

**CHARAKTERISIERUNG KOVALENT
REVERSIBLER INHIBITOREN DER
ENTEROVIRUS D68 3C PROTEASE UND
IHRE BILDUNG DURCH PROTEIN-
INDUZIERTER KNOEVENAGEL-REAKTION**

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades des
Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

eingereicht im Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

CAROLIN TAUBER

geb. in Berlin

Berlin 2019

Die Promotionsarbeit wurde im Zeitraum von April 2015 bis Februar 2019 am Institut für Pharmazie der Freien Universität Berlin unter der Leitung von Prof. Dr. Jörg Rademann durchgeführt.

Erstgutachter: Prof. Dr. Jörg Rademann

Zweitgutachter: Prof. Dr. Maria Kristina Parr

Tag der Disputation: 02.07.2019

Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die hier vorliegende Arbeit mit dem Titel „Charakterisierung kovalent reversibler Inhibitoren der Enterovirus D68 3C Protease und ihre Bildung durch Protein-induzierte Knoevenagel-Reaktion“ selbst verfasst und keine weiteren als die hier aufgeführten Hilfsmittel und Quellen verwendet habe.

Carolin Tauber

Danksagung

Ich danke Prof. Dr. Jörg Rademann für die Überlassung dieses interessanten Themas und die hervorragende Betreuung während meiner gesamten Promotionszeit und Prof. Dr. Maria Parr für die Übernahme des Zweitgutachtens.

Dr. Christoph Arkona und Silke Bergemann danke ich für ihre Unterstützung in biochemischen Fragestellungen. Dr. Manfred Weiss, Dr. Franziska Huschmann und Monika Ühlein vom Helmholtz-Zentrum Berlin und Dr. Martina Schäfer (Bayer Pharma AG) brachten mir die Grundlagen der Proteinkristallographie bei.

Dr. Robert Schulz und Szymon Pach aus der AG Wolber sollen an dieser Stelle genannt werden für das Docking meiner synthetisierten Verbindungen und weitere Molecular Modelling Experimente, anregende Gespräche, sowie Ideen für neue Inhibitorstrukturen.

Prof. Dr. Maria Parr, Bernhard Wüst und Dr. Jan Joseph danke ich für den regen Austausch und die geduldige Hilfe in Massenspektrometrie-Fragen, Ellen Christmann-Österreich um ihre Bemühungen Emma am Laufen zu halten und bestmöglich für meine Experimente vorzubereiten und Dr. Benno Kuroпка und Dr. Melanie Göth für ihre Unterstützung bei der Nativen MS.

Meinen Masterstudenten Marisa Tugend und Sabrina Lechnitz sowie Je-Ryun Lee gebührt Anerkennung für die fleißige Synthese- und Aufreinigungsarbeit diverser Verbindungen.

Robert Schulz, Trung Ngoc „Gocky“ Nguyen und Damian Klemczak behalte ich als „Leidensgenossen“ bei der Betreuung des Praktikums des 8. Semesters im Gedächtnis.

Der AG Rademann und AG Klinger danke ich für die schöne Zeit und angenehme, offene Arbeitsatmosphäre. Besondere Erwähnung finden dabei meine Laborkollegen Eric Nawrotzky, Joanna Blaszkiewicz, Thomas Rudolf und Jan-Niklas Dürig.

Zuletzt möchte ich meiner Familie danken, die mich durch ihre stete Förderung und Unterstützung geformt und diese Promotion ermöglicht hat.

Abkürzungsverzeichnis

3C^{Pro}	3C Protease
AS	Aminosäure
BisTris	Bis(2-hydroxyethyl)amino- tris(hydroxymethyl)methan
Bs	Breites Singulett (NMR)
CC₅₀	Halbmaximale cytotoxische Konzentration
CCS	Collision-cross-section, Kollisionsquerschnitt
COX	Cyclooxygenase
Cox B3	Coxsackievirus B3
CPE	Cytopathic effect, Zytopathischer effekt
DABCO	1,4-Diazabicyclo[2.2.2]octan
DCM	Dichlormethan
DFT	Diskrete Fourier-Transformation
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTT	Dithiothreitol
EC₅₀	Halbmaximale effektive Konzentration
EDC	1-Ethyl-3-(3- dimethylaminopropyl)carbodiimid
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EIC	Extracted Ion Chromatogram
EMA	European Medicines Agency, Europäische Arzneimittel-Agentur
ESI	Elektrospray-Ionisation
EtOH	Ethanol
EV D68	Enterovirus D68
FA	Formic acid, Ameisensäure
FDA	Food and Drug Administration
GSH	Glutathion
HAV	Hepatitis A Virus
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)- ethansulfonsäure
HPLC	Hochdruckflüssigchromatographie
HRMS	High resolution mass spectrum, hoch aufgelöstes Massenspektrum
HRV	Humanes Rhinovirus
HSAB	Hard and Soft Acids and Bases
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
IC₅₀	Halbmaximale inhibitorische Konzentration
ITC	Isotherme Titrationskalorimetrie
LC	Liquid chromatography, Flüssigchromatographie
M	Multipllett (NMR)
MeOH	Methanol
MPLC	Mitteldruckflüssigchromatographie
MS	Massenspektrometrie
MTS	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-5-(3- carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)- 2H-tetrazolium

NaOH	Natriumhydroxid
PDB	Protein Data Bank
pK_s	Negativ dekadischer Logarithmus der Säurekonstante K _s
PMS	Phenazin-Methosulfat
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PyrSO₃	Schwefeltrioxid-Pyridin-Komplex
q	Quadruplett (NMR)
RFU	Relative Fluorescence Units, relative Fluoreszenzeinheit
rt	Raumtemperatur
SAR	Structure-activity relationship, Strukturaktivitätsbeziehungen
SARS 3CL^{Pro}	SARS-Virus 3C-like Protease
Smp	Schmelzpunkt
t	Triplett (NMR)
TEA	Triethylamin
TFA	Trifluoroacetic acid (Trifluoressigsäure)
THF	Tetrahydrofuran
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
QToF	Quadrupol – Time of Flight
ZNS	Zentralnervensystem

Zusammenfassung

Enterovirale Infektionen stellen ein weltweites gesundheitliches Problem dar, das bisher nicht effizient durch wirksame Impfstoffe eingedämmt werden konnte. Die enterovirale 3C Protease als hochkonservierte Struktur ist elementar für die Virusvermehrung und ein attraktives Ziel für Arzneistoffe. Die bisherige Forschung an peptidischen Leitstrukturen lieferte Rupintrivir als hochpotenten 3C Proteaseinhibitor, der jedoch wegen fehlender Wirksamkeit gegen HRV bei Patienten mit natürlich erworbenen Erkältungskrankheiten in der klinischen Phase III scheiterte. Aufgrund ungünstiger pharmakokinetischer Eigenschaften der Peptide konzentrierte man sich auf die Entwicklung niedermolekularer Inhibitoren, doch viele dieser Verbindungen waren entweder nicht ausreichend wirksam oder zu unselektiv und toxisch. In dieser Arbeit wurden kovalent reversible Inhibitoren der viralen 3C Protease von EV D68 hinsichtlich ihrer Wirkung, den thermodynamischen und kinetischen Eigenschaften der Protein-Inhibitor-Bindung und ihrer Bildung systematisch untersucht. Die synthetisierten Knoevenagel-Produkte waren sowohl im FRET-Assay mit isolierter Protease als auch im Zellassay im niedrigen und mittleren mikromolaren Bereich wirksam und nicht-toxisch. Reaktionen mit konkurrierenden Nukleophilen wie Glutathion und DTT und die Retro-Knoevenagel-Reaktion erklärten Diskrepanzen zwischen den Aktivitäten beider Assays. Sowohl die Reaktivität als auch die Stabilität der Knoevenagel-Produkte und der Protein-Inhibitor-Komplexe hingen mit dem Ausmaß des Elektronenzugs durch die Substituenten der vormals CH-aziden Verbindung zusammen. Für einen potenten und selektiven kovalent reversiblen Inhibitor war ein starker elektronenziehender Rest, der eine Resonanzstabilisierung ermöglicht, in α -Position des Michael-Systems erforderlich. Eine chemische Verschiebung von etwa 7.8 ppm für das β -Proton im $^1\text{H-NMR}$ gewährleistete dabei sowohl eine ausreichende Aktivierung für den Angriff des Cysteins im aktiven Zentrum als auch die Unterdrückung der Retro-Knoevenagelreaktion. Die Stabilität der Protein-Inhibitor-Komplexe wurde mittels ITC und Massenspektrometrie beurteilt. Es wurde herausgefunden, dass α -substituierte Michael-Akzeptoren die gesamte Bandbreite von sehr langsam reversiblen Addukten bis hin zu Protein-Inhibitor-Komplexen mit sehr schneller Kinetik abbilden. Eine sehr langsame Kinetik korrelierte dabei mit einer guten zellulären Wirkung und unterstrich die Wichtigkeit der verlängerten Residenzzeit am Zielprotein für eine optimale Inhibition. Verwirklicht wurden diese Aspekte im Malonsäurediethylester-Derivat **33**, das einen potenten, selektiven und nicht toxischen Inhibitor der EV D68 3C^{Pro} darstellt.

Die Hypothese, dass das Oxoanionloch der 3C^{Pro}, das mit positiver Partialladung ausgekleidet ist, als Katalysator fungiert und die Reaktivität von Carbonylgruppen erhöht, konnte in dieser Arbeit bestätigt werden. Es wurde gezeigt, dass die Reaktion zwischen 3-Formylbenzamid **1** und 3-Oxobutanitril Protein-katalysiert abläuft und ein verbesserten Inhibitor gebildet wurde. Die Knoevenagel-Kondensation als C-C-Bindungs-knüpfernde Reaktion erweitert damit das Repertoire der für die Fragmentligation nutzbaren bioorthogonalen, chemischen Reaktionen.

Abstract

Infections by enteroviruses are a worldwide health threat that could not be confined by effective vaccines yet. The enteroviral 3C protease is a highly conserved structure and displays an attractive drug target. Previous research on peptidic leads yielded Rupintrivir as a highly potent 3C protease inhibitor that failed in clinical phase III because of lack of efficacy in patients suffering from naturally acquired colds. Because of unfavourable pharmacokinetic properties of peptide drugs, now the focus is on the development of small molecule inhibitors, but many of them were not effective or too unselective and toxic. In this work the effect, the thermodynamical and kinetic properties of the protein-inhibitor-binding and the formation of covalent reversible inhibitors of the viral 3C protease were investigated systematically. The synthesized Knoevenagel-products were active and non-toxic in a low and medium micromolar range in the FRET-assay using isolated protease as well as in the cell assay. Discrepancies in both assays were explained by reactions with competing nucleophiles like glutathione and DTT and the Retro-Knoevenagel-reaction. Both the reactivity and the stability of the Knoevenagel-products and the protein-inhibitor-complexes were related to the extent of the electron withdrawing effect by the substituents of the former CH-acidic compound. A potent and selective covalent reversible inhibitor required a strong electron withdrawing moiety allowing resonance stabilization in α -position of the Michael-system. A chemical shift of ca. 7.8 ppm for the β -Proton in the $^1\text{H-NMR}$ provided both a sufficient activation for the attack of the active site cysteine and suppression of the Retro-Knoevenagel-reaction. The stability of the protein-inhibitor-complexes was evaluated by ITC and mass spectrometry experiments. It was shown, that α -substituted Michael-acceptors cover the whole spectrum from slow reversible adducts towards protein-inhibitor-complexes with very fast kinetics. Very slow kinetics correlated with a good cellular activity and emphasized the importance of a prolonged residence time at the target protein for optimal inhibition. These aspects were implemented in the diethyl malonate **33**, which displays a potent, selective and non-toxic inhibitor of EV D68 3C^{Pro}.

The hypothesis, that the oxoanion hole of the 3C^{Pro}, which is partially positively charged, is able to serve as a catalyst, increasing the reactivity of carbonyl groups, was verified in this work. It was shown, that the reaction between 3-formylbenzamide **1** and 3-oxobutanenitrile was protein-catalyzed and yielded an enhanced inhibitor. Thereby the Knoevenagel-condensation as a C-C-bond-forming reaction expands the repertoire of the biorthogonal chemical fragment ligation reactions.

Inhaltsverzeichnis

Allgemeiner Teil	1
Einleitung	1
Enteroviren als weltweite gesundheitliche Bedrohung	1
Der virale Lebenszyklus und potentielle Angriffspunkte antiviraler Wirkstoffe	3
Wirkstoffe zur Inhibition viraler 3C Proteasen	7
Peptidische Inhibitoren.....	10
Nicht-Peptidische Inhibitoren	13
Kovalente Interaktion als Wirkmechanismus von Arzneistoffen.....	16
Fragment-basiertes Wirkstoffdesign	18
Zielsetzung der Arbeit	21
Ergebnisse und Diskussion.....	22
Charakterisierung der kovalent-reversiblen Inhibitoren	23
Untersuchungen zum Bindungsmodus im aktiven Zentrum der 3C ^{Pro}	23
E-/Z-Isomerie der Knoevenagel-Produkte	25
Struktur-Wirkungsbeziehungen	31
Aldehyde	33
Cyanessigsäureester.....	36
Cyanessigsäureamide.....	39
β -Ketonitrile.....	40
Sulfon- und Thioamidderivate.....	42
Halogenierte Michael-Akzeptoren	45
Malonsäureesterderivate	46
Acyhydrazone	48
Diverse	49
Pyridine.....	51
Zusammenfassung	52
Aktivität ausgewählter Verbindungen im Zell-Assay	53
Reaktivität mit DTT	59
Retro-Knoevenagelreaktion	62
Zusammenfassung	64
Kinetische Aspekte der Protein-Inhibitor-Bindung	65
Reversibilität im FRET-Assay	66

ITC zur Charakterisierung der Protein-Inhibitor-Bindung.....	68
Verdünnungsassays	76
Klassische Protein-MS	78
Tryptischer Verdau.....	84
Sättigungsexperimente.....	87
Native Protein-MS	90
Zusammenfassung.....	95
Protein-induzierte Knoevenagelreaktionen	96
Mechanismus und Reaktionsbedingungen der Knoevenagelreaktion	96
Modell der Aldehydaktivierung	98
Protein-induzierte Knoevenagel-Reaktion an der EV D68 3C ^{Pro}	100
Zusammenfassung.....	107
Experimenteller Teil	108
Allgemeines.....	108
Chemikalien.....	108
Methoden und Geräte.....	108
Herstellung rekombinanter EV D68 3C Protease.....	111
FRET-Assay	114
Zell-Assay (Zell-basierter zytopathischer Effekt-Reduktionsassay)	116
MS Experimente	116
ITC	120
Synthese	121
Anhang: Tabellen und Spektren	145
Literaturverzeichnis.....	171

Allgemeiner Teil

Einleitung

Enteroviren als weltweite gesundheitliche Bedrohung

Im südostasiatischen Raum brechen Enterovirus-Infektionen zyklisch aus. Allerdings wird inzwischen von einer weltweiten Verbreitung mit häufigerem Auftreten und in einem größerem Ausmaß berichtet.^[1-2] Zuletzt traf die USA im Spätsommer 2014 eine größere EV D68-Epidemie mit mehr als 1000 betroffenen Patienten. Glücklicherweise verläuft eine Infektion mit Enteroviren häufig völlig symptomlos oder unkompliziert mit milden Symptomen. Doch es treten auch Fälle mit ernst zu nehmenden Anzeichen wie beispielsweise Pneumonie, Enzephalitis und schlaffer Lähmung bei Infektion des ZNS auf. Therapiert wird bisher nur symptomatisch, in der Regel mit β_2 -Sympathomimetika und systemisch verabreichten Corticoiden.^[3] Je nach Art des Virus werden vielfältige Krankheiten, darunter Meningitis, Myokarditis, Poliomyelitis oder Hand-Fuß-Mund-Krankheit ausgelöst, die bei Kindern, Älteren und immunsupprimierten Patienten zum Tode führen können.^[4] Enterovirus-Infektionen sind ebenfalls assoziiert mit Krankheiten, denen Entzündungsprozesse zugrunde liegen, wie Typ 1-Diabetes und Asthma.^[5-6]

Gattung	Art	Erkrankung
Enterovirus	Enterovirus D68	Atemwegserkrankungen, Enzephalitis und Meningitis mit Lähmungen
	Coxsackievirus B3	Hand-Fuß-Mund-Krankheit, Herpangina, Enzephalitis mit Lähmungen, Gastroenteritis, Hepatitis, Pankreatitis, Myokarditis
	Poliovirus	Poliomyelitis
	Rhinovirus A-C	Erkältung, Atemwegserkrankungen
Hepatovirus	Hepatitis A Virus	Hepatitis

Tab. 1 Auswahl bekannter Picornaviren und von ihnen ausgelöste Erkrankungen ^[7]

Am verbreitetsten ist vermutlich aber die durch Rhinoviren ausgelöste gewöhnliche Erkältung, die vor allem eine wirtschaftliche Belastung des Gesundheits- und Sozialsystems darstellt. Hinzu kommt eine in vielen Fällen ungeeignete antibiotische Therapie, die Resistenzen fördert. Obwohl die Infektion in den meisten Fällen problemlos binnen weniger Tage endet, können Komplikationen wie Rhinosinusitis und Mittelohrentzündung auftreten.^[7-8] Wünschenswert wäre es daher, ein hochwirksames, kostengünstiges Breitspektrum-Arzneimittel gegen Enteroviren zu entwickeln. Die Viren verbreiten sich über Tröpfcheninfektion sowie direkte Exposition durch kontaminierte Finger über die Schleimhäute und über die fäkal-orale Route durch Wasser.^[9] In vielen Fällen können allein grundlegende hygienische Vorsichtsmaßnahmen die Verbreitung der Viren zuverlässig eindämmen.

Der Gedanke mit Impfstoffen gegen Enteroviren vorzugehen kam bereits in den 50er und 60er-Jahren auf, doch viele Rückschläge bezüglich der Wirksamkeit verhinderten bisher die Produktion eines effektiven und breit anwendbaren Vakzins. Es ist notwendig typenübergreifende Epitope für Antikörper zu finden, denn bis jetzt ist unklar, ob bestimmte Serotypen saisonal vermehrt auftreten oder bestimmte Stämme klinisch besonders wichtig sind. Denkbar ist ein Vorgehen vergleichbar mit dem Influenza-Wirkstoff, der jährlich angepasst wird, was allerdings bei der enormen Vielfalt mit mehr als 100 Serotypen allein beim Rhinovirus schwierig ist. Mutationen im Genom sind bei RNA-Viren wie den Enteroviren stärker ausgeprägt als bei DNA-Viren. Die Rate an Fehlinsertationen wird auf 10^{-3} bis 10^{-5} Substitutionen je Nukleotid und Ablesungszyklus geschätzt. Zudem fehlen an RNA-Polymerasen Korrekturlese-Einheiten und Enzyme, die Reparaturen bei Basenfehlpaarungen durchführen können. Es heißt, die Viren befänden sich am „threshold of error catastrophe“, also an der Grenze der Anzahl an Fehlern, die gerade noch vertretbar ist, um sich reproduzierende Viren bilden zu können. Diese hohe Fehlerrate führt daher auch zu einem großen Teil nicht-funktionaler Viruspartikel, ermöglicht aber andererseits eine schnelle Anpassung an das Immunsystem der Wirte und erschwert durch Antigendrift und -shift die Entwicklung von Impfstoffen. Der Antigendrift beschreibt dabei die zufällige, langsame und kontinuierliche Veränderung von Oberflächenstrukturen durch gehäufte Mutationen. Unter Antigen-shift versteht man den Austausch genetischen Materials verschiedener Virustypen bei gleichzeitiger Infektion einer Wirtszelle, der eine neue Kombination von Oberflächenstrukturen ermöglicht. Bekannt ist das beispielsweise für das Glykoprotein Hämagglutinin und die Neuraminidase der Influenza-Viren. Durch die Veränderung der Epitope der Oberflächenstrukturen entzieht sich das Virus einer schnellen und starken Immunantwort des Wirts durch Antikörper, die durch frühere Infektionen oder nach Gabe von Vakzinen gebildet wurden.^[10-11] Ein großes Hindernis in der Impfstoffentwicklung ist auch das Fehlen geeigneter Tiermodelle, denn häufig werden spezifisch nur humane Oberflächenrezeptoren, die die Einschleusung des Virus in die Wirtszelle ermöglichen, erkannt. Berichtet wurde im Fall der Rhinoviren über antigene Peptide, die von Kapsidproteinen abgeleitet wurden und in vitro kreuzreaktive Antikörper bildeten. Allerdings blieben sie in der präklinischen Phase stecken. Neueste Forschungen befassen sich mit der tierexperimentellen Testung eines polyvalenten Rhinovirus-Impfstoffs gegen 50 verschiedene Epitope, der zumindest immunologisch wirksam und verträglich sein soll. Hohe Kosten und ein enormer Aufwand vor allem hinsichtlich der Qualitätskontrolle lassen die klinische Anwendung jedoch unrealistisch erscheinen.^[12-14] Dennoch erhielt 2016 ein Impfstoff von Sinovac Biotech mit inaktivierten ganzen Viren

gegen EV71 zur Vorbeugung der Hand-Fuß-Mund-Krankheit die Zulassung in China. Der Titer neutralisierender Antikörper gegen das Virus war auch 5 Jahre nach der Impfung deutlich erhöht. Diverse andere Impfstoffe gegen verschiedene Enteroviren, bestehend aus Virus-Peptiden oder abgeschwächten Erregern, befinden sich in der präklinischen Phase.^[15-16] Impfstoffe gegen Hepatitis A und Polio-Virus sind bereits etabliert und führten bei zweiterem zur fast vollständigen Eradikation der Krankheit.^[17]

Aufgrund der Vielfalt der Enteroviren erscheint es demnach aussichtsreicher, Wirkstoffe zu entwickeln, die in den Replikationszyklus eingreifen.

Der virale Lebenszyklus und potentielle Angriffspunkte antiviraler Wirkstoffe

Enteroviren gehören zur Familie der Picornaviren, die besonders kleine Viren von etwa 30 nm darstellen und eine icosaedrische Kapsidoberfläche besitzen. Sie sind unbehüllte, positiv einzelsträngige RNA-Viren. Das bedingt auch ihre hohe Virulenz, denn das Erbgut kann vom wirtszelleigenen Replikationsapparat direkt translatiert werden.

Die Gruppierung dieser Viren unterliegt einem steten Wandel, da unentwegt neue Viren und Serotypen identifiziert und heutzutage nach ihrer genomischen Abstammung klassifiziert werden. Die 29 Picornavirus-Arten, darunter Enterovirus A-D, Coxsackievirus, Rhinovirus A-C, Poliovirus und Hepatitis A-Virus, gliedern sich in 13 Gattungen. Die taxonomische Gattung der Enteroviren umfasst die 4 humanpathogenen Spezies A-D mit unterschiedlichen Serotypen, die 5 tierpathogenen Spezies E-I und drei Rhinovirus-Spezies A-C.^[3, 18]

Ein Merkmal von Viren ist, dass sie sich nicht ohne Hilfe eines Wirts replizieren können. Im Folgenden wird der Lebenszyklus eines Enterovirus genauer betrachtet.

Nach Bindung an bestimmte Oberflächenstrukturen der Wirtszelle, in der Regel transmembranäre Glykoproteine, wird das Eindringen des Virus in die Wirtszelle durch verschiedene Mechanismen, darunter Clathrin- und Caveolae-vermittelte Endozytose, ermöglicht.^[19-20] Die Eintrittswege variieren mit verschiedenen Virustypen und bestimmen damit auch ihre Zellselektivität. Es folgt das Uncoating, die Freisetzung der Virus-RNA aus dem Kapsid in das Cytosol. Die Replikation des viralen Genoms erfolgt in der Nähe von Membranvesikeln, die zumindest teilweise dem endoplasmatischen Retikulum der Wirtszelle entstammen.^[21] Dabei wird im ersten Schritt aus der positiv-strängigen RNA eine analoge negativ-strängige RNA durch die virale 3D-Polymerase gebildet, die dann als Vorlage für die Transkription vieler +ss-RNA dient. Aus dem einzigen offenen Leserahmen wird ein Polyprotein abgelesen, das einer Autoproteolyse durch die 2A und 3C Protease-Einheiten unterliegt. Diese Proteasen, also Peptidbindung-spaltende Enzyme schneiden das Polyprotein weiter in funktionale und strukturgebende Proteine, die zu neuen Viruspartikeln zusammengesetzt werden.^[22] Anschließend werden die neuen Viren wahrscheinlich unter Zelllyse aus der Wirtszelle freigesetzt und infizieren benachbarte Zellen. Allerdings gibt es auch Hinweise auf eine vesikuläre Ausschleusung der Viren.^[23]

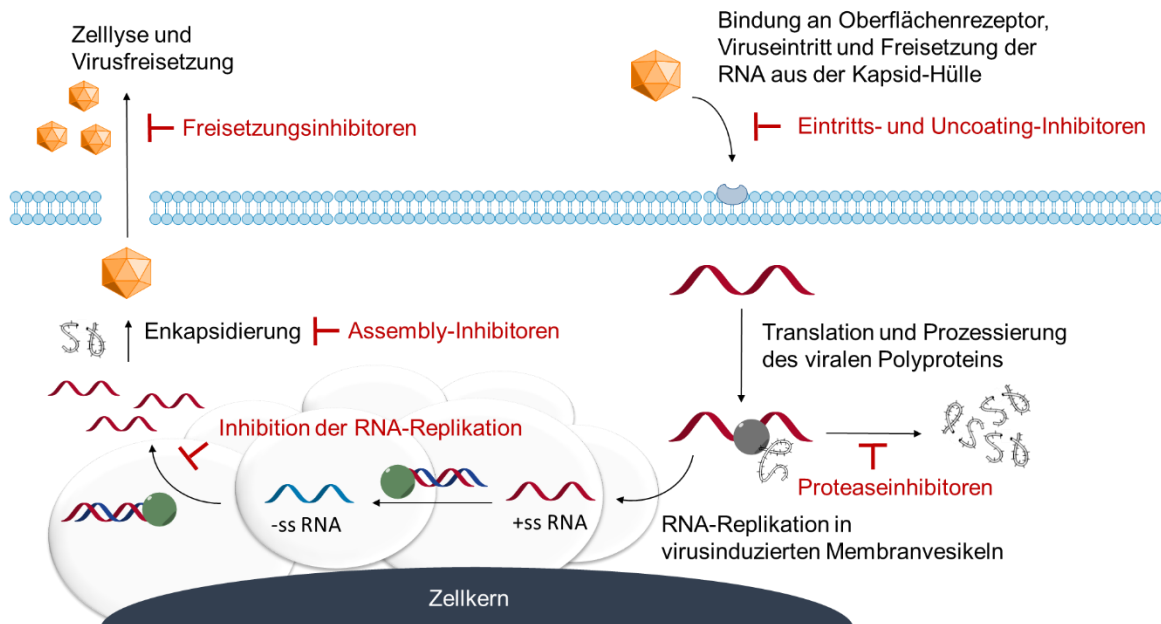


Abb. 1 Viruszyklus mit möglichen und realisierten Angriffspunkten antiviraler Wirkstoffe

Aus dem Lebenszyklus ergeben sich verschiedene Zielstrukturen, die für die Arzneistoffentwicklung bedeutsam sind und großes Potential bieten. Im Folgenden wird auf einige mögliche und realisierte Angriffspunkte antiviraler Wirkstoffe näher eingegangen.

Der Wirkmechanismus der Uncoating-Inhibitoren ist inzwischen gut untersucht. So besetzen sie die Bindungsstelle eines lipophilen „Pocket-factors“, der sonst nach Bindung an einen Oberflächenrezeptor verdrängt wird, was zu einer Destabilisierung führt und die Freisetzung der Virus-RNA einleitet. Pleconaril, Vapendavir und Pocopavir haben bereits die Hürde zur Testung in klinischen Studien genommen. Doch die Resistenzentwicklung und die Spezifität für bestimmte Virustypen führten bereits zu Rückschlägen.^[24-25] Für Pleconaril wurde sogar eine Zulassung beantragt, die wegen unerwünschter Arzneimittelwechselwirkungen, unter anderem Interaktionen mit oralen Kontrazeptiva, von der FDA zurückgewiesen wurde.^[26]

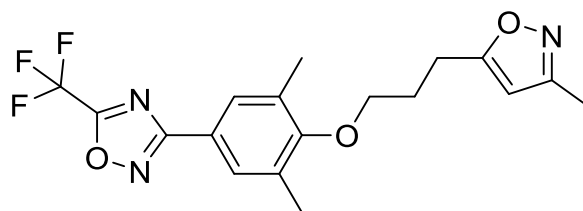


Abb. 2 Struktur des Uncoating-Inhibitors Pleconaril.

Da das Virus zur Vermehrung die wirtszelleigenen Replikationsmechanismen nutzt, ist es kaum möglich in diesen Vorgang regulierend einzugreifen ohne den Wirtsorganismus zu schädigen. Wirkstoffe, die auf die Hemmung der RNA-Polymerase abzielen, lassen

sich in nukleosidische und nicht-nukleosidische Verbindungen einteilen. Nur wenige Wirkstoffe wurden virusspezifisch neu entwickelt. Gängiger ist die Erweiterung der Indikation zugelassener Arzneistoffe um Infektionen mit neuen Virustypen wie beispielsweise der Einsatz von Ribavirin gegen den Poliovirus anstatt des Hepatitis C-Virus.^[27] Die Inhibition der viralen 2C^{ATPase}, die vielfältige Funktionen in der RNA-Replikation und Enkapsidierung ausübt, durch Fluoxetin und anderen Verbindungen wird derzeit untersucht.^[28-29] Die Inhibition der Enkapsidierung, die unter Beteiligung von Chaperon HSP90 und Glutathion abläuft, ist Gegenstand der aktuellen Forschung.^[24]

Ein vielversprechender Ansatz besteht darin, Virusproteasen selektiv zu hemmen. Das 6700-8800 Nukleotide umfassende Genom des Enterovirus bildet einen großen offenen Leserahmen (OLR) und wird während der Translation in ein Polyprotein bestehend aus etwa 2200 Aminosäuren übersetzt. Der OLR gliedert sich in drei Bereiche P1-3 und wird eingefasst von nicht-translatierten Regionen mit Vpg, einem viralen Primer, und dem Polyadenin-Schwanz. P1 umfasst dabei die strukturgebenden Kapsid-bildenden Proteine VP1-4, P2 und P3 dagegen nicht-strukturelle Proteine, darunter die virale 3C- und 2A-Protease.^[29] Die Prozessierung des Polyproteins ist essentiell für die Virusreplikation und wird eingeleitet durch eine Autoproteolyse der 2A^{Pro}. Der Großteil der Spaltungen wird jedoch durch die 3C^{Pro} verwirklicht, weshalb sie das attraktivere Zielprotein darstellt.

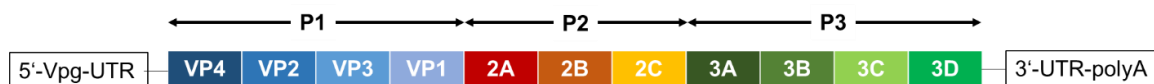


Abb. 3 Genomische Organisation des OLR eines Enterovirus. UTR steht für „untranslated regions“, also nicht-translatierte Regionen. Poly-A beschreibt den Polyadenin-Schwanz. Vpg ist ein viraler Primer, der die RNA-Synthese initiiert.

Die 3C Protease von Entero- und Rhinoviren spaltet bevorzugt zwischen Glutamin und Glycin. Die S4-Tasche wird dabei bevorzugt von kleinen hydrophoben Aminosäuren wie Alanin besetzt, die S2'-Tasche mit Prolin oder Leucin. Körpereigene Enzyme mit dieser Substratspezifität sind bisher nicht bekannt, was das Risiko von unerwünschten Nebeneffekten reduziert.^[30-31]

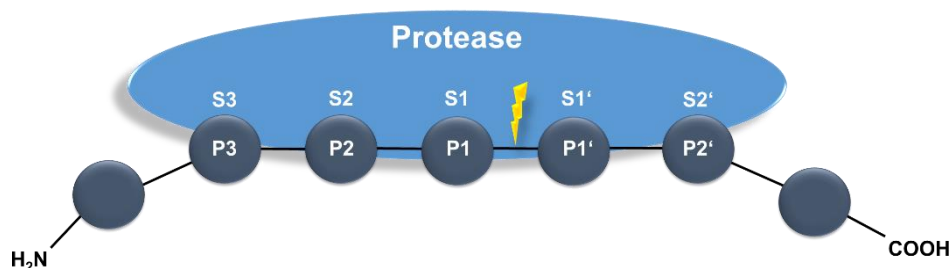


Abb. 4 Nomenklatur der Proteasen nach Schechter und Berger. Die Bindungsstellen der Aminosäurereste des Substrats an der Protease werden mit S, die in diesen Bindungstaschen liegenden Aminosäuren mit P bezeichnet. Es wird fortlaufend in beide Richtungen von der Spaltstelle nummeriert.

Diese Arbeit befasst sich mit Inhibitoren der 3C^{Pro} von Enterovirus D68. Zwischen den enteroviralen 3C Proteasen besteht jedoch eine große Ähnlichkeit, sodass von einer breiten inhibitorischen Aktivität der Verbindungen auszugehen ist.

Betrachten wir nun den strukturellen Aufbau der EV D68 3C Protease genauer. Auf eine N-terminale Helix von 10 Aminosäuren folgend faltet sich ein Großteil der 3C Protease in zwei β -Fässer (AS 14-86 und AS 93-175), die von je 6 antiparallelen Strängen gebildet werden. Die β -Fässer sind etwa im 90°-Winkel angeordnet und bilden eine ausgeprägte Furche, in der das Substrat bindet. Das aktive Zentrum liegt innerhalb dieses Spalts. Diese Art der Faltung gleicht eigentlich dem Chymotrypsin, einer Serinprotease. Für viele Picornaviren konnten schon Kristallstrukturen der 3C Proteasen gewonnen werden. Vergleicht man diese Strukturen miteinander, ergibt sich ein kleiner Wert von $< 1\text{\AA}$ für die RMSD (quadratische gemittelte Abweichung). Die Struktur der 3C Proteasen ist also hochkonserviert.^[29]

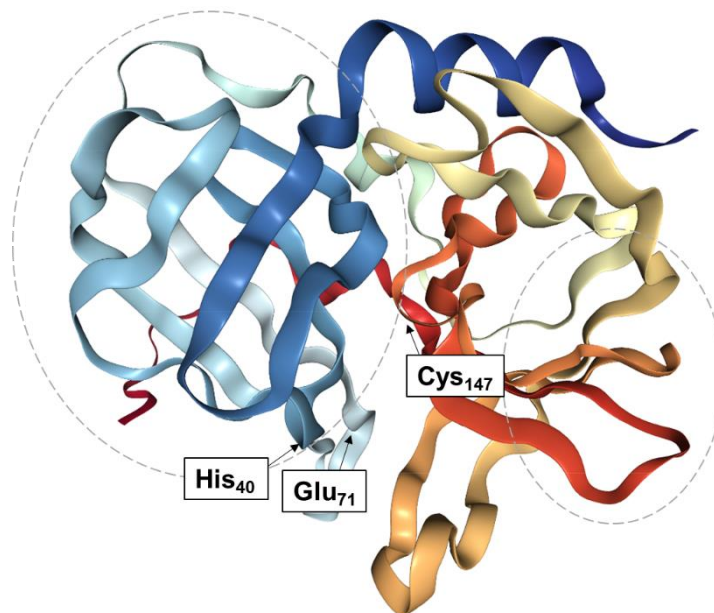


Abb. 5 Chymotrypsinartige Faltung der Cysteinprotease (PDB 3ZVG). Das aktive Zentrum befindet sich zwischen zwei β -Fässern. Die Aminosäuren der katalytischen Triade und die β -Fässer sind gekennzeichnet.

Um die hohe Konservierung zu verdeutlichen, wurde ein Sequenzabgleich der Rhinovirus 3C^{Pro} mit der EV D68 3C^{Pro} durchgeführt und es zeigte sich eine Homologie von 49%. In der Literatur wird der Prozentsatz identischer Aminosäuren des viralen Polyproteins über verschiedene Enterovirus-Spezies hinweg mit 58-63% angegeben.^[7] Daher ist es sinnvoll, Inhibitoren und Struktur-Aktivitätsbeziehungen anderer enteroviraler 3C^{Pro} auf die Entwicklung neuer Inhibitoren gegen EV D68 3C^{Pro} zu beziehen.

AS 1-60	RhV 3C ^{Pro}	GPEEEFGMSL	IKHNSCVITT	ENGKFTGLGV	YDRFVVVPTH	ADPGKEIQVD	GITTKVIDSY
	EV D68 3C ^{Pro}	GPGFDFAQAI	MKKNTVVRT	EKGEFTMLGV	HDRVAVIPTH	ASVGETIYIN	DVETKVLDAC
AS 61-120	RhV 3C ^{Pro}	DLYNKNGIKL	EITVLKLDNR	EKFRDIRRYI	PNNEDDYPNC	NLALLANQPE	PTIINVGDVV
	EV D68 3C ^{Pro}	ALRDLTDTNL	EITIVKLDNR	QKFRDIRHFL	PRYEDDYNDA	VLSVHTSKFP	NMYIPVGQVT
AS 121-181	RhV 3C ^{Pro}	SYGNILLSGN	QTARMLKYSY	PTKSGYCGGV	LYKIGQVLGI	HVGGNGRDGF	SAMLLRSYFTD
	EV D68 3C ^{Pro}	NYGFLNLGGT	PTHRILMYNF	PTRAGQC CGV	VTTTGKVI GI	HVGGNGAQQGF	AAMLLHSYFTD

Abb. 6 Sequenzabgleich der Rhinovirus 3C^{Pro} mit EV D68 3C^{Pro}. Identische Aminosäuren sind grün gekennzeichnet, in rot die Aminosäuren der katalytischen Triade His₄₀, Glu₇₁ und Cys₁₄₇. Cys₁₄₇, sowie Gly₁₄₅ und Gly₁₄₆ bilden das Oxoanionloch.

Dennoch ist zu beachten, dass sich die aktiven Zentren durchaus in einigen Aminosäuren unterscheiden, sodass bestimmte Taschen größer oder kleiner ausfallen oder zusätzliche Wechselwirkungen zwischen Inhibitor und Proteinoberfläche ermöglicht werden. Die Kristallisation des HRV 3C^{Pro}-Inhibitors Rupintrivir mit EV71 3C^{Pro} zeigte, dass die S2-Tasche halb geschlossen und die S1'-Tasche des Proteins im Vergleich kleiner ausfällt, was die etwa 100fach schwächere Wirkung des Inhibitors erklärt.^[32]

Die enterovirale 3C^{Pro} spielt nicht nur in der Prozessierung des viralen Polyproteins eine Rolle, sondern spaltet auch verschiedene wirtszelleigene Proteine, darunter Transkriptionsfaktoren, Mitochondrien-assoziierte Proteine und an der Immunreaktion der Zelle beteiligte Strukturen wie Pattern-Recognition-Rezeptoren.^[23, 29] Die Blockade dieses Enzyms sollte demnach einen breiten antiviralen Effekt auslösen.

Die Entwicklung des peptischen Proteaseinhibitors Rupintrivir wurde in der klinischen Phase II/III aufgegeben. Zwar wurde das Arzneimittel nach lokaler Applikation als Nasenspray gut vertragen und die Viruslast minimiert, aber die Häufigkeit der Erkältungen blieb konstant.^[33] Nach dem Scheitern von Rupintrivir und der zurückgewiesenen Zulassung von Pleconaril befinden sich zwar noch Wirkstoffe in der klinischen Testung, aber momentan gibt es immer noch kein zugelassenes Arzneimittel gegen enterovirale Infektionen auf dem Markt.^[34]

Daher widmet sich diese Arbeit dem Verständnis der notwendigen Eigenschaften eines niedermolekularen, selektiven und potenten Inhibitors der EV D68 3C^{Pro}. Einleitend sollen an dieser Stelle bereits bekannte inhibitorische Moleküle und Herangehensweisen an eine selektive Hemmung beschrieben werden.

Wirkstoffe zur Inhibition viraler 3C Proteasen

Um einen geeigneten Inhibitor zu entwickeln, sind Kenntnisse über den Wirkmechanismus der 3C^{Pro} unabdingbar. Es handelt sich um eine virale Cysteinprotease mit einer katalytischen Triade bestehend aus Cys₁₄₇, His₄₀ und Glu₇₁ im aktiven Zentrum. Die Glutaminsäure liegt bei einem physiologischen pH von 7.4 negativ geladen vor und bildet eine Wasserstoffbrückenbindung mit Histidin aus, das die Deprotonierung des Cysteins zum Thiolat erleichtert. Die katalytische Triade übt demnach die Funktion der Erhöhung der Nukleophilie des Thiolats aus. Die Aktivierungsenergie für den nukleophilen Angriff an den Carbonylkohlenstoff der Peptidbindung des Substrats ist gesenkt.^[35] Beim nukleophilen Angriff des peptidischen Carbonylkohlenstoffs wird ein tetraedischer Übergangszustand ausgebildet, bei dem der Carbonylsauerstoff negativ geladen ist. Dieses Anion wird über Wasserstoffbrückenbindungen mit NH-Gruppen des Proteinrückgrats im Oxoanionloch stabilisiert. Prinzipiell handelt es sich dabei um Dipole, die komplementär zur Ladung ausgerichtet sind. Wie stark der Einfluss der Stabilisierung durch das Oxoanionloch ist, wurde durch Mutationsstudien an der Cysteinprotease Papain gezeigt.^[36] Mit der Umlagerung des tetraedrischen Übergangszustandes und des Protontransfers vom Histidin zum Aminorest des Substrats wird die Peptidbindung gebrochen. Die

Glutaminsäure der katalytischen Triade hat weniger einen Einfluss auf den pK_S -Wert des Histidins und die Wahrscheinlichkeit der Aufnahme des Cysteinprotons, aber es führt zu einer Polarisierung der Wasserstoffbrückenbindung. Insgesamt wird dadurch die Energiebarriere zum Protonentransfer an den abgehenden Substratrest gesenkt.^[37] Der verbleibende Thioester wird durch den Angriff von Wasser gespalten und das Enzym wiederhergestellt. Erwähnenswert ist, dass in einigen Proteasen wie der HAV 3C^{Pro} die saure Funktion, stellvertretend durch Asparaginsäure oder Glutaminsäure, durch Wasser ersetzt ist, sodass eine katalytische Diade entsteht. Die höhere Nukleophilie des Schwefels verglichen mit dem Sauerstoff eines Serins ermöglicht dies.

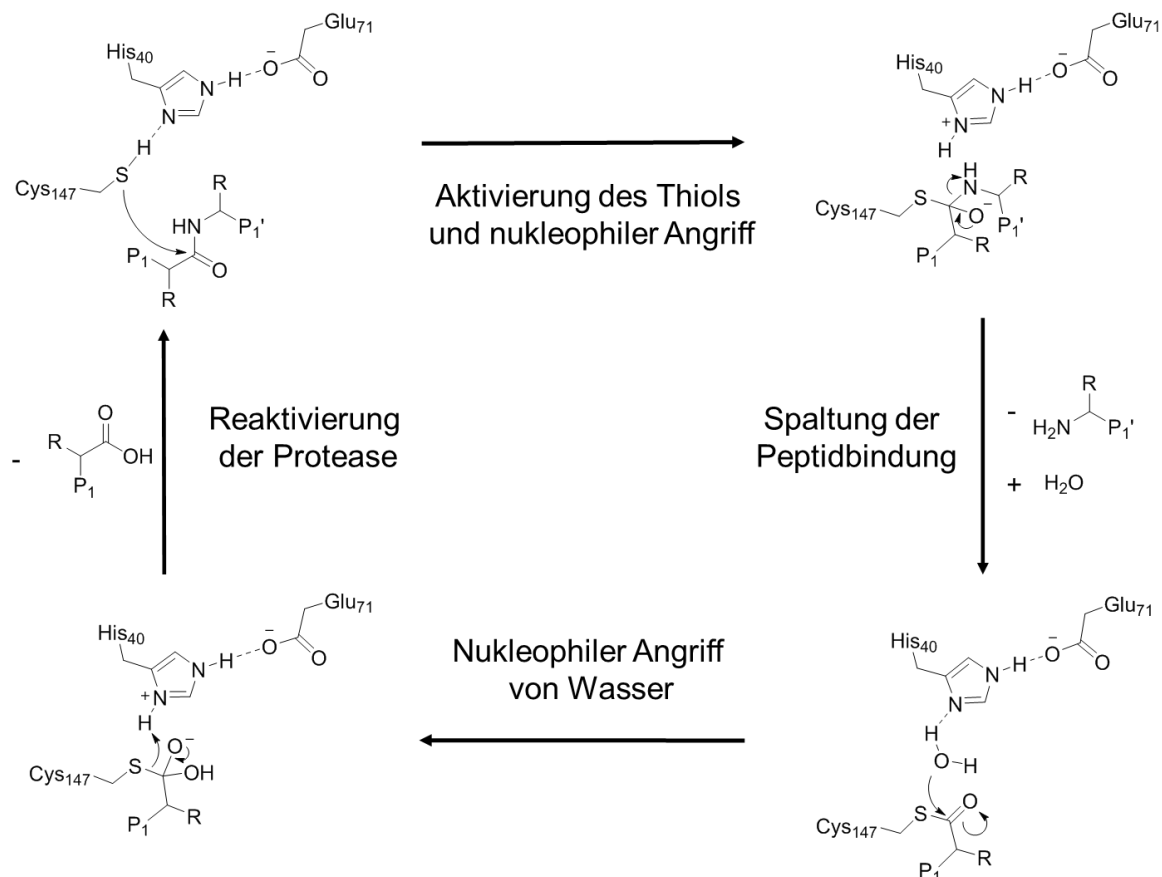


Abb. 7 Aktivierung des Thioms durch die katalytische Triade und Mechanismus der Spaltung des Peptidsubstrats

Inhibitoren, die diesen Mechanismus unterbinden sollen, würden im einfachsten Fall die Substratbindungstaschen besetzen, sodass keine Umsetzung mehr erfolgen kann. Dieser Bindungsmodus wird als kompetitive Inhibition bezeichnet, denn Substrat und Inhibitor konkurrieren um dieselbe Bindungsstelle. Möglich ist auch, dass der Inhibitor unkompetitiv an eine andere Stelle im Enzym bindet, aber die Konformation des aktiven Zentrums derart modifiziert, dass die katalysierte Reaktion nicht mehr ablaufen kann. Die rationale Entwicklung solcher allosterischen Inhibitoren ist schwierig, vielversprechende Strukturen können aber in Hochdurchsatztestungen gefunden werden. Zufälligerweise wurde Benserazid als allosterischer Inhibitor der Cox B3 3C^{Pro} in einem Screening erkannt.^[38-39]

Damit kompetitive Inhibitoren eine ausreichende Affinität zum Zielprotein entwickeln, sind hinreichend starke Wechselwirkungen mit der Proteinoberfläche notwendig. Diese ergeben sich zum einen aus der Art der Bindung, aber auch aus einer optimalen Geometrie der Bindungspartner zueinander. Man unterscheidet zudem zwischen reversibler und irreversibler Bindung, wobei es auch Mischtypen mit langer Halbwertszeit gibt, die pseudoirreversibel sind. Beide Bindungstypen können sowohl kovalent als auch nicht-kovalente Bindungen umfassen. Einer kovalenten Bindung geht eine Annäherung an das aktive Zentrum mit Ausbildung nicht-kovalenter Bindungen voraus.

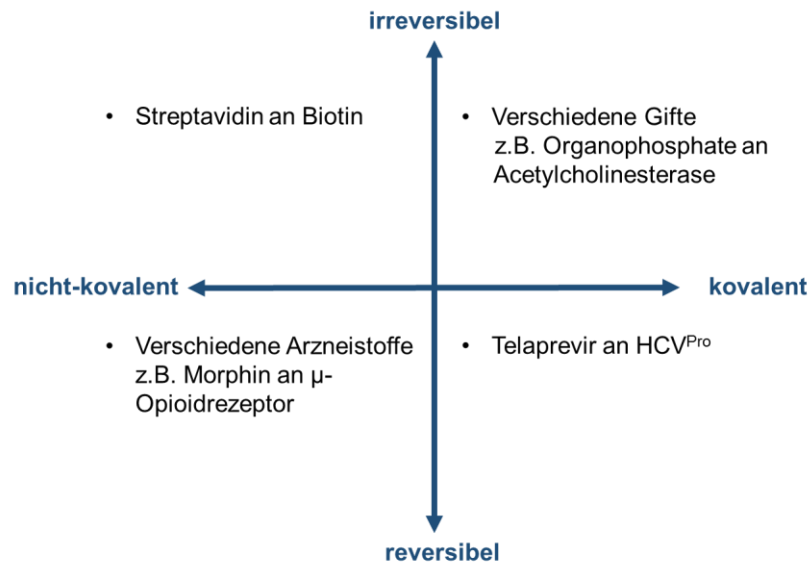


Abb. 8 Gliederung der Bindungsarten nach Reversibilität und kovalentem oder nicht-kovalentem Bindungsmodus mit bekannten Beispielen.

Das aktive Zentrum eines Enzyms sitzt in der Regel in einer Furche oder Höhle auf der Proteinoberfläche und besitzt eine Vielzahl von funktionellen Gruppen, die sich als potentielle Bindungspartner eignen. Da die Mehrzahl der zugelassenen Arzneistoffe kleine Moleküle mit einem Molekulargewicht ≤ 500 Da darstellen, besetzen sie nur einen Teil der Bindungstaschen, die von größeren, peptidischen Substraten belegt werden. Studien zur Substratspezifität der 3C Proteasen haben gezeigt, dass die Besetzung der S1-Tasche als Erkennungsmerkmal der Glutamin-Glycin-Spaltstelle elementar ist. Die P4-Position stellt im natürlichen Substrat häufig ein Alanin dar und die P2'-Position ist mit Prolin besetzt. Gegenüber den Positionen P2 und P3 verhält sich die 3C^{Pro} recht promisk.^[29]

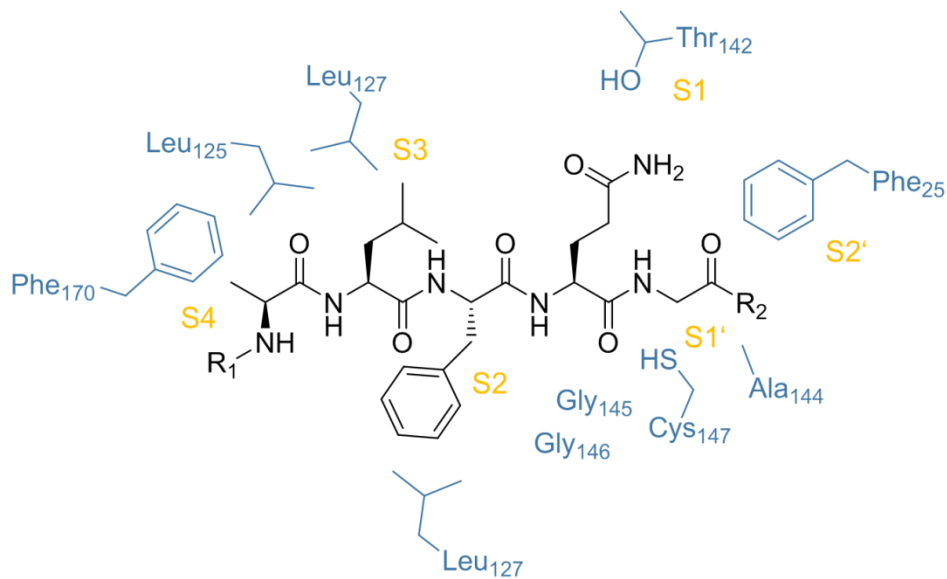


Abb. 9 Chemische Umgebung im aktiven Zentrum der EV D68 3C^{Pro} – AS der Protease in graublau, ungefähre Lage der Bindungstaschen in orange, Ausschnitt eines Peptidsubstrats in schwarz

Als Grundlage dieser Arbeit werden im Folgenden ausgewählte Inhibitoren vorgestellt, in denen die Anpassung an das aktive Zentrum mit verschiedenen molekularen Strukturen verwirklicht wurde. Sie wurden gegliedert in peptidische und nicht-peptidische Inhibitoren und sortiert nach ihren reaktive Kopfgruppen.

Peptidische Inhibitoren

Aldehyde und α -Ketoderivate

Der Beginn der rationalen Entwicklung der Inhibitoren gegen 3C Proteasen liegt etwa in der Mitte der 1990er Jahre und wurde durch die Untersuchungen zu Substratspezifitäten und der Aufklärung der Kristallstrukturen der Proteasen 1994 eingeleitet. Vorteil ist die Generierung einer hohen Affinität durch Substratanaloga und eine Vielzahl von Wechselwirkungen mit der Proteinoberfläche. Um selbst kein Substrat darzustellen, wird die P1-Position an der Schnittstelle der Protease modifiziert. Man erhält so Mechanismus-basierte Inhibitoren. Da der erste Schritt der Substratspaltung der nukleophile Angriff des Cysteins an den peptidischen Carbonylkohlenstoff darstellt, hat es sich bewährt, elektrophile Kopfgruppen in dieser Position einzufügen, um das Nukleophil abzufangen. Die erste angewendete elektrophile Kopfgruppe war die Aldehydgruppe. Die Forschung auf diesem Gebiet geht zurück auf die Entdeckung und Isolation von Peptidaldehyden aus Streptomyces-Kulturen als Plasmin- und Trypsin-Inhibitoren im Jahr 1969.^[40] Wenn auch mehr von wissenschaftlichem Interesse denn von praktischem Nutzen als Arzneistoff, setzten viele Pharmaunternehmen wie Eli Lilly and Company oder Agouron Pharmaceuticals Hoffnung in den Ansatz der Peptidaldehyde.^[41-42] Die Verknüpfung der Aldehyd-Kopfgruppe mit kurzen Substrat-ähnlichen Peptiden lieferte Inhibitoren, die Affinitäten im niedrigen mikromolaren bis

nanomolaren Bereich besitzen. Die Stabilisierung des reversiblen Hemithioacetals im Oxoanionloch trägt wesentlich dazu bei. Es handelt sich hier um sogenannte „Transition-State“-Analoge, also Wirkstoffe, die den Übergangszustand in der Spaltung des natürlichen Substrats imitieren. Da die 3C^{Pro} Glutamin in P1-Position favorisiert und in vielen Inhibitoren das primäre Amid verwirklicht ist, ergibt sich bei diesen Peptidaldehyden die Möglichkeit der internen Zyklisierung.^[43] In der reversiblen, tautomeren Ringformation ist der Aldehyd zwar geschützt vor Oxidation oder Hydratisierung durch nukleophilen Angriff von Wasser aber die Affinität zum Enzym ist deutlich verringert.

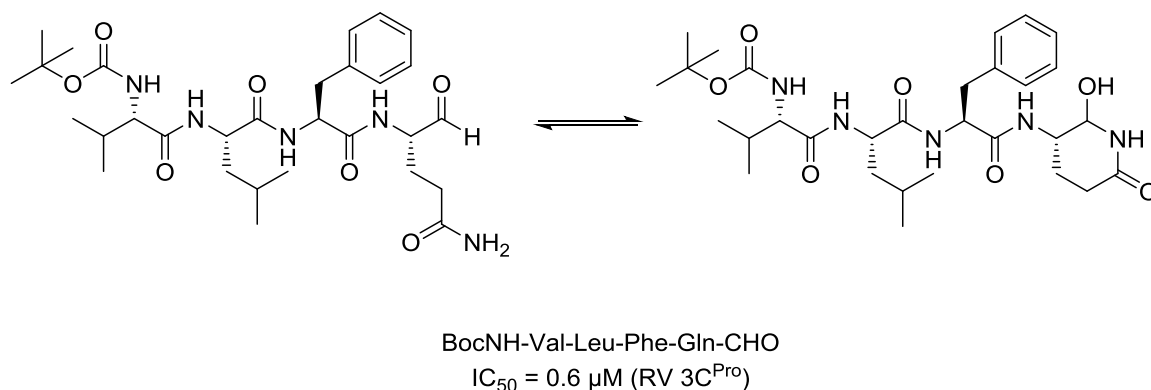


Abb. 10 Beispiel für ein Peptidaldehyd-Inhibitor der Lilly Research Laboratories. Der Glutamin-aldehyd kann cyclisieren und den Aldehyd maskieren. Trotzdem besitzt das Molekül einen submikromolaren IC₅₀-Wert gegen die HRV 3C^{Pro}.

Als elektrophile Kopfgruppen wurden zudem α-Ketoester, α-Ketoamide und 1,2-Diketone beschrieben.^[44-45] α-Ketoaldehyde sind dagegen eher als Proteasominhibitoren bekannt, die Threoninproteasen sind.^[46] Der Einsatz eines peptidischen α-Ketoaldehyds lieferte in einem Fragmentligationscreening einen picomolaren Caspaseinhibitor.^[47]

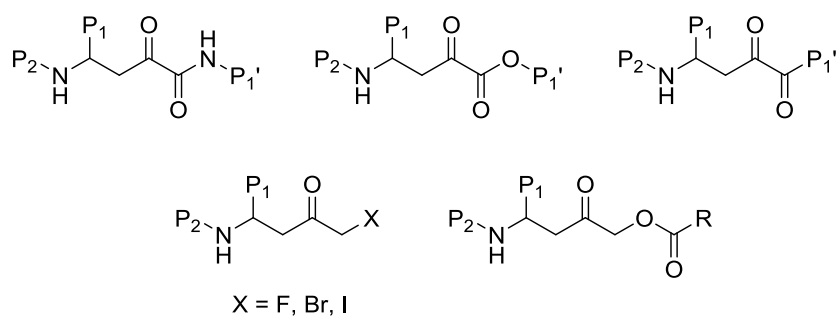


Abb. 11 Verschiedene elektrophile Kopfgruppen, die in peptidischen 3C^{Pro}-Inhibitoren eingesetzt wurden.

Zu berücksichtigen ist hierbei, dass je höher der Elektronenzug auf den Carbonylkohlenstoff ist, desto stärker ist die Hydratisierung. So ist sie bei Aldehyden verhältnismäßig stark ausgeprägt. Das könnte sich nachteilig auf die Affinität des Inhibitors auswirken, denn nur die dehydratisierte Form kann nukleophil angegriffen werden.

Peptidische Halomethylketone zeigen eine gewisse Selektivität für Cysteinproteasen. Der Wirkmechanismus beruht wahrscheinlich auf der Alkylierung des Thiols des aktiven Zentrums. Diese Strategie wurde auch mit Acyloxymethylketonen verfolgt.^[48-51]

Ein neuer Ansatz ergibt sich aus dem nukleophilen Angriff des Thiols an endständige Alkylgruppen am Beispiel von USPs und Caspase-1.^[52] Der Einsatz von Nitrilen als Kopfgruppe für Serinprotease-Inhibitoren ist gängig, sie tauchen aber auch als Inhibitoren für DUBs - Proteasen, die Ubiquitine abspalten - auf. Für Cysteinproteasen sind dagegen Cyanhydrine beschrieben.^[53-55]

Michael-Akzeptor-basierte Systeme

Die ersten vinylogenen Ester als Proteaseinhibitoren richteten sich gegen Papain und wurden bereits 1984 beschrieben.^[56-57] Die Michael-Systeme erwiesen sich als äußerst aktive Verbindungen, die eine irreversible Bindung an das Zielprotein aufwiesen. Der bekannteste und erfolgreichste Inhibitor aus der Reihe wurde AG7088, später Rupintrivir genannt, von Agouron Pharmaceuticals/Pfizer. Rupintrivir wirkt selektiv gegen 3C Proteasen und beeinflusst andere verwandte Serin- oder Cysteinproteasen wie Chymotrypsin oder Cathepsin B nicht. Im Zell-Assay mit HRV- infizierten Hela-Zellen beträgt der EC₅₀ 5 nM. Rupintrivir ist nicht toxisch, allerdings zerfällt der Inhibitor schnell in Plasma durch Spaltung des α,β -ungesättigten Esters.^[58]

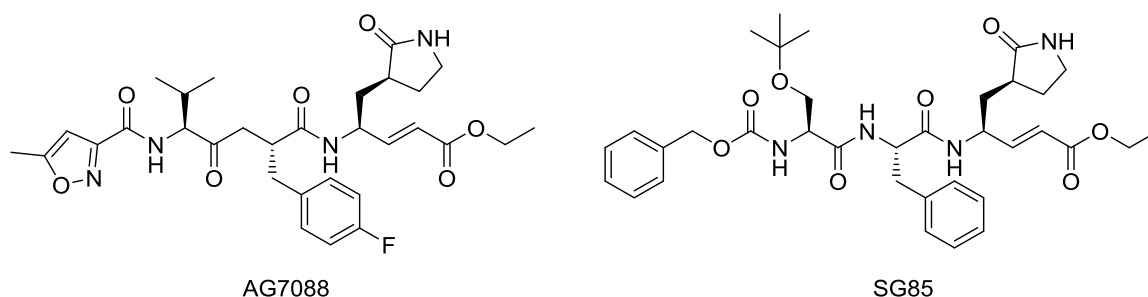


Abb. 12 Struktur von AG7088 (Rupintrivir) und SG85

Trotzdem wurde AG7088 zur Leitstruktur vieler peptidischer Inhibitoren und bildete die Grundlage der Exploration der einzelnen Proteinbindetaschen durch Modifikation einzelner peptidartiger Bausteine. Ringförmige Glutaminmimetika verhinderten nun die intramolekulare Reaktion des primären Amids mit der elektrophilen Position. Die S1'-Bindetaschen sind in den enteroviralen 3C Proteasen verschiedenartig ausgeprägt. Während für die EV D68 3C^{Pro} der Ethylester optimal ist, bietet die S1'-Tasche der HRV 3C^{Pro} Raum für größere Substituenten. So wurde das Michael-System beispielsweise mit Indanamiden erweitert oder in Lacton- und Lactam-Ringsysteme inkorporiert.^[58-59]

Ein relevanter Nachteil peptidischer Arzneistoffe ist ihre Instabilität in Plasma und die Spaltbarkeit der Peptidbindung durch körpereigene Proteasen. Um diesem Problem zu begegnen, wurde versucht, das Proteinrückgrat zu modifizieren. Möglich ist hier der Austausch von Amidgruppen zu Ketonen oder die Einführung der umgekehrten Amide. Für

eine sterische Hinderung sorgten der Einbau der Peptidkette in Pyridone oder Cyclopentapyrrolidine.^[45, 60] Außerdem wurden Azapeptide synthetisiert, die aber, wie sich später rausstellte, Substrate der Protease darstellen. Allerdings werden sie nur langsam umgesetzt und sind durchaus als Inhibitoren einsetzbar.^[61-62]

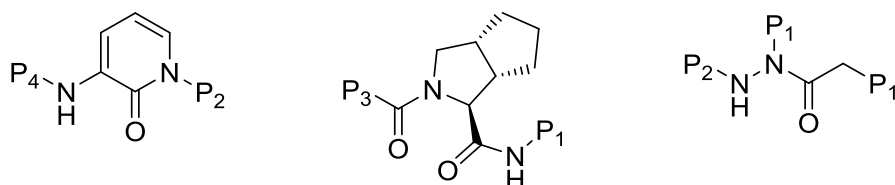


Abb. 13 Mögliche Modifikationen im Peptidrückgrat zur Erhöhung der Stabilität

Neben dem präsystemischen enzymatischen Abbau trägt die schlechte Membranpermeabilität peptidischer Strukturen zu ihrer schlechten oralen Bioverfügbarkeit bei. Zwar wurden durch biotechnologische Fortschritte in der Entwicklung der Arzneiformen und durch Zusätze von Permeationsverstärkern und Enzyminhibitoren Fortschritte in der oralen Gabe von Peptiden gemacht, doch die effektivste Methode ist bisher noch die chemische Modifikation.^[63] Das Abspecken der Peptidomimetika, sodass nur wenige Proteintaschen belegt werden, stellt den Übergang zu den nicht-peptidischen Verbindungen dar.^[64]

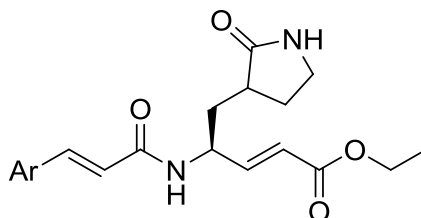


Abb. 14 Abgespeckte Peptidomimetika besetzen häufig nur die S2-, S1- und S1'-Tasche

Nicht-Peptidische Inhibitoren

Mit dem Abspecken der Peptidomimetika und dem Einsatz niedermolekularer Wirkstoffe, die in der Regel eine Masse von weniger als 500 Da besitzen, reduzieren sich auch die theoretischen Interaktionsmöglichkeiten mit dem Zielprotein. Trotzdem kann auch mit kleinen reversiblen Molekülen mit 10-20 Nicht-Wasserstoff-Atomen eine pico- bis nanomolare Affinität erreicht werden.^[65]

Auch im Bereich der Naturstoffe finden sich potente 3C^{Pro}-Inhibitoren. Darunter beispielsweise Citrinin, Radicinin, das 1,4-Naphthochinon-Derivat Thysanon und Triterpensulfate aus *Fusarium*, einer Schlauchpilzart.^[66-69] Derivate des Isatins waren vielversprechende Elektrophile, die sich im Zell-Assay jedoch sehr toxisch zeigten.^[70] Strukturell verwandt sind auch die im Screening entdeckten Homophthalimide und Chinolone.^[71-73]

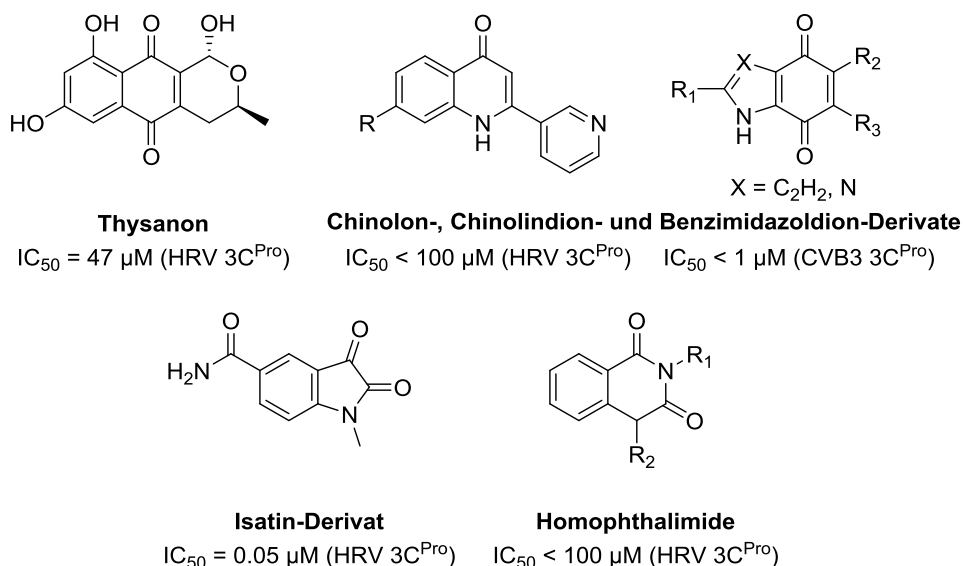


Abb. 15 Verschiedene nicht-peptidische 3C^{Pro}-Inhibitoren

In Benzamid-Derivaten, die auch dieser Arbeit zugrunde liegen, werden kleine Moleküle mit Michael-Systemen ausgestattet und erreichen damit IC_{50} -Werte im niedrigen mikromolaren Bereich. Die Kombination der Benzamid-Grundstruktur mit Bromomethylketonen lieferte ebenfalls potente Inhibitoren der 3C^{Pro}.^[74-75] Neben der elektrophilen Kopfgruppe erfolgt hier die Verankerung in der aktiven Tasche über das primäre Amid in S1-Position. Die Amid-Struktur kann dabei auch in Form eines Pyrazolons, verknüpft mit verschiedenen reaktiven Kopfgruppen wie Michael-Akzeptoren und Epoxiden, eingesetzt werden.^[76]

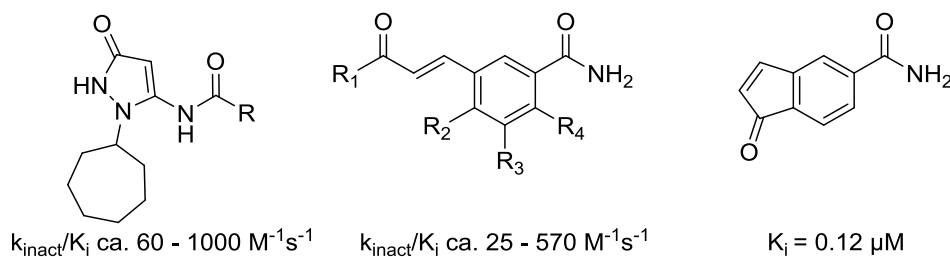


Abb. 16 Pyrazolon- und Benzamid-Derivate werden mit reaktiven Kopfgruppen wie Michael-Systemen verknüpft

Im Rahmen eines Vertiefungspraktikums von Je-Ryun Lee wurden in Zusammenarbeit mit Robert Schulz, der das Modelling und die Aktivitätstestung der Verbindungen übernahm, verschiedene Pyrrolcarboxamid-Derivate synthetisiert. Das primäre Amid besetzte dabei analog zu den Benzamiden als Glutaminmimetikum die S1-Tasche. Der Zimtsäure-Substituent am Pyrrol-Stickstoff sollte laut Docking in die üblicherweise von Phenylalanin besetzte S2-Tasche ragen und lipophile Kontakte herstellen. Die insertierte Methylengruppe ermöglichte eine gewisse Flexibilität, die dafür sorgte, dass der Rest nicht von der Proteinoberfläche abgewandt in die Umgebung ragt.

Verschiedene elektrophile Kopfgruppen, die vom Thiol des aktiven Zentrums angegriffen werden können, wurden ausprobiert. Der Aldehyd und das Ketoamid zeigten praktisch keine inhibitorische Aktivität. Der Michael-Ester war mit einem IC_{50} von $> 500 \mu\text{M}$ nur ein sehr schwacher Inhibitor. Zwar wurde der Aktivitätsassay nur mit der verwandten Coxsackievirus B3 3C Protease durchgeführt, doch aufgrund der starken strukturellen Ähnlichkeit beider Proteine ist davon auszugehen, dass die Verbindungen auch bei EV D68 3C^{Pro} unwirksam sind.

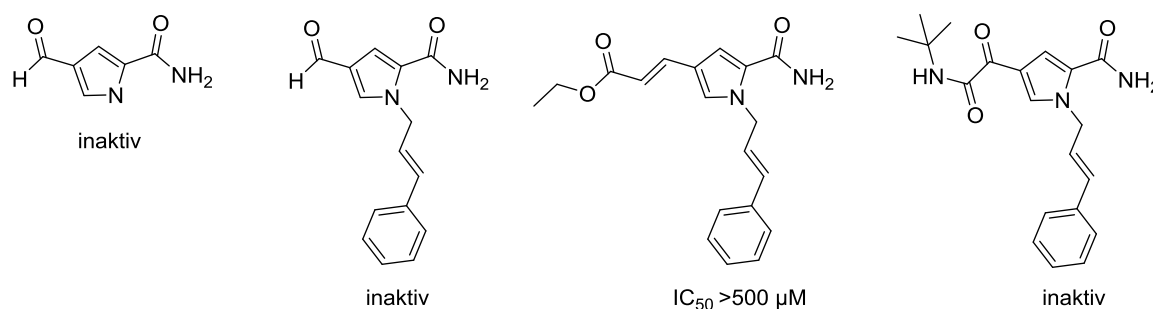


Abb. 17 Derivate des Pyrrolcarboxamids mit verschiedenen elektrophilen Kopfgruppen. Derivate mit Zimtsäuresubstituent synthetisiert von Je-Ryun Lee.

Auch der unsubstituierte Pyrrolaldehyd zeigte praktisch keine Wirkung im FRET-Assay. Das heißt, dass das Pyrrolamid nicht durch den großen Zimtsäurerest in eine ungünstige Position gedrängt wurde. Vielmehr lag die fehlende Wirkung wahrscheinlich an dem unterschiedlichen Winkel in dem primäres Amid und elektrophile Gruppe zueinander stehen. Zwar war in den Pyrrolen auch ein theoretisch optimaler Abstand von 5C-Atombindungsängen realisiert, doch durch den fünfgliedrigen Ring standen die beiden Gruppen weiter auseinander. Der nukleophile Angriff des Cys₁₄₇ ist möglicherweise erschwert bzw. nicht möglich. Der optimal passende, flexiblere Ethylester des Michael-Akzeptors positionierte das Pyrrol offensichtlich noch am besten, während der Aldehyd oder das sterisch anspruchsvolle, starre tert-Butylamid negative Auswirkungen auf die Bindung hatten.

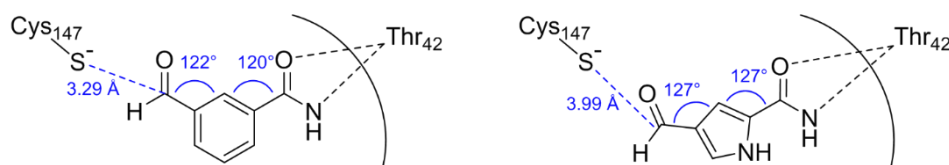


Abb. 18 Docking von **1** und Formylpyrrolcarboxamid liefert deutlich unterschiedliche Winkel zwischen fixierendem primäres Amid und elektrophiler Position. Der Abstand der elektrophilen Position zum Thiol ist im Pyrrol vergrößert.

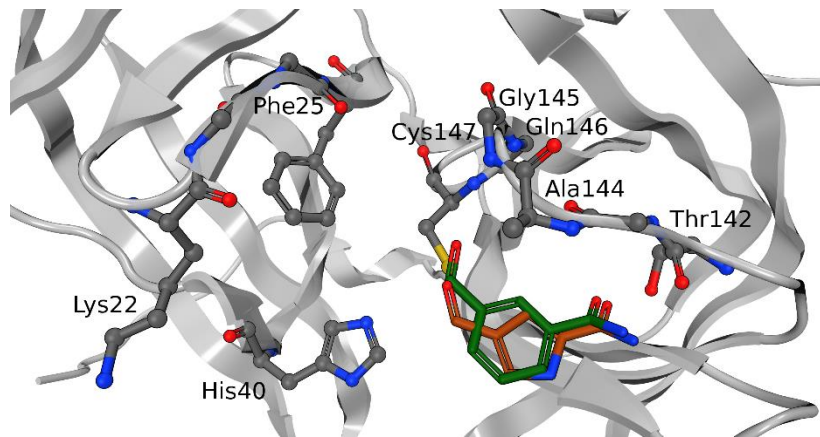


Abb. 19 Docking von 3-Formylbenzamid **1** (grün) und Formylpyrrolcarboxamid (orange). Der Pyrrolstickstoff kann theoretisch eine Wasserstoffbrückenbindung zu Gly₁₆₄ ausbilden, doch es ist relevanter, dass der Abstand des Thiols zur elektrophilen Gruppe vergrößert ist.

Kovalente Interaktion als Wirkmechanismus von Arzneistoffen

Inhibitoren können reversibel oder irreversibel an ihre Zielstruktur binden und dabei nicht-kovalent, beispielsweise über Wasserstoffbrückenbindungen oder ionische Wechselwirkungen, interagieren oder eine Atombindung ausbilden, also kovalent binden. Sowohl der kovalente als auch der nicht-kovalente Bindungsmodus bringen Vor- und Nachteile mit sich. So sind nicht-kovalente Bindungen häufig reversibler Natur, was die Auftretswahrscheinlichkeit von toxischen Nebeneffekten durch unspezifische Bindungen reduzieren kann. Diffundiert der reversible Inhibitor ab, wird er durch Metabolisierung oder Verteilung entfernt und die Toxizität verschwindet. Viele irreversible Inhibitoren, dessen Reaktivität nicht gut auf ihre Affinität abgestimmt ist, acylieren oder alkylieren unspezifisch exponierte Aminosäurereste. Diese Modifikation kann die Funktionalität der Proteine einschränken oder zur Haptenbildung führen. Das heißt, dass die größeren Strukturen nun vom Immunsystem als fremd erkannt werden und eine Immunreaktion ausgelöst wird.^[77-79] Bereits in frühen Phasen der Wirkstoffentwicklung wird daher beispielsweise auf die Reaktivität mit Thiolen wie Glutathion getestet, um das Toxizitätsrisiko zu senken.^[80]

Andererseits werden auch Zielstrukturen dauerhaft gebunden, was zu einer längeren Residenzzeit führt, die häufig einen größeren Effekt auf die Arzneistoffwirkung besitzt als die reine Affinität. Die Residenzzeit ist definiert als $1/k_{\text{off}}$, der Kehrwert der Geschwindigkeitskonstante des Zerfalls des Protein-Inhibitor-Komplexes, kurz der off-rate.^[81] Die Residenzzeit ist unter anderem abhängig von der Geschwindigkeit der Verminderung der Konzentration des freien Inhibitors durch Ausscheidungs- und Metabolisierungsprozesse, sowie von der Größe der kinetischen Barriere, die zur Spaltung der kovalenten Bindung überwunden werden muss. Gerade der zweite Aspekt bietet möglicherweise eine Stellschraube mittels derer die in vivo-Aktivität durch chemische Modifikation verbessert werden kann. Residenzzeiten lassen sich beispielsweise über die Messung von k_{off} in der Bio-Layer-Interferometrie bestimmen.

Außerdem konnte gezeigt werden, dass die freie Bindungsenergie ΔG durch die Ausbildung einer kovalenten Bindung deutlich größer sein kann als bei nicht-kovalenten Liganden. Daraus ergibt sich, dass ein kovalenter Bindungsmodus potentere Arzneistoffe liefern kann.^[82] Die Ausbildung einer irreversiblen Bindung ist ein zeitabhängiger Prozess. Bei ausreichender Inkubationszeit kommt es immer zu einer vollständigen Inhibition, auch bei verminderter Affinität. Dieser Effekt fehlt bei reversiblen Hemmstoffen und kann zu einer unvollständigen Abdeckung führen und die Entwicklung von Resistenzen begünstigen. Betrifft die irreversible Inhibition funktionale Proteine, so ist hier die zeitintensive Resynthese der Proteine erforderlich. Daraus resultieren geringere Dosierungen und Dosierungsintervalle bei irreversiblen Inhibitoren.

