *Biopolymers* **1996**, *40*, 617–625.
- (93) Huc, I.; Lehn, J. M. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1997**, *94*, 2106–2110.
- (94) Bunyapaiboonsri, T.; Ramström, O.; Lohmann, S.; Lehn, J. M.; Peng, L.; Goeldner, M. *ChemBioChem* **2001**, *2*, 438–444.
- (95) Lehn, J.-M. *Essays in Contemporary Chemistry* **1999**, 2455–2463.
- (96) Gilbert, H. F. *The Journal of Biological Chemistry* **1997**, *272*, 29399–29402.
- (97) Fernandes, P. A.; Ramos, M. J. *Chemistry* **2004**, *10*, 257–266.
- (98) Ramström, O.; Lehn, J.-M. *Nature Reviews. Drug Discovery* **2002**, *1*, 26–36.
- (99) Ramström, O.; Lehn, J. M. *ChemBioChem* **2000**, *1*, 41–48.
- (100) Nicolaou, K. C.; Hughes, R.; Cho, S. Y.; Winssinger, N.; Smethurst, C.; Labischinski, H.; Endermann, R. *Angewandte Chemie* **2000**, *39*, 3823–3828.
- (101) Nicolaou, K. C.; Hughes, R.; Cho, S. Y.; Winssinger, N.; Labischinski, H.; Endermann, R. *Chemistry* **2001**, *7*, 3824–3843.
- (102) Layer, R. W. *Chemical Reviews* **1963**, *63*, 489–510.
- (103) Godoy-Alcántar, C.; Yatsimirsky, A. K.; Lehn, J.-M. *Journal of Physical Organic Chemistry* **2005**, *18*, 979–985.
- (104) Clayden, J.; Greeves, N.; Warren, S.; Wothers, P. *Organic Chemistry*; 1st ed.; Oxford University Press: Oxford, 2000.
- (105) Lew, W.; Chen, X.; Kim, C. U. *Current Medicinal Chemistry* **2000**, *7*, 663–672.

- (106) Hochgürtel, M.; Kroth, H.; Piecha, D.; Hofmann, M. W.; Nicolau, C.; Krause, S.; Schaaf, O.; Sonnenmoser, G.; Eliseev, A. V. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2002**, *99*, 3382–3387.
- (107) Ramström, O.; Lohmann, S.; Bunyapaiboonsri, T.; Lehn, J.-M. *Chemistry* **2004**, *10*, 1711–1715.
- (108) Langolf, S. *Diplomarbeit, Universität Würzburg* **2008**.
- (109) Langolf, S.; Machon, U.; Ehlers, M.; Sicking, W.; Schirmeister, T.; Büchhold, C.; Gelhaus, C.; Rosenthal, P. J.; Schmuck, C. *ChemMedChem* **2011**, 1581–1586.
- (110) Machon, U. *Unveröffentlichte Ergebnisse* **2008**.
- (111) Schirmeister, T.; Kaeppler, U. *Mini Reviews in Medicinal Chemistry* **2003**, *3*, 361–373.
- (112) Ettari, R.; Zappalà, M.; Micale, N.; Schirmeister, T.; Gelhaus, C.; Leippe, M.; Evers, A.; Grasso, S. *European Journal of Medicinal Chemistry* **2010**, *45*, 3228–3233.
- (113) Micale, N.; Kozikowski, A. P.; Ettari, R.; Grasso, S.; Zappalà, M.; Jeong, J.-J.; Kumar, A.; Hanspal, M.; Chishti, A. H. *Journal of Medicinal Chemistry* **2006**, *49*, 3064–3067.
- (114) Fricker, S. P. *Metallomics: Integrated Biometal Science* **2010**, *2*, 366–377.
- (115) Otto, H.-H.; Schirmeister, T. *Chemical Reviews* **1997**, *97*, 133–172.
- (116) McKerrow, J. H. *International Journal for Parasitology* **1999**, *29*, 833–837.
- (117) Caffrey, C.; Scory, S.; Steverding, D. *Current Drug Targets* **2000**, 155–162.
- (118) Schirmeister, T.; Klockow, A. *Mini Reviews in Medicinal Chemistry* **2003**, *3*, 585–596.
- (119) Barrett, A. J.; Kembhavi, A. A.; Brown, M. A.; Kirschke, H.; Knight, C.; Tamai, M.; Hanada, K. *Biochemical Journal* **1982**, *201*, 189–198.
- (120) Santos, M. M. M.; Moreira, R. *Mini Reviews in Medicinal Chemistry* **2007**, *7*, 1040–1050.
- (121) Schmuck, C.; Machon, U. *European Journal of Organic Chemistry* **2006**, *2006*, 4385–4392.
- (122) Schmuck, C.; Bickert, V.; Merschky, M.; Geiger, L.; Rupprecht, D.; Dudaczek, J.; Wich, P.; Rehm, T.; Machon, U. *European Journal of Organic Chemistry* **2008**, 324–329.
- (123) Schmuck, C.; Geiger, L. *Chemical Communications* **2005**, 772–774.
- (124) Evers, A.; Heppner, S.; Leippe, M.; Gelhaus, C. *Biological Chemistry* **2008**, *389*, 1523–1525.
- (125) T. Schirmeister, C. Schmuck, U. Machon, S. Langolf, K. Baumann, S. G. R. N-protected guanidine-substituted furans, thiophenes and pyrroles as cysteine protease inhibitors, and their therapeutic use, WO 2010/ 037536A1, **2010**.
- (126) Desai, P. V.; Patny, A.; Gut, J.; Rosenthal, P. J.; Tekwani, B.; Srivastava, A.; Avery, M. *Journal of Medicinal Chemistry* **2006**, *49*, 1576–1584.
- (127) Shenai, B. R.; Sijwali, P. S.; Singh, A.; Rosenthal, P. J. *The Journal of Biological Chemistry* **2000**, *275*, 29000–29010.
- (128) Caffrey, C. R.; Hansell, E.; Lucas, K. D.; Brinen, L. S.; Alvarez Hernandez, A.; Cheng, J.; Gwaltney, S. L.; Roush, W. R.; Stierhof, Y. D.; Bogyo, M.; Steverding, D.; McKerrow, J. H. *Molecular and Biochemical Parasitology* **2001**, *118*, 61–73.
- (129) Ehlers, M. *Examensarbeit, Universität Duisburg-Essen* **2011**.
- (130) Anand, K.; Ziebuhr, J.; Wadhvani, P.; Mesters, J. R.; Hilgenfeld, R. *Science* **2003**, *300*, 1763–1767.
- (131) Schiller, M. *Dissertation, Universität Würzburg* **2009**.

- (132) Kaeppler, U.; Stiefl, N.; Schiller, M.; Vicik, R.; Breuning, A.; Schmitz, W.; Rupprecht, D.; Schmuck, C.; Baumann, K.; Ziebuhr, J.; Schirmeister, T. *Journal of Medicinal Chemistry* **2005**, *48*, 6832–6842.
- (133) Du, L.; He, Y.; Zhou, Y.; Liu, S.; Zheng, B. J.; Jiang, S. *Nature Reviews Microbiology* **2009**, *7*, 226–236.
- (134) Yang, H.; Yang, M.; Ding, Y.; Liu, Y.; Lou, Z.; Zhou, Z.; Sun, L.; Mo, L.; Ye, S.; Pang, H.; Gao, G. F.; Anand, K.; Bartlam, M.; Hilgenfeld, R.; Rao, Z. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2003**, *100*, 13190–13195.
- (135) Chou, C.-Y.; Chang, H.-C.; Hsu, W.-C.; Lin, T.-Z.; Lin, C.-H.; Chang, G.-G. *Biochemistry* **2004**, *43*, 14958–14970.
- (136) Plewczynski, D.; Hoffmann, M.; von Grotthuss, M.; Ginalski, K.; Rychewski, L. *Chemical Biology & Drug Design* **2007**, *69*, 269–279.
- (137) Mukherjee, P.; Shah, F.; Desai, P.; Avery, M. *Journal of Chemical Information and Modeling* **2011**, *51*, 1376–1392.
- (138) Wang, H.-M.; Liang, P.-H. *Expert Opinion on Therapeutic Patents* **2007**, *17*, 533–546.
- (139) Zhang, J.; Pettersson, H. I.; Huitema, C.; Niu, C.; Yin, J.; James, M. N. G.; Eltis, L. D.; Vederas, J. C. *Journal of Medicinal Chemistry* **2007**, *50*, 1850–1864.
- (140) Chan, W. C.; White, P. D. *Fmoc Solid Phase Peptide Synthesis: A Practical Approach*; Oxford University Press, USA, 2000; Vol. 222, p. 346.
- (141) Salehi, P.; Firouzabadi, H.; Farrokhi, A.; Gholizadeh, M. *Synthesis* **2001**, *15*, 2273–2276.
- (142) Chaubey, G. S.; Kharsyntiew, B.; Mahanti, M. K. *Journal of Physical Organic Chemistry* **2004**, *17*, 83–87.
- (143) Hunsen, M. *Synthesis* **2005**, 2487–2490.
- (144) Kaiser, E.; Colecott, R.; Bossinger, C.; Cook, P. *Analytical Biochemistry* **1970**, *34*, 595–598.
- (145) Attardi, M. E.; Porcu, G.; Taddei, M. *Tetrahedron Letters* **2000**, *41*, 7391–7394.
- (146) Blanchard, J. E.; Elowe, N. H.; Huitema, C.; Fortin, P. D.; Cechetto, J. D.; Eltis, L. D.; Brown, E. D. *Chemistry & Biology* **2004**, *11*, 1445–1453.
- (147) Ziebuhr, J.; Heussipp, G.; Siddell, S. G. *Journal of Virology* **1997**, *71*, 3992–3997.
- (148) Ziebuhr, J.; Herold, J.; Siddell, S. G. *Journal of Virology* **1995**, *69*, 4331–4338.
- (149) Edman, P. *Acta Chemica Scandinavica* **1950**, *4*, 283–293.
- (150) Boeijen, A.; Liskamp, R. M. J. *Tetrahedron Letters* **1998**, *39*, 3589–3592.
- (151) Fan, K.; Wei, P.; Feng, Q.; Chen, S.; Huang, C.; Ma, L.; Lai, B.; Pei, J.; Liu, Y.; Chen, J.; Lai, L. *The Journal of Biological Chemistry* **2004**, *279*, 1637–1642.
- (152) Chuck, C.-P.; Chong, L.-T.; Chen, C.; Chow, H.-F.; Wan, D. C.-C.; Wong, K.-B. *PloS one* **2010**, *5*, e13197.
- (153) Lai, L.; Han, X.; Chen, H.; Wei, P.; Huang, C.; Liu, S.; Fan, K.; Zhou, L.; Liu, Z.; Pei, J.; Liu, Y. *Current Pharmaceutical Design* **2006**, *12*, 4555–4564.
- (154) Vicik, R.; Busemann, M.; Baumann, K.; Schirmeister, T. *Current Topics in Medicinal Chemistry* **2006**, *6*, 331–353.
- (155) Liang, P.-H. *Current Topics in Medicinal Chemistry* **2006**, *6*, 361–376.
- (156) Goetz, D. H.; Choe, Y.; Hansell, E.; Chen, Y. T.; McDowell, M.; Jonsson, C. B.; Roush, W. R.; McKerrow, J.; Craik, C. S. *Biochemistry* **2007**, *46*, 8744–8752.
- (157) Crawford, C.; Mason, R. W.; Wikstrom, P.; Shaw, E. *The Biochemical journal* **1988**, *253*, 751–758.
- (158) Mason, R. W.; Green, G. D.; Barrett, a J. *The Biochemical journal* **1985**, *226*, 233–241.

