

DYNAMISCHES LIGATIONSSCREENING ZUR IDENTIFIZIERUNG VON PROTEINLIGANDEN

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

Marco Schmidt

aus Berlin

Februar 2009

Marco Schmidt
Leibniz-Institut für Molekulare Pharmakologie (FMP)
Robert-Rössle-Straße 10
13125 Berlin
e-mail: mcschmidt@fmp-berlin.de

Die vorliegende Arbeit wurde unter Anleitung von

Herrn Prof. Dr. Jörg Rademann

in der Zeit von November 2005 bis November 2008 am Leibniz-Institut für Molekulare Pharmakologie (FMP) Berlin sowie am Institut für Chemie und Biochemie der Freien Universität Berlin angefertigt.

1. Gutachter: Prof. Dr. Jörg Rademann

2. Gutachter: Prof. Dr. Wolfram Saenger

Disputation am 27.05.2009

„Subjektiv gesehen muss Evolution sehr häufig gleichbedeutend mit Krankheit gewesen sein. Und diese Krankheiten waren natürlich molekularer Natur. Das Auftauchen des Konzepts von “gut” und “böse”, von den Menschen als die leidvolle Vertreibung aus dem Paradies interpretiert, war vielleicht eine solche molekulare Krankheit, die sich als Evolution herausstellte.“

Aus Zuckerstandl, E.; Pauling, L.
In: Kasha, M.; Pullham, B. (Hrsg.)
Horizonts in Biochemistry.
London/New York (Academic
Press) 1964. S. 189-225.

INHALTSVERZEICHNIS

INHALTSVERZEICHNIS	i
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	vii
1. EINLEITUNG	1
1.1 WARUM PROTEINLIGANDEN?	1
1.2 DER WEG ZUM ARZNEIMITTEL – DIE MEDIZINISCHE CHEMIE	2
1.3 EMPIRISCHE REGELN FÜR DIE ENTWICKLUNG EINES WIRKSTOFFES	4
1.4 KOMBINATORISCHE CHEMIE UND <i>HIGH-THROUGHPUT SCREENING</i> (HTS)	5
1.5 DAS KONZEPT DER FRAGMENTBASierten WIRKSTOFFENTWICKLUNG	7
1.5.1 FRAGMENTBASIERTE WIRKSTOFFENTWICKLUNG MITTELS STRUKTURBIOLOGIE	7
1.5.2 SUBSTRATAKTIVITÄTSSCREENING (SAS)	9
1.5.3 DYNAMISCH-KOMBINATORISCHE CHEMIE	11
1.5.4 <i>TETHERING</i>	13
1.5.5 DYNAMISCH-KOMBINATORISCHE RESOLUTION	14
1.5.6 REZEPTOR-VERMITTELTE SYNTHESE	16
1.5.7 PSEUDO-KOMBINATORISCHE CHEMIE	17
2. FRAGESTELLUNG	19
3. DAS SCHWERE AKUTE RESPIRATORISCHE SYNDROM - SARS	21
3.1 SCHWERES AKUTES RESPIRATORISCHES SYNDROM CORONAVIRUS – SARS-CoV	21
3.2 MOLEKULARE MECHANISMEN DER INFEKTION	21
3.3 DIE <i>SARS CORONAVIRUS-ASSOCIATED MAIN PROTEASE</i> (SARS-CoV M ^{pro})	23
3.4 ENTWICKLUNG EINES INHIBITORS FÜR DIE SARS-CoV M ^{pro}	26
3.4.1 SYNTHESE VON PEPTIDLADENHINHIBITOREN	26
3.4.2 DESIGN UND EVALUATION DER PEPTIDALDEHYDINHIBITORBIBLIOTHEK	27
3.4.3 ENTWICKLUNG EINES DYNAMISCH-KONTROLLIERTEN FRAGMENTSCREENINGASSAYS – DAS DYNAMISCHE LIGATIONSSCREENING (DLS)	30

3.4.4 IDENTIFIZIERUNG VON FRAGMENTEN FÜR DIE SUBTASCHEN S1 UND S1* ERMÖGLICHEN DIE ENTWICKLUNG EINES DER BESTEN REVERSIBLEN <i>DRUG-LIKE</i> INHIBITOREN DER SARS-CoV M ^{pro}	31
4. HUMAN IMMUNODEFICIENCY VIRUS – HIV	39
4.1 AIDS UND HIV	39
4.2 MOLEKULARE URSACHEN DER INFEKTION	39
4.3 DIE <i>HIGHLY ACTIVE ANTI-RETROVIRAL THERAPY</i> – HAART	41
4.4 DIE <i>HUMAN IMMUNODEFICIENCY VIRUS 1 PROTEASE</i> (HIV1-PROTEASE)	42
4.5 ENTWICKLUNG EINES HIV1-PROTEASEINHIBITORS MIT HILFE DES DYNAMISCHEN LIGATIONSSCREENING (DLS)	44
4.5.1 DYNAMISCHES LIGATIONSSCREENING FÜR DIE P1*-POSITION	45
4.5.2 DYNAMISCHES LIGATIONSSCREENING FÜR DIE P2-POSITION	47
4.6 SYNTHESE UND EVALUATION DES DURCH DLS IDENTIFIZIERTEN HIV1-PROTEASEINHIBITORS	49
5. CYSTEINASPARTYLPROTEASE 3 (CASPASE 3)	53
5.1 CASPASE 3 UND APOPTOSE	53
5.2 ERWEITERUNG DES DYNAMISCHEN LIGATIONSSCREENING ZUR UNTERSCHIEDUNG VON KOMPETITIVEN UND KOOPERATIVEN BINDERN	54
5.2.1 ENTWICKLUNG EINER FLUORESCENZSONDE FÜR DIE CASPASE 3	56
5.2.2 SCREENING DER FMP-BIBLIOTHEK NACH KOMPETITIVEN INHIBITOREN UND KOOPERATIVEN BINDER FÜR DIE CASPASE 3	57
5.2.3 SIMULATION UND VERGLEICH ADDITIVER UND KOOPERATIVER BINDUNG	58
5.2.4 SYNTHESE UND EVALUIERUNG EINES CASPASE 3 INHIBITORS BEI IRREVERSIBLER VERKNÜPFUNG DES IDENTIFIZIERTEN KOOPERATIVEN FRAGMENTS UND DEM NATIVEN BINDUNGSMOTIV	61

6. MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS PROTEINTYROSIN- PHOSPHATASE A (MptpA)	63
6.1 TUBERKULOSE UND MptpA	63
6.2 ENTWICKLUNG EINES DYNAMISCHEN LIGATIONSSUBSTRAT- SCREENING-ASSAYS ZUR SIMULTANEN IDENTIFIZIERUNG KOMPETITIVER INHIBITOREN UND KOOPERATIVER BINDER	65
6.2.1 UNTERSUCHUNG DER FRAGMENTBIBLIOTHEK IM SUBSTRATLIGATIONSASSAY MIT MptpA	68
6.2.2 UNTERSUCHUNG DER FRAGMENTBIBLIOTHEK IM SUBSTRATLIGATIONSASSAY MIT PTPN7	69
6.2.3 UNTERSUCHUNG DER FRAGMENTBIBLIOTHEK IM SUBSTRATLIGATIONSASSAY MIT SHP2	70
6.2.4 UNTERSUCHUNG DER FRAGMENTBIBLIOTHEK IM SUBSTRATLIGATIONSASSAY MIT PTPRR	72
6.2.5 UNTERSUCHUNG DER FRAGMENTBIBLIOTHEK IM SUBSTRATLIGATIONSASSAY MIT PTP1B	73
6.3 SYNTHESE UND EVALUATION DES POTENZIELLEN MptpA- INHIBITORS	76
7. ZUSAMMENFASSUNG	81
8. EXPERIMENTELLER TEIL	85
8.1 MATERIALIEN	85
8.2 GERÄTE UND ANALYTISCHE METHODEN	85
8.2.1 DÜNNESCHICHTCHROMATOGRAPHIE (DC)	85
8.2.2 KERNRESONANZSPEKTROSKOPIE (NMR)	85
8.2.3 HPLC/ESI/MS-KUPPLUNG	86
8.2.4 HOCHAUFLÖSUNGSMASSENSPEKTROMETRIE	86
8.2.5 PRÄPARATIVE HOCHLEISTUNGSFLÜSSIGKEITS- CHROMATOGRAPHIE	86
8.2.6 UV/VIS-SPEKTROSKOPIE	87
8.2.7 NINHYDRIN-TEST NACH KAISER – NACHWEIS PRIMÄRER AMINE	87
8.2.8 MIKROTITERPLATTENPHOTOMETER „SAFIRE II®“ DER FIRMA TECAN	87
8.2.9 MIKROWELLENUNTERSTÜTZTE SYNTHESE	88

8.3 SYNTHESVORSCHRIFTEN	88
8.3.1 ALLGEMEINES PROTOKOLL DER FESTPHASENSYNTHESE	88
8.3.1.1 BELEGUNG VON 2-CHLORTRIPHENYLMETHYL- CHLORIDHARZ MIT FMOC-AMINOSÄUREN	88
8.3.1.2 FLUORENYLMETHOXYCARBONYL-(FMOC)- ENTSCHÜTZUNG	88
8.3.1.3 PEPTIDKUPPLUNGSPROTOKOLL	89
8.3.1.4 ACETYLIERUNG DES N-TERMINUS	89
8.3.1.5 ACETYLIERUNG DES N-TERMINUS MIT 5-(6)-CARBOXYFLUORESCEIN	89
8.3.1.6 PEPTIDABSPALTUNG UND AUFARBEITUNG	89
8.3.2 7-AMINO-4-METHYL-3-COUMARIN- ESSIGSÄURE (AMCA)-GELABELTE PEPTIDE	90
8.3.2.1 <i>N</i> -FMOC-7-AMINO-4-METHYL-3-COUMARIN- ESSIGSÄURE	90
8.3.2.2 IMMOBILISIERUNG VON FMOC-7-AMINO-4- METHYL-3-COUMARINESSIGSÄURE (FMOC-AMCA) AN RINK AMID HARZ	91
8.3.2.3 FMOC-SPPS AN <i>N</i> -FMOC-AMCA BELEGTEN RINK AMID HARZ	91
8.3.3 PEPTIDALDEHYDINHIBITOREN	92
8.3.3.1 REDUKTION VON FMOC-AMINOSÄUREN ZU FMOC-AMINOALKOHOLEN	92
8.3.3.2 OXIDATION VON FMOC-AMINOALKOHOLEN ZU FMOC-AMINOALDEHYDEN	93
8.3.3.3 SYNTHESE DER PEPTIDALDEHYDINHIBITOREN AN DER FESTPHASE	94
8.3.4 REDUKTIVE AMINIERUNG VON <i>N</i> -FMOC-AMINO- ALDEHYDEN AUF FREIE N-TERMINI VON PEPTIDBAU- STEINEN AM HARZ	95
8.3.5 3-(ACETYLAMINO)- <i>N</i> -(3-FORMYLPHENYL)- BENZAMID (90)	96

8.3.6 3 3-(ACETYLAMINO)- <i>N</i> -[3-(2-OXOETHYL)-PHENYL]- BENZAMID (91)	96
8.3.7 3-(ACETYLAMINO)- <i>N</i> -[3-(2-OXOACETYL)-PHENYL]- BENZAMID (92)	97
8.3.8 3-ACETAMIDO- <i>N</i> -[3-(2-OXO-ACETYL)-PHENYL]- BENZAMID (93)	98
8.3.9 1-(4-AMINO-FURAZAN-3-YL)-5-METHYL-1H-[1,2,3] TRIAZOL-4-CARBONSÄUREETHYLESTER (95)	99
8.3.10 1-(4-{2-[3-(3-ACETYLAMINO-BENZOYLAMINO)- PHENYL]-2-OXO-ETHYLAMINO}-FURAZAN-3-YL)- 5-METHYL-1H-[1,2,3]TRIAZOL-4-CARBONSÄURE- ETHYLESTER (98)	99
8.3.11 BIS-(9H-FLOREN-9-YLMETHOXYCARBONYLAMINO)- ESSIGSÄURE (116)	100
8.3.12 (2,4-DIBROM-6-METHYL-PHENYLAMINO)- ESSIGSÄURE (126)	100
8.3.13 <i>N</i> -((<i>S</i>)-1-BENZYL-2-OXO-ETHYL)-2-(2,4-DIBROM-6- METHYL-PHENYLAMINO)-ACETAMID (127)	101
8.3.14 <i>N</i> -{(<i>S</i>)-1-BENZYL-2-[2-(4-ETHOXY-PHENYL)-2H- BENZOTRIAZOL-5-YLAMINO]-ETHYL}-2-(2,4- DIBROM-6-METHYL-PHENYLAMINO)- ACETAMID (128)	102
8.3.15 PHOSPHORSÄUREMONO-(4-FORMYL-PHENYL)- ESTER (152)	102
8.3.16 5-AMINO-2-(2,4-DIMETHYL-PHENYL)-ISOINDOL- 1,3-DION (159)	103
8.3.17 <i>N</i> -[2-(2,4-DIMETHYL-PHENYL)-1,3-DIOXO-2,3- DIHYDRO-1H-ISOINDOL-5-YL]-4-TRIFLUOR- METHANESULFONYLAMINO-BENZAMID (188)	103
8.3.18 4-TRIFLUORMETHANSULFONYLAMINO BENZOE- SÄURE (189)	104
8.3.19 3-AMINOPHTALSÄURE (192)	105
8.4 ASSAYBESCHREIBUNGEN	105
8.4.1 SARS-CoV M ^{PRO}	105

8.4.1.1 AMCA ASSAY	105
8.4.1.2 HPLC-ASSAY	105
8.4.2 HIV1-PROTEASE	106
8.4.2.1 FRET-ASSAY	106
8.4.3 CASPASE 3	106
8.4.3.1 FLUORESZENZPOLARISATIONSSASSAY	106
8.4.3.2 AMCA ASSAY	106
8.4.4 PROTEINTYROSINPHOSPHATASEN (PTP)	107
8.4.4.1 NACHWEIS VON ANORGANISCHEM PHOSPHAT MIT MALACHITGRÜN	107
8.4.4.2 SUBSTRATAKTIVITÄTSNACHWEIS ÜBER 4-NITROPHENOLPHOSPHAT (<i>p</i> -NPP)	108
9. LITERATURVERZEICHNIS	109

