

# **Bildung von Proteaseinhibitoren durch Proteintemplat-unterstützte Fragment- Ligation und *in-situ* Amidierung**

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

**MIKE JAEGLE**

aus Villingen-Schwenningen

Berlin 2018



Die Promotionsarbeit wurde im Zeitraum von Juli 2013 bis August 2018 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. Matthias F. Melzig

Tag der Disputation: 21.01.2019



# Erklärung

Hiermit versichere ich, Mike Jaegle, dass ich die hier vorliegende Arbeit selbst verfasst und keine weiteren als die hier aufgeführten Hilfsmittel verwendet habe.

Mike Jaegle



Teile der vorliegenden Arbeit wurden bereits veröffentlicht in:

M. Jaegle, T. Steinmetzer, J. Rademann, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2017**, 56, 3718–3722.



# Danksagung

Ich möchte Prof. Dr. Rademann für die Bereitstellung des interessanten Themas und die gute Betreuung während der Doktorarbeit danken.

Bei Prof. Dr. Melzig bedanke ich mich für die Übernahme des Zweitgutachtens.

Dr. Isabel Fernández-Bachiller und Dr. Christoph Arkona will ich für die Hilfe in biochemischen Fragen danken. Dr. Christoph Arkona danke ich zudem für die Bereitstellung der WNV NS2B-NS3-Protease. Prof. Wolber danke ich dafür, dass ich die *Schroedinger Suite* im Zuge des WNV NS2B-NS3-Protease *in-silico* Screenings nutzen durfte. Prof. Steinmetzer gebührt Dank für die Bereitstellung der Faktor Xa-Kristallstruktur.

Für die schöne Zeit während der langen Labortage und auch nach Feierabend möchte ich der gesamten AG Rademann danken. Besonderer Dank gilt hierbei meiner Kollegin und meinen Kollegen aus Labor 357/358: Christina Fischer, Dr. Sebastian Köhling und Xinning Wang. Ebenfalls bedanken möchte ich mich bei meinen Bürokolleginnen Franziska Gottschalk und Lisa Redl, die stets für eine harmonische Atmosphäre im Büro gesorgt haben.

Für die stetige Unterstützung danke ich außerdem meinen Freunden und meiner Familie. Ganz besonders bedanken möchte ich mich abschließend bei meinen Eltern und meiner Freundin Melanie, ohne die diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.



# Inhaltsverzeichnis

<b>I. Allgemeiner Teil</b> .....	1
<b>1. Einleitung</b> .....	3
1.1. Fragment-basierte Wirkstoffentwicklung .....	3
1.2. Templat-unterstützte Methoden .....	6
1.3. Dynamisches Ligationsscreening – DLS .....	9
1.4. Enzyminhibitoren als Arzneistoffe .....	11
1.5. Proteasen als Zielstruktur.....	12
1.6. Serin-Proteasen .....	14
1.7. Faktor Xa .....	16
1.8. West-Nil-Virus NS2B-NS3-Protease .....	20
<b>2. Zielstellung und Planung der Arbeit</b> .....	25
<b>3. Grundlagen</b> .....	29
3.1. Reaktivität von Carbonsäurederivaten.....	29
3.2. Aktivierungsreagenzien .....	30
3.3. Michaelis-Menten-Gleichung .....	33
3.4. Inhibitionskonstante und Hemmmechanismen.....	37

3.5.	Freie Bindungsenergie und Bindungsaffinität .....	41
3.6.	IC <sub>50</sub> -Wert.....	42
3.7.	Enzymaktivitätsassay.....	43
3.8.	Docking und <i>in-silico</i> Methoden .....	44
<b>II.</b>	<b>Ergebnisse und Diskussion .....</b>	<b>47</b>
<b>4.</b>	<b>Entwicklung des Ligationsassays .....</b>	<b>49</b>
4.1.	Synthese der Aktivester .....	50
4.2.	Synthese des S1-bindenden Amin-Fragments .....	52
4.3.	Aufbau des Ligations-Assays .....	53
4.4.	Ermittlung der IC <sub>50</sub> -Werte der Fragmente .....	55
4.5.	Kontrollmessung mittels BLI .....	56
4.6.	Suche nach einem geeigneten Aktivester .....	59
4.7.	Maximierung des gefundenen Templat-Effekts .....	62
4.8.	Detektion des Ligationsprodukts mittels LC/MS .....	64
<b>5.</b>	<b>Untersuchung der Templat-unterstützten Amidierungsreaktion.....</b>	<b>67</b>
5.1.	Quantifizierung des Ligationsprodukts mittels QTOF/MS .....	67
5.2.	Acylamidin-Nebenprodukt .....	71
5.3.	Untersuchung der aufgeklärten Struktur von Faktor Xa im Komplex mit Inhibitor <b>15</b> .....	75
5.4.	Untersuchung der superadditiven Bindungsenergiezunahme als Folge der Ligation.....	80
<b>6.</b>	<b>Carbonsäureaktivierung im Mikrotiterplatten-Maßstab.....</b>	<b>85</b>
<b>7.</b>	<b>Screening der Carbonsäure-Bibliothek gegen</b>	
	<b>WNV NS2B-NS3-Protease .....</b>	<b>91</b>
7.1.	Synthese von Amin <b>19</b> (GCMA) .....	92
7.2.	<i>In-situ</i> Amidierung.....	93

7.3.	WNV NS2B-NS3-Protease Screening.....	95
7.4.	Validierung der Screening-Hits .....	98
7.5.	<i>In-silico</i> Screening .....	102
7.6.	Hit-Auswahl.....	104
7.7.	Synthese der ausgewählten Fragment-Kombinationen.....	108
7.8.	IC <sub>50</sub> -Bestimmung der Screening-Hits .....	110
7.9.	Modellierter Komplex von <b>CA3-Amid</b> mit der WNV NS2B-NS3-Protease.....	111
<b>8.</b>	<b>Abschlussdiskussion</b> .....	113
<b>III.</b>	<b>Experimenteller Teil</b> .....	117
<b>9.</b>	<b>Materialien und Methoden</b> .....	119
9.1.	Materialien .....	119
9.2.	Allgemeine instrumentelle Methoden und verwendete Geräte....	120
9.3.	BLI-Messungen von Verbindung <b>14</b> und <b>15</b> .....	122
9.4.	Strukturelle Aufklärung der Templat- unterstützten Reaktion ....	123
9.5.	Carbonsäureaktivierung im Mikrotiterplatten-Maßstab .....	124
9.6.	<i>In-silico</i> Screening und Docking gegen WNV NS2B-NS3-Protease.....	125
9.7.	<i>In-situ</i> Amidierung im Mikrotiterplatten-Maßstab.....	125
9.8.	<i>In-situ</i> Screening gegen die WNV NS2B-NS3-Protease.....	126
<b>10.</b>	<b>Enzymkinetische Messungen</b> .....	129
10.1.	IC <sub>50</sub> -Bestimmungen .....	129
10.2.	Bestimmung der K <sub>M</sub> -Werte.....	130
10.3.	Faktor Xa-Aktivitätsassay .....	131
10.4.	WNV NS2B-NS3-Protease-Aktivitätsassay.....	131
<b>11.</b>	<b>Ligationsassay-Durchführung</b> .....	133

11.1. Detektion mittels Enzymaktivitätsassay.....	133
11.2. Detektion mittels LC/MS-Analytik.....	135
11.3. Quantifizierung des Ligationsprodukts mittels LC-QTOF-MS ..	135
<b>12. Synthesevorschriften .....</b>	<b>139</b>
<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>159</b>
<b>A. Tabellen und Spektren .....</b>	<b>177</b>
A.1. <i>In-situ</i> Screening-Ergebnisse .....	179
A.2. Dosis-Wirkungs-Kurven – Faktor Xa.....	187
A.3. Dosis-Wirkungs-Kurven – WNV NS2B-NS3-Protease .....	188
A.4. NMR-Spektren.....	189

# Abkürzungsverzeichnis

<b>AcOH</b>	Essigsäure
<b>AMC</b>	7-Amino-4-methylcumarin
<b>Äq.</b>	Äquivalent
<b>arom.</b>	aromatisch
<b>Boc</b>	<i>tert</i> -Butyloxycarbonyl
<b>Cbz</b>	Ameisensäurebenzylester
<b>CDI</b>	1,1'-Carbonyldiimidazol
<b>d</b>	Dublett
<b>DAST</b>	Diethylaminoschwefeltrifluorid
<b>DCC</b>	<i>N,N'</i> -Dicyclohexylcarbodiimid
<b>DCC</b>	<i>dynamic combinatorial chemistry</i>
<b>DCM</b>	Dichlormethan
<b>DIPEA</b>	<i>N,N</i> -Diisopropylethylamin
<b>DMAP</b>	4-(Dimethylamino)-pyridin
<b>DMF</b>	<i>N,N</i> -Dimethylformamid
<b>DMSO</b>	Dimethylsulfoxid

<b>EDC</b>	1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid
<b>EE</b>	Ethylacetat
<b>EDTA</b>	Ethylendiamintetraessigsäure
<b>FBDD</b>	<i>fragment-based drug discovery</i>
<b>Fmoc</b>	9-Fluorenylmethoxycarbonyl
<b>FRET</b>	Förster-Resonanzenergietransfer
<b>FXa</b>	Faktor Xa
<b>GCMA</b>	<i>trans</i> -(4-Guanidino)cyclohexylmethyamid
<b>HA</b>	Heteroatome
<b>HATU</b>	1-[Bis(dimethylamino)methylen]-1 <i>H</i> -1,2,3-triazolo-[4,5- <i>b</i> ]pyridinium Hexafluorophosphat-3-oxid
<b>HBTU</b>	2-(1 <i>H</i> -Benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium Hexafluorophosphat
<b>HOBt</b>	1-Hydroxybenzotriazol
<b>HPLC</b>	<i>high performance liquid chromatography</i>
<b>HTS</b>	<i>High Throughput Screening</i>
<b>IBCF</b>	Isobutylchloroformiat
<b>IPCF</b>	Isopropenylchloroformiat
<b>IR</b>	Infrarotspektroskopie
<b>LC/MS</b>	HPLC-gekoppeltes Massenspektrometer
<b>LE</b>	Liganden-Effizienz
<b>LM</b>	Lösungsmittel
<b>m</b>	Multipllett
<b>MeCN</b>	Acetonitril
<b>MeOH</b>	Methanol
<b>MOPS</b>	3-( <i>N</i> -Morpholino)propansulfonsäure
<b>NHS</b>	<i>N</i> -Hydroxysuccinimid
<b>NMM</b>	<i>N</i> -Methylmorpholin
<b>NMR</b>	Kernresonanzspektroskopie
<b>PAINS</b>	<i>pan assay interference compounds</i>
<b>Ph</b>	Phenyl

<b>PyBOP</b>	Benzotriazol-1-yl-oxytripyrrolidinophosphonium Hexafluorophosphat
<b>q</b>	Quartett
<b>Q-TOF</b>	<i>quadrupol time of flight</i>
<b>rpm</b>	<i>rounds per minute</i>
<b>s</b>	Singulett
<b>TCFH</b>	Tetramethylchloroformamidinium Hexafluorophosphat
<b>TEA</b>	Triethylamin
<b>TFA</b>	Trifluoressigsäure
<b>TFFH</b>	Tetramethylfluoroformamidinium Hexafluorophosphat
<b>THF</b>	Tetrahydrofuran
<b>WNV</b>	West-Nil-Virus



# Zusammenfassung

Fragment-basierte Ansätze zur Entwicklung neuer Arzneistoffe erfreuen sich immer größerer Beliebtheit. Dies liegt darin begründet, dass bereits durch den Einsatz und die Kombination von verhältnismäßig kleinen Fragment-Bibliotheken ein großer chemischer Raum abgedeckt werden kann. Als Startpunkt dient dabei meist ein Primärfragment, das durch geschicktes Anhängen weiterer funktioneller Gruppen oder durch Verknüpfung (Ligation) mit weiteren Fragmenten so erweitert wird, dass neue Interaktionspunkte mit der jeweiligen Zielstruktur entstehen. Hierdurch ist die Bildung hochaffiner Liganden möglich.

In der vorliegenden Arbeit wird die Amidierung als irreversible Form der Ligation zweier Fragmente näher untersucht. Die Arbeit gliedert sich dabei in zwei Teile. Im ersten Teil wurde ein Ligationsassay entwickelt, bei der die Amidierung Templat-unterstützt im Stil einer Proteintarget-geleiteten Synthese durchgeführt wird. Nach vorheriger Bindung der beiden Fragmente begünstigt dabei das Templat bzw. der Templat-Effekt die Reaktion der beiden Fragmente, wenn sich deren komplementäre funktionelle Gruppen in ausreichender Nähe zueinander befinden. Als Zielprotein wurde dabei Faktor Xa eingesetzt, an dem die Ligationsreaktion eines S1-bindenden Amin-Fragments, mit einem aktivierten Carbonsäure-Fragment Templat-unterstützt, durchgeführt werden sollte. Das Produkt dieser Reaktion ist ein nanomolar-aktiver Faktor Xa-Inhibitor. Die Templat-unterstützte Amidierung wurde dabei durch Umsetzung unterschiedlich reaktiver Carbonsäurederivate (Aktivester) nachgewiesen, indem die Reaktion in An- und Abwesenheit des

Proteintemplats untersucht wurde. Da im Zuge der Reaktion aus zwei millimolar-aktiven Fragmenten ein nanomolar-aktives Ligationsprodukt gebildet wird, konnte zur Detektion der Produktbildung ein Enzymaktivitätsassay verwendet werden. Dieser ermöglichte aufgrund der hohen Affinitätsunterschiede der Ausgangsfragmente im Vergleich zum Fragment-Kombinationsprodukt bereits den Nachweis kleinster Produktmengen. Für den Phenyl- und den Trifluorethylester der Carbonsäure konnte dabei eine selektiv-templierte Reaktion nachgewiesen werden, d. h. die templierte Reaktion läuft ohne gleichzeitige Reaktion durch nicht gebundene Fragmente ab (Hintergrundreaktion). Die Menge des gebildeten Produkts konnte nachfolgend mittels HPLC-QTOF-MS quantifiziert werden. Ebenfalls konnte durch die Untersuchung der Faktor Xa-Kristallstruktur mit dem cokrystallisierten Fragment-Ligationsprodukt der Reaktionsmechanismus der Reaktion auf molekularer Ebene aufgeklärt werden. Abschließend konnten Reaktionsbedingungen gefunden werden, die auch im Mikrotiterplatten-Maßstab eine erfolgreiche Umsetzung von Carbonsäuren zum entsprechenden Aktivester zulassen.

Im zweiten Teil wurde ein *in-situ* Screening gegen die NS2B-NS3-Protease des West-Nil-Virus durchgeführt. Dabei sollte eine aus 1615 Carbonsäure Fragmenten bestehende Substanz-Bibliothek mit einem Amin-Fragment verknüpft werden. Das verwendete Amin stellte hierbei ein bekannter S1-Binder der WNV-Protease dar. Zur Ligation der Fragmente mussten zunächst geeignete Reaktionsbedingungen gefunden werden, die eine möglichst effiziente Umsetzung der Carbonsäuren zum entsprechenden Amid gewährleisten. Hierbei stellten sich die Aktivierung mittels HBTU/DIPEA in einem DMF/DMSO-Gemisch und die Aktivierung mittels DCC/DMAP in Dioxan als geeignet heraus. Nachfolgend wurde das Protease-Screening durchgeführt. Zur Detektion wurde dabei ein Fluoreszenz-basierter Enzymaktivitätsassay eingesetzt. Unterstützend wurden *in-silico* Methoden verwendet. Nach der Validierung der erhaltenen Ergebnisse konnten durch geeignete Hit-Selektionsschritte drei Fragment-Ligationspaare ausgewählt werden, die in größerem Maßstab nachsynthetisiert wurden und anschließend näher untersucht wurden. Für die aussichtsreichste Fragment-Kombination **CA3-Amid** konnte dabei ein  $IC_{50}$ -Wert von 2,66  $\mu$ M ermittelt werden.

# Abstract

Fragment-based drug discovery approaches are getting popular more and more. This is due to fact that despite using and combining relatively small fragment-libraries a broad chemical space can be covered. In most cases a primary fragment is used as a starting point which consecutively gets expanded by further functional groups or through the ligation with another fragment. Thereby additional interactions with the target structure can be formed that can finally lead to the formation of highly active ligands.

In the presented work, the use of the amidation reaction is investigated to link two fragments irreversibly. The work is divided into two parts. In the first part a ligation assay was developed that uses the template-assisted amidation in a “target-guided-synthesis” reaction. Here, the protein template accelerates the reaction of two fragments if both are bound to the template and if the complementary functional group of the two fragments are in the right orientation to each other. Factor Xa was thereby used as a test system. This factor Xa-template was subsequently used to establish a method to link an S1-binding amine fragment to an activated carboxylic acid fragment. The reaction of the two fragments, here, leads to the formation of a nanomolar-active factor Xa inhibitor. To investigate the occurrence of a template-assisted reaction several active esters were synthesized, covering a broad spectrum of reactivity. These synthesized esters were subsequently tested to react in a template-assisted manner with the amine fragment in presence of the protein template. The reaction in absence of the protein-template was

used as a control. Since in the course of the ligation reaction two millimolar-active fragments are linked together to form a nanomolar-active ligation product, the formation of the product can be detected highly sensitively through the use of an enzyme activity assay. In the case of the phenyl- and trifluoroethyl-ester a selective templated reaction was demonstrated without the formation of the ligation product through unbound fragments (background reaction). In later experiments the amount of the formed product was quantified via HPLC-QTOF-MS. Furthermore using the crystal structure with the co-crystallized ligation product the reaction mechanism of the templated amidation reaction have been clarified. Finally, reaction conditions were found that allow the formation of active esters from carboxylic acids in microtiter plates.

In the second part an *in-situ* screening against the NS2B-NS3 protease of the west-nile virus was conducted. Firstly, a library containing 1615 carboxylic acid fragments were supposed to be linked to an amine fragment. In this case the used amine fragment was a known S1-binding ligand of the WNV protease. In the starting experiments several reaction conditions were investigated to find an efficient way to convert the carboxylic acids to the respective amides. The activation via HBTU/DIPEA in a DMF/DMSO-mixture and the activation with DCC/DMAP in dioxane were found to be effective and were subsequently used for the protease screening. To detect inhibiting amides an enzyme activity assay was performed using a fluorogenic substrate. As a support *in-silico* methods were used. After the validation of the identified screening hits using several hit selection approaches, three different hit-structure groups were chosen. One compound representing each group was synthesized in a larger scale and further investigated. For the best fragment-combination **CA3-Amid**, an  $IC_{50}$ -value of 2.66  $\mu$ M was found.

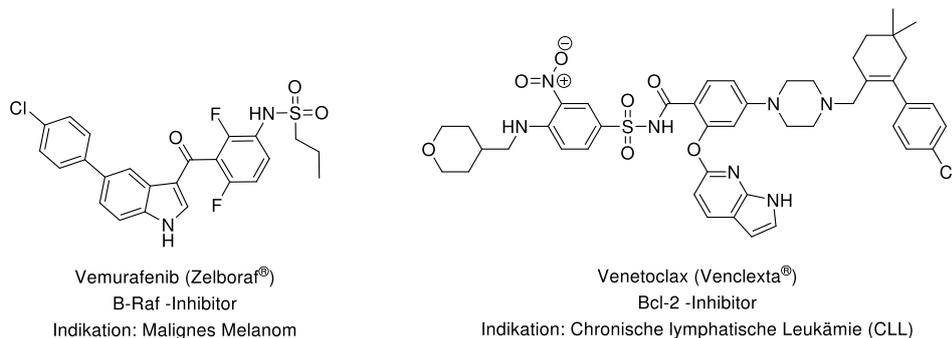
# **I. Allgemeiner Teil**



# 1. Einleitung

## 1.1. Fragment-basierte Wirkstoffentwicklung

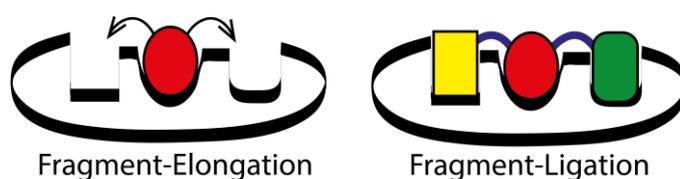
Fragment-basierte Methoden zur Entwicklung neuer Arzneistoffe werden mittlerweile seit über 20 Jahren sowohl in den Universitäten als auch in der Pharmaindustrie eingesetzt.<sup>[1-3]</sup> Jährlich erscheint eine große Anzahl an Publikationen, die von der Entdeckung neuer Leitstrukturen oder der Aufklärung biologischer Prozesse berichten, welche auf Erkenntnissen aus Fragment-basierten Versuchsansätzen beruhen.<sup>[4, 5]</sup> So ist es auch nicht verwunderlich, dass der Ansatz bisher über 30 Arzneistoffkandidaten hervorgebracht hat, welche es in die klinische Entwicklung geschafft haben. Im Fall von Vemurafenib<sup>[6]</sup> und Venetoclax<sup>[7]</sup> reichte es sogar bis hin zur Marktreife (s. Abb. 1.1).



**Abbildung 1.1.** Dargestellt sind die beiden ersten Arzneistoffe auf dem Markt, die aus Fragment-basierten Wirkstoffkampagnen hervorgegangen sind.

Fragmente besitzen in der Regel eine Molekülmasse von unter 300 Da. Was den Einsatz von Fragmenten als Startpunkt zur Wirkstoffsuche so attraktiv macht, ist die Tatsache, dass ein gefundenes Fragment zwar groß genug ist um Wechselwirkungen zu einer bestimmten Zielstruktur zu ermöglichen, gleichzeitig aber zu klein ist, um energetisch ungünstige Interaktionspunkte zu verursachen, die einer Bindung wieder entgegenwirken würden.<sup>[8]</sup> Den Grundstein für Fragment-basierte Wirkstoffentwicklung lieferte dabei eine Arbeit von Jencks aus dem Jahre 1981. Darin werden Berechnungen aufgestellt, aus denen hervorgeht, dass die Bindungsenergie zweier verknüpfter Fragmente größer als die

Summe der Bindungsenergien der Einzelfragmente sein kann.<sup>[9]</sup> Ein einzelnes Fragment bildet aufgrund seiner geringen Größe meist nur wenige, schwache Interaktionen aus. Durch geschickte Verlängerung eines ersten gefundenen „Primär“-Fragments, können jedoch durch Anhängen weiterer funktioneller Gruppen (Fragment-Elongation bzw. „-*Growing*“) oder durch Verknüpfung mit weiteren, benachbart-bindenden Fragmenten (Fragment-Ligation) neue Interaktionspunkte zum Zielprotein entstehen, womit dann insgesamt eine sehr hohe Affinität zur Zielstruktur möglich wird (s. Abb. 1.2).<sup>[10]</sup>



**Abbildung 1.2.** Dargestellt sind zwei Möglichkeiten zur Verlängerung von Primärfragmenten. Bei der Fragment-Elongation wird zunächst Kontakt mit der Oberfläche erzeugt und dann versucht das Primärfragment in benachbarte Bindungstaschen „wachsen“ zu lassen. Die Fragment-Ligation zielt darauf ab, in benachbarte Bindungstaschen bindende Fragmente über einen Linker miteinander zu verknüpfen.

Eine erste praktische Anwendung dieser aufgestellten These findet sich in einer Arbeit von Fesik aus dem Jahre 1996, in der von der Entwicklung einer NMR-basierten Methode berichtet wird („*SAR by NMR*“). Diese ermöglichte es niedrigaffine Fragment-Liganden in benachbarten Bindungstaschen aufzuspüren, welche dann durch Verknüpfung zu einem hochaffinen Fragment-Ligationsprodukt umgesetzt werden konnten.<sup>[11]</sup> Der große Vorteil von Fragment-basierten Ansätzen ist dabei die Möglichkeit bereits mit verhältnismäßig kleinen Bibliotheken, durch geschickte Elongation bzw. Ligation der Fragmente, einen sehr großen „chemischen Raum“ abzudecken. Diese strukturelle Vielfalt ermöglicht es die Methode an einem großen Spektrum möglicher Zielstrukturen einzusetzen. In der Regel werden dabei Bibliotheken bestehend aus mehreren Hundert bis Tausend Fragmenten verwendet. Im Vergleich zu den meist mehrere Hunderttausend bis Millionen Substanzen umfassenden, standardmäßig im Zuge von Hochdurchsatz-Screenings eingesetzten Substanzbibliotheken, sind die Anschaffungskosten von Fragment-Bibliotheken damit erheblich geringer. Dies macht die Methode besonders auch für Universitäten und kleinere Unternehmen attraktiv.

Zu Beginn jedes Fragment-basierten Ansatzes steht zunächst die Suche nach Primärfragmenten. Dabei werden im Zuge eines Primärscreenings eine kleine Auswahl oder bereits ganze Bibliotheken von Fragmenten auf die Bindung an eine bestimmte Zielstruktur getestet. Die Detektion dieser Bindung kann sich dabei als schwierig herausstellen, da die Fragmente, aufgrund ihrer geringen Größe und damit verbunden einer nur geringen Anzahl möglicher Interaktionspunkte, lediglich eine geringe Affinität zum Zielmolekül aufweisen (meist im hohen mikromolaren bis millimolaren Bereich).

Die Detektionsmöglichkeiten waren hier in der Vergangenheit stark begrenzt, jedoch gelang es mit voranschreitender Technik und immer sensitiver werdenden Methoden, besonders durch Verwendung von biophysikalischen Detektionsmethoden, wie NMR-Spektroskopie,<sup>[12]</sup> Röntgenkristallographie<sup>[13]</sup> oder Oberflächenplasmonenresonanz,<sup>[14]</sup> immer zuverlässiger erste Primärfragmente zu identifizieren. Diese Detektionsmethoden eignen sich dazu eine Bindung nachzuweisen und liefern im Fall der Röntgenkristallographie sogar strukturelle Daten zur Bindung des Fragments an die Zielstruktur. Sie haben jedoch den Nachteil, dass sie bisher kostenintensiv und zeitaufwendig sind und sich daher eher für kleinere Maßstäbe eignen.

Neben den biophysikalischen Detektionsmethoden, dem Thermal Shift Assay<sup>[15]</sup> und der isothermen Titrationskalorimetrie,<sup>[16]</sup> erfreuen sich heutzutage vor allem Bioassays großer Beliebtheit. Besonders häufig werden hier Enzymaktivitäts-Assays mit Fluoreszenzsubstraten<sup>[17-19]</sup> und Bindungsassays mit Fluoreszenzpolarisationssonden<sup>[20]</sup> eingesetzt. Bioassays bieten den Vorteil, dass hier direkt eine Aussage zur resultierenden Bioaktivität der jeweiligen Zielstruktur getroffen werden kann. Die anderen gängigen Detektionsmethoden lassen lediglich Aussagen zur Bindung der Substanz zu. Erwähnt werden muss in diesem Zusammenhang jedoch auch, dass dieser Vorteil mit einer erhöhten Anfälligkeit für falsch-negativ und -positiv Aussagen einhergeht, was durch Interferenzen der Testsubstanz mit dem Detektionssignal oder bestimmten Assaybestandteilen (z. B. dem Zielprotein) bedingt ist.<sup>[21]</sup>

Trotz der großen Fortschritte im Bereich der Detektionsmöglichkeiten von Primärfragmenten, haben alle bisherigen Methoden gemein, dass auf die eigentlich wichtige Frage zur Optimierung dieser ersten Primärhits keine Antwort gegeben wird: Wie kann

ein solches Fragment vergrößert oder mit einem benachbart-bindenden Fragment verknüpft werden, um in den wirklich hochaffinen Bindungsbereich vorzustoßen? Das Anhängen weiterer funktioneller Gruppen (Fragment-Elongation), mit der Absicht das Fragment aus der Bindungstasche heraus „wachsen“ zu lassen, stellt meist ein zeitintensives und chemisch aufwendiges Unterfangen dar.<sup>[22]</sup>

Auch die zweite Methode zur Fragment-Optimierung sieht leider nur auf dem Papier leicht aus. Zwei Fragmente werden hierbei durch einen Linker miteinander verknüpft und im Idealfall resultiert daraus eine Fragment-Kombination, welche eine superadditive Bindungsenergie im Vergleich zu den Einzelfragmenten aufweist. Die Suche nach einem geeigneten Linker stellt jedoch oft eine komplexe Herausforderung dar.<sup>[23]</sup> Dieser muss nämlich bewerkstelligen, dass die beiden Fragmente auch in verknüpfter Form möglichst den identischen ursprünglichen Bindungsmodus einnehmen können. Gleichzeitig muss er selbst möglichst spannungsfrei sein und gleichzeitig dazu in der Lage sein die zwei Fragmente in Position zu halten.<sup>[24]</sup> Dies funktioniert in der Realität oft nur mäßig (mit subadditiver Bindungsenergie als Ergebnis) oder manchmal auch gar nicht.<sup>[25, 26]</sup>

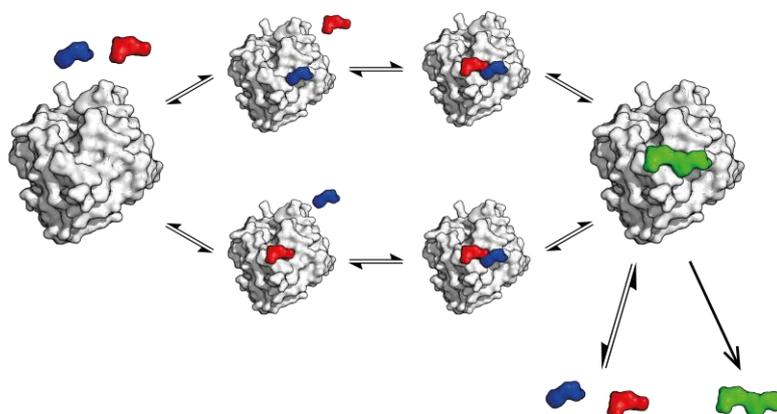
## 1.2. Templat-unterstützte Methoden

Aufgrund der potentiellen Möglichkeit synergistische Effekte mit superadditiven Bindungsenergien als Resultat zu erzielen, ist die Fragment-Ligation besonders reizvoll hinsichtlich der Optimierung von Primärfragmenten. Dieser stehen jedoch oben genannte Schwierigkeiten im Weg. Eine elegante Lösung zu dieser Problematik lieferten Huc und Lehn im Jahr 1997 mit ihrer Veröffentlichung zu *Virtual combinatorial libraries*.<sup>[27]</sup> Sie verwendeten dabei einen für *dynamic combinatorial chemistry* (DCC) typischen Versuchsansatz: Zwei Gruppen von Fragmenten werden eingesetzt mit jeweils komplementären reaktiven Gruppen. Eine Gruppe trägt eine Aldehyd-Funktion, die andere eine Amin-Funktion. Ein Gemisch dieser Fragmentgruppen führt zur Entstehung komplexer Gleichgewichte aus den Fragmenten sowie allen möglichen Ligationsprodukten (Imine) der jeweiligen Fragment-Kombinationspaare. Die Fragmente wurden dabei so gewählt, dass bei der Reaktion bereits bekannte Carboanhydrase II-Inhibitoren entstehen. Nach Zugabe der Zielstruktur Carboanhydrase II konnte eine Verschiebung der Gleichgewichte

zugunsten der Ligationsprodukte mit den höchsten Affinitäten zu Carboanhydrase II nachgewiesen werden. Der Produktnachweis erfolgte hierbei nach Reduktion der Imine durch  $\text{NaCNBH}_3$ , in Form der entsprechenden sekundären Amine, mittels HPLC.

Diese Methode<sup>[28]</sup> nutzt also den durch das Zielprotein bzw. Templat bedingten Selektionsdruck auf ein dynamisches Gleichgewichtssystem aus, um das am stärksten gebundene bzw. am besten stabilisierte Kombinationsprodukt nachweisen zu können. Inzwischen existieren zahlreiche Berichte über den erfolgreichen Einsatz von Zielproteinen als Templat für DCC-Versuchsansätze.<sup>[29]</sup> Trotz der Vielzahl der Veröffentlichungen zu DCC erlangte die Methode keine praktische Bedeutung. Da das Templat hier nur zur Bindung und Stabilisation der bereits verknüpften Fragmente verwendet wird, muss es nahezu äquimolar zu den Fragmenten bzw. den Fragment-Kombinationsprodukten eingesetzt werden, was sehr kostenintensiv ist.<sup>[28]</sup> Weiterhin fehlen Möglichkeiten zur direkten Bewertung der Bioaktivität der gebildeten Produkte und das Entstehen labiler Produkte macht Folgereaktionen notwendig (z. B. Reduktion mit  $\text{NaCNBH}_3$ ), um stabile nachweisbare Reaktionsprodukte zu erhalten. All dies macht die Methode unpraktikabel.

Doch die jeweilige Zielstruktur kann nicht nur als Templat zum Nachweis des besten Binders einer kombinatorischen Fragment-Bibliothek genutzt werden. Das Zielprotein bzw. Templat kann ebenfalls dazu eingesetzt werden, die Reaktion bzw. Ligation der beiden Fragmente aktiv in Form einer Proteintarget-geleiteten Synthese (*kinetic target-guided synthesis*) zu induzieren (s. Abb. 1.3).<sup>[3]</sup>

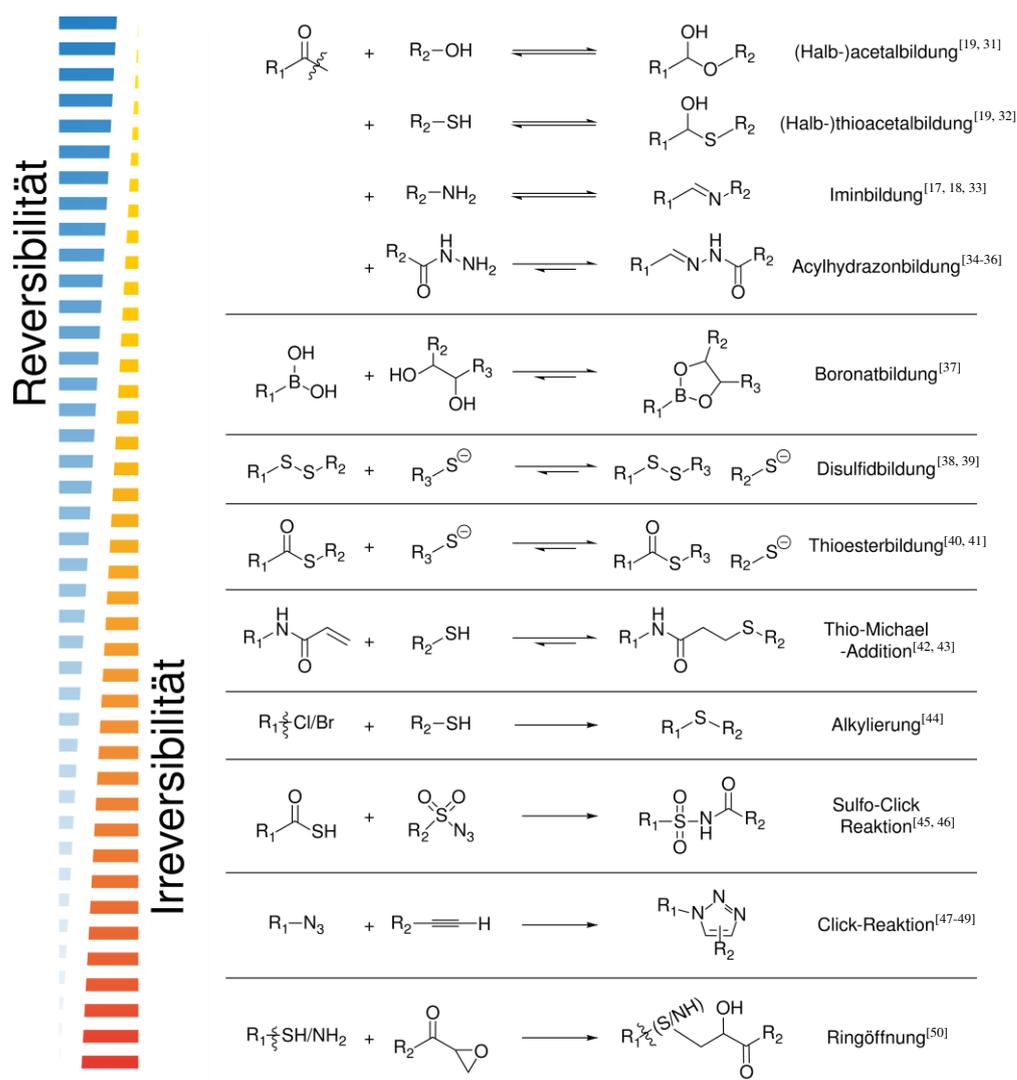


**Abbildung 1.3.** Schema einer Templat-unterstützten Fragment-Ligation. Nach Bindung der beiden Fragmente an das Templat und nachfolgender Ligation der Fragmente dissoziiert das Fragment-Kombinationsprodukt wieder (reversible Ligation) oder bleibt als stabiles Produkt erhalten (irreversible Ligation).

Notwendige Bedingung für diesen Templat-Effekt ist die vorherige Bindung der beiden Fragmente in benachbarte Bindungstaschen. Das Templat führt so zu einer erhöhten „effektiven Molarität“ der Fragmente, da deren komplementäre reaktive Gruppen in räumliche Nähe zueinander dirigiert werden.

Im Lauf der Zeit wurde die Templat-unterstützte Fragment-Ligation immer populärer. Gleichzeitig wurde auch stetig von neuen Reaktionen berichtet,<sup>[30]</sup> die Templat-unterstützt durchgeführt werden konnten und so das Spektrum einsetzbarer Reaktionstypen immer mehr vergrößerten (s. Tabelle 1.1). Doch nicht nur reversible (also im Gleichgewicht stehende) Reaktionen konnten erfolgreich Templat-unterstützt eingesetzt werden, inzwischen existieren auch zahlreiche Beispiele von irreversiblen Reaktionen.<sup>[30]</sup>

**Tabelle 1.1.** Beispiele Templat-unterstützter Fragment-Ligationsreaktionen<sup>[30]</sup>



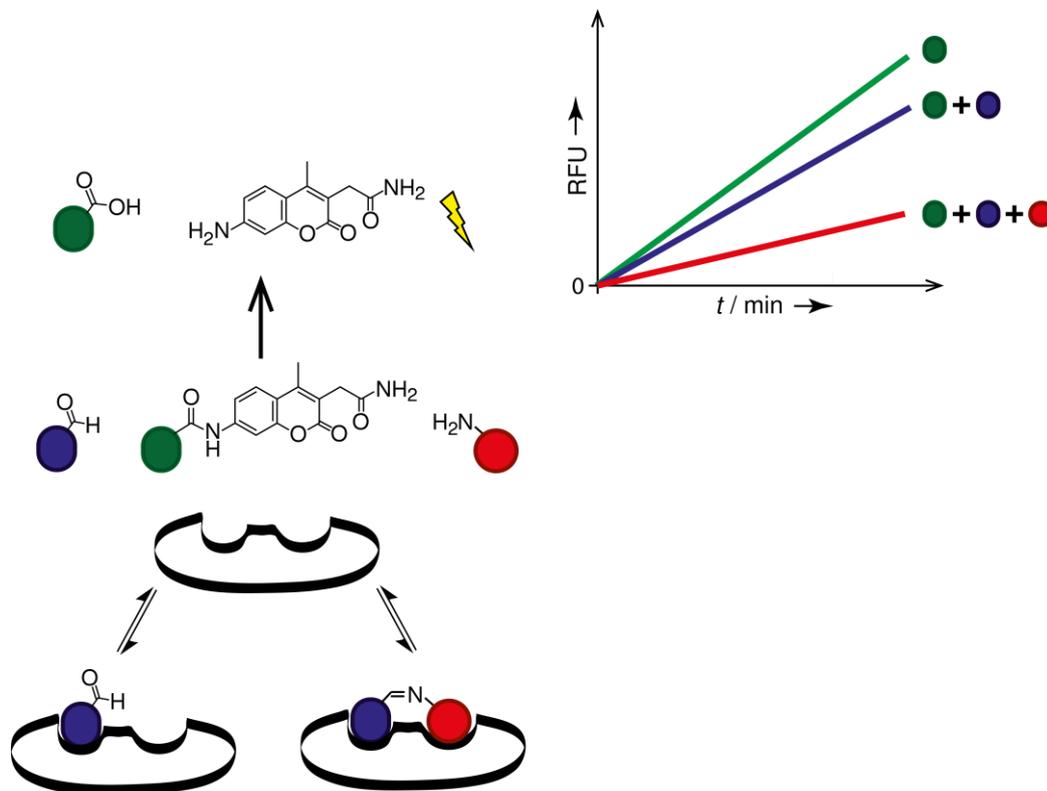
Die größte Relevanz besitzt hier die von Sharpless *et al.* veröffentlichte Protein-templierte Version der Click-Reaktion, bei der Azide und Alkine zu 1,2,3-Triazolen umgesetzt werden.<sup>[51]</sup>

### 1.3. Dynamisches Ligationsscreening – DLS

Das dynamische Ligationsscreening (*dynamic ligation screening*) ermöglichte es erstmals die dynamische, Templat-unterstützte Synthese von Fragment-Kombinationsprodukten sowie deren direkte Testung auf eine mögliche Hemmung der Zielstruktur innerhalb eines Assays zu kombinieren.<sup>[17]</sup> Auch diese Methode nutzte in ihren Anfängen Fragmentgruppen mit Aldehyd- und Amin-Funktionen mit den entsprechenden Iminen als mögliche Ligationsprodukte (s. Abb. 1.4). In späteren Arbeiten konnten jedoch auch andere nukleophile Fragmente, wie bspw. Alkohole und Thiole eingesetzt werden.<sup>[19]</sup>

Ein gefundenes, erstes Primärfragment wird bei dieser Methode als dirigierende chemische Sonde eingesetzt, welche es ermöglicht, Fragmente mit komplementärer reaktiver Gruppe direkt auf „Passen“ auf benachbarte, im Enzym vorhandene Bindungstaschen zu überprüfen. Die erhaltenen reversibel-verbundenen Fragment-Kombinationsprodukte werden anschließend direkt, ohne vorherige Stabilisierung des Produkts, mittels Kompetitionsassay auf das mögliche Ausmaß der Verdrängung eines fluorogenen Reportersubstrats vom aktiven Zentrum des Zielproteins hin getestet. Somit kann eine sofortige Aussage über die Aktivität des jeweiligen Zielenzym und damit über die hemmenden Eigenschaften des gebildeten Ligationsprodukts getroffen werden. Durch Ausnutzen der immer weiter voranschreitenden Enzymreaktion findet eine stetige Verstärkung des Messsignals durch zunehmende Freisetzung des Fluorophors statt, bei gleichzeitigem Einsatz von nur geringen Proteinmengen. Die Detektion der Bindung des Imin-Ligationsprodukts erfährt dabei aufgrund der Affinitätssteigerung des Kombinationsprodukts eine deutliche Erhöhung der Sensitivität im Vergleich zum Bindungsnachweis der Einzelfragmente. Aussichtsreiche Kandidaten werden im Anschluss mittels weiterer chemischer Schritte (z. B. reduktive Aminierung mit  $\text{NaCNBH}_3$ ) in den irreversibel-verbundenen Inhibitor umgewandelt und weiteren Tests unterzogen. Durch DLS kann so ein orts aufgelöstes Screening in einfachen Mikrotiterplatten im Hochdurchsatzformat durchgeführt

werden. Eine später verwendete modifizierte Version dieses Assayformats nutzte Enzymsubstrate, die selbst eine reaktive Gruppe tragen und somit mit potentiell bindenden Fragmenten reagieren können.<sup>[19, 20]</sup> Die Ligation von Substrat mit einem passenden Fragment führt dann zu einer Erhöhung der Substrataffinität zum Zielprotein, was mit einem erhöhten Substratumsatz einhergeht. Dieses Format wird Substrat-Verstärkungsassay genannt.<sup>[20]</sup> Andere Modifikationen des DLS erlaubten dann die Verwendung von FRET-Substraten<sup>[18]</sup> sowie die Ausweitung auf das große Feld der Proteinbindungsassays.<sup>[52]</sup> Durch Einsatz von Fluoreszenzpolarisationssonden war es hier erstmals möglich auch Fragment-Kombinationen an nichtenzymatischen Bindungsstellen zu identifizieren.<sup>[52]</sup>



**Abbildung 1.4.** Schematische Darstellung des dynamischen Ligationsscreenings. Aldehyd- und Amin-Fragment reagieren in einer Gleichgewichtsreaktion zum Imin-Ligationsprodukt. Die Bindung der Fragmente in benachbarte Bindungstaschen des Zielproteins führt durch dessen Templat-Effekt zur Verschiebung der Gleichgewichtslage in Richtung des Imin-Ligationsprodukts (Templat-unterstützte Fragment-Ligation). Da sowohl die Fragmente als auch das Fragment-Ligationsprodukt mit dem Fluoreszenzsubstrat um das Enzym konkurrieren, kann die Bildung eines Fragment-Ligationsprodukts durch eine deutliche Reduktion des Substratumsatzes detektiert werden, welche im Idealfall zur superadditiven Inhibition im Vergleich zu den Einzelfragmenten führt.<sup>[17]</sup>

## 1.4. Enzyminhibitoren als Arzneistoffe

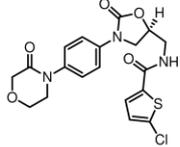
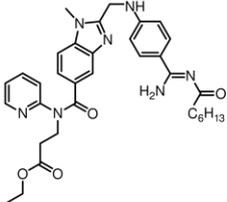
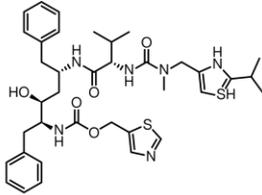
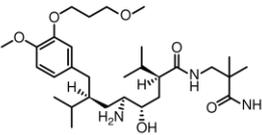
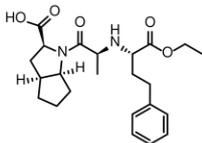
Enzyme sind ubiquitär in lebenden Organismen und sind dort in nahezu alle Stoffwechselfvorgänge eingebunden. Als biologische Katalysatoren sind sie dazu in der Lage, die Einstellung chemischer Reaktionsgleichgewichte enorm zu beschleunigen, indem sie zu einer Senkung der Aktivierungsenergie der jeweiligen Reaktionen führen. Das Molekül, das im Zuge einer solchen katalysierten Reaktion im aktiven Zentrum des Enzyms umgesetzt wird, bezeichnet man als Substrat. Sowohl die Katalyse als auch die spezifische Erkennung des Substrats ist durch die einzigartige dreidimensionale Struktur des Enzyms bedingt. Nur wenn das Substrat an die jeweilige Bindungsstelle „passt“ und sich in der richtigen Position im aktiven Zentrum befindet, ist eine Reaktion möglich. Die Erkennung erfolgt dabei über spezifische Wechselwirkungen vermittelt durch Wasserstoffbrücken, ionische Wechselwirkungen, Metallkomplexierung, hydrophobe Wechselwirkungen sowie Kation- $\pi$ -Elektronen-Wechselwirkungen.<sup>[53]</sup> Je stärker und je zahlreicher diese Interaktionen sind, desto höher ist die Affinität des jeweiligen Substrats. Moleküle, die ebenfalls dazu in der Lage sind, in Wechselwirkung mit dem Enzym zu treten und dadurch die Bindung und Umsetzung eines physiologischen Substrats verhindern, nennt man Enzymhemmstoffe oder auch Inhibitoren.

Solche Enzyminhibitoren stellen eine wichtige Arzneistoffklasse dar,<sup>[54]</sup> da der Mensch zwar über effiziente Regulationsmechanismen der zahlreichen körpereigenen Enzyme verfügt, es jedoch auch immer wieder zu Fehlregulationen im Körper kommen kann. Dies kann wiederum zu Überexpression oder Überaktivität bestimmter Enzyme führen, was bei der Entstehung zahlreicher Krankheitsbilder eine Rolle spielt. Doch nicht nur der Mensch ist auf eine normale Funktion von Enzymen angewiesen, auch für Mikroorganismen ist sie essenziell und eine Hemmung kann zu deren Schädigung führen. Somit stellt die Abwehr und Bekämpfung von Infektionen ein weiteres großes Einsatzgebiet für Enzyminhibitoren dar, wobei hier immer auch die Selektivität gegenüber den menschlichen Enzymen von Bedeutung ist.

## 1.5. Proteasen als Zielstruktur

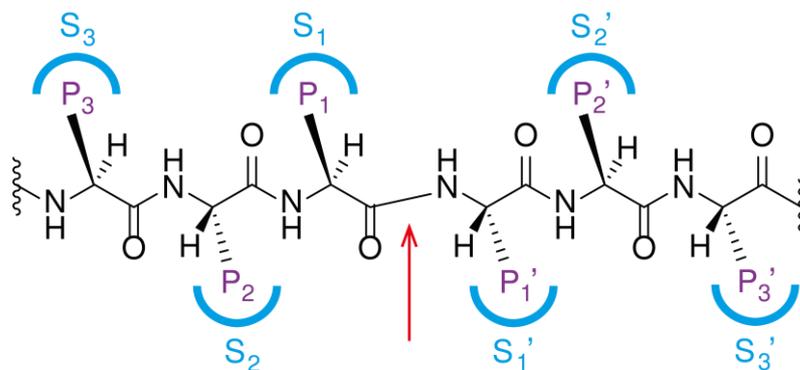
Die Klassifizierung verschiedener Enzyme erfolgt über das jeweilige Substrat, welches umgesetzt wird: Im Fall von Peptidbindungen (Amidbindung zwischen zwei Aminosäuren) spricht man hier von Peptidasen. Werden größere Proteine gespalten spricht man auch von Proteasen.<sup>[55]</sup> Proteasen sind wichtige Zielstrukturen von Arzneistoffen,<sup>[56]</sup> was sich anhand zahlreicher Beispiele belegen lässt (s. Tabelle 1.2). Inhibitoren von Proteasen stellen oft Peptidmimetika dar oder besitzen Übergangszustands-ähnliche Strukturen.<sup>[57]</sup> Neben reversiblen Hemmmechanismen existieren auch zahlreiche irreversible Bindungsmechanismen, welche die für die Katalyse wichtigen Seitenketten im katalytischen Zentrum zum Ziel haben.<sup>[58, 59]</sup>

**Tabelle 1.2.** Beispiele von Proteasen als Arzneistoff-Zielstruktur

Protease-Zielstruktur	Art der Protease	Indikation	Inhibitor	Struktur
Faktor Xa	Serin	Thrombo-embolische Erkrankungen	Rixaroxaban <sup>[60]</sup>	
Thrombin	Serin	Thrombo-embolische Erkrankungen	Dabigatran-etexilat <sup>[61]</sup>	
HIV-Protease	Aspartat	HIV-Infektion	Ritonavir <sup>[62]</sup>	
Renin	Aspartat	Arterielle Hypertonie	Aliskiren <sup>[63]</sup>	
ACE	Metallo	Arterielle Hypertonie	Ramipril <sup>[64]</sup>	

Für die Spaltung von Peptiden/Proteinen müssen Peptidbindungen aufgebrochen werden, welche die einzelnen Aminosäuren miteinander verknüpfen. Zur Erkennung der Substrate besitzen Proteasen dabei in der Regel ausgedehnte Bindungsstellen mit definierten Bindungstaschen für jede einzelne Aminosäure der Erkennungssequenz des Substrats. Diese stark ausgeprägten Bindungsstellen lassen sich jedoch ebenfalls durch andere Proteinliganden (proteinbindende Moleküle) nutzen und so eignen sich Proteasen von Natur aus auch ideal für Fragment-Ligationsmethoden.<sup>[25, 65]</sup>

Um die Spezifität einer Protease bzw. ihrer Spaltsequenz zu beschreiben, führten Schechter und Berger im Jahr 1967 das nach ihnen benannte Nomenklatur-Modell<sup>[66]</sup> ein (s. Abb. 1.5). In diesem Modell wird die Spaltstelle mit Sitz des katalytischen Zentrums flankiert von den zur Erkennung und Unterbringung der einzelnen Aminosäureseitenketten verantwortlichen Bindungsstellen bzw. -taschen. Per Definition werden die Aminosäureseitenketten mit P bezeichnet und deren komplementäre Bindetaschen mit S. Links der Spaltstelle (zum N-Terminus des Substrats hin) wird beginnend mit der ersten Position neben der Spaltstelle aufwärts S1, S2, S3 etc. gezählt, rechts (zum C-Terminus des Substrats hin) mit S1', S2', S3' etc.

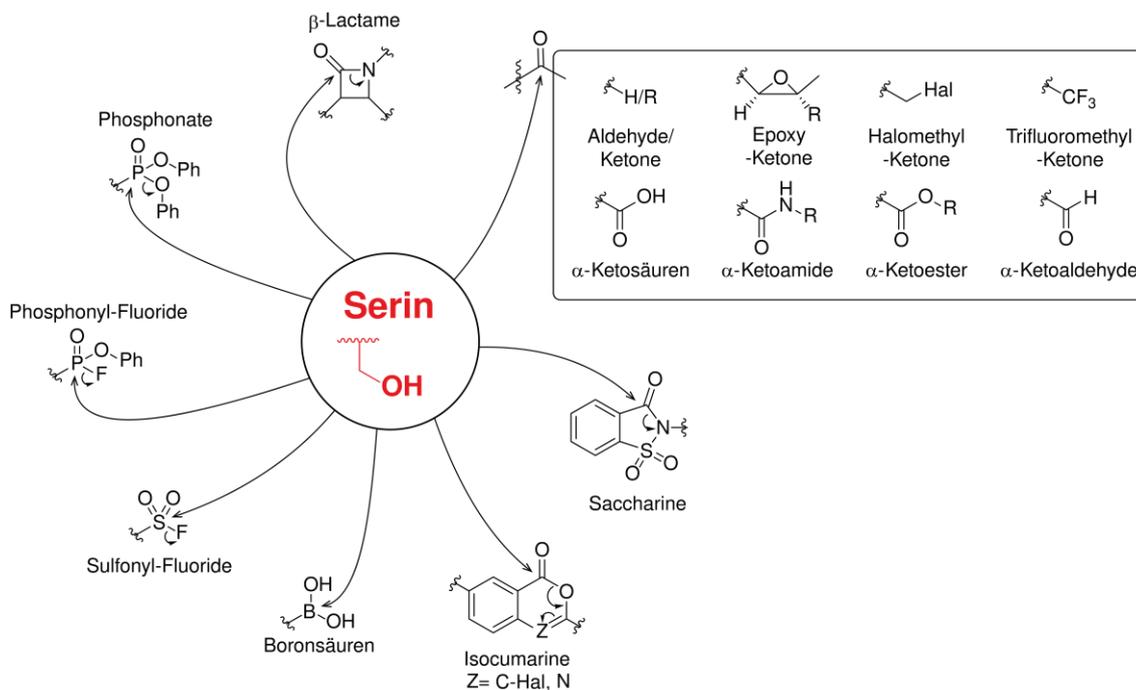


**Abbildung 1.5.** Schematische Darstellung der Schechter-Berger Nomenklatur. Die Schnittstelle ist durch einen roten Pfeil dargestellt.

Verschiedene Proteasen besitzen hier unterschiedliche Voraussetzungen, die erfüllt sein müssen, damit eine Spaltung erfolgt. Unterschiede bestehen hier sowohl hinsichtlich dem Ausmaße, in dem diese Bindungstaschen besetzt sein müssen als auch hinsichtlich der Seitenketten die darin akzeptiert werden.

## 1.6. Serin-Proteasen

Auf Grundlage des katalytischen Mechanismus, der zur Spaltung der Amidbindung führt, lassen sich Proteasen in verschiedene Gruppen einteilen. Der Großteil der Proteasen lässt sich dabei den vier großen Gruppen der Serin-, Cystein-, Aspartat- und Metallo-Proteasen zuordnen. Namensgebend ist hier jeweils die für das Ablaufen der Reaktion maßgebliche funktionelle Gruppe. Serin-Proteasen lassen sich gemäß ihrer Substratspezifität weiter in die drei großen Kategorien der Trypsin-ähnlichen (Spaltung nach basischer Aminosäure), Chymotrypsin-ähnlichen (Spaltung nach Aminosäuren mit voluminösen hydrophoben Resten) und Elastase-ähnlichen (Spaltung nach Aminosäuren mit kleinen aliphatischen Resten) Proteasen unterteilen. Das katalytische Zentrum der Serin-Proteasen beinhaltet die katalytische Triade, welche neben einer Serin-Seitenkette, noch aus einer Histidin-Seitenkette und einer Aspartat- oder Glutamat-Seitenkette besteht (s. Abb. 1.7). Aufgrund dieser, in allen Serin-Proteasen gleichermaßen vorhandenen strukturellen Gegebenheiten, existiert eine Reihe funktioneller Gruppen, die inhibitorische Wirkung auf fast das gesamte Spektrum der verschiedenen Serin-Proteasen besitzen. Meist sind dies Elektrophile, die das katalytische Serin binden (s. Abb. 1.6).<sup>[67, 68]</sup>



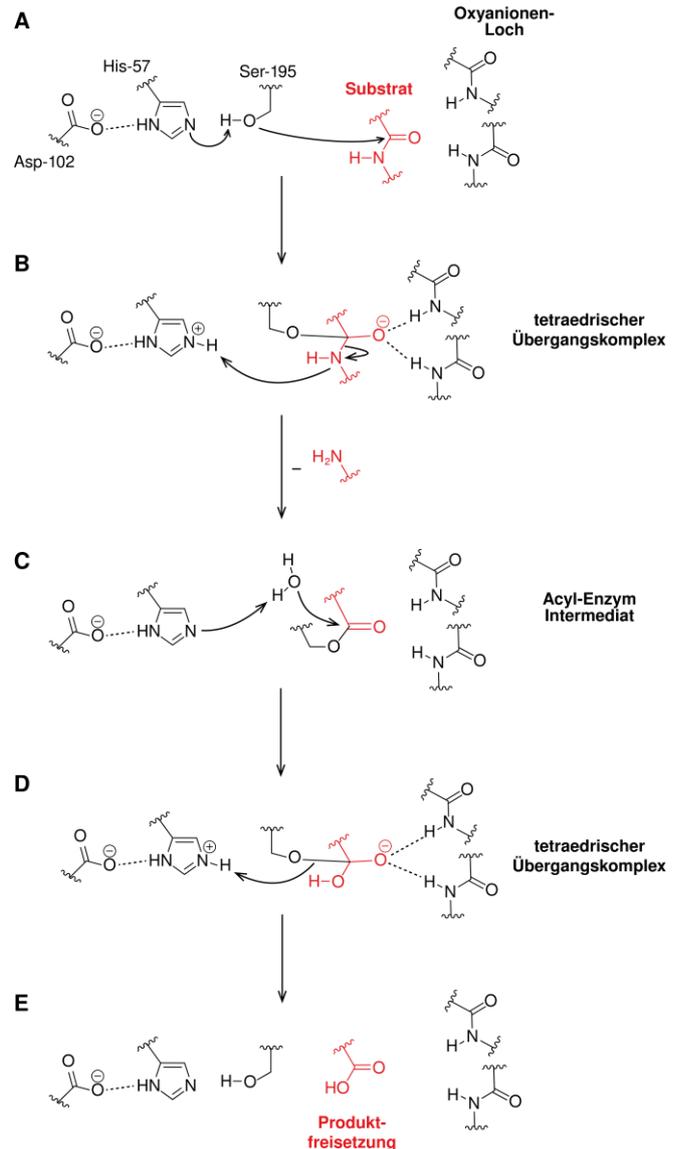
**Abbildung 1.6.** Schematische Darstellung einiger universeller Serin-Protease Inhibitoren.

**Abbildung 1.7. Schematische Darstellung des Katalysemechanismus von Serin-Proteasen.<sup>[69]</sup>**

Die Nummerierung der Aminosäuren entspricht der Primärstruktur des Rinderchymotrypsinogens, welche u. a. auch für Trypsin und Faktor Xa gilt.

(A) Im aktiven Zentrum erfolgt ein nukleophiler Angriff von Serin an der Spaltstelle des Substrats. Histidin und Asparaginsäure sorgen als weitere Bestandteile der katalytischen Triade für eine korrekte Positionierung des Serins, sowie durch die basischen Eigenschaften von Histidin für eine Polarisierung mit anschließendem Protonenabzug am Serin. Hierdurch wird dessen Nucleophilie erhöht und der Angriff am Substrat erleichtert. Die resultierende Ladung am Histidin wird durch die Asparaginsäure stabilisiert. (B) Es entsteht ein kurzlebiger tetraedrischer Übergangskomplex mit negativer Ladung am Sauerstoffatom. Die Ladung wird über Wasserstoffbrücken im Oxyanionen-Loch stabilisiert. Der Komplex

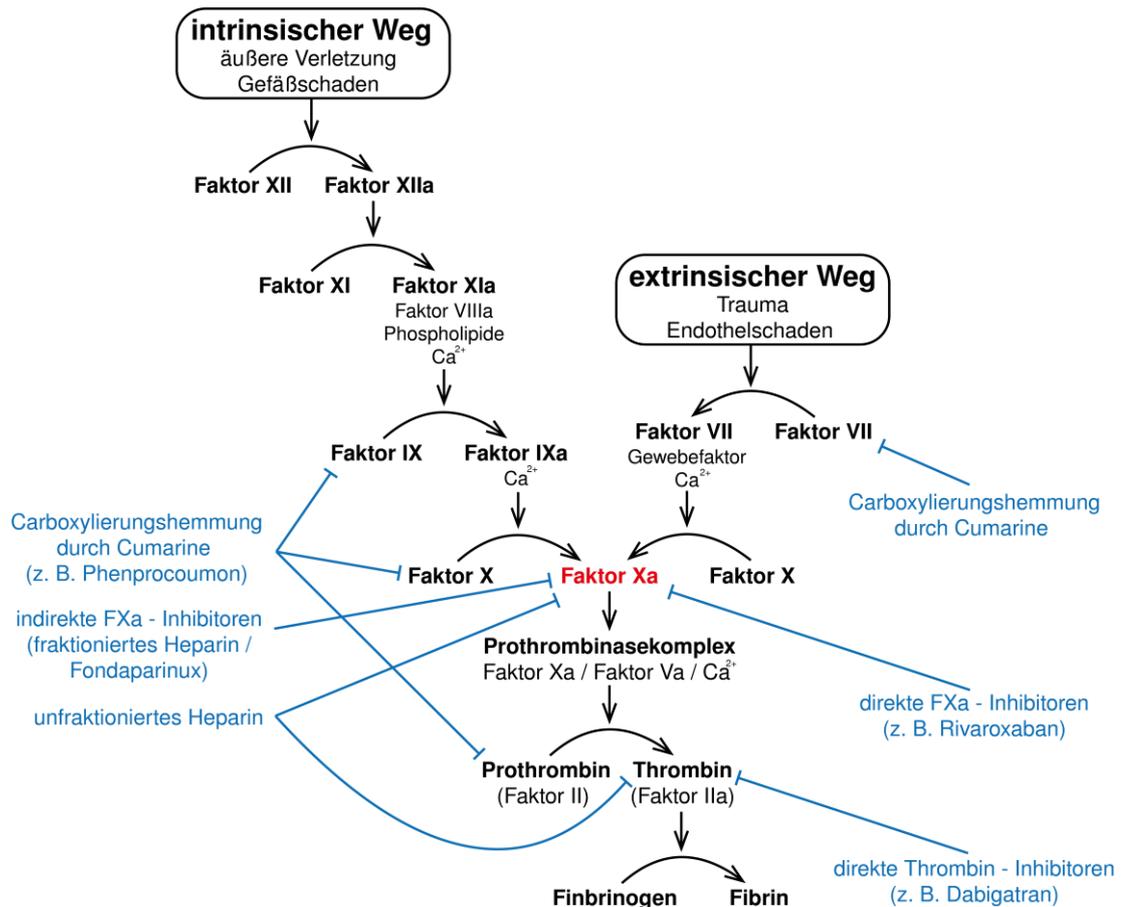
zerfällt unter Eliminierung der Amin-Komponente des Substrats. Dieser Zerfall wird durch Übertragung des Protons vom Histidin auf die Amin-Funktion des Spaltprodukts erleichtert. (C) Ein Acyl-Enzym Intermediat entsteht. Dieses Ester-Zwischenprodukt wird im Anschluss durch Wasser angegriffen. Dabei erfolgt abermals eine Polarisierung mit anschließender Deprotonierung durch Histidin-57, was den nukleophilen Angriff des Wassers erleichtert. (D) Ein zweiter tetraedrischer Übergangskomplex wird gebildet. (E) Der Zerfall dieses zweiten Komplexes führt zur Freisetzung des Carbonsäure-Produkts mit gleichzeitiger Regenerierung der katalytischen Triade.



## 1.7. Faktor Xa

Ein bekannter Vertreter der Serinproteasen ist Faktor Xa, welcher auch Stuart-Prower-Faktor (aktiviert) oder Prothrombinase genannt wird. Aufgrund seiner Aminosäuresequenz-Homologie lässt sich Faktor Xa der Chymotrypsin-Familie zuordnen.<sup>[70, 71]</sup> Faktor Xa ist ein Gerinnungsfaktor und nimmt in der Blutgerinnungskaskade des Menschen eine zentrale Rolle ein (s. Abb. 1.8). Im Körper wird zunächst die inaktive Vorstufe (auch: Zymogen) Faktor X gebildet, welche dann bei Bedarf durch Proteolyse aktiviert wird. Diese Proteolyse kann auf zwei unterschiedlichen Wegen erfolgen, dem intrinsischen und dem extrinsischen Weg. Die Spaltung führt dabei zu einer Konformationsänderung des Faktor X, welche das aktive Zentrum für das Substrat „empfindlich“ macht und damit das Enzym in seine aktive Form (Faktor Xa) überführt. Die Aktivierung durch Proteolyse ist auch bei anderen Gerinnungsfaktoren wie bspw. Faktor II, IX und XI bekannt, welche ebenfalls Serin-Proteasen darstellen. Im Anschluss an die Aktivierung folgt eine über Calcium-Ionen vermittelte Bindung von Faktor Xa an Phospholipidmembranen sowie die Rekrutierung von Faktor Va als Kofaktor. Dieser auch als Prothrombinase-Komplex bezeichnete Komplex ist nun dazu in der Lage, Prothrombin zu spalten, was mit dessen Aktivierung zu aktivem Thrombin einhergeht.<sup>[72]</sup> Weitere Schritte führen über Thrombus-Bildung, Fibrinpolymerisation und Quervernetzung der Fibrinstränge zu einem Stoppen der Blutung.

Was bei der Verletzung von Blutgefäßen gewollt ist, kann verbunden mit bestimmten Vorerkrankungen zu schwerwiegenden thromboembolischen Ereignissen führen. So sind gerinnungshemmende Medikamente (Antikoagulantien) u. a. zur Thromboseprophylaxe nach Operationen, Schlaganfällen und Herzinfarkten sowie bei koronarer Herzkrankheit, Lungenembolien, tiefen Venenthrombosen und Vorhofflimmern angezeigt. Da bei den bisherigen Therapieoptionen aufgrund fehlender oraler Bioverfügbarkeit<sup>[73]</sup> (Heparine) sowie geringer therapeutischer Breite<sup>[74, 75]</sup> (Vitamin-K-Antagonisten vom Cumarintyp) noch dringend nach Alternativen gesucht wurde, war die Entwicklung von direkten oralen Antikoagulantien in Form von Thrombin- und Faktor Xa-Hemmstoffen ein großer Fortschritt.<sup>[69, 76]</sup>

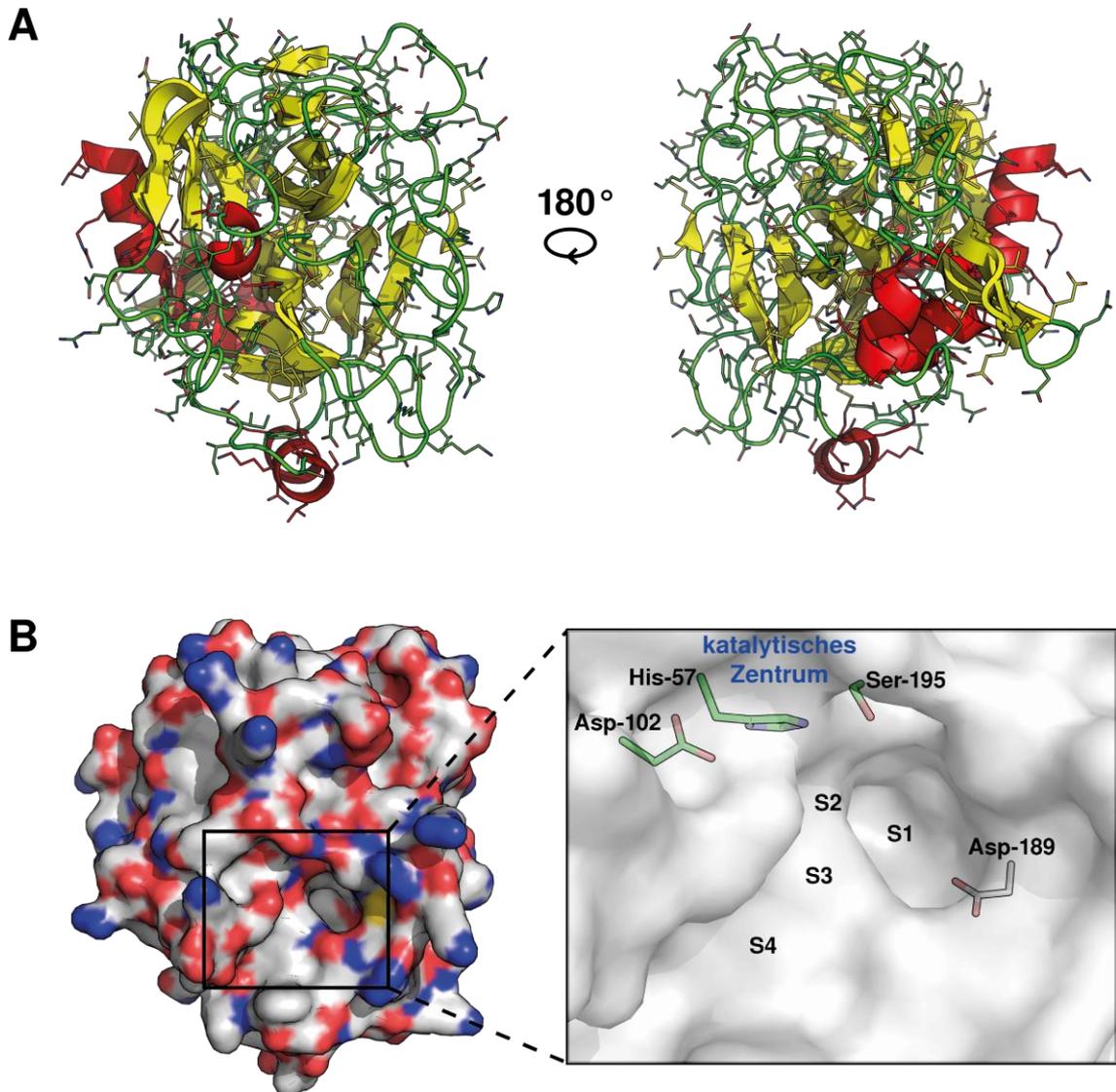


**Abbildung 1.8. Schematische Darstellung der Blutgerinnungskaskade und deren Hemmung durch Arzneistoffe.**<sup>[69]</sup> Bei der Auslösung der Kaskade wird zwischen dem intrinsischen und dem extrinsischen Weg unterschieden. Beide Wege führen zur Aktivierung von Faktor Xa. Dieser Kaskadenmechanismus startet mit wenigen aktivierten Faktoren und führt dann zu einer lawinenartigen Aktivierung von einer massiven Anzahl nachfolgender Faktoren. Gleichzeitig wirken die Gerinnungsfaktoren über Rückkopplungsmechanismen auf höhere Ebenen der Kaskadenhierarchie zurück, sodass eine sehr schnelle Reaktion auf den Auslöser möglich ist. Bei thromboembolischen Erkrankungen sowie zu deren Prophylaxe, ist die (überschießende) Blutgerinnung jedoch unerwünscht, weswegen im Laufe der Zeit zahlreiche Arzneimittel mit unterschiedlichen Angriffspunkten entwickelt wurden.

**Mechanismus Cumarine:** Bei der Synthese in der Leber werden die Gerinnungsfaktoren II, VII, IX, X am  $\gamma$ -C-Atom bestimmter Glutamatreste carboxyliert. Diese Carboxylierung ist nötig, um über Calcium-Ionen an die Phospholipidmembranen der Thrombozyten zu binden. Für die Carboxylierung ist Vitamin K notwendig, dessen Stoffwechsel durch Cumarine (Vitamin-K-Antagonisten) gehemmt wird.

**Mechanismus Heparine:** Heparine komplexieren Antithrombine. Allen voran führt der Komplex mit Antithrombin III dabei zu einer enormen Beschleunigung der Inaktivierung von aktivierten Gerinnungsfaktoren.

Da Faktor Xa (s. Abb. 1.9) eine hohe Spezifität für basische Aminosäuren, insbesondere für Arginin, in der S1-Bindetasche besitzt,<sup>[71]</sup> enthielt die erste Generation von Inhibitoren nahezu ausnahmslos sog. Arginin-Mimetika in Form von bis-Amidinen oder anderen basischen Gruppen.<sup>[77, 78]</sup> Arginin und dementsprechend auch dessen Mimetika führen über die Ausbildung einer ionischen Wechselwirkung mit der Aspartyl-Seitenkette von Asp-189 zu einer besonders starken und wichtigen Interaktion.<sup>[79]</sup> Der Einsatz solcher basischen Gruppen führt unter physiologischen Bedingungen jedoch zu einer positiven Ladung des Inhibitors, weswegen die erste Inhibitor-Generation nahezu nicht oral bioverfügbar war.<sup>[80, 81]</sup> In den folgenden Jahren konzentrierte sich die Forschung daher darauf die Amidin-Funktion durch weniger polare und vor allem weniger basische Gruppen zu ersetzen.<sup>[82, 83]</sup> Ein großer Paradigmenwechsel fand statt, als entdeckt wurde, dass mit nur geringen Affinitätseinbußen in S1 auch ein Arylhalogen toleriert wird, was durch eine starke hydrophobe *Edge-to-Face*-Hal- $\pi$ -Wechselwirkung mit dem Arylrest von Tyr-228 ermöglicht wird.<sup>[84, 85]</sup> Damit waren nachfolgende Inhibitoren nicht mehr auf die Interaktion mit Asp-189 angewiesen, womit auch auf basische Gruppen verzichtet werden konnte. Folgearbeiten führten dann schließlich zur Entwicklung und Zulassung von Rivaroxaban im Jahr 2008.<sup>[60]</sup> Später folgten die Zulassung von Apixaban<sup>[86]</sup> (2011) und Edoxaban<sup>[87]</sup> (2015).