-
- (159) Leiros, H.-kirsti S.; Brandsdal, B. O.; Andersen, O. L. E. A.; Os, V.; Leiros, I.; Helland, R.; Otlewski, J.; Willassen, N. P.; Smalås, A. O. **2004**, 1056–1070.
- (160) Ramjee, M. K.; Henderson, I. M.; McLoughlin, S. B.; Padova, A. *Thrombosis research* **2000**, *98*, 559–569.
- (161) Chase, T.; Shaw, E. *Biochemistry* **1969**, *8*, 2212–2224.
- (162) Hesse, M.; Meier, H.; Zeeh, B. *Spektroskopische Methoden in der organischen Chemie*; 6th ed.; Georg Thieme Verlag, 2005.
- (163) Baricos, W. H.; Zhou, Y.; Mason, R. W.; Barrett, A. J. *Biochemical Journal* **1988**, *252*, 301–304.
- (164) Mason, R. W. *The Biochemical Journal* **1986**, *240*, 285–288.
- (165) Lopes, A. R.; Sato, P. M.; Terra, W. R. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* **2009**, *70*, 188–203.
- (166) Williams, D. H.; Bardsley, B. *Angewandte Chemie (Int. Ed.)* **1999**, *38*, 1172–1193.

8.2 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

°C	Grad Celsius	<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
4-DMAP	4-(Dimethylamino)-pyridine	EDTA	Ethylendiamin-tetraessigsäure
abs.	absolutiert	EE	Ethylacetat
Abz	2-Aminobenzoessäure	ESI	Elektrospray Ionisation
Ac	Acetyl	et al.	et alii
ACN	Acetonitril	Et	Ethyl
Ala (A)	Alanin	Et ₂ O	Diethylether
AMC	7-Amino-3-methylcoumarin	Et ₃ N	Triethylamin
Äq	Äquivalent(e)	Fmoc	Fluorenylmethoxycarbonyl
aq	aqueous	FP-2	Falcipain-2
Ar	Aromat(en)	FRET	Fluoreszenz-Resonanz-Elektronen-Transfer
Arg (R)	Arginin	FT-IR	Fourier-Transformation-Infrarotspektroskopie
AS	Aminosäure	Fu	Furan
Asn (N)	Asparagin	g	Gramm
Asp (D)	Asparaginsäure	Gln (Q)	Glutamin
Bn	Benzyl	Glu (E)	Glutaminsäure
Boc	<i>tert</i> -Butyloxycarbonyl	Gly (G)	Glycin
br.	breit	Gua	Guanidin
bzw.	beziehungsweise	h	Stunde(n)
Cat B	Cathepsin B	HCoV	human corona virus
Cat K	Cathepsin K	HCTU	5-Chloro-1-[bis-(dimethylamino)-methylene]-1 <i>H</i> -benzotriazolium-3-oxidhexafluorophosphat
Cat L	Cathepsin L	Hex	<i>n</i> -Hexan
Cbz	Benzyloxycarbonyl	His (H)	Histidin
c _{final}	finale Konzentration	HPLC	high performance liquid chromatography
ChT	Chymotrypsin	Hz	Hertz
Cl-HOBt	6-Chloro-1-hydroxibenzotriazol	Ile (I)	Isoleucin
CoV	corona virus	Inh	Inhibitor
Cy	Cyclohexan	<i>i</i> -Pr	<i>iso</i> -Propanol
Cys (C)	Cystein	IR	Infrarotspektroskopie
d	Tag(e)	J	Kopplungskonstante
Da	Dalton	K	Kelvin
DC	Dünnschicht-chromatographie	kat.	katalytisch
DCC	<i>N,N'</i> -Dicyclohexylcarbodiimid	<i>K_m</i>	Michaelis-Menten-Konstante
DCM	Dichlormethan	konz.	Konzentriert
DIC	<i>N,N</i> -Diisopropylcarbodiimid		
DIEA	Diisopropylethylamin		
DMF	<i>N,N'</i> -Dimethylformamid		
DMSO	Dimethylsulfoxid		
DTT	Dithiothreitol		

I	Liter	Py	Pyrrol
LC/MS	Liquid chromatography/ mass spectrometry	PyBOP	Benzotriazol-(1-yloxy)- tripyrrolidino-phosphonium- hexafluorophosphat
Leu (L)	Leucin		
LM	Lösungsmittel	Pyr	Pyridin
Lys (K)	Lysin	quant.	quantitativ
m	<i>meta</i>	R	Rest
m	Meter	R _f	Retentionsfaktor
M	molar	Rhod	Rhodesain
m/z	Masse pro Ladung	RP	reversed phase
MBP	maltose binding protein	RT	Raumtemperatur
Me	Methyl	SARS	Severe Accute Respiratory Syndrome
MHz	Megahertz		
min	Minute(n)	Sel-Bib	Selektionsbibliothek
mol	Mol	Ser (S)	Serin
MPLC	medium performance liquid chromatography	Smp.	Schmelzpunkt
M ^{Pro}	Hauptprotease	Stabw	Standardabweichung
MS	Massenspektrometrie	Suc	Succinimid
MW	Mittelwert	<i>T. b.</i>	<i>Trypanosoma brucei</i>
neg.	negativ	<i>T. b. b.</i>	<i>Trypanosoma brucei brucei</i>
NMM	<i>N</i> -Methylmorpholin	TBC	Tetrabutylammonium- cyanoborhydrid
NMP	<i>N</i> -Methyl-2-pyrrolidon	<i>t</i> -Bu	<i>tert</i> -Butyl
NMR	Kernresonanzspektroskopie	TFA	Trifluoressigsäure
Nr.	Nummer	THF	Tetrahydrofuran
o	<i>ortho</i>	Thr (T)	Threonin
p	<i>para</i>	TIS	Triisopropylsilan
<i>P.f.</i>	<i>Plasmodium falciparum</i>	t _R	Retentionszeit
Pbf	2,2,5,7,8-Pentamethyl- dihydrobenzofuran-5- sulfonyl	TRIS	Tris-(hydroxymethyl)- aminomethan
PCC	Pyridiniumchlorochromat	Trp (W)	Tryptophan
Ph	Phenyl	Trt	Trityl
Phe (F)	Phenylalanin	Tryp	Trypsin
Phg	Phenylglycin	Tyr (Y)	Tyrosin
pK _S	Säurekonstante	UV	Ultraviolett-Spektroskopie
pos.	positiv	V	Volt
ppm	parts per million	Val (V)	Valin
PTH	Phenylthiohydantoin	Verb.	Verbindung
		z.B.	zum Beispiel