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Å	Ångström, 10^{-10} m
Abs.	Absorption
abs.	wasserfrei
Ac	Acetyl
ACN	Acetonitril
AcOH	Essigsäure
Ac ₂ O	Essigsäureanhydrid
AMCA	7-Amino-4-methyl-3-coumarinacetat
arom.	aromatisch
AS	Aminosäure
br.	breit
Boc	<i>tert</i> -Butyloxycarbonyl
Boc ₂ O	<i>tert</i> -Butyloxycarbonylanhydrid
Caspase	Cysteinaspartylprotease
Cbz	Benzyloxycarbonyl
d	Dublett
δ	chemische Verschiebung
DC	Dünnschichtchromatographie
DCC	<i>N,N</i> -Dicyclohexylcarbodiimid
DCM	Dichlormethan
dest.	destilliert
DIC	<i>N,N</i> -Diisopropylcarbodiimid
DIPEA	<i>N,N</i> -Diisopropylethylamin
DMAP	4-(Dimethylamino)pyridin
DMF	<i>N,N</i> -Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i>
DTT	1,4-Dithio-DL-threitol
ε	Extinktionskoeffizient
EA	Ethylacetat
EDC	<i>N</i> -(3-Dimethylaminopropyl)- <i>N</i> -ethylcarbodiimid
eq.	Äquivalente

ESI/MS	<i>electrospray ionisation / mass spectrometry</i>
Et	ethyl
Et ₂ O	Diethylether
EtOH	Ethanol
Fmoc	9-Fluorenylmethoxycarbonyl
HATU	<i>O</i> -(7-Azabenzotriazol-1-yl)- <i>N,N,N',N'</i> -tetramethyluroniumhexafluorphosphat
HIV	<i>human immunodeficiency virus</i>
H ₂ O	Wasser
HOBT	1-Hydroxybenzotriazol
HPLC	<i>high-performance-liquid-chromatographie</i>
Hz	Hertz
IC	<i>inhibitory capacity</i>
IR	Infrarot
<i>J</i>	Skalare Kopplungskonstante
<i>K_D</i>	Dissoziationskonstante
<i>K_I</i>	Bindungskonstante des Inhibitors
λ	Wellenlänge
LC/MS	<i>liquid chromatography-mass spectrometry</i>
M	Molarität
MeOH	Methanol
MS	Massenspektrometrie
m/z	Masse-zu-Ladung-Verhältnis
N	Normal
NMM	<i>N</i> -Methylmorpholin
NMR	Kernresonanzspektroskopie
pH	potentia hydrogenii
ppm	parts per million
PS	Polystyrol
R	Rest
RNA	<i>ribonucleic acid</i>
<i>R_t</i>	Retentionszeit
RT	Raumtemperatur
s	Singulett

SARS	Schweres Akutes Respiratorisches Syndrom
SARS-CoV	Schweres Akutes Respiratorisches Syndrom Coronavirus
SARS-CoV M ^{pro}	<i>severe acute respiratory syndrome coronavirus main protease</i>
SPPS	<i>solid phase peptide synthesis</i>
t	Triplett
t	<i>time</i>
TIPS	Triisopropylsilan
THF	Tetrahydrofuran
TFA	Trifluoressigsäure
TFE	Trifluorethanol
Trt	Trityl
UV	Ultraviolett
v	Volumen
Vis	sichtbares Licht

Die in dieser Arbeit verwendete Nomenklatur orientiert sich an den von Chemical Abstracts (Chemical Abstracts, „Index Guide“, 77, 210.) und den *IUPAC-IUB*-Kommissionen für biologische Nomenklatur (IUPAC, *Eur. J. Biochem.*, **1971**, 21, 455-477; IUPAC, *Pure Appl. Chem.*, **1996**, 68, 1919; IUPAC Commission on Nomenclature of Organic Chemistry (CNO) and IUPAC-IUB Joint Commission on Biochemical Nomenclature (JBN), *Biochemistry*, **1974**, 10, 3983; IUPAC-IUB (JCBN), *Eur. J. Biochem.*, **1984**, 138, 9-37;) empfohlenen Richtlinien zur Bezeichnung der Aminosäuren durch den Ein- bzw. Dreibuchstabencode.

1. Einleitung

1.1 Warum Proteinliganden?

Als im Jahre 1953 die beiden Wissenschaftler Francis Crick und James D. Watson die Struktur der Desoxyribonukleinsäure (DNA), der Erbinformation eines jedes lebenden Systems, aufklärten, war das der Anfang eines neuen Verständnisses von Leben.^[1] Bereits 20 Jahre später war der für lebende Systeme grundlegende Fluss von Informationen zu den Funktionen beschrieben. Die DNA als Informationsträger für den Bau der Funktionsträger, den Proteinen, tritt in Wechselwirkung mit der Ribonukleinsäure (RNA), die die Information in Funktionsträger also Proteinen umsetzt. Man bezeichnet diesen Fluss auch als Molekularbiologisches Dogma (siehe auch Abb. 1.1).^[2]



Abb. 1.1 Das Molekularbiologische Dogma stellt die grundlegende Beziehung von Informationsträger, der DNA, über den Vermittler RNA zu den Funktionsträgern lebender Systeme, den Proteinen, dar.

Es war nun klar, dass entscheidende Prozesse des Lebens durch die Information der DNA bestimmt und durch die Funktionsträger, die Proteine ausgeführt werden. In diesem Zusammenhang konnten seit der Entdeckung der DNA-Struktur die molekularen Ursachen von Dysfunktionen, die sich oft den Menschen als Krankheiten offenbaren, weitgehend aufgeklärt werden. Wie kann der Mensch nun aber in diesen Prozess eingreifen, um molekulare Dysfunktionen zu beseitigen, also um Krankheiten zu lindern oder sogar zu heilen? Der Mensch hat hierfür das Konzept des kleinen Moleküls aus der Natur adaptiert.^[3] Seien es Beispiele wie das des Penicillins, der Salicylsäure oder anderer Naturstoffe. Die Natur hat gezeigt, dass man mit kleinen Molekülen, sogenannten *small molecules*, erfolgreich lebende Systeme manipulieren kann. *Small molecules* zeichnen sich dadurch aus, dass sie in der Lage sind, auf Grund ihrer geringen Größe und ihres zum Teil unpolaren Charakters, Zellmembranen zu überwinden und hochspezifisch an ein Makromolekül zu binden. Durch Bindung an das Makromolekül wird dessen Funktion moduliert. Ist das Makromolekül ein DNA- oder ein RNA-Molekül, wird die Weitergabe der genetischen Information gestört oder verstärkt, also die Transkription des Gens wird moduliert. Im Falle der ribosomalen Antibiotika wird die Translation, die Synthese des Funktionsträgers Protein, gestört. Die Modulation der Proteine beeinflusst direkt deren Funktion.