Konventionelle Arzneistoffe binden in der Regel nicht-kovalent reversibel, seltener kovalent irreversibel. Häufig wurden die Wirkmechanismen der kovalenten Arzneistoffe auch erst spät aufgeklärt, denn die meisten dieser Arzneistoffe waren Zufallsentdeckungen oder wurden auf Basis affiner, nicht-kovalenter Derivate entwickelt.

Während die Entwicklung kovalent-reversibler Inhibitoren gegen Serinproteasen schon verwirklicht wurde, ist die Anwendung dieses Wirkmechanismus für Cysteinproteasen weniger gut erforscht. Kovalent-reversible Kinase-Inhibitoren, die auf ein nicht-katalytisches Cystein abzielen, sind beschrieben.^[83-85] Die Acrylamide Afatinib, Ibrutinib und Osimertinib stellen kovalent-irreversible Inhibitoren konservierter Cysteine von Tyrosinkinasen dar und wurden für verschiedenen Krebsarten von der FDA und der EMA zugelassen.^[86]

Zugelassener AS	Wirkmechanismus	Erläuterungen
Acetylsalicylsäure	Kovalent-irreversibel	Acylierung eines Serins der COX
Omeprazol	Kovalent-irreversibel	Disulfidbindung an ein Cystein der Protonenpumpe
Clopidogrel	Kovalent-irreversibel	Nach Metabolisierung zum Thiol Disulfidbindung an Cysteine des P2Y ₁₂ -ADP-Rezeptors auf Thrombozyten
β-Lactam-Antibiotika	Kovalent-irreversibel	Acylierung eines Serins der bakteriellen Transpeptidase
Telaprevir, Boceprevir	Kovalent-reversibel	Bindung an ein Serin der NS3 ^{Pro} von HCV mittels α -Ketoamid

Tab. 2 Auswahl zugelassener AS mit kovalentem Wirkmechanismus

Die Bildung eines kovalenten Protein-Inhibitor-Komplexes wird initiiert durch eine reversible Bindung an das Zielprotein. Dieser Prozess ist wesentlich von der Fähigkeit des Moleküls bestimmt, mit der Proteinoberfläche zu wechselwirken und wird charakterisiert durch die Dissoziationskonstante K_i . In einem zweiten Schritt wird die

kovalente Bindung ausgebildet. Das Ausmaß des kovalenten Protein-Inhibitor-Komplexes wird dabei bestimmt von der Reaktionsrate k_2 , die von der Reaktivität des Inhibitors abhängt. Je nach Größe der Geschwindigkeitskonstanten kann der Inhibitor bei schneller Umsetzung zum kovalenten Protein-Inhibitor-Komplex eine monophasische Kinetik oder bei langsamer, schrittweiser Umsetzung eine biphasische Kinetik aufweisen. Bei den zweitgenannten handelt es sich um „Slow tight binding inhibitors“.

Trotzdem darf die Reaktivität nicht wahllos erhöht werden, denn sonst spielt die Affinität zur Zielstruktur keine Rolle mehr und verschiedene Positionen werden unselektiv modifiziert. Daher ist eine gute Feinabstimmung zwischen der Affinität und der Reaktivität erforderlich, was beispielsweise schon für Caspase-Inhibitoren untersucht wurde.^[87] Der Schwerpunkt sollte dabei eher auf der Erhöhung der Affinität und einer optimalen Passform liegen, weil allein die Nähe der Proteinoberfläche zur elektrophilen Gruppe des Inhibitors die Reaktion katalysieren kann.^[88-89]

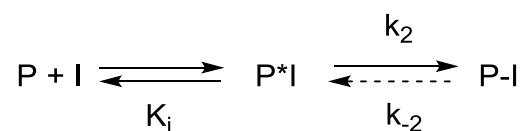


Abb. 20 Die Bindung eines kovalenten Inhibitors ist in der Regel ein zweistufiger Prozess. Dem initialen, reversiblen Protein-Inhibitor-Komplex, dessen Stabilität charakterisiert ist über den K_i -Wert, folgt die Ausbildung der kovalenten Bindung zum Protein. Ist $k_{-2}=0$ handelt es sich um einen irreversiblen Inhibitor.

Je kleiner k_{-2} als Bestandteil von k_{off} , desto länger ist die Residenzzeit am Protein und desto stärker die inhibitorische Wirkung. Die Reaktion mit konkurrierenden Nukleophilen nimmt ebenfalls Einfluss auf das Protein-Inhibitor-Gleichgewicht indem die Konzentration an freiem Inhibitor gesenkt wird. Der Inhibitor kann bei einer irreversiblen Reaktion mit dem Nukleophil deaktiviert und unwirksam werden und gleichzeitig unerwünschte Arzneimittelwirkungen hervorrufen. Insgesamt bleibt es schwierig, eine Selektivität für bestimmte Nukleophile insbesondere bei verwandten Proteasen aufgrund ihrer Ähnlichkeit herzustellen. Eine Möglichkeit besteht darin, gezielt nicht-katalytische Cysteine zu modifizieren. Für die HCV^{Pro} wurde das bereits versucht.^[90]

Fragment-basiertes Wirkstoffdesign

Die Entwicklung neuer Arzneistoffe ist heute ein langwieriger und teurer Prozess, der sich über Jahre hinzieht und etwa 2.5 Milliarden \$ pro neuem zugelassenen therapeutischen Arzneimittel verschlingt. Grund dafür ist häufig die nicht erreichte Sicherheit und Wirksamkeit der Arzneimittel in den Phasen II und III der klinischen Studien. Problematisch sind hierbei im Wesentlichen die physikochemischen Eigenschaften des Arzneistoffs und die Auswahl messbarer Biomarker oder Surrogatparameter als Indikator für die Wirksamkeit. Betrachtet man die frühen Phasen der Arzneimittelentwicklung, wird deutlich, dass die Identifikation und Kenntnis geeigneter Angriffspunkte sowie die Möglichkeiten der therapeutischen Modulation essentiell für den Erfolg eines Arzneistoffs sind.^[91] Umso erstaunlicher ist es, dass - auch aufgrund der Unkenntnis bezüglich bestimmter Regulationswege und biochemischen Strukturen - zufällige Funde zu potenten Arzneistoffen führten, wie z.B. die Entdeckung

des Penicillins durch Fleming oder der Einsatz des PDE-5-Hemmers Sildenafil als Potenzmittel, statt - wie ursprünglich durch Pfizer vorgesehen - als Arzneimittel bei Angina pectoris.^[92] Die Forschung an Naturstoffen und ihrem therapeutischen Einsatz erreichte ihren Höhepunkt in den 1970er Jahren, während das Interesse in den letzten Jahren immer mehr abebbte. Die Komplexität und teilweise ungenügende Reinheit von Naturstoffbibliotheken mit häufigem Einsatz von Substanzgemischen erschwert die Hochdurchsatztestung. Nichtsdestotrotz bieten Naturstoffe ein großes Potential für die Identifikation von Arzneistoffen.^[93] Die Identifikation von Leitstrukturen erfolgt heute überwiegend über die Hochdurchsatz-Testung von Bibliotheken, die aus tausenden synthetisierten Verbindungen bestehen. Die vielfältigen Möglichkeiten aus diesen Bibliotheken potentielle Arzneistoffkandidaten herauszufiltern erstrecken sich über einfache biochemische Assays bis hin zu aufwändiger Hochdurchsatzkristallgraphie. Gemeinsam ist diesen Methoden der große Aufwand, sei es finanziell, zeitlich und personell, mit verhältnismäßig geringen Ausbeuten an potentiellen Kandidaten. Nicht zu vernachlässigen ist zudem die Etablierung der Substanzbibliotheken selbst, die tausende synthetisierte, aufgereinigte und charakterisierte Verbindungen enthalten.

Ende der 1990er Jahre kam das Fragment-basierte Wirkstoffdesign (fragment-based drug design, FBDD) auf, das kleine fragmentartige Leitstrukturen, die in der Regel nur schwach an das Zielprotein binden, identifizierte und sie zu hochpotenten Arzneistoffen entwickelte. Diese niedermolekularen Verbindungen stellen häufig günstigere Ausgangspunkte für die Derivatisierung und Untersuchungen zu Struktur-Aktivitäts-Beziehungen dar, denn die eingesetzten Fragmente entsprechen häufig den Richtlinien der „Rule of Three“. Diese sind von Lipinskis „Rule of Five“ abgeleitet und umfassen die Parameter: Molekulargewicht < 300 Da, $\text{clogP} \leq 3$ und die Anzahl an Wasserstoffbrückendonatoren und – akzeptoren jeweils ≤ 3 .^[94-95] Im Gegensatz dazu besitzen viele Kandidaten aus Hochdurchsatzbibliotheken von vornherein eine ausgeprägte Lipophilie, die sich in späteren Entwicklungsphasen in einer geringen Löslichkeit und ungünstigen pharmakokinetischen Parametern zeigt.

Eine Schwierigkeit, die sich im FBDD ergibt, ist die Detektion der fragmentartigen Leitstrukturen aufgrund der geringen Affinität zum Zielprotein im hohen mikro- bis millimolaren Bereich. In Protein-Templat gestützten Ligationsreaktionen werden im Assay kleine, reaktive Fragmente kombiniert, miteinander verknüpft und auf ihre Aktivität hin untersucht. Binden beide Fragmente in benachbarten, nicht-überlappenden Taschen des aktiven Zentrums und bleiben die optimalen Abstände und Winkel zu interagierenden Aminosäureresten auf der Proteinoberfläche bei Ausbildung einer kovalenten Verbindung zwischen beiden Fragmente erhalten, kann sich ein überadditiver Effekt, eine Erhöhung der freien Gibbs-Energie - verglichen mit der Bindung der einzelnen Fragmente – ergeben.^[96] Die Fragmentkombination ist dann höher affin als die einzelnen Fragmente und kann einfacher detektiert werden. Vorteilhaft ist ebenfalls, dass über die Kombination kleiner Moleküle ein größerer chemischer Raum abgedeckt werden kann als mit Hochdurchsatzbibliotheken.^[97-98] Der zweistufige Prozess der Etablierung der Substanzbibliothek und der biochemischen Testung wird hier in einem Schritt zusammengefasst und spart Ressourcen ein. Zur Verknüpfung der Fragmente stehen diverse biokompatible Reaktionen zur Verfügung, die von reversibler Acetal-Bildung bis hin zu irreversibler Click-Reaktion zwischen Aziden und Propargylresten

reichen. Der Vorteil irreversibler Fragmentierungen liegt in der anschließend einfacheren Isolierung und Analytik vorteilhafter Fragmentkombinationen.

Die Methode der Templat-gestützten Fragmentierung wurde insbesondere zur Entwicklung von Proteaseinhibitoren ausgenutzt. In Dynamischen Ligationscreenings, in denen reversible Ligationsprodukte wie beispielsweise Imine entstehen, konnten potente Inhibitoren für Caspase-3, SARS 3CL^{Pro} und Cox B3 3C^{Pro} identifiziert werden.^[47, 76, 99] Das Konzept wurde später auf die katalytische Aktivierung von Präsubstraten über Fragmentierung durch die Protein-Templates Trypsin und Faktor Xa ausgeweitet und ermöglichte die Charakterisierung von Bindungstaschen und spezifisch bindenden Liganden.^[100] Irreversible Fragmentierungsreaktionen lieferten einen nanomolaren Faktor Xa-Inhibitor über die Ausbildung von Amidbindungen und mikro- bis nanomolare Inhibitoren von STAT5 über Mannich-Reaktionen.^[101-102]

In dieser Arbeit wurde untersucht, ob die Knoevenagel-Kondensation das Spektrum biokompatibler C-C-Bindung-knüpfer Reaktionen erweitern kann. Bisher bekannt ist in diesem Zusammenhang die Henry-Reaktion zwischen Aldehyden und Nitroalkanen.^[97, 103] Dazu wurde ein empfindlicher FRET-Assay zur Detektion aktiver Fragmentkombinationen eingesetzt. FRET bedeutet Förster-Resonanz-Energietransfer und beschreibt das Phänomen, dass ein angeregtes Donormolekül seine Energie strahlungsfrei über Dipol-Dipol-Wechselwirkungen auf ein in räumlicher Nähe befindliches Akzeptor-Molekül übertragen kann.^[104] Dafür wurde ein Peptid entworfen, das als Substrat von EV D68 3C^{Pro} gespalten werden kann. Die Aminosäuresequenz ist dabei aus der Verbindung der Proteine 2C und 3A im viralen Polyprotein abgeleitet. Am N- und C-terminalen Ende ist dieses Substratpeptid mit Dabcyl bzw. Edans modifiziert, die ein FRET-Donor-Akzeptor-Paar darstellen. Spaltet die Protease das Peptid, befinden sich Donor und Akzeptor in der Assaylösung nicht mehr in unmittelbarer räumlicher Nähe und der Energietransfer ist unterbunden. Nach Anregung des Donors wird die Energie nun in Form von messbarer Fluoreszenz abgestrahlt. Besitzt eine Fragmentkombination inhibitorische Aktivität, nimmt der Anteil an gespaltenem Peptidsubstrat und die gemessene Fluoreszenz ab.

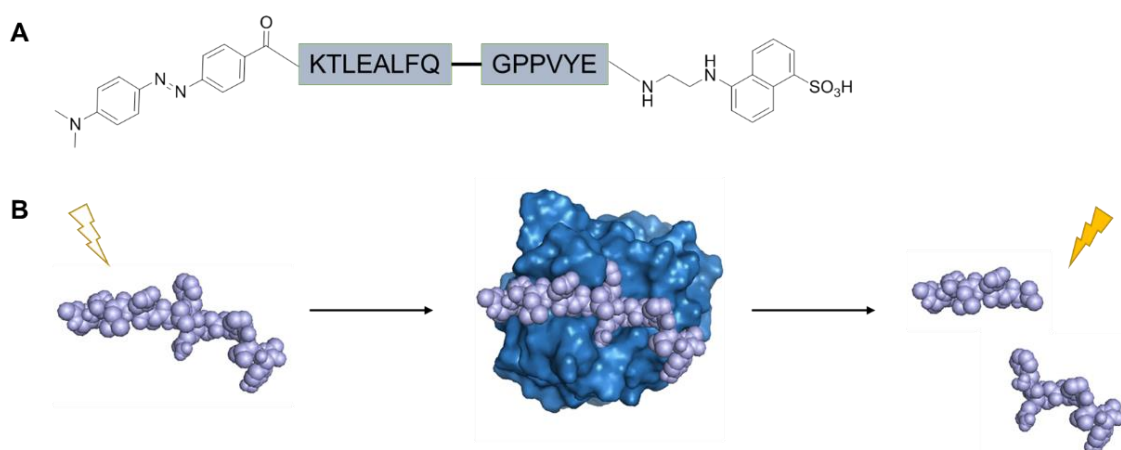


Abb. 21 **A** Struktur des modifizierten Peptidsubstrats mit angedeuteter Spaltstelle in der Peptidsequenz **B** Prinzip des angewendeten FRET-Assays. Ist das Peptidsubstrat intakt tritt FRET auf. Wird das Peptid von der Protease gespalten und FRET-Donor und -Akzeptor räumlich getrennt, kann nach Anregung mit einer bestimmten Wellenlänge Fluoreszenz gemessen werden.

Zielsetzung der Arbeit

In dieser Arbeit sollen kovalent reversible Inhibitoren der viralen 3C Protease hinsichtlich ihrer Wirkung, den thermodynamischen und kinetischen Eigenschaften der Protein-Inhibitor-Bindung und ihrer Bildung systematisch untersucht werden.

In vorangegangenen Arbeiten zeigten sich die synthetisierten, niedermolekularen Verbindungen entweder als nicht ausreichend wirksam oder zu reaktiv, unselektiv und zu toxisch. Der kovalent reversible Bindungsmechanismus soll nun die Vorteile einer langen Residenzzeit am Zielprotein mit erhöhter Wirksamkeit und einer verminderten Toxizität vereinen. Dazu sollen die synthetisierten Inhibitoren der EV D68 3C^{Pro} hinsichtlich ihrer Affinität im FRET-Assay und der biologischen Aktivität im Zell-Assay beurteilt werden. Neue Methoden wie ITC und Massenspektrometrie sollen über die Stabilität der Protein-Inhibitor-Komplexe aufklären. Aus diesen Ergebnissen sollen strukturelle Merkmale abgeleitet werden, die zu maximal wirksamen, spezifischen und nicht-toxischen Inhibitoren führen. Der optimale Grad an Reversibilität zwischen den Extrempunkten kovalent irreversibel und nicht-kovalent reversibel soll definiert werden.

Der Arbeit liegt außerdem die Hypothese zugrunde, dass das Oxoanionloch der 3C^{Pro}, das mit positiver Partialladung ausgekleidet ist, als Katalysator fungiert und die Reaktivität von Carbonylgruppen erhöht. Darauf aufbauend soll untersucht werden, ob sich die Knoevenagel-Kondensation als C-C-Bindungs-knüpfernde Reaktion unter milden Bedingungen für die Fragmentligation im Fragment-basierten Wirkstoffdesign eignet und die EV D68 3C^{Pro} die Bildung verbesserter Inhibitoren katalysiert.

Ergebnisse und Diskussion

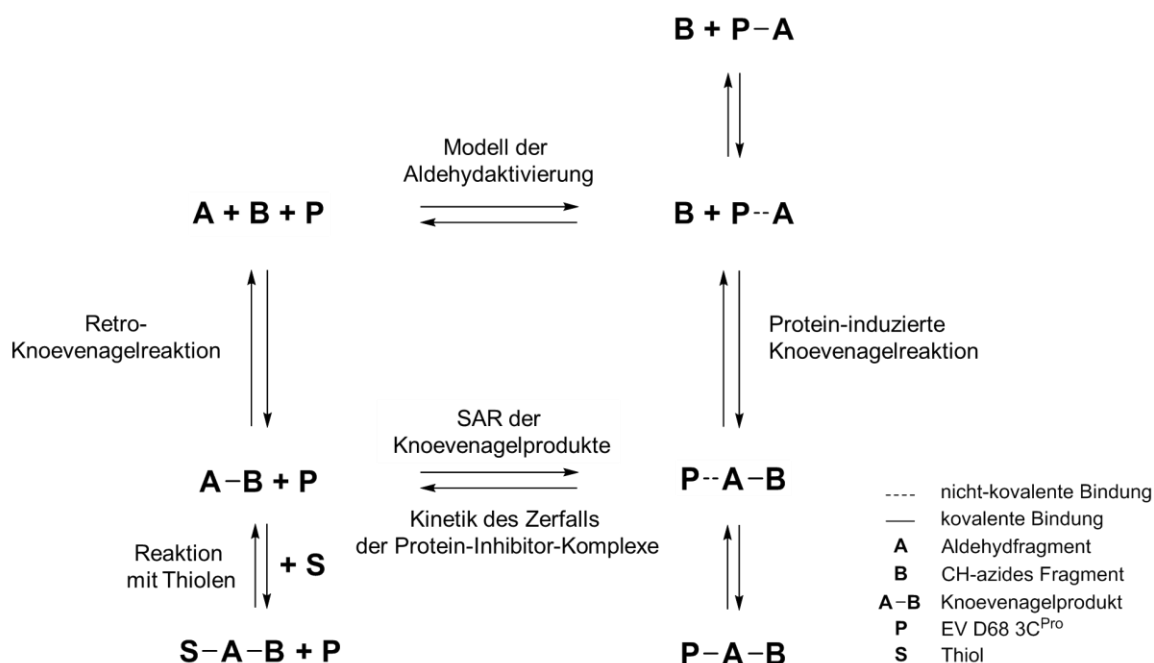


Abb. 22 Übersicht der in dieser Arbeit untersuchten Gleichgewichtsprozesse zwischen Aldehydfragment, CH-azidem Fragment, Knoevenagelprodukt, Thiolen und EV D68 3C Protease.

In der vorliegenden Arbeit werden verschiedene Gleichgewichtsprozesse zwischen den Komponenten Aldehydfragment, CH-azides Fragment, Knoevenagelprodukt, Thiolen und EV D68 3C Protease näher untersucht. Zuerst steht die synthetische Derivatisierung der Knoevenagel-Produkte im Vordergrund. Die Derivate werden hinsichtlich ihrer Affinität und Kinetik mithilfe vielfältiger Methoden charakterisiert. Die Reaktion mit Thiolen liefert Erklärungsansätze für die Wirksamkeit der Verbindungen im Zellmodell. Untersuchungen zur Retro-Knoevenagel-Reaktion geben Aufschluss über die Stabilität der Inhibitoren. Anschließend wird auf die Protein-induzierten Knoevenagelreaktion eingegangen und ein Modell der Aldehydaktivierung im aktiven Zentrum zur Erklärung herangezogen.

Charakterisierung der kovalent-reversiblen Inhibitoren



In ersten Teil der Arbeit werden synthetisch hergestellte Knoevenagelprodukte verschiedener CH-azider Verbindungen mit 3-Formylbenzamid untersucht. Die inhibitorische Aktivität der Michael-Akzeptoren gegenüber der cysteinhaltigen EV D68 3C^{Pro} wird mit einem FRET-Assay mit isolierter Protease erfasst. Es werden Struktur-Wirkungs-Beziehungen abgeleitet und Bindungsmodi anhand von Docking-Posen visualisiert.

Untersuchungen zum Bindungsmodus im aktiven Zentrum der 3C^{Pro}

Die EV D68 3C Protease wurde bereits mit verschiedenen peptidischen Inhibitoren kristallisiert und die Strukturen der Komplexe 2013 von Tan et al. veröffentlicht.^[59] Zur rationalen Wirkstoffentwicklung wurden 3-Formylbenzamid und dessen Michael-Akzeptor-Derivate in die Kristallstruktur 3ZVG gedockt. Theoretisch berechnete Wechselwirkungen und Abstände wurden zur Erklärung der unterschiedlichen Affinitäten herangezogen und Vorschläge zur weiteren Derivatisierung abgeleitet. Grundsätzlich ergaben sich aus der logischen Betrachtung der Arbeitsweise und des Aufbaus der Protease folgende Anforderungen an einen Inhibitor: Die Verbindung sollte durch ein primäres Amid in der S1-Tasche des aktiven Zentrums durch Wasserstoffbrückenbindungen mit Thr₁₄₂ verankert sein. Zwischen dieser Verankerung und der elektrophilen Position liegt ein Abstand von etwa 4 Kohlenstoffbindungsängen. Der Inhibitor besitzt idealerweise eine Carbonylfunktion, die nach Angriff des Cysteins im Oxoanionloch stabilisiert wird. Günstige Reste nach der elektrophilen Position geben zusätzliche Wechselwirkungen in der S1'-Tasche, die im Substrat üblicherweise von Glycin besetzt wird. Modifikationen an der Alkylkette zwischen Amid und elektrophiler Position ermöglichen Interaktionen mit entfernteren Proteintaschen. Derart konzipierte Inhibitoren zeigen einen kompetitiven Bindungsmodus, weil sie an derselben Stelle im Protein binden wie auch das Substrat.

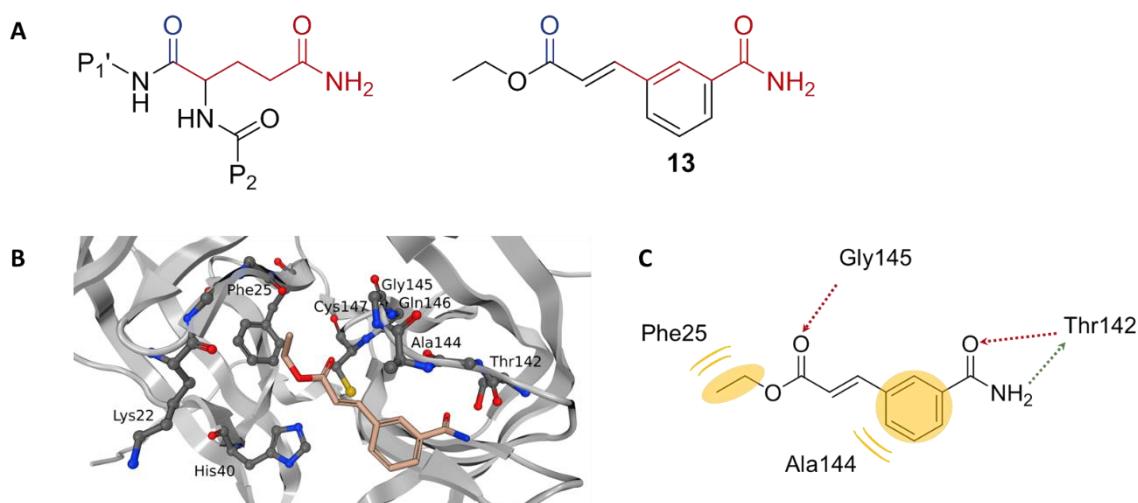


Abb. 23 Der Vergleich vom natürlich vorkommenden Glutamin und Inhibitor **13** (**A**) verdeutlicht den optimalen Abstand von 4 Kohlenstoffbindungen von der in S1-bindenden Amidgruppe bis zur Spaltstelle und Lage der elektrophilen Position (rot) und die Lage des im Oxoanionenloch stabilisierten Anions gebildet im Übergangszustandes nach Angriff des Thiols (blau). Docking von **13** (**B**) und Pharmakophor (**C**) zeigen elementare Wechselwirkungen. Im Pharmakophor gelb unterlegt sind lipophile Kontakte, in rot Wasserstoffbrückenbindungsakzeptoren und in grün – donatoren.

Die Benzamid-Grundstruktur für Inhibitoren gegen virale 3C Proteasen tauchte bereits in der Arbeit von Reich et al. auf.^[74] Das primäre Amid imitierte hierbei das P1-Erkennungselement Glutamin der Protease und wurde mit einer elektrophilen Gruppe, in der Regel einem Michael-Akzeptor, in meta-Position kombiniert. Die Gruppe entdeckte dabei einen reversiblen Michael-Akzeptor, bei dem die α -Position des Michael-Systems mit einer Nitrilfunktion versehen war. Arylcianoacrylamide wurden außerdem als Serinproteaseinhibitoren gegen Dengue und West-Nil-Virus-Proteasen erwähnt.^[53] Allerdings fungierte hier das Nitril selbst als reaktive elektrophile Kopfgruppe, die mit dem Serin des aktiven Zentrums wechselwirkt. Vermutlich geschieht das über Dipol-Dipol-Interaktionen oder die Ausbildung einer reversiblen kovalenten Bindung zum Thioimidat. Begründet wurde dies damit, dass keine Glutathion-Addukte in LC/MS-Analysen nachgewiesen werden konnten und damit keine Michael-Akzeptor-Reaktivität bestünde. Tatsächlich könnte es sich aber auch um eine schnell reversible Bindung handeln, denn ein ähnliches Phänomen wurde auch bei den hier untersuchten Verbindungen beobachtet. Die Kombination des Benzamid-Michael-Akzeptor-Systems mit elektronenziehenden Substituenten wie Nitril in α -Position soll in dieser Arbeit die Grundlage für die Entwicklung kovalent-reversibler Inhibitoren bilden.

E-/Z-Isomerie der Knoevenagel-Produkte

Nur ein Isomer der Knoevenagelprodukte bringt die nötigen sterischen Voraussetzungen zum Angriff des Cystein-Nukleophils an den Michael-Akzeptor im aktiven Zentrum der 3C Protease mit. In der Regel sollte es sich dabei um das langgestreckte Isomer handeln, während das geknickte Isomer laut Molecular Modelling weitgehend inaktiv ist. Nutzt man die Protein-Templat-gestützte Fragmentligation sollte nur das passende Isomer gebildet werden. In der Synthese läuft die Knoevenagel-Reaktion in Abhängigkeit der sterischen Ansprüche der Edukte und der Wahl der Reaktionsbedingungen auch stereoselektiv ab. In den meisten hier durchgeführten Synthesen konnte über LC/MS ausschließlich ein Isomerenpeak identifiziert werden. Aufgrund der beobachteten Aktivität im FRET-Assay handelt es sich vermutlich um das Isomer mit sterisch weniger anspruchsvollem Rest in syn-Stellung zum Benzamid und der damit thermodynamisch stabileren Verbindung. Diese Beschreibung trifft üblicherweise auf das E-Isomer zu. Ausnahmen von dieser enantiomerenreinen Synthese sind das Hydantoin-Derivat **44** und das Knoevenagelprodukt mit Acetessigester **32**. Die Bildung von Isomergemischen zeigte sich auch bei den im Rahmen einer Masterarbeit synthetisierten Malonester-Derivaten von Sabrina Lechnitz deutlich.^[105] Sowohl sterische Ansprüche als auch elektrostatische Abstoßungen begünstigten jedoch häufig die Bildung eines Isomers.^[106] Tanikaga et al. beschrieben schon, dass bei der Reaktion von Benzaldehyd mit Diketonen zu 99% die E-Isomere entstünden.^[107] IR-Studien wiesen ebenfalls darauf hin, dass aromatische Aldehyde mit Ethylcyanacetat bzw. Cyanacetamid unter wässrigen oder ethanolischen Bedingungen E-Knoevenagelprodukte bilden. Isomere Knoevenagelprodukte sind bekannt für aromatische Aldehyde und CH-azide Nitroverbindungen.^[108-109]

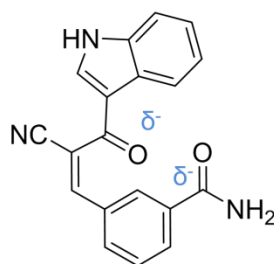


Abb. 24 Z-Isomer von **26**. Elektrostatische Abstoßungen der Carbonylfunktionen und eine ungünstige Verdrillung der Struktur des Z-Isomers durch sterische Hinderungen begünstigen in der Synthese in der Regel die thermodynamisch günstigeren E-Konformationen.

In der Knoevenagelreaktion folgt dem nukleophilen Angriff des Enolats an den Carbonylkohlenstoff des Aldehyds eine Eliminierungsreaktion von Wasser bzw. des als Katalysator eingesetzten Amins. Die Abspaltung verläuft dabei nach dem E1_{cb}-Mechanismus. Das bedeutet, dass im ersten Schritt mithilfe einer Base ein Proton abstrahiert wird. Erst danach bricht die Kohlenstoff-Heteroatom-Bindung. Entscheidend für die Stereochemie ist der antiperiplanare Eliminierungsschritt aus dem stabilen Carbanion, dessen Struktur im Wesentlichen von den sterischen Ansprüchen der elektronenziehenden Reste der CH-aziden Verbindung abhängt.

In der Newman-Projektion wird deutlich, dass die anti-Stellung des Carbonyls zum Benzamid-Ring bzw. die gauche-Stellung der Nitrilgruppe zum Benzamid-Ring sterisch günstiger ist als umgekehrt. Gibt es nun in ihrem sterischen Anspruch gleichwertige Substituenten wie bei einigen Malonesterderivaten, ist keine der beiden Konformationen begünstigt und es entsteht ein Gemisch. Die bevorzugte Entstehung eines Isomers kann auch durch Ausbildung eines 6-gliedrigen Übergangszustandes begünstigt werden, wenn die CH-azide Verbindung enolisierbare Funktionen enthält.

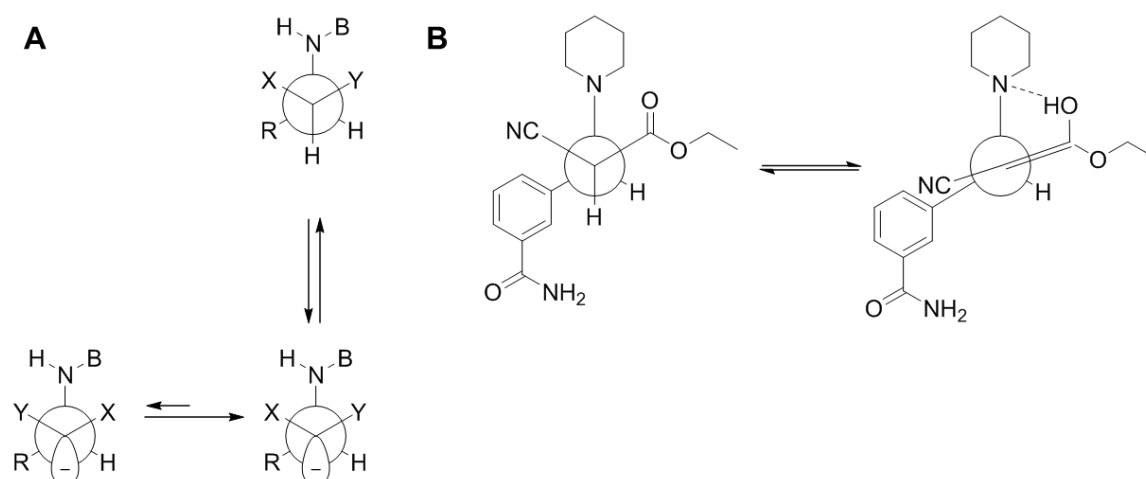


Abb. 25 Newman-Projektion des Additionsproduktes der methylenaktiven Verbindung mit dem aus Aldehyd und Hilfsbase gebildeten Imin und dem Carbanion als ersten Schritt im E1cb-Mechanismus. Der Substituent X ist sterisch weniger anspruchsvoll als Y. Der E1cb-Mechanismus begünstigt die Bildung des thermodynamisch stabileren Produkts über ein frei drehbares Anion (**A**). Enthält die methylenaktive Verbindung enolisierbare Funktionen, kann sich ein stabilisierender 6-gliedriger Übergangszustand bilden und die Abspaltung des Amins vereinfachen (**B**).

Auch wenn es durch diesen mechanistischen Hintergrund nahe liegt, dass das E-Isomer gebildet wird, so steht dennoch ein Nachweis dafür aus. Üblicherweise erfolgt die Bestimmung der Isomerie über die vicinale $^3J_{H,H}$ -Kopplungskonstante der beiden Protonen an der Doppelbindung, wobei $^3J_{H,H-E} > ^3J_{H,H-Z}$.^[110] Für den durch stereoselektive Wittig-Horner Reaktion hergestellten Michael-Akzeptor **13** funktionierte das problemlos und die $^3J_{H,H}$ -Kopplungskonstante von 16 Hz sprach eindeutig für das gewünschte E-Isomer. Durch die Substitution des α -Protons der Doppelbindung durch einen elektronenziehenden Rest, konnte diese Methode nicht mehr angewendet werden.

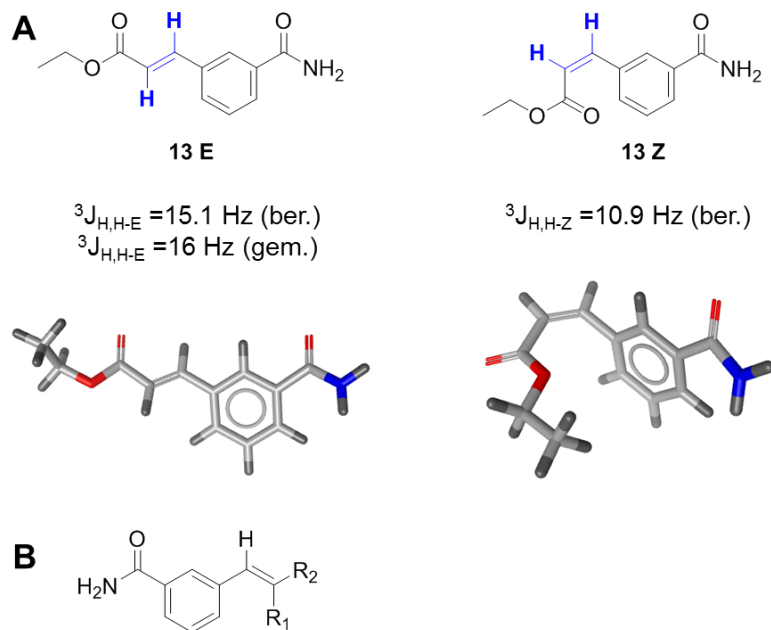


Abb. 26 A Üblicherweise wird die Isomerie durch die vicinale $^3J_{H,H}$ -Kopplungskonstante der beiden Protonen an der Doppelbindung bestimmt, wobei $^3J_{H,H-E} > ^3J_{H,H-Z}$. Angegeben sind die berechneten (ber.) und gemessenen (gem.) Kopplungskonstanten. Die räumliche Struktur der Isomere kann sich je nach Substitutionsmuster deutlich unterscheiden. **B** Fehlt das zweite Proton der Doppelbindung wird je nach Substitutionsmuster von R_1 und R_2 bevorzugt das thermodynamisch günstigere Isomer oder ein Isomerengemisch gebildet. Die klassische Methode zur Bestimmung der Konformation kann hier nicht angewendet werden.

Liegen beide Isomere vor, können über chemische Verschiebungen im NMR Rückschlüsse auf die vorliegende Konformation gezogen werden. Allein durch Vergleichs- und vorhergesagte Spektren lässt sich jedoch häufig keine eindeutige Aussage treffen, zumal hier bei den meisten Inhibitoren nur das NMR-Spektrum eines Isomers vorliegt.

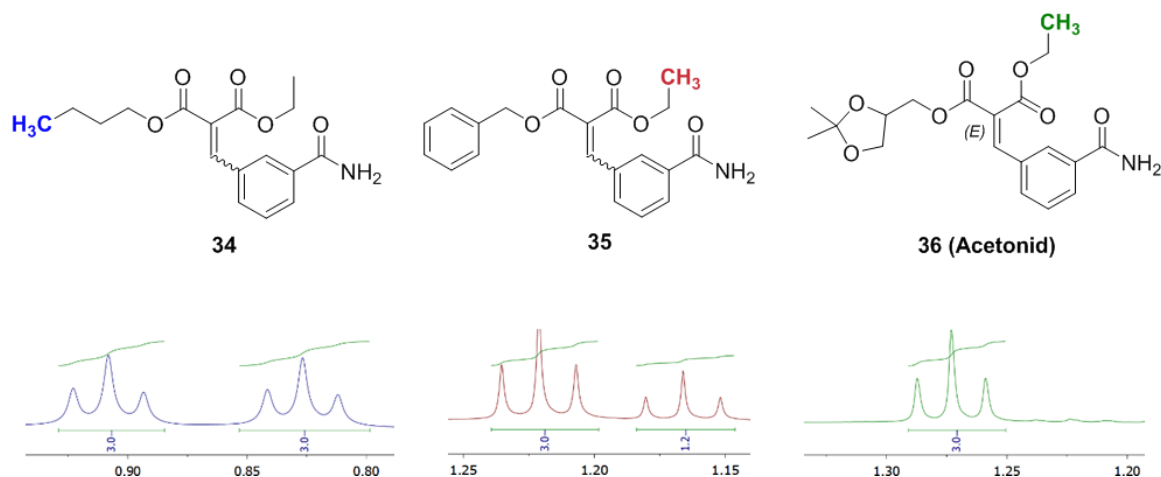


Abb. 27 Auszug der ^1H -NMR-Spektren mit Fokus auf die Methylgruppen. Anhand der Integration isolierter Signale im ^1H -Spektrum lässt sich das Isomerenverhältnis ablesen. Je nach sterischem Anspruch der Substituenten der CH-aziden Verbindung ergaben sich isomerenreine Produkte oder Gemische mit verschiedenen Anteilen der einzelnen Isomere.^[105]

Bei kleineren Alkylsubstituenten wie beispielsweise Ethyl- und Butylrest, verwirklicht im Malonester **34**, der von Sabrina Lechnitz hergestellt wurde, entstehen unter klassischen Knoevenagelbedingungen je 50% des E- und Z-Isomers. Das Verhältnis kann dabei in der Regel von den Integralen isolierter Protonensignale im NMR abgelesen werden. Sind die Substituenten der Malonesterderivate größer, wie im noch geschützten Glycerol-Derivat **36**, entsteht mitunter wieder stereoselektiv in der Regel das thermodynamisch begünstigte E-Isomer. Sowohl sterische Ansprüche, als auch elektronische Abstoßungseffekte zwischen partiell negativ geladenen Sauerstoffen in Carbonylen werden dafür verantwortlich gemacht. Obwohl die Verschiebungen der Alkylreste im NMR auf ein Isomer hinweisen, ist die eindeutige Zuordnung häufig nicht möglich.

Sabrina Lechnitz gelang in den meisten Fällen die Trennung des Isomerengemischs mithilfe von isokratischer HPLC, sodass beide Isomere einzeln auf ihre inhibitorische Aktivität getestet werden konnten. Für die Verbindung **34** konnte gezeigt werden, dass das Z-Isomer mit 19 μM eine höhere Affinität zum Zielprotein aufweist als das E-Isomer mit einem IC_{50} von 33 μM . Da die Substituenten sich in diesem Fall kaum unterscheiden, sind sich die Verbindungen auch in ihrer inhibitorischen Aktivität sehr ähnlich. Bei vielen zugelassenen Arzneistoffen ist nur ein Isomer - das Eutomer - wirksam, das andere – das Distomer – dagegen nicht oder sogar verantwortlich für unerwünschte Arzneimittelwirkungen. Eine exakte Charakterisierung des Gemischs oder eine Trennung der Isomere ist daher für die Beurteilung der Wirkung elementar.^[111]

Da sich die räumliche Struktur der Isomere zum Teil deutlich unterscheidet, wurde vermutet, dass spezifisch für ein Isomer bestimmte Kernspin-Wechselwirkungen, der Nuclear-Overhauser-Effekt, mit dem Benzamid-Gerüst auftreten. Daraufhin wurde versucht, sich dem Problem über zweidimensionale NOESY-Spektren mit Kopplungen durch den Raum, zu nähern. Diese Methode erwies sich bei einigen Malonesterderivaten als erfolgreich, lieferte bei den β -Ketonitril-Derivaten aber leider nur schwach ausgeprägte Signale, die trotz Molekuldynamik-Simulationen keine eindeutige Zuordnung der Isomere zuließen.

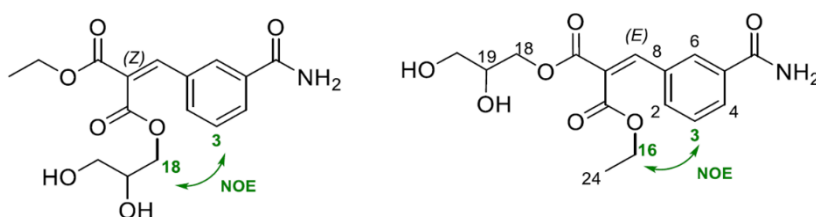
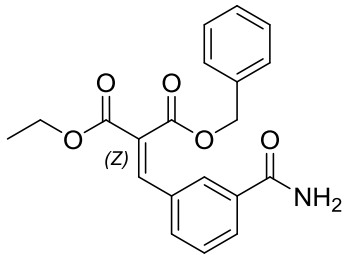
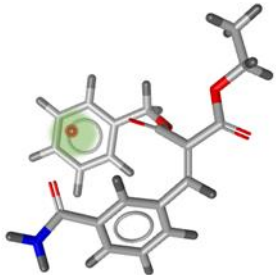
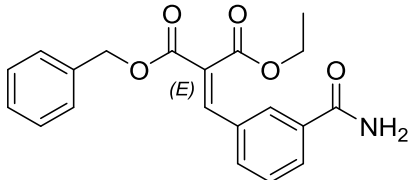
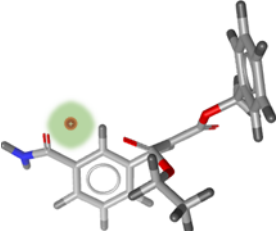


Abb. 28 Einige Isomere geben unterschiedliche Signale für Kernspin-Kopplungen bei räumlicher Nähe, die durch NOESY erfasst werden können.^[105]

Ein neuer Ansatz zur Identifikation der Konformation ergibt sich aus der Ionenmobilitäts-Massenspektrometrie (IM-MS). Bei dieser Methode wandern Ionen durch ein inertes Gas bei angelegtem elektrischem Feld. Die Form und Größe der Ionen bestimmt dabei die Drift-Zeit, wobei kleinere, kompaktere Teilchen schneller sind als große, sperrige Ionen, da sie weniger mit Teilchen des inertes Gases kollidieren. Aus der Zeit, die zur Durchquerung der Messzelle benötigt wird, lässt sich ein Kollisionsquerschnitt (Collision-cross-section, CCS) ableiten, der mit anhand von Modellen erstellten Kollisionsquerschnitten verglichen wird. Räumlich unterschiedlich gebaute Isomere zeigten hier unterschiedliche Kollisionsquerschnitte und konnten mithilfe von Diskrete-Fourier-Transformation-Modellen identifiziert werden.

	Isomer (Na ⁺ -Addukt)	CCS (ber.) [Å ²]	CCS (gem.) [Å ²]
 <p>35 (Z)</p>		123.41	121.35
 <p>35 (E)</p>		130.52	127.99

Tab. 3 Ergebnisse der IM-MS-Messungen von **35**. Das Natrium-Ion (grüne Sphäre) koordiniert mit den Carbonylsauerstoffen des primären Amids und einer Malonester-Gruppe. Angegeben sind der berechnete (ber.) und gemessene (gem.) Kollisionsquerschnitt (CCS). Der berechnete CCS bezieht sich auf die Konformere mit der geringsten Energie.

Für **35** stimmten die gemessenen und berechneten Kollisionsquerschnitte gut überein und erlaubten die Zuordnung der Konformation. Bei Malonester **34** mit sich weniger stark unterscheidenden Ethyl- und Butylsubstituenten war keine eindeutige Identifikation der Isomere möglich, aber IM-MS gab deutliche Hinweise auf die Konformation.

Bei der Charakterisierung von Proteinen ist IM-MS bereits eine etablierte Methode. Ihre Anwendung bei kleinen Molekülen ist häufig beschränkt durch den geringen Unterschied im Kollisionsquerschnitt der Isomere und den Messfehler bei der Bestimmung des CCS von üblicherweise 0.5 – 2%.^[112] Für die Derivate mit Nitrilgruppe lag jeweils nur ein Isomer zur Messung mittels IM-MS vor. Die gemessenen Kollisionsquerschnitte wichen stark von den theoretischen, berechneten Werten ab und ließen keine Zuordnung zu einem Isomer zu.

Letztendlich bleibt die aussagekräftigste Methode zur Bestimmung der Konformation die zeit- und ressourcenaufwändige Kristallisation und Röntgenstrukturanalyse, auf die aus besagten Gründen verzichtet wurde. Die Kenntnis des Bindungsmechanismus und bekannte Kristallstrukturen lieferten bereits ausreichende Informationen zur gezielten Variation der Benzamid-Inhibitoren.

Erwähnenswert ist noch, dass in besonderen Fällen eine Umwandlung solcher Isomere ineinander möglich ist. So konnte gezeigt werden, dass verschiedene Nucleophile wie beispielsweise Triethylamin oder Malonsäuredinitril in basischem Puffer über eine Additions-Eliminierungssequenz zur Isomerisierung von Ethyl-(Z)-2-cyano-3-(2-methoxyphenyl)acrylat zur E-Form führen können.^[108] Die Umwandlung wurde UV-photometrisch verfolgt. Postuliert wurde hier der Angriff des Nucleophils am positiv polarisierten β -Kohlenstoff und der Isomerisierung über ein Carbanion-Zwischenprodukt. Eine Isomerisierung an Sulfhydryl-Gruppen wurde auch für Retinsäure-Derivate beschrieben und könnte auch auf die reversiblen synthetisierten Proteaseinhibitoren übertragen werden.^[113] Nach Angriff des Thiols im aktiven Zentrum der Protease an das Michael-System bildet sich ein sp^3 -hybridisiertes Kohlenstoffzentrum. Nach Einleitung der Rückreaktion durch Abspaltung des aziden Protons in α -Position bestünde die Möglichkeit, dass sich die Substituenten in β -Stellung durch energieminimisierende Anpassung an die Proteinoberfläche so angeordnet haben, dass das gegensätzliche Isomer entsteht. Allerdings konnte ein solches Verhalten nicht über LC/MS-Analytik beobachtet werden. Vermutlich liegen die Verbindungen auch in der Bindetasche schon in ihrer thermodynamisch günstigsten Form vor. Zwar können für viele Inhibitoren Addukte durch den nucleophilen Angriff der schwefelhaltigen Verbindung DTT nachgewiesen werden, doch offensichtlich erfolgt die Abspaltung in der Rückreaktion wieder stereoselektiv.

Struktur-Wirkungsbeziehungen

Der K_D -Wert oder die Dissoziationskonstante beschreibt die Lage des Gleichgewichts zwischen freiem Liganden und Protein und Protein-Ligand-Komplex nach dem Massenwirkungsgesetz. Ist der Ligand ein Inhibitor, wird analog auch die Bezeichnung K_I -Wert verwendet. Der K_D -Wert ist stoffspezifisch und im Gegensatz zum IC_{50} -Wert, also der Konzentration, die zu einer 50%igen Reduktion der Proteaseaktivität führt, methodenunabhängig. Er bietet damit eine theoretische Basis für den Vergleich von Affinitäten, die unter unterschiedlichen Bedingungen ermittelt wurden.

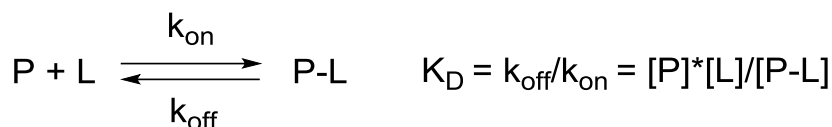


Abb. 29 Der K_D -Wert ergibt sich aus dem Massenwirkungsgesetz und besitzt die Einheit [M].

In dieser Arbeit werden IC_{50} -Werte zum Vergleich der Affinitäten der Inhibitoren herangezogen, da für alle Verbindungen dieselben Messbedingungen eingehalten wurden. Die IC_{50} -Werte entstammen dem FRET-Assay, der mit 100 μM DTT zur Reaktivierung der Protease und ohne Inkubationszeit durchgeführt wurde. An dieser Stelle soll kurz auf die IC_{50} -Wert-Bestimmung mittels FRET-Assay eingegangen werden.

Gemessen wurde die relative Fluoreszenz der Assaylösung bei 538 nm nach Anregung bei 355 nm zu verschiedenen Zeitpunkten, die mit dem Ausmaß gespaltenen FRET-Substratpeptids korreliert. Bei Inkubation der Protease mit einem Inhibitor, wurde die Spaltung des Substrats reduziert und die Fluoreszenz nahm weniger stark zu. Die Steigungen der relativen Fluoreszenz über die Zeit bei verschiedenen Inhibitorkonzentrationen wurden dann auf eine Positivkontrolle ohne Inhibitor normalisiert. Eine halblogarithmische Auftragung der prozentualen Aktivitäten gegen die Inhibitorkonzentration ergab eine typische sigmoidale Kurve dessen Wendepunkt den IC_{50} -Wert darstellt und über nicht-lineare Regression ermittelt wurde. Dabei wurde auch der Hill-Koeffizient bestimmt, der die Steilheit und Abweichung von einer idealen sigmoidalen Kurve beschreibt.

$$\frac{v_i}{v_0} = \frac{1}{1 + ([I]/IC_{50})^h}$$

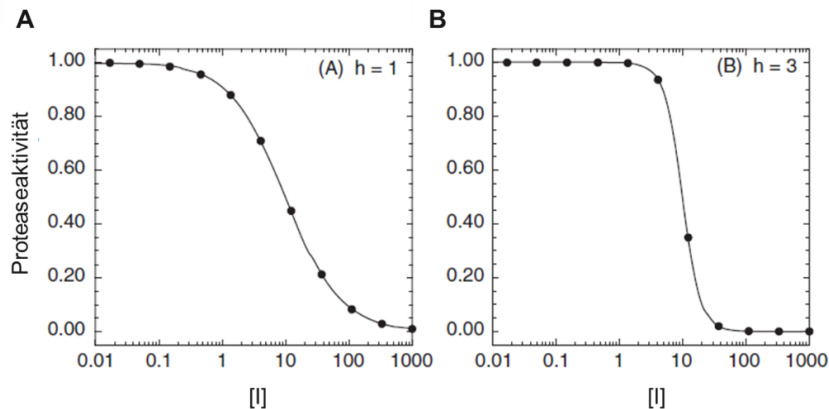


Abb. 30 Verlauf der mithilfe der modifizierten Konzentrations-Wirkungs-Gleichung berechneten sigmoidalen Kurven mit dem Hill-Koeffizienten 1 (**A**) und 3 (**B**). Adaptiert nach.^[176]

In der modifizierten Konzentrations-Wirkungs-Gleichung wird der Zusammenhang zwischen Affinität, InhibitorKonzentration $[I]$ und den Reaktionsgeschwindigkeiten v unter Berücksichtigung des Hill-Koeffizienten h hergestellt. v_0 bezieht sich dabei auf die Reaktionsgeschwindigkeit ohne Inhibitor.

Der Hill-Koeffizient kann von 1 abweichen, wenn beispielsweise Stöchiometrien ungleich 1:1 bestehen. Für niedermolekulare, kompetitive Inhibitoren ist das aber selten der Fall. Häufiger kommt es vor, dass bei $h > 1$ das Zielprotein bei höheren InhibitorKonzentrationen denaturiert und präzipitiert oder das irreversible oder festbindende Inhibitoren vorliegen. Niedrigere Hill-Koeffizienten resultieren mitunter aus der Aggregation der InhibitorMoleküle durch Unlöslichkeit im wässrigen Puffersystem.

Voraussetzung für eine zuverlässige Bestimmung der Affinität ist, dass die Inkubationszeit so gewählt wird, dass sich vor der Messung ein Gleichgewicht zwischen freiem Inhibitor und Protease und Protease-Inhibitor-Komplex eingestellt hat. Ansonsten führt das zu einer Unterbewertung der Affinität, denn die Konzentration an Protein-Inhibitor-Komplex steigt noch an. Bei allen hier untersuchten Inhibitoren wurde eine schnelle Gleichgewichtseinstellung mit hoher Geschwindigkeitskonstante für die Additionsreaktion an das Protein k_{on} beobachtet. Eine Inkubationszeit von einer halben Minute erwies sich hier als ausreichend.

Zwar ist die Fluoreszenzmessung eine sehr empfindliche Methode, dennoch muss das Substrat in ausreichender Konzentration eingesetzt werden um bei seiner Spaltung ein auswertbares Signal zu erzeugen. Idealerweise startet die Messung bei einer Substratkonzentration, die dem K_m -Wert, der Michaelis-Menten-Konstante, entspricht. Das ist die Konzentration, bei der die Umsatzgeschwindigkeit des Enzyms halbmaximal ist. Vorteil ist, dass so die Effekte auf kompetitive und unkompetitive Inhibitoren etwa gleich stark ausfallen und zu Beginn der Charakterisierung der Inhibitoren der Bindungsmodus häufig noch ungeklärt ist. In dieser Arbeit wird angenommen, dass es sich um kompetitive Inhibitoren handelt. Hohe Substratkonzentrationen würden den reversiblen Inhibitor aus dem aktiven Zentrum verdrängen und die Affinität geringer erscheinen lassen. Von Nachteil ist ebenfalls der hohe Verbrauch an Peptidsubstrat und die hohe Umsatzgeschwindigkeit der Protease. Zur Erfassung der Kinetik sollte die Substratkonzentration und die Umsatzgeschwindigkeit über etwa 10 bis 30 Minuten konstant bleiben, andernfalls flachen die Kurven durch Substratverarmung und Abnahme

der Fluoreszenz über die Zeit ab. Das ist bei hohen Substratkonzentrationen nicht unbedingt gegeben. Hinzu kommt, dass eine hohe Konzentration an gespaltenem Peptid zu einer hohen Konzentration von Quencher-Peptidbruchstücken in der Lösung führt, die die vom Donor-Peptidbruchstücke emittierte Fluoreszenz über Strahlungsenergie aufnehmen können und das Messsignal abschwächen. Daher wurde entschieden, die Messungen bei sehr niedrigen Substratkonzentrationen von etwa 1/40 des K_m -Wertes durchzuführen. Gemäß der Cheng-Prusoff-Gleichung nähert sich der ermittelte IC_{50} -Wert damit dem K_D -Wert an.

Aldehyde

Ausgangspunkt für die Synthese der Benzamid-Derivate war das Aldehydfragment **1** aus der Arbeit von Reich et al.. Es ließ sich einfach durch Nitrilverkochung mit konzentrierter Schwefelsäure aus 3-Formylbenzonitril herstellen.^[74] Aldehyde selbst stellen kovalent reversible Inhibitoren dar, die Nukleophile wie den Schwefel des Cysteins im aktiven Zentrum der 3C^{Pro} addieren und halbacetalische Strukturen bilden. Durch Anlagerung von Wasser zerfallen Acetale wieder in ihre Ausgangsprodukte. Durch die Verankerung des Moleküls in der S1-Tasche über Wasserstoffbrückenbindungen zu Thr₁₄₂ kam es trotz schneller Reversibilität zu einer moderaten Hemmung der Protease mit IC_{50} -Werten von 48 μ M bzw. 14 μ M für das bromierte Formylbenzamid **2**. Unterstützt wurde die Wichtigkeit der Verankerung in der S1-Tasche durch nicht vorhandene Aktivität von Benzaldehyd **3**, der durch fehlende Bindung im aktiven Zentrum rasch von der Protease abdiffundiert. Auch bei anderen Verbindungen, die die für ausreichende Affinität der kleinen Moleküle elementaren Wasserstoffbrückenbindungen nicht oder nur abgeschwächt ausbilden konnten, fehlte die inhibitorische Aktivität.

Die Bromierung in meta-Stellung bei **2** bewirkte eine etwa dreifache Erhöhung der Affinität verglichen mit der unsubstituierten Verbindung. Neben elektrostatischen Anziehungskräften durch die leicht polarisierte Halogen-Kohlenstoff-Bindung wurden auch Halogen-Wasserstoff-Wechselwirkungen in der Literatur beschrieben.^[114] Doch im Modelling wurde ersichtlich, dass das Brom von der Proteinoberfläche weg zeigt und wahrscheinlich nicht interagiert. Vorausgesetzt die Docking-Pose entsprach den realen Verhältnissen in Lösung, musste der Unterschied in der Inhibition in der Veränderung der elektronischen Verhältnisse begründet sein. Der negative induktive Effekt des Halogens führte vermutlich zu einer Verminderung der Elektronendichte am Carbonyl-Kohlenstoff des Aldehydes und machte ihn damit besser angreifbar für Nukleophile. Dieses Phänomen der Aktivierung des Aldehyds spielt auch in der Fragmentligation eine Rolle und führte zur Entwicklung der heterozyklischen Derivate.

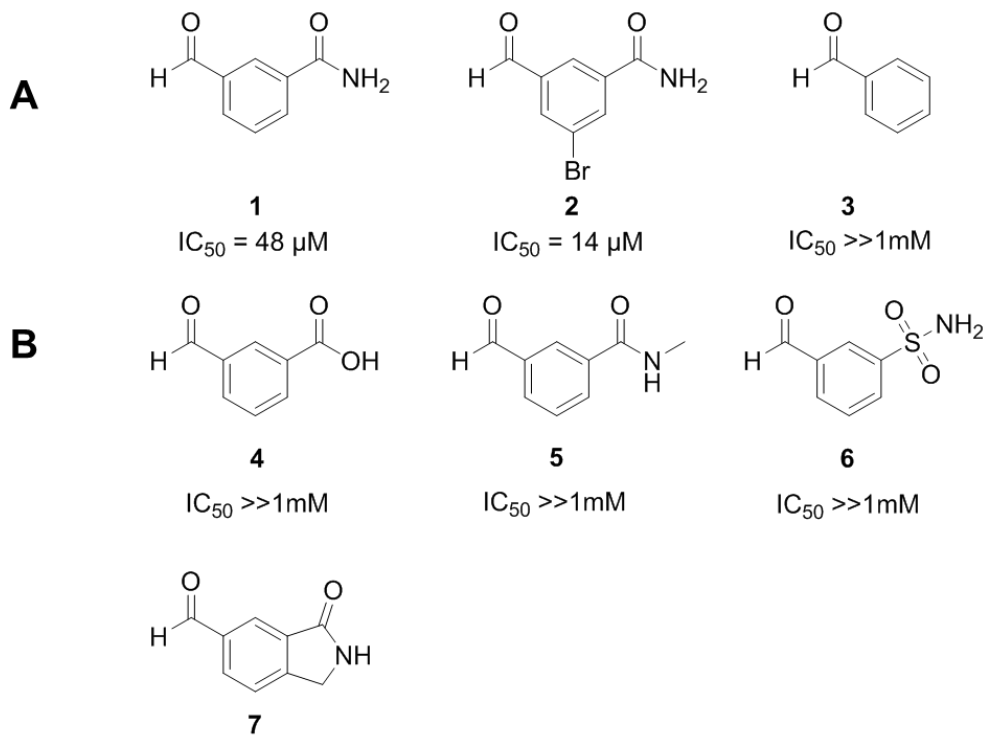


Abb. 32 **A** Aldehydderivate und **B** Modifikationen an der primären Benzamid-Gruppe verdeutlichen die Notwendigkeit des Vorliegens eines primären Amids zur Verankerung der fragmentartigen Inhibitoren in der S1-Tasche für eine ausreichende Wirksamkeit.

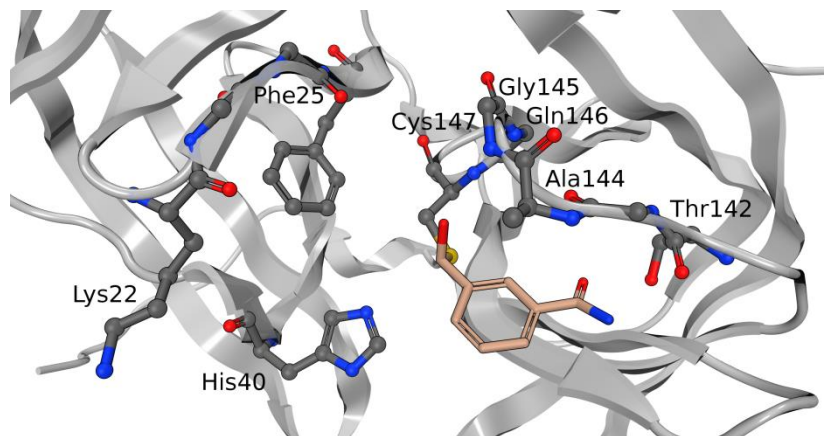


Abb. 31 Kovalentes Docking von 1. Elementar für die Entwicklung potenter Inhibitoren sind Wasserstoffbrückenbindungen des primären Amids mit Thr₁₄₂ und ein optimaler Abstand von etwa vier Kohlenstoffbindungsängen zur elektrophilen Position, die vom Thiol (gelb) angegriffen werden kann.

Modifikationen am primären Amid wie die Spaltung zur Säure oder Alkylierung führten zum Verlust der Wirksamkeit. 3-Formylbenzoesäure **4** liegt nach Henderson-Hasselbalch-Gleichung bei physiologischem pH von 7.4 bzw. im Assaypuffer von pH 8 fast ausschließlich deprotoniert vor und besitzt nur noch die Eigenschaft als Wasserstoffbrückenakzeptor. In der Nähe des aktiven Zentrums befinden sich auch keine komplementären basischen Aminosäuren, abgesehen von His₄₀ der katalytischen Triade, die elektrostatische Interaktionen ermöglichen würden. Die zusätzliche Methylgruppe an **5** kann die Ausbildung der Wasserstoffbrückenbindungen durch sterische Hinderung erschweren und die fehlende inhibitorische Wirkung erklären. Allerdings erwies sich ein Tripeptid mit um einen Kohlenstoff verkürztem Dimethylamid-Substituent um ein Vielfaches wirksamer gegenüber der verwandten HRV3C^{Pro} als das unsubstituierte Amid.^[42] Die genaue Ausrichtung der Methylgruppen hat demnach einen großen Einfluss auf die Toleranz der Protease. Die cis-Form, bei der die Methylgruppe vom Carbonylsauerstoff weiter entfernt ist und das Proton am Stickstoff weniger stark abschirmt, müsste theoretisch aktiv sein. Bestätigen ließe sich das, wenn die Methylgruppe durch Ringschluss wie im Formyloxoisindolin **7** in dieser Position fixiert würde. Eine ähnliche Verbindung mit einem Bromomethylketon als Elektrophil tauchte bereits bei Maugeri et al. auf und zeigt gute inhibitorische Aktivität.^[75] Der Ansatz wurde trotzdem nicht weiterverfolgt, da die unsubstituierten primären Amide höhere Affinität zeigten.

Die elementaren Wasserstoffbrückenbindungen zu Thr₁₄₂ könnten prinzipiell auch durch andere Substituenten wie Sulfonamide ausgebildet werden. 3-Formylsulfonamid **6** sollte erwartungsgemäß mindestens gleichwertige Aktivität zum Formylbenzamid zeigen, denn der elektronenziehende und damit der Aldehyd-aktivierende Effekt dürfte etwas stärker ausgeprägt sein. Die schlechte Affinität lässt sich vermutlich auf die Größe und nicht-planare Geometrie der Sulfonamid-Gruppe zurückführen, die schlichtweg nicht in die S1-Tasche passt. Zudem führt die fehlende Resonanzstabilisierung zu einer geringeren negativen Polarisation des Sauerstoffs und damit einer schwächer ausgebildeten Eigenschaft als Wasserstoffbrückenakzeptor. Der Austausch der Amidgruppe zu einem Sulfon wurde in einem Tripeptidaldehyd mit submikromolarer Affinität von den Lilly Research Laboratories vollzogen.^[115-116] Der Grund für die schlechte Übertragbarkeit der Ergebnisse könnte an den marginalen Unterschieden in der Beschaffenheit der aktiven Tasche der enteroviralen Proteasen liegen. Daneben bieten peptidische Strukturen weit mehr potentielle Interaktionen, sodass die Ausbildung einer zusätzlichen Wasserstoffbrückenbindung nicht so sehr ins Gewicht fällt, wie bei niedermolekularen Strukturen. Abschließend soll festgehalten werden, dass das freie primäre Amid der Substituent der Wahl für Inhibitoren der EV D68 3C^{Pro} ist.

Aldehydfunktionen selbst kommen praktisch nicht in zugelassenen Arzneistoffen vor und gehören zu den unerwünschten Substituenten, da sie reaktive elektrophile Gruppen darstellen, die kovalent mit Proteinen und Nucleophilen wie Cysteinen, Imidazol- und Aminogruppen reagieren und damit off-target-Effekte auslösen können.^[117] Die Bindung an körpereigene Strukturen kann die Funktion verschiedener Proteine stören und so zytotoxische Effekte verursachen. Zu den wenigen zugelassenen Arzneistoffen mit Aldehydfunktion gehören beispielsweise Leucovorin (5-Formyltetrahydrofolsäure) und die Naturstoffe Streptomycin und Protocatechualdehyd.^[118] Trotz dieser theoretischen

Bedenken zeigt sich 3-Formylbenzamid **1** im zellbasierten Assay moderat wirksam und nicht toxisch. Problematisch bleibt dennoch die metabolische Labilität von Aldehyden.

Cyanessigsäureester

Mit dem Ziel nicht-toxische, biologisch wirksame Inhibitoren zu entwickeln, erfolgte der Austausch der elektrophilen Aldehydkopfgruppe gegen α,β -ungesättigte Michael-Akzeptoren.

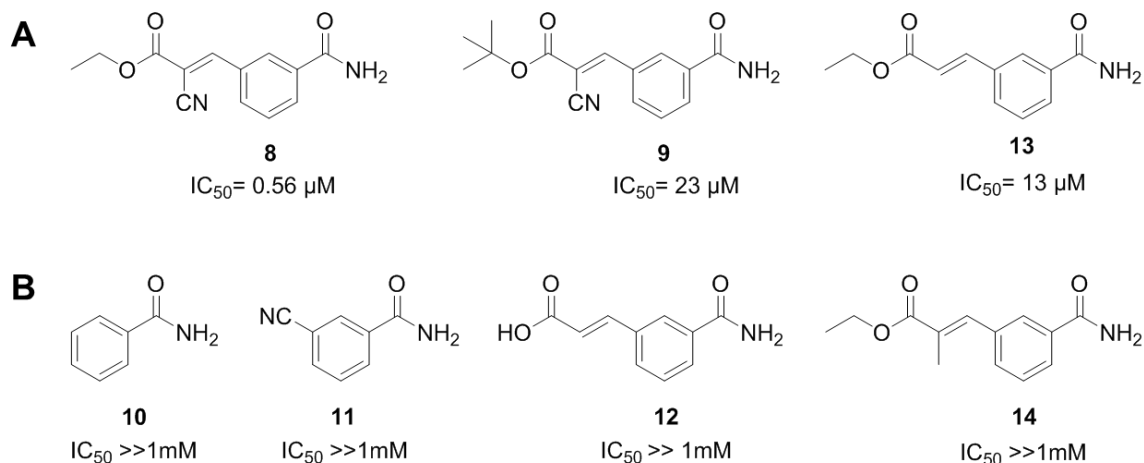


Abb. 33 A Wirksame Cyanessigsäureester-Derivate **B** Modifikationen der elektrophilen Gruppe. Ein geeignetes Elektrophil ist notwendig, um eine kovalente Bindung des Thiois zu gewährleisten. Die Verringerung des Elektronenzugs durch Spaltung des Esters zur Carbonsäure oder Ersatz der Nitrilfunktion durch eine Methylgruppe eliminiert die Affinität.

Cyanessigsäureester **9** besitzt einen raumfüllenden tert-Butyl-Ester, der ausgeprägtere lipophile Kontakte mit der S1'-Tasche bzw. zu Phe₁₂₅ und Ala₁₄₄ ausbilden könnte. In Substraten der EV D68 3C^{Pro} wird diese Tasche in der Regel durch die kleinste Aminosäure Glycin ausgefüllt. Die verglichen mit dem Ethylester **8** schlechtere Aktivität liegt vermutlich darin begründet, dass der tert-butyl-Rest sich nur so positionieren kann, dass der Michael-Akzeptor etwas weiter entfernt für das Cystein im aktiven Zentrum liegt. Da sich auch bei peptidischen Inhibitoren der Ethyl-Rest als vorteilhaft erwiesen hat, wurde auf die Synthese größerer Ester verzichtet. Dass die Hydrolyseanfälligkeit der Ester Einfluss auf die gemessene Aktivität im FRET-Assay hat, ist unwahrscheinlich, denn die recht kurze Messung wird im stabilisierenden Puffer bei pH 8 durchgeführt. Tatsächlich kommen, wenn auch selten, in der Natur stabile tert-Butyl-Ester vor.^[19]

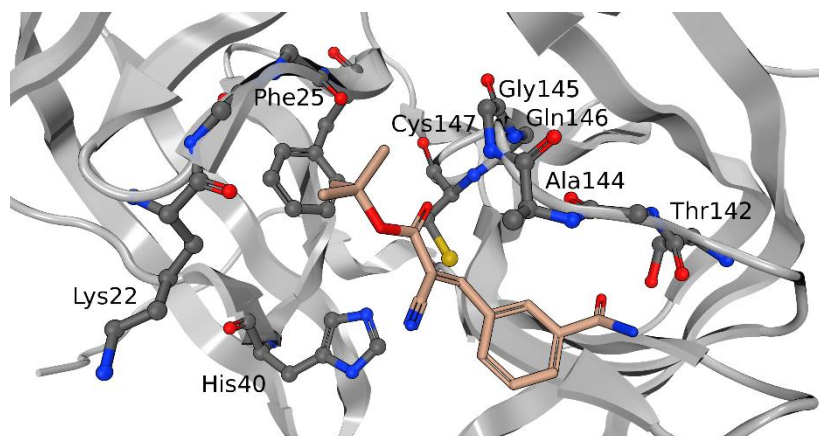


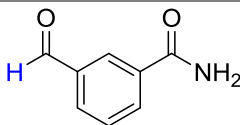
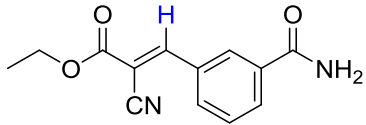
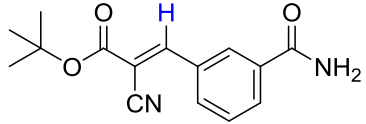
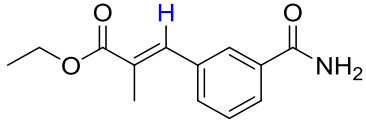
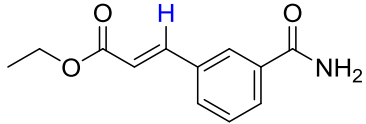
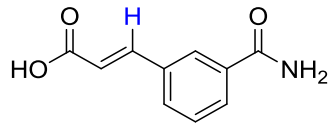
Abb. 34 Docking von **9**. Der tert-Butyl-Rest könnte lipophile Kontakte in der S1'-Tasche ausbilden, vergrößert aber möglicherweise den Abstand zum Thiol.

Um einen potenten niedermolekularen Inhibitor zu erhalten, ist es neben der Verankerung in der S1-Tasche durch das primäre Amid notwendig, eine geeignete elektrophile Gruppe einzufügen, die mit dem Cystein des aktiven Zentrums reagieren kann. Benzamid **10** selbst und das Nitril-Derivat **11** zeigten keine Aktivität obwohl Nitrilgruppen durchaus als Elektrophile eingesetzt wurden, um mit Cysteinproteasen wie Cathepsinen zum reversiblen Thioimidat zu reagieren.^[120]

Erstaunlicherweise eliminierte der Austausch der elektronenziehenden Nitril-Gruppe bzw. des Protons in α -Position gegen eine Methylgruppe mit schwachem +I-Effekt bei **14** die Aktivität völlig. Durch die Synthese über den Wittig-Horner-Mechanismus ist davon auszugehen, dass das abgebildete E-Produkt entstanden ist. Eine sterische Hinderung durch die Methylgruppe ist nicht auszuschließen, wenn man die deutliche Verminderung der Affinität im Vergleich zu **13** bedenkt, dass ebenfalls keinen elektronenziehenden Substituenten trägt.

Die Spaltung des Esters zur Carbonsäure in **12** eliminiert die Affinität zum Zielprotein ebenfalls. Im Assaypuffer bei pH 8 liegt die Säure als Anion vor, dessen negative Ladung sich ebenfalls über die Carbonylfunktion stabilisiert. Der Elektronenzug auf die β -Position des Michael-Akzeptors ist leicht vermindert. Hinzu kommen vermutlich elektrostatische Abstoßungen bei Annäherung an das aktive Zentrum.

Ein Wirkverlust der Derivate kann zum Teil auf die deutliche Verminderung des Elektronenzugs auf die elektrophile β -Position des Michael-Akzeptors zurückgeführt werden. Erkennbar wird das im Vergleich der chemischen Verschiebungen der Signale im ^1H -Spektrum als Surrogatparameter der Elektrophilie dieser Position.

	¹ H – Verschiebung [ppm]	IC ₅₀
 1	10.06	48 μM
 8	8.44	0.56 μM
 9	8.36	23 μM
 14	7.64	>> 1mM
 13	7.68	13 μM
 12	7.61	>> 1mM

Tab. 4 Vergleich der chemischen Verschiebungen der Signale im ¹H-Spektrum in DMSO-*d*₆ als Surrogatparameter der Elektrophilie der β-Position des Michael-Akzeptors. Die betrachteten Atome sind in blau hervorgehoben.

Hervorzuheben ist hier, dass der Ethylester **13** trotz verringerten Elektronenzugs auf die β-Position einen moderaten Inhibitor der EV D68 3C^{Pro} darstellt.

Cyanessigsäureamide

Ein möglicher Nachteil in der Anwendung von Michael-Akzeptor-Estern liegt in ihrer Labilität und dem Abbau durch körpereigene Carboxylesterasen.^[121] Deutlich stabiler zeigen sich dahingehend Carbonsäureamide, die als Derivate synthetisiert und getestet wurden.

Im Vergleich zum Cyanessigsäureethylester **8** waren alle getesteten Cyanessigsäureamide weniger aktiv. Grundsätzlich könnte das durch den geringeren Elektronenzug durch Resonanzstabilisierung des freien Elektronenpaars des Amid-Stickstoffs und die damit verminderten Aktivierung des Elektrophils begründet werden. Betrachtet man die chemischen Verschiebungen der Protonen in β -Position, rangieren die Signale im ^1H -Spektrum zwischen 8.28 und 8.21 ppm und liegen damit etwas unter den Cyanessigsäureestern mit 8.44 bis 8.36 ppm.

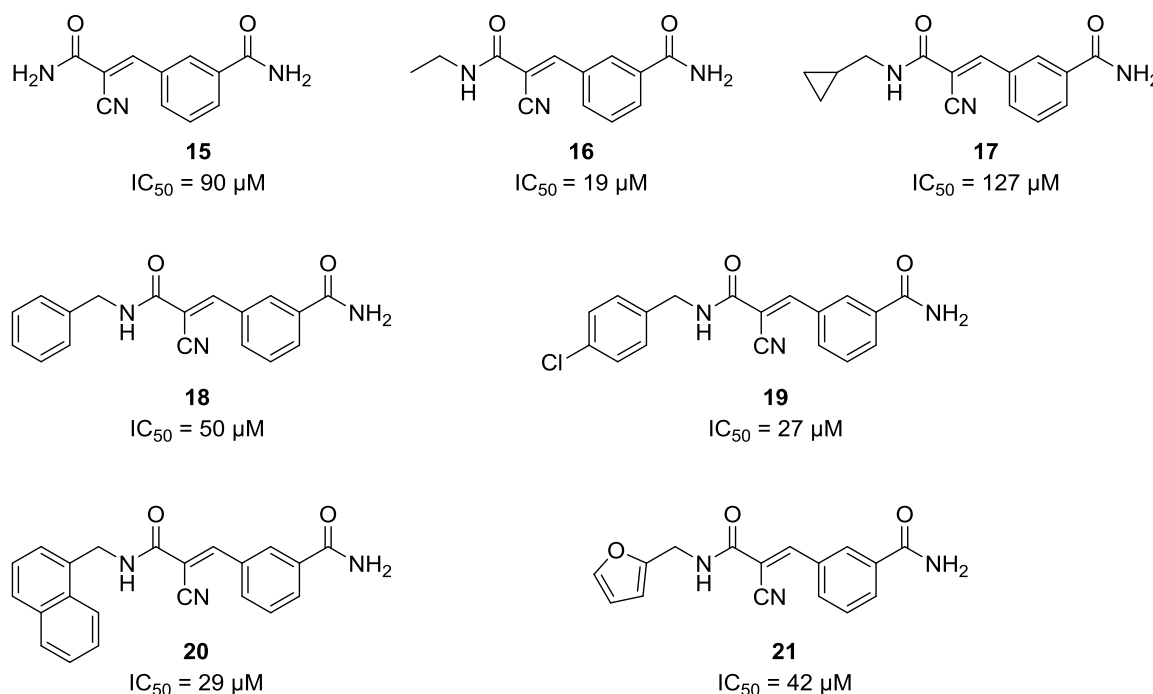


Abb. 35 Cyanessigsäureamid-Derivate und ihre im FRET-Assay ermittelten IC₅₀-Werte.