8.3 ERGÄNZENDE EXPERIMENTELLE DATEN

8.3.1 HPLC-DATEN

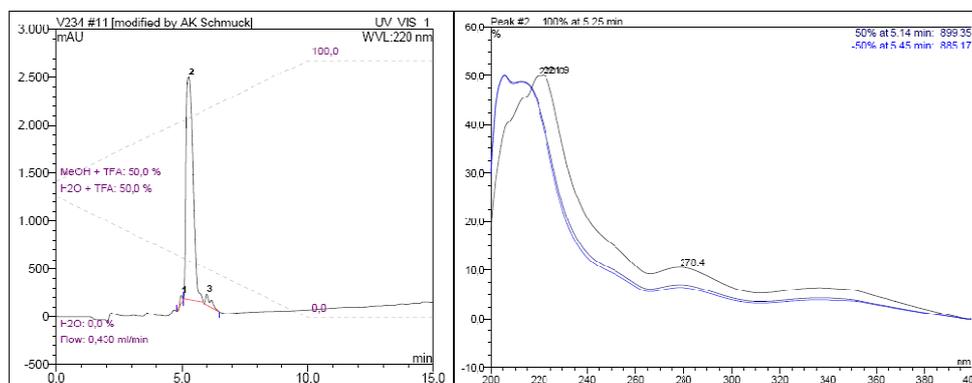


Abbildung 118: Mittels HPLC wurde für Verbindung **127** eine Reinheit von 91 % ermittelt. Säule: YMC ODS-A (15 cm × 3.0 mm, 5 μm); Lösungsmittel 50 bis 100 % Methanol/Wasser in 15 min (0.05 % TFA); Flussrate: 0.43 ml/min; Retentionszeit $t_R = 5.3$ min; Detektionswellenlänge 220 nm.

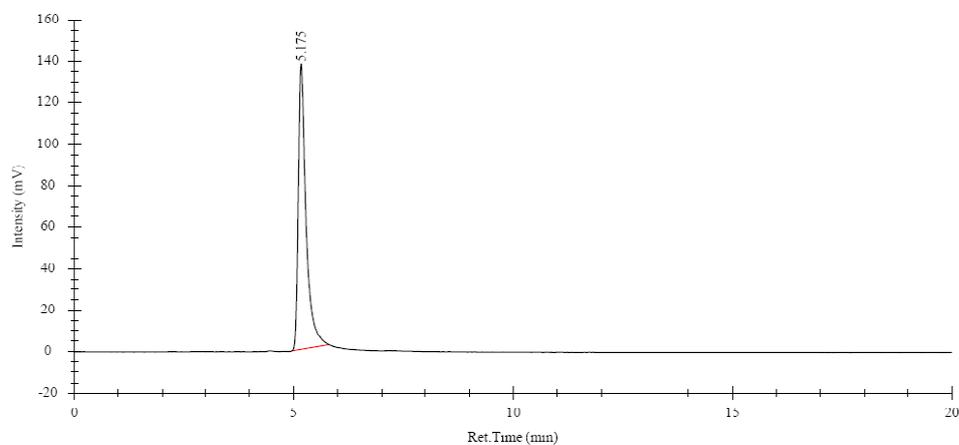


Abbildung 119: Mittels HPLC wurde für Verbindung **147** eine Reinheit von 99 % ermittelt. Säule: Macherey-Nagel Nucleosil (25 cm × 4.0 mm, 7 μm); Lösungsmittel: *n*-Hexan/Ethylacetat 6/4 in 20 min; Flussrate: 0.8 ml/min; Retentionszeit $t_R = 5.1$ min; Detektionswellenlänge 290 nm.

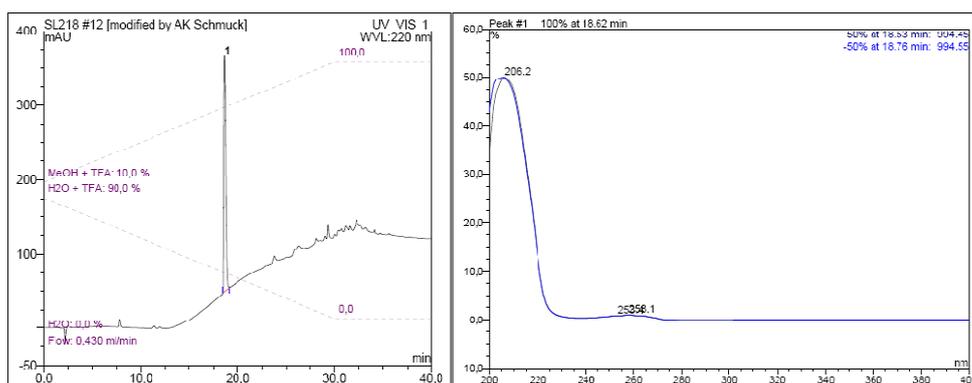


Abbildung 120: Mittels HPLC wurde für Verbindung **149** eine Reinheit von 95 % ermittelt. Säule: YMC ODS-A (15 cm × 3.0 mm, 5 μm); Lösungsmittel 10 bis 100 % Methanol/Wasser in 40 min (0.05 % TFA); Flussrate: 0.43 ml/min; Retentionszeit $t_R = 18.6$ min; Detektionswellenlänge 220 nm.

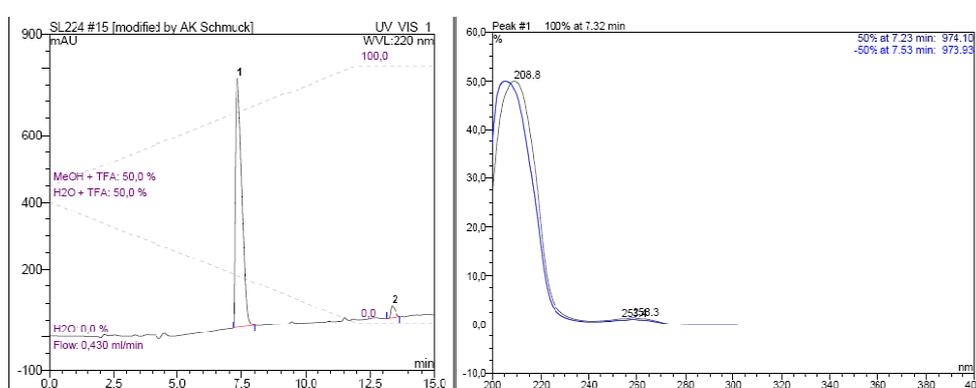


Abbildung 121: Mittels HPLC wurde für Verbindung **150** eine Reinheit von 95 % ermittelt. Säule: YMC ODS-A (15 cm × 3.0 mm, 5 μm); Lösungsmittel 50 bis 100 % Methanol/Wasser in 15 min (0.05 % TFA); Flussrate: 0.43 ml/min; Retentionszeit $t_R = 7.3$ min; Detektionswellenlänge 220 nm.

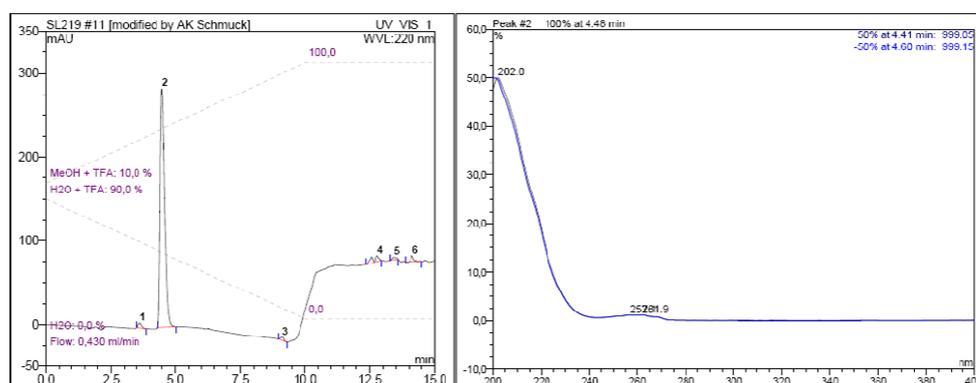


Abbildung 122: Mittels HPLC wurde für Verbindung **151** eine Reinheit von 91 % ermittelt. Säule: YMC ODS-A (15 cm × 3.0 mm, 5 μm); Lösungsmittel 10 bis 100 % Methanol/Wasser in 15 min (0.05 % TFA); Flussrate: 0.43 ml/min; Retentionszeit $t_R = 4.48$ min; Detektionswellenlänge 220 nm.