Mit Aufklärung der molekularen Ursachen vieler Krankheiten stellt sich heute die Aufgabe an die Wissenschaft und hier im Besonderen an die Disziplin der Medizinischen Chemie, kleine Moleküle zu entwickeln, die hochspezifisch an Makromoleküle binden und damit deren Funktion modulieren, um definierte Dysfunktionen auszugleichen. Aus diesem Grund wurden in den letzten 30 Jahren enorme Anstrengungen unternommen, um schnell, einfach und kostengünstig kleine Moleküle entwickeln zu können. In diesem Kontext wurde in der hier vorliegenden Dissertation mit der Entwicklung des Dynamischen Ligationscreenings ein neuer Weg in der Identifizierung von *small molecules* (kleinen Proteinliganden) beschritten.

1.2 Der Weg zum Arzneimittel – Die Medizinische Chemie

Die Medizinische Chemie ist die Disziplin der Entdeckung, Identifizierung, Entwicklung und Synthese biologisch aktiver Verbindungen. Darüber hinaus umfasst sie die Interpretation der molekularen Wirkungsweise und den Metabolismus von Wirkstoffen. Ihr Ziel ist die Entwicklung neuer Wirkstoffe mit therapeutischem Effekt, den sogenannten Medikamenten.^[4]

Im Zentrum der Medizinischen Chemie steht die Leitstruktur. Sie ist der Ausgangspunkt für die Entwicklung neuer Medikamente und zeichnet sich dadurch aus, dass sie *in vitro* schon eine erwünschte biologische Wirkung hat, aber in der Wirkstärke, Selektivität oder in den pharmakokinetischen Eigenschaften noch nicht die für einen Arzneistoff essenziellen Qualitäten zeigt. Die häufigsten Quellen zur Identifizierung neuer Leitstrukturen sind der Zufall, Inhaltsstoffe von Pflanzen, tierische Gifte, tierische und mikrobielle Wirkstoffe, Untersuchungen des Wirkstoffmetabolismus, klinische Beobachtungen, rationales Design, virtuelles Screening, *molecular modelling*, Screening von synthetischen Substanzen sowie die Nachahmung endogener Liganden. Dennoch ist allen Leitstrukturen gemein, dass sie durch chemische Modifikation in ihren pharmakologischen Eigenschaften verbessert werden können. Die Leitstruktur ist demnach ein Prototyp. Die folgende Wirkstoffoptimierung ist ein zyklischer, iterativer Prozess aus chemischer Synthese und biologischer Evaluation.^[5] Das Ergebnis der iterativen Optimierung sind Kandidaten für die weitere Entwicklung, aus denen nach präklinischer und toxikologischer Prüfung Entwicklungssubstanzen ausgewählt werden. Pharmazeutische Formulierung, klinische Prüfung und Zulassung führen dann zum Arzneimittel.

Die Fortschritte in der Molekularbiologie der letzten Jahre haben ein weites Spektrum an potenziellen Wirkstoffzielen wie Enzymen oder Rezeptoren hervorgebracht. Zur Entwicklung von zukünftigen Wirkstoffen, die diese Ziele inhibieren, verwendet man im Allgemeinen die Strategien der Synthese großer Substanzbibliotheken mittels der Kombinatorischen Chemie

sowie dem *high-throughput screening* (HTS) dieser Bibliotheken. In den vergangenen Jahren zeigte sich, dass die oben genannte Strategie Nachteile aufweist.

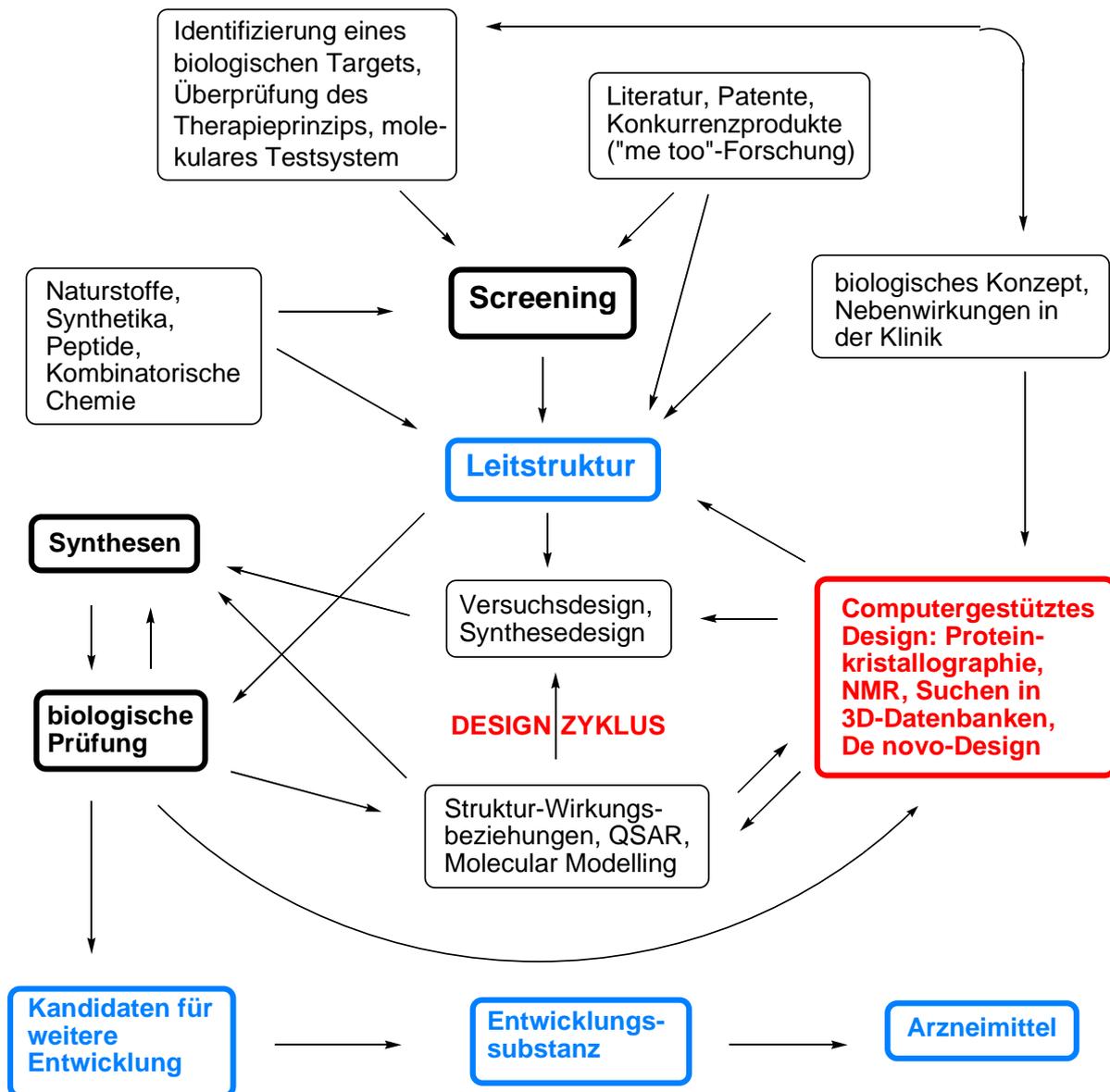


Abb. 1.2: Lang ist der Weg zum Arzneimittel. Der obere Teil der Abb. zeigt Wege zur Leitstruktur. Der mittlere Teil beschreibt den Design-Cyclus, der in praktisch allen Fällen mehrfach durchlaufen werden muss. Das Ergebnis der iterativen Optimierung sind Kandidaten für die weitere Entwicklung, aus denen nach präklinischer und toxikologischer Prüfung Entwicklungssubstanzen ausgewählt werden. Pharmazeutische Formulierung, klinische Prüfung und Zulassung führt dann zum Arzneimittel.^[5]