**Abbildung 1.9.** (A) Cartoon-Darstellung von Faktor Xa (Helices = rot; Faltblätter = gelb; Loop-Regionen = grün). (B) Darstellung der Faktor Xa-Oberfläche (links; grau = Kohlenstoff; rot = Sauerstoff; blau = Stickstoff; gelb = Schwefel) sowie einer Vergrößerung des katalytischen Zentrums mit benachbarten Binderegionen (rechts). Die S1-Tasche stellt die für die Spezifität entscheidende Bindetasche dar. Aufgrund der Asparaginsäure-189 am Boden der Tasche werden bevorzugt basische Aminosäuren wie bspw. Arginin gebunden, mit denen eine starke ionische Wechselwirkung möglich ist. S2 ist nur gering ausgeprägt, weswegen hier bevorzugt kleine Aminosäuren wie Glycin gebunden werden. Die S3 „Tasche“ bietet keine nennenswerte Vertiefung mit der Wechselwirkungen möglich sind. S4 wird von Tyr-99, Trp-215 und Phe-174 gebildet (nicht eingezeichnet) und erzeugt aufgrund der hydrophoben aromatischen Reste die sog. *aromatic box*. In diesem Bereich befinden sich ebenfalls die Carbonylgruppen der Aminosäuren Lys-96, Glu-97 und Thr-98 (nicht eingezeichnet), welche eine elektronegative Kavität bilden, das sog. Kationenloch. Daher werden in S4 sowohl hydrophobe als auch basische Reste akzeptiert.<sup>[79]</sup> (PDB: 5k0H)

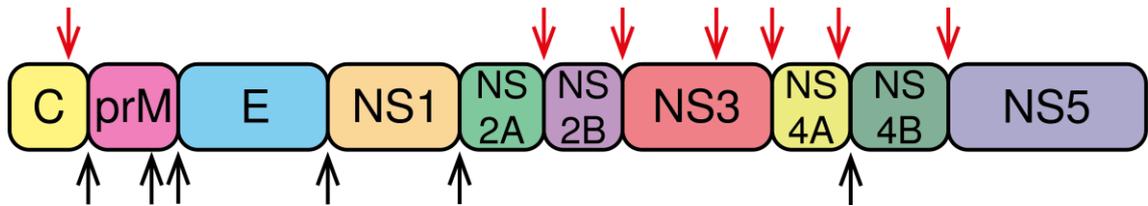
## 1.8. West-Nil-Virus NS2B-NS3-Protease

Das West-Nil-Virus ist ein pathogenes Virus der Gattung Flavivirus (Familie: Flaviridae).<sup>[88]</sup> Zu dieser Gattung gehören ebenfalls das Zika-Virus (ZIKV), das Dengue Virus (DENV), das Gelbfieber-Virus (YFV), das Japanische Enzephalitis-Virus (JEV) sowie das FSME-Virus (TBE).<sup>[89]</sup> Die Übertragung des Virus erfolgt durch Mosquitos. Die erstmalige Identifizierung erfolgte 1937. Berichte über Ausbrüche in Asien, Europa und Afrika sind aus den 1950er bis 1980er Jahre bekannt.<sup>[90]</sup> In den Fokus der Öffentlichkeit rückte das durch den West-Nil-Virus übertragene West-Nil-Fieber erstmals in den 1990er Jahren, da Frequenz, Schweregrad und geographische Ausbreitung immer mehr zunahmen und erste Fälle dann schließlich auch in Nord- und Südamerika gemeldet wurden.<sup>[91]</sup>

Heute wird das West-Nil-Virus als einer der wichtigsten Verursacher von viraler Enzephalopathie überhaupt angesehen.<sup>[92]</sup> Bisher existieren hier jedoch weder ein geeigneter Impfstoff<sup>[93]</sup> noch eine gezielte antivirale Therapie.<sup>[94]</sup> Etwa 80 % der West-Nil-Fieber-Infektionen verlaufen milde und symptomlos. In den restlichen 20 % der Fälle äußert sich eine Infektion in Form einer fiebrigen Episode verbunden mit Kopf-, Gelenk-, und Muskelschmerzen sowie Müdigkeit, Verdauungsbeschwerden, Hautausschlägen und Lymphadenopathie.<sup>[95]</sup> Bei einem geringen Prozentsatz der Erkrankungen (in 1 von 150 Fällen) dringt das Virus jedoch auch in das zentrale Nervensystem ein, wo es zu Meningitis, Enzephalitis sowie akut auftretender, schlaffer Parese führen kann.<sup>[96]</sup> Besonders gefährdet sind hier ältere und immunsupprimierte Menschen.<sup>[97]</sup>

Das West-Nil-Virus-Genom enthält einen 11 kb großen, positivsträngigen RNA-Einzelstrang, welcher direkt nach der Infektion translatiert werden kann. Codiert werden von diesem Strang die drei Strukturproteine (Kapsid-, Hüll-, und Membran-Protein) sowie die sieben Funktions-Proteine (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B, und NS5).<sup>[90]</sup> Das Protein NS3 besitzt eine Helikase-Domäne und eine Protease-Domäne, welche über einen kurzen Linker miteinander verbunden sind. Die Protease-Domäne ist erst nach Bindung des Kofaktors NS2B enzymatisch aktiv.<sup>[98]</sup>

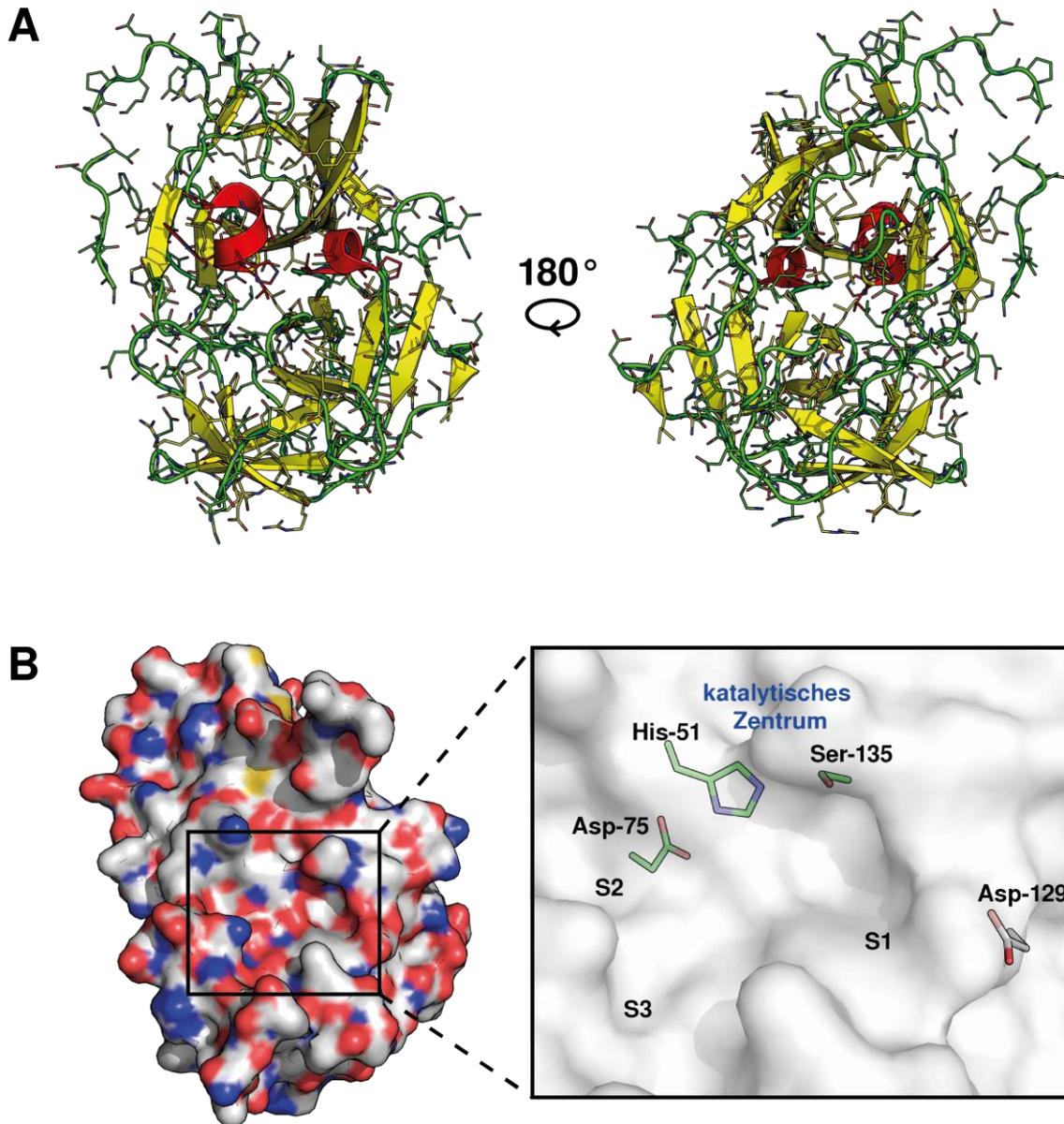
Als NS2B-NS3-Protease besitzt sie eine zentrale Rolle in der posttranslationalen Verarbeitung des Vorläufer-Polyproteins (s. Abb. 1.10). Hierbei führt sie zur Spaltung der NS2A/NS2B, NS2B/NS3, NS3/NS4A, NS4B/NS5 Verknüpfungen sowie der Kapsid-, NS3- und NS4A-Proteine.<sup>[99]</sup> Diese essentielle Rolle in der viralen Replikation macht die WNV NS2B-NS3-Protease zu einer geeigneten Arzneistoff-Zielstruktur.<sup>[100, 101]</sup>



**Abbildung 1.10.** Schematische Darstellung des Polyprotein-Vorläufers. Dieses wird durch die wirtseigenen Proteasen Furin und Signalase (Schnittstellen in schwarz) sowie der viralen Serinprotease NS2B-NS3 (Schnittstellen in rot) in die individuellen Proteine gespalten (C: Kapsidprotein; prM: prä-Membran- und Membran-Protein; E: Hüllprotein).<sup>[102]</sup>

Für enzymkinetische Messungen wird ein rekombinantes Fusionsprotein aus dem Kofaktor NS2B- und der NS3-Proteasedomäne verwendet.<sup>[98]</sup> Eine eingeführte Mutation in der NS2B-Domäne (K96A) verhindert dabei die autoproteolytische Zersetzung des Proteins.<sup>[102]</sup>

In Arbeiten von Aleshin *et al.* aus dem Jahre 2007 konnte nachgewiesen werden, dass die WNV Protease in zwei verschiedenen Konformationen existiert: offen und geschlossen.<sup>[102]</sup> Es konnte dabei anhand von Kristallstrukturen der Protease gezeigt werden, dass erst nach Substratbindung, im Zuge eines *induced fit*-Mechanismus, die produktive, geschlossene Konformation entsteht. NS2B nimmt hier eine wichtige Rolle ein, da erst durch dessen Bindung die NS3-Aminosäurereste der Aminosäuren 116-132 so koordiniert werden, dass die Ausbildung der S1-Bindetasche mit Asparaginsäure-129 am Boden der Tasche möglich wird (s. Abb. 1.11). Wie bei Faktor Xa führt dies zu einer Spezifität für basische Aminosäuren in S1, mit denen eine starke ionische Wechselwirkung möglich ist.<sup>[103]</sup>



**Abbildung 1.11.** (A) Cartoon-Darstellung der NS2B-NS3-Protease (Helices = rot; Faltblätter = gelb; Loop-Regionen = grün). (B) Darstellung der NS2B-NS3-Protease-Oberfläche (links; grau = Kohlenstoff; rot = Sauerstoff; blau = Stickstoff; gelb = Schwefel) sowie einer Vergrößerung des katalytischen Zentrums mit benachbarten Binderegionen (rechts). Die katalytische Triade der NS2B-NS3-Protease setzt sich aus Asp-75, His-51 und Ser-135 zusammen. Sowohl die S1- als auch S2-Bindetasche besitzt Spezifität für basische Aminosäuren. In S1' (nicht eingezeichnet) werden Glycin, Alanin, Serin und Threonin akzeptiert, wobei die Präferenz bei Glycin liegt. Dies trifft ebenfalls auf S2' zu. S3 und S4 sind weniger spezifisch und erlauben ein größeres Spektrum an Aminosäureresten.<sup>[104, 105]</sup> (PDB: 2YOL)

Trotz intensiver Bemühungen im Bereich der NS2B-NS3-Protease Inhibitor-Entwicklung zeigen die meisten synthetisierten Verbindungen bisher nur moderate Affinitäten zur Protease, welche meist im mikromolaren Bereich liegen.<sup>[105-107]</sup> Am vielversprechendsten sind hier bisher Ansätze, welche auf Substratmimetika basieren: So führte bspw. die Steinmetzer-Gruppe in einer Veröffentlichung aus dem Jahr 2013 ein P1 Screening mit decarboxylierten Arginin-Mimetika durch. Bei diesem Screening wurde *trans*-(4-Guanidino)cyclohexylmethanamid (GCMA) als bester S1-Binder identifiziert und mit ihm in P1-Position war die Entwicklung eines 0,13 mikromolar-affinen Inhibitors möglich.<sup>[108]</sup>



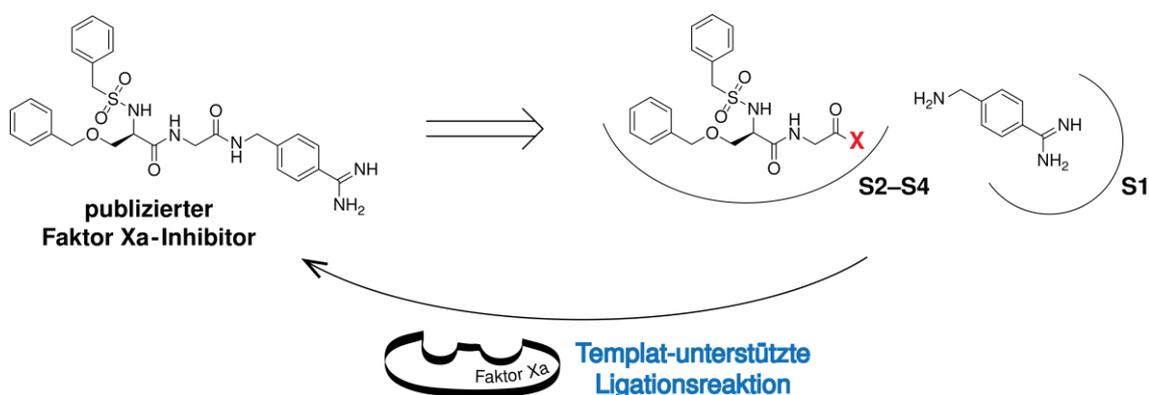
## 2. Zielstellung und Planung der Arbeit

Im Mittelpunkt der Arbeit soll die zentrale Frage der Fragment-basierten Wirkstoffsuche stehen, nämlich wie ein gefundenes Startfragment möglichst effizient erweitert werden kann. Wie unter 1.1. beschrieben, birgt die Fragment-Ligation das Potential ein Kombinationsprodukt hervorzubringen, welches eine superadditive Bindungsenergie im Vergleich zu den Einzelfragmenten aufweist und so theoretisch zu einem enormen Affinitätszuwachs führen kann. Die Fragment-Ligation soll daher im Fokus dieser Arbeit stehen. Aufgrund ihrer essentiellen Bedeutung in der Natur und der hohen Verbreitung in bisher entdeckten bioaktiven Liganden<sup>[109]</sup> soll dabei die Amidbindung als irreversible Fragment-Verknüpfungsart zum Einsatz kommen. Ausgehend von einem S1-bindenden Arginin-Mimetikum als Startfragment sollen zwei Varianten der Amidierung als Fragment-Ligationsmethode untersucht und entwickelt werden: eine methodische, Templat-unterstützte Amidierung im Stil einer Proteintarget-geleiteten Synthese und eine technologisch-orientierte, zum Hochdurchsatz-geeignete Form des *in-situ* Screenings. Dies teilt die Arbeit in zwei Teilprojekte ein:

Wie in Tabelle 1.1 gezeigt, existieren inzwischen einige Beispiele in denen Fragmente irreversibel durch Proteintarget-geleitete Synthesen miteinander verknüpft wurden. Das Templat induziert dabei aktiv die Ligation der Fragmente, indem es die komplementären reaktiven Gruppen der beiden gebundenen Fragmente in räumliche Nähe zueinander dirigiert. Bisher fehlt im Repertoire der Templat-unterstützten Fragment-Ligationsreaktionen jedoch die enorm wichtige Amidierungsreaktion, welche eine deutliche Bereicherung in diesem Feld bedeuten würde. Daher sollen im ersten Teil Reaktionsbedingungen gefunden werden, die es ermöglichen eine Amidierung Templat-unterstützt durchzuführen. Vergleichbar, wie bei der bereits in der Arbeitsgruppe etablierten Methode des dynamischen Ligationsscreenings, soll dabei ein Ligationssassay entwickelt werden, der die Templat-unterstützte Synthese der Fragment-Kombinationsprodukte und deren direkter Nachweis innerhalb eines Assays vereint. Wie beim DLS soll dabei zum Produktnachweis ein Kompetitionsassay mit Fluoreszenzsubstrat zum Einsatz kommen,

der eine sofortige Aussage über die Bioaktivität des gebildeten Produkts zulässt. Die potentiell zu erwartende deutliche Aktivitätssteigerung des Fragment-Ligationsprodukts ermöglicht dabei einen hochsensitiven Nachweis der Produktbildung. Da im Vergleich zum dynamischen Ligationscreening bei der Templat-unterstützten Amidierung eine irreversible Ligation der Fragmente erfolgt, kann der finale Nachweis der inhibierenden Spezies, ohne vorherige Stabilisierung des Ligationsprodukts, ebenfalls mittels LC/MS-Analytik erfolgen.

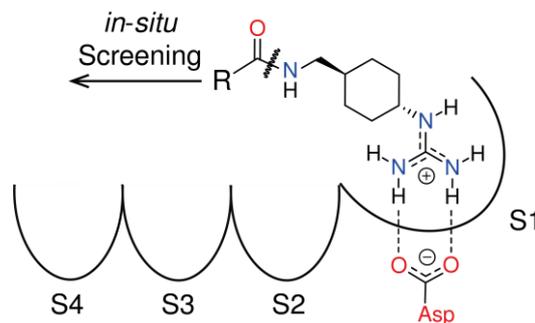
Zur Methodenentwicklung sollte Faktor Xa als Zielstruktur verwendet werden, welches große Relevanz als Arzneistofftarget besitzt.<sup>[110-113]</sup> Amidbindungen werden üblicherweise durch Umsetzung eines Amin-Nukleophils mit einer aktivierten Carbonsäure (Aktivester) gebildet.<sup>[114]</sup> Als Carbonsäure wurde hierbei die Teilstruktur eines publizierten Faktor Xa-Inhibitors<sup>[115]</sup> gewählt, aus der eine Reihe Aktivester, unterschiedlicher Reaktivität, hergestellt werden soll. Von dieser Dipeptidteilstruktur wird erwartet, dass sie in die S2–S4-Bindetasche von Faktor Xa bindet. Im publizierten Inhibitor ist diese Teilstruktur über eine Amidbindung mit 4-Aminomethylbenzamidin (einem bekannten S1-Binder<sup>[116, 117]</sup>) verknüpft – genau diese Bindung soll im Zuge des *proof of concept* als Modellsystem dienen und Templat-unterstützt geknüpft werden (s. Abb. 2.1). Werden geeignete Versuchsparameter gefunden, soll die Kinetik und der molekulare Ablauf der templierten Reaktion näher untersucht werden. Anschließend soll die Möglichkeit zur Parallelisierung der Reaktion überprüft werden, womit die Durchführung von orts aufgelösten Screenings auch für bisher unbekannte Verbindungen prinzipiell möglich wäre.



**Abbildung 2.1.** Schematische Darstellung der geplanten Templat-unterstützten Amidierungsreaktion.

Eine Templat-unterstützte Form der Amidierung im Stil einer Proteintarget-geleiteten Synthese ist bis dato nicht bekannt. Zwar existiert eine Veröffentlichung von Gelin *et al.*, in der ein Nukleotid-Analoga mit einem nicht-aktivierten Citrat im Kristall der NAD Kinase von *Listeria monocytogenes* umgesetzt wird und dabei auf Grundlage der Elektronendichte die Entstehung eines Amid-Ligationsprodukts postuliert wird,<sup>[118]</sup> dieses wird nachfolgend aber nicht nachgewiesen. Klar abzugrenzen sind außerdem Arbeiten zur Protease-katalysierten Bildung von Amidbindungen, welche auf der Transpeptidase-Aktivität von (Serin-)Proteasen beruhen.<sup>[119, 120]</sup> Hierbei liegt ein enzymatischer Prozess zugrunde, da die dort beschriebene Amidierung über ein Acyl-Enzym-Intermediat verläuft, welches im Anschluss von einem zweiten Nukleophil gespalten wird und dadurch das Amid-Produkt freisetzt.<sup>[121, 122]</sup>

Im zweiten Teilprojekt der Arbeit soll eine technologisch-orientierte Variante der Amidierung als Methode zur Fragment-Ligation entwickelt werden, die sich zur Suche neuer Proteaseinhibitoren eignet. Zur Bildung der Amidbindung soll hier die *in-situ* Amidierung verwendet werden. Diese soll im Zuge eines Hochdurchsatz-Bibliotheksscreening dazu genutzt werden, neue Inhibitoren für die WNV NS2B-NS3-Protease zu finden. Bisher existiert keine antivirale Therapie gegen das West-Nil-Virus. Neue Leitstrukturen werden daher dringend benötigt. Das nach Hammamy *et al.* aktivste P1-Fragment *trans*-(4-Guanidino)cyclohexylmethylamid (GCMA)<sup>[108]</sup> soll dabei als Ausgangspunkt des *in-situ* Screenings dienen (s. Abb. 2.2).



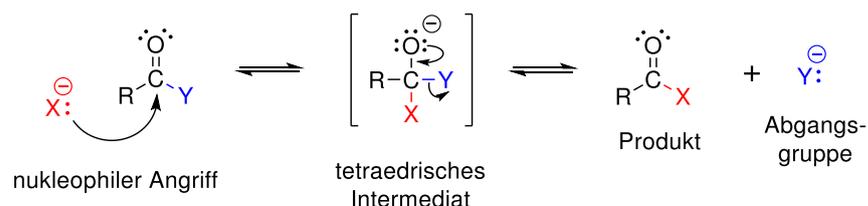
**Abbildung 2.2.** Darstellung des geplanten NS2B-NS3-Protease Screenings. Das P1-Fragment *trans*-(4-Guanidino)cyclohexylmethylamid dient als Startfragment und soll im Zuge des *in-situ* Screenings über eine Amidbindung mit Carboxylat-Fragmenten der Carboxylat-Bibliothek verknüpft werden.

Dieses stellt ein Arginin-Mimetikum mit freier Amin-Funktion dar und eignet sich somit ideal als Startfragment. Die Amin-Funktion soll durch eine Amidbindung mit Carboxylat-Fragmenten verknüpft werden. Hierfür muss zunächst eine möglichst effiziente Methode gefunden werden, um die vorhandene Carboxylat-Bibliothek (1615 Fragmente) innerhalb der Mikrotiterplatten zu aktivieren und sie im nächsten Schritt mit dem Amin umsetzen zu können. Diese „Amid“-Bibliothek soll dann gegen WNV NS2B-NS3-Protease gescreent werden. Aussichtsreiche Fragment-Kombinationen sollen in größerem Maßstab nachsynthetisiert und anschließend getestet werden. Computergestützte Methoden (*in-silico* Docking) sollen als Ergänzung eingesetzt werden.

# 3. Grundlagen

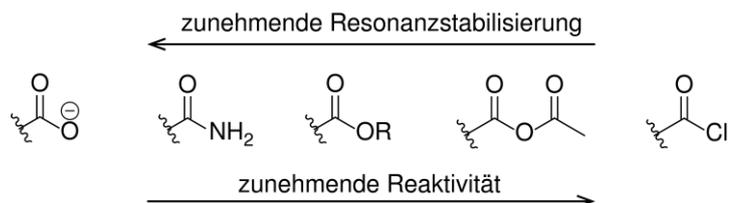
## 3.1. Reaktivität von Carbonsäurederivaten

Die für die meisten Carbonsäurederivate typische Reaktivität beruht auf der Polarität der Carbonylfunktion, deren partiell-positiv geladener Kohlenstoff für Angriffe durch Nukleophile empfänglich ist. Nach dem nukleophilen Angriff entsteht dabei zunächst das tetraedrische Intermediat, aus dem dann die beste Abgangsgruppe eliminiert wird. Insgesamt entspricht die Reaktion einer nukleophilen Acyl-Substitution, welche über einen Additions-Eliminierungsmechanismus verläuft (s. Abb. 3.1).



**Abbildung 3.1.** Dargestellt ist die für Carbonsäurederivate typische nukleophile Acyl-Substitution.

Unterschiede in der Reaktivität der Carbonsäurederivate bzw. Aktivester gegenüber dem Angriff durch Nukleophile ergeben sich dabei durch die elektronenziehenden Eigenschaften von Y. Stärkerer Elektronenzug führt hier zu einer Erhöhung der positiven Partialladung, was wiederum zu einer erhöhten Elektrophilie des Carbonyl-Kohlenstoffs führt. Eine mögliche Resonanzstabilisierung durch Y verringert hingegen die Elektrophilie und senkt damit die Reaktivität gegenüber dem Angriff von Nukleophilen (s. Abb. 3.2).



**Abbildung 3.2.** Schematische Darstellung der Reaktivität von Carbonsäurederivaten als Folge der Resonanzstabilisierung

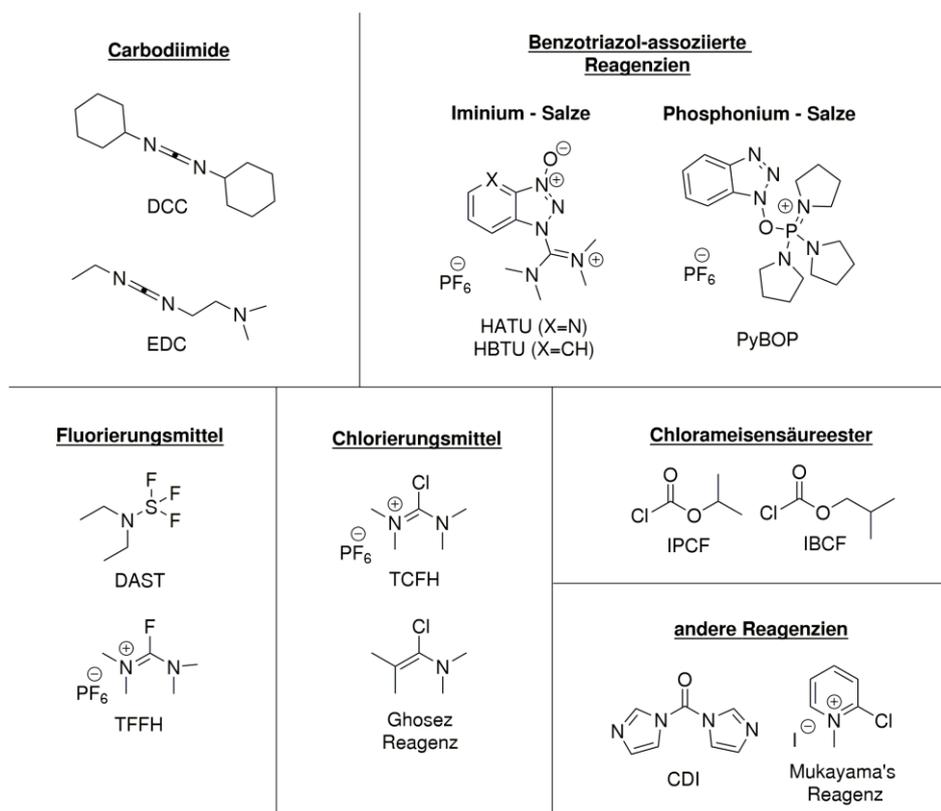
Das Carboxylat besitzt eine Resonanzenergie von ca. 126 kJ/mol, das Amid 92 kJ/mol und der Alkyl-Ester 59 kJ/mol. Je höher der Verlust an Resonanzenergie, der sich durch Bildung des tetraedrischen Intermediats ergibt, desto energetisch höher liegt der Übergangszustand der Reaktion und desto unreaktiver ist ein Carbonsäurederivat. Auf der Stufe des tetraedrischen Intermediats beeinflusst insbesondere die Elektronegativität von Y die jeweilige Reaktivität des Carbonsäurederivats. Eine hohe Elektronegativität führt hier zu einer Stabilisierung der negativen Ladung des tetraedrischen Intermediats und begünstigt somit die Bildung des Intermediats. Nach der Bildung des tetraedrischen Intermediats spielen vor allem die Abgangsgruppeneigenschaften von Y eine Rolle, welche sich umgekehrt proportional zur Basenstärke der jeweiligen Gruppe verhalten. Je nach Basenstärke kann die Eliminierung der entsprechenden Gruppe aus dem tetraedrischen Intermediat somit entweder erleichtert oder erschwert sein.

## 3.2. Aktivierungsreagenzien

Amidbindungen werden üblicherweise durch Umsetzung eines Amin-Nucleophils mit einer aktivierten Carbonsäure (z. B. einem Aktivester) gebildet.<sup>[114]</sup> Die Aktivierung ist hier nötig, da sonst im Zuge einer einfachen Säure-Base-Reaktion ein Nucleophilieverlust desamins erfolgt und gleichzeitig die Carbonsäure in das für Nucleophile wenig empfindliche Carboxylat umgewandelt wird (s. Abschnitt 3.1). Zur Aktivierung von Carbonsäuren nutzen die eingesetzten Aktivierungsreagenzien meist die Nucleophilie des konjugierten Carboxylat-Anions aus, um die Carbonsäuren in aktivere Carbonsäurederivate zu überführen (s. Abb. 3.3).

Bei vielen Aktivierungsreagenzien besteht die Gefahr der Racemisierung, wenn chirale Aminosäuren aktiviert werden.<sup>[123]</sup> Dies kann durch direkte Enolisierung geschehen, häufiger ist jedoch die Entstehung einer Oxazolone-Zwischenstufe, bei der die chirale Information durch zwischenzeitliche  $sp^2$ -Hybridisierung des  $\alpha$ -Kohlenstoffs verloren geht (s. Abb. 3.4).<sup>[124]</sup> Aus diesem Grund wird oft ein Additiv wie 1-Hydroxybenzotriazol (HOBt) zugegeben, welches durch Bildung eines HOBt-Aktivesters diese potentielle Gefahr zu unterdrücken vermag.<sup>[125]</sup> Inzwischen existieren viele Aktivierungsreagenzien, die bereits eine Aktivester-Komponente enthalten, welche nach dem nucleophilen Angriff

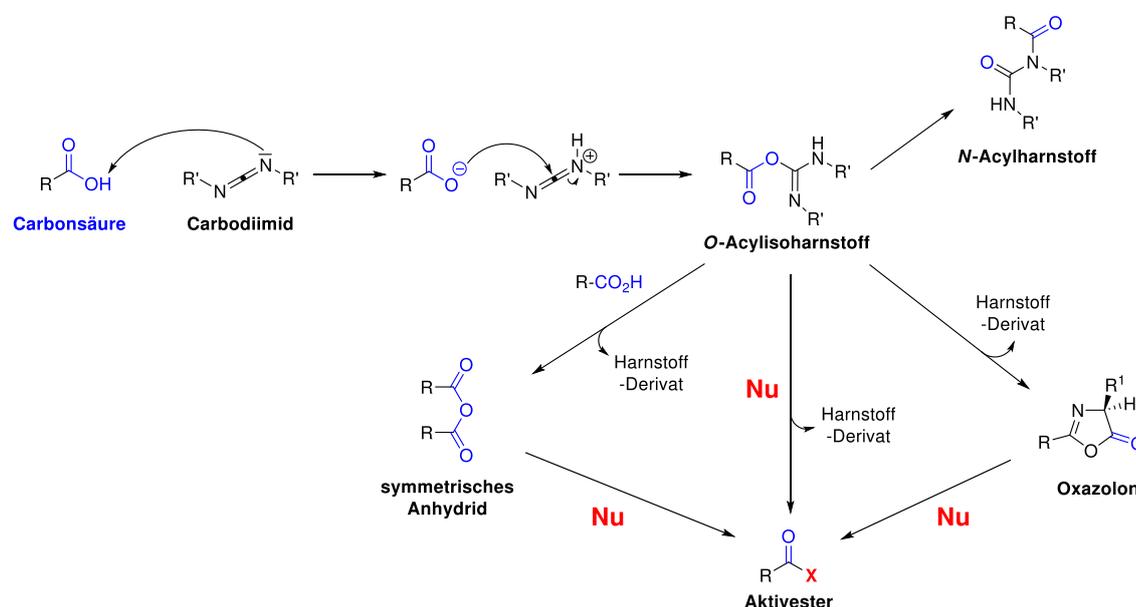
mit der aktivierten Carbonsäurespezies reagieren. Oft sind die resultierenden Aktivester so stabil, dass sie isoliert werden können. Wichtig ist, dass das Gegenion dieser Reagenzien nur sehr schwach nukleophil ist, um Konkurrenzreaktionen zu vermeiden. Dafür werden z. B. Hexafluorophosphate eingesetzt.



**Abbildung 3.3.** Darstellung einiger in dieser Arbeit verwendeter Aktivierungsreagenzien.

Zu den klassischen Aktivierungsreagenzien gehören die Carbodiimide, zu denen u. a. auch Dicyclohexylcarbodiimid<sup>[126]</sup> (DCC) gehört. Diese Reagenzien führen aufgrund der Basizität ihrer Diimid-Funktion zunächst zur Deprotonierung der Carbonsäure. Anschließend nutzen Carbodiimide die Nukleophilie des Carboxylat-Anions aus, um einen sehr reaktiven *O*-Acylisoharnstoff zu bilden (s. Abb. 3.4).<sup>[124, 127]</sup> Dieser kann nun mit einem zweiten Carboxylat-Anion ein symmetrisches Anhydrid bilden oder im Zuge einer intramolekularen Reaktion zum Oxazolone reagieren. Ebenfalls ist eine direkte Reaktion mit dem zu kuppelnden Amin oder einer Aktivester-Komponente möglich. Bei allen drei Reaktionswegen entsteht ein Harnstoff-Nebenprodukt.

Die verschiedenen Carbodiimid-Reagenzien führen dabei zu jeweils unterschiedlichen Harnstoff-Nebenprodukten. Diese besitzen besonders bezüglich der Löslichkeit eine hohe Variabilität, was gezielt bei der Abtrennung aus dem Reaktionsgemisch ausgenutzt werden kann. Bei der Verwendung von DCC entsteht ein Harnstoff, der in nahezu allen Lösungsmitteln schwerlöslich ist und daher oft einfach abfiltriert werden kann. Wird 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid<sup>[128]</sup> (EDC) verwendet, bildet sich ein wasserlösliches Harnstoff-Nebenprodukt, welches sich gut von den meist hydrophoben Produkten (Amide geschützter Aminosäuren oder Ester) durch wässrige Extraktion abtrennen lässt.



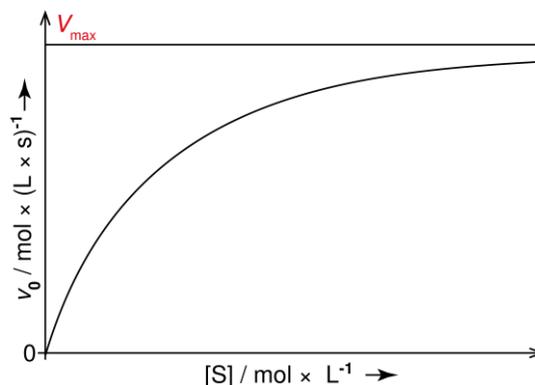
**Abbildung 3.4.** Schematische Darstellung der Aktivierung einer Carbonsäure durch Carbodiimid-Aktivierungsreagenzien und anschließender Kupplung mit einem Nucleophil bzw. einer Aktivesterkomponente (rot).

Eine Nebenreaktion der Carbodiimid-Aktivierung tritt ausgehend vom *O*-Acylisoharnstoff in Form eines [1,3]-Acylshifts auf, welcher irreversibel zum unreaktiven *N*-Acylharnstoff führt. Diese Reaktion ist zwar langsam, gewinnt aber vor allem dann an Bedeutung, wenn sich nur ungenügend starke Nucleophile in Lösung befinden. Ebenso tritt diese Reaktion in polaren Lösungsmitteln gehäuft auf, da hier der stark polare Übergangszustand dieser Nebenreaktion begünstigt wird. Da besonders die bei der Herstellung von

Estern verwendeten Alkohole oft eine zu geringe Nukleophilie aufweisen, wird hier meist 4-(Dimethylamino)-pyridin (DMAP) im Zuge einer sog. Steglich-Veresterung zugesetzt.<sup>[129]</sup> DMAP dient als Acylierungs-Katalysator, der über die Bildung eines DMAP-Aktivesters einen solchen *N*-Acylshift verhindert. Dieser Aktivester konserviert einen Großteil der Reaktivität, da ein *N*-Acylpyridinium-Ion gebildet wird, dessen Mesomerie-Stabilisierung zu einer hochreaktiven doppelt positiv geladenen Teilstruktur führen würde.

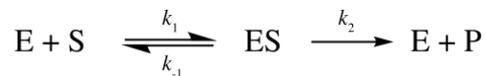
### 3.3. Michaelis-Menten-Gleichung

Um ein Enzym experimentell kinetisch zu charakterisieren, wird in der Regel die aus der Variation der Substratkonzentration resultierende Reaktionsgeschwindigkeit bestimmt, indem die Substratabnahme oder Produktzunahme pro Zeit gemessen wird. Da die Substratkonzentration im Laufe der Reaktion abnimmt, beschränkt man sich zur Bestimmung der Reaktionsgeschwindigkeit auf die Anfangsgeschwindigkeit  $v_0$  unter der Annahme, dass die Konzentration des Substrats in der Anfangsphase der Reaktion noch nicht maßgeblich abgenommen hat und demzufolge als annähernd konstant betrachtet werden kann. Trägt man die eingesetzten Substratkonzentrationen gegen die gemessenen Anfangsgeschwindigkeiten auf, erhält man eine Sättigungskurve mit typischen hyperbolem Kurvenverlauf (s. Abb. 3.5).



**Abbildung 3.5.** Graphische Auftragung der Anfangsgeschwindigkeit  $v_0$  gegen die Substratkonzentration  $[S]$ . Die resultierende hyperbole Sättigungskurve nähert sich der Maximalgeschwindigkeit  $v_{\text{max}}$  an.

Bei geringen Substratkonzentrationen ist die Wahrscheinlichkeit relativ hoch, dass ein Substratmolekül auf ein freies Enzym trifft und direkt gebunden und umgesetzt werden kann. Dies führt zu Beginn der Kurve zu einem linearen Anstieg der Anfangsgeschwindigkeit  $v_0$  in Abhängigkeit zur eingesetzten Konzentration. Bei höheren Konzentrationen tritt jedoch immer häufiger auch der Fall ein, dass ein Substratmolekül auf ein bereits besetztes Enzym trifft. Hierdurch steigt die Reaktionsgeschwindigkeit nicht mehr proportional zur Substratkonzentration an, sondern es stellt sich eine Sättigung ein, was sich in einem Abflachen der Kurve äußert. Bei sehr hohen Substratkonzentrationen nähert sich die Anfangsgeschwindigkeit  $v_0$  dadurch einer Maximalgeschwindigkeit  $v_{\max}$  an. Dies entspricht einem Zustand in dem alle Enzymmoleküle dauerhaft Substrat-gebunden vorliegen und mit maximalem Substratdurchsatz arbeiten. Eine weitere Steigerung der Substratkonzentration führt hier also zu keiner weiteren Steigerung der Anfangsgeschwindigkeit  $v_0$ , da das Enzym bereits mit maximaler Geschwindigkeit arbeitet. Praktisch kann dieser  $v_{\max}$ -Wert nicht erreicht werden und muss daher aus dem Diagramm extrapoliert werden. Ein noch heute gültiges Modell zur quantitativen Beschreibung einer solchen enzymatischen Umsetzung stellt das Michaelis-Menten Modell dar.<sup>[130, 131]</sup>



Wobei  $k$  für die Geschwindigkeitskonstante der jeweiligen Reaktion steht. Dieses Modell nimmt an, dass der erste Reaktionsschritt einer enzymatischen Reaktion eine schnelle Gleichgewichtsreaktion mit Bindung des Substrats an das Enzym darstellt, wobei ein Enzym-Substrat Übergangskomplex gebildet wird. Dieser Komplex kann nachfolgend im geschwindigkeitsbestimmenden Schritt zum Produkt und dem regenerierten Enzym reagieren. Die Rückreaktion wird hierbei vernachlässigt, da zu Anfangsbedingungen noch zu wenig Produkt vorliegt, um eine nennenswerte Rückreaktion zu ermöglichen. Die Geschwindigkeit der Produktbildung kann also in Abhängigkeit der Konzentration des Enzym-Substrat-Komplexes [ES] beschrieben werden.

$$v = k_2 \times [\text{ES}] \quad (3.1)$$

Der [ES]-Wert lässt sich jedoch nicht experimentell ermitteln, weswegen er auf Grundlage der Enzym- und Substratkonzentration bestimmt werden muss: Die Zunahme von [ES] erfolgt durch Bindung von Substrat an das Enzym. Die Abnahme von [ES] erfolgt durch Zerfall zurück in Substrat und Enzym sowie durch die Umsetzung zum Produkt.

Bildung von ES: 
$$v = k_1 \times [E] \times [S] \quad (3.2)$$

Zerfall von ES: 
$$v = k_2 \times [ES] + k_{-1} \times [ES] \quad (3.3)$$

Die Konzentration des Komplexes kann unter der Annahme von *steady-state*-Bedingungen als konstant angenommen werden, da er zu Anfangsbedingungen mit derselben Geschwindigkeit gebildet wird, wie er zerfällt. Diese Annahme lässt sich solange treffen, wie das Substrat noch in deutlichem Überschuss im Vergleich zum Enzym vorliegt. Erst wenn im Verlauf der Reaktion ein deutlicher Substratanteil umgesetzt wurde, nimmt die Konzentration von ES merklich ab. Somit lassen sich die Gleichungen 3.2 und 3.3 unter *steady-state*-Bedingungen gleichsetzen:

$$k_1 \times [E] \times [S] = k_2 [ES] + k_{-1} \times [ES] \quad (3.4)$$

Da auch die Konzentration an freiem Enzym nicht bekannt ist (da sich das Enzym teilweise in Substrat-gebundenem Zustand befindet), muss zunächst eine weitere Gleichung zur Lösung von Gleichung 3.4 aufgestellt werden.

$$[E_g] = [E] + [ES] \quad (3.5)$$

Nach [E] umgestellt folgt: 
$$[E] = [E_g] - [ES] \quad (3.6)$$

Wobei  $[E_g]$  hier der Gesamtzymkonzentration im System entspricht, also der anfangs eingesetzten Enzymkonzentration. Durch Einsetzen von 3.6 in 3.4 und nachfolgender Umformung erhält man für [ES]:

$$[ES] = \frac{[E_g] \times [S]}{[S] + \frac{k_2 + k_{-1}}{k_1}} \quad (3.7)$$

Bzw. mit 
$$K_M = \frac{k_2 + k_{-1}}{k_1} \quad (3.8)$$

folgt: 
$$[ES] = \frac{[E_g] \times [S]}{[S] + K_M} \quad (3.9)$$

Der  $K_M$ -Wert ist hierbei als Michaelis-Konstante definiert. Das Einsetzen von Gleichung 3.1 in 3.9 führt nun zu einer Geschwindigkeitsgleichung mit Messgrößen, die sich vollständig experimentell bestimmen lassen.

$$v_0 = \frac{k_2 \times [E_g] \times [S]}{K_M + [S]} \quad (3.10)$$

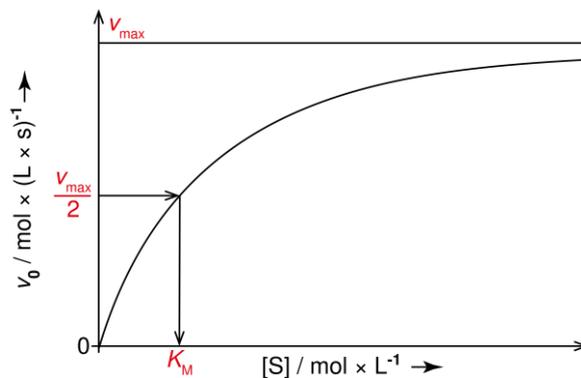
Durch die Annahme, dass die Maximalgeschwindigkeit erreicht wird, wenn alle Enzymmoleküle Substrat-gebunden vorliegen, lässt sich weiter folgern, dass für diesen Fall auch [ES] maximal sein muss. [ES] lässt sich dementsprechend mit  $[E_g]$  gleichsetzen.

$$v_{\max} = k_2 \times [\text{ES}]_{\max} = k_2 \times [\text{E}_g] \quad (3.11)$$

Einsetzen von 3.11 in 3.10 ergibt die Michaelis-Menten-Gleichung, eine der zentralen Gleichungen in der Enzymkinetik:

$$v_0 = \frac{v_{\max} \times [\text{S}]}{K_M + [\text{S}]} \quad (3.12)$$

Ebenfalls ist der  $K_M$ -Wert eine wichtige Enzymkenngröße. Für den Fall  $[\text{S}] = K_M$  ergibt sich für die Anfangsgeschwindigkeit  $v_0$  ein Wert von  $\frac{1}{2} v_{\max}$  (s. Abb. 3.6). Das jeweilige Enzym setzt das Substrat also mit halbmaximaler Geschwindigkeit um oder anders ausgedrückt, die Hälfte aller Enzymmoleküle liegen Substrat-gebunden vor.



**Abbildung 3.6.** Graphische Auftragung der Anfangsgeschwindigkeit  $v_0$  gegen die Substratkonzentration  $[\text{S}]$  mit Ermittlung des  $K_M$ -Werts.

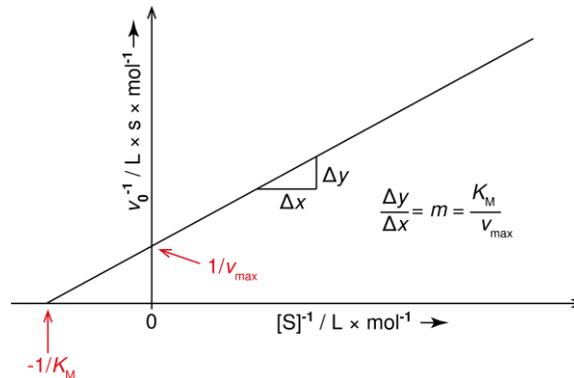
Die Michaelis-Menten Konstante ist auch ein wichtiges Maß für die Affinität des jeweiligen Substrats zum Enzym. Denn wenn  $k_2$  viel kleiner ist als  $k_{-1}$ , kann  $k_2$  im Zähler vernachlässigt werden.

$$\text{Aus 3.8 wird dann: } K_M \approx \frac{k_{-1}}{k_1} = K_D \quad (3.13)$$

Somit ergibt sich für den  $K_M$ -Wert ein Wert der ungefähr dem  $K_D$ -Wert entspricht. Je kleiner der  $K_D$ -Wert, umso höher ist die Affinität eines Substrats zum Enzym. Da sich experimentell die Anfangsgeschwindigkeit nur asymptotisch annähert und der Maximalwert nie erreicht wird, lassen sich der  $K_M$ -Wert und  $v_{\max}$  aus dem ermittelten Graphen nur ungenügend genau bestimmen. Bildet man jedoch den Kehrwert der Michaelis-Menten-Gleichung erhält man:

$$\frac{1}{v_0} = \frac{K_M}{v_{\max}} \times \frac{1}{[\text{S}]} + \frac{1}{v_{\max}} \quad (3.14)$$

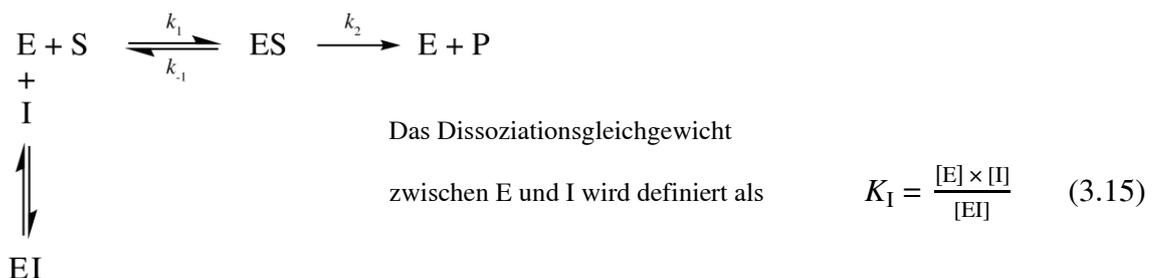
Beim Auftragen von  $1/[S]$  gegen  $1/v_0$  erhält man nun eine lineare Funktion, welche auch als Lineweaver-Burk-Plot bekannt ist (s. Abb. 3.7). Mittels linearer Regression lässt sich nun der  $K_M$ -Wert und  $v_{\max}$  aus der Steigung der resultierenden Geraden und dem extrapolierten Achsenabschnitt bestimmen.



**Abbildung 3.7.** Graphische Auftragung des Kehrwerts der Anfangsgeschwindigkeit  $v_0$  gegen den Kehrwert der Substratkonzentration  $[S]$ .

### 3.4. Inhibitionskonstante und Hemmmechanismen

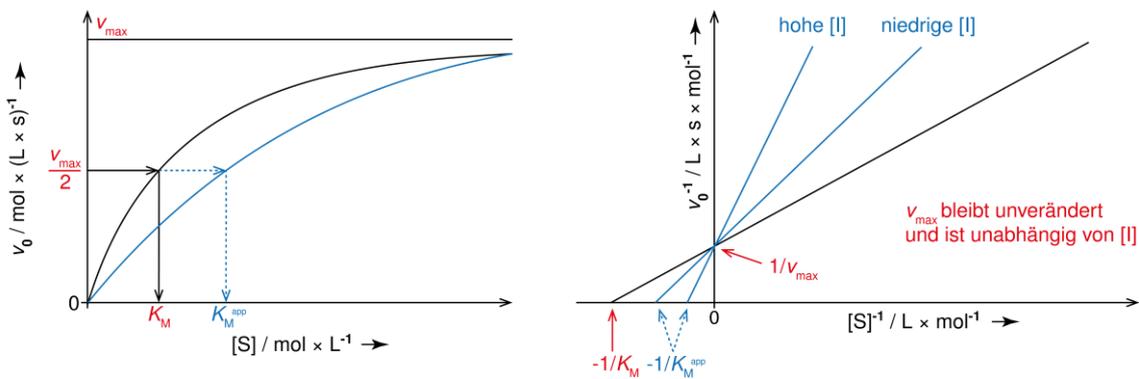
Für ein Gleichgewichtssystem bestehend aus Enzym, Substrat und kompetitivem Inhibitor lassen sich folgende Gleichgewichtsreaktionen aufstellen:



Der Inhibitor verhindert durch Bindung im aktiven Zentrum des Enzyms die Bindung und Umsetzung des Substrats. Die Dissoziationskonstante des Enzym-Inhibitor-Komplexes wird hier als  $K_I$ -Wert definiert. Dieser  $K_I$ -Wert kann als allgemeine Kenngröße zur Beschreibung der Affinität eines Inhibitors zum Enzym bzw. der Potenz eines Inhibitors herangezogen werden. Je niedriger er ist, desto mehr Enzym liegt Inhibitor-gebunden vor. Die Anwesenheit des Inhibitors führt somit zu einer scheinbaren Affinitätssenkung des Substrats zum Enzym, d.h. der  $K_M$ -Wert steigt (wird größer). Zum Erreichen der halb-

maximalen Umsetzungsgeschwindigkeit muss daher nun eine höhere Substratkonzentration eingesetzt werden. Man spricht bei diesem erhöhten Wert auch vom apparenten  $K_M$ -Wert  $K_M^{\text{app}}$ . Im Lineweaver-Burk-Plot äußert sich dies in einer veränderten Steigung der Geraden, während der Ordinatenabschnitt jedoch unverändert bleibt (da  $v_{\text{max}}$  keine Änderung erfährt).

Daraus lässt sich schließen, dass bei der kompetitiven Hemmung der Inhibitor durch eine ausreichend hohe Substratkonzentration vom Enzym verdrängt werden kann und die ursprüngliche maximale Umsetzungsgeschwindigkeit  $v_{\text{max}}$  weiterhin möglich ist (s. Abb. 3.8).

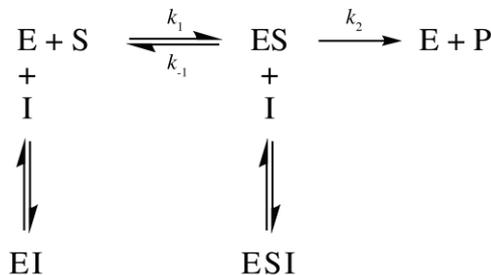


**Abbildung 3.8.** Schematische Darstellung der durch Zugabe eines kompetitiven Inhibitors resultierenden Veränderungen auf den  $K_M$ - und  $v_{\text{max}}$ -Wert im hyperbolischen Plot (links). Sowie die Veränderungen resultierend aus einer niedrigen und hohen Inhibitorkonzentration  $[I]$  im Lineweaver-Burk-Plot (rechts).

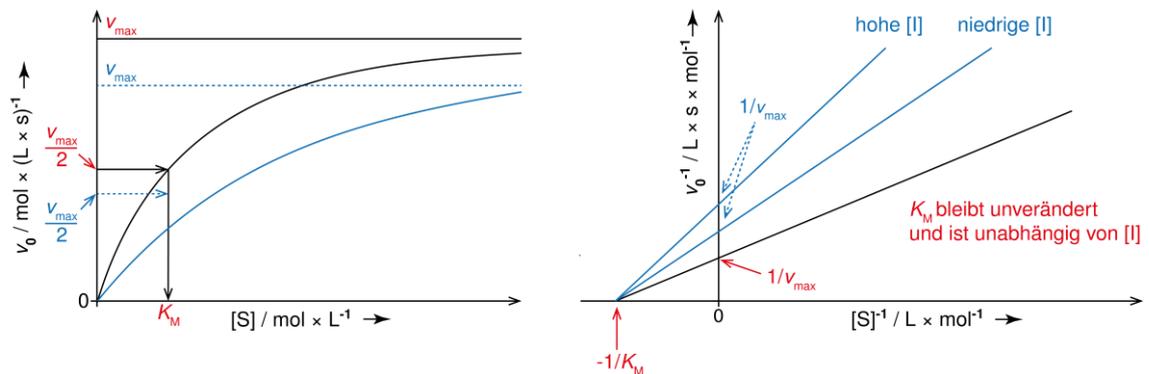
Zur Ermittlung des  $K_I$ -Werts wird experimentell die Anfangsgeschwindigkeit bei einer fixen Inhibitorkonzentration  $[I]$ , aber unterschiedlichen Substratkonzentrationen  $[S]$  gemessen. Aus dem Lineweaver-Burk-Plot wird im Anschluss der  $K_M^{\text{app}}$ -Wert bestimmt. Mit dem zuvor ermittelten  $K_M$ -Wert ohne Inhibitor lässt sich dann auf Grundlage von Gleichung 3.16 der  $K_I$ -Wert bestimmen.

$$K_I = \frac{[I]}{\frac{K_M^{\text{app}}}{K_M} - 1} \quad (3.16)$$

Neben der kompetitiven Hemmung existieren jedoch auch andere Hemmmechanismen, die sich experimentell mithilfe des Lineweaver-Burk-Plots bestimmen lassen. Bei der nicht-kompetitiven Hemmung bindet der Inhibitor reversibel an das Enzym, jedoch nicht an der Substrat-Bindungsstelle des Enzyms. Das Substrat kann so unverändert an das Enzym binden, es findet allerdings nur eine verringerte Umsetzung zum Produkt statt. Der Inhibitor besitzt dabei die gleiche Affinität zum freien Enzym wie zum Enzym-Substrat-Komplex. Diese Art der Inhibition kann nicht durch eine Erhöhung der Substratkonzentration umgangen werden und hängt allein von der Inhibitorkonzentration ab.



Im Lineweaver-Burk-Plot zeigt sich hier eine verringerte Maximalgeschwindigkeit  $v_{\max}$ . Der  $K_M$ -Wert erfährt hingegen keine Veränderung, da die Anwesenheit des Inhibitors nicht zur Senkung der Substrataffinität des Enzyms führt (s. Abb. 3.9).

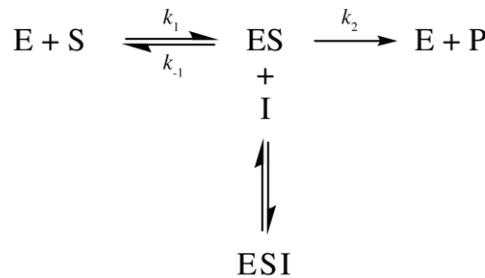


**Abbildung 3.9.** Schematische Darstellung der durch Zugabe eines nicht-kompetitiven Inhibitors resultierenden Veränderungen auf den  $K_M$ - und  $v_{\max}$ -Wert im hyperbolen Plot (links). Sowie die Veränderungen resultierend aus einer niedrigen und hohen Inhibitorkonzentration [I] im Lineweaver-Burk-Plot (rechts).

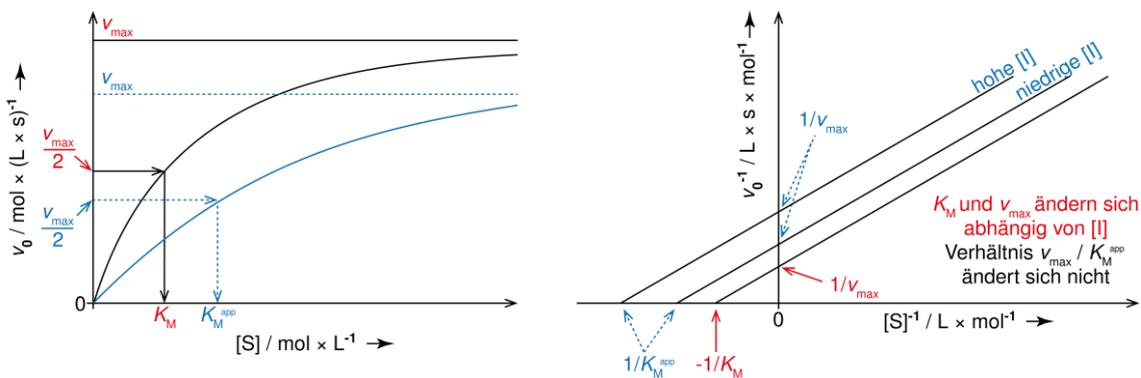
Dieselben Inhibitionsmerkmale lassen sich auch bei der Anwesenheit von sog. allosterischen Inhibitoren beobachten. Diese Inhibitoren binden an Bindungsstellen abseits des

aktiven Zentrums des Enzyms. Meist führt die Bindung des Inhibitors hier zu einer Konformationsänderung des Enzyms, welche zwar die Substrataffinität nicht verändert, jedoch aufgrund der strukturellen Veränderung die Aktivität des Enzyms herabsetzt. Für den Fall, dass bedingt durch diese Strukturänderungen ebenfalls eine Veränderung der Substrataffinität erfolgt, spricht man von einer gemischten Inhibition.

Bei einer unkompetitiven Hemmung bindet der Inhibitor bevorzugt an den Enzym-Substrat-Komplex, wodurch das Substrat nicht zum Produkt umgesetzt werden kann. Es findet jedoch keine Beeinflussung des freien Enzyms statt.



Daher führt der Inhibitor in diesem Fall nicht zu einer Verminderung der Substrataffinität des Enzyms, sondern diese ist scheinbar sogar erhöht, was sich in einem erniedrigten  $K_M^{\text{app}}$ -Wert zeigt. Der Inhibitor führt hier nämlich durch ein Entziehen des ES-Komplexes und damit der Senkung von  $[\text{ES}]$ , zu einer Senkung von  $v_{\text{max}}$  und damit ebenfalls zu einer verringerten Substratmenge, die zum Erreichen der halbmaximalen Geschwindigkeit notwendig ist (s. Abb. 3.10). Das Verhältnis von  $v_{\text{max}}$  zu  $K_M^{\text{app}}$  bleibt dabei stets erhalten. Unkompetitive Hemmung ist in der Natur jedoch recht selten anzutreffen.



**Abbildung 3.10.** Schematische Darstellung der durch Zugabe eines nicht-kompetitiven Inhibitors resultierenden Veränderungen auf den  $K_M$ - und  $v_{\text{max}}$ -Wert im hyperbolen Plot (links). Sowie die Veränderungen resultierend aus einer niedrigen und hohen Inhibitorkonzentration  $[\text{I}]$  im Lineweaver-Burk-Plot (rechts).

Neben den reversiblen Inhibitoren existieren auch irreversible Inhibitoren. Diese binden kovalent an für die Katalyse notwendige Aminosäuren im aktiven Zentrum des Enzym und inaktivieren so das Enzym dauerhaft (z. B. in Form eines Acyl-Enzym-Intermediats, das nicht mehr gespalten werden kann).<sup>[59]</sup>

### 3.5. Freie Bindungsenergie und Bindungsaffinität

Die Bindungsaffinität eines Liganden lässt sich auf Grundlage der freien Bindungsenergie (auch Gibbs-Bindungsenergie) beurteilen.<sup>[132]</sup> Diese kann durch Gleichung 3.17 bestimmt werden.

$$\Delta G = \Delta H - T \times \Delta S \quad (3.17)$$

$\Delta H$  steht hier für die Enthalpie der Bindung und  $\Delta S$  für die Entropieänderung der Reaktion. Eine negative Änderung der freien Bindungsenergie resultiert in einer Erhöhung der Bindungsaffinität. Über Gleichung 3.18 ist die freie Bindungsenergie mit der Inhibitions-konstante  $K_I$  verbunden.

$$\Delta G = -RT \times \ln(K_I) \quad (3.18)$$

Die treibende Kraft einer Templat-unterstützten Fragment-Ligation stellt die mögliche Additivität der Bindungsenergien der eingesetzten Startfragmente dar.<sup>[30]</sup> Diese kann zu einer deutlichen Zunahme der resultierenden Bindungsaffinität des Ligationsprodukts führen. Voraussetzung ist jedoch, dass die Bindung der Fragmente voneinander unabhängig erfolgt und keine Überlappungen der benachbarten Bindungsstellen existieren.<sup>[133]</sup> Erste Berechnungen, zu der aus der Ligation zweier Fragmente resultierenden Bindungsenergie, führten Jencks *et al.* in ihrer Arbeit von 1981 durch (Gleichung 3.19).<sup>[9]</sup>

$$\Delta G_{AB} = \Delta G_A + \Delta G_B + \Delta G_S \quad (3.19)$$

$\Delta G_{AB}$  steht hier für die Bindungsenergie des Ligationsprodukts,  $\Delta G_A$  und  $\Delta G_B$  für die Bindungsenergien der Einzelfragmente. Der Term  $\Delta G_S$  wird auch als *super-additivity*-Term bezeichnet.<sup>[134]</sup> Der Begriff der Superadditivität wird dabei zur Beschreibung einer aus der Ligation der Fragmente resultierenden Bindungsenergie verwendet, die die Summe der Bindungsenergien der Ausgangsfragmente übersteigt.<sup>[135]</sup>  $\Delta G_S$  steht dabei für den Wert der Abweichung vom reinen Additionsergebnis der Bindungsenergien. Eine

Beurteilung der Effizienz der Ligation zweier Fragmente kann ebenfalls durch die Ermittlung des Verknüpfungskoeffizienten  $E$  erfolgen (Gleichung 3.20).<sup>[136]</sup>

$$K_I^{AB} = K_I^A \times K_I^B \times E \quad (3.20)$$

Wobei  $K_I^{AB}$  für die Inhibitionskonstante des Ligationsprodukts und  $K_I^A/K_I^B$  für die Konstanten der jeweiligen Fragmente stehen. Wird für  $E$  ein Wert von über 1 erhalten, liegt ein superadditiver Effekt vor.<sup>[134]</sup>

### 3.6. IC<sub>50</sub> - Wert

Zur Evaluierung von Enzyminhibitoren innerhalb eines bestimmten Testsystems dient meist der IC<sub>50</sub>-Wert. Der IC<sub>50</sub>-Wert entspricht der Inhibitor-Konzentration, die zu einer 50%igen Hemmung des Enzyms führt. Im Vergleich zum  $K_I$ -Wert, stellt der IC<sub>50</sub>-Wert jedoch keine Konstante dar und kann nur verglichen werden, wenn gleiche Enzym- und Substratkonzentrationen zur Bestimmung eingesetzt wurden.

Zur Ermittlung des IC<sub>50</sub>-Werts wird die Enzymaktivität bei verschiedenen Inhibitor-Konzentrationen gemessen. Trägt man diese Aktivitätswerte gegen den Logarithmus der jeweiligen eingesetzten Konzentration auf, erhält man eine sigmoidale Konzentrations-Wirkungs-Kurve, die sich durch das Vier-Parameter-Modell (auch Hill-Modell<sup>[137, 138]</sup>) beschreiben lässt (s. Abb. 3.11). Mittels nicht-linearer Regression lässt sich auf Grundlage von Gleichung 3.21 der IC<sub>50</sub>-Wert bestimmen.

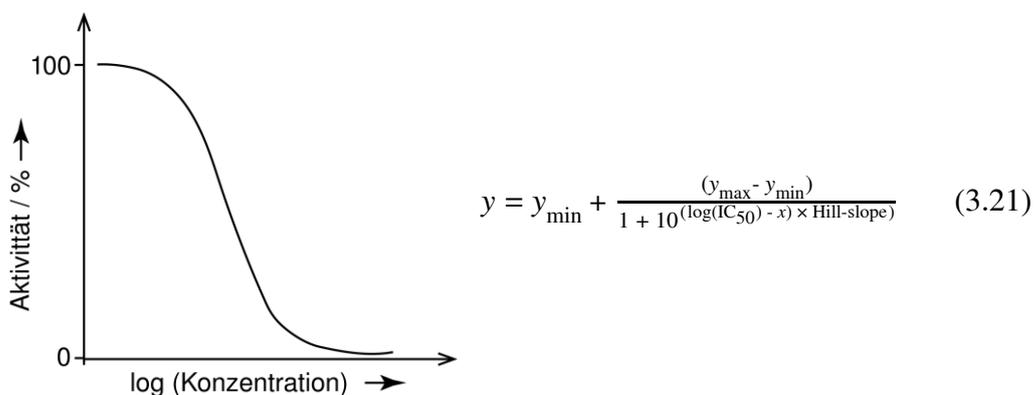


Abbildung 3.11. Exemplarische Bestimmung des IC<sub>50</sub>-Werts.

Der *Hill-slope* ist dabei ein Maß für die Steilheit der Kurve und kann als Indikator dafür herangezogen werden, ob die Inhibitor-Bindung spezifisch an einer definierten Bindungsstelle erfolgt (mit einem Idealwert von 1).<sup>[139]</sup> Mithilfe der Cheng-Prusoff Gleichung<sup>[140]</sup> (Gleichung 3.22) lässt sich ausgehend vom IC<sub>50</sub>-Wert der K<sub>I</sub>-Wert berechnen

$$K_I = \frac{IC_{50}}{1 + \frac{[S]}{K_M}} \quad (3.22)$$

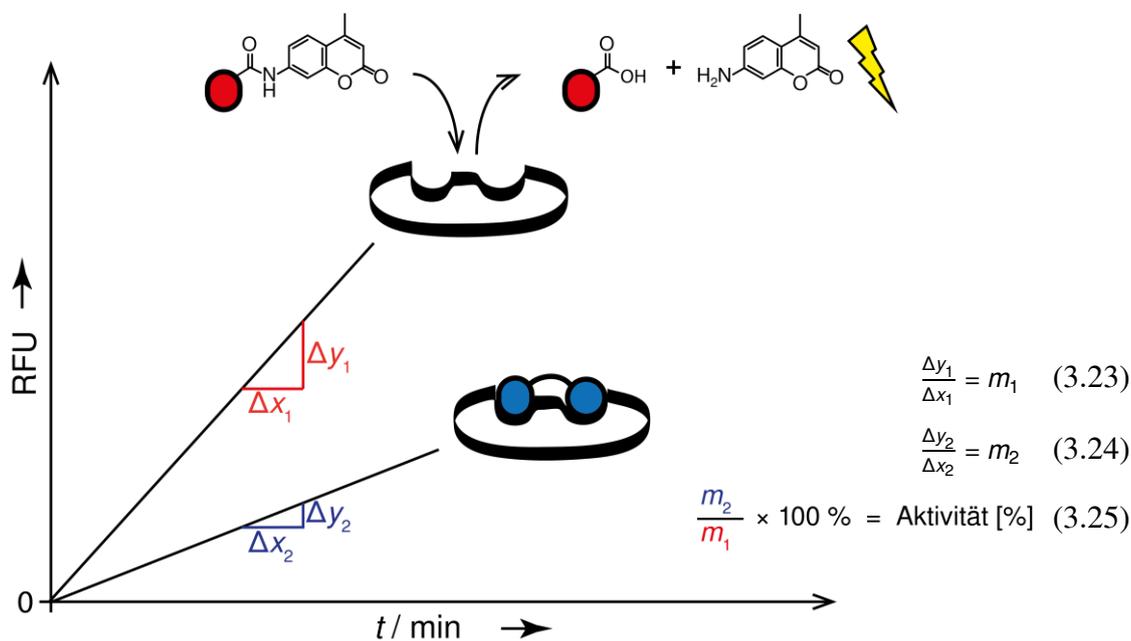
### 3.7. Enzymaktivitätsassay

Zur Ermittlung des IC<sub>50</sub>-Werts wird ein Enzymaktivitätsassay (s. Abb. 3.12) durchgeführt. Dazu eignet sich prinzipiell jedes Assayformat, das dazu in der Lage ist, entweder die Substratabnahme oder die Produktzunahme zu detektieren. Meist werden hier LC/MS oder spektroskopische Methoden verwendet.

Im Zuge dieser Arbeit sind dies vor allem UV/Vis-Spektroskopie und Fluoreszenzspektroskopie. Diese Methoden arbeiten mit Absorptions- bzw. Fluoreszenzsubstraten, die in einem Spektrometer mit einer bestimmten Wellenlänge bestrahlt werden. Die Spaltung durch das Enzym führt dabei zu charakteristischen Veränderungen der Absorptions- bzw. Emissionseigenschaften z. B. durch Veränderung des mesomeren Systems, wodurch Konzentrationsänderungen detektiert werden können. Weiterhin soll aufgrund der zentralen Stellung in dieser Arbeit ein typischer fluoreszenzspektroskopischer Assay erklärt werden.

In einem solchen Assay wird der zeitliche Verlauf der enzymatischen Spaltung eines Fluoreszenzsubstrats untersucht. Dazu wird die Intensität der Fluoreszenz in bestimmten Zeitintervallen gemessen. Diese Fluoreszenz nimmt bei der gemessenen Wellenlänge durch voranschreitende Spaltung des Fluoreszenzsubstrats immer weiter zu. Grund hierfür ist die Freisetzung eines Fluorophors aus dem Fluoreszenzsubstrat wie bspw. 7-Amino-4-methylcumarin (Anregungswellenlänge 380 nm; Emissionswellenlänge 460 nm). Dieses zeichnet sich durch eine sehr intensive Fluoreszenz aus, wodurch bereits die Detektion kleinster Substratumsätze möglich ist.<sup>[141]</sup>

Trägt man die Zeit gegen die gemessene Fluoreszenzintensität auf, erhält man in der Initialphase einen direkt proportionalen Zusammenhang, der mittels Geradengleichung beschrieben werden kann. Die Steigung dieser Geraden kann nun zur Aktivitätsbestimmung herangezogen werden: Der Steigungswert (Gleichung 3.23), der aus der Messung ohne Inhibitor resultiert, entspricht einem zu 100 % aktivem Enzym (= Positiv-Kontrolle). Setzt man nun den Wert, der in Anwesenheit eines Inhibitors gemessenen Steigung (Gleichung 3.24), in Relation zum 100 %-Wert, lässt sich die restliche Aktivität bzw. die resultierende Inhibition des Enzyms ermitteln (Gleichung 3.25).



**Abbildung 3.12.** Darstellung eines Enzymaktivitätsassays mit einem AMC-Fluoreszenzsubstrat (rot) und einem Beispielinhibitor (blau).

### 3.8. Docking und *in-silico* Methoden

Docking ist mittlerweile ein elementarer Bestandteil der modernen Wirkstoffentwicklung geworden.<sup>[142, 143]</sup> Ein typischer Docking-Prozess besteht dabei aus zwei Komponenten. Die erste Komponente besteht aus einem Algorithmus, der den Liganden in verschiedenen Zuständen erzeugt und anschließend versucht diesen an das Enzym zu binden. Dabei werden sog. Posen erzeugt. Eine Pose beschreibt eine bestimmte räumliche Anordnung bzw.

Orientierung des Liganden zum Zielprotein.<sup>[144, 145]</sup> Die zweite Komponente stellt ein Bewertungssystem dar, das die erzeugten Posen in Form eines sog. *scorings* auf energetischer Ebene bewertet. Ziel des Dockings ist eine möglichst korrekte und realitätsnahe Darstellung des Bindungsprozesses sowie den damit verbundenen Wechselwirkungen zwischen Ligand und Protein.<sup>[146]</sup>

Das in dieser Arbeit verwendete *Glide* (Schroedinger Software Suite 2017) nutzt dabei einen Docking-Algorithmus, der die zu testenden Liganden systematisch in allen möglichen Positionen, Orientierungen und Konformationen generiert und am Protein testet.<sup>[147]</sup> Die Software filtert, gruppiert und bewertet daraufhin die Liganden bzw. die damit erzeugten Bindungsposen. Die Bewertung erfolgt hier durch Berechnung des sog. *GScore*, der aus den einzelnen die Bindung beeinflussenden Energiebeiträgen ermittelt werden kann (Gleichung 3.26).<sup>[148]</sup>

$$GScore = E_{\text{coul}} + E_{\text{vdW}} + E_{\text{bind}} + E_{\text{penalty}} \quad (3.26)$$

$E_{\text{coul}}$  steht dabei für den coulombschen Energiebeitrag,  $E_{\text{vdW}}$  für den Van-der-Waals-Energiebeitrag der Protein-Ligand-Interaktion.  $E_{\text{bind}}$  errechnet sich aus Beiträgen der Wasserstoffbrückenbildung,  $\pi$ -Kationen-Interaktionen und lipophilen Wechselwirkungen.  $E_{\text{penalty}}$  beinhaltet Strafterme für Desolvatisierung und Deformation.<sup>[148]</sup> Abschließend wird ein Ranking basierend auf den *scores* der jeweiligen besten Pose eines Liganden erstellt. Docking kann so für den relativen Vergleich der Bindungsaffinitäten der getesteten Substanzen genutzt werden. Der Entwickler betont dabei, dass sich erhaltene *GScore*-Werte aufgrund der genutzten Berechnungsmethode insbesondere für die Unterscheidung von aktiven zu inaktiven ( $K_I < 10 \mu\text{M}$ ) Substanzen eignet. Ein Vergleich mit experimentell zu erwartenden Bindungsenergien ist jedoch laut Angaben des Entwicklers im besten Fall auf wenige  $\text{kcal} \times \text{mol}^{-1}$ -Differenz möglich.<sup>[148]</sup> In der Realität findet man hier sogar noch größere Abweichungen. Eines der zentralen Probleme stellt dabei die Flexibilität des Proteins dar, deren Berechnung sich als äußerst komplex darstellt.<sup>[149-151]</sup>



## **II. Ergebnisse und Diskussion**



## 4. Entwicklung des Ligationsassays

Eine Templat-unterstützte Amidierungsreaktion erfordert zunächst die Bindung eines Amin- und Aktivester-Fragments an das Templat. Dieses kann nun die Reaktion zum Fragment-Ligationsprodukt begünstigen, wenn sich die komplementären funktionellen Gruppen der beiden Fragmente in ausreichender Nähe zueinander befinden (s. Abb. 4.1). Produktbildung durch nicht-gebundene Fragmente wird hierbei als Hintergrundreaktion definiert. Die Bildung des Ligationsprodukts soll durch einen Enzymaktivitätsassay detektiert werden. Da das Fragment-Ligationsprodukt bzw. der finale Inhibitor im vorliegenden Fall im nanomolaren Bereich aktiv ist,<sup>[115]</sup> reichen hier bereits die Bildung kleinster Mengen Inhibitor aus, um zu einer Aktivitätsminderung zu führen. Bei einer zu großen Hintergrundreaktion könnte dabei eine Templat-bedingte zusätzliche Inhibitorbildung nicht mehr von der nicht-templierten Hintergrundreaktion unterschieden werden, da das Enzym bereits zu 100 % gehemmt ist. Daher muss zunächst ein geeigneter Aktivester gefunden werden, der zwar Templat-unterstützt mit dem Amin reagiert, Templat-ungebunden jedoch zu unreaktiv ist, um eine Hintergrundreaktion zu ermöglichen. Nur so ist gewährleistet, dass das Detektionsfenster im Enzymaktivitätsassay ausreichend groß ist.

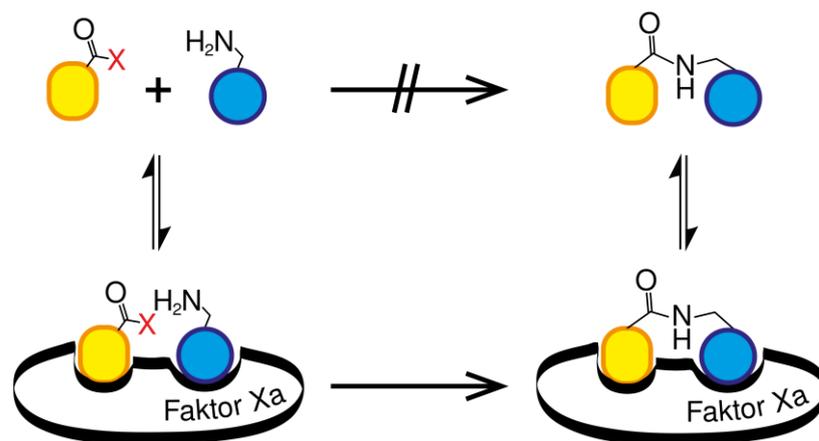
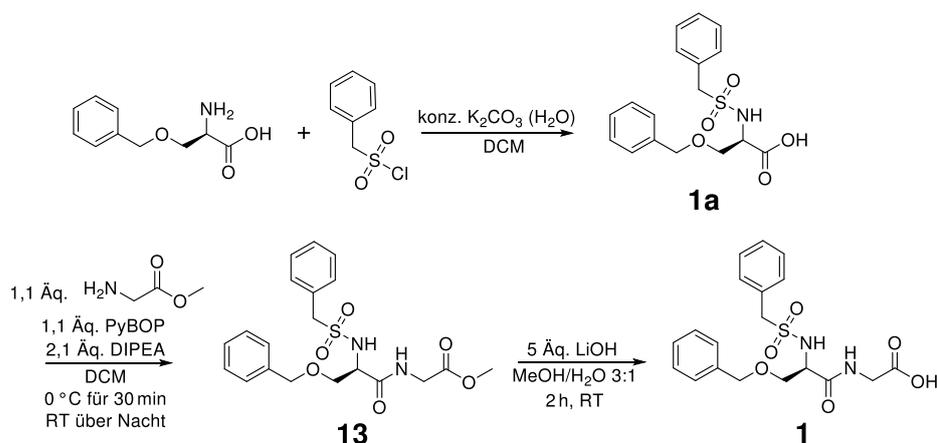


Abbildung 4.1. Schematische Darstellung der Templat-unterstützten Amidierungsreaktion.

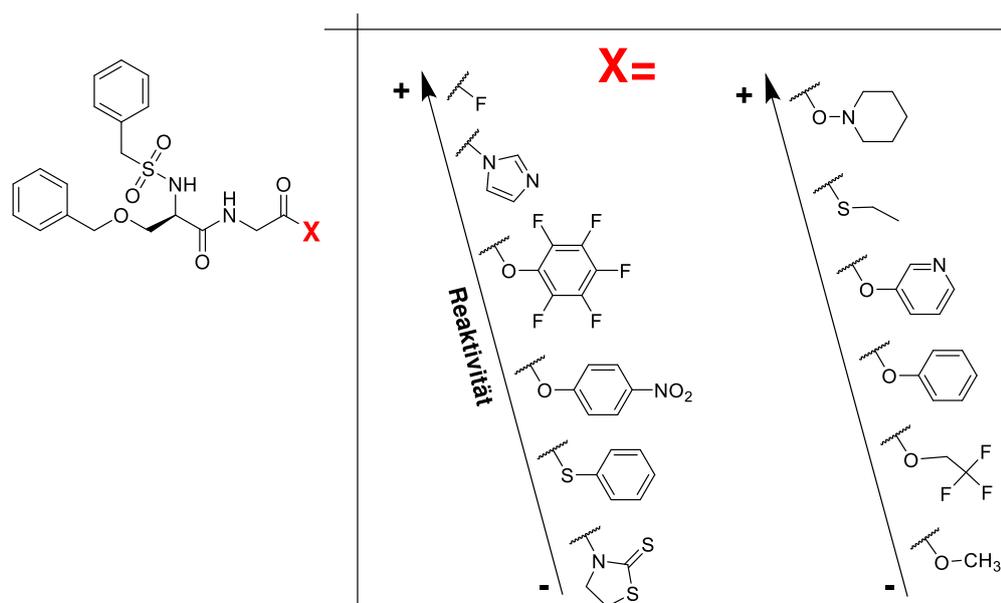
## 4.1. Synthese der Aktivester

Zuerst wurde das Carbonsäure-Fragment *O*-Benzyl-*N*-benzylsulfonyl-*D*-serinyl-glycin **1** synthetisiert, wofür eine modifizierte Vorschrift von Künzel *et al.* verwendet wurde (s. Schema 4.1).<sup>[152, 153]</sup> *O*-Benzyl-*D*-serin wurde dazu vorgelegt und unter Schotten-Baumann-Bedingungen<sup>[154, 155]</sup> mit käuflich erworbenem Benzylsulfonylchlorid umgesetzt. Das Kuppelungsprodukt **1a** wurde nach Extraktion in einer Ausbeute von 69 % erhalten. Anschließend wurde **1a** mit Methyl-geschütztem Glycin gekuppelt, wobei PyBOP<sup>[156]</sup> als Kuppelungsreagenz eingesetzt wurde. Die Verwendung von Methyl-geschütztem Glycin diente hier dem Erhalt eines einheitlichen Produkts, da Nebenreaktionen durch Kupplung mit einem weiteren Glycin-Molekül so verhindert werden. Extraktion und Aufreinigung mittels HPLC lieferte Verbindung **13** in guter Ausbeute (82 %). Im Anschluss folgte eine alkalische Esterhydrolyse mit 5 Äquivalenten Lithiumhydroxid, welche nach zwei Stunden vollständig war. Nach Evaporation des Lösungsmittels wurde das Produkt nochmals in Wasser aufgenommen und mit einem stark saurem Kationenaustauscherharz (Dowex 50WX8) für drei Stunden gerührt. Bereits nach wenigen Minuten fing die freie Carbonsäure an auszufallen. Das präzipitierte Produkt wurde in Aceton gelöst und das Austauscherharz abfiltriert. Dieser Schritt ist notwendig, da vorrangegangene Kupplungsversuche ohne Erfolg waren, vermutlich aufgrund der Bildung des Lithiumsalzes der Carbonsäure. Ohne weitere Ausbeuteverluste konnte so Verbindung **1** erhalten werden.



**Schema 4.1.** Schematische Darstellung der Synthese von Methyl ester **13** und Carbonsäure-Fragment **1**.

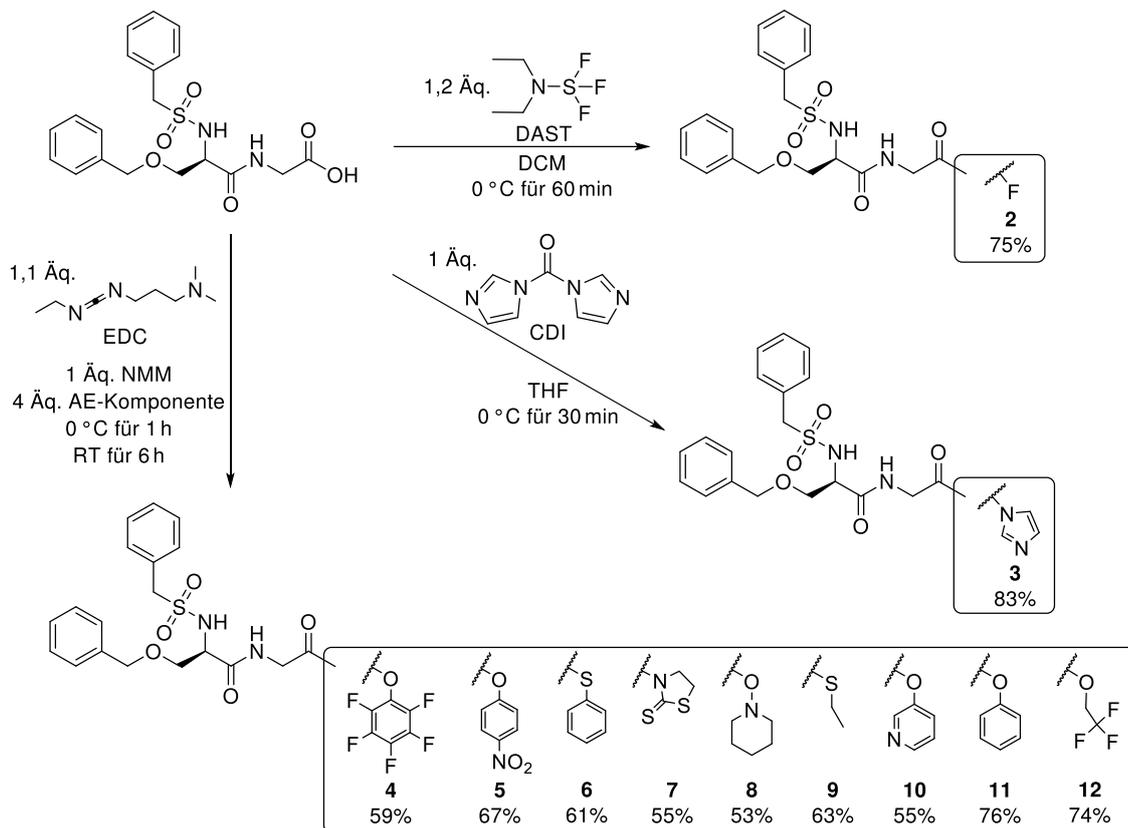
Ausgehend von Verbindung **1** wurde dann, um die für eine Templat-unterstützte Amidierung nötige Reaktivität des Aktivesters auszuloten, eine Reihe von Aktivestern hergestellt, welche das komplette Reaktivitätsspektrum von Carbonsäurederivaten abdecken sollten (s. Abb. 4.2). Das Spektrum der hergestellten Aktivester reichte dabei vom sehr reaktiven Carbonsäurefluorid (**2**) bis hin zum wenig reaktiven Methylester (**13**).



**Abbildung 4.2.** Reaktivität der synthetisierten Aktivester gegenüber Angriffen von Nucleophilen.

Mit Ausnahme der Ester **2**, **3** und **13** wurden alle Aktivester mittels 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid<sup>[128]</sup> (EDC) hergestellt. Da in diesem Fall die zu aktivierende Carbonsäure Glycin darstellt, konnte auf die Zugabe weiterer Additive verzichtet werden. Die mittels EDC hergestellten Aktivester wurden nach HPLC-Aufreinigung in Ausbeuten von 53 % bis 76 % erhalten (s. Schema 4.2). Schwankungen sind hier hauptsächlich auf die unterschiedliche Nucleophilie der Aktivesterkomponente zurückzuführen. Eine Erhöhung der Basenäquivalente und damit verbunden eine durch Deprotonierung bedingte Steigerung der Nucleophilie, konnte hier keine besseren Ausbeuten erzielen, da dies lediglich zur Zunahme des *N*-Acylharnstoff-Nebenprodukts führte. Ebenfalls führte eine Erhöhung der Aktivesterkomponenten-Äquivalente nicht zu höheren Ausbeuten, da dies vermehrt zur Bildung von Isoharnstoff mit gebundener Aktivesterkomponente führte und nicht zur Acylierung durch die aktivierte Carbonsäure.

Das Carbonsäurefluorid **2** wurde mit Diethylaminoschwefeltrifluorid (DAST),<sup>[157, 158]</sup> einem klassischen Fluorierungsreagenz, in einer Ausbeute von 75 % erhalten. Für die Herstellung von Carbonsäureimidazolid **3** wurde 1,1'-Carbonyldiimidazol<sup>[159]</sup> (CDI) verwendet. Die Ausbeute betrug hier 83 %.

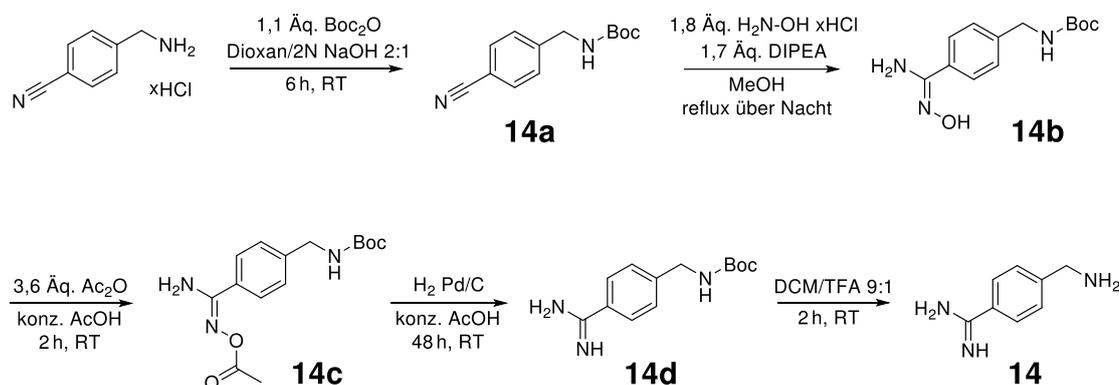


**Schema 4.2.** Schematische Darstellung der Aktivester-Synthesen.

## 4.2. Synthese des S1-bindenden Amin-Fragments

Die Synthese des P1-Ankermoleküls 4-Aminomethylbenzamidin wurde nach angepassten Synthesevorschriften der Steinmetzer-Gruppe in fünf Stufen durchgeführt (s. Schema 4.3).<sup>[115, 153, 160]</sup> Ausgehend vom käuflich erworbenen 4-Aminomethylbenzocarbonitril wurde zunächst die Amin-Funktion Boc-geschützt. Dadurch wird vermieden, dass im nächsten Schritt neben dem nukleophilen Angriff des Hydroxylamins auch ein Angriff desamins eines zweiten 4-Aminomethylbenzocarbonitril-Moleküls am Nitril erfolgen kann. Die Addition des Hydroxylamins führte zur Bildung des Amidoxims **14b**, welches in einer Ausbeute

von 59 % erhalten wurde. Im nächsten Schritt erfolgte die Acetylierung des Amidoxims zu **14c**. Judkins *et al.* berichteten in ihrer Veröffentlichung von 1996, dass dadurch die Reduktion von Amidoximen zu Amidinen sehr viel schonender möglich sei im Vergleich zu früheren Methoden. Diese benötigten zum großen Teil noch „harte“ Reduktionsbedingungen wie bspw. die Verwendung von Rayney-Nickel oder H<sub>2</sub>-Drücken von über 3 atm. Dabei wurde proklamiert, dass dies auf eine Schwächung der N-O-Bindung zurückzuführen sei, welche bedingt durch den Elektronenzug der Acetylgruppe entsteht.<sup>[161]</sup> Die Reduktion zu **14d** konnte so nahezu quantitativ mit einem H<sub>2</sub>-Druck von 1 atm innerhalb von 48 h erfolgen. Abschließend wurde die Boc-Entschützung durchgeführt, welche das Amin-Fragment **14** in einer Gesamtausbeute von 52 % lieferte.