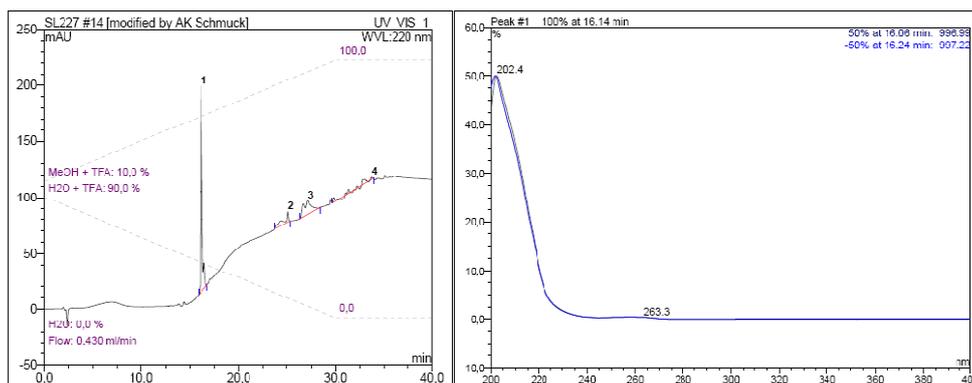


Abbildung 123: Mittels HPLC wurde für Verbindung **154** eine Reinheit von 90 % ermittelt. Säule: YMC ODS-A (15 cm × 3.0 mm, 5 μm); Lösungsmittel 10 bis 100 % Methanol/Wasser in 40 min (0.05 % TFA); Flussrate: 0.43 ml/min; Retentionszeit $t_R = 16.1$ min; Detektionswellenlänge 220 nm.

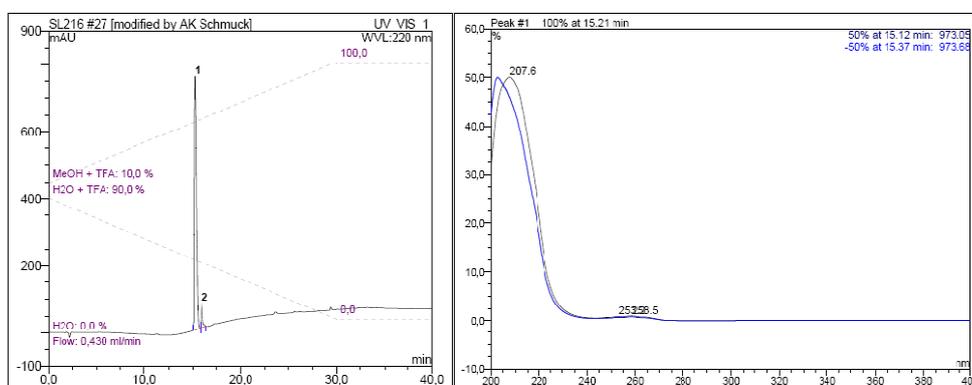
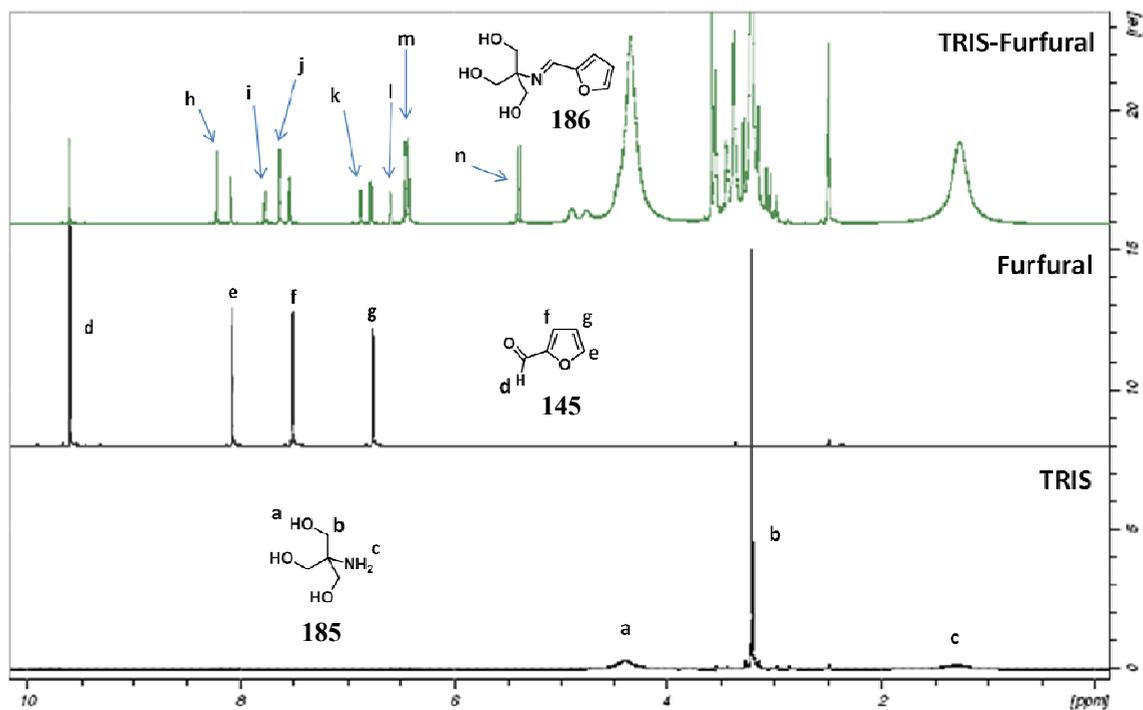


Abbildung 124: Mittels HPLC wurde für Verbindung **155** eine Reinheit von 91 % ermittelt. Säule: YMC ODS-A (15 cm × 3.0 mm, 5 μm); Lösungsmittel 10 bis 100 % Methanol/Wasser in 40 min (0.05 % TFA); Flussrate: 0.43 ml/min; Retentionszeit $t_R = 15.2$ min; Detektionswellenlänge 220 nm.

8.3.2 $^1\text{H-NMR}$ UNTERSUCHUNG DER WECHSELWIRKUNG TRIS/ALDEHYD

Abgebildet sind hier die $^1\text{H-NMR}$ -Spektren von Furfural **145**, TRIS **185** und einer Mischung aus Furfural **145** und TRIS **185** in DMSO-d_6 . Dadurch ließ sich die Bildung des Imins **186** nachweisen. Das TRIS **185** reagierte mit dem Aldehyd **145** zum Imin **186**.



8.3.3 FLUORIMETRISCHE DATEN

8.3.3.1 Daten der Inhibitoren zweiter Generation für Rhodesain

Nr.	Prozentuale Hemmung bei 100 μM (vier unabhängige Messwerte in %)				MW (%)	Prozentuale Hemmung bei unterschiedlichen Konzentrationen zur Bestimmung des IC_{50} -Werts (MW aus vier Messungen in %)							IC_{50}	K_i
	1	2	3	4		100 μM	80 μM	60 μM	40 μM	20 μM	10 μM	1 μM		
60	94	95	96	94	95	95	90	83	73	40	19	7	23.0	470
61	95	97	98	98	97	99	99	99	99	28	5	3	22.5	460
62	99	100	99	99	99	98	99	95	91	21	3	0	25.9	530
63	100	98	98	98	99	99	99	98	96	93	49	0	10.1	200
64	98	99	99	98	99	98	97	89	30	3	2	0	44.8	910
65	99	99	99	98	99	99	99	99	99	98	77	2	4.40	90.0
66	98	99	99	99	99	99	98	99	97	8	0	0	26.7	540
67	11	9	13	8	11	13	8	4	0	1	0	0	-	-
68	99	96	99	99	98	98	97	97	98	98	90	0	5.65	110

MW: Mittelwert.

8.3.3.2 Daten der Inhibitoren zweiter Generation für Falciapin-2

Nr.	Prozentuale Hemmung bei 20 μM (zwei unabhängige Messwerte in %)		MW (%)	Prozentuale Hemmung bei unterschiedlichen Konzentrationen zur Bestimmung des IC_{50} -Werts (MW aus zwei Messungen, Werte in %)							IC_{50}	K_i
	1	2		20 μM	16 μM	12 μM	10 μM	8 μM	4 μM	2 μM		
60	77	62	70	91	80	54	44	17	0	0	11.2	3.92
	1	2		10 μM	8 μM	6 μM	5 μM	4 μM	2 μM	1 μM	μM	μM
61	87	91	89	82	43	39	13	11	0	0	7.57	2.71
62	86	95	91	75	64	34	25	12	4	0	7.05	2.47
63	96	96	96	61	56	33	19	18	3	2	2.11	0.73
64	96	83	90	88	83	43	32	18	4	3	6.04	2.11
	1	2		4 μM	3.2 μM	2.4 μM	2 μM	1.6 μM	0.8 μM	0.4 μM	μM	μM
63	90	89	90	80	59	44	40	37	8	2	2.42	0.85
65	96	96	96	83	73	55	44	37	12	4	2.11	0.73
68	90	93	92	90	85	70	59	48	20	3	1.62	0.57

MW: Mittelwert.

8.3.3.3 Daten der Komponenten 107, 116, 117 und 119

Nr.	Prozentuale Hemmung bei 20 μM (zwei unabhängige Messwerte in %)		MW (%)	Prozentuale Hemmung bei unterschiedlichen Konzentrationen zur Bestimmung des IC_{50} -Werts (MW aus zwei Messungen, Werte in %)							IC_{50}	K_i
	1	2		40 μM	32 μM	24 μM	20 μM	16 μM	8 μM	4 μM		
107	50	52	51	81	67	57	52	37	21	12	19	14.9
116	48	46	47	-	-	-	-	-	-	-	-	-
117	3	0	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-
				100 μM	80 μM	60 μM	50 μM	40 μM	20 μM	10 μM		
119	74	68	71	97	97	92	85	84	64	67	6	4.7

MW: Mittelwert

8.3.3.4 Daten der Festphaseninhibitoren 124–126

Inkubationszeit: 20 h bei RT

Nr.	Messung (in %)			MW	Stabw
	1	2	3		
PEGA	16.6	21.0	40.2	25.9	12.6
107	100	100	100	100	0.0
124	90.1	100	90.4	93.6	5.7
125	97.1	98.8	90.8	95.6	4.2
126	81.6	83.5	91.1	85.4	5.0

MW: Mittelwert; Stabw: Standardabweichung.