1.3 Empirische Regeln für die Entwicklung eines Wirkstoffes

Mit der Einführung der Kombinatorischen Chemie glaubte man zunächst, dass sich die Zahl der Medikamente einfach durch eine große Zahl an synthetisierten und biologisch evaluierten Verbindungen erhöhen ließe. Leider zeigte sich jedoch, dass die ersten kombinatorisch erzeugten Bibliotheken nicht optimal waren, da sie meist große, lipophile, flexible Moleküle enthielten. Aus dieser Erfahrung heraus wird nun bereits bei dem Design von Bibliotheken versucht, Wirkstoff-ähnliche Moleküle (*drug-like molecules*) zu generieren.

Wie sehen aber Wirkstoff-ähnliche Moleküle aus? Zum Einen muss sichergestellt werden, dass der Wirkstoff seinen Wirkort erreichen kann. Daher muss das Molekül sowohl mit einer wässrigen wie auch einer lipophilen Umgebung wechselwirken können. Nur Substanzen mit einer mittleren Lipophilie vermögen sowohl durch wässrige als auch durch lipophile Phasen zu gelangen. Zudem setzen sich viele Bindungsstellen in Makromolekülen aus polaren und unpolaren Bereichen zusammen. Viele quantitative Struktur-Wirkungsbeziehungen zeigen daher eine deutliche Korrelation zwischen Lipophilie einer Verbindung und deren biologischer Wirkung. Zur Beschreibung der Lipophilie hat sich der Verteilungskoeffizient P (partition coefficient) zwischen Oktan-1-ol und Wasser als sehr geeignet erwiesen.^[6]

$$P = \frac{[\text{Verbindung}]_{\text{Oktan-1-ol}}}{[\text{Verbindung}]_{\text{Wasser}} \cdot (1 - \alpha)} \quad (1)$$

α : Dissoziationsgrad der Verbindung in Wasser

Für Verbindungen, die in Oktan-1-ol besser löslich sind als in Wasser, ist $P > 1$ und $\log P$ wird dadurch positiv. Der $\log P$ -Wert setzt sich additiv aus den Gruppenbeiträgen einzelner Teile des Moleküls zusammen. Einige Chemie-Software besitzen bereits eine Funktion zur Berechnung von $\log P$ für eine beliebige Verbindung, die aber zum Teil von den im Experiment gewonnenen Daten erheblich abweichen.

Durch die Analyse von 2 245 oral bioverfügbaren Wirkstoffen konnten Lipinsky et al. von der Firma Pfizer einige allgemeine Eigenschaften für diese Substanzen ableiten.^[7]

Die als *rule of five* bekannt gewordenen Gesetzmäßigkeiten trafen auf ca. 90 % der untersuchten Verbindungen zu:

- $\log P < 5$
- Molekulargewicht < 500 g/mol
- Anzahl der Wasserstoff-Donatoren < 5
- Anzahl der Wasserstoff-Akzeptoren < 10
- Eine der vier vorgenannten Regeln kann verletzt werden.

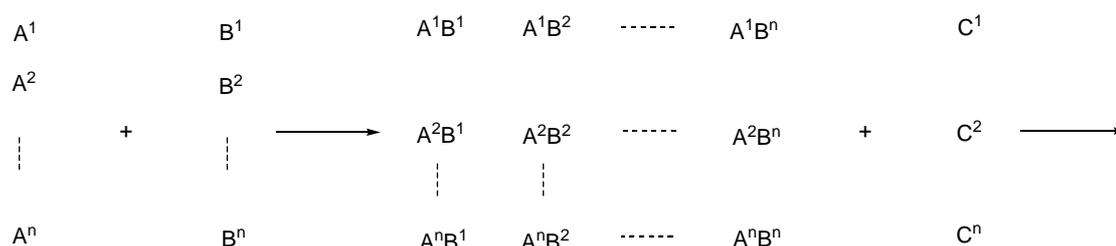
Trotz der Verletzung der *rule of five* sind jedoch viele Antibiotika, Fungizide, Vitamine und herzwirksame Glykoside oral bioverfügbar. Eine Erklärung für diese Beobachtung ist, dass diese Moleküle Substrate für Transportsysteme darstellen. Die *rule of five* stellt eine Orientierungshilfe dar. Daher stellte Rishton eine Liste mit nahezu 25 funktionellen Gruppen zusammen, die aufgrund von Solvolyse und Reaktivität mit Nucleophilen ungeeignet sind für die Verwendung als Wirkstoff.^[8] Weitere Methoden, um Wirkstoff-ähnliche Moleküle zu finden, sind die Analyse des chemischen Raums^[9], Analyse der Bausteine von bekannten Medikamenten^[10] und die sich daraus ergebende Postulierung von sog. privilegierten Unterstrukturen^[11], sowie der die Minimierung von flexiblen Bindungen und der polaren Oberfläche^[12] und neuronale Netzwerke^[13,14]. Die sogenannten „Veber-Regeln“ postulieren eine bevorzugte orale Bioverfügbarkeit von Molekülen, die weniger als 10 rotierbare Bindungen enthalten und deren polare Oberfläche kleiner als 140 Å ist, was etwa zwölf oder weniger Wasserstoff-Donatoren und –Akzeptoren entspricht. Im Gegensatz zu dem in den Lipinski Regeln verlangten Massenausschlusskriterium (MW < 500), gelten die „Veber-Regeln“ unabhängig von der Molekülgröße.^[12]

1.4 Kombinatorische Chemie und *high-throughput screening* (HTS)

Die Fortschritte der Molekularbiologie in den letzten Jahren haben ein weites Spektrum an potenziellen Wirkstoffzielen wie Enzymen oder Rezeptoren hervorgebracht. Die dadurch exponentiell ansteigende Nachfrage nach zu testenden Verbindungen führte Ende 1980er Jahre zur Entwicklung der Kombinatorischen Chemie. Diese versucht, durch Kombination und Variation verschiedener Reste an einem Grundgerüst eine Vielzahl von Molekülen herzustellen.^[15]

Dazu muss die Zielverbindung **ABC** modular aus den einzelnen Bausteinen **A**, **B** und **C** aufgebaut werden. Statt zwei Edukte **A** und **B** zu einem Produkt **AB** zu verknüpfen, werden unterschiedliche Bausteine vom Typ **A(A¹-Aⁿ)** mit verschiedenen Bausteinen vom Typ **B(B¹-Bⁿ)** verknüpft. Dabei reagiert jeder Baustein **A** mit jedem Baustein **B**. Die Reaktion kann simultan in einer Mischung (Mischsynthese), welches nur an der Festphase zur besseren Aufarbeitung sinnvoll ist, oder parallel in getrennten Reaktionsgefäßen (Parallelsynthese) durchgeführt werden. Anschließend werden alle Produkte **AB** mit allen Bausteinen **C(C¹-Cⁿ)** umgesetzt.

a)



b)

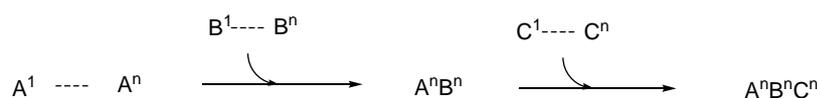


Abb. 1.3: a) Prinzip der kombinatorischen Synthese. a) Prinzip der mehrstufigen, kombinatorischen Synthese.