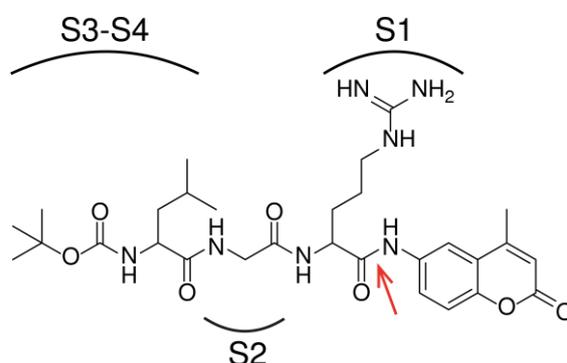
**Schema 4.3.** Schematische Darstellung der Synthese des Amin-Fragments **14**.<sup>[115, 153, 160]</sup>

### 4.3. Aufbau des Ligations-Assays

Nachdem nun das Amin-Fragment und das Carbonsäure-Fragment bzw. dessen Aktivester-Derivate hergestellt worden waren, musste ein geeigneter Enzymaktivitätsassay entwickelt werden, welcher später dann auch als Fragment-Ligationsassay verwendet werden sollte. Üblicherweise wird für Faktor Xa-Aktivitätsassays ein Standard TRIS-Puffer verwendet.<sup>[162]</sup> Dieser kam für den geplanten Ligationsassay jedoch nicht in Frage, da sonst Konkurrenzreaktionen des im Puffer enthaltenen primärenamins mit dem Aktivester-Fragment zu erwarten gewesen wären. Daher wurde für den Ligationsassay ein

MOPS-Puffersystem eingesetzt. Das tertiäre Amin der 3-(*N*-Morpholino)propansulfonsäure ist zwar als Base Teil des Puffersystems, kann aber nicht als Nukleophil reagieren. Der pH-Wert des Puffers wurde auf 8,0 festgesetzt. Dies stellt ein Kompromiss aus der Nähe zum physiologischen pH-Wert des Blutes (7,4) dar und liegt aber dennoch minimal im Basischen, sodass ein größerer, für die Reaktion notwendiger Anteil der Aminfunktion von 4-Aminomethylbenzamidin als freies Amin vorliegt. Der Puffer wurde in einer Konzentration von 200 mM MOPS eingesetzt. Die damit verbundene hohe Pufferkapazität wurde gewählt, da zu Beginn noch nicht bekannt war, in welchen Konzentrationen die Fragmente eingesetzt werden müssen, um eine Templat-unterstützte Reaktion zu ermöglichen.

Als Fluoreszenzsubstrat wurde das bereits in der Arbeitsgruppe etablierte 7-(*N*-Boc-Leucinyl-glycyl-arginyl)-7-amino-4-methylcumarin (Boc-LGR-AMC) gewählt (s. Abb. 4.3).<sup>[163]</sup> Durch Messung der Fluoreszenzzunahme pro Zeit für verschiedene Substratkonzentrationen, konnte unter Verwendung der Michaelis-Menten-Gleichung (Gleichung 3.12) ein  $K_M$ -Wert von 76  $\mu\text{M}$  bestimmt werden. Eine Substratkonzentration von 76  $\mu\text{M}$  wurde dann auch im Assay eingesetzt, was den „ausgewogenen“ Bedingungen (*balanced conditions*) von Copeland entspricht.<sup>[164]</sup> Unter diesen Bedingungen ist eine sensitive Messung unabhängig vom Inhibitionsmechanismus möglich, womit sich der Assay auch für mögliche Hochdurchsatz-Bibliotheksscreenings eignet, bei denen der Hemmmechanismus etwaiger gefundener Fragment-Kombinationen noch nicht bekannt ist.



**Abbildung 4.3.** Darstellung des verwendeten Fluoreszenzsubstrats Boc-Leu-Gly-Arg-AMC. Die Spaltstelle ist mit einem roten Pfeil gekennzeichnet.

Für Faktor Xa wurde eine Konzentration eingesetzt, welche mit 14,5 nM (1:1000 Verdünnung der Stammlösung) über den standardmäßig im Zuge von Faktor Xa-Aktivitätsassays eingesetzten Konzentrationen liegt. Normalerweise wird eine Konzentration im dreistelligen pikomolaren bis einstelligen nanomolaren Bereich verwendet. Aufgrund der Tatsache, dass das Enzym im Ligationsassay jedoch nicht nur zur Umsetzung des Fluoreszenzsubstrats eingesetzt werden sollte, sondern ebenso aktiv an der irreversiblen Ligationsreaktion als Templat teilnimmt, wurde hier eine höhere Konzentration gewählt. Diese lag mit 14,5 nM im Bereich von bereits veröffentlichten Arbeiten zu Templat-unterstützten irreversiblen Ligationsreaktionen.<sup>[165]</sup> Die DMSO-Konzentration im Assay lag bei 2,9 %, bedingt durch die Aktivester-DMSO-Lösung. Bei dieser Konzentration konnte kein negativer Einfluss auf die Enzymaktivität nachgewiesen werden. Das Benzamidin-Fragment konnte in Wasser gelöst werden.

#### 4.4. Ermittlung der IC<sub>50</sub> - Werte der Fragmente

Zwingende Voraussetzung für die Templat-unterstützte Fragment-Ligation ist die vorherige Bindung beider Fragmente an das Enzym. Da die Bindung von Benzamidin **14** in S1 sowie die Bindung der Carbonsäure **1** bzw. deren Aktivester in S2–S4 die gleichzeitige Bindung und Umsetzung des Fluoreszenzsubstrats ausschließt, kann die Enzymaktivität als Indikator des jeweiligen Fragment-Bindungsgrads herangezogen werden. Bei einem hohen Bindungsgrad der Einzelfragmente ist ebenfalls die Wahrscheinlichkeit hoch, dass genug Enzym im Gleichgewichtssystem existiert, an dem beide Fragmente gleichzeitig gebunden sind und somit eine detektierbare Templat-unterstützte Reaktion möglich ist. Um die grundsätzliche Affinität der Fragmente zu bestimmen und damit verbunden auch die nötige Konzentration zu ermitteln, welche für eine bestimmte Absättigung des Enzyms notwendig ist, wurden zunächst die IC<sub>50</sub>-Werte der Einzelfragmente **1** und **14** sowie der Fragment-Kombination **15** unter Verwendung der unter 3.5. beschriebenen Methode bestimmt (s. Tabelle 4.1). Die  $K_I$ -Werte konnten im Anschluss mithilfe der Cheng-Prusoff-Gleichung (Gleichung 3.18) ermittelt werden.

**Tabelle 4.1.** Ermittelte inhibitorische Daten

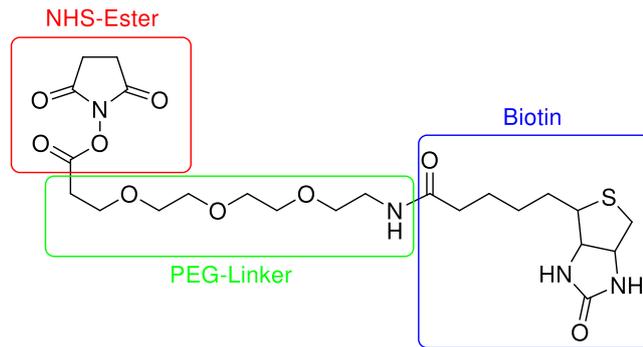
Verbindung	IC <sub>50</sub>	K <sub>I</sub>
<b>1</b>	10,91 (± 0,85) mM	5,5 (± 0,4) mM
<b>11</b>	20,29 (± 0,64) mM	10,15 (± 0,3) mM
<b>12</b>	19,26 (± 0,75) mM	9,6 (± 0,4) mM
<b>14</b>	1,36 (± 0,04) mM	0,68 (± 0,02) mM
<b>15</b>	58,6 (± 3,6) nM	29,3 (± 2) nM

Ebenfalls wurde versucht die IC<sub>50</sub>-Werte der Aktivester zu bestimmen, was jedoch nicht in allen Fällen gelang. Ausnahmen stellten hier lediglich Verbindung **11** und **12** dar. Gründe hierfür sind vermutlich eine zu geringe Affinität zum Zielprotein sowie die ansteigende Reaktivität der Aktivester, was eine erhöhte Zersetzungsgefahr der Aktivester unter Assaybedingungen mit sich bringt. Denkbar ist besonders bei den substituierten Phenolen **4** und **5** auch eine mögliche Interferenz der Aktivesterkomponente mit dem Detektionssignal.

## 4.5. Kontrollmessung mittels BLI

Zur Bestätigung der ermittelten Werte wurde Bio-Layer-Interferometrie<sup>[166]</sup> (BLI) verwendet.<sup>1</sup> Dies ist eine biophysikalische Messmethode, welche zur Detektion der Bindung bzw. Bindungsstärke, die aus der Bindung eines Liganden resultierende Interferenzmusterverschiebung an einer optischen Faser misst. Für die Messung wurde zunächst Faktor Xa mittels EZ-Link™ NHS-PEG4-Biotin-Reagenz (s. Abb. 4.4) biotinyliert. Im Anschluss an die Biotinylierung wurde überprüft, ob das Enzym noch ausreichend aktiv ist, da eine Aktivitätsabnahme auch zu verändertem Bindungsverhalten gegenüber anderen Liganden bzw. Inhibitoren führen würde. Im Enzymaktivitätsassay konnte jedoch nur eine minimale Aktivitätsabnahme festgestellt werden.

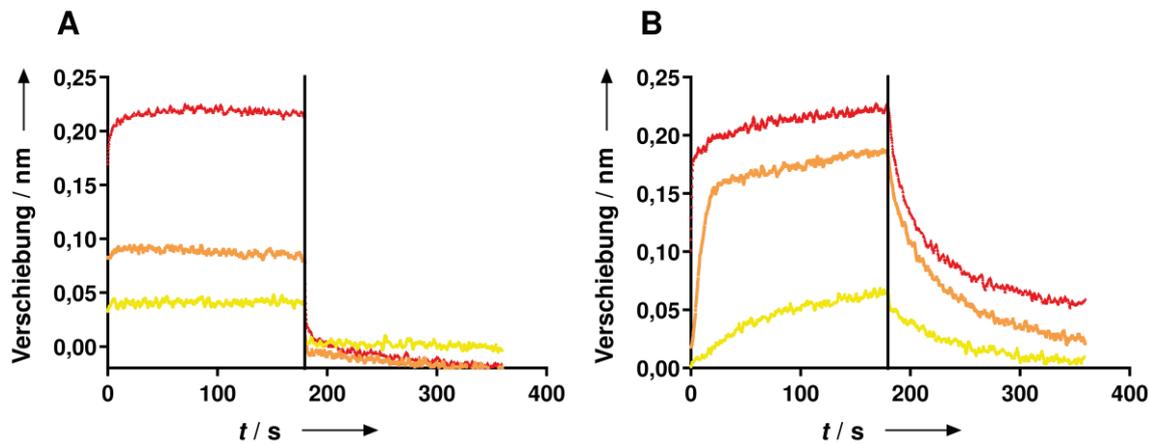
<sup>1</sup> Die BLI-Messungen wurden zusammen mit Dr. Hendrik Wünsche von der Firma Pall ForteBio am Pharmazeutischen Institut Berlin durchgeführt.



**Abbildung 4.4.** Darstellung des verwendeten Biotinylierungsreagenzes EZ-Link™ NHS-PEG4-Biotin. Der *N*-Hydroxysuccinimid-Aktivester acyliert Lysin-Seitenketten des Proteins. Der Polyethylenglycol-Linker verbessert die Bindungsfähigkeit des Biotins mit Streptavidin.

Bei der eigentlichen Messung werden dann optische Fasern (= Sensoren) genutzt, durch die elektromagnetische Strahlung im sichtbaren Wellenlängenbereich geleitet wird. Am Ende der Faser befindet sich eine optische Schicht, welche das eingeleitete Licht zurückreflektiert. Dieses zurückreflektierte Licht interferiert dabei in konstruktiver oder destruktiver Weise mit dem eingeleiteten Licht. Das Messinstrument ist nun dazu in der Lage, durch den Vergleich von Mess- und Referenzsensoren, das mögliche Ausmaß der Verschiebung des Interferenzmusters zu erfassen. Eine solche Verschiebung des Interferenzmusters ergibt sich bspw. durch Bindung einer Substanz oder eines Proteins an die optische Schicht des Sensors. Hierauf beruht das Messprinzip der BLI.

Zur Überprüfung der im Enzymaktivitätsassay ermittelten Werte wurden Streptavidin-beschichtete Sensoren eingesetzt, welche zunächst in eine Lösung mit dem biotinylierten Enzym getaucht wurden. Da Biotin eine starke Affinität zur Streptavidin-Schicht des Sensors besitzt, zeigt sich im Sensorgramm eine Zunahme der Verschiebung durch an den Sensor bindendes Enzym. Faktor Xa ist nun am Sensor immobilisiert. Im folgenden Equilibrierungsschritt werden die Sensoren in Puffer getaucht und die hier gemessene Verschiebung nachfolgend als Basiswert herangezogen. Anschließend wurde die resultierende Verschiebung bei verschiedenen Inhibitorkonzentrationen bestimmt (s. Abb. 4.5). Hierbei wurde die Assoziation des Inhibitors an den Sensor beim Eintauchen in Inhibitorlösung detektiert sowie die nachfolgende Dissoziation des Inhibitors vom Sensor beim Eintauchen in die Pufferlösung.



**Abbildung 4.5.** Dargestellt sind die aufgenommenen Sensorgramme für Verbindung **14** und **15**. Nach einer Assoziationsphase von 180 Sekunden in Inhibitorlösung, folgt die Dissoziationsphase in Puffer. (A) Sensorgramm für Verbindung **14** in einer Konzentration von 250 µM (gelb), 1 mM (orange) und 10 mM (rot). (B) Sensorgramm für Verbindung **15** in einer Konzentration von 58 nM (gelb), 580 nM (orange) und 5,8 µM (rot).

Mithilfe der Octet® Software konnten die Rohdaten durch einen globalen 1:1 *fit* unter Verwendung der Gleichungen 4.1–4.3 in die entsprechenden  $K_D$ -Werte bzw., da es sich um Inhibitoren handelt,  $K_I$ -Werte umgerechnet werden.  $R_{\max}$  steht dabei für das maximale Bindungssignal.

$$K_D = \frac{k_d}{k_a} \quad (4.1)$$

$$\text{Assoziationsphase: } y = R_{\max} \times \frac{1}{1 + \frac{k_d}{k_a \times [I]}} \times (1 - e^{-(k_a \times [I] + k_d) \times x}) \quad (4.2)$$

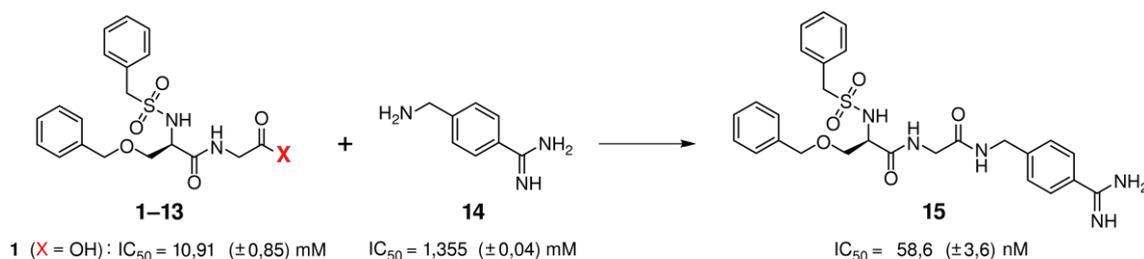
$$\text{Dissoziationsphase: } y_0 = R_{\max} \times \frac{1}{1 + \frac{k_d}{k_a \times [I]}} \times (1 - e^{-(k_a \times [I] + k_d) \times x_0}) \quad (4.3)$$

Somit konnte für Amin **14** ein  $K_I$ -Wert von 1,7 mM ( $Chi^2 = 0,16$ ;  $R^2 = 0,98$ ) sowie für das Fragment-Ligationsprodukt **15** ein  $K_I$ -Wert von 137 nM ( $Chi^2 = 0,17$ ;  $R^2 = 0,97$ ) ermittelt werden. Die Abweichungen zu den Ergebnissen des Enzymaktivitätsassays ergaben sich hier vermutlich aufgrund der Unterschiede des jeweiligen Assayformats. Beim Enzymaktivitätsassay lag das Enzym nicht auf einem Sensor immobilisiert vor, es wurde in kleineren Volumina in anderen Messplatten gearbeitet und während der Messung war ebenfalls ein Fluoreszenzsubstrat anwesend. Ebenfalls können leichte

Veränderungen im Bindungsverhalten der Inhibitoren am biotinylierten Enzym nicht komplett ausgeschlossen werden. Dennoch konnte durch den Einsatz von BLI eine ähnliche Größenordnung der Affinitäten von Fragment **14** und dem Ligationsprodukt **15** nachgewiesen werden. Gleichzeitig konnte ein reversibles Bindungsverhalten durch die von der Octet® Software berechneten Assoziations- und Dissoziationsgeschwindigkeiten von **14** und **15** bestätigt werden.

## 4.6. Suche nach einem geeigneten Aktivester

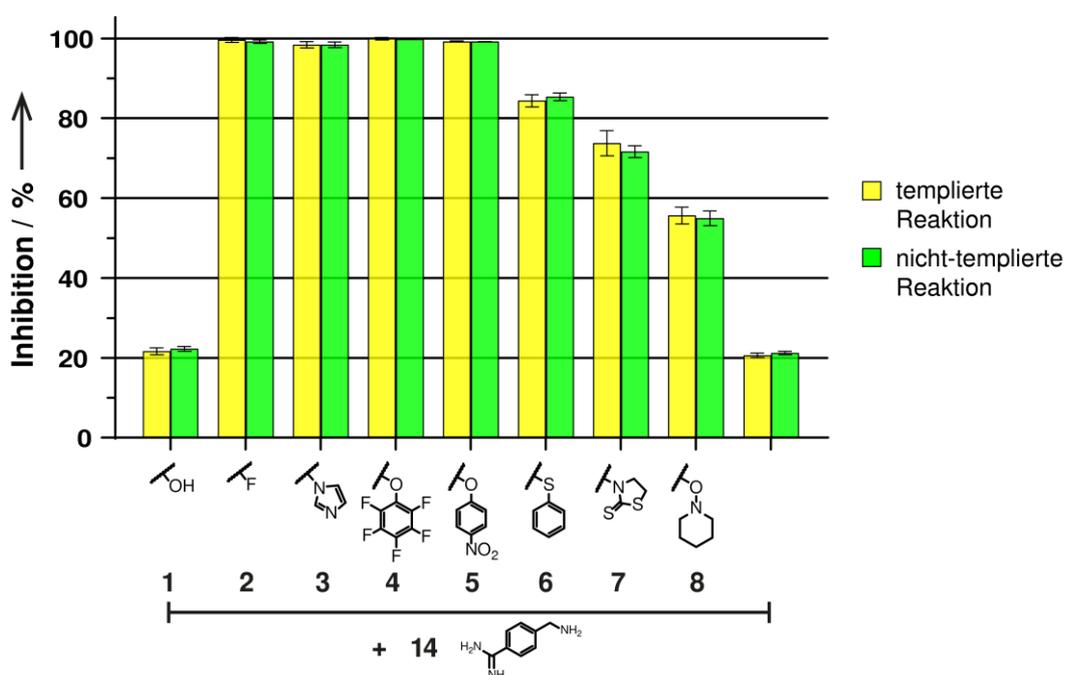
Die gemessenen Werte zeigen, dass aus zwei millimolar-aktiven Fragmenten, den Aktivestern **2–13** und dem Amin **14**, das Fragment-Ligationsprodukt **15** entsteht, welches mit einer, im Vergleich zu den Einzelfragmenten, stark erhöhten Affinitätssteigerung bis in den nanomolaren Bereich einhergeht (s. Schema 4.4).



**Schema 4.4.** Darstellung der Templat-unterstützten Amidierung. Aus zwei millimolar-aktiven Fragmenten wird ein nanomolar-aktives Fragment-Ligationsprodukt.

Somit war zu erwarten, dass bereits kleinste Mengen an gebildetem Ligationsprodukt **15** im Enzymaktivitätsassay detektierbar sein sollten. Auf Grundlage der ermittelten Werte wurde für **14** eine Konzentration gewählt, welche zu einer 20%igen Inhibition von Faktor Xa führte. Dies entsprach einer Konzentration von 171  $\mu\text{M}$ . Somit blieb für die Detektion der Bildung von **15** ein Messfenster von 0–80 % offen. Damit sollte ebenfalls eine sensitive Detektion einer potentiellen zusätzlichen Inhibition möglich sein, bedingt durch Bildung von **15** aufgrund der Templat-unterstützten Ligationsreaktion.

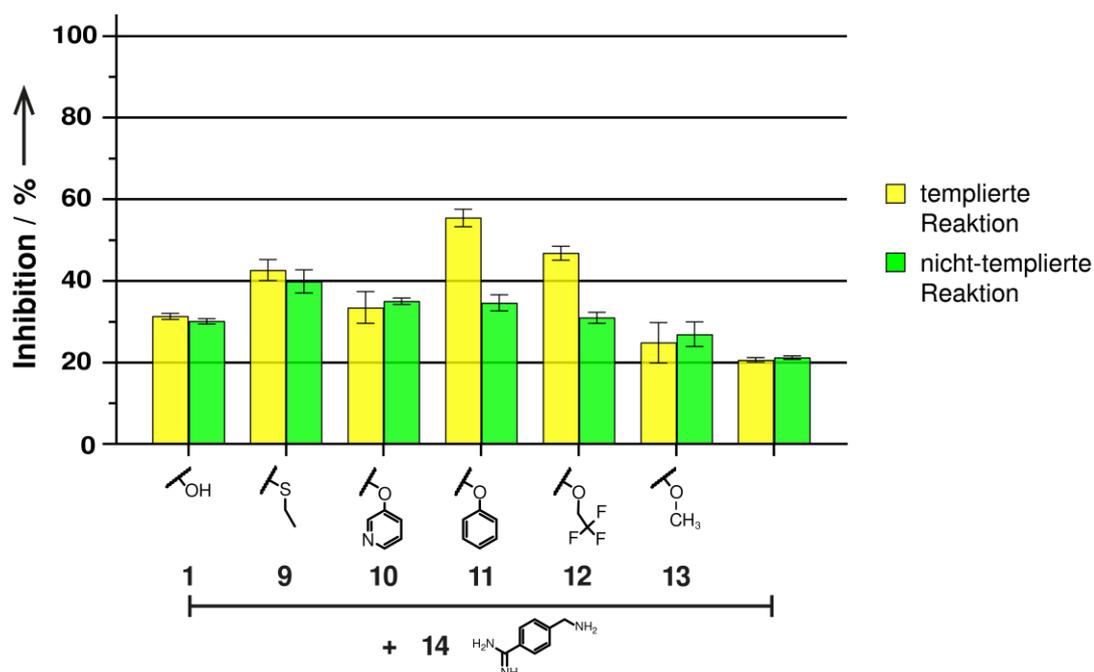
Bei der ersten Versuchsreihe des Ligationsassays wurde eine Aktivesterkonzentration von 285  $\mu\text{M}$  verwendet. Es wurde dabei für jeden Aktivester jeweils eine templierte Reaktion und eine nicht-templierte Reaktion durchgeführt. Bei der templierten Reaktion war das Zielprotein bzw. Templat während der zweistündigen Reaktionszeit anwesend. Die nicht-templierte Reaktion fand in Abwesenheit des Zielproteins statt. Zur Bestimmung der Enzymaktivität wurde dann auch bei der nicht-templierten Reaktion im Anschluss an die zweistündige Reaktion das Enzym zugegeben und anschließend für beide Reaktionen die Aktivität bestimmt (s. Abb. 4.6).



**Abbildung 4.6.** Abgebildet sind die Ergebnisse des Ligationsassays von Amin **14** (171  $\mu\text{M}$ ) mit den Aktivestern **2–8** (285  $\mu\text{M}$ ) inkubiert für 2 h jeweils mit und ohne Templat. Die Messung von Carbonsäure **1** (285  $\mu\text{M}$ ) mit Amin **14** sowie von Amin **14** allein dienten als Kontrolle.

Aktivester **2–5** zeigten hier sowohl für die templierte als auch für die nicht-templierte Reaktion eine vollständige Faktor Xa-Inhibition. Damit waren diese Verbindungen für den geplanten Ansatz der Templat-unterstützten Amidierungsreaktion ungeeignet. Die hohe Reaktivität dieser Aktivester führt bereits bei verhältnismäßig geringen Konzentrationen und damit verbunden einem geringen zu erwartenden Bindungsgrad, zu

einer zu starken Bildung des Ligationsprodukts **15**. Dadurch ist die Detektion einer zusätzlichen Inhibition, bedingt durch zusätzlich, templiert-gebildetes Ligationsprodukt nicht mehr möglich und erscheint bei dem geringen Aktivester-Bindungsgrad auch als unwahrscheinlich. Aktivester **6–8** zeigten ebenfalls bereits bei 285  $\mu\text{M}$  eine deutliche Inhibition. Eine Templat-unterstützte zusätzliche Bildung von **15** konnte jedoch nicht festgestellt werden. Die Aktivester **9–13** zeigten bei 285  $\mu\text{M}$  im Vergleich zur Kontrolle **1 + 14** keine zusätzliche Inhibition und daher auch keine Bildung von Ligationsprodukt **15** (Daten nicht gezeigt). Eine Templat-unterstützte Amidierungsreaktion konnte ebenfalls nicht festgestellt werden. Daher wurden diese Ester in einer zweiten Versuchsreihe nochmal bei einer Konzentration von 5 mM im Ligationsassay getestet (s. Abb. 4.7). Bei diesen hohen Konzentrationen war bereits ein hoher Bindungsgrad des Aktivesters zu erwarten, wodurch eine templierte Reaktion wahrscheinlicher wird.



**Abbildung 4.7.** Abgebildet sind die Ergebnisse des Ligationsassays von Amin **14** (171  $\mu\text{M}$ ) mit den Aktivestern **9–13** (5 mM) inkubiert für 2 h jeweils mit und ohne Templat. Die Messung von Carbonsäure **1** (5 mM) mit Amin **14** sowie von Amin **14** allein dienten als Kontrolle.

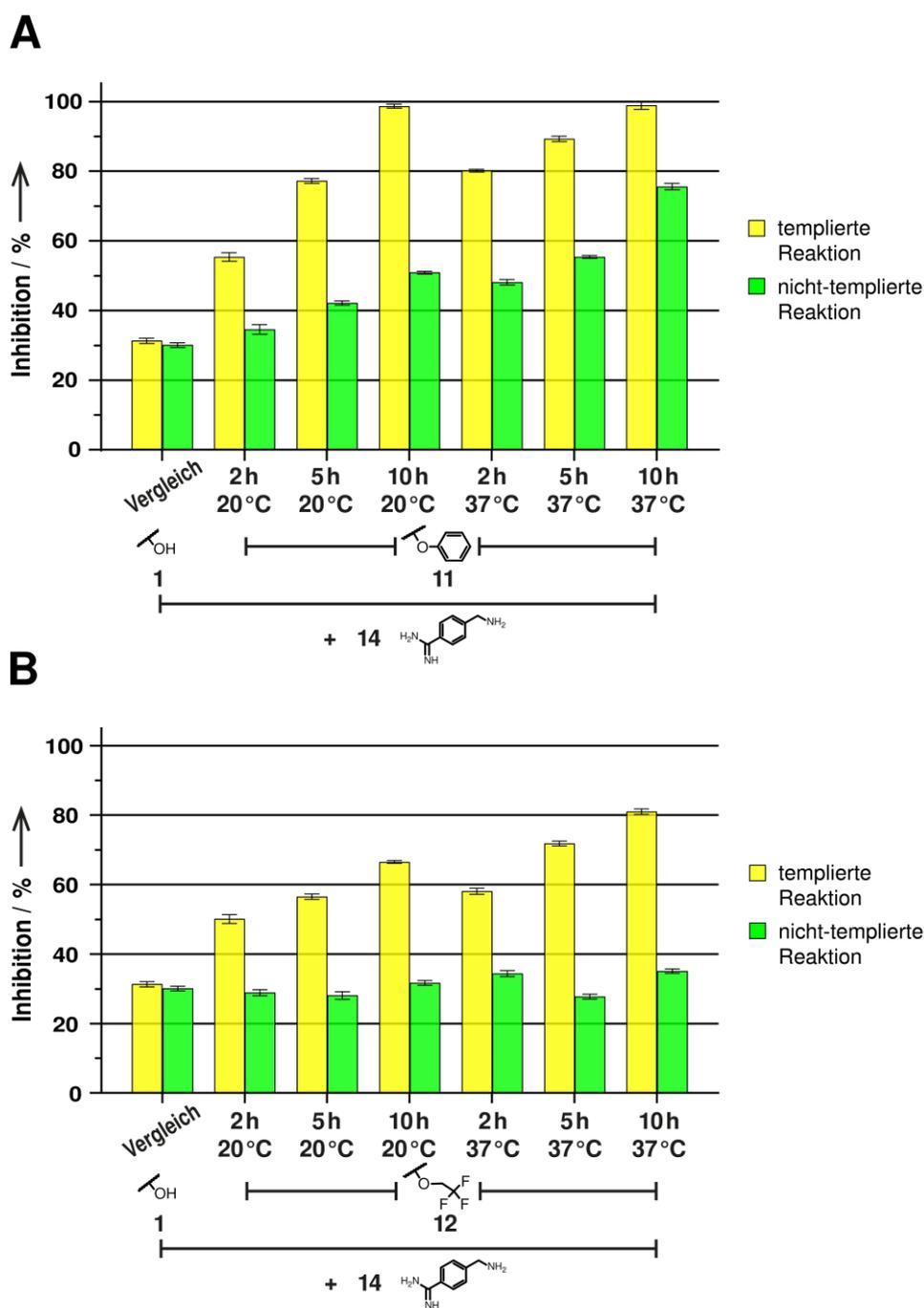
Diesmal zeigten auch die Aktivester **9–13** eine Zunahme der Inhibition, was auf die Bildung von Ligationsprodukt **15** schließen lässt. Lediglich der unreaktivste verwendete Ester, Methylester **13**, stellte hier eine Ausnahme dar. Bei diesem konnte auch bei einer Konzentration von 5 mM keine erhöhte Inhibition detektiert werden. Für Phenylester **11** und Trifluorethylester **12** konnte im Fall der templierten Reaktion sogar eine zusätzliche Inhibition im Vergleich zur nicht-templierten Reaktion festgestellt werden, was erstmals das mögliche Vorhandensein einer Templat-unterstützten Reaktion andeutete.

## 4.7. Maximierung des gefundenen Templat-Effekts

Dieser erste Hinweis auf eine Templat-unterstützte Amidierungsreaktion sollte anschließend mittels weiterer Experimente bestätigt werden. Dazu wurde zunächst geprüft, ob sich der gezeigte Templat-Effekt durch Variation der Reaktionsbedingungen verstärken lässt. Der Ligationsassay wurde daher für Verbindung **11** und **12** nochmals mit verlängerter Reaktionszeit und bei erhöhter Temperatur durchgeführt (s. Abb. 4.8).

Bei diesen veränderten Bedingungen konnte für Verbindung **11** eine deutlich erhöhte Inhibition beobachtet werden. Zwar konnte auch für die nicht-templierte Reaktion eine geringfügig erhöhte Inhibition festgestellt werden, jedoch zeigte sich hier ein signifikanter Unterschied zur Templat-unterstützten Reaktion. Auch bei Verbindung **12** konnte eine erhöhte Inhibition gemessen werden, wobei die verstärkte Inhibition jedoch ohne eine ebenfalls erhöhte Inhibition der nicht-templierten Reaktion einherging. Der Inhibitionswert für die nicht-templierte Reaktion blieb hier sogar nach 10 h Reaktionszeit bei 37 °C relativ konstant, wohingegen der Inhibitionsgrad für die templierte Reaktion auf ca. 80 % anstieg.

Somit konnten im Zuge des entwickelten Ligationsassays aus einer Reihe unterschiedlich reaktiver Aktivester zwei Aktivester identifiziert werden, bei denen ein deutlicher Templat-Effekt nachgewiesen werden konnte, wenn das Zielprotein während der Reaktionszeit mit anwesend war. Für den Trifluorethylesters **12** konnte sogar eine reine Templat-unterstützte Reaktion gezeigt werden, d. h. eine templierte Reaktion, die ohne jegliche Hintergrundreaktion abläuft.



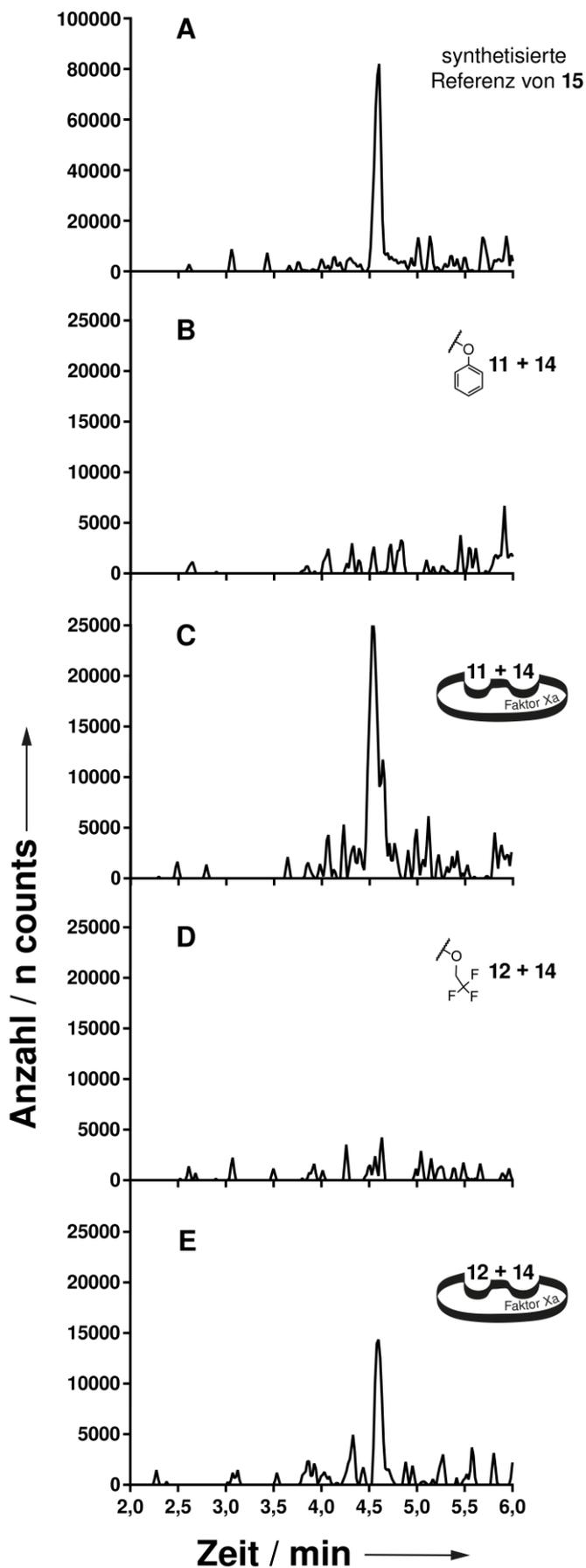
**Abbildung 4.8.** (A) Abgebildet sind die Ergebnisse des Ligationsassays von Amin **14** (171  $\mu\text{M}$ ) mit Aktiv-ester **11** (5 mM) unter unterschiedlichen Reaktionsbedingungen, inkubiert jeweils mit und ohne Templat. Die Messung von Carbonsäure **1** (5 mM) mit Amin **14** (171  $\mu\text{M}$ ) dient als Vergleich. (B) Zeigt die Ergebnisse des Ligationsassays von Amin **14** (171  $\mu\text{M}$ ) mit Aktiv-ester **12** (5 mM) unter unterschiedlichen Reaktionsbedingungen, inkubiert jeweils mit und ohne Templat. Die Messung von Carbonsäure **1** (5 mM) mit Amin **14** (171  $\mu\text{M}$ ) dient als Vergleich.

## 4.8. Detektion des Ligationsprodukts mittels LC/MS

Um sicherzustellen, dass tatsächlich die Bildung von Ligationsprodukt **15** für die zusätzliche Inhibition verantwortlich war, sollte nun dessen direkter Nachweis mittels Hochleistungsflüssigkeitschromatographie-Massenspektrometrie (LC/MS) erfolgen. Bei dieser Methode wird die eingespritzte Probe zunächst über eine Umkehrphasen-Trennsäule (C18) geleitet und in die einzelnen Bestandteile aufgetrennt. Hinter die Trennsäule ist ein UV/VIS-Detektor mit Diodenarray (DAD) geschaltet, der eine Identifizierung der getrennten Substanzen aufgrund ihrer absorptiven Eigenschaften ermöglicht. Im Anschluss wird die mobile Phase zum Massenspektrometer geleitet.

Hier werden die Substanzen in die Gasphase überführt und ionisiert. Im Zuge dieser Experimente wurde die Elektronenspray-Ionisation verwendet, wobei hauptsächlich  $[M+H]^+$ ,  $[M-H]^-$  sowie  $[M+Na]^+$ -Addukte gebildet werden. Der nachgeschaltete Massenanalysator trennt die resultierenden Ionen nun nach ihrem  $m/z$ -Verhältnis. Als Analysator kam hier ein Single-Quadrupol zum Einsatz. Die aufgetrennten Ionen bzw. Ionenströme werden dann vom Massendetektor erfasst und in ein Massenspektrum umgewandelt. In diesem ist das  $m/z$ -Verhältnis gegen die relative Intensität aufgetragen. Die Messung kann in verschiedenen Modi erfolgen. Im Scan-Modus werden alle Ionen erfasst, deren Molmasse im eingestellten Massenbereich liegen. Man erhält dabei ein Totalionenchromatogramm (TIC). In diesem ist die Zeit gegen die Summe aller zum jeweiligen Zeitpunkt detektierten Ionenströme aufgetragen. Hieraus lässt sich anschließend ein extrahiertes Ionenchromatogramm (EIC) erzeugen, welches ein vereinfachtes Chromatogramm darstellt, in dem nur ausgewählte Massen dargestellt werden. Mittels Integration des EICs ist ebenfalls die Quantifizierung einer bestimmten Substanz bzw. eines bestimmten Ions möglich.

Zur Identifizierung des Ligationsprodukts **15** wurde zunächst die synthetisierte Referenzverbindung vermessen. Zur Herstellung der Referenzlösung wurde dabei ebenfalls der Assaypuffer verwendet, um identische Bedingungen der Probenmatrices zu schaffen. Mit der ermittelten Retentionszeit und der zugehörigen Masse der Referenz war so eine eindeutige Identifizierung der im Ligationsassay inhibierenden Spezies möglich (s. Abb. 4.9).



**Abbildung 4.9.** Abgebildet sind die extrahierten Ionenchromatogramme für das Signal des Ligationsprodukts **15**  $[M+H]^+$ ,  $m/z$  538.

**(A)** Synthetisierte Referenz von Verbindung **15**.

**(B)** Phenylester **11** mit Amin **14** inkubiert für 2 h in Abwesenheit des Templats.

**(C)** Phenylester **11** mit Amin **14** inkubiert für 2 h in Anwesenheit des Templats (Faktor Xa).

**(D)** Trifluorethylester **12** mit Amin **14** inkubiert für 2 h in Abwesenheit des Templats.

**(E)** Trifluorethylester **12** mit Amin **14** inkubiert für 2 h in Anwesenheit des Templats (Faktor Xa).

Tatsächlich zeigte sich in diesen Experimenten, dass die erhöhte Inhibition im Ligationsassay mit einer vermehrten Bildung von Ligationsprodukt **15** einhergeht. Wie ebenfalls aufgrund der gemessenen Inhibitionswerte im Ligationsassay zu erwarten war, konnte bei der Templat-unterstützten Umsetzung des Phenylesters **11** mit Amin **14** eine höhere Produktbildung im Vergleich zur Umsetzung von Trifluorethylester **12** mit Amin **14** festgestellt werden. Die im Ligationsassay gemessene, leichte Erhöhung der Inhibition für die nicht-templierte Reaktion von **11** mit **14** konnte hier nicht gezeigt werden. Dies lag vermutlich an der zu geringen Sensitivität des Single-Quadrupols. Da im Zuge des Ligationsassays nur sehr geringe Mengen des Ligationsprodukts gebildet werden, musste zum Erhalt eines deutlich sichtbaren Signals im Chromatogramm, ein verhältnismäßig großes Massenfenster von  $\pm 0,5 m/z$  gewählt werden. Dies führt gleichzeitig zu einem erhöhtem Grundrauschen im Chromatogramm, womit ebenfalls denkbar ist, dass die zu erwartende minimale Produktbildung für die nicht-templierte Reaktion von **11** mit **14** vom Grundrauschen „verschluckt“ wurde.

## 5. Untersuchung der Templat-unterstützten Amidierungsreaktion

Die gefundene Templat-unterstützte Amidierungsreaktion von Amin **14** mit den Aktivestern **11** und **12** sollte im Anschluss nun näher untersucht werden. Dazu wurde zunächst das im Zuge der Templat-unterstützten Reaktion gebildete Ligationsprodukt quantifiziert und der zeitliche Verlauf der Reaktion genauer betrachtet.

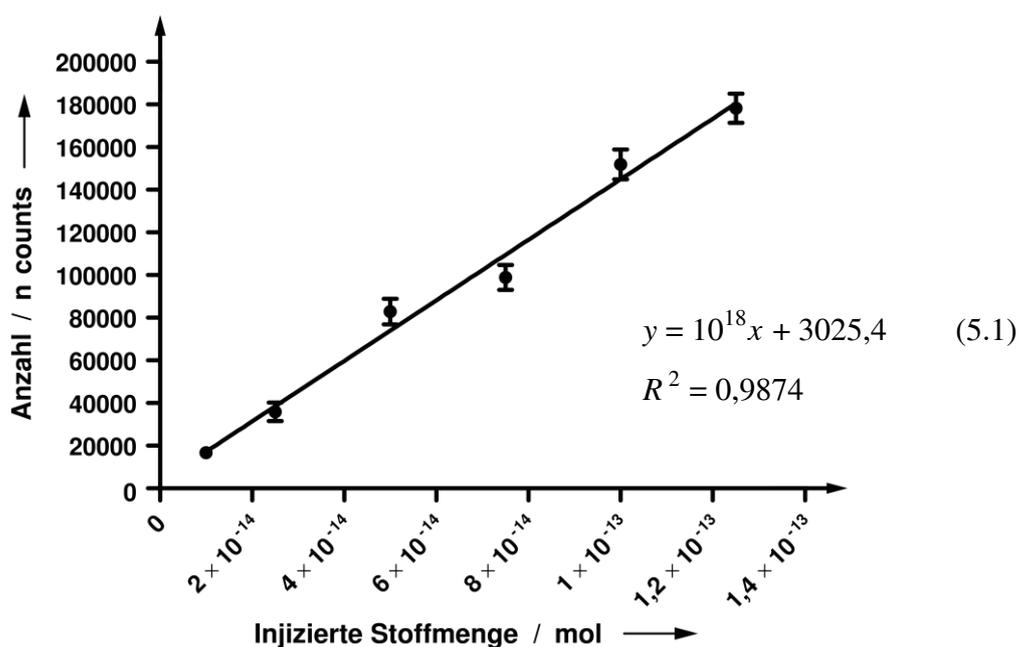
### 5.1. Quantifizierung des Ligationsprodukts mittels QTOF/MS

Da sich das in 4.8. genutzte Single-Quadrupol-LC/MS-Instrument aufgrund der zu geringen Sensitivität nicht zur Quantifizierung des gebildeten Ligationsprodukts eignete, wurde hierzu ein sehr viel sensitiveres, hochauflösendes Quadrupol-Flugzeit(QTOF)-Massenspektrometer eingesetzt.<sup>11671</sup> Das Spektrometer war hierbei ebenfalls mit einem LC bzw. UHPLC-System gekoppelt. Bei diesem Instrument gelangen die erzeugten Ionen, nachdem sie den Quadrupol durchquert haben, zunächst in eine Kollisionszelle und anschließend in das Flugrohr. Hier werden die einzelnen Ionen bzw. Massen aufgetrennt. Durch eine Spannungsquelle wird ein kurzer Spannungstoß erzeugt, welcher die Ionen im Flugrohr beschleunigt. Diese fliegen aufgrund ihrer unterschiedlichen Massen auch unterschiedlich schnell. Bei gegebener kinetischer Energie erreichen kleine Massen dabei eine höhere Geschwindigkeit als Große. Ein Ionenspiegel reflektiert die Ionen am Ende des Flugrohrs wieder zurück zum Detektor und auf Basis der massenabhängigen Flugzeit kann die jeweilige Masse des Ions ermittelt werden.

Zur Quantifizierung der im Ligationassay gebildeten Mengen von Verbindung **15** wurde zunächst eine Kalibriergerade erstellt. Hierbei wurde der *find by formula*-Algorithmus der *MassHunter*-Software mit der Summenformel  $C_{27}H_{31}N_5O_5S$  (entspricht Verbindung **15**) benutzt. Das Programm erzeugt dabei ein extrahiertes Ionenchromatogramm

auf Basis der eingegebenen Summenformel und den gewählten  $[M+H]^+$ - und  $[M+Na]^+$ -Addukten sowie deren +1 Isotope. Zur Identifizierung der jeweiligen Verbindung nutzt die *MassHunter*-Software dabei die exakte Masse, das Isotopenmuster und die Abstände der einzelnen Isotope zueinander.

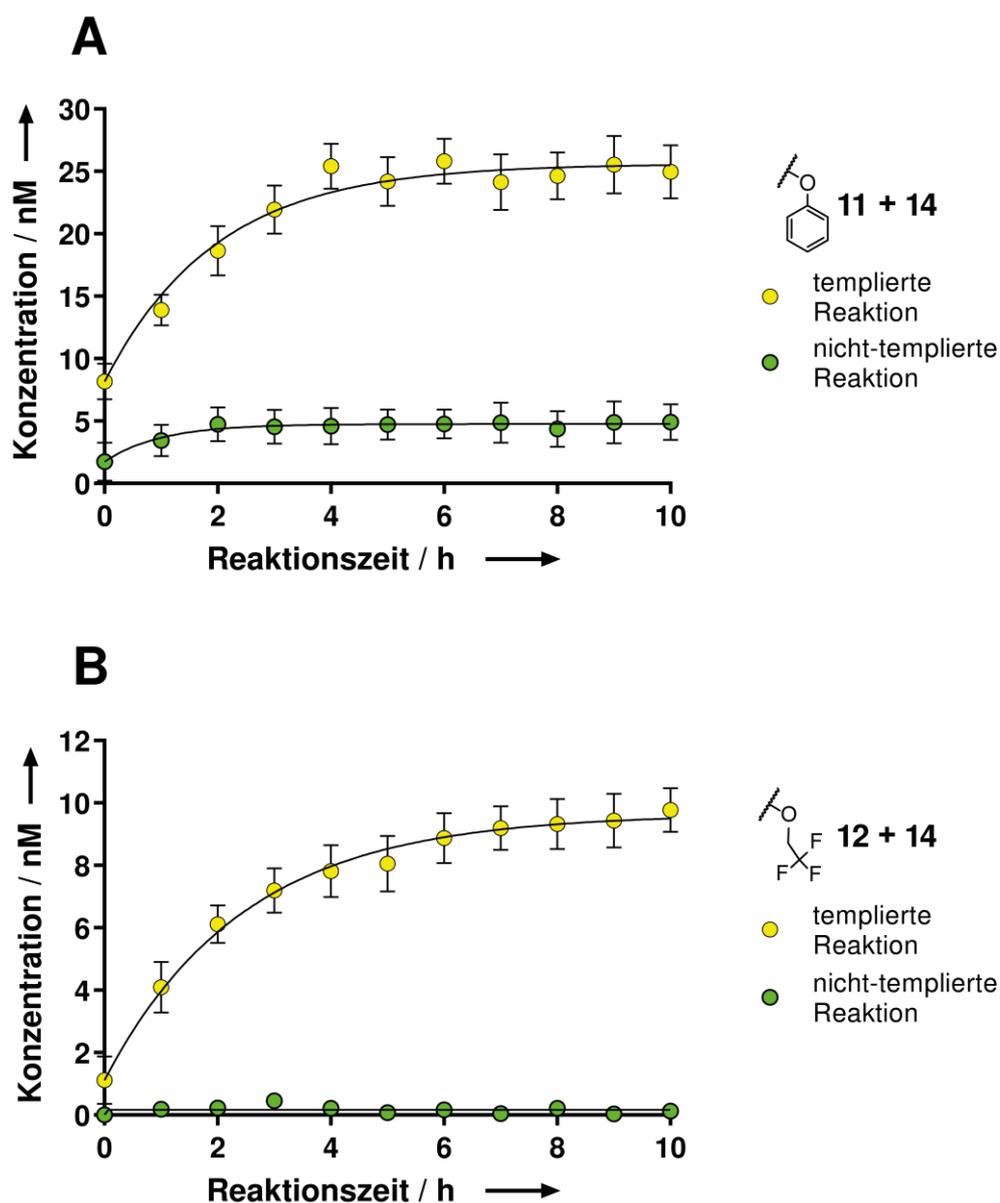
Zur Erstellung der Kalibriergeraden wurden sechs unterschiedlich konzentrierte Referenzlösungen der synthetisierten Verbindung **15** vermessen. Die aus den extrahierten Ionenchromatogrammen ermittelten Peakflächen wurden anschließend gegen die jeweils injizierte Stoffmenge aufgetragen (s. Abb. 5.1). Hieraus konnte mittels linearer Regression eine Kalibriergerade erstellt werden.



**Abbildung 5.1.** Dargestellt ist die ermittelte Kalibriergerade und deren Funktionsgleichung. Das Bestimmtheitsmaß  $R^2$  der ermittelten Gerade beträgt 0,9874.

Auf Grundlage dieser Kalibriergeraden konnte die im Zuge des Ligationsassays gebildete Menge von Verbindung **15** quantifiziert werden sowie der zeitliche Verlauf der Reaktion näher untersucht werden. Hierzu wurden von den beiden Fragmentpaaren **14 / 11** und **14 / 12** jeweils Ansätze mit und ohne Templat hergestellt. Diese wurden anschließend in einstündigen Intervallen mittels LC-QTOF-MS vermessen.

Die aus dem extrahierten Ionenchromatogramm erhaltenen Peakflächen konnten dann mithilfe der Kalibriergeraden in die entsprechenden Konzentrationen von **15** umgerechnet werden. Diese Konzentrationen wurden anschließend gegen die jeweilige Reaktionszeit aufgetragen (s. Abb. 5.2).



**Abbildung 5.2.** Dargestellt ist der zeitliche Verlauf der Bildung von Ligationsprodukt **15**. **(A)** Verlauf der templierten und nicht-templierten Reaktion von Amin **14** mit Phenylester **11**. **(B)** Verlauf der templierten und nicht-templierten Reaktion von Amin **14** mit Trifluorethylester **12**.

Für die templierte Reaktion von Phenylester **11** mit Amin **14** zeigte sich hier ein steiler Konzentrationsanstieg in den ersten drei Stunden, der dann jedoch stark abflachte. Ab Stunde vier stellte sich ein Plateau bei einem Wert von ca. 26 nM ein. Wie aufgrund der leichten zusätzlichen Inhibition im Ligationsassay zu erwarten war, konnte für die nicht-templierte Reaktion von **14** und **11** eine geringfügige Hintergrundreaktion nachgewiesen werden. Es wurde hier eine Ligationsprodukt-Konzentration von ca. 5 nM ermittelt.

Die templierte Reaktion von **14** und **12** zeigte ebenfalls zunächst einen steilen Konzentrationsanstieg in den ersten drei Stunden. Ab der sechsten Stunde stellte sich ebenfalls ein Plateau bei einem Wert von ca. 10 nM ein. Die ermittelten Werte für die nicht-templierte Reaktion decken sich auch hier mit den Ergebnissen aus dem Ligationsassay und bestätigen nochmals, dass die Amidierungsreaktion von Amin **14** und Trifluorethylester **12** selektiv Templat-unterstützt verläuft und nur eine minimale Umsetzung zum Produkt (0,15 nM) aufgrund der Hintergrundreaktion detektierbar ist. Da die Kurven beider templierter Reaktionsansätze ein Sättigungsverhalten mit Annäherung an eine maximale Konzentration  $c_{\max}$  zeigen, lässt sich der Kurvenverlauf mittels einphasiger exponentieller Assoziationsfunktion beschreiben (Gleichung 5.2).

$$c = c_{\max} \times (1 - e^{-k \times x}) \quad (5.2)$$

Daraus lässt sich mittels nicht-linearer Regression für die Amidierungsreaktion von Phenylester **11** und Amin **14** eine  $c_{\max}$  von 25,6 nM errechnen mit einer Halbwertszeit von 1,4 h. Für die Umsetzung von Trifluorethylester **12** mit Amin **14** erhält man eine  $c_{\max}$  von 9,6 nM und eine Halbwertszeit von 1,7 h. Das gemessene Sättigungsverhalten lässt sich durch die Tatsache erklären, dass bei der Bildung von Ligationsprodukt **15** ein autoinhibitorischen Prozess vorliegt. Da das Enzym in ungebundener, freier Form zwingende Voraussetzung für die Templat-unterstützte Reaktion ist und dieses im Laufe der Reaktion immer mehr vom gebildeten, hochpotenten Inhibitor **15** „abgeschirmt“ vorliegt, wird bei fortlaufender Reaktion die Wahrscheinlichkeit immer geringer, dass die beiden Ausgangsfragmente ein freies Enzymmolekül finden und Templat-unterstützt zu **15** umgesetzt werden können.

## 5.2. Acylamidin-Nebenprodukt

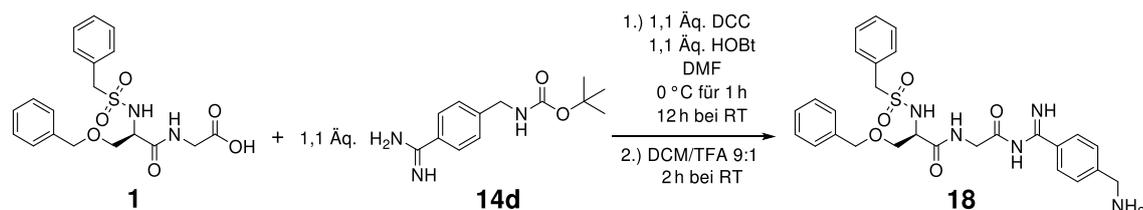
Im Zuge der LC-QTOF-MS-Untersuchung der Templat-unterstützten Amidierungsreaktion konnte über den *find by formula*-Algorithmus der MassHunter Software eine zweite, in der Lösung befindliche Spezies detektiert werden, welche eine zu Verbindung **15** identische Summenformel und damit auch Masse besitzt.

Die Messung einer synthetischen Referenz von **15**, bei der versucht wurde eine im Vergleich zu den im Ligationsassay verwendeten Ansätzen identische Probenmatrix zu erzeugen, zeigte einen scharfen Peak bei einer Retentionszeit von 3,6 Minuten mit den zu erwartenden Massen der  $[M+H]^+$ - und  $[M+Na]^+$ -Addukte. Bei der Messung der Proben aus dem Ligationsassay war jedoch ein zweiter Peak bei einer Retentionszeit von 3,2 Minuten zu erkennen, für den mit starken Schwankungen in etwa eine Peakfläche von 10–30 % des eigentlichen Produkt **15**-Peaks ermittelt werden konnte.

Um Löslichkeitsprobleme oder Säulenüberladung auszuschließen, wurden sämtliche Kombinationen der Einzelkomponenten des Ligationsassay-Ansatzes mittels LC-QTOF-MS vermessen, wobei jedoch kein Doppelpeak oder Ähnliches zu beobachten war. Dieser zweite Peak im Spektrum trat nur auf, wenn alle Komponenten des Ligationsassays in der Probe enthalten waren. Somit musste es sich bei diesem zweiten Peak um ein bis dahin nicht erwartetes Nebenprodukt handeln.

Potentiell konnte diese unerwartete Reaktivität nur von der Amidin-Funktion von Verbindung **14** ausgehen. Dieser Verdacht wurde durch Literaturrecherche bestätigt. Zwar wurden Amidine und Guanidine in der Vergangenheit meist als nicht-nukleophile, starke Basen betrachtet, jedoch wurde in den letzten Jahren auch immer häufiger vom Einsatz bestimmter Amidine und Guanidine als nukleophile Katalysatoren berichtet, u. a. auch im Zuge von Acyl-Transfer Reaktionen.<sup>[168, 169]</sup> Hierbei greift das Amidin zunächst an einem Acyldonor bzw. aktiviertem Carbonsäurederivat an, wobei eine geladene, hochreaktive *N*-Acyl-Zwischenstufe gebildet wird.<sup>[170]</sup> Dieses Intermediat kann im Anschluss von einem beliebigen Nukleophil angegriffen werden, wobei das Amidin als Katalysator der Reaktion wieder regeneriert wird.

Um zu bestätigen, dass es sich beim zweiten detektierten Peak tatsächlich um das *N*-Acylamidin **18** handelte, sollte die Verbindung nun gezielt synthetisiert und isoliert werden (s. Schema 5.1).<sup>[171]</sup> Hierzu wurde Verbindung **14** zunächst Boc-geschützt und dann in stark alkalisiertem Wasser aufgenommen. Durch Extraktion mit Dichlormethan konnte so Verbindung **14d** mit freier Amidinfunktion erhalten werden.

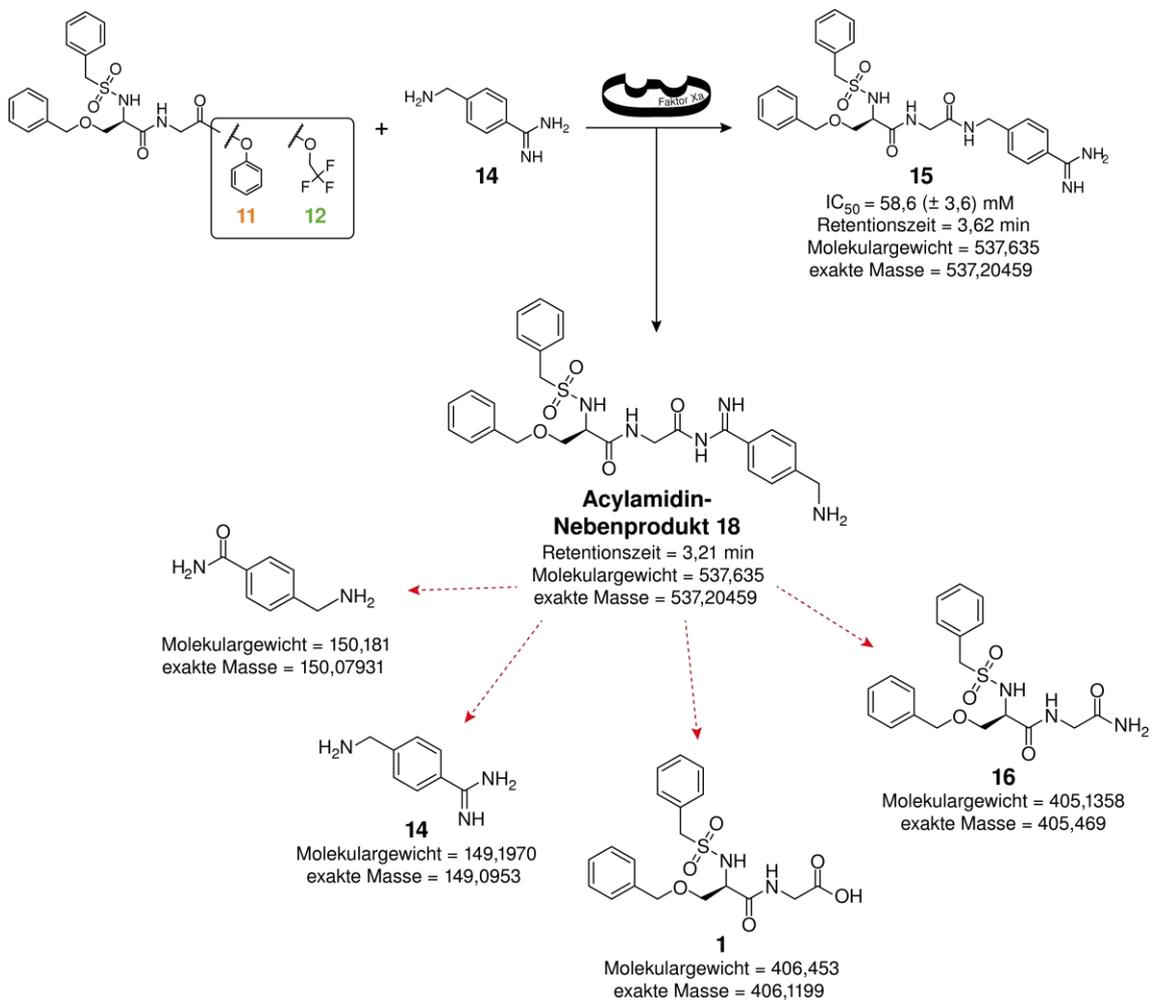


**Schema 5.1.** Schematische Darstellung der Synthese von Verbindung **18**.

Zur Kupplung der Carbonsäure **1** mit Amidin **14d** wurde eine DCC/HOBt-Kombination verwendet. Nach 13 h konnte mittels LC/MS die komplette Umsetzung von **1** nachgewiesen werden. Die nachfolgende Boc-Entschützung stellte sich aufgrund der hohen Instabilität von **18** als problematisch heraus. Am besten funktionierte hier ein klassisches DCM/TFA 9:1-Gemisch, welches zu einer Rohausbeute von 72 % führte. Auch bei der nachfolgenden Aufreinigung des Rohprodukts führte die Instabilität von Verbindung **18** zu Schwierigkeiten. Ein erster Versuch mittels basischer Extraktion und der Aufreinigung durch präparative HPLC schlug fehl. Jegliche Extraktionsversuche mit wässrigen Lösungen führten zu massiven Ausbeuteverlusten. Am Ende wurde eine Flash-Chromatographie mit DCM/MeOH 95:5 durchgeführt, wobei Produkt **18** in einer Gesamtausbeute von 26 % mit minimalen Spuren von Zersetzungsprodukten erhalten wurde. Ein geringer Methanol-Anteil war hier vonnöten um eine zufriedenstellende Trennung zu erhalten. Andere Fließmittelkombinationen, die keine Nukleophile enthielten, stellten sich als ungeeignet heraus.

Aufgrund der Tatsache, dass das Nebenprodukt **18** potentiell ebenfalls zur im Ligationsassay gemessenen Inhibition beitragen könnte, sollte das isolierte Produkt **18** nun dazu verwendet werden eine Kalibriergerade (vgl. Abschnitt 5.1) zu erstellen, um so die

gebildeten Mengen quantifizieren zu können. Gleichzeitig sollte der  $IC_{50}$ -Wert der Verbindung bestimmt werden. Somit könnte ermittelt werden, ob die Affinität von **18** ausreicht, um in den gebildeten Konzentrationsbereichen einen Einfluss auf die Enzymaktivität zu haben. Leider war die Stabilität von Verbindung **18** jedoch unter keiner der getesteten Bedingungen ausreichend, um die geplanten Experimente durchzuführen. Insbesondere die Anwesenheit von Wasser scheint großen negativen Einfluss auf die Stabilität des Acylamidins zu haben. Mittels LC-QTOF-MS konnten zahlreiche Zersetzungsprodukte von **18** identifiziert werden (s. Abb. 5.3).



**Abbildung 5.3.** Entstehung des Acylamidin-Nebenprodukts und dessen mittels LC-QTOF-MS detektierte Zerfallsprodukte. Neben der Hydrolyse der Carbonylfunktion des Acylamidins mit Zerfall zu Amin **14** und Carbonsäure **1**, konnte ebenfalls die Hydrolyse der Imino-Funktion des Acylamidins nachgewiesen werden.

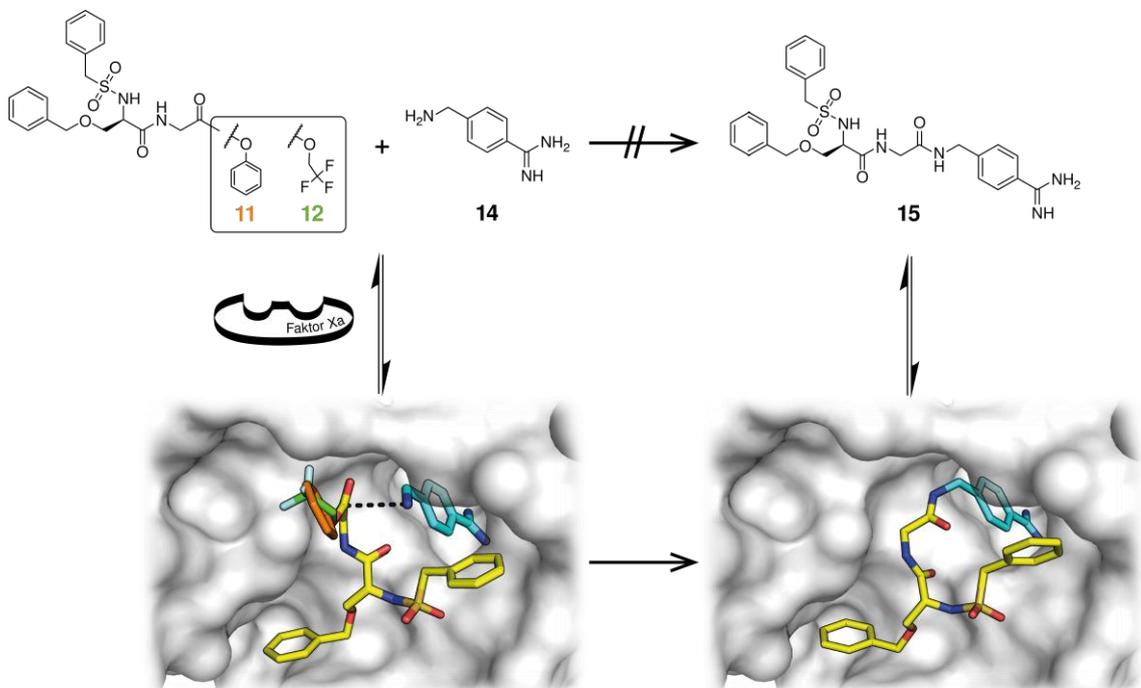
Fraglich bleibt, welchen Einfluss die Messung im LC-QTOF-MS selbst auf die Zersetzung von **18** besitzt. Kritische Parameter sind hier bspw. die Trennung auf der LC-Trennsäule (mobile Phase: H<sub>2</sub>O/MeCN; 0,1 % Ameisensäure) sowie die Ionisierung in der ESI-Quelle.

Aufgrund der zu geringen Stabilität von **18** konnte der mögliche Störeinfluss auf die Ergebnisse des Ligationsassays nicht abschließend geklärt werden. In Arbeiten von Lam *et al.* aus dem Jahr 2003 konnte jedoch gezeigt werden, dass ein P1-Austausch des Benzamidins gegen Benzylamin mit einer mehr als 200-fachen Abnahme der Faktor Xa-Bindungsaffinität einhergeht.<sup>[82]</sup> Ähnliches konnte in Arbeiten von Markwardt *et al.* gezeigt werden, wo diverse P1-Bausteine an verschiedenen Serin-Proteasen getestet wurden. Bei Serum-Kallikrein führte der Benzamidin/Benzylamin-Austausch zu einem vollständigen Affinitätsverlust im Fall des unsubstituierten Benzylamins. Bei einer etwas komplexeren Verbindung (Benzylamin-substituiert,  $M = 193$  g/mol; Benzamidin-substituiert,  $M = 206$  g/mol) führte der Austausch zu einer Bindungsaffinität-Abnahme um mehr als das 1000-fache.<sup>[172]</sup> In einer weiteren Arbeit testete Markwardt *et al.* nochmals Benzamidin- und Benzylamin-substituierte Fragmente und verglich dabei die Affinität bei drei verschiedenen Serin-Proteasen (Trypsin, Thrombin, Plasmin). Auch hier konnte gezeigt werden, dass ein Benzamidin/Benzylamin-Austausch zu 5- bis 56-fachen Affinitäts-Abnahmen führte.<sup>[173]</sup>

Somit ist auch bei Verbindung **18** im Vergleich zu **15** mit deutlichen Affinitäts-einbußen zu rechnen und der Einfluss auf den Ligationsassay kann daher als gering eingeschätzt werden.

### 5.3. Untersuchung der aufgeklärten Struktur von Faktor Xa im Komplex mit Inhibitor 15

Abschließend sollte nun der sterische und mechanistische Verlauf der gefundenen Templat-unterstützten Amidierungsreaktion näher untersucht werden (s. Abb. 5.4). Dies geschah auf Basis der Kristallstruktur<sup>1</sup> von Faktor Xa im Komplex mit Inhibitor **15** (PDB: 5K0h).<sup>[115, 133]</sup> Der Kristallkomplex wurde durch *Back-Soaking* erhalten. Diese Methode nutzt einen bestehenden Faktor Xa / Inhibitor-Komplex, welcher in eine Lösung des zu kristallisierenden Inhibitors gegeben wird.



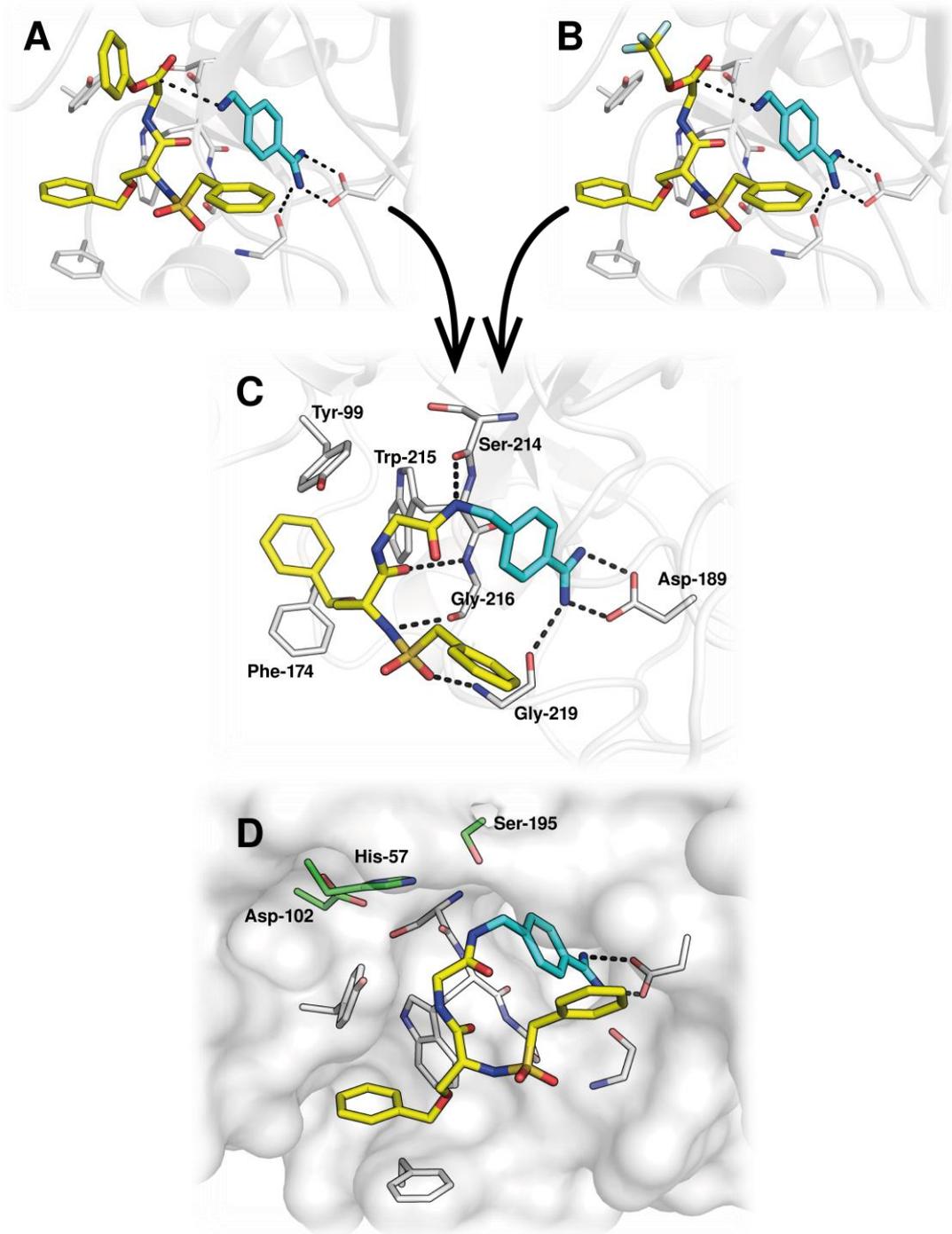
**Abbildung 5.4.** Schematische Darstellung der Templat-unterstützten Reaktion und der zum Ablauf der Reaktion notwendigen Interaktion der Fragmente mit dem Templat. Der Komplex, bestehend aus den beiden Aktivestern **11/12** und Amin **14** (unten), wurde auf Grundlage des Faktor Xa / Ligationprodukt **15**-Komplexes modelliert (PDB: 5K0h).

<sup>1</sup> Die Kristallstruktur wurde von Prof. Dr. Torsten Steinmetzer (Institut für Pharmazeutische Chemie der Philipps-Universität Marburg) zur Verfügung gestellt und auf PDB unter dem Code 5K0h abgelegt. Die Strukturanalyse wurde von der Firma Proteros Biostructures GmbH (Planegg-Martinsried, Deutschland) unter der Projektleitung von Dr. Nils Ostermann durchgeführt.

Der Ansatz wird mehrere Tage stehen gelassen. Da der zu kristallisierende Inhibitor im Überschuss eingesetzt wird, erfolgt eine Verdrängung bzw. Substitution des gebundenen Inhibitors mit dem sich in Lösung befindlichen Inhibitor. Auf diese Weise konnte der Faktor Xa/Inhibitor **15**-Kristallkomplex erhalten werden. Die eigentliche Strukturauflösung wurde im Anschluss am Synchrotron durchgeführt. Synchrotronstrahlung zeichnet sich durch eine hohe Intensität und Fokussierbarkeit aus. Zur Strukturaufklärung wird der erhaltene Co-Kristall mit einem gebündelten Röntgenstrahl beschossen. Die Wellenlängen dieser Strahlung liegen im Ångstrom-Bereich ( $1 \text{ \AA} = 0,1 \text{ nm}$ ) und können daher an den Elektronen der sich im Kristall befindenden Atome/Moleküle gebeugt bzw. gestreut werden. Hierbei wird ein spezifisches Diffraktionsmuster erzeugt, welches dazu verwendet werden kann, Rückschlüsse auf die Elektronendichte und damit auch auf den molekularen Aufbau des Kristallkomplexes zu ziehen. So konnte die Struktur des Protein / Inhibitor-Komplexes in einer hohen Auflösung von  $2,2 \text{ \AA}$  aufgeklärt werden.

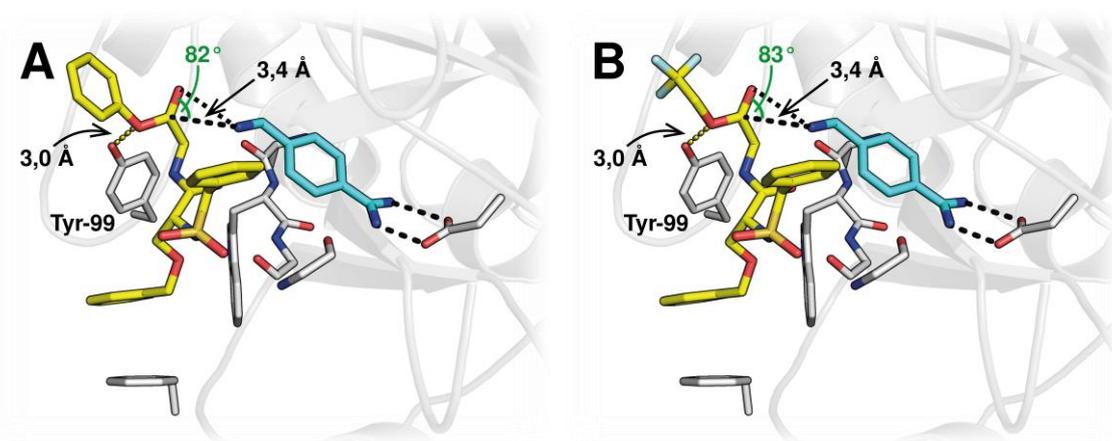
Mithilfe der aufgelösten Struktur konnten einige Annahmen, die zu Beginn der Arbeit getroffen wurden, bestätigt werden. Wie zu erwarten war, bindet der Benzamidin-Rest von Inhibitor **15** in die S1-Bindetasche des Enzyms und interagiert dort mit Asp-189 (s. Abb. 5.5). Damit trägt die Benzamidin-Funktion in hohem Maße zur freien Bindungsenergie des Inhibitors bei und ist essentiell für die hohe Affinität von **15** zum Zielprotein.

Ebenfalls bestätigt werden konnte die proklamierte Bindung der *O*-Benzyl- und *N*-Benzylsulfonyl-Reste in die Bindetaschen S2–S4. Die Tatsache, dass hier nur verhältnismäßig schwache Interaktionen zum Zielprotein möglich sind, erklärt die geringe Affinität der Aktivester zum Enzym. Ausgehend von der aufgeklärten Struktur des Protein / Inhibitor **15**-Komplexes konnten modellierte Faktor Xa-Komplexe der Aktivester **11/12** und Amin **14** berechnet werden, aus denen die Bindungsmodi der reagierenden Fragmente abgeleitet werden konnten. Die modellierte Komplexe konnten ebenfalls bestätigen, dass die zuvor beschriebene (s. Abschnitt 2), über ein Acyl-Enzym-Intermediat verlaufende, Protease-katalysierte Bildung einer Amidbindung hier nicht möglich bzw. sehr unwahrscheinlich ist. Grund dafür ist die zu große Distanz des katalytischen Serins zum Carbonyl-Kohlenstoff des Aktivesters. Für Phenylester **11** wurde hier ein Abstand von  $4,8 \text{ \AA}$  gemessen. Beim Trifluorethylester **12** wurden  $4,9 \text{ \AA}$  ermittelt.



**Abbildung 5.5.** (A)+(B) Abgebildet sind die auf Basis der aufgeklärten Struktur des Protein / Inhibitor-Komplexes (PDB: 5K0h) modellierten Faktor Xa-Komplexe der Aktivester **11** (A) bzw. **12** (B) mit Amin **14**. Die Aktivester sind gelb dargestellt, 4-Aminomethylbenzamidin in cyan. (C) Zeigt das im Zuge der Templat-unterstützten Amidierung gebildete Ligationsprodukt **15** mit den wichtigsten, an der Inhibitorbindung beteiligten Aminosäureresten. (D) Darstellung der Proteinoberfläche mit gebundenem Inhibitor **15**. Die wichtigsten Aminosäure-Interaktionspartner sind in grau abgebildet, die Aminosäuren der katalytischen Triade in grün.

Anhand der modellierten Faktor Xa-Komplexe von Aktivester **11/12** und Amin **14** sollte anschließend eine detailliertere Betrachtung des sterischen Verlaufs der templierten Fragment-Verknüpfung erfolgen (s. Abb. 5.6). Gleichzeitig sollte überprüft werden, ob die Position und räumliche Orientierung, der an der Reaktion beteiligten funktionellen Gruppen, eine Templat-unterstützte Reaktion der Fragmente zulässt bzw. begünstigt und somit die aufgestellte Hypothese einer templierten Amidierung bekräftigen kann.



**Abbildung 5.6.** Darstellung der modellierten Faktor Xa-Komplexe von Aktivester **11** (A) bzw. **12** (B) und Amin **14**. Abgebildet ist ebenfalls die Interaktion der Aktivester bzw. Aktivesterkomponenten mit Tyr-99, welche potentiell eine entscheidende Rolle beim beobachteten Templat-Effekt spielt. Interaktionen sind durch gestrichelte Linien dargestellt. Der N-C-O-Winkel ist in grün abgebildet.

Zunächst wurde die Distanz des angreifenden Amin-Stickstoffs zum Carbonyl-Kohlenstoff des aktivierten Esters ermittelt. Dabei konnte für beide Aktivester ein Wert von 3,4 Å bestimmt werden. Um zu ermitteln, ob eine intermolekulare Interaktion zweier Atome innerhalb eines Kristallkomplexes möglich ist, werden meist die jeweiligen Van-der-Waals-Radien der beiden potentiell interagierenden Atome herangezogen.<sup>[174, 175]</sup> Hierzu wird zunächst die Summe der Radien gebildet: Für das Stickstoff- und das Kohlenstoffatom beträgt diese 3,25 Å. Der errechnete Wert wird anschließend mit den aus den modellierten Komplexen ermittelten Distanzen der reagierenden Atome verglichen. Diese liegen mit jeweils 3,4 Å im Bereich der Summe der Van-der-Waals-Radien (Toleranz:  $\pm 0,7$  Å),<sup>[176]</sup> womit eine intermolekulare Interaktion möglich ist.