Obwohl die chemischen Verschiebungen der Cyanessigsäureamide sehr gleichförmig sind, unterscheiden sich die Affinitäten zum Zielenzym deutlich. Das einfachste primäre Amid **15** ist ein moderater Inhibitor mit einem IC₅₀-Wert von 90 μM. Möglich wäre, dass der Inhibitor eine andere Orientierung im aktiven Zentrum einnimmt und mit dem Amid der aliphatischen Seitenkette Bindungen zu Thr₁₄₂ ausbildet. Dann würde **15** einen nicht-kovalenten, reversiblen Inhibitor darstellen. In beiden Fällen würde allerdings die S1'-Tasche nicht besetzt, was die geringere Affinität erklärt. Ethylamid **16** dagegen füllt die S1'-Tasche optimal aus. Größere Reste wie Isopropylmethyl, sowie Benzyl und Furyl passen nicht gut hinein und werden etwas rausgedrängt. Mit zunehmender Größe und

Lipophilie wie beim Naphthyl-Derivat **20** ermöglichen sich aber neue lipophile Kontakte zu Ala₁₄₄, die erklären, warum die Affinität wieder ansteigt.

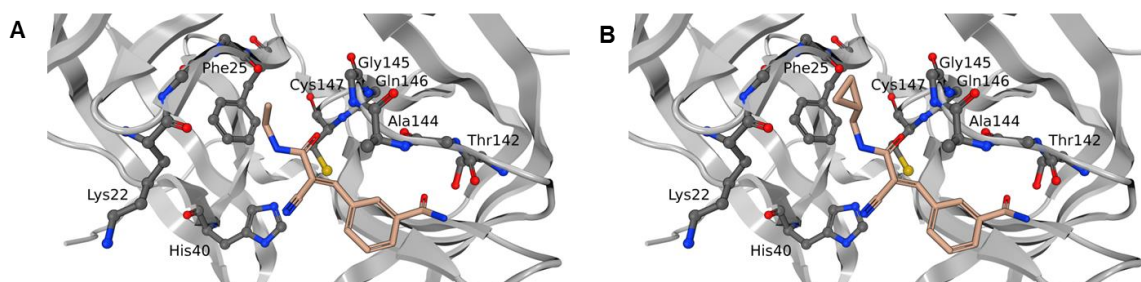
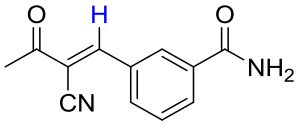
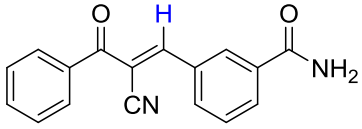
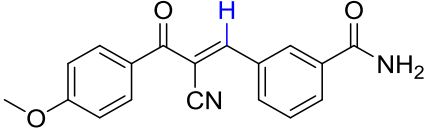
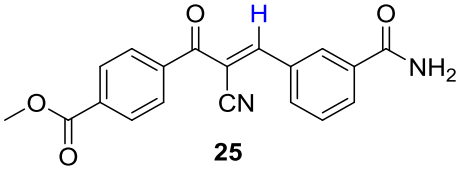
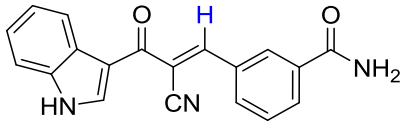


Abb. 36 Docking von **16** und **17**. Die Besetzung der S1'-Tasche durch kleine lipophile Reste erhöht die Affinität zum Zielprotein. Bei zunehmender Größe werden die Inhibitoren aus der Tasche gedrängt. Größere aromatische Reste nehmen vermutlich einen anderen Bindungsmodus ein und ermöglichen lipophile Wechselwirkungen mit Ala₁₄₄.

Neben der geringeren Aktivität erwiesen sich einige Verbindungen zudem als schlecht löslich im wässrigen Assaypuffer. Auf weitere Derivatisierungen wurde deshalb verzichtet.

β-Ketonitrile

Der Einsatz von α,β -ungesättigten Ketonen bietet eine Möglichkeit den starken Elektronenzug auf die β -Position zu erhalten und die metabolische Stabilität zu erhöhen. Die Keton-Derivate erwiesen sich als äußerst aktive Verbindungen, was wahrscheinlich in erster Linie auf ihre hohe Reaktivität zurückzuführen ist. Bezüglich der chemischen Verschiebung im NMR-Spektrum siedeln sich die β -Ketonitril-Derivate zwischen den Estern und den Amiden an.

	¹ H – Verschiebung [ppm]	IC ₅₀
 <p style="text-align: center;">22</p>	8.46	0.56 μM
 <p style="text-align: center;">23</p>	8.18	1.5 μM
 <p style="text-align: center;">24</p>	8.14	2 μM
 <p style="text-align: center;">25</p>	8.19	27 μM
 <p style="text-align: center;">26</p>	8.28	0.45 μM

Tab. 5 β-Ketonitril-Derivate mit den chemischen Verschiebungen der Signale im ¹H-Spektrum in DMSO-*d*₆ als Surrogatparameter der Elektrophilie der β-Position des Michael-Akzeptors. Die betrachteten Atome sind in blau hervorgehoben.

Das Methylketon **22** weist in der Reihe die höchste Elektrophilie auf und zeigt daher eine Inhibition im submikromolaren Bereich, obwohl das Molekül laut Docking zu klein für Interaktionen in der S1'-Bindetasche ist. Bei **23** zeigt sich ein vergleichbarer Effekt wie bei den Cyanessigsäureamiden. Der Phenyl-Rest ist zu groß für die S1'-Bindetasche und knickt ab, kann damit aber lipophile Kontakte mit Ala₁₄₄ eingehen. Warum sich das p-Methoxyketon **24** und das p-Methylacetat-Derivat **25** in ihrer Affinität zu EV D68 3C^{Pro} um den Faktor 10 unterscheiden, ist auf den ersten Blick nicht ersichtlich. Im Docking zeigen Substituenten in para-Position von der Proteinoberfläche weg. Zwar ist die Methoxy-Gruppe ein elektronenschiebender Rest, während der Acyl-Rest –I- und –E-Effekte aufweist, doch im NMR wird deutlich, dass kein signifikanter Einfluss auf das Michael-System gegeben ist. Bei beiden Verbindungen beträgt der Hill-Slope etwa 1, sodass unspezifische Proteininteraktionen wie Präzipitation eher ausgeschlossen werden können. In verschiedenen MS-Experimenten in Puffer zeigte sich der Methylester stabil. Möglicherweise nimmt **25** einen anderen Bindungsmodus ein als

erwartet. Der Indol-Substituent von **26** kann neben lipophilen Kontakten zu Ala₁₄₄ noch eine zusätzliche Wasserstoffbrückenbindung zum Proteinrückgrat von Lys₂₂ ausbilden, was die Affinität wieder deutlich erhöht.

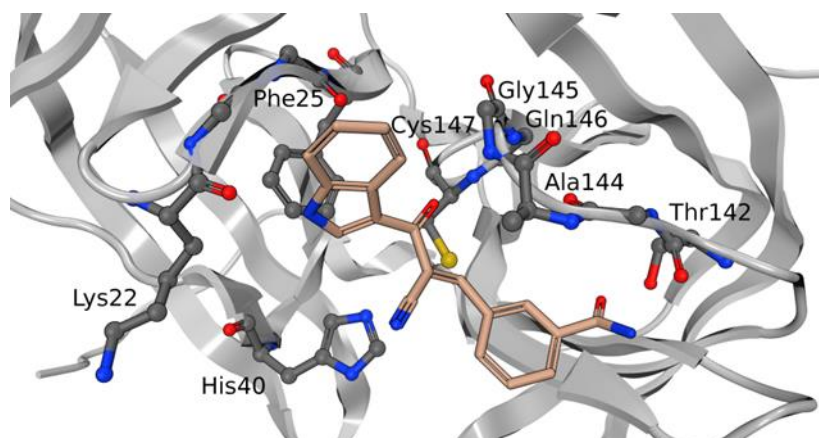


Abb. 37 Docking von **26**. Der Indolsubstituent ermöglicht eine zusätzliche Wasserstoffbrückenbindung zum Carbonylsauerstoff des Proteinrückgrats von Lys₂₂.

Sulfon- und Thioamidderivate

Auf der Suche nach biokompatiblen Substituenten stößt man auf Sulfone als durchaus gängige Gruppen in Arzneistoffen wie in Eletriptan gegen Migräne oder dem inzwischen vom Markt genommenen Chlormezanon. Der Großteil zugelassener, schwefelhaltiger Arzneistoffe enthält Sulfonamid-Substrukturen, wie beispielsweise in Diuretika und Antibiotika.^[122]

Die biochemische Aktivität hängt zu einem großen Teil von der intrinschen Reaktivität der Moleküle selbst ab. Der Ersatz von Nitril durch Sulfon erhöht die Elektrophilie deutlich und bietet daher Potential für hochaktive Inhibitoren. Ernüchternd dagegen sind die Ergebnisse von Agouron Pharmaceuticals, die α,β -ungesättigte Methyl- und Phenylsulfone in Tripeptide inkorporiert hatten. Die Sulfonderivate zeigten keine antivirale Wirkung.^[123]

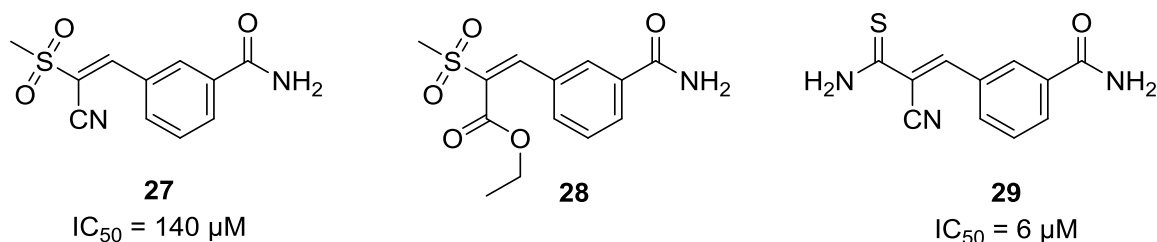


Abb. 38 Sulfon- und Thioamidderivate und ihre im FRET-Assay ermittelten IC_{50} -Werte. **27** wurde von Marisa Tügend synthetisiert.

Dass die theoretischen Überlegungen zur erhöhten Elektrophilie stimmen, verdeutlicht die starke chemische Verschiebung des β -Protons der Verbindung **27** von 8.37 ppm im 1H -NMR. Ein deutlicher Nachteil dieser Reaktivität ist die spontane Michael-Addition diverser Nucleophile, darunter auch Wasser, was die Retro-Knoevenagel-Reaktion einleitet. Die Anlagerung von Wasser als schwachem Nucleophil an Michael-Systeme geschieht üblicherweise nur basen- oder enzymkatalysiert.^[124] Die Instabilität dieser Verbindungen resultierte leider in Gemischen, die im FRET-Assay getestet wurden. Die Addition an diverse Nucleophile wie DTT und exponierte Aminosäurereste der Protease führten sicher ebenfalls zu den schlechten IC_{50} -Werten, denn laut Docking sollten die Strukturen ins aktive Zentrum passen und sogar das Oxoanionloch besetzen können.

Die Reaktion von Methylsulfonylacetat mit dem Formylbenzamid **1** lieferte unter anderem das Knoevenagelprodukt **28**. Die Aufreinigung des Produkts mithilfe chromatografischer Methoden an Normal- und C18-Phasen erwies sich als schwierig. Die massenspektrometrischen Analysen deuten darauf hin, dass außerdem ein zweites Methylsulfonylacetat an den Michael-Akzeptor gebunden hat. Ferner sind Addukte mit Formiat sichtbar. Im NMR fehlt der Peak des Protons in β -Position des Michael-Akzeptors und es gibt Hinweise auf ein Addukt mit dem Restwasser des deuterierten Lösungsmittels. Dennoch wurde das Reaktionsgemisch im FRET-Assay getestet und erzielte einen IC_{50} von 135 μM . Entweder handelt es sich um einen sehr potenten Inhibitor, der auch in Spuren wirksam ist oder eine äußerst reaktive Verbindung, die mit diversen Nucleophilen reversible Bindungen eingehen kann. Ein Hillslope von 3 deutet allerdings auf Abweichungen hin. Es könnte ein Hinweis auf multiple Bindungsstellen oder ein unspezifischer Mechanismus wie die Denaturierung des Proteins sein. Denkbar ist auch, dass die Substanz ab einer bestimmten Konzentrationsschwelle aggregiert und Licht an den Partikeln gestreut wird, sodass eine Inhibition im FRET-Assay vorgetäuscht wird. Mit bloßem Auge war jedoch keine Trübung der Assaylösung erkennbar.

Die Reaktion von 2-Phenylsulfonacetonitril und 3-Formylbenzamid **1** resultierte ebenfalls in einem Gemisch, das sich nicht aufreinigen ließ. Bei der Kombination von **1** und Nitromethylsulfonylbenzol entsteht ebenfalls ein Knoevenagelprodukt, das durch den Eintritt der Retroreaktion nicht als Reinstoff isoliert werden konnte.

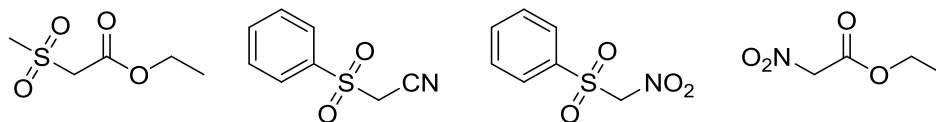


Abb. 39 Die Knoevenagelprodukte der hier gezeigten CH-aziden Verbindungen waren zu instabil, um sie in Reinform zu isolieren.

Da die Sulfonderivate als zu reaktiv eingeschätzt wurden, um sie sinnvoll als stabile Leitstrukturen weiterzuentwickeln, wurde auf weitere Derivatisierungen verzichtet und dieser Ansatz verworfen.

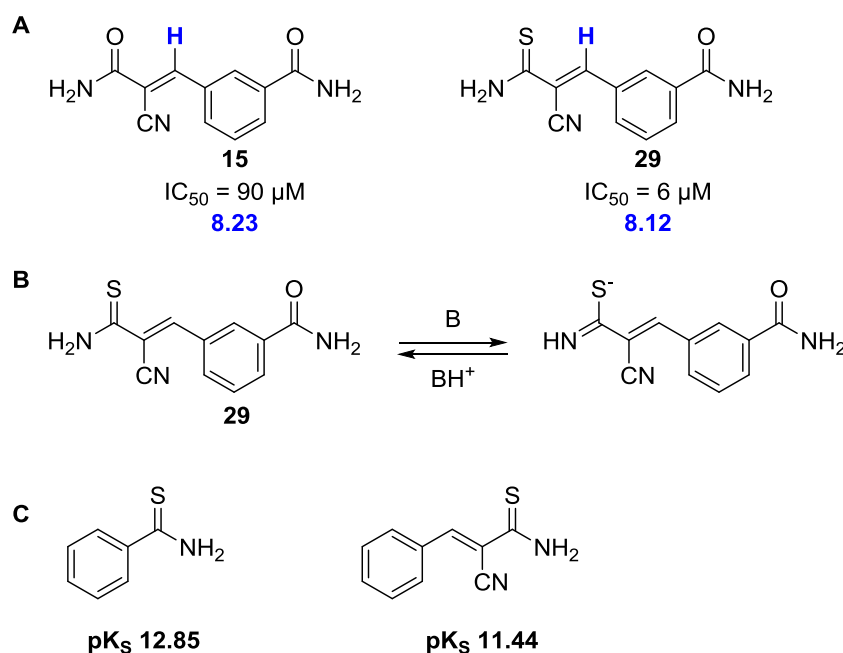


Abb. 40 A Vergleich der inhibitorischen Aktivitäten des Thioamids und des Carbonsäureamids. In blau die chemische Verschiebung im 1H -NMR als Maß für den Elektronenzug auf diese Position. **B** Thioamide reagieren NH-acide. Die negative Ladung sitzt bevorzugt am Schwefel. **C** Je nach Substitutionsmuster liegen die pK_S -Werte um 11-12.

Das Thioamidderivat **29** ist mit einem IC_{50} von $6 \mu M$ ein guter Inhibitor der EV D68 3C^{Pro} und damit 15fach affiner als das primäre Carbonsäureamid **15**. In der Literatur wird der pK_S -Wert der Thiobenzamide mit etwa 13 angegeben und liegt damit 2-3 Einheiten unter den Amid-Derivaten. Thioacrylamide mit elektronenziehendem Substituenten werden mit einem pK_S um 11 noch deutlich azider eingeschätzt.^[125-126] Das Thioamid **29** hat voraussichtlich ebenfalls einen pK_S -Wert von 11-12. Das bedeutet, dass es bei physiologischem pH und auch im Assay-Puffer fast ausschließlich ungeladen vorliegt. Der Elektronenzug an der β -Position ist etwas geringer, jedoch vergleichbar hoch mit dem Amid-Derivat **15**. Computergestützte Methoden postulieren, das Thioformamid ein schwächerer Wasserstoffbrückenbindungsakzeptor wäre als Formamid. Dagegen seien die Donoreigenschaften des Stickstoffs stärker ausgeprägt.^[127] Tatsächlich ist der Schwefel durch seinen größeren Atomradius und seine geringere Elektronegativität

verglichen mit Sauerstoff das bessere Nukleophil, kann aber durch die nicht-planare Geometrie schlechter im Oxoanionloch stabilisiert werden.

Halogenierte Michael-Akzeptoren

Ein elektronenziehender Substituent in α -Position gilt als Voraussetzung für die Reversibilität der 2-Cyanacryl-Derivate. Der Versuch, die Nitrilfunktion zu substituieren ist bisher nicht erfolgt. Die Einführung von Heteroaromaten anstatt des Carbonyls lieferte potente reversible Inhibitoren.^[128-129] Neben der Optimierung der Elektrophilie spielen die begrenzten sterischen Gegebenheiten der Proteintaschen eine große Rolle. Eine Möglichkeit, sterisch wenig anspruchsvolle und dennoch elektronenziehende Substituenten einzusetzen, bilden die Halogene. Organisch gebundenes Fluor stellt das kleinste und elektronegativste Halogen dar. Außerdem kann es aufgrund seiner weitgehend negativ geladenen Oberfläche als Wasserstoffbrückenbindungsakzeptor fungieren. Dabei muss aber die chemische Umgebung des Halogens unbedingt berücksichtigt werden. Befinden sich in der Nähe starke Elektronenzieher wie Nitrogruppen, kann sich das elektrostatische Oberflächenpotential der Halogene auch umkehren und positiv sein.^[130]

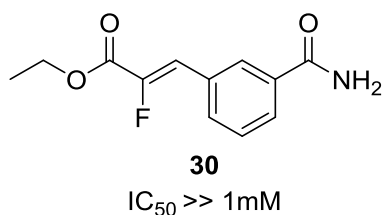


Abb. 41 Austausch der elektronenziehenden Nitril-Gruppe mit Fluor. **30** synthetisiert von Marisa Tügend.

Das Fluor-Derivat **30** zeigte nur einen IC₅₀ >> 1mM. Die vergleichsweise geringe Verschiebung von 7.26 im ¹H-Spektrum für die β -Position des Michael-Systems deutet schon darauf hin, dass der Elektronenzug schwach ist. Offensichtlich ist eine Mesomeriestabilisierung über den elektronenziehenden Substituenten für einen potenten Inhibitor erforderlich.

Malonsäureesterderivate

Der Ansatz der Resonanzstabilisierung wurde mit den Malonsäureesterderivaten detaillierter untersucht. Hier wurde auch erstmals deutlich, dass abhängig vom Substitutionsmuster in der Synthese auch beide Isomere in einem definierten Verhältnis entstehen können und E- und Z-Isomer unterschiedliche Affinitäten zum Zielprotein besitzen.

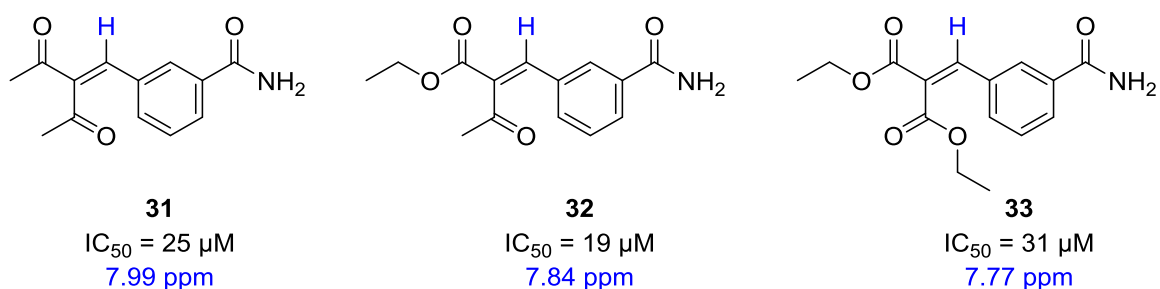


Abb. 42 Verwirklichte Knoevenagelprodukte mit β -Dicarbonylverbindungen. Die chemische Verschiebung des β -Protons im 1H -NMR in DMSO- d_6 ist in blau angegeben. **31** und **33** synthetisiert von Marisa Tügend.

Die Reaktion von 3-Formylbenzamid mit Acetylaceton, Acetessigester und Diethylmalonat liefert annähernd equipotente Inhibitoren. Anzumerken ist jedoch, dass bei **31**, dem reaktivsten Molekül der Reihe, Probleme in der Aufreinigung der Verbindung bestanden. Wie bei den Sulfonderivaten wurde daher nur ein Gemisch getestet.

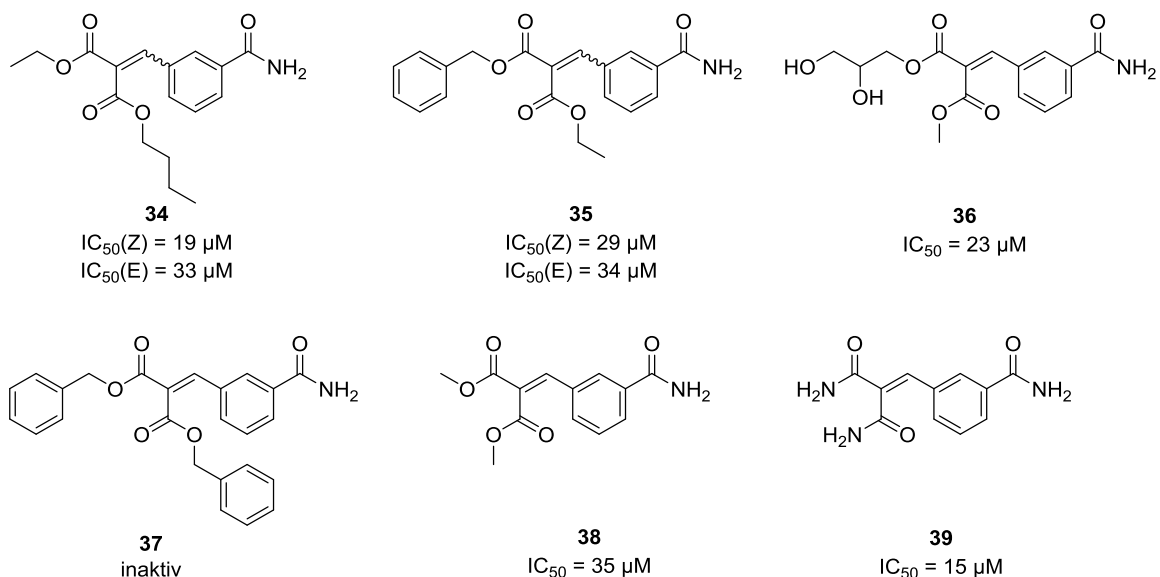


Abb. 43 Verschiedene Malonsäureester- und Malonsäureamid-Derivate mit IC_{50} -Werten. **34-39** synthetisiert von Sabrina Lechnitz.

Leider ergaben die verschiedenen Variationen der Substituenten nur marginale Änderungen in der Affinität. Die Malonesterderivate siedeln sich alle um die 30 μM an und stellen damit nur moderate Inhibitoren dar. Am aktivsten zeigen sich das Malonsäurediamid **39** mit 15 μM , sowie **34** (Z) und **32** mit 19 μM . Gemeinsam sind ihnen die relativ kleinen und flexiblen Alkylketten, die lipophile Kontakte zur Proteinoberfläche herstellen und sich an die teilweise engen Taschen anpassen können. Malonsäurediamid **39** kann theoretisch auch umgekehrt im aktiven Zentrum liegen und in der S1-Tasche durch Thr₁₄₂ verankert werden. Der Michael-Akzeptor wäre für das Cystein so nicht zu erreichen und ein nicht-kovalenter reversibler Bindungsmodus liegt vor. Eine Kristallstruktur würde darüber Aufschluss geben.

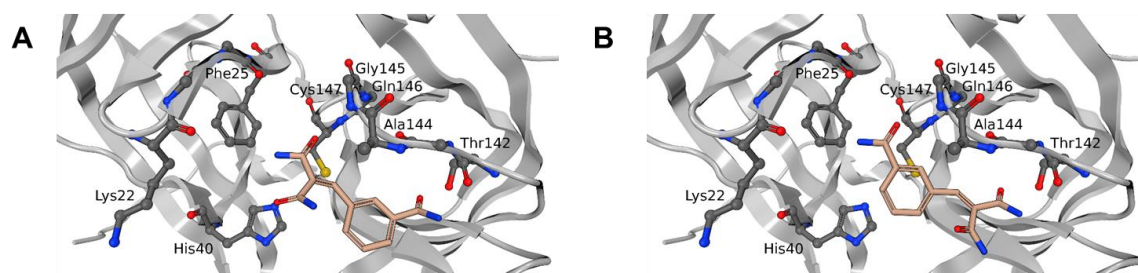


Abb. 44 Zwei alternative Konformationen des Malondiamids **39** im Docking, die in einem kovalenten (A) oder nicht-kovalenten (B) Bindungsmodus resultieren.

Auffällig war, dass sterisch anspruchsvolle Reste wie Benzylester sich eher negativ auf die Affinität auswirken, was wahrscheinlich an der engen räumlichen Struktur einiger Bindungstaschen liegt. Mit dem Glycerolderivat **36** wurde außerdem versucht weitere Wasserstoffbrückenbindungen zu den Gruppen des Proteinrückgrats aufzubauen.

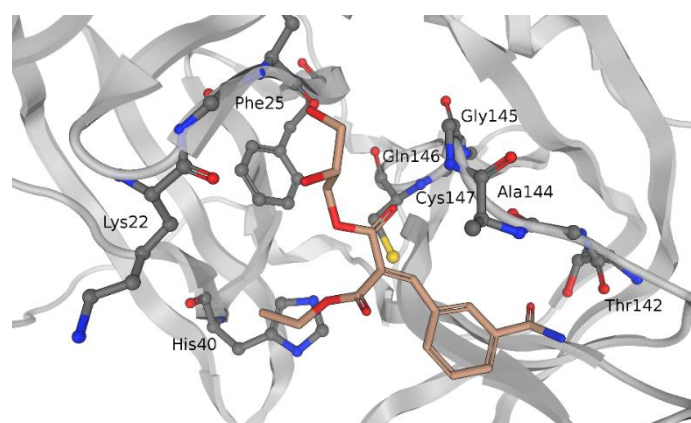


Abb. 45 Docking von **36**. Die eingeführten Hydroxylgruppen bilden potentiell neue Wasserstoffbrückenbindungen zum Proteinrückgrat aus.^[114]

Acylhydrazone

Acylhydrazone und Semicarbazone gelten als reversible Inhibitoren von Cysteinproteasen, dessen Wirkmechanismus dem der klassischen Michael-Akzeptoren gleicht. Es wurden bereits peptidähnliche Verbindungen beschrieben, die IC_{50} -Werte im niedrigen mikro- bis nanomolaren Bereich aufweisen und gegen Cathepsin K und Calpain gerichtet sind.^[131-132] Ihrer einfachen synthetischen Zugänglichkeit und der Biokompatibilität der Reaktionsbedingungen verdanken sie ihren Einsatz im Fragment-basierten Wirkstoffdesign.^[133]

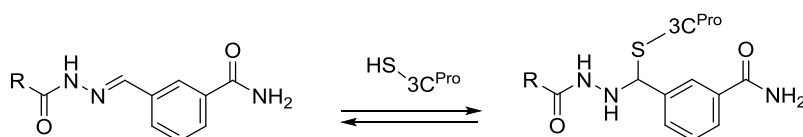


Abb. 46 Der postulierte Wirkmechanismus der Acylhydrazone gleicht dem der Michael-Akzeptoren.

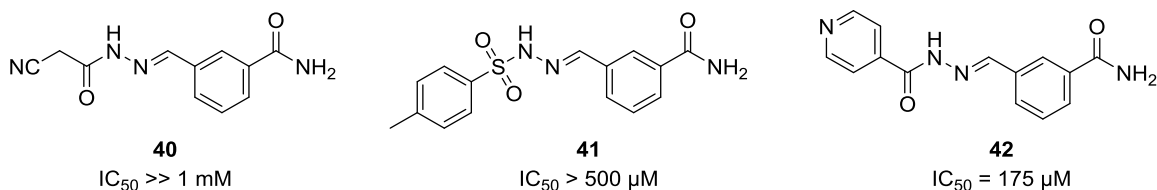


Abb. 47 Acylhydrazon-Derivate mit ihren IC_{50} -Werten.

Obwohl der aus dem Docking ermittelte optimale Abstand von verankerndem Benzamid und elektrophiler Position eingehalten wurde, zeigten **40** und **41** praktisch keine inhibitorische Aktivität. Der Elektronenzug ist hier mit einer Verschiebung des β -Protons bei etwa 8 ppm etwas herabgesetzt und die relativ starre, lineare Verbindung durch das Hydrazone könnte ein Anpassen an die räumlichen Gegebenheiten des aktiven Zentrums erschweren. Wahrscheinlich kann das entstehende Anion nicht im Oxoanionloch stabilisiert werden, da es zu weit entfernt ist. Allerdings hätten potentielle zusätzliche Interaktionen diesen Verlust ausgleichen können, denn die Acylhydrazone-Brücke selbst kann sowohl als Wasserstoffbrückenakzeptor und -donor fungieren. Ungewöhnlich ist, dass allein durch Mischung des 3-Formylbenzamids und 2-Cyanoacetohydrizid etwa 1/3 Knoevenagelprodukt neben dem Acylhydrazone entstehen. Da das getestete Gemisch **40** unerwartet inaktiv war, wurde auf eine weitere Isolierung beider Komponenten verzichtet.

Für das Hydrazone mit Isoniazid **42** konnte dagegen eine moderate Inhibition mit einem IC_{50} von 175 μM gemessen werden. Der Hillkoeffizient von zwei im FRET-Asay weist aber auf einen abweichenden Bindungsmodus hin. Daraufhin wurde untersucht, ob **42** ein potentiell allosterischer Inhibitor der EV D68 3C^{Pro} ist, der mit der RNA-bindenden-Domäne wechselwirken kann. Dieses Verhalten wurde auch bei dem zugelassenen DOPA-Decarboxylase-Inhibitor Benserazid mit der Cox B3 3C^{Pro} beobachtet.^[38]

Robert Schulz beschrieb die transiente, allosterische Bindungstasche und interagierende Seitenketten und Funktionen des Proteinerückgrats genauer.^[134] Basierend auf diesen Erkenntnissen führte Szymon Pach einen Vergleich der gemeinsamen Pharmakophor-Merkmale durch und konnte zeigen, dass **42** denselben Bindungsmodus wie Benserazid einnehmen kann. Wichtige Elemente sind dabei der mit einem Wasserstoffbrückenbindungsdonator substituierte Aromat, in **42** verwirklicht durch das primäre Benzamid, die Acylhydrazinbrücke und ein Wasserstoffbrückenbindungsakzeptor im Abstand von drei bis vier Atombindungen.

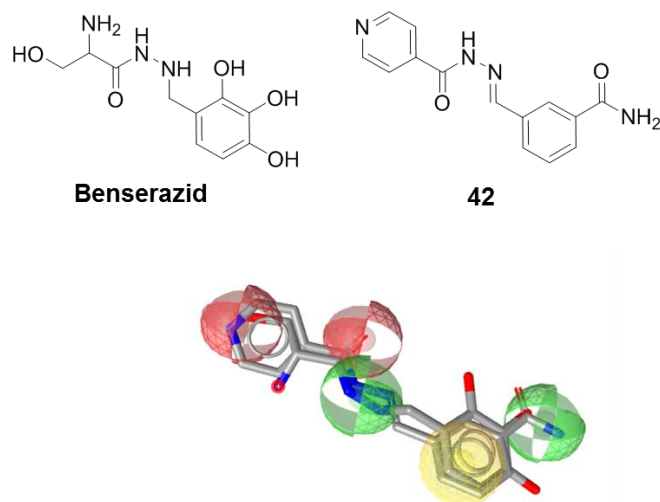


Abb. 48 Der Vergleich der Pharmakophor-Merkmale von **42** und dem allosterischen Inhibitor Benserazid zeigt eine hohe Übereinstimmung. Die Sphären beschreiben die Lage potentieller Interaktionen mit der Proteinoberfläche: Wasserstoffbrückenbindungsakzeptoren (rot), - donatoren (grün) und lipophile Kontakte (gelb).

Diverse

Im Sinne einer Knoevenagel-Reaktion reagieren diverse CH-azide Verbindungen. Darunter auch Malonsäuredinitril, das trotz fehlender S1'-Interaktion durch starke Aktivierung der β -Position mit 8.61 ppm einen moderaten Inhibitor lieferte. Nachteilig wirkt sich sicherlich auch die fehlende Stabilisierung des Oxoanionlochs aus, in welches das starre, lineare Nitril nicht gut passt. Ferner wurden CH-azide Heterozyklen wie Hydantoin, Barbitursäure, Oxindol und ein Hydroxycumarin gekoppelt.

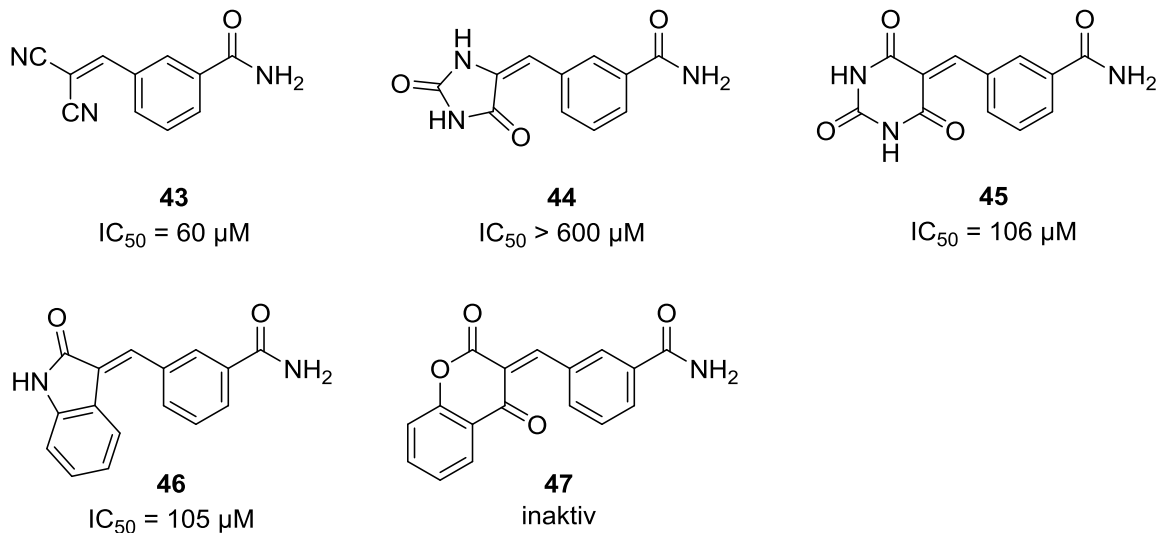


Abb. 49 Knoevenagelprodukte aus der Reaktion diverser CH-azider Komponenten mit Formylbenzamid **1** mit ihren IC_{50} -Werten. **46** und **47** synthetisiert von Sabrina Lechnitz.

Während für einige Verbindungen wie das Hydantoin-Derivat **44** vermutlich der geringe Elektronenzug auf die β -Position des Michael-Systems mit einer Verschiebung von nur 6.38 ppm für die ungenügende inhibitorische Aktivität verantwortlich war, so wirkten sich sterisch anspruchsvolle Reste wie bei der Barbitursäure **45** ungünstig auf die Affinität aus. Mit einer Verschiebung des β -Protons zu 8.30 ppm lag das Derivat schon im Bereich der potenten Cyanessigsäureester und β -Ketonitrile. Zur Ausbildung der kovalenten Bindung mit dem Thiolat müsste laut Docking jedoch eine Rotation des starren Ringsystems erfolgen, was die frei werdene Bindungsenergie und die Affinität verringern würde.

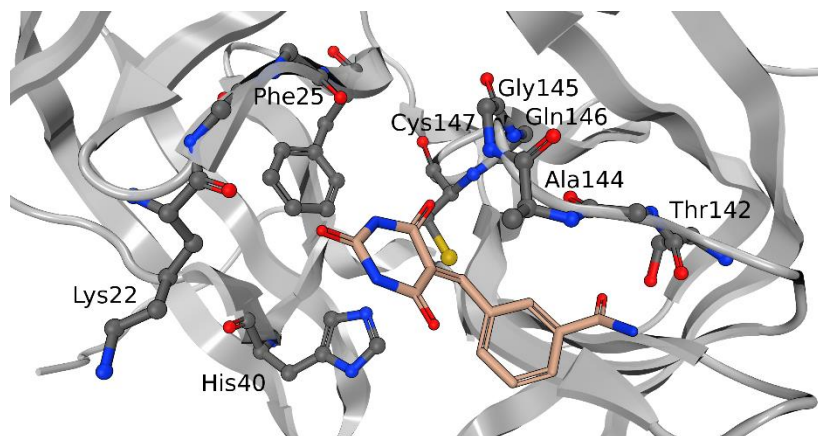


Abb. 50 Docking des Barbitursäurederivats **45**. Vermutlich würde erst eine energieaufwändige Rotation des Heterozyklus die Ausbildung der kovalenten Bindung erlauben.

Beim Indolderivat **46** kommt hinzu, dass der sterisch anspruchsvolle Rest das Molekül etwas aus dem aktiven Zentrum herausdrängt. Es kann aber vergleichbar mit dem Malonsäurediamid **39** verkehrt herum an das Thr₁₄₂ in der S1-Tasche binden. Das Hydroxycumarin **47** erwies sich als vollständig inaktiv. Ausschlaggebend sind dafür wahrscheinlich die Größe des Substituenten und der schwache Elektronenzug auf die β -Position mit nur 6.28 ppm durch die Konjugation der aromatischen Systeme.

Pyridine

Erste Vorarbeiten zu Pyrrolen verdeutlichten die Wichtigkeit der optimalen Positionierung von primärem Amid und elektrophiler Kopfgruppe. In der theoretischen Überlegung sollte ein Stickstoff in α -Position zur elektrophilen Kopfgruppe stehen, um die Gegebenheiten im natürlichen Substrat mit Glutaminrest in P1 am besten zu simulieren. Das würde im 2,4-substituierten Pyridin der Fall sein, doch während die Aminofunktion im natürlichen Substrat sowohl als Donor und Akzeptor für Wasserstoffbrückenbindungen fungiert, ist der Pyridinstickstoff nur ein Akzeptor. Andererseits würde die Inkorporation des Stickstoffs in das Ringsystem zu einer verringerten Elektronendichte im Aromaten führen und der aktivierende Effekt auf die elektrophile Position in ortho- und para-Stellung erhöht sein.

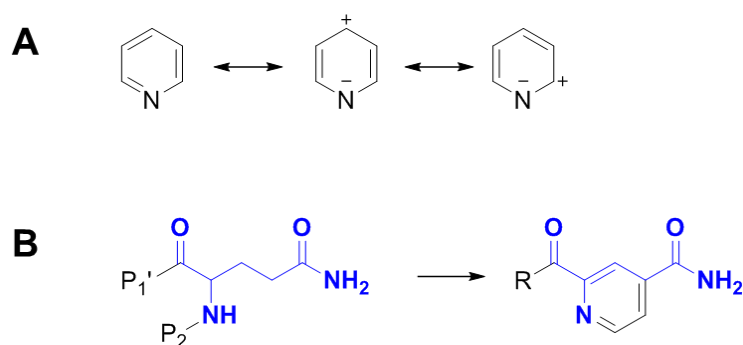


Abb. 51 In ortho- und para-Stellung des Pyridinstickstoffs herrscht eine verringerte Elektronendichte (**A**). Die Nähe zum natürlichen Substrat mit Glutaminrest in P1 ist bei einem Pyridinstickstoff in ortho-Stellung zur elektrophilen Kopfgruppe am ehesten gegeben (**B**).

Meta-Substituierte heteroaromatische Pyridinester wurden bereits als potente Inhibitoren der SARS 3CL^{Pro} identifiziert. Allerdings fungieren sie als Aktivester und acylieren das Cystein des aktiven Zentrums. Im et al. griffen diese Idee wieder auf und untersuchten die Ester als Inhibitoren der HRV 3C^{Pro} und behaupteten, das halogenierte Pyridin würde die S1-Tasche besetzen.^[135-136] Nachdem sich der in meta-Position bromierte Pyridinaldehyd **52** als unwirksam erwiesen hat, schien das unwahrscheinlich. Das aktive Zentrum der HRV 3C^{Pro} und der EV D68 3C^{Pro} sind sich sehr ähnlich und doch zeigen die halogensubstituierten Pyridine hier keine bis schlechte Affinität.

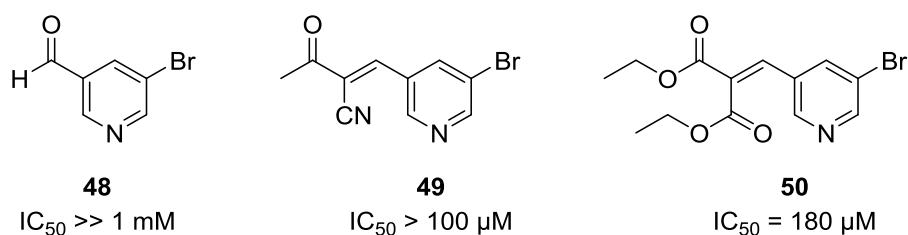


Abb. 52 Pyridinderivate mit Halogen anstelle des primären Amids und ihre IC_{50} -Werte. **54** synthetisiert von Sabrina Lechnitz.

Leider konnten die 2,4-substituierten Pyridinderivate im Rahmen dieser Arbeit nicht fertiggestellt werden. Die bisherigen Ergebnisse werden in einem Synthesepan dargestellt. Sowohl die Aktivierung der Säure über das Carbodiimid EDC und die Umsetzung mit wasserfreiem Ammoniak zum primären Amid als auch die Oxidation des primären Alkohols zum Aldehyd in einer Parikh-Doering-Oxidation lieferten in Testreaktionen die über LC/MS detektierten gewünschten Produkte.

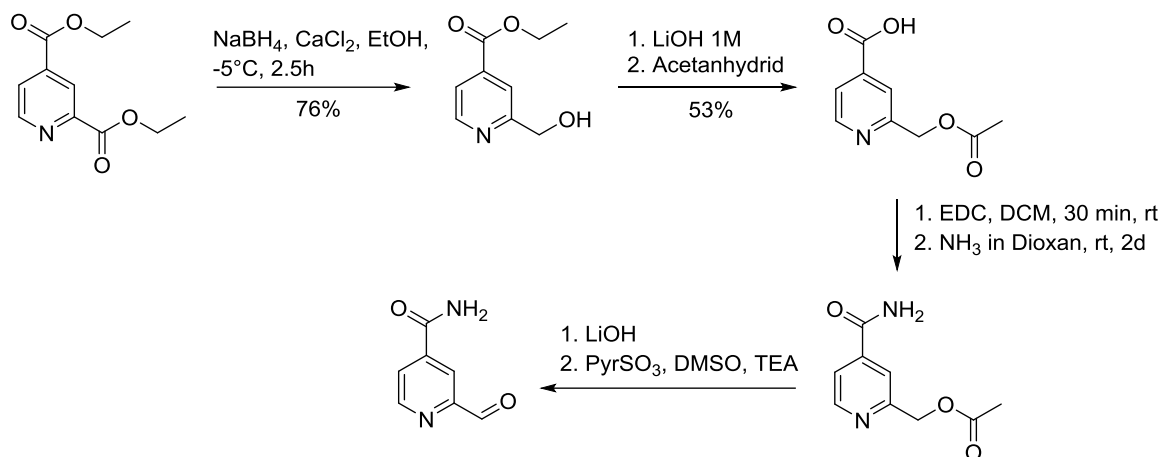
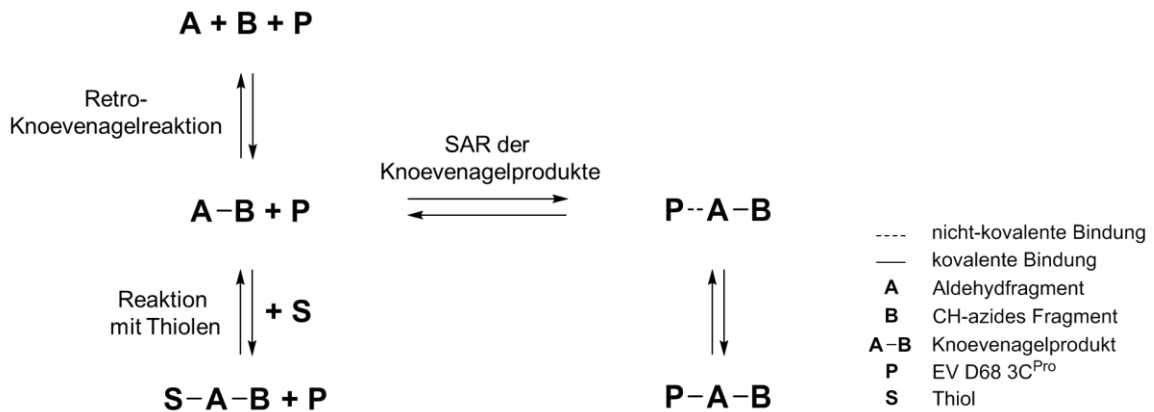


Abb. 53 Synthesepan für 2-Formylisonicotinamid.

Zusammenfassung

Aus der Reaktion von 3-Formylbenzamid mit verschiedenen CH-aziden Verbindungen wurden Knoevenagelprodukte gewonnen, die im FRET-Assay auf ihre inhibitorische Aktivität getestet wurden. Ein starker Elektronenzug auf die β -Position des α,β -ungesättigten Michael-Systems hängt dabei mit der Potenz des Inhibitors zusammen. So lässt sich erklären, warum die Cyanessigsäureamide schwächer wirksam waren als die Cyanessigsäureester und die β -Ketonitrile. Dennoch führt eine zu starke Aktivierung durch beispielsweise Sulfon- oder Nitrogruppen zu instabilen Verbindungen. Eine Mesomeriestabilisierung über die elektronenziehenden Substituenten ist bei Nitrilen und Carbonylen möglich und ist scheinbar für einen potenten Inhibitor erforderlich, denn das Derivat mit Fluorsubstituent war unerwartet inaktiv.



Die biologische Wirksamkeit ausgewählter Knoevenagel-Produkte wurde in einem zell-basierten Assay über die Quantifizierung der Reduktion des zytopathischen Effekts bewertet. Die Daten werden mit den im FRET-Assay ermittelten IC₅₀-Werten verglichen. Sowohl mögliche Reaktionen mit den Konkurrenz-nucleophilen DTT und Glutathion als auch die Retro-Knoevenagelreaktion werden bei der Erklärung der Ergebnisse berücksichtigt.

Aktivität ausgewählter Verbindungen im Zell-Assay

Vielen potenten Inhibitoren mit hoher intrinsischer Reaktivität wie Epoxiden und Halomethylketonen mangelt es an Selektivität, sie zeigen toxische Effekte in lebenden Organismen und eignen sich nicht als Arzneistoffe. Daher wurde für ausgewählte Verbindungen die Wirksamkeit und Toxizität in HeLa-Zellen untersucht. Dafür wurden die Zellen mit EV D68 infiziert und nach Inkubation mit den antiviralen Wirkstoffen die Reduktion des zytopathischen Effekts nach 3-4 Tagen quantifiziert. Der zytopathische Effekt beschreibt die morphologischen Veränderungen der Zelle hervorgerufen durch eine Virusinfektion. Bei Enteroviren umfasst das beispielsweise Fragmentierung des Chromatins im Zellkern, Abrundung und Anschwellen der Zellen, Ablösung von Oberflächen und Zellyse. Mit geeigneten Färbetechniken lassen sich diese Effekte schon wenige Stunden nach der Infektion detektieren.^[137] In diesem Assay wurde das Ausmaß des zytopathischen Effekts über einen MTS-basierten Assay erfasst. Lebende, metabolisierende Zellen setzten dabei das gelbe Tetrazolium-Substrat in ein violettes bis braunes Formazan um, dessen Konzentration nach etwa 1h Inkubationszeit UV-photometrisch bei 498 nm bestimmt wurde. Zeigte der eingesetzte Inhibitor keine Wirkung, starben die Zellen an der Virusinfektion und das Tetrazolium-Salz wurde nicht umgesetzt. Aus den UV-photometrischen Daten für verschiedene

Inhibitorkonzentrationen ließ sich dann ein EC_{50} -Wert bestimmen.^[138] In Kontrollexperimenten wurden nicht infizierte Zellen mit den Inhibitoren inkubiert. Bestand eine Zelltoxizität, so zeigte sich das ebenfalls an der verminderten Bildung des Formazan-Produkts. Die Toxizität wird mit dem CC_{50} -Wert ausgedrückt.

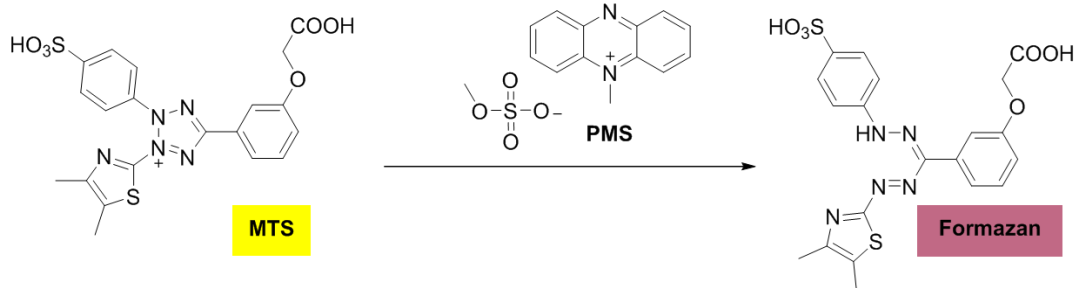
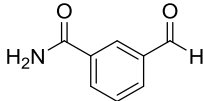
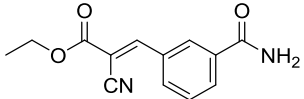
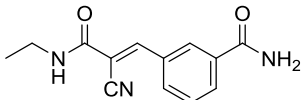
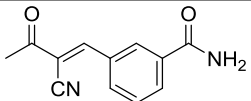
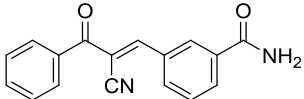
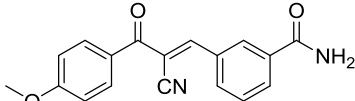
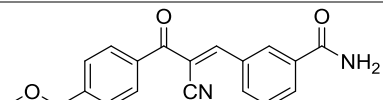
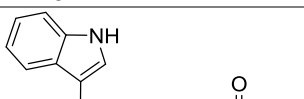
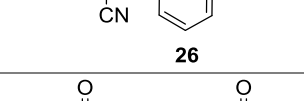
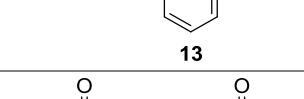
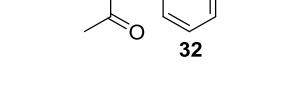


Abb. 54 Im MTS/PMS-basierten Assay setzen lebende Zellen das Tetrazolium-Salz zum Formazan um. PMS fungiert dabei als Elektronenüberträger. Der Farbumschlag wird UV-photometrisch erfasst.

In diesem Versuchsaufbau lässt sich die antivirale Wirkung der Verbindungen quantifizieren. Er gibt jedoch keine Aussage darüber, ob allein die Affinität zur EV D68 3C^{Pro} dafür eine Rolle spielt oder ob noch andere unbekannte Zielstrukturen existieren.

	Reduktion des CPE EC ₅₀ [μM]	Enzyminhibition IC ₅₀ [μM]	Toxizität CC ₅₀ [μM]
 1	36	48	> 100
 8	37	0.56	> 100
 16	19	19	> 100
 22	40	0.55	> 100
 23	72	1.4	> 100
 24	34	2	> 100
 25	11	27	89
 26	35	0.46	84
 13	12	13	> 100
 32	36	19	> 100
 33	2.3	31	> 100

Tab. 6 Vergleich der EC₅₀-Werte des CPE-Reduktions-Assays in HeLa-Zellen mit den IC₅₀-Werten des FRET-Assays mit isolierter EV D68 3C^{Pro}

Zwischen den in vitro im FRET-Assay gemessenen IC₅₀-Werten und den EC₅₀-Werten als in vivo Daten aus dem HeLa-Zellassay besteht bei den Inhibitoren **16** und **13** eine sehr gute Korrelation. Für den Cyanessigsäureester **8** und die β -Ketonitrile **22-24** und **26** besteht eine schlechte Korrelation und die Aktivität ist in vivo mitunter bis zu 70fach schlechter als im isolierten Proteaseassay. Das β -Ketonitril **25** und der Malonsäurediester **33** zeigen im Zellassay sogar eine größere inhibitorische Aktivität als im FRET-Assay.

Die ermittelten CC₅₀-Werte der getesteten Substanzen lagen bei allen über den EC₅₀-Werten. Der Quotient EC₅₀/CC₅₀ betrug mindestens zwei, in den meisten Fällen aber ein Vielfaches davon und zeugt von einer akzeptablen therapeutischen Breite.

Einen der ersten Faktoren, den es bei der Erklärung der Ergebnisse zu berücksichtigen gilt, ist die Fähigkeit der Moleküle Zellmembranen zu passieren. Diese Zellpermeabilität sollte vor dem Hintergrund der hier vorliegenden niedermolekularen und ausreichend lipophilen Inhibitoren, die der „Lipinski Rule of Five“ entsprechen, gegeben sein. Experimentell ließe sich die Zellpermeabilität beispielsweise durch Diffusion durch eine Schicht Caco-2-Darmepithelzellen untersuchen.^[139] In diesem Fall wurde darauf verzichtet, weil nur marginale Veränderungen in der chemischen Struktur wie bei den β -Ketonitrilen **24** und **25** voraussichtlich wenig Einfluss auf die Zellpermeabilität der Verbindungen haben. Trotzdem wurde bei Methoxy-Derivat **24** eine Erhöhung und bei Methylester-derivat **25** eine Erniedrigung der Aktivität im Zellassay verglichen mit dem FRET-Assay beobachtet.

In diesem Assay könnte eine hohe Konzentration an natürlichem Substrat der 3C^{Pro} zum Wirkverlust geführt haben. Es handelt sich hier um kompetitive Antagonisten, die dieselbe Stelle im aktiven Zentrum besetzen wie das Substrat und daher einfach vom höher konzentrierten viralen Polyprotein verdrängt werden. Die reversiblen Inhibitoren haben zudem den Nachteil, dass sie im nicht-gebundenen Zustand verschiedenen Ausschleusungsvorgängen oder Metabolisierungsenzymen ausgesetzt sind. Denkbar ist, dass aktive Transportmechanismen durch ABC-Transporter wie p-Glykoprotein eine Rolle spielen. Viele Karzinomzellen verfügen so über eine ausgeprägte Arzneistoffresistenz.^[140-141] Dennoch ist es unwahrscheinlich das von den strukturell sehr ähnlichen Molekülen nur Ausgewählte vom Transporter erkannt würden.

Anfällig für Metabolisierungsprozesse ist beispielsweise die Esterfunktion. Die entstehende Säure ist, wie im FRET-Assay getestet, nicht inhibitorisch wirksam. Denkbar ist auch, dass die Michael-Systeme über die Reaktion mit Glutathion oder Cystein in der Zelle abgefangen werden. Auch eine Bindung an andere nukleophile Proteinstrukturen wie Serumalbumin würden einen Schutz vor Metabolisierung und Ausschleusung bieten. Im Falle von Afatinib, einem α,β -ungesättigten Amid, beträgt die Wiederfindungsrate der applizierten Dosis im Urin und Fäces etwa 90%. Die Metabolisierung über Konjugation mit körpereigenen Strukturen scheint daher eher von untergeordneter Bedeutung zu sein.^[142]

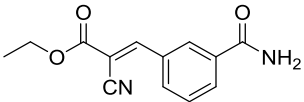
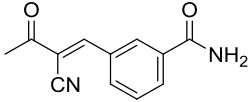
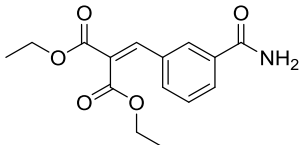
Für Entacapon, ein Cyanacrylamid-Derivat eingesetzt als Catechol-O-Methyltransferase-Inhibitor bei Parkinson, wurde auch der Aldehyd als Metabolit beim Menschen identifiziert.^[143] Implantate und chirurgische Klebstoffe aus Cyanacrylaten werden

ebenfalls über eine Retro-Knoevenagelreaktion abgebaut und resorbiert. Formaldehyd und Cyanessigsäure werden anschließend renal ausgeschieden.^[144]

Nitrilfunktionen werden nur selten metabolisiert und werden in der Regel unverändert ausgeschieden. Nitrilhydratasen katalysieren die Umwandlung in ein primäres Amid und Nitrilasen bzw. Amidasen die Reaktion zur Carbonsäure. Diese Enzyme gehören allerdings eher zur Ausstattung von Mikroorganismen.^[145-146] Das primäre Amid kann ebenfalls von diesen Enzymen hydrolysiert werden. Frovatriptan als zugelassener Arzneistoff bei Migräne enthält ebenfalls ein primäres Benzamid. Der Benzoesäure-Metabolit wurde bisher nur in Fäces nachgewiesen und ist daher vermutlich ein Abbauprodukt der mikrobiellen Darmflora. Im Apixaban ist das primäre Amid an ein Pyrazol gebunden und wird - soweit bekannt - nicht metabolisiert, was ebenfalls für die Stabilität dieser Gruppe spricht.^[147-148]

Insgesamt ist demnach von einer wenig ausgeprägten Metabolisierung auszugehen, abgesehen von der Esterhydrolyse und gegebenenfalls Hydroxylierungen am Aromaten und Reduktion der Ketone. Letztere Reaktionen führen nicht unbedingt zum vollständigen Wirkverlust, denn das S1-bindende Element und die elektrophile Funktion sind noch intakt.

Wahrscheinlicher scheint daher, dass das Ausmaß der ungerichteten Bindung an Nukleophile in der Zelle für die verringerte inhibitorische Aktivität verantwortlich ist. Daraufhin wurde die Aktivitätstestung im FRET-Assay unter Zusatz von 1 mM Glutathion (GSH) für drei Inhibitoren wiederholt. Ausgewählt wurden Cyanessigsäureester **8** und β -Ketonitril **22**, für die zwischen FRET-Assaydaten und Zelldaten nur eine schlechte Korrelation bestand, und das Malonesterderivat **33** mit besserer Zellaktivität als durch den isolierten Proteaseassay erwartet. Glutathion stellt praktisch als hochkonzentriertes Reduktionsmittel in der Zelle einen guten Surrogatparameter der Gesamtheit der Zellnukleophile dar. Die Konzentration an GSH ist allerdings stark vom Zelltyp abhängig und rangiert im Bereich von 1-10 mM.^[149-150]

Inhibitor	IC ₅₀ mit 100 μ M DTT [μ M]	Hill-Koeffizient	IC ₅₀ mit 1 mM GSH [μ M]	Hill-Koeffizient
8 	0.56	1.1	1.37	1
22 	0.55	1.3	21	1.3
33 	31	1.4	> 100	1

Tab. 7 Im FRET-Assay ermittelte IC₅₀-Werte mit 100 μ M DTT oder 1 mM GSH.

Wurde dem Assaypuffer 1 mM Glutathion zugesetzt, erhöhten sich die gemessenen IC_{50} -Werte deutlich, was die schlechte Korrelation mit den Zelldaten für **8** und **22** erklären könnte. Leider eliminierte GSH aber auch die Aktivität von **33**, das im Zellassay konkurrierende Nukleophile toleriert hatte. Denkbar ist, dass sich der antivirale Effekt dieser Verbindung nicht ausschließlich auf die Inhibition der $3C^{Pro}$ zurückführen lässt, denn offensichtlich besteht keine Selektivität für die Bindung an das nukleophile Cystein des aktiven Zentrums der Protease. Erwähnenswert ist, dass eine hohe Glutathion-Konzentration bei einigen Enteroviren eine essentielle Rolle beim Zusammenbau des Kapsids für neue Viruspartikel spielt. Wird GSH nun durch elektrophile Verbindungen abgefangen, werden bestimmte Vorläuferpeptide destabilisiert und der Aufbau funktionaler Viruspartikel reduziert.^[151-152] Da die Inhibitoren im gewählten CPE-Reduktionsassay aber nur in Konzentrationen im mikromolaren Bereich eingesetzt wurden, ist dieser Wirkmechanismus unwahrscheinlich.

Der Elektrophilie-Index gilt als anerkannte Vergleichsgröße unter anderem zur Bewertung der Reaktivität und Toxizität potentieller Arzneistoffe. Die Berechnung stützt sich auf das molekulare chemische Potential und das HSAB-Konzept bzw. die Energien des höchsten besetzten Molekülorbitals HOMO und des niedrigsten nicht-besetzten Molekülorbitals LUMO. Eine Weiterentwicklung dieses Modells ermöglicht die Vorhersage der spezifischen Reaktivität gegenüber Glutathion und liefert eine gute Korrelation mit experimentell ermittelten Geschwindigkeitskonstanten der Reaktion von α,β -ungesättigten Michael-Akzeptoren mit GSH.^[153] Leider wurde diese Theorie bisher nur auf sehr einfache irreversible Michael-Akzeptoren ohne Nitrilsubstituenten angewendet. Problematisch an Modellthiolen ist außerdem, dass die Nukleophilie eines Cysteins im aktiven Zentrum durch die chemische Umgebung deutlich verändert sein kann. Ferner wird die Affinität der Elektrophile durch fehlende Interaktionen mit einer Proteinoberfläche nicht richtig eingeschätzt.

Der bisher durchgeführte FRET-Assay nutzte DTT zur Reaktivierung der oxidierten Protease. Wie groß der Einfluss dieses Konkurrenznukeophils auf die gemessenen IC_{50} -Werte ist, muss noch untersucht werden.

Da eine hohe Glutathion-Konzentration auch die Aktivität von Malonsäurediester **33** vermindert, obwohl Nukleophile im Zellassay offensichtlich toleriert werden, müssen noch andere Aspekte einen wichtigen Einfluss auf die Protein-Bindung haben. Weiterführende Experimente sollen Aufschluss über die Selektivität für die Protease und die Residenzzeit der Inhibitoren geben.

Reaktivität mit DTT

In vielen Assays wurde Dithiothreitol (DTT) eingesetzt, um die oxidierte Cysteinprotease zu reaktivieren. Trotzdem muss beachtet werden, dass DTT ein konkurrierendes Nukleophil darstellt, dass die Konzentration an freiem Inhibitor reduziert.

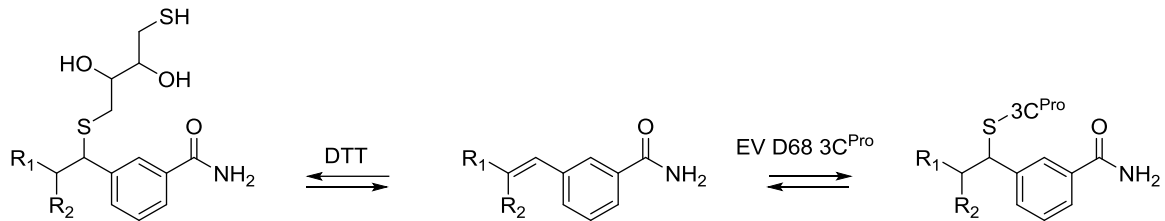


Abb. 55 Reaktivität mit DTT als Konkurrenznukeophil

Nach Inkubation in DTT-Puffer erscheinen im EIC-Spektrum zwei Peaks für den Inhibitor **23**. Der erste entspricht **23**, das dem hydrophileren, stabilen DTT-Addukt entstammt, das erst in der ESI-Quelle zerfällt. Obwohl der DTT-Komplex unter LC/MS-Bedingungen stabil war, gelang dessen Isolierung und NMR-Analytik nicht.

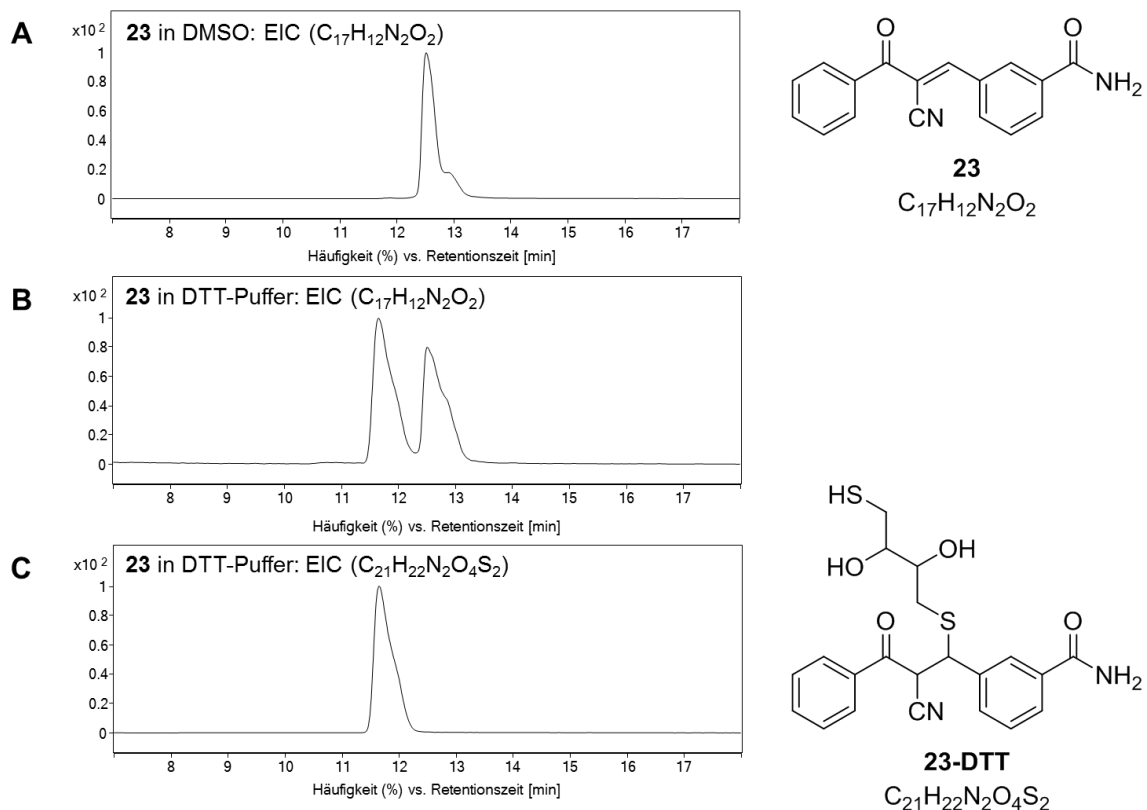
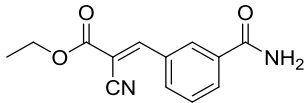
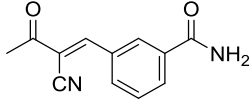
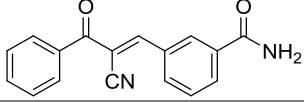
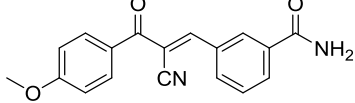
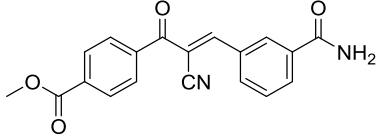
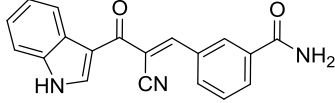
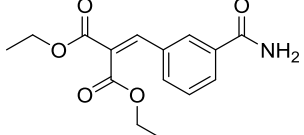


Abb. 56 Massenspektrometrische Untersuchung von **23** in DTT-Puffer nach chromatographischer Auftrennung ergibt zwei Peaks mit der Masse von **23**. Der erste Peak entspricht dabei dem reversiblen DTT-Addukt, das in der ESI-Quelle zerfällt.

Für viele Inhibitoren konnten keine oder nur Spuren solcher DTT-Addukte in der LC/MS nachgewiesen werden. Dazu gehören unter anderem der Aldehyd **1**, die Cyanessigsäureester **8** und der unsubstituierte Michael-Akzeptor **13**. Der Zerfall der DTT-Addukte folgt hier einer schnellen Kinetik. Die Cyanessigsäureamide und die Malonesterderivate zeigten große Reaktivität mit DTT. Neben den einfachen DTT-Addukten konnte zum Teil beobachtet werden, dass ein DTT zwei Inhibitormoleküle inaktiviert. Hier gibt es auch keine Überlagerung mit den EICs der Inhibitormoleküle. Das heißt, die Addukte zerfallen nicht bei höheren Temperaturen und Spannungen beim Übergang in die Gasphase.

Weil die Thiol-Addukte vieler Verbindungen instabil und schnell reversibel sind und sich nicht isolieren lassen, könnte die Lage der Thiol-Gleichgewichte in NMR-Experimenten überprüft werden. Dazu werden DTT und Inhibitor in Puffer gemischt und das Verhältnis zu gebundenem und ungebundenem Inhibitor über Integration des Protons der β -Position bestimmt. Die Quantifizierung über LC/MS ist wahrscheinlich ungenauer, da unbekannt ist, wie stark das Addukt bereits auf der Säule oder in der Quelle zerfällt. Zudem sind die sauren Bedingungen mit hohem Anteil an organischem Lösungsmittel wenig vergleichbar mit dem FRET-Assay in wässrigem Puffer bei pH 8.

Liegen die Thiol-Gleichgewichte stark auf der Seite der Addukte vermindert das die Konzentration an freiem Inhibitor, der an die $3C^{Pro}$ binden kann. Daraus würden erhöhte IC_{50} -Werte und scheinbar geringere Affinitäten resultieren. Da die Inhibitoren im FRET-Assay trotz des Konkurrenz-nukleophils wirksam waren, wurden standardmäßig 100 μM DTT zugesetzt um vergleichbare IC_{50} -Werte zu erhalten. Für einige Verbindungen wurden die FRET-Assays mit höherer Konzentration an Protein und ohne DTT wiederholt um den Einfluss dieses Parameters abschätzen zu können. Stoffspezifisch verringerte sich der IC_{50} kaum wie bei Cyanessigsäureester **8** oder im Extremfall bei β -Ketonitril **25** sogar um das 50fache. Erwähnenswert ist noch, dass DTT im Assay teilweise als Lösungsvermittler fungiert hat, denn während sich sehr lipophile Derivate im höher mikromolaren Bereich im Puffer unlöslich zeigten, wiesen die hydrophileren DTT-Addukte keine Probleme auf.

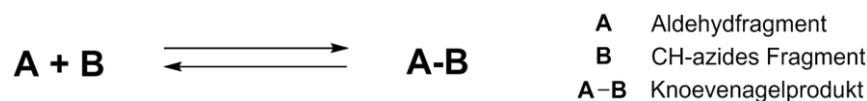
Inhibitor	IC ₅₀ mit 100 µM DTT [µM]	IC ₅₀ ohne DTT [µM]	IC ₅₀ mit DTT/IC ₅₀ ohne DTT
8 	0.56 (1.1)	0.6 (1.1)	0.9
22 	0.55 (1.3)	0.29 (1.9)	1.9
23 	1.4 (1.4)	0.24 (2)	5.8
24 	2.2 (1.3)	1.9 (1.5)	1.2
25 	27 (1.1)	0.48 (1.2)	56
26 	0.46 (1.1)	0.35 (1.5)	1.3
33 	31 (1.4)	0.88 (1.2)	35

Tab. 8 IC₅₀-Werte bestimmt im FRET-Assay mit 100 µM oder ohne DTT. In Klammern dahinter angegeben sind die Hill-Koeffizienten.

Das Verhältnis der IC₅₀-Werte mit und ohne DTT korreliert mit der Lage des Thiol-Gleichgewichts. Höhere Zahlenwerte bedeuten, dass mehr Inhibitor im Thiol-Addukt gebunden ist und dass das Addukt stabiler und langsamer reversibel ist.

Ein der Protein-Inhibitor-Bindung vorgelagertes Gleichgewicht mit einem Thiol kann Einfluss auf den Hill-Koeffizienten und die Steilheit der Bindungskurve besitzen. Liegt eine sehr schnelle Gleichgewichtseinstellung mit dem Thiol ohne Einfluss auf den IC₅₀ wie bei **8** vor, bleibt der Hill-Koeffizient unverändert. Der Hill-Koeffizient von Inhibitoren mit schneller Kinetik wie die β-Ketonitrile **22-26** bei Zugabe von Thiol eher 1 an. Für den Malonester **33** mit sehr langsamer Kinetik wird das erst bei sehr hohen Konzentrationen von Thiol wie 1 mM GSH deutlich. Die kontinuierliche Freisetzung der Inhibitoren aus der reversiblen Thiolbindung unterdrückt vermutlich unspezifische Bindungen an das Protein, Aggregationen der Inhibitoren im wässrigen Puffer und destabilisierende Effekte durch hohe Konzentrationen der freien Inhibitoren.

Retro-Knoevenagelreaktion



Bereits bei den Synthesen mit Knoevenagelreaktionen mit hochreaktiven CH-aziden Verbindungen fiel auf, dass die Produkte zwar entstehen und dünnschichtchromatographisch oder im LC/MS nachgewiesen werden konnten, aber sich nicht in Reinform isolieren ließen.

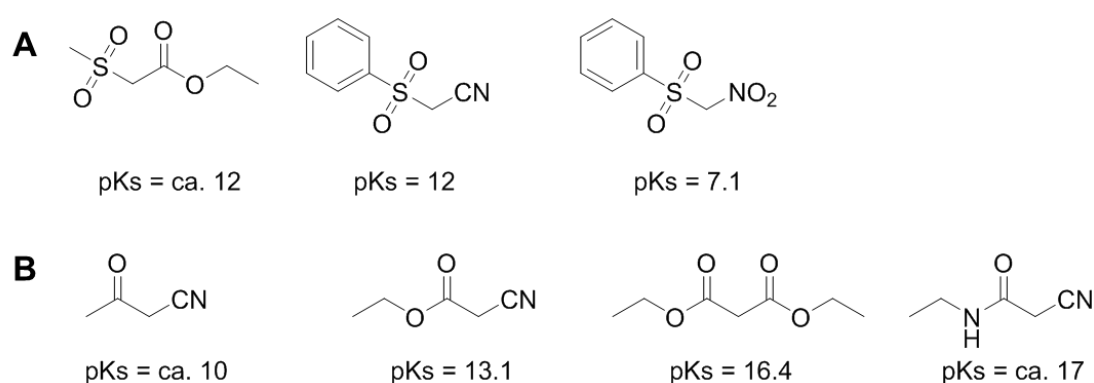


Abb. 57 **A** Hochreaktive CH-azide Verbindungen, die nicht isolierbare Knoevenagelprodukte bildeten. **B** 3-Oxobutanitril, Cyanessigsäureethylester, Diethylmalonat und 2-Cyanessigsäureethylamid liefern isolierbare Produkte. Angegeben sind gemessene pKs-Werte in DMSO (Bordwell pKa table) bzw. Schätzungen beruhend auf ähnlichen Strukturen.

Auch das Lösen der Knoevenagelprodukte in wässrigem Puffer oder in Acetonitril-Wasser-Gemischen mit 0.1% FA, dem Fließmittelgemisch der LC/MS, kann zur Dekomposition der Knoevenagelprodukte führen. Als isolierte Feststoffe oder als Lösung in DMSO sind die Knoevenagelprodukte auch über Monate und Jahre stabil.