Durch die Kombination weniger Bausteine kann somit eine große Anzahl an Verbindungen, eine sogenannte Bibliothek, synthetisiert werden. Werden für die Bausteine **A**, **B** und **C** jeweils 10 verschiedene Verbindungen eingesetzt, so erhält man bereits $10 \times 10 \times 10 = 10^3$ Produkte.

Die so synthetisierten Substanzbibliotheken werden dann in Hochdurchsatzverfahren (*high-throughput screening*, HTS) in biologischen Tests, Assays genannt, gegen das zu modulierende Wirkstoffziel getestet.

Seit Etablierung der Kombinatorischen Chemie wurden viele Millionen Verbindungen hergestellt und in HTS-Systemen getestet. Leider zeigte sich, dass nur ein Bruchteil biologische Aktivitäten aufwies. Der Gedanke alle synthetisch möglichen Verbindungen (chemischer Raum) herzustellen und zu testen, ist auf Grund des enormen Synthesaufwandes nicht realisierbar. Die Stärke der Kombinatorische Chemie liegt vielmehr in der schnellen und einfachen Derivatisierung einer bekannten Leitstruktur und nicht, wie anfänglich angenommen, in der Identifikation der Leitstruktur. Das Problem der Leitstrukturidentifikation muss daher mit anderen Mitteln angegangen werden.

1.5 Das Konzept der Fragment-basierten Wirkstoffentwicklung

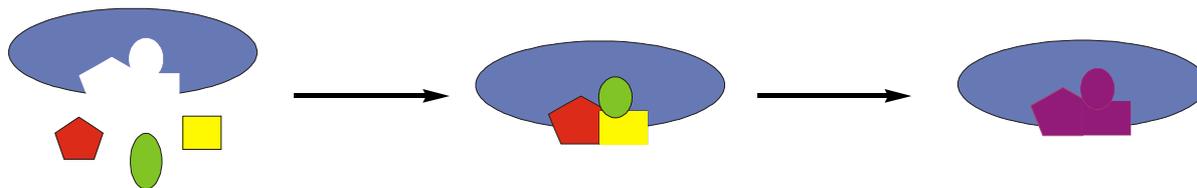


Abb. 1.4 Prinzip des Fragment-basierten Wirkstoffentwicklung. Durch einfaches Verknüpfung niedrig affiner Liganden zu einem hochaffinen kommt man zur Leistruktur.

Auf Grund der Nachteile der oben beschriebenen, konventionellen Methoden in der Leitstruktursuche wie die der Kombinatorischen Chemie und des HTS kam Mitte der 1990er Jahre der Gedanke der Fragment-basierten Wirkstoffentwicklung auf. Die Idee war, aus mehreren kleinen Proteinbindern (sogenannten Fragmenten) durch eine Verknüpfung dieser, einen hochaffinen Liganden zu konstruieren (siehe auch Abb. 1.4). Das allgemeine Problem hierbei war, wie man die niederaffinen Fragmente detektiert. Woher weiß man, wie sie in der Tasche liegen und wie verknüpft man am Besten die Fragmente zueinander. Diese Fragen stehen im Fokus der Fragment-basierten Wirkstoffsuche und werden mit unterschiedlichen Strategien beantwortet.

1.5.1 Fragmentbasierte Wirkstoffentwicklung mittels Strukturbioogie

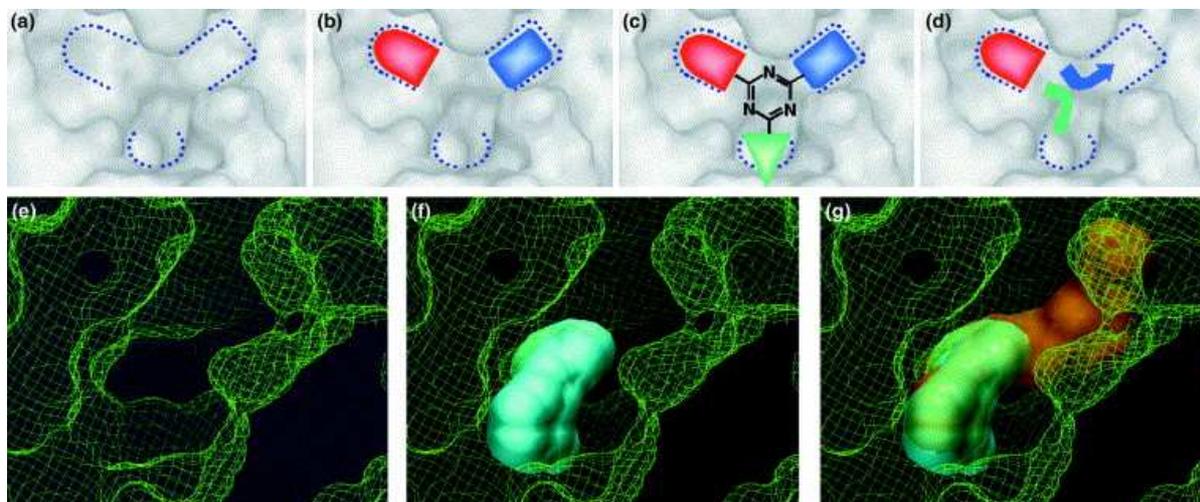


Abb. 1.7 Fragmentbasierte Wirkstoffentwicklung mittels Strukturbioogie: **(a)** Schematische Darstellung der aktiven Tasche mit ihren drei Subtaschen; **(b)** Fragmente binden in zwei der drei Subtaschen; **(c)** drei Fragmente werden miteinander kovalent verknüpft; **(d)** Strategie des aus der Tasche wachsenden Fragments mittels kombinatorischer Synthese des Fragments; **(e)** reale Bindungstasche mit der van der Waals Oberfläche; **(f)** ein Fragment bindet in einer Subtasche; **(g)** Strategie des aus der Tasche wachsenden Fragments mittels kombinatorischer Synthese des Fragments. Der erste Hit, dem niedrig affinen Binder, wird mittels kombinatorischer Synthese erweitert. Man hofft so, dass das neu entstandene Molekül nun auch die nächste Subtasche besetzt.^[17]