Zwischen dem angreifenden Amin-Stickstoff von Verbindung **14** und der Aktivester-Carbonylfunktion (CO) von **11** und **12** konnte ein N-C-O-Winkel von  $82^\circ$  (**11**) bzw.  $83^\circ$  (**12**) ermittelt werden. Bürgi und Dunitz postulierten in ihrer Arbeit aus dem Jahr 1973 den nach ihnen benannten Winkel als idealen Angriffswinkel eines Nucleophils an eine Carbonylfunktion. Dieser Winkel beträgt ca.  $107^\circ$ .<sup>[177]</sup> In späteren Arbeiten konnte jedoch gezeigt werden, dass dieser nicht immer zutreffend ist und eine erfolgreiche Reaktion auch für Angriffswinkel im Bereich von  $68^\circ$  bis  $134^\circ$  möglich ist. Dies sei besonders bei asymmetrisch-substituierten Carbonylen oder bei Anwesenheit voluminöser Substituenten der Fall.<sup>[178]</sup> Da im vorliegenden Beispiel ein asymmetrisch-substituierter Ester mit voluminösen Phenylresten mit einem Amin-Nucleophil reagiert, ist eine Abweichung vom idealen Angriffswinkel ebenfalls wahrscheinlich. Die ermittelten Werte von  $82^\circ$  bzw.  $83^\circ$  liegen dabei in der genannten Toleranz, womit auch der Angriffswinkel eine intermolekulare Interaktion zulässt und die These der templierten Reaktion unterstützt.

Zusammenfassend konnte durch die Untersuchung der modellierten Komplexe von Faktor Xa mit den gebundenen Ausgangsfragmenten der vorgeschlagene Mechanismus der Templat-unterstützten Amidierung weiter verifiziert werden. Es konnte dabei gezeigt werden, dass sich die gebundenen Fragmente und deren reaktive Gruppen in einem für die Reaktion geeigneten Abstand zueinander befinden sowie die Orientierung der reagierenden Gruppen einen erfolgreichen Angriff des Amin-Nucleophils an der Aktivester-Carbonylfunktion ermöglichen.

Ob Faktor Xa bei der Templat-unterstützten Reaktion neben der Rolle des Templats ebenfalls den Ablauf der Reaktion aktiv begünstigt, konnte auf Grundlage der berechneten Komplexe nicht abschließend geklärt werden. Denkbar wäre eine in der ursprünglichen Struktur von Faktor Xa mit Inhibitor **15** nicht vorhandene Interaktion der Aktivester **11/12** mit Tyr-99 (s. Abb. 5.6). Die potentiell mögliche Wasserstoffbrückenbildung zwischen der Tyrosin-Hydroxylgruppe und dem Sauerstoff-Atom der Aktivesterkomponente von **11/12** könnte zur Protonierung der Aktivesterkomponente führen. Dies würde mit einer deutlichen Verbesserung der Abgangsgruppeneigenschaften einhergehen, wodurch Faktor Xa auch aktiv eine Rolle in der proklamierten selektiv-ablaufenden templierten Amidierung spielen würde.

## 5.4. Untersuchung der superadditiven Bindungsenergiezunahme als Folge der Ligation

Die Bestimmung der  $K_1$ -Werte der Fragmente und des Fragment-Ligationsprodukts zeigte, dass im Zuge der Templat-unterstützten Amidierung aus zwei millimolar-aktiven Fragmenten ein nanomolar-aktives Produkt gebildet wird (s. Abschnitt 4.4). Somit führt die Ligation der Fragmente zu einer deutlichen Steigerung der Bindungsaffinität. Um die Effizienz der Verknüpfung zu beurteilen, wurde unter Verwendung von Gleichung 3.20 der Verknüpfungskoeffizient  $E$  von Verbindung **1** mit **14** bestimmt. Hierbei wurde ein Wert von 0,0078 ermittelt. Damit stellt die Reaktion ein Beispiel für eine Fragment-Ligation mit superadditiver resultierender Bindungsaffinität dar. Eine solche Superadditivität wird in der Regel nur selten beobachtet, besonders in der für die Ligation von **1** und **14** gefundenen Größenordnung.<sup>[134, 135]</sup>

Zur Untersuchung der gefundenen Superadditivität wurden zunächst die freien Bindungsenergien der Einzelfragmente durch Verwendung von Gleichung 3.18 ermittelt (s. Tabelle 5.1). Für die Fragmente **1** und **14** konnten dabei Werte von  $-12,7 \text{ kJ} \times \text{mol}^{-1}$  bzw.  $-17,79 \text{ kJ} \times \text{mol}^{-1}$  erhalten werden. Die Summe der Gibbs-Energien von **1** und **14** ergibt somit eine theoretische Gibbs-Energie für das Ligationsprodukt von  $-30,5 \text{ kJ} \times \text{mol}^{-1}$ . Damit weicht der theoretische Wert, wie zu erwarten, deutlich von der experimentell gefundenen Gibbs-Energie für Ligationsprodukt **15** von  $-42,3 \text{ kJ} \times \text{mol}^{-1}$  ab.

Ebenfalls wurde zur Untersuchung der Superadditivität die Liganden-Effizienzen (LE) der einzelnen Fragmente sowie der Fragment-Kombination ermittelt. Diese wurden durch Verwendung von Gleichung 5.3 erhalten.<sup>[179]</sup>

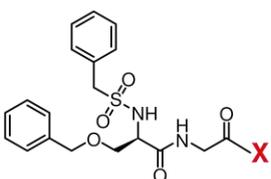
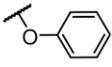
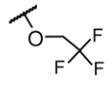
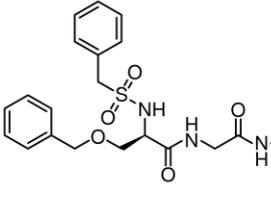
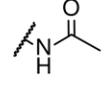
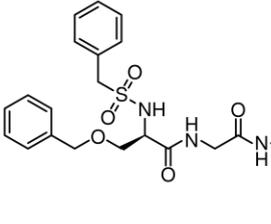
$$\text{LE} = \frac{\Delta G}{\text{HA}} \quad (5.3)$$

Die Liganden-Effizienz wird oft bei der Optimierung von Fragmenten eingesetzt und setzt die freie Gibbs-Energie in Relation zur Anzahl der im Molekül befindlichen Atome HA (ohne Wasserstoffatome). Hierdurch soll bei der Optimierung der Fragmentstruktur eine möglichst effiziente Nutzung der Atome und funktionellen Gruppen des Liganden bei der Bindung zum Zielprotein gewährleistet werden.<sup>[179, 180]</sup> Zur Veranschaulichung führten Hopkins *et al.* bei ihrer Einführung der Liganden-Effizienz ein Rechenbeispiel an. In



Ziel war es dabei, die Bindungsverhältnisse von **15** nachzuahmen und den Einfluss der Erweiterung von Amin **14** und Carbonsäure **1** um die in **15** jeweils vorhandene Amid-Teilstruktur zu untersuchen. Für **16** und **17** wurden anschließend ebenfalls die  $K_I$ -Werte bestimmt und daraus die jeweiligen freien Bindungsenergien ermittelt.

**Tabelle 5.1.** Übersicht der experimentell ermittelten thermodynamischen Daten

	<b>= X</b>	$K_I$	HA	LE [kcal $\times$ mol <sup>-1</sup> ]	$\Delta G_{\text{exp}}$ [kJ $\times$ mol <sup>-1</sup> ]	$\Delta G_{\text{exp}}$ [kcal $\times$ mol <sup>-1</sup> ]
	<b>1</b> 	5,5 mM	28	0,11	-12,70	-3,04
	<b>11</b> 	10,2 mM	34	0,08	-11,19	-2,67
	<b>12</b> 	9,6 mM	33	0,08	-11,32	-2,70
	<b>16</b> 	6,0 mM	28	0,11	-12,46	-2,98
	<b>14</b> 	0,68 mM	11	0,39	-17,79	-4,25
	<b>17</b> 	1,1 mM	14	0,28	-16,60	-3,97
		<b>29,3 nM</b>	<b>38</b>	<b>0,27</b>	<b>-42,28</b>	<b>-10,10</b>

Für die „Amid“-Derivate von **1** und **14** konnten dabei  $K_I$ -Werte von 6 mM für **16** und 1,1 mM für **17** ermittelten werden. Die erhaltenen  $K_I$ -Werte liegen somit höher wie die der jeweiligen Ausgangsfragmente. Die beobachtete Wechselwirkung der entsprechenden Amidbindung von **15** mit Serin-214 (s. Abb. 5.5 (C)) scheint bei **16** und **17** nicht zu

einer signifikanten Erhöhung der Bindungsenergie zu führen. Auf Grundlage der ermittelten Daten kann daher ein Einfluss des Linkers auf die superadditive Bindungsenergie des Ligationsprodukts ausgeschlossen werden. Denkbar ist hierbei jedoch auch, dass besonders im Fall von **17** die verhältnismäßig kleine Acetylgruppe nicht ausreicht, um die Amid-Struktur in die Position zu zwingen, die zur Ausbildung der Wasserstoffbrücke zwischen Amid-NH und Ser-214-Carbonylfunktion nötig wäre.

Eine weitere mögliche Ursache einer durch die Verknüpfung von Fragmenten bedingten superadditiven Zunahme der resultierenden Bindungsenergie beschrieben Murray und Verdonk in ihrer Arbeit aus dem Jahr 2002.<sup>[182]</sup> Diese begründeten das Auftreten von Superadditivität auf Basis von Entropieänderungen: Jedes Fragment verliert demnach bei der Bindung Freiheitsgrade, was mit einer Entropieabnahme einhergeht. Bei der theoretischen Berechnung der freien Bindungsenergie eines Ligationsprodukts zweier Fragmente (Gleichung 3.19) ist so für beide Fragmente ein energetisch ungünstiger Entropieabnahme-Term enthalten. Die Bindung des entsprechenden Fragment-Kombinationsprodukts würde daher zu einem geringeren Entropieverlust führen, da hier nur ein Term für die aus der Bindung des Ligationsprodukts bedingte Entropieabnahme in die Rechnung mit eingehen würde. Somit kann die Verknüpfung zweier Fragmente Entropiebedingt zu einer erheblichen Steigerung der freien Bindungsenergie führen.<sup>[182]</sup> Da der Linker nicht zur erhöhten Affinität beiträgt, kann auch im vorliegenden Fall die weniger negative Bindungsentropie, die sich aus der Verknüpfung der Fragmente ergibt, als Ursache für die beobachtete Superadditivität angenommen werden.



## 6. Carbonsäureaktivierung im Mikrotiterplatten-Maßstab

Mit dem entwickelten Ligationsassay konnten erfolgreich Phenylester und Trifluorethylester als mögliche Ausgangsfragmente für eine Templat-unterstützte Amidierungsreaktion identifiziert werden. Auf Grundlage der gewonnenen Erkenntnisse sollte nun versucht werden, die Aktivierung von Carbonsäuren zu Phenyl- bzw. Trifluorethylestern in Mikrotiterplatten durchzuführen. Damit wäre es prinzipiell möglich, durch Parallelisierung der Templat-unterstützten Reaktion, Screenings im kleineren Maßstab durchzuführen. Dies könnte bspw. im Zuge von Hit-Auswahl-Prozessen, wo die Anzahl der Fragment-Kombinationen bereits begrenzt ist, hilfreich sein. Ein sehr viel wichtigeres Einsatzgebiet stellt jedoch die Aktivierung von Carbonsäure-Bibliotheken mit nachfolgender Umsetzung zu den entsprechenden Amiden dar. Die so erzeugten Amide können nachfolgend innerhalb verschiedenster Screening- und Assayformate verwendet werden.

Für Reaktionen in Mikrotiterplatten bestehen dabei generell im Vergleich zur Reaktion im Kolben einige Besonderheiten: Beispielsweise sind die Möglichkeiten den Reaktionsansatz aufzureinigen auf einfache Evaporations- und Filterschritte begrenzt. Ebenfalls gilt, dass bei einer bestimmten Fragment-Bibliothek zwar die reagierende funktionelle Gruppe identisch bleibt, je nach sonstigen Substituenten und sterischen Gegebenheiten im Fragment diese jedoch in einem breiten Reaktivitätsspektrum vorliegen kann. Daher sollte der eingesetzte Reaktionstyp möglichst selektiv sein, sodass auch weniger reaktive Fragmente ohne Nebenreaktionen zu einem definierten Produkt reagieren und dabei gleichzeitig andere funktionelle Gruppen im Fragment toleriert werden.

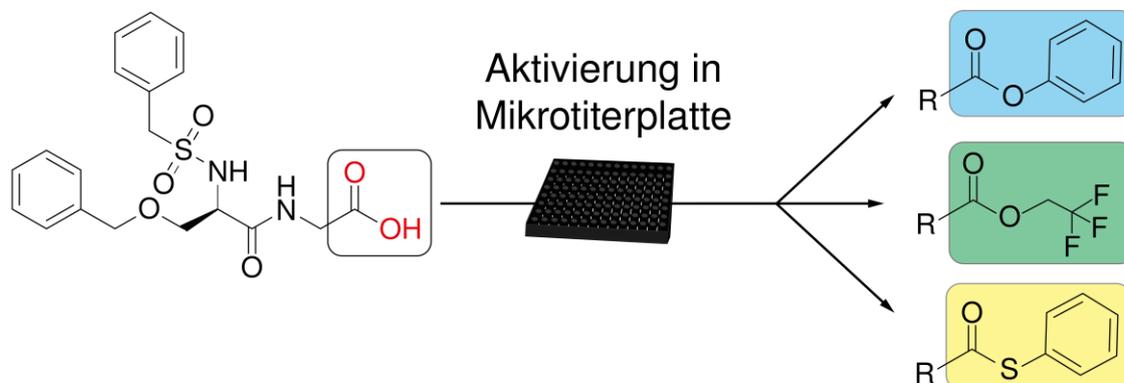
Da der Reaktionsansatz direkt im Assay verwendet wird, sollte die Reaktion nur zu wasserlöslichen (Neben-)Produkten führen oder zu solchen, die bereits durch geringe Anteile organischer Lösungsmittel in Lösung gebracht werden können. Präzipitation bestimmter Reaktionsbestandteile bzw. deren Abbauprodukte kann zu Interferenzen mit

dem Assaysystem führen, was zu fehlerbehafteten Messergebnissen führen würde. Unumgänglich ist dabei, dass der Einfluss der einzelnen Bestandteile des Reaktionsansatzes auf die Aktivität des verwendeten Enzyms im Voraus überprüft wird. Die Carbonsäureaktivierung im Mikrotiterplatten-Format sollte anhand der Umsetzung zu drei verschiedenen Aktivestern untersucht werden: Trifluorethylester, Phenylester und dem etwas reaktiveren Thiophenylester.

Exemplarisch wurde Carbonsäure **1** gewählt, um verschiedene Aktivierungsmethoden zu testen. Bereits zu Beginn zeigte sich dabei, dass die zuvor verwendeten Polystyrol-Mikrotiterplatten (Corning 3655) für Reaktionen mit organischen Lösungsmitteln ungeeignet waren. Besonders DMF führte hier zur schnellen Auflösung der Platte. Daher wurden für die nachfolgenden Versuche Polypropylen-Mikrotiterplatten (ABgene Storage Plates) verwendet, welche sich als deutlich robuster erwiesen. Erste Aktivierungsversuche zum Phenylester zielten darauf ab (s. Tabelle 6.1 A), das Spektrum einsetzbarer Lösungsmittel zu testen. Dabei wurde das zuvor erfolgreich eingesetzte EDC als Aktivierungsreagenz verwendet. Hierbei konnte besonders im Fall von Dioxan (72 %) eine hohe Umsetzungsrate gezeigt werden. Der Einsatz der anderen getesteten Lösungsmittel (DCM, EE, Aceton, THF, MeCN) konnte im Zuge dieser ersten Tests bereits nahezu ausgeschlossen werden. Die schlechte Pipettierbarkeit verhinderte ein exaktes Abmessen der eingesetzten Volumina im Fall von DCM und Aceton komplett, bzw. war im Fall von EE, THF, MeCN stark erschwert.

Weiterführende Tests mit Fokus auf Dioxan konnten anschließend zeigen, dass Reaktionszeiten von über 2 h zu keiner weiteren Steigerung des Umsatzes führten. Ebenso führte die Zugabe von Basen (NMM, DIPEA) nicht zu vermehrter Produktbildung. Die zu erwartende erhöhte Reaktivität als Folge der Deprotonierung der Carbonsäure sowie der Aktivesterkomponente blieb aus und stattdessen war lediglich eine deutliche Zunahme von Oxazol- und *N*-Acylharnstoff-Nebenprodukten im LC/MS-Spektrum zu beobachten (s. Abb. 6.1). Zwar kann das Oxazol-Nebenprodukt prinzipiell zum Aktivester weiterreagieren, dies konnte jedoch nicht nachgewiesen werden, vermutlich aufgrund einer zu geringen Nukleophilie des Phenols.

**Tabelle 6.1.** Übersicht der getesteten Bedingungen zur Optimierung der Carbonsäureaktivierung

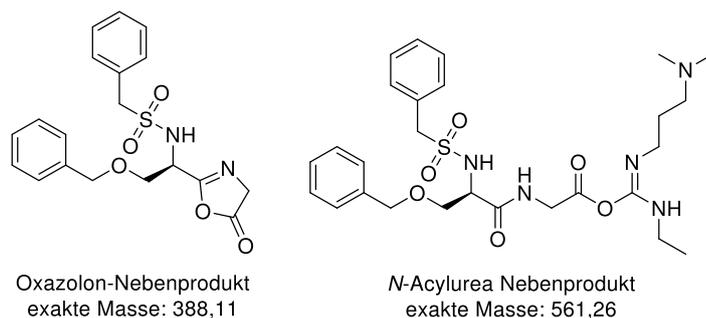


**A**

Reagenz	LM	 [Äq.]	Base [Äq.]	Reaktionszeit [h]	Umsatz [%]
EDC	Dioxan	1	-	2	72
	DCM	-	-	2	16
	Aceton	-	-	2	42
	MeCN	-	-	2	55
	EE	-	-	2	24
	THF	-	-	1	54
	Dioxan	-	-	0,2	45
	Dioxan	-	-	2	86
	Dioxan/DMF 1:1	-	-	0,2	13
	Dioxan	-	-	2	63
	Dioxan	-	1 NMM	0,2	44
	Dioxan	-	2	0,2	85
	Dioxan	-	1 DIPEA	0,2	31
	Dioxan	-	2	2	67
Ghosez (1,1 Äq.)	DCM	-	-	2	0
Dioxan	-	-	-	2	0
DAST (1,2 Äq.)	DCM	-	-	2	23
Dioxan	-	-	-	2	0
TFFH	DCM	-	2 DIPEA	2	25
Dioxan	-	-	2 DIPEA	2	8
TCFH	DCM	-	2,5 Pyridin	2	8
Dioxan	-	-	2,5 Pyridin	2	0
CDI	THF	-	-	2	14
Dioxan	-	-	-	2	9
IBCF	Dioxan	1,5	2,5 NMM	2	63
PCF	Dioxan	1,5	2,5 NMM	2	79

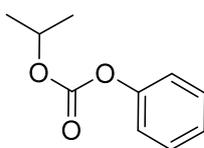
**B**

Reagenz	LM	Aktivester-Komponente [Äq.]	Reaktionszeit [h]	Umsatz [%]	
DCC (4 Äq.)	Dioxan	4 	2	63	
		12 HO 	2	99	
		4 	2	93	
		12 HS 	2	80	
		50 HO 	2	53	
		DCC/DMAP (1,1/0,1 Äq.)	4 	2	98
		12 HO 	2	97	
		4 	2	88	
		12 HS 	2	74	
		50 HO 	2	100	



**Abbildung 6.1.** Dargestellt sind die nachgewiesenen Haupt-Nebenprodukte der EDC-Aktivierung.

Anschließend wurden weitere klassische Aktivierungsmethoden (DAST, TFFH, TCFH, CDI, IPCF, IBCF) untersucht. Hierbei wurde jeweils ein Ansatz in Dioxan und ein Ansatz in einem, typischerweise für das jeweilige Reagenz eingesetzten Lösungsmittel, hergestellt und getestet. Sämtliche getestete Methoden führten jedoch nur zu geringen Umsetzungsraten. Lediglich mit IPCF (79 %) und IBCF (63 %) konnten akzeptable Ausbeuten erzielt werden. Diese bieten potentiell den Vorteil, dass sowohl das Reagenz als auch dessen Abbauprodukte mittels Vakuumpkonzentrator (SpeedVac) aus den Platten bzw. Reaktionsansätzen entfernt werden könnten. Weitere Versuche zur Optimierung der Reaktion mit IPCF und IBCF (Daten nicht gezeigt) blieben jedoch erfolglos. Die Steigerung von Aktivierkomponenten-, Reagenz- und Basenäquivalenten führte hierbei nahezu ausnahmslos zu erhöhter Bildung des IPCF-Phenol-Addukts (s. Abb. 6.2) bzw. dessen IBCF-Analogs.



**Abbildung 6.2.** Dargestellt ist das bei der IPCF-Aktivierung gebildete IPCF-Phenol-Addukt.

In nachfolgenden Tests wurde die Aktivierung durch die beiden Carbodiimid-Reagenzien EDC und DCC miteinander verglichen. Hierbei konnten mit DCC sehr gute Ausbeuten erzielt werden. Gleichsam konnte für die Aktivierung mit DCC nahezu kein *N*-Acylharnstoff-Nebenprodukt detektiert werden, vermutlich aufgrund der im Vergleich zu EDC fehlenden zusätzlichen Amin-Funktion und der damit verbundenen verringerten Basizität.

Im Anschluss wurde der Einsatz verschiedener Aktivesterkomponenten- und Reagenz-Äquivalente untersucht sowie auch die Verwendung von DMAP getestet (s. Tabelle 6.1 B). Für die Erhöhung der Äquivalente konnte hier in Relation zu möglichen Konzentrations-bedingten Assay-Störeffekten nur eine geringe Steigerung des Reaktionsumsatzes nachgewiesen werden.

Sehr gute Ausbeuten konnten durch Verwendung der klassischen Steglich-Aktivierung mit 1,1 Äq. DCC und 0,1 Äq. DMAP erhalten werden. Hierbei konnten Umsetzungsraten von 88 % (Thiophenylester) über 98 % (Phenylester) bis hin zur vollständigen Umsetzung im Fall des Trifluorethylester erreicht werden. Gerade die Aktivierung zum Trifluorethylester stellte sich dabei als besonders praktikabel heraus: Trifluorethanol kann mit bis zu 50 Äq. eingesetzt werden, was die nahezu quantitative Umsetzung zum Trifluorethylester zur Folge hat. Im Anschluss kann der Überschuss der Aktivesterkomponente einfach mittels Vakuumkonzentrator entfernt werden.

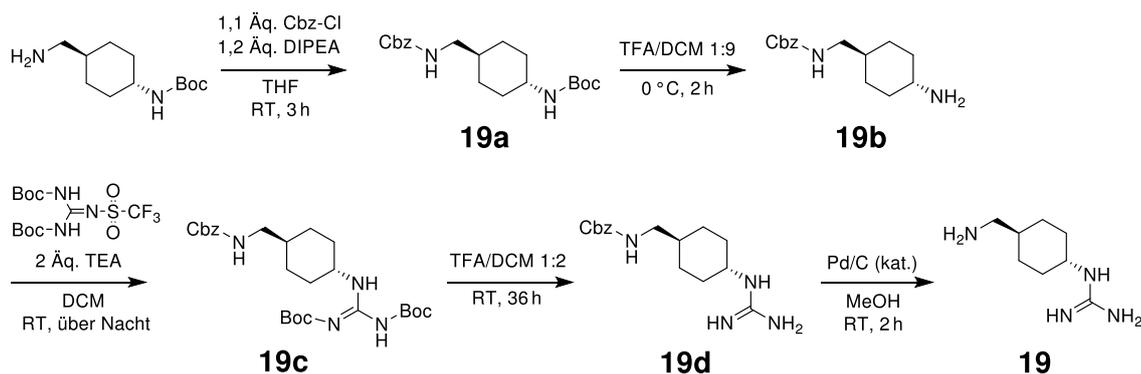
Somit konnte jeder der Aktivester erfolgreich in der Mikrotiterplatte erzeugt werden und die einfache Aktivierung mittels Steglich-Veresterung mit nachfolgender Umsetzung zum Amid sollte einen breiten Einsatz innerhalb verschiedenster Screening- und Assayformate ermöglichen.





## 7.1. Synthese von Amin **19** (GCMA)

Zur Durchführung des *in-situ* Screenings wurde zunächst Amin **19** (GCMA) synthetisiert (s. Schema 7.1). Dabei wurde das käuflich erworbene *trans*-4-(Boc-amino)cyclohexanmethylamin im ersten Schritt Cbz-geschützt und das entstandene Produkt **19a** im Anschluss an der zweiten Amin-Funktion Boc-entschützt. **19b** konnte nun im nächsten Schritt guadinyliert werden. Die Guadinylierung erwies sich zunächst als schwierig und Versuche mit 1*H*-Pyrazol-1-carboxamidin und 2-Ethyl-2-thiopseudourea führten nur zu geringen Ausbeuten, welche auch durch erhöhte Basenzugabe nicht weiter gesteigert werden konnten. Unter Verwendung von 1,3-Di-Boc-2-(trifluormethylsulfonyl)guanidin in DCM mit zwei Äquivalenten Base (TEA) konnte nach Rühren über Nacht jedoch die vollständige Umsetzung zu Guanidin **19c** erreicht werden. Die zwei vorhandenen Boc-Gruppen erwiesen sich bei der nachfolgenden Boc-Entschützung als äußerst stabil und erforderten zur Entschützung eine hohe TFA-Konzentration (TFA/DCM 1:2). Nach 36 h konnte mittels LC/MS die quantitative Entschützung zu **19d** nachgewiesen werden. Anschließend folgte die finale Cbz-Entschützung mit Pd/C unter H<sub>2</sub>-Atmosphäre in Methanol. Die Reaktion war nach 2 h vollständig und lieferte Endprodukt **19**, welches mit einer Gesamtausbeute von 68 % erhalten werden konnte.



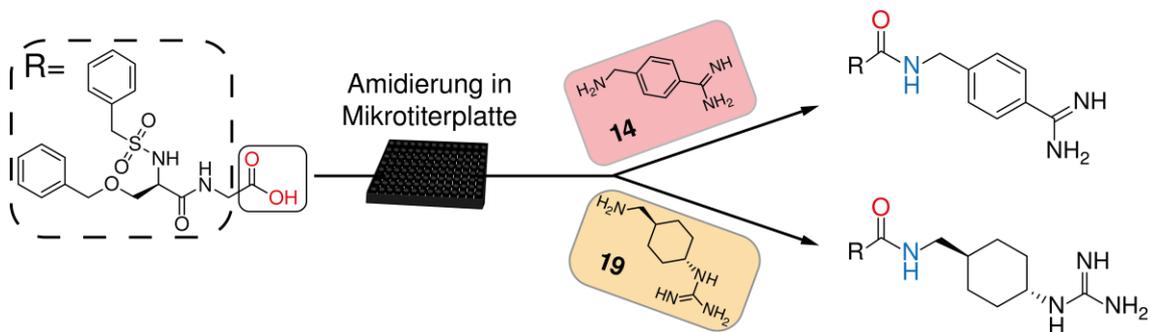
**Schema 7.1.** Schematische Darstellung der Synthese von Amin-Fragment **19**.

## 7.2. In-situ Amidierung

Amin **19** sollte nachfolgend mit der Carboxylat-Bibliothek zur Reaktion gebracht werden. Dazu mussten zuvor geeignete Reaktionsbedingungen und Kupplungsreagenzien gefunden werden, die eine möglichst effiziente Kupplung im Mikrotiterplatten-Maßstab gewährleisten sollten. Wie bei den Versuchen zur Aktivester-Umsetzung (s. Abschnitt 6) wurde auch hier Carbonsäure **1** verwendet, welche exemplarisch mit Amin **14** bzw. **19** zum jeweiligen Amid-Produkt umgesetzt werden sollte.

Da ein Exemplar der Carboxylat-Bibliothek bereits in DMSO gelöst vorlag, wurde zu Beginn versucht eine Aktivierungsmethode mit DMSO bzw. einem DMF/DMSO-Gemisch als Lösungsmittel zu finden. Wong *et al.* verwendeten in einem ähnlichen Ansatz einer *in-situ* Amidierung erfolgreich HBTU/DIPEA (1,1/2,2 Äq.) in DMF zur Fragment-Ligation.<sup>[183]</sup> Für den Test eines vergleichbaren Ansatzes von **1** und **14** in einem DMF/DMSO 1:1-Gemisch konnte ein Umsatz von 72 % nach 30 Minuten Reaktionszeit nachgewiesen werden. Für EDC konnte hier ein Umsatz von 55 % festgestellt werden, wohingegen IPCF und IBCF zu keiner Umsetzung führten.

Ausgehend von den Erkenntnissen aus den Versuchen zur Aktivester-Bildung wurde nachfolgend der Fokus auf die Carbodiimid-Aktivierung in Dioxan gelegt. Auch hier konnte durch die klassische Steglich-Veresterung eine sehr hohe Umsatzrate von 90 % mit Amin **14** gezeigt werden. Für Amin **19-2** wurden zu Beginn durchgehend schlechte Kupplungsraten erhalten. Erst durch viermalige Lyophilisation (**19-2** → **19**) konnte eine deutliche Steigerung beobachtet werden. Vermutlich verhinderte hier die Salzform des Amins und der damit verbundene Nucleophilieverlust die erfolgreiche Kupplung. Stark basisches Ausschütteln mit Extraktion des freien Amins war zuvor nicht zielführend. Da erst nach Lyophilisation eine merkliche Steigerung der Kupplungsraten zu beobachten war, handelte es sich vermutlich um ein stabiles TFA-Salz des Amins, welches erst nach mehrmaliger Lyophilisation in die freie Form des Amins überführt wurde. Im Anschluss konnte auch für Amin **19** mit DCC/DMAP (1,1/0,1 Äq.) eine Umsetzung von 84 % nachgewiesen werden.

**Tabelle 7.1.** Übersicht der getesteten Bedingungen zur Optimierung der Amidierungsreaktion

Amin	Reagenz-Äquiv. [Äq.]	Reagenz	LM	Base [Äq.]	Reaktionszeit [h]	Umsatz [%]
<b>14</b> 	1	EDC	DMF / DMSO (1:1)	-	0,5	55
		HBTU		<b>2 DIPEA</b>	<b>0,5</b>	<b>72</b>
		IPCF		2,5 NMM	0,5	-
		IBCF		2,5 NMM	0,5	-
		EDC		Dioxan	-	0,5
		HBTU		2 DIPEA	0,5	11
		IPCF		2,5 NMM	0,5	71
		IBCF		2,5 NMM	0,5	55
		DCC		-	2	50
		<b>19-2</b> 	1,1	DCC/HOBt		-
<b>1,1/0,1 DCC/DMAP</b>	-			<b>2</b>		<b>90</b>
EDC	-			0,5		-
EDC	-			2		27
DCC	-			2		18
DCC/HOBt	-			2		37
DCC/DMAP	-			2		12
<b>19</b>	<b>1,1/0,1</b>	<b>DCC/DMAP</b>		-	<b>2</b>	<b>84</b>

### 7.3. WNV NS2B-NS3-Protease Screening

Die Vielzahl der vorhandenen Aktivierungsreagenzien<sup>[14]</sup> legt nahe, dass kein bestimmtes Reagenz existiert, dass jede Amin/Carbonsäure-Kombination erfolgreich zum Amid umgesetzt. Je nach Substituenten und sterischen Gegebenheiten der Fragmente, können diese in einem breiten Reaktivitätsspektrum vorliegen. Ausgehend von den Ergebnissen aus Abschnitt 7.2 wurden für das *in-situ* Screening daher zwei Aktivierungsmethoden verwendet, um eine größtmögliche Anzahl an Carbonsäure-Fragmenten in das entsprechende Amid zu überführen. Für Screen 1 wurde DCC/DMAP in Dioxan gewählt, für Screen 2 HBTU/DIPEA in DMF/DMSO (1:1).

Für beide Screenings wurde zunächst eine wässrige Lösung von Amin **19** (GCMA) in die Reaktionsplatten vorgelegt und anschließend das Lösungsmittel mittels Vakuumkonzentrator entfernt (s. Abb. 7.2). Die Aktivierung der Carbonsäuren erfolgte bereits in der Pipettenspitze des Pipettierroboters durch sequentielle Aufnahme der einzelnen Reagenzien. Im Anschluss erfolgte die Zugabe dieses Reaktionsgemisches in die Reaktionsplatten. Zur Umsetzung der kompletten Carboxylat-Bibliothek wurden pro Screen je fünf Platten eingesetzt, welche jeweils aktiviert und im Anschluss mit Amin **19** zum Amid umgesetzt wurden. Alle Platten wurden nachfolgend für 2 h bei Raumtemperatur geschüttelt. Nach Evaporations- und Verdünnungsschritten folgte die Testung der gebildeten Amide. Im Fall von Screen 1 wurde eine potentielle Amid-Maximalkonzentration von 100  $\mu\text{M}$  eingesetzt. Für Screen 2 wurden „Amid“-Konzentrationen von 100, 10 und 1  $\mu\text{M}$  verwendet (Screen 2-100, 2-10 bzw. 2-1).

Die eingesetzten Amid-Konzentrationen liegen im Bereich von standardmäßig verwendeten Konzentrationen zum Screening von Fragment-Kombinationen. Da durch die Fragment-Ligation eine erhöhte Inhibition im Vergleich zu den Einzelfragmenten zu erwarten war, wurde eine Amin **19**-Lösung als Referenz verwendet. Die Konzentration dieser Lösung entsprach der jeweiligen getesteten Amid-Konzentration. Für Amin **19** wurde ein  $\text{IC}_{50}$ -Wert von 1,055 mM bestimmt. Die im Screen 1 und 2-100 verwendete 100  $\mu\text{M}$  Lösung von **19** führte dabei zu einer ca. 10%igen Inhibition der WNV NS2B-NS3-Protease. Als Hit-Kriterium für das Screening wurde eine im Vergleich zur Amin-Lösung 30%ige Erhöhung der Inhibition festgelegt.

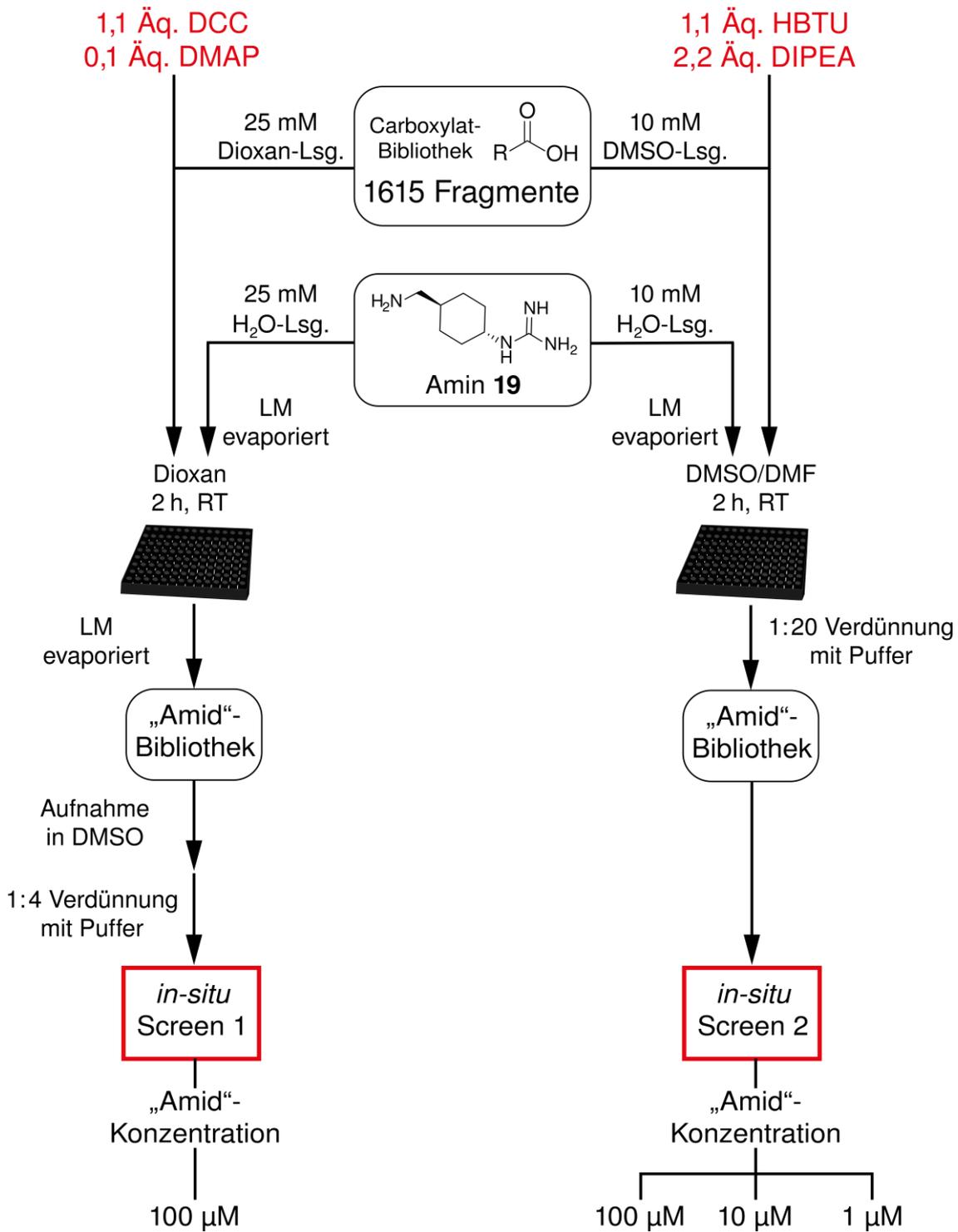
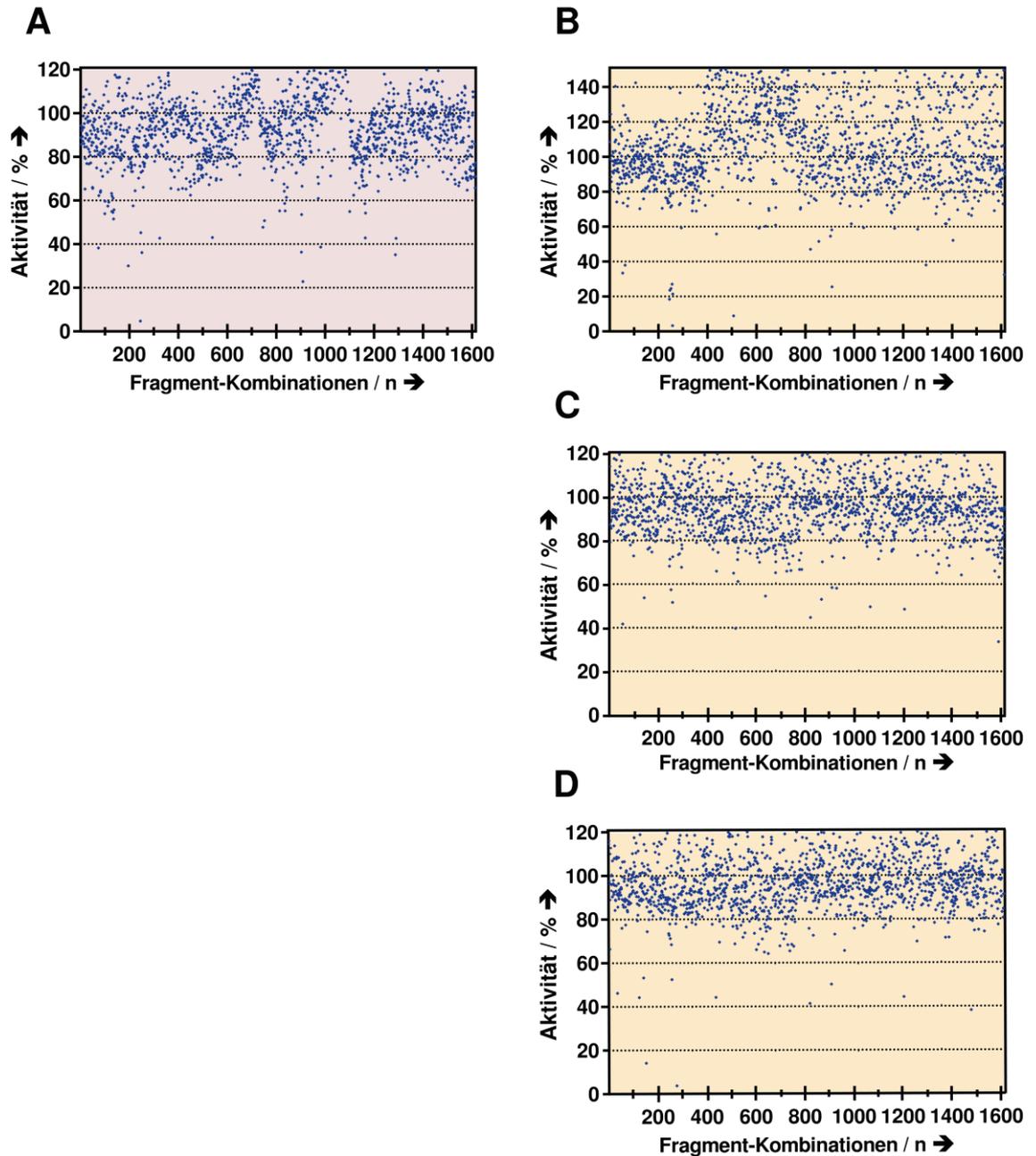


Abbildung 7.2. Ablauf des durchgeführten WNV NS2B-NS3-Protease Screenings.

Im Zuge der beiden Screenings konnten 95 (Screen 1) bzw. 55 (Screen 2) Hits identifiziert werden. Abbildung 7.3 zeigt die Aktivitätsverteilung der getesteten Fragment-Kombinationen im jeweiligen Screen in Form von Scatter-Plots.



**Abbildung 7.3.** Dargestellt sind Scatter Plots der Screenings. (A) Screen 1 wurde bei einer Amid-Konzentration von 100  $\mu\text{M}$  im Assay durchgeführt. Screen 2 bei einer Amid-Konzentration im Assay von 100  $\mu\text{M}$  (B), bzw. 10  $\mu\text{M}$  (C) und 1  $\mu\text{M}$  (D).

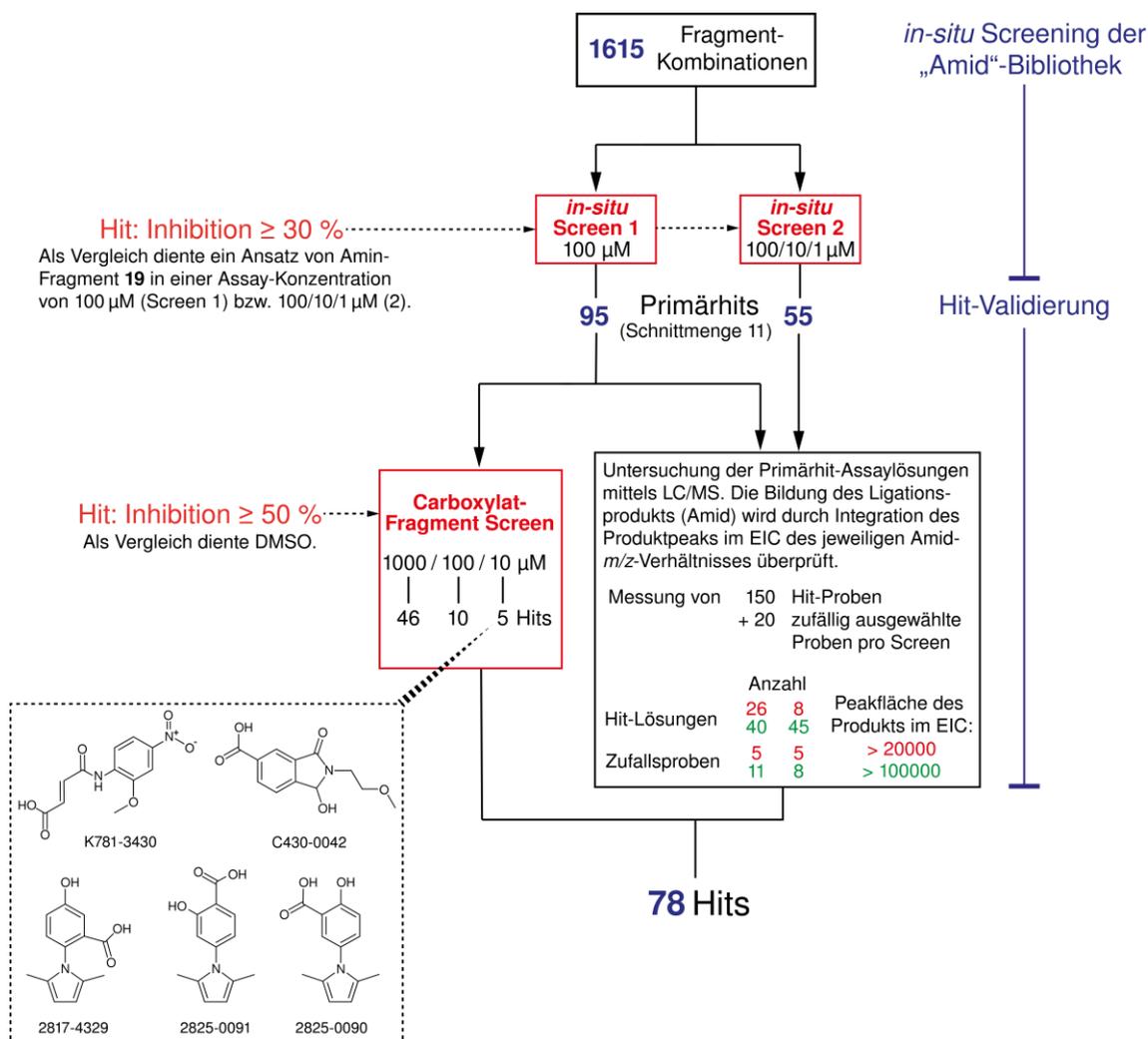
## 7.4. Validierung der Screening-Hits

Zur Validierung der gefundenen Screening-Hits wurden die jeweiligen Lösungen zunächst mittels LC/MS untersucht (s. Abb. 7.4). Hierbei konnten die Messlösungen auf einen erfolgten Substratumsatz und auf mögliche Assay-Artefakte hin überprüft werden, womit eine korrekte Assaydurchführung gewährleistet werden konnte. Hauptziel war es dabei jedoch das Fragment-Kombinationsprodukt als tatsächlich für die verringerte Aktivität verantwortliche Substanz im Assay zu identifizieren. Hierfür wurde die Effizienz der Fragment-Ligation auf Grundlage der Peakflächen im EIC mit dem jeweiligen  $m/z$ -Verhältnis des Fragment-Kombinationsprodukts ermittelt. Gleichzeitig konnte somit die Hemmung durch mögliche Fragment-Zerfallsprodukte ausgeschlossen werden. Von den 95 gemessenen Hit-Proben aus Screen 1 konnte für 40 Proben das Ligationsprodukt in guter Ausbeute mit einer Peakfläche von  $>100000$  nachgewiesen werden. Im Fall von 26 Proben war das Produkt noch in Spuren mit einer Peakfläche von  $>20000$  identifizierbar. Bei Screen 2 war von den 55 injizierten Proben für 45 Proben eine Peakfläche von  $>100000$  und für 8 Proben eine Fläche  $>20000$  nachweisbar. Insgesamt 4 Proben enthielten weder Carbonsäure noch Amid und wurden daher aussortiert.

Zusätzlich wurden 20 zufällig ausgewählte Proben pro Screen injiziert. Damit konnte überprüft werden, ob im Fall der nicht als Hit identifizierten Proben ebenfalls eine ausreichende Menge der jeweiligen Fragment-Kombination gebildet wurde, sodass die fehlende Umsetzung zum Amid als Ursache, der im Vergleich zu den Hit-Proben geringen Inhibition ausgeschlossen werden konnte. Hierbei konnte für beide Screens bei 11 Proben eine effiziente Bildung des Ligationsprodukts (Peakfläche  $>100000$ ) ermittelt werden. Bei 8 Proben (Screen 1) bzw. 5 Proben (Screen 2) konnte das Ligationsprodukt noch in Spuren nachgewiesen werden (Peakfläche  $>20000$ ).

Aufgrund der insgesamt geringeren Effizienz der Amidbildung im Fall der Hits aus Screen 1 wurden die jeweiligen Carboxylat-Fragmente nochmals separat bei drei verschiedenen Konzentrationen getestet. Dies diente dazu ebenfalls vielversprechende Carboxylat-Fragmente in nachfolgende Untersuchungen miteinzuschließen. Von 95 getesteten Fragmenten konnte dabei, bei einer vergleichsweise hohen Konzentration von 1 mM, für 46 Fragmente eine Inhibition von  $\geq 50\%$  nachgewiesen werden. Bei 100  $\mu\text{M}$  waren es

noch 10 und bei 10  $\mu\text{M}$  noch 5 Fragmente mit einer Inhibition von  $\geq 50\%$ . Im Fall von 3 dieser 5 aussichtsreichen Carboxylate handelte es sich jedoch um *N*-Aryl-2,5-dialkylpyrrole, einer mittlerweile bekannten *frequent hit*-Struktur insbesondere im Bereich der Phosphatasen.<sup>[184]</sup> In ihrer Veröffentlichung von 2013 proklamieren Hartmann *et al.* die Polymerisation des Fragments unter Bildung eines Polyanion-Polymerisationsprodukts. Dieses soll an positive Aminosäureseitenketten des Zielproteins binden können und so zur Hemmung des Proteins führen.<sup>[185]</sup> Im Fall von Fragment K781-3430 ist aufgrund des ausgedehnten mesomeren Systems eine Interferenz mit dem Assay-Ausgabesignal wahrscheinlich. Ebenfalls bedenklich ist die Reaktivität als Michael-Akzeptor mit Anfälligkeit für zahlreiche Nebenreaktionen. Daher wurden 4 der 5 Carboxylat-Hits aussortiert.



**Abbildung 7.4.** Übersicht der Screening-Ergebnisse und der anschließenden Hit-Validierung.

Auf Grundlage der erhaltenen Inhibitionswerte im Primärscreen und der daraus gebildeten Hit-Schnittmenge beider Screens sowie unter Berücksichtigung der bereits aussortierten Verbindungen fand eine Vorauswahl von 78 der insgesamt 150 gefundenen Primärhits statt (s. Abb. 7.5).

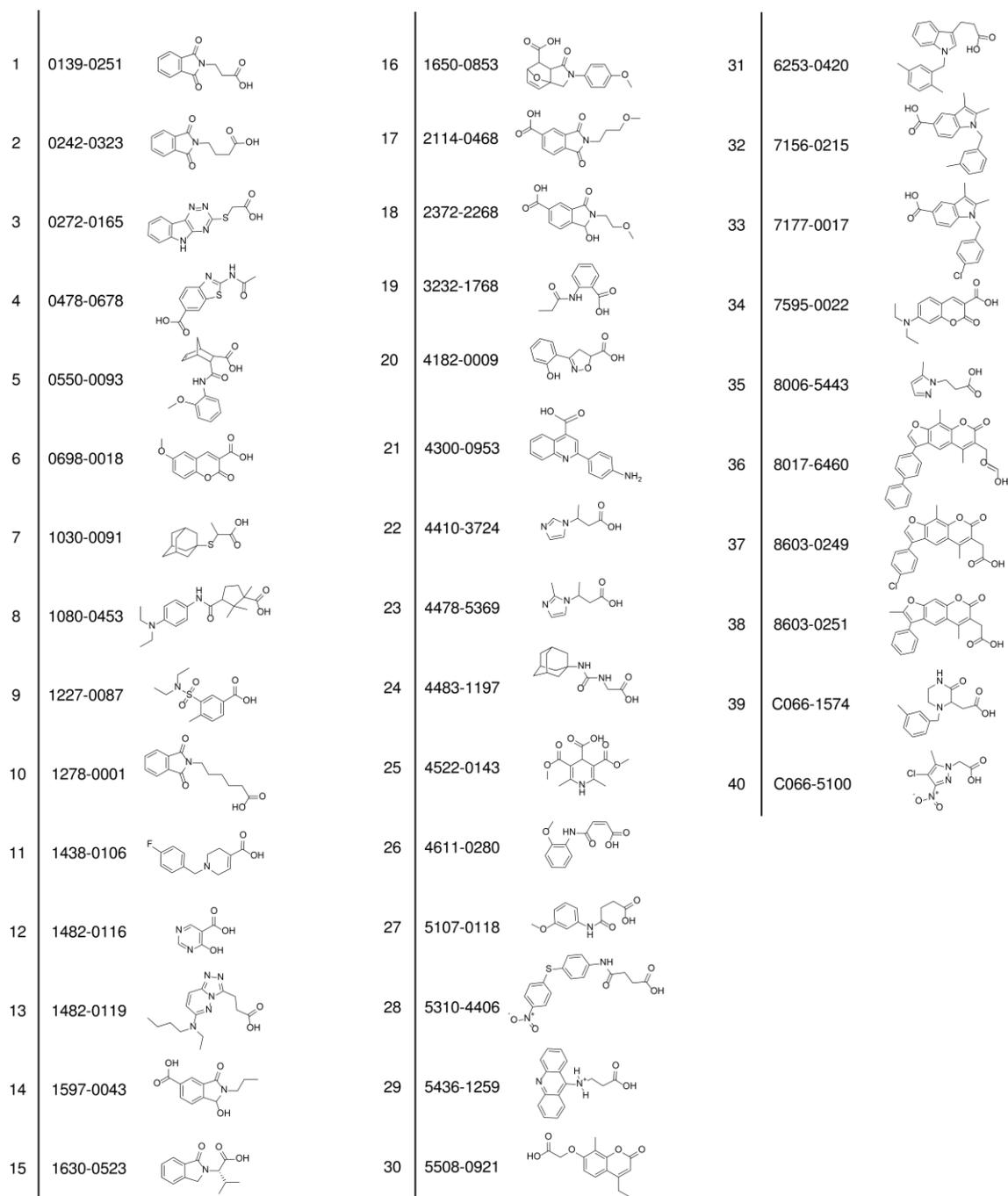
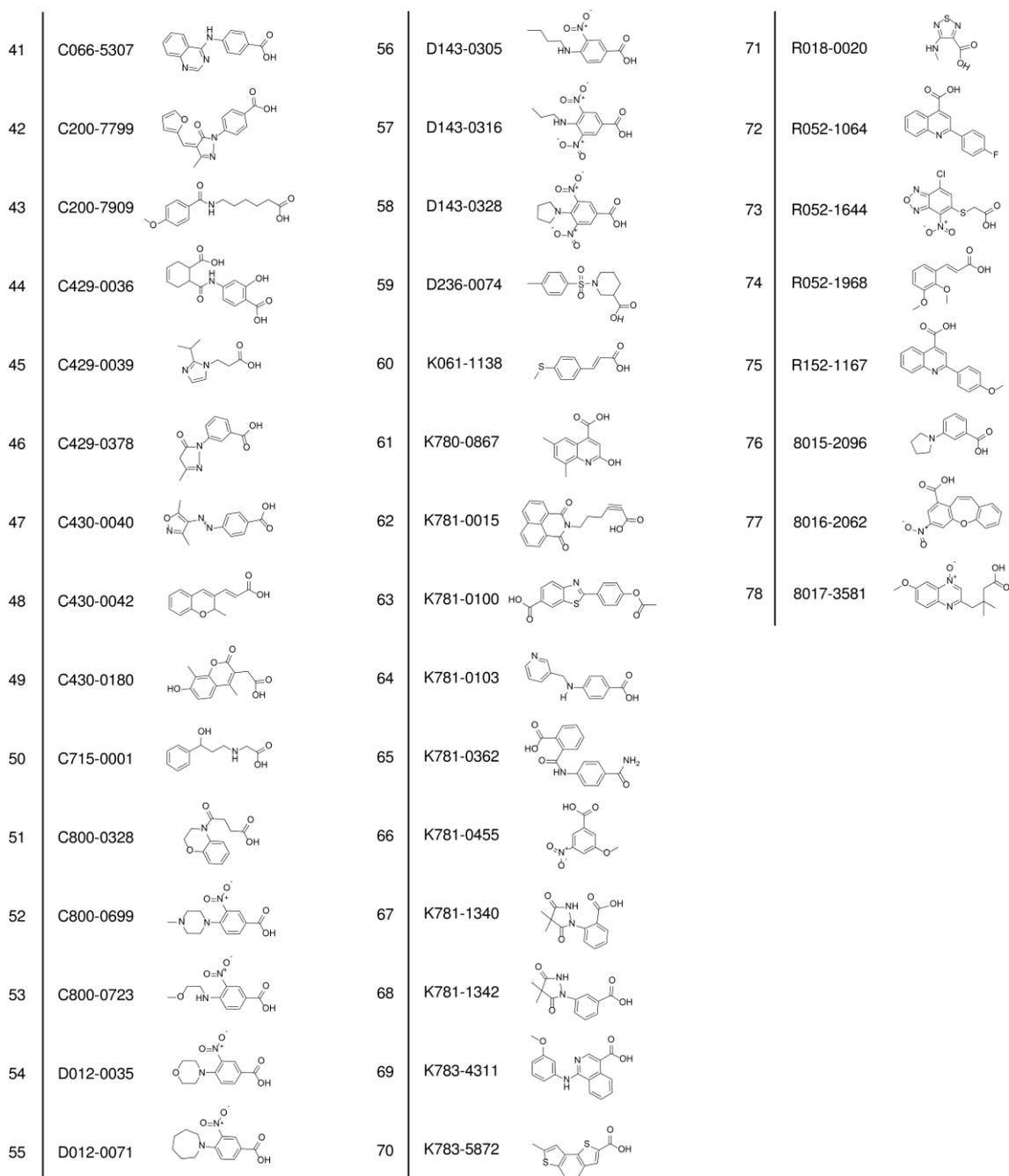


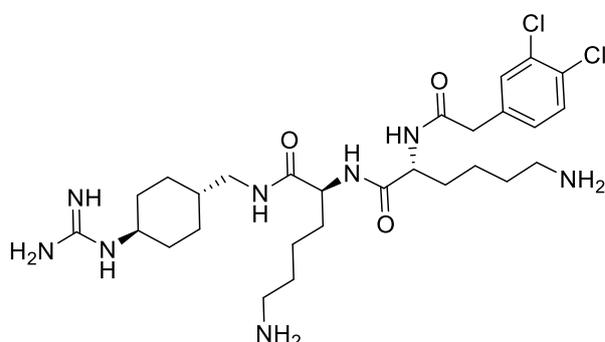
Abbildung 7.5. Übersicht der 78 ausgewählten Hit-Fragmente.



Fortsetzung Abbildung 7.5. Übersicht der 78 ausgewählten Hit-Fragmente.

## 7.5. *In-silico* Screening

Neben dem experimentellen *in-situ* Screening wurde die Carboxylat-Bibliothek zusätzlich *in-silico* gescreent. Hierfür wurde ein Docking unter Verwendung der *Schroedinger Suite* (Schroedinger Release 2017-1: Schrödinger, LLC, New York, NY, 2017) durchgeführt. Die von Hammamy *et al.*<sup>[108]</sup> veröffentlichte Kristallstruktur (PDB: 2YOL) erschien dabei als geeignete Docking-Zielstruktur, da der dort enthaltene co-kristallisierte Ligand ebenfalls die GCMA-Teilstruktur als S1-Binder trägt (s. Abb. 7.6).

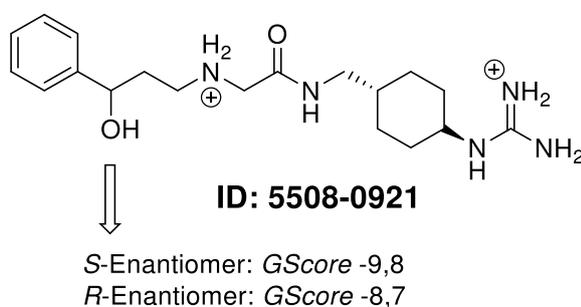


**Abbildung 7.6.** Darstellung des co-kristallisierten Liganden, der zum Docking verwendeten Kristallstruktur (PDB: 2YOL).<sup>[108]</sup>

Um die Bibliothek an das Zielprotein docken zu können, musste zunächst das Protein vorbereitet werden. Dies geschah mittels *Protein Preparation Wizard*.<sup>[186]</sup> Hierbei werden zu Beginn fehlende Aminosäureseitenketten ergänzt und für die Bindung des Liganden unwichtige Wassermoleküle entfernt. Im Anschluss werden die Bindungsordnungen aller Aminosäuren beim gewählten pH-Wert ermittelt und die entsprechenden Wasserstoffatome zur Struktur hinzugefügt. Abschließend folgt eine Energieminimierung der hinzugefügten Wasserstoffatome. Im nächsten Schritt wurde die Fragment-Bibliothek mittels *LigPrep* und *Epik* vorbereitet.<sup>[187]</sup> Zunächst werden hierbei die Wasserstoffatome der Fragmente ergänzt. Ausgehend von den gewählten Parametern werden nachfolgend alle vom Programm als wahrscheinlich erachteten Protonierungszustände, Tautomere und Isomere der einzelnen Fragmente erzeugt. Aus den 1615 Fragmenten der Carboxylat-Bibliothek wurden so insgesamt 2270 Strukturen erzeugt, welche daraufhin mit Amin **19** kombiniert

werden konnten. Hierzu wurde die *Combinatorial Library Enumeration*-Funktion der *Schrodinger Suite* verwendet. Das Amin wurde dabei als Kernverbindung voreingestellt und an der festgelegten Position (Amin-Funktion) mit der Carbonsäure-Funktion der Fragmente verknüpft. Die erzeugten Strukturen wurden abschließend energieminiert und waren nun bereit, um an der definierten Protein-Bindungsstelle (Rezeptor-*Grid*) mittels *Glide* gedockt zu werden. *Glide* bietet hierbei zwei auf verschiedenen Algorithmen basierende Docking-Modi: SP- und XP-Docking. XP-Docking zeichnet sich durch ein, im Vergleich zum SP-Modus, extensiveres *sampling* aus, d. h. es wird eine höhere Anzahl unterschiedlicher Orientierungen des Liganden zum Protein erzeugt und getestet. Somit sollen genauere Ergebnisse erzielt werden, was jedoch mit einer erhöhten Rechenzeit einhergeht.<sup>[147, 148]</sup>

Das Screening der gesamten Bibliothek wurde daher zunächst im SP-Modus durchgeführt. Die 100 bestbewerteten Posen bzw. deren zugehörige Strukturen wurden im Anschluss nochmals im XP-Modus gedockt (Tabelle A.3. zeigt die 40 besten gedockten Strukturen). Insgesamt konnte beim durchgeführten *in-silico* Screening nur eine geringe Korrelation mit den Ergebnissen aus dem *in-situ* Screening gefunden werden. Mit Ausnahme von **5508-0921** (s. Abb. 7.7) tauchte keine der 78 experimentell gefundenen Hits auch unter den 100 bestbewerteten Posen des *in-silico* Screenings auf. Zwar wurde für **5508-0921** ein verhältnismäßig hoher *GScore* von -9,82 ermittelt, *in-situ* konnte jedoch auch für diese Verbindung nur eine Inhibition von 20 % (Screen 1) bzw. 39 % (Screen 2-10) gefunden werden.



**Abbildung 7.7.** Darstellung von **5508-0921**, der einzigen Fragment-Kombination, die sowohl *in-situ* als auch *in-silico* als Hit identifiziert wurde.

Bei jeder der gedockten Fragment-Kombinationen wurde korrekterweise die Guanidin-Wechselwirkung mit Asp-129 in der S1-Bindetasche als stärkste Wechselwirkung erkannt. Ausgehend von diesem festen Ankerpunkt war daher zu erwarten, dass das resultierende vereinfachte Docking-Experiment zu einer höheren Korrelation mit den experimentell gefundenen Ergebnissen führt. Als Grund für diese geringe Korrelation sind die Unterschiede der Kristallisations-Bedingungen (20 % PEG 3350; 0,1 M HEPES-Puffer (pH 7,4)) im Vergleich zu den im Assay verwendeten Bedingungen (20 % Glycerol; 10 mM MOPS-Puffer (pH 8); 3,2 % DMSO) denkbar. Zwar wurden beim Docking die pH-Verhältnisse angeglichen, jedoch können die Wahl des Puffers sowie die des verwendeten Polyols einen großen Einfluss auf die Stabilität und Aktivität der WNV NS2B-NS3-Protease haben.<sup>[188, 189]</sup> Unterschiede im Bindungsverhalten sind daher auch beim Vergleich des *in-silico*- mit dem *in-situ*-Screening möglich. Fraglich ist ebenso, inwieweit die tatsächlichen komplexen Bindungsverhältnisse der WNV NS2B-NS3-Protease vom verwendeten Programm simuliert werden konnten. Schwierigkeiten ergeben sich hier z. B. aufgrund der Flexibilität der NS2B-NS3-Protease sowie aufgrund der flachen, Lösungsmittel-exponierten Bindungstaschen.<sup>[190, 191]</sup>

Gleichzeitig führt jedoch auch der hohe Anteil an Assay-spezifischen falsch-positiv und falsch-negativ Ergebnissen des *in-situ* durchgeführten Primär-Screenings zu einer Senkung der Hit-Korrelation. Da sich diese durch geeignete Filtermechanismen und Folgeexperimente jedoch leichter identifizieren ließen, wurde bei der anschließenden Hit-Auswahl der Fokus weiterhin auf die experimentell gefundenen Ergebnisse bzw. die bereits gewählten 78 Hit-Fragmente gelegt.

## 7.6. Hit-Auswahl

Ausgehend von den zuvor ausgewählten 78 Fragment-Kombinationen sollten anschließend die aussichtsreichsten Verbindungen in einem größeren Maßstab synthetisiert und weitergehend untersucht werden. Zur Auswahl dieser Verbindungen kamen verschiedene Methoden zum Einsatz (s. Abb. 7.8):

## 78 Hits

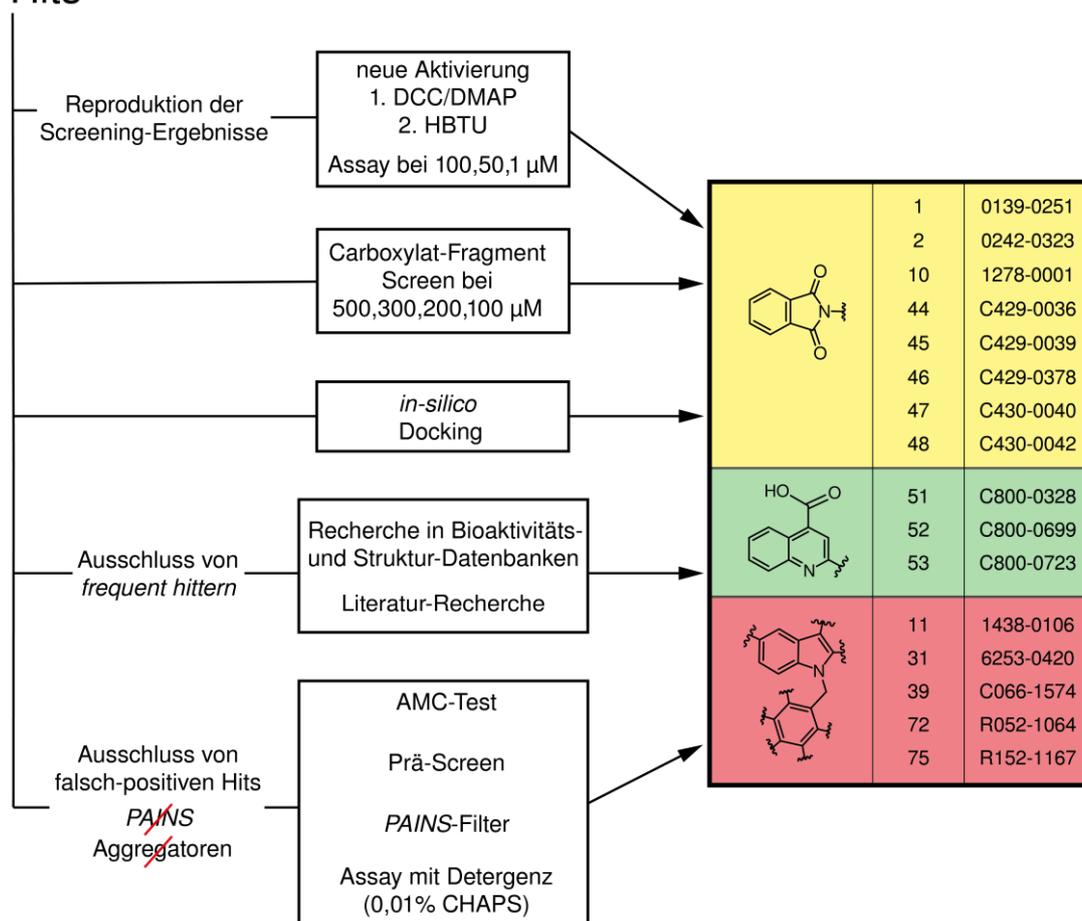


Abbildung 7.8. Übersicht der zur Hit-Selektion verwendeten Methoden/Experimente.

Zunächst wurde zur Überprüfung der Ergebnisse aus den Screens die entsprechenden Fragmente auf separaten Platten nochmals mit beiden Aktivierungsmethoden zum entsprechenden Ligationsprodukt umgesetzt. Die erfolgreiche Bildung der Fragment-Kombinationsprodukte wurde wie zuvor mittels LC/MS überprüft. Diese neuen Ansätze wurden *in-situ* bei einer Amid-Konzentration von 100, 50 und 1  $\mu\text{M}$  im Inhibitionsassay getestet (s. Tabelle A.2). Hierbei konnten die aus dem Primär-Screen erhaltenen Ergebnisse in hohem Maße bestätigt werden. Dies gilt ebenso für die zur Reproduktion der Ergebnisse des Primär-Screenings durchgeführten Messungen der Carboxylat-Fragmente und der Wiederholung des *in-silico* Dockings.

Neben statistischen Schwankungen sowie anwender-/ und gerätebedingten Fehlern wird ein hoher Anteil falsch-positiver Ergebnisse durch sogenannte *PAINS* (*pan assay interference compounds*)<sup>[192, 193]</sup> verursacht. Das Aussortieren dieser *PAINS* ist zwar gängig, birgt jedoch auch die Gefahr, dass aktive Verbindungen verworfen werden. Die Interferenz der Substanzen kann dabei auf verschiedenen Mechanismen beruhen. Bekannte Mechanismen sind hierbei bspw. Aggregation, chemische Reaktivität, Redox-Aktivität, Interferenz durch enthaltene Verunreinigungen, Assay-spezifische Störmechanismen sowie Absorptions- und Fluoreszenz-Interferenzen.<sup>[194]</sup> Beim durchgeführten Protease-Inhibitionsassay sind Interferenzen mit dem eingestrahnten sowie dem emittierten Licht besonders relevant. Eine Störung kann hier bedingt durch die absorptiven Eigenschaften des Fragments sowie aufgrund möglicher Eigenfluoreszenz entstehen.

Um den Einfluss der Fragmente bzw. der Fragment-Kombinationen auf die im Assay verwendeten (Mess-)Wellenlängen zu überprüfen, wurde eine, der Zusammensetzung im Assay entsprechende, 100  $\mu\text{M}$ -Testlösung der Fragment-Kombinationen hergestellt, ausgehend von Ansätzen beider verwendeter Aktivierungsmethoden. Diese Testlösung enthielt ebenfalls AMC in einer Konzentration von 50  $\mu\text{M}$ . Eine vergleichbare Kontrolllösung ohne Testsubstanz führte zu einem RFU-Wert von ca. 16000. Zur Bewertung von möglichen Fragment-bedingten Störeinflüssen auf das Detektionssignal wurde die Abweichung der Testlösungen im Vergleich zur Kontrolllösung ermittelt (s. AMC-Test in Tabelle A.4). Hierbei wurde eine Abweichung von  $>5000$  als deutliche Abweichung im Vergleich zur Kontrolle gewertet. Dies konnte im Fall von 20 Fragment-Kombinationen nachgewiesen werden. Bei den jeweiligen Fragmenten lag der Verdacht nahe, dass ein falsch-positives Ergebnis aufgrund von Interferenzen mit dem Messsignal erhalten wurde und die entsprechenden Substanzen wurden daher aussortiert.

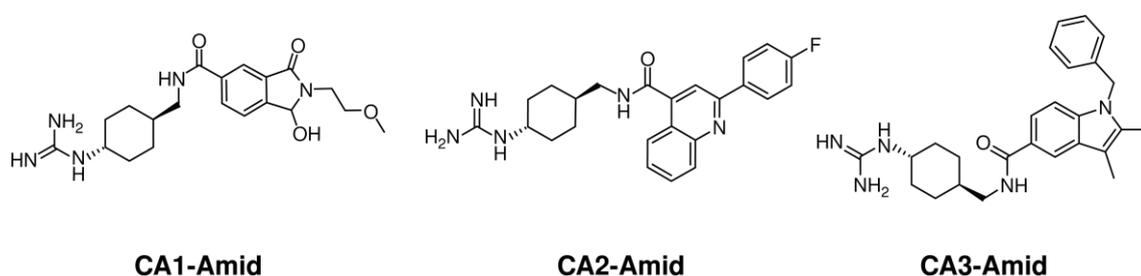
Weiterhin wurde die Eigenfluoreszenz der Fragment-Kombinationen durch einen sog. RFU *Prescan* überprüft (s. RFU *Prescan* in Tabelle A.4). Dabei wurde die Fluoreszenzintensität der Messlösungen vor Zugabe des Fluoreszenzsubstrats gemessen. Die Amid-Konzentration lag hierbei entsprechend bei 120  $\mu\text{M}$ . Bei 15 Substanzen konnte ein RFU-Wert von  $>5000$  im Vergleich zur Probe ohne Testsubstanz gefunden werden. Die Schnittmenge zum vorangegangenen AMC-Test lag bei 14 Fragment-Kombinationen. Die

eine im AMC-Test nicht erfasste Testsubstanz wurde aussortiert, da auch hier von einem falsch-positiven Ergebnis im Primär-Screen auszugehen war.

Ein weiterer bedeutender *PAIN*-Mechanismus ist die Aggregation der Testsubstanzen. Diese Aggregate können ebenfalls in unspezifischer Weise mit dem Enzym interagieren und so die Enzymaktivität herabsetzen.<sup>[195]</sup> Dies kann durch Detergenzien-Zugabe verhindert werden, wobei hier meist Triton X-100 in einer Konzentration von 0,01–0,1 % eingesetzt wird.<sup>[196]</sup> Da dies jedoch die Aktivität der WNV NS2B-NS3-Protease senkt,<sup>[197]</sup> wurde zur Überprüfung des Aggregationsverhaltens der gefundenen Fragment-Kombinationen als Alternative CHAPS in einer Konzentration von 0,01 % eingesetzt. Hierbei konnte im Fall der 78 getesteten Kombinationen keine verringerte Inhibition auf die zuvor ermittelten Inhibitionswerte festgestellt werden. Somit konnte Aggregation als Grund für die gefundene Inhibition ausgeschlossen werden.

Abschließend wurde ein *PAIN*-Filter zum Ausschluss der restlichen *PAIN*-Strukturen verwendet. Hierbei wurde die *FAF-Drugs3*-Datenbank<sup>[198]</sup> verwendet, deren Software die jeweiligen Strukturen, basierend auf den von Baell *et al.*<sup>[199]</sup> im Jahr 2010 veröffentlichten Filtern, aussortiert. Somit konnten nochmals 8 der 78 Fragment-Kombinationen aussortiert werden.

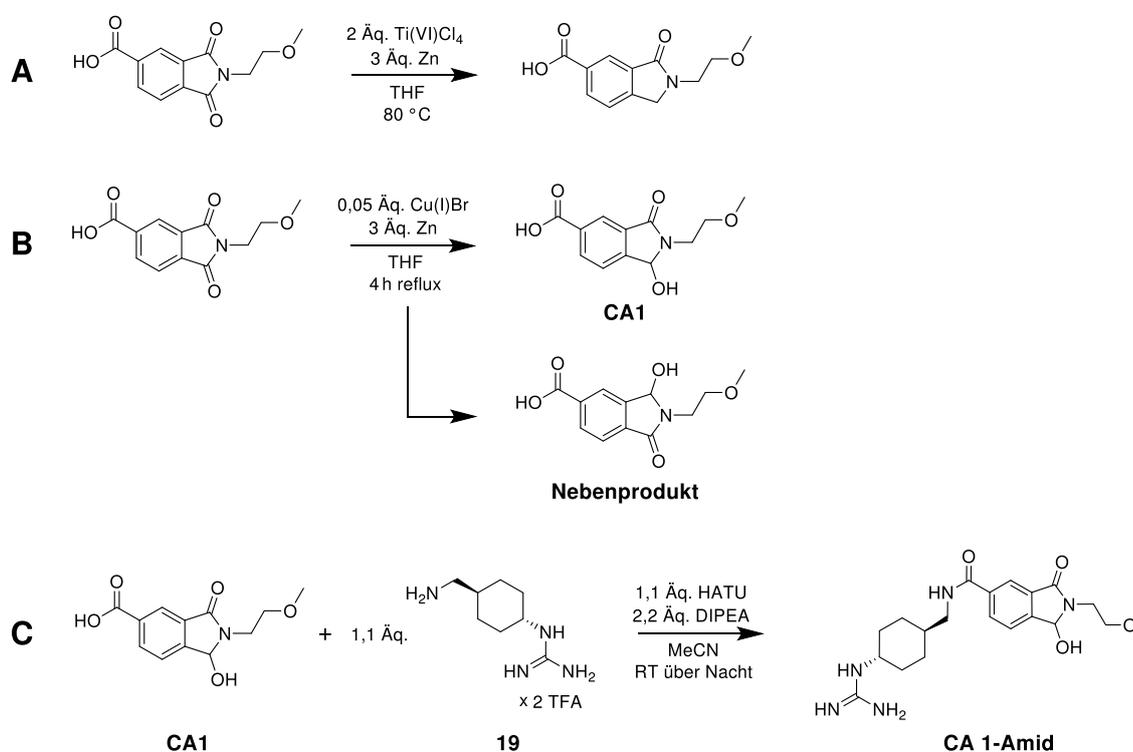
Ausgehend von den durchgeführten Tests wurden drei aussichtsreiche Strukturgruppen (s. Abb. 7.8) ausgewählt, die in nachfolgenden Experimenten näher untersucht werden sollten. Dazu wurde pro Strukturgruppe eine Fragment-Kombination gewählt, die synthetisch gut zugänglich ist und als Repräsentant der jeweiligen Gruppe in größerem Maßstab hergestellt werden sollte (s. Abb. 7.9).



**Abbildung 7.9.** Ausgewählte Fragment-Kombinationen.

## 7.7. Synthese der ausgewählten Fragment-Kombinationen

**CA1** wurde ausgehend vom käuflich erworbenen Phthalimid hergestellt. Eine bereits in der Arbeitsgruppe erprobte Reduktionsmethode unter Verwendung von  $\text{Ti(IV)Cl}_4$  / Zn in THF führte hier nicht zum Ziel, da bereits nach 2 h die vollständige Reduktion zum Lactam mittels LC/MS nachgewiesen werden konnte (s. Schema 7.2 (A)).

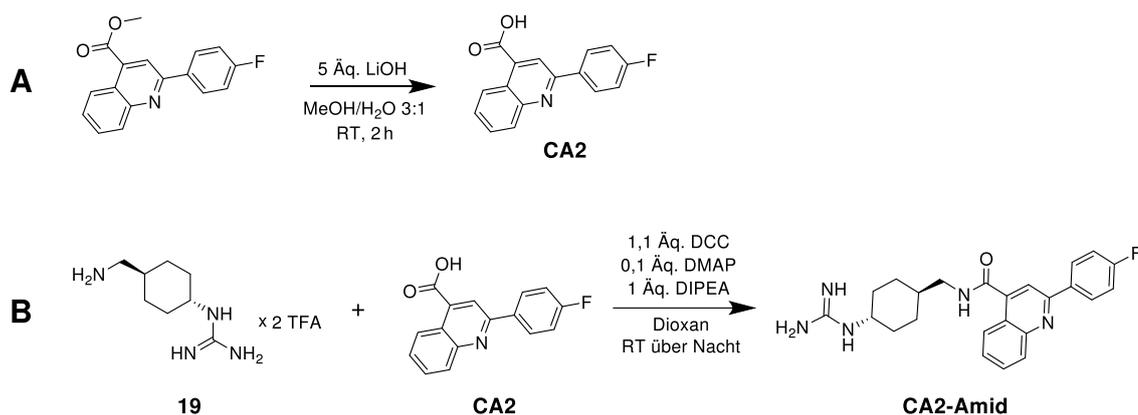


**Schema 7.2.** Reduktion des Phthalimids mit  $\text{Ti(IV)Cl}_4$  / Zn (**A**) bzw.  $\text{Cu(I)Br}$  / Zn (**B**). (**C**) Kupplung von **CA1** mit Amin **19** führt zur Bildung des gewünschten Produkts **CA1-Amid**.

Unter Verwendung einer Vorschrift von Wang *et al.*<sup>[200]</sup> konnte durch Reduktion mit  $\text{Cu(I)Br}$  / Zn jedoch das gewünschte Arylhydroxylactam **CA1** in einer Ausbeute von 81 % erhalten werden (s. Schema 7.2 (B)). Hierbei konnte mittels  $^1\text{H-NMR}$  festgestellt werden, dass bei der Reaktion ebenfalls das Regioisomer als Nebenprodukt in einem Verhältnis von ca. 1:4 im Vergleich zum gewünschten Produkt **CA1** entsteht (s. A.4. NMR

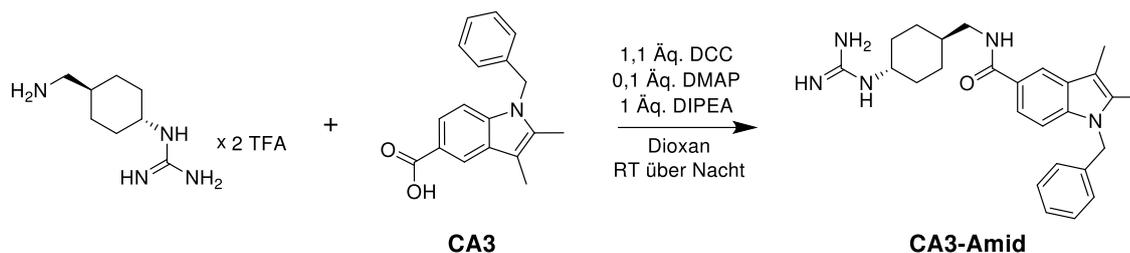
**CA1:** 8.09 (s, 0.26 H), 7.755 (d,  $J = 7.7$  Hz, 0.1 H)). Jegliche Versuche dieses Nebenprodukt von **CA1** abzutrennen, waren aufgrund der sehr ähnlichen physikalischen Eigenschaften der beiden Verbindungen nicht erfolgreich. Auch der Versuch die Verbindungen nach Kupplung mit Amin **19** (s. Schema 7.2 (C)) aufzutrennen war nicht zielführend. Hier wurde die geplante Aufreinigung durch die unerwartete Instabilität von **CA1-Amid** verhindert. Diese führt zur Spaltung der Amid-Bindung zurück zu den Ausgangsfragmenten. Denkbarer Grund für diese Instabilität könnte ein intra- oder intermolekularer Angriff des Guanidin-Rests an der Hydroxylactam-Struktur sein (vgl. Abschnitt 5.2).