Zur Beurteilung der Reaktivität wurden die pKs-Werte der CH-aziden Verbindungen herangezogen. Für Ethyl-2-(Methylsulfonyl)acetat kann der pKs nur anhand ähnlicher Strukturen geschätzt werden. Das Trifluormethylsulfon-Derivat besitzt einen pKs von 6.4 und Phenylsulfone mit Keto- statt Estersubstitution liegen etwa bei 11-12. Da der Einfluss der Trifluormethylgruppe auf den pKs vermutlich sehr groß ist, wird für Ethyl-2-(Methylsulfonyl)acetat eher ein pKs um 12 angenommen.

Die Beobachtungen in der Synthese und LC/MS bestätigen die Annahme, dass je stärker CH-azide die Verbindung ist, desto eher tritt die Retro-Knoevenagelreaktion ein und das Produkt ist instabil. Ein pKs um 13 der CH-aziden Komponente scheint hier einen Schwellenwert für die Stabilität darzustellen.

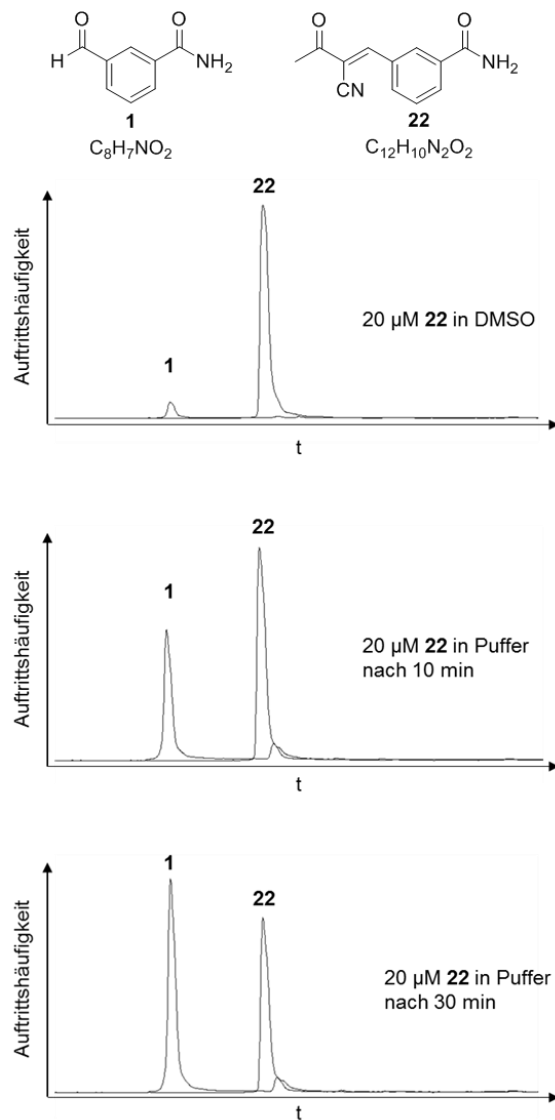


Abb. 58 EICs von **1** und **22** in DMSO und Puffer pH 8 (100 mM HEPES, 1 mM EDTA) nach 10 bzw. 30 Minuten bei Raumtemperatur. Im Wässrigen tritt schnell die Retro-Knoevenagelreaktion ein.

Die Retro-Knoevenagelreaktion ist stark abhängig vom pH der wässrigen Lösung, dem Anteil an organischen Lösungsmitteln wie DMSO und dem Zusatz von Aminen. Während die Addition von Wasser bzw. Hydroxid-Ionen im Neutralen bis Basischen schnell zu einem Zerfall der Knoevenagelprodukte führen kann, sind sie im Sauren wesentlich stabiler. Untersucht wurde beispielsweise die Hydrolyse von Benzyliden-Meldrumsäure. Bei pH < 3 war die Verbindung mit einer Halbwertszeit $t_{1/2}$ von etwa 35 Minuten relativ stabil und bei pH 6 lief die Retroreaktion mit $t_{1/2}$ von 2 Minuten am schnellsten ab. Die Zersetzungsrates war bei pH 8-9 am geringsten und das Knoevenagelprodukt hatte dort eine $t_{1/2}$ von etwa 60 Minuten. Im Sauren ist die Nukleophilie des Wassers herabgesetzt, im leicht Basischen ist die Protonierung des OH-Addukts und bei höheren pH-Werten der nukleophile Angriff des Hydroxids geschwindigkeitsbestimmend. Das Stabilitätsoptimum der Knoevenagelprodukte ist demnach abhängig von den elektronenziehenden Substituenten der CH-aziden Verbindung und liegt wahrscheinlich im Bereich pH 6-8.^[110, 154]

Theoretisch bietet ein System mit reversibler Knoevenagelreaktion und schneller Gleichgewichtseinstellung im Wässrigen bei Raumtemperatur die Möglichkeit, es zum Aufbau einer dynamisch kombinatorischen Bibliothek anzuwenden. Der Einsatz eines bekannten bindenden Aldehydfragments würde auf der Proteinoberfläche mit einem passenden CH-aziden Fragment bevorzugt das höchststabile Knoevenagelprodukt bilden. Die Absenkung des pH-Wertes würde die Isolation oder zumindest die Identifikation einer vorteilhaften Fragmentkombination zulassen. Dass der schnelle Austausch im Sinne einer Cross-Knoevenagelreaktion unter Katalyse von L-Prolin in organischen Lösungsmitteln möglich ist, konnte bereits gezeigt werden.^[155]

Interessant ist außerdem, dass einige Knoevenagelprodukte aus Retinal und zyklischen 1,3-Diketonen im Wässrigen ebenfalls der Retro-Knoevenagelreaktion unterliegen. Die antikanzerogene biologische Wirkung korreliert dabei mit dem Ausmaß und der Geschwindigkeit der Retroreaktion und der Freisetzung des Aldehyds.^[156]

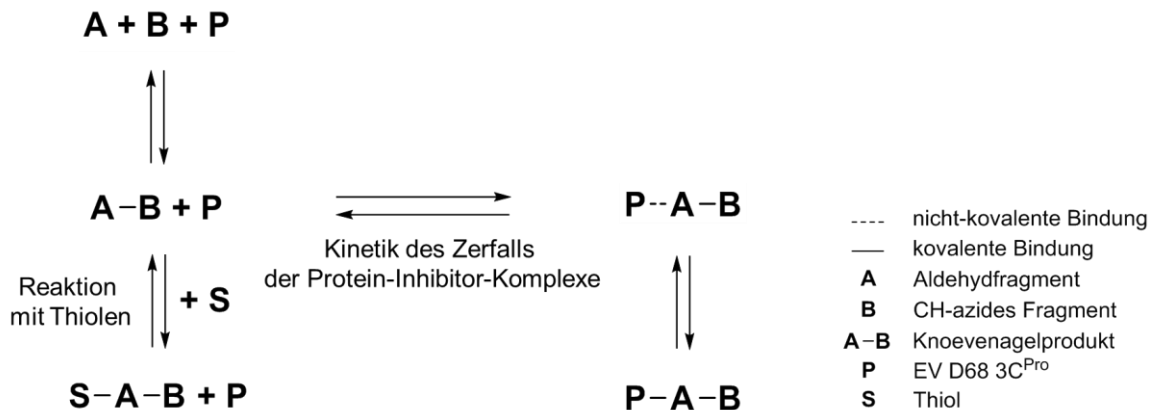
Die Zerfall der hier untersuchten Knoevenagelprodukte in wässrigem Puffer könnte ebenfalls mit ihrer antiviralen Wirkung im Zellassay zusammenhängen. Allerdings würde das hier entstehende 3-Formylbenzamid einen schwächeren Inhibitor darstellen. Dass viele untersuchte Inhibitoren wie der Cyanessigsäureester **8**, die β -Ketonitrile **22-24** und **26** und der Acetessigester **32** nur einen EC_{50} von etwa 36 μ M – entsprechend dem des Aldehyds – zeigen, unterstreicht diese Hypothese. Dagegen ist der pK_s des Diethylmalonats um >3 Einheiten größer und der Zerfall von **33** in der Retro-Knoevenagelreaktion stark verringert. Auch eine Inkubation von mehreren Tagen im wässrigen Zellkulturmedium führt damit nicht zur Zersetzung und **33** zeigt noch eine starke antivirale Wirkung im Zellassay. Auch das Cyanessigsäureamid **16** und das Wittig-Horner-Produkt **13** sind stabil und zeigen eine gute Korrelation der IC_{50} - und EC_{50} -Werte.

Zusammenfassung

Die ausgewählten Knoevenagelprodukte zeigten sich bei der Testung ihrer antiviralen Wirksamkeit in mit EV D68 infizierten HeLa-Zellen als moderat aktiv bei geringer Toxizität. Hervorzuheben ist das Diethylmalonat **33** mit einem EC_{50} im niedrigen mikromolaren Bereich.

Die Diskrepanz zwischen den gemessenen Aktivitäten im isolierten Protease- und Zellassay kann auf die Reaktion mit konkurrierenden Nukleophilen in der Zelle wie Glutathion und eine ausgeprägte Retro-Knoevenagel-Reaktion bei stärker CH-aziden Komponenten zurückgeführt werden.

LC/MS-Experimente zur Reaktion mit DTT zeigten, dass sich die Stabilität der Addukte je nach Art der CH-aziden Komponente des Knoevenagelprodukts deutlich unterschied. Das wirft die Frage auf, ob auch die Stabilität der Protein-Inhibitor-Komplexe und die Residenzzeit der Inhibitoren am Protein derart verschieden ist und welchen Effekt das auf die Wirkung der Verbindungen hat.



Die Kinetik des Zerfalls der Protein-Inhibitor-Komplexe wird über klassische und Native MS-Experimente und Verdünnungsassays beurteilt. ITC-Experimente unterstreichen die Bedeutung der Reaktion mit Konkurrenzreaktionen wie DTT. Über einen tryptischen Verdau lassen sich die Bindungsstellen langsam reversibler Inhibitoren identifizieren.

Kinetische Aspekte der Protein-Inhibitor-Bindung

Während die Kinetik der Addition von Nucleophilen wie DTT oder Glutathion an klassische Michael-Akzeptoren ohne elektronenziehenden Substituenten in α -Position gut erforscht ist, gibt es nur wenige Untersuchungen, die sich mit Michael-Akzeptoren mit Nitril-Substituenten befassen. Es wird über im NMR und UV beobachtbare Addukte berichtet, die nicht über LC/MS isolierbar sind.^[157]



Aufgrund der Reversibilität und der schnellen Gleichgewichtseinstellung der Prozesse ist es schwierig, allein den kovalenten oder nicht-kovalenten Protein-Inhibitor-Komplex zu erfassen. Im Folgenden werden daher nur die Zustände freier und gebundener Inhibitor betrachtet und es ergibt sich $K_D = (k_1 \cdot k_2) / (k_{-1} \cdot k_{-2})$.

Reversibilität im FRET-Assay

Kovalente Inhibitoren, also Liganden, die eine Atombindung zu ihrem Zielprotein ausbilden, können einen irreversiblen oder reversiblen Bindungsmechanismen aufweisen. Im Falle der Michael-Akzeptoren kann nach 1,4-Addition die Rückreaktion eingeleitet werden, indem das Proton in α -Stellung abgespalten wird. Dazu muss eine ausreichende Azidität des Protons vorliegen, was durch einen Nitrilsubstituenten sichergestellt werden kann.^[83, 128-129] Daraus ergibt sich die zentrale Fragestellung, ob das Nitril gegen andere elektronenziehende Reste, die mitunter noch zusätzliche Interaktionen mit der Proteinoberfläche ermöglichen, ausgetauscht und die Reversibilität der Inhibitoren erhalten werden kann.

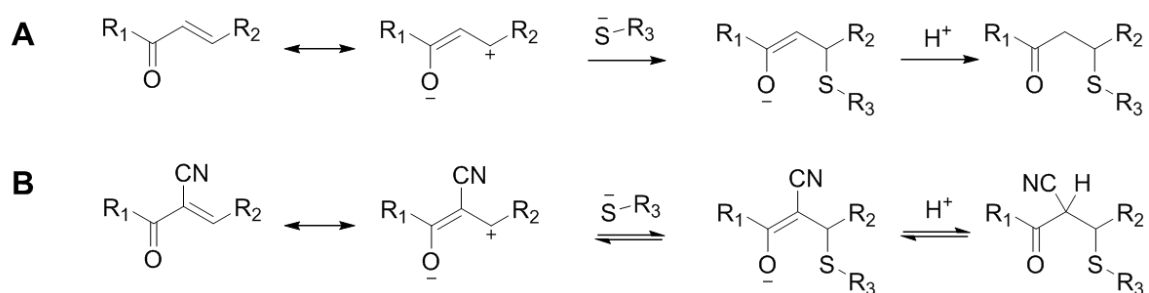


Abb. 59 **A** Mechanismus der Michael-Addition eines Inhibitors mit α,β -ungesättigtem Carbonyl an das Thiolat der 3C^{Pro}. **B** Befinden sich elektronenziehende Reste in α -Position, wird das nach der Addition umgelagerte α -Proton acide. Die Abspaltung dieses Protons leitet die Retro-Michael-Addition ein.

Zur Bestimmung des Bindungsmodus stehen verschiedene Methoden zur Verfügung. Betrachtet man beispielsweise die Rohdaten aus dem FRET-Assay, so ergibt die Auftragung der gemessenen Fluoreszenzintensität über die Zeit im Falle reversibler Inhibitoren eine Gerade. Vorausgesetzt wird dabei, dass im „steady-state“, also im Gleichgewichtszustand, gemessen wird. Der Anteil an freiem, nicht-inhibiertem Enzym setzt dann weiter Substrat um, nur die Umsetzungsgeschwindigkeit ist verringert. Dagegen wird im Falle irreversibler Inhibition ein Abflachen der Assaykurven über die Zeit erwartet. Im Verlauf der Messung bindet immer mehr Inhibitor an das Enzym, bis sich die Umsetzungsgeschwindigkeit Null annähert. Die Affinität irreversibler Inhibitoren wird daher über die Inaktivierungsgeschwindigkeit k_{inakt}/K_i beschrieben.

Die Auftragung der Rohdaten aus dem FRET-Assay lieferte bei allen getesteten Inhibitoren Geraden, deren Anstiege die Umsetzungsgeschwindigkeiten der Protease bei verschiedenen Inhibitorkonzentrationen darstellen. Eine Abflachung nach längerer Messzeit hängt mit der Substratverarmung zusammen, die die Umsetzungsgeschwindigkeit reduziert. Denkbar ist auch eine Abschwächung des Messsignals durch hohe Konzentrationen des FRET-Quenchers in der Assaylösung.

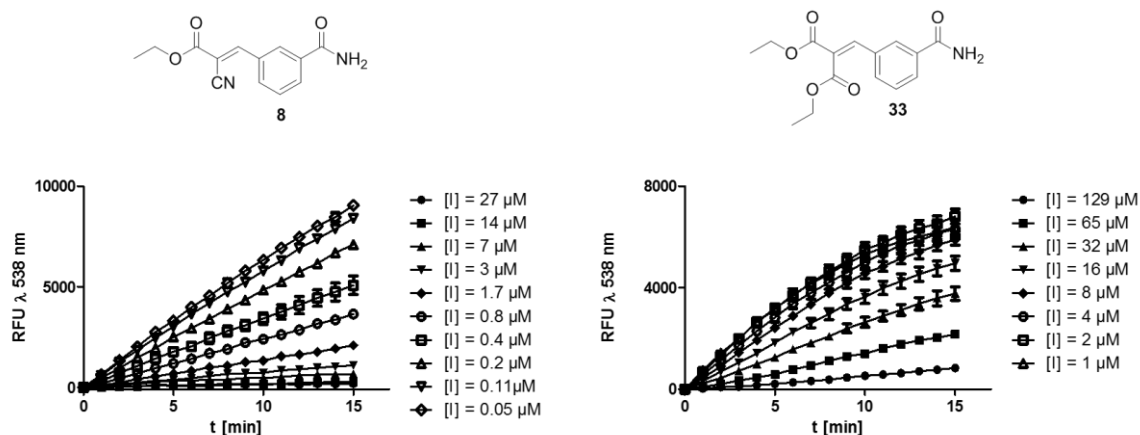


Abb. 60 Die Auftragung der Rohdaten aus dem FRET-Assay liefert bei reversiblen Inhibitoren Geraden. Die leichte Abflachung bei niedrigen Konzentrationen von **33** ist auf Substratverarmung zurückzuführen.

Die FRET-Assays wurden unter Zusatz von 100 μM DTT durchgeführt, um oxidierte Protease zu reaktivieren. Wie bereits erläutert, kann das Thiol-Gleichgewicht auf der Seite der stabilen Thiol-Addukte liegen. Allerdings gilt auch hier, dass bei ausreichender Azidität des α -Protons die Reaktion reversibel ist und Thiol-Addukt im Gleichgewicht mit freiem Inhibitor steht, der durch die Protease gebunden werden kann. Die Isotherme Titrationskalorimetrie (ITC) ist in der Lage die Summe der Bindungsenergien dieser Gleichgewichtsprozesse zu erfassen.

Die Unterschiede in den Residenzzeiten und der Reversibilität sind allein aus den Rohdaten der FRET-Assays nicht ersichtlich und können mittels Verdünnungsassays, Klassischer und Nativer Protein MS und Sättigungsexperimenten untersucht werden.

ITC zur Charakterisierung der Protein-Inhibitor-Bindung

Die Isotherme Titrationskalorimetrie (ITC) erlaubt es, direkte Wärmemengen aus der Interaktion zweier Analyten zu bestimmen. Dabei wird die Temperatur zwischen einer Proben- und Referenzzelle konstant gehalten, während in der klassischen Methode der multiplen Injektionen ein Analyt in bestimmten Intervallen in die Probenzelle titriert wird. Die außerordentliche Empfindlichkeit des Systems beruht auf der Messung der Leistungsdifferenz mittels eines Peltier-Elements und nicht der Erfassung der Temperatur selbst. Die Leistung, die zur Kompensation der Temperaturdifferenz notwendig ist, ist direkt verknüpft mit der Reaktions- bzw. Bindungswärme. Die Rohdaten werden dafür noch um den Betrag der Verdünnungswärme korrigiert. Vorteil des ITC ist, dass weder eine Immobilisierung, noch eine chemische Modifikation oder Markierung der Analyten notwendig ist. Außerdem gibt es praktisch keine Größenbegrenzung der untersuchten Moleküle. Allerdings werden durch die Bestimmung der Wärmemenge der Interaktion alle Vorgänge, die darauf Einfluss haben, zusammen erfasst. Das gilt demnach auch für Lösungsmittelleffekte, Konformitätsänderungen des Proteins oder die Addition von Thiolen, die sorgfältig untersucht werden müssen.^[158-159]

Die theoretischen Überlegungen der isothermen Titrationskalorimetrie begründen sich im Wesentlichen auf folgende Annahmen:

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S$$

und

$$\Delta G_{\text{Bindung}} = RT \ln(K_D)$$

In der Gibbs-Helmholtz-Gleichung bezeichnet ΔG die Gibbs-Freie-Energie, die sich aus der Enthalpie ΔH und dem Entropieterm $T\Delta S$ zusammensetzt. In der unteren van't Hoff Gleichung wird der Zusammenhang zwischen der bei der Bindung freigesetzten Gibbs-Energie und der Bindungsaffinität hergestellt.

Spezifische Interaktionen des Liganden mit der Proteinoberfläche wie beispielsweise Wasserstoffbrückenbindungen machen einen Großteil des enthalpischen Gewinns für die Bindung aus. Ist der Ligand sehr polar und geht starke Wechselwirkungen mit dem Lösungsmittel ein, muss unter Umständen erst Energie aufgewendet werden, um Wasser oder Lösungsmittel zu entfernen und funktionelle Gruppen zugänglich zu machen. Dieser Vorgang und auch die Verdrängung von in Proteinbindungstaschen gebundenem Wasser durch lipophile Kontakte führt zu einer Erhöhung der Entropie. Sind Konformitätsänderungen flexibler Proteinseitenketten notwendig, um die Bindung des Liganden zu ermöglichen, reduzieren sich die Freiheitsgrade für Rotation und Translation, was sich negativ auf die Entropie auswirkt. ΔG wird infolgedessen insgesamt positiver.

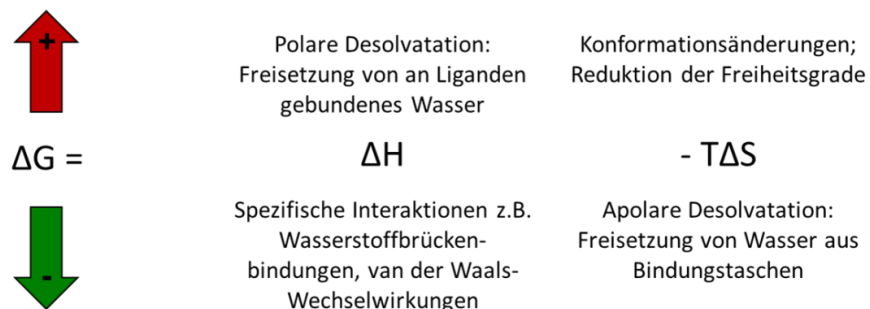


Abb. 61 Einfluss verschiedener enthalpischer und entropischer Effekte auf die Gibb's freie Energie.

Mittels ITC kann der Anteil des enthalpischen Terms ΔH und des entropischen Terms $T\Delta S$ quantifiziert werden. Daher eignet sich die Methode als Hilfsmittel zur Begründung, welche Verbindungen aus Hochdurchsatztestungen für die weitere zeit- und kostenintensive Entwicklung ausgewählt werden. Gemessene IC_{50} - bzw. K_D -Werte zahlreicher Methoden haben den Nachteil, dass die Wahl zwischen äquipotenten Verbindungen mit unterschiedlichen molekularen Grundgerüsten schwierig ist. ITC liefert hier neben der Affinität zum Zielprotein zusätzliche Informationen und ermöglicht damit eine rationale Abwägung. Im Laufe eines Optimierungsprogramms gewinnt durch Einführung lipophiler Gruppen an ein Grundgerüst üblicherweise der entropische Term an Bedeutung für die Zunahme der Potenz. Das ergibt sich unter anderem aus der Schwierigkeit, räumlich günstige nicht-kovalente Interaktionen wie Wasserstoffbrückenbindungen nachträglich zu etablieren, obwohl Modelling-Programme präzise Berechnungen zu potentiellen Interaktionsmöglichkeiten liefern. Nichtsdestotrotz sollte betont werden, dass eine Optimierung zugunsten der enthalpischen Anteils der Bindung durch Einführung neuer Wasserstoffbrückenbindungen oder elektrostatischer Wechselwirkungen zu verbesserten Arzneistoffkandidaten führt. Retrospektiv betrachtet konnte das am Beispiel einiger Statine und HIV-Proteaseinhibitoren gezeigt werden. Perspektivisch bedeutet das, dass in der Optimierung im fragment-basierten Wirkstoffdesign idealerweise von vorwiegend enthalpisch bindenden Molekülen ausgegangen wird.^[160-161]

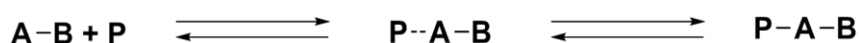
Mit dem Ziel sowohl enthalpisch als auch entropisch optimierte Liganden zu erhalten, lassen sich grundlegende Aspekte für die Entwicklung von Inhibitoren ableiten. Vorteilhaft ist die Etablierung von zwei bis drei optimal ausgerichteten Wasserstoffbrückenbindungen. Eine Wasserstoffbrückenbindung kann dabei mit 4.2-20.9 kJ/mol zur Gesamtenthalpie beitragen, wobei die Effekte mehrerer Bindungen summiert werden. Zu beachten ist dabei, dass die Einführung polarer Gruppen, die nicht der Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen dienen, die Affinität durch polare Desolvatation-Effekte auch verringern können. Rigide Strukturen wie in planaren aromatischen Systemen sind in der Regel erwünscht, denn das hält den entropischen Verlust durch Konformationsanpassung niedrig. Eine damit einhergehende Reduktion der Freiheitsgrade wird im Entropieverlust mit etwa 16.7 kJ/mol beziffert. Die Verdrängung

von Wasser aus dem aktiven Zentrum macht für niedermolekulare, fragmentartige Liganden nur einen geringen Anteil an der Bindungsenergie aus.^[162] Das rigide, planare 3-Formylbenzamid mit einem Molekulargewicht < 200 Da, das über zwei Wasserstoffbrückenbindungen des primären Amids in der S1-Tasche verankert ist, stellt damit aus einen hervorragenden Ausgangspunkt für die weitere Optimierung dar.

In dieser Arbeit wurde versucht, die Bindung niedermolekularer kovalent-reversibler Inhibitoren mittels ITC zu charakterisieren. Fragmente haben den Nachteil, dass sie durch ihre geringe Größe nur begrenzt mit dem Protein interagieren können und daher nur schwache Signale der frei werdenden Wärmemengen liefern. Die Ausbildung einer kovalenten Bindung kann dagegen einen großen Beitrag zum enthalpischen Gewinn leisten und die Detektierbarkeit ermöglichen. Eine schnelle Kinetik der Reversibilität der kovalenten Bindung wirkt sich jedoch anscheinend weniger stark auf die Affinität aus. Bisher wurde ITC für die Untersuchung der reversiblen Bindung von Amidinen an ein Cystein der DDAH-1 und eines Bicyclomycin-Derivats an den hexameren Transkriptionsfaktor Rho über ein Imin angewendet.^[163-165] Kovalent-reversible Reaktionen aus dem Bereich der Polymere beispielsweise in einer reversiblen Diels-Alder-Reaktion zwischen Furanen und Maleimiden wurden ebenfalls über Mikrokalorimetrie analysiert.^[166-167]

Da im ITC alle Vorgänge in Lösung erfasst werden können, sollte es theoretisch auch möglich sein, Fragmentligationen auf der Proteinoberfläche mittels ITC zu verfolgen. So wurde in Anwesenheit eines zweiten Fusicoccin-Derivat-Fragments eine steilere ITC-Kurve und eine höhere Affinität beobachtet als bei der Bindung des Phosphopeptids QSYpTV an das 14-3-3 Protein allein. Die Entstehung des Ligationsproduktes wurde über HPLC nachgewiesen.^[168] Ob das Prinzip auch auf die Ligation schwach bindender, niedermolekularer Fragmente anwendbar ist, ist bisher nicht untersucht worden.

Der Bindungsprozess kovalent-reversibler Liganden ist als mehrteilig zu betrachten:



Der Ausbildung eines nicht-kovalenten Enzym-Inhibitor-Komplexes folgt der nukleophile Angriff des Cysteins an das Michael-System. Es wird davon ausgegangen, dass der erste Schritt sehr schnell abläuft. Die Geschwindigkeit der Ausbildung der kovalenten Bindung bestimmt, ob sich der gesamte Prozess in einer ein- oder zweiphasigen Kinetik ausdrückt. Beide Phänomene lassen sich mit ITC charakterisieren.^[169] Üblicherweise laufen diese Prozesse in einem kurzen Zeitrahmen ab, sodass vom ITC die Summe der Energien erfasst wird. In einigen Fällen lassen sich kinetische Informationen aus den Rohdaten ablesen. Ist das Verhältnis der Peakhöhe zum Integral nicht konstant, verlängert sich die Equilibrierungszeit, also die Zeit, die notwendig ist, bis der Messwert zur Basislinie zurückkehrt. Diese Signalverbreiterung tritt vor allem bei hochaffinen Inhibitoren am IC₅₀ auf, wenn die Konzentration an freiem Inhibitor und ungebundenem Protein verringert ist. Solche kinITC-Messungen wurden beispielsweise schon für Riboswitches angewendet, bei denen auf die Bindung eines Liganden eine Konformationsänderung folgt.^[170-171] Für die in dieser Arbeit untersuchten Inhibitoren **8**

und **22** konnte keine Signalverbreiterung festgestellt werden. Der zweistufige Bindungsprozess lief so schnell ab, dass er als einphasige Kinetik erscheint.

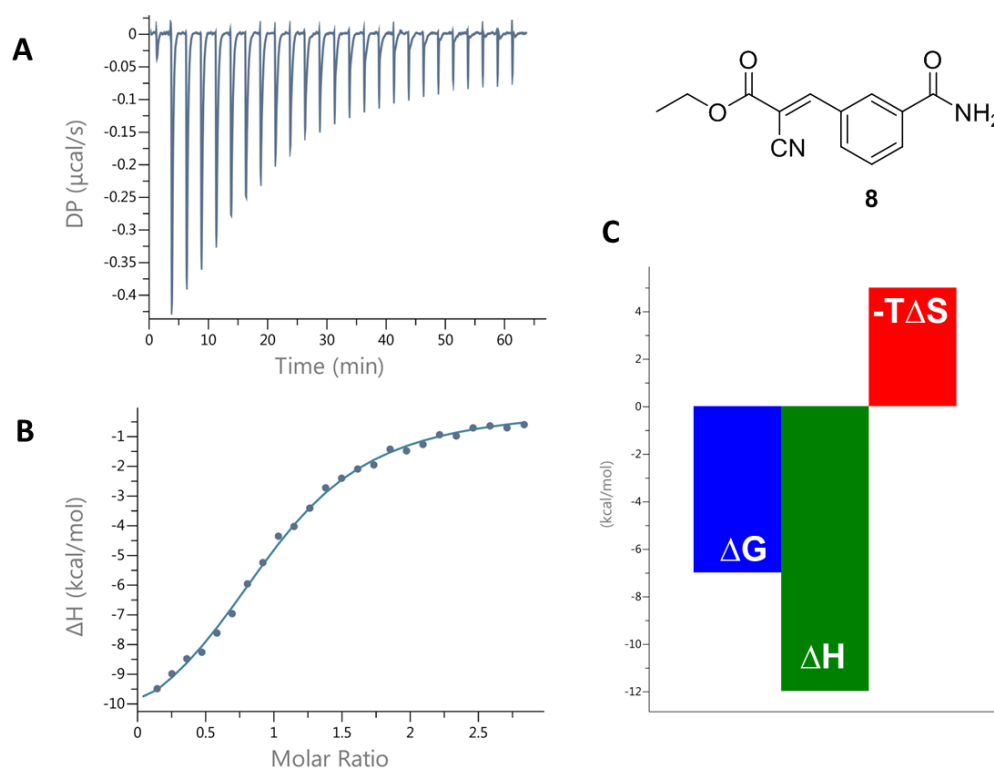


Abb. 62 ITC-Daten von **8**. Aus multiplen Injektionen des 500 μM Inhibitors in die 33 μM Protease in 10 mM DTT-Puffer und Messung der Leistungsdifferenz (Differential Power, DP) (**A**) kann unter Einbeziehung der Konzentrationen des Inhibitors und der Protease eine sigmoidale Kurve mit ΔH gegen das Verhältnis Inhibitor:Protease abgeleitet werden (**B**). Die Rohdaten liefern ebenfalls Informationen über den Anteil des Enthalpie- und Entropieterms an ΔG (**C**).

Beim Cyanessigsäureester **8** war die Bindung wie erwartet vorwiegend enthalpischer Natur. Grund dafür waren vermutlich die optimal ausgerichteten Wasserstoffbrückenbindungen des primären aromatischen Amids zu Thr₁₄₂ und die Stabilisierung im Oxoanionloch. Der entropische Term führte jedoch dazu, dass ΔG weniger negativ ausfällt. Verantwortlich dafür war wahrscheinlich der Verlust an Freiheitsgraden durch die Fixierung am Protein.

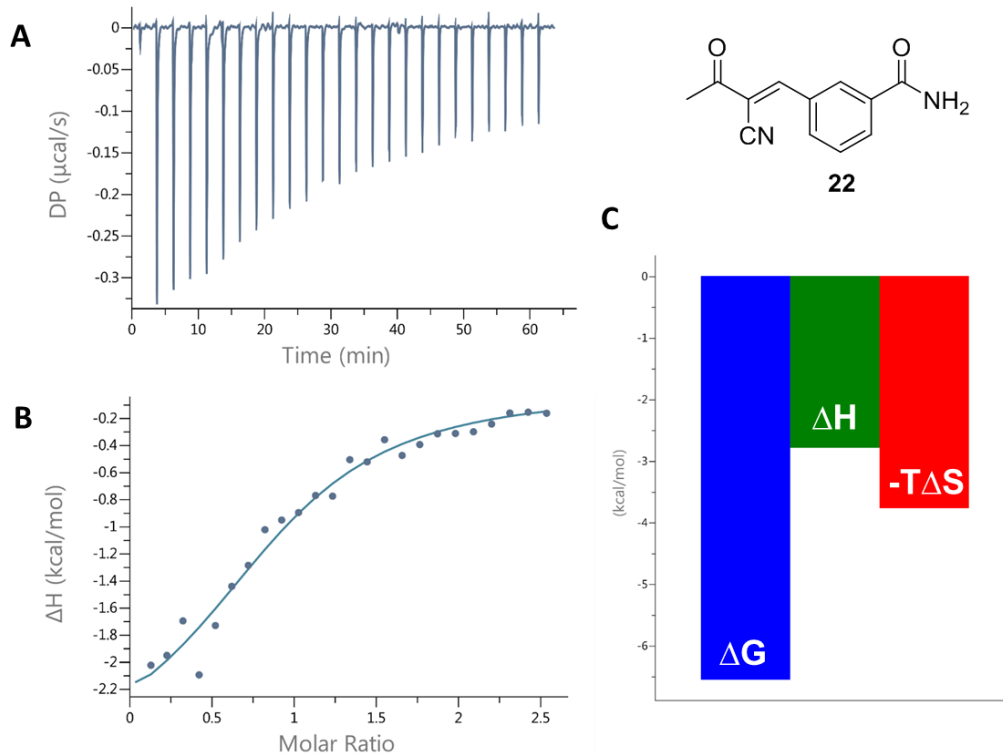


Abb. 63 ITC-Daten von **22**. Aus multiplen Injektionen des 800 μM Inhibitors in die 55 μM Protease in 10 mM DTT-Puffer und Messung der Leistungsdifferenz (Differential Power, DP) (**A**) kann unter Einbeziehung der Konzentrationen des Inhibitors und der Protease eine sigmoide Kurve mit ΔH gegen das Verhältnis Inhibitor:Protease abgeleitet werden (**B**). Die Rohdaten liefern ebenfalls Informationen über den Anteil des Enthalpie- und Entropieterms an ΔG (**C**).

Erstaunlicherweise fiel der Enthalpiegewinn für das äußerst ähnliche β -Ketonitril **22** deutlich geringer aus, obwohl die Bindung an Thr₁₄₂ und die Stabilisierung im Oxoanionloch hier genauso gegeben sind. Die Beträge von ΔG waren aber für Verbindung **8** und **22** fast identisch, was ihre im FRET-Assay bestimmten ähnlichen IC₅₀-Werte von etwa 0.5 μM bestätigt. Es ist unwahrscheinlich, dass bei solch marginalen Strukturunterschieden nur für einen Inhibitor Einschränkungen der Flexibilität der Proteinseitenketten bestehen oder der Verlust von Freiheitsgraden sich derart unterscheidet. Daher wurde untersucht, ob DTT, das dem Puffer in einer Konzentration von 10 mM zur Reaktivierung der Protease zugesetzt wurde, einen Einfluss auf das Bindungsprofil der Inhibitoren haben könnte.

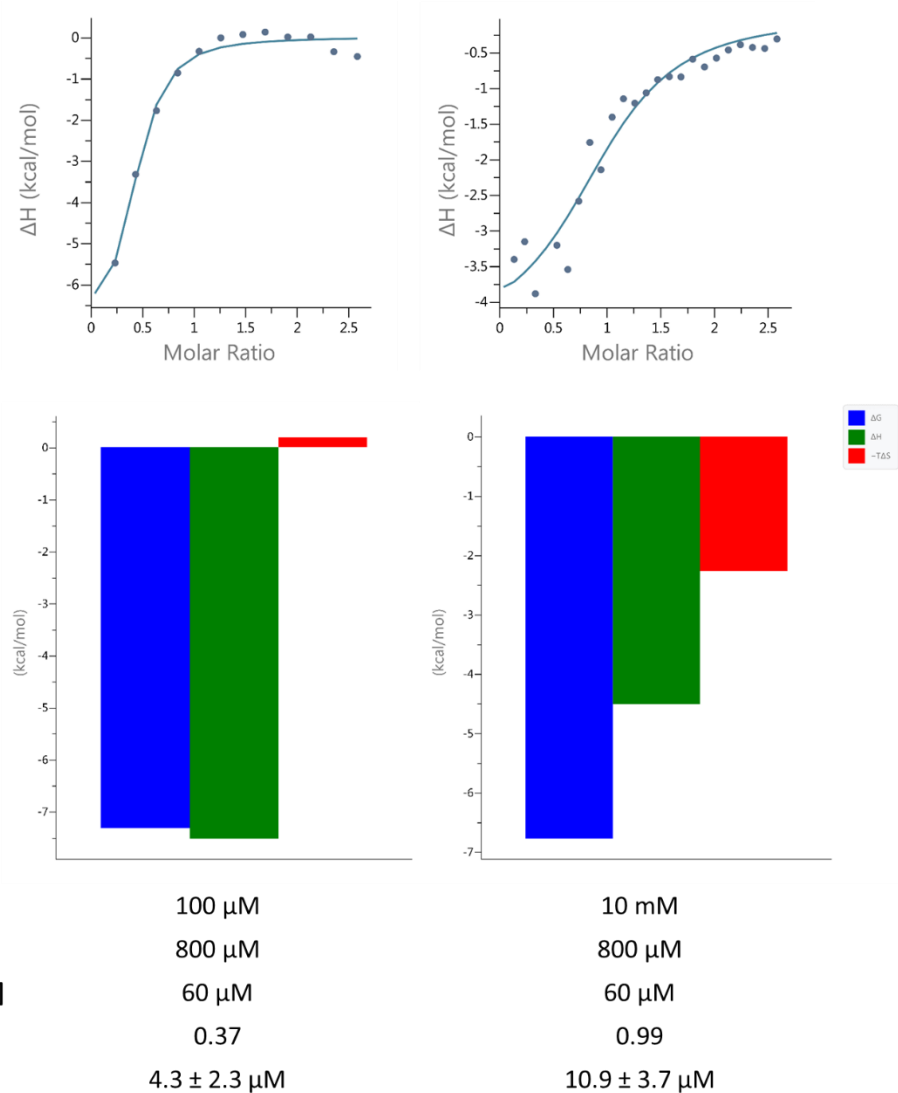


Abb. 64 Ergebnisse der ITC-Experimente mit β -Ketonitril **22**, dass in eine Lösung von EV D68 3C titriert wurde. Die DTT-Konzentration im Puffer beträgt 100 μ M bzw. 10 mM.

Wurde die Bindung des β -Ketonitrils **22** an EV D68 3C^{Pro} in einem Puffer mit niedriger DTT-Konzentration untersucht, war der Entropieterm positiv. Bei höheren DTT-Konzentrationen dagegen war er deutlich negativ. Wie bereits diskutiert, bestand beim β -Ketonitril **22** eine Reaktivität mit DTT im FRET-Assay. Der gemessene IC₅₀-Wert halbierte sich etwa bei Verzicht auf den 100 μ M DTT-Zusatz. Bei Cyanessigsäureester **8** blieb der IC₅₀ praktisch gleich. Die Konzentration von DTT war in der Spritze genauso hoch wie in der Messzelle um Verdünnungseffekte zu vermeiden. Bei niedrigen DTT-Konzentrationen von 100 μ M lag nur ein Bruchteil der 800 μ M Inhibitorlösung kovalent gebunden an DTT vor. Als dieses Gemisch in die Messzelle titriert wurde, erfasste man demnach hauptsächlich die Bindung des Inhibitors an die Protease und das Bindungsprofil ähnelte dem von Cyanessigsäureester **8**. Zu bedenken ist dabei, dass der N-Term als Stöchiometrie-Parameter nur 0.37 betrug. Da ausgehend von der Proteinstruktur und MS-Experimenten eine 1:1-Stöchiometrie angenommen werden

kann, bedeutete das, dass nur etwa ein Drittel der Protease aktiv war. Das wurde dadurch bestätigt, dass bei 10 mM DTT eine 99%ige Aktivität des Enzyms festgestellt wurde. Die durch die Addition an DTT verringerte Konzentration an freiem Inhibitor, führt zwar ebenfalls zu einer Verminderung des N-Terms. Dass die Auswirkung auf den N-Term weniger stark ins Gewicht fällt, zeigt die Messung mit 10 mM DTT. In diesem Fall müsste der N-Term durch eine geringere Konzentration des freien Inhibitors kleiner sein. Scheinbar liegt das Thiol-Gleichgewicht bei **22** deutlich auf der Seite des freien Inhibitors. Bei einem Überschuss an DTT im Puffer lag der Inhibitor vermutlich zu einem größeren Teil als reversibles DTT-Addukt vor. Wurde dieses DTT-Addukt in die Messzelle titriert, stellte sich ein neues Gleichgewicht zwischen freiem Inhibitor und DTT und DTT-Addukt ein. Die Freisetzung von DTT aus der Bindung führte zu einem großen Entropiegewinn, der auch im Bindungsprofil sichtbar war.

ITC-Experimente mit dem Zimtsäureester **13** lieferten leider zu schwache, nicht auswertbare Signale. Es wurde erst vermutet, dass hier ein Sonderfall vorlag, bei dem sich ΔH und $-T\Delta S$ fast aufheben, denn die erfolgte irreversible Modifikation des Proteins konnte über LC/MS bewiesen werden. Die Wiederholung der Messung bei 15°C und damit die Manipulation am Entropieterm brachte aber keine besseren Ergebnisse. Auf die Messung bei Temperaturen über 25°C wurde wegen der Instabilität der Protease verzichtet. Die schwachen Signale stellten beim Indol-Derivat **26** ebenfalls ein Problem dar. Wahrscheinlicher ist, dass die Inhibitoren durch die hohe Konzentration an DTT im Puffer hauptsächlich als stabile DTT-Addukte vorlagen. Selbst nach Verdünnung in der Messzelle wurde die Bindung an DTT nur langsam gelöst, sodass die tatsächliche Konzentration an freiem Michael-Akzeptor, der in der Lage ist am Cystein zu binden, drastisch reduziert war.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass die Charakterisierung kovalent-reversibler Inhibitoren mittels ITC erfolgreich durchgeführt werden konnte. Anzumerken ist dennoch, dass die Messung der Bindungsenergien kleiner Fragmente sich wegen der geringen Größe und den wenigen Interaktionen zum Protein als schwierig gestaltet. Um auswertbare Daten zu erhalten, muss daher das Protein verhältnismäßig hoch konzentriert eingesetzt werden. Der Wiseman-c-Parameter gibt Aufschluss darüber, ob die Proteinkonzentration angemessen gewählt wurde:

$$c = [\text{Protein}] / K_D$$

Für Cyanessigsäureester **8** ergibt sich $c = 5.1$ und für β -Ketonitril **22** $c = 4.6$. Ein Betrag von 10-500 wäre optimal. C-Werte von 1-5 geben noch gut auswertbare, wenn auch flachere Kurven. Sollte der c-Wert < 1 sein, sollte eine Verdrängungs-Titration mit einem schwach bindenden Inhibitor in Erwägung gezogen werden. Generell ist ITC aber eine geeignete Methode um auch Fragmente mit K_D -Werten von 0.5 bis 17 mM mittels klassischer multipler Injektion zu titrieren, solange ΔH ausreichend groß, sowie das Kalorimeter hinreichend sensitiv ist und am Ende der Titration idealerweise mehr als 80% der Bindungsstellen mit Ligand abgesättigt sind.^[172-174]

Das Konzept der Ligandeneffizienz bietet eine Grundlage zur Beurteilung vorteilhafter Strukturen in der Wirkstoffentwicklung. Sie ist definiert als $LE = \Delta G/N$ und berücksichtigt neben der Affinität auch das Molekulargewicht. Eine $LE \leq -0.3$ gilt als günstig.^[175]

Verbindung **8** und **22** mit einer LE von -0.39 und -0.42 bieten optimale Startpunkte für die Optimierung zu höherpotenten Wirkstoffen.

	K_D-Wert [μM]	ΔG [kJ/mol]	N	LE [kJ/mol*atom]
8	6.5 ± 1.4	-29.7 ± 0.4	18	-1.63
22	12.5 ± 4.7	-28.0 ± 0.8	16	-1.76

Tab. 9 Übersicht über die im ITC ermittelten Daten. N beschreibt die Anzahl an Nicht-Wasserstoff-Atomen. Die Ligandeneffizienz ist definiert als LE= ΔG/N.

Vergleicht man die im FRET-Assay und im ITC ermittelten IC₅₀- bzw. K_D-Werte, werden die Affinitäten im ITC um das 10- bis 20fache schwächer eingeschätzt. Für **22** hängt das sicher mit der Reaktion mit DTT zusammen, denn trotz Verdünnung in der Messzelle wird der Inhibitor in der gegebenen Zeit nicht vollständig aus dem Addukt freigesetzt. Auch Cyanessigsäureester **8** wird im Gleichgewicht mit seinem DTT-Addukt stehen, obwohl die schnelle Kinetik einen Nachweis bisher verhinderte. Die reduzierte tatsächliche freie Inhibitorkonzentration resultiert dann in einem höheren K_D. Laut Cheng-Prusoff-Gleichung kann der IC₅₀ nicht kleiner sein als der über ITC ermittelte K_D-Wert. Tatsächlich wurde aber schon beschrieben, dass über ITC bestimmte K_D-Werte signifikant größer waren als die im enzymatischen Assay ermittelten K_i-Werte. Eine Rangordnung der Verbindungen nach Potenz ergab trotzdem gleiche Ergebnisse, sodass die verlängerte Inkubations- und Messzeit beim enzymatischen Assay dafür verantwortlich gemacht wurde.^[163] In diesem Fall wird im ITC unverzüglich nach Zugabe des Inhibitors gemessen, in den angewendeten FRET-Assays verzögerte sich die Messung um maximal 2-3 Minuten, sodass davon auszugehen ist, dass die Ursache der Abweichung in der hohen DTT-Konzentration liegt.

Das Bindungsprofil der untersuchten niedermolekularen Knoevenagelprodukte sollte sich aufgrund der großen strukturellen Ähnlichkeit wenig unterscheiden. Erwartet wurde eine enthalpisch getriebene Bindung durch die Ausbildung der Wasserstoffbrückenbindungen zu Thr₁₄₂ in der S1-Tasche und die kovalente Bindung zum Cystein und einem geringen Entropieverlust durch die Einbuße von Freiheitsgraden bei Bindung an das Protein. Für Cyanessigsäureester **8**, der nur zu einem geringen Teil im DTT-haltigen Puffer als Thiol-Addukt vorliegt, trafen diese Erwartungen zu. Die ITC-Daten für β-Ketonitril zeigten einen großen Entropiegewinn an, der aus der Freisetzung von DTT aus dem Thiol-Addukt bei Verdünnung in der Messzelle und Einstellung eines neuen Gleichgewichts stammt. Bei **13** und **26** wurde vermutet, dass das Thiol-Gleichgewicht stark in Richtung des Thiol-Addukts verschoben ist. Daraus resultierten nur sehr geringe Konzentrationen an freiem Inhibitor, der an die Protease binden konnte, und die schwachen, nicht auswertbaren Signale. Doch auch wenn es sich um ein schnell reversibles Thiol-Gleichgewicht mit geringem Anteil an DTT-Addukt handelte, wurden die bestimmten K_D-Werte zu hoch eingeschätzt.

Verdünnungsassays

Da im FRET-Assay keine Aussage über die Stabilität der reversiblen Protein-Inhibitor-Komplexe gemacht werden kann und die ITC-Daten die unterschiedlich stark ausgeprägten Wechselwirkungen mit Thiolen herausstellten, wurden Verdünnungsassays durchgeführt, die die Protein-Inhibitor-Bindung charakterisieren sollen.

Wird ein Enzym mit einem reversiblen Inhibitor inkubiert und im Anschluss ausreichend verdünnt, so stellt sich entsprechend des K_D -Wertes ein neues Gleichgewicht ein und der Enzym-Inhibitor-Komplex zerfällt zum Teil wieder. Das hat zur Folge, dass das Enzym seine Aktivität wiedergewinnt und Substrat umsetzt. Üblicherweise wird im Vergleich zu den üblichen Assaybedingungen 100fach konzentriertes Enzym eingesetzt und mit dem Inhibitor in einer Konzentration inkubiert, die dem 10fachen IC_{50} und einer Enzymhemmung von 91% entspricht. Nach einer 1:100 Verdünnung liegt das Enzym nun in der üblichen Konzentration vor, der Inhibitor in 0.1fachem IC_{50} , entsprechend einer Inhibition von 9% des Enzyms.^[176]

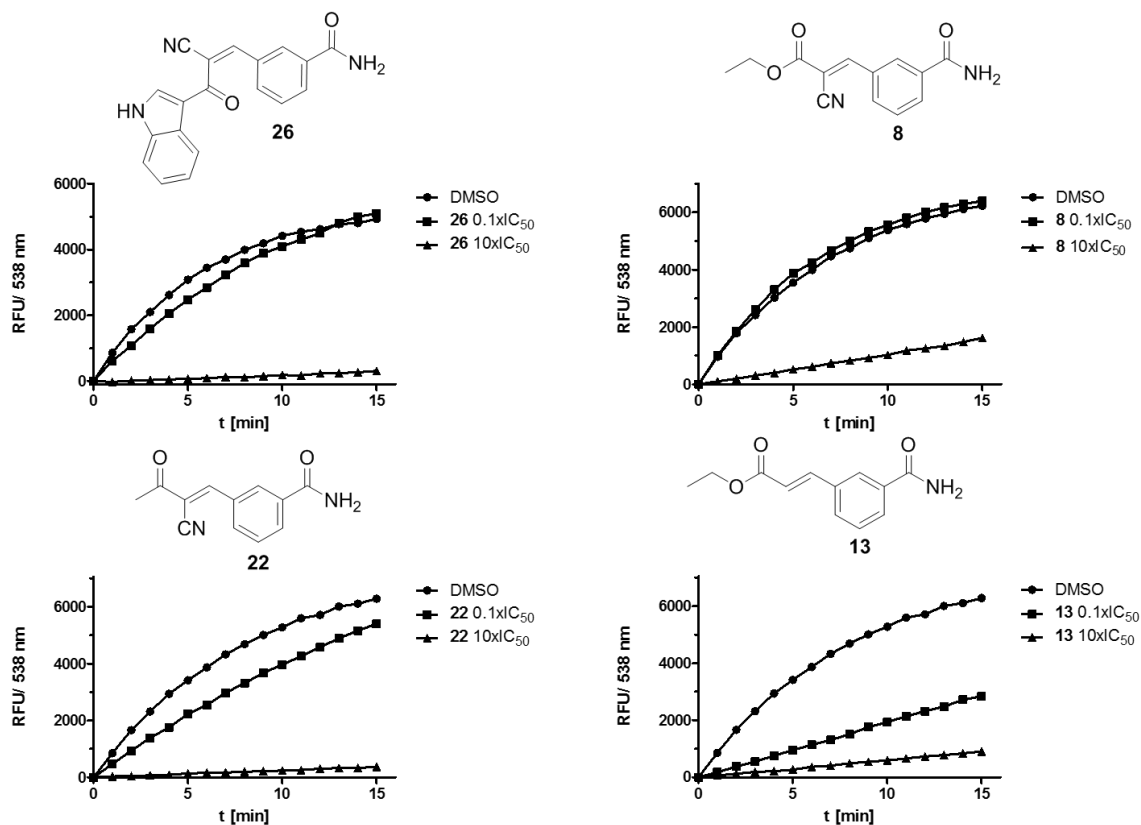


Abb. 65 Enzymkinetischer Verlauf der FRET-Assaykurven in den Verdünnungsassays. DMSO entspricht der Kontrolle mit nicht-inhibiertem Enzym nach 1:100 Verdünnung.

Inhibitor	Konzentration	% Aktivität des Enzyms	Verhältnis der Enzymaktivitäten (10x IC ₅₀ /0.1x IC ₅₀)
26	10x IC ₅₀	2.8 ± 0.7	1/29
	0.1xIC ₅₀	81.3 ± 3	
8	10x IC ₅₀	14.8 ± 1.6	1/7.4
	0.1xIC ₅₀	109.8 ± 1.9	
22	10x IC ₅₀	3.6 ± 0.8	1/18
	0.1xIC ₅₀	64.7 ± 3.1	
13	10x IC ₅₀	7.9 ± 1.8	1/3.5
	0.1xIC ₅₀	27.9 ± 1.8	

Tab. 10 Restaktivität des Enzyms in % bei verschiedenen Inhibitorkonzentrationen. Grundlage der Berechnung sind die ersten 5 Minuten des Assays, da die Kurven der Kontrolle mit der Zeit durch Substratverarmung abflachen.

In den Verdünnungsassays konnte gezeigt werden, dass für Cyanessigsäureester **8** eine komplette Wiederherstellung der Enzymaktivität nach Verdünnung auftrat. Es handelte sich also um einen reversiblen Inhibitor mit schneller Gleichgewichtseinstellung. Bei den β -Ketonitrilen **22** und **26** nahm die Enzymaktivität ebenfalls wieder zu. Auffällig war jedoch, dass sie nicht die Aktivität der uninhibierten Protease erreichte. Das Gleichgewicht stellte sich hier langsamer ein und der Zerfall des kovalenten Enzym-Inhibitor-Komplex war erschwert. Beim unsubstituierten Michael-Akzeptor **13** gewann das Enzym nach Verdünnung auch etwas Aktivität zurück. Der Zerfall des Protein-Inhibitor-Komplexes war dennoch deutlich verlangsamt und drückte sich in einem größeren Wert für das Verhältnis der Enzymaktivitäten (10x IC₅₀/0.1x IC₅₀) zueinander aus.

Prinzipiell ist es für die Arzneistoffentwicklung positiv zu sehen, wenn die reversible Bindung nur langsam gelöst wird. Die Residenzzeit des Inhibitors, also die Zeitspanne in der das Enzym deaktiviert ist, ist klinisch häufig relevanter als die reine Affinität. Am Beispiel von invertierten Cyanoacrylamiden wurde gezeigt, wie reversibel kovalente Kinaseinhibitoren, die auf ein nicht-katalytisches Cystein abzielen, hinsichtlich ihrer Residenzzeit optimiert werden können.^[83]

Da die Verdünnungsassays schon deutliche Unterschiede in der Kinetik der Protein-Inhibitor-Komplexe aufzeigten, wurden MS-Experimente mit einer größeren Anzahl an Knoevenagelprodukten durchgeführt. Je nach Wahl der Messbedingungen ließen sich stabile und langsam reversible oder labile und schnell reversible Protein-Inhibitor-Komplexe sichtbar machen.

Klassische Protein-MS

Reversible Inhibitoren sind dadurch gekennzeichnet, dass ihre Affinität zum Zielenzym vorwiegend auf der Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen oder elektrostatischen Wechselwirkungen basiert. Lipophile Kontakte, Dipol-Dipol-Wechselwirkungen und π -stacking von Aromaten führen zu zusätzlichem Energiegewinn aus der Bindung. Die Ausbildung dieser Wechselwirkungen setzt jedoch die dreidimensionale Oberfläche des Zielproteins voraus, damit der Inhibitor optimal im aktiven Zentrum gebunden werden kann. In der klassischen MS-Proteinanalytik wird unter denaturierenden Bedingungen gearbeitet. Dazu gehören insbesondere ein höherer Anteil an organischen Lösungsmitteln wie Acetonitril oder Methanol gespickt mit Modifier-Zusätzen wie 0,1% TFA oder FA, die für einen sauren pH-Wert sorgen. Hinzu kommen hohe Temperaturen von $\geq 200^\circ\text{C}$ beispielsweise durch das Trocknungsgas in der ESI-Quelle. Das führt zur Denaturierung, der Entfaltung des Proteins, sodass die dreidimensionale Oberfläche unter diesen Bedingungen nicht mehr gegeben ist. Die Wechselwirkungen zwischen Inhibitor und Protein können nicht mehr erhalten werden. Daraufhin diffundieren reversible Inhibitoren vom Protein ab. Das Protein wird auf der C18-Säule zurückgehalten und der HPLC-Fluss spült abgelösten Inhibitor weg. Freier Inhibitor wird also dem Gleichgewicht entzogen bis es wieder vollkommen auf Seite des dissoziierten Enzym-Inhibitor-Komplexes liegt. Dagegen binden irreversible Inhibitoren in der Regel über eine kovalente, nicht spaltbare Bindung. Selbst wenn nun die Oberfläche des Proteins unter denaturierenden Bedingungen nicht mehr besteht und zusätzliche nicht-kovalente Wechselwirkungen nicht mehr ausgebildet werden können, bleibt der irreversible Inhibitor am Protein haften. Im Spektrum kann der Protein-Inhibitor-Komplex identifiziert werden.

Unter diesen denaturierenden Bedingungen sollte keine Proteinmodifikation für schnell reversible Bindungen im Spektrum identifiziert werden können. Langsam reversible und stabile Protein-Inhibitor-Komplexe sind möglicherweise im dekonvolvierten Massenspektrum sichtbar.

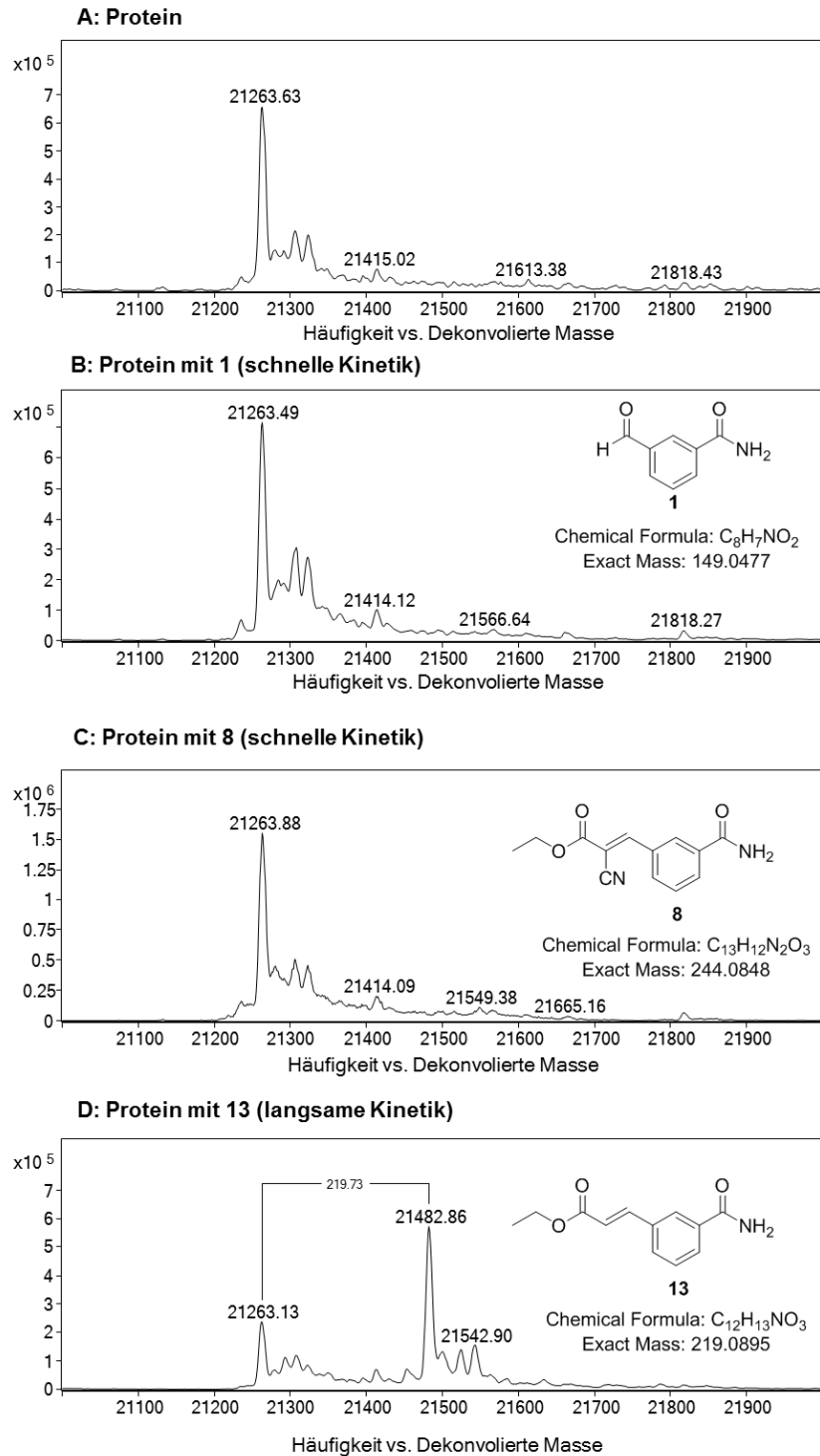
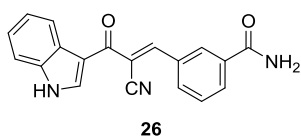


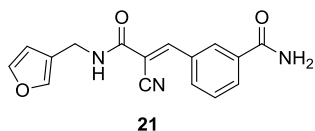
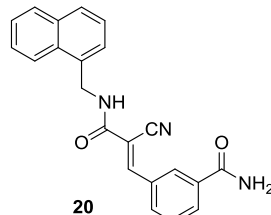
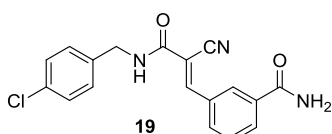
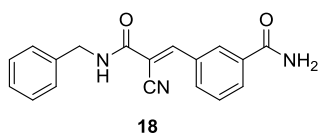
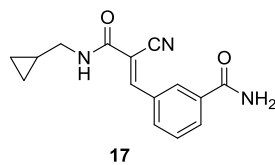
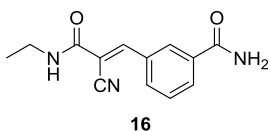
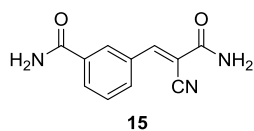
Abb. 66 Dekonvolutierte Spektren von EV D68 3C^{Pro} ohne Inhibitor (**A**), mit schnell reversiblen (**B** und **C**) bzw. langsam reversiblen Inhibitor (**D**). Nur bei sehr fest bindenden Inhibitoren ist unter denaturierenden Bedingungen ein Protein-Inhibitor-Komplex sichtbar, entsprechend der Summe der Massen des Proteins und des Inhibitors.

Die Messung der unmodifizierten EV D68 3C^{Pro} zeigt im dekonvolutierten Massenspektrum die mit den Berechnungen übereinstimmende Masse von 21263 Da. Kleinere Peaks um 21300 Da stammen aus Oxidationsprodukten der Protease. Anfällige Positionen sind diverse Cysteine und Methionine, die im tryptischen Verdau identifiziert werden konnten. Frisch exprimiertes Protein zeigt nur einen einzigen Peak bei 21263 Da und wird durch Zusatz des Reduktionsmittels DTT geschützt. Kovalent-reversible Inhibitoren mit schneller Kinetik wie das 3-Formylbenzamid **1** und Cyanessigsäureester **8** zeigen unter denaturierenden Bedingungen im MS keine Bindung an die Protease. Stabilere Protein-Inhibitor-Komplexe mit langsamer Kinetik wie bei **13** lassen eine massenspektrometrische Detektion zu.

Ketonitril



Cyanessigsäureamide



Malonsäureesterderivate

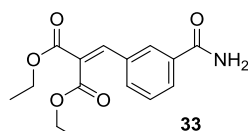
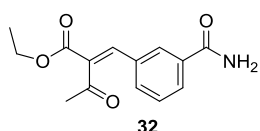
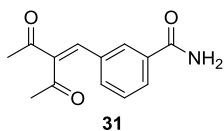
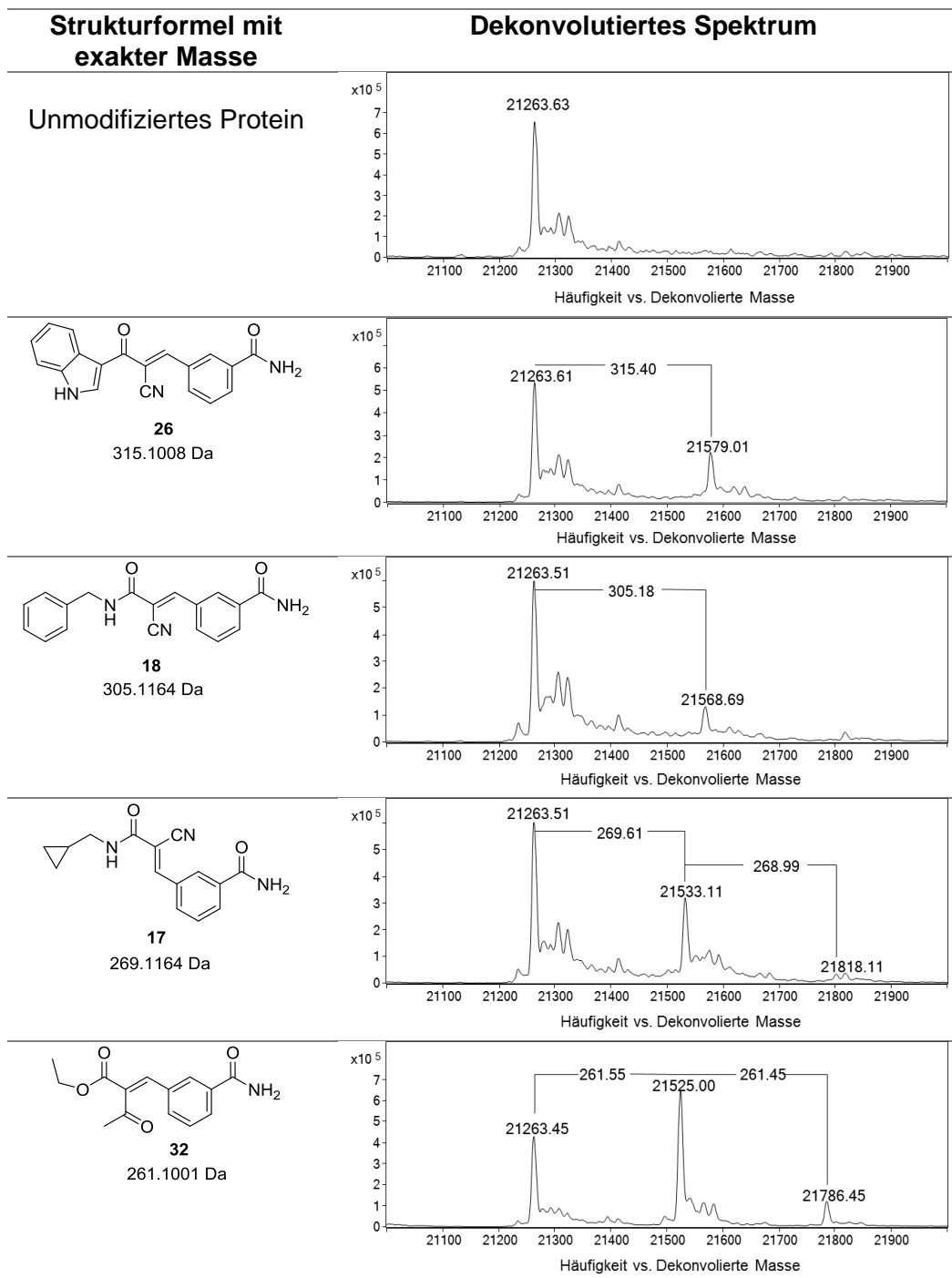


Abb. 67 Übersicht von Inhibitoren mit detektierbarer Modifikation des Proteins in der denaturierenden MS.

Für das β -Ketonitril **26**, die Cyanessigsäureamide **15-21** und die Malonsäureesterderivate **31-33** konnten die Massen der dazugehörigen Protein-Inhibitor-Komplexe identifiziert werden. Die Verbindungen **15,19** und **20** liefern nur Spuren von modifiziertem Protein, da sie nur eine schwache Affinität zur EV D68 3C^{Pro} zeigten und dafür in einer zu geringen Konzentration eingesetzt wurden.



Tab. 11 Ausgewählte dekonvolutierte Spektren. Die Proben wurden unter denaturierenden Bedingungen vermessen. Einige Inhibitoren binden mehrfach an das Protein.

Die Peakhöhe des modifizierten Proteins korreliert dabei mit der Affinität des Inhibitors zum Protein und der Stabilität des Protein-Inhibitor-Komplexes. Wenn also die Konzentration des Inhibitors seiner Affinität zum Zielprotein angepasst wird, beispielsweise durch Inkubation mit einer Konzentration entsprechend des IC_{50} -Wertes, so lassen sich theoretisch aus den Peakhöhen vergleichbare Zerfallskonstanten ableiten. Voraussetzung dafür ist, dass die Dekomposition des kovalenten Komplexes beim Übergang in die Gasphase vernachlässigbar klein oder zumindest für alle Inhibitoren gleich stark ist.

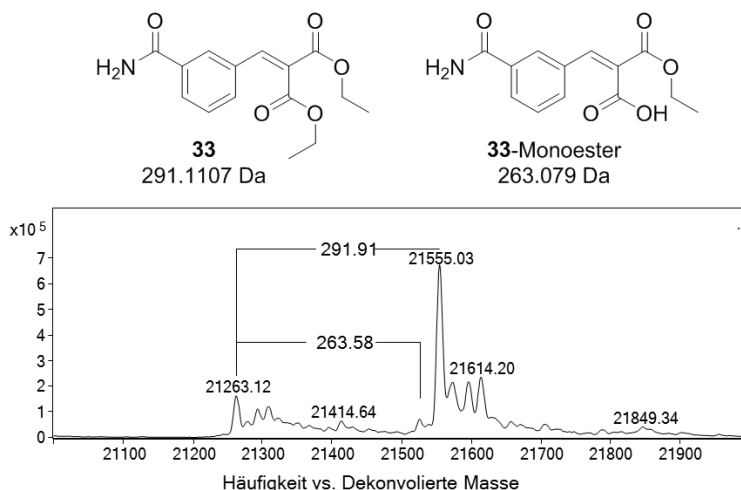


Abb. 68 Im dekonvolvierten Spektrum von **33** sind Spuren von gespaltenem Diethylester detektierbar.

Für das Diethylmalonat **33** konnte zu einem geringen Anteil partiell gespaltenes Monoester gebunden an das Protein gefunden werden. Wahrscheinlich wurde der exponierte Rest aber erst nach Bindung an das Protein im sauren HPLC-Milieu abgespalten, denn die freien Säuren zeigten im FRET-Assay keine Affinität. Malonsäurederivate sind ebenfalls dafür bekannt zu decarboxylieren. Diese Abspaltung tritt vorwiegend im basischen Milieu bei Disäuren und Monoestern auf. Die direkte Decarboxylierung bei α,β -ungesättigten Malonesterderivaten mit konjugierten aromatischen Systemen verläuft nur sehr langsam, vermutlich auch bedingt durch sterische Effekte.^[177] Für die hier synthetisierten Verbindungen konnte keine Decarboxylierung beobachtet werden. Bei **31** wurde dagegen massenspektrometrisch nachgewiesen, dass ein Acylrest abgespalten wird.

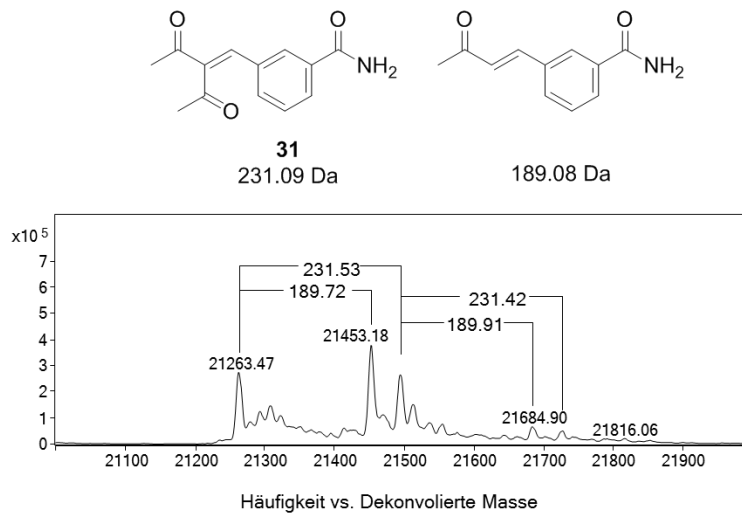


Abb. 69 Das dekonvolutierte Spektrum von **31** zeigt auch die Massendifferenz des desacylierten Inhibitors.

Denkbar ist, dass nach Bindung des Inhibitors an die 3C Protease ein nukleophiler Angriff an den ungebundenen Carbonylkohlenstoff erfolgt. Der Angriff an das aktiviertere, im Oxoanionloch stabilisierte Carbonyl erfolgt vermutlich aufgrund sterischer Hinderung nicht. Anschließend wird Essigsäure abgespalten und das Enolat des Inhibitors wieder protoniert.^[178]

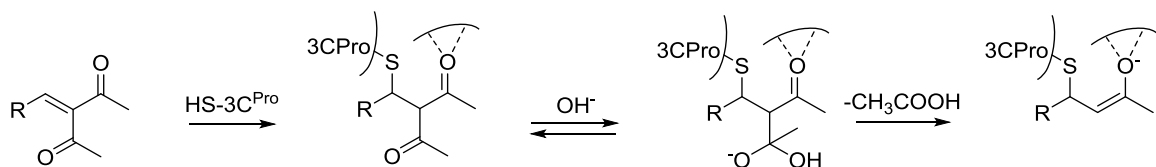


Abb. 70 Angenommener Mechanismus der Desacylierung von **31**.

Tryptischer Verdau

Zwar lässt sich sowohl in der denaturierenden MS als auch in der Nativen MS eine Bindung an das Zielprotein beweisen, doch über den spezifischen Ort der Bindung können aus den dekonvolvierten Spektren keine Rückschlüsse gezogen werden. Docking-Studien und der postulierte Mechanismus legen nahe, dass die Bindung am Cystein des aktiven Zentrums erfolgt. Drei Inhibitoren zeigten im Spektrum eine mehrfache Bindung an das Zielprotein und damit eine verminderte Selektivität. Das betrifft die Malonesterderivate **31** und **32** und zu einem geringeren Ausmaß das Cyanessigsäureamid **17**.

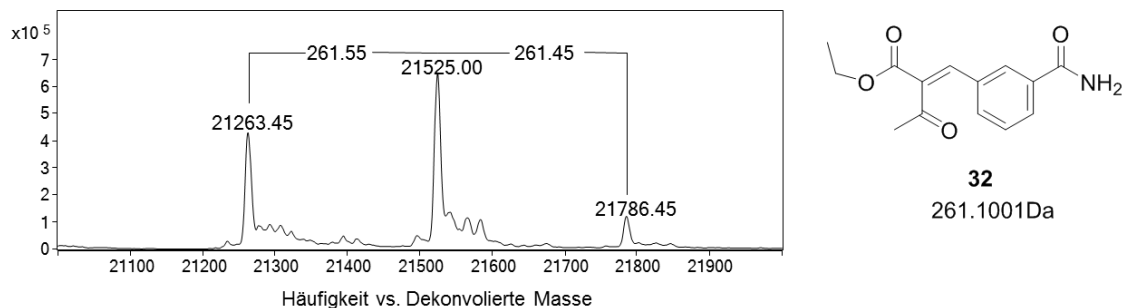


Abb. 71 Dekonvolviertes Spektrum von EV D68 3C^{Pro} mit mehrfach bindendem Inhibitor **32**.

Daher stellt sich die Frage, ob und wie es möglich ist, für bestimmte Cysteine selektiv Inhibitoren zu entwickeln. Im Bereich der Proteomics zielt man darauf ab, selektiv die Funktion von Enzymen vor dem Hintergrund komplexer Proteome mittels kovalenter Modifikation von Aminosäuren des aktiven Zentrums zu beeinflussen. Es wurden bereits Sonden entwickelt, die fast ausschließlich an ihr Zielprotein binden, obwohl es einen großen Überschuss an anderen nukleophilen Aminosäureresten gibt. Die ersten Versuche wurden mit Halomethyl- und Acyloxymethylketonen gemacht, um Caspasen zu charakterisieren. Selektivität für bestimmte Enzyme und die Verringerung der Reaktivität erreichte man durch den Einbau dieser Kopfgruppen in spezifische Peptidrückgrate. Die Suche nach weniger reaktiven Kopfgruppen lieferte Maleimide und Iodoacetamid. Endständige Alkine und Michael-Akzeptoren und auch andere tragen aber leider bis jetzt immer noch das Risiko von Nebenreaktionen.^[179] Für lysosomale Cysteinproteasen wurde dieser Ansatz mit der Entwicklung von Vinylsulfonen und Epoxid-basierten Elektrophilen verfolgt. Aber auch hier zeigte sich nur eine unzureichende Selektivität durch das angefügte Peptid bzw. die peptidomimetische Struktur.^[180] Immerhin kann über die Steuerung der Elektrophilie eine Reaktivität mit Serinen oder Lysinen weitgehend zurückgedrängt werden. Außerdem sind die modifizierbaren Cysteine tatsächlich vorwiegend diejenigen, die für Regulation und Katalyse verantwortlich sind, da sie häufig exponiert sind und eine erhöhte Nukleophilie aufweisen.^[181] Doch eine Selektivität kann sich erst im Zusammenspiel mit Aminosäuren des aktiven Zentrums ergeben, wobei die Möglichkeiten der Interaktion fragmentartiger Inhibitoren dabei nur begrenzt sind. Ob die Entwicklung von selektiven kleinen Molekülen mit elektrophiler Kopfgruppe überhaupt zu realisieren ist, bleibt demnach abzuwarten.