Inkubationszeit: 6 h bei RT

Nr.	Messung (in %)			MW	Stabw
	1	2	3		
PEGA	12.6	22.2	4.3	13.0	8.9
107	100	100	99.3	100	0.7
124	95.8	94.0	100	98.1	5.5
125	95.1	94.6	95.4	95.0	0.4
126	93.5	97.8	95.1	95.5	2.1

MW: Mittelwert; Stabw: Standardabweichung.

Inkubationszeit: 5 min bei RT

Nr.	Messung (in %)			MW	Stabw
	1	2	3		
PEGA	0	10.0	4.9	3.4	7.4
107	100	100	99.5	99.9	0.3
124	77.2	71.3	76.8	75.1	3.2
125	72.6	66.3	73.9	70.9	4.1
126	80.7	77.8	81.7	80.1	2.0

MW: Mittelwert; Stabw: Standardabweichung.

Inkubationszeit: 20 h bei 4 °C

Nr.	Messung (in %)			MW	Stabw
	1	2	3		
PEGA	13.4	16.0	17.4	15.6	1.91
107	100	99.8	100	100	0.2
124	97.9	95.5	95.7	96.4	1.3
125	96.3	98.2	97.7	97.4	0.9
126	81.1	94.5	89.1	88.2	6.7

MW: Mittelwert; Stabw: Standardabweichung.

8.3.3.5 Daten des dynamischen Screenings

Cathepsin B

Prozentuale Hemmung der Einzelkomponenten					Prozentuale Hemmung der Dekonvolutionsbibliothek						
Nr.	Messung (in %)			MW	Stabw	Nr.	Messung (in %)			MW	Stabw
	1	2	3			1	2	3			
141	-0.4	1.0	-7.2	-2.2	4.4	-141	24.1	28.4	28.2	26.9	2.4
142	1.1	-0.4	-6.2	-1.8	3.8	-142	26.7	29.7	28.5	28.3	1.5
143	-5.2	2.3	-6.7	-3.2	4.8	-143	25.3	22.5	30.8	26.2	4.2
144	1.1	-5.8	-6.3	-3.7	4.1	-144	21.5	17.7	28.6	22.6	5.5
145	2.4	0.1	-3.3	-0.3	2.9	-145	21.1	26.7	31.6	26.5	5.3
146	-10.7	-10.3	-0.5	-7.2	5.8	-146	7.1	15.5	9.2	10.6	4.4
147	0.0	6.2	-2.7	1.2	4.5	-147	28.1	25.7	18.6	24.1	4.9
148	1.0	7.1	-1.5	2.2	4.4	-148	24.8	25.3	30.5	26.9	3.1
149	-2.6	-9.6	11.5	-0.2	10.7	-149	24.3	28.3	39.0	30.5	7.6
150	2.4	-4.6	0.3	-0.6	3.6	-150	24.7	27.9	35.0	29.2	5.3
151	-14.1	2.1	-0.5	-4.2	8.7	-151	27.1	26.0	33.1	28.7	3.8
152	9.4	9.3	7.6	8.8	1.0	-152	25.2	15.2	28.0	22.8	6.7
153	-12.2	5.7	13.2	2.2	13.1	-153	17.3	25.8	27.7	23.6	5.6
154	-9.1	-9.1	0.4	-5.9	5.5	-154	26.5	32.8	35.2	31.5	4.5
155	-12.9	-5.0	-1.3	-6.4	5.9	-155	34.5	32.5	31.5	32.8	1.5
156	-2.9	10.5	-11.8	-1.4	11.2	-156	27.8	19.6	14.8	20.7	6.6
157	5.0	-9.5	-2.2	-2.2	7.3	-157	30.3	40.7	33.2	34.8	5.4
158	-5.6	6.3	-1.0	-0.1	6.0	-158	27.9	20.4	15.0	21.1	6.5
159	-14.2	-5.0	2.6	-5.5	8.4	-159	21.5	19.1	12.2	17.6	4.8
160	-2.7	11.4	5.6	4.8	7.1	-160	19.5	20.5	24.6	21.5	2.7
161	-4.5	3.7	1.2	0.1	4.2	-161	24.4	26.8	19.9	23.7	3.5
Bib	44.4	41.0	51.4	45.6	5.3	Bib	33.6	40.8	34.2	36.2	4.0

MW: Mittelwert; Stabw: Standardabweichung.

MW: Mittelwert; Stabw: Standardabweichung.

Prozentuale Hemmung der Selektionsbibliothek										
	Nr.	-144	-146	-147	-152	-153	-156	-159	-160	Sel-Bib
Messung (in %)	1	10.2	-4.3	11.9	15.7	9.7	-3.2	2.4	4.3	17.3
	2	8.0	1.2	4.5	24.0	23.2	1.7	1.5	3.6	10.3
	3	3.7	9.1	7.2	15.6	20.6	7.7	6.9	-0.1	10.0
MW		7.3	2.0	7.9	18.4	17.8	2.0	3.6	2.6	12.6
Stabw		3.3	6.7	3.8	4.8	7.1	5.5	2.9	2.4	4.2

MW: Mittelwert; Stabw: Standardabweichung.

Cathepsin K

Prozentuale Hemmung der Einzelkomponenten					Prozentuale Hemmung der Dekonvolutionsbibliothek						
Nr.	Messung (in %)			MW	Stabw	Nr.	Messung (in %)			MW	Stabw
	1	2	3			1	2	3			
141	1.4	3.4	-3.8	0.3	3.7	-141	55.0	62.5	50.3	55.9	6.2
142	7.7	2.0	16.4	8.7	7.2	-142	59.6	58.6	54.6	57.6	2.7
143	6.0	-10.3	-5.6	-3.3	8.4	-143	62.4	60.2	55.2	59.3	3.7
144	7.8	6.4	14.4	9.5	4.2	-144	57.5	54.2	61.5	57.7	3.7
145	0.3	-4.3	-0.7	-1.6	2.5	-145	54.4	53.3	56.0	54.6	1.3
146	-12.7	-5.3	-3.9	-7.3	4.7	-146	54.8	58.5	54.9	56.0	2.1
147	-0.9	7.6	11.2	6.0	6.2	-147	58.9	58.5	53.6	57.0	2.9
148	50.0	46.6	45.9	47.5	2.2	-148	61.1	60.6	53.6	58.4	4.2
149	4.3	3.2	7.9	5.1	2.5	-149	57.7	57.2	51.7	55.5	3.3
150	-3.4	-0.6	0.2	-1.3	1.9	-150	57.5	62.5	51.2	57.1	5.7
151	-11.1	-5.3	-3.4	-6.6	4.0	-151	59.3	58.7	51.0	56.3	4.6
152	21.8	17.6	17.4	18.9	2.5	-152	60.3	51.3	48.4	53.3	6.2
153	-5.6	-6.6	-14.7	-9.0	5.0	-153	52.3	63.0	55.2	56.8	5.5
154	7.7	5.6	12.2	8.5	3.4	-154	51.4	47.6	37.9	45.6	6.9
155	15.4	9.8	24.1	16.4	7.2	-155	50.9	50.8	49.1	50.3	1.0
156	-6.0	-11.2	-2.4	-6.5	4.4	-156	55.2	60.2	57.0	57.5	2.5
157	4.5	2.9	13.4	6.9	5.7	-157	59.0	58.7	52.3	56.7	3.8
158	-6.3	-0.4	-0.3	-2.3	3.5	-158	58.2	58.1	62.3	59.6	2.4
159	2.1	-2.1	-0.3	-0.1	2.1	-159	57.4	55.3	65.7	59.5	5.5
160	0.0	2.4	3.7	2.0	1.9	-160	55.3	52.6	49.8	52.6	2.8
161	4.2	-13.5	-4.7	-4.6	8.9	-161	60.0	62.4	54.0	58.8	4.3
Bib	85.0	78.3	82.2	81.8	3.4	Bib	57.7	49.4	55.6	54.2	4.3

MW: Mittelwert; Stabw: Standardabweichung.

MW: Mittelwert; Stabw: Standardabweichung.

Prozentuale Hemmung der Selektionsbibliothek									
	Nr.	-142	-144	-148	-152	-154	-155	-160	Sel-Bib
Messung (in %)	1	40.0	58.8	39.4	33.8	46.0	57.9	18.8	42.2
	2	52.3	61.4	43.5	29.6	53.0	66.6	28.2	51.5
	3	59.2	60.4	48.3	22.9	39.6	51.4	25.7	59.3
MW		50.5	60.2	43.8	28.8	46.2	58.6	24.2	51.0
Stabw		9.7	1.3	4.5	5.5	6.7	7.6	4.9	8.6

MW: Mittelwert; Stabw: Standardabweichung.