**CA2** konnte ausgehend vom käuflich erworbenen Methylester erhalten werden (s. Schema 7.3). Die Esterhydrolyse mit LiOH führte zu einer Ausbeute von 87 %. Im Anschluss folgte die Kupplung mit Amin **19** unter Verwendung von DCC/DMAP in Dioxan. Das gewünschte Produkt **CA2-Amid** konnte in einer Ausbeute von 84 % erhalten werden.



**Schema 7.3.** Schematische Darstellung der Synthese von **CA2-Amid**. (A) Esterhydrolyse führt zu **CA2**. (B) Kupplung von Amin **19** mit **CA2** führt zum gewünschten Produkt **CA2-Amid**.

Das Carboxylat-Fragment **CA3** konnte direkt käuflich erworben werden. Die Kupplung mit Amin **19** erfolgte abermals unter Verwendung von DCC/DMAP in Dioxan (s. Schema 7.4). **CA3-Amid** konnte so in einer Ausbeute von 81 % erhalten werden.



Schema 7.4. Schematische Darstellung der Synthese von CA3-Amid.

## 7.8. IC<sub>50</sub> - Bestimmung der Screening-Hits

Nachfolgend wurden die IC<sub>50</sub>-Werte der synthetisierten Fragment-Kombinationen bestimmt (s. Tabelle 7.2). Hierzu wurde der unter 7. beschriebene Aktivitätsassay der WNV NS2B-NS3-Protease verwendet.

Tabelle 7.2. Ermittelte IC<sub>50</sub>-Werte

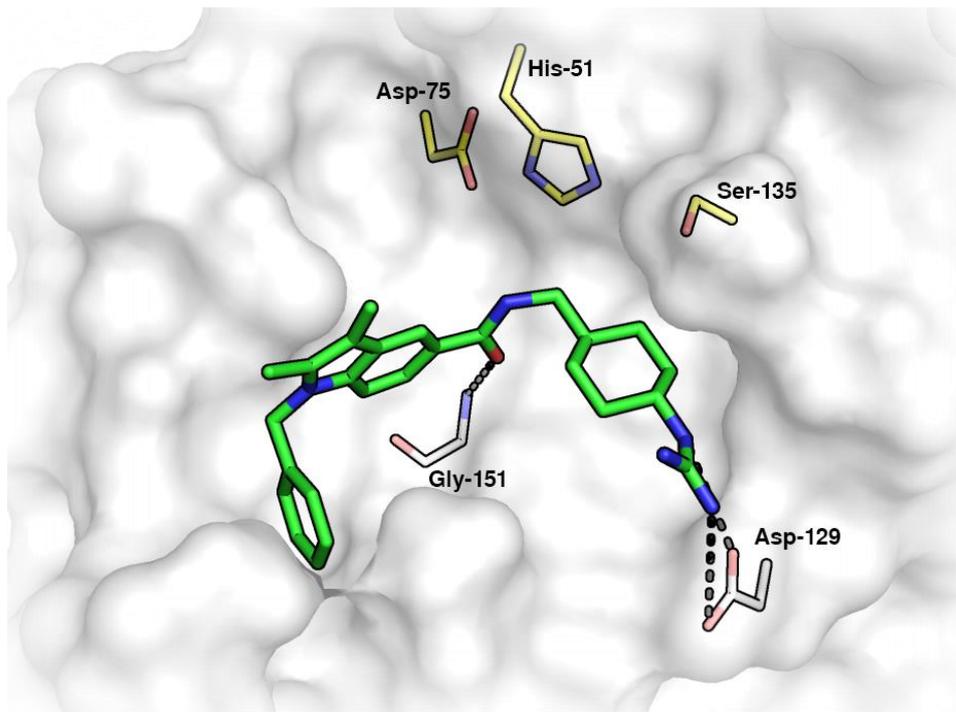
Verbindung	Struktur	IC <sub>50</sub>
CA1		270 (± 0,5) μM
CA2-Amid		81 (± 0,4) μM
CA3-Amid		2,66 (± 0,7) μM

Aufgrund der unter 7.7. beschriebenen Instabilität von **CA1-Amid** wurde das, mit dem Regioisomer verunreinigte **CA1** getestet, um eine Abschätzung der Potenz des Carboxylat-Fragments bzw. des Fragment-Kombinationsprodukts zu ermöglichen. Hier wurde mit  $270 (\pm 0,5) \mu\text{M}$  ein, im Verhältnis zur Größe des Fragments vielversprechender  $\text{IC}_{50}$ -Wert erhalten. Aufgrund der höheren Potenz der Fragment-Kombinationen **CA2-Amid** und **CA3-Amid** und der problematischen Isolierung von **CA1** sowie der Instabilität von **CA1-Amid**, wurden die Verbindungen **CA1** bzw. **CA1-Amid** jedoch nicht weitergehend getestet. Für **CA2-Amid** konnte ein  $\text{IC}_{50}$ -Wert von  $81 (\pm 0,4) \mu\text{M}$  erhalten werden. Dies entspricht einer im Vergleich zu Amin **19** ( $\text{IC}_{50}$ -Wert:  $1,055 \text{ mM}$ ) bereits deutlichen Affinitätssteigerung. Als noch potenter stellte sich jedoch die Fragment-Kombination **CA3-Amid** heraus, für die ein  $\text{IC}_{50}$ -Wert von  $2,66 (\pm 0,7) \mu\text{M}$  ermittelt werden konnte. Hier konnte durch die Ligation mit dem Carboxylat-Fragment die Affinität im Vergleich zum Amin-Fragment **19** somit um drei 10er-Potenzen gesteigert werden. Dies macht **CA3-Amid** zu einer vielversprechenden Verbindung, deren Potenz im Zuge von Struktur-Wirkungsbeziehungs-Studien sogar noch weiter zu steigern sein sollte.

## 7.9. Modellierter Komplex von CA3-Amid mit der WNV NS2B-NS3-Protease

Zur Aufklärung des Bindungsmodus von **CA3-Amid** wurde ein Docking wie unter 7.5. beschrieben durchgeführt (s. Abb. 7.10). Dabei konnte gezeigt werden, dass **CA3-Amid** mit der Amin **19**-Teilstruktur wie zu erwarten in der S1-Bindetasche bindet, wo die Guanidin-Funktion mit Asp-129 interagiert. Die zwischen Amin- und Carboxylat-Fragment geknüpfte Amidbindung wechselwirkt mit dem Sauerstoffatom der Carbonylfunktion über eine Wasserstoffbrückenbindung mit dem Stickstoffatom von Gly-1151. Der co-kristallisierte Inhibitor (s. Abb. 7.6) der verwendeten Kristallstruktur bindet nachfolgend mittels zweier 4-Aminobutylseitenketten in der S2- bzw. S3-Bindetasche.<sup>[108]</sup> Diese Wechselwirkungen in S2 und S3 sind bei **CA3-Amid** nicht vorhanden bzw. in S3 bestenfalls schwach ausgeprägt. In die folgende, wenig-spezifische S4-Bindetasche bindet **CA3-Amid** über hydrophobe Wechselwirkungen.

Die Begründung des beobachteten Affinitätsunterschieds von **CA3-Amid** ( $K_I$ -Wert =  $1,33 (\pm 0,2) \mu\text{M}$ ) zum co-kristallisierten Liganden aus der Hammamy-Veröffentlichung ( $K_I$ -Wert =  $0,13 \mu\text{M}$ )<sup>[108]</sup> liegt vermutlich in der fehlenden Interaktion mit S2/S3. Durch strukturelle Modifikation im Zuge von Struktur-Wirkungsbeziehungs-Studien ist daher auch bei **CA3-Amid** mit einer deutlichen Affinitätssteigerung zu rechnen, wenn Teilstrukturen gefunden werden, die in die S2/S3-Taschen binden.



**Abbildung 7.10.** Darstellung des modellierten Komplexes von **CA3-Amid** mit der WNV NS2B-NS3-Protease (PDB: 2YOL). Die wichtigsten Aminosäure-Interaktionspartner sind in grau abgebildet, die Aminosäuren der katalytischen Triade in gelb.

## 8. Abschlussdiskussion

Im Zuge dieser Arbeit wurden zwei unterschiedliche Amidierungsmethoden untersucht bzw. entwickelt, die sich zur irreversiblen Ligation von Carbonsäure-Fragmenten mit einem Amin-Fragment eignen.

Im ersten Teil der Arbeit konnte erstmalig die Templat-unterstützte Amidierungsreaktion zweier Fragmente gezeigt werden. Hierzu wurde ausgehend von der Carbonsäure-Teilstruktur eines publizierten Faktor Xa-Inhibitors zunächst eine Reihe aktivierter Carbonsäurederivate hergestellt. Diese wurden nachfolgend mit dem S1-bindenden Amin **14** unter Verwendung von Faktor Xa als Templat auf die Bildung des Amid-Ligationsprodukts hin untersucht. Hierbei konnte gezeigt werden, dass die Amidierung im Fall des Phenylesters der eingesetzten Carbonsäure nahezu ohne Hintergrundreaktion durch Templat-ungebundene Fragmente abläuft. Im Fall des Trifluorethylesters konnte sogar die vollständig Proteintemplat-gesteuerte Umsetzung zum Amid nachgewiesen werden. Der Nachweis des Fragment-Ligationsprodukts konnte hierbei sowohl über einen einfachen, aber hochsensitiven Enzymaktivitätsassay erfolgen als auch mittels LC/MS-Analytik.

In der nachfolgenden methodischen Untersuchung der gefundenen Templat-unterstützten Reaktion wurden zunächst Bedingungen zur Maximierung des Templat-Effekts getestet. Im Fall der Reaktion von Phenylester **11** mit Amin **14** konnte nach 10 h bei 37 °C eine maximale Inhibition festgestellt werden, welche jedoch mit einer erhöhten Hintergrundreaktion einherging. Für die Reaktion des Trifluorethylesters **12** mit **14** konnte hingegen nach 10 h bei 37 °C eine 80%ige Inhibition ohne jegliche Hintergrundreaktion festgestellt werden. Anschließend wurde die Reaktionskinetik der Templat-gesteuerten Reaktion mittels hochauflösendem LC-QTOF-MS verfolgt. Hierbei konnte das Vorliegen eines auto-inhibitorischen Prozesses gezeigt werden, da das hochaffine Ligationsprodukt die weitere Bindung und Umsetzung zum Amid verhindert. Dies äußerte sich durch Bildung eines Plateaus bei einer Maximalkonzentration von 25,6 nM (Phenylester-Reaktion mit **14**) bzw. 9,6 nM (Trifluorethylester-Reaktion mit **14**).

Im Anschluss wurde der Ablauf der Proteintemplat-gesteuerten Reaktion auf molekularer Ebene untersucht. Ausgehend von der Kristallstruktur des Ligationsprodukts **15** wurden modellierte Komplexe der gebundenen Aktivester-Fragmente **11/12** und Amin **14** berechnet. Anhand dieser konnte die Distanz des angreifenden Amin-Stickstoffs zum Carbonyl-Kohlenstoff ermittelt werden. Hierbei wurde für beide templierten Reaktionen ein Abstand von 3,4 Å gefunden. Auf Grundlage dieses Abstands und der ebenfalls aus den modellierten Komplexen ermittelten N-C-O-Winkel (82° für **11/14** und 83° für **12/14**), konnte die Hypothese der Templat-unterstützten Reaktion auf molekularer Ebene bestätigt werden.

Die Betrachtung der resultierenden Bindungsenergien von Ligationsprodukt **15** im Vergleich zu den Ausgangsfragmenten **1** und **14** ergab, dass die Ligation der Fragmente mit einer superadditiven Bindungsenergiezunahme einhergeht. Besonders in der vorliegenden Größenordnung (Verknüpfungskoeffizient  $E = 0,0078$ ) ist dies nur selten zu beobachten. Durch Synthese und Testung von verkürzten Amid-Derivaten von **1** und **14** (→ Verbindung **16** und **17**) konnte dabei nachgewiesen werden, dass der Linker des Ligationsprodukts **15** nicht zur Bindungsenergiezunahme beiträgt. Somit kann angenommen werden, dass die weniger negative Bindungsentropie, die sich aus der Verknüpfung der Fragmente ergibt, die Ursache für die beobachtete Superadditivität ist.

Der erste Teil dieser Arbeit stellt somit die erste umfassende Untersuchung einer Proteintemplat-gesteuerten Reaktion dar. Erstmals konnte dabei die Proteintemplat-unterstützte Synthese einer Amidbindung nachgewiesen werden. Aufgrund der essentiellen Bedeutung der Amidfunktion in der Natur und der hohen Verbreitung in bisher entdeckten bioaktiven Liganden,<sup>[109]</sup> stellt dies eine enorme Bereicherung des Repertoires Templat-unterstützter Fragment-Ligationsreaktionen dar. Da es sich bei der Reaktion um eine nicht-enzymatische Proteinkatalyse handelt, kann die Proteintarget-gesteuerte Synthese von Amidien dabei prinzipiell nicht nur zur Erzeugung von Proteaseliganden eingesetzt werden, sondern ist universell, unabhängig von der katalytischen Funktion des Proteins, an allen Proteinoberflächen einsetzbar, die dazu in der Lage sind, zwei Fragmente benachbart, in einer geeigneten Orientierung zu binden. Somit eignet sich die

Templat-unterstützte Amidierung zur systematischen Untersuchung von, zu einem gefundenen Primärfragment benachbarten Proteinbindungstaschen und ermöglicht dabei die Optimierung des jeweiligen Liganden durch einen natürlichen Selektionsmechanismus.

Im zweiten Teil der Arbeit konnte eine technologisch-orientierte Amidierungsmethode zur Fragment-Ligation im Hochdurchsatzformat entwickelt werden. Hierzu wurden zunächst Bedingungen getestet, die eine Aktivierung von Carbonsäuren zum Trifluorethyl-, Phenyl-, und Thiophenylester im Mikrotiterplatten-Maßstab ermöglichen. Die klassische Steglich-Veresterung mit 1,1 Äq. DCC und 0,1 Äq. DMAP in Dioxan stellte sich hierbei als besonders effizient heraus. Unter diesen Bedingungen konnte die Umsetzung der exemplarisch verwendeten Carbonsäure **1** bei einer Reaktionszeit von 2 h mit Umsetzungsraten von 88 % (Thiophenylester) über 98 % (Phenylester) bis hin zur vollständigen Umsetzung (Trifluorethylester) erreicht werden. Eine so aktivierte Carbonsäure-Bibliothek könnte nachfolgend mit einem gewünschten Amin zu den jeweiligen Amiden umgesetzt werden und im Anschluss innerhalb verschiedenster Screening- und Assayformate eingesetzt werden. Da die erzeugten Aktivester in hohem Maße lagerstabil sind, kann eine einmal aktivierte Carbonsäure-Bibliothek dabei diverse Male verwendet werden.

Für das in Abschnitt 7 durchgeführte Screening gegen die WNV NS2B-NS3 Protease wurde jedoch die Carbonsäure-Bibliothek direkt mit Amin **19** zu den entsprechenden Amiden umgesetzt. Auch für diese *in-situ* durchgeführte Amidierung mussten zunächst geeignete Reaktionsbedingungen gefunden werden. Um eine größtmögliche Anzahl an Carbonsäure-Fragmenten zum Amid zu überführen, wurden hierbei schlussendlich zwei verschiedene Aktivierungsmethoden gewählt: 1,1/0,1 Äq. DCC/DMAP in Dioxan (Screen 1) und 1,1/2,2 Äq. HBTU/DIPEA in einem 1:1-Gemisch DMSO/DMF (Screen 2). Im Anschluss folgten die zweifach durchgeführte Umsetzung der 1615 Carbonsäure-Fragmente zu den jeweiligen Amiden sowie die nachfolgende Testung der Fragment-Kombinationen im WNV NS2B-NS3 Protease Aktivitätsassay. Nach der Validierung der Ergebnisse konnten durch geeignete Hit-Selektionsschritte zunächst 78 Hit-Fragment-Kombinationen ausgewählt werden. Von dieser Vorauswahl wurden durch weitere Selektionsschritte drei aussichtsreichste Fragment-Kombinationen ausgewählt, die nachsynthetisiert und anschließend näher untersucht wurden. Für die aussichtsreichste

Fragment-Kombination **CA3-Amid** konnte dabei ein  $IC_{50}$ -Werte von 2,66  $\mu$ M ermittelt werden. Somit stellt **CA3-Amid** eine vielversprechende Verbindung dar, deren Potenz im Zuge von Struktur-Wirkungsbeziehungs-Studien sogar noch weiter zu steigern sein sollte.

Im zweiten Teil dieser Arbeit konnte damit erfolgreich eine technologische Variante der Amidierung entwickelt werden, die sich zur effektiven Suche neuer Proteaseinhibitoren eignet, da sie eine schnelle Umsetzung und Testung ganzer Fragment-Bibliotheken ermöglicht. Die dabei verwendete *in-situ* Amidierung, mit Fokus auf die Entwicklung von Reaktionsbedingungen, die im Mikrotiterplatten-Maßstab durchgeführt werden können, lässt die bequeme und praktikable Parallelisierung der Methode mit zahlreichen Einsatzmöglichkeiten innerhalb diverser Screening- und Assayformate im Hochdurchsatzformat möglich werden.

### **III. Experimenteller Teil**



# 9. Materialien und Methoden

## 9.1. Materialien

Die Chemikalien und Reagenzien wurden von Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland), Bachem (Bubendorf, Schweiz), VWR (Darmstadt, Deutschland), Alfa Aesar (Karlsruhe, Deutschland) und ABCR (Karlsruhe, Deutschland) bezogen und ohne weitere Aufreinigung verwendet. Die wasserfreien Lösungsmittel wurden in HPLC-grade Qualität von VWR und Merck (Darmstadt, Deutschland) erworben. Acetonitril zur MS-Analytik wurde in LC/MS-grade Qualität erworben und stammt von der Firma VWR. Wasser für die Aufreinigung mittels präparativer HPLC und zur MS-Analytik wurde über ein LaboStar™ UV 2 Reinstwassersystem der Firma Siemens (Barsbüttel, Deutschland) gewonnen. Deuterierte Lösungsmittel für die NMR-Spektroskopie wurden von Deutero GmbH (Kastellaun, Deutschland) und Carl Roth GmbH und Co. KG (Karlsruhe, Deutschland) bezogen. Trockenes Methanol, DCM, THF und DMF wurden der MB-SPS-800 Lösungsmitteltrocknungsanlage der Firma MBraun (Garching, Deutschland) entnommen.

Faktor Xa (Human Factor Xa HCXA-0060; 5 mg/ml) wurde von der Firma HTI (Essex Junction, VT, USA) bezogen, aliquotiert und bei -20 °C aufbewahrt. Das für den Faktor Xa-Aktivitätsassay verwendete Fluoreszenzsubstrat Boc-LGR-AMC wurde von Bachem (Bubendorf, Schweiz) bezogen. Die rekombinante WNV NS2B-NS3-Protease wurde von Dr. Christoph Arkona am Pharmazeutischen Institut Berlin hergestellt und mithilfe eines Äkta-Systems aufgereinigt. Für die Stammlösung wurde eine Konzentration von 31 µM bestimmt. Die Stammlösung wurde aliquotiert und bei -80 °C aufbewahrt. Das für den WNV NS2B-NS3-Protease-Aktivitätsassay verwendete Fluoreszenzsubstrat Cbz-GKR-AMC wurde von Franziska Gottschalk am Pharmazeutischen Institut der Universität Leipzig synthetisiert. Die Reinheit der Verbindung wurde mittels LC/MS-Analytik und NMR nachgewiesen.

## 9.2. Allgemeine instrumentelle Methoden und verwendete Geräte

### 9.2.1. Präparative HPLC

Die Aufreinigung mittels präparativer HPLC wurde mit einer Agilent 1260 Infinity series durchgeführt (Agilent, Santa Clara, CA, USA). Zur Detektion wurde ein Multiwellenlängen-Detektor eingesetzt (Messwellenlänge: 210 nm und 254 nm). Die verwendete Trennsäule stammte von Macherey Nagel (VP 150/32 Nucleodur C18 HTec, 5  $\mu$ M). Als Laufmittel wurden Acetonitril/Wasser-Gemische eingesetzt mit einem 0,1% Trifluoressigsäure-Zusatz. Die Trennung wurde mit einem linearen Gradienten (Acetonitril-Anteil: 5-95 % in 32 Minuten) durchgeführt. Die Flussrate betrug 30 ml/min. Die aufzureinigenden Substanzen wurden in einem Acetonitril/Wasser-Gemisch gelöst, wobei der Acetonitril-Anteil maximal 50 % betrug. Die maximal auf die Trennsäule gegebene Substanzmenge betrug 100 mg pro Lauf.

### 9.2.2. LC/MS-Analytik

Die LC/MS-Analytik wurde auf einem Agilent 1100 series Hochleistungsflüssigkeitschromatographie-Massenspektrometer der Firma Agilent (Santa Clara, CA, USA) durchgeführt. Die HPLC-Anlage war mit einem UV/VIS- und DAD-Detektor ausgestattet. Als Standard-Messwellenlängen wurden 210 nm und 254 nm genutzt. Die verwendete Trennsäule war eine Luna C18 (3  $\mu$ m, 4,6  $\times$  100 mm) von Phenomenex (Aschaffenburg, Deutschland). Als Laufmittel wurden Acetonitril/Wasser-Gemische eingesetzt mit einem 0,1% Ameisensäure-Zusatz. Die Proben wurden in einem Acetonitril/Wasser-Gemisch (1:1) gelöst. Die Elution erfolgte zunächst für 5,5 Minuten mit einem linearen Gradienten (Acetonitril-Anteil: 5–99 %), anschließend folgte eine 4,5-minütige isokratische Elutionsphase (Acetonitril-Anteil: 99 %). Die Flussrate betrug 1 ml/min. Das gekoppelte Single-Quadrupol-Massenspektrometer nutzte zur Ionisierung der zu analysierenden Moleküle Elektrospray-Ionisation. Dabei wurde eine Kapillarspannung von 3 kV verwendet. Das Desolvatisierungsgas wurde mit einer Flussrate von 12 l/min bei einem Druck von 12,4 bar und einer Temperatur von 350 °C eingesetzt. Die Datenverarbeitung erfolgte unter Verwendung der *ChemStation*-Software von Agilent.

### 9.2.3. LC-HRMS-Analytik

Zur Ermittlung der hochaufgelösten Massen der Verbindungen **1–15** wurde ein 6210 ESI-TOF von Agilent (Santa Clara, CA, USA) verwendet. Die Flussrate betrug 4  $\mu\text{L}/\text{min}$ , die Sprayspannung 4 kV. Das Desolvatisierungsgas wurde auf 15 psi (1 bar) gesetzt. Alle anderen Parameter wurden für eine maximale Abundanz des jeweiligen  $[M+H]^+$  und  $[M+Na]^+$  optimiert.

Zur Ermittlung der hochaufgelösten Massen der Verbindungen **16–19** sowie von **CA1-Amid**, **CA2-Amid** und **CA3-Amid** wurde eine Agilent Infinity 1290 UHPLC gekoppelt mit einem 6550 iFunnel QTOF verwendet (Agilent, Santa Clara, CA, USA). Die verwendete Trennsäule war eine ZORBAX Eclipse Plus C18 (1,8  $\mu\text{m}$ ; 2,1  $\times$  50 mm) von Agilent. Als Laufmittel wurden Acetonitril/Wasser-Gemische eingesetzt mit einem 0,1% Ameisensäure-Zusatz. Die Proben wurden in einem Acetonitril/Wasser-Gemisch (1:1) gelöst. Die Elution erfolgte zunächst für 8 Minuten mit einem linearen Gradienten (Acetonitril-Anteil: 5–95 %), anschließend folgte eine 1-minütige isokratische Elutionsphase (Acetonitril-Anteil: 95 %). Die Flussrate betrug 0,5 ml/min. Das gekoppelte QTOF-Massenspektrometer wurde mit folgenden Parametern betrieben: Messung im Positiv-Modus; Fragmentorspannung: 175 V; Kapillarspannung: 4 kV; Spannung der zylindrischen Eintrittsblende: 1 kV; Desolvatisierungsgas-Flussrate: 14 l/min; Desolvatisierungsgas-Temperatur: 200 °C; *stealth*-Gas-Flussrate: 11 l/min; *stealth*-Gas-Temperatur: 350 °C. Zur Massenkalisierung wurden die Referenzmassen 121,050873 und 922,009798 eingespritzt. Der eingestellte Massenbereich betrug 100–1000  $m/z$ , bei einer Scanrate von 1 Spektrum/Sekunde. Die Messungen wurden im *Fullscan*-Modus durchgeführt. Die Datenverarbeitung erfolgte unter Verwendung der *MassHunter*-Software von Agilent.

### 9.2.4. NMR-Spektroskopie

Die Aufnahme der NMR-Spektren erfolgte auf einem ECP500 (Jeol, Akishima, Japan) und einem AVANCE III 700 (Bruker, Billerica, MA, USA). Die Werte der chemischen Verschiebung  $\delta$  sind in ppm angegeben. Zur Beschreibung von Multiplizitäten wurden die Abkürzungen s (=Singulett), d (=Dublett), t (=Triplett) und q (Quartett) verwendet. Als Referenzsignal wurde das Lösungsmittelsignal (Messung in  $\text{DMSO-d}_6$ ) oder das, des internen Standards Trichlormethylsilan (Messung in  $\text{CDCl}_3$ ) genutzt. Die  $^{13}\text{C}$ -Spektren

wurden  $^1\text{H}$ -Breitband-entkoppelt aufgenommen. Zur Signalzuordnung wurden die chemischen Verschiebungen, Kern-Kopplungssysteme und 2D-Spektren (H,H-COSY, HMQC, HMBC, DEPT-135) analysiert. Die Auswertung der Spektren erfolgte unter Verwendung der *MNova Suite* (Mestrelab Research, S.L., Santiago de Compostela, Spanien).

### 9.2.5. Bio-Layer-Interferometrie

Die BLI-Messungen wurden auf einem Octet RED96 der Firma Pall FortéBIO (Fremont, CA, USA) durchgeführt. Die Datenakquisition erfolgte mit 5 Hz. Die 8 Messkanäle waren mit Superstreptavidin-Biosensoren (SSA) der Firma Pall FortéBIO bestückt. Der Bindungsassay wurde in Greiner-Mikrotiterplatten (Modell 650209; 96 Vertiefungen, schwarz) der Firma Greiner (Frickhausen, Deutschland) durchgeführt.

## 9.3. BLI-Messungen von Verbindung 14 und 15

Faktor Xa wurde mittels EZ-Link™ NHS-PEG4-Biotin der Firma Thermo Scientific (Dreieich, Deutschland) biotinyliert. Die Biotinylierung erfolgte unter Verwendung der vom Hersteller bereitgestellten Arbeitsvorschrift. Hierbei wurde vom Biotinylierungsreagenz zunächst eine 1-millimolare wässrige Lösung hergestellt. Vom zu biotinylierenden Enzym, Faktor Xa, wurde eine 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ -Lösung (Volumen: 500  $\mu\text{l}$ ) in einem Eppendorf-Gefäß hergestellt. Als Lösungsmittel wurde dafür der Standard-MOPS-Puffer (s. Abschnitt 10.1.) verwendet. Anschließend wurden 3,3  $\mu\text{l}$  der Reagenz-Lösung zur Proteinlösung zugegeben (dies entspricht einer molaren Kupplungsrate von 3:1 Biotin-Reagenz / Protein). Die Reaktionslösung wurde daraufhin 30 Minuten bei Raumtemperatur stehen gelassen. Die überschüssige Reagenz-Lösung wurde im Anschluss durch Verwendung von Zeba Entsalzungssäulen (Säulenvolumen: 2 ml) der Firma Thermo Scientific entfernt. Das biotinylierte Enzym wurde abschließend einem Enzymaktivitätsassay (s. Abschnitt 10.1) unterzogen, wobei lediglich eine zu vernachlässigende Aktivitätsabnahme von Faktor Xa festgestellt werden konnte.

Die BLI-Messung wurde in Greiner-Mikrotiterplatten (s. 9.2.5) bei einem Probenvolumen von 200  $\mu\text{l}$  durchgeführt. Vor der Messung wurden alle Messsensoren in

MOPS-Puffer vorbefeuchtet. Im Anschluss wurden 6 Sensoren mit Faktor Xa (Konzentration: 80 µg/ml) beladen. Die restlichen 2 Sensoren wurden mit Biocytin (Konzentration: 10 µg/ml) blockiert und nachfolgend als Referenzsensoren zur Detektion von unspezifischer Bindung verwendet. Der Äquilibrierungs-Schritt wurde in MOPS-Puffer durchgeführt. Im Anschluss folgten Assoziations- und Dissoziations-Schritt. Verbindung **14** wurde bei Assay-Konzentrationen von 250 µM, 1 mM und 10 mM vermessen. Die Vermessung von Verbindung **15** erfolgte bei Assay-Konzentrationen von 5,8 µM, 580 µM und 58 nM. Die Rohdaten wurden mithilfe der Octet® Software unter Verwendung eines globalen 1:1 *fits* in die entsprechenden  $K_I$ -Werte umgerechnet.

## 9.4. Strukturelle Aufklärung der Templat-unterstützten Reaktion

Die Aufklärung des Reaktionsmechanismus der templierten Reaktion wurde anhand des Faktor Xa / Inhibitor **15**-Kristallkomplexes durchgeführt (PDB: 5K0h). Die Kristallstruktur wurde von Prof. Dr. Torsten Steinmetzer (Institut für Pharmazeutische Chemie der Philipps-Universität Marburg) zur Verfügung gestellt. Die Strukturanalyse wurde von der Firma Proteros Biostructures GmbH (Planegg-Martinsried, Deutschland) unter der Projektleitung von Dr. Nils Ostermann durchgeführt. Der Kristallkomplex wurde mittels *back-soaking* durch Austausch der strukturell verwandten Verbindung *O*-tert-butyl-*N*-benzylsulfonyl-*D*-serinyl-glycinyl-4-amidinobenzylamid in einer Auflösung von 2,2 Å erhalten.<sup>[114]</sup> Hierbei wurde eine Arbeitsvorschrift von Brandstetter *et al.* verwendet.<sup>[201]</sup>

Die modellierten Komplexe von Amin **14** mit den Aktivestern **11** und **12** wurden mittels *LigandScout* (Inte:Ligand, Wien, Österreich) erzeugt. Die energieminierten Komplexe wurden dabei ausgehend vom Faktor Xa / Inhibitor **15**-Kristallkomplex berechnet. Die Darstellung der ursprünglichen Kristallstruktur und der berechneten Komplexe erfolgte mittels *PyMOL* (Schroedinger, LLC). Die Ermittlung der Atomabstände sowie der N-C-O-Winkel erfolgte ebenfalls mittels *PyMOL* unter Verwendung des entsprechenden *wizards*.

## 9.5. Carbonsäureaktivierung im Mikrotiterplatten-Maßstab

Die finalen Aktivierungsversuche zum Trifluorethyl-, Thiophenyl-, und Phenylester wurden in ABgene Storage Plates mit 384 Vertiefungen durchgeführt. Von Carbonsäure **1** wurden 40 µl einer 10 mM Dioxan-Lösung vorgelegt. Die übrigen Reagenzien wurden im jeweils angegebenen anderen Lösungsmittel gelöst bzw. wurden, bei Angabe von nur einem Lösungsmittel, ebenfalls als Dioxan-Lösung verwendet (s. Tabelle 6.1). Alle Reagenzien wurden in Volumina von 10 µl zugegeben. Die Reihenfolge der Zugabe war: (DMAP) → (Base) → Aktivierungsreagenz → Aktivesterkomponente. Nach Zugabe aller Reagenzien wurden die genutzten Vertiefungen der Mikrotiterplatte versiegelt und nachfolgend mit 1200 rpm für 5 Minuten geschüttelt. Im Fall der Reaktionsansätze mit 2-stündiger Reaktionszeit wurde nach 1 h Reaktionszeit ein weiteres Mal für 5 Minuten bei 1200 rpm geschüttelt.

Nach Ablauf der Reaktionszeit wurde das Lösungsmittel im Vakuumkonzentrator (RVC 2-33 CDplus der Firma Christ (Osterode am Harz, Deutschland)) entfernt. Nach 1-stündiger Laufzeit bei Raumtemperatur und 1000 rpm konnte das Lösungsmittel vollständig entfernt werden. Die Reaktionsrückstände wurden in 100 µl eines MeCN/H<sub>2</sub>O-Gemisches (1:1) aufgenommen. Die Platte wurde anschließend für 2 Minuten bei 2000 rpm geschüttelt. Im Anschluss wurden die Reaktionslösungen in LC/MS-Gefäße überführt und im Hochleistungsflüssigkeitschromatographie-Massenspektrometer vermessen. Das Injektionsvolumen betrug 3 µl. Die Auswertung des Umsatzes erfolgte auf Grundlage der Peakflächen des 210 nm Spektrums.

Eine exakte quantitative Bestimmung, der während der Reaktion gebildeten Produktmengen, ist dabei mit einigen Schwierigkeiten verbunden: Gerätebedingt entstehen zeitliche Differenz zwischen den einzelnen LC/MS-Messungen. Innerhalb der damit verbundenen Standzeiten der Proben kann dabei weiterhin Produkt gebildet werden, was den Vergleich der Reaktionsansätze erschwert. Im Fall der Aktivester ist dabei ebenfalls der Produktzerfall möglich, der durch Edukt-/ und Reagenzienbedingte pH-Wert Einflüsse noch beschleunigt wird. Weiterhin kann die Evaporation des während der Reaktion eingesetzten Lösungsmittels zu Konzentrationsschwankungen führen, welche bei Arbeiten

im Mikromaßstab einen merklichen Einfluss haben können. Aufgrund dieser versuchsspezifischen Gegebenheiten wurde zur Bewertung der Effizienz der einzelnen Aktivierungsmethoden der Reaktionsumsatz bestimmt. Hierbei wurde im UV-Spektrum des jeweiligen Ansatzes die Fläche des Produkt-Peaks ermittelt und diese anschließend in Relation zur Summe des Edukt- und Produkt-Peaks gesetzt.

## 9.6. *In-silico* Screening und Docking gegen WNV NS2B-NS3-Protease

Das *in-silico* Screening wurde wie unter 7.5. beschrieben durchgeführt. Die verwendete *Schroedinger Suite* (Schrödinger, LLC, New York, NY, 2017) lag in Version 2017-1 vor. Die einzelnen verwendeten Programme wurden in der folgenden Version verwendet: *Combiglide-v44011*; *Epik-v39011*; *Glide-v74011*; *Maestro-v111011*; *Ligprep-v41011*. Für das Re-Docking des natürlichen Liganden wurde ein RMSD-Wert von 1,0369 Å berechnet. Die durch *Epik* erzeugten Tautomere und Ionisierungszustände wurden für einen pH-Wert von  $8 \pm 0,5$  berechnet. Beim Docking mittels *Glide* wurden sowohl beim SP- wie auch beim XP-Docking die Liganden flexibel behandelt. Stickstoff-Inversionen waren erlaubt und nicht-planare Amide wurden bestraft. Es wurden keine *restraints* vorgegeben. Das SP-Docking wurde unter Standardbedingungen durchgeführt. Für das XP-Docking wurde die Anzahl der Posen die initial beibehalten werden auf 50000 erhöht. Das *Scoring*-Fenster wurde auf 500 gesetzt. Die Anzahl der minimierten Posen pro Ligand wurde auf 1000 gesetzt. Die Funktion *extended sampling* wurde verwendet.

## 9.7. *In-situ* Amidierung im Mikrotiterplatten-Maßstab

Die *in-situ* Amidierungsversuche wurden in Corning 3658-Mikrotiterplatten durchgeführt. Vom jeweils verwendeten Amin wurden 10 µl einer wässrigen Lösung (10 bzw. 25 mM) in die Mikrotiterplatte gegeben. Anschließend wurde das Lösungsmittel im Vakuumkonzentrator (RVC 2-33 CDplus der Firma Christ (Osterode am Harz, Deutschland)) entfernt. Nach 1-stündiger Laufzeit bei Raumtemperatur und 1000 rpm konnte das

Lösungsmittel vollständig entfernt werden. Dieser Schritt war aufgrund der geringen Löslichkeit von Amin **19** in Dioxan notwendig. Carbonsäure **1** wurde als 10 mM DMSO-Lösung (Aktivierung in DMSO/DMF) bzw. 25 mM Dioxan-Lösung (Aktivierung in Dioxan) verwendet. Hiervon wurden 10 µl in die Mikrotiterplatten zum Amin gegeben. In den Reaktionsansätzen mit DMAP wurde nachfolgend 1 µl einer 1 mM-Lösung des entsprechenden Lösungsmittels zugegeben (s. Tabelle 7.1). Nachfolgend wurden 10 µl Aktivierungsreagenz und 1 bzw. 2 µl Base als DMF (Aktivierung in DMSO/DMF)- bzw. Dioxan (Aktivierung in Dioxan)-Lösung zugegeben. Nach Zugabe aller Reagenzien wurden die genutzten Vertiefungen der Mikrotiterplatte versiegelt und anschließend für die gesamte Reaktionszeit mit 1200 rpm geschüttelt.

Nach Ablauf der Reaktionszeit (30 Minuten bzw. 2 h) wurden 10 µl der Reaktionsansätze in LC/MS-Gefäße überführt. Anschließend wurden jeweils 90 µl eines MeCN/H<sub>2</sub>O-Gemisches (1:1) zugegeben. Im Anschluss wurden die Reaktionslösungen in LC/MS-Gefäße überführt und im Hochleistungsflüssigkeitschromatographie-Massenspektrometer vermessen. Das Injektionsvolumen betrug 3 µl. Die Auswertung des Umsatzes erfolgte auf Grundlage der Peakflächen des 254 nm Spektrums. Hierbei wurde im UV-Spektrum des jeweiligen Ansatzes die Fläche des Produkt-Peaks ermittelt und diese anschließend in Relation zur Summe des Edukt- und Produkt-Peaks gesetzt.

## 9.8. *In-situ* Screening gegen die WNV NS2B-NS3-Protease

Zu Beginn des Screenings wurden 10 µl einer 25 mM (Screen 1) bzw. 10 mM (Screen 2-100, 2-10, 2-1) wässrigen Lösung von Amin **19** in die Mikrotiterplatte vorgegeben. Anschließend wurde das Lösungsmittel im Vakuumkonzentrator (RVC 2-33 CDplus der Firma Christ (Osterode am Harz, Deutschland)) entfernt. Nach 1-stündiger Laufzeit bei Raumtemperatur und 1000 rpm konnte das Lösungsmittel vollständig entfernt werden. Die Carboxylat-Fragmente lagen vorplattiert als 25 mM Dioxan-Lösung (Screen 1) bzw. 10 mM DMSO-Lösung (Screen 2) vor. Zum Umsetzen der Fragmente und Reagenzien wurde ein ALH-3000 CaliperLS Pipettierroboter der Firma Sciclone verwendet. Im Fall

von Screen 1 erfolgte die Aktivierung der Carbonsäure durch sequentielle Aufnahme von Carbonsäure-Fragment (10 µl), 10 µl DCC-Lösung (27,5 mM in Dioxan) und 1 µl DMAP-Lösung (25 mM in Dioxan). Bei Screen 2 erfolgte die Aktivierung durch sequentielle Aufnahme von Carbonsäure-Fragment (10 µl), 5 µl DIPEA-Lösung (21 mM in DMF) und 5 µl HBTU-Lösung (11 mM in DMF).

Im Anschluss folgte die Zugabe dieses Reaktionsgemisches in die Reaktionsplatten. Zur Umsetzung der kompletten Carboxylat-Bibliothek wurden somit pro Screen jeweils fünf Platten eingesetzt, welche jeweils aktiviert und im Anschluss mit Amin **19** zum Amid umgesetzt wurden. Alle Platten wurden nachfolgend für 2 h bei Raumtemperatur und 1200 rpm geschüttelt. Im Fall von Screen 1 wurde daraufhin das Lösungsmittel (Dioxan) mittels Vakuumkonzentrator entfernt. Nach 1-stündiger Laufzeit bei Raumtemperatur und 1000 rpm konnte das Lösungsmittel vollständig entfernt werden. Im Anschluss wurden die Fragment-Kombinationen in 4 × 10 µl DMSO aufgenommen. Nachfolgend wurden 10 µl dieser DMSO-Lösung entnommen und mit 30 µl MOPS-Puffer verdünnt. Dieser Lösung wurden 2 µl entnommen und in die Messplatten umgesetzt. Anschließend wurden die Platten bei einer potentiellen Amid-Maximalkonzentration von 100 µM vermessen. Im Fall von Screen 2 folgte im Anschluss an die zweistündige Reaktionszeit die direkte 1:20 Verdünnung (1 µl auf 19 µl MOPS-Puffer) mit MOPS-Puffer. Nachfolgend wurde diese Lösung nochmals mit MOPS-Puffer auf die entsprechende im Assay verwendete Konzentration verdünnt. Die finalen Amid-Konzentrationen im Assay betrugen 100, 10 und 1 µM (Screen 2-100, 2-10 bzw. 2-1). Im Anschluss folgte die Messung. Alle Platten wurden mit dem Standard WNV NS2B-NS3-Protease-Aktivitätsassay vermessen. Als Positivkontrolle wurde hierbei 1 µl einer 100 µM (Screen 1) bzw. 100, 10 und 1 µM (Screen 2-100, 2-10, 2-1) Amin **19**-Lösung verwendet. Die resultierende Inhibition im Screening wurde in Relation zum hierbei gemessenen Wert gesetzt.

Als Hit-Kriterium für das Screening wurde eine im Vergleich zur Amin **19**-Lösung 30%ige Erhöhung der Inhibition festgelegt. Die Bewertung der Umsetzung zum Amid erfolgte mittels Standard-LC/MS-Analytik wie unter 9.2.2. beschrieben. Bei Screen 1 betrug das injizierte Volumen 9 µl; bei Screen 2 wurden 8 µl injiziert. Die Peakfläche wurde unter Verwendung der *ChemStation*-Software von Agilent berechnet.

Die im Zuge der Hit-Auswahl durchgeführte Literatur- und Datenbankrecherche erfolgte auf *PubChem*.<sup>[202, 203]</sup> Die Recherche erfolgte auf Grundlage der Struktursuche. Zum Ausschluss der *PAIN*-Strukturen wurden die *sdf*-Strukturen der 78 Hit-Kombinationen zunächst in die entsprechenden *SMILE*-Strukturen im *RPBS Web portal*<sup>[204]</sup> umgewandelt. Anschließend wurden die *SMILE*-Strukturen auf den *FAF-Drugs3* Web-Server<sup>[205]</sup> hochgeladen und dort auf *PAIN*-Strukturmerkmale untersucht.

Für den AMC-Test wurde eine 100  $\mu\text{M}$  Lösung der 78 Hit-Kombinationen verwendet. Hierzu wurde 1  $\mu\text{l}$  aus den entsprechenden Aktivierungsansätzen (Screen 1 bzw. Screen 2) entnommen und in eine Mikrotiterplatte überführt. Anschließend wurden 30  $\mu\text{l}$  einer Puffer-/AMC-Lösung zugegeben. Die finale AMC-Konzentration betrug 50  $\mu\text{M}$ . Die Platte wurde anschließend bei 360 nm bestrahlt und das resultierende Emissionslicht bei einer Wellenlänge von 465 nm gemessen. Die Prä-Screens wurden bei einer Amidkonzentration von 120  $\mu\text{M}$  durchgeführt. Die Messung wurde hier im Zuge eines Standard-WNV-Protease-Aktivitätsassays durchgeführt, wobei die erste Messung der Fluoreszenzintensität jedoch schon vor Zugabe des Fluoreszenzsubstrats erfolgte. Die Anregungswellenlänge war 360 nm; das emittierte Licht wurde bei 465 nm gemessen. Zur Überprüfung des Aggregationsverhalten wurde ein Standard-WNV-Protease-Aktivitätsassays durchgeführt mit einem 0,01%igen CHAPS-Anteil im Messpuffer.

# 10. Enzymkinetische Messungen

Für die enzymkinetischen Messungen von Faktor Xa wurde ein SAFIRE II basic Fluoreszenzreader der Firma Tecan GmbH (Grödig, Österreich) verwendet. Die Messungen wurden in Corning 3655 Mikrotiterplatten (384 Vertiefungen) durchgeführt. WNV NS2B-NS3-Protease-Messungen wurden an einem Infinite M1000 PRO Fluoreszenzreader der Firma Tecan GmbH durchgeführt. Für die Messungen wurden Corning 3658 Mikrotiterplatten (384 Vertiefungen) verwendet. Nach Zugabe der einzelnen Assaybestandteile wurde die Mikrotiterplatte mit einer 5810 R Zentrifuge der Firma Eppendorf (Hamburg, Deutschland) zentrifugiert. Zum Schütteln der Platten wurde ein MixMate der Firma Eppendorf verwendet. Für alle Messungen wurden geeignete Kontrollen geführt. Im Fall der Positivkontrolle wurde die Testsubstanz-Lösung durch 1 µl DMSO ersetzt. Für die Negativkontrolle wurde anstelle der Enzym-Lösung eine äquivalente Menge des Messpuffers zugegeben. Alle Aktivitätsbestimmungen wurden als Triplikate durchgeführt.

Die Auswertung der im Zuge eines Aktivitätsassays erhaltenen Fluoreszenzintensitäts-Werte (RFU) erfolgte zunächst mittels der *Magellan™*-Software der Firma Tecan GmbH (Grödig, Österreich). Für gewöhnlich wurden die RFU-Werte der ersten 20 Minuten zur Ermittlung der Geradensteigung verwendet. Dieses Zeitintervall wurde entsprechend angepasst, wenn ein früheres Abflachen der Kurve beobachtet werden konnte. Die Geradensteigungen (RFU/min) wurden nachfolgend in *Excel* (Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA) überführt. Hier wurden die Werte der jeweiligen Negativkontrollen abgezogen. Im Anschluss wurde der resultierende Wert der Geradensteigung in Relation zur Positivkontrolle gesetzt, woraus sich die Aktivität des Enzyms ergibt.

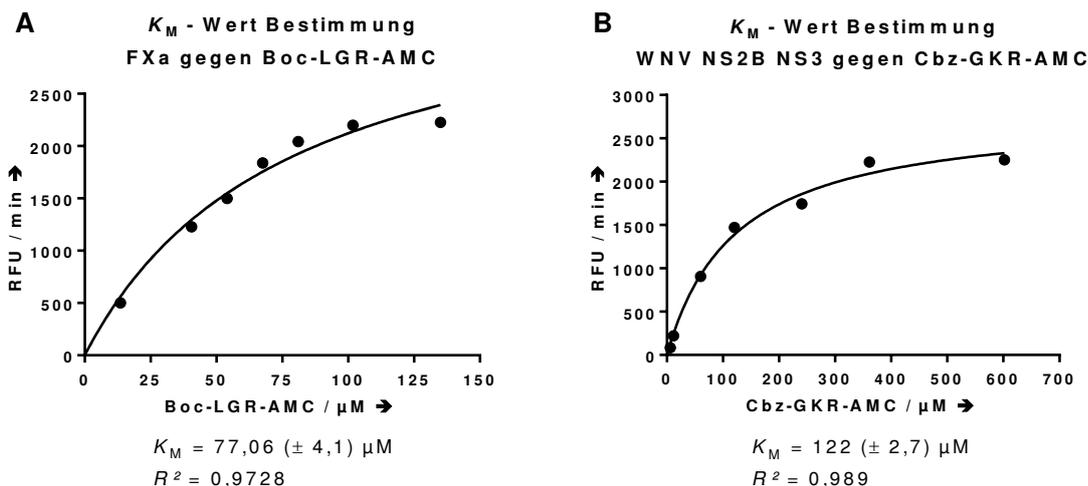
## 10.1. IC<sub>50</sub> - Bestimmungen

Zur Bestimmung der IC<sub>50</sub>-Werte wurden 6–10 unterschiedlich konzentrierte DMSO-Lösungen der Testsubstanz gegen das jeweilige Enzym im Aktivitätsassay vermessen. Die

aus dem Aktivitätsassay erhaltenen Aktivitätswerte wurden in die *GraphPad Prism*-Software (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA) übertragen und dort gegen die logarithmierten Konzentrationswerte aufgetragen. Die  $IC_{50}$ -Werte wurden nachfolgend, wie unter 3.6. beschrieben, mittels nicht-linearer Regression unter Verwendung des Hill-Modells (Gleichung 3.21) erhalten.

## 10.2. Bestimmung der $K_M$ -Werte

Zur Bestimmung der  $K_M$ -Werte wurden 7 unterschiedlich konzentrierte Substratlösungen von Boc-LGR-AMC (Faktor Xa) bzw. Cbz-GKR-AMC (WNV NS2B-NS3-Protease) vermessen. Die Daten der ersten 10 Minuten wurden zur Berechnung des initialen Substratumsatzes verwendet. Von den erhaltenen Fluoreszenzintensitätswerten pro Zeit wurden die Werte der Negativkontrollen abgezogen und die daraus resultierenden Werte in *GraphPad Prism*-Software (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA) übertragen. Hier wurden die Konzentrationen der verwendeten Lösungen gegen die jeweils gemessene Fluoreszenzintensität pro Zeit aufgetragen. Die  $K_M$ -Werte wurden nachfolgend mittels nicht-linearer Regression unter Verwendung des Michaelis-Menten-Modells (Gleichung 3.12) erhalten.



**Abbildung 10.1.** Darstellung der aus den Messungen zur  $K_M$ -Wert-Bestimmung erhaltenen Daten für Faktor Xa (**A**) und der WNV NS2B-NS3-Protease (**B**).

### 10.3. Faktor Xa-Aktivitätsassay

Für den Faktor Xa-Aktivitätsassay wurde ein Puffer mit folgender Zusammensetzung verwendet: 200 mM 3-(*N*-Morpholino)propansulfonsäure (MOPS), 50 mM Natriumacetat, 5 mM Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA; als Dinatriumsalz Dihydrat verwendet). Der pH-Wert des Puffers wurde mit Natriumhydroxid auf pH 8 eingestellt. Das Fluoreszenzsubstrat wurde in 10-millimolaren DMSO-Stammlösungen angesetzt. Aliquote dieser Stammlösungen wurden vor der Messung mit MOPS-Puffer aufgefüllt. Die Konzentration dieser Lösungen betrug 646  $\mu$ M. Im Assay wird damit eine Substrat-Konzentration von 76  $\mu$ M (=  $K_M$ -Wert) erreicht. Amin-Fragment **14** konnte in Wasser gelöst werden. Die Verbindungen **1–13** sowie **15–17** wurden als DMSO-Lösung verwendet. Der finale DMSO-Anteil im Assay betrug 2,9 %, wobei keine DMSO-bedingte Aktivitätsabnahme beobachtet werden konnte.

Zu Beginn des Assays wurden 1  $\mu$ l der zu testenden Verbindung in die Mikrotiterplatte vorgelegt. Nachfolgend wurde die Platte bei 3000 rpm für 1 Minute zentrifugiert. Anschließend wurden 25  $\mu$ l des MOPS-Puffer zugegeben. Es folgte ein Zyklus bestehend aus Zentrifugieren, Schütteln der Platte (2 Minuten bei 1800 rpm) und erneutem Zentrifugieren. Daraufhin wurden 4  $\mu$ l Faktor Xa-Lösung (MOPS-Puffer-Lösung) zugegeben. Die finale Assay-Konzentration von Faktor Xa betrug 14,5 nM. Es folgte ein weiterer Zyklus bestehend aus Zentrifugieren, Schütteln und Zentrifugieren. Abschließend wurden 4  $\mu$ l der Fluoreszenzsubstrat-Lösung zugegeben. Nach einem finalen Zyklus bestehend aus Zentrifugieren, Schütteln und Zentrifugieren wurde die Messung gestartet. Als Anregungswellenlänge wurde 380 nm gewählt. Das emittierte Licht wurde bei einer Wellenlänge von 460 nm gemessen.

### 10.4. WNV NS2B-NS3-Protease-Aktivitätsassay

Für den WNV NS2B-NS3-Protease-Aktivitätsassay wurde ein 10 mM MOPS-Puffer mit einem 20%igen Glycerol-Anteil verwendet. Der pH-Wert des Puffers wurde mit Natriumhydroxid auf pH 8 eingestellt. Das Fluoreszenzsubstrat wurde in 10-millimolaren

DMSO-Stammlösungen angesetzt. Aliquote dieser Stammlösung wurden vor der Messung mit Puffer aufgefüllt. Die Konzentration dieser Lösungen betrug  $378 \mu\text{M}$ . Im Assay wird damit eine Substrat-Konzentration von  $122 \mu\text{M}$  ( $= K_M$ -Wert) erreicht. Alle gegen die WNV NS2B-NS3-Protease getesteten Verbindungen wurden als DMSO-Lösung verwendet. Der DMSO-Anteil im Assay betrug  $3,2 \%$ .

Zu Beginn des Assays wurden  $1 \mu\text{l}$  der zu testenden Verbindung in die Mikrotiterplatte vorgelegt. Nachfolgend wurde die Platte bei  $3000 \text{ rpm}$  für  $1 \text{ Minute}$  zentrifugiert. Anschließend wurden  $10 \mu\text{l}$  des MOPS-Puffer zugegeben. Es folgte ein Zyklus bestehend aus Zentrifugieren, Schütteln der Platte ( $2 \text{ Minuten}$  bei  $1800 \text{ rpm}$ ) und erneutem Zentrifugieren. Daraufhin wurden  $10 \mu\text{l}$  WNV NS2B-NS3-Protease-Lösung (MOPS-Puffer-Lösung) zugegeben. Die finale Assay-Konzentration der WNV NS2B-NS3-Protease betrug  $14,3 \text{ nM}$ . Es folgte ein weiterer Zyklus bestehend aus Zentrifugieren, Schütteln und Zentrifugieren. Abschließend wurden  $10 \mu\text{l}$  der Fluoreszenzsubstrat-Lösung zugegeben. Nach einem finalen Zyklus bestehend aus Zentrifugieren, Schütteln und Zentrifugieren wurde die Messung gestartet. Als Anregungswellenlänge wurde  $360 \text{ nm}$  gewählt. Das emittierte Licht wurde bei einer Wellenlänge von  $465 \text{ nm}$  gemessen.

# 11. Ligationsassay-Durchführung

## 11.1. Detektion mittels Enzymaktivitätsassay

Zur Detektion der Templat-unterstützten Reaktion mittels Enzymaktivitätsassay wurde eine modifizierte Version des unter 10.1. beschriebenen Aktivitätsassays durchgeführt. Hierbei wurden die Konzentrationen der verwendeten Fluoreszenzsubstrat- und Enzym-Lösungen auf das erhöhte Assayvolumen (35  $\mu\text{l}$  statt 34  $\mu\text{l}$ ) entsprechend angepasst. Die Fluoreszenzsubstrat-Lösung wurde in einer Konzentration von 665  $\mu\text{M}$  eingesetzt. Im Fall der Faktor Xa-Lösung wurde eine Konzentration von 127  $\mu\text{M}$  eingesetzt. Damit betragen die finalen Konzentrationen, wie im Standard-Aktivitätsassay, 76  $\mu\text{M}$  (Fluoreszenzsubstrat) bzw. 14,5 nM (Faktor Xa). Amin-Fragment **14** konnte als wässrige Lösung verwendet werden. Die finale Assay-Konzentration von **14** betrug 0,285 mM. Die Verbindungen **1–13** wurden als DMSO-d<sub>6</sub>-Lösung verwendet. Der finale DMSO-d<sub>6</sub>-Anteil im Assay betrug 2,9 %, wobei keine DMSO-bedingte Aktivitätsabnahme beobachtet werden konnte. Die Positivkontrolle enthielt im Fall des Ligationsassays 1  $\mu\text{l}$  Wasser und 1  $\mu\text{l}$  DMSO.

Der Ligationsassay wurde für jeden Aktivester in einem templieren und einem nicht-templieren Reaktionsansatz durchgeführt (s. Tabelle 11.1). Zu Beginn wurden 1  $\mu\text{l}$  der Amin-Fragment **14**-Lösung für beide Reaktionsansätze in der Mikrotiterplatte vorgelegt. Nachfolgend wurde die Platte bei 3000 rpm für 1 Minute zentrifugiert. Anschließend wurden 21  $\mu\text{l}$  MOPS-Puffer zum templieren Reaktionsansatz zugegeben und 25  $\mu\text{l}$  zum nicht templieren Reaktionsansatz. Es folgte ein Zyklus bestehend aus Zentrifugieren, Schütteln der Platte (1 Minute bei 1800 rpm) und erneutem Zentrifugieren. Daraufhin wurden 4  $\mu\text{l}$  Faktor Xa-Lösung (MOPS-Puffer-Lösung) zum templieren Reaktionsansatz zugegeben. Es folgte ein weiterer Zyklus bestehend aus Zentrifugieren, Schütteln (1 Minute bei 1500 rpm) und Zentrifugieren. Nun wurde zu beiden Reaktionsansätzen 1  $\mu\text{l}$  der Aktivester-Lösung zugegeben. In der ersten Versuchsreihe wurden alle Aktivester in einer Assay-Konzentration von 0,285 mM eingesetzt; in der zweiten Versuchsreihe wurden die Aktivester **9–13** in einer Konzentration von 5 mM verwendet.

Im Anschluss an die Aktivester-Zugabe folgte ein Zyklus bestehend aus Zentrifugieren, Schütteln (5 Minuten bei 1800 rpm) und Zentrifugieren. Beide Reaktionsansätze wurden nun für 2 h bzw., für die Experimente zur Maximierung des Templat-Effekts, bis zu 10 h stehen gelassen. Daraufhin wurden zum templierten Ansatz 4 µl Puffer zugegeben und zum nicht-templierten Ansatz 5 µl der Enzym-Lösung. Es folgte ein Zyklus bestehend aus Zentrifugieren, Schütteln (5 Minuten bei 1800 rpm) und Zentrifugieren. Abschließend wurde in beide Ansätze 4 µl der Fluoreszenzsubstrat-Lösung gegeben. Nachdem nochmals zentrifugiert, geschüttelt (5 Minuten bei 1800 rpm) und zentrifugiert wurde, wurde die Messung gestartet.

**Tabelle 11.1.** Aufbau des Ligationsassays – Detektion mittels Enzymaktivitätsassay

Schritt	Zugabe von	zugegebenes Volumen (in µl)	
		templierte Reaktion	nicht-templierte Reaktion
1	Amin <b>14</b>	1	1
2	Puffer	21	25
3	Enzym-Lsg.	4	-
4	Aktivester-Lsg.	1	1
5	Enzym-Lsg.	-	4
6	Puffer	4	-
7	Fluoreszenzsubstrat-Lsg.	4	4

Für den templierten Reaktionsansatz konnte eine Standzeit-bedingte Aktivitätsabnahme des Enzyms mittels geeigneter Kontrollmessungen ausgeschlossen bzw. als vernachlässigbar bewertet werden. Die, zur Maximierung des Templat-Effekts bei erhöhten Temperaturen, durchgeführten Experimente (37 °C) wurden im Trockenschrank durchgeführt. Das Enzym zur Vermessung der Aktivität im nicht-templierten Reaktionsansatz wurde hierbei ebenfalls während der Reaktionszeit im Trockenschrank gelagert. Zur Durchführung der Experimente bei verlängerter Reaktionszeit wurden alle Reaktionsansätze in dreifacher Kopie hergestellt. Die jeweiligen Vertiefungen auf der Mikrotiterplatte wurden während der Reaktionszeit versiegelt. Nach 2, 5 und 10 h Reaktionszeit wurde nachfolgend je eine Kopie der Reaktionsansätze vermessen.

## 11.2. Detektion mittels LC/MS-Analytik

Zur Untersuchung der Templat-unterstützten Reaktion mittels LC/MS-Analytik wurden sowohl für Aktivester **11** als auch für Aktivester **12** jeweils 2 Reaktionsansätze auf die unter 11.1. beschriebene Methode hergestellt. Abweichungen ergeben sich hier lediglich aufgrund der unterschiedlichen Messmethode (s. Tabelle 11.2). So wurde im Fall der nicht-templierten Reaktion auf die Zugabe von 4 µl der Enzym-Lösung verzichtet. Stattdessen wurden hier zusätzliche 4 µl MOPS-Puffer zugegeben. Ebenfalls war für dieses Experiment kein Fluoreszenzsubstrat notwendig, weswegen abschließend in beide Reaktionsansätze nochmals 4 µl MOPS-Puffer gegeben wurden.

**Tabelle 11.2.** Aufbau des Ligationsassays – Detektion mittels LC/MS-Analytik

Schritt	Zugabe von	zugegebenes Volumen (in µl)	
		templerte Reaktion	nicht-templerte Reaktion
1	Amin <b>14</b>	1	1
2	Puffer	21	25
3	Enzym-Lsg.	4	-
4	Aktivester-Lsg.	1	1
5	Puffer	8	8

Die hergestellten Reaktionsansätze wurden anschließend in das Hochleistungsflüssigkeitschromatographie-Massenspektrometer injiziert. Das injizierte Volumen betrug 15 µl. Zur Untersuchung der Templat-unterstützten Reaktion wurde das extrahierte Ionenchromatogramm für das Signal des Ligationsprodukts **15**  $[M+H]^+$ ,  $m/z$  538 verwendet.

## 11.3. Quantifizierung des Ligationsprodukts mittels LC-QTOF-MS

Die Kalibriergerade wurde wie unter 5.1. beschrieben erstellt. Hierbei wurden 6 verschiedene Konzentrationen der Verbindung **15**-Referenzlösung verwendet (10, 25, 50, 75, 100 und 125 nM). Die Herstellung der Referenzlösungen erfolgte in MOPS-Puffer. Jede Messung wurde in Triplikaten durchgeführt. Durch Auftragung der injizierten Stoffmengen gegen die aus den extrahierten Ionenchromatogrammen entnommenen Peakflächen

konnte mittels linearer Regression in *Excel* (Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA) die Kalibriergerade erhalten werden. Die Funktion der Geraden konnte nachfolgend zur Quantifizierung des im Zuge der Templat-unterstützten Reaktion gebildeten Ligationsprodukts genutzt werden.

Zur Untersuchung des zeitlichen Verlaufs der Templat-unterstützten Reaktion wurden für beide Aktivester (**11** und **12**) je ein templierter und ein nicht-templierter Reaktionsansatz verwendet (s. Tabelle 11.3). Die Reaktion wurde in einem LC/MS-Gefäß durchgeführt.

**Tabelle 11.3.** Aufbau des Ligationsassays – Quantifizierung mittels LC-QTOF-MS

Schritt	Zugabe von	zugegebenes Volumen (in µl)	
		templerte Reaktion	nicht-templerte Reaktion
1	Amin <b>14</b>	2	2
2	Puffer	58	66
3	Enzym-Lsg.	8	-
4	Aktivester-Lsg.	2	2

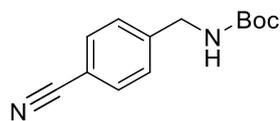
Da jede Messung als Triplikat durchgeführt wurde, wurden versuchsbedingt größere Ansätze der Reaktionen verwendet. Amin **14** und die Aktivester **11** / **12** wurden wie zuvor in einer finalen Konzentration von 0,285 mM bzw. 5 mM eingesetzt. Durch Kontrollen der Enzymaktivität konnte eine Abnahme der Aktivität (oder der Enzymmenge) im LC/MS-Gefäß festgestellt werden, daher musste zum Ablauf der templieren Reaktion eine höhere Enzymkonzentration verwendet werden. Die finale Enzymkonzentration betrug hier 82 nM. Die Quantifizierung des gebildeten Produkts erfolgte durch eine stündliche Injektion von 1 µl der templieren und nicht-templieren Reaktionslösung für einen Zeitraum von 10 h. In den Läufen zwischen den Injektionen der beiden Testlösungen wurden Leerproben injiziert. Da in Testmessungen eine deutliche Abtrennung des Produktpeaks von den Eduktpeaks nachgewiesen werden konnte, wurde in nachfolgenden Messungen nur der HPLC-Fluss im Zeitintervall von 1,6–4,1 Minuten zum Massenspektrometer geleitet. Somit wurde die empfindliche Ionenquelle nicht durch hohe Edukt- und Salzkonzentrationen in der Messlösung belastet. Die erhaltenen Daten wurden wie unter 5.1. beschrieben mithilfe der *MassHunter*-Software von Agilent verarbeitet. Als Massenfenster wurde 20 ppm gewählt. Für die Berechnung der jeweiligen Peakflächen wurde

dieses auf 35 ppm ausgeweitet. Die Kurvenanpassung der erhaltenen Daten an das Modell der einphasigen exponentiellen Assoziationsfunktion erfolgte unter Verwendung der *GraphPad Prism*-Software (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA)



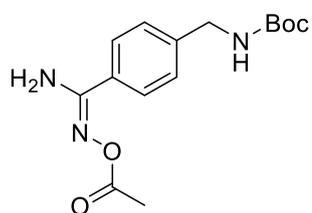
## 12. Synthesevorschriften

### ***N*-Boc-4-aminomethyl-benzonitril (14a)**

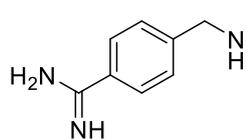


4-Aminomethyl-benzonitril Hydrochlorid (20 g, 0.119 mol) wurde in einem 2:1 Gemisch aus Dioxan/2N NaOH (360 ml) gelöst. Innerhalb von 10 Minuten wurde Di-*O*-*tert*-butyl carbonat (28.6 g, 0.131 mol) bei 0 °C zugegeben. Nachdem die Reaktion für 6 h bei Raumtemperatur gerührt wurde, konnte über Dünnschichtchromatographie die Vollständigkeit der Reaktion nachgewiesen werden. Das Lösungsmittel wurde am Rotationsverdampfer entfernt und der Rückstand in Ethylacetat aufgenommen. Im Anschluss wurde die organische Phase drei mal mit 5%iger wässriger KHSO<sub>4</sub>-Lösung extrahiert. Nach Trocknen mit Natriumsulfat und Einengen des Lösungsmittels konnte Produkt **14a** als weißer Feststoff erhalten werden. (25.4 g, 0.11 mol).

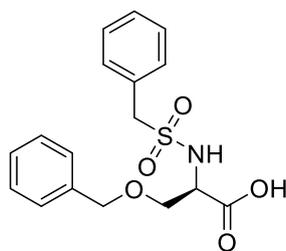
### ***N*-Boc-4-aminomethyl-*N'*-acetoxy-benzamidin (14c)**



*N*-Boc-4-aminomethyl-benzonitrile **14a** (23.2 g, 0.1 mol) wurde in Methanol gelöst (30 ml). Nach der Zugabe von Hydroxylamin Hydrochlorid (12.41 g, 0.1785 mol) und *N,N*-Diisopropylethylamin (DIPEA, 30 ml, 0.172 mol) wurde der Ansatz über Nacht unter Rückfluss gekocht. Anschließend wurde das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Der ölige Rückstand wurde in konzentrierter Essigsäure aufgenommen (200 ml) und 34 ml (0.36 mol) Acetanhydrid zugegeben. Die Lösung wurde für 2 h gerührt und im Anschluss wurde das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Der resultierende Rückstand wurde in Ethylacetat aufgenommen und drei mal mit Brine gewaschen. Anschließend wurde das Lösungsmittel eingengt und der Rückstand mittels Flash-Chromatographie (DCM/Methanol 9:1) gereinigt, wodurch Produkt **14b** (18.1 g, 0.059 mol) erhalten werden konnte.

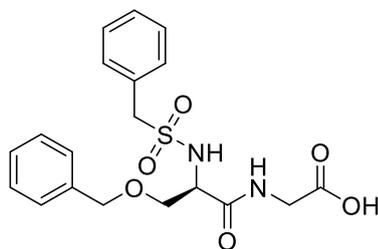
**N-Boc-4-aminomethyl-benzamidin (14d)**

*N*-Boc-4-aminomethyl-*N'*-acetoxymethyl-benzamidin **14c** (17 g, 0.055 mol) wurde in einen Schlenk-Kolben überführt und in Essigsäure gelöst (150 ml). Im Anschluss wurde Palladium/Kohlenstoff (10 % (w/w), 0.3 g, 2.75 mmol) zugegeben. Der Reaktionsansatz wurde mit einem H<sub>2</sub>-Ballon versehen und für 24 h unter H<sub>2</sub>-Atmosphäre gerührt. Anschließend wurde der Reaktionsansatz erneut mit Wasserstoff gesättigt und für weitere 24 h gerührt. Nach Abfiltrieren des Katalysators und Einengen des Lösungsmittels wurde das gewünschte Produkt **14d** erhalten (13 g, 0.052 mol).

**O-Benzyl-N-benzylsulfonyl-D-serin (1a)**

*O*-Benzyl-*D*-serin (5 g, 0.026 mol) wurde in gesättigter Kaliumcarbonat-Lösung gelöst (80 ml). Der Reaktionsansatz wurde auf 70 °C erwärmt und im Anschluss tropfenweise Benzylsulfonylchlorid (5.37 g, 0.028 mol) als DCM-Lösung (100 ml) zugegeben. Nachdem die Reaktion für 1 h gerührt wurde, konnte

mittels LC/MS-Analytik die Vollständigkeit der Reaktion nachgewiesen werden. Nach Abkühlen des Ansatzes wurde der pH-Wert mit konz. Salzsäure auf pH 1 gebracht und drei mal mit DCM extrahiert. Die vereinten organischen Phasen wurden mit Natriumsulfat getrocknet. Nach Einengen des Lösungsmittels konnte Produkt **1a** (6.43 g, 0.018 mol) erhalten werden.

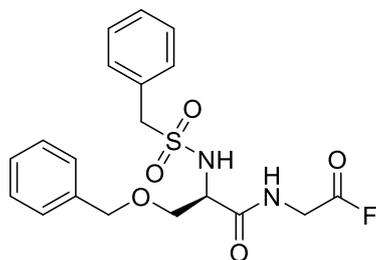
**O-Benzyl-N-benzylsulfonyl-D-serinyl-glycin (1)**

*O*-Benzyl-*N*-benzylsulfonyl-*D*-serinyl-glycin-methylester **13** (4.63 g, 0.011 mol) wurde in einem 3:1 Gemisch aus Methanol/Wasser (80 ml) gelöst. Im Anschluss wurde Lithiumhydroxid Monohydrat (2.3 g, 0.055 mol) zugegeben. Nachdem die Reaktion für 2 h gerührt wurde,

konnte mittels LC/MS-Analytik die Vollständigkeit der Reaktion nachgewiesen werden. Anschließend wurde das Methanol am Rotationsverdampfer entfernt und die verbleibende wässrige Lösung gefriergetrocknet. Zur Entfernung der resultierenden Lithium-

Salze wurde der Rückstand in Wasser aufgenommen und 5 g Dowex 50WX8 (H<sup>+</sup>-Form, 100-200 mesh) zugegeben. Nach wenigen Minuten konnte die Präzipitation des Produkts beobachtet werden. Der Ansatz wurde für 3 h gerührt und die ausgefallene Carbonsäure durch Aceton-Zugabe (30 ml) wieder in Lösung gebracht. Anschließend wurde der Ionenaustauscher abfiltriert und das Aceton am Rotationsverdampfer entfernt. Lyophilisation lieferte Produkt **1** als freie Carbonsäure (4.4 g, 0.011 mol). ESI-MS:  $m/z$  berechnet für C<sub>19</sub>H<sub>22</sub>N<sub>2</sub>O<sub>6</sub>S: 429.1091 [ $M$ -Na]<sup>+</sup>; gefunden: 429.1130. <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>)  $\delta$  (ppm) 8.49 (t,  $J$  = 5.8 Hz, NH Glycin, 1H), 7.67 (d,  $J$  = 8.7 Hz, NH Serin, 1H), 7.25–7.4 (m, ArH, 10H), 4.52 (s, CH<sub>2</sub> Benzyl, 2H), 4.32 (s, CH<sub>2</sub> Benzylsulfonyl, 2H), 4.2 (m, CH Serin, 1H), 3.92 (m, CH<sub>2</sub> Glycin, 2H), 3.56–3.65 (m, CH<sub>2</sub> Serin, 2H); <sup>13</sup>C (125 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>)  $\delta$  (ppm) 170.6, 170.5, 138.6, 131.4, 130.6, 128.8, 128.5, 128.16, 128.14, 128.1, 72.7, 71.0, 59.1, 56.8, 52.3.

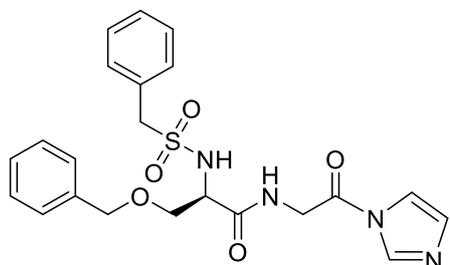
### **O-Benzyl-N-benzylsulfonyl-D-serinyl-glycinylfuorid (2)**



*O*-Benzyl-*N*-benzylsulfonyl-*D*-serinyl-glycin **1** (0.12 g, 0.295 mmol) wurde in trockenem DCM (10 ml) gelöst. Anschließend wurden 46  $\mu$ l DAST zugegeben (0.35 mmol) bei 0 °C zugegeben. Durch Umsetzung des entstandenen Carbonsäurefluorids mit einer 5%igen methanolischen Pyridin-Lösung konnte die Vollständigkeit der Reaktion über den Nachweis des entsprechenden Methylesters verfolgt werden. Nach 60 Minuten konnte die vollständige Umsetzung nachgewiesen werden. Der Ansatz wurde drei mal mit kaltem Wasser extrahiert. Anschließend wurde die organische Phase mit Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel eingeengt. Durch Aufreinigung des Rückstands mittels Flash-Chromatographie (EA/Hexan 1:1) konnte Produkt **2** (0.09 g, 0.22 mmol) erhalten werden. Die LC-QTOF-Messung wurde nach der Umsetzung zum Methylester durchgeführt. ESI-MS  $m/z$  berechnet für C<sub>20</sub>H<sub>24</sub>N<sub>2</sub>O<sub>6</sub>S: 443.1247 [ $M$ -Na]<sup>+</sup>; gefunden: 443.1264. <sup>1</sup>H NMR (700 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  (ppm) 7.55–7.57 (m, 1H), 7.27–7.41 (m, 11H), 4.46–4.55 (m, 2H), 4.27–4.35 (m, 2H), 4.13–4.18 (m, 1H), 3.96–4.09 (m, 2H), 3.74 (ddd,  $J$  = 10.8 Hz, 9.7 Hz, 4.8 Hz, 1H), 3.58 (ddd,  $J$  = 15.7 Hz, 9.7 Hz, 5.8 Hz, 1H); <sup>13</sup>C NMR (125 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>)  $\delta$

(ppm) 170.5, 170.4, 138.5, 131.3, 130.6, 128.71, 128.69, 128.4, 128.04, 127.96, 72.7, 70.9, 59.0, 56.7, 52.2;  $^{19}\text{F}$  NMR (470 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm) 32.9.

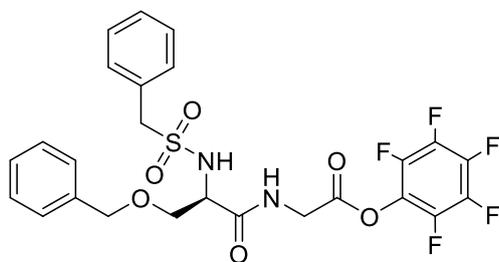
### **O-Benzyl-N-benzylsulfonyl-D-serinyl-glycinylimidazolid (3)**



*O*-Benzyl-*N*-benzylsulfonyl-*D*-serinyl-glycin **1** (0.12 g, 0.295 mmol) wurde in trockenem THF (10 ml) gelöst. Anschließend wurde CDI (48 mg, 0.295 mmol) bei 0 °C zugegeben. Durch Umsetzung des entstandenen Carbonsäureimidazolids mit

einer 5%igen methanolischen Pyridin-Lösung konnte die Vollständigkeit der Reaktion über den Nachweis des entsprechenden Methylesters verfolgt werden. Nach 30 Minuten konnte die vollständige Umsetzung nachgewiesen werden. Das Lösungsmittel wurde anschließend am Rotationsverdampfer entfernt und der resultierende Rückstand nachfolgend in DCM aufgenommen. Der Ansatz wurde drei mal mit kaltem Wasser extrahiert. Nach Trocknen der organischen Phase mit Natriumsulfat und Einengen des Lösungsmittels konnte Produkt **3** in hoher Reinheit erhalten werden (0.11 g, 0.245 mmol). ESI-MS:  $m/z$  berechnet für  $\text{C}_{22}\text{H}_{24}\text{N}_4\text{O}_5\text{S}$ : 479.1360  $[\text{M}-\text{Na}]^+$ ; gefunden: 479.1370;  $^1\text{H}$  NMR (700 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm) 8.17 (s, 1H), 7.5 (t,  $J = 5.3$  Hz, 1H), 7.4 (s, 1H), 7.27–7.4 (m, 11H), 7.1 (s, 1H), 4.43–4.58 (m, 4H), 4.32 (s, 2H), 4.03–4.08 (m, 1H), 3.77 (dd,  $J = 9.7$  Hz, 4.7 Hz, 1H), 3.59 (dd,  $J = 9.7$  Hz, 5.9 Hz, 1H);  $^{13}\text{C}$  NMR (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm) 170.2, 165.5, 137.0, 136.1, 131.4, 130.8, 128.9, 128.8, 128.7, 128.6, 128.2, 128.0, 115.7, 73.7, 70.1, 59.6, 56.7, 53.5, 42.8.

### **O-Benzyl-N-benzylsulfonyl-D-serinyl-glycin-pentafluorophenylester (4)**

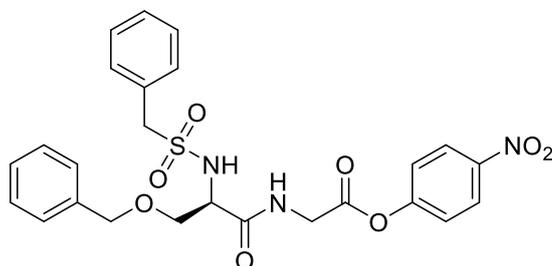


*O*-Benzyl-*N*-benzylsulfonyl-*D*-serinyl-glycine **1** (0.2 g, 0.49 mmol) wurde in trockenem DMF (10 ml) gelöst. Anschließend wurden *N*-Methylmorpholin (NMM, 54  $\mu\text{l}$ , 0.49 mmol) und 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimid

(EDC, 95  $\mu\text{l}$ , 0.54 mmol) bei 0 °C zugegeben. Nachfolgend wurde Pentafluorophenol (0.36 g, 1.96 mmol) zugegeben und die Reaktion für 1 h bei 0 °C gerührt. Nach weiteren

6 h bei Raumtemperatur wurde das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernen und der Rückstand in DCM aufgenommen. Das Reaktionsgemisch wurde drei mal mit wässriger 5%iger NaHCO<sub>3</sub>-Lösung extrahiert und anschließend drei mal mit brine gewaschen. Im Anschluss wurde die organische Phase mit Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel nachfolgend am Rotationsverdampfer entfernt. Durch Aufreinigung des Rückstands mittels präparativer HPLC (Retentionszeit: 18,9–20,7 Minuten) und anschließender Lyophilisation aus Dioxan/Wasser (1:1) konnte Produkt **4** erhalten werden (0.166 g, 0.29 mmol). ESI-MS: *m/z* berechnet für C<sub>25</sub>H<sub>21</sub>F<sub>5</sub>N<sub>2</sub>O<sub>6</sub>S: 595.0933 [*M*-Na]<sup>+</sup>; gefunden: 595.0948. <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ (ppm) 8.87 (t, *J* = 5,8 Hz, 1H), 7.74 (d, *J* = 8,4 Hz, 1H), 7.23–7.41 (m, 10H), 4.51 (s, 2H), 4.39 (d, *J* = 5.7 Hz, 2H), 4.25–4.35 (m, 2H), 4.18–4.24 (m, 1H), 3.55–3.66 (m, 2H); <sup>13</sup>C NMR (125 MHz, d<sub>6</sub>-DMSO) δ (ppm) 188.3, 170.3, 148.9, 138.6, 131.41, 131.37, 130.7, 128.8, 128.7, 128.53, 128.47, 128.2, 128.1, 128.0, 76.6, 72.7, 59.1, 56.8, 41.4; <sup>19</sup>F NMR (470 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ (ppm) -152.9 (m), 157.6 (m), 161.7 (m), 165.3 (m), 171.7 (m).

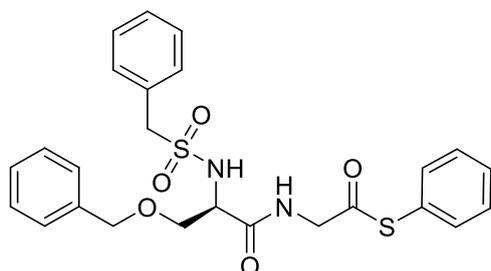
### ***O*-Benzyl-*N*-benzylsulfonyl-*D*-serinyl-glycin-4-nitrophenylester (**5**)**



*O*-Benzyl-*N*-benzylsulfonyl-*D*-serinyl-glycin **1** (0.2 g, 0.49 mmol) wurde in trockenem DMF (10 ml) gelöst. Anschließend wurden *N*-Methylmorpholin (NMM, 54 µl, 0.49 mmol) und 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimid (EDC, 95 µl, 0.54 mmol) bei 0 °C zugegeben. Nachfolgend wurde 4-Nitrophenol (0.27 g, 1.96 mmol) zugegeben und die Reaktion für 1 h bei 0 °C gerührt. Nach weiteren 6 h bei Raumtemperatur wurde das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernen und der Rückstand in DCM aufgenommen. Das Reaktionsgemisch wurde drei mal mit wässriger 5%iger NaHCO<sub>3</sub>-Lösung extrahiert und anschließend drei mal mit brine gewaschen. Im Anschluss wurde die organische Phase mit Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel nachfolgend am Rotationsverdampfer entfernt. Durch Aufreinigung des Rückstands mittels präparativer HPLC (Retentionszeit: 22,7–23,9 Minuten) und anschließender Lyophilisation aus Dioxan/Wasser (1:1) konnte Produkt **5** erhalten werden

(0.173 g, 0.33 mmol). ESI-MS:  $m/z$  berechnet für  $C_{25}H_{25}N_3O_8S$ : 550.1255  $[M-Na]^+$ ; gefunden: 550.1268.  $^1H$  NMR (500 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  (ppm) 8.81 (t,  $J = 5.7$  Hz, 1H), 8.26–8.31 (m, 2H), 7.74 (d,  $J = 8.4$  Hz, 1H), 7.39–7.44 (m, 10H), 7.24–7.37 (m, 10H), 4.52 (s, 2H), 4.28–4.37 (m, 2H), 4.20–4.27 (m, 3H), 3.63 (qd, 9.9 Hz, 6 Hz, 2H);  $^{13}C$  NMR (125 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  (ppm) 170.9, 168.6, 155.7, 145.7, 138.5, 131.4, 130.6, 128.80, 128.77, 128.5, 128.1, 125.9, 123.5, 72.8, 71.0, 59.1, 56.8, 42.0.