In der Sequenz der EV D68 3C^{Pro} liegen ein zweites Cystein sowie verschiedene Lysine und Tyrosine vor. Die Nukleophilie des Schwefels ist deutlich höher als bei den genannten Amino- und Hydroxy-Funktionen. Das Thiol des Cysteins besitzt einen pKs-Wert von 8, während der von Lysin gerade einmal bei 10.5 liegt.^[182] Daher ist es wahrscheinlicher, dass mehrfach bindende Inhibitoren unspezifisch das zweite Cystein außerhalb des aktiven Zentrums statt Lysinen angreifen. Für irreversible Inhibitoren lässt sich der spezifische Ort der Bindung leicht über einen tryptischen Verdau des Zielproteins nachweisen. Trypsin ist eine Serinprotease, die bevorzugt Peptidbindungen nach basischen Aminosäuren wie Arginin und Lysin schneidet. Folgt Prolin in der Sequenz oder gibt es saure Funktionen in unmittelbarer Nähe, ist die Peptidbindung mitunter proteasestabil.^[183] Die Peptidbruchstücke werden anschließend über C18-Säulen chromatographisch aufgetrennt und massenspektrometrisch untersucht. Über spezifische Fragmentierungsmuster in MS/MS-Experimenten lassen sich die Peptide der ursprünglichen Protein-Sequenz zuordnen. Modifikationen durch irreversible Inhibitoren werden durch entsprechenden Massenzuwachs des spezifischen Peptids erkannt. Einige Protein-Inhibitor-Komplexe erwiesen sich unter denaturierenden Bedingungen in der MS als sehr stabil. Ob diese kovalent-reversiblen Komplexe auch einen tryptischen Verdau überleben, wurde für Cyanessigsäureester **13**, Cyanessigsäureamid **16**, das β -Ketonitril **26** und die Malonsäureesterderivate **31** und **32** untersucht.

Im Programm MassHunter, das zur Auswertung der MS-Daten verwendet wurde, gehen nur die Peptide in die Berechnung der Sequenzabdeckung ein, die über passende MS/MS-Massen abgesichert wurden. Sind die MS/MS-Signale zu klein oder nicht vorhanden, wirkt sich das auf den erreichten Prozentsatz aus. In diesen Fällen wurden die Spektren manuell auf die exakten Massen der fehlenden Peptidbruchstücke, gegebenenfalls mit Modifikationen, untersucht. Bis auf den C-terminalen His-Tag und sehr kleine Spaltprodukte wie einzelne Aminosäuren oder Dipeptide wurden so die fehlenden Sequenzen identifiziert.

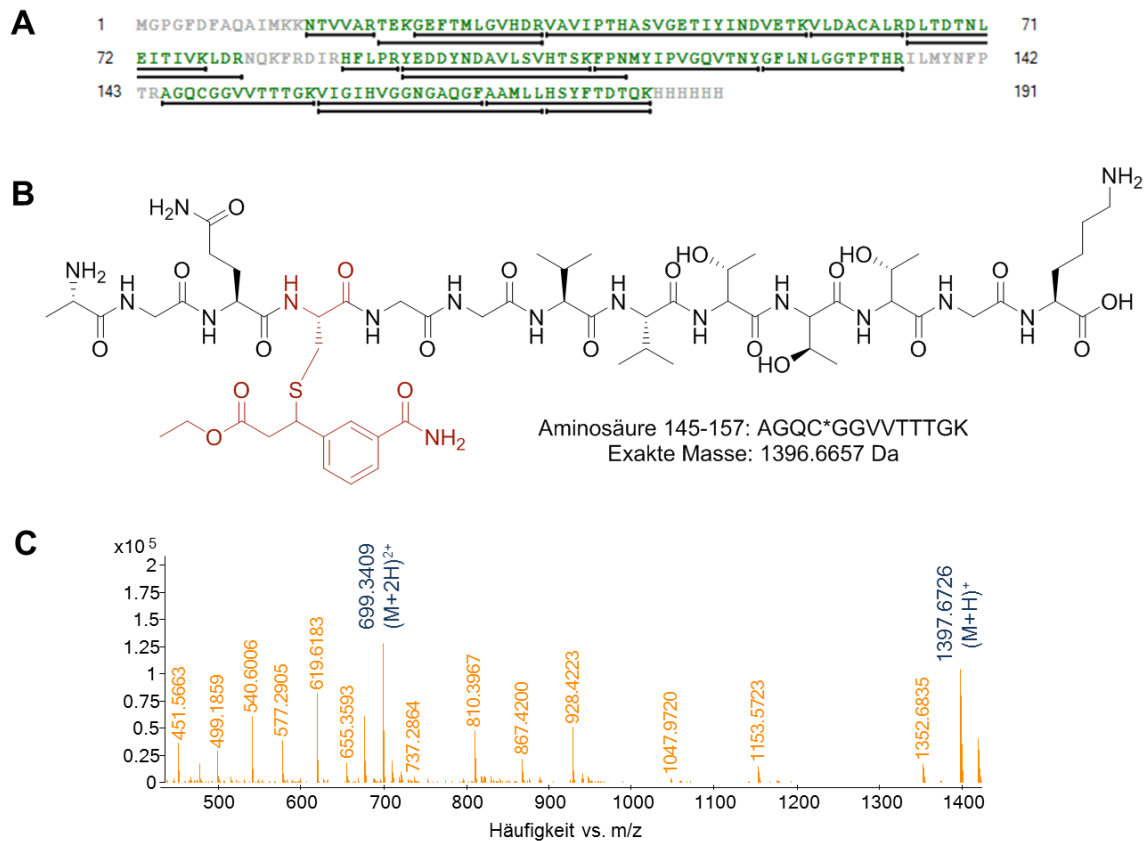


Abb. 72 Tryptischer Verdau von EV D68 3C^{Pro} inkubiert mit **13**. **A** 6h tryptischer Verdau liefern 81% Sequenzabdeckung in MS/MS-Experimenten. **B** Struktur des mit **13** modifizierten Peptidbruchstücks. **C** Zoom ins MS-Spektrum. In blau die hochaufgelösten Massen, die dem modifizierten Peptidbruchstück entsprechen.

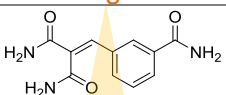
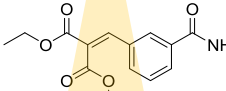
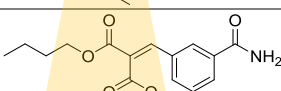
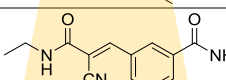
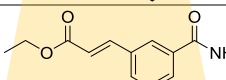
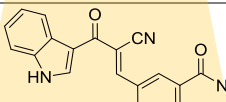
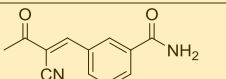
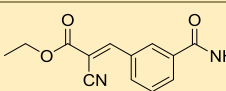
Der unsubstituierte Michael-Akzeptor **13** wurde als charakteristischer und selektiver Cysteinprotease-Inhibitor ausgewählt und untersucht. Nach dem tryptischen Verdau wurde ein modifiziertes Peptid entdeckt, dass das Cystein des aktiven Zentrums enthält. Das zweite Cystein, sowie andere potentiell nukleophile Aminosäurereste wie Lysin wurden von **13** nicht angegriffen. Die Malonsäureesterderivate **31** und **32** banden an beide Cysteine der Protease. Für **31** konnte eines der beiden Cysteinbruchstücke nicht gefunden werden. Aufgrund der hohen Sequenzabdeckung und dem Fehlen von Modifikationen an anderen nukleophilen Zentren wurde davon ausgegangen, dass die Malonsäureesterderivate immerhin Cystein-selektiv sind. Auch in diesem Experiment wurde die desacylierte Form von **31** gebunden an Peptidbruchstücke identifiziert. Das Cyanessigsäureamid **16** zeigte in den MS-Versuchen zur Reversibilität nur eine einfache Modifikation des Proteins. Im tryptischen Verdau dagegen waren beide Cysteine modifiziert, was durch die hohen eingesetzten Inhibitorkonzentration bedingt sein kann. Vergleich man die Peakhöhen der modifizierten Peptidbruchstücke miteinander, kam man zu dem Schluss, dass die Inhibitoren in den untersuchten Fällen hauptsächlich an Cys₁₄₇ des aktiven Zentrums gebunden waren. Voraussetzung dafür war die Annahme, dass alle Peptidbruchstücke eine vergleichbare Ionisation aufweisen. Durch die erhöhte Nukleophilie dieses Cysteins durch die Einbindung in die katalytische Triade war der bevorzugte Angriff durch die Michael-Akzeptoren aber wahrscheinlich.

Für das β -Ketonitril **26** konnten keine kovalenten Peptidmodifikationen detektiert werden. Der Protein-Inhibitor-Komplex ist demnach stabiler als beispielsweise mit anderen Cyanessigsäureestern oder β -Ketonitrilen, zerfällt aber schneller als ein Komplex mit den Malonsäureesterderivaten.

Sättigungsexperimente

Während in den durchgeführten Experimenten zur Klassischen Protein MS nur mithilfe einer fixen Konzentration an Inhibitor auf das Vorliegen einer detektierbaren Proteinmodifikation unter denaturierenden Bedingungen getestet wurde, liefern Sättigungsexperimente genauere Informationen über das Ausmaß der Reversibilität und ermöglichen eine Quantifizierung.

Wird das Protein mit einem deutlichen Überschuss an Inhibitor inkubiert und anschließend dialysiert oder chromatographisch aufgetrennt, so kann es nur bei Vorliegen einer irreversiblen oder langsam reversiblen Bindung vollständig gesättigt werden. Ansonsten läge immer ein bestimmter Teil unmodifizierten Proteins vor.

	sehr langsam reversibel	% nicht-modifiziertes Protein
39		<1
33		<1
34		3
16		17
13		24
26		55
22		98
8		100
	schnell reversibel	

Tab. 12 Prozentualer Anteil nicht-modifizierten Proteins im dekonvolvierten Spektrum der Sättigungsexperimente. Die Inhibitoren sind nach steigender Reversibilität geordnet. **34** und **39** synthetisiert von Sabrina Lechnitz, **33** synthetisiert von Marisa Tügend.

Für die Malonsäureesterderivate konnte eine vollständige Sättigung des Proteins, überwiegend mit mehrfacher Bindung des Inhibitors an verschiedene nukleophile Positionen, gezeigt werden. Der Protein-Inhibitor-Komplex ist äußerst stabil und grenzt an einen irreversiblen Bindungsmodus. Das Cyanessigsäureamid **16** und das Zimtsäurederivat **13** modifizieren das Protein nur zu 17 bzw. 24% und das β -Ketonitril **26** liegt im mittleren Bereich mit 55%. Die Protein-Inhibitor-Komplexe mit β -Ketonitril **22** und Cyanessigsäureester **8** zerfallen praktisch vollständig in der LC/MS und zeugen von einer schnellen Reversibilität.

Die intrinsische Reaktivität der Michael-Akzeptoren liegt in der Elektrophilie der β -Position, die im Wesentlichen von den elektronenziehenden Eigenschaften der übrigen Reste und ihrer Fähigkeit zur Resonanzstabilisierung abhängt. Um die Reaktivität in eine messbare Größe zu überführen, kann die Reaktion des Elektrophils stellvertretend mit einem Modellnukleophil analysiert werden. Wie bereits erläutert gibt es auch in silico-Modelle wie den Elektrophilie-Index.

In dieser Arbeit wurden die Tieffeldverschiebungen der $^1\text{H-NMR}$ -Spektren als Maß für den Elektronenzug auf die β -Position gegenübergestellt. Elektronenziehende Reste in der chemischen Umgebung führen zu einer Entschirmung und die Signale treten bei höheren δ -Werten auf.

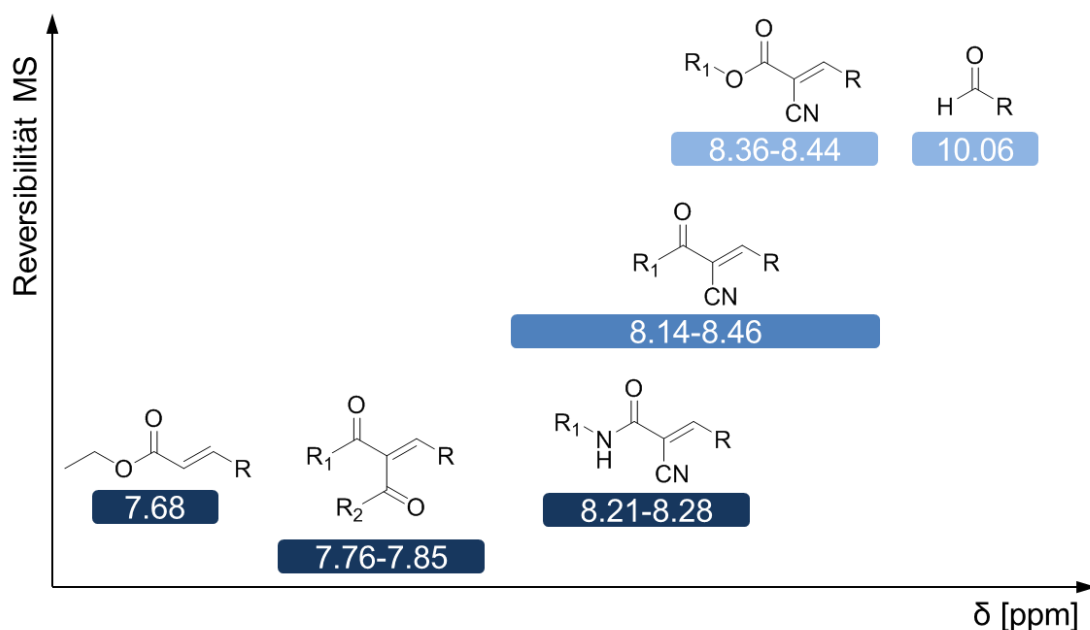


Abb. 73 $^1\text{H-NMR}$ -Tieffeldverschiebung der β -Position der Michael-Akzeptoren mit verschiedenen Resten in meta-Position des Benzamids R aufgetragen gegen die Reversibilität beobachtet in MS-Experimenten.

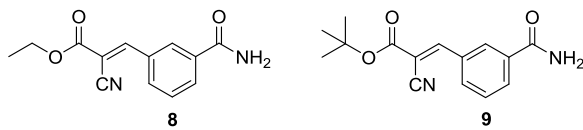
Während die Malonesterderivate, der unsubstituierte Michael-Ester **13** und die Cyanessigsäureamide einen ausgesprochen stabilen Komplex mit der EV D68 3C^{Pro} eingehen, sind die β -Ketonitrile moderat bis schnell reversibel. Die Cyanessigsäureester und der Aldehyd **1** stellen reversible Inhibitoren mit sehr schneller Kinetik dar. Die ¹H-NMR-Tieffeldverschiebungen lassen sich dabei mit dem Ausmaß der Reversibilität korrelieren. Je schwächer der Elektronenzug, desto weniger azid ist das Proton in α -Stellung, dessen Abspaltung die Rückreaktion der Michael-Addition initiiert. Die Grenzen zwischen pseudo-irreversibel und sehr schnell reversibel sind fließend. Ein Schwellenwert zwischen sehr langsamer und schneller Kinetik scheint etwa um 8.3 ppm Verschiebung des β -Protons zu liegen. Neben den elektronischen Verhältnissen müssen auch sterische Aspekte berücksichtigt werden. Möglicherweise bestehen bei den Malonesterderivaten und dem Indolderivat **26** kinetische Barriere für Rückreaktion durch großvolumige Reste in der Nähe der neu entstandenen kovalenten Bindung.

Wie in den Versuchen zur Bindungskinetik deutlich wurde, scheint zur Entwicklung eines schnell reversiblen Inhibitors eine Nitril-Gruppe notwendig. Versuche, dieses Element durch andere Elektronenzieher auszutauschen, führten entweder zu weitgehend inaktiven Verbindungen wie beim Fluor oder potente aber sehr langsam reversiblen Inhibitoren wie bei den Malonsäureesterderivaten. Sowohl die für die kovalente Reaktion mit dem Thiol des aktiven Zentrums benötigte Elektrophilie der β -Position als auch und die Azidität des α -Protons bedingen stark elektronenziehende Reste. Ist der Elektronenzug zu schwach und unterschreitet eine Grenze von etwa 7.3 ppm, reduziert sich die Wahrscheinlichkeit eines nukleophilen Angriffs des Thiols. In einem Bereich von etwa 7.6 bis 8.33 ppm wird der Inhibitor kovalent gebunden aber durch die schwache Azidität des α -Protons wird die Rückreaktion stark verlangsamt. Hinzu kommt, dass größere Reste das Proton durch sterische Hinderung abschirmen können. Dabei ist die Mitwirkung des basischen Histidins der katalytischen Triade bei der Abstraktion des Protons prinzipiell denkbar. Ferner konnte festgestellt werden, dass vermutlich die Selektivität beim Austausch der Nitrilgruppe zu Carbonylen verloren geht. Die Entwicklung reversibler Inhibitoren mit ausreichender Selektivität erfordert daher ein sehr feines Abstimmen der Struktur und Elektrophilie des Michael-Akzeptors auf das Zielprotein.

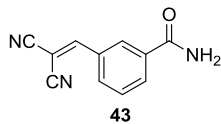
Native Protein-MS

Die Cyanessigsäureester, das Malonsäuredinitril **43**, das Sulfon **27** und die übrigen β -Ketonitrile zeigten keine kovalente Modifikation des Proteins im dekonvolutierten Spektrum unter klassischen denaturierenden Bedingungen. Um massenspektrometrisch eine Bindung der schnell reversiblen Inhibitoren an die EV D68 3C^{Pro} nachzuweisen, müssen hier die Messbedingungen derart verändert werden, dass die dreidimensionale Proteinoberfläche mitsamt der nicht-kovalenten Wechselwirkungen auch beim Übergang in die Gasphase erhalten bleiben.

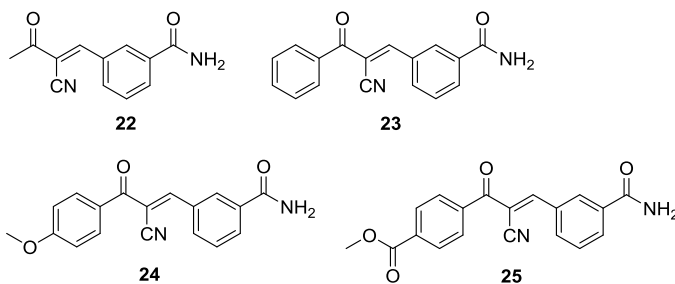
Cyanessigsäureester



Malonsäuredinitril



Ketonitrile



Sulfone

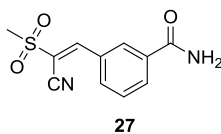


Abb. 74 Übersicht schnell reversibler Inhibitoren. Der Protein-Inhibitor-Komplex ist nur unter nativen Bedingungen im MS detektierbar.

Diese milden Bedingungen werden in der Nativen MS verwirklicht. Volatile Puffersysteme wie Ammoniumcarbonat oder Ammoniumacetat stabilisieren das Protein. Die pH-Werte liegen im neutralen bis schwach basischen Bereich. Auf Säurezusatz wird verzichtet, was dazu führt, dass die Signale deutlich schwächer ausfallen. Die Quellenparameter sind hinsichtlich niedriger Temperaturen des Trocknungsgases und der Quelle angepasst. Spannungen werden so niedrig gewählt, dass sie gerade ausreichend für einen Transport der Ionen zum Detektor sind, aber keine

Fragmentierungen auslösen oder nicht-kovalente Bindungen auseinanderreißen. Das erfordert viele Optimierungsläufe, denn niedrige Temperaturen und Spannungen bedeuten auch ein schlechteres Elektrospray, was in kleinen, schlecht aufgelösten Signalen resultiert. Der Übertragung der nicht-kovalenten Bindungen der Inhibitoren, wie sie auch in Lösung vorliegen, und der Vermeidung von falsch negativen Zerfällen und falsch positiven Addukten liegt hier eine besondere Bedeutung bei.^[184] Im Übergang zur Gasphase werden enthalpische Wechselwirkungen verstärkt, während entropische geschwächt werden.^[185] Die Stärke elektrostatischer Anziehungskräfte ist neben der Ladung und dem Abstand der Moleküle zueinander indirekt proportional zur Dielektrizitätskonstante des Mediums. Die Bindungstasche eines Proteins weist, verglichen mit der solvatisierten Oberfläche, eine niedrigere dielektrische Umgebung auf.^[176] Werden in der ESI-Quelle Solvensmoleküle verdampft, verstärkt sich dieser Effekt zusätzlich. Der Energiegewinn aus lipophilen Kontakten ist entropisch bedingt und spielt durch Verdampfen des Solvens keine Rolle mehr. Daher können überwiegend auf diesen Anziehungskräften beruhende Interaktionen nur selten in der Nativen MS beobachtet werden. Da die Bindung der hier bearbeiteten Fragmente vorwiegend enthalpischer Natur ist, sollte eine Detektion des Protein-Inhibitor-Komplexes möglich sein.

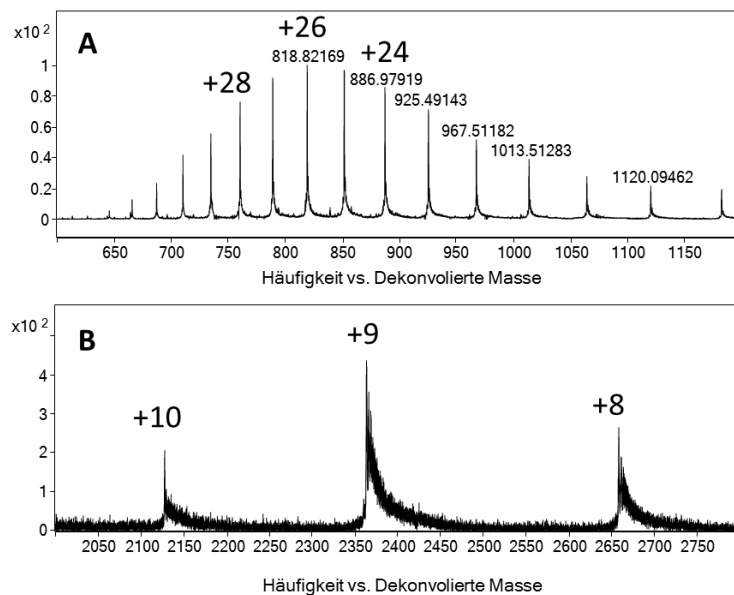


Abb. 75 Vergleich eines denaturierten und nativen Massenspektrums von EV D 68 3C^{Pro}.

Das Rohspektrum der nativen MS unterscheidet sich deutlich von dem der klassischen, denaturierenden MS. Es gibt weniger Peaks, also einen kompakteren Bereich der Ladungsverteilung, und die Peaks sind zu größeren Massen, also niedrigeren Ladungszahlen verschoben. Das liegt daran, dass im intakten, gefalteten Protein viele Peptidseitenketten nicht lösungsmittel exponiert sind, sodass weniger als die übliche eine Ladung pro 100 Da am Protein vorliegen. Außerdem sind die Peaks in der Regel breiter durch nicht vollständig abdissoziierte Lösungsmittel- und Puffermoleküle.^[186]

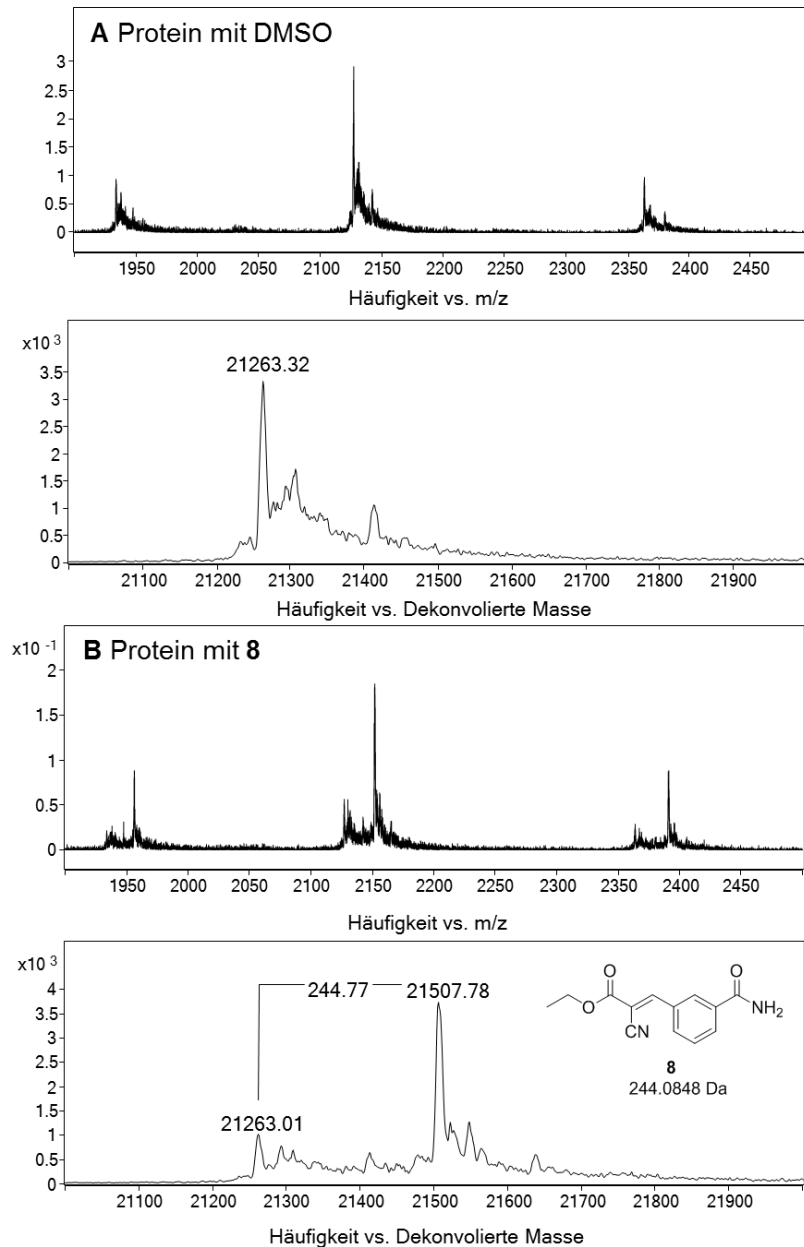


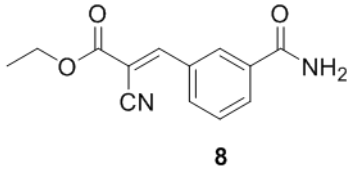
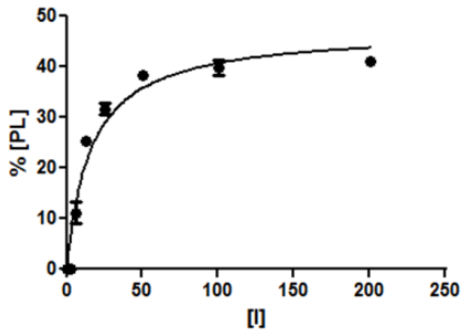
Abb. 76 Auszug aus dem Nativen Rohspektrum und dekonvolutiertes Spektrum ohne Inhibitor (A) und mit sichtbaren Proteinmodifikationen durch **8** als Beispiel für einen schnell reversiblen kovalenten Inhibitor (B).

Unter geeigneten Bedingungen ließ sich für alle untersuchten, schnell reversiblen kovalenten Inhibitoren eine Bindung an die EV D68 3C^{Pro} beweisen. Da die Messbedingungen in der Regel für jede Protein-Inhibitor-Paarung optimiert werden müssen und sich geringfügig voneinander unterscheiden, ist es nicht sinnvoll Vergleiche zwischen den Auftretshäufigkeit der Protein-Ligand-Komplexe anzustellen. Trotzdem ist die Intensität dieses Peaks Ausdruck eines Gleichgewichtsprozesses zwischen freiem Protein und Ligand und Protein-Ligand-Komplex und abhängig von der Affinität des Inhibitors. Ob das Gleichgewicht dem in Lösung entspricht, ist umstritten, denn die verlustfreie Übertragung der Vorgänge zwischen Protein und Ligand in Lösung in die Gasphase ist kritisch. Die Ermittlung von vergleichbaren Dissoziationskonstanten über Native MS ist dennoch möglich und wurde für Cyanessigsäureester **8** durchgeführt. Praktisch bedeutet das, dass Proteinproben mit unterschiedlichen Ligand-Konzentrationen in der Nativen MS vermessen werden und verschieden starke Intensitäten des PL-Komplexes liefern, analog der Verschiebung des Gleichgewichts in Lösung. Dafür müssen freies Protein und Protein-Ligand-Komplex eine vergleichbare Ionisation aufweisen, wovon bei kleinen, fragmentartigen Bindern auszugehen ist. Die Peakintensität des PL-Komplex kann aus der Dekonvolution der einzelnen Ladungszuständen abgeleitet werden. In der Regel wird er als prozentualer Anteil der Summe der gesamten Proteinsignale ausgedrückt. Zur Bestimmung von K_D -Werten von ca. 10-200 μM eignen sich 10 μM Proteinlösungen. Niedrigere Proteinkonzentrationen sind nicht empfehlenswert, da die ohnehin eher schwachen Signale im Rauschen verschwinden. Höhere Proteinkonzentrationen sind meist durch ihre Verfügbarkeit limitiert.

Aus dem Massenwirkungsgesetz ergibt sich die Berechnung der Dissoziationskonstante K_D aus den Konzentrationen des freien Proteins (P), des freien Liganden (L) und des Protein-Ligand-Komplexes (PL). Die unbekannte Konzentration des freien Liganden kann über die Gesamtkonzentration des Liganden (L_0) berechnet werden.

$$K_D = \frac{P * L}{PL} = \frac{P(L_0 - PL)}{PL}$$

Die Auftragung des PL-Komplexes gegen die InhibitorKonzentration liefert eine Sättigungskurve, die mithilfe nicht-linearer Regression in einen K_D -Wert überführt werden kann.^[187-188]

Inhibitor	[PL] vs. [I]	K _D -Wert (nicht-lineare Regression)
 <p style="text-align: center;">8</p>		<p style="text-align: center;">15.99 ± 2.4 μM</p>

Tab. 13 Bestimmung des K_D-wertes mittels Nativer MS. [PL] Protein-Ligand-Komplex in %, [I] in μM; K_D-Wert ermittelt über nicht-lineare Regression in Graphpad Prism.

Für Cyanessigsäureester **8** wurde mithilfe der nicht-linearen Regression ein K_D-Wert von 16 μM ermittelt, der damit fast 30fach höher ist als der im FRET-Assay bestimmte IC₅₀-Wert. Obwohl es sich um ein vorwiegend enthalpisch bindendes Fragment handelt ist fraglich, ob die Geschehnisse in Lösung naturgetreu in der Gasphase abgebildet werden können.

Die Sättigung der Kurve tritt schon bei etwa 40% Protein-Ligand-Komplex auf. Das bedeutet, dass mehr als die Hälfte des Proteins nicht gebunden wird. Das kann verschiedene Ursachen haben: Zum einen gibt die UV-metrische Bestimmung der Proteinkonzentration keinen Aufschluss über den tatsächlich aktiven Proteinanteil, der nicht oxidiert und korrekt gefaltet ist. Außerdem ist die Auswahl der Quellenparameter in der Hinsicht kritisch, dass bei höheren Kollisionsenergien und angelegten Spannungen Protein-Ligand-Komplex beim Übergang in die Gasphase wieder zerfällt. Eine Optimierung der Parameter ist in der Regel für jede Protein-Inhibitor-Paarung notwendig. Eine wichtige Stellschraube ist dabei die angelegte Kollisionsenergie, die zur Desolvatation des Proteins beiträgt und damit direkt die Signalintensität beeinflusst. In diesem Zusammenhang wurde für einige Inhibitoren die kollisionsaktivierte Dissoziation (collisionally activated dissociation, CAD) näher untersucht. Als gutes Mittelmaß zwischen Signalintensität und Stabilität der PL-Komplexe erwies sich eine Kollisionsenergie um 20 V. Auch wenn die Affinitäten nicht mit in Lösung bestimmten K_D-Wert übereinstimmen, bleibt dennoch die schnelle Messung und der geringe Verbrauch an Ligand und Protein, der eine Hochdurchsatztestung erlaubt, ein unbestrittener Vorteil der MS-basierten Bestimmung. Ein Vergleich und die Reihung der Inhibitoren nach Aktivität innerhalb einer Methode sollte zuverlässige Ergebnisse bringen.

Zusammenfassung

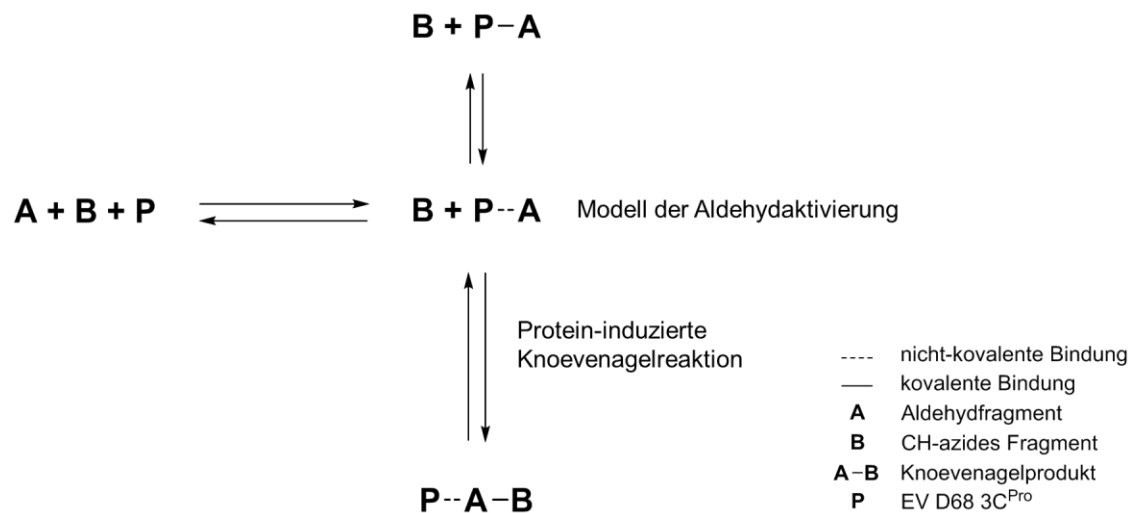
Alle in dieser Arbeit untersuchten Knoevenagelprodukte waren kovalent-reversible Inhibitoren der EV D68 3C^{Pro}. Massenspektrometrische Untersuchungen, Verdünnungsassays und Sättigungsexperimente gaben Aufschluss über die Stabilität der Protein-Inhibitor-Komplexe und ihre Dissoziationsgeschwindigkeiten. Es wurde herausgefunden, dass α -substituierte Michael-Akzeptoren die gesamte Bandbreite von sehr langsam reversiblen Addukten bis hin zu Protein-Inhibitor-Komplexen mit sehr schneller Kinetik abbilden. Einige Komplexe zeigten sich so stabil, dass selbst harsche Bedingungen in der klassischen Protein-MS und ein tryptischer Verdau überstanden wurden. Sehr schnell reversible Protein-Inhibitor-Komplexe ließen sich dagegen nur über Native MS abbilden. Die kovalente Bindung an das Cystein des aktiven Zentrums konnte über den tryptischen Verdau und LC/MSMS-Analyse sehr stabiler Protein-Inhibitor-Komplexe nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse bestärken den postulierten Bindungsmodus und zeigten die Selektivität der Verbindungen.

Diese Kinetik war auch übertragbar auf die Reaktion mit den konkurrierenden Nukleophilen DTT und Glutathion und nahm damit Einfluss auf einige Messergebnisse, wie die mittels FRET-Assay bestimmten IC₅₀-Werte oder das aus den ITC-Daten abgeleitete Bindungsprofil durch Verminderung der freien Inhibitorkonzentration. Auch die verminderte Wirkung in Zellen könnte mit der Adduktbildung mit Glutathion zusammenhängen. Die Kinetik der Protein-Inhibitor-Komplexe korrelierte dabei mit der Stärke des Elektronenzugs im Knoevenagelprodukt. Je stärker elektronenziehend die Substituenten der ehemals CH-aziden Verbindung waren, desto schneller reversibel war der Protein-Inhibitor-Komplex mit dem Knoevenagel-Produkt. Allerdings waren diesem Modell Grenzen gesetzt. Ein zu geringer Elektronenzug aktivierte die β -Position nicht ausreichend für den nukleophilen Angriff des Cysteins und ein zu starker Elektronenzug führt zu instabilen Produkten, die sich leicht in einer Retro-Knoevenagel-Reaktion zersetzen.

Die zuerst widersprüchlichen inhibitorischen Aktivitäten gemessen im FRET-Assay mit isolierter Protease und den zellulären Assays ließen sich durch die Retro-Knoevenagel-Reaktion, unterschiedliche Kinetiken der Protein-Inhibitor-Komplexe und die Reaktion mit Konkurrenz-nukleophilen wie Glutathion erklären. Dass sich hier die langsam reversiblen Inhibitoren mit niedriger off-rate als effektiver erwiesen haben, unterstreicht die Wichtigkeit der verlängerten Residenzzeit am Zielprotein und ihrem Nutzen zur Vorhersagbarkeit der in vitro/in vivo-Korrelation.

Aus den gewonnenen Erkenntnissen wird geschlussfolgert, dass für einen potenten und selektiven kovalent reversiblen Inhibitor ein starker elektronenziehender Rest in α -Position des Benzamid-Michael-Systems, der eine Resonanzstabilisierung ermöglicht, erforderlich ist. Eine chemische Verschiebung von 7.8 ppm für das β -Proton im ¹H-NMR gewährleistet dabei sowohl eine ausreichende Aktivierung für den Angriff des Cysteins als auch die Unterdrückung der Retro-Knoevenagelreaktion. Optimal für die zelluläre Wirkung ist ein Protein-Inhibitor-Komplex mit sehr langsamer Kinetik. Verwirklicht wurden diese Aspekte im Malonsäurediethylester-Derivat **33**, das einen potenten, selektiven und nicht toxischen Inhibitor der EV D68 3C^{Pro} darstellt.

Protein-induzierte Knoevenagelreaktionen



Wird das Aldehydfragment mit der EV D68 3C Protease inkubiert, stellt sich ein Gleichgewicht zwischen freiem Protein und Aldehyd und Protein-Aldehyd-Komplex ein, das über eine Dissoziationskonstante K_D charakterisiert werden kann. Der Protein-Aldehyd-Komplex entsteht im ersten Schritt durch eine Annäherung beider Moleküle und ist von der Ausbildung nicht-kovalenter Interaktionen wie Wasserstoffbrückenbindungen und van-der-Waals-Wechselwirkungen geprägt. Im zweiten Schritt entsteht die kovalente Bindung durch den nukleophilen Angriff des Cysteins im aktiven Zentrum unter Bildung eines Thiohalbacetals. Die Bildung des Thiohalbacetals und des Protein-Aldehyd-Komplexes ist reversibel und unterliegt einer schnellen Kinetik.^[189-190] Wird ein Gemisch aus Aldehyd, CH-azidem Fragment und Protein inkubiert, kann die Proteinoberfläche katalytisch wirksam sein und die Bildung des Knoevenagelprodukts aus Aldehyd und CH-azidem Fragment durch eine Aktivierung über Wasserstoffbrückenbindungen beschleunigen. Die Entstehung des Knoevenagelprodukts ohne Protein als Hintergrundreaktion wird wesentlich bestimmt durch die Reaktivität des Aldehyds, der Azidität der Fragmente, des Lösungsmittels und seines pH-Werts.

Mechanismus und Reaktionsbedingungen der Knoevenagelreaktion

Die Knoevenagel-Reaktion wurde zuerst 1894 in den Chemischen Berichten erwähnt, wo sie sich auf die mit Diethylamin katalysierte Reaktion zwischen Formaldehyd und Diethylmalonat bezog. Heute wird der Begriff weiter gefasst und beschreibt die Kondensation von Aldehyden oder Ketonen mit CH-aziden Verbindungen in Anwesenheit von Katalysatoren, üblicherweise schwachen Basen, zu Alkyliden- oder Benzyliden-Produkten. Die CH-azide Verbindung wird dabei durch zwei elektronenziehende Reste aktiviert.^[110]

Zum mechanistischen Ablauf der Reaktion gibt es mehrere Theorien. Am gängigsten ist die Bildung eines Imins oder Iminiumsalzes mit der katalytischen Base vor dem nukleophilen Angriff der CH-aziden Verbindung. Dieser Mechanismus wird unter anderem für die Reaktion der Malonsäureesterderivate postuliert.^[191] Dem gegenüber steht der Hann-Lapworth-Mechanismus, bei dem die Base ausschließlich die CH-azide Verbindung deprotoniert, die dann den Carbonyl-Kohlenstoff angreift. In diesem Falle entstehen streng genommen Aldol-Intermediate, die größtenteils isolierbar sind. Bei Malonsäuredinitril schließt sich dagegen sofort eine Dehydratation via eines viergliedrigen Übergangszustandes an. Da für Knoevenagel-Reaktionen mit Malonsäuredinitril, Cyanessigsäureamiden und Cyanessigestern gezeigt werden konnte, dass die Reaktionsrate durch Säurezugabe abnimmt, trifft hier vermutlich der Hann-Lapworth-Mechanismus zu. Trotzdem scheint der Mechanismus stark vom gewählten Katalysator und dem Lösungsmittel abzuhängen. So bevorzugen beispielsweise primäre Amine die Bildung des Imins. Die Deprotonierung der CH-aziden Verbindung zum Enolat ist in stark polaren Lösungsmitteln begünstigt und der Eliminierungsschritt in protischen Lösungsmitteln erschwert. Aprotische, polare Lösungsmittel wie DMF und DMSO liefern hohe Ausbeuten des Knoevenagelprodukts. Neben diesen Faktoren hängt die Reaktionsrate und Ausbeute natürlich noch von der sterischen Hinderung der CH-aziden Verbindung ab. Dallesandro et al. ^[192] berechneten und vermaßen das Gibbs-Energie-Profil der Knoevenagel-Reaktion von Acetylaceton mit Benzaldehyd in Methanol katalysiert durch Piperidin. Sie betonen, dass die Reaktion über ein Iminium-Ion verläuft, dessen Bildung der geschwindigkeitsbestimmende Schritt sei.

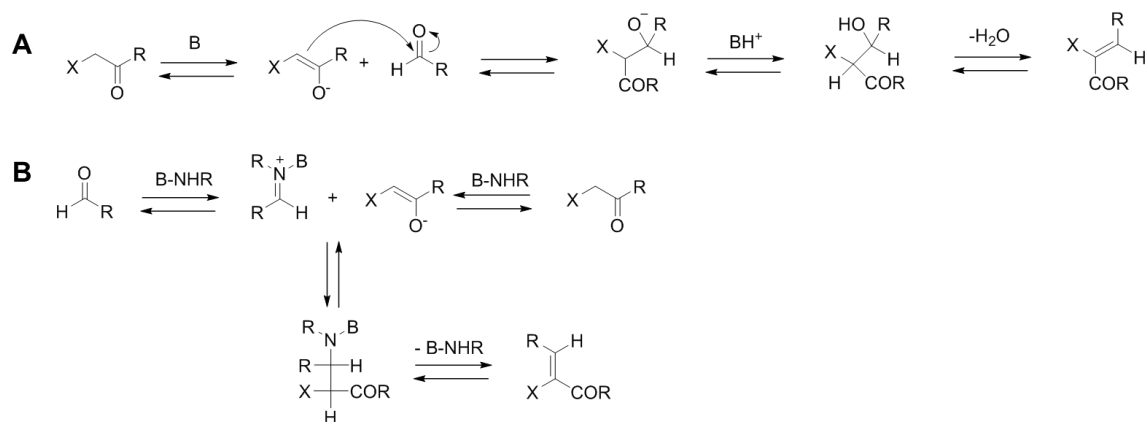


Abb. 77 Mechanismus der Knoevenagel-Reaktion nach Hann-Lapworth (A) und über die Ausbildung von Iminium-Ionen (B).

Die in dieser Arbeit synthetisierten Knoevenagelprodukte wurden in der Regel in Ethanol unter Katalyse von Piperidin, teilweise unter Zusatz von Eisessig, bei Temperaturen um 60°C hergestellt. Die Abtrennung von Wasser aus dem Reaktionsgemisch über Molekularsiebe oder eine Dean-Stark-Apparatur erhöhte die Ausbeute. Erstaunlich war, dass die Reaktion auch im Wässrigen bei Raumtemperatur ablaufen kann. Im Rahmen der „Green Chemistry“-Initiative wurde in jüngster Zeit umfassend an geeigneten Reaktionsbedingungen geforscht. Beschrieben sind beispielsweise Knoevenagelreaktionen in Wasser mit Aminen, Phasentransferkatalysatoren, anorganischen Salzen, Lehm, Pflanzenextrakten oder völlig ohne Basenzusatz oder Katalysator, die in kurzer Zeit weitgehend quantitativ ablaufen.^[193-195]

Daher ist es wahrscheinlich, milde Bedingungen definieren zu können bei denen eine Protein-katalysierte Fragmentligationsreaktion beobachtbar ist. Solche bioorthogonalen chemischen Reaktionen interferieren nicht mit biologischen Prozessen und haben hohe Umsatzgeschwindigkeiten unter physiologischen Bedingungen. Die Reaktanden müssen selektiv und weitgehend inert gegenüber vielen funktionellen Gruppen sein, die in Zellen im Überschuss vorliegen. Die Fragmentligationen folgen einer Kinetik zweiter Ordnung und ihre Reaktionsrate ist abhängig von der Konzentration beider Reaktionspartner. Daher müssen Bedingungen gewählt werden, die eine ausreichend hohe und detektierbare Produktbildung ermöglichen ohne die Aktivität des Proteins durch pH-Verschiebung oder Präzipitation bei hohen Fragmentkonzentrationen zu beeinträchtigen.^[196]

Modell der Aldehydaktivierung

Die Überlegungen zu einem Modell der Protein-katalysierten Knoevenagel-Reaktion können mithilfe von Molecular Modelling visualisiert werden. 3-Formylbenzamid fungiert als in der S1-Tasche verankerte Sonde. Der Aldehyd selbst stellt einen moderaten reversiblen Inhibitor dar und ist mit ca. 149 Da recht klein und reaktiv. Für die kleinen CH-aziden Verbindungen konnte durch Docking keine bevorzugte Lage und wichtige Interaktion identifiziert werden, sodass sie voraussichtlich keinen definierten Bindungsmodus einnehmen. Die Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen zwischen dem Aldehyd und Amidgruppen des Oxoanionlochs des Proteins reduziert die Elektronendichte am Carbonylkohlenstoff. Ein nukleophiler Angriff durch die CH-azide Verbindung wäre dann durch die polarisierte Bindung begünstigt. Fragmente, die in benachbarte Taschen passen, können sich dem Aldehydfragment ausreichend annähern, sodass eine Reaktion stattfindet.

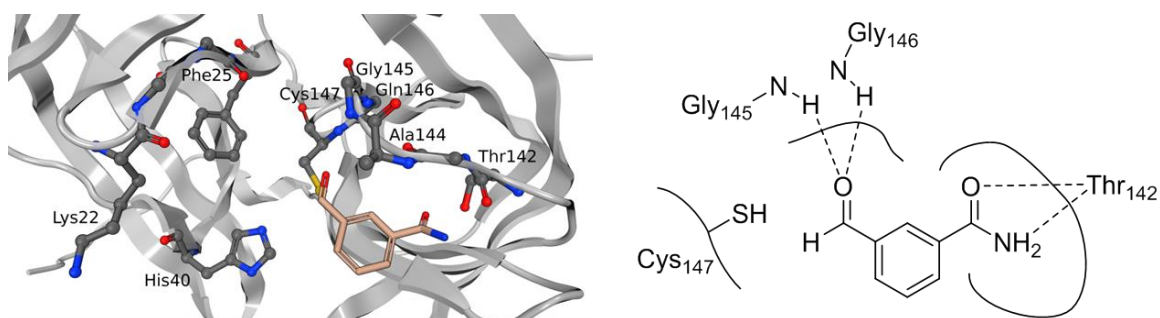


Abb. 78 Molecular Modelling: Bindung des Aldehyd-Fragments **1** im aktiven Zentrum der EV D68 3C^{Pro}. (3ZVG) Durch Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen zu Amidgruppen des Oxoanionlochs wird die Carbonylbindung stärker polarisiert.

Dazu müssen einige Voraussetzungen erfüllt sein. Zum einen sollte der Aldehyd in seiner freien, nicht-hydratisierten Form vorliegen. Bei aromatischen Aldehyden mit elektronenziehenden Resten in meta-Position ist durch die Resonanzstabilisierung nur ein Bruchteil hydratisiert.^[197] LC/MS- und NMR-Daten von 3-Formylbenzamid weisen ebenfalls nicht auf die Hydratform hin. Für an Chymotrypsin bindende Peptidaldehyde konnte gezeigt werden, dass sowohl der freie Aldehyd als auch seine Hydratform im

aktiven Zentrum nicht-kovalent fixiert werden können.^[198-199] Fraglich ist allerdings, ob die kovalente Bindung durch die schnelle Reversibilität mithilfe der angewendeten spektroskopischen Methoden erfasst werden kann. Zumindest geben diese Experimente den Hinweis, dass der nicht-kovalente Protein-Aldehyd-Komplex im Gleichgewicht vorliegt.

Außerdem muss der Carbonylsauerstoff im Oxoanionloch Wasserstoffbrückenbindungen mit Aminosäuren des Proteinerückgrats eingehen können. Aldehyde werden hier nicht als optimale Analoga des Übergangszustandes der Substratspaltung angesehen, denn das durch Angriff des Cysteins entstehende Thiohalbacetal zeigt mitunter nicht in Richtung des Oxoanionlochs sondern zum Histidin der katalytischen Triade. Dass die korrekte Ausrichtung des Aldehyds dennoch wahrscheinlich ist, zeigt die Kristallstruktur von Leupeptin in Papain.^[200-201] Im Fall des 3-Formylbenzamids wird die Annahme der Stabilisierung im Oxoanionloch durch die starre Struktur des Benzamids und die bevorzugte Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen zu Thr₁₄₂ bestärkt.

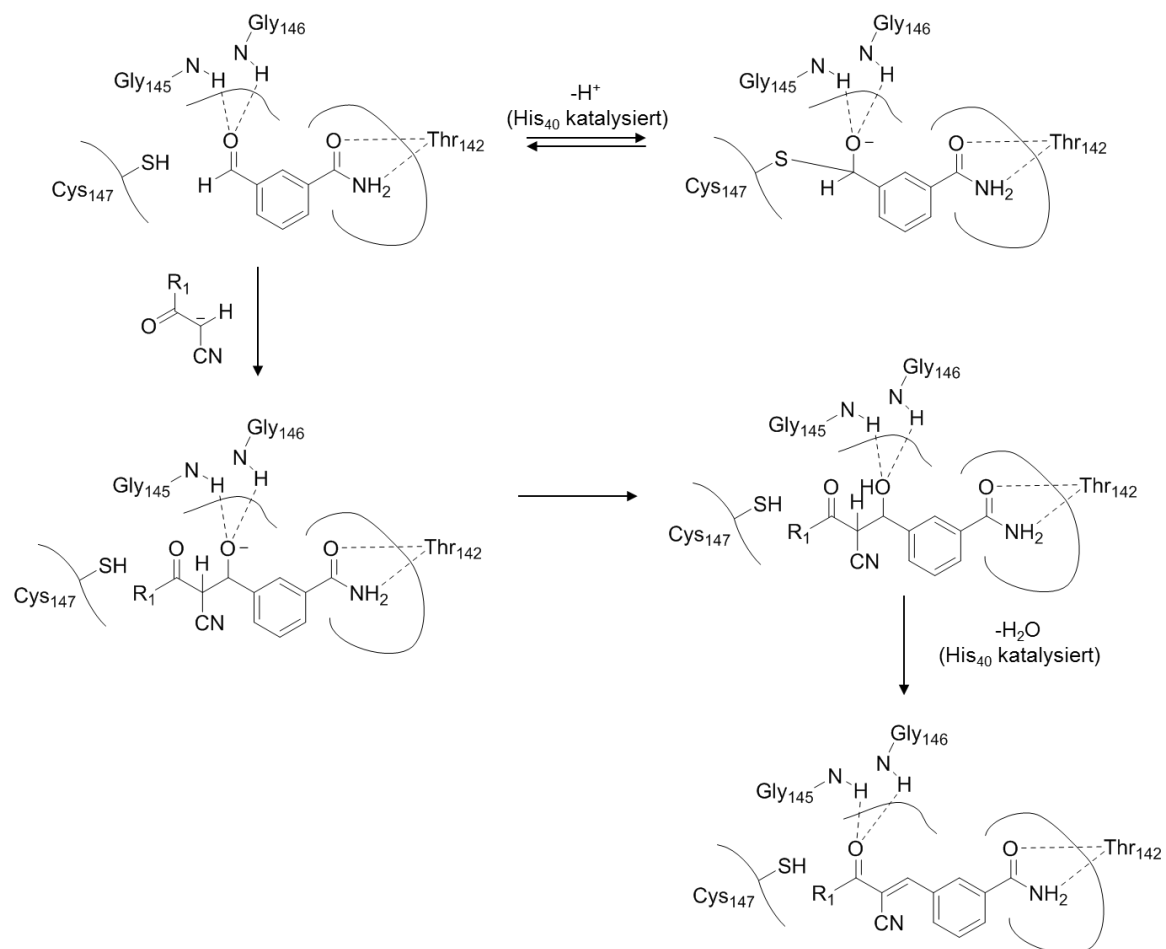


Abb. 79 Postulierter Mechanismus der Protein-induzierten Knoevenagelreaktion. Nach Angriff der CH-aziden Verbindung wird das entstehende Anion im Oxoanionloch stabilisiert. Die Wasserabspaltung läuft vermutlich konzertiert nach E2-Mechanismus (oder E1_{cb}) ab und wird möglicherweise vom Histidin der katalytischen Triade begünstigt.

Nach nukleophilem Angriff des CH-aziden Fragments wird das entstehende Anion und anschließend auch die protonierte Form im Oxoanionloch stabilisiert. Die Abspaltung des Wassers folgt vermutlich einem E1_{cb}-Mechanismus. Denkbar ist hier durchaus auch ein E2-Mechanismus, also eine konzertierte, einstufige Abspaltung von Wasser aus dem Aldolprodukt, was durch das His₄₀ der katalytischen Triade begünstigt würde. Theoretisch liefert diese Protein-induzierte Reaktion ausschließlich das passende E-Isomer.

Möglicherweise liegt der Protein-induzierte Effekt auch darin begründet, dass His₄₀ oder das Thiolat des Cys₁₄₇ die Deprotonierung des CH-aziden Fragments begünstigen. Ebenfalls vorstellbar ist der Angriff des Thiolats an der Carbonylfunktion des CH-aziden Fragments. Das entstehende Anion würde genauso im Oxoanionloch stabilisiert und das CH-azide Fragment so in unmittelbarer Nähe zum in S1-bindenden Aldehydfragment positioniert.

Protein-induzierte Knoevenagel-Reaktion an der EV D68 3C^{Pro}

Um 3-Formylbenzamid nicht-kovalent im aktiven Zentrum binden zu können, muss das Protein in einer nativen Form vorliegen. Dazu gehört auch, dass die Aminosäurereste im aktiven Zentrum den für die proteolytische Aktivität nötigen Protonierungszustand einnehmen. Die Aktivität der EV D68 3C^{Pro} wurde daraufhin in Puffern mit pH 4 bis 10 im FRET-Assay untersucht.

Puffer	pH	Aktivität
Ammoniumacetat 100 mM/AcOH/1mM EDTA	4	<1%
BisTris 100 mM/1mM EDTA	6	60%
HEPES 100 mM/ 1mM EDTA	8	100%
CHES 100 mM/ 1mM EDTA	10	24%

Tab. 14 Proteolytische Aktivität der EV D68 3C^{Pro} im FRET-Assay bei verschiedenen pH-Werten.

Das pH-Optimum der Protease liegt im neutralen bis leicht basischen Bereich. Im Sauren ist EV D68 3C^{Pro} komplett inaktiv. Eine Methode um die Stabilität eines Proteins in einem Puffer zu beurteilen ist der Thermofluor-Assay. Dabei lagert sich bei sukzessiver Temperaturerhöhung ein lipophiler Fluoreszenzfarbstoff an durch Entfaltung des Proteins exponierte, hydrophobe Bereiche an und eine Fluoreszenz kann detektiert werden. Mit zunehmender Temperatur aggregiert das Protein und der Farbstoff dissoziiert ab. Der Peak der Fluoreszenz entspricht dabei dem Schmelzpunkt des Proteins und korreliert mit seiner Stabilität. Je höher der ermittelte Schmelzpunkt, desto stabilisierender wirken sich der Puffer, seine Additive und der pH auf das Protein aus. Für EV D68Pro wurde ein Thermofluor-Assay durchgeführt, der eine vollständige Denaturierung der Protease bei pH-Werten < 5 durch Fehlen eines Fluoreszenzpeaks anzeigte. Im stärker Basischen ab pH 9.5 war eine Erniedrigung des Schmelzpunktes von 40°C auf < 38°C des Proteins beobachtbar, was für eine deutliche Destabilisierung

spricht. Eine Protein-katalysierte Reaktion kann demnach am ehesten bei pH 6-8 beobachtet werden.

Im ersten Schritt sollte überprüft werden, ob für 4 verschiedene CH-azide Fragmente eine Knoevenagel-Reaktion in den Puffern pH 4 bis 10 abläuft. Auf den Zusatz von Katalysatoren wie Piperidin wurde verzichtet. Allerdings ist CHES ein sekundäres Amin mit einem pK_S -Wert von etwa 9 und damit theoretisch in der Lage Imine zu bilden und die Reaktion selbst zu katalysieren. Der Aldehyd und die CH-aziden Fragmente wurden in Konzentrationen von 100 μM eingesetzt, eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend über LC/MS-QToF quantifiziert. Der Zusatz von 10 μM EV D68 3C^{Pro} sollte erste Hinweise auf eine mögliche Protein-Katalyse liefern.

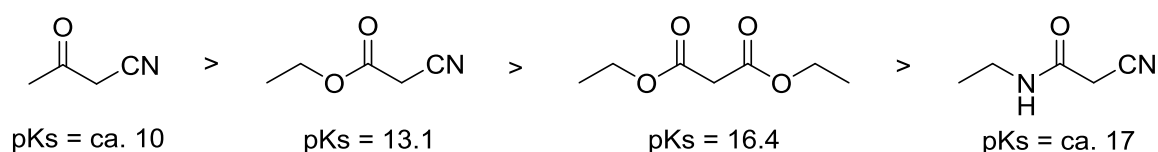


Abb. 80 Eingesetzte CH-azide Fragmente und gemessene pK_s -Werte in DMSO (Bordwell pK_a table). Für 3-Oxobutanitril und 2-Cyanoacetamid wurden die pK_s -Werte anhand ähnlicher Verbindungen geschätzt.

Das β -Ketonitril und der Cyanessigsäureester sind verhältnismäßig azide und reagieren bereits im neutralen bis schwach sauren pH-Bereich. Bei pH 10 nimmt die Reaktionsrate dagegen wieder ab, weil der Eliminationsschritt von Wasser verlangsamt wird. Für das β -Ketonitril ist eine deutliche Abhängigkeit der Reaktion von aktivem Protein erkennbar. Das am schwächsten azide Fragment Cyanessigsäureamid liefert nur bei pH 10 mit 3-Formylbenzamid Spuren von Knoevenagel-Produkt.

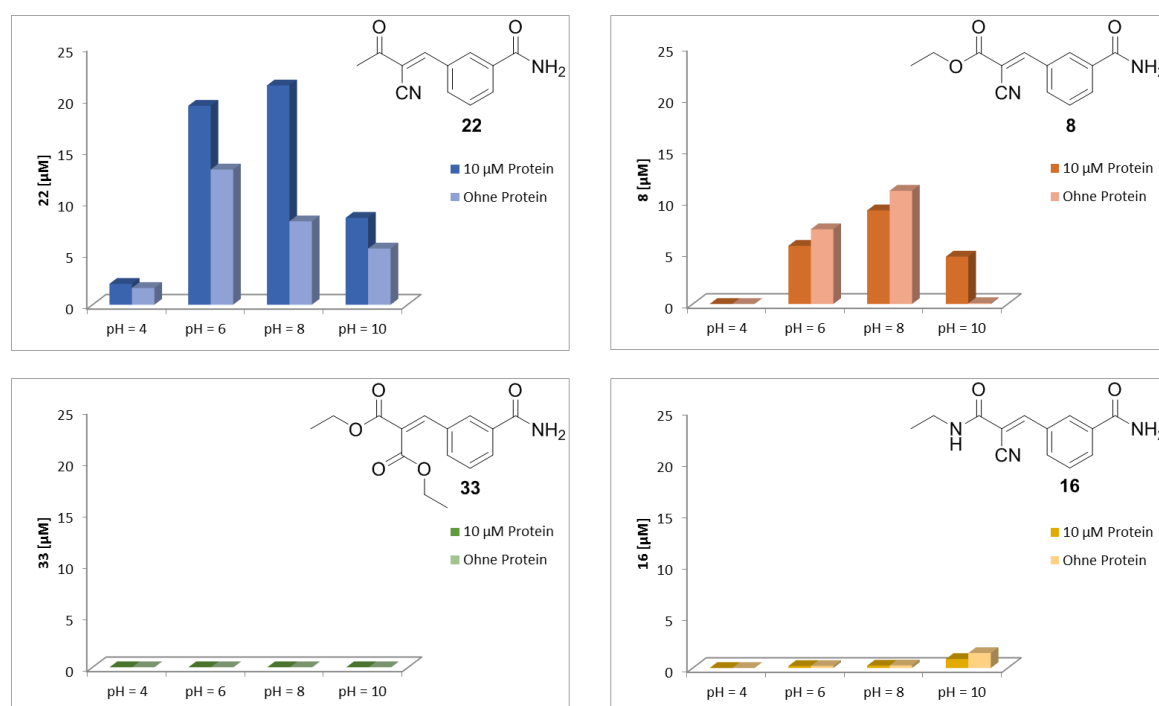


Abb. 81 Konzentration des entstandenen Knoevenagel-Produkts bei verschiedenen pH-Werten ohne oder mit 10 μM EV D68 3C^{Pro}.

Dagegen konnte wider Erwarten bei Diethylmalonat keine Reaktion beobachtet werden, obwohl diese durch die Stabilisierung der Enol-Form über einen intramolekularen 6-gliedrigen Übergangszustand erleichtert werden sollte. Die schwache Azidität und sterische Aspekte könnten die Ursache dafür sein. Daraufhin wurde eine Katalyse über die Bildung von Iminium-Ionen mit Piperidin, Piperazin und DABCO erwogen, doch auch hier war kein Knoevenagel-Produkt detektierbar. Dabei wurde im MS-Spektrum sowohl nach den Spaltprodukten des Esters als auch nach kovalenten Proteinmodifikationen gesucht.

Da die Protease bei pH 8 in HEPES/EDTA-Puffer die höchste Aktivität zeigte und schon nach nur einer Stunde Knoevenagel-Produkt detektierbar war, wurde unter diesen Bedingungen ein kleines FRET-basiertes Fragment-Screening durchgeführt. Ziel war es, 3-Formylbenzamid **1** im Sinne einer Fragmentligationsreaktion zu verknüpfen um höher affine Inhibitoren zu gewinnen. Die Konzentration des verankernden Aldehyds **1** wurde dabei so gewählt, dass die Restaktivität der Protease etwa 80% beträgt. Das stellt sicher, dass ein ausreichender Teil des Aldehydfragmentes gebunden vorliegt und ermöglicht zudem eine sichere Erkennung überadditiver Effekte. Der Aldehyd **1** ist mit einem IC_{50} von 48 μ M ein moderater Inhibitor der EV68 3C Protease. Die Fragmente allein zeigen in der eingesetzten Konzentration praktisch keine Inhibition. Ist die Restaktivität der Protease nach Inkubation mit der Fragmentkombination kleiner als die Summe der inhibitorische Wirkung der einzelnen Fragmente erwarten lässt, spricht man von einem überadditiven inhibitorischen Effekt. Dieser kann durch das gebildete Knoevenagelprodukt zustande kommen.^[202] Um das zu beweisen wurden die Assaylösungen massenspektrometrisch untersucht.

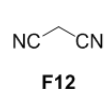
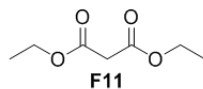
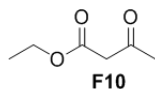
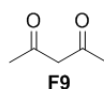
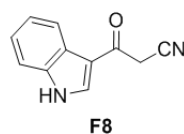
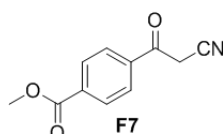
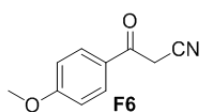
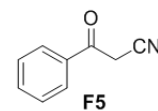
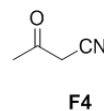
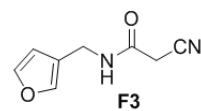
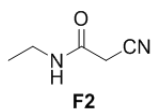
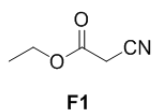
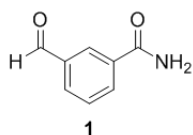
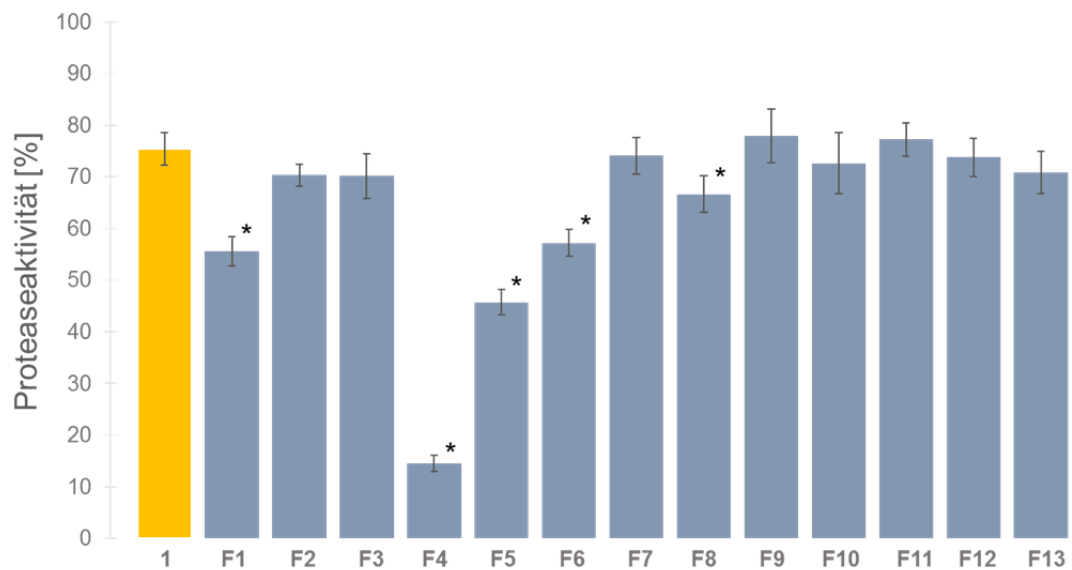


Abb. 82 Ergebnisse des FRET-Fragmentscreenings. Die Konzentration von **1** und **F1-F13** beträgt 19 μM . Das Aldehydfragment **1** verringert die Proteaseaktivität auf ca. 75% (gelb). Die Fragmente **F1-13** sind in den eingesetzten Konzentrationen nicht inhibitorisch wirksam (nicht dargestellt). Die Kombination aus **1** und den methylenaktiven Fragmenten **F1-13** kann zu einem überadditiven inhibitorischen Effekt führen (blau). Statistisch signifikante Unterschiede der Proteaseaktivitäten von **1** und der Fragmentkombination sind mit * markiert.

Fragmentkombination	Proteaseaktivität	t- Wert
1	75.4 ± 3.2 %	
F1 + 1	55.6 ± 2.8 %	8.1
F2 + 1	70.3 ± 2.1 %	2.3
F3 + 1	70.2 ± 4.3 %	1.7
F4 + 1	14.5 ± 1.5 %	29.9
F5 + 1	45.7 ± 2.4 %	12.8
F6 + 1	57.2 ± 2.6 %	7.6
F7 + 1	74.1 ± 3.6 %	0.5
F8 + 1	66.6 ± 3.5 %	3.2
F9 + 1	78.0 ± 5.2 %	-0.7
F10 + 1	72.6 ± 5.9 %	0.7
F11 + 1	77.2 ± 3.3 %	-0.7
F12 + 1	73.7 ± 3.7 %	0.6
F13 + 1	70.8 ± 4.0 %	1.5

Tab. 15 Statistische Auswertung der Ergebnisse des Fragmentscreens mithilfe des Zweistichproben-t-Tests. Der kritische t-Wert (df = 4, p = 0.05) beträgt 2.8. Besteht ein signifikanter Unterschied zwischen der Proteaseaktivität mit **1** und einer Fragmentkombination, ist der t-Wert fett markiert.

Sowohl für die Kombination mit den Cyanessigsäureamiden **F2** und **F3**, als auch für die Malonsäureesterderivate **F9-F11**, Malonsäuredinitril **F12** und Fluoraceton **F13** konnte keine verstärkte Inhibition beobachtet werden und im Massenspektrum wurden keine Knoevenagel-Produkte identifiziert. Vermutlich lief die Kondensationsreaktion hier nicht oder nicht in der gegebenen Zeit ab. Dagegen gab es deutliche überadditive inhibitorische Effekte bei Cyanessigsäureethylester **F1** und den β -Ketonitrilen **F4**, **F5** und **F6** und weniger ausgeprägt bei **F8**. β -Ketonitril **F7** reiht sich erstaunlicherweise nicht hier ein, obwohl sich die Fragmente recht ähnlich sind. Für die erstgenannten konnte massenspektrometrisch bewiesen werden, dass die Bildung des höherpotenten Knoevenagelprodukts für die stärkere Inhibition verantwortlich ist.

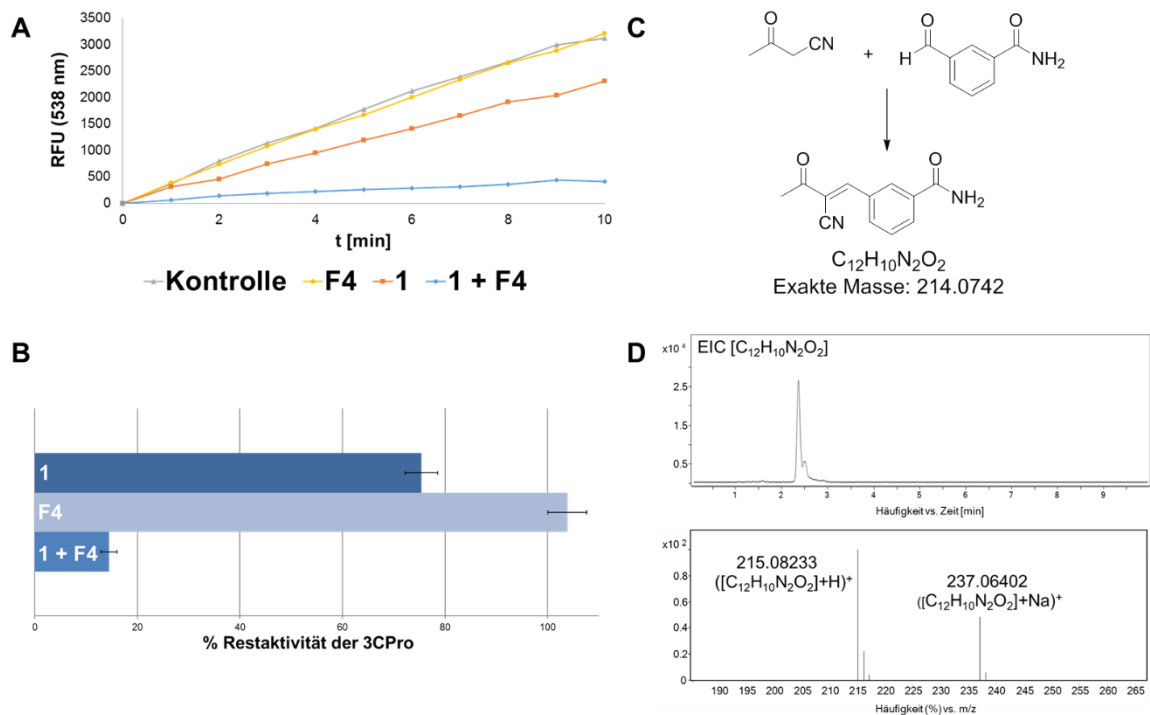


Abb. 83 F4 3-Oxobutannitril zeigt im FRET-Screening in Kombination mit 1 einen überadditiven inhibitorischen Effekt auf die 3C^{Pro}. **A** stellt die Messung der Fluoreszenz über die Zeit dar. Die DMSO-Kontrolle entspricht dem nicht inhibierten Enzym. Das CH-acide Fragment 3-Oxobutannitril allein ist nicht aktiv, die Konzentration von 1 wurde so gewählt, dass die Protease nur zu einem geringen Teil blockiert wird. Bei der Kombination beider Fragmente ist die gemessene Fluoreszenz deutlich verringert. **B** verdeutlicht den überadditiven inhibitorischen Effekt. **C** 3-Oxobutannitril und 1 reagieren in einer Knoevenagelreaktion zum potenten Inhibitor 22. **D** Die Entstehung des Knoevenagelprodukts in situ im FRET-Assay lässt sich mithilfe der Massenspektrometrie beweisen.

Wie deutlich sich überadditive Fragmentkombinationen in diesem Assay nachweisen lassen, hängt von der Affinität der gebildeten Knoevenagelprodukte ab. Bei diesem Versuchsaufbau wurden niedrige Konzentrationen von ca. 19 μ M für das Aldehydfragment 1 und das CH-azide Fragments gewählt. Daraus resultiert, dass maximal 19 μ M Inhibitor gebildet werden können. Zudem war die Inkubationszeit mit 1h recht kurz. Daher ließen sich hier nur besonders potente Inhibitoren nachweisen, dessen Bildungsreaktion schnell abläuft. Eine weitere Schwierigkeit könnte hier in der Detektion an das Protein gebundener Knoevenagelprodukte liegen, denn möglicherweise ist die Proteinkonzentration mit $< 1 \mu$ M zu niedrig und die Massensignale zu schwach um ein zuverlässig auswertbares dekonvolutes Spektrum zu erhalten.

Im nächsten Schritt sollte für die vorteilhaften Fragmentkombinationen untersucht werden, ob hier Protein-induzierte Reaktionen ablaufen oder die Bildung des Knoevenagel-Produkts auch ohne Protein im Assaypuffer stattfindet. Handelt es sich ausschließlich um eine Protein-induzierte, also von der Proteinoberfläche katalysierte Reaktion, ist sie selbstlimitierend, da der bereits vorhandene Inhibitor seine weitere Bildung autoinhibiert. Der Vorteil einer Protein-induzierten Reaktion besteht darin, dass praktisch nur eine Fragmentligation auftritt, wenn die einzelnen Fragmente optimal in nicht überlappenden, angrenzenden Bindungstaschen sitzen und ihre reaktiven Positionen so ausgerichtet sind, dass eine Verknüpfung stattfinden kann.

Die gebildeten Fragmentligationsprodukte binden demnach mit einer gewissen Affinität an das Protein. Für die in situ-gebildeten Produkte trifft das nicht unbedingt zu.^[203]

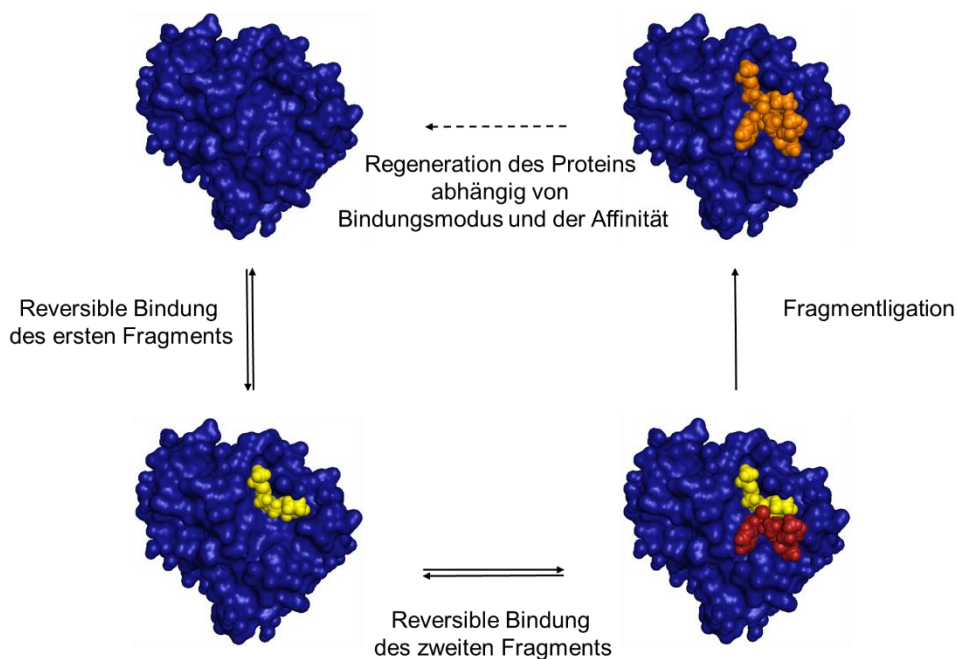


Abb. 84 Ist das gebildete Lignationsprodukt irreversibel oder hochaffin und fest bindend, kann kein freies Protein regeneriert werden, dass die weitere Bildung des Lignationsproduktes katalysiert. Die Quantifizierung des entstandenen Lignationsproduktes gibt also Aufschluss darüber, ob es sich um eine Protein-induzierte Reaktion handelt.

Für die im Screening potenteste Fragmentkombination aus 3-Formylbenzamid **1** und 3-Oxobutanitril **F4** wurde die Entstehung des Knoevenagelproduktes bei pH 8 über 90 Minuten im LC/MS-QToF verfolgt. Eine Konzentration von 10 μM der EV D68 3C^{Pro} und 100 μM 3-Formylbenzamid **1** stellten sicher, dass ein relevanter Anteil des Proteins mit **1** gebunden vorliegt. Das Gemisch wurde mit 50 μM CH-azidem Fragment bei Raumtemperatur inkubiert.