Cathepsin L

Prozentuale Hemmung der Einzelkomponenten						Prozentuale Hemmung der Dekonvolutionsbibliothek					
Nr.	Messung (in %)			MW	Stabw	Nr.	Messung (in %)			MW	Stabw
	1	2	3			1	2	3			
141	-5.2	1.7	1.2	-0.8	3.8	-141	69.9	71.6	72.1	71.2	1.1
142	-8.6	-8.4	-2.2	-6.4	3.6	-142	73.5	70.5	70.7	71.6	1.7
143	-1.7	-1.7	-7.4	-3.6	3.3	-143	67.0	70.9	68.5	68.8	2.0
144	-13.7	-13.3	-11.5	-12.8	1.2	-144	64.0	70.9	72.6	69.1	4.6
145	-2.3	-1.8	-9.3	-4.4	4.2	-145	66.7	69.9	64.9	67.2	2.5
146	4.3	-0.6	8.6	4.1	4.6	-146	71.0	66.0	70.1	69.0	2.7
147	5.9	6.1	5.3	5.8	0.4	-147	68.5	69.8	74.0	70.7	2.9
148	0.4	1.1	5.1	2.2	2.5	-148	73.7	68.5	69.9	70.7	2.7
149	83.6	83.3	82.3	83.1	0.7	-149	44.5	42.7	51.3	46.2	4.5
150	58.8	62.8	60.9	60.8	2.0	-150	56.5	53.5	63.5	57.8	5.1
151	-1.7	-5.6	-6.9	-4.7	2.7	-151	70.0	66.8	65.8	67.5	2.2
152	6.6	12.5	24.5	14.5	9.1	-152	67.1	66.1	52.0	61.7	8.4
153	-1.8	-2.9	-1.5	-2.0	0.7	-153	65.8	68.7	67.5	67.3	1.5
154	-7.5	-5.5	7.5	-1.8	8.1	-154	59.3	64.9	43.5	55.9	11.1
155	28.4	39.3	48.2	38.6	9.9	-155	57.7	57.0	47.3	54.0	5.8
156	1.3	5.9	-1.4	1.9	3.7	-156	73.0	65.6	63.6	67.4	5.0
157	1.6	-3.7	-4.3	-2.1	3.2	-157	67.6	66.2	69.8	67.9	1.8
158	4.4	8.0	7.8	6.8	2.0	-158	70.1	71.0	73.7	71.6	1.9
159	8.1	4.1	-5.2	2.3	6.8	-159	69.1	71.6	67.8	69.5	1.9
160	1.7	5.1	0.4	2.4	2.4	-160	63.1	57.4	63.7	61.4	3.4
161	10.1	9.3	-1.8	5.9	6.7	-161	72.8	70.6	68.8	70.7	2.0
Bib	86.3	86.4	88.9	87.2	1.5	Bib	67.7	67.3	58.1	64.4	5.5

MW: Mittelwert; Stabw: Standardabweichung.

MW: Mittelwert; Stabw: Standardabweichung.

Prozentuale Hemmung der Selektionsbibliothek								
	Nr.	-146	-147	-149	-150	-152	-155	Sel-Bib
Messung (in %)	1	71.3	69.3	53.3	63.7	66.8	62.0	62.2
	2	68.0	70.2	47.9	60.4	58.4	63.6	65.1
	3	69.8	71.2	57.3	62.8	59.8	59.8	60.5
MW		69.7	70.2	52.8	62.3	61.6	61.8	62.6
Stabw		1.7	0.9	4.7	1.7	4.5	1.9	2.3

MW: Mittelwert; Stabw: Standardabweichung.

Chymotrypsin

Prozentuale Hemmung der Einzelkomponenten					Prozentuale Hemmung der Dekonvolutionsbibliothek						
Nr.	Messung (in %)			MW	Stabw	Nr.	Messung (in %)			MW	Stabw
	1	2	3			1	2	3			
141	1.4	-7.4	-6.5	-4.2	4.8	-141	36.3	38.9	43.6	39.6	3.7
142	-7.8	-10.5	-3.8	-7.4	3.4	-142	38.4	38.7	31.3	36.1	4.2
143	-1.4	4.2	2.2	1.7	2.8	-143	35.5	34.7	34.7	35.0	0.5
144	-10.6	-13.4	-3.6	-9.2	5.0	-144	32.7	30.9	33.6	32.4	1.4
145	-5.9	-2.2	-8.1	-5.4	3.0	-145	36.9	33.8	28.9	33.2	4.0
146	-2.3	-5.0	-9.4	-5.6	3.6	-146	31.1	30.6	20.5	27.4	6.0
147	0.5	0.2	-8.3	-2.5	5.0	-147	41.4	41.0	43.8	42.1	1.6
148	-3.0	-0.6	-4.5	-2.7	1.9	-148	34.2	33.1	35.6	34.3	1.3
149	1.4	14.1	15.1	10.2	7.6	-149	28.4	31.4	34.2	31.4	2.9
150	-1.8	7.5	-1.1	1.5	5.2	-150	30.5	25.5	29.0	28.4	2.6
151	1.2	-9.7	-6.4	-5.0	5.6	-151	31.6	30.1	29.7	30.5	1.0
152	6.1	7.1	8.4	7.2	1.2	-152	31.7	35.7	37.6	35.0	3.1
153	-4.5	-3.5	-4.6	-4.2	0.6	-153	40.4	26.4	29.8	32.2	7.3
154	-3.9	0.3	1.8	-0.6	3.0	-154	25.7	31.8	38.2	31.9	6.2
155	-16.0	-1.9	3.0	-5.0	9.9	-155	24.2	30.1	35.6	30.0	5.7
156	-2.8	-1.9	-3.9	-2.9	1.0	-156	37.9	32.8	28.6	33.1	4.7
157	3.1	2.7	9.9	5.3	4.1	-157	36.7	33.1	27.9	32.6	4.5
158	-8.1	-1.0	-7.6	-5.6	3.9	-158	38.6	36.6	16.8	30.7	12.0
159	-1.7	-5.9	-11.4	-6.3	4.8	-159	29.9	34.2	34.5	32.8	2.6
160	-1.9	0.9	-4.2	-1.7	2.6	-160	31.7	34.4	31.1	32.4	1.7
161	36.5	33.5	34.1	34.7	1.6	-161	16.7	20.9	8.8	15.5	6.1
Bib	65.8	70.8	66.6	67.7	2.7	Bib	30.4	35.4	36.5	34.1	3.3

MW: Mittelwert; Stabw: Standardabweichung.

MW: Mittelwert; Stabw: Standardabweichung.

Prozentuale Hemmung der Selektionsbibliothek									
	Nr.	-143	-146	-150	-151	-152	-153	-161	Sel-Bib
Messung (in %)	1	25.7	20.6	20.4	33.7	25.3	31.7	-5.7	32.1
	2	24.5	23.7	20.5	25.7	32.0	27.5	-6.6	29.2
	3	30.6	21.9	22.9	27.6	21.4	25.4	0.5	25.5
MW		26.9	22.1	21.3	29.0	26.2	28.2	-3.9	28.9
Stabw		3.3	1.6	1.4	4.2	5.4	3.2	3.8	3.3

MW: Mittelwert; Stabw: Standardabweichung.

Falcipain-2

Prozentuale Hemmung der Einzelkomponenten						Prozentuale Hemmung der Dekonvolutionsbibliothek					
Nr.	Messung (in %)			MW	Stabw	Nr.	Messung (in %)			MW	Stabw
	1	2	3				1	2	3		
141	5.2	-8.7	8.3	1.6	9.1	-141	23.6	25.4	31.6	26.8	4.2
142	16.2	13.3	11.7	13.7	2.3	-142	33.6	37.6	21.4	30.9	8.5
143	0.2	-3.3	7.0	1.3	5.2	-143	36.3	24.0	24.5	28.2	6.9
144	7.4	-5.8	3.5	1.7	6.8	-144	33.3	22.2	31.1	28.9	5.9
145	1.8	-7.1	6.6	0.4	7.0	-145	18.4	25.6	21.8	22.0	3.6
146	-2.3	7.8	-6.3	-0.3	7.3	-146	13.5	3.5	17.0	11.4	7.0
147	-14.1	3.2	-3.5	-4.8	8.7	-147	8.5	27.2	29.6	21.8	11.5
148	11.2	2.8	9.9	8.0	4.5	-148	28.7	28.3	36.4	31.1	4.6
149	35.8	28.8	43.7	36.1	7.5	-149	20.7	38.6	34.0	31.1	9.3
150	24.8	21.4	10.5	18.9	7.5	-150	14.0	26.7	41.1	27.3	13.6
151	6.3	-2.0	16.4	6.9	9.2	-151	22.3	31.5	35.2	29.7	6.7
152	4.9	-0.1	4.0	2.9	2.6	-152	6.0	26.5	22.5	18.3	10.9
153	7.5	4.6	21.8	11.3	9.2	-153	31.8	30.7	29.1	30.5	1.3
154	19.3	17.4	17.2	18.0	1.2	-154	15.7	9.7	30.7	18.7	10.8
155	7.7	4.4	-1.6	3.5	4.7	-155	17.3	25.6	18.5	20.4	4.5
156	-1.6	0.5	-19.1	-6.7	10.8	-156	32.0	27.9	25.7	28.5	3.2
157	10.4	3.9	-5.6	2.9	8.1	-157	26.4	37.4	28.9	30.9	5.8
158	-2.9	1.2	-19.6	-7.1	11.0	-158	12.8	11.6	14.9	13.1	1.7
159	-5.8	-8.9	-15.1	-9.9	4.7	-159	18.4	20.2	39.9	26.2	11.9
160	11.7	6.1	17.5	11.8	5.7	-160	33.2	35.6	21.5	30.1	7.5
161	-3.8	9.7	-16.5	-3.6	13.1	-161	25.1	28.2	30.0	27.8	2.5
Bib	57.6	54.9	50.0	54.2	3.9	Bib	29.5	20.9		25.2	6.1

MW: Mittelwert; Stabw: Standardabweichung.