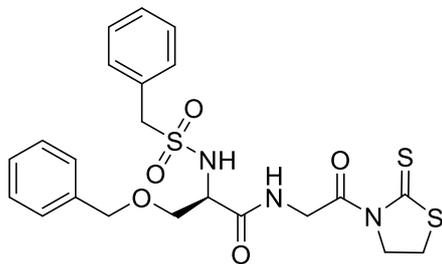
### O-Benzyl-N-benzylsulfonyl-D-serinyl-glycin-phenylthioester (6)



*O*-Benzyl-*N*-benzylsulfonyl-*D*-serinyl-glycin **1** (0.2 g, 0.49 mmol) wurde in trockenem DCM gelöst (10 ml). Anschließend wurden *N*-Methylmorpholin (NMM, 54  $\mu$ l, 0.49 mmol) und 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimid

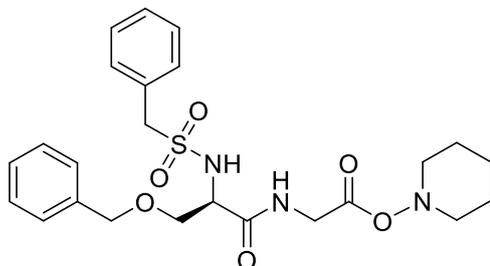
(EDC, 95  $\mu$ l, 0.54 mmol) bei 0 °C zugegeben. Nachfolgend wurde Thiophenol (200  $\mu$ l, 1.96 mmol) zugegeben und die Reaktion für 1 h bei 0 °C gerührt. Nach weiteren 6 h bei Raumtemperatur wurde das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernen und der Rückstand in DCM aufgenommen. Das Reaktionsgemisch wurde drei mal mit wässriger 5%iger  $NaHCO_3$ -Lösung extrahiert und anschließend drei mal mit brine gewaschen. Im Anschluss wurde die organische Phase mit Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel nachfolgend am Rotationsverdampfer entfernt. Durch Aufreinigung des Rückstands mittels präparativer HPLC (Retentionszeit: 22,8–24,2 Minuten) und anschließender Lyophilisation aus Dioxan/Wasser (1:1) konnte Produkt **6** erhalten werden (0.15 g, 0.3 mmol). ESI-MS:  $m/z$  berechnet für  $C_{25}H_{26}N_2O_5S_2$ : 521.1175  $[M-Na]^+$ ; gefunden: 521.1186.  $^1H$  NMR (500 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  (ppm) 8.90 (t,  $J = 6$  Hz, 1H), 7.73 (d,  $J = 8.4$  Hz, 1H), 7.45 (m, 3H), 7.24–7.39 (m, 12H), 4.54 (s, 2H), 4.29–4.4 (m, 2H), 4.21–4.27 (ddd,  $J = 8.4$  Hz, 6.5 Hz, 5.2 Hz, 1H), 4.19 (dd,  $J = 5.9$  Hz, 1.3 Hz, 2H), 3.66 (qd,  $J = 9.9$  Hz, 5.9 Hz, 2H);  $^{13}C$  NMR (125 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  (ppm) 196.4, 170.9, 138.5, 135.1, 131.4, 130.6, 130.1, 129.0, 128.8, 128.7, 128.5, 128.2, 128.1, 127.4, 72.8, 66.9, 59.1, 57.0, 49.6.

### 3-*N*-(*O*-Benzyl-*N*-benzylsulfonyl-*D*-serinyl-glycyl)-3-acyl-2-thiono-1,3-thiazolidin (7)



*O*-Benzyl-*N*-benzylsulfonyl-*D*-serinyl-glycin **1** (0.2 g, 0.49 mmol) wurde in trockenem DMF gelöst (10 ml). Anschließend wurden *N*-Methylmorpholin (NMM, 54  $\mu$ l, 0.49 mmol) und 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimid (EDC, 95  $\mu$ l, 0.54 mmol) bei 0 °C zugegeben. Nachfolgend wurde 2-Thiazolin-2-thiol (0.23 g, 1.96 mmol) zugegeben und die Reaktion für 1 h bei 0 °C gerührt. Nach weiteren 6 h bei Raumtemperatur wurde das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernen und der Rückstand in DCM aufgenommen. Das Reaktionsgemisch wurde drei mal mit wässriger 5%iger NaHCO<sub>3</sub>-Lösung extrahiert und anschließend drei mal mit brine gewaschen. Im Anschluss wurde die organische Phase mit Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel nachfolgend am Rotationsverdampfer entfernt. Durch Aufreinigung des Rückstands mittels präparativer HPLC (Retentionszeit: 21,8–23,8 Minuten) und anschließender Lyophilisation aus Dioxan/Wasser (1:1) konnte Produkt **7** erhalten werden (0.139 g, 0.27 mmol). ESI-MS:  $m/z$  berechnet für C<sub>22</sub>H<sub>25</sub>N<sub>3</sub>O<sub>5</sub>S<sub>3</sub>: 530.0849 [ $M$ -Na]<sup>+</sup>; gefunden: 530.0869. <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  (ppm) 8.48 (t,  $J$  = 5.6 Hz, 1H), 7.65 (d,  $J$  = 8.5 Hz, 1H), 7.24–7.4 (m, 10H), 4.65–4.81 (m, 2H), 4.53 (s, 2H), 4.5 (dd,  $J$  = 9 Hz, 6,5 Hz, 2H), 4.34 (s, 2H), 4.23 (dt,  $J$  = 8.3 Hz, 6Hz, 1H), 3.55–3.67 (m, 2H), 3.43 (t,  $J$  = 7.7 Hz, 2H); <sup>13</sup>C NMR (125 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  (ppm) 203.0, 170.7, 170.3, 138.5, 131.3, 130.5, 128.7, 128.4, 128.1, 128.0, 100.0, 72.7, 70.9, 59.0, 56.8, 56.6, 46.4, 29.5.

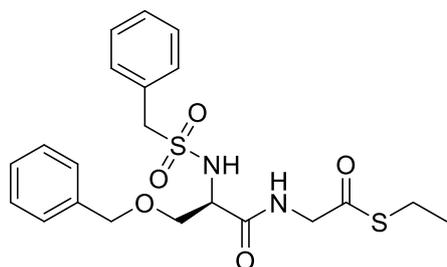
### *O*-Benzyl-*N*-benzylsulfonyl-*D*-serinyl-glycin-piperidinyl-1-ester (8)



*O*-Benzyl-*N*-benzylsulfonyl-*D*-serinyl-glycin **1** (0.2 g, 0.49 mmol) wurde in trockenem DMF gelöst (10 ml). Anschließend wurden *N*-Methylmorpholin (NMM, 54  $\mu$ l, 0.49 mmol) und 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimid (EDC, 95  $\mu$ l, 0.54 mmol) bei 0 °C zugegeben. Nachfolgend wurde *N*-Hydroxypiperidin (0.2 g, 1.96 mmol) zugegeben und die Reaktion für 1 h bei 0 °C gerührt. Nach weiteren

6 h bei Raumtemperatur wurde das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernen und der Rückstand in DCM aufgenommen. Das Reaktionsgemisch wurde drei mal mit brine gewaschen. Im Anschluss wurde die organische Phase mit Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel nachfolgend am Rotationsverdampfer entfernt. Durch Aufreinigung des Rückstands mittels präparativer HPLC (Retentionszeit: 19.4–20.7 Minuten) und anschließender Lyophilisation aus Dioxan/Wasser (1:1) konnte Produkt **8** erhalten werden (0.127 g, 0.26 mmol). ESI-MS/MS:  $m/z$  berechnet für  $C_{24}H_{31}N_3O_6S$ : 512.1826  $[M-Na]^+$ ; gefunden: 512.1851.  $^1H$  NMR (700 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  (ppm) 8.43–8.47 (m, 1H), 7.61–7.64 (m, 1H), 7.26–7.38 (m, 10H), 4.52 (s, 2H), 4.3–4.37 (m, 2H), 4.18–4.22 (m, 1H), 3.56–3.65 (m, 2H), 3.01 (t,  $J = 5.7$  Hz, 2H), 1.64 (p,  $J = 5.8$  Hz, 2H), 1.55 (q,  $J = 5.8$  Hz, 1H);  $^{13}C$  NMR (125 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  (ppm) 170.2, 167.1, 138.5, 131.3, 130.6, 128.7, 128.4, 128.07, 128.06, 128.0, 72.6, 70.9, 59.0, 56.8, 44.2, 39.6, 22.7, 22.1.

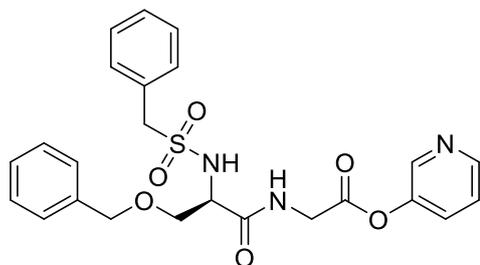
### **O-Benzyl-N-benzylsulfonyl-D-serinyl-glycin-ethylthioester (9)**



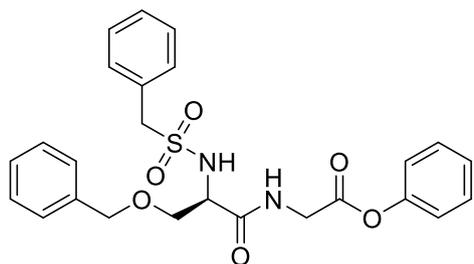
*O*-Benzyl-*N*-benzylsulfonyl-*D*-serinyl-glycin **1** (0.2 g, 0.49 mmol) wurde in trockenem DMF gelöst (10 ml). Anschließend wurden *N*-Methylmorpholin (NMM, 54  $\mu$ l, 0.49 mmol) und 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimid (EDC, 95  $\mu$ l, 0.54 mmol) bei 0 °C zugegeben. Nachfolgend wurde Ethanthiol (141  $\mu$ l, 1.96 mmol) zugegeben und die Reaktion für 1 h bei 0 °C gerührt. Nach weiteren 6 h bei Raumtemperatur wurde das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernen und der Rückstand in DCM aufgenommen. Das Reaktionsgemisch wurde drei mal mit wässriger 5%iger  $NaHCO_3$ -Lösung extrahiert und anschließend drei mal mit brine gewaschen. Im Anschluss wurde die organische Phase mit Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel nachfolgend am Rotationsverdampfer entfernt. Durch Aufreinigung des Rückstands mittels präparativer HPLC (Retentionszeit: 22–23.4 Minuten) und anschließender Lyophilisation aus Dioxan/Wasser (1:1) konnte Produkt **9** erhalten werden (0.14 g, 0.31 mmol). ESI-MS:  $m/z$  berechnet für  $C_{21}H_{26}N_2O_5S_2$ : 473.1175  $[M-Na]^+$ ; gefunden: 473.1184.  $^1H$  NMR (500 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  (ppm) 8.78 (t,  $J = 6$  Hz, 1H), 7.68 (d,  $J = 8.4$  Hz, 1H), 7.26–7.41 (m, 10H), 4.53 (s, 2H), 4.32 (m, 2H), 4.21 (ddd,  $J = 8.4$  Hz, 6.6 Hz, 5.3 Hz, 1H), 4.05 (d,  $J =$

6.1 Hz, 2H), 3.63 (m, 2H), 2.79 (q,  $J = 7.4$  Hz, 2H), 1.12 (t,  $J = 7.3$  Hz, 3H);  $^{13}\text{C}$  NMR (125 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  (ppm) 198.3, 170.6, 138.5, 131.3, 130.5, 128.7, 128.4, 128.1, 128.0, 72.7, 70.9, 66.8, 59.1, 56.9, 49.5, 22.7, 15.0.

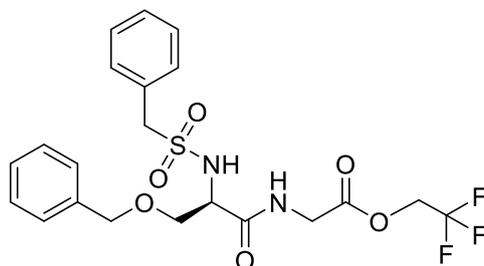
### **O-Benzyl-N-benzylsulfonyl-D-serinyl-glycin-pyridinyl-3-ester (10)**



*O*-Benzyl-*N*-benzylsulfonyl-*D*-serinyl-glycin **1** (0.2 g, 0.49 mmol) wurde in trockenem DMF gelöst (10 ml). Anschließend wurden *N*-Methylmorpholin (NMM, 54  $\mu\text{l}$ , 0.49 mmol) und 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimid (EDC, 95  $\mu\text{l}$ , 0.54 mmol) bei 0 °C zugegeben. Nachfolgend wurde 3-Hydroxypyridin (0.19 g, 1.96 mmol) zugegeben und die Reaktion für 1 h bei 0 °C gerührt. Nach weiteren 6 h bei Raumtemperatur wurde das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernen und der Rückstand in DCM aufgenommen. Das Reaktionsgemisch wurde drei mal mit wässriger 10%iger  $\text{K}_2\text{CO}_3$ -Lösung extrahiert und anschließend drei mal mit brine gewaschen. Im Anschluss wurde die organische Phase mit Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel nachfolgend am Rotationsverdampfer entfernt. Durch Aufreinigung des Rückstands mittels präparativer HPLC (Retentionszeit: 20.4–22.1 Minuten) und anschließender Lyophilisation aus Dioxan/Wasser (1:1) konnte Produkt **10** erhalten werden (0.130 g, 0.27 mmol). ESI-MS:  $m/z$  berechnet für  $\text{C}_{24}\text{H}_{25}\text{N}_3\text{O}_6\text{S}$ : 506.1356  $[\text{M}-\text{Na}]^+$ ; gefunden: 506.1379.  $^1\text{H}$  NMR (700 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  (ppm) 8.48 (t,  $J = 5.8$  Hz, 1H), 7.9–7.93 (m, 1H), 7.83–7.86 (m, 1H), 7.71 (d,  $J = 8.5$  Hz, 1H), 7.63–7.66 (m, 1H), 7.5–7.53 (m, 1H), 7.25–7.38 (m, 10H), 4.52 (d,  $J = 3.5$  Hz, 2H), 4.3–4.37 (m, 2H), 4.23–4.26 (m, 1H), 3.78–3.91 (m, 2H), 3.58–3.67 (m, 2H);  $^{13}\text{C}$  NMR (125 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  (ppm) 170.8, 168.9, 146.9, 143.0, 138.4, 131.3, 130.8, 130.5, 128.69, 128.67, 128.4, 128.03, 127.95, 72.7, 70.9, 66.82, 59.0, 56.7, 41.7.

**O-Benzyl-N-benzylsulfonyl-D-serinyl-glycin-phenylester (11)**

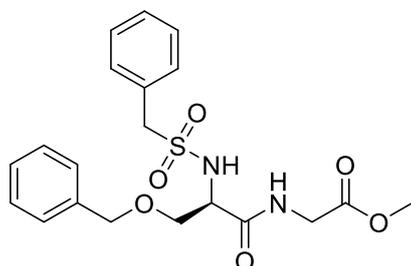
*O*-Benzyl-*N*-benzylsulfonyl-*D*-serinyl-glycin **1** (0.2 g, 0.49 mmol) wurde in trockenem DCM gelöst (10 ml). Anschließend wurden *N*-Methylmorpholin (NMM, 54  $\mu$ l, 0.49 mmol) und 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimid (EDC, 95  $\mu$ l, 0.54 mmol) bei 0 °C zugegeben. Nachfolgend wurde Phenol (0.18 g, 1.96 mmol) zugegeben und die Reaktion für 1 h bei 0 °C gerührt. Nach weiteren 6 h bei Raumtemperatur wurde das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernen und der Rückstand in DCM aufgenommen. Das Reaktionsgemisch wurde drei mal mit wässriger 10%iger K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>-Lösung extrahiert und anschließend drei mal mit brine gewaschen. Im Anschluss wurde die organische Phase mit Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel nachfolgend am Rotationsverdampfer entfernt. Durch Aufreinigung des Rückstands mittels präparativer HPLC (Retentionszeit: 22.6–24.6 Minuten) und anschließender Lyophilisation aus Dioxan/Wasser (1:1) konnte Produkt **11** erhalten werden (0.18 g, 0.37 mmol). ESI-MS: *m/z* berechnet für C<sub>25</sub>H<sub>26</sub>N<sub>2</sub>O<sub>6</sub>S: 505.1404 [*M*-Na]<sup>+</sup>; gefunden: 505.1438. <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  (ppm) 8.73 (t, *J* = 5.8 Hz, 1H), 7.7 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H), 7.38–7.43 (m, 2H), 7.23–7.35 (m, 11H), 7.09–7.13 (m, 2H), 4.52 (s, 2H), 4.27–4.35 (m, 2H), 4.14–4.26 (m, 3H), 3.58–3.67 (m, 2H); <sup>13</sup>C NMR (125 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  (ppm) 170.7, 169.0, 150.8, 138.5, 131.3, 130.5, 130.0, 128.7, 128.4, 128.1, 128.0, 126.4, 122.0, 72.7, 71.0, 59.0, 56.7, 41.7.

**O-Benzyl-N-benzylsulfonyl-D-serinyl-glycin-2,2,2-trifluoroethylester (12)**

*O*-Benzyl-*N*-benzylsulfonyl-*D*-serinyl-glycin **1** (0.2 g, 0.49 mmol) wurde in trockenem DMF gelöst (10 ml). Anschließend wurden *N*-Methylmorpholin (NMM, 54  $\mu$ l, 0.49 mmol) und 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimid (EDC, 95  $\mu$ l, 0.54 mmol) bei 0 °C zugegeben. Nachfolgend wurde 2,2,2-Trifluoroethanol (149  $\mu$ l, 1.96 mmol) zugegeben und die Reaktion für 1 h bei 0 °C gerührt. Nach weiteren 6 h bei Raumtemperatur wurde das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernen und

der Rückstand in DCM aufgenommen. Das Reaktionsgemisch wurde drei mal mit wässriger 5%iger NaHCO<sub>3</sub>-Lösung extrahiert und anschließend drei mal mit brine gewaschen. Im Anschluss wurde die organische Phase mit Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel nachfolgend am Rotationsverdampfer entfernt. Durch Aufreinigung des Rückstands mittels präparativer HPLC (Retentionszeit: 21.6–22.7 Minuten) und anschließender Lyophilisation aus Dioxan/Wasser (1:1) konnte Produkt **12** erhalten werden (0.177 g, 0.36 mmol). ESI-MS: *m/z* berechnet für C<sub>21</sub>H<sub>23</sub>F<sub>3</sub>N<sub>2</sub>O<sub>6</sub>S: 511.1121 [*M*-Na]<sup>+</sup>; gefunden: 511.1151. <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ (ppm) 8.69 (t, *J* = 5.8 Hz, 1H), 7.70 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H), 7.25–7.4 (m, 10H), 4.78 (q, *J* = 9 Hz, 2H); 4.52 (s, 2H), 4.27–4.36 (m, 2H), 4.17–4.24 (m, 1H), 4.05 (dd, *J* = 5.8 Hz, 2.7 Hz, 2H), 3.54–3.65 (m, 2H); <sup>13</sup>C NMR (125 MHz, d<sub>6</sub>-DMSO) δ (ppm) 170.7, 169.1, 138.6, 131.4, 130.6, 128.81, 128.80, 128.5, 128.2, 128.1, 72.7, 71.0, 60.5, 60.8, 59.1, 56.8, 41.1; <sup>19</sup>F NMR (470 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ (ppm) -72.2 (t, *J* (<sup>1</sup>H, <sup>19</sup>F) = 9.2 Hz).

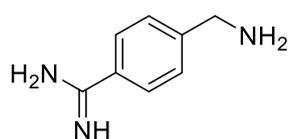
### O-Benzyl-N-benzylsulfonyl-D-serinyl-glycin-methylester (**13**)



*O*-Benzyl-*N*-benzylsulfonyl-*D*-serin **1a** (6 g, 17 mmol) wurde in trockenem DCM gelöst (100 ml). Anschließend wurden DIPEA, (6.13 ml, 0.36 mol), Benzotriazol-1-yl-oxy-tris-pyrrolidino-phosphonium Hexafluorophosphat (PyBOP, 9.83 g, 0.019 mol) und Glycinmethylester Hydrochloride (2.37 g, 0.019 mol) bei 0 °C zugegeben. Die Reaktion wurde für 30 Minuten bei 0 °C und anschließend über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Das Reaktionsgemisch wurde anschließend jeweils drei mal mit 5%iger wässriger KHSO<sub>4</sub>-Lösung, wässriger 5%iger NaHCO<sub>3</sub>-Lösung und brine extrahiert bzw. gewaschen. Im Anschluss wurde die organische Phase mit Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel nachfolgend am Rotationsverdampfer entfernt. Durch Aufreinigung des Rückstands mittels präparativer HPLC (Retentionszeit: 19.6–21.7 min) und anschließender Lyophilisation aus Dioxan/Wasser (1:1) konnte Produkt **13** erhalten werden (5.84 g, 0.014 mol). ESI-MS: *m/z* berechnet für C<sub>20</sub>H<sub>24</sub>N<sub>2</sub>O<sub>6</sub>S: 443.1247 [*M*-Na]<sup>+</sup>; gefunden: 443.1273. <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ (ppm) 8.57 (t, *J* = 5.9 Hz, 1H), 7.64 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H), 7.26–7.38 (m, 10H), 4.52 (s, 2H), 4.32 (s, 2H), 4.2 (ddd, *J* = 8.5 Hz, 6.6 Hz,

5.5 Hz, 1H), 3.92 (qd,  $J = 17.4$  Hz, 5.9 Hz, 2H), 3.56–3.65 (m, 5H)  $^{13}\text{C}$  NMR (125 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  (ppm) 170.5, 170.4, 138.5, 131.3, 130.5, 128.72, 128.70, 128.4, 128.1, 128.0, 72.6, 70.9, 59.0, 56.7, 52.2, 41.3.

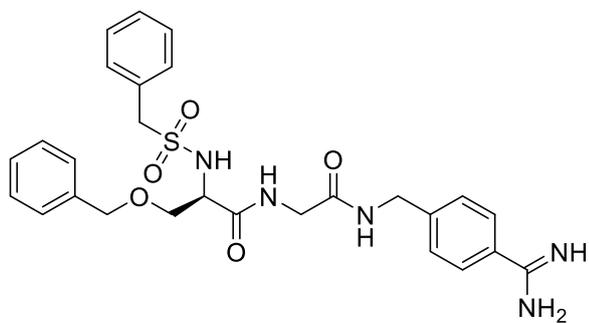
#### 4-Aminomethyl-benzamidin (**14**)



*N*-Boc-4-aminomethyl-benzamidin **14d** (13 g, 0.052 mol) wurde in einem 3:1-Gemisch (200 ml) aus DCM/Trifluoressigsäure gelöst. Nachdem der Reaktionsansatz für 2 h gerührt wurde konnte

mittels LC/MS-Analytik die Vollständigkeit der Entschützung nachgewiesen werden. Anschließend wurde das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt und der resultierende Rückstand aus Wasser lyophilisiert. Produkt **14** konnte nachfolgend als weißer Feststoff erhalten werden (7.75 g, 0.052 mol). ESI-MS:  $m/z$  berechnet für  $\text{C}_8\text{H}_{11}\text{N}_3$ : 150.1026  $[M-H]^+$ ; gefunden: 150.1041.  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  (ppm) 9.69 (s, 2H), 9.43 (s, 2H), 8.58 (s, 3H), 7.87 (d,  $J = 8.4$  Hz, 2H), 7.68 (d,  $J = 8.4$  Hz, 2H), 4.17 (s, 2H);  $^{13}\text{C}$  NMR (125 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  (ppm) 166.0, 140.5, 129.6, 128.8, 128.7, 42.2.

#### *O*-Benzyl-*N*-benzylsulfonyl-*D*-serinyl-glycin-4-amidinobenzylamid (**15**)

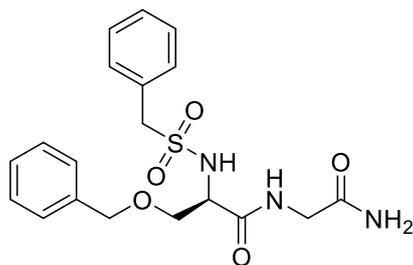


*O*-Benzyl-*N*-benzylsulfonyl-*D*-serinyl-glycin **1** (0.2 g, 0.49 mmol) wurde in trockenem DMF gelöst (10 ml). Anschließend wurden DIPEA, (251  $\mu\text{l}$ , 1.47 mmol), Benzotriazol-1-yl-oxy-trispyrrolidino-phosphonium Hexafluorophosphat (PyBOP, 0.26 g, 0.49 mmol) und **14** (0.073 g, 0.49 mol) bei 0 °C zugegeben.

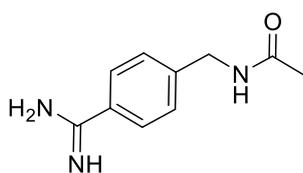
Die Reaktion wurde für 30 Minuten bei 0 °C und anschließend über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Im Anschluss wurde die organische Phase mit Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel nachfolgend am Rotationsverdampfer entfernt. Durch Aufreinigung des Rückstands mittels präparativer HPLC (Retentionszeit: 12.3–14.1 min) und anschließender Lyophilisation aus Dioxan/Wasser (1:1) konnte Produkt **15** als weißer Feststoff erhalten werden (0.25 g, 0.38 mmol). ESI-MS:  $m/z$  berechnet für  $\text{C}_{27}\text{H}_{32}\text{N}_5\text{O}_5\text{S}$ : 538.2119  $[M-H]^+$ ; gefunden: 538.2155.  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  (ppm) 9.28 (d,

$J = 8,8$  Hz, 3H; NH Benzylamid), 8.51 (t,  $J = 5,8$  Hz, 1H; NH Glycin), 8.39 (t,  $J = 6,1$  Hz, 1H; NH Amidinobenzylamid), 7.74 (d,  $J = 8.3$  Hz, 2H; Benzylamid aromatisch), 7.69 (d,  $J = 8.2$  Hz; NH Serin), 7.43 (d,  $J = 8.2$  Hz, 2H; Benzylamid aromatisch), 7.26–7.37 (m, 10H; Phenyl aromatisch), 4.51 (s, 2H; CH<sub>2</sub> Benzyl), 4.36 (s, 2H; CH<sub>2</sub> Amidinobenzylamid), 4.32 (m, 2H; CH<sub>2</sub> Benzylsulfonyl), 4.2 (dt,  $J = 8$  Hz, 6 Hz, 1H; CH Serin), 3.83 (qd,  $J = 5.9$  Hz, 16.7 Hz, 2H; CH<sub>2</sub> Glycin), 3.63 (qd,  $J = 9.9$  Hz, 6 Hz, 2H; CH<sub>2</sub> Serin); <sup>13</sup>C NMR (125 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>)  $\delta$  (ppm) 170.4 (Carbonyl Glycin), 169.4 (Carbonyl Serin), 166.0 (C Amidin), 146.2 (C Benzylamid aromatisch), 138.5 (C Benzylamid aromatisch), 131.4, 130.6, 128.8, 128.6, 128.5, 128.1, 128.12, 128.1, 127.9, 127.1 (C aromatisch), 72.6 (CH<sub>2</sub> Benzylsulfonyl), 71 (CH<sub>2</sub> Serin), 58.8 (CH<sub>2</sub> Amidinobenzylamid), 56.9 (CH Serin), 42.9 (CH<sub>2</sub> Glycin), 42.2 (CH<sub>2</sub> Benzylsulfonyl).

### **O-Benzyl-N-benzylsulfonyl-D-serinyl-glycin-amid (16)**

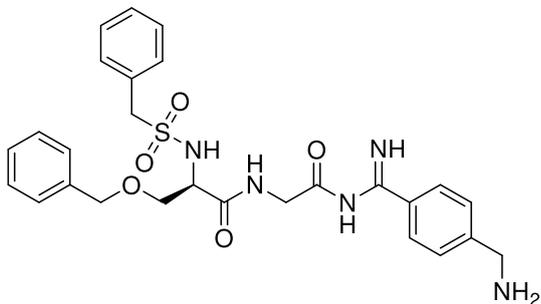


O-Benzyl-N-benzylsulfonyl-D-serinyl-glycin **1** (0.2 g, 0.49 mmol) wurde in trockenem DCM gelöst (10 ml). Anschließend wurde CDI (87 mg, 0.54 mmol) bei 0 °C zugegeben. Nach 30 Minuten Reaktionszeit wurden Ammoniumchlorid (0.039 g, 0.74 mmol) und DIPEA (125  $\mu$ l, 0.74 mmol) zugegeben. Nach weiteren 6 h wurde das Reaktionsgemisch jeweils drei mal mit 5%iger wässriger KHSO<sub>4</sub>-Lösung, wässriger 5%iger NaHCO<sub>3</sub>-Lösung und brine extrahiert bzw. gewaschen. Im Anschluss wurde die organische Phase mit Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel nachfolgend am Rotationsverdampfer entfernt. Durch Aufreinigung des Rückstands mittels präparativer HPLC (Retentionszeit: 16.0–17.0 min) und anschließender Lyophilisation aus Dioxan/Wasser (1:1) konnte Produkt **16** erhalten werden (0.13 g, 0.31 mmol). ESI- MS:  $m/z$  berechnet für C<sub>21</sub>H<sub>23</sub>F<sub>3</sub>N<sub>3</sub>O<sub>5</sub>S: 428.1251 [ $M-Na$ ]<sup>+</sup>; gefunden: 428.1263. <sup>1</sup>H NMR (700 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>)  $\delta$  (ppm) 8.30 (t,  $J = 5.8$  Hz, 1H), 7.62 (d,  $J = 8.2$  Hz, 1H), 7.26–7.38 (m, 10H), 7.20 (s, 1H), 7.12 (s, 1H), 4.52 (s, 2H), 4.33–4.40 (m, 2H), 4.13–4.18 (m, 1H), 3.63–3.77 (m, 2H), 3.56–3.63 (m, 2H); <sup>13</sup>C NMR (125 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>)  $\delta$  (ppm) 171.0, 170.1, 138.4, 131.3, 130.6, 128.72, 128.70, 128.4, 128.1, 128.0, 72.7, 70.8, 58.7, 56.8, 42.5.

**4-Acetyl-aminomethyl-benzamidin (17)**

4-Aminomethyl-benzamidin **14** (0.2 g, 1.34 mmol) wurde in Eisessig gelöst (10 ml). Anschließend wurden 1.27 ml Acetanhydrid (13.4 mmol) zugegeben. Nachdem der Reaktionsansatz für 3 h gerührt wurde, konnte mittels LC/MS-Analytik die

Vollständigkeit der Reaktion nachgewiesen werden. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 10 ml Wasser gequenchet und anschließend für weitere 30 Minuten gerührt. Durch direkte Lyophilisation des Reaktionsgemisches konnte Produkt **17** als weißer Feststoff erhalten werden (0.254 g, 1.34 mmol). ESI-MS:  $m/z$  berechnet für  $C_{10}H_{13}N_3O$ : 192.1131 [ $M-Na$ ] $^+$ ; gefunden: 192.1157.  $^1H$  NMR (700 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  (ppm) 9.48 (s, 2H), 9.3 (s, 2H), 8.54 (s, 1H), 7.78 (d,  $J = 8.3$  Hz, 2H), 7.46 (d,  $J = 8.4$  Hz, 2H), 4.34 (d,  $J = 6$  Hz, 1H), 1.90 (s, 3H);  $^{13}C$  NMR (125 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  (ppm) 166.0, 140.5, 129.6, 128.8, 128.7, 42.2.

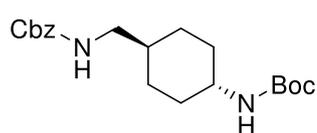
**O-Benzyl-N-benzylsulfonyl-D-serinyl-glycinyl-N-(iminomethyl(4-aminomethyl))-benzamidin (18)**

O-Benzyl-N-benzylsulfonyl-D-serinyl-glycin **1** (300 mg, 0.74 mmol) wurde in trockenem DMF gelöst (10 ml). Daraufhin wurden DCC (181 mg, 0.88 mmol) und 1-Benzotriazol (HOBt, 118 mg, 0.87 mmol) bei 0 °C zugegeben. Im Anschluss wurde *N*-

Boc-4-aminomethyl-benzamidin **14d** (200 mg, 0.87 mmol) zugegeben und die Reaktion für 1 h gerührt. Nach 12 h bei Raumtemperatur wurden dem Reaktionsansatz 20 ml Ethylacetat zugegeben. Nachfolgend wurde die organische Phase drei mal brine gewaschen. Anschließend wurde die organische Phase getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Es folgte die direkte Entschützung ohne weitere Aufreinigung. Hierzu wurde das rohe Produkt in einem 9:1-Gemisch (15 ml) aus DCM/Trifluoressigsäure gelöst. Nachdem der Reaktionsansatz für 2 h gerührt wurde, konnte mittels LC/MS-Analytik die Vollständigkeit der Entschützung nachgewiesen werden. Im Anschluss wurde das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt und der Rückstand in

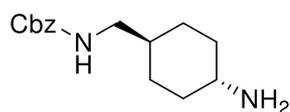
Ethylacetat aufgenommen. Nachfolgend wurde die organische Phase drei mal mit 5-molarer NaOH extrahiert und anschließend mit Natriumsulfat getrocknet. Daraufhin wurde nochmals das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Durch Aufreinigung mittels Flash-Chromatographie (DCM/MeOH 95:5) konnte Produkt **18** in einer Rohausbeute von 26 % erhalten werden mit minimalen Verunreinigungen durch Zersetzungsprodukte. Aufgrund der unzureichenden Lagerstabilität wurde bei der Untersuchung des Produkts mittels NMR-Spektroskopie lediglich ein unsauberer Spektren erhalten (nicht in A.4. enthalten), welches ein Edukt-Produkt-Gemisch sowie weiteren **18**-Zerfallsprodukten (s. Abschnitt 5.2) zeigte. ESI-MS:  $m/z$  berechnet für  $C_{27}H_{32}N_5O_5S$ : 538.2119  $[M-H]^+$ ; gefunden: 538.2155.

#### ***trans*-N-(4-Cbz-aminomethyl)cyclohexyl-boc-amin (19a)**

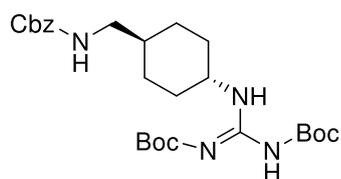


*trans*-4-(Aminomethyl)cyclohexan-boc-amin (1.5 g, 6.6 mmol) wurde in trockenem THF gelöst (30 ml). Anschließend wurden Benzylchloroformiat (1.03 ml, 7.23 mmol) und DIPEA (1,4 ml, 7.92 mmol) zugegeben. Nachdem der Reaktionsansatz für 3 h gerührt wurde, wurde das Lösungsmittel ab Rotationsverdampfer entfernt. Der resultierende Rückstand wurde in Ethylacetat aufgenommen. Es folgte die Zugabe von 30 ml Wasser und nachfolgend wurde drei mal mit Ethylacetat extrahiert. Im Anschluss wurde die organische Phase mit Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Produkt **19a** konnte nachfolgend als weißer Feststoff erhalten werden (2.13 g, 5.9 mmol).

#### ***trans*-(4-Cbz-aminomethyl)cyclohexylamin (19b)**

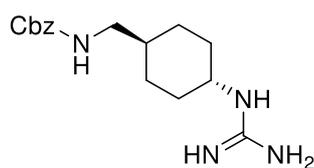


*trans*-N-(4-Cbz-aminomethyl)cyclohexyl-boc-amin **19a** (2.13 g, 5.9 mmol) wurde in einem DCM/Trifluoressigsäure-Gemisch (1:9, 30 ml) bei 0 °C gelöst. Nach 2 h Reaktionszeit konnte die Vollständigkeit der Reaktion mittels LC/MS-Analytik nachgewiesen werden. Im Anschluss wurde das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Produkt **19b** konnte nachfolgend als weißer Feststoff erhalten werden (1.52 g, 5.78 mmol).

**trans-(4-Cbz-aminomethyl)cyclohexyl-1,3-di-boc-guanidin (19c)**

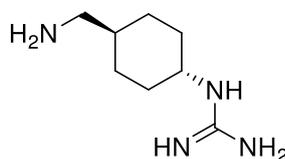
*trans*-(4-Cbz-aminomethyl)cyclohexylamin **19b** (1.52 g, 5.78 mmol) wurde in DCM gelöst. Anschließend wurden Di-boc-trifluoromethylsulfonylguanidin (2.26 g, 5.78 mmol) und Triethylamin zugegeben (1.42, 11.56 mmol). Die Re-

aktion wurde über Nacht gerührt. Die Vollständigkeit der Reaktion konnte mittels LC/MS-Analytik nachgewiesen werden. Das Reaktionsgemisch wurde nachfolgend jeweils zwei mal mit 5%iger wässriger  $\text{KHSO}_4$ -Lösung, wässriger 5%iger  $\text{NaHCO}_3$ -Lösung und brine extrahiert bzw. gewaschen. Im Anschluss wurde die organische Phase mit Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Produkt **19c** konnte nachfolgend weißer Feststoff erhalten werden (2.32 g, 4.6 mmol).

**trans-(4-Cbz-aminomethyl)cyclohexylguanidin (19d)**

*trans*-(4-Cbz-aminomethyl)cyclohexyl-1,3-di-boc-guanidin **19c** (2.22 g, 4.39 mmol) wurden in einem DCM/Trifluoressigsäure-Gemisch (2:1, 30 ml) gelöst. Nach 36 h konnte die vollständige Entschützung mittels LC/MS-Analytik nachgewiesen

werden. Im Anschluss wurde das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt und der resultierende Rückstand aus Dioxan/Wasser (1:1) lyophilisiert. Produkt **19d** konnte nachfolgend als weißer Feststoff erhalten werden (1.38 g, 4.55 mmol).

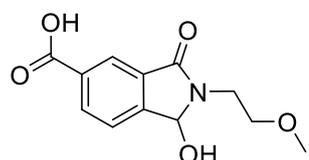
**trans-(4-aminomethyl)cyclohexylguanidin (19c)**

*trans*-(4-Cbz-aminomethyl)cyclohexylguanidin **19d** (1.31 g, 4.3 mmol) wurde in einen Schlenk-Kolben überführt und nachfolgend in 20 ml Methanol gelöst. Im Anschluss wurde Palladium/Kohlenstoff (10 % (w/w), 0.023 g, 0.21 mmol) zu-

gegeben. Der Reaktionsansatz wurde mit einem  $\text{H}_2$ -Ballon versehen und für 2 h unter  $\text{H}_2$ -Atmosphäre gerührt. Nach Abfiltrieren des Katalysators und Einengen des Lösungsmittels wurde das gewünschte Produkt **19c** erhalten (0.77 g, 4.49 mmol). ESI-MS:  $m/z$  berechnet für  $\text{C}_8\text{H}_{18}\text{N}_4$ : 85.0598 [ $M-2\text{H}$ ] $^{2+}$ ; gefunden: 85.0607.  $^1\text{H}$  NMR (700 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$  (ppm) 3.19-3.24 (m, 1H), 2.41 (d,  $J = 6.7$  Hz, 2H), 1.94 (d,  $J = 10.9$  Hz, 2H), 1.75 (d,  $J$

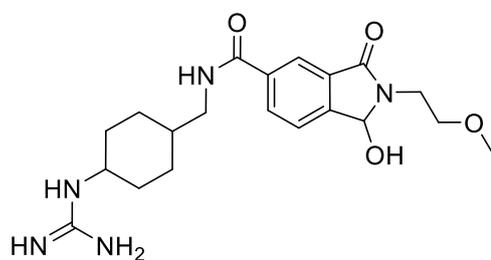
= 12.6 Hz, 2H), 1.26-1.31 (m, 1H), 1.19-1.25 (m, 2H), 0.89-0.98 (m, 2H);  $^{13}\text{C}$  NMR (125 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$  (ppm) 171.0, 155.8, 50.9, 46.4, 38.2, 31.4, 28.4.

### 1-Hydroxy-2-(2-methoxyethyl)-3-oxoisindolin-5-carbonsäure (CA1)



2-(2-methoxyethyl)-1,3-dioxoisindolin-5-carbonsäure (200 mg, 0.8 mmol) wurde in trockenem THF gelöst (200  $\mu\text{l}$ ). Anschließend wurden  $\text{Cu(I)Br}$  (5.8 mg, 40  $\mu\text{mol}$ ) und Zinkstaub (158 mg, 2.4 mmol) zugegeben. Nachdem die Reaktion für 4 h bei 70  $^\circ\text{C}$  gerührt wurde, wurde der pH-Wert mit 3-molarer Salzsäure auf pH 3 gebracht. Der Reaktionsansatz wurde für eine weitere Stunde gerührt und anschließend filtriert. Dem Ansatz wurden nachfolgend 10 ml Wasser zugegeben. Es folgte dreimalige Extraktion mit DCM. Die vereinten organischen Phasen wurden mit Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel im Anschluss am Rotationsverdampfer entfernt. Das Produkt **CA1** konnte mit leichter Verunreinigung) durch das 1-Oxoisindolin-Regioisomer (Verhältnis Produkt/Regioisomer 4:1) als weißer Feststoff erhalten werden (47 mg, 0.187 mmol). ESI-MS:  $m/z$  berechnet für  $\text{C}_{12}\text{H}_{13}\text{NO}_5$ : 252.0866  $[\text{M}-\text{H}]^+$ ; gefunden: 252.0873.  $^1\text{H}$  NMR (700 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ )  $\delta$  (ppm) 13.25 (s, 1H), 8.17–8.21 (m, 1H), 8.11 (s, 1H), 7.72 (d,  $J = 7.7$  Hz, 1H), 6.74 (s, 1H), 5.92 (s, 1H), 3.78 (dt,  $J = 14.0, 5.7$  Hz, 1H), 3.49–3.61 (m, 2H), 3.40–3.49 (m, 23H), 3.26 (s, 3H);  $^{13}\text{C}$  NMR (125 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ )  $\delta$  (ppm) 165.2, 149.0, 132.1, 124.1, 81.1, 69.5, 57.9, 38.2.

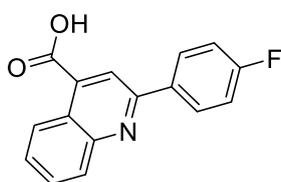
### *trans*-(4-*N*-(1-Hydroxy-2-(2-methoxyethyl)-3-oxoisindolin-5-amid)methyl)cyclohexyl-guanidin (CA1-Amid)



1-Hydroxy-2-(2-methoxyethyl)-3-oxoisindolin-5-carbonsäure **CA1** (47 mg, 0.187 mmol) wurde in MeCN gelöst (10 ml). Anschließend wurden HATU (78 mg, 0.21 mmol), DIPEA (72  $\mu\text{l}$ , 0.187 mmol) und Amin **19** (35 mg, 0.21 mmol) zugegeben. Nachdem die Reaktion über Nacht gerührt wurde, konnte die Vollständigkeit der Reaktion mittels LC/MS-Analytik nachgewiesen werden. Es wurde nachfolgend zwei mal mit 2-molarer Natronlauge extrahiert. Die organische Phase wurde

anschließend mit Natrumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Nachfolgend wurde der resultierende Rückstand mittels präparativer HPLC aufgereinigt. Aufgrund der unzureichenden Lagerstabilität und dem nicht abtrennbaren Regioisomer-Kupplungsprodukt wurde bei der Untersuchung des Produkts mittels NMR-Spektroskopie lediglich ein unsauberes Spektrum erhalten (nicht in A.4. enthalten). ESI-MS:  $m/z$  berechnet für  $C_{20}H_{29}N_5O_4$ : 404.2292  $[M-H]^+$ ; gefunden: 404.2298.

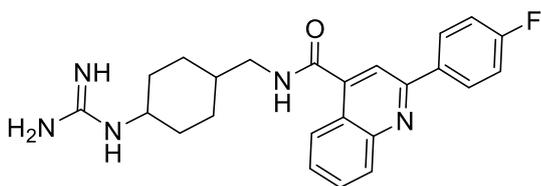
### 2-(4-Fluorophenyl)quinolin-4-carbonsäure (CA2)



2-(4-Fluorophenyl)quinolin-4-methylester (0.5 g, 1.78 mmol) wurde in einem MeOH/H<sub>2</sub>O-Gemisch (3:1, 20 ml) gelöst. Anschließend wurde Lithiumhydroxid (213 mg, 8.9 mmol) zugegeben. Die Vollständigkeit der Reaktion konnte nach 3 h mittels

LC/MS-Analytik nachgewiesen werden. Der Methanol-Anteil des Lösungsmittels wurde nachfolgend am Rotationsverdampfer entfernt. Die wässrige Lösung wurde mit 1-molarer Salzsäure auf pH 5 gebracht und nachfolgend drei mal mit DCM extrahiert. Die vereinten organischen Phasen wurden mit Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel anschließend am Rotationsverdampfer entfernt. Produkt **CA2** wurde als weiß-gelblicher Feststoff erhalten (414 mg, 1.55 mmol).

### *trans*-(4-*N*-(2-(4-Fluorophenyl)quinolin-4-amid)methyl)cyclohexylguanidin (CA2-Amid)

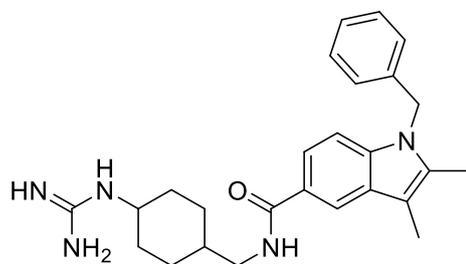


2-(4-Fluorophenyl)quinoline-4-carbonsäure **CA2** (73 mg, 0.27 mmol) wurde in trockenem Dioxan gelöst. Anschließend wurden DCC (62 mg, 0.3 mmol), DIPEA (52  $\mu$ l,

0.3 mmol), DMAP (0.027 mmol, 3.3 mg) und Amin **19** (46 mg, 0.27 mmol) zugegeben. Nachdem der Reaktionsansatz über Nacht gerührt wurde, konnte die vollständige Umsetzung mittels LC/MS-Analytik nachgewiesen werden. Der Reaktionsansatz wurde nachfolgend filtiert und das Lösungsmittel wurde am Rotationsverdampfer entfernt. Durch Aufreinigung des resultierenden Rückstands mittels präparativer HPLC konnte das Produkt **CA2-Amid** erhalten werden (95 mg, 0.23 mmol). ESI-MS:  $m/z$  berechnet für

$C_{24}H_{26}FN_5O$ : 420.2194  $[M-H]^+$ ; gefunden: 420.2208.  $^1H$  NMR (700 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  (ppm) 8.81 (t,  $J = 5.8$  Hz, 1H), 8.31–8.35 (m, 2H), 8.11 (d,  $J = 8.4$  Hz, 1H) 8.07 (d,  $J = 5.8$  Hz, 2H), 7.78 (t,  $J = 7.6$  Hz), 7.56–7.62 (m, 2H), 7.36 (t,  $J = 8.5$  Hz, 2H), 3.31 (m, 1H), 3.2 (t,  $J = 6.3$  Hz, 2H), 1.87 (d,  $J = 13$  Hz, 2h), 1.82 (d,  $J = 13$  Hz, 2h), 1.54 (s, 1H), 1.37–1.22 (m, 2H), 1.01–1.09 (m, 1H);  $^{13}C$  NMR (125 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  (ppm) 166.6, 164.1, 162.7, 155.9, 147.8, 143.4, 134.7, 130.2, 129.6, 129.5, 127.1, 123.3, 116.4, 115.9, 115.8, 64.9, 49.8, 44.9, 36.4, 31.8, 28.9, 15.2.

***trans*-(4-*N*-(1-Benzyl-2,3-dimethyl-1*H*-indol-5-amid)methyl)cyclohexyl-guanidin (CA3-Amid)**



1-Benzyl-2,3-dimethyl-1*H*-indol-5-carbonsäure **CA3** (100 mg, 0.36 mmol) wurde in trockenem Dioxan gelöst. Anschließend wurden DCC (81 mg, 0.396 mmol), DIPEA (62  $\mu$ l, 0.3 mmol), DMAP (4.4 mg, 0.036 mmol) und Amin **19**

(61 mg, 0,36 mmol) zugegeben. Nachdem der Reaktionsansatz über Nacht gerührt wurde, konnte die vollständige Umsetzung mittels LC/MS-Analytik nachgewiesen werden. Der Reaktionsansatz wurde nachfolgend filtriert und das Lösungsmittel wurde am Rotationsverdampfer entfernt. Durch Aufreinigung des resultierenden Rückstands mittels präparativer HPLC konnte das Produkt **CA3-Amid** erhalten werden (126 mg, 0.29 mmol). ESI-MS:  $m/z$  berechnet für  $C_{26}H_{33}N_5O$ : 432.2866  $[M-H]^+$ ; gefunden: 432.2873.  $^1H$  NMR (700 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  (ppm) 8.26 (t,  $J = 5.9$  Hz, 1H), 7.99 (s, 1H), 7.62 (d,  $J = 8.3$  Hz, 1H), 7.54 (d,  $J = 8.5$  Hz, 1H), 7.33 (d,  $J = 8.6$  Hz, 1H), 7.22 (t,  $J = 7.4$  Hz, 2H), 7.16 (t,  $J = 7.5$  Hz, 1H), 6.9 (d,  $J = 7.6$  Hz, 2H), 5.36 (s, 2H), 3.26 (s, 1H), 3.09 (t,  $J = 6.3$  Hz, 2H), 2.21 (d,  $J = 15.8$  Hz, 6H), 1.83 (d,  $J = 12.2$  Hz, 2H), 1.73 (d,  $J = 13.1$  Hz, 2H), 1.49 (s, 1H), 1.13 (q,  $J = 12.5$  Hz, 2H), 0.99 (q, 13.8, 13.2 Hz, 2H);  $^{13}C$  NMR (125 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  (ppm) 167.3, 155.9, 138.4, 137.5, 134.0, 128.6, 127.6, 127.1, 126.1, 125.3, 120.1, 117.4, 108.6, 107.1, 49.9, 45.9, 44.9, 36.7, 31.8, 28.9, 10.0, 8.7.



# Literaturverzeichnis

- [1] D. A. Erlanson, S. W. Fesik, R. E. Hubbard, W. Jahnke, H. Jhoti, Twenty years on: the impact of fragments on drug discovery *Nat. Rev. Drug Discovery* **2016**, *15*, 605–619.
- [2] B. Lamoree, R. E. Hubbard, Current perspectives in fragment-based lead discovery (FBLD) *Essays Biochem.* **2017**, *61*, 453–464.
- [3] M. Jaegle, E. Nawrotzky, E.-L. Wong, C. Arkona, J. Rademann in *Fragment-based Drug Discovery Lessons and Outlook* (Hrsg.: D. A. Erlanson, W. Jahnke), Wiley-VCH, Weinheim, **2016**, 293–326.
- [4] C. N. Johnson, D. A. Erlanson, C. W. Murray, D. C. Rees, Fragment-to-Lead Medicinal Chemistry Publications in 2015 *J. Med. Chem.* **2017**, *60*, 89–99.
- [5] C. N. Johnson, D. A. Erlanson, W. Jahnke, P. N. Mortenson, D. C. Rees, Fragment-to-Lead Medicinal Chemistry Publications in 2016 *J. Med. Chem.* **2017**, *61*, 1774–1784.
- [6] L. Shelledy, D. Roman, Vemurafenib: First-in-Class BRAF-Mutated Inhibitor for the Treatment of Unresectable or Metastatic Melanoma *J. Adv. Pract. Oncol.* **2015**, *6*, 361–365.
- [7] M. Gentile, A. Petrunaro, G. Uccello, E. Vigna, A. G. Recchia, N. Caruso, S. Bossio, L. De Stefano, A. Palumbo, F. Storino, M. Martino, F. Morabito, Venetoclax for the treatment of chronic lymphocytic leukemia *Expert Opin. Invest. Drugs* **2017**, *26*, 1307–1316.
- [8] M. M. Hann, A. R. Leach, G. Harper, Molecular Complexity and Its Impact on the Probability of Finding Leads for Drug Discovery *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* **2001**, *41*, 856–864.
- [9] W. P. Jencks, On the attribution and additivity of binding energies *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1981**, *78*, 4046–4050.
- [10] M. N. Schulz, R. E. Hubbard, Recent progress in fragment-based lead discovery *Curr. Opin. Pharm.* **2009**, *9*, 615–621.
- [11] S. B. Shuker, P. J. Hajduk, R. P. Meadows, S. W. Fesik, Discovering High-Affinity Ligands for Proteins: SAR by NMR *Science* **1996**, *274*, 1531–1534.
- [12] Y. Li, C. Kang, Solution NMR Spectroscopy in Target-Based Drug Discovery *Molecules* **2017**, *22*, 1399.

- [13] Z. Chilingaryan, Z. Yin, A. J. Oakley, Fragment-based screening by protein crystallography: successes and pitfalls *Int. J. Mol. Sci.* **2012**, *13*, 12857–12879.
- [14] I. Navratilova, A. L. Hopkins, Fragment screening by surface plasmon resonance *ACS Med. Chem. Lett.* **2010**, *1*, 44–48.
- [15] M. K. Grøftehaug, N. R. Hajizadeh, M. J. Swann, E. Pohl, Protein–ligand interactions investigated by thermal shift assays (TSA) and dual polarization interferometry (DPI) *Acta Crystallogr. Sect. D. Biol. Crystallogr.* **2015**, *71*, 36–44.
- [16] N. C. Garbett, J. B. Chaires, Thermodynamic studies for drug design and screening *Expert Opin. Drug Discovery* **2012**, *7*, 299–314.
- [17] M. F. Schmidt, A. Isidro-Llobet, M. Lisurek, A. El-Dahshan, J. Tan, R. Hilgenfeld, J. Rademann, Sensitized Detection of Inhibitory Fragments and Iterative Development of Non-Peptidic Protease Inhibitors by Dynamic Ligation Screening *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 3275–3278.
- [18] M. I. Fernández-Bachiller, A. Horatscheck, M. Lisurek, J. Rademann, Alzheimer’s Disease: Identification and Development of  $\beta$ -Secretase (BACE-1) Binding Fragments and Inhibitors by Dynamic Ligation Screening (DLS) *ChemMedChem* **2013**, *8*, 1041–1056.
- [19] E. Burda, J. Rademann, Catalytic activation of pre-substrates via dynamic fragment assembly on protein templates *Nat. Commun.* **2014**, *5*:5170, 1–9.
- [20] M. F. Schmidt, M. R. Groves, J. Rademann, Dynamic Substrate Enhancement for the Identification of Specific, Second-Site-Binding Fragments Targeting a Set of Protein Tyrosine Phosphatases *ChemBioChem* **2011**, *12*, 2640–2646.
- [21] S. Gul, P. Gribbon, Exemplification of the challenges associated with utilising fluorescence intensity based assays in discovery *Expert Opin. Drug Discovery* **2010**, *5*, 681–690.
- [22] P. J. Hajduk, Fragment-Based Drug Design: How Big Is Too Big? *J. Med. Chem.* **2006**, *49*, 6972–6976.
- [23] P. J. Hajduk, D. R. Sauer, Statistical Analysis of the Effects of Common Chemical Substituents on Ligand Potency *J. Med. Chem.* **2008**, *51*, 553–564.
- [24] S. Chung, J. B. Parker, M. Bianchet, L. M. Amzel, J. T. Stivers, Impact of linker strain and flexibility in the design of a fragment-based inhibitor *Nat. Chem. Biol.* **2009**, *5*, 407–413.
- [25] D. A. Erlanson, Fragment-based lead discovery: a chemical update *Curr. Opin. Biotechnol.* **2006**, *17*, 643–652.

- [26] D. Kozakov, D. R. Hall, S. Jehle, L. Luo, S. O. Ochiana, E. V. Jones, M. Pollastri, K. N. Allen, A. Whitty, S. Vajda, Ligand deconstruction: Why some fragment binding positions are conserved and others are not *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2015**, *112*, E2585–E2594.
- [27] I. Huc, J.-M. Lehn, Virtual combinatorial libraries: Dynamic generation of molecular and supramolecular diversity by self-assembly *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1997**, *94*, 2106–2110.
- [28] R. Huang, I. Leung, Protein-Directed Dynamic Combinatorial Chemistry: A Guide to Protein Ligand and Inhibitor Discovery *Molecules* **2016**, *21*, 910.
- [29] M. Jaegle, E.-L. Wong, C. Tauber, E. Nawrotsky, C. Arkona, J. Rademann, Protein-Templated Fragment Ligations – From Molecular Recognition to Drug Discovery *Angew. Chem. Int. Ed.* **2017**, *56*, 7358–7378.
- [31] L. You, J. S. Berman, E. V. Anslyn, Dynamic multi-component covalent assembly for the reversible binding of secondary alcohols and chirality sensing *Nat. Chem.* **2011**, *3*, 943–948.
- [32] R. Caraballo, M. Sakulsombat, O. Ramström, Towards Dynamic Drug Design: Identification and Optimization of  $\beta$ -Galactosidase Inhibitors from a Dynamic Hemithioacetal System *ChemBioChem* **2010**, *11*, 1600–1606.
- [33] D. Becker, Z. Kaczmarek, C. Arkona, R. Schulz, C. Tauber, G. Wolber, R. Hilgenfeld, M. Coll, J. Rademann, Irreversible inhibitors of the 3C protease of Coxsackie virus through templated assembly of protein-binding fragments *Nat. Commun.* **2016**, *7*:12761, 1-9.
- [34] M. Mondal, N. Radeva, H. Fanlo-Virgós, S. Otto, G. Klebe, A. K. H. Hirsch, Fragment Linking and Optimization of Inhibitors of the Aspartic Protease Endothiapepsin: Fragment-Based Drug Design Facilitated by Dynamic Combinatorial Chemistry *Angew. Chem. Int. Ed.* **2016**, *55*, 9422–9426.
- [35] P. Frei, L. Pang, M. Silbermann, D. Eriş, T. Mühlethaler, O. Schwardt, B. Ernst, Target-directed Dynamic Combinatorial Chemistry: A Study on Potentials and Pitfalls as Exemplified on a Bacterial Target *Chem. - Eur. J.* **2017**, *23*, 11570–11577.
- [36] J. Soubhye, M. Gelbcke, P. Van Antwerpen, F. Dufrasne, M. Y. Boufadi, J. Nève, P. G. Furtmüller, C. Obinger, K. Zouaoui Boudjeltia, F. Meyer, From Dynamic Combinatorial Chemistry to in Vivo Evaluation of Reversible and Irreversible Myeloperoxidase Inhibitors *ACS Med. Chem. Lett.* **2017**, *8*, 206–210.
- [37] I. K. H. Leung, T. Brown Jr, C. J. Schofield, T. D. W. Claridge, An approach to enzyme inhibition employing reversible boronate ester formation *MedChemComm* **2011**, *2*, 390–395.

- [38] S. P. Black, J. K. M. Sanders, A. R. Stefankiewicz, Disulfide exchange: exposing supramolecular reactivity through dynamic covalent chemistry *Chem. Soc. Rev.* **2014**, *43*, 1861–1872.
- [39] B. Rasmussen, A. Sorensen, H. Gotfredsen, M. Pittelkow, Dynamic combinatorial chemistry with diselenides and disulfides in water *Chem. Commun.* **2014**, *50*, 3716–3718.
- [40] R. Larsson, O. Ramström, Dynamic Combinatorial Thiolester Libraries for Efficient Catalytic Self-Screening of Hydrolase Substrates *Eur. J. Org. Chem.* **2006**, *2006*, 285–291.
- [41] R. L. Marcus Angelin, Pornrapee Vongvilai, Olof Ramström, Introducing Dynamic Combinatorial Chemistry: Probing the Substrate Selectivity of Acetylcholinesterase *Am. Chem. Soc. and Div. of Chem. Edu, Inc.* **2010**, *87*, 1248–1251.
- [42] E. Oueis, F. Nachon, C. Sabot, P.-Y. Renard, First enzymatic hydrolysis/thio-Michael addition cascade route to synthesis of AChE inhibitors *Chem. Commun.* **2014**, *50*, 2043–2045.
- [43] S. G. Kathman, A. V. Statsyuk, Covalent tethering of fragments for covalent probe discovery *MedChemComm* **2016**, *7*, 576–585.
- [44] R. Nguyen, I. Huc, Using an Enzyme's Active Site To Template Inhibitors *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 1774–1776.
- [45] D. T. Rijkers, R. Merckx, C. B. Yim, A. J. Brouwer, R. M. Liskamp, 'Sulfo-click' for ligation as well as for site-specific conjugation with peptides, fluorophores, and metal chelators *J. Pept. Sci.* **2010**, *16*, 1–5.
- [46] S. S. Kulkarni, X. Hu, K. Doi, H. G. Wang, R. Manetsch, Screening of protein-protein interaction modulators via sulfo-click kinetic target-guided synthesis *ACS Chem. Biol.* **2011**, *6*, 724–732.
- [47] K. Tanaka, S. Shiotsuki, T. Iwata, C. Kageyama, T. Tahara, S. Nozaki, E. R. Siwu, S. Tamura, S. Douke, N. Murakami, H. Onoe, Y. Watanabe, K. Fukase, Template-assisted and self-activating clicked peptide as a synthetic mimic of the SH2 domain *ACS Chem. Biol.* **2012**, *7*, 637–645.
- [48] C. Peruzzotti, S. Borrelli, M. Ventura, R. Pantano, G. Fumagalli, M. S. Christodoulou, D. Monticelli, M. Luzzani, A. L. Fallacara, C. Tintori, M. Botta, D. Passarella, Probing the binding site of abl tyrosine kinase using in situ click chemistry *ACS Med. Chem. Lett.* **2013**, *4*, 274–277.
- [49] Y. Bourne, K. B. Sharpless, P. Taylor, P. Marchot, Steric and Dynamic Parameters Influencing In Situ Cycloadditions to Form Triazole Inhibitors with Crystalline Acetylcholinesterase *J. Am. Chem. Soc.* **2016**, *138*, 1611–1621.

- [50] T. Maki, A. Kawamura, N. Kato, J. Ohkanda, Chemical ligation of epoxide-containing fusicoccins and peptide fragments guided by 14-3-3 protein *Mol. BioSyst.* **2013**, *9*, 940–943.
- [51] M. Jaegle, T. Steinmetzer, J. Rademann, Protein-Templated Formation of an Inhibitor of the Blood Coagulation Factor Xa through a Background-Free Amidation Reaction *Angew. Chem. Int. Ed.* **2017**, *56*, 3718–3722.
- [52] M. F. Schmidt, A. El-Dahshan, S. Keller, J. Rademann, Selective Identification of Cooperatively Binding Fragments in a High-Throughput Ligation Assay Enables Development of a Picomolar Caspase-3 Inhibitor *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 6346–6349.
- [53] C. Bissantz, B. Kuhn, M. Stahl, A Medicinal Chemist's Guide to Molecular Interactions *J. Med. Chem.* **2010**, *53*, 5061–5084.
- [54] G. A. Holdgate, T. D. Meek, R. L. Grimley, Mechanistic enzymology in drug discovery: a fresh perspective *Nat. Rev. Drug Discovery* **2017**, *17*, 115–132.
- [55] N. M. Hooper, Proteases: a primer *Essays Biochem.* **2002**, *38*, 1–8.
- [56] P. Imming, C. Sinning, A. Meyer, Drugs, their targets and the nature and number of drug targets *Nat. Rev. Drug Discovery* **2006**, *5*, 821–834.
- [57] R. M. J. Liskamp, D. T. S. Rijkers, J. A. W. Kruijtzter, J. Kemmink, Peptides and Proteins as a Continuing Exciting Source of Inspiration for Peptidomimetics *ChemBioChem* **2011**, *12*, 1626–1653.
- [58] S. De Cesco, J. Kurian, C. Dufresne, A. K. Mittermaier, N. Moitessier, Covalent inhibitors design and discovery *Eur. J. Med. Chem.* **2017**, *138*, 96–114.
- [59] R. A. Bauer, Covalent inhibitors in drug discovery: from accidental discoveries to avoided liabilities and designed therapies *Drug Discov. Today* **2015**, *20*, 1061–1073.
- [60] E. Perzborn, S. Roehrig, A. Straub, D. Kubitzka, F. Misselwitz, The discovery and development of rivaroxaban, an oral, direct factor Xa inhibitor *Nat. Rev. Drug Discovery* **2010**, *10*, 61–75.
- [61] J. van Ryn, J. Stangier, S. Haertter, K. H. Liesenfeld, W. Wienen, M. Feuring, A. Clemens, Dabigatran etexilate – a novel, reversible, oral direct thrombin inhibitor: Interpretation of coagulation assays and reversal of anticoagulant activity *Thromb. Haemost.* **2010**, *103*, 1116–1127.
- [62] A. Hsu, G. R. Granneman, R. J. Bertz, Ritonavir *Clin. Pharmacokinet.* **1998**, *35*, 275–291.

- [63] A. H. Gradman, R. E. Schmieder, R. L. Lins, J. Nussberger, Y. Chiang, M. P. Bedigian, Aliskiren, a Novel Orally Effective Renin Inhibitor, Provides Dose-Dependent Antihypertensive Efficacy and Placebo-Like Tolerability in Hypertensive Patients *Circulation* **2005**, *111*, 1012–1018.
- [64] P. A. Todd, P. Benfield, Ramipril *Drugs* **1990**, *39*, 110–135.
- [65] T. J. Stout, C. R. Sage, R. M. Stroud, The additivity of substrate fragments in enzyme–ligand binding *Structure* **1998**, *6*, 839–848.
- [66] I. Schechter, A. Berger, On the size of the active site in proteases. I. Papain *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1967**, *27*, 157–162.
- [67] B. Walker, J. F. Lynas, Strategies for the inhibition of serine proteases *Cell. Mol. Life Sci.* **2001**, *58*, 596–624.
- [68] J. C. Powers, J. L. Asgian, Ö. D. Ekici, K. E. James, Irreversible Inhibitors of Serine, Cysteine, and Threonine Proteases *Chem. Rev.* **2002**, *102*, 4639–4750.
- [69] A. Straub, S. Roehrig, A. Hillisch, Oral, Direct Thrombin and Factor Xa Inhibitors: The Replacement for Warfarin, Leeches, and Pig Intestines? *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 4574–4590.
- [70] N. D. Rawlings, A. J. Barrett, R. Finn, Twenty years of the MEROPS database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors *Nucleic Acids Res.* **2016**, *44*, D343–D350.
- [71] MEROPS the Peptidase Database: Summary for peptidase S01.216: coagulation factor Xa, <https://www.ebi.ac.uk/merops/cgi-bin/pepsum?mid=S01.216> ,zuletzt abgerufen am: 25.01.2018.
- [72] S. Krishnaswamy, W. R. Church, M. E. Nesheim, K. G. Mann, Activation of human prothrombin by human prothrombinase. Influence of factor Va on the reaction mechanism *J. Biol. Chem.* **1987**, *262*, 3291–3299.
- [73] J. Hirsh, S. S. Anand, J. L. Halperin, V. Fuster, Guide to Anticoagulant Therapy: Heparin A Statement for Healthcare Professionals From the American Heart Association **2001**, *103*, 2994–3018.
- [74] T. van der Hulle, J. Kooiman, P. L. den Exter, O. M. Dekkers, F. A. Klok, M. V. Huisman, Effectiveness and safety of novel oral anticoagulants as compared with vitamin K antagonists in the treatment of acute symptomatic venous thromboembolism: a systematic review and meta-analysis *J. Thromb. Haemost.* **2014**, *12*, 320–328.
- [75] J. Hirsh, V. Fuster, Guide to anticoagulant therapy. Part 2: Oral anticoagulants. American Heart Association *Circulation* **1994**, *89*, 1469–1480.

- [76] M. de Candia, G. Lopopolo, C. Altomare, Novel factor Xa inhibitors: a patent review *Expert Opin. Ther. Pat.* **2009**, *19*, 1535–1580.
- [77] F. Al-Obeidi, J. A. Ostrem, Factor Xa inhibitors *Expert Opin. Ther. Pat.* **1999**, *9*, 931–953.
- [78] T. Nagahara, Y. Yokoyama, K. Inamura, S.-i. Katakura, S. Komoriya, H. Yamaguchi, T. Hara, M. Iwamoto, Dibasic (Amidinoaryl)propanoic Acid Derivatives as Novel Blood Coagulation Factor Xa Inhibitors *J. Med. Chem.* **1994**, *37*, 1200–1207.
- [79] Y.-K. Lee, M. R. Player, Developments in factor Xa inhibitors for the treatment of thromboembolic disorders *Med. Res. Rev.* **2011**, *31*, 202–283.
- [80] J. M. Fevig, J. Buriak, P. F. W. Stouten, R. M. Knabb, G. N. Lam, P. C. Wong, R. R. Wexler, Preparation of pyrrolidine and isoxazolidine benzamidines as potent inhibitors of coagulation factor Xa *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1999**, *9*, 1195–1200.
- [81] P. C. Wong, M. L. Quan, E. J. Crain, C. A. Watson, R. R. Wexler, R. M. Knabb, Nonpeptide Factor Xa Inhibitors: I. Studies with SF303 and SK549, a New Class of Potent Antithrombotics *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2000**, *292*, 351–357.
- [82] P. Y. S. Lam, C. G. Clark, R. Li, D. J. P. Pinto, M. J. Orwat, R. A. Galemno, J. M. Fevig, C. A. Teleha, R. S. Alexander, A. M. Smallwood, K. A. Rossi, M. R. Wright, S. A. Bai, K. He, J. M. Luetzgen, P. C. Wong, R. M. Knabb, R. R. Wexler, Structure-Based Design of Novel Guanidine/Benzamidine Mimics: Potent and Orally Bioavailable Factor Xa Inhibitors as Novel Anticoagulants *J. Med. Chem.* **2003**, *46*, 4405–4418.
- [83] M. Lucija Peterlin, Arginine Mimetic Structures in Biologically Active Antagonists and Inhibitors *Curr. Med. Chem.* **2006**, *13*, 3627–3648.
- [84] H. Nar, The role of structural information in the discovery of direct thrombin and factor Xa inhibitors *Trends Pharmacol. Sci.*, *33*, 279–288.
- [85] M. Nazaré, D. W. Will, H. Matter, H. Schreuder, K. Ritter, M. Urmann, M. Essrich, A. Bauer, M. Wagner, J. Czech, M. Lorenz, V. Laux, V. Wehner, Probing the Subpockets of Factor Xa Reveals Two Binding Modes for Inhibitors Based on a 2-Carboxyindole Scaffold: A Study Combining Structure-Activity Relationship and X-ray Crystallography *J. Med. Chem.* **2005**, *48*, 4511–4525.
- [86] J. Carreiro, J. Ansell, Apixaban, an oral direct Factor Xa inhibitor: awaiting the verdict *Expert Opin. Invest. Drugs* **2008**, *17*, 1937–1945.
- [87] A. J. Camm, H. Bounameaux, Edoxaban *Drugs* **2011**, *71*, 1503–1526.

- [88] J. S. Mackenzie, D. J. Gubler, L. R. Petersen, Emerging flaviviruses: the spread and resurgence of Japanese encephalitis, West Nile and dengue viruses *Nat. Med.* **2004**, *10*, 98–109.
- [89] E. A. Gould, T. Solomon, Pathogenic flaviviruses *The Lancet*, *371*, 500–509.
- [90] W. L. Olivia, G. Mosomtai, S. Symekher, West Nile Virus, a Reemerging Virus. *Prec. Medicine* **2015**, *2*, 1–7.
- [91] D. J. Gubler, The Continuing Spread of West Nile Virus in the Western Hemisphere *Clin. Infect. Dis.* **2007**, *45*, 1039–1046.
- [92] C. Chancey, A. Grinev, E. Volkova, M. Rios, The Global Ecology and Epidemiology of West Nile Virus *BioMed Res. Int.* **2015**, *2015*, 1–20.
- [93] S. J. Thomas, A. L. Rothman, Trials and tribulations on the path to developing a dengue vaccine *Vaccine* **2015**, *33*, D24–D31.
- [94] S. P. Lim, P.-Y. Shi, West Nile Virus Drug Discovery *Viruses* **2013**, *5*, 2977–3006.
- [95] M. S. Suthar, M. S. Diamond, M. Gale Jr, West Nile virus infection and immunity *Nat. Rev. Microbiol.* **2013**, *11*, 115–128.
- [96] J. J. Sejvar, M. B. Haddad, B. C. Tierney, et al., Neurologic manifestations and outcome of west nile virus infection *JAMA* **2003**, *290*, 511–515.
- [97] S. A. Fischer, Emerging viruses in transplantation: there is more to infection after transplant than CMV and EBV *Transplantation* **2008**, *86*, 1327–1339.
- [98] T. A. Nall, K. J. Chappell, M. J. Stoermer, N.-X. Fang, J. D. A. Tyndall, P. R. Young, D. P. Fairlie, Enzymatic Characterization and Homology Model of a Catalytically Active Recombinant West Nile Virus NS3 Protease *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 48535–48542.
- [99] K. J. Chappell, M. J. Stoermer, D. P. Fairlie, P. R. Young, Insights to Substrate Binding and Processing by West Nile Virus NS3 Protease through Combined Modeling, Protease Mutagenesis, and Kinetic Studies *J. Biol. Chem.* **2006**, *281*, 38448–38458.
- [100] M. Brecher, J. Zhang, H. Li, The Flavivirus Protease As a Target for Drug Discovery *Virol. Sin.* **2013**, *28*, 326–336.
- [101] K. J. Chappell, M. J. Stoermer, D. P. Fairlie, P. R. Young, West Nile Virus NS2B/NS3 Protease As An Antiviral Target *Curr. Med. Chem.* **2008**, *15*, 2771–2784.

- [102] A. E. Aleshin, S. A. Shiryaev, A. Y. Strongin, R. C. Liddington, Structural evidence for regulation and specificity of flaviviral proteases and evolution of the Flaviviridae fold *Protein Sci.* **2007**, *16*, 795–806.
- [103] Sergey A. Shiryaev, Igor A. Kozlov, Boris I. Ratnikov, Jeffrey W. Smith, M. Lebl, Alex Y. Strongin, Cleavage preference distinguishes the two-component NS2B–NS3 serine proteinases of Dengue and West Nile viruses *Biochem. J.* **2007**, *401*, 743–752.
- [104] J. Kouretova, M. Z. Hammamy, A. Epp, K. Hardes, S. Kallis, L. Zhang, R. Hilgenfeld, R. Bartenschlager, T. Steinmetzer, Effects of NS2B–NS3 protease and furin inhibition on West Nile and Dengue virus replication *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* **2017**, *32*, 712–721.
- [105] H. Steuber, M. Kanitz, F. G. R. Ehlert, W. E. Diederich in *Therapy of Viral Infections* (Hrsg.: W. E. Diederich, H. Steuber), Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, **2015**, 93–141.
- [106] P. Anders, K. Congbao, H. K. Thomas, Drug Design For Flavivirus Proteases: What Are We Missing? *Curr. Pharm. Des.* **2014**, *20*, 3422–3427.
- [108] M. Z. Hammamy, C. Haase, M. Hammami, R. Hilgenfeld, T. Steinmetzer, Development and Characterization of New Peptidomimetic Inhibitors of the West Nile Virus NS2B–NS3 Protease *ChemMedChem* **2013**, *8*, 231–241.
- [109] O. Ramström, J.-M. Lehn, Drug discovery by dynamic combinatorial libraries *Nat. Rev. Drug Discovery* **2002**, *1*, 26–36.
- [110] J. Xing, L. Yang, Y. Yang, L. Zhao, Q. Wei, J. Zhang, J. Zhou, H. Zhang, Design, synthesis and biological evaluation of novel 2,3-dihydroquinazolin- 4(1H)-one derivatives as potential FXa inhibitors *Eur. J. Med. Chem.* **2017**, *125*, 411–422.
- [111] X. Sun, Z. Hong, M. Liu, S. Guo, D. Yang, Y. Wang, T. Lan, L. Gao, H. Qi, P. Gong, Y. Liu, Design, synthesis, and biological activity of novel tetrahydropyrazolopyridone derivatives as FXa inhibitors with potent anticoagulant activity *Bioorg. Med. Chem.* **2017**, *25*, 2800–2810.
- [112] Y. Pu, H. Liu, Y. Zhou, J. Peng, Y. Li, P. Li, Y. Li, X. Liu, L. Zhang, In silico Discovery of Novel FXa Inhibitors by Pharmacophore Modeling and Molecular Docking *Nat. Prod. Bioprospect.* **2017**, *7*, 249–256.
- [113] C. Lagos, G. Segovia, N. Nuñez-Navarro, M. Faúndez, F. Zacconi, Novel FXa Inhibitor Identification through Integration of Ligand- and Structure-Based Approaches *Molecules* **2017**, *22*, 1588.
- [114] M. Lisurek, B. Rupp, J. Wichard, M. Neuenschwander, J. P. von Kries, R. Frank, J. Rademann, R. Kühne, Design of chemical libraries with potentially bioactive

- molecules applying a maximum common substructure concept *Mol. Divers.* **2010**, *14*, 401–408.
- [114] C. A. G. N. Montalbetti, V. Falque, Amide bond formation and peptide coupling *Tetrahedron* **2005**, *61*, 10827–10852.
- [115] S. Torsten, S. Jorg, S. Oliver, S. Uta, S. Andrea, S. Anne, New Substrate Analogue Inhibitors of Factor Xa Containing 4-Amidinobenzylamide as P1 Residue: Part 1 *Med. Chem.* **2006**, *2*, 349–361.
- [116] D. Gustafsson, T. Antonsson, R. Bylund, U. Eriksson, E. Gyzander, I. Nilsson, M. Elg, C. Mattsson, J. Deinum, S. Pehrsson, O. Karlsson, A. Nilsson, H. Sörensen, Effects of Melagatran, a New Low-molecular-weight Thrombin Inhibitor, on Thrombin and Fibrinolytic Enzymes *Thromb. Haemost.* **1998**, *80*, 110–118.
- [117] M. R. Wiley, N. Y. Chirgadze, D. K. Clawson, T. J. Craft, D. S. Gifford-Moore, N. D. Jones, J. L. Olkowski, L. C. Weir, G. F. Smith, D-Phe-Pro-p-Amidinobenzylamine: A potent and highly selective thrombin inhibitor *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1996**, *6*, 2387–2392.
- [118] M. Gelin, G. Poncet-Montange, L. Assairi, L. Morellato, V. Huteau, L. Dugué, O. Dussurget, S. Pochet, G. Labesse, Screening and In Situ Synthesis Using Crystals of a NAD Kinase Lead to a Potent Antistaphylococcal Compound *Structure* **2012**, *20*, 1107–1117.
- [119] C. F. Barbas, J. R. Matos, J. B. West, C. H. Wong, A search for peptide ligase: cosolvent-mediated conversion of proteases to esterases for irreversible synthesis of peptides *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, *110*, 5162–5166.
- [120] V. Čeřovský, F. Bordusa, Protease-catalyzed fragment condensation via substrate mimetic strategy: a useful combination of solid-phase peptide synthesis with enzymatic methods *J. Peptide Res.* **2000**, *55*, 325–329.
- [121] J. F. Krebs, G. Siuzdak, H. J. Dyson, J. D. Stewart, S. J. Benkovic, Detection of a Catalytic Antibody Species Acylated at the Active Site by Electrospray Mass Spectrometry *Biochemistry* **1995**, *34*, 720–723.
- [122] K. Morihara, Using proteases in peptide synthesis *Trends Biotechnol.* **1987**, *5*, 164–170.
- [123] G. W. Anderson, F. M. Callahan, Racemization by the dicyclohexylcarbodiimide method of peptide synthesis *J. Am. Chem. Soc.* **1958**, *80*, 2902–2903.
- [124] A. El-Faham, F. Albericio, Peptide Coupling Reagents, More than a Letter Soup *Chem. Rev.* **2011**, *111*, 6557–6602.

- [125] W. König, R. Geiger, Eine neue Methode zur Synthese von Peptiden: Aktivierung der Carboxylgruppe mit Dicyclohexylcarbodiimid unter Zusatz von 1-Hydroxybenzotriazolen *Chem. Ber.* **1970**, *103*, 788–798.
- [126] J. C. Sheehan, G. P. Hess, A New Method of Forming Peptide Bonds *J. Am. Chem. Soc.* **1955**, *77*, 1067–1068.
- [127] E. Valeur, M. Bradley, Amide bond formation: beyond the myth of coupling reagents *Chem. Soc. Rev.* **2009**, *38*, 606–631.
- [128] J. Sheehan, P. Cruickshank, G. Boshart, Notes- A Convenient Synthesis of Water-Soluble Carbodiimides *J. Org. Chem.* **1961**, *26*, 2525–2528.
- [129] G. Höfle, W. Steglich, H. Vorbrüggen, 4-Dialkylaminopyridines as Highly Active Acylation Catalysts. [New synthetic method (25)] *Angew. Chem. Int. Ed.* **1978**, *17*, 569–583.
- [130] A. Cornish-Bowden, One hundred years of Michaelis–Menten kinetics *Perspectives in Science* **2015**, *4*, 3–9.
- [131] L. Menten, M. Michaelis, Die kinetik der invertinwirkung *Biochem. Z.* **1913**, *49*, 333–369.
- [132] G. G. Ferenczy, G. M. Keserű, The impact of binding thermodynamics on medicinal chemistry optimizations *Future Med. Chem.* **2015**, *7*, 1285–1303.
- [134] O. Ichihara, J. Barker, R. J. Law, M. Whittaker, Compound Design by Fragment-Linking *Mol. Inf.* **2011**, *30*, 298–306.
- [135] M. Nazaré, H. Matter, D. W. Will, M. Wagner, M. Urmann, J. Czech, H. Schreuder, A. Bauer, K. Ritter, V. Wehner, Fragment Deconstruction of Small, Potent Factor Xa Inhibitors: Exploring the Superadditivity Energetics of Fragment Linking in Protein–Ligand Complexes *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 905–911.
- [136] V. Borsi, V. Calderone, M. Fragai, C. Luchinat, N. Sarti, Entropic Contribution to the Linking Coefficient in Fragment Based Drug Design: A Case Study *J. Med. Chem.* **2010**, *53*, 4285–4289.
- [137] J. N. Weiss, The Hill equation revisited: uses and misuses *The FASEB Journal* **1997**, *11*, 835–841.
- [138] A. V. Hill, The possible effects of the aggregation of the molecules of haemoglobin on its dissociation curves *J. Physiol.* **1910**, *40*, 4–7.
- [139] B. K. Shoichet, Interpreting Steep Dose-Response Curves in Early Inhibitor Discovery *J. Med. Chem.* **2006**, *49*, 7274–7277.