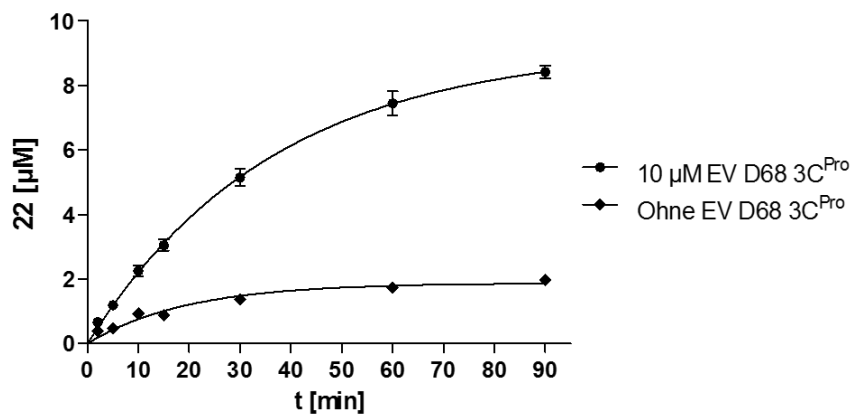


Abb. 85 Quantifizierung des Knoevenagelproduktes **22** aus 100 μM 3-Formylbenzamid und 50 μM 3-Oxobutanitril über LC/MS-QToF.

Nicht-lineare Regression liefert Maximalkonzentrationen von 9.2 μM bei Inkubation mit EV D68 3C^{Pro} und 1.9 μM ohne Protein und zeigt deutlich den katalytischen Effekt der Protease. Für die Reaktion von 100 μM 3-Formylbenzamid und 10 μM 2-Cyanoacetat konnte keine Protein-Induktion beobachtet werden. Mit und ohne Zusatz von EV D68 3C^{Pro} entstanden weniger als 1.5 μM Knoevenagelprodukt.

Vereinzelte Berichte von Protein-katalysierten Knoevenagelreaktionen fallen auf durch ihren hohen Anteil an organischen Lösungsmitteln wie DMSO oder DMF, sehr langen Reaktionszeiten von mehreren Tagen, erhöhten Temperaturen und einem hohen Überschuss CH-azider Komponente.^[204] Beschrieben ist auch eine künstliche Retroaldolase, die Knoevenagelreaktionen durch Iminbildung an einem zugänglichen Lysin-Rest in einer hydrophoben Tasche katalysieren kann.^[205] Diese eher unspezifische Katalyse ist hier unwahrscheinlich, da die Bildung des Knoevenagelprodukts **22** deutlich von der intakten Tertiärstruktur und proteolytischen Aktivität der EV D68 3C^{Pro} abhängt. Die Hintergrundreaktion trat bei pH 6-10 in relevantem Ausmaß auf und war bei pH 6 am stärksten. Wahrscheinlich war das Knoevenagel-Produkt **22** hier am stabilsten und die Retro-Reaktion wurde zurückgedrängt. Bei pH 10 lag etwa die Hälfte des CH-aziden Fragments mit einem pK_S von etwa 10 als Enolat vor und erleichtert so die Knoevenagel-Reaktion. Der Protein-induzierende Effekt ist am deutlichsten bei pH 8, denn hier lag nur ein Bruchteil des CH-aziden Fragments als Enolat vor und die Protease zeigte hier ihre größte Aktivität und Fähigkeit zur Katalyse.

Zusammenfassung

Es konnte gezeigt werden, dass die Knoevenagel-Kondensation das Repertoire der für die Fragmentligation nutzbaren bioorthogonalen, chemischen Reaktionen erweitert. Knoevenagelprodukte, die verbesserte Inhibitoren gegen die EV D68 3C^{Pro} darstellten, konnten hierbei aus der Kombination von 3-Formylbenzamid und niedermolekularen CH-aziden Fragmenten gewonnen und über massenspektrometrische Untersuchungen identifiziert werden.

Hervorzuheben ist dabei, dass die Reaktion in wässrigem Puffer mit einem DMSO-Anteil von 4% ohne Zusatz von Katalysatoren wie sekundären Aminen, bei Raumtemperatur und in kürzester Zeit abläuft. Die Reaktivität der CH-aziden Fragmente, ausgedrückt durch ihren pK_S-Wert, bestimmt dabei das Ausmaß der Knoevenagelreaktion in Puffer.

Der postulierte Mechanismus, dass die Polarisierung der Carbonylbindung durch Bindung an der Proteinoberfläche einen nukleophilen Angriff der CH-aziden Fragmente erleichtert und so eine Protein-induzierte Reaktion ermöglicht, ist wahrscheinlich zutreffend.

Experimenteller Teil

Allgemeines

Chemikalien

Alle verwendeten Chemikalien wurden von Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland), abcr GmbH (Karlsruhe, Deutschland), Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe, Deutschland), Alfa Aesar (Karlsruhe, Deutschland), Fluka (Seelze, Deutschland) und VWR International GmbH (Darmstadt, Deutschland) mit dem größtmöglichen Reinheitsgrad erworben und falls nicht anders beschrieben ohne weitere Aufreinigung verwendet. Lösungsmittel wurden, wenn angegeben, in der Lösungsmitteltrocknungsanlage MB-SPS 800 von MBRAUN GmbH getrocknet. Lösungsmittel für HPLC bzw. Massenspektrometrie wurden in den entsprechenden Reinheitsgraden verwendet. Reinwasser wurde über ein Milli-Q Wasseraufbereitungssystem von Merck Millipore aus Leitungswasser hergestellt. Deuterierte Lösungsmittel für die NMR-Spektroskopie wurden von Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe, Deutschland) und Deutero GmbH (Kastellaun, Deutschland) bezogen.

Methoden und Geräte

Dünnschichtchromatographie

Zur Dünnschichtchromatographie wurden mit Kieselgel 60 beschichtete Aluminiumplatten mit Fluoreszenzindikator (254 nm) von Merck KgaA (Darmstadt, Deutschland) verwendet. Die Detektion erfolgte mittels UV-Licht bei 254 oder 366 nm. Die Laufmittelgemische bestanden aus Methanol/DCM oder Ethylacetat/Hexan in verschiedenen Verhältnissen.

Mitteldruckflüssigchromatographie (MPLC)

Die Aufreinigung mittels MPLC erfolgte mit Biotage Isolera One und vorgepackten Biotage SNAP-Kartuschen. Sofern nicht anders angegeben, wurden HP Silica-Säulen mit angepassten Methanol/DCM Gradienten genutzt. Die Detektion erfolgte bei 254 und 210 nm.

Hochdruckflüssigchromatographie (HPLC)

Die Aufreinigung mittels HPLC erfolgte mit Agilent 1260 Infinity Binary LC, ausgestattet mit VP150/32 Nucleodur-C18 HTec, 5 µm Säule von Macherey-Nagel (Düren, Deutschland). Als Laufmittel diente ein Wasser-Acetonitril –Gemisch mit 0.1% TFA. Die Detektion erfolgt bei 210, 254 und 325 nm.

Hochdruckflüssigchromatographie/ESI-MS (LC-MS)

Reaktionskontrollen, Identitäts- und Reinheitsbestimmungen erfolgten mit Agilent 1100 LC/MS. Dazu wurde eine Phenomenex Luna C18 – Säule (3 µm, 100 Å, 4.6 x 100 mm) verwendet. Als Laufmittel diente ein Wasser (A) -Acetonitril (B) –Gemisch mit 0.1% FA und ein Gradient von 95/5 (A/B) auf 1/99 (A/B) innerhalb von 5.5 min bei einer Flussrate von 1 ml/min. Die Detektion erfolgt bei 210, 254 und 325 nm. ESI-MS-Spektren wurden im Positiv- und Negativmodus mit Fast Polarity Switching aufgenommen und mit Masshunter Workstation Software ausgewertet.

Hochauflösende Massenspektrometrie (HR-MS)

HR-MS-Spektren wurden mit einem Agilent 6550 iFunnel QToF aufgenommen, das an eine Agilent 1290 Infinity II UHPLC gekoppelt ist. Neben der Direktinjektion wurde eine ZORBAX Eclipse Plus C18 Säule (1.8 µm, 95 Å, 2.1 x 50 mm) von Agilent verwendet. Als Laufmittel diente ein Wasser/Acetonitril–Gemisch mit 0.1% FA. Die Referenzmassen 121.050873 Da und 922.009798 Da wurden zur internen Korrektur verwendet. Die Auswertung erfolgte mittels Masshunter Software und Find-by-Formula-Algorithmus für Proton- und Natriumaddukte.

Für Proteinspektren wurden die Proben an einer Jupiter C18 –Säule (5µm, 300 Å, 3 x 250 mm) von Phenomenex aufgetrennt und im ESI-MS vermessen.

IM-MS

Die Vorhersagen der Kollisionsquerschnitte, sowie die Drift-Zeiten der Na⁺-Addukte verschiedener Inhibitoren der EV D68 3C^{Pro} in Helium wurden von M. Grabarics (AG Pagel, Freie Universität Berlin, Institut für Chemie und Biochemie) bestimmt (MOBCAL [206-207]). Die für die Vorhersagen notwendigen energieminimisierten Konformationen stammen von S.Pach (AG Wolber, Freie Universität Berlin, Institut für Pharmazie) und Prof. Dr. G.Wolber (erstellt mit CORINA und SZYBKI, minimale 2Å Standardabweichung)

Kernresonanzspektroskopie

NMR-Spektren wurden mit einem Jeol ECP500- oder Bruker AVANCE500-Spektrometer aufgenommen. Die chemische Verschiebung δ ist in ppm angegeben und wurde auf das

Lösungsmittel referenziert. Sofern nicht anders vermerkt, wurden die Spektren in DMSO-d₆ gemessen. Die Auswertung der Spektren erfolgte durch die Software MestReNova 7 der Fa. Mestrelab Research.

Schmelzpunktbestimmung

Schmelzpunkte wurden mit einem Büchi B545 bestimmt.

Fluoreszenzspektrometrie

Fluoreszenzspektren und enzymkinetische Daten wurden mit TECAN Infinite M1000 gemessen. Dafür wurden 384 well Mikrotiter-Platten von Corning (Corning 3766, black with clear flat bottom, non-binding surface) genutzt.

Standardeinstellungen für die Generierung enzymkinetischer Daten:

21 kinetische Zyklen im Intervall von 1 min; Anregungswellenlänge 355 nm , Messwellenlänge 538 mit je 20 nm Bandbreite; Gain 100, 10 Flashes mit einer Frequenz von 400 Hz, 20 µs Integrationszeit, Z-Position ca. 22000 µm

Konzentrationsbestimmung von Proteinlösungen

Mithilfe des ProtParam-Tools (SIB, Swiss Institute of Bioinformatics) wurden auf Grundlage der Peptidsequenz theoretische Absorptionwerte einer 0.1%igen, entsprechend 1 g/l, Proteinlösung (Abs 0.1%) berechnet. Diese dienten nach Abzug der Basislinie des Lösungsmittels als Referenzwert. Die Absorption bei 280 nm wurde mit einem Nanodrop One Spektrophotometer von Thermo Fisher Scientific gemessen.

Bestimmung der Sequenzhomologie

Zum Sequenzabgleich wurde das SIM - Alignment Tool for protein sequences (SIB, Swiss Institute of Bioinformatics) genutzt. Die Peptidsequenzen entstammen den Kristallstrukturen 1CQQ und 3ZVG der Protein Data Bank (RCSB PDB).

Molecular Modelling und Docking

Molecular Modelling und Docking wurden durchgeführt von Robert Schulz und Szymon Pach (AG Wolber, Freie Universität Berlin, Institut für Pharmazie).

Die Proteinstruktur (PDB:3ZVG) sowie die Ligand-Konformationen wurden mit Hilfe von MOE 2015.10 vorbereitet. In der Protein-Struktur wurde die Seitenkette des His40 in ein Rotamer überführt, welches H-Brücken zu C147 ausbilden kann. Alle Protein-Ligand-Komplexe wurden mit Gold 5.2.2 erstellt. Der Radius der Sphäre der Bindetasche wurde

auf 10 Angström vom Schwefelatom des katalytischen C147 gesetzt. Das Docking wurde unter Verwendung der ASP scoring function und ChemScore function für re-scoring ausgeführt. Jedes Molekül wurde in 25 genetic algorithm runs gedockt (ohne Wasser mit 100%igen Genauigkeit). Für jedes Molekül wurden (soweit möglich) zwei distance constrains (unter Standard-Bedingungen) gesetzt: zwischen NH₂-Amid-Gruppe und Carbonyl-O von T142 sowie zwischen Carbonyl-O-Amid-Gruppe und OH-Gruppe von T142. Für kovalentes Docking wurden stereochemisch korrekte Strukturen der Liganden mit MOE 2015.10 erstellt. Bei kovalentem Docking wurden dieselben Einstellungen verwendet. Es wurde zusätzlich ein covalent Constrain zwischen dem Schwefel-Atom des kov. Liganden und dem Schwefel-Atom des C147 gesetzt.

Die Suche nach der Ähnlichkeit mit dem Benserazid-Pharmakophor wurde wie folgt ausgeführt: Konformationengenerierung mit Ligandscout 4.2, Einstellung ICON-Best (d.h. max. 200 Konformationen, RMSD-Grenzwert 0.8 Å, Energie-Fenster 200), Ligand-Based Pharmakophor-Suche: scoring-function 'Atom sphere overlap (fast shape)', shared feature pharmacophore, max. 25 Pharmakophor-Modelle

Herstellung rekombinanter EV D68 3C Protease

Aus einem 50%igen Glycerolstock von Tuner (DE3) placi BL21 mit transformiertem Plasmid für EV D68 3C Protease wurde eine Übernachtskultur bei 37°C in 3 ml LB-Medium mit je 3 µl Ampicillin (100 mg/ml) und Chloramphenicol (34 mg/ml in Ethanol) angesetzt. Am Folgetag wurden 400 ml LB- oder TB-Medium mit je 400 µl Ampicillin (100 mg/ml) und Chloramphenicol (34 mg/ml in Ethanol) versetzt und mit 1 ml Übernachtskultur angeimpft und bei 37°C inkubiert bis eine Bakteriendichte OD₆₀₀ von ca. 0.6 erreicht wurde. Anschließend wurden 400 µl IPTG (0.5 M) hinzugefügt und die Kultur über Nacht bei 17°C geschüttelt. Die Pellets wurden auszentrifugiert (15 min, 3000 rpm, 4°C) und maximal 2 Wochen bis zur Aufarbeitung bei -25°C gelagert. Nach Auftauen auf Eis wurden die Pellets mit je ca. 7.5 ml Lysepuffer aufgeschwemmt und mit einer Ultraschallspitze lysiert (70%, 10x 20s). Dabei wurde die Suspension auf Eis gelagert und durch Wartezeiten zwischen den Intervallen sichergestellt, dass die Mischung sich nicht erwärmt. Die Suspensionen wurden auszentrifugiert (30 min, 15000 rpm, 4°C), der Überstand mit NiNTA-Puffer 2 auf 50 mM Imidazol eingestellt und erneut zentrifugiert (30 min, 17000 rpm, 4°C). Die NiNTA-Säule (ca. 3ml Säulenvolumina, SV) wurde mit 10 SV NiNTA-Puffer 1 equilibriert, die Probe aufgetragen, mit 10 SV NiNTA-Puffer 1 gespült und mit 7.5 ml NiNTA-Puffer 2 eluiert. Die NiNTA-Säule wurde danach mit 10 ml 0.5M NaOH regeneriert, in 20% Ethanol im Kühlschrank gelagert und nach 6 Durchläufen erneuert. Die an NiNTA vorgereinigte Probe wurde auf die Superdex-Säule der ÄKTA Pure (GE Healthcare) aufgetragen und mit Superdex-Puffer eluiert (Methode: Superdex75 16_600). Die Fraktionen oberhalb der halben Peakbreite wurden vereinigt, die Konzentration via Nanodrop bestimmt und die Identität und Reinheit des Proteins über Gelelektrophorese und LC/QToF-MS sichergestellt.

Ausbeute: ca. 25 mg aufgereinigtes Protein/ 1l Medium

Für die Konzentrationsbestimmung via Nanodrop wurde in ProtParam auf Grundlage der Peptidsequenz der Absorptionskoeffizient 0.1% (1g/l) von 0.491 bestimmt.

Zusammensetzung der Puffer:

Lysepuffer: TRIS-HCl 25 mM, NaCl 200 mM, D⁺-Trehalose Dihydrat 10% m/V, DTT 2mM (frisch zusetzen), PMSF 50 µM (frisch zusetzen), pH8 eingestellt mit NaOH-Lösung

NiNTA-Puffer 1: Imidazol 50 mM, TRIS-HCl 50 mM, NaCl 500 mM, DTT 100 µM (frisch zusetzen), pH8 eingestellt mit NaOH-Lösung

NiNTA-Puffer 2: Imidazol 300 mM, TRIS-HCl 50 mM, NaCl 500 mM, DTT 100 µM (frisch zusetzen), pH8 eingestellt mit NaOH-Lösung

Superdex-Puffer: HEPES 100 mM, EDTA 1 mM, DTT 100 µM (frisch zusetzen), pH8 eingestellt mit NaOH-Lösung

Als Superdex-Puffer wurden außerdem getestet:

- Ammoniumhydrogencarbonat 50 mM, DTT 100 µM (frisch zusetzen), pH8 eingestellt mit NaOH-Lösung
- Ammoniumacetat 50 mM, DTT 100 µM (frisch zusetzen)
- TRIS-HCl 25 mM, NaCl 200 mM, DTT 100 µM (frisch zusetzen), pH8 eingestellt mit NaOH-Lösung

Das Protein ist in den getesteten Puffern deutlich weniger aktiv und instabiler. Einige Chargen mit Ammoniumhydrogencarbonat und -acetat waren selbst nach einem Einfrier- und Auftau-Zyklus praktisch inaktiv und nicht mehr durch DTT-Zugabe reaktivierbar.

Der Einfluss verschiedener Puffer und Additive auf die Stabilität der EV D68 3C^{Pro} wurde in Thermal-Shift-Assays zusammen mit Monika Ühlein (AG Manfred Weiss, Helmholtz Zentrum Berlin) untersucht ^[208]. Hier zeigte sich HEPES und ein pH>7 als stabilisierend. Dagegen führten pH-Werte < 5 zur vollständigen Denaturierung der Protease. Hohe Imidazol-Konzentrationen sind ebenfalls kritisch zu betrachten. Es wird daher empfohlen, die Protease ohne Zeitverzug nach der NiNTA über Superdex aufzureinigen oder zu dialysieren. 5 mM DTT führten ebenfalls zu einer deutlichen Instabilität des Proteins, sodass die Konzentration in den Puffern auf 100 µM reduziert wurde. Massenspektrometrische Untersuchungen und Aktivitätstestungen im FRET-Assay legen nahe, dass das zum Schutz vor Oxidation der Protease ausreichend ist.

	Auswirkung auf Proteinstabilität
Natriumacetat pH4.5	--
Tris pH 7.5-8.5	+
HEPES pH8	+
CHES pH 9-10	--
NaCl	+
Zink-Chlorid 100 µM-5 mM	++
TCEP-HCl 100 µM	0
DTT 5 mM	-
Trehalose-Dihydrat	+
Glycerol 15-20%	++
Imidazol	-

Tab. 16 Auswahl von Pufferbestandteilen und Additiven mit ihrer Auswirkung auf die Proteinstabilität ermittelt im TSA. + stabilisierend, - destabilisierend, 0 keinen Effekt

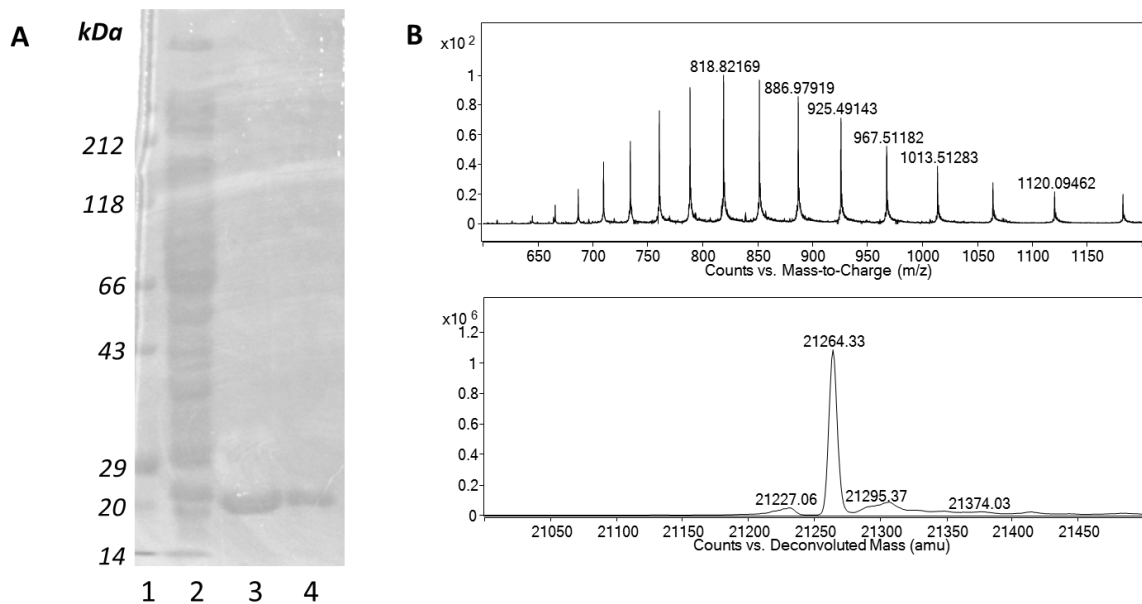


Abb. 86 A. Gelelektrophorese: 1 Marker, 2 Probe vor NiNTA-Säule, 3 Probe nach NiNTA-Säule, 4 Probe nach Superdex-Säule. B. Rohspektrum und dekonvolutiertes Spektrum aus QToF-MS (berechnete Masse: 21263.20, gefunden: 21264.3)

FRET-Assay

Vorbemerkungen

Obwohl für einige Inhibitoren eine Reaktivität mit DTT besteht, wurde es sofern nicht anders beschrieben allen Aktivitätsassays in einer Konzentration von 100 μM zugesetzt. Alternativ wurde TCEP in einer Konzentration von 5 μM getestet. Der Einsatz im Aktivitätsassay ist möglich, doch das Protein ist weniger aktiv. Da es sich um eine starke Säure handelt, ist gegebenenfalls die Pufferkapazität anzupassen. Ein Arbeiten ohne reduzierende Zusätze ist möglich, erfordert aber wesentlich höhere Proteinkonzentrationen. Wenn nicht anders angegeben entspricht die Zusammensetzung des Puffers HEPES 100 mM, EDTA 1 mM, eingestellt mit NaOH auf pH8.

Anzumerken ist auch, dass die Aktivität der Protease bei niedrigeren DMSO-Konzentrationen erhöht ist. Im regulären Assay werden 3.2% DMSO eingesetzt. Das scheint vertretbar, denn im ITC konnte gezeigt werden, dass bei 4% DMSO in der Lösung $\geq 90\%$ der Protease aktiv sind. Falls nicht anders angegeben, gab es zwischen den Präparationsschritten und der Messung in den Assays keine weiteren Inkubationszeiten. Für ausgewählte Inhibitoren wurden Inkubationszeiten bis zu 2 h getestet, mit dem Ergebnis, dass die Gleichgewichtseinstellung schon nach wenigen Minuten abgeschlossen war. Zu Bedenken ist hier, dass die Aktivität der Protease bei Inkubation bei Raumtemperatur bereits nach 2h merklich abnimmt. Bei Lagerung auf Eis bleibt die Aktivität deutlich länger erhalten.

Das eingesetzte FRET-Substrat hat die Sequenz Dabcyl-KTLEALFQGPPVY-E(Edans)-Amid und wurde von Biosyntan (Berlin, Deutschland) bezogen. Aus dem lyophilisierten Peptid wurde eine 2 mM Stammlösung aus DMSO/Wasser (50%) hergestellt und aliquotiert bei -25°C gelagert. Wenn nicht anders angegeben, wurde die Stammlösung 1:200 in Puffer verdünnt.

Screening überadditiver inhibitorischer Fragmentkombinationen

Eine Mischung von 1 μl **1** (20 mM 1:33 in DMSO, ca. 606 μM), 1 μl des jeweiligen CH-aziden Fragments (20 mM 1:33 in DMSO, ca. 606 μM), 10 μl Proteinlösung (ca. 50 μM , 1:50 in buffer) und 10 μl Puffer wurden für 1h bei Raumtemperatur inkubiert. In Kontrollexperimenten werden nur DMSO oder **1** oder die Fragmente eingesetzt. Die Konzentration der Sonde **1** im Assay wurde so gewählt, dass ca. 70-80% Aktivität der Protease verbleiben. Es wurde auf DTT im Assay verzichtet um eine mögliche Addition der entstehenden Knoevenagel-Produkte zu vermeiden, was die freie Inhibitorkonzentration senken und zu falsch negativen Ergebnissen führen würde. Nach 1h wurden 10 μl des Substrats (1:200 in Assay-Puffer) hinzugefügt und die Fluoreszenzintensität bei 538 nm über einen bestimmten Zeitraum (10-20 min) gemessen. Die resultierenden Steigungen (RFU/min) der einzelnen Ansätze werden auf die DMSO-Kontrolle, die 100% Aktivität entspricht, normiert. Überadditive inhibitorische Fragmentkombinationen übersteigen die inhibitorische Aktivität der Summe beider Fragmente allein. Die Assaylösungen wurden im Anschluss via LC/QToF analysiert und

über die Masshunter Software und dem EIC/Find by Formula-Algorithmus auf Vorliegen des Knoevenagel-Produkts untersucht.

Wichtige Methodenparameter:

LC: Injektionsvolumen: 5µl, Laufmittel: Wasser (A) -Acetonitril (B) –Gemisch mit 0.1% FA, Gradient: von 95/5 (A/B) auf 5/95 (A/B) innerhalb von 8 min bei einer Flussrate von 0.5 ml/min

QToF: Positiv-Modus, Sheath Gas Flow 11, Sheath GasTemp 350°C, Nebulizer 35 psig, Gas Flow 14 l/min, Gas Temp 200°C, OctopoleRFPeak 750, Fragmentor 175, Nozzle Voltage 1000 V, VCap 4000

Aktivitätstestung und Bestimmung der IC₅₀-Werte

Aus der üblicherweise 20 mM Stammlösung des Inhibitors in DMSO wird eine entsprechende Verdünnungsreihe in DMSO hergestellt. Die Proteinlösung wird so verdünnt, dass in der Positivkontrolle mit DMSO statt Inhibitor ein Anstieg von etwa 250 RFU/min resultiert. Je nach Charge und bereits erfolgten Einfrier- und Auftauzyklen ist das in der Regel eine 1:20 bis 1:200 Verdünnung und entspricht einer Konzentration von 300 nM aktivem Protein. 1 µl Inhibitorlösung in DMSO werden mit 10 µl Puffer und 10 µl Proteinlösung versetzt, 30 s geschüttelt (1200 rpm) und zentrifugiert. Nach Zugabe von Substratlösung (1:200 Verdünnung in Puffer) wird erneut 30 s geschüttelt, zentrifugiert und gemessen.

Die RFU/min werden auf die Positivkontrolle normalisiert und gegen den Logarithmus der Inhibitorkonzentration aufgetragen. Die nicht-lineare Regression und Ermittlung der IC₅₀- Werte und Hillkoeffizienten wurde mit Graphpad Prism durchgeführt.

Zum Vergleich mit Literaturwerten werden Ki-Werte herangezogen. Die Umrechnung erfolgt mittels der Cheng-Prusoff-Gleichung.^[209] Da im angewendeten Assay mit niedrigen Substratkonzentrationen gearbeitet wird, nähert sich der IC₅₀- dem Ki-Wert an.

$$K_i = \frac{IC_{50}}{\left(1 + \frac{[S]}{K_M}\right)}$$

$$K_i = \frac{48 \mu M}{\left(1 + \frac{3.2 \mu M}{121 \mu M}\right)}$$

Umrechnung des IC₅₀ in den Ki-Wert am Beispiel von 1. Der Cheng-Prusoff-Faktor [S]/K_M ist sehr klein und beträgt 0.0267

Um den Effekt von DTT auf den IC₅₀-Wert zu untersuchen wurden Assays wie oben beschrieben ohne DTT oder stattdessen unter Zusatz von 1 mM Glutathion durchgeführt.

Verdünnungsassays

9 µl Proteinlösung wurden mit 1 µl Inhibitor in DMSO versetzt und 5 Minuten bei Raumtemperatur geschüttelt. Die Proteinkonzentration wurde dabei 100fach höher (ca. 20 µM) als im FRET-Assay zur Aktivitätsbestimmung gewählt, die Inhibitorkonzentration entspricht dem 10fachen des IC₅₀-Wertes. Anschließend wurde die Mischung 1:33 mit Puffer verdünnt. 20 µl der verdünnten Mischung und 10 µl Substrat (1:200 verdünnt) wurden unter FRET-Assaybedingungen vermessen. Die Kontrollen enthielten nur DMSO statt Inhibitorlösung bzw. den Inhibitor in 1000facher IC₅₀ – Konzentration (bzw. max. 2mM). [210]

Zell-Assay (Zell-basierter zytopathischer Effekt-Reduktionsassay)

Die Versuche wurden von der AG Neyts der KU Leuven (Department of Microbiology and Immunology, Rega Institute for Medical Research) durchgeführt [138].

MS Experimente

Reversibilität

Die Proteaselösung wurde mit 10 µM DTT versetzt um das Enzym zu reaktivieren. 10 µl dieser Lösung von EV D68 3C^{Pro} (ca.9 µM) wurden mit 1 µl Inhibitor-Lösung (20 mM Stammlösung, 1:277 verdünnt in Wasser) versetzt, sodass sich für beide Komponenten etwa eine Konzentration von 8 µM ergibt. Die Proben wurden direkt ohne Inkubationszeit am LC/MS QToF vermessen.

Wichtige Methodenparameter (EV68denat.m):

LC: Jupiter C18 –Säule (5µM, 300 Å, 3 x 250 mm) Phenomenex, Injektionsvolumen: 1µl, Laufmittel: Wasser (A) -Acetonitril (B) –Gemisch mit 0.1% FA, Gradient: 0-4 min 95/5 (A/B), 4-10 min von 95/5 (A/B) auf 40/60 (A/B), 10-12 min 40/60 (A/B), 12-15 min von 40/60 (A/B) auf 95/5 (A/B) bei einer Flussrate von 0.5 ml/min

QToF: Positiv-Modus, Sheath Gas Flow 11, Sheath GasTemp 350°C, Nebulizer 35 psig, Gas Flow 14 l/min, Gas Temp 200°C, OctopoleRFPeak 750, Fragmentor 350, Nozzle Voltage 2000 V, VCap 3500; Der LC-Fluss der ersten 4 min des Experiments wird nicht in das Massenspektrometer geleitet.

Die Auswertung der Daten erfolgte mittels Masshunter Software von Agilent. Die Rohspektren wurden manuell an mindestens zwei Ladungszuständen (üblicherweise +25 und +26) auf zusätzliche Proteinpeaks untersucht, die auf eine irreversible Modifikation hindeuten. Modifikationen in den dekonvolutierten Spektren (Maximum entropy, 18.00-24.000; 1 Da, proton, no limited m/z-range) wurden mittels Caliper-Tool definiert.

Sättigungsexperimente

9 µl einer Lösung von EV D68 3C^{Pro} (ca. 50 µM) wurden mit 1 µl der 20 bzw. 30 mM Stammlösung des Inhibitors in DMSO versetzt. Das entspricht einem Überschuss von mindestens dem 1000x IC₅₀. Nach 10 min Schütteln bei Raumtemperatur werden die Proben am LC/MS QToF vermessen. Die Methode entspricht dabei derselben wie für die Experimente zur Reversibilität.

Die Auswertung der Daten erfolgte mittels Masshunter Software von Agilent. Die dekonvolvierten Spektren (Maximum entropy, 18.00-24.000; 1 Da, proton, no limited m/z-range) wurden über den Agile-Algorithmus integriert. Anschließend wurde der prozentuale Anteil modifizierten Proteins bezogen auf die gesamte Peakfläche der Proteinsignale berechnet. Dafür wurden auch Proteinpeaks mit mehrfacher Modifikation berücksichtigt.

Reaktivität mit DTT

Die 20 mM Stammlösungen der Inhibitoren in DMSO wurden 1:200 mit Puffer mit 100 µM DTT oder ohne DTT verdünnt. Anschließend wurden die Proben am LC/MS QToF mit derselben Methode wie für die Experimente zur Reversibilität vermessen.

Die Auswertung der Daten erfolgte mittels Masshunter Software von Agilent. Dafür wurden über das Find-by-Formula-Tool nach den entsprechenden Massen des Inhibitors und des Inhibitor-DTT-Addukts gesucht. Da die untersuchten Inhibitoren teilweise feste, aber reversible Bindungen mit DTT eingehen, zerfallen die Addukte in der Quelle beim Übergang in die Gasphase mitunter wieder. Daraus ergeben sich zwei Peaks mit verschiedenen Retentionszeiten für den Inhibitor.

Tryptischer Verdau

29 µl Proteinlösung (11.5 µM) wurden mit 1 µl Inhibitorlösung in DMSO (3 mM) versetzt und 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Trypsin wurde in Ammoniumhydrogencarbonat-Puffer (50 mM, pH 8) gelöst und zur Protein-Inhibitor-Mischung im Verhältnis 1:20 (Trypsin:EV68 3C^{Pro}, m/m) gegeben. Die Proben wurden 6h bei 37°C inkubiert und anschließend im LC/QToF mit Tandem-MS-Methode vermessen. (Nach Promega Usage Information)

Wichtige Methodenparameter (SWCT_verdau_MSms_opt.m):

LC: Jupiter C18 –Säule (5µM, 300 Å, 3 x 250 mm) Phenomenex, Injektionsvolumen: 0.5 µl, Laufmittel: Wasser (A) -Acetonitril (B) –Gemisch mit 0.1% FA, Gradient: 0-4 min 95/5 (A/B), 4-10 min von 95/5 (A/B) auf 60/40 (A/B), 10-12 min von 60/40 (A/B) auf 40/60 (A/B), 12-15 min von 40/60 (A/B) auf 1/99 (A/B), 15-18 min von 1/99 (A/B) auf 95/5 (A/B) bei einer Flussrate von 0.5 ml/min

QToF: Positiv-Modus, AutoMS2, MS: 100-3000 m/z, 2 spectra/s; MS/MS: 100-3000 m/z, 1 spectrum/s, max. 2 precursors per cycle, Sheath Gas Flow 12, Sheath GasTemp

400°C, Nebulizer 40 psig, Gas Flow 14 l/min, Gas Temp 290°C, OctopoleRFPeak 750, Fragmentor 400, Nozzle Voltage 2000 V, VCap 5000; Der LC-Fluss der ersten 0.5 min des Experiments wird nicht in das Massenspektrometer geleitet.

Die Auswertung erfolgte mittels Mass Hunter BioConfirm 9.0 auf Grundlage der Aminosäuresequenz des exprimierten Proteins und der zuvor definierten Addukte der einzelnen Inhibitoren an nukleophile Zentren der Aminosäuren.

Quantifizierung der Knoevenagelreaktion in verschiedenen Puffern

100 µM 3-Formylbenzamid **1** und 100 µM CH-azides Fragment wurden bei Raumtemperatur in Puffer pH4-10 (ohne DTT-Zusatz) mit 10 µM EV D68 3C^{Pro} oder ohne Protein inkubiert. Die finale DMSO-Konzentration betrug 4%. Für das CH-azide Fragment Diethylmalonat wurden zusätzliche Proben in Puffer pH8 angesetzt, denen jeweils 10 µM Piperidin, Piperazin oder DABCO zugesetzt wurden. Nach 60 min wurden Proben entnommen und mit Ameisensäure durch Senkung des pH auf <4 gequenchet. Die Quantifizierung des entstandenen Knoevenagelprodukts in den Proben erfolgt via LC/MS-QToF. Es wurden Kalibriergerade erstellt, die den Messbereich 0.63 µM bis 20 µM abdecken. Die Stammlösung wurde aufgrund der auftretenden Retro-Knoevenagel-Reaktion in DMSO verdünnt.

Zusammensetzung der Puffer:

pH 4: Ammoniumacetat 100 mM/AcOH/1mM EDTA

pH 6: BisTris 100 mM/1mM EDTA

pH 8: HEPES 100 mM/ 1mM EDTA

pH 10:CHES 100 mM/ 1mM EDTA

Wichtige Methodenparameter (robertassay_waste.m):

LC: Zorbax Eclipse plus C18 RRHD – Säule (1.8µM, 95 Å, 2.1 x 50 mm) Agilent, Injektionsvolumen: 1 µl, Laufmittel: Wasser (A) -Acetonitril (B) –Gemisch mit 0.1% FA, Gradient: 0-8 min von 95/5 (A/B) auf 5/95 (A/B), 8-9 min 5/95 (A/B), 9-10 min von 5/95 (A/B) auf 95/5 (A/B) bei einer Flussrate von 0.5 ml/min

QToF: Positiv-Modus, Sheath Gas Flow 11, Sheath GasTemp 350°C, Nebulizer 35 psig, Gas Flow 14 l/min, Gas Temp 200°C, OctopoleRFPeak 750, Fragmentor 175, Nozzle Voltage 1000 V, VCap 400, 0-1 Minuten waste

Die Auswertung der Daten erfolgte mittels Masshunter TOF-Quantification Software von Agilent.

Quantifizierung des Knoevenagelprodukts 22 einer Protein-induzierten Reaktion

100 μM 3-Formylbenzamid **1** und 50 μM Oxobutanitril wurden bei Raumtemperatur in Puffer pH8 (100 mM HEPES, 1 mM EDTA, ohne DTT-Zusatz) mit 10 μM EV D68 3C^{Pro} oder ohne Protein inkubiert. Die finale DMSO-Konzentration betrug 4%. Zu den Zeitpunkten $t = 2, 5, 10, 15, 30, 60$ und 90 min wurden Proben entnommen und mit Ameisensäure durch Senkung des pH auf <4 gequenchet. Die Quantifizierung des entstandenen Knoevenagelprodukts in den Proben erfolgt via LC/MS-QToF. Die Methode entsprach dabei derselben wie für die Experimente zur Knoevenagel-Reaktion in verschiedenen Puffern. Es wurde eine Kalibriergerade erstellt, die den Messbereich 0.63 μM bis 20 μM abdeckt. Die Stammlösung wurde aufgrund der auftretenden Retro-Knoevenagel-Reaktion in DMSO verdünnt.

Native MS

EV D68 3C^{Pro} wurde mittels Dialyse in Slide-A-Lyzer-Kassetten (Thermo Fisher Scientific) auf 50 mM Ammoniumhydrogencarbonat pH8 mit 100 μM DTT umgepuffert. Die Proteinkonzentration wurde anschließend mittels Nanodrop bestimmt. Eine optimale Konzentration für Native MS-Experimente liegt bei $\geq 10 \mu\text{M}$. Proteinkonzentrationen bis 7.5 μM geben noch gute Signale.

1 μl 1 mM Inhibitorlösung und 9 μl Proteinlösung werden gemischt und ohne vorherige Säulentrennung über einen Bypass direkt injiziert. Die finale Konzentration von DMSO sollte dabei 2% nicht überschreiten.

Wichtige Methodenparameter (carodirect.m):

LC: Bypass, Injektionsvolumen: 1 μl , Laufmittel: 50 mM Ammoniumhydrogencarbonat bei einer Flussrate von 0.5 ml/min

QToF: Positiv-Modus, Sheath Gas Flow 11, Sheath GasTemp 35°C, Nebulizer 35 psig, Gas Flow 14 l/min, Gas Temp 125°C, OctopoleRFPeak 750, Fragmentor 350, Nozzle Voltage 2000 V, VCap 2500, collision energy 10-30

Die Auswertung der Daten erfolgte mittels Masshunter Software von Agilent. Die Rohspektren wurden manuell an mindestens zwei Ladungszuständen (üblicherweise +8 und +9) auf zusätzliche Proteinpeaks untersucht, die auf eine Modifikation hindeuten. Modifikationen in den dekonvolutierten Spektren (Maximum entropy, 18.00-24.000; 1 Da, proton, no limited m/z-range) wurden mittels Caliper-Tool definiert.

Native MS-Bestimmung des K_D -Wert

Die Vorbereitung der Protein- und Inhibitorlösungen entspricht der unter Native MS beschriebenen Bedingungen. 2.5 μl Proteinlösung und 2.5 μl Inhibitorlösung verschiedener Konzentrationen werden gemischt und ohne weitere Inkubationszeit und ohne vorherige Säulentrennung über einen Bypass direkt injiziert. Die LC/MS-Methodenparameter entsprechen dabei den oben Genannten.

Die Auswertung der Daten erfolgte mittels Masshunter Software von Agilent. Aus den Auftretshäufigkeiten der Massen des unmodifizierten und modifizierten Proteins im dekonvolvierten Spektrum (Maximum entropy, 18.00-24.000; 1 Da, proton, no limited m/z-range) werden prozentuale Anteile des Protein-Ligand-Komplexes bei verschiedenen Inhibitorkonzentrationen bestimmt ^[187]. Die Auftragung %PL gegen die Inhibitorkonzentration liefert eine Sättigungskurve, die mithilfe von Graphpad Prism durchgeführte nicht-lineare Regression liefert den K_D -Wert.

ITC

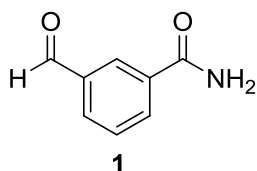
Die Messungen zur Isothermen Titrationskalorimetrie wurden an einem MicroCal PEAQ-ITC (Malvern Panalytical) durchgeführt. EV D68 3C^{Pro} wurde in einer Konzentration von mindestens 20 μM , besser $\geq 50 \mu\text{M}$ eingesetzt. Die Proteinkonzentrationen wurden mittels Nanodrop vor der Messung bestimmt. Die DMSO-Konzentration wurde so weit wie möglich reduziert und sollte $\leq 2.5\%$ betragen. DTT wurde in einer Konzentration von 10 mM zur Reaktivierung der Protease eingesetzt. Die Inhibitorkonzentration in der Spritze wurde an die eingesetzte Proteinkonzentration und den erwarteten K_D -Wert angepasst und lag etwa bei 250-500 μM . Die Lösungen in der Spritze und der Messzelle wurden hinsichtlich ihrer DMSO- und DTT-Konzentration angepasst um Verdünnungseffekte zu vermeiden. Als Kontrollexperiment wurde Inhibitor in Puffer statt Proteinlösung titriert. Die Messungen wurden, soweit nicht anders angegeben, bei 25 °C durchgeführt.

Die Auswertung der Daten erfolgte mit der MicroCal PEAQ-ITC Analysis Software mittels Integration der Leistungsdifferenzen [$\mu\text{cal/s}$] und ergab die Kenngrößen ΔG , ΔH und $-T\Delta$.

Synthese

Benzamide

3-Formylbenzamid (1)



396 mg (3mmol) 3-Cyanobenzaldehyd wurden in 4 ml konz. Schwefelsäure bei 100°C im Ölbad für 2h gerührt. Nach dem Abkühlen wurden 25 ml Eiswasser hinzugefügt. Das Reaktionsgemisch wurde drei Mal gegen Ethylacetat ausgeschüttelt, mit gesättigter NaHCO₃-Lösung gewaschen und mit Na₂SO₄ getrocknet. Das Lösungsmittel wurde am Rotationsverdampfer entfernt und der weiße Feststoff 3-Formylbenzamid aus Wasser/Acetonitril lyophilisiert.^[211]

Ausbeute: 446,3 mg (99%)

¹H NMR (500 MHz, DMSO-D₆) δ [ppm] = 10.07 (s, 1H), 8.41(m, 1H), 8.21(bs,1H), 8.19-8.18 (m, 1H), 8.06-8.05 (m,1H), 7.69 (t, 1H), 7.58 (bs,1H)

¹³C NMR (126 MHz, DMSO-D₆) δ [ppm] = 192.90, 166.89, 136.21, 135.17, 133.18, 131.98, 129.26, 128.54

ESI-HRMS: [M+H⁺] berechnet für C₈H₈NO₂⁺: 150.0510 Da, gefunden:150.05503 Da

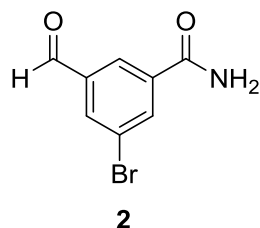
Elementaranalyse: berechnet für C₈H₇NO₂ N=9.39%, C=64.42%, H=4.73%, gefunden: N=8.93%, C=64.59%, H=4.75%

Smp.: 131°C

Rf: 0.63 (Methanol/DCM 10:90)

Laborjournalnummer: CT68

3-Bromo-5-formylbenzamide 2



205 mg (0.98 mmol) 3-Bromo-5-formylbenzonitril wurden in 4 ml konz. Schwefelsäure bei 100°C im Ölbad für 2h gerührt. Nach dem Abkühlen wurden 25 ml Eiswasser hinzugefügt. Das hellgelbe Präzipitat wurde abfiltriert, mit kaltem Wasser gewaschen und via HPLC aufgereinigt. Lyophilisation aus Wasser/Acetonitril lieferte 3-Bromo-5-formylbenzamide (**2**) als weißen Feststoff.^[211]

Ausbeute: 59 mg (26%)

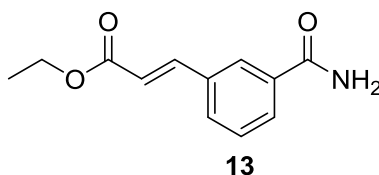
¹H NMR (500 MHz, DMSO-d₆) δ [ppm] = 10.02 (s, 1H), 8.38 (s, 1H), 8.34 (s, 1H), 8.29 (s, 1H), 8.22 (s, 1H), 7.71 (s, 1H)

¹³C NMR (126 MHz, DMSO-D₆) δ [ppm] = 191.71, 165.38, 138.00, 137.13, 135.38, 134.51, 127.18, 122.37

ESI-HRMS: [M+H⁺] berechnet für C₈H₆BrNO₂Na⁺: 249.9479 Da, gefunden: 249.94759 Da

Laborjournalnummer: CT80

Ethyl-(E)-3-(3-carbamoylphenyl)acrylat (**13**)



90 mg (2.25 mmol) NaH als 60% in Mineralöl und 297 µl (1.5 mmol) Triethylphosphonoacetat werden in 1.5 ml trockenem THF unter Argonatmosphäre bei 0°C für 30 min gerührt. 100 mg (0.67 mmol) **1** wird in 3 ml trockenem THF gelöst und tropfenweise hinzugefügt. Das Gemisch wird für 8h unter Erwärmung auf Raumtemperatur gerührt und anschließend mit 8 ml Wasser gequench und über Nacht gerührt. Das Präzipitat wurde gefiltert, in Methanol aufgenommen, via MPLC aufgereinigt und der weiße Feststoff aus Wasser/Acetonitril lyophilisiert.^[212]

Ausbeute: 85 mg (58%)

¹H NMR (500 MHz, DMSO-d₆) δ [ppm] = 8.22 (s, 1H), 8.06 (bs, 1H), 7.92-7.90 (d, J = 7.8 Hz, 1H), 7.86-7.85 (d, J = 7.7 Hz, 1H), 7.70-7.67 (d, J = 16.0 Hz, 1H), 7.52-7.49 (t, 1H), 7.48 (bs, 1H), 6.75-6.72 (d, J = 16.0 Hz, 1H), 4.22-4.18 (q, J = 7.1 Hz, 2H), 1.28-1.25 (t, J = 7.1 Hz, 3H)

¹³C NMR (126 MHz, DMSO-D₆) δ [ppm] = 157.51, 156.39, 134.04, 125.12, 124.40, 121.57, 119.78, 119.31, 117.02, 109.40, 50.45, 4.50

ESI-HRMS: [M+H⁺] berechnet für C₁₂H₁₄NO₃⁺: 220.0929 Da, gefunden: 220.09737 Da

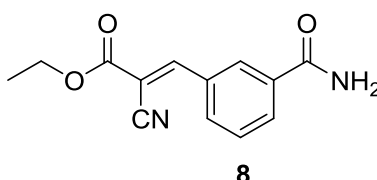
Elementaranalyse: berechnet für C₁₂H₁₃NO₃ N=6.39%, C=65.74%, H=5.98%, gefunden: N=6,56%, C=65,79%, H=6,02%

Smp.: 172°C

Laborjournalnummer: CT79

Cyanessigsäureester

Ethyl-(E)-3-(3-carbamoylphenyl)-2-cyanoacrylat (**8**)



73 µl (0.68 mmol) Ethylcyanoacetat und 135 µl (1.36 mmol) Piperidin wurden in 2 ml Ethanol gelöst und im Eisbad gekühlt. 101 mg (0.68 mmol) 3-Formylbenzamid (**1**) wurden hinzugefügt und bei Raumtemperatur gerührt. Der Reaktionsverlauf wurde mittels LCMS kontrolliert. Nach 19h wurde die Reaktion aufgearbeitet, obwohl noch keine vollständige Umsetzung erfolgt ist. Ethanol wurde am Rotationsverdampfer entfernt, die Mischung in Dichlormethan wieder aufgenommen und mit 0.1M HCl, Wasser und Brine gewaschen und dann am Vakuum eingeeengt. Die Phasentrennung bei der Aufreinigung war schlecht und Partikel an der Phasengrenze wurden abgetrennt. Spätere Analysen zeigten, dass es sich um Produkt handelte. Die Ausbeute fällt daher geringer aus. Der weiße Feststoff wurde mittels MPLC (MeOH/Dichlormethan) aufgereinigt und aus Wasser/Acetonitril lyophilisiert.^[74]

Ausbeute: 41 mg (25%)

¹H NMR (500 MHz, DMSO-D₆) δ [ppm] = 8.49(m,1H), 8.44(s,1H), 8.21-8.19(m,1H), 8.10(bs,1H), 8.09 - 8.07(m,1H), 7.70- 7.67 (t, 1H), 7.58(bs,1H), 4.35- 4.31(q,2H), 1.33-1.30(t, 3H)

¹³C NMR (126 MHz, DMSO-D₆) δ [ppm] = 166.86, 161.63, 154.57, 135.36, 132.56, 131.70, 131.45, 130.43, 129.31, 115.32, 103.60, 62.48, 13.97

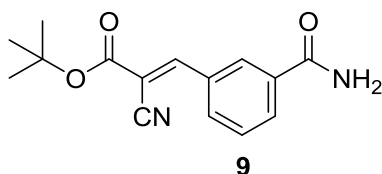
ESI-HRMS: [M+H⁺] berechnet für C₁₃H₁₃N₂O₃⁺: 245.0881Da, gefunden: 245.09276 Da

Elementaranalyse: berechnet für C₁₃H₁₂N₂O₃ N=11.47%, C=63.93%, H=4.95%, gefunden: N=11.50%, C=63.47%, H=4.99%

Smp.:176°C

Laborjournalnummer: CT69

Tert-butyl-(E)-3-(3-carbamoylphenyl)-2-cyanoacrylat (**9**)



41 mg (0.28 mmol) 3-Formylbenzamid (**1**), 120 μ l tert-Butylcyanoacetat (0.84 mmol) und 2 μ l Piperidin wurden in 2ml Ethanol bei 70°C 19h gerührt. Das Reaktionsgemisch wurde mittels MPLC aufgereinigt (Methanol/Dichlormethan) und Lyophilisation aus Wasser/Acetonitril lieferte **9** als weißen Feststoff.

Ausbeute: 70 mg (92%)

¹H NMR (500 MHz, DMSO) δ [ppm] = 8.45 (m,1H), 8.36 (s,1H), 8.18-8.17(m,1H), 8.08(bs, 1H), 8.07-8.06(m,1H), 7.68-7.65(t,1H), 7.55 (bs,1H), 1.54 (s,9H)

¹³C NMR (126 MHz, DMSO) δ [ppm] = 166.86, 160.48, 153.86, 135.30, 132.91, 132.20, 131.48, 130.32, 129.14, 115.38, 105.01, 83.47, 27.82, 27.61, 27.41.

ESI-HRMS: [M+H⁺] berechnet für C₁₅H₁₇N₂O₃⁺: 273.1194Da, gefunden: 273.12369 Da

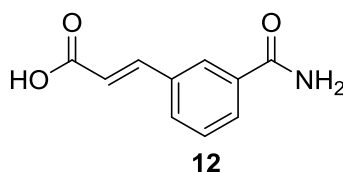
Rf: 0.7 (Methanol/DCM 10:90)

Smp:152°C

Laborjournalnummer: CT92

Säurederivate & Negativkontrollen

(E)-3-(3-carbamoylphenyl)acrylsäure (**12**)



34 mg (0.16 mmol) **13** wurden in 3 ml 0.4 M ethanolischer NaOH suspendiert und bei Raumtemperatur gerührt. Nach 3 h wurde die Mischung auf pH 1 angesäuert und 3-mal mit 10 ml Ethylacetat ausgeschüttelt. Die organische Phase wurde mit Wasser gewaschen, über Na₂SO₄ getrocknet und am Rotationsverdampfer eingeeengt. Der weiße Rückstand wurde via HPLC aufgereinigt.

Ausbeute: 8 mg (27%)

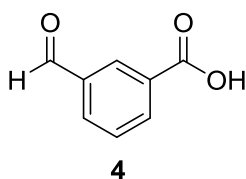
¹H NMR (500 MHz, DMSO-d₆) δ [ppm] = 12.52 (bs, 1H), 8.18 (s, 1H), 8.07 (bs, 1H), 7.89 (d, J = 7.7 Hz, 1H), 7.82 (d, J = 7.7 Hz, 1H), 7.61 (d, J = 16.0 Hz, 1H), 7.52-7.48 (t, 1H), 7.47 (bs, 1H), 6.63 (d, J = 16.0 Hz, 1H)

¹³C NMR (126 MHz, DMSO-D₆) δ [ppm] = 167.27, 143.17, 134.81, 134.33, 131.13, 129.20, 128.97, 126.57, 120.34

ESI-HRMS: [M+H⁺] berechnet für C₁₀H₁₀NO₃⁺: 192.0616 Da, gefunden: 192.06579 Da

Laborjournalnummer: CT84

3-Formylbenzoesäure (4)*



71 mg (0.48 mmol) (3-Cyanobenzaldehyd wurden in 2 ml konz. HCl gelöst und 20 h unter Reflux gekocht. Anschließend wurde die Mischung mit 15 ml NaHCO₃/water und 15 ml DCM versetzt. Die organische Phase wurde dann gegen gesättigte NaHCO₃-Lösung ausgeschüttelt. Die vereinigten NaHCO₃-Phasen wurden angesäuert und gegen DCM ausgeschüttelt. Das Lösungsmittel wurde am Rotationsverdampfer entfernt und der weiße Rückstand aus Wasser/Acetonitril lyophilisiert.^[213]

Ausbeute: 16 mg (19%)

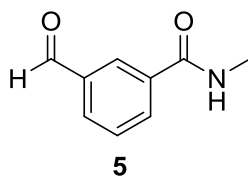
¹H NMR (500 MHz, DMSO-d₆) δ [ppm] = 13.37 (bs, 1H), 10.09 (s, 1H), 8.44 (s, 1H), 8.23 (d, J = 7.7 Hz, 1H), 8.13 (d, J = 7.6 Hz, 1H), 7.74 (t, J = 7.6 Hz, 1H)

¹³C NMR (126 MHz, DMSO-D₆) δ [ppm] = 193.40, 167.11, 136.99, 135.42, 133.61, 132.38, 130.97, 130.24

ESI-HRMS: [M+H⁺] berechnet für C₈H₇O₃⁺: 151.0350 Da, gefunden: 151.03892 Da

*Synthetisiert im Rahmen des Wahlpflichtpraktikums von Thi Mai Maria Le.
Laborjournalnummer: CT89

3-Formyl-N-methylbenzamid (5)



152 mg (1 mmol) 3-Carboxybenzaldehyd und 174 mg (1.1 mmol) Carbonylbisimidazol wurden in 5 ml trockenem DCM gelöst und für 1 h gerührt. Anschließend wurden 68 mg (1 mmol) Methylamin-Hydrochloride und 139 μ l (1 mmol) Triethylamin hinzugefügt. Die Mischung wurde 20 h gerührt und mit gesättigter NaHCO_3 -Lösung pH 9 extrahiert. Die organische Phase wurde über Na_2SO_4 getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Der weiße Rückstand wurde via MPLC aufgereinigt.

Ausbeute: 26 mg (16%)

^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ [ppm] = 10.07 (s, 2H), 8.68 (s, 2H), 8.36 (m, 2H), 8.16 – 8.12 (m, 2H), 8.05 (m, 2H), 7.73 – 7.67 (t, 2H), 2.82 – 2.81 (d, 6H)

^{13}C NMR (126 MHz, DMSO- D_6) δ [ppm] = 192.89, 165.59, 136.20, 135.32, 132.79, 131.92, 129.31, 127.92, 26.31

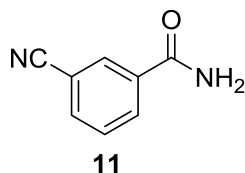
ESI-HRMS: $[\text{M}+\text{H}^+]$ berechnet für $\text{C}_9\text{H}_{10}\text{NO}_2^+$: 164.0667 Da, gefunden: 164.0709 Da

Rf: 0.6 (Methanol/DCM 10:90)

Smp.: 102°C

Laborjournalnummer: CT75

3-Cyanobenzamid (11)



127 mg (1 mmol) 1,3-Dicyanobenzol, 18 mg (0.1 mmol) $\text{Cu}(\text{OAc})_2$ und 0.2 ml Wasser wurden in 10 ml AcOH bei 100°C für 6 h gerührt. Anschließend wurde die Mischung in 50 ml brine gegossen und 3-mal mit 20 ml DCM extrahiert, mit 3-mal 20 ml Wasser gewaschen und mit Na_2SO_4 getrocknet. Das Lösungsmittel wurde am Rotationsverdampfer entfernt, der Rückstand via MPLC gereinigt Lyophilisation aus Wasser/Acetonitril lieferte 3-Cyanobenzamid als weißen Feststoff.^[214]

Ausbeute: 46 mg (31%)

^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ [ppm] = 8.28 (m, 1H), 8.18-8.16 (m, 1H), 8.18 (bs, 1H), 8.01 – 7.99 (m, 1H), 7.70- 7.67 (t, 1H), 7.66 (bs, 1H)

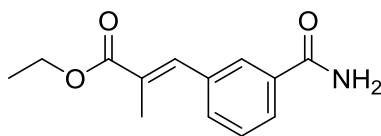
^{13}C NMR (126 MHz, DMSO- D_6) δ [ppm] = 166.53, 135.86, 135.29, 132.79, 131.64, 130.29, 118.96, 112.02

ESI-HRMS: $[\text{M}+\text{H}^+]$ berechnet für $\text{C}_8\text{H}_7\text{N}_2\text{O}^+$: 147.0514 Da, gefunden: 147.05547

Smp.: 232°C

Laborjournalnummer: CT71

Ethyl-(E)-3-(3-carbamoylphenyl)-2-methylacrylat (**14**)



14

12 mg (0.31 mmol) Natriumhydrid (60% in Mineralöl) wurden in 1.4 ml trockenem THF suspendiert. Die Mischung wurde im Eisbad gekühlt und 66.5 μ l (0.31 mmol) Triethylphosphonopropionat hinzugegeben und 30 min gerührt. 41.6 mg (0.28 mmol) 3-Formylbenzimid **1** wurden in ca. 7 ml THF gelöst und der Mischung hinzugefügt. Nach 2 h rühren bei Raumtemperatur wurde die Reaktion mit derselben Menge gesättigter Ammoniumchlorid-Lösung versetzt, drei Mal gegen Ethylacetat ausgeschüttelt, mit brine gewaschen und über Natriumsulfat getrocknet. Nach Entfernung des Ethylacetats wurde der weiße Feststoff via MPLC aufgereinigt. Lyophilisation aus Wasser/Acetonitril lieferte Ethyl-(E)-3-(3-carbamoylphenyl)-2-methylacrylat (**14**) als weißen Feststoff.^[215]

Ausbeute: 38 mg (58%)

¹H NMR (500 MHz, DMSO-D₆) δ [ppm] = 8.03 (bs, 1H), 7.95 (t, 1H), 7.87 – 7.85 (m, 1H), 7.64 (s, 1H), 7.63 – 7.61 (m, 1H), 7.54 – 7.50 (t, 1H), 7.45 (bs, 1H), 4.25 – 4.18 (q, 2H), 2.06 (d, 3H), 1.30 – 1.26 (t, 3H)

¹³C NMR (126 MHz, DMSO-D₆) δ [ppm] = 167.53, 167.43, 137.44, 135.21, 134.53, 132.14, 128.84, 128.57, 128.53, 127.55, 60.62, 14.16, 13.92

ESI-HRMS: [M+H⁺] berechnet für C₁₃H₁₆NO₃⁺: 233.1052 Da, gefunden: 233.1055 Da

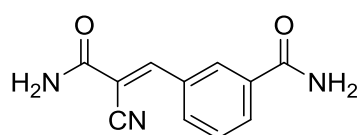
Rf: 0.67 (Methanol/DCM 10:90)

Smp.: 136°C

Laborjournalnummer: CT107

Cyanessigsäureamide

(E)-3-(3-amino-2-cyano-3-oxoprop-1-en-1-yl)benzamid (**15**)



15

31 mg (0.21 mmol) **1**, 18 mg (0.21 mmol) 2-Cyanoacetamid wurden in 2ml Ethanol gelöst. 10µl Piperidin, 6µl Eisessig sowie eine Spatelspitze Molsieb 4Å wurden hinzugefügt und die Mischung 4h bei 60°C im Ölbad gerührt. Das Reaktionsgemisch wurde mittels MPLC aufgereinigt (Methanol/Dichlormethan) und Lyophilisation aus Wasser/Acetonitril lieferte **15** als weißen Feststoff.^[128]

Ausbeute: 13 mg (30%)

¹H NMR (500 MHz, DMSO-D6) δ [ppm] = 8.37(m,1H), 8.23(s,1H), 8.10(bs,1H), 8.09-8.07(m,1H), 8.04-8.02(m,1H), 7.97(bs,1H), 7.81(bs,1H), 7.67-7.64(t,1H), 7.55(bs,1H)

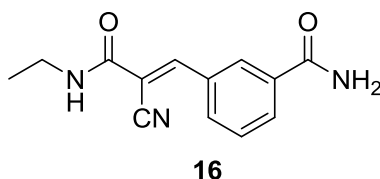
¹³C NMR (126 MHz, DMSO-D6) δ [ppm] = 167.04, 162.53, 150.07, 135.27, 132.07, 131.86, 130.68, 129.66, 129.21, 116.15, 107.68

ESI-HRMS: [M+H⁺] berechnet für C₁₁H₁₀N₃O₂⁺: 216.0728Da, gefunden: 216.07668 Da

Rf: 0.53 (Methanol/DCM 10:90)

Laborjournalnummer: CT101

(E)-3-(2-cyano-3-(ethylamino)-3-oxoprop-1-en-1-yl)benzamid (16)



38 mg (0.26 mmol) **1** und 29 mg (0.26 mmol) N-Ethylcyanoacetamid wurden in 5 ml Ethanol gelöst und 20mol% Triethylamin hinzugefügt. Das Reaktionsgemisch wurde im Ölbad bei 60°C für 3h und anschließend bei Raumtemperatur 16 gerührt. Nach Abkühlen der Mischung wurde das weiß-gelbe Präzipitat abfiltriert und mit kaltem Ethanol gewaschen. Lyophilisation aus Wasser/Acetonitril lieferte **16** als weißen Feststoff.^[216]

Ausbeute: 14 mg (22%)

¹H NMR (500 MHz, DMSO-D6) δ [ppm] = 8.53-8.50(t,1H), 8.38(m,1H), 8.21(s,1H), 8.10(bs,1H), 8.10-8.08(m,1H), 8.04-8.02(m,1H), 7.67-7.64(t,1H), 7.55(bs,1H), 3.28-3.22(m,2H), 1.12- 1.10(t,3H)

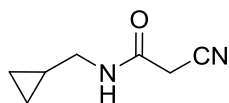
¹³C NMR (126 MHz, DMSO-D6) δ [ppm] = 167.01, 160.46, 149.87, 135.25, 132.08, 131.84, 130.65, 129.63, 129.21, 116.10, 107.41, 34.68, 14.48

ESI-HRMS: [M+H⁺] berechnet für C₁₃H₁₄N₃O₂⁺: 244.1041Da, gefunden: 244.1088 Da

Smp.: 206°C

Laborjournalnummer: CT74

(E)-3-(2-cyano-3-((cyclopropylmethyl)amino)-3-oxoprop-1-en-1-yl)benzamid (17)



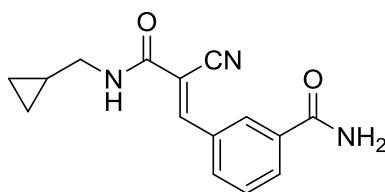
87 μ l Cyclopropylmethylamin (1mmol) and 107 μ l 2-Ethylcyanoacetat (1mmol) wurden ohne Lösungsmittel bei Raumtemperatur 42 h gerührt. Das Gemisch wurde mittels MPLC (Methanol/ Dichlormethan) aufgereinigt. Lyophilisation aus Wasser/Acetonitril lieferte 2-cyano-N-(cyclopropylmethyl)acetamid als weißen Feststoff.

Ausbeute: 83 mg (60%)

$^1\text{H NMR}$ (500 MHz, DMSO- d_6) δ [ppm] = 8.32 (s, 1H), 3.61 (s, 2H), 2.96 – 2.93 (m, 2H), 0.93 – 0.85 (m, 1H), 0.45 – 0.40 (m, 2H), 0.17-0.13 (m, 2H)

$^{13}\text{C NMR}$ (126 MHz, DMSO- D_6) δ [ppm] = 161.86, 116.30, 43.51, 25.24, 10.49, 3.25

Rf: 0.24 (Methanol/DCM 10:90)



17

35 mg (0.24 mmol) **1** und 33 mg (0.24 mmol) 2-cyano-N-(cyclopropylmethyl)acetamid wurden in 2 ml Ethanol gelöst und 20mol% Piperidin wurde hinzugefügt. Die Mischung wird 18 h unter Reflux erhitzt und mittels HPLC gereinigt. Der Rückstand wird aus Wasser/Acetonitril lyophilisiert und lieferte (E)-3-(2-cyano-3-((cyclopropylmethyl)amino)-3-oxoprop-1-en-1-yl)benzamid (**17**) als weißen Feststoff.^[216]

Ausbeute: 6mg (10%)

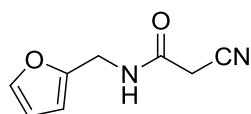
$^1\text{H NMR}$ (500 MHz, DMSO- d_6) δ [ppm] = 8.62 (1H), 8.38 (1H), 8.22 (1H), 8.10 (2H), 8.03 (1H), 7.66 (1H), 7.56 (1H), 3.10 (2H), 1.03 (1H), 0.44 (2H), 0.24 (2H).

$^{13}\text{C NMR}$ (126 MHz, DMSO- D_6) δ [ppm] = 167.03, 160.69, 149.99, 135.25, 132.09, 131.86, 130.68, 129.67, 129.22, 116.13, 107.42, 44.20, 10.76, 3.38

ESI-HRMS: [M+H⁺] berechnet für C₁₅H₁₆N₃O₂⁺: 270.1198 Da, gefunden: 270.12419 Da

Laborjournalnummer: CT87

(E)-3-(2-Cyano-3-((furan-2-ylmethyl)amino)-3-oxoprop-1-en-1-yl)benzamide (21)

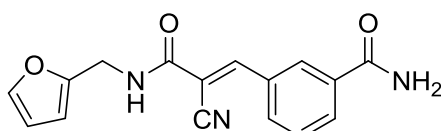


92.5 μ l (1mmol) Furfurylamin und 107 μ l (1mmol) 2-Ethylcyanoacetat wurden ohne Lösungsmittel 24h bei Raumtemperatur gerührt. Das Präzipitat wurde mit kaltem Diethylether gewaschen. Lyophilisation aus Wasser/Acetonitril lieferte 2-Cyano-N-(furan-2-ylmethyl)acetamid als hellorangenen Feststoff.

Ausbeute: 106 mg (65%)

$^1\text{H NMR}$ (500 MHz, DMSO- d_6) δ [ppm] = 8.71 (s, 1H), 7.60 -7.59 (m, 1H), 6.41 -6.40 (m, 1H), 6.30-6.28 (m, 1H), 4.29-4.28 (d, 2H), 3.67 (s, 2H)

$^{13}\text{C NMR}$ (126 MHz, DMSO- D_6) δ [ppm] = 162.63, 151.93, 142.96, 116.66, 111.07, 107.92, 36.46, 25.79



21

33.6 mg (0.23 mmol) **1** und 37.8 mg (0.23 mmol) 2-Cyano-N-(furan-2-ylmethyl)acetamid wurden in 2ml Ethanol gelöst und 20mol% Piperidin wurden hinzugefügt. Die Mischung wurde für 21h bei 65°C gerührt. Das Präzipitat wurde abfiltriert und mit kaltem Ethanol gewaschen. Lyophilisation aus Wasser/Acetonitril lieferte (E)-3-(2-Cyano-3-((furan-2-ylmethyl)amino)-3-oxoprop-1-en-1-yl)benzamide als hellgelben Feststoff.^[216]

Ausbeute: 9 mg (13%)

$^1\text{H NMR}$ (500 MHz, DMSO- d_6) δ [ppm] = 9.03 (t, 1H), 8.38 (s, 1H), 8.24 (s, 1H), 8.10-8.08 (m, 1H), 8.10 (bs, 1H), 8.02-8.05 (m, 1H), 7.67 -7.63 (t, 1H), 7.61-7.60 (m, 1H), 7.56 (bs, 1H), 6.41-6.43 (m, 1H), 6.33-6.32 (m, 1H), 4.44-4.41 (d, 2H)

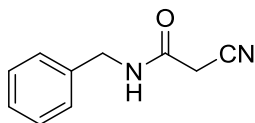
$^{13}\text{C NMR}$ (126 MHz, DMSO- D_6) δ [ppm] = 166.99, 160.89, 151.52, 150.29, 142.28, 135.26, 132.01, 131.89, 130.76, 129.73, 129.22, 115.96, 110.54, 107.39, 107.13, 36.50

ESI-HRMS: [M+H⁺] berechnet für C₁₆H₁₄N₃O₃⁺: 296.0990 Da, gefunden: 296.10303 Da

Smp.: 213°C

Laborjournalnummer: CT82

(E)-3-(3-(benzylamino)-2-cyano-3-oxoprop-1-en-1-yl)benzamide (18)

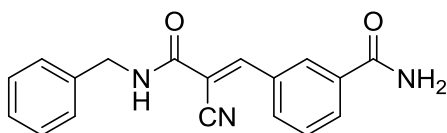


109 μ l (1 mmol) Benzylamin und 128 μ l (1.2 mmol) 2-Ethylcyanoacetat wurden in 10 ml Ethanol gelöst und 18h unter Reflux gekocht. Die Mischung wurde via MPLC aufgereinigt. Lyophilisation aus Wasser/Acetonitril lieferte N-benzyl-2-cyanoacetamid als gelbbraunen Feststoff.^[217]

Ausbeute: 94 mg (54%)

¹H NMR (500 MHz, DMSO-d₆) δ [ppm] = 8.73 (s, 1H), 7.36 – 7.22 (m, 6H), 4.30 – 4.28 (d, 2H), 3.70 (s, 2H)

¹³C NMR (126 MHz, DMSO-D₆) δ [ppm] = 162.74, 139.13, 128.94, 127.96, 127.60, 116.78, 43.23, 25.87



18

76 mg (0.51 mmol) N-Benzyl-2-cyanoacetamid und 101 μ l (1.02 mmol) Piperidin wurden in 2 ml Ethanol gerührt und im Eisbad gekühlt. 90mg (0.51 mmol) **1** wurden hinzugefügt und die Mischung wurde 21 h unter Erwärmung auf Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wurde am Rotationsverdampfer entfernt und der Rückstand via MPLC aufgereinigt. Lyophilisation aus Wasser/Acetonitril lieferte (E)-3-(3-(benzylamino)-2-cyano-3-oxoprop-1-en-1-yl)benzamide (**18**) als weißen Feststoff.^[74]

Ausbeute: 47 mg (30 %)

¹H NMR (500 MHz, DMSO-d₆) δ [ppm] = 9.09 (t, 1H), 8.39 (s, 1H), 8.27 (s, 1H), 8.12-8.09 (m, 1H), 8.11 (bs, 1H), 8.05-8.03 (m, 1H), 7.68-7.64 (t, 1H), 7.56 (bs, 1H), 7.37-7.24 (m, 5H), 4.45-4.42 (d, 2H)

¹³C NMR (126 MHz, DMSO-D₆) δ [ppm] = 167.00, 160.90, 150.26, 138.79, 135.26, 132.05, 131.89, 130.74, 129.73, 129.22, 128.34, 127.44, 126.98, 116.06, 107.22, 43.21

ESI-HRMS: [M+H⁺] berechnet für C₁₈H₁₆N₃O₂⁺: 306.1198 Da, gefunden: 306.12387 Da

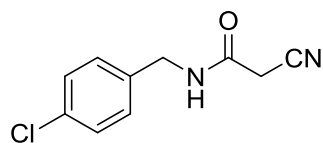
Rf: 0.59 (Methanol/DCM 10:90)

Rf: 0.16 (Ethylacetat/Hexan 50:50)

Smp.: 240°C

Laborjournalnummer: CT82

(E)-3-(3-((4-chlorobenzyl)amino)-2-cyano-3-oxoprop-1-en-1-yl)benzamid (19)

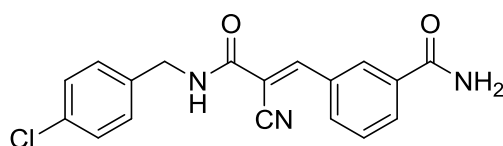


122 μ l (1 mmol) p-Chlorobenzylamin und 107 μ l (1 mmol) Ethylcyanoacetat wurden ohne Lösungsmittel 17.5 h bei Raumtemperatur gerührt. Das Präzipitat wurde via MPLC aufgereinigt. Lyophilisation aus Wasser/Acetonitril lieferte N-(4-chlorobenzyl)-2-cyanoacetamid als weißen Feststoff.