Ende der 1990er Jahre publizierten unabhängig voneinander die Gruppen um Fesik und Nienhaber die Möglichkeit, nieder affine Liganden mittels strukturbioogischer Methoden zu

detektieren. Fesik bewies, dass man die Kernresonanzspektroskopie dazu nutzen kann, bindende Fragmente zu identifizieren. Diese Methode wird auch als *structure-activity relations by nuclear magnetic resonance* (SAR by NMR) bezeichnet.^[16] Demgegenüber begründete Nienhaber die *fragment-based high-throughput x-ray crystallography*, also die Möglichkeit nieder affine Substanzen mittels Röntgenstrukturanalyse zu identifizieren.^[17] Zwar nutzen beide unterschiedliche Detektionsmethoden, dennoch ist das Prinzip das gleiche und wird in Abb. 1.7 gezeigt. Die aktive Tasche des zu modulierenden Wirkstoffziels besitzt drei Subtaschen. In dem NMR- oder Kristallisationsexperiment wird das Wirkstoffziel mit einem Cocktail von meist 20 bis 50 Fragmenten inkubiert und dann vermessen bzw. kristallisiert. Die niedrig affinen Fragmente binden jeweils entsprechend ihrer Eigenschaften in die Subtaschen. Dies kann in der Kristallstruktur bzw. in der NMR-Struktur detektiert werden.

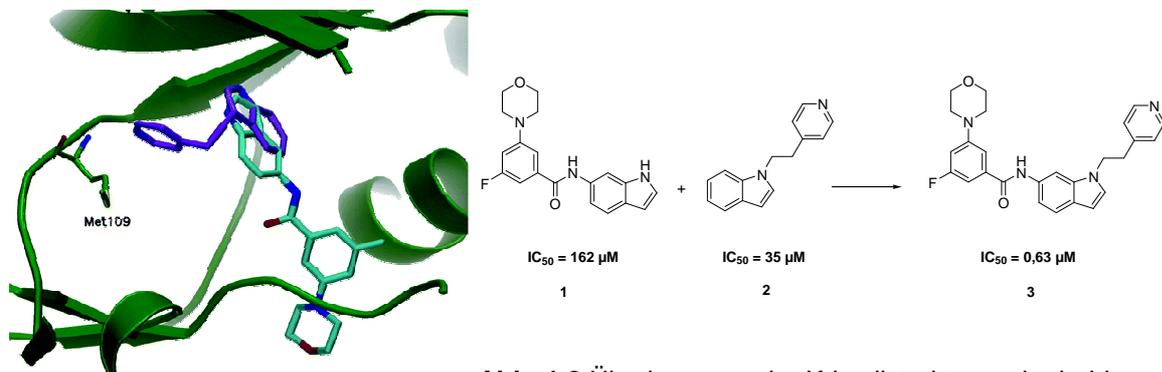


Abb. 1.8 Überlagerung der Kristallstrukturen der beiden nieder affinen Indolderivate. Durch Kombination der richtigen Hybride erhält man einen hoch affinen p38α MAP Kinaseinhibitor.^[18]

Wie in Abb. 1.8 gezeigt, binden die Moleküle **1** und **2** (IC₅₀ von 165 μM und 35 μM) unabhängig voneinander an das Wirkstoffziel, die p38α Mitogen-activated protein (MAP) Kinase, deren Inhibition die Entzündungskaskade unterbricht.^[18] Durch die Überlagerung der Kristallstrukturen (Abb. 1.8 linkes Bild) erkennt man, dass der Indolring beider Moleküle an die gleiche Stelle im Protein bindet. Im nächsten Schritt werden die identifizierten Fragmente mittels organischer Synthese miteinander verknüpft. Das neu synthetisierte Molekül bestehend aus den ursprünglichen Fragmenten wird dann nochmals gegen das Wirkstoffziel mit einem IC₅₀ von 0,63 μM evaluiert. Aus zwei mäßigen Inhibitoren konnte so ein hochaffiner Inhibitor entwickelt werden. Nachteil ist, dass man auf Grund der Dynamik des Wirkstoffziels nie sicher sein kann, ob die Endverbindung überhaupt aktiv ist. Dieses Phänomen wird auch als Kooperativität bezeichnet. Die Bindung des einen kann die Bindung des anderen Fragments verbessern (positive Kooperativität) oder verschlechtern (negative Kooperativität). Leider ist dies aus der Struktur nicht bestimmbar. Das ist der große Nachteil

der strukturbiochemisch unterstützten Fragmentidentifikation. Dennoch ist sie eine der erfolgreichsten Methoden in der Fragment-basierten Wirkstoffentwicklung, aber auch eine der zeit- und kostenintensivsten.

1.5.2 Substrataktivitätsscreening (SAS)

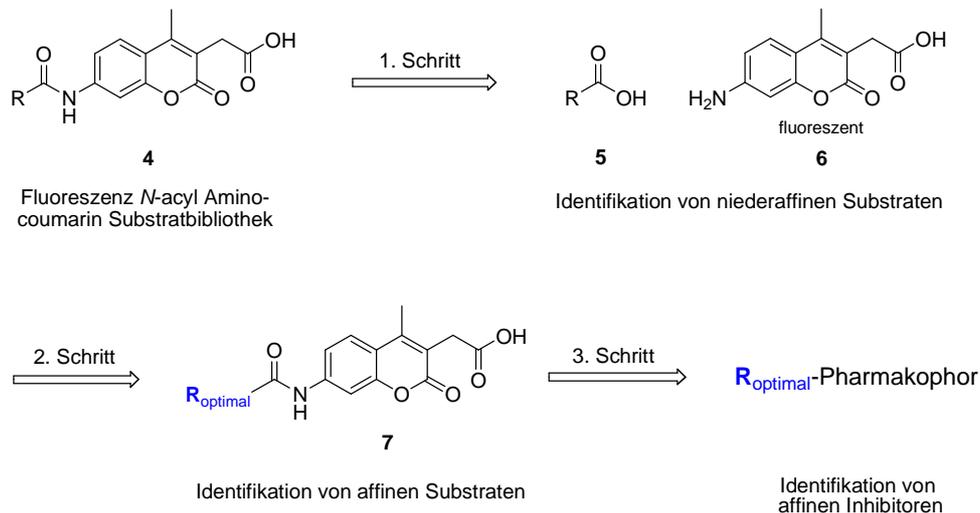


Abb. 1.5 Generelles Prinzip des Substrataktivitätsscreenings (SAS) für Proteasen.^[19]

Im Jahre 2005 veröffentlichte die Arbeitsgruppe von Jonathan Ellman das Konzept des Substrataktivitätsscreenings (SAS).^[19] Das SAS erfolgt in drei Schritten: Zuerst wird das Fluorophor, 7-Amino-4-methyl-3-coumarin-essigsäure (AMCA), über seine Aminofunktion mit einem Fragment acyliert. Dieses Substrat wird dann gegen eine therapeutisch relevante Protease wie Cathepsin S getestet. Im zweiten Schritt werden die kinetischen Parameter des besten Substrates bestimmt bzw. durch Parallelsynthese von Derivaten noch verbessert. Im dritten und letzten Schritt wird das Substrat in einen Inhibitor umgewandelt, indem man z.B. im Falle der Cysteinprotease Cathepsin S anstatt des Fluorophors eine Aldehydfunktion als inhibitorische Gruppe einführt.