- [140] L. J. Haupt, F. Kazmi, B. W. Ogilvie, D. B. Buckley, B. D. Smith, S. Leatherman, B. Paris, O. Parkinson, A. Parkinson, The Reliability of Estimating Ki Values for Direct, Reversible Inhibition of Cytochrome P450 Enzymes from Corresponding IC50 Values: A Retrospective Analysis of 343 Experiments *Drug Metab. Disposition* **2015**, *43*, 1744–1750.
- [141] M. Zimmerman, E. Yurewicz, G. Patel, A new fluorogenic substrate for chymotrypsin *Anal. Biochem.* **1976**, *70*, 258–262.
- [142] G. Wang, W. Zhu, Molecular docking for drug discovery and development: a widely used approach but far from perfect *Future Med. Chem.* **2016**, *8*, 1707–1710.
- [143] P. Śledź, A. Caflisch, Protein structure-based drug design: from docking to molecular dynamics *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2018**, *48*, 93–102.
- [144] S. Grinter, X. Zou, Challenges, Applications, and Recent Advances of Protein-Ligand Docking in Structure-Based Drug Design *Molecules* **2014**, *19*, 10150.
- [145] L. Ferreira, R. dos Santos, G. Oliva, A. Andricopulo, Molecular Docking and Structure-Based Drug Design Strategies *Molecules* **2015**, *20*, 13384.
- [146] K. Chaudhary, N. Mishra, A Review on Molecular Docking: Novel Tool for Drug Discovery *JSM Chemistry* **2016**, 1029, 1–4.
- [147] R. A. Friesner, J. L. Banks, R. B. Murphy, T. A. Halgren, J. J. Klicic, D. T. Mainz, M. P. Repasky, E. H. Knoll, M. Shelley, J. K. Perry, D. E. Shaw, P. Francis, P. S. Shenkin, Glide: A New Approach for Rapid, Accurate Docking and Scoring. 1. Method and Assessment of Docking Accuracy *J. Med. Chem.* **2004**, *47*, 1739–1749.
- [148] R. A. Friesner, R. B. Murphy, M. P. Repasky, L. L. Frye, J. R. Greenwood, T. A. Halgren, P. C. Sanschagrin, D. T. Mainz, Extra Precision Glide: Docking and Scoring Incorporating a Model of Hydrophobic Enclosure for Protein–Ligand Complexes *J. Med. Chem.* **2006**, *49*, 6177–6196.
- [149] S.-Y. Huang, X. Zou, Advances and Challenges in Protein-Ligand Docking *Int. J. Mol. Sci.* **2010**, *11*, 3016–3034.
- [150] M. a. J. R. Yunta, Docking and Ligand Binding Affinity: Uses and Pitfalls *American Journal of Modeling and Optimization* **2016**, *4*, 74–114.
- [151] T. Scior, A. Bender, G. Tresadern, J. L. Medina-Franco, K. Martínez-Mayorga, T. Langer, K. Cuanalo-Contreras, D. K. Agrafiotis, Recognizing Pitfalls in Virtual Screening: A Critical Review *J. Chem. Inf. Model.* **2012**, *52*, 867–881.
- [152] S. Kuenzel, A. Schweinitz, T. Steinmetzer, J. Stuerzebecher, Dipeptide inhibitors for the blood-clotting factor xa *WO 2001096366 A3* **2002**.

- [153] S. Künzel, A. Schweinitz, S. Reißmann, J. Stürzebecher, T. Steinmetzer, 4-Amidinobenzylamine-Based inhibitors of urokinase *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2002**, *12*, 645–648.
- [154] E. Baumann, Ueber eine einfache Methode der Darstellung von Benzoësäureäthern *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1886**, *19*, 3218–3222.
- [155] C. Schotten, Ueber die Oxydation des Piperidins *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1884**, *17*, 2544–2547.
- [156] J. Coste, D. Le-Nguyen, B. Castro, PyBOP®: A new peptide coupling reagent devoid of toxic by-product *Tetrahedron Lett.* **1990**, *31*, 205–208.
- [157] W. J. Middleton, New fluorinating reagents. Dialkylaminosulfur fluorides *J. Org. Chem.* **1975**, *40*, 574–578.
- [158] C. Kaduk, H. Wenschuh, M. Beyermann, K. Forner, L. A. Carpino, M. Bienert, Synthesis of Fmoc-amino acid fluorides via DAST, an alternative fluorinating agent *Let. Pept. Sci.* **1996**, *2*, 285–288.
- [159] R. Paul, G. W. Anderson, *N,N'*-Carbonyldiimidazole, a New Peptide Forming Reagent I, *J. Am. Chem. Soc.* **1960**, *82*, 4596–4600.
- [160] G. L. Becker, F. Sielaff, M. E. Than, I. Lindberg, S. Routhier, R. Day, Y. Lu, W. Garten, T. Steinmetzer, Potent Inhibitors of Furin and Furin-like Proprotein Convertases Containing Decarboxylated P1 Arginine Mimetics *J. Med. Chem.* **2010**, *53*, 1067–1075.
- [161] B. D. Judkins, D. G. Allen, T. A. Cook, B. Evans, T. E. Sardharwala, A Versatile Synthesis of Amidines from Nitriles Via Amidoximes *Synth. Commun.* **1996**, *26*, 4351–4367.
- [162] B. Gabriel, M. T. Stubbs, A. Bergner, J. Hauptmann, W. Bode, J. Stürzebecher, L. Moroder, Design of Benzamidine-Type Inhibitors of Factor Xa *J. Med. Chem.* **1998**, *41*, 4240–4250.
- [163] T. Morita, H. Kato, S. Iwanaga, K. Takada, T. Kimura, S. Sakakibara, New Fluorogenic Substrates for  $\alpha$ -Thrombin, Factor Xa, Kallikreins, and Urokinase I *J. Biochem.* **1977**, *82*, 1495–1498.
- [164] R. A. Copeland, Mechanistic considerations in high-throughput screening *Anal. Biochem.* **2003**, *320*, 1–12.
- [166] C. A. Wartchow, F. Podlaski, S. Li, K. Rowan, X. Zhang, D. Mark, K.-S. Huang, Biosensor-based small molecule fragment screening with biolayer interferometry *J. Comput.-Aided Mol. Des.* **2011**, *25*, 669.

- [167] R. Plumb, J. Castro-Perez, J. Granger, I. Beattie, K. Joncour, A. Wright, Ultra-performance liquid chromatography coupled to quadrupole-orthogonal time-of-flight mass spectrometry *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2004**, *18*, 2331–2337.
- [168] X. Fu, C.-H. Tan, Mechanistic considerations of guanidine-catalyzed reactions *Chem. Commun.* **2011**, *47*, 8210–8222.
- [166] A. A. Aly, A. M. Nour-El-Din, Functionality of amidines and amidrazones *ARKIVOC* **2008**, *1*, 153–194.
- [170] J. E. Taylor, S. D. Bull, J. M. J. Williams, Amidines, isothioureas, and guanidines as nucleophilic catalysts *Chem. Soc. Rev.* **2012**, *41*, 2109–2121.
- [171] P. L. Barker, P. L. Gendler, H. Rapoport, Acylation of dibasic compounds containing amino amidine and aminoguanidine functions *J. Org. Chem.* **1981**, *46*, 2455–2465.
- [172] F. Markwardt, J. Drawert, P. Walsmann, Synthetic low molecular weight inhibitors of serum kallikrein *Biochem. Pharmacol.* **1974**, *23*, 2247–2256.
- [173] F. Markwardt, H. Landmann, P. Walsmann, Comparative Studies on the Inhibition of Trypsin, Plasmin, and Thrombin by Derivatives of Benzylamine and Benzamidine *Eur. J. Biochem.* **1968**, *6*, 502–506.
- [174] S. C. Nyburg, C. H. Faerman, A revision of van der Waals atomic radii for molecular crystals: N, O, F, S, Cl, Se, Br and I bonded to carbon *Acta Crystallogr., Sect. B* **1985**, *41*, 274–279.
- [175] A. Bondi, van der Waals Volumes and Radii *J. Phys. Chem.* **1964**, *68*, 441–451.
- [176] S. Alvarez, A cartography of the van der Waals territories *Dalton Trans.* **2013**, *42*, 8617–8636.
- [177] H. B. Bürgi, J. D. Dunitz, J. M. Lehn, G. Wipff, Stereochemistry of reaction paths at carbonyl centres *Tetrahedron* **1974**, *30*, 1563–1572.
- [178] A. S. Cieplak in *Structure Correlation* (Edit.: H.-B. Bürgi, J. D. Dunitz), Wiley-VCH, Weinheim, **2008**, 205–302.
- [179] A. L. Hopkins, G. M. Keserü, P. D. Leeson, D. C. Rees, C. H. Reynolds, The role of ligand efficiency metrics in drug discovery *Nat. Rev. Drug Discovery* **2014**, *13*, 105–121.
- [180] S. Schultes, C. de Graaf, E. E. J. Haaksma, I. J. P. de Esch, R. Leurs, O. Krämer, Ligand efficiency as a guide in fragment hit selection and optimization *Drug Discov. Today: Technol.* **2010**, *7*, e157–e162.

- [181] A. L. Hopkins, C. R. Groom, A. Alex, Ligand efficiency: a useful metric for lead selection *Drug Discov. Today* **2004**, *9*, 430–431.
- [182] C. W. Murray, M. L. Verdonk, The consequences of translational and rotational entropy lost by small molecules on binding to proteins *J. Comput.-Aided Mol. Des.* **2002**, *16*, 741–753.
- [183] A. Brik, C.-Y. Wu, C.-H. Wong, Microtiter plate based chemistry and in situ screening: a useful approach for rapid inhibitor discovery *Org. Biomol. Chem.* **2006**, *4*, 1446–1457.
- [184] V. V. Vintonyak, H. Waldmann, D. Rauh, Using small molecules to target protein phosphatases *Bioorg. Med. Chem.* **2011**, *19*, 2145–2155.
- [185] W. Zhu, M. Groh, J. Haupenthal, R. W. Hartmann, A Detective Story in Drug Discovery: Elucidation of a Screening Artifact Reveals Polymeric Carboxylic Acids as Potent Inhibitors of RNA Polymerase *Chem. - Eur. J.* **2013**, *19*, 8397–8400.
- [186] G. Madhavi Sastry, M. Adzhigirey, T. Day, R. Annabhimoju, W. Sherman, Protein and ligand preparation: parameters, protocols, and influence on virtual screening enrichments *J. Comput.-Aided Mol. Des.* **2013**, *27*, 221–234.
- [187] J. R. Greenwood, D. Calkins, A. P. Sullivan, J. C. Shelley, Towards the comprehensive, rapid, and accurate prediction of the favorable tautomeric states of drug-like molecules in aqueous solution *J. Comput.-Aided Mol. Des.* **2010**, *24*, 591–604.
- [188] S. O. Ugwu, S. P. Apte, The effect of buffers on protein conformational stability *Pharm. Technol.* **2004**, *28*, 86–109.
- [189] C. Steuer, K. H. Heinonen, L. Kattner, C. D. Klein, Optimization of Assay Conditions for Dengue Virus Protease: Effect of Various Polyols and Nonionic Detergents *J. Biomol. Screen.* **2009**, *14*, 1102–1108.
- [190] M. Brecher, Z. Li, B. Liu, J. Zhang, C. A. Koetzner, A. Alifarag, S. A. Jones, Q. Lin, L. D. Kramer, H. Li, A conformational switch high-throughput screening assay and allosteric inhibition of the flavivirus NS2B-NS3 protease *PLoS Path.* **2017**, *13*:e1006411, 1-29.
- [191] F. Spyrakis, C. N. Cavasotto, Open challenges in structure-based virtual screening: Receptor modeling, target flexibility consideration and active site water molecules description *Arch. Biochem. Biophys.* **2015**, *583*, 105–119.
- [192] C. Aldrich, C. Bertozzi, G. I. Georg, L. Kiessling, C. Lindsley, D. Liotta, K. M. Merz, A. Schepartz, S. Wang, The Ecstasy and Agony of Assay Interference Compounds *ACS Infect. Dis.* **2017**, *3*, 259–262.

- [193] J. B. Baell, J. W. M. Nissink, Seven Year Itch: Pan-Assay Interference Compounds (PAINS) in 2017—Utility and Limitations *ACS Chem. Biol.* **2018**, *13*, 36–44.
- [194] J. L. Dahlin, M. A. Walters, How to Triage PAINS-Full Research Assay *Drug Dev. Technol.* **2016**, *14*, 168–174.
- [195] A. Jadhav, R. S. Ferreira, C. Klumpp, B. T. Mott, C. P. Austin, J. Inglese, C. J. Thomas, D. J. Maloney, B. K. Shoichet, A. Simeonov, Quantitative Analyses of Aggregation, Autofluorescence, and Reactivity Artifacts in a Screen for Inhibitors of a Thiol Protease *J. Med. Chem.* **2010**, *53*, 37–51.
- [196] N. Thorne, D. S. Auld, J. Inglese, Apparent activity in high-throughput screening: origins of compound-dependent assay interference *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2010**, *14*, 315–324.
- [197] M. D. Ezgimen, N. H. Mueller, T. Teramoto, R. Padmanabhan, Effects of detergents on the West Nile virus protease activity *Bioorg. Med. Chem.* **2009**, *17*, 3278–3282.
- [198] D. Lagorce, O. Sperandio, J. B. Baell, M. A. Miteva, B. O. Villoutreix, FAF-Drugs3: a web server for compound property calculation and chemical library design *Nucleic Acids Res.* **2015**, *43*, W200–W207.
- [199] J. B. Baell, G. A. Holloway, New Substructure Filters for Removal of Pan Assay Interference Compounds (PAINS) from Screening Libraries and for Their Exclusion in Bioassays *J. Med. Chem.* **2010**, *53*, 2719–2740.
- [200] L. Wang, J. Wang, F. Yang, J. Shen, W. Wang, Copper(I) Bromide Promoted Selective Reduction of N-substituted Phthalimides with Zinc *Lett. Org. Chem.* **2008**, *5*, 26–29.
- [201] H. Brandstetter, A. Kühne, W. Bode, R. Huber, W. von der Saal, K. Wirthensohn, R. A. Engh, X-ray Structure of Active Site-inhibited Clotting Factor Xa: Implications for Drug Design and Substrate Recognition *J. Biol. Chem.* **1996**, *271*, 29988–29992.
- [202] S. Kim, P. A. Thiessen, E. E. Bolton, J. Chen, G. Fu, A. Gindulyte, L. Han, J. He, S. He, B. A. Shoemaker, J. Wang, B. Yu, J. Zhang, S. H. Bryant, PubChem Substance and Compound databases *Nucleic Acids Res.* **2016**, *44*, D1202–D1213.
- [203] Pubchem, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/> ,zuletzt abgerufen am: 30.06.2017.
- [204] RPBS Web portal, <http://mobylerpbs.univ-paris-diderot.fr/cgi-bin/portal.py?form=FAF-Drugs4#forms::Bank-Formatter> ,zuletzt abgerufen am: 30.06.2017

[205] FAF3-Drugs Web-Server, <http://fafdrugs3.mti.univ-paris-diderot.fr/>, zuletzt abgerufen am: 30.06.2018.



## **A. Tabellen und Spektren**



## A.1. *In-situ* Screening-Ergebnisse

Tabelle A.1. Ergebnisse der *in-situ* Screens

Nr.	IDNUMBER	Inhibition [%]	Inhibition [%]	Inhibition [%]	Inhibition [%]
		Screen 1-100 $\mu$ M	Screen 2-100 $\mu$ M	Screen 2-10 $\mu$ M	Screen 2-1 $\mu$ M
1	0139-0251	4.7	9.3	13.3	-6.9
2	0242-0323	9.3	-3.3	7.3	4.3
3	0272-0165	12.3	15.5	3.3	-7.8
4	0478-0678	34.5	-11.9	0.7	8.7
5	0550-0093	-3.6	26.4	6.5	10.7
6	0698-0018	61.7	28.2	8.6	-2.6
7	1030-0091	17.7	-0.2	27.1	7.3
8	1080-0453	40.4	7.2	12.6	6.8
9	1227-0087	42.6	-0.9	9.2	-10.6
10	1278-0001	40.7	1	-12.4	7.4
11	1438-0106	25.4	29.7	-10.4	55.8
12	1482-0116	45.1	-0.6	-8.5	4.9
13	1482-0119	38	5	-3.4	-18.9
14	1597-0043	45.5	9.4	9	10.4
15	1630-0523	44.2	19.2	-15.4	-5.7
16	1650-0853	-17.5	8.8	46.2	46.8
17	2114-0468	70	-1	16.2	2.4
18	2372-2268	42.5	29.4	10.6	13.1
19	3232-1768	-2.4	40.7	-6	-18.5
20	4182-0009	29.3	3.5	8	-9.1
21	4300-0953	-2.5	-20.3	21.9	8
22	4410-3724	9.6	2.5	24.1	22.3
23	4478-5369	30	-47.2	7.3	2.2
24	4483-1197	3	44.2	34.1	55.7
25	4522-0143	31.2	-39.6	-16.9	-0.6
26	4611-0280	28.1	-38.9	16.8	12.2
27	5107-0118	-0.2	9.5	15.3	-0.2
28	5310-4406	-30.9	91.1	34.9	23.2
29	5436-1259	17.7			31.3
30	5508-0921	19.8	24.7	38.8	24.3
31	6253-0420	-6.1	39.1	34.7	-2
32	7156-0215	52.3	8.5	-7.2	16
33	7177-0017	49.3	-25	0.4	-6.1
34	7595-0022	30.8	9.6	10.7	1
35	8006-5443	25.7	-8.4	3.4	5.9
36	8017-6460	18.1	5.4	16.3	1.3
37	8603-0249	32.4	4.9	-3.8	6.1
38	8603-0251	41.4	0.6	11	1.1
39	C066-1574	38.6	-14.2	12.8	3.8
40	C066-5100	111.5	24.9	4.8	10.2
41	C066-5307	33.9	14.6	2.4	2.3
42	C200-7799	27.4	-60.5	-41.6	-28.1
43	C200-7909	27.3	-57.5	-6.5	8.3
44	C429-0036	63.6	45.5	20.9	-5
45	C429-0039	46.5	-36.1	-17.2	-13.6
46	C429-0378	33.4	-55.4	-23.8	-10.5
47	C430-0040	21.5	41.8	2.7	8
48	C430-0042	77.2	74.4	41.6	49.9
49	C430-0180	23.4	22.4	27.3	2.4

Fortsetzung Tabelle A.1. Ergebnisse der *in-situ* Screens

Nr.	IDNUMBER	Inhibition [%]	Inhibition [%]	Inhibition [%]	Inhibition [%]
		Screen 1-100 $\mu$ M	Screen 2-100 $\mu$ M	Screen 2-10 $\mu$ M	Screen 2-1 $\mu$ M
50	C715-0001	-6.7	-12.4	14.1	9.9
51	C800-0328	29.3	-37.7	-8.6	9.4
52	C800-0699	39.1	-6.1	-5.2	-5.3
53	C800-0723	32.2	-5.2	-2.3	0
54	D012-0035	61.4	28.2	7.4	15.9
55	D012-0071	24.8	-7.1	-6.8	4.8
56	D143-0305	-50.8	-7.7	2.6	6.2
57	D143-0316	-16.2	22.5	3.3	17.2
58	D143-0328	-6.2	40.6	-6.4	23.1
59	D236-0074	-27.8	2.4	17.9	12.4
60	K061-1138	45.1	-9.5	-27.7	-2.6
61	K780-0867	34.3	6.7	-17.4	5.3
62	K781-0015	28.4	9.4	0	5.8
63	K781-0100	26.7	3.3	0.4	3.1
64	K781-0103	21.8	-18.1	19.9	19.1
65	K781-0362	30.9	-16.5	-1.8	-17.4
66	K781-0455	33.3	23.5	24.2	4.2
67	K781-1340	33.4	4.9	5.3	-27.4
68	K781-1342	41.5	21.8	17.9	-14
69	K783-4311	4.9	23	51.5	55.6
70	K783-5872	35.8	-45.8	4.2	-15
71	R018-0020	30.3	17.8	-1.9	2.1
72	R052-1064	64.9	9.8	0.3	-13.6
73	R052-1644	57.4	2.1	15.3	10.7
74	R052-1968	24.8	61.9	25	11.3
75	R152-1167	5	32.6	9.9	7
76	8015-2096	-0.9	10.4	18.6	-33.5
77	8016-2062	17.9	25.2	20.7	3.6
78	8017-3581	-14.6	33.6	15	13.9

Tabelle A.2. Ergebnisse des WNV NS2B-NS3-Protease Dockings

Ranking #	IDNUMBER	Struktur	XP GScore	SP GScore	Ranking #	IDNUMBER	Struktur	XP GScore	SP GScore
1	4553-3743		-11.15	-8.15	11	5069-0132		-9.83	-8.41
2	4912-1120		-11.11	-8.53	12	K783-1043		-9.82	-9.27
3	8014-8998		-10.88	-8.74	13	5508-0921		-9.82	-8.83
4	8014-8998		-10.41	-8.72	14	K783-2904		-9.79	-9.04
5	4553-3784		-10.2	-8.56	15	7098-0397		-9.75	-8.71
6	D117-0009		-10.15	-8.1	16	6322-0305		-9.75	-8.44
7	D117-0011		-10.07	-8.78	17	K085-0006		-9.74	-8.98
8	6705-0252		-10	-8.67	18	6350-0003		-9.73	-8.67
9	6705-0252		-9.95	-8.11	19	K783-0226		-9.73	-8.22
10	K629-0042		-9.86	-9.39	20	7098-0397		-9.67	-8.56

Fortsetzung Tabelle A.2. Ergebnisse des WNV NS2B-NS3-Protease Dockings

Ranking #	IDNUMBER	Struktur	XP GScore	SP GScore
21	K085-0008		-9.65	-8.86
22	6350-0003		-9.65	-8.53
23	K085-0008		-9.64	-8.64
24	K629-0010		-9.59	-8.62
25	8001-6145		-9.56	-8.99
26	K085-0023		-9.52	-8.09
27	K085-0003		-9.41	-8.47
28	K085-0023		-9.41	-8.09
29	8001-6145		-9.4	-8.42
30	C796-0333		-9.37	-8.94

Ranking #	IDNUMBER	Struktur	XP GScore	SP GScore
31	6705-0252		-9.37	-8.34
32	4912-0319		-9.35	-8.63
33	K783-3643		-9.34	-8.39
34	K085-0019		-9.33	-9.03
35	4553-3743		-9.33	-8.09
36	4912-0419		-9.32	-8.9
37	4912-0419		-9.32	-8.5
38	K085-0001		-9.32	-8.3
39	D236-0078		-9.31	-8.18
40	K085-0016		-9.3	-8.88

Tabelle A.3. Ergebnisse der Experimente zur Hit-Selektion

Nr.	IDNUMBER	Carbonsäure-Fragment Screen Inhibition [%]			Inhibition [%] Aktivierung neu						78XP Score
		500 µM	300 µM	100 µM	1-100 µM	1-50 µM	1-10 µM	2-100 µM	2-50 µM	2-10 µM	
1	0139-0251	31.7	34.6	-19.1	27.2	24.6	11.4	13.7	-3.8	0.5	-6.96
2	0242-0323	47.2	18.7	0.4	23.2	28.4	9.3	19.8	3	3.1	-7.4
3	0272-0165	47.6	30.6	-10.3	24	60.4	16.1	28.5	9.4	2.9	-6.7
4	0478-0678	10.6	-6.9	-1.3	24	25	10.5	17.3	-1.2	-0.4	-4.59
5	0550-0093	16.9	23.9	-7.2	17.4	29.8	9.4	19.8	3.6	4.3	-7.33
6	0698-0018	n.b.	23.6	35.7	14.7	74.9	15	35.2	-5.4	18.4	-6.18
7	1030-0091	11.3	2.9	-5.1	38	21.8	19.6	26.2	3.9	15.3	-6.7
8	1080-0453	4.1	11.5	-1.6	34.5	27.2	12.1	23.9	4.2	12.2	-6.42
9	1227-0087	28.3	27.6	1.6	29.2	34.2	18.3	25.5	2.8	12.6	-6.26
10	1278-0001	45	21.1	10	36.9	29.1	22.3	24.2	1	13.1	-6.56
11	1438-0106	58.2	43.2	8.4	46.1	42.5	28.3	37.1	13.2	16.8	-6.62
12	1482-0116	43.6	17.6	-9.4	13.9	32.8	15.2	21.8	2.6	9.6	-7.4
13	1482-0119	32.8	21.6	-7.8	21.1	28.5	12	21.3	1.2	9.5	-7.79
14	1597-0043	48.3	24	-5.7	33.6	21.8	12.9	22.4	3.2	5	-5.09
15	1630-0523	43.6	23	-5	19	40.1	16.6	28.6	4.1	2.1	-6.49
16	1650-0853	25.2	16.7	1.4	30.2	29.7	17.3	24.1	12.8	-3.7	-7.04
17	2114-0468	18.4	16.4	-5.3	19.3	11.6	11.8	10.7	-2.4	1.7	-7.01
18	2372-2268	52.9	63.5	32.8	63	76.9	34.2	66.7	12.5	21.1	-5.56
19	3232-1768	73.3	15.8	-12.5	32.9	38.7	26.8	29.7	15.3	9.3	-7.65
20	4182-0009	41	44.4	-7.2	29	33.8	24.1	29.7	9.3	8	-6.14
21	4300-0953	71.8	29.9	-6.2	46.6	24	27.2	17.2	7.3	3.4	-6.5
22	4410-3724	76.3	65	46.4	99.5	75.2	61.5	49.4	12.1	21.1	-6.59
23	4478-5369	30.3	32.2	-2.2	32.2	19.8	11.6	25.5	2.6	11.3	-6.25
24	4483-1197	50.9	42.1	8.6	29	39.4	5.6	30.2	2.4	9.5	-6.8
25	4522-0143	48.4	30.3	4.2	24.2	27.5	5.8	13	7.9	7.1	-7.43
26	4611-0280	45.8	26.1	8.6	-9.6	17.8	-9.7	25.6	1.4	14	-8.14
27	5107-0118	63.8	36.2	10.1	39.5	30.6	21.5	26.3	14.6	15	-5.87
28	5310-4406	47.8	20.7	-17.2	23.6	25.5	21.4	19.5	13	12.2	-5.78
29	5436-1259	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	24	26.7	-7.66
30	5508-0921	3.5	1.6	-8.8	30	19.6	16.3	16.5	5.6	8.5	-9.82
31	6253-0420	38.8	0.4	-0.8	71.7	18	61.9	17	34.4	3.5	-7.13
32	7156-0215	42.9	38.5	22.7	50.7	60.6	34.1	44.6	17.6	10.3	-6.45
33	7177-0017	-26.9	6.8	-0.1	37.1	38.4	25.5	31.5	13.9	13.9	-8.1
34	7595-0022	25.2	36.6	13.8	25.2	22.1	20.8	27.8	14.2	12.7	-6.77
35	8006-5443	-4.3	-6.8	0.7	17.1	17.5	14.1	23.3	11.5	6.5	-7.74
36	8017-6460	32.2	31.2	16.9	24.6	39.8	9.3	21	-0.8	5.3	-6.87
37	8603-0249	71.4	51.3	45.3	43.5	56.3	30.1	36	8.3	12.6	-7.63
38	8603-0251	71.5	67.7	46.2	41	65.6	31.4	56.3	8.8	12.5	-7.44
39	C066-1574	51	67.2	26.6	51.5	61	15.5	35.1	4.1	4.1	-7.13
40	C066-5100	-212.3	n.b.	72.4	n.b.	n.b.	27.5	n.b.	24.3	33	-3.68
41	C066-5307	27.6	9.4	36.6	17.7	44.4	19.6	30.3	-5	7.5	-7.26
42	C200-7799	-27.8	-21.5	5.2	11.3	7.6	6.2	15.4	-3.9	4.8	-7.71
43	C200-7909	37.3	22.6	15.2	37.1	34.7	20	25.5	10	2.4	-6.73
44	C429-0036	92	79.6	59.8	74.7	69.9	63.6	67.8	31.6	31.7	-7.79
45	C429-0039	36.9	8.2	-0.4	36.2	22	19.1	29.2	9.1	7	-7.26
46	C429-0378	11.4	-10.1	-2.4	25.2	18.3	22.8	26.7	13.9	5	-6.56
47	C430-0040	10	-2.5	-0.1	32.6	28.9	25.6	29.3	3.2	0.5	-5.33
48	C430-0042	99.3	92.3	80.6	87.4	88.8	77.1	83.6	50.1	59.7	-7.92
49	C430-0180	33.5	32.3	8.6	29.6	29.3	20	26.6	8.6	9.3	-6.69

Fortsetzung Tabelle A.3. Ergebnisse der Experimente zur Hit-Selektion

Nr.	IDNUMBER	Carbonsäure-Fragment Screen Inhibition [%]			Inhibition [%] Aktivierung neu						78XP Score
		500 µM	300 µM	100 µM	1-100 µM	1-50 µM	1-10 µM	2-100 µM	2-50 µM	2-10 µM	
50	C715-0001	17.7	12.6	19.3	22.4	24.1	15.6	18.3	9.9	8.8	-7.84
51	C800-0328	-40.4	-14.2	-0.5	40.5	33.1	22.8	35.6	13.3	14.1	-7.55
52	C800-0699	-21.7	-7.5	12.1	72.5	61.7	33.7	32.7	2.4	3.9	-5.26
53	C800-0723	-26.1	-18.8	9.7	86.7	66.5	37.7	39.7	7.3	10.7	-2.68
54	D012-0035	-43.3	n.b.	37	-31.3	61.9	21.5	36.6	5.7	9.8	-5.39
55	D012-0071	32.5	27.9	4.5	25.2	23	14.3	15	14.4	9.2	-7.35
56	D143-0305	-51.6	26.3	4.2	-34.8	-2.7	-35.5	-14.2	9.8	6.4	-2.73
57	D143-0316	-18.8	-55.8	18.6	42.3	99.9	27.5	48.6	9.4	23.5	-5.18
58	D143-0328	18.3	7.5	15	71	26.5	34.7	34.5	14.5	23.3	-5.61
59	D236-0074	19	19.1	5.7	23.9	19.6	14.9	11.3	9.1	6.7	-9.64
60	K061-1138	30.2	17.2	3.4	21.9	33.3	22.2	25.8	6.5	10.7	-7.08
61	K780-0867	17	7.7	4.4	28	26	12.2	22.7	5.4	7.1	-7.5
62	K781-0015	6.4	-20.7	11.8	22.8	33.7	17.4	25.6	9.9	7.3	-7.8
63	K781-0100	58.7	53.8	23.8	35.5	40.4	22.6	31.5	10	3.5	-5.9
64	K781-0103	-1.2	24	28.9	47.8	37.9	25.6	28.3	6.6	11.6	-5.93
65	K781-0362	40.1	43.9	21.1	44	45.2	25.1	22.9	5.6	6.3	-5.81
66	K781-0455	38.6	55.7	36.2	35.5	42.3	12.5	29.1	-1	3.9	-5.94
67	K781-1340	69.9	62.5	29.6	30.7	56.5	18.2	38	0.1	8	-6.31
68	K781-1342	75	76	29.6	39	50.1	20.1	40.2	4.9	7.1	-5.41
69	K783-4311	28.6	42.4	8.3	26.8	21.6	12.5	19.2	-5.9	-0.6	-6.43
70	K783-5872	24.5	27.4	13.3	37.3	50.8	17.8	26.2	-0.3	2.6	-5.58
71	R018-0020	70.2	48	6.6	22.7	33.8	-7.5	34.8	4.9	10	-6.49
72	R052-1064	62.5	40.4	-5.7	30.5	30.2	18.9	37.4	9.5	15.9	-5.94
73	R052-1644	72.9	37.3	9	27	21.2	15.6	23.8	1.3	8.7	-6.07
74	R052-1968	67.6	30.4	9.6	22.1	18.9	11.6	24.7	7	7.3	-5.91
75	R152-1167	n.b.	n.b.	31.8	29.1	n.b.	18.4	42.6	12.9	8.7	-4.79
76	8015-2096	-73.3	-46.2	11	18.6	31.2	12.5	9	3.3	-0.7	-7.64
77	8016-2062	57.1	58.1	17.9	41.3	60.1	15.3	35.6	-2.2	6.6	-6.75
78	8017-3581	n.b.	-18.2	25.3	11.6	26.2	14.1	38.5	4.6	1.9	-7.4

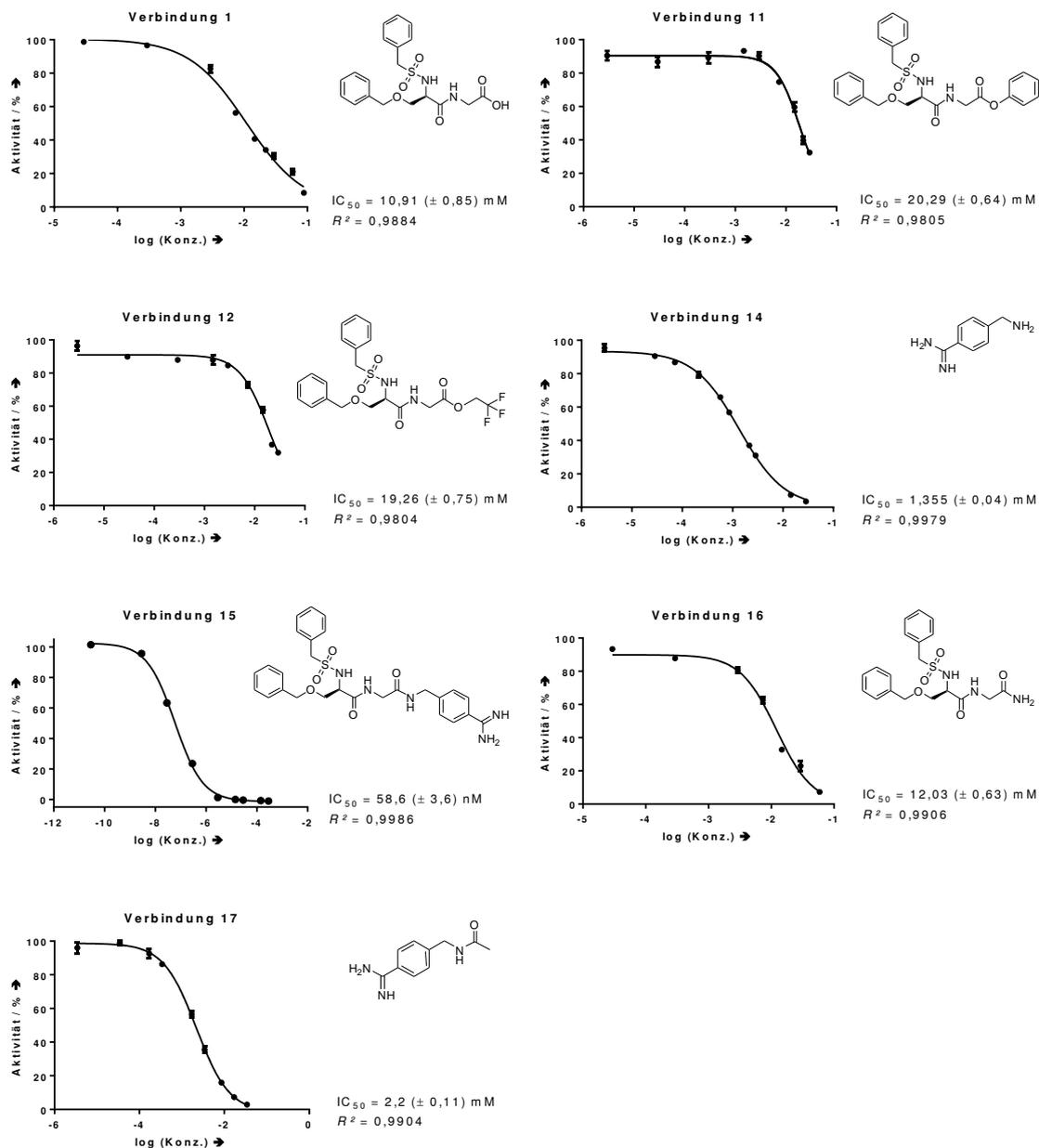
Tabelle A.4. Ergebnisse der Experimente zur Hit-Selektion 2

Nr.	IDNUMBER	PAIN	Inhibition [%] Detergenz-Assay Amidkonz. 100 µM	RFU Prescan DCC-Akt. Amidkonz. 120 µM	AMC Test DCC-Akt. RFU	RFU Prescan HBTU-Akt. Amidkonz. 120 µM	AMC Test HBTU-Akt. RFU
1	0139-0251		29.1	109.5	15763.5	121.5	16078.5
2	0242-0323		12.9	123	14475.5	258	13992
3	0272-0165		27.2	91.5	12824.5	143	11662.5
4	0478-0678		12.1	184	14111	176.5	13993.5
5	0550-0093		18.7	137	16049	107	15949
6	0698-0018		20.3	14866.5	32225.5	30812	50308
7	1030-0091		20	113	13614	143.5	15743
8	1080-0453	X	23.6	104	14975	104	14462
9	1227-0087		29.1	126.5	16254	116	16040.5
10	1278-0001		15.9	130.5	16236.5	128.5	16715
11	1438-0106		36.9	218	11578.5	139	11994.5
12	1482-0116		-3.8	155	16489.5	151.5	15015.5
13	1482-0119		2.3	131	16448	185	15925
14	1597-0043		16.3	226	13220.5	225	11900.5
15	1630-0523		36.3	3993	19345	9297	24426.5
16	1650-0853		23.2	2322.5	16447.5	120.5	15783.5
17	2114-0468		4.7	121	15608	158	16339
18	2372-2268		83.4	74	6687	57.5	4266
19	3232-1768	X	18.3	10177.5	26664.5	11619.5	30606
20	4182-0009		31	344	15956	3714.5	19385
21	4300-0953		30.2	138.5	14977	621	14036
22	4410-3724	X	66.3	139	10319.5	59	3866
23	4478-5369		0.4	162	15708	150.5	15983.5
24	4483-1197		18.4	167	16171	224.5	16164
25	4522-0143		4.7	155.5	16372	102	16318
26	4611-0280		42.1	93	11268	95.5	12710
27	5107-0118	X	36	176.5	14519	154	12402.5
28	5310-4406		-3	161	15657.5	171.5	15388.5
29	5436-1259		n.b.	50000	n. b.	50000	n. b.
30	5508-0921		-17.4	137.5	15135.5	105.5	14149.5
31	6253-0420		6.2	247.5	15496.5	328	15284
32	7156-0215		53.8	8555.5	18975	11677	23411
33	7177-0017		39.7	8478.5	22407	3375	18689
34	7595-0022		17	114.5	15987	108.5	14557.5
35	8006-5443		-29.6	126.5	15317	119	15892.5
36	8017-6460		8.3	151	14692.5	99	12924
37	8603-0249	X	43.5	93.5	11708	102	8807.5
38	8603-0251	X	77	90	10385	60	3712.5
39	C066-1574		53.5	298	11312	238.5	8534.5
40	C066-5100		n.b.	50000	n. b.	50000	n. b.
41	C066-5307		-4.8	139.5	16701.5	151	16400.5
42	C200-7799		28.6	156	16019.5	122	15999
43	C200-7909		1.5	205	13790.5	235	15289
44	C429-0036		72.8	111.5	14878	112	15303
45	C429-0039		-23.1	136	16167.5	116.5	15983
46	C429-0378		-1.7	126	14176	105	15982
47	C430-0040		23.8	129.5	15565	107.5	15399
48	C430-0042		91.7	545	14941.5	111	15240.5
49	C430-0180		34.8	230.5	16242	266	16073.5

**Fortsetzung Tabelle A.4.** Ergebnisse der Experimente zur Hit-Selektion 2

Nr.	IDNUMBER	PAIN	Inhibition [%] Detergenz-Assay Amidkonz. 100 µM	RFU Prescan DCC-Akt. Amidkonz. 120 µM	AMC Test DCC-Akt. RFU	RFU Prescan HBTU-Akt. Amidkonz. 120 µM	AMC Test HBTU-Akt. RFU
50	C715-0001		20.8	150.5	13175	176	14727
51	C800-0328		46.4	317.5	12414	456	11456.5
52	C800-0699	X	61.5	3053.5	15105	238	10488
53	C800-0723	X	61.8	5334	17023.5	325	11044
54	D012-0035		60.7	25295.5	42021.5	21274	35110
55	D012-0071		-3.5	157	16599	130	15767.5
56	D143-0305		-21.5	3763.5	15341.5	3905.5	14955.5
57	D143-0316		53.7	7112	20983.5	11488	26107
58	D143-0328		45.2	1274	12870	2766	15024.5
59	D236-0074		-15.8	262.5	15910	111	15957.5
60	K061-1138		0.9	167	16022	105	15671
61	K780-0867		-6.9	126	14905	122	15131
62	K781-0015		5.9	128	16039	109.5	13036
63	K781-0100		28.2	171.5	13446	81	11071
64	K781-0103		19.8	269.5	14661	87	10719
65	K781-0362		46.8	100.5	11862.5	74	11888
66	K781-0455		37.4	103	13501	74	12053
67	K781-1340		63.8	92.5	12773	71.5	9990
68	K781-1342		47.4	106	12874.5	61	7406.5
69	K783-4311		-8.6	149	14590	127.5	16231
70	K783-5872		18.4	9746	25550.5	9087	24025
71	R018-0020		36.6	710.5	16388	425	11424
72	R052-1064		35.5	1080	13119	3927.5	14936.5
73	R052-1644		3.1	104.5	13712.5	111.5	12863
74	R052-1968		-20.1	572.5	16121.5	457.5	14191
75	R152-1167		n.b.	23067.5	40961.5	63445	n. b.
76	8015-2096		-2.1	9611.5	26180	12647	30445.5
77	8016-2062		60.8	100.5	11799	87	8683
78	8017-3581		24.6	23866.5	36409	41588	59165.5

## A.2. Dosis-Wirkungs-Kurven – Faktor Xa



**Abbildung A.1.** Darstellung der erhaltenen Dosis-Wirkungs-Kurven der gegen Faktor Xa getesteten Verbindungen

### A.3. Dosis-Wirkungs-Kurven – WNV NS2B-NS3- Protease

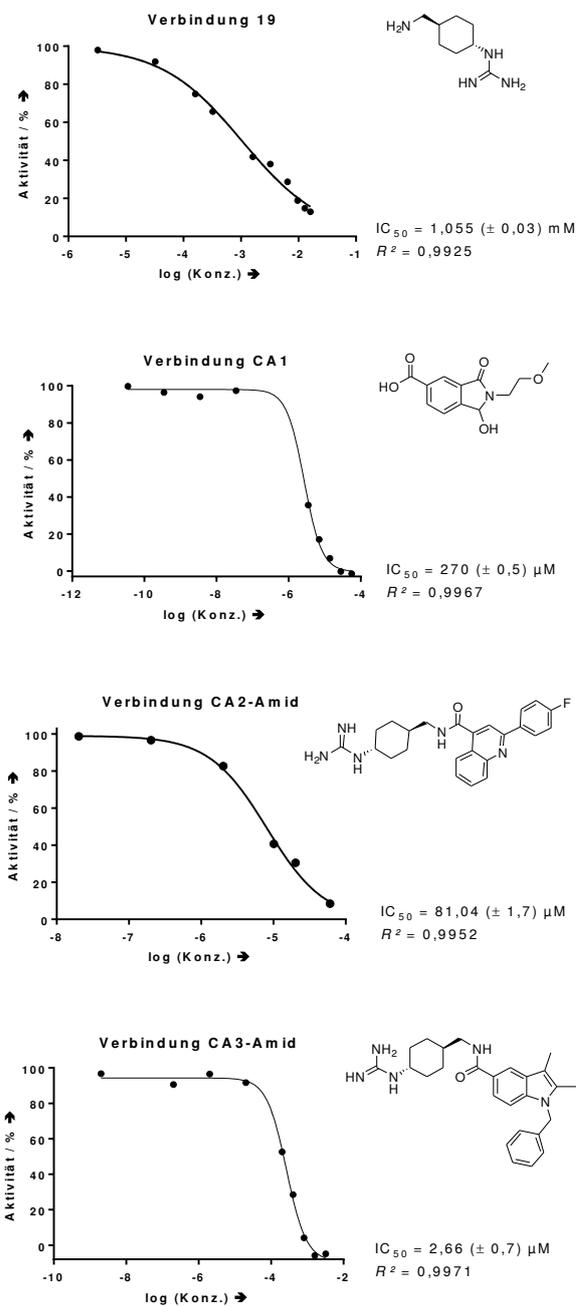
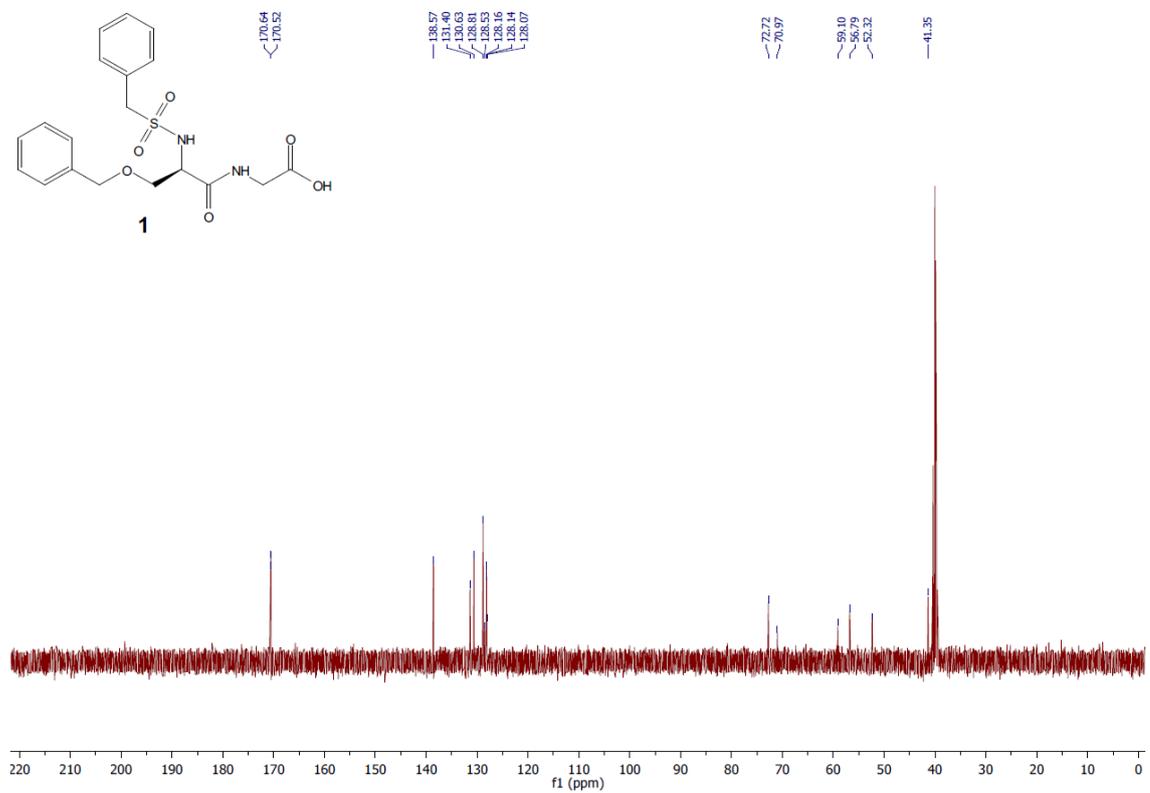
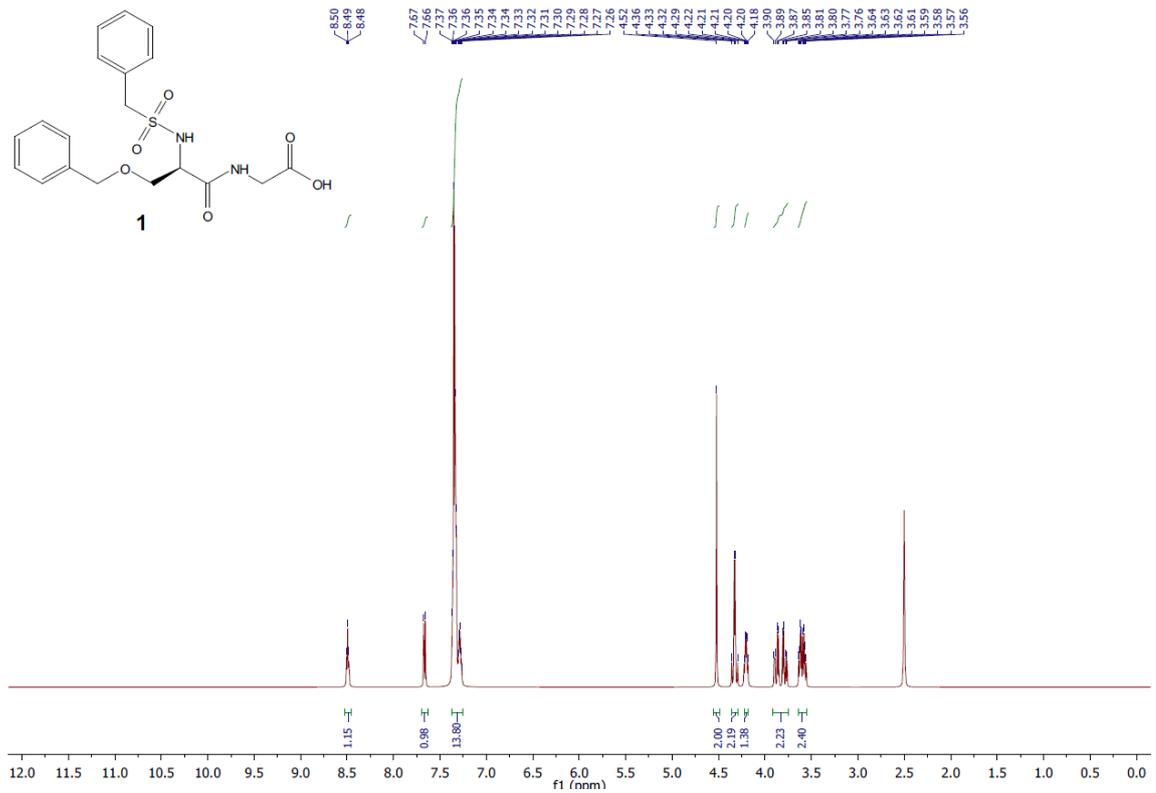


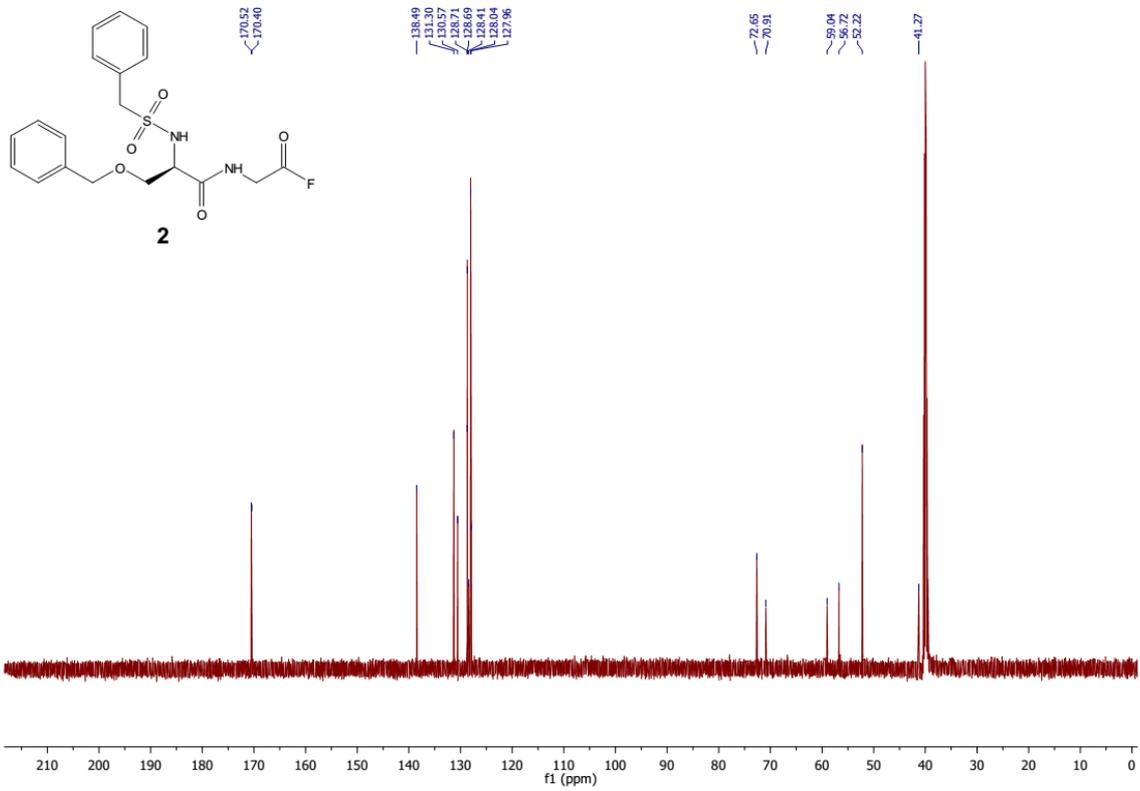
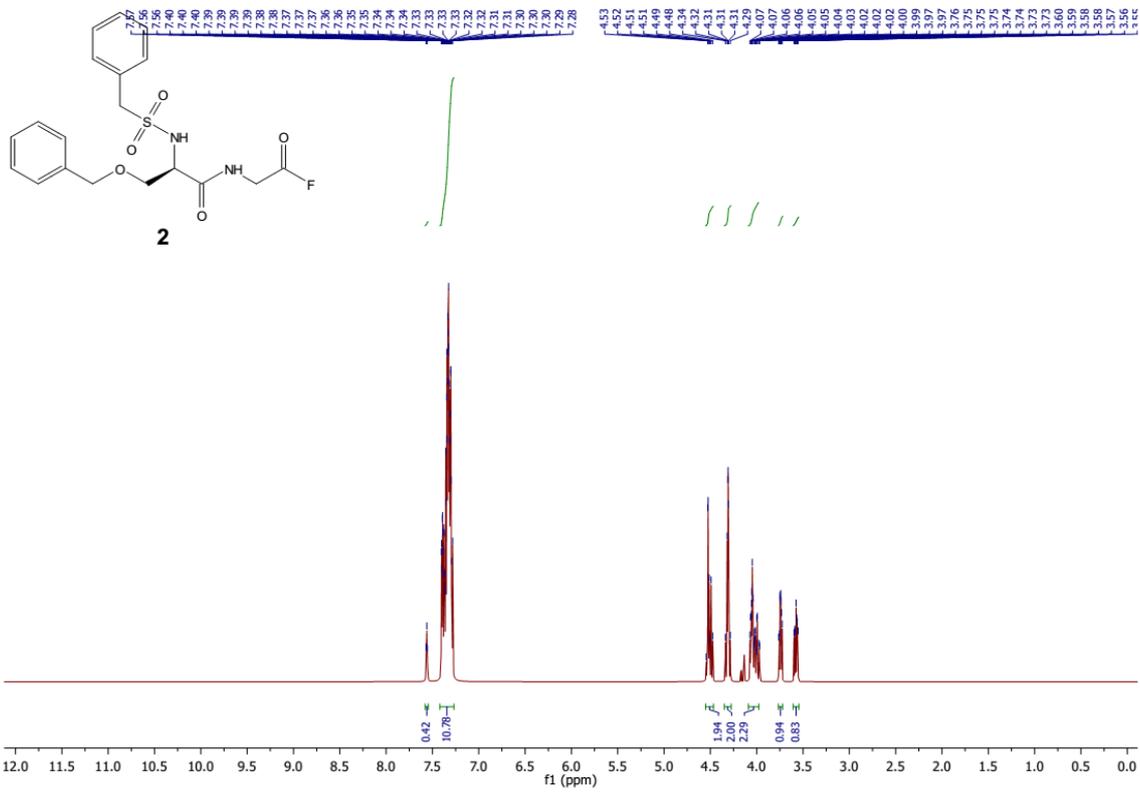
Abbildung A.2. Darstellung der erhaltenen Dosis-Wirkungs-Kurven der gegen die WNV NS2B-NS3-Protease getesteten Verbindungen

## A.4. NMR-Spektren

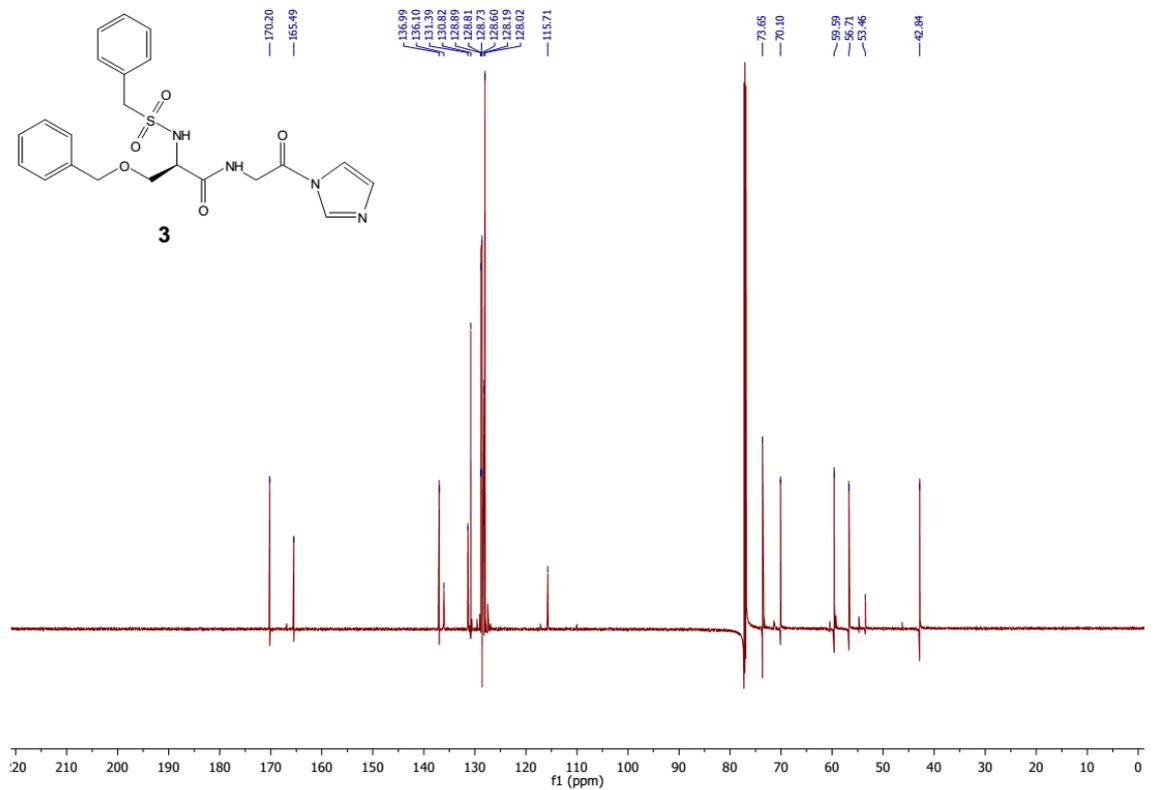
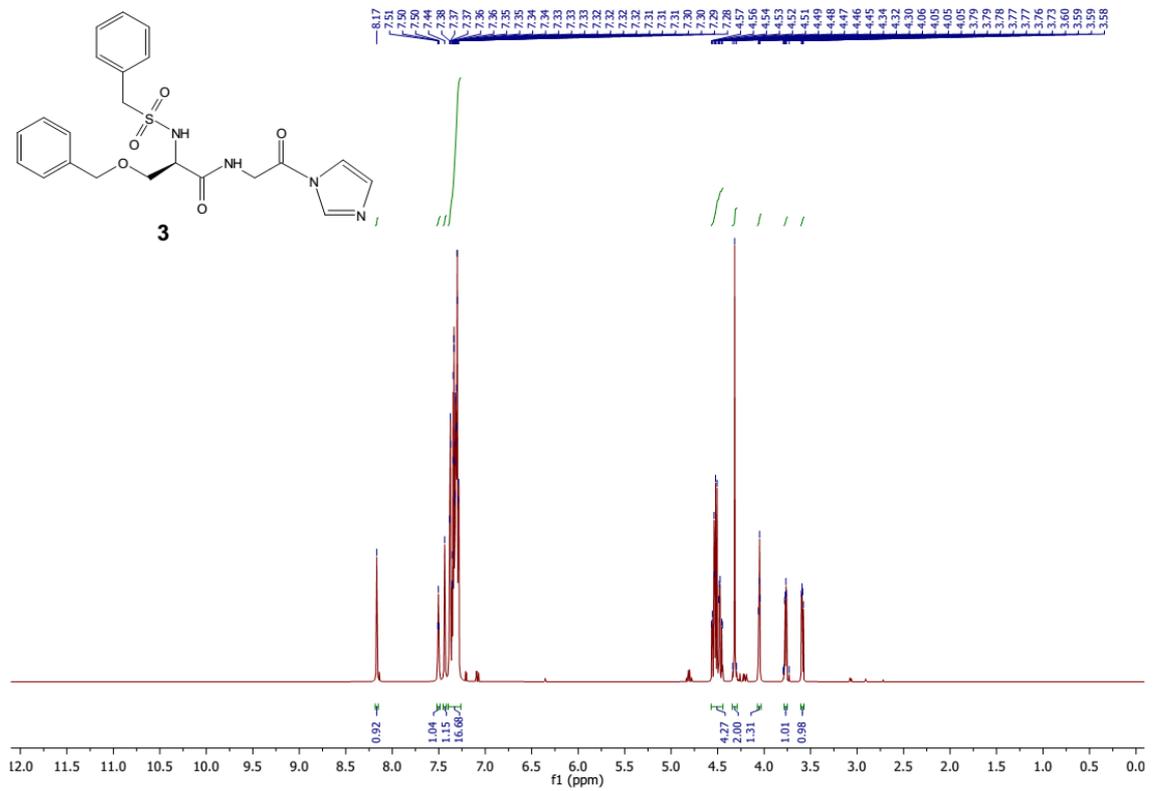


$^1\text{H-NMR}$ -Spektrum (500 MHz, DMSO- $d_6$ ) und  $^{13}\text{C-NMR}$ -Spektrum (125 MHz, DMSO- $d_6$ ) von **1**

A. Tabellen und Spektren

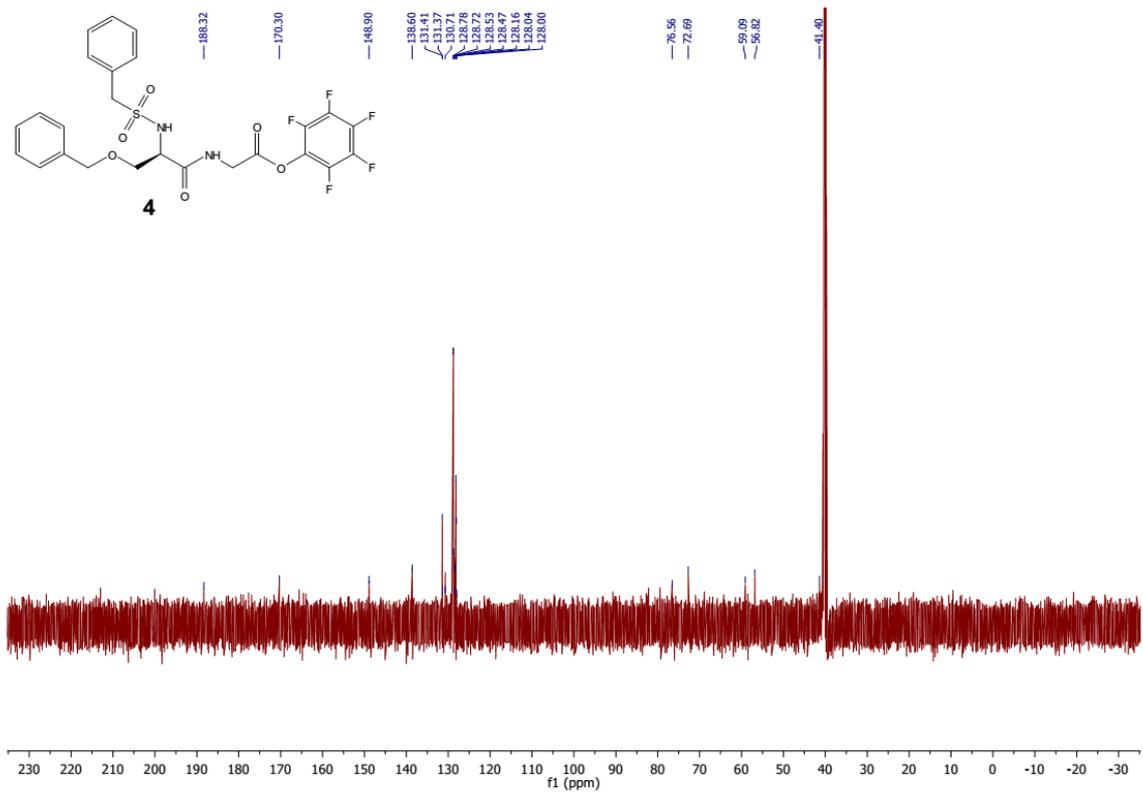
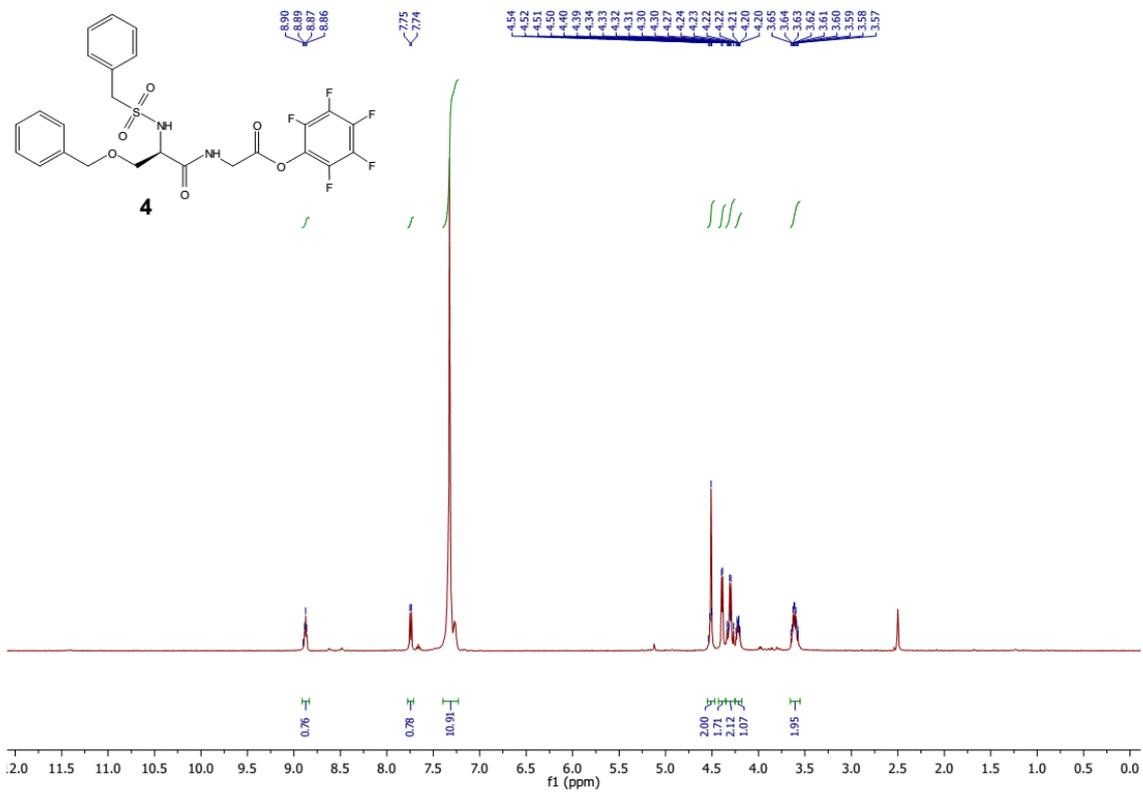


**<sup>1</sup>H NMR-Spektrum (700 MHz, CDCl<sub>3</sub>) und <sup>13</sup>C-NMR-Spektrum (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>) von 2**

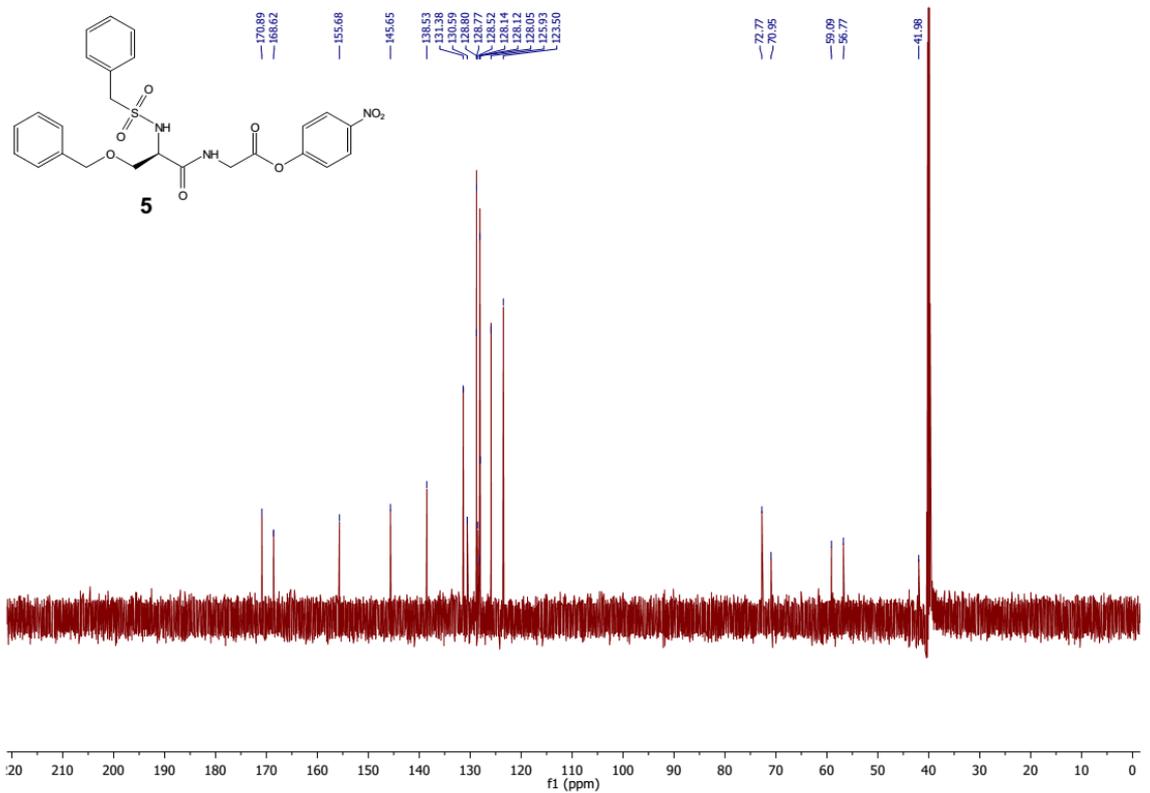
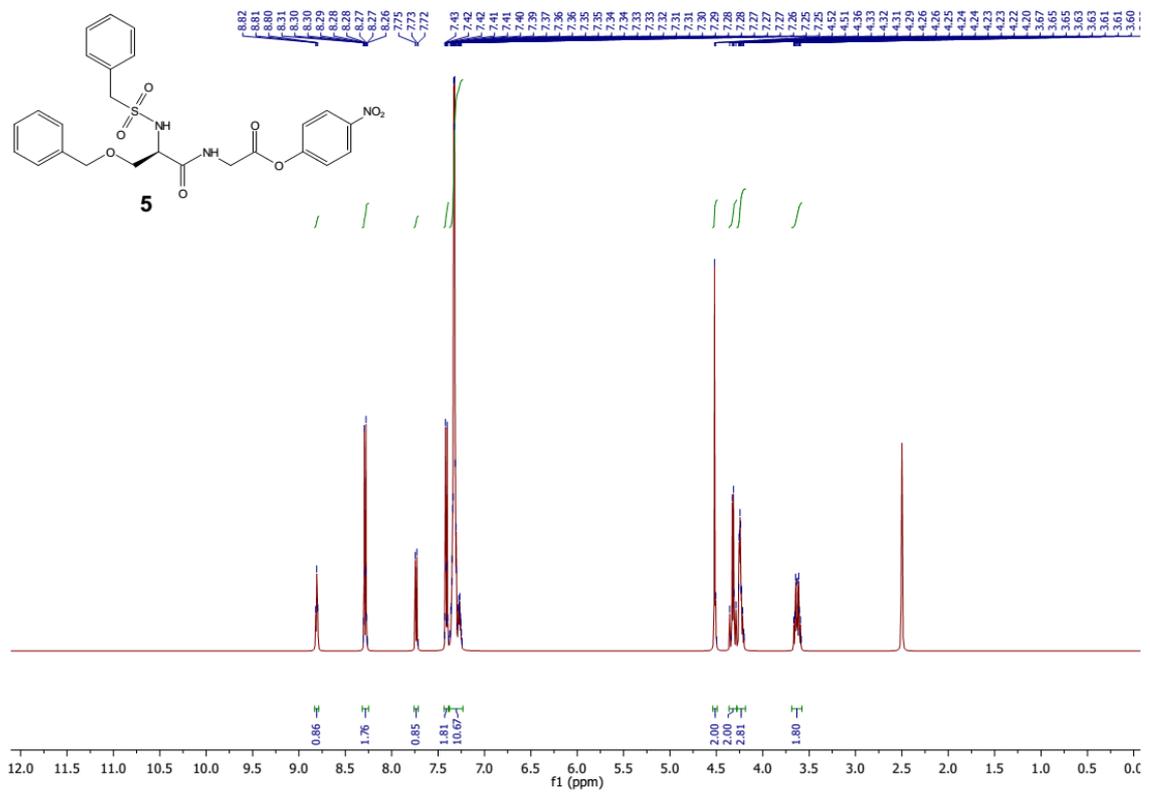


$^1\text{H}$ -NMR-Spektrum (700 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) und  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) von **3**

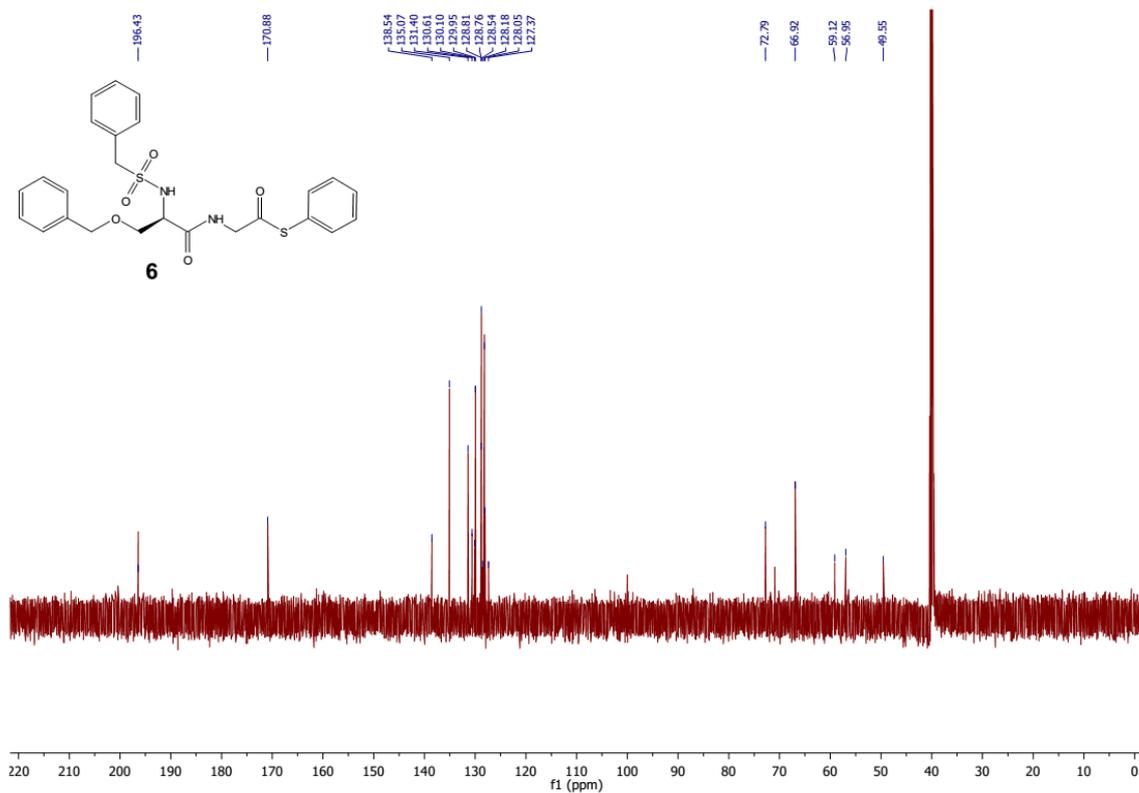
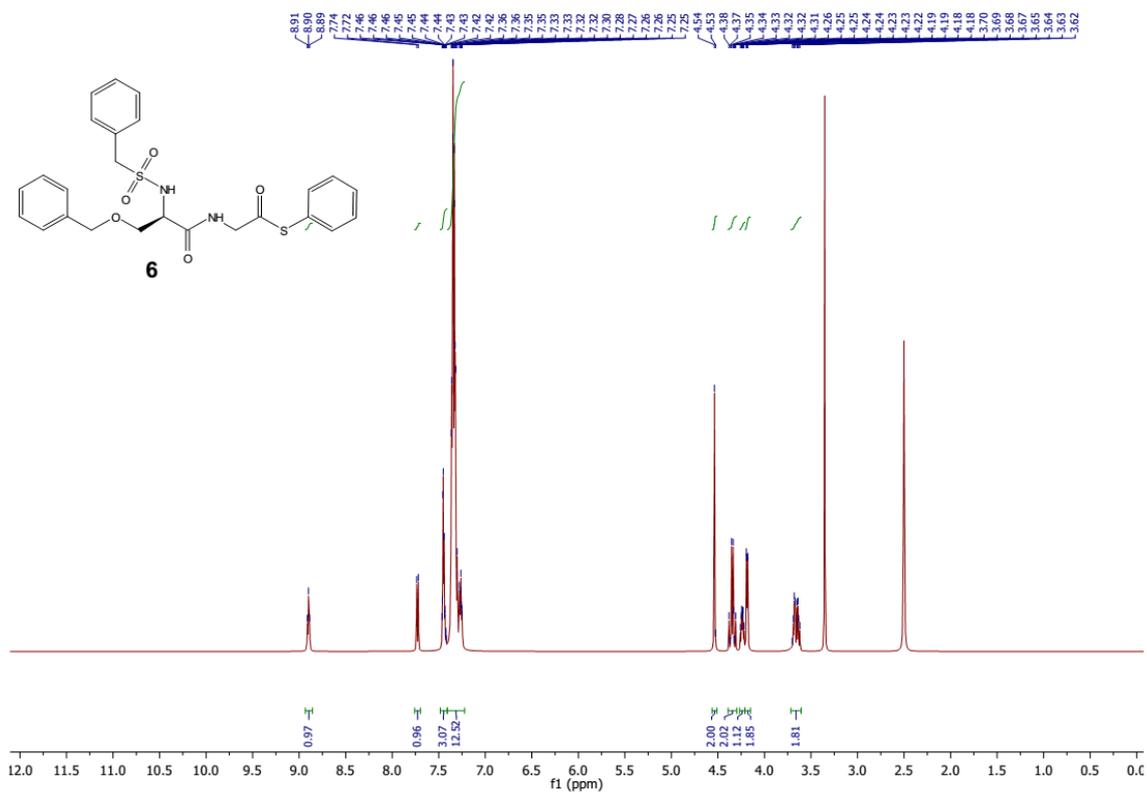
A. Tabellen und Spektren