Ausbeute: 166 mg (80%)

$^1\text{H NMR}$ (500 MHz, DMSO- d_6) δ [ppm] = 8.75 (t, 1H), 7.41-7.38 (m, 2H), 7.31-7.27 (m, 2H), 4.29-4.27 (d, 2H), 3.71 (s, 2H)

$^{13}\text{C NMR}$ (126 MHz, DMSO- D_6) δ [ppm] = 162.32, 137.69, 131.59, 129.23, 128.30, 116.15, 41.96, 25.32



19

37 mg (0.25 mmol) **1** und 52 mg (0.25 mmol) N-(4-chlorobenzyl)-2-cyanoacetamid wurden in 2 ml Ethanol gelöst und mit 20mol% Piperidin versetzt. Die Mischung wurde 26h bei 65°C gerührt. Das Präzipitat wird abfiltriert und mit kaltem Ethanol gewaschen. Lyophilisation aus Wasser/Acetonitril lieferte (E)-3-(3-((4-chlorobenzyl)amino)-2-cyano-3-oxoprop-1-en-1-yl)benzamid (**19**).^[216]

Ausbeute: 10 mg (12%)

$^1\text{H NMR}$ (500 MHz, DMSO- d_6) δ [ppm] = 9.10 (t, 1H), 8.39 (t, 1H), 8.27 (s, 1H), 8.12 – 8.07 (m, 1H), 8.10 (bs, 1H), 8.02-8.05 (m, 1H), 7.68 – 7.63 (t, 1H), 7.56 (bs, 1H), 7.43-7.38 (m, 2H), 7.36-7.33 (m, 2H), 4.43-4.39 (d, 2H)

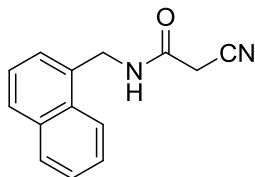
$^{13}\text{C NMR}$ (126 MHz, DMSO- D_6) δ [ppm] = 166.99, 160.93, 150.42, 137.87, 135.26, 132.01, 132.01, 131.93, 131.54, 130.78, 129.75, 129.43, 129.34, 129.23, 128.28, 116.02, 107.05, 42.58

ESI-HRMS: [M+H⁺] berechnet für C₁₈H₁₅CIN₃O₂⁺: 341.0745 Da, gefunden: 341.08568

Smp.: 238°C

Laborjournalnummer: CT78

**(E)-3-(2-cyano-3-((naphthalen-1-ylmethyl)amino)-3-oxoprop-1-en-1-yl)benzamid
(20)**



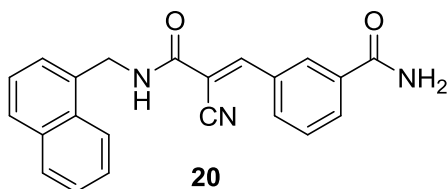
147 μ l (1 mmol) 1-Naphthylmethylamin und 128 μ l (1.2 mmol) Ethylcyanoacetat wurden in 5 ml Ethanol gelöst, 18h unter Reflux gekocht und anschließend 24h bei Raumtemperatur gerührt. Die Mischung wurde via MPLC aufgereinigt. Lyophilisation aus Wasser/Acetonitril lieferte 2-Cyano-N-(naphthalen-1-ylmethyl)-acetamid als hellgelben Feststoff.^[217]

Ausbeute: 112 mg (50%)

¹H NMR (500 MHz, DMSO-d₆) δ [ppm] = 8.78 (t, 1H), 8.06-8.03 (m, 1H), 7.98-7.95 (m, 1H), 7.90-7.86 (m, 1H), 7.61 – 7.52 (m, 3H), 7.51-7.46 (m, 2H), 4.78-4.74 (m, 1H), 3.71-3.72 (d, 2H)

¹³C NMR (126 MHz, DMSO-D₆) δ [ppm] = 162.07, 133.72, 133.31, 130.84, 128.56, 127.89, 126.40, 125.91, 125.89, 125.42, 123.42, 116.22, 40.78, 25.28

Rf: 0.84 (Methanol/DCM 10:90)



39 mg (0.17 mmol) 2-Cyano-N-(naphthalen-1-ylmethyl)-acetamid und 27 mg (0.17 mmol) **1** wurden in 2 ml Ethanol gelöst und 20mol% Piperidin wurde hinzugefügt. Die Mischung wird 6 h bei 65°C und 2 Tage bei Raumtemperatur gerührt. Der Rückstand wird abfiltriert und mit kaltem Ethanol gewaschen. Lyophilisation aus Wasser/Acetonitril lieferte (E)-3-(2-cyano-3-((naphthalen-1-ylmethyl)amino)-3-oxoprop-1-en-1-yl)benzamid (**20**) als hellgelben Feststoff.^[216]

Ausbeute: 33mg (55%)

¹H NMR (500 MHz, DMSO-d₆) δ [ppm] = 9.14 (t, 1H), 8.38 (t, 1H), 8.28 (s, 1H), 8.18-8.15 (m, 1H), 8.09-8.12 (m, 1H), 8.10 (bs, 1H), 8.05-8.02 (m, 1H), 7.98-7.96 (m, 1H), 7.89-7.86 (m, 1H), 7.68 – 7.63 (t, 1H), 7.62 – 7.48 (m, 5H), 4.93-4.90 (d, 2H)

¹³C NMR (126 MHz, DMSO-D₆) δ [ppm] = 166.99, 160.98, 150.23, 135.25, 133.77, 133.31, 132.05, 131.85, 130.84, 130.74, 129.76, 129.21, 128.57, 127.73, 126.35, 125.86, 125.63, 125.44, 123.41, 116.08, 107.26, 41.27

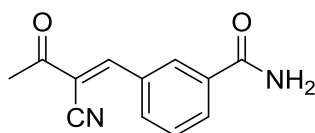
ESI-HRMS: [M+H⁺] berechnet für C₂₂H₁₈N₃O₂⁺: 356.1354 Da, gefunden: 356.13924

Smp.: 228°C

Laborjournalnummer: CT76

β-Ketonitrile

(E)-3-(2-Cyano-3-oxobut-1-en-1-yl)benzamid (**22**)



22

75 mg (0.5 mmol) **1** und 12.5 mg (0.1 mmol) L-Prolin wurden in 2 ml absoluten Ethanol gelöst. 43 µl (0.5 mmol) 3-Oxobutanitril wurden hinzugefügt, die Mischung 24 h bei Raumtemperatur gerührt und anschließend via HPLC aufgereinigt. Lyophilisation aus Wasser/Acetonitril lieferte (E)-3-(2-Cyano-3-oxobut-1-en-1-yl)benzamid (**22**) als weißen Feststoff.^[218]

Ausbeute: 67 mg (63%)

¹H NMR (500 MHz, DMSO-d₆) δ [ppm] = 8.51 (s, 1H), 8.49 (s, 1H), 8.23-8.19 (d, 1H), 8.13 (bs, 1H), 8.10-8.06 (d, 1H), 7.73 – 7.65 (t, 1H), 7.58 (bs, 1H), 2.54 (s, 3H)

¹³C NMR (126 MHz, DMSO-D₆) δ [ppm] = 193.10, 166.95, 153.29, 135.38, 132.35, 131.91, 131.43, 130.69, 129.29, 115.98, 112.41, 26.66

ESI-HRMS: [M+H⁺] berechnet für C₁₂H₁₁N₂O₂⁺: 215.0776 Da, gefunden: 215.08236

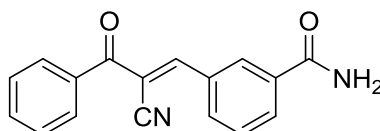
Elementaranalyse: berechnet für C₁₂H₁₁N₂O₂ N=13.08%, C=67.28%, H=4.71%, gefunden: N=13.19%, C=64.50%, H=4.73%

Rf: 0.75 (Methanol/DCM 10:90)

Smp.: 179°C

Laborjournalnummer: CT88

(E)-3-(2-Cyano-3-oxo-3-phenylprop-1-en-1-yl)benzamid (**23**)



23

49 mg (0.33 mmol) **1** und 8 mg (0.07 mmol) L-Prolin wurden in 2 ml absoluten Ethanol gelöst. 48 mg (0.33 mmol) Benzoylacetonitril wurden hinzugefügt, die Mischung 30 h bei Raumtemperatur gerührt. Der weiß-beige Rückstand wurde abfiltriert, mit kaltem Ethanol gewaschen und via HPLC aufgereinigt. Lyophilisation aus Wasser/Acetonitril lieferte (E)-3-(2-Cyano-3-oxo-3-phenylprop-1-en-1-yl)benzamid (**23**) als weißen Feststoff.^[218]

Ausbeute: 35 mg (38%)

¹H NMR (500 MHz, DMSO-d₆) δ [ppm] = 8.48 (s, 1H), 8.25-8.22 (d, 1H), 8.18 (s, 1H), 8.10-8.08 (d, 1H), 8.10 (bs, 1H), 7.90-7.87 (m, 2H), 7.75 – 7.67 (m, 2H), 7.63 – 7.59 (m, 2H), 7.56 (bs, 1H)

¹³C NMR (126 MHz, DMSO-D₆) δ [ppm] = 189.66, 166.87, 155.15, 135.48, 135.28, 133.42, 132.35, 131.90, 131.56, 130.57, 129.44, 129.26, 128.79, 116.33, 111.35

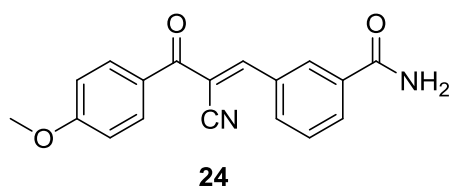
ESI-HRMS: [M+H⁺] berechnet für C₁₇H₁₃N₂O₂⁺: 277.0932 Da, gefunden: 277.09741 Da

Rf: 0.7 (Methanol/DCM 10:90)

Smp.: 186°C

Laborjournalnummer: CT94

(E)-3-(2-cyano-3-(4-methoxyphenyl)-3-oxoprop-1-en-1-yl)benzamid (**24**)



37 mg (0.25 mmol) **1** und 45 mg (0.25 mmol) 3-(4-Methoxyphenyl)-3-oxopropanenitril wurden in 2 ml Ethanol gelöst, mit 10 mol% Piperidin und einer Spatelspitze 4 Å Molsieb versetzt und 26h unter Reflux gekocht. Nach Abkühlung wurde das Präzipitat abfiltriert, mit kaltem Ethanol gewaschen und via MPLC aufgereinigt. Lyophilisation aus Wasser/Acetonitril lieferte (E)-3-(2-cyano-3-(4-methoxyphenyl)-3-oxoprop-1-en-1-yl)benzamid als weißen Feststoff.^[216]

Ausbeute: 49 mg (64%)

¹H NMR (500 MHz, DMSO-d₆) δ [ppm] = 8.47 (t, 1H), 8.23-8.20 (d, 1H), 8.14 (s, 1H), 8.09 (bs, 1H), 8.09-8.07 (m, 1H), 7.93-7.90 (m, 2H), 7.71 – 7.66 (t, 1H), 7.56 (bs, 1H), 7.15-7.12 (m, 2H), 3.88 (s, 3H)

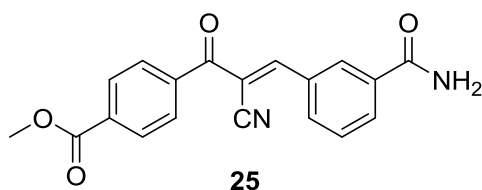
¹³C NMR (126 MHz, DMSO-D₆) δ [ppm] = 187.73, 166.93, 163.64, 154.07, 135.26, 132.24, 132.12, 132.05, 131.29, 130.35, 129.21, 127.74, 116.58, 114.19, 111.28, 55.70

ESI-HRMS: [M+H⁺] berechnet für C₁₈H₁₄N₂O₃Na⁺: 329.08966 Da, gefunden: 329.08946 Da

Smp.: 201°C

Laborjournalnummer: CT96

Methyl (E)-4-(3-(3-carbamoylphenyl)-2-cyanoacryloyl)benzoat (25)



36 mg (0.24 mmol) **1** und 49 mg (0.24 mmol) Methyl 4-(2-cyanoacetyl)benzoat wurden in 2 ml Ethanol gelöst, mit 10 mol% Piperidin und einer Spatelspitze 4Å Molsieb versetzt und 26h unter Reflux gekocht. Nach Abkühlung wurde das Präzipitat abfiltriert, mit kaltem Ethanol gewaschen und via MPLC aufgereinigt. Lyophilisation aus Wasser/Acetonitril lieferte Methyl (E)-4-(3-(3-carbamoylphenyl)-2-cyanoacryloyl)benzoat (**25**) als weißen Feststoff.^[216]

Ausbeute: 20 mg (25%)

¹H NMR (500 MHz, DMSO-d₆) δ [ppm] = 8.48 (t, 1H), 8.26-8.23 (d, 1H), 8.19 (s, 1H), 8.15-8.12 (m, 2H), 8.11-8.08 (m, 1H), 8.09 (bs, 1H), 7.99-7.97 (m, 2H), 7.73 – 7.68 (t 1H), 7.56 (bs, 1H), 3.91 (s, 3H)

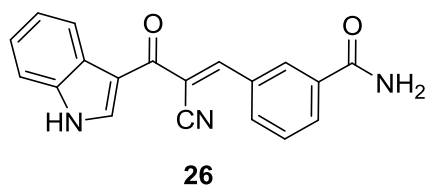
¹³C NMR (126 MHz, DMSO-D₆) δ [ppm] = 189.61, 166.82, 165.51, 155.82, 139.44, 135.30, 133.15, 132.41, 131.80, 131.74, 130.81, 129.66, 129.37, 129.28, 116.06, 111.31, 52.57

ESI-HRMS: [M+H⁺] berechnet für C₁₉H₁₅N₂O₄⁺: 335.0987 Da, gefunden: 335.10264 Da

Smp.: 187°C

Laborjournalnummer: CT97

(Z)-3-(2-Cyano-3-(1H-indol-3-yl)-3-oxoprop-1-en-1-yl)benzamid (26)



28 mg (0.19 mmol) **1** und 35 mg (0.19 mmol) 3-(1H-Indol-3-yl)-3-oxopropanenitril wurden in 3 ml Ethanol gelöst, mit 10 mol% Piperidin und einer Spatelspitze 4Å Molsieb versetzt und 2h unter Reflux gekocht. Die Mischung wurde via MPLC aufgereinigt. Lyophilisation aus Wasser/Acetonitril lieferte (Z)-3-(2-Cyano-3-(1H-indol-3-yl)-3-oxoprop-1-en-1-yl)benzamid (**26**) als gelben Feststoff.^[216]

Ausbeute: 30 mg (50%)

¹H NMR (500 MHz, DMSO-d₆) δ [ppm] = 12.32 (s, 1H), 8.49 (s, 2H), 8.28 (s, 1H), 8.21-8.20 (m, 1H), 8.20-8.18 (m, 1H), 8.10 (bs, 1H), 8.07-8.05 (m, 1H), 7.7 – 7.66 (t, 1H), 7.57-7.54 (m, 2H), 7.33 – 7.25 (m, 2H)

¹³C NMR (126 MHz, DMSO-D₆) δ [ppm] = 181.23, 167.09, 151.46, 136.75, 136.26, 135.20, 132.58, 132.08, 130.62, 129.95, 129.06, 126.07, 123.62, 122.48, 121.35, 117.32, 113.50, 112.53, 112.46

ESI-HRMS: [M+H⁺] berechnet für C₁₉H₁₄N₃O₂⁺: 316.1041 Da, gefunden: 316.10791 Da

Elementaranalyse: berechnet für C₁₉H₁₃N₃O₂ N=13.33%, C=72.37%, H=4.16%, gefunden: N=12.92%, C=69.39%, H=4.19%

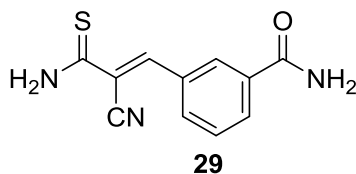
Smp.: 265°C

Rf: 0.5 (Methanol/DCM 10:90)

Laborjournalnummer: CT98

Thioamidderivat

(E)-3-(3-Amino-2-cyano-3-thioxoprop-1-en-1-yl)benzamid (29)



30 mg (0.22 mmol) **1** und 22 mg (0.22 mmol) Cyanothioacetamid wurden in 3 ml Methanol gelöst und mit 2.2 µl (0.02 mmol) N-Methylpiperazin versetzt. Das Gemisch wird 2h bei 60°C im Ölbad gerührt und anschließend mittels MPLC aufgereinigt. Lyophilisation aus Wasser/Acetonitril liefert **29** als gelben Feststoff.^[53]

Ausbeute: 6 mg (14%)

¹H NMR (500 MHz, DMSO-d₆) δ [ppm] = 10.16 (s, 1H), 9.68 (s, 1H), 8.36 (s, 1H), 8.12 (s, 1H), 8.10 (bs, 1H), 8.10-8.07 (m, 1H), 8.04-8.01 (m, 1H), 7.67-7.63 (t, 1H), 7.54 (bs, 1H)

¹³C NMR (126 MHz, DMSO-D₆) δ [ppm] = 192.11, 167.02, 146.23, 135.26, 132.08, 131.85, 130.53, 129.93, 129.18, 115.97, 113.35

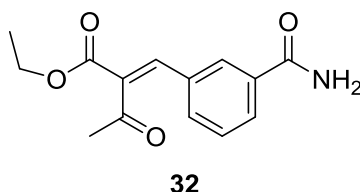
ESI-MS: [M+H⁺] berechnet für C₁₁H₉N₃OS⁺: 232.1 Da, gefunden: 232.0 Da

Rf: 0.5 (Methanol/DCM 10:90)

Laborjournalnummer: CT108

Malonesterderivate

Ethyl-(E)-2-(3-carbamoylbenzylidene)-3-oxobutanoat (32)



34 mg (0.23 mmol) **1** und 29 μ l (0.23 mmol) Acetessigester wurden in 3 ml Toluol gelöst. 1 μ l Piperidin, 3 μ l Eisessig und eine Spatelspitze 4 \AA Molsieb wurden hinzugefügt, die Mischung 2 h unter Reflux gekocht und für 44.5h bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wurde am Rotationsverdampfer entfernt und der Rückstand via HPLC aufgereinigt. Lyophilisation aus Wasser/Acetonitril lieferte Ethyl-(E)-2-(3-carbamoylbenzylidene)-3-oxobutanoat (**32**) als weißen Feststoff.^[219]

Ausbeute: 27 mg (45% E-Isomer), 4 mg (7% Z-Isomer)

¹H NMR (500 MHz, DMSO-d₆) δ [ppm] = 8.07 – 8.05 (t, 1H), 8.04 (bs, 1H), 7.96-7.93 (m, 1H), 7.84 (s, 1H), 7.65-7.62 (m, 1H), 7.57-7.53 (t, 1H), 7.46 (bs, 1H), 4.27-4.23 (q, 2H), 2.45 (s, 3H), 1.21-1.17 (t, 3H)

¹³C NMR (126 MHz, DMSO) δ [ppm] = 195.86, 167.13, 166.81, 140.75, 135.24, 135.03, 132.93, 131.69, 129.29, 129.06, 128.87, 61.23, 25.95, 13.59

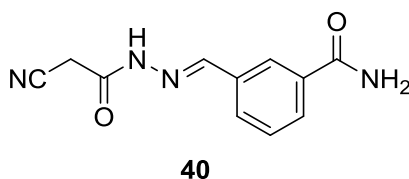
ESI-HRMS: [M+H⁺] berechnet für C₁₄H₁₆NO₄⁺: 262.1035 Da, gefunden: 262.10776 Da

Laborjournalnummer: CT90

Acylhydrazone

Allgemeine Vorschrift: 20-23 mg 3-Formylbenzamid (**1**) (0.13-0.15 mmol) wurden in 3 ml Ethanol gelöst. 1 Äquivalent Hydrazid (0.13-0.15 mmol) wurden hinzugefügt und die Mischung bei Raumtemperatur für 24h gerührt.

(E)-3-((2-(2-cyanoacetyl)hydrazono)methyl)benzamid (40)



Der sich gebildete hellgelbe Niederschlag wurde abfiltriert und mit kaltem Ethanol gewaschen. Lyophilisation aus Wasser/Acetonitril lieferte (E)-3-((2-(2-cyanoacetyl)-hydrazono)methyl)benzamid (**40**) als hellgelben Feststoff.

Ausbeute: 20 mg (56%); Es entsteht ein Gemisch mit etwa 1/3 Knoevenagel Produkt und 2/3 Hydrazid. Das Gemisch wurde für die Aktivitätstestung nicht weiter aufgereinigt.

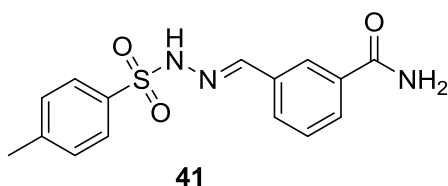
¹H NMR (500 MHz, DMSO-d₆) δ [ppm] = 11.87 (bs, 1H), 8.15 (s, 1H), 8.06 (bs, 1H), 8.05 (s, 1H), 7.93-7.90 (d, J = 7.8 Hz, 1H), 7.87-7.84 (d, J = 7.7 Hz, 1H), 7.53-7.51 (t, 1H), 7.49 (bs, 1H), 4.26 (s, 2H).

¹³C NMR (126 MHz, DMSO-D₆) δ [ppm] = 167.24, 164.93, 143.80, 134.79, 133.89, 129.39, 129.01, 128.79, 126.12, 116.07, 24.32

ESI-HRMS: [M+Na⁺] berechnet für C₁₁H₁₀N₄O₂Na⁺: 253.07015 Da, gefunden: 253.06983 Da

Laborjournalnummer: CT103

(E)-3-((2-tosylhydrazono)methyl)benzamid (**41**)



Die Mischung wurde via MPLC aufgereinigt. Das resultierende helle Öl wurde in wenigen ml Acetonitril/Wasser-Gemisch (1:1, V/V) aufgenommen und fiel im Ultraschallbad weiß aus. Der Rückstand wurde abfiltriert und getrocknet und lieferte (E)-3-((2-tosylhydrazono)methyl)benzamid (**41**) als weißen Feststoff.

Ausbeute: 27 mg (58%)

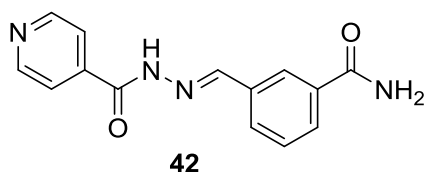
¹H NMR (500 MHz, DMSO-d₆) δ [ppm] = 11.55 (bs, 1H), 8.05 (bs, 1H), 8.01 (t, 1H), 7.95 (s, 1H), 7.87-7.85 (m, 1H), 7.79-7.76 (m, 2H), 7.72-7.69 (m, 1H), 7.49 – 7.45 (t, 1H), 7.44 (bs, 1H), 7.42-7.39 (m, 2H), 2.35 (s, 3H)

¹³C NMR (126 MHz, DMSO-D₆) δ [ppm] = 167.92, 146.92, 144.06, 136.75, 135.47, 134.36, 130.27, 129.56, 129.39, 129.34, 127.77, 126.74, 21.57

ESI-HRMS: [M+Na⁺] berechnet für C₁₅H₁₆N₃O₃S⁺: 318.091239 Da, gefunden: 318.09095 Da

Laborjournalnummer: CT105

(E)-3-((2-(2-cyanoacetyl)hydrazono)methyl)benzamid (42)



Der sich gebildete weiße Niederschlag wurde abfiltriert und mit kaltem Ethanol gewaschen. Lyophilisation aus Wasser/Acetonitril lieferte (E)-3-((2-(2-cyanoacetyl)hydrazono)methyl)benzamid (**42**) als weißen Feststoff.

Ausbeute: 27 mg (75%)

¹H NMR (500 MHz, DMSO-d₆) δ [ppm] = 12.16 (bs, 1H), 8.80 (d, 2H), 8.51 (s, 1H), 8.22 (s, 1H), 8.12 (bs, 1H), 7.96-7.92 (d, J = 7.7 Hz, 1H), 7.92-7.88 (d, J=7.7 Hz, 1H), 7.86-7.80 (d, 2H), 7.58-7.53 (t, J = 7.7 Hz, 1H), 7.48 (bs, 1H)

¹³C NMR (126 MHz, DMSO-D₆) δ [ppm] = 167.43, 161.72, 150.35, 148.39, 140.42, 135.02, 134.17, 129.69, 129.13, 128.87, 126.49, 121.56

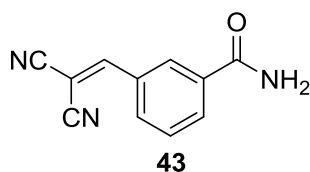
ESI-HRMS: [M+Na⁺] berechnet für C₁₄H₁₂N₄O₂Na⁺: 291.0858 Da, gefunden: 291.08588 Da

Smp.: 292°C

Laborjournalnummer: CT104

Sonstige

3-(2,2-Dicyanovinyl)benzamid (43)



32 mg (0.21 mmol) **1** und 30 µl (0.53 mmol) Malonsäuredinitril wurden in 2 ml Ethanol gelöst. 10 µl (0.11 mmol) Piperidin wurde hinzugefügt, die Mischung für 1 h bei 65°C gerührt und anschließend via MPLC aufgereinigt. Lyophilisation aus Wasser/Acetonitril lieferte 3-(2,2-Dicyanovinyl)benzamid (**42**) als weißen Feststoff.^[216]

Ausbeute: 19 mg (45%)

¹H NMR (500 MHz, DMSO-d₆) δ [ppm] = 8.61 (s, 1H), 8.42 (t, 1H), 8.15 (bs, 1H), 8.14-8.11 (m, 1H), 8.10-8.07 (m, 1H), 7.73-7.69 (t, 1H), 7.62 (bs, 1H)

¹³C NMR (126 MHz, DMSO-D₆) δ [ppm] = 166.69, 161.13, 135.50, 132.39, 131.40, 130.17, 129.50, 114.07, 112.99, 82.68

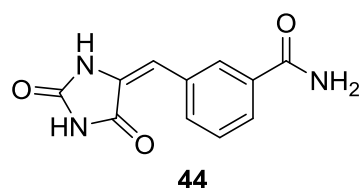
ESI-HRMS: $[M+H^+]$ berechnet für $C_{11}H_8N_3O^+$: 198.0623 Da, gefunden: 198.06645 Da

Smp.: 206°C

Laborjournalnummer: CT83

Heterozyklen

(E)-3-((2,5-Dioxoimidazolidin-4-ylidene)methyl)benzamid (**44**)



32 mg (0.22 mmol) **1**, 21 mg (0.22 mmol) Hydantoin und 6.5 μ l (0.11 mmol) Ethanolamin wurden in 2 ml Ethanol/Wasser (1:1 V/V) gelöst und 24h bei 80°C gekocht. Nach dem Abkühlen wurde das Präzipitat abfiltriert und mit kaltem Ethanol/Wasser-Gemisch gewaschen. Lyophilisation aus Wasser/Acetonitril lieferte (E)-3-((2,5-Dioxoimidazolidin-4-ylidene)methyl)benzamid (**44**) als weißen Feststoff.^[220]

Ausbeute: 11 mg (21%)

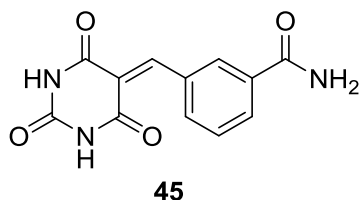
Rf: 0.07 (Methanol/DCM 10:90)

¹H NMR (500 MHz, DMSO-d₆) δ [ppm] = 10.81 (bs, 2H), 8.05 (s, 1H), 7.90 (s, 1H), 7.83-7.68 (d, 2H), 7.55-7.42 (s, 2H), 6.38 (s, 1H)

ESI-HRMS: $[M+H^+]$ berechnet für $C_{11}H_{10}N_3O_3^+$: 232.0677 Da, gefunden: 232.0722 Da

Laborjournalnummer: CT91

3-((2,4,6-Trioxotetrahydropyrimidin-5(2H)-ylidene)methyl)benzamid (**45**)



24 mg (0.16 mmol) **1** und 18 mg (0.14 mmol) Barbitursäure wurden in 2 ml Ethanol/Wasser (1:1, V/V) gelöst, 4 h bei 80°C gekocht und anschließend 2 Tage bei Raumtemperatur gerührt. Das gelbe Präzipitat wurde abfiltriert und mit kaltem Wasser gewaschen. Lyophilisation aus Wasser/Acetonitril lieferte 3-((2,4,6-Trioxotetrahydropyrimidin-5(2H)ylidene)methyl)benzamid (**45**) als gelben Feststoff.^[221]

Ausbeute: 22 mg (60%)

¹H NMR (500 MHz, DMSO-d₆) δ [ppm] = 11.42 (bs, 1H), 11.27 (bs, 1H), 8.40 (s, 1H), 8.30 (s, 1H), 8.21-8.18 (d, 1H), 8.02 (bs, 1H), 7.99-7.96 (d, 1H), 7.56 – 7.52 (t, 1H), 7.47 (bs, 1H)

¹³C NMR (126 MHz, DMSO-D₆) δ [ppm] = 167.23, 163.18, 161.43, 153.83, 150.23, 134.73, 134.04, 132.84, 131.93, 130.53, 127.93, 119.92

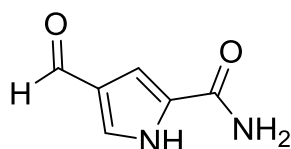
ESI-HRMS: [M+H⁺] berechnet für C₁₂H₁₀N₃O₄⁺: 260.0627 Da, gefunden: 260.06657 Da

Smp.: 293°C

Rf: 0.05 (Methanol/DCM 10:90)

Laborjournalnummer: CT106

4-Formyl-1H-pyrrole-2-carboxamid



37 mg (0.2 mmol) Ethyl 4-formyl-1H-pyrrole-2-carboxylat wurden in 5 ml 1M KOH-Lösung 6h bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktionskontrolle erfolgte über Dünnschichtchromatographie (Methanol/DCM 10:90). Anschließend wurde mit 2M HCl-Lösung auf pH1 angesäuert und die Mischung 3-mal gegen Ethylacetat ausgeschüttelt. Das Lösungsmittel wurde am Rotationsverdampfer entfernt. Lyophilisation aus Wasser/Acetonitril liefert 4-Formyl-1H-pyrrole-2-carbonsäure (Ausbeute: 25 mg, 90%).

Der Rückstand wird ohne weitere Aufreinigung in 1 ml trockenem THF und 10 µl DMF gelöst und im Eisbad gekühlt. 34 µl (0.4 mmol) Oxalylchlorid wurden hinzugetropft und 1 h gerührt. Anschließend wurden 2 ml 0.4M NH₃ in THF hinzugefügt und 1h bei Raumtemperatur gerührt. Die Mischung wurde via MPLC aufgereinigt. Lyophilisation aus Wasser/Acetonitril lieferte 4-Formyl-1H-pyrrole-2-carboxamid (**48**) als weißen Feststoff.^[222]

Ausbeute: 11 mg (44%)

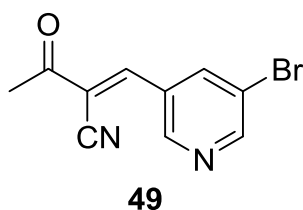
¹H NMR (500 MHz, DMSO-d₆) δ [ppm] = 12.24 (bs, 1H), 9.71 (s, 1H), 7.78 (bs, 1H), 7.67 (d, 1H), 7.22 (bs, 1H), 7.19 (d, 1H)

¹³C NMR (126 MHz, DMSO-D₆) δ [ppm] = 185.79, 161.74, 130.33, 128.87, 126.47, 108.25

ESI-MS: [M-H⁺] berechnet für C₆H₅N₂O₂⁻: 137.035 Da, gefunden: 137.1 Da

Laborjournalnummer: CT100

(E)-2-((5-bromopyridin-3-yl)methylene)-3-oxobutanenitril (53)



48 mg (0.26 mmol) 5-Bromonicotinaldehyd und 22 μ l (0.26 mmol) Oxobutanitril wurden in 3 ml Ethanol gelöst, mit 10 mol% Piperidin und einer Spatelspitze 4Å Molsieb versetzt und 19h unter Reflux gekocht. Die Mischung wurde anschließend via HPLC aufgereinigt. Lyophilisation aus Wasser/Acetonitril lieferte (E)-2-((5-bromopyridin-3-yl)methylene)-3-oxobutanenitril (**53**) als weißen Feststoff.^[216]

Ausbeute: 7 mg (11%)

¹H NMR (500 MHz, DMSO-d₆) δ [ppm] = 9.11 (s, 1H), 8.94 (s, 1H), 8.64 (s, 1H), 8.46 (s, 1H), 2.53 (s, 3H)

¹³C NMR (126 MHz, DMSO-D₆) δ [ppm] = 192.47, 153.33, 149.63, 149.01, 138.80, 115.63, 114.88, 26.64

ESI-HRMS: [M+H⁺] berechnet für C₁₀H₈BrN₂O⁺: 250.9819 Da, gefunden: 250.98208 Da

Laborjournalnummer: CT99

Anhang: Tabellen und Spektren

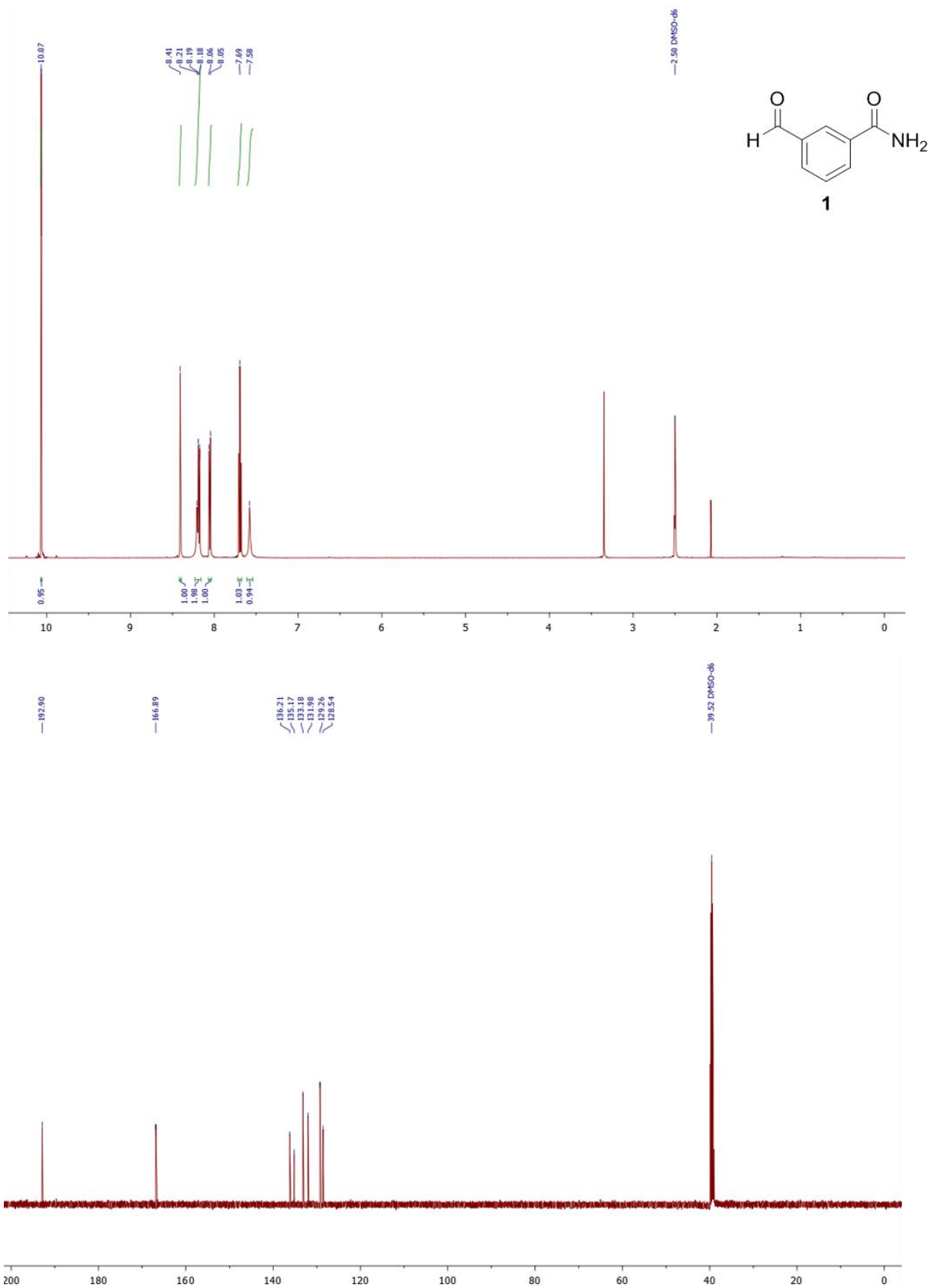


Abb. A1 ¹H-NMR-Spektrum (500 MHz, DMSO-d₆) und ¹³C-NMR-Spektrum (126 MHz, DMSO-d₆) von Aldehydfragment 1.

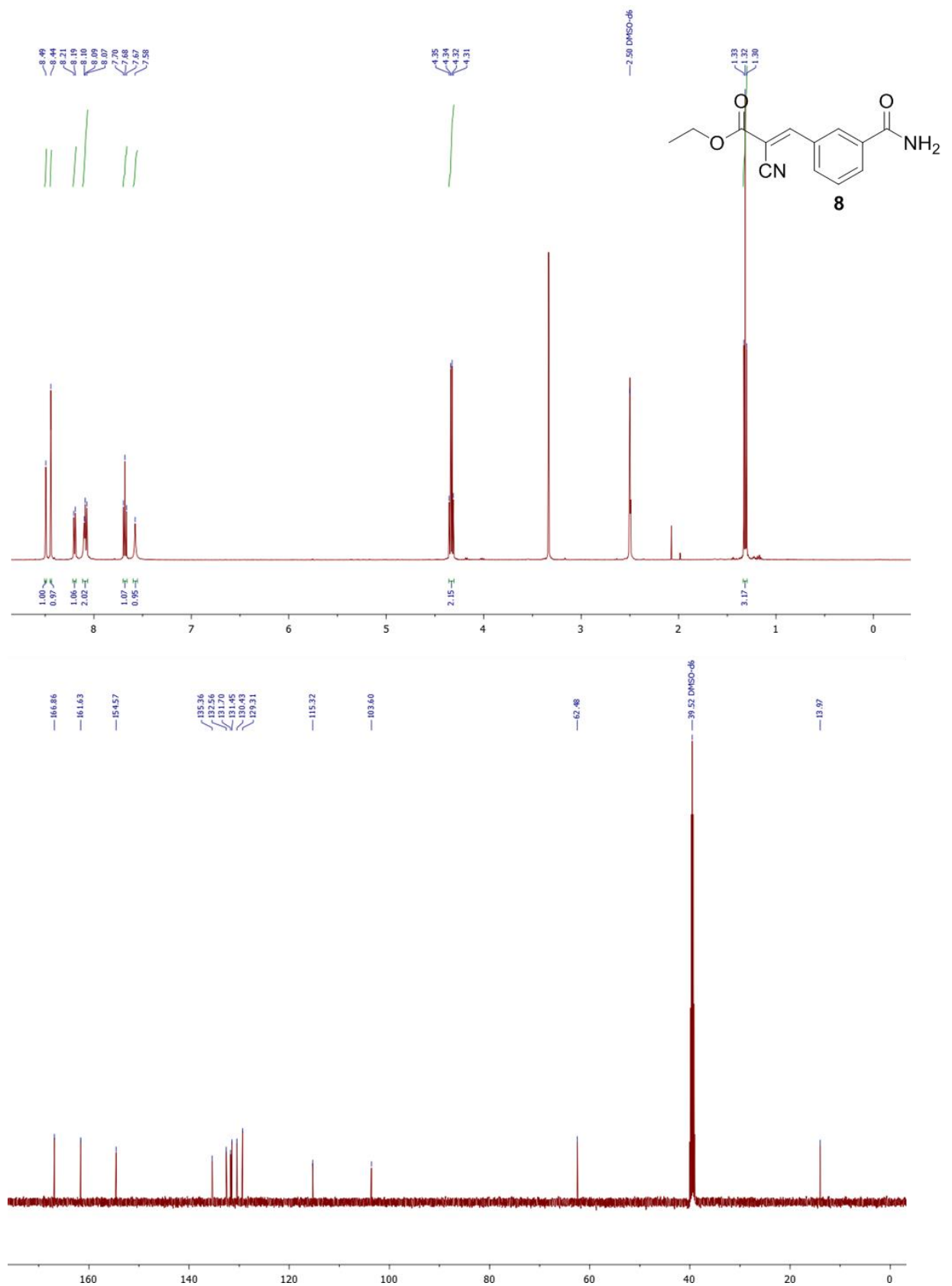


Abb. A2 ¹H-NMR-Spektrum (500 MHz, DMSO-d₆) und ¹³C-NMR-Spektrum (126 MHz, DMSO-d₆) von Cyanessigsäureester **8**.

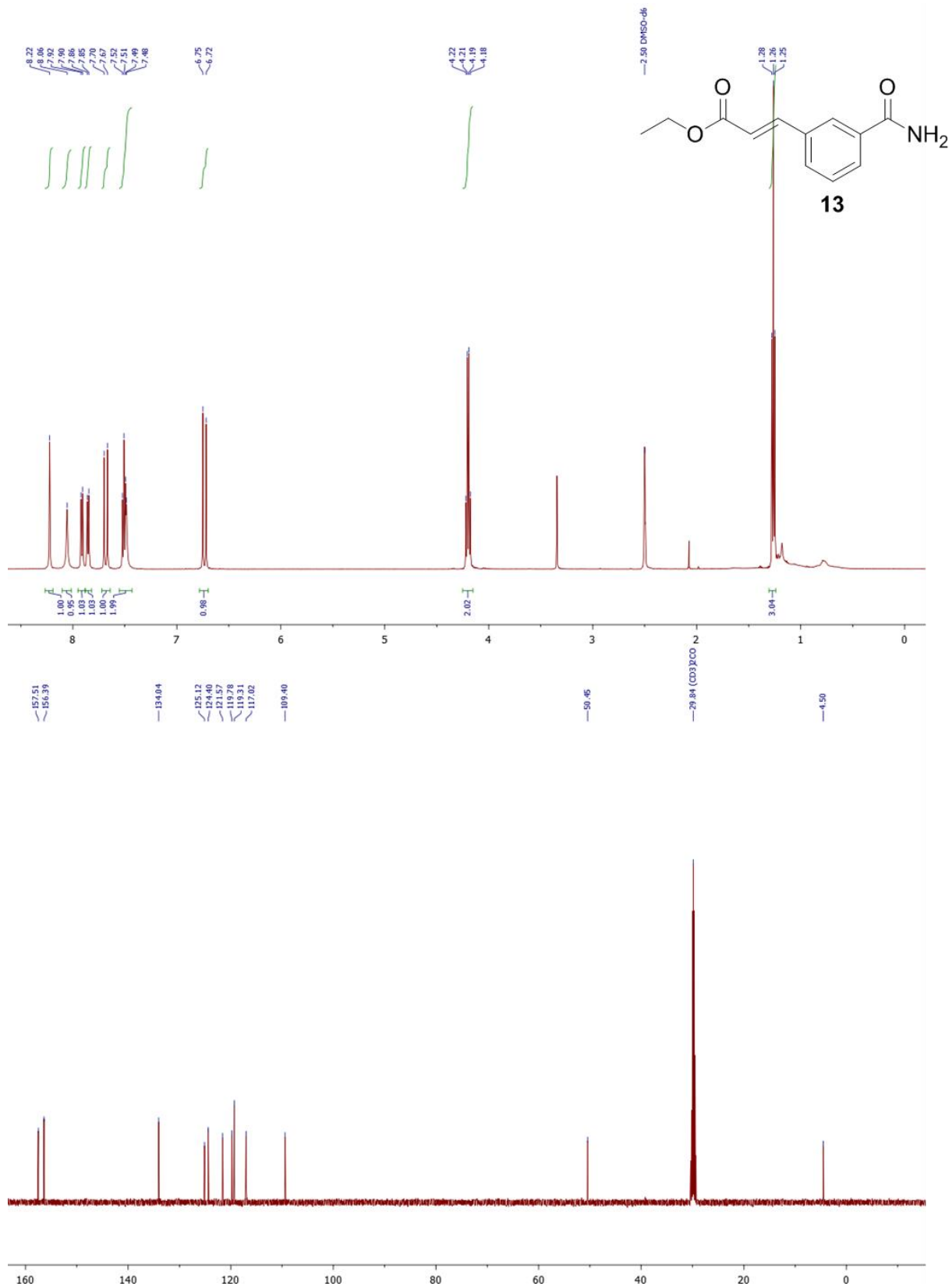


Abb. A3 ¹H-NMR-Spektrum (500 MHz, DMSO-d₆) und ¹³C-NMR-Spektrum (126 MHz, DMSO-d₆)

von **13**.

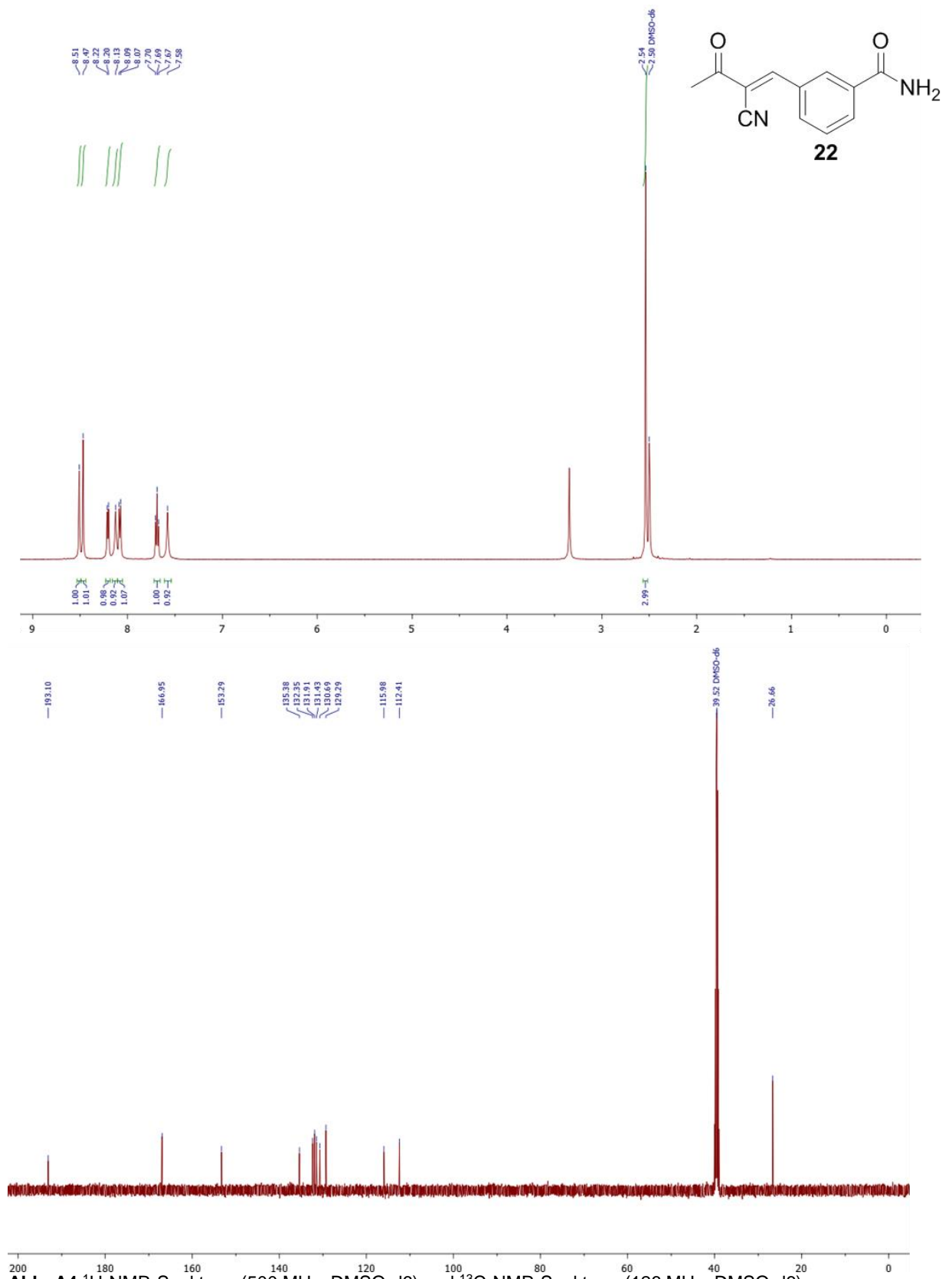


Abb. A4 ¹H-NMR-Spektrum (500 MHz, DMSO-d₆) und ¹³C-NMR-Spektrum (126 MHz, DMSO-d₆)

von **22**.

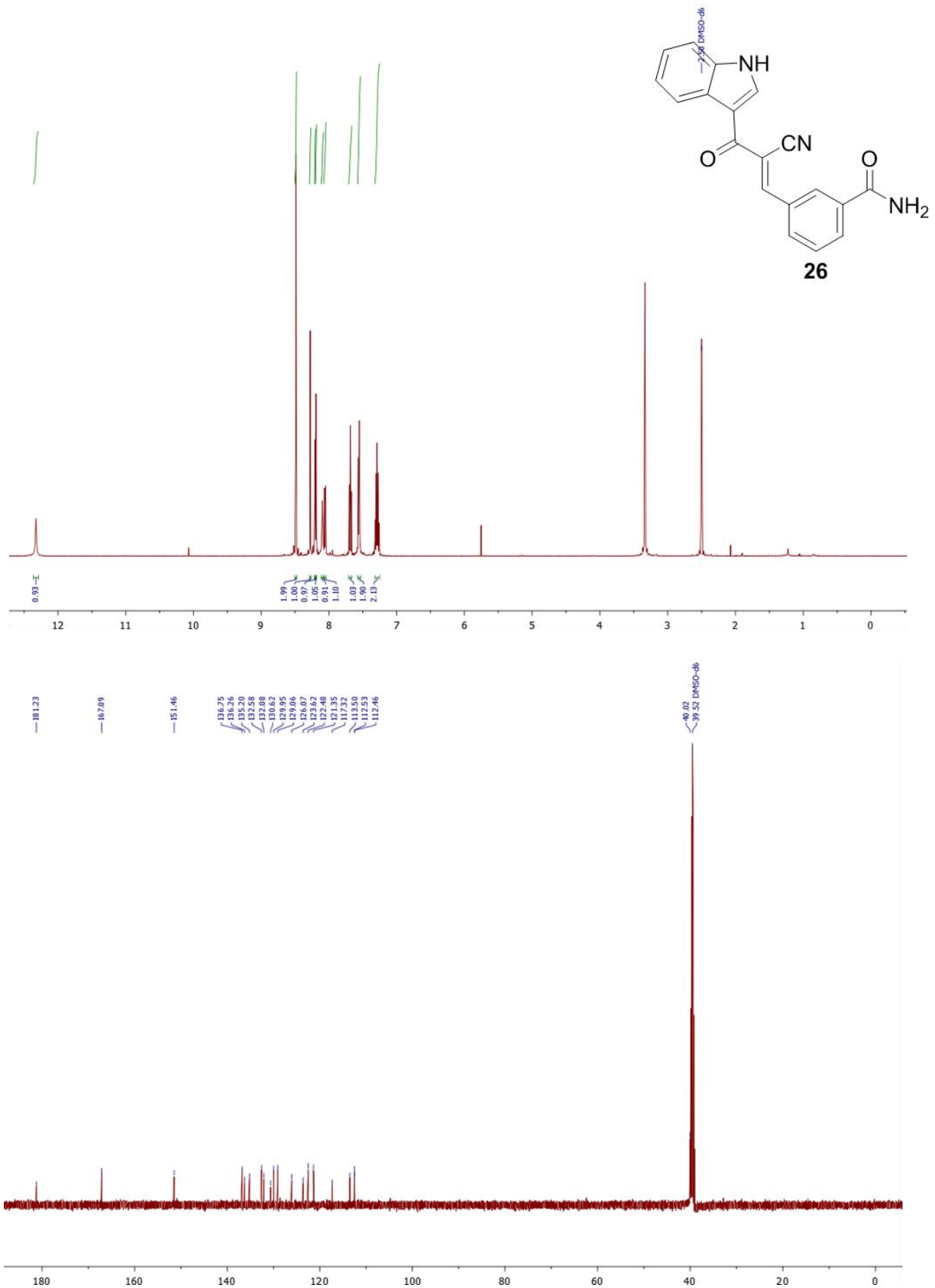


Abb. A5 ¹H-NMR-Spektrum (500 MHz, DMSO-d₆) und ¹³C-NMR-Spektrum (126 MHz, DMSO-d₆) von 26.

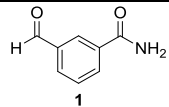
Strukturformel und Nummer

IC₅₀

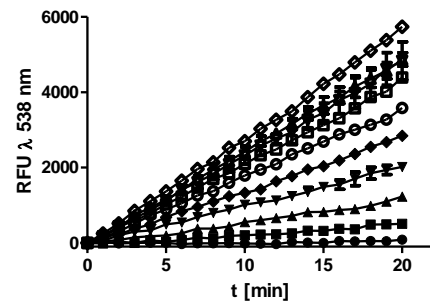
Enzymkinetischer Verlauf im FRET-Assay

Bestimmung der Inhibitions Kenngröße

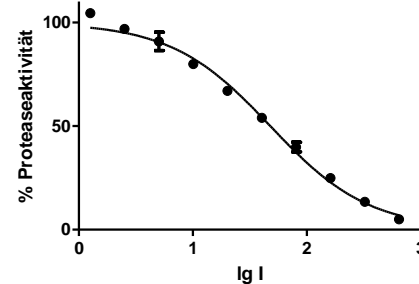
Hill-Koeffizient
t



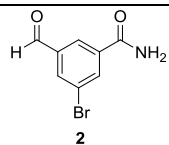
47.8
± 2.5
μM



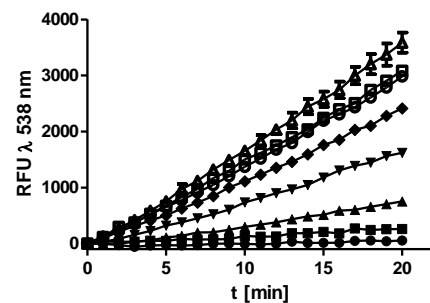
- [I] = 645 μM
- [I] = 323 μM
- ▲ [I] = 161 μM
- ▼ [I] = 81 μM
- ◆ [I] = 40 μM
- [I] = 20 μM
- [I] = 10 μM
- △ [I] = 5 μM
- ▽ [I] = 2.5 μM
- ◇ [I] = 1.3 μM



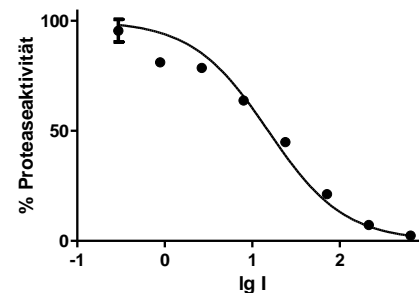
1



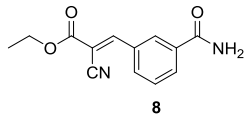
14.5
± 0.9
μM



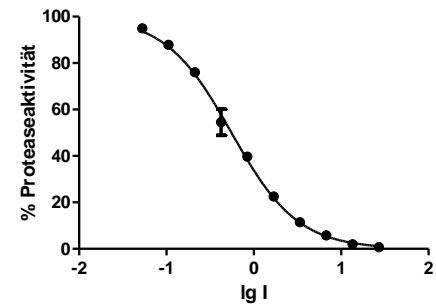
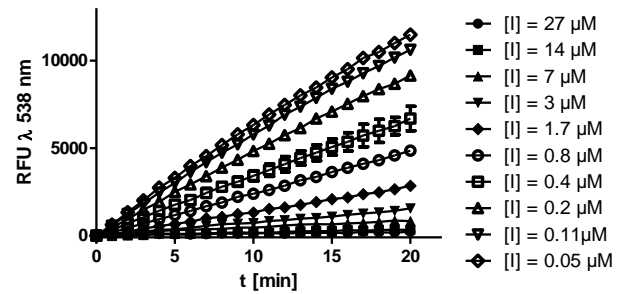
- [I] = 645 μM
- [I] = 215 μM
- ▲ [I] = 72 μM
- ▼ [I] = 24 μM
- ◆ [I] = 8 μM
- [I] = 2.7 μM
- [I] = 0.9 μM
- △ [I] = 0.3 μM



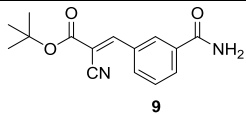
0.8



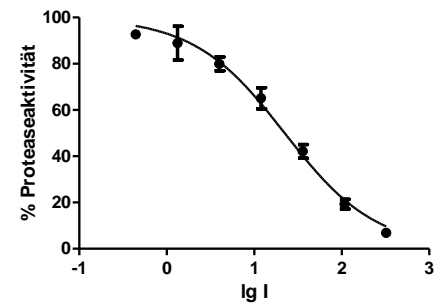
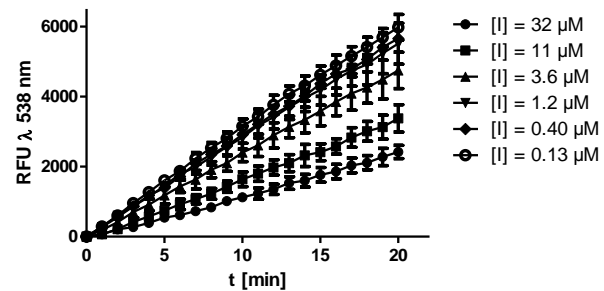
0.56
±
0.04
μM



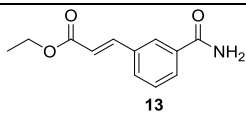
1.1



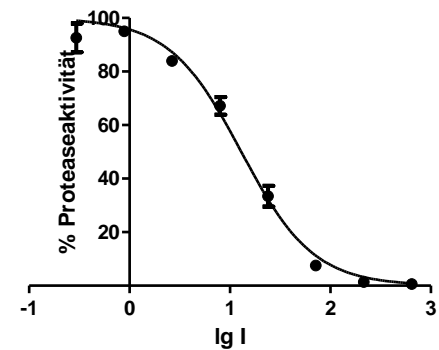
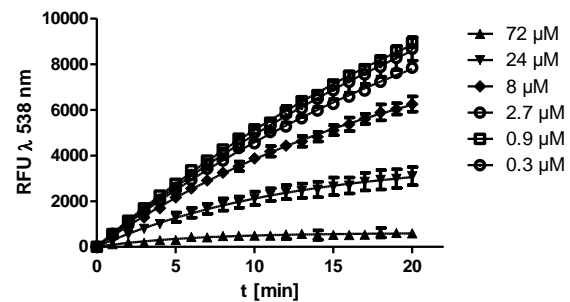
22.9
± 6.5
μM



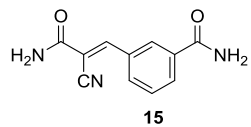
0.8



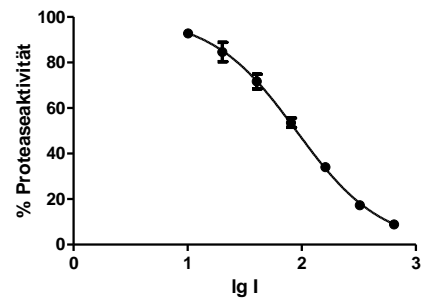
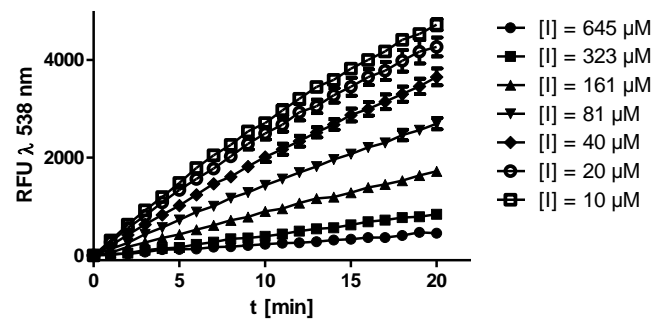
13 ±
1.9
μM



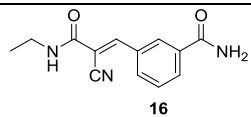
1.2



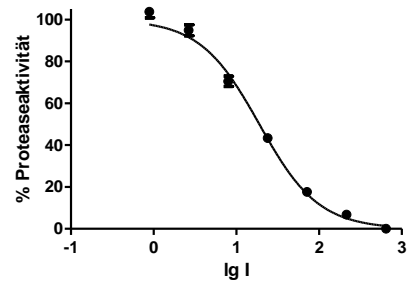
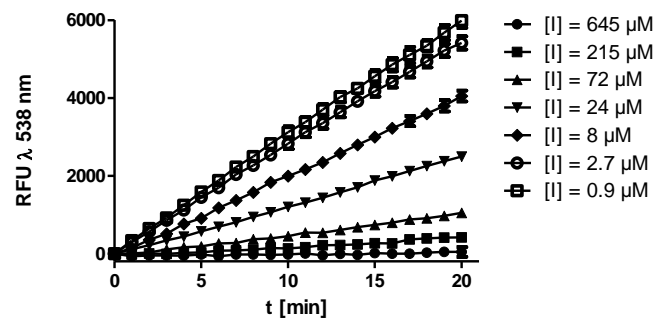
89.7
±
14.3
μM



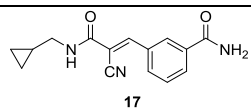
1.2



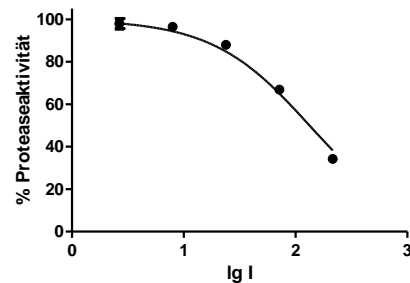
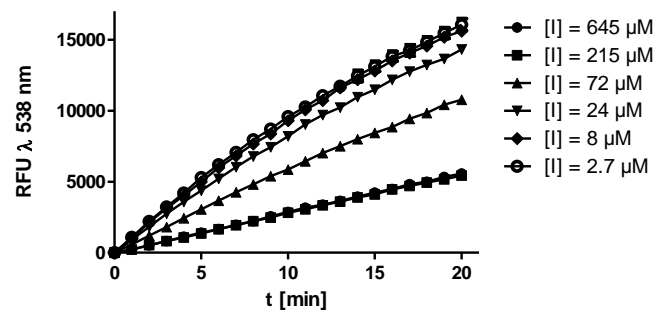
18.9
± 1.4
μM



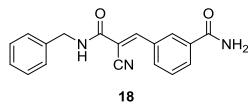
1.2



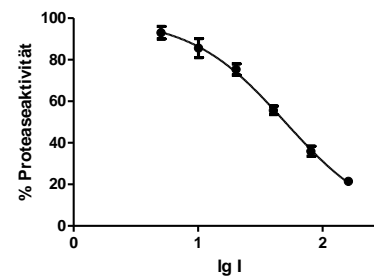
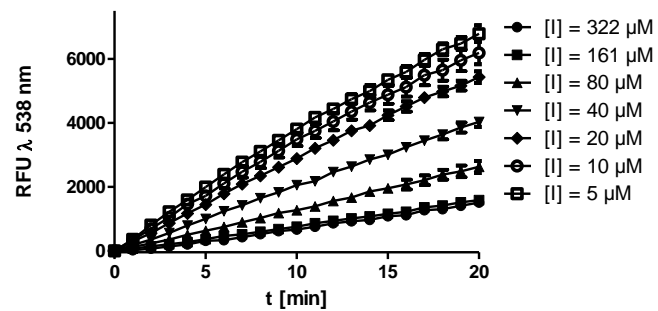
126.
5 ±
8.6
μM



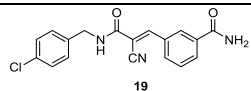
1.2



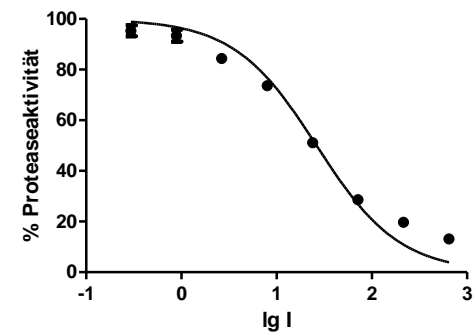
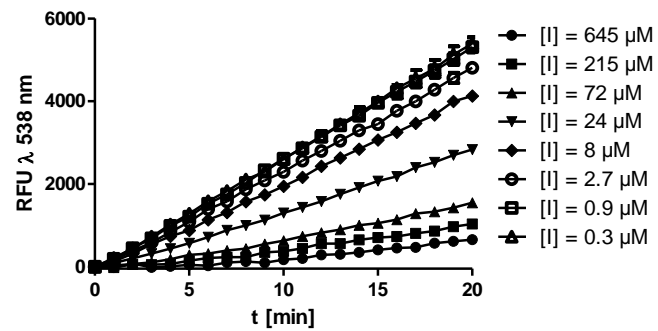
50.1
± 8.3
μM



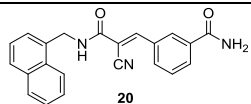
1.1



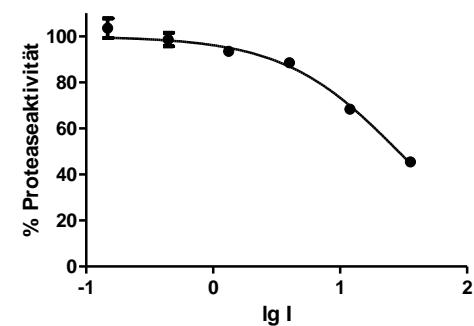
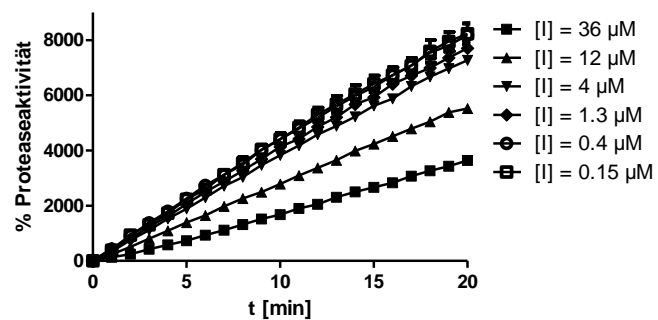
26.9
± 2.3
μM



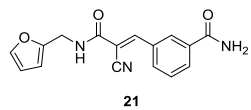
1.4



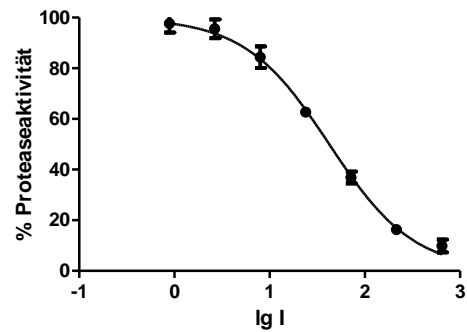
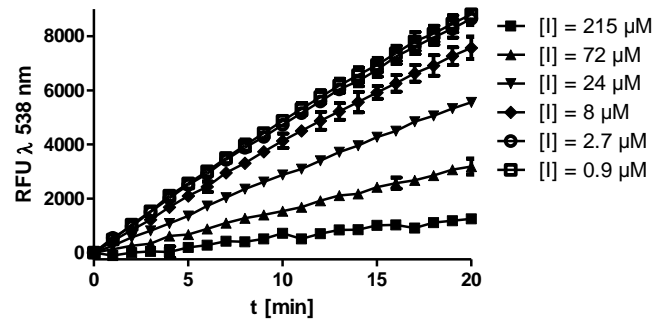
28.9
± 3.2
μM



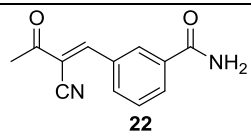
1



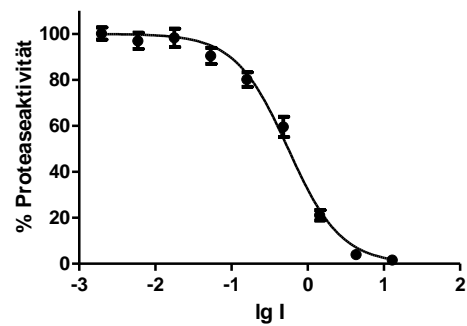
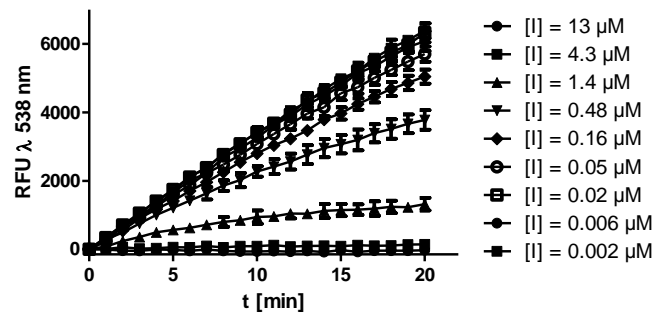
42.4
± 7.6
μM



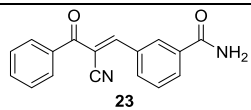
1



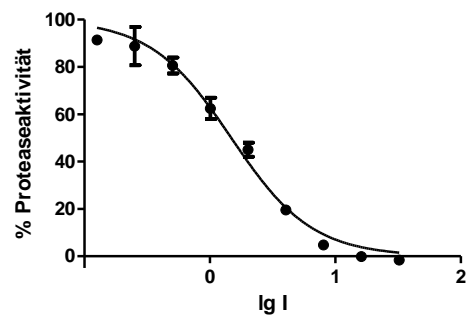
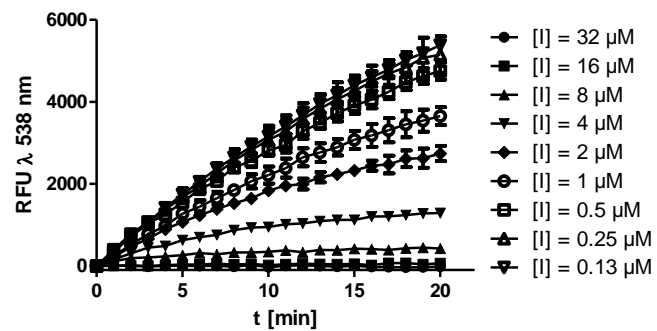
0.56
± 0.12
μM



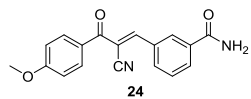
1.3



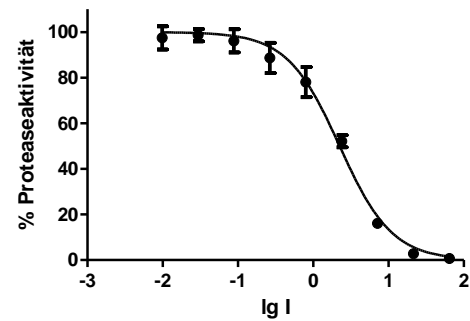
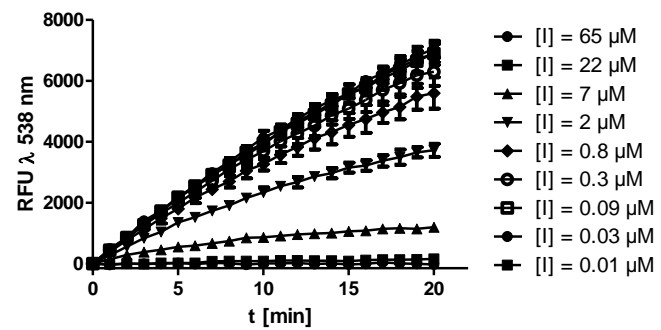
1.48
± 0.3
μM



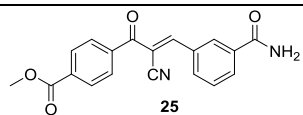
1.4



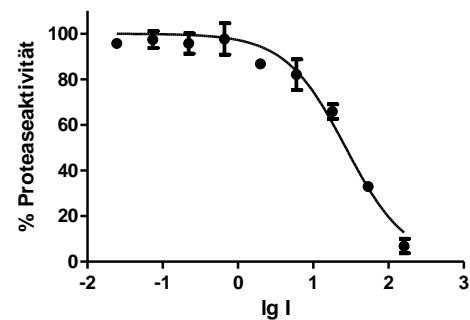
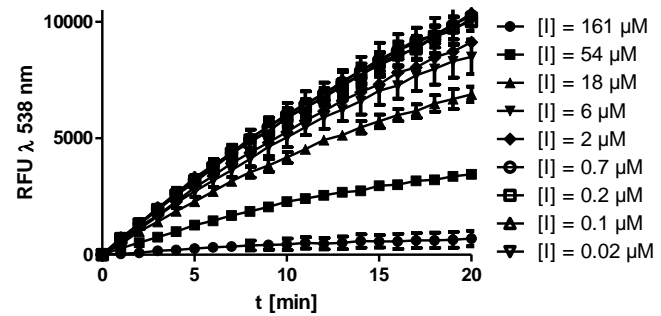
2.21
± 0.6
μM



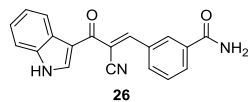
1.3



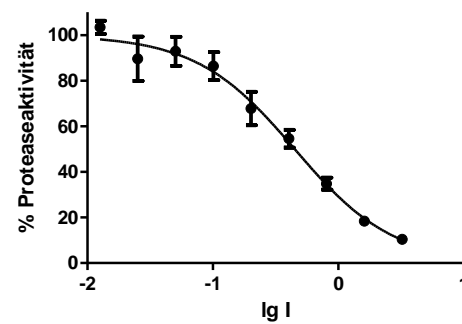
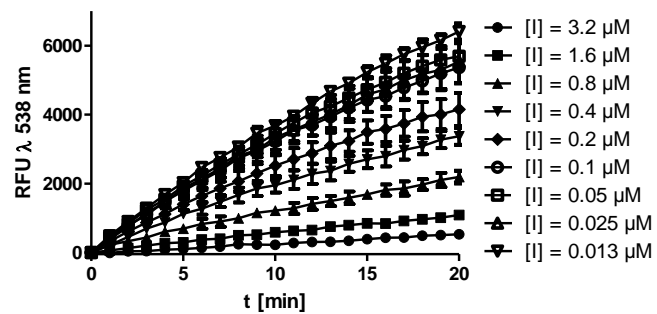
27 ±
6.7
μM



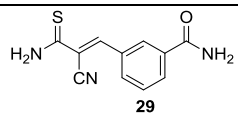
1.1



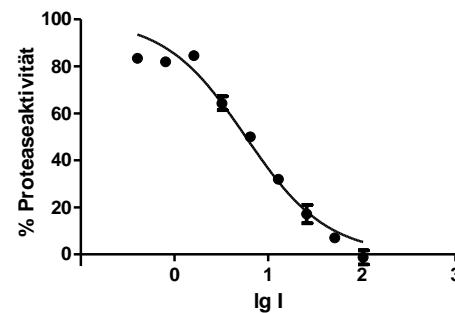
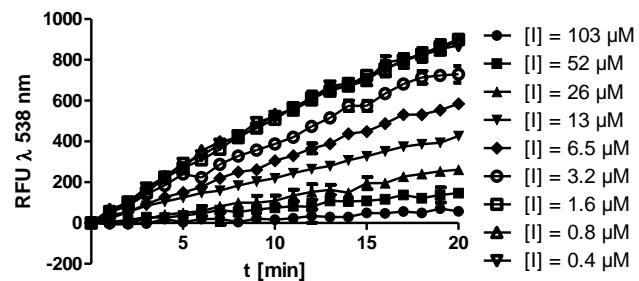
0.45
±
0.13
μM



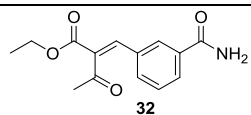
1.1



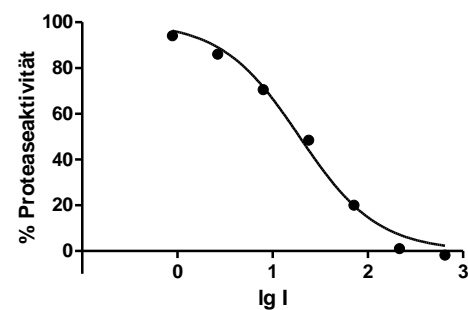
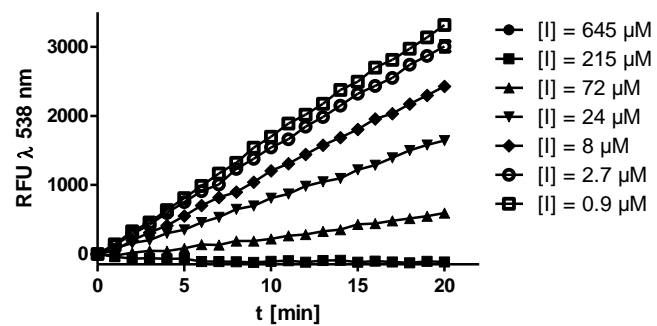
5.8 ±
0.44
μM



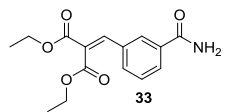
1



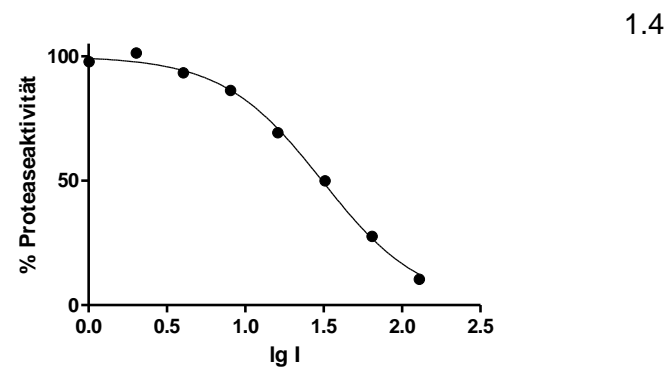
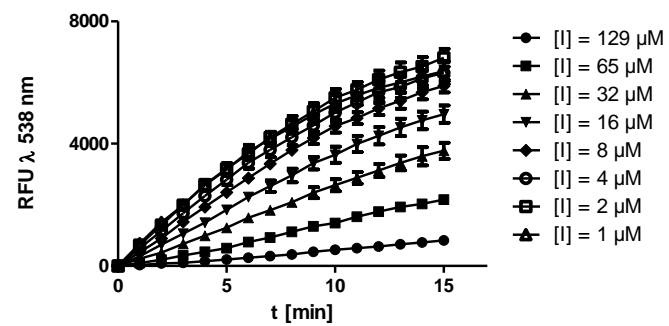
19 ±
0.8
μM



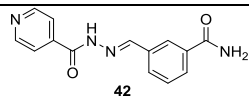
1.1



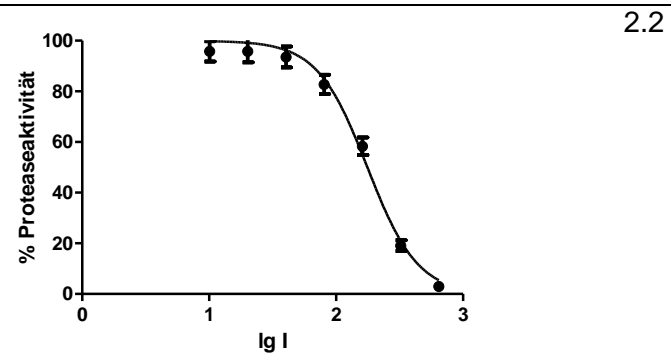
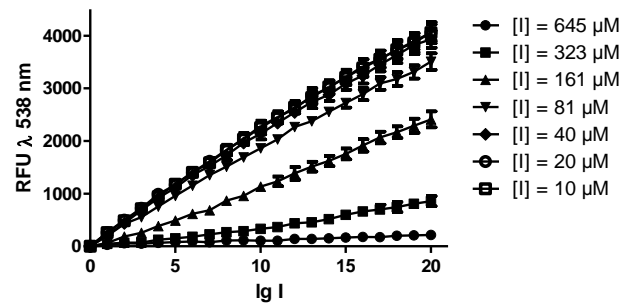
31 ±
1.4
μM



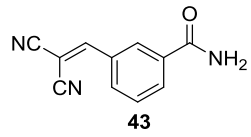
1.4



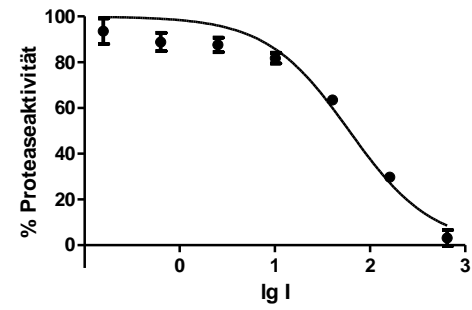
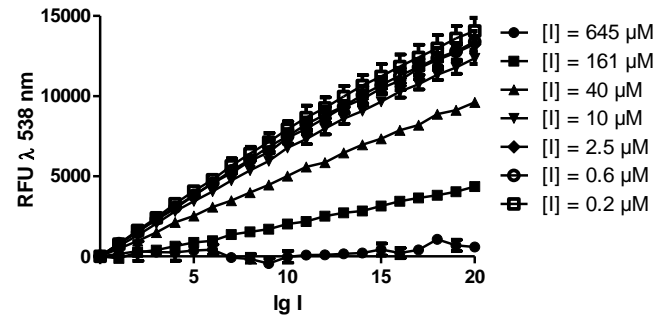
175 ±
24
μM