MW: Mittelwert; Stabw: Standardabweichung.

HCoV 229E M^{Pro}

Prozentuale Hemmung der Einzelkomponenten					Prozentuale Hemmung der Dekonvolutionsbibliothek						
Nr.	Messung (in %)			MW	Stabw	Nr.	Messung (in %)			MW	Stabw
	1	2	3			1	2	3			
141	1.7	0.7	6.1	2.8	2.9	-141	24.5	22.2	28.0	24.9	2.9
142	-3.7	-8.3	6.4	-1.9	7.5	-142	19.9	24.8	23.8	22.8	2.6
143	-8.5	-1.8	6.9	-1.1	7.7	-143	24.1	24.4	26.6	25.0	1.4
144	-4.2	-5.2	-7.8	-5.7	1.9	-144	18.3	20.8	35.4	24.8	9.3
145	-12.8	-2.7	-7.4	-7.6	5.1	-145	12.7	16.4	23.3	17.5	5.4
146	10.2	15.5	5.5	10.4	5.0	-146	13.5	23.1	15.2	17.2	5.2
147	52.0	55.2	49.6	52.2	2.8	-147	7.1	16.7	11.2	11.7	4.8
148	-4.2	-16.1	-8.2	-9.5	6.0	-148	20.8	9.9	26.2	19.0	8.3
149	-3.0	-3.5		-3.2	0.4	-149	30.0	33.7	31.6	31.8	1.9
150	-6.8	-6.4		-6.6	0.3	-150	28.2	30.6	35.0	31.3	3.4
151	-3.7	-5.3		-4.5	1.2	-151	29.0	28.2	31.9	29.7	1.9
152	-11.4	-6.8	3.5	-4.9	7.7	-152	29.3	23.0	17.9	23.4	5.7
153	0.7	-1.6		-0.5	1.6	-153	30.9	33.7	19.2	27.9	7.7
154	7.5	4.1	-4.2	2.4	6.0	-154	32.3	29.0	32.3	31.2	1.9
155	3.2	7.5	-8.7	0.7	8.4	-155	19.5	22.5	15.3	19.1	3.6
156	13.6	3.1	-12.1	1.5	12.9	-156	20.6	22.2	23.9	22.2	1.6
157	-5.0	-4.0		-4.5	0.8	-157	31.2	31.9	29.9	31.0	1.0
158	7.3	9.4	-12.6	1.4	12.1	-158	21.4	31.1	24.9	25.8	4.9
159	-1.6	-1.6	-15.0	-6.1	7.7	-159	14.6	21.3	25.5	20.5	5.5
160	2.2	3.8	0.6	2.2	1.6	-160	30.6	24.9	18.2	24.6	6.2
161	-3.7	6.3	-9.9	-2.4	8.2	-161	19.4	21.3	20.3	20.3	1.0
Bib	52.5	52.7	43.0	49.4	5.6	Bib	32.1	30.0	26.4	29.5	2.9

MW: Mittelwert; Stabw: Standardabweichung.

MW: Mittelwert; Stabw: Standardabweichung.

Prozentuale Hemmung der Selektionsbibliothek								
	Nr.	-145	-147	-146	-161	-152	-155	Sel-Bib
Messung (in %)	1	30.4	-0.2	15.2	13.3	15.3	17.1	22.7
	2	13.0	-6.5	7.0	9.6	27.4	10.2	11.7
	3	15.2	-0.6	14.1	14.4	21.2	19.7	20.4
MW		19.6	-2.5	12.1	12.4	21.3	15.7	18.3
Stabw		9.5	3.5	4.5	2.5	6.1	4.9	5.8

MW: Mittelwert; Stabw: Standardabweichung.

Rhodesain

Prozentuale Hemmung der Einzelkomponenten						Prozentuale Hemmung der Dekonvolutionsbibliothek					
Nr.	Messung (in %)			MW	Stabw	Nr.	Messung (in %)			MW	Stabw
	1	2	3				1	2	3		
141	-6.8	0.0	-4.7	-3.8	3.5	-141	53.2	50.6	49.0	50.9	2.1
142	-9.2	-8.2	-5.7	-7.7	1.8	-142	45.5	40.9	48.2	44.9	3.7
143	-2.6	1.5	-0.7	-0.6	2.1	-143	50.1	46.5	49.2	48.6	1.9
144	4.8	-1.0	0.6	1.5	3.0	-144	48.7	41.5	46.1	45.4	3.7
145	-5.4	-5.9	-9.5	-6.9	2.2	-145	42.9	39.3	59.5	47.3	10.8
146	-0.3	1.3	1.9	1.0	1.1	-146	37.5	36.8	30.2	34.8	4.1
147	2.3	1.4	1.2	1.6	0.6	-147	35.8	35.2	35.5	35.5	0.3
148	1.4	1.6	1.0	1.3	0.3	-148	41.5	41.1	41.8	41.5	0.4
149	17.5	11.2	16.4	15.0	3.4	-149	44.9	39.4	46.1	43.5	3.6
150	4.8	6.8	5.7	5.8	1.0	-150	41.2	36.7	42.2	40.0	2.9
151	0.3	-8.1	-4.0	-4.0	4.2	-151	42.0	40.3	37.7	40.0	2.2
152	-11.3	-0.9	0.6	-3.9	6.5	-152	46.6	44.1	45.6	45.4	1.3
153	-0.5	-1.7	0.8	-0.5	1.3	-153	41.5	39.0	35.8	38.8	2.9
154	1.9	-8.5	-4.7	-3.8	5.3	-154	44.1	44.4	45.3	44.6	0.6
155	-6.5	2.6	6.8	1.0	6.8	-155	38.2	41.9	42.2	40.8	2.2
156	-4.0	-0.6	-1.4	-2.0	1.8	-156	42.4	44.2	41.9	42.8	1.2
157	-7.2	-6.4	-6.3	-6.6	0.5	-157	45.8	46.4	40.1	44.1	3.5
158	-1.4	-8.2	-12.3	-7.3	5.5	-158	38.7	38.0	35.6	37.5	1.6
159	-9.8	-0.8	-9.1	-6.6	5.0	-159	44.8	43.3	39.6	42.6	2.7
160	20.7	18.8	30.5	23.3	6.3	-160	43.9	38.1	42.8	41.6	3.1
161	-17.5	-4.1	-6.1	-9.2	7.2	-161	48.1	49.3	45.6	47.7	1.9
Bib	-6.8	0.0	-4.7	-3.8	3.5	Bib	48.3	49.3	52.7	50.1	2.3

MW: Mittelwert; Stabw: Standardabweichung.

MW: Mittelwert; Stabw: Standardabweichung.

Trypsin

Prozentuale Hemmung der Einzelkomponenten						Prozentuale Hemmung der Dekonvolutionsbibliothek					
Nr.	Messung (in %)			MW	Stabw	Nr.	Messung (in %)			MW	Stabw
	1	2	3			1	2	3			
141	-1.0	-0.4	6.9	1.8	4.4	-141	59.1	60.4	58.1	59.2	1.2
142	-3.0	-2.0	-5.5	-3.5	1.8	-142	60.3	61.8	64.7	62.3	2.2
143	-4.6	1.7	2.7	-0.1	4.0	-143	59.5	61.4	67.5	62.8	4.2
144	-1.2	-2.9	-1.3	-1.8	1.0	-144	56.6	67.1	64.5	62.7	5.4
145	-2.9	5.6	-1.2	0.5	4.5	-145	55.7	61.7	60.0	59.2	3.1
146	-4.6	-1.6	-4.1	-3.4	1.6	-146	57.2	53.8	51.3	54.1	3.0
147	-4.0	1.9	1.6	-0.1	3.3	-147	60.3	54.0	56.5	57.0	3.2
148	-10.5	-8.4	-8.2	-9.0	1.3	-148	59.6	64.5	64.3	62.8	2.8
149	-5.8	-8.1	-5.0	-6.3	1.6	-149	52.0	53.9	54.1	53.3	1.2
150	5.1	-5.5	3.0	0.9	5.6	-150	43.3	43.6	46.7	44.6	1.9
151	0.1	-6.4	3.3	-1.0	5.0	-151	49.9	53.6	56.9	53.5	3.5
152	-1.2	-4.0	1.7	-1.2	2.8	-152	56.7	55.3	55.5	55.8	0.8
153	-9.9	-1.6	-9.4	-7.0	4.7	-153	51.9	53.3	55.4	53.5	1.8
154	2.0	-2.6	-0.7	-0.4	2.3	-154	54.3	57.2	55.6	55.7	1.5
155	1.0	5.2	3.9	3.4	2.1	-155	56.2	56.3	55.9	56.1	0.2
156	-9.6	-3.7	-7.8	-7.0	3.0	-156	60.5	58.8	56.9	58.7	1.8
157	1.1	-10.2	-6.0	-5.0	5.7	-157	53.7	58.8	57.8	56.8	2.7
158	-0.3	2.5	4.0	2.1	2.2	-158	59.1	58.4	55.8	57.8	1.8
159	-1.6	-7.1	-7.9	-5.5	3.4	-159	57.1	59.4	56.7	57.7	1.5
160	9.9	-3.6	4.9	3.7	6.8	-160	56.6	54.5	53.8	55.0	1.5
161	55.2	53.9	54.5	54.5	0.7	-161	36.4	39.6	35.4	37.1	2.2
Bib	75.2	71.3	76.6	74.4	2.8	Bib	63.6	62.6	63.0	63.1	0.5

MW: Mittelwert; Stabw: Standardabweichung.