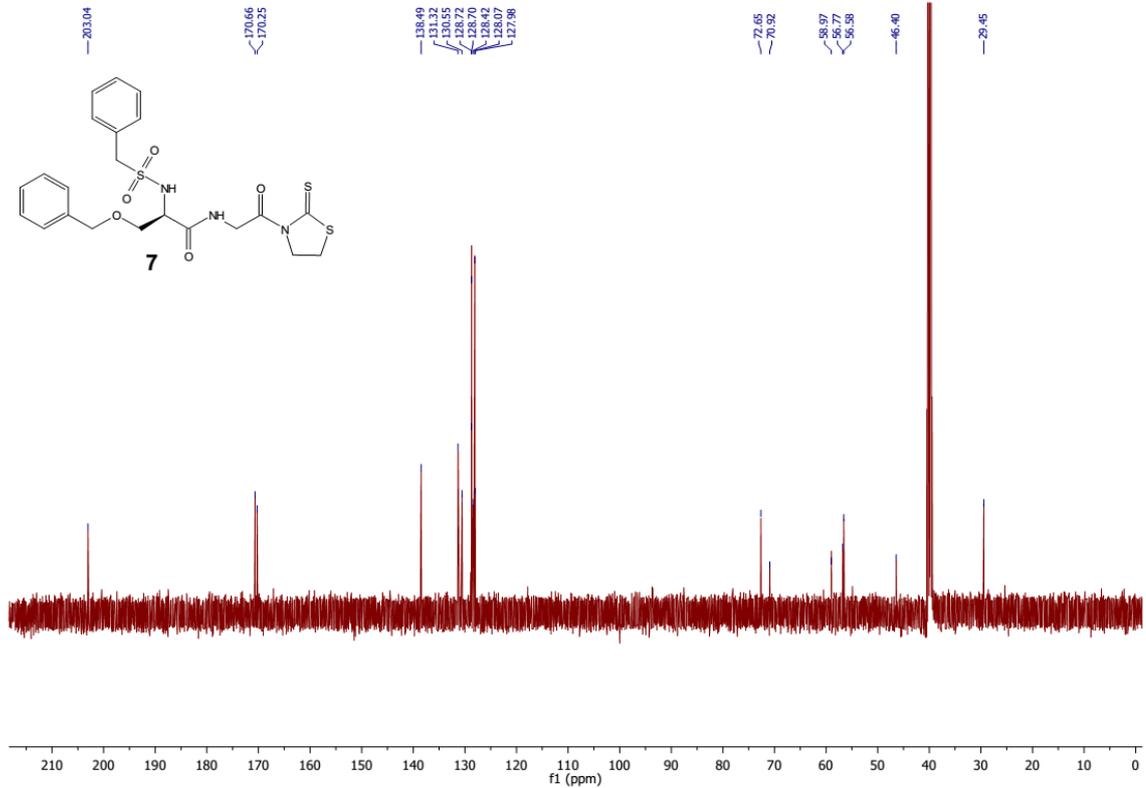
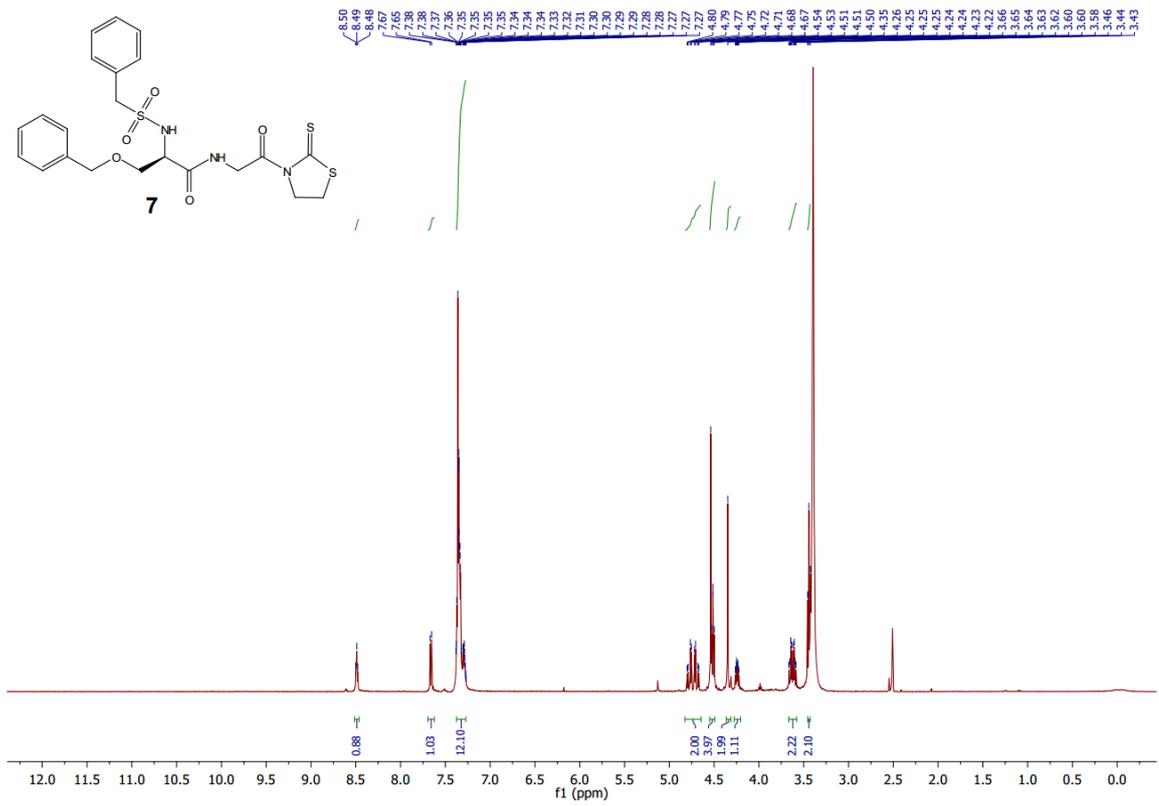
**<sup>1</sup>H NMR-Spektrum (500 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) und <sup>13</sup>C-NMR-Spektrum (125 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) von 4**



**<sup>1</sup>H NMR-Spektrum (500 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) und <sup>13</sup>C-NMR-Spektrum (125 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) von 5**

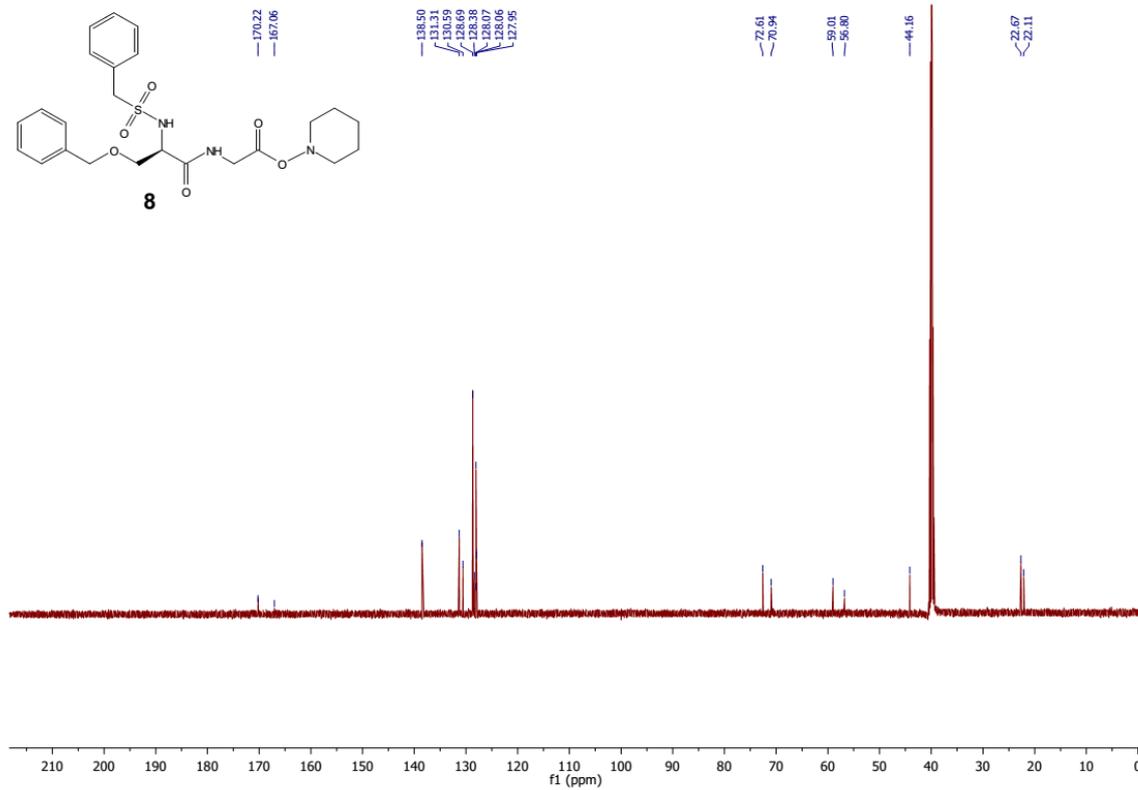
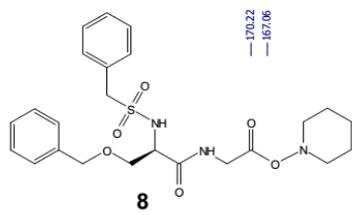
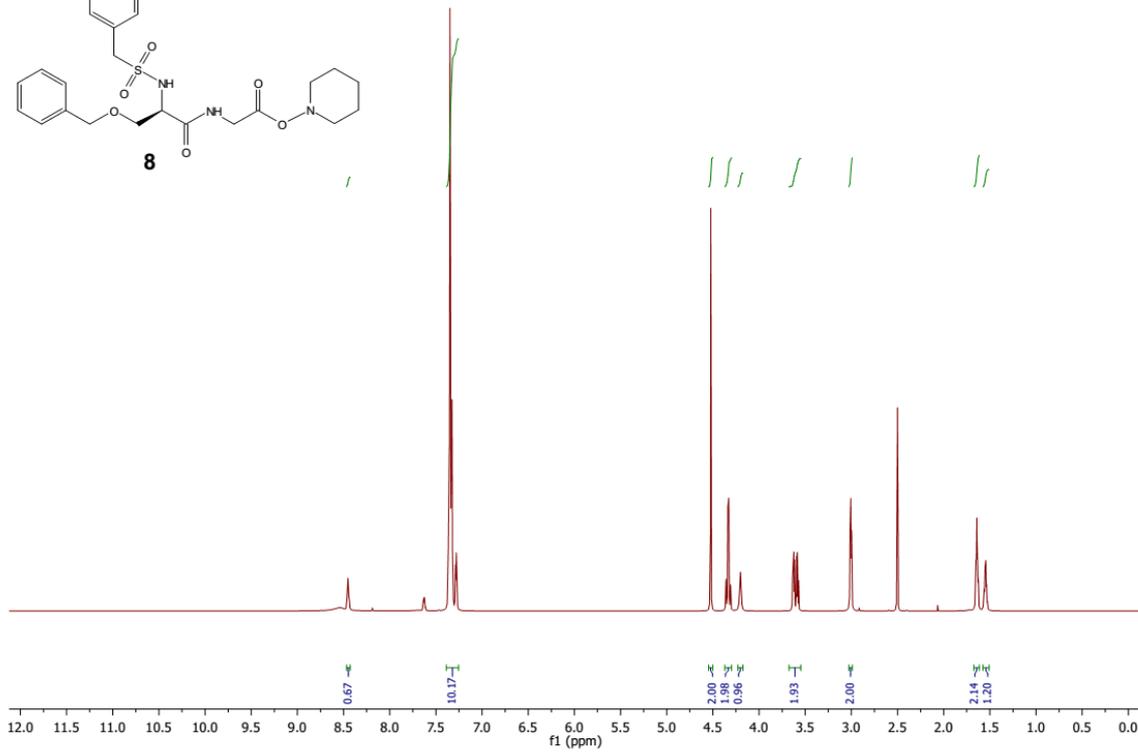
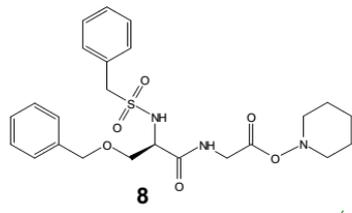


<sup>1</sup>H NMR-Spektrum (500 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) und <sup>13</sup>C-NMR-Spektrum (125 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) von 6

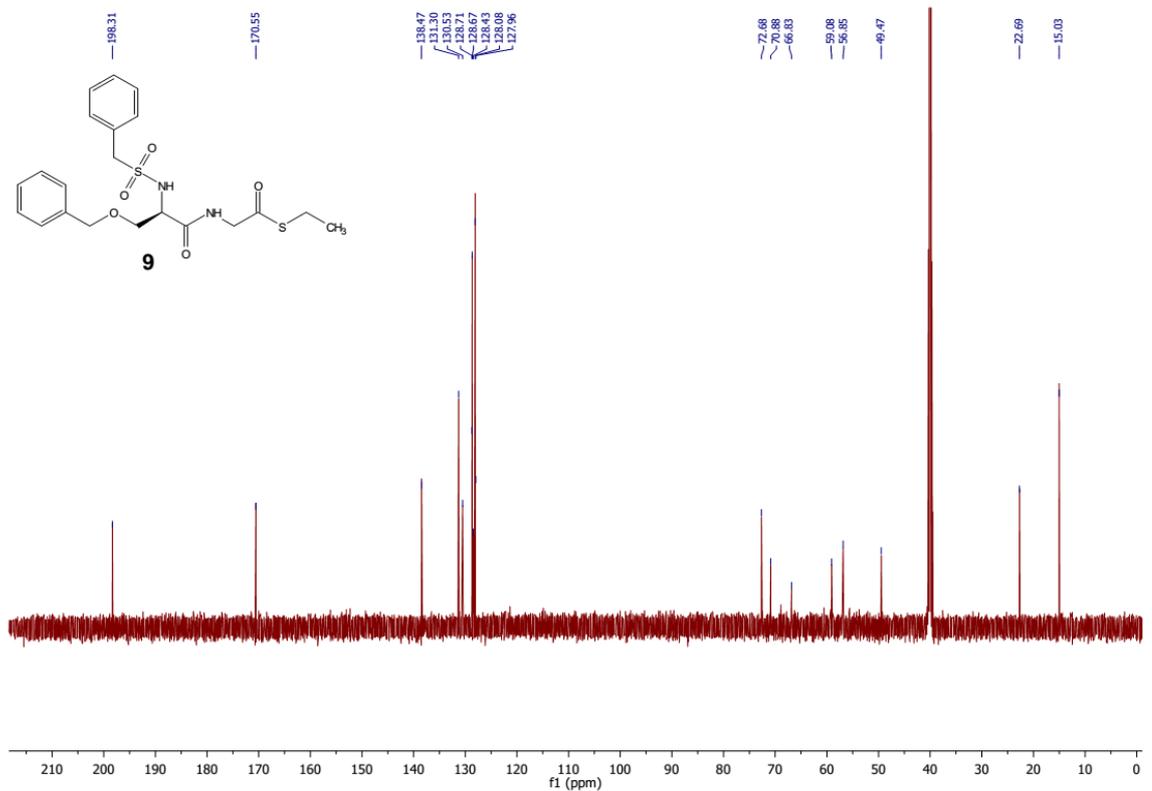
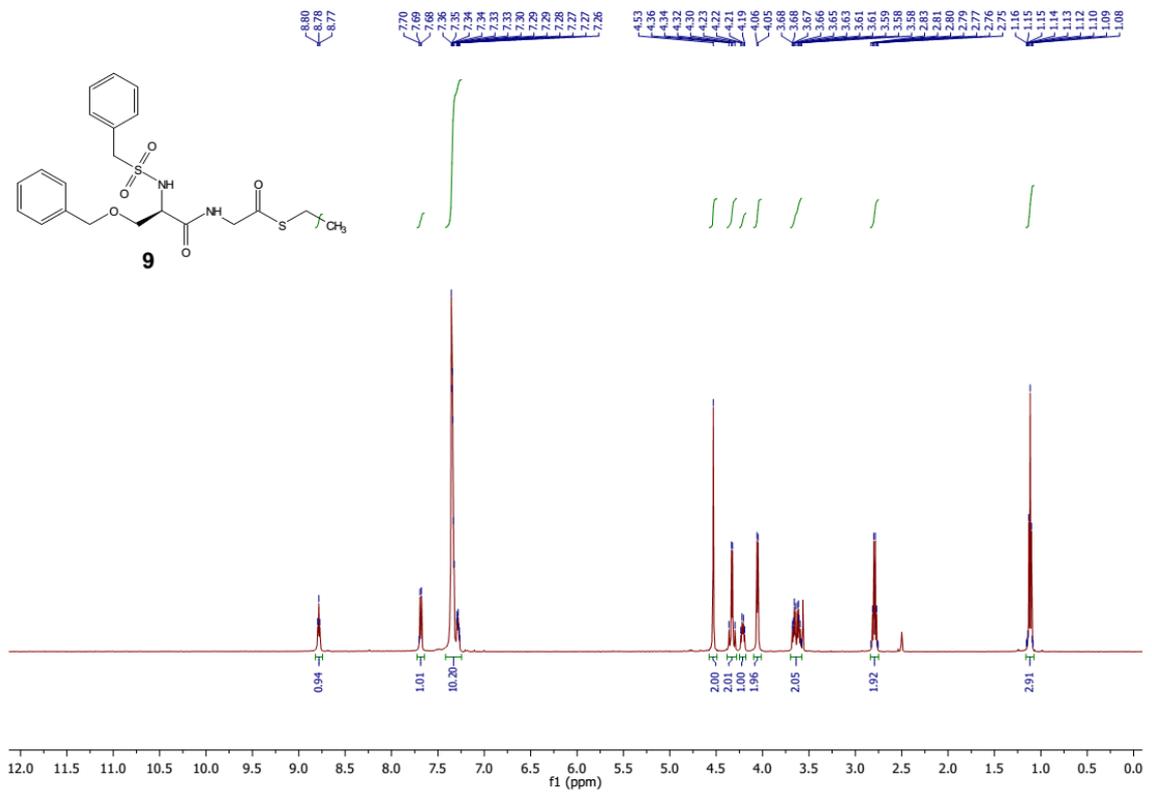


$^1\text{H}$  NMR-Spektrum (500 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ) und  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum (125 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ) von **7**

A. Tabellen und Spektren

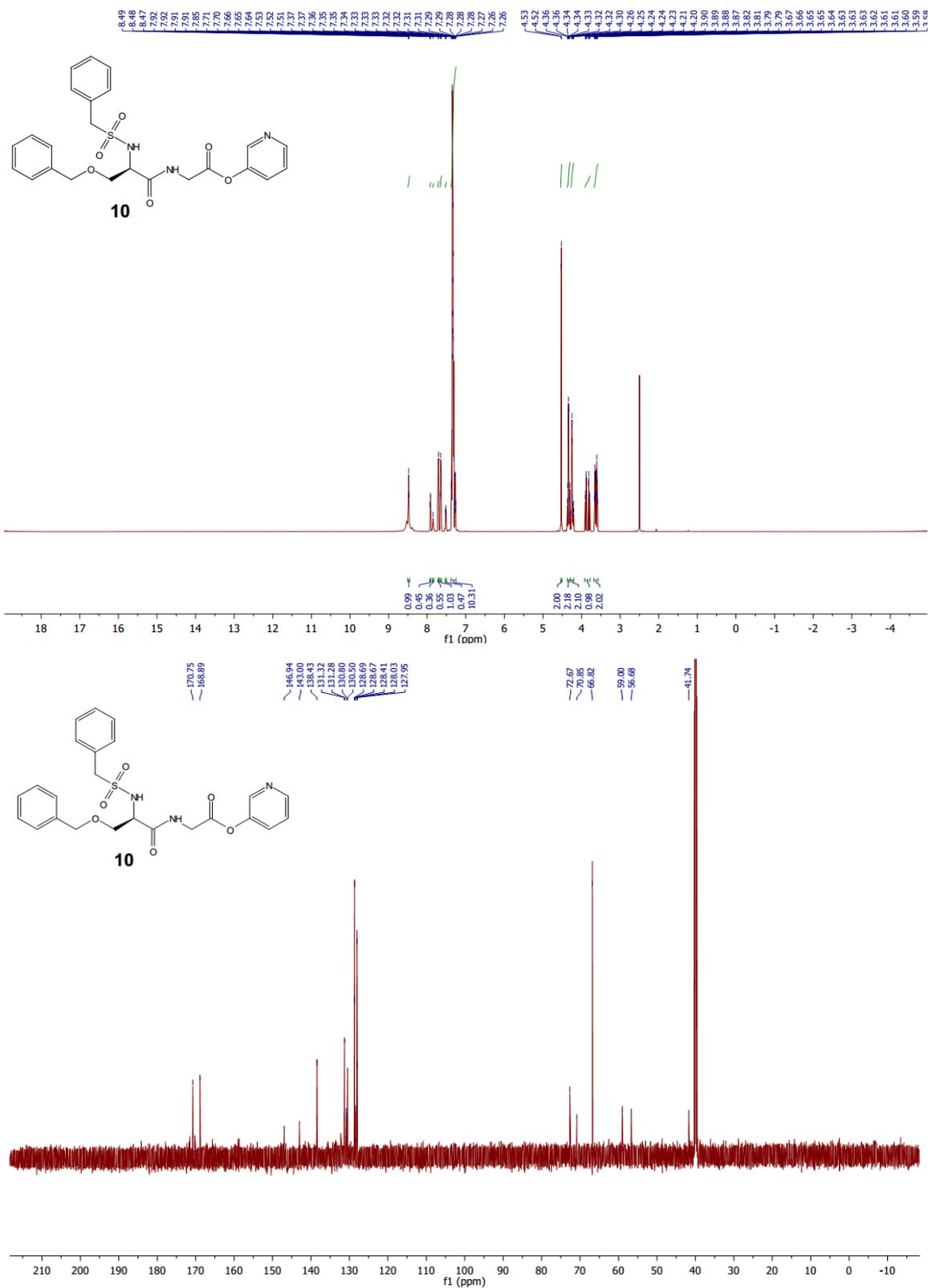


<sup>1</sup>H NMR-Spektrum (500 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) und <sup>13</sup>C-NMR-Spektrum (125 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) von **8**

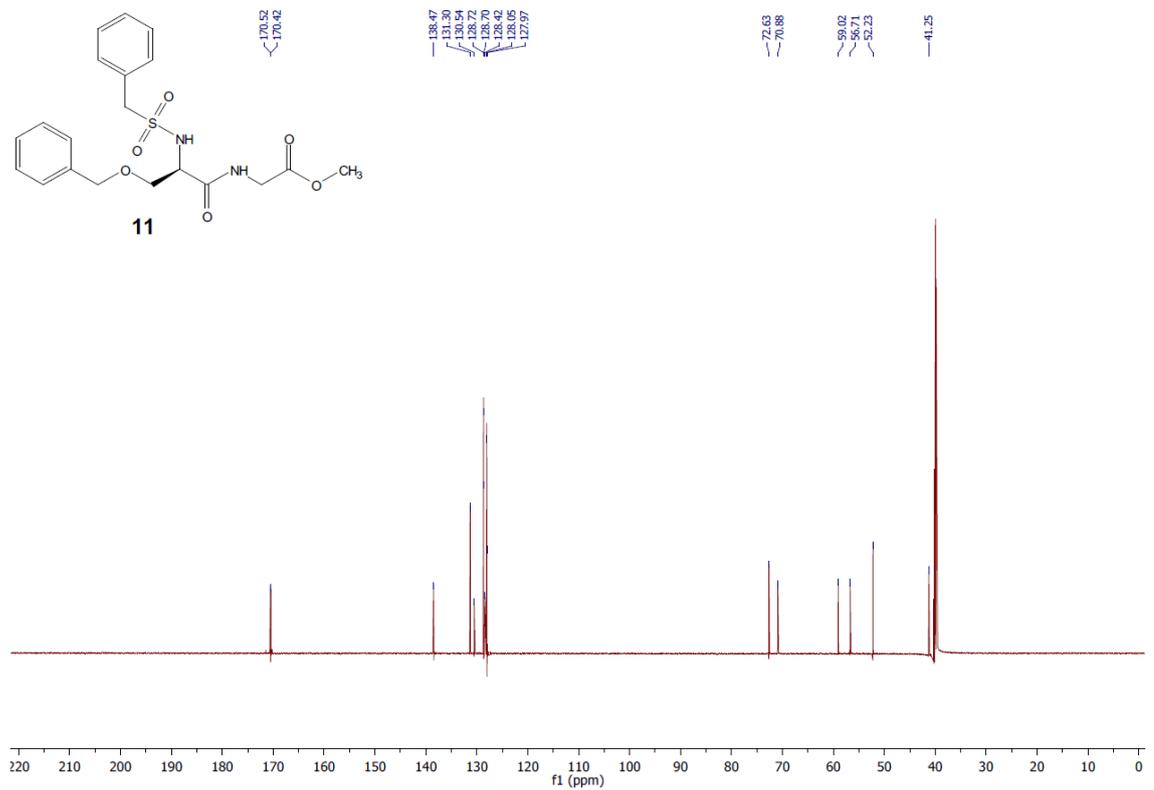
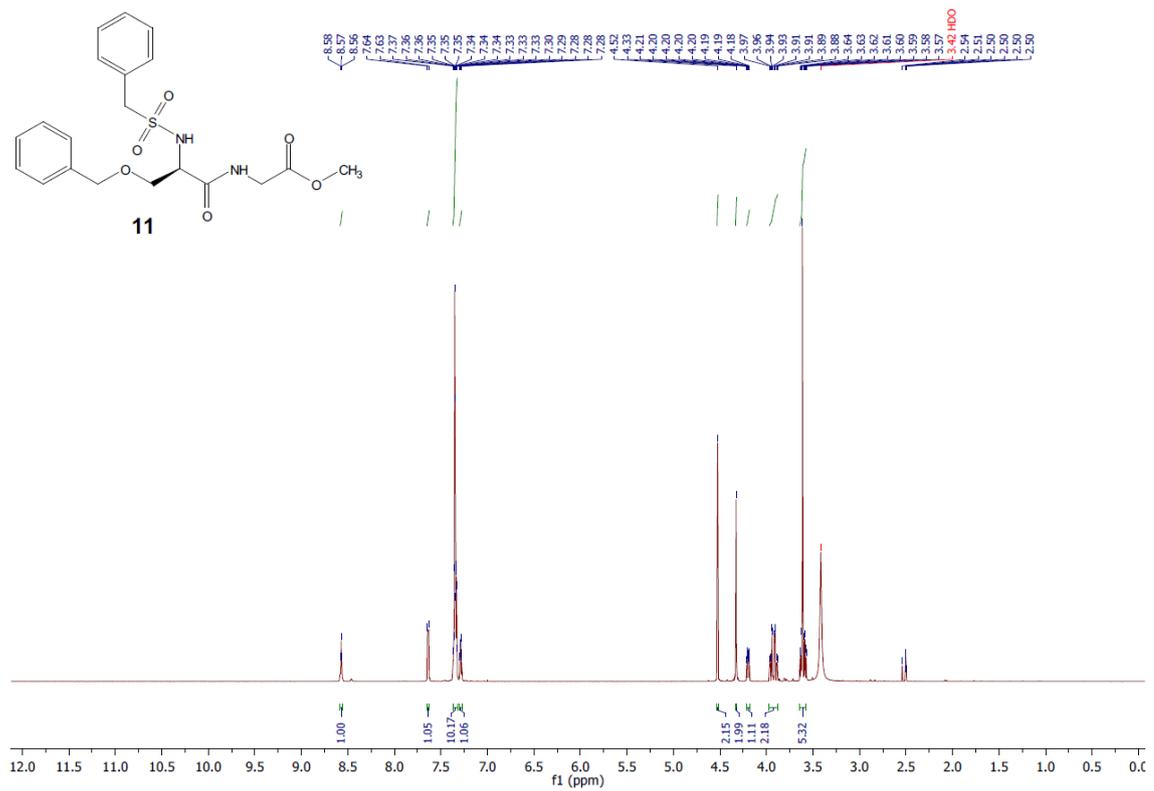


$^1\text{H}$  NMR-Spektrum (500 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ) und  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum (125 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ) von **9**

A. Tabellen und Spektren

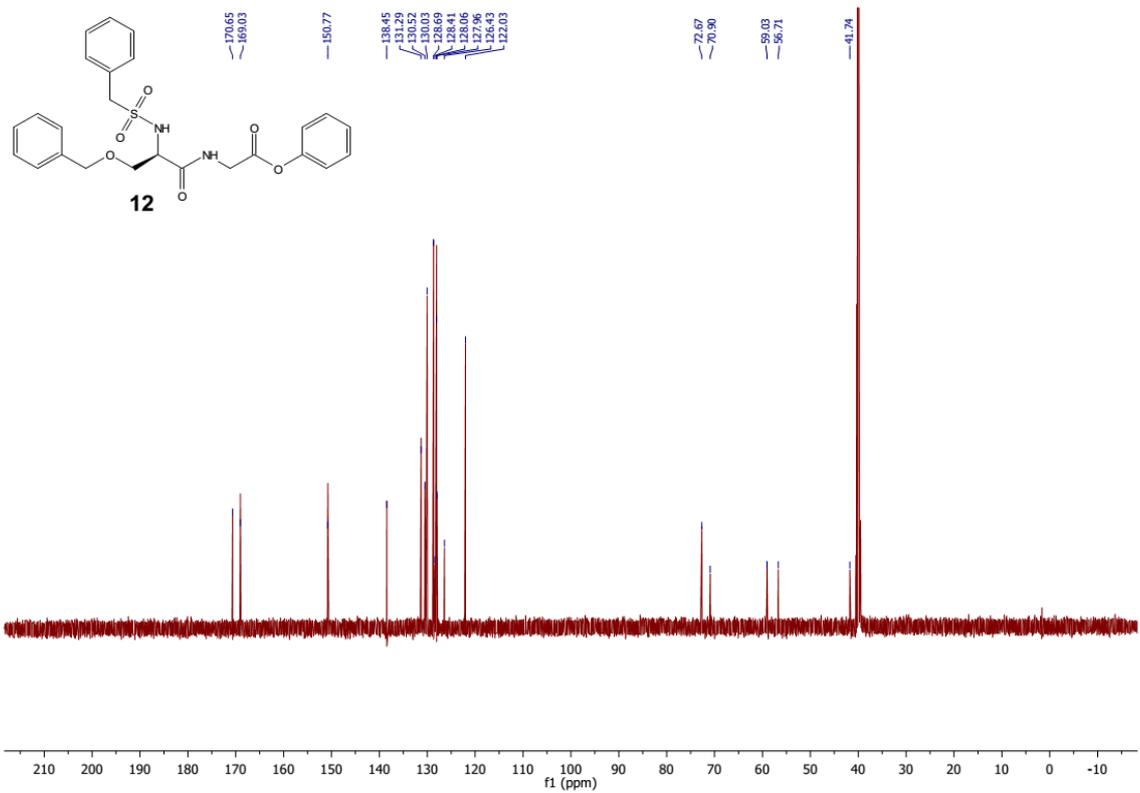
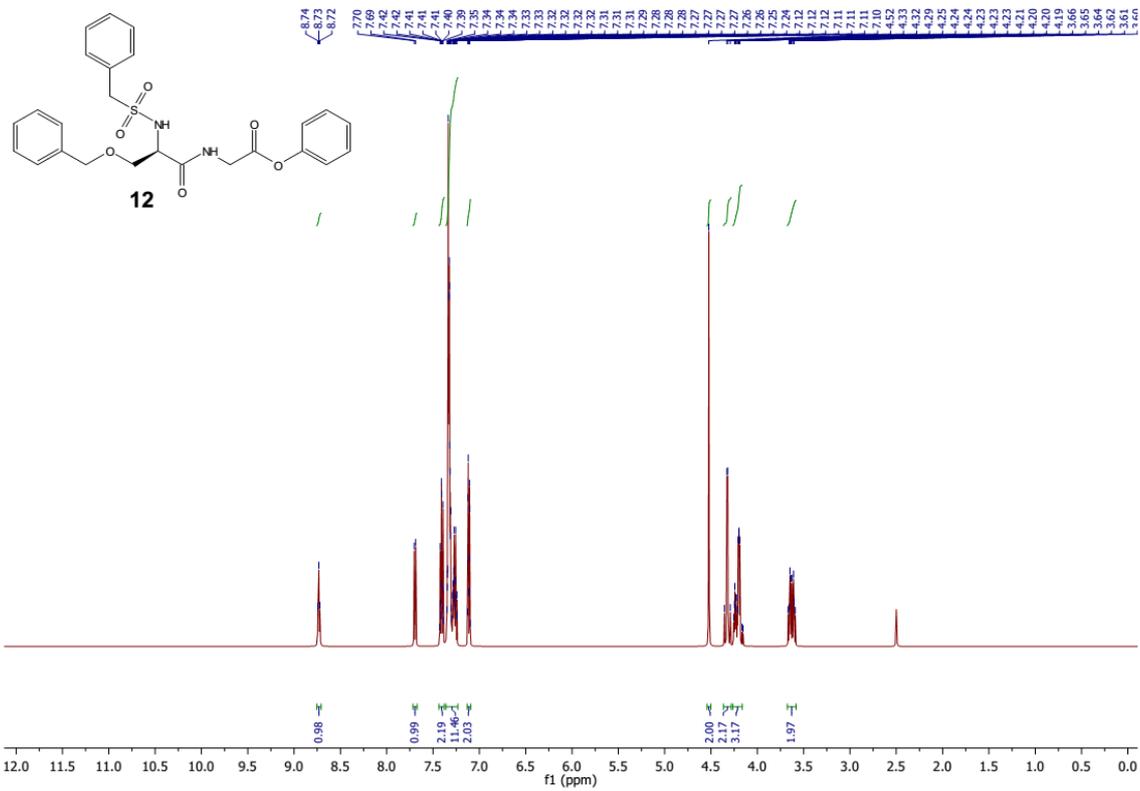


**<sup>1</sup>H NMR-Spektrum (700 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) und <sup>13</sup>C-NMR-Spektrum (125 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) von 10**

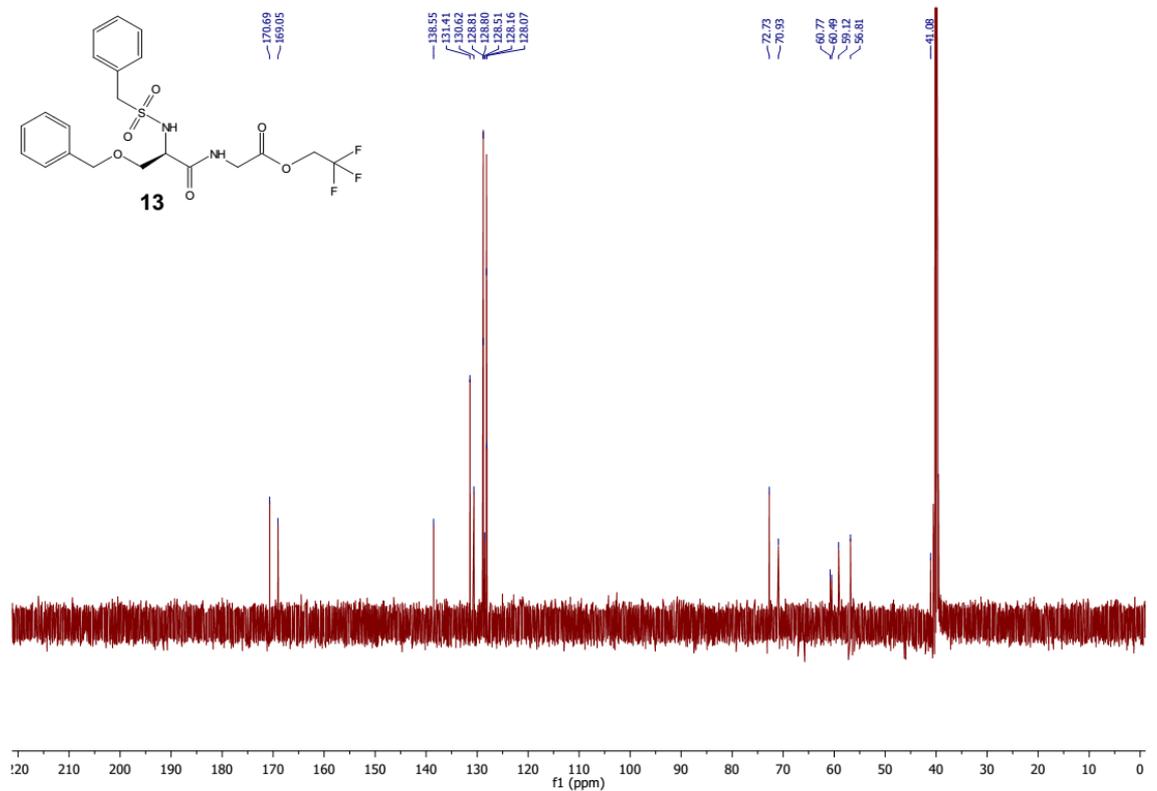
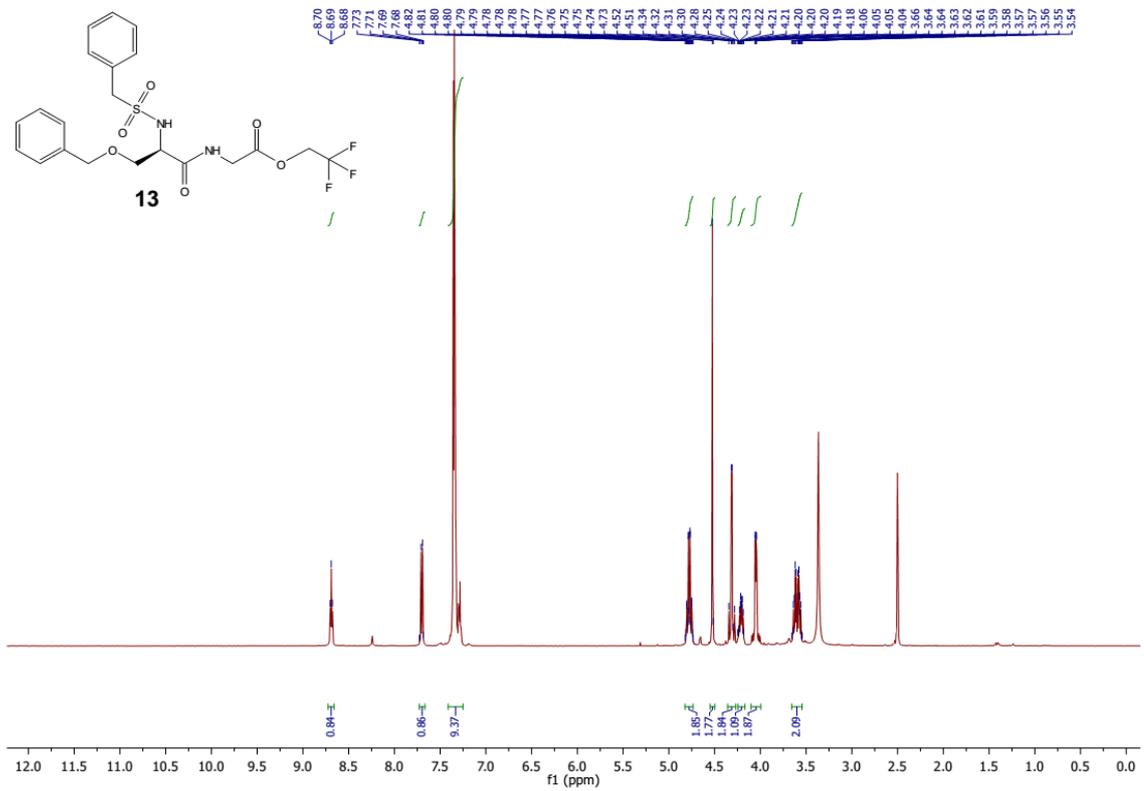


<sup>1</sup>H-NMR-Spektrum (500 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) und <sup>13</sup>C-NMR-Spektrum (125 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) von **11**

A. Tabellen und Spektren

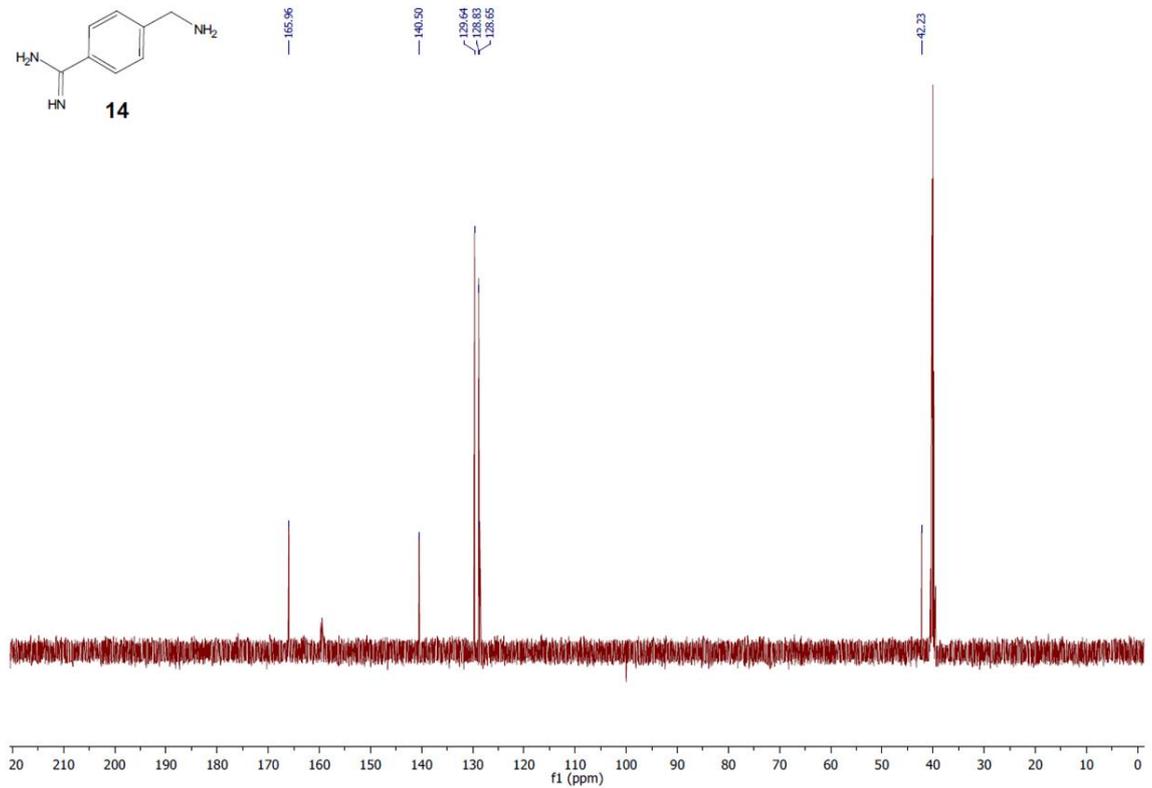
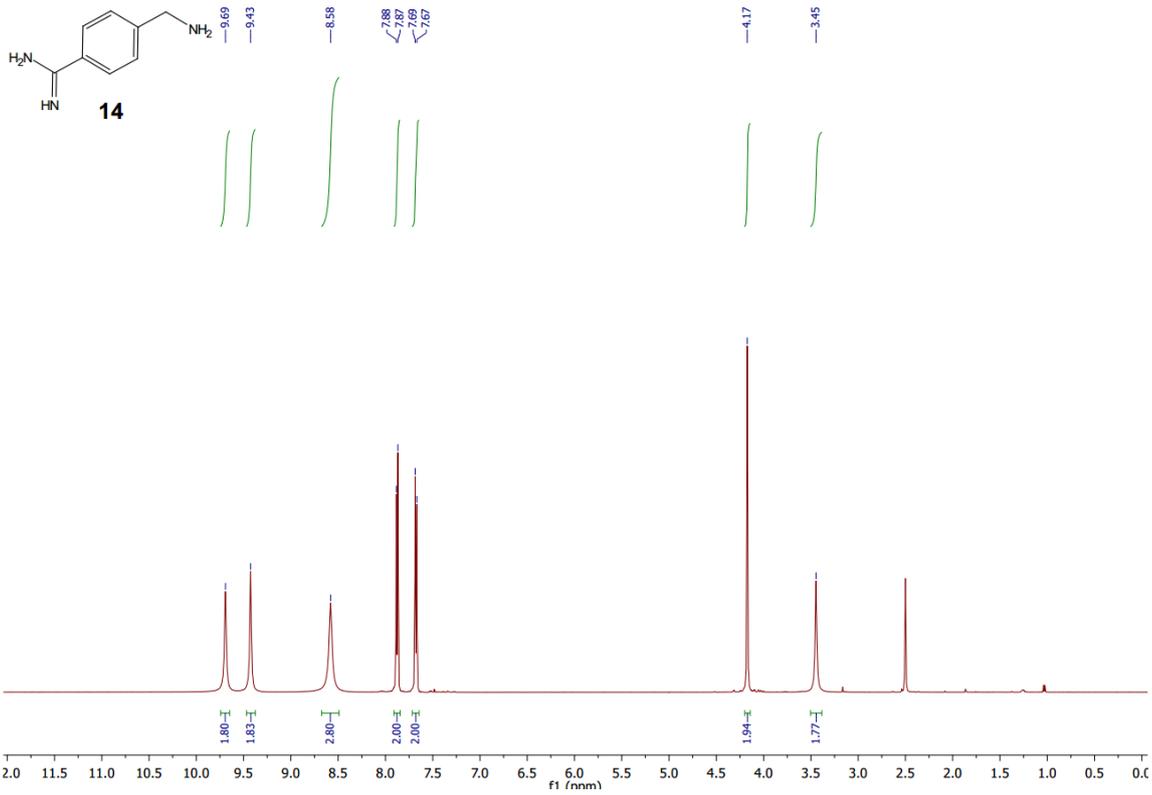


**<sup>1</sup>H NMR-Spektrum (500 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) und <sup>13</sup>C-NMR-Spektrum (125 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) von 12**

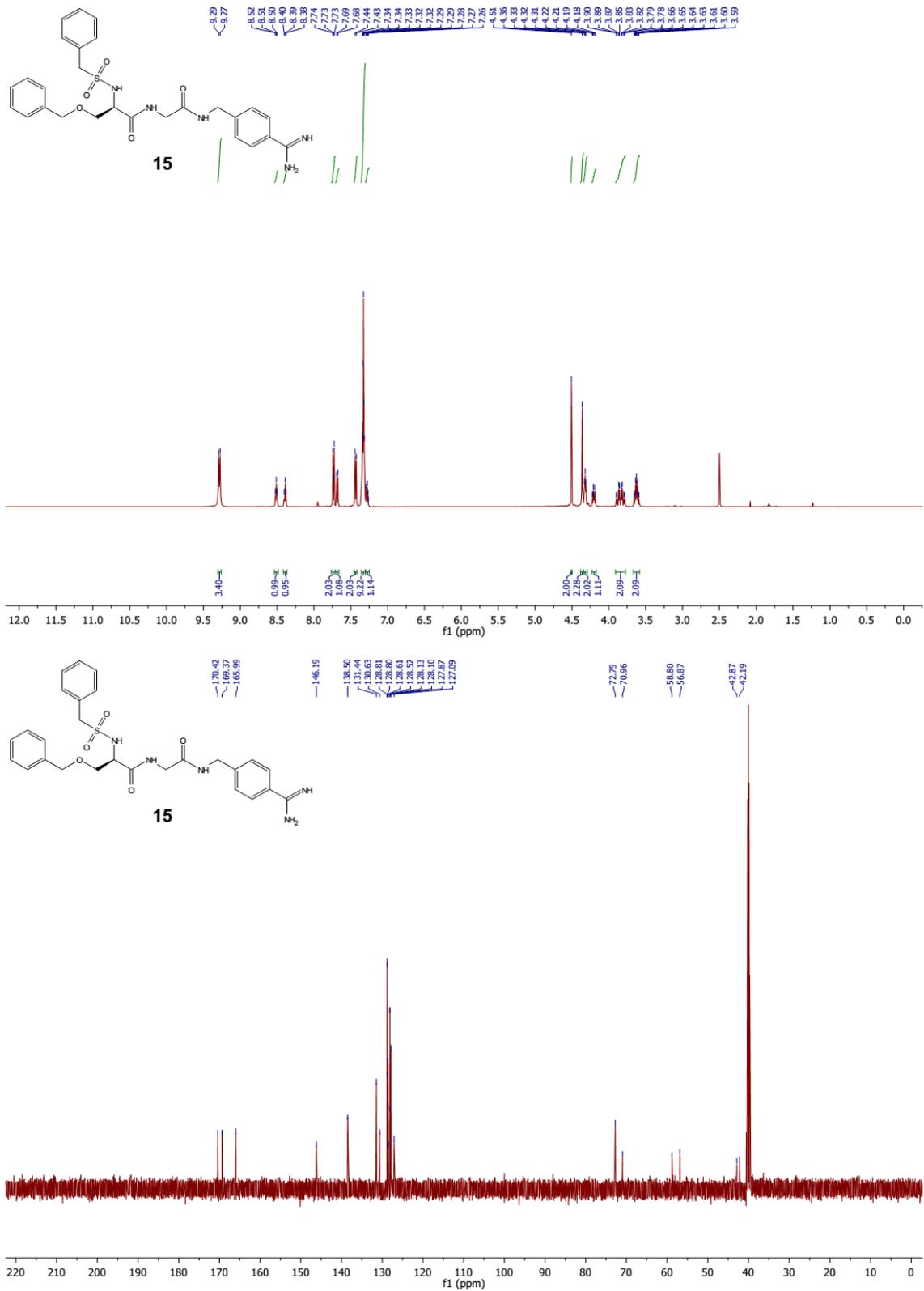


$^1\text{H}$  NMR-Spektrum (500 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ) und  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum (125 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ) von **13**

A. Tabellen und Spektren

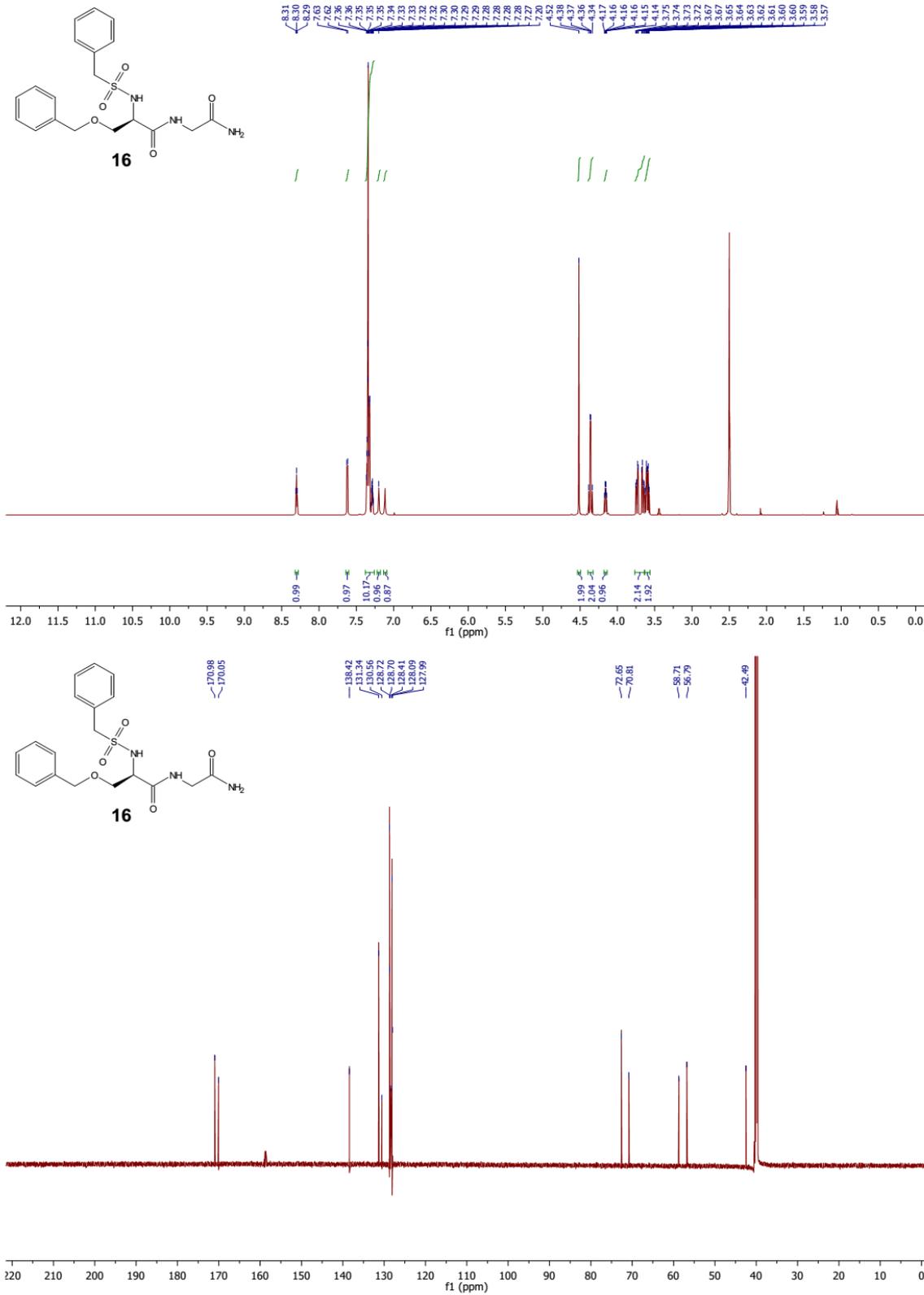


$^1\text{H}$  NMR-Spektrum (500 MHz, DMSO- $d_6$ ) und  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum (125 MHz, DMSO- $d_6$ ) von **14**

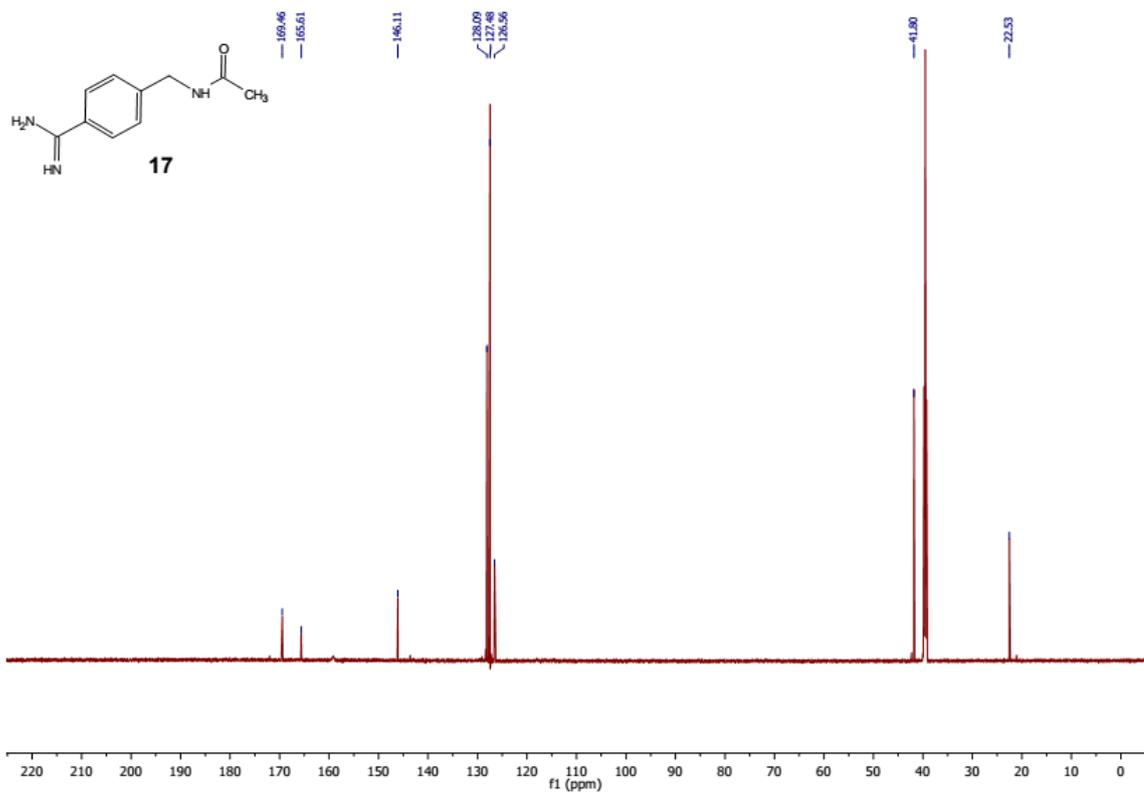
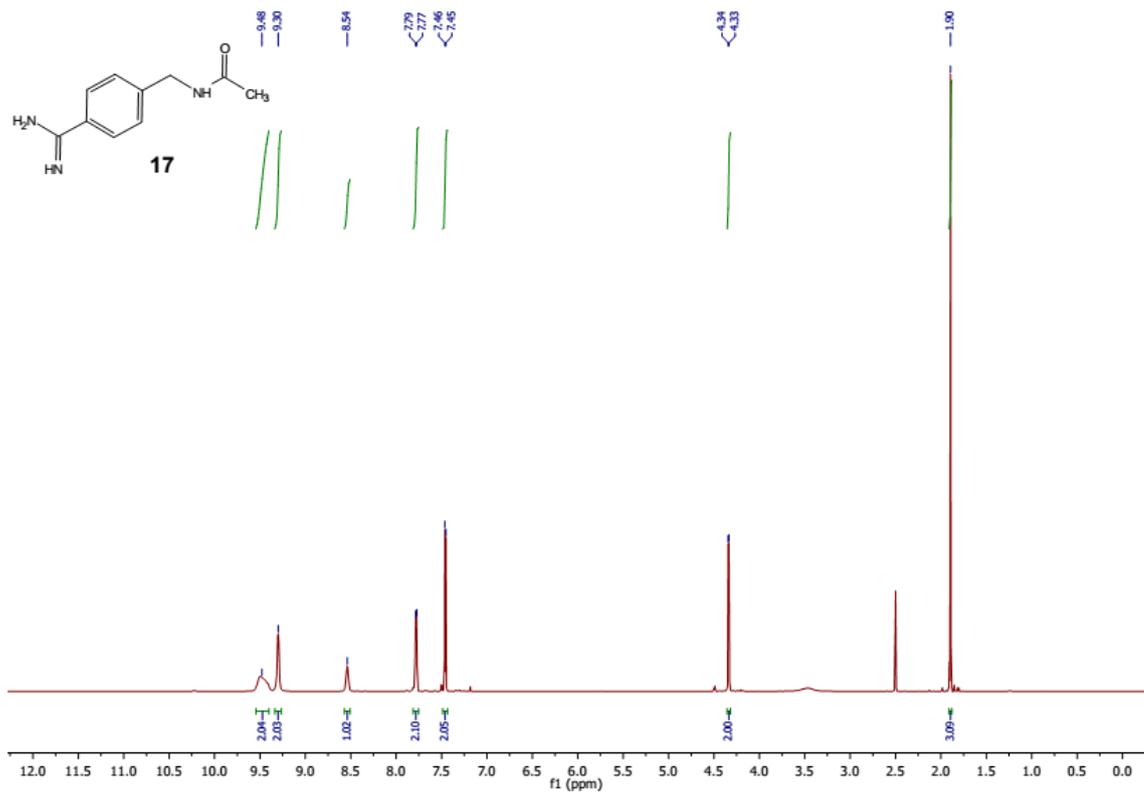


$^1\text{H}$  NMR-Spektrum (500 MHz, DMSO- $d_6$ ) und  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum (125 MHz, DMSO- $d_6$ ) von 15

A. Tabellen und Spektren

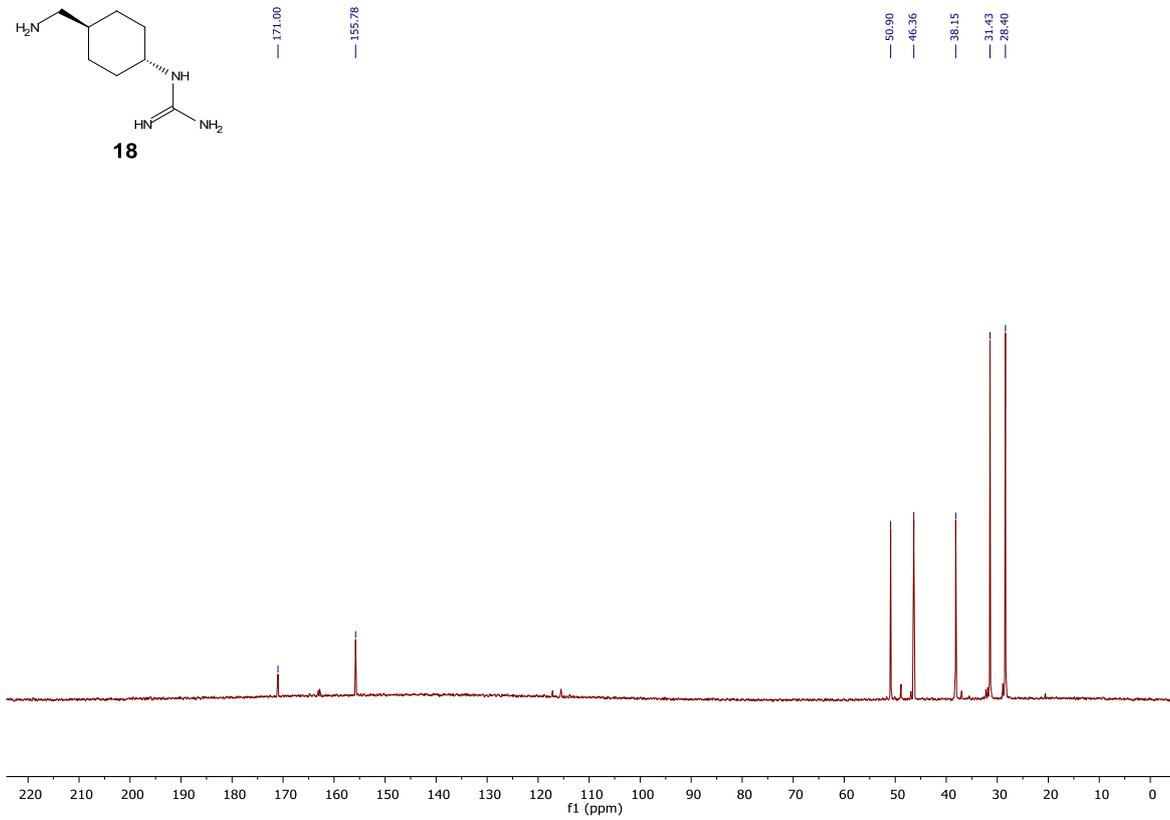
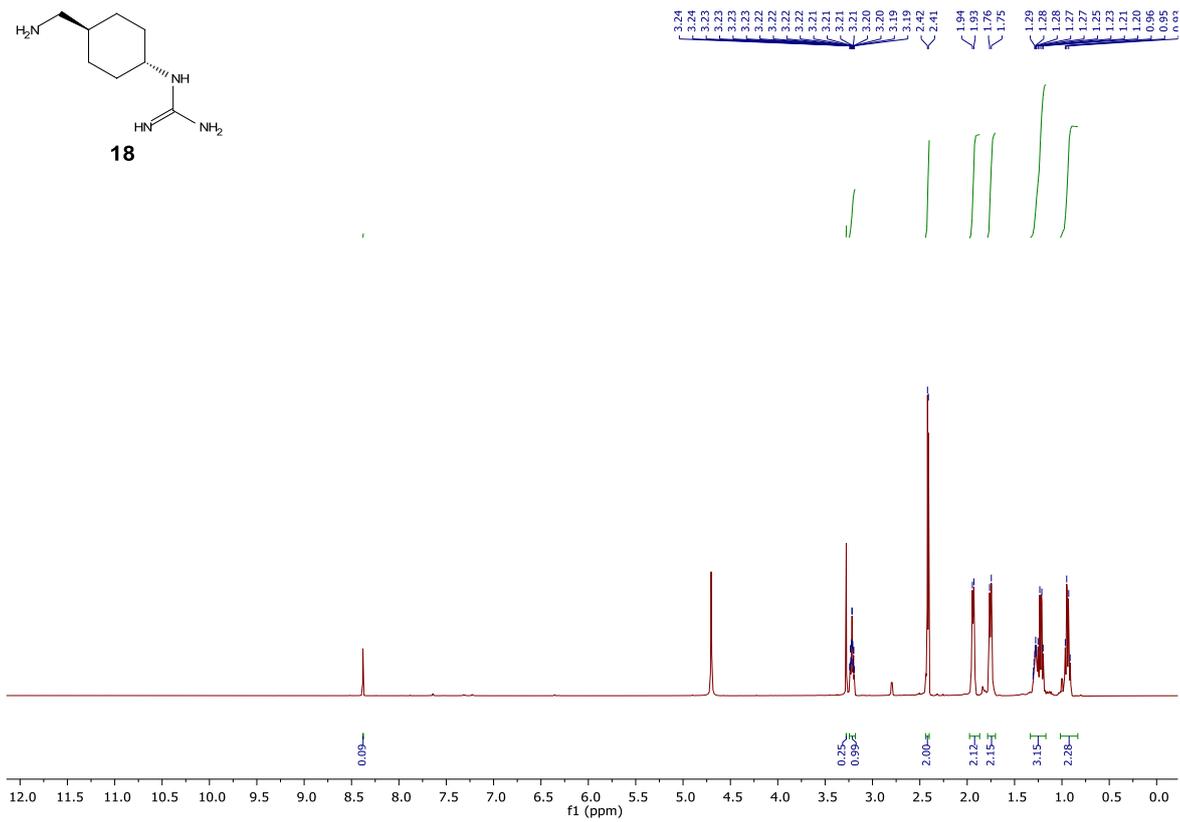
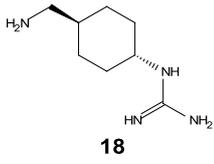


**<sup>1</sup>H NMR-Spektrum (700 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) und <sup>13</sup>C-NMR-Spektrum (125 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) von 16**

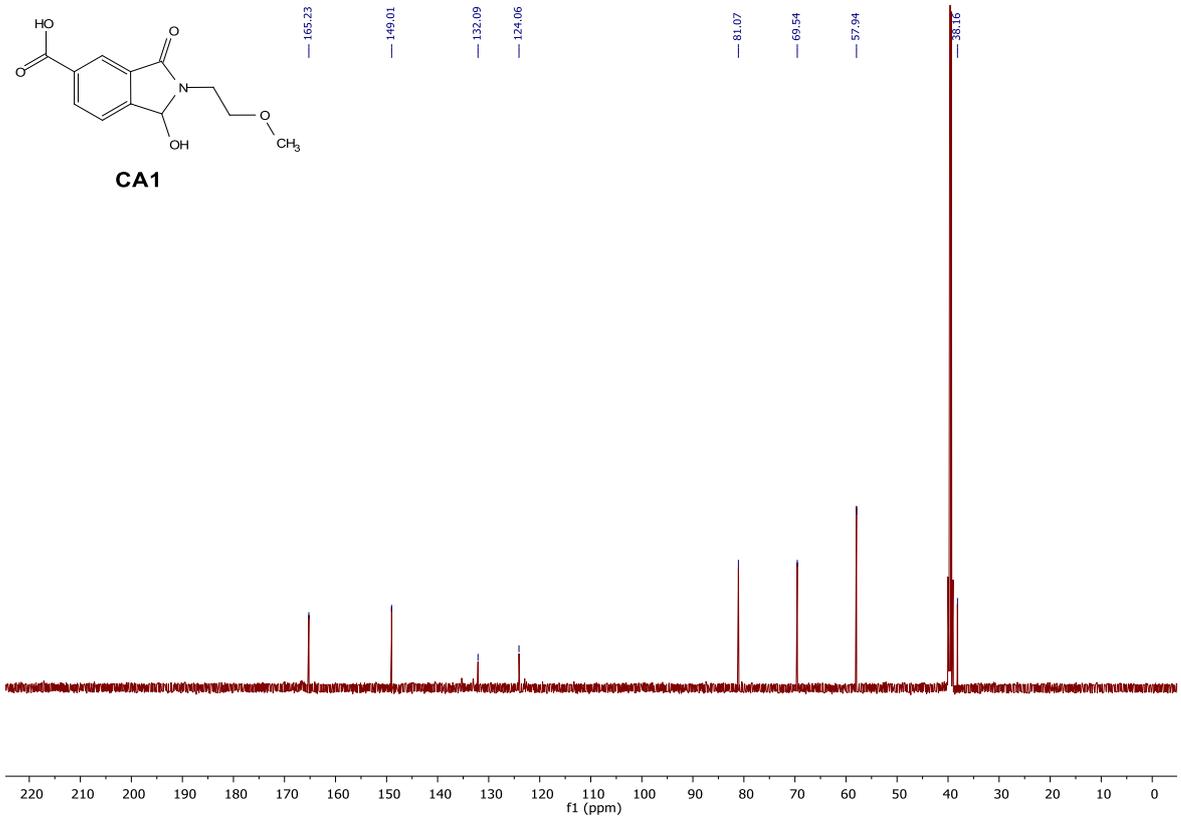
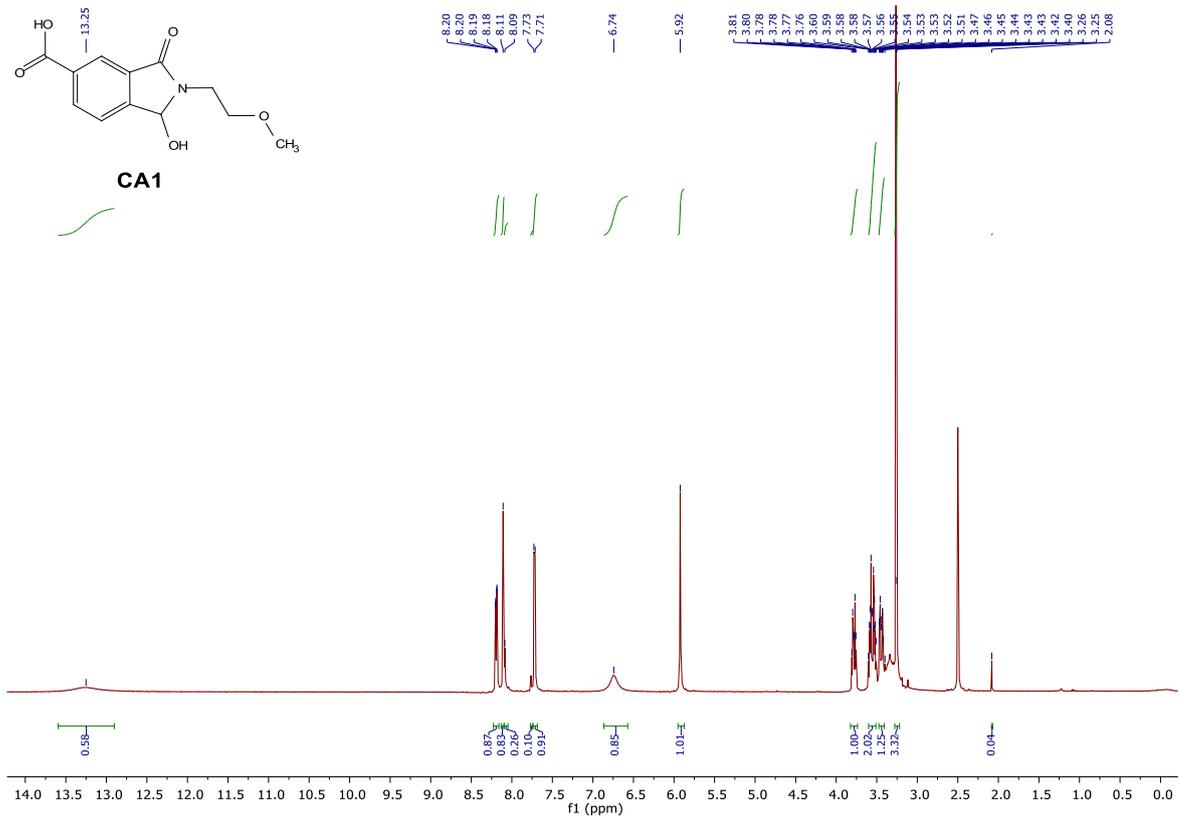


<sup>1</sup>H NMR-Spektrum (700 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) und <sup>13</sup>C-NMR-Spektrum (125 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) von **17**

A. Tabellen und Spektren

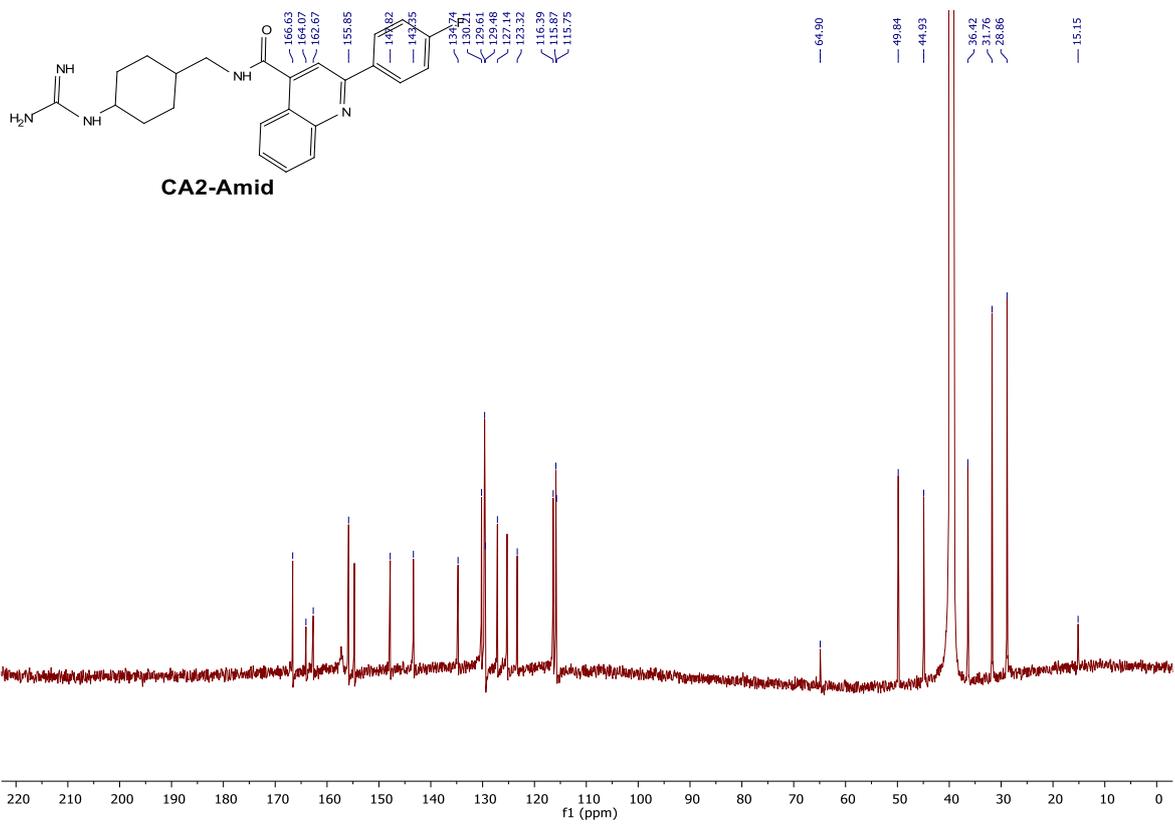
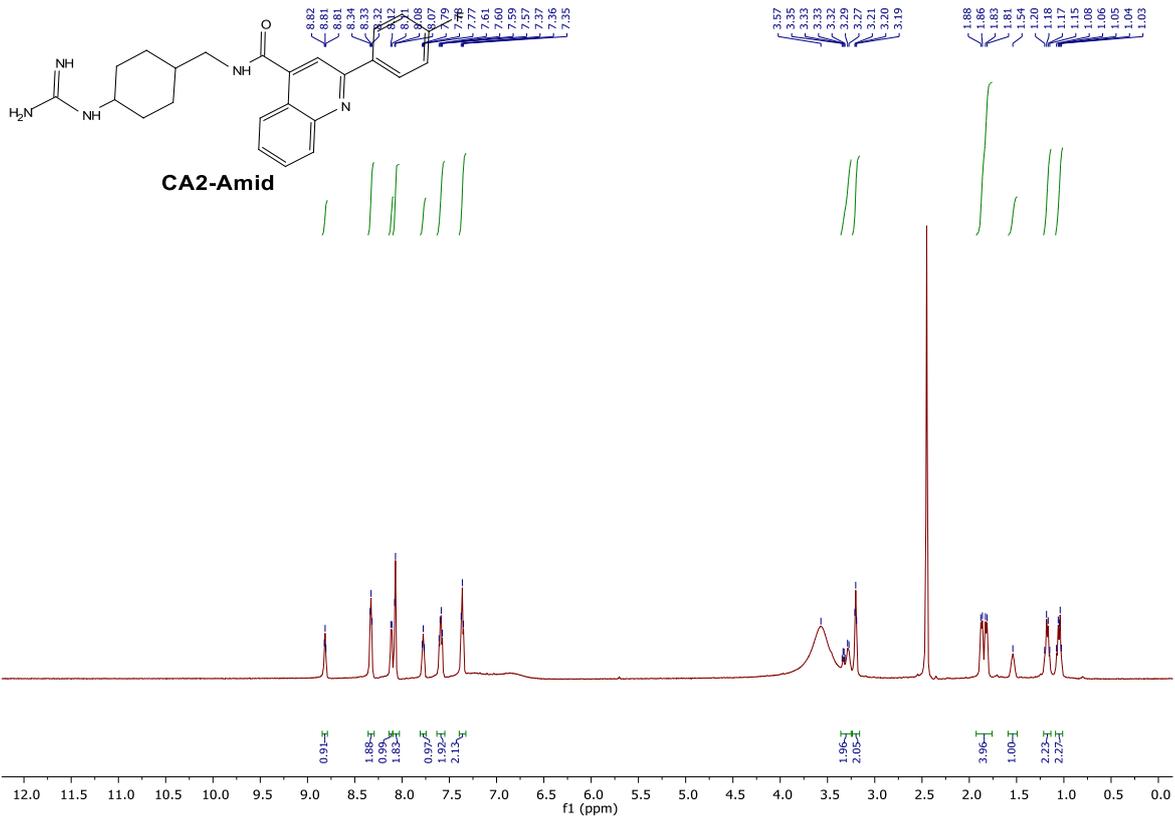


**<sup>1</sup>H NMR-Spektrum (700 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) und <sup>13</sup>C-NMR-Spektrum (125 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) von 18**

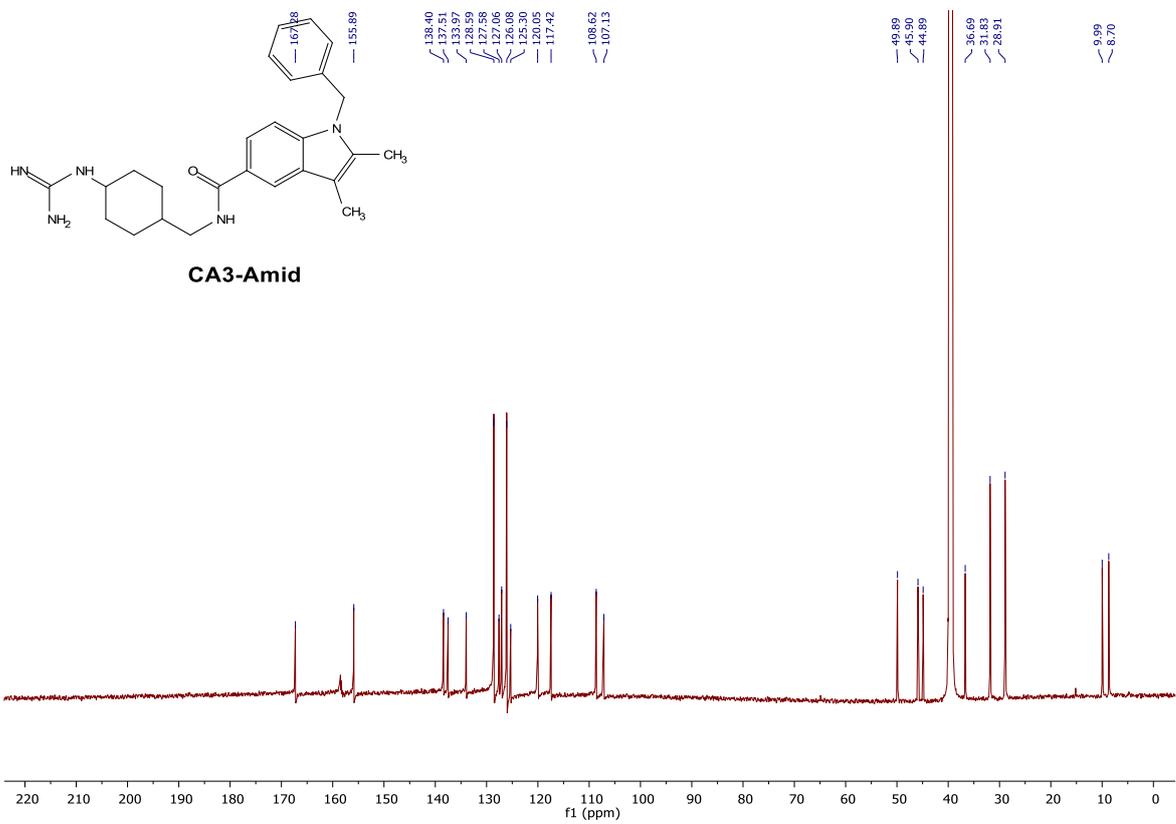
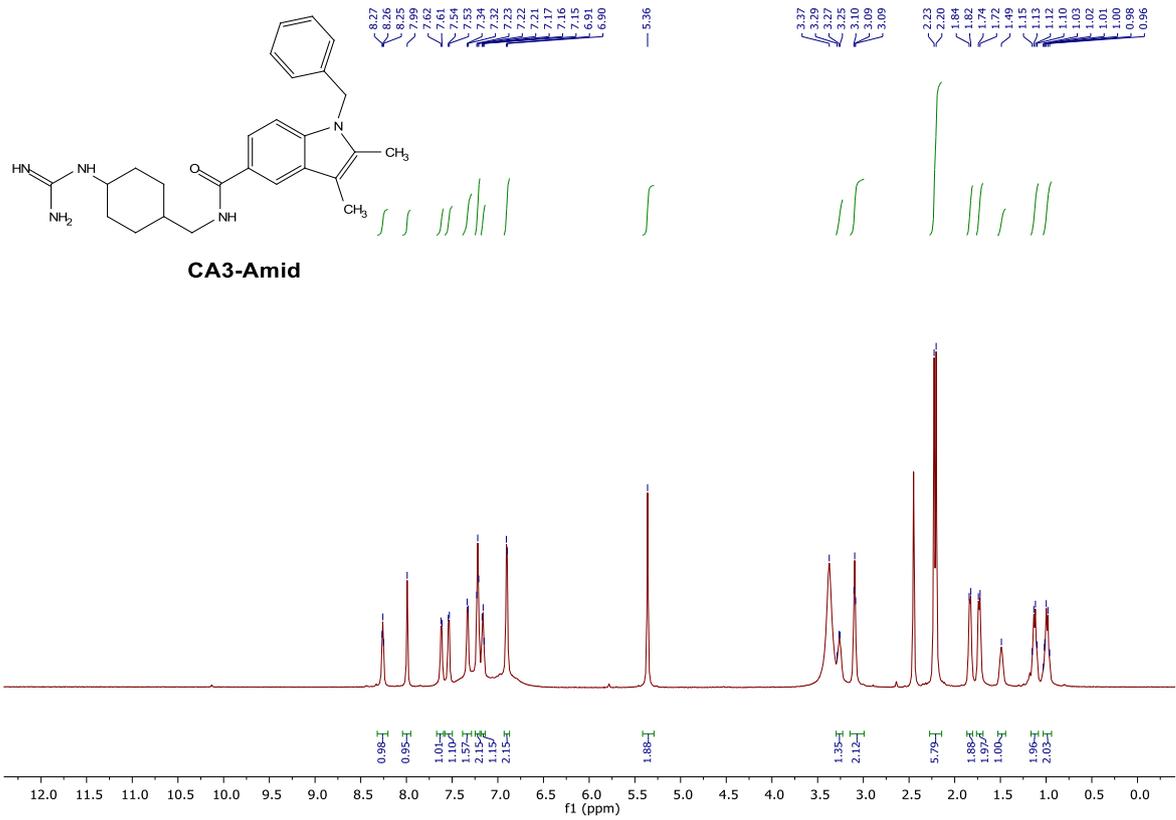


$^1\text{H}$  NMR-Spektrum (500 MHz, DMSO- $d_6$ ) und  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum (125 MHz, DMSO- $d_6$ ) von CA1

A. Tabellen und Spektren



$^1\text{H}$  NMR-Spektrum (700 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ) und  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum (125 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ) von CA2-Amid



**<sup>1</sup>H NMR-Spektrum (700 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) und <sup>13</sup>C-NMR-Spektrum (125 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) von CA3-Amid**