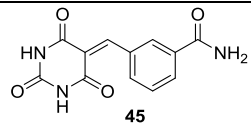
2.2



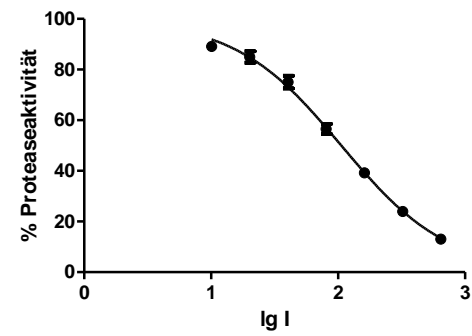
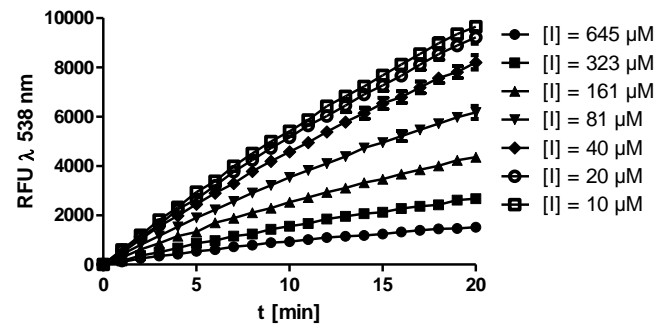
58 ±
8.4
μM



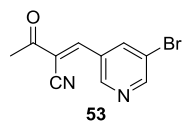
0.9



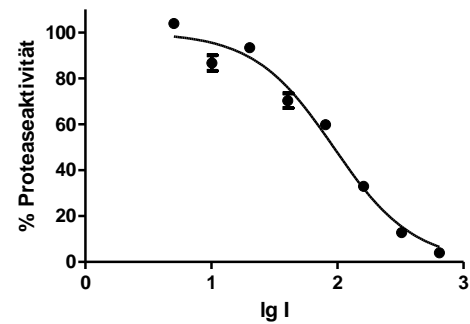
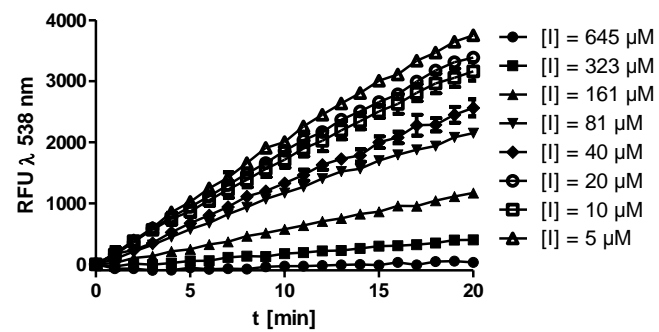
106 ±
15
μM



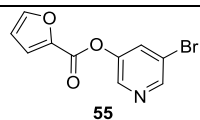
1



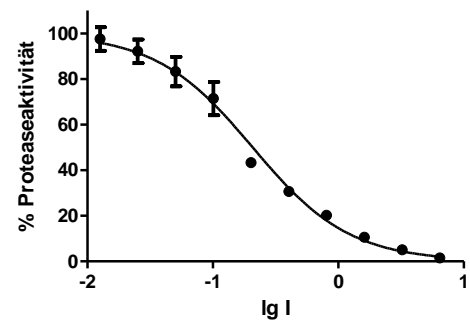
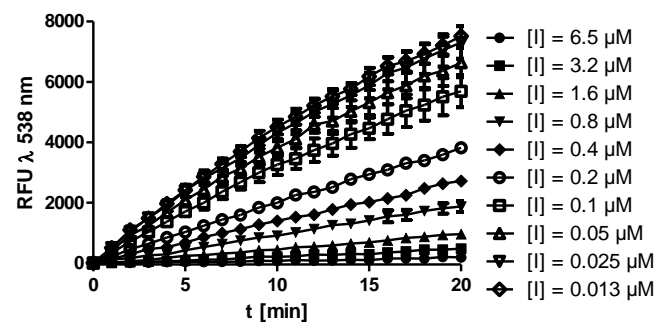
93 ± 3.8
 μM



1.4

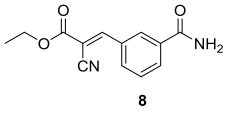
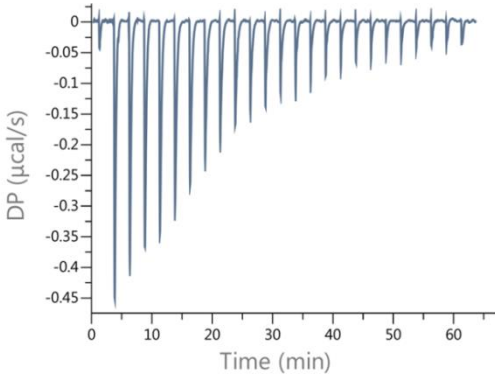
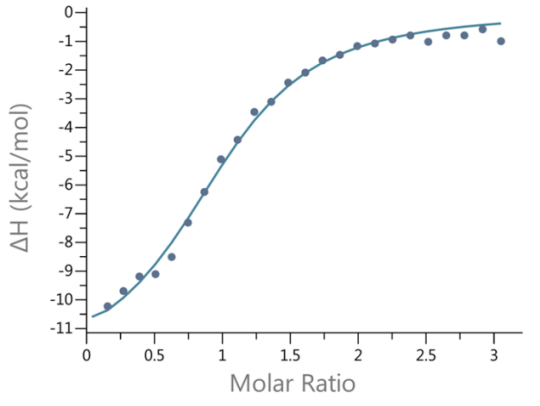
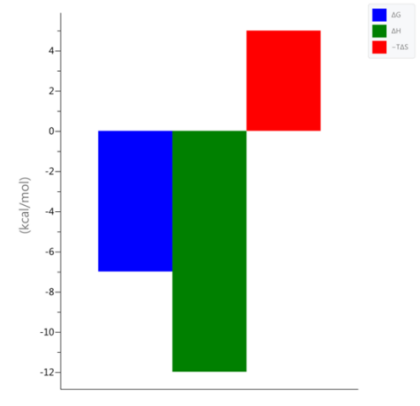
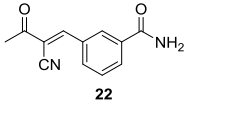
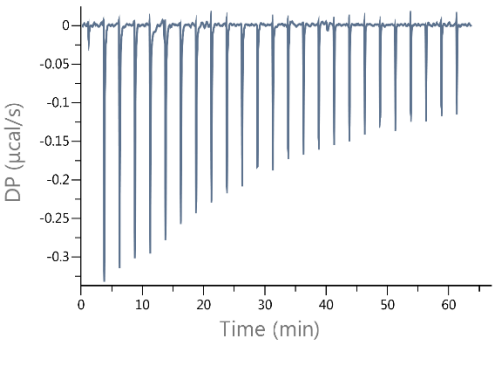
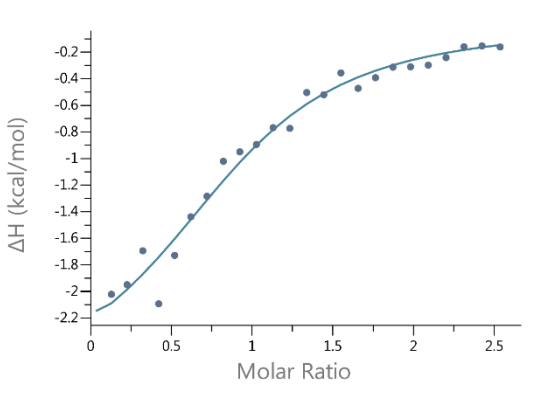
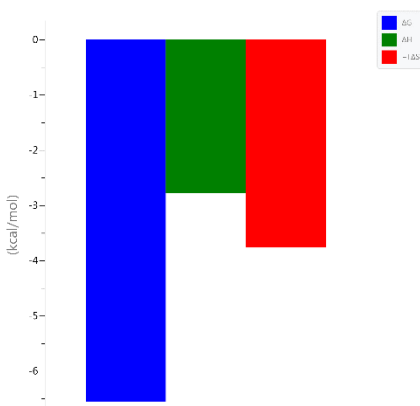


0.23 ± 0.09
 μM

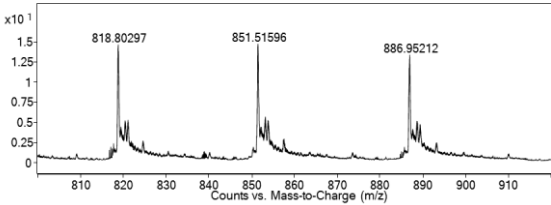
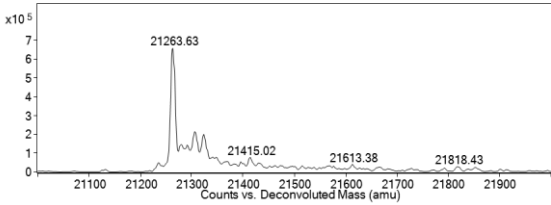
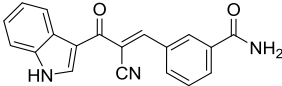
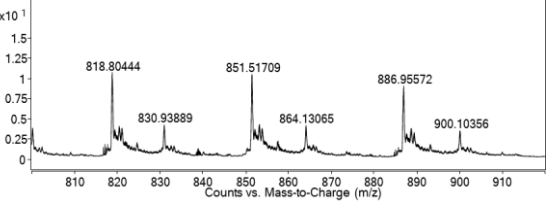
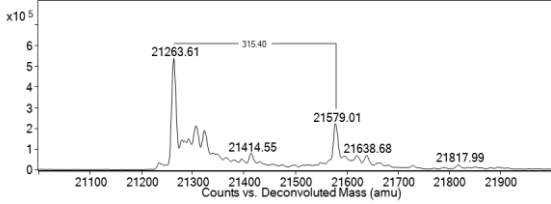
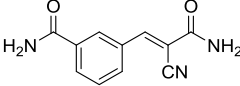
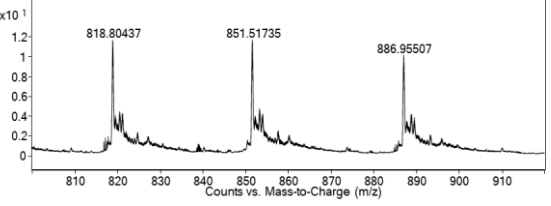
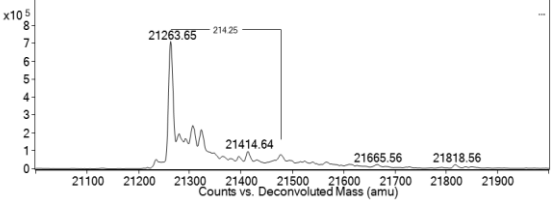
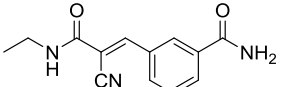
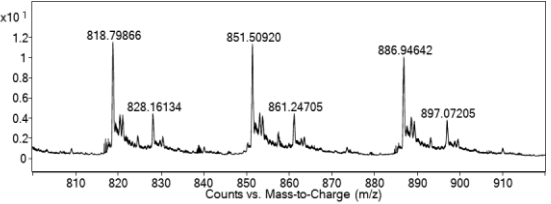
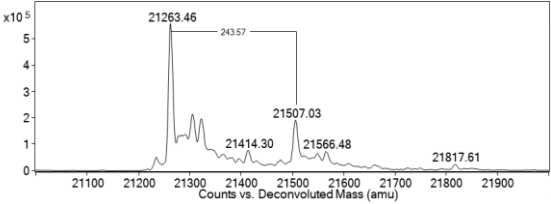


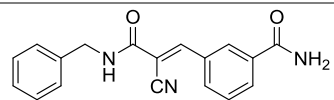
1.1

Tab. A1 Ermittlung des IC_{50} -Wertes aus den enzymkinetischen Verläufen des FRET-Assays mittels nicht-linearer Regression

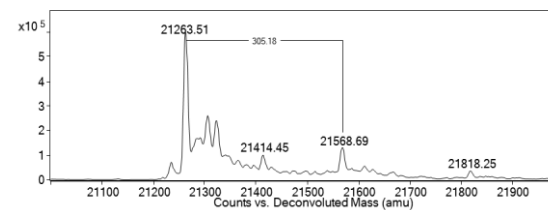
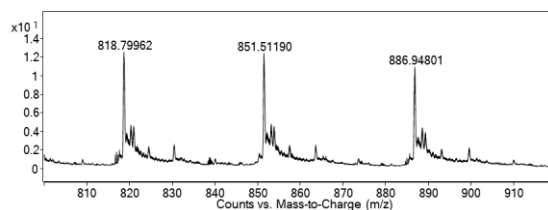
Strukturformel	K _D -Wert	Rohdaten: Wärmemenge pro Zeit (Basislinie abgezogen)	Gibbs Energie vs. Molares Verhältnis	Charakterisierung der Bindung
 <p style="text-align: center;">8</p>	<p>6.5 ± 1.4 μM</p>			
 <p style="text-align: center;">22</p>	<p>12.5 ± 4.7 μM</p>			

Tab. A2 Ergebnisse der ITC-Messungen KD-Werte ergeben sich als Mittelwert von mindestens zwei unabhängigen Experimenten

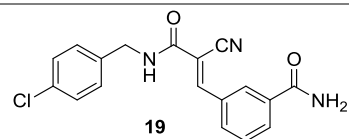
Struktur-formel	Auszug Rohspektrum (Ladungszustand +24 bis +26)	Dekonvolutiertes Spektrum	Masse gef. [Da]
Protein-Kontrolle ohne Inhibitor $C_{947}H_{1469}N_{269}O_{274}S_8$ 21263.20 Da			21263.63
 <p>26 $C_{19}H_{13}N_3O_2$ 315.1008 Da</p>			21579.01
 <p>15 $C_{11}H_9N_3O_2$ 215.0695 Da</p>			21477.9
 <p>16 $C_{13}H_{13}N_3O_2$ 243.1008 Da</p>			21507.03



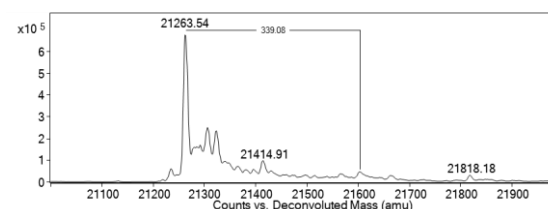
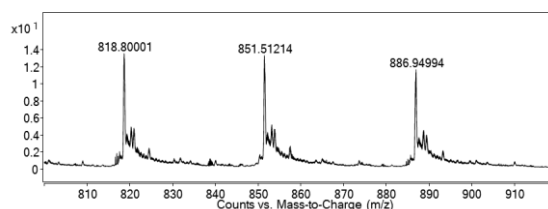
18
C₁₈H₁₅N₃O₂
305.1164 Da



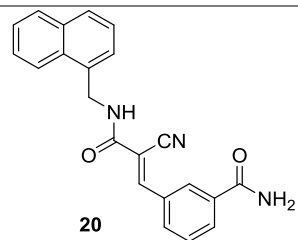
21568.69



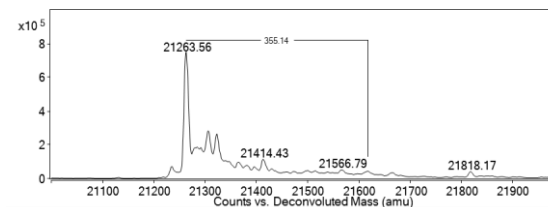
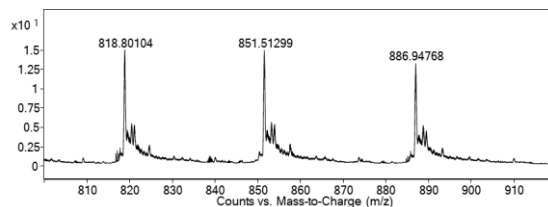
19
C₁₈H₁₄ClN₃O₂
339.0775 Da



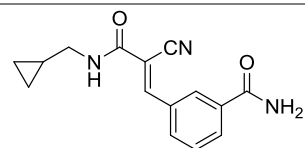
21602.62



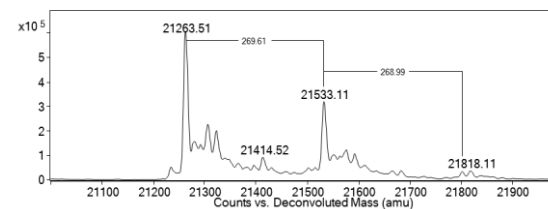
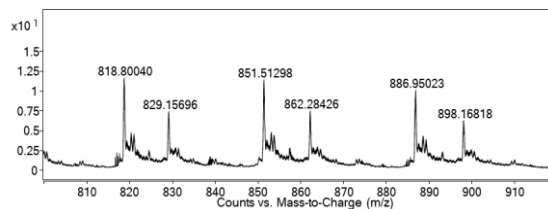
20
C₂₂H₁₇N₃O₂
355.1321 Da



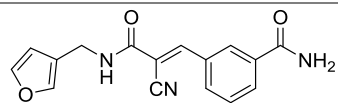
21618.7



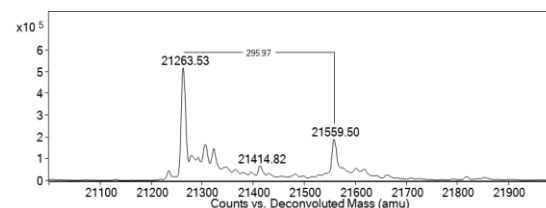
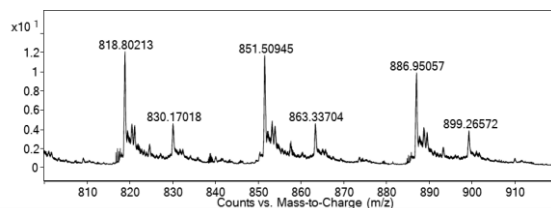
17
C₁₅H₁₅N₃O₂
269.1164 Da



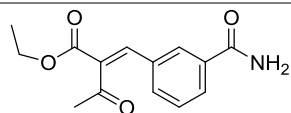
21533.11; 21818.11



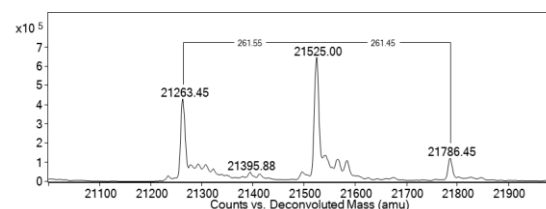
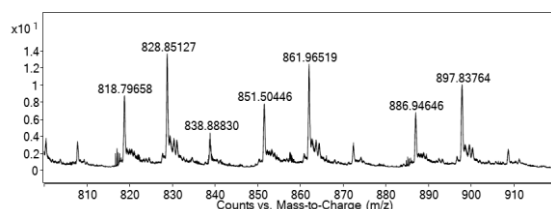
21
 $C_{16}H_{13}N_3O_3$
 295.0957 Da



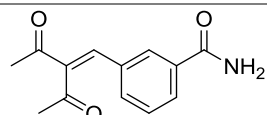
21559.50



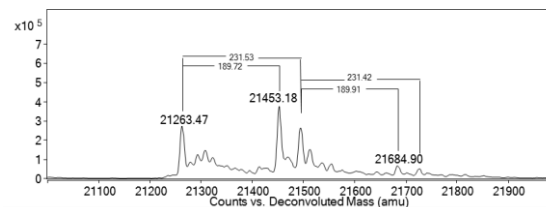
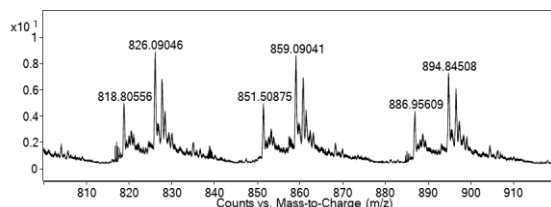
32
 $C_{14}H_{15}NO_4$
 261.1001 Da



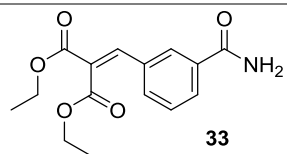
21525.00; 21786.45



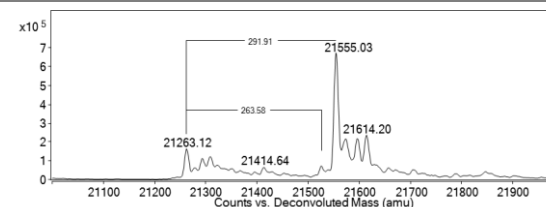
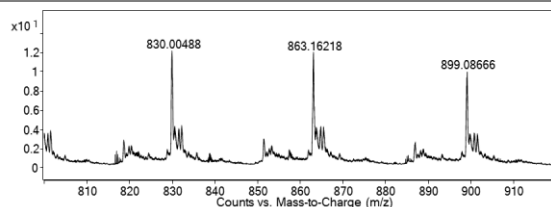
31
 $C_{13}H_{13}NO_3$
 231.0895 Da



21453.18; 21494.99;
 21684.90; 21726.42

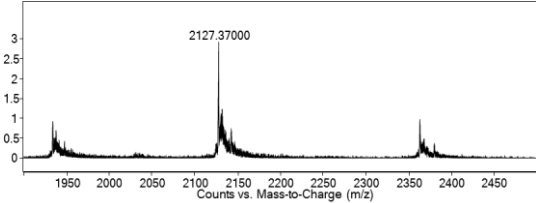
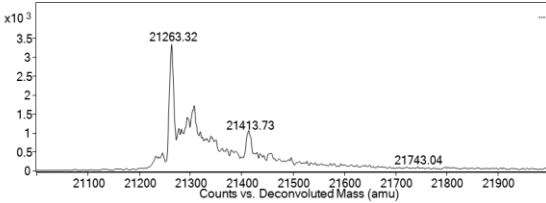
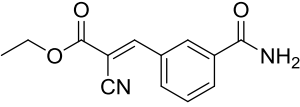
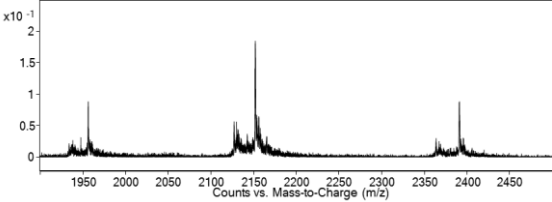
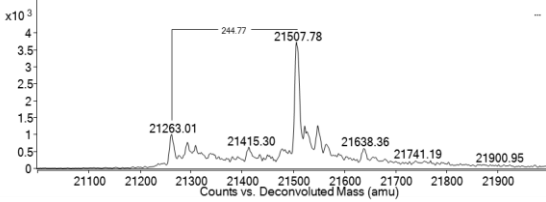
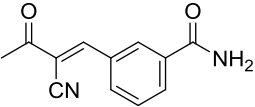
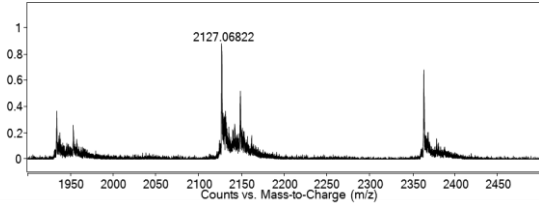
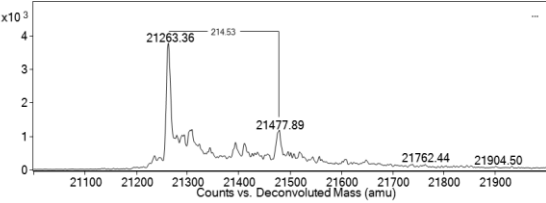


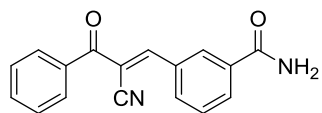
33
 $C_{15}H_{17}NO_5$
 291.1107 Da



21526.70; 21555.03

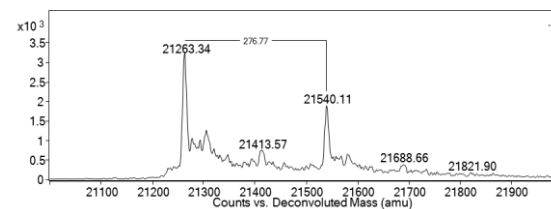
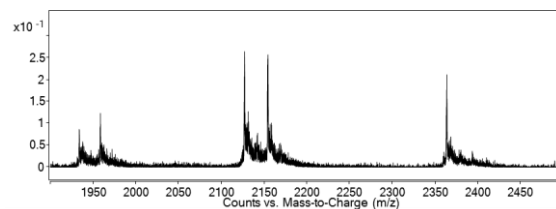
Tab. A3 Ergebnisse der MS unter denaturierenden Bedingungen

Strukturformel	Auszug Rohspektrum (Ladungszustand +11 bis +9)	Deconvolutes Spektrum	Masse gef. [Da]
Protein-Kontrolle ohne Inhibitor $C_{947}H_{1469}N_{269}O_{274}S_8$ 21263.20 Da			
 <p>8</p> $C_{13}H_{12}N_2O_3$ 244.0848 Da			21507.78
 <p>22</p> $C_{12}H_{10}N_2O_2$ 214.0742 Da			21477.89

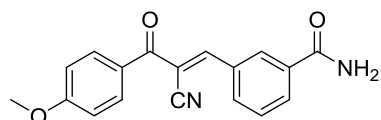


23

$C_{17}H_{12}N_2O_2$
276.0899 Da

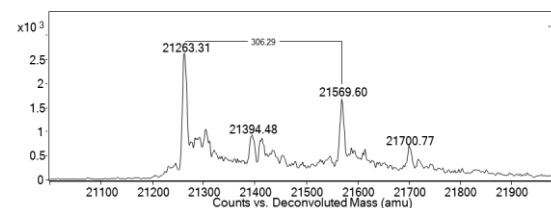
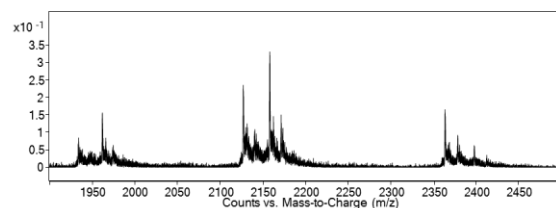


21540.11

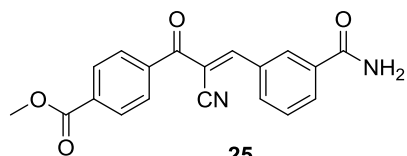


24

$C_{18}H_{14}N_2O_3$
306.1004 Da

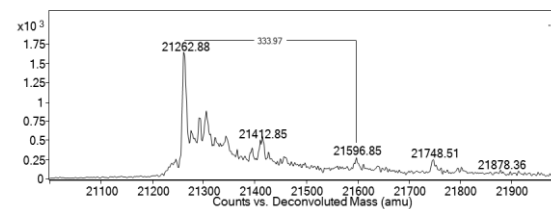
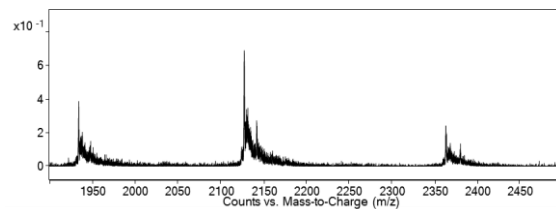


21569.60



25

$C_{19}H_{14}N_2O_4$
334.0954 Da



21596.85

Tab. A4 Ergebnisse der MS unter nativen Bedingungen

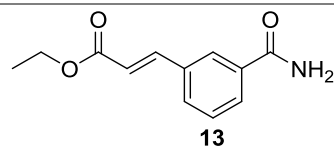
Peptidsequenz

10 20 30 40 50 60
 MGPGFDFQA IMKKNVVAR TEKGEFTMLG VHDRVAVIPT HASVGETIYI NDVETKVLDA

 70 80 90 100 110 120
 CALRDLTDN LEITIVKLDL NQKFRDIRHF LPRYEDDYND AVLSVHTSKF PNYIIPVQV

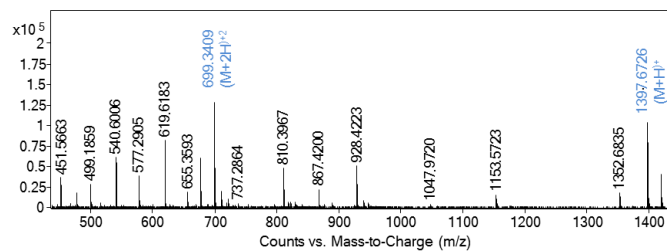
 130 140 150 160 170 180
 TNYGFLNLGG TPTHRLMYN FPTRAGQCGG VVTTTGKVIK IHVGGNGAQG FAAMLLHSYF

 190
 TDTQKHHHHH H

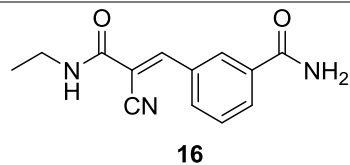
Inhibitor**Mod. Peptidbaustein****Masse
ber.****Spektrum mit Masse gef. (blau)****Sequenz-
abdeckung**

Aminosäure 145-157:
AGQC*GGVTTTGK

Exakte
Masse:
1396.6657

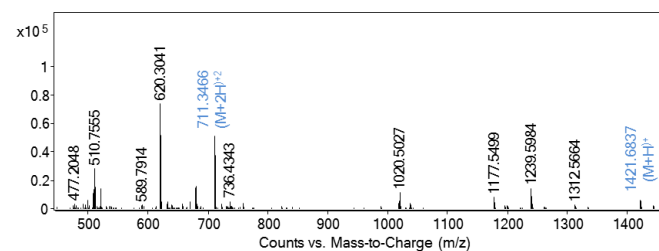


80.63%



Aminosäure 145-157:
AGQC*GGVTTTGK

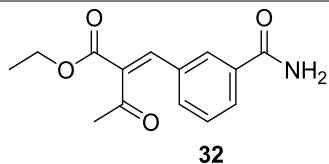
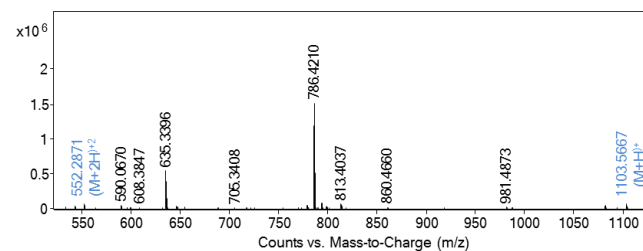
Exakte
Masse:
1420.6781



87.43%

Aminosäure: 57-64:
VLDAC*ALR

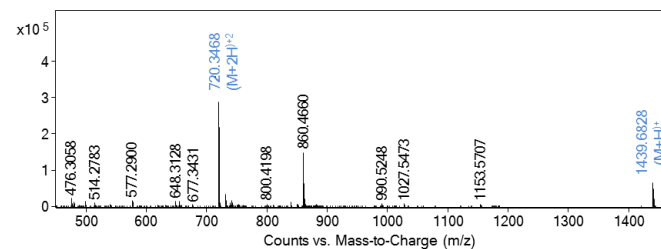
Exakte
Masse:
1102.5594



Aminosäure 145-157:
AGQC*GGVTTTGK

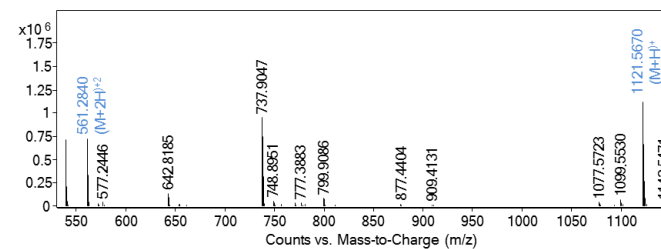
Exakte
Masse:
1438.6762

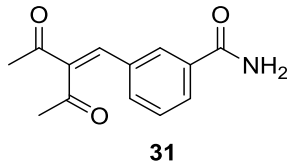
84.29%



Aminosäure: 57-64:
VLDAC*ALR

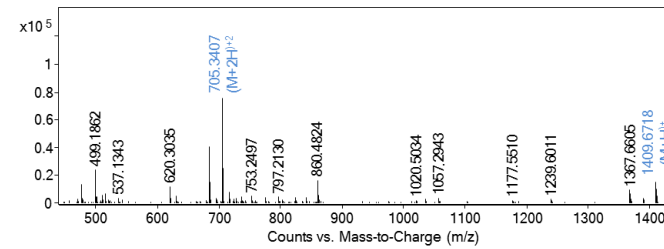
Exakte
Masse:
1120.5587



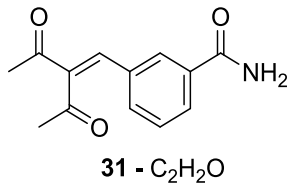


Aminosäure 145-157:
AGQC*GGVTTTGK

Exakte
Masse:
1408.6657

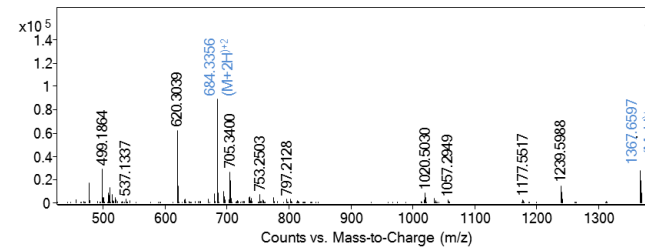


82.72%



Aminosäure 145-157:
AGQC*GGVTTTGK

Exakte
Masse:
1366.6551



Tab. A5 Tryptischer Verdau von EV D68 3C^{Pro} mit anschließender massenspektrometrischer Analyse nach Inkubation mit verschiedenen Inhibitoren. Der Ort der Modifikation in der Peptidsequenz im Einbuchstaben-Code ist mit * gekennzeichnet. Die Sequenzabdeckung bezeichnet den prozentualen Anteil der gefundenen Aminosäurebruchstücke, die über MS/MS –Experimente bestätigt wurden. Bei **31** wurde das Bruchstück AS 57-64 nicht gefunden.

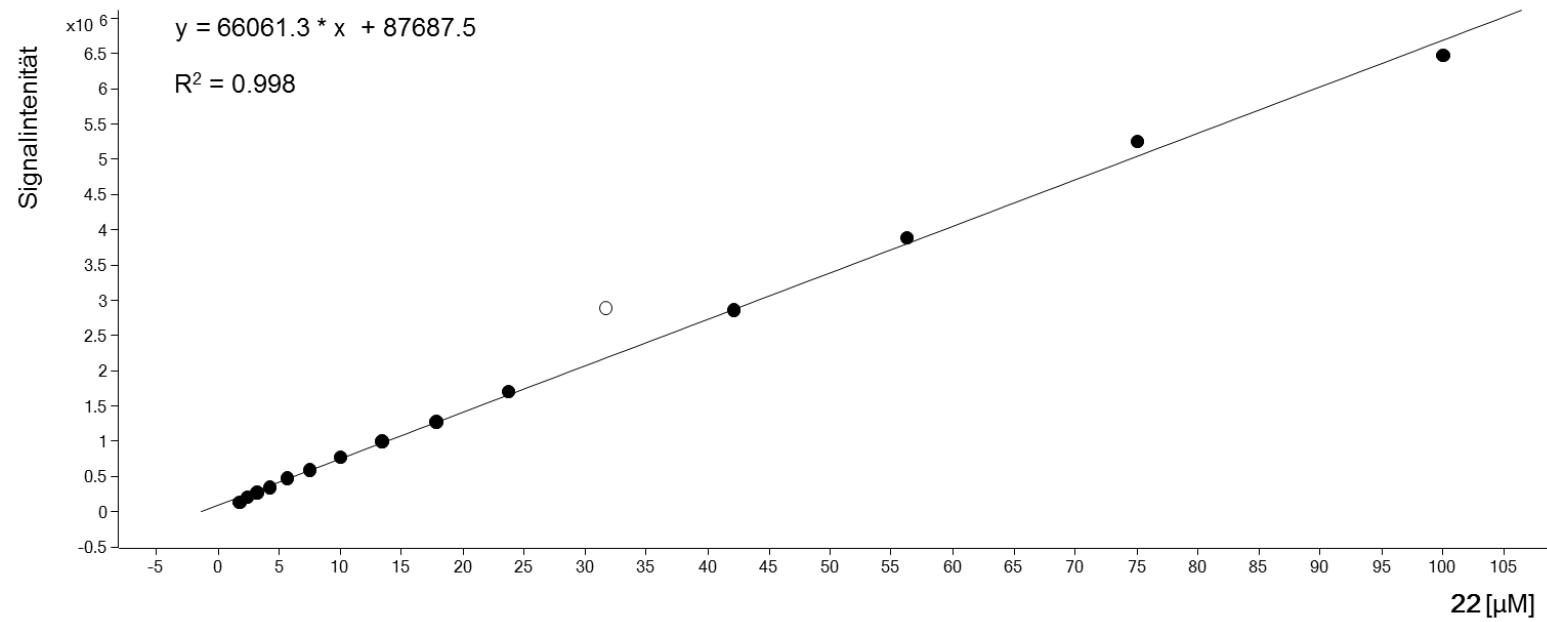


Abb. A6 Kalibriergerade zur Quantifizierung des Knoevenagelprodukts **22** in einer Protein-induzierten Reaktion.

Literaturverzeichnis

- [1] WHO, WHO warns of growing threat from severe form of hand, foot and mouth disease., **2009**.
- [2] T. Solomon, P. Lewthwaite, D. Perera, M. J. Cardoso, P. McMinn, M. H. Ooi, *The Lancet Infectious Diseases* **2010**, *10*, 778-790.
- [3] C. M. Oermann, J. E. Schuster, G. P. Connors, J. G. Newland, R. Selvarangan, M. A. Jackson, *AnnalsATS* **2015**, *12*, 775-781.
- [4] K. S. Benschop, H. G. v. d. Avoort, E. Duizer, M. P. Koopmans, *Antiviral Therapy* **2015**, *20*, 121-130.
- [5] W.-C. G. Yeung, W. D. Rawlinson, M. E. Craig, *BMJ* **2011**, *342*, d35.
- [6] A. Kotaniemi-Syrjänen, R. Vainionpää, T. M. Reijonen, M. Waris, K. Korhonen, M. Korppi, *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **2003**, *111*, 66-71.
- [7] C. Tapparel, F. Siegrist, T. J. Petty, L. Kaiser, *Infection, Genetics and Evolution* **2013**, *14*, 282-293.
- [8] M. J. Mäkelä, T. Puhakka, O. Ruuskanen, M. Leinonen, P. Saikku, M. Kimpimäki, S. Blomqvist, T. Hyypiä, P. Arstila, *Journal of Clinical Microbiology* **1998**, *36*, 539.
- [9] C. P. Gerba, in *Environmental Microbiology (Third Edition)* (Eds.: I. L. Pepper, C. P. Gerba, T. J. Gentry), Academic Press, San Diego, **2015**, pp. 509-550.
- [10] E. Domingo, J. J. Holland, *Annual Review of Microbiology* **1997**, *51*, 151-178.
- [11] F. Carrat, A. Flahault, *Vaccine* **2007**, *25*, 6852-6862.
- [12] B. Schlingmann, K. R. Castiglia, C. C. Stobart, M. L. Moore, *PLOS Pathogens* **2018**, *14*, e1006904.
- [13] G. G. U. Rohde, *European Respiratory Journal* **2011**, *37*, 3.
- [14] A. Papi, M. Contoli, *European Respiratory Journal* **2011**, *37*, 5.
- [15] Y. Hu, G. Zeng, K. Chu, J. Zhang, W. Han, Y. Zhang, J. Li, F. Zhu, *Human Vaccines & Immunotherapeutics* **2018**, *14*, 1517-1523.
- [16] Q. Mao, Y. Wang, L. Bian, M. Xu, Z. Liang, *Emerging Microbes & Infections* **2016**, *5*, e75.
- [17] WHO, Global Polio Eradication Initiative, **2010**.
- [18] V. M. Patil, S. P. Gupta, in *Viral Proteases and Their Inhibitors* (Ed.: S. P. Gupta), Academic Press, **2017**, pp. 263-315.
- [19] M. G. Rossmann, Y. He, R. J. Kuhn, *Trends in Microbiology* **2002**, *10*, 324-331.

- [20] V. Marjomäki, V. Pietiäinen, H. Matilainen, P. Upla, J. Ivaska, L. Nissinen, H. Reunanen, P. Huttunen, T. Hyypiä, J. Heino, *Journal of Virology* **2002**, *76*, 1856.
- [21] D. A. Suhy, T. H. Giddings, K. Kirkegaard, *Journal of Virology* **2000**, *74*, 8953.
- [22] H. Toyoda, M. J. H. Nicklin, M. G. Murray, C. W. Anderson, J. J. Dunn, F. W. Studier, E. Wimmer, *Cell* **1986**, *45*, 761-770.
- [23] O. H. Laitinen, E. Svedin, S. Kapell, A. Nurminen, V. P. Hytönen, M. Flodström-Tullberg, *Reviews in Medical Virology* **2016**, *26*, 251-267.
- [24] L. Bauer, H. Lyoo, H. M. van der Schaar, J. R. P. M. Strating, F. J. M. van Kuppeveld, *Current Opinion in Virology* **2017**, *24*, 1-8.
- [25] Y. Liu, J. Sheng, A. Fokine, G. Meng, W.-H. Shin, F. Long, R. J. Kuhn, D. Kihara, M. G. Rossmann, *Science* **2015**, *347*, 71.
- [26] K. Senior, *The Lancet Infectious Diseases* **2002**, *2*, 264.
- [27] S. Crotty, D. Maag, J. J. Arnold, W. Zhong, J. Y. N. Lau, Z. Hong, R. Andino, C. E. Cameron, *Nature Medicine* **2000**, *6*, 1375.
- [28] V. L. Linden, C. K. Wolthers, J. F. Van Kuppeveld, *Viruses* **2015**, *7*.
- [29] H. Norder, A. M. De Palma, B. Selisko, L. Costenaro, N. Papageorgiou, C. Arnan, B. Coutard, V. Lantéz, X. De Lamballerie, C. Baronti, M. Solà, J. Tan, J. Neyts, B. Canard, M. Coll, A. E. Gorbalenya, R. Hilgenfeld, *Antiviral Research* **2011**, *89*, 204-218.
- [30] N. Blom, J. Hansen, S. Brunak, D. Blaas, *Protein Science* **1996**, *5*, 2203-2216.
- [31] I. Schechter, A. Berger, *Biochemical and Biophysical Research Communications* **1968**, *32*, 898-902.
- [32] G. Lu, J. Qi, Z. Chen, X. Xu, F. Gao, D. Lin, W. Qian, H. Liu, H. Jiang, J. Yan, G. F. Gao, *Journal of Virology* **2011**, *85*, 10319.
- [33] F. G. Hayden, R. B. Turner, J. M. Gwaltney, K. Chi-Burris, M. Gersten, P. Hsyu, A. K. Patick, G. J. Smith, L. S. Zalman, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **2003**, *47*, 3907.
- [34] H. J. Thibaut, A. M. De Palma, J. Neyts, *Biochemical Pharmacology* **2012**, *83*, 185-192.
- [35] G. Dodson, A. Wlodawer, *Trends in Biochemical Sciences* **1998**, *23*, 347-352.
- [36] R. Menard, C. Plouffe, P. Laflamme, T. Vernet, D. C. Tessier, D. Y. Thomas, A. C. Storer, *Biochemistry* **1995**, *34*, 464-471.
- [37] J. Moulton, F. Sussman, M. N. G. James, *Journal of Molecular Biology* **1985**, *182*, 555-566.
- [38] B.-K. Kim, H. Ko, E.-S. Jeon, E.-S. Ju, L. S. Jeong, Y.-C. Kim, *European Journal of Medicinal Chemistry* **2016**, *120*, 202-216.
- [39] J. A. Hardy, J. A. Wells, *Current Opinion in Structural Biology* **2004**, *14*, 706-715.

- [40] T. Aoyagi, T. Takeuchi, A. Matsuzaki, K. Kawamura, S. Kondo, M. Hamada, K. Maeda, H. Umezawa, *The Journal of Antibiotics* **1969**, *22*, 283-286.
- [41] S. W. Kaldor, M. Hammond, B. A. Dressman, J. M. Labus, F. W. Chadwell, A. D. Kline, B. A. Heinz, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **1995**, *5*, 2021-2026.
- [42] S. E. Webber, K. Okano, T. L. Little, S. H. Reich, Y. Xin, S. A. Fuhrman, D. A. Matthews, R. A. Love, T. F. Hendrickson, A. K. Patick, J. W. Meador, R. A. Ferre, E. L. Brown, C. E. Ford, S. L. Binford, S. T. Worland, *Journal of Medicinal Chemistry* **1998**, *41*, 2786-2805.
- [43] S. I. Al-Gharabli, S. T. A. Shah, S. Weik, M. F. Schmidt, J. R. Mesters, D. Kuhn, G. Klebe, R. Hilgenfeld, J. Rademann, *ChemBioChem* **2006**, *7*, 1048-1055.
- [44] S. Mehdi, *Bioorganic Chemistry* **1993**, *21*, 249-259.
- [45] S.-H. Chen, J. Lamar, F. Victor, N. Snyder, R. Johnson, B. A. Heinz, M. Wakulchik, Q. M. Wang, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2003**, *13*, 3531-3536.
- [46] M. A. Gräwert, N. Gallastegui, M. Stein, B. Schmidt, P.-M. Kloetzel, R. Huber, M. Groll, *Angewandte Chemie* **2011**, *123*, 563-566.
- [47] M. F. Schmidt, A. El-Dahshan, S. Keller, J. Rademann, **2009**, *48*, 6346-6349.
- [48] T. S. Morris, S. Fromann, S. Shechosky, C. Lowe, M. S. Lall, V. Gauss-Müller, R. H. Purcell, S. U. Emerson, J. C. Vederas, B. A. Malcolm, *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **1997**, *5*, 797-807.
- [49] R. A. Smith, L. J. Copp, P. J. Coles, H. W. Pauls, V. J. Robinson, R. W. Spencer, S. B. Heard, A. Krantz, *Journal of the American Chemical Society* **1988**, *110*, 4429-4431.
- [50] J. Drenth, K. H. Kalk, H. M. Swen, *Biochemistry* **1976**, *15*, 3731-3738.
- [51] K. D. Brady, *Biochemistry* **1998**, *37*, 8508-8515.
- [52] R. Ekkebus, S. I. van Kasteren, Y. Kulathu, A. Scholten, I. Berlin, P. P. Geurink, A. de Jong, S. Goerdayal, J. Neefjes, A. J. R. Heck, D. Komander, H. Ovaa, *Journal of the American Chemical Society* **2013**, *135*, 2867-2870.
- [53] C. Nitsche, C. Steuer, C. D. Klein, *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2011**, *19*, 7318-7337.
- [54] Y. Zhai, X. Zhao, Z. Cui, M. Wang, Y. Wang, L. Li, Q. Sun, X. Yang, D. Zeng, Y. Liu, Y. Sun, Z. Lou, L. Shang, Z. Yin, *Journal of Medicinal Chemistry* **2015**, *58*, 9414-9420.
- [55] N. J. Donato, C. Wobus, H. D. Showalter, M. Talpaz, J. W. Perry, R. J. Sorenson, M. X. O'Riordan, Y. Jin, US 8,809,377 B2, **2014**.
- [56] R. P. Hanzlik, S. A. Thompson, *Journal of Medicinal Chemistry* **1984**, *27*, 711-712.
- [57] S. Liu, R. P. Hanzlik, *Journal of Medicinal Chemistry* **1992**, *35*, 1067-1075.

- [58] P. S. Dragovich, T. J. Prins, R. Zhou, S. E. Webber, J. T. Marakovits, S. A. Fuhrman, A. K. Patick, D. A. Matthews, C. A. Lee, C. E. Ford, B. J. Burke, P. A. Rejto, T. F. Hendrickson, T. Tuntland, E. L. Brown, J. W. Meador, R. A. Ferre, J. E. V. Harr, M. B. Kosa, S. T. Worland, *Journal of Medicinal Chemistry* **1999**, *42*, 1213-1224.
- [59] J. Tan, S. George, Y. Kusov, M. Perbandt, S. Anemüller, J. R. Mesters, H. Norder, B. Coutard, C. Lacroix, P. Leyssen, J. Neyts, R. Hilgenfeld, *Journal of Virology* **2013**, *87*, 4339.
- [60] P. S. Dragovich, T. J. Prins, R. Zhou, E. L. Brown, F. C. Maldonado, S. A. Fuhrman, L. S. Zalman, T. Tuntland, C. A. Lee, A. K. Patick, D. A. Matthews, T. F. Hendrickson, M. B. Kosa, B. Liu, M. R. Batugo, J.-P. R. Gleeson, S. K. Sakata, L. Chen, M. C. Guzman, J. W. Meador, R. A. Ferre, S. T. Worland, *Journal of Medicinal Chemistry* **2002**, *45*, 1607-1623.
- [61] H. L. Sham, W. Rosenbrook, W. Kati, D. A. Betebenner, N. E. Wideburg, A. Saldivar, J. J. Plattner, D. W. Norbeck, *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1* **1995**, 1081-1082.
- [62] S. Venkatraman, J.-s. Kong, S. Nimkar, Q. M. Wang, J. Aubé, R. P. Hanzlik, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **1999**, *9*, 577-580.
- [63] J. H. Hamman, G. M. Enslin, A. F. Kotzé, *BioDrugs* **2005**, *19*, 165-177.
- [64] T. O. Johnson, Y. Hua, H. T. Luu, E. L. Brown, F. Chan, S. S. Chu, P. S. Dragovich, B. W. Eastman, R. A. Ferre, S. A. Fuhrman, T. F. Hendrickson, F. C. Maldonado, D. A. Matthews, J. W. Meador, A. K. Patick, S. H. Reich, D. J. Skalitzky, S. T. Worland, M. Yang, L. S. Zalman, *Journal of Medicinal Chemistry* **2002**, *45*, 2016-2023.
- [65] I. D. Kuntz, K. Chen, K. A. Sharp, P. A. Kollman, *Proceedings of the National Academy of Sciences* **1999**, *96*, 9997.
- [66] S. Kadam, J. Poddig, P. Humphrey, J. Karwowski, M. Jackson, S. Tennent, L. Fung, J. Hochlowski, R. rasmussen, J. McAlpine, *The Journal of Antibiotics* **1994**, *47*, 836-839.
- [67] G. Brill, W. M. Kati, D. Montgomery, J. Karwowski, P. Humphrey, M. Jackson, J. Clement, S. Kadam, R. Chen, J. McAlpine, *The Journal of Antibiotics* **1996**, *49*, 541-546.
- [68] J. Young Jeong, J. Sperry, J. A. Taylor, M. A. Brimble, *European Journal of Medicinal Chemistry* **2014**, *87*, 220-227.
- [69] S. B. Singh, P. L. Graham, R. A. Reamer, M. G. Cordingley, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2001**, *11*, 3143-3146.
- [70] S. E. Webber, J. Tikhe, S. T. Worland, S. A. Fuhrman, T. F. Hendrickson, D. A. Matthews, R. A. Love, A. K. Patick, J. W. Meador, R. A. Ferre, E. L. Brown, D. M. DeLisle, C. E. Ford, S. L. Binford, *Journal of Medicinal Chemistry* **1996**, *39*, 5072-5082.

- [71] L. N. Jungheim, J. D. Cohen, R. B. Johnson, E. C. Villarreal, M. Wakulchik, R. J. Loncharich, Q. M. Wang, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **1997**, *7*, 1589-1594.
- [72] A. Baxter, M. Chambers, F. Edfeldt, K. Edman, A. Freeman, C. Johansson, S. King, A. Morley, J. Petersen, P. Rawlins, L. Spadola, B. Thong, H. V. d. Poël, N. Williams, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2011**, *21*, 777-780.
- [73] E. Jung, J.-Y. Lee, H. J. Kim, C.-K. Ryu, K.-I. Lee, M. Kim, C.-K. Lee, Y. Y. Go, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2018**, *28*, 2533-2538.
- [74] S. H. Reich, T. Johnson, M. B. Wallace, S. E. Kephart, S. A. Fuhrman, S. T. Worland, D. A. Matthews, T. F. Hendrickson, F. Chan, J. Meador, R. A. Ferre, E. L. Brown, D. M. DeLisle, A. K. Patick, S. L. Binford, C. E. Ford, *Journal of Medicinal Chemistry* **2000**, *43*, 1670-1683.
- [75] C. Maugeri, M. A. Alisi, C. Apicella, L. Cellai, P. Dragone, E. Fioravanzo, S. Florio, G. Furlotti, G. Mangano, R. Ombrato, R. Luisi, R. Pompei, V. Rincicotti, V. Russo, M. Vitiello, N. Cazzolla, *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2008**, *16*, 3091-3107.
- [76] D. Becker, Z. Kaczmarek, C. Arkona, R. Schulz, C. Tauber, G. Wolber, R. Hilgenfeld, M. Coll, J. Rademann, *Nature Communications* **2016**, *7*, 12761.
- [77] J. Singh, R. C. Petter, T. A. Baillie, A. Whitty, *Nature Reviews Drug Discovery* **2011**, *10*, 307.
- [78] A. S. Kalgutkar, D. K. Dalvie, *Expert Opinion on Drug Discovery* **2012**, *7*, 561-581.
- [79] R. Mah, J. R. Thomas, C. M. Shafer, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2014**, *24*, 33-39.
- [80] J. Gan, Q. Ruan, B. He, M. Zhu, W. C. Shyu, W. G. Humphreys, *Chemical Research in Toxicology* **2009**, *22*, 690-698.
- [81] H. Lu, P. J. Tonge, *Current Opinion in Chemical Biology* **2010**, *14*, 467-474.
- [82] A. J. T. Smith, X. Zhang, A. G. Leach, K. N. Houk, *Journal of Medicinal Chemistry* **2009**, *52*, 225-233.
- [83] J. M. Bradshaw, J. M. McFarland, V. O. Paavilainen, A. Bisconte, D. Tam, V. T. Phan, S. Romanov, D. Finkle, J. Shu, V. Patel, T. Ton, X. Li, D. G. Loughhead, P. A. Nunn, D. E. Karr, M. E. Gerritsen, J. O. Funk, T. D. Owens, E. Verner, K. A. Brameld, R. J. Hill, D. M. Goldstein, J. Taunton, *Nature Chemical Biology* **2015**, *11*, 525.
- [84] M. H. Potashman, M. E. Duggan, *Journal of Medicinal Chemistry* **2009**, *52*, 1231-1246.
- [85] R. A. Bauer, *Drug Discovery Today* **2015**, *20*, 1061-1073.
- [86] Z. Zhao, P. E. Bourne, *Drug Discovery Today* **2018**, *23*, 727-735.
- [87] J. C. Wu, L. C. Fritz, *Methods* **1999**, *17*, 320-328.

- [88] W. P. Jencks in *Advances in Enzymology and Related Areas of Molecular Biology*, **1975**.
- [89] F. M. Menger, *Accounts of Chemical Research* **1985**, *18*, 128-134.
- [90] M. Hagel, D. Niu, T. St Martin, M. P. Sheets, L. Qiao, H. Bernard, R. M. Karp, Z. Zhu, M. T. Labenski, P. Chaturvedi, M. Nacht, W. F. Westlin, R. C. Petter, J. Singh, *Nature Chemical Biology* **2010**, *7*, 22.
- [91] R. M. Plenge, *Science Translational Medicine* **2016**, *8*, 349ps315.
- [92] T. A. Ban, *Dialogues in clinical neuroscience* **2006**, *8*, 335-344.
- [93] F. E. Koehn, G. T. Carter, *Nature Reviews Drug Discovery* **2005**, *4*, 206.
- [94] C. A. Lipinski, F. Lombardo, B. W. Dominy, P. J. Feeney, *Advanced Drug Delivery Reviews* **2001**, *46*, 3-26.
- [95] H. Jhoti, G. Williams, D. C. Rees, C. W. Murray, *Nature Reviews Drug Discovery* **2013**, *12*, 644.
- [96] M. Jaegle, E. Nawrotzky, E. L. Wong, C. Arkona, J. Rademann, in *Fragment-based Drug Discovery: Lessons and Outlook* (Eds.: D. A. Erlanson, W. Jahnke), Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, **2016**.
- [97] M. Jaegle, E. L. Wong, C. Tauber, E. Nawrotzky, C. Arkona, J. Rademann, *Angewandte Chemie International Edition* **2017**, *56*, 7358-7378.
- [98] D. A. Erlanson, S. W. Fesik, R. E. Hubbard, W. Jahnke, H. Jhoti, *Nature Reviews Drug Discovery* **2016**, *15*, 605.
- [99] M. F. Schmidt, A. Isidro-Llobet, M. Lisurek, A. El-Dahshan, J. Tan, R. Hilgenfeld, J. Rademann, *Angewandte Chemie International Edition* **2008**, *47*, 3275-3278.
- [100] E. Burda, J. Rademann, *Nature Communications* **2014**, *5*, 5170.
- [101] M. Jaegle, T. Steinmetzer, J. Rademann, *Angewandte Chemie International Edition* **2017**, *56*, 3718-3722.
- [102] E. L. Wong, E. Nawrotzky, C. Arkona, B. G. Kim, S. Belyny, X. Wang, S. Wagner, M. Lisurek, D. Carstanjen, J. Rademann, *Nature Communications* **2019**, *10*, 66.
- [103] P. Vongvilai, M. Angelin, R. Larsson, O. Ramström, *Angewandte Chemie International Edition* **2007**, *46*, 948-950.
- [104] T. Förster, *Annalen der Physik* **1948**, *437*, 55-75.
- [105] S. Lechnitz, Master thesis, Freie Universität Berlin (Berlin), **2018**.
- [106] L. Sun, N. Tran, F. Tang, H. App, P. Hirth, G. McMahon, C. Tang, *Journal of Medicinal Chemistry* **1998**, *41*, 2588-2603.
- [107] R. Tanikaga, N. Konya, K. Hamamura, A. Kaji, *ChemInform* **1989**, *20*.

- [108] S. Patai, Z. Rappoport, *Journal of the Chemical Society (Resumed)* **1962**, 396-403.
- [109] J. Zabicky, *Journal of the Chemical Society (Resumed)* **1961**, 683-687.
- [110] L. F. Tietze, U. Beifuss, in *Comprehensive organic synthesis*, 1. ed. (Ed.: B. M. Trost), Pergamon Press, Oxford, **1991**, pp. 341-394.
- [111] E. J. Ariëns, *European Journal of Clinical Pharmacology* **1984**, 26, 663-668.
- [112] C. Huber, K. Pagel, W. Hoffmann, S. Heiles, K. C. Schäfer, M. Kompauer, S. Gerbig, J. Soltwisch, *Nachrichten aus der Chemie* **2018**, 66, 389-399.
- [113] T.-W. Shih, T.-H. Lin, Y. F. Shealy, D. L. Hill, *Drug Metabolism and Disposition* **1997**, 25, 27.
- [114] S. Purser, P. R. Moore, S. Swallow, V. Gouverneur, *Chemical Society Reviews* **2008**, 37, 320-330.
- [115] Q. M. Wang, C. Shu-Hui, *Current Protein & Peptide Science* **2007**, 8, 19-27.
- [116] T. A. Shepherd, G. A. Cox, E. McKinney, J. Tang, M. Wakulchik, R. E. Zimmerman, E. C. Villarreal, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **1996**, 6, 2893-2896.
- [117] P. Axerio-Cilies, I. P. Castañeda, A. Mirza, J. Reynisson, *European Journal of Medicinal Chemistry* **2009**, 44, 1128-1134.
- [118] DrugBank, Vol. 5.1, **07.08.2018**.
- [119] P. Bisel, L. Al-Momani, M. Müller, *Organic & Biomolecular Chemistry* **2008**, 6, 2655-2665.
- [120] M. Frizler, F. Lohr, N. Furtmann, J. Kläs, M. Gütschow, *Journal of Medicinal Chemistry* **2011**, 54, 396-400.
- [121] T. Fukami, T. Yokoi, *Drug Metabolism and Pharmacokinetics* **2012**, 27, 466-477.
- [122] K. A. Scott, J. T. Njardarson, *Topics in Current Chemistry* **2018**, 376, 5.
- [123] P. S. Dragovich, S. E. Webber, R. E. Babine, S. A. Fuhrman, A. K. Patick, D. A. Matthews, C. A. Lee, S. H. Reich, T. J. Prins, J. T. Marakovits, E. S. Littlefield, R. Zhou, J. Tikhe, C. E. Ford, M. B. Wallace, J. W. Meador, R. A. Ferre, E. L. Brown, S. L. Binford, J. E. V. Harr, D. M. DeLisle, S. T. Worland, *Journal of Medicinal Chemistry* **1998**, 41, 2806-2818.
- [124] V. Resch, C. Seidler, B.-S. Chen, I. Degeling, U. Hanefeld, *European Journal of Organic Chemistry* **2013**, 2013, 7697-7704.
- [125] W. Walter, R. F. Becker, *Justus Liebigs Annalen der Chemie* **1969**, 727, 71-80.
- [126] ACD/Labs, Vol. V11.02, **1994-2019**.
- [127] H.-J. Lee, Y.-S. Choi, K.-B. Lee, J. Park, C.-J. Yoon, *The Journal of Physical Chemistry A* **2002**, 106, 7010-7017.

- [128] S. Krishnan, R. M. Miller, B. Tian, R. D. Mullins, M. P. Jacobson, J. Taunton, *Journal of the American Chemical Society* **2014**, *136*, 12624-12630.
- [129] R. M. Miller, V. O. Paavilainen, S. Krishnan, I. M. Serafimova, J. Taunton, *Journal of the American Chemical Society* **2013**, *135*, 5298-5301.
- [130] Y. Lu, Y. Wang, Z. Xu, X. Yan, X. Luo, H. Jiang, W. Zhu, *The Journal of Physical Chemistry B* **2009**, *113*, 12615-12621.
- [131] K. K. Adkison, D. G. Barrett, D. N. Deaton, R. T. Gampe, A. M. Hassell, S. T. Long, R. B. McFadyen, A. B. Miller, L. R. Miller, J. A. Payne, L. M. Shewchuk, K. J. Wells-Knecht, D. H. Willard, L. L. Wright, *Bioorganic & medicinal chemistry letters* **2006**, *16*, 978-983.
- [132] M. Nakamura, J. Inoue, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2002**, *12*, 1603-1606.
- [133] M. Mondal, N. Radeva, H. Fanlo-Virgós, S. Otto, G. Klebe, A. K. H. Hirsch, *Angewandte Chemie (International ed. in English)* **2016**, *55*, 9422-9426.
- [134] R. Schulz, PhD thesis, Freie Universität Berlin (Berlin), **2017**.
- [135] J. Zhang, H. I. Pettersson, C. Huitema, C. Niu, J. Yin, M. N. G. James, L. D. Eltis, J. C. Vederas, *Journal of Medicinal Chemistry* **2007**, *50*, 1850-1864.
- [136] I. Im, E. S. Lee, S. J. Choi, J.-Y. Lee, Y.-C. Kim, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2009**, *19*, 3632-3636.
- [137] M. Reissig, D. W. Howes, J. L. Melnick, *The Journal of Experimental Medicine* **1956**, *104*, 289.
- [138] L. Sun, L. Delang, C. Mirabelli, J. Neyts, *Bio-protocol* **2017**, *7*, e2183.
- [139] H. van de Waterbeemd, D. A. Smith, K. Beaumont, D. K. Walker, *Journal of Medicinal Chemistry* **2001**, *44*, 1313-1333.
- [140] D. Fu, I. M. Arias, *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* **2012**, *44*, 461-464.
- [141] G. Szakács, J.-P. Annereau, S. Lababidi, U. Shankavaram, A. Arciello, K. J. Bussey, W. Reinhold, Y. Guo, G. D. Kruh, M. Reimers, J. N. Weinstein, M. M. Gottesman, *Cancer Cell* **2004**, *6*, 129-137.
- [142] P. Stopfer, K. Marzin, H. Narjes, D. Gansser, M. Shahidi, M. Uttereuther-Fischer, T. Ebner, *Cancer Chemotherapy and Pharmacology* **2012**, *69*, 1051-1061.
- [143] T. Wikberg, A. Vuorela, P. Ottoila, J. Taskinen, *Drug Metabolism and Disposition* **1993**, *21*, 81.
- [144] A. M. Henderson, M. Stephenson, *Biomaterials* **1992**, *13*, 1077-1084.
- [145] F. F. Fleming, L. Yao, P. C. Ravikumar, L. Funk, B. C. Shook, *Journal of Medicinal Chemistry* **2010**, *53*, 7902-7917.
- [146] H. C. Pace, C. Brenner, *Genome Biology* **2001**, *2*, reviews0001.0001.

- [147] P. Buchan, C. Keywood, A. Wade, C. Ward, *Headache: The Journal of Head and Face Pain* **2002**, *42*, 54-62.
- [148] N. Raghavan, C. E. Frost, Z. Yu, K. He, H. Zhang, W. G. Humphreys, D. Pinto, S. Chen, S. Bonacorsi, P. C. Wong, D. Zhang, *Drug Metabolism and Disposition* **2009**, *37*, 74.
- [149] H. J. Forman, H. Zhang, A. Rinna, *Molecular aspects of medicine* **2009**, *30*, 1-12.
- [150] J. Gan, T. W. Harper, M.-M. Hsueh, Q. Qu, W. G. Humphreys, *Chemical Research in Toxicology* **2005**, *18*, 896-903.
- [151] H.-C. Ma, Y. Liu, C. Wang, M. Strauss, N. Rehage, Y.-H. Chen, N. Altan-Bonnet, J. Hogle, E. Wimmer, S. Mueller, A. V. Paul, P. Jiang, *PLOS Pathogens* **2014**, *10*, e1004052.
- [152] H. J. Thibaut, L. van der Linden, P. Jiang, B. Thys, M.-D. Canela, L. Aguado, B. Rombaut, E. Wimmer, A. Paul, M.-J. Pérez-Pérez, F. J. M. van Kuppeveld, J. Neyts, *PLOS Pathogens* **2014**, *10*, e1004039.
- [153] J. A. H. Schwöbel, D. Wondrousch, Y. K. Koleva, J. C. Madden, M. T. D. Cronin, G. Schüürmann, *Chemical Research in Toxicology* **2010**, *23*, 1576-1585.
- [154] T. I. Crowell, T.-R. Kim, *Journal of the American Chemical Society* **1973**, *95*, 6781-6786.
- [155] S. Kulchat, K. Meguellati, J.-M. Lehn, **2014**, *97*, 1219-1236.
- [156] N. Acton, A. Brossi, **1980**, *63*, 1396-1399.
- [157] P. A. Jackson, J. C. Widen, D. A. Harki, K. M. Brummond, *Journal of Medicinal Chemistry* **2017**, *60*, 839-885.
- [158] A. Korytowski, MicroCal PEAQ-ITC Training course, Malvern Panalytical, **2018**.
- [159] J. E. Ladbury, G. Klebe, E. Freire, *Nature Reviews Drug Discovery* **2009**, *9*, 23.
- [160] E. Freire, *Drug Discovery Today* **2008**, *13*, 869-874.
- [161] G. G. Ferenczy, G. M. Keserü, *MedChemComm* **2016**, *7*, 332-337.
- [162] G. Williams, G. G. Ferenczy, J. Ulander, G. M. Keserü, *Drug Discovery Today* **2017**, *22*, 681-689.
- [163] R. J. Rojas, D. E. Edmondson, T. Almos, R. Scott, M. E. Massari, *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2015**, *23*, 770-778.
- [164] A. P. Brogan, W. R. Widger, D. Bensadek, I. Riba-Garcia, S. J. Gaskell, H. Kohn, *Journal of the American Chemical Society* **2005**, *127*, 2741-2751.
- [165] M. Lluís, Y. Wang, A. F. Monzingo, W. Fast, J. D. Robertus, *ChemMedChem* **2011**, *6*, 81-88.
- [166] G. Scheltjens, M. M. Diaz, J. Brancart, G. Van Assche, B. Van Mele, *Reactive and Functional Polymers* **2013**, *73*, 413-420.

- [167] A. Arnaud, L. Bouteiller, *Langmuir* **2004**, *20*, 6858-6863.
- [168] T. Maki, A. Kawamura, N. Kato, J. Ohkanda, *Molecular BioSystems* **2013**, *9*, 940-943.
- [169] J. M. Di Trani, S. De Cesco, R. O'Leary, J. Plescia, C. J. do Nascimento, N. Moitessier, A. K. Mittermaier, *Nature Communications* **2018**, *9*, 893.
- [170] P. Dumas, E. Ennifar, G. Bec, A. Pineiro, J. Sabn, E. Munoz, J. Rial, Implementation of kinITC into AFFINImeter, Malvern Panalytical, **2015**.
- [171] D. Burnouf, E. Ennifar, S. Guedich, B. Puffer, G. Hoffmann, G. Bec, F. Disdier, M. Baltzinger, P. Dumas, *Journal of the American Chemical Society* **2012**, *134*, 559-565.
- [172] T. Wiseman, S. Williston, J. F. Brandts, L.-N. Lin, *Analytical Biochemistry* **1989**, *179*, 131-137.
- [173] H. L. Silvestre, T. L. Blundell, C. Abell, A. Ciulli, *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2013**, *110*, 12984.
- [174] E. Rühmann, M. Betz, M. Fricke, A. Heine, M. Schäfer, G. Klebe, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* **2015**, *1850*, 647-656.
- [175] A. L. Hopkins, C. R. Groom, A. Alex, *Drug Discovery Today* **2004**, *9*, 430-431.
- [176] R. A. Copeland, *Evaluation of Enzyme Inhibitors in Drug Discovery : A Guide for Medicinal Chemists and Pharmacologists*, Wiley-Interscience, Hoboken, N.J., **2005**.
- [177] E. J. Corey, *Journal of the American Chemical Society* **1952**, *74*, 5897-5905.
- [178] A. M. Echavarren, J. K. Stille, *Journal of Organometallic Chemistry* **1988**, *356*, C35-C37.
- [179] D. A. Shannon, E. Weerapana, *Current Opinion in Chemical Biology* **2015**, *24*, 18-26.
- [180] M. Bogyo, S. Verhelst, V. Bellingard-Dubouchaud, S. Toba, D. Greenbaum, *Chemistry & Biology* **2000**, *7*, 27-38.
- [181] E. Weerapana, C. Wang, G. M. Simon, F. Richter, S. Khare, M. B. D. Dillon, D. A. Bachovchin, K. Mowen, D. Baker, B. F. Cravatt, *Nature* **2010**, *468*, 790.
- [182] B. Bernardim, M. J. Matos, X. Ferhati, I. Compañón, A. Guerreiro, P. Akkapeddi, A. C. B. Burtoloso, G. Jiménez-Osés, F. Corzana, G. J. L. Bernardes, *Nature Protocols* **2019**, *14*, 86-99.
- [183] J. M. Wilkinson, *Fragmentation of Polypeptides by Enzymic Methods*, In: *Practical Protein Chemistry: A Handbook*, John Wiley and Sons, New York, **1986**.
- [184] J. A. Loo, *Mass Spectrometry Reviews* **1997**, *16*, 1-23.
- [185] S.-A. Poulsen, *Australian Journal of Chemistry* **2013**, *66*, 1495-1501.

- [186] A. C. Leney, A. J. R. Heck, *Journal of The American Society for Mass Spectrometry* **2017**, *28*, 5-13.
- [187] H. J. Maple, R. A. Garlish, L. Rigau-Roca, J. Porter, I. Whitcombe, C. E. Prosser, J. Kennedy, A. J. Henry, R. J. Taylor, M. P. Crump, J. Crosby, *Journal of Medicinal Chemistry* **2012**, *55*, 837-851.
- [188] M. Göth, V. Badock, J. Weiske, K. Pagel, B. Kuroпка, *ChemMedChem* **2017**, *12*, 1201-1211.
- [189] C. A. Lewis, R. Wolfenden, *Biochemistry* **1977**, *16*, 4890-4895.
- [190] G. E. Lienhard, W. P. Jencks, *Journal of the American Chemical Society* **1966**, *88*, 3982-3995.
- [191] G. Jones, in *Organic Reactions*, **2011**.
- [192] E. V. Dalessandro, H. P. Collin, L. G. L. Guimarães, M. S. Valle, J. R. Pliego, *The Journal of Physical Chemistry B* **2017**, *121*, 5300-5307.
- [193] F. Bigi, C. Quarantelli, *Current Organic Synthesis* **2012**, *9*, 31-39.
- [194] M. N. Gomes, C. M. A. de Oliveira, C. F. D. Garrote, V. de Oliveira, R. Menegatti, *Synthetic Communications* **2010**, *41*, 52-57.
- [195] A. McCluskey, P. J. Robinson, T. Hill, J. L. Scott, J. K. Edwards, *Tetrahedron Letters* **2002**, *43*, 3117-3120.
- [196] E. M. Sletten, C. R. Bertozzi, *Angewandte Chemie International Edition* **2009**, *48*, 6974-6998.
- [197] P. Greenzaid, *The Journal of Organic Chemistry* **1973**, *38*, 3164-3167.
- [198] E. J. Breaux, M. L. Bender, *FEBS Letters* **1975**, *56*, 81-84.
- [199] D. G. Gorenstein, D. Kar, R. K. Momii, *Biochemical and Biophysical Research Communications* **1976**, *73*, 105-111.
- [200] E. Dufour, A. C. Storer, R. Menard, *Biochemistry* **1995**, *34*, 9136-9143.
- [201] E. Schröder, C. Phillips, E. Garman, K. Harlos, C. Crawford, *FEBS Letters* **1993**, *315*, 38-42.
- [202] W. P. Jencks, *Proceedings of the National Academy of Sciences* **1981**, *78*, 4046.
- [203] R. Manetsch, *Expert Opinion on Drug Discovery* **2006**, *1*, 525-538.
- [204] Y. Ding, X. Ni, M. Gu, S. Li, H. Huang, Y. Hu, *Catalysis Communications* **2015**, *64*, 101-104.
- [205] X. Garrabou, B. I. M. Wicky, D. Hilvert, *Journal of the American Chemical Society* **2016**, *138*, 6972-6974.
- [206] M. F. Mesleh, J. M. Hunter, A. A. Shvartsburg, G. C. Schatz, M. F. Jarrold, *The Journal of Physical Chemistry* **1996**, *100*, 16082-16086.

- [207] A. A. Shvartsburg, M. F. Jarrold, *Chemical Physics Letters* **1996**, *261*, 86-91.
- [208] L. Reinhard, H. Mayerhofer, A. Geerlof, J. Mueller-Dieckmann, M. S. Weiss, *Acta Crystallographica Section F* **2013**, *69*, 209-214.
- [209] B. T. Burlingham, T. S. Widlanski, *Journal of Chemical Education* **2003**, *80*, 214.
- [210] J. Kesselring, PhD thesis, Johannes-Gutenberg Universität Mainz (Mainz), **2017**.
- [211] G.-C. Zhou, S. L. Parikh, P. C. Tyler, G. B. Evans, R. H. Furneaux, O. V. Zubkova, P. A. Benjes, V. L. Schramm, *Journal of the American Chemical Society* **2004**, *126*, 5690-5698.
- [212] R. Blöcher, C. Lamers, S. K. Wittmann, D. Merk, M. Hartmann, L. Weizel, O. Diehl, A. Brüggerhoff, M. Boß, A. Kaiser, T. Schader, T. Göbel, M. Grundmann, C. Angioni, J. Heering, G. Geisslinger, M. Wurglics, E. Kostenis, B. Brüne, D. Steinhilber, M. Schubert-Zsilavec, A. S. Kahnt, E. Proschak, *Journal of Medicinal Chemistry* **2016**, *59*, 61-81.
- [213] S. F. Wnuk, S. M. Chowdhury, P. I. Garcia, M. J. Robins, *The Journal of Organic Chemistry* **2002**, *67*, 1816-1819.
- [214] X. Xin, D. Xiang, J. Yang, Q. Zhang, F. Zhou, D. Dong, *The Journal of Organic Chemistry* **2013**, *78*, 11956-11961.
- [215] X.-H. Hu, J. Zhang, X.-F. Yang, Y.-H. Xu, T.-P. Loh, *Journal of the American Chemical Society* **2015**, *137*, 3169-3172.
- [216] K. Wang, K. Nguyen, Y. Huang, A. Dömling, *Journal of Combinatorial Chemistry* **2009**, *11*, 920-927.
- [217] J. B. Shaik, B. K. Palaka, M. Penumala, K. V. Kotapati, S. R. Devineni, S. Eadlapalli, M. M. Darla, D. R. Ampasala, R. Vadde, G. D. Amooru, *European journal of medicinal chemistry* **2016**, *107*, 219-232.
- [218] P. K. Amancha, Y.-C. Lai, I. C. Chen, H.-J. Liu, J.-L. Zhu, **2010**, *66*, 871-877.
- [219] H. G. O. Becker, R. Beckert, *Organikum*, 24. ed., Wiley-VCH, Weinheim, **2015**.
- [220] B.-D. Ma, S.-H. Du, Y. Wang, X.-M. Ou, M.-Z. Huang, L.-X. Wang, X.-G. Wang, *Tetrahedron: Asymmetry* **2017**, *28*, 47-53.
- [221] Y. Luo, L. Ma, H. Zheng, L. Chen, R. Li, C. He, S. Yang, X. Ye, Z. Chen, Z. Li, Y. Gao, J. Han, G. He, L. Yang, Y. Wei, *Journal of Medicinal Chemistry* **2010**, *53*, 273-281.
- [222] M. Yoshida, M. Sakairi, Y. Tsubamoto, T. Nakamura, Y. Mizuno, T. Kagigami, H. Kinoshita, PCT Int. Appl. 2009148004, **2009**.