MW: Mittelwert; Stabw: Standardabweichung.

Prozentuale Hemmung der Selektionsbibliothek						
	Nr.	-146	-147	-150	-161	Sel-Bib
Messung (in %)	1	38.0	46.3	37.4	-2.1	41.1
	2	39.5	46.1	35.2	4.6	40.1
	3	39.5	44.8	34.2	3.4	43.2
MW		39.0	45.7	35.6	2.0	41.5
Stabw		0.9	0.8	1.6	3.5	1.6

MW: Mittelwert; Stabw: Standardabweichung.

8.4 LEBENSLAUF

Der Lebenslauf ist in der Online-Version aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten.

8.5 PUBLIKATIONSLISTE

Veröffentlichung/ Patent

S. Langolf, U. Machon, M. Ehlers, W. Sicking, T. Schirmeister, C. Büchold, C. Gelhaus, P. J. Rosenthal, C. Schmuck, Development of Antitrypanosomal and Antiplasmodial Nonpeptidic Cysteine Protease Inhibitors based on *N*-Protected-Guanidino-Furan and Pyrrole Building Blocks, *ChemMedChem* **2011**, 6(9), 1581–1586.

T. Schirmeister, C. Schmuck, U. Machon, S. Langolf, K. Baumann, S. G. Rohrer, *N*-protected guanidine-substituted furans, thiophenes and pyrroles as cysteine protease inhibitors, and their therapeutic use, *PCT Int. Appl.*, WO 2010/ 037536A1, **2010**.

Vorträge

S. Langolf, Eine neue Klasse von Wirkstoffen gegen Malaria und Schlafkrankheit, *14. Workshop: Mechanismen der Zell- und Gewebeschädigung*, Xanten **2008**.

U. Machon, S. Langolf, A new Lead Structure for Antimalarial Drugs, *SFB 630 Symposium*, Würzburg **2008**.

Posterbeiträge

M. Malissek, S. Simon, C. Damm, J. Diendorf, D. Mahl, A. Rostek, W. Meyer-Zaika, S. Langolf, C. Schmuck, M. Epple, R. Zellner, W. Peukert, L. Treuel, Interactions of Nanoparticles with Proteins – Adsorption Equilibria, Impact on the Structural Integrity of the Protein and Enzyme Activity, *Workshop Nanoscience*, Essen **2011**.

S. Langolf, U. Machon, T. Schirmeister, C. Schmuck, A new lead structure for antimalarial and antitrypanosomal drugs, *4th Joint Ph.D. Students Meeting of the Collaborative Research Centers SFB 630, SFB 766 and SFB 544: "New Trends in Infectious Disease Research"*, Bronnbach **2008**.

S. Langolf, U. Machon, T. Schirmeister, C. Schmuck, Design of Cystein Protease Inhibitors – a Classical and a Combinatorial Approach", *Chem-SyStM (Chemie-Symposium der Studierenden Mainfrankens)*, Würzburg **2007**; *2nd EuCheMS Chemistry Congress*, Turin (Italien) **2008**; *JCF Frühjahrssymposium*, Essen **2009**; *Industry Meets Science*, Essen, **2011**.

T. Schirmeister, C. Schmuck, S. Langolf, U. Machon, C. Büchold, C. Gelhaus, M. Leippe, S. Rohrer, K. Baumann, Guanidinocarbonylpyrrols – A New Class of reversible Falcipain-2 Inhibitors, *5th General Meeting of the International Proteolysis Society*, Patras (Griechenland) **2007**.

8.6 ERKLÄRUNG

Die vorliegende Arbeit wurde im Zeitraum von April 2008 bis Mai 2012 im Arbeitskreis von Prof. Dr. Carsten Schmuck am Institut für Organische Chemie der Julius-Maximilians-Universität Würzburg und am Institut für Organische Chemie der Universität Duisburg-Essen durchgeführt.

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit mit dem Titel

INHIBITOREN FÜR CYSTEINPROTEASEN

– SYNTHESE, SCREENING UND METHODENENTWICKLUNG –

selbst verfasst und keine außer den angegebenen Hilfsmitteln und Quellen benutzt habe, und dass die Arbeit in dieser oder ähnlicher Form noch bei keiner anderen Universität eingereicht wurde.

Essen, im Mai 2012

.....

Sebastian Langolf

8.7 DANKSAGUNG

An dieser Stelle möchte ich all denen danken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben. Egal ob durch (fachliche) Ratschläge oder (tatkraftige) Unterstützung.

Ich bedanke mich bei Prof. Dr. Carsten Schmuck für die Möglichkeit dieses vielseitige und interessante Thema im Rahmen meiner Dissertation bearbeiten zu dürfen. Die konstruktive Kritik und die vielen fachlichen Ratschläge haben mich stets vorangebracht. Außerdem danke ich Dir für dein Vertrauen und die 12 mir anvertrauten Praktikanten, Bachelor-, Diplom- und Vertiefungsstudenten – das hat mir stets viel Spaß gemacht.

Das gute Arbeitsklima im Labor ist meinen Würzburger und Essener Kollegen Dr. Uwe Machon, Barbara Geibel, Dr. Michael Merschky, Ute Michels, Julia Schulz und Martin Ehlers zu verdanken – ich denke wir waren ein gutes Team! Die kleinen fachlichen Diskussionen am Abzug haben mir aus so mancher synthetischen Sackgasse geholfen!

Neben der Synthese darf man die Analytik nicht vergessen. Deswegen bedanke ich mich bei Dr. Torsten Schaller und Heinz Bandmann (NMR-Abteilung), sowie bei Werner Karow und Ute Michels (Massenspektrometrie).

Bei den Berechnungen der Inhibitorstrukturen halfen mir dankenswerter Weise Martin Ehlers, Dominik Heider und Prof. Dr. Daniel Hofmann.

Desweiteren geht ein Dankeschön an alle Auszubildenden, Bachelor-, Diplom-, Lehramts- und Vertiefungsstudenten, die durch ihren Einsatz einen Beitrag zu dieser Doktorarbeit geleistet haben.

Auch beim Rest des AK's möchte ich mich für die angenehme Arbeitsatmosphäre bedanken.

Für die Übernahme des Zweitgutachtens danke ich Prof. Dr. Shirley Knauer.

Ganz besonders möchte ich mich auch bei meinen Unterstützern auf dem Gebiet der Enzyme und der pharmazeutischen Chemie bedanken. Prof. Dr. Philip Rosenthal und Christian Büchold für die Messungen an Falcipain-2. Prof. Dr. Tanja Schirmeister für die Hilfe bei den Enzymassays und Cornelia Heindl für zahlreiche Enzymmessungen an diversen Proteasen – mit und ohne Tensid...! Prof. Dr. Matthias Leippe, Dr. Christoph Gelhaus und Astrid Evers für die Tests an den Malaria Erregern und an Falcipain-2, sowie Dr. Heike Bruhn, Elena Katzowitsch und Jennifer Rath für die Untersuchungen auf Zellgiftigkeit, an Leishmanien und an Trypanosomen. Bei Prof. Dr. Caroline Kisker und Uwe Dietzel möchte ich mich für die Exprimierung und Bereitstellung diverser Proteasen bedanken.

Meinen Freunden möchte ich für den Beweis danken, dass es neben der Arbeit noch Freizeit gibt; für kein verlorenes Squash-Match; für die Stadtmeisterschaft; für

Schlappeseppel, Willi und Cuba; für Spaghetti mit Zimt; für Circus und unvergessliche Stunden.

Bekanntheit mit meiner unglaublich präzisen Kommasetzung und meiner Wortgewandtheit durften Tassilo Fenske, Rike Langolf, Barbara Geibel, Martin Ehlers, Ute Michels und Lina Bartsch machen – ich beneide euch nicht, aber Danke euch sehr!

...Und das wichtigste zum Schluss: Ohne meine Familie, die mich immer unterstützt hat, wäre diese Arbeit nicht entstanden. Rike, Lendschi und Hannes - Ich danke euch von ganzem Herzen! Mein größter Dank gilt Toby, danke für deine grenzenlose Unterstützung und dass du für mich da bist!