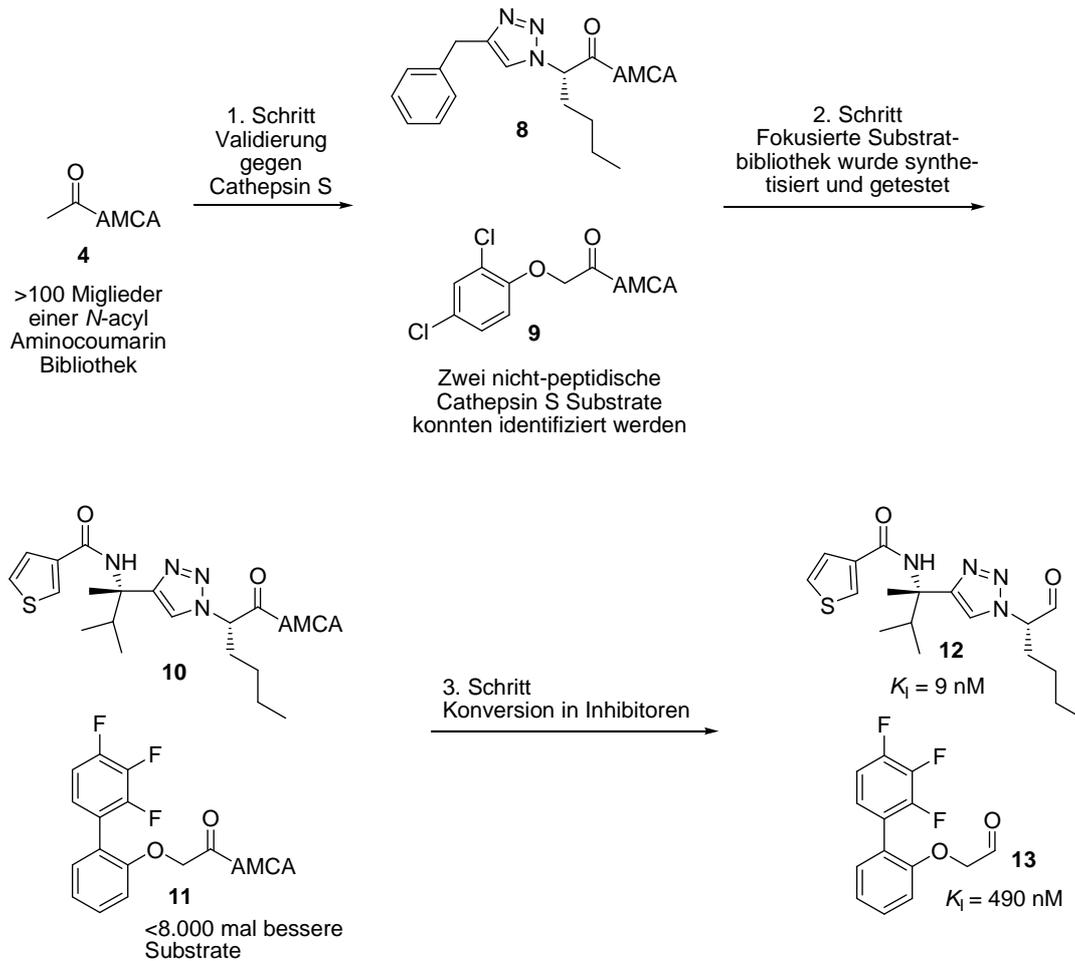


Abb. 1.6 Entwicklung eines nicht-peptidischen Inhibitors für Cathepsin S durch SAS.^[19]

Durch SAS konnten bereits mehrere Wirkstoff-ähnliche Moleküle für therapeutisch relevante Enzyme identifiziert werden. Der große Vorteil ist die schnelle Identifikation von nicht substratanalogen Strukturen, die auch in der Substrattasche binden können. Aber dennoch ist SAS erheblich begrenzt. Zum Einen ist es nur auf Wirkstoffziele anwendbar, die eine beobachtbare Funktion haben, also meist Enzyme wie Proteasen oder Phosphatasen. Zu diesen beiden Enzymklassen war es überhaupt möglich solche Substratscreeningstechnologien zu etablieren. Zum Zweiten ist die Fragmentsuche nur auf die Substrattasche beschränkt. Der klassische Gedanke des fragmentbasierten Screenings, niederaffine Binder in unterschiedlichen Taschen miteinander zu verbinden, ist daher hier nicht möglich.

1.5.3 Dynamisch-Kombinatorische Chemie

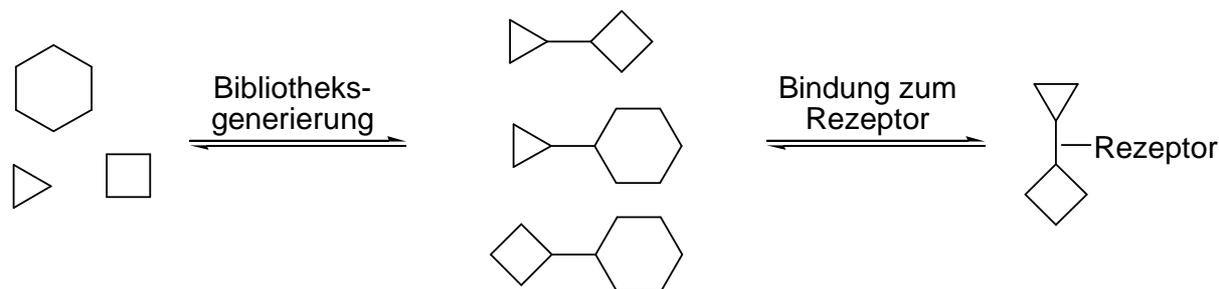


Abb. 1.9 Prinzip der Dynamisch-Kombinatorischen Chemie, Bindung an einen Rezeptor verschiebt das Gleichgewicht auf die Seite affiner Liganden.^[20]

Im Jahr 1888 formulierte Henry LeChatelier das Massenwirkungsgesetz.^[21] Nach diesem thermodynamischen Prinzip versucht ein System, das sich im Gleichgewichtszustand befindet, von außen einwirkende Zwänge durch eine Anpassung der anderen Zustandsgrößen zu kompensieren. Das heißt, ein chemisches Gleichgewicht kann beeinflusst werden. Diese Erkenntnis war die Grundlage der Dynamisch-Kombinatorischen Chemie, welche 1997 von Jean-Marie Lehn und Ivan Huc erstmals beschrieben wurde.^[20] Die Dynamisch-Kombinatorische Chemie beruht auf der Generierung von scheinbaren Kombinationen, die ein Fragmentgemisch durch reversible Bindungen mit sich selbst eingehen kann (siehe Abb. 1.10). Ziel ist dabei das Gleichgewicht dieser scheinbaren Bibliothek entscheidend in eine bestimmte Richtung zu verschieben. Im konkreten Fall, den Huc und Lehn beschrieben, handelt es sich um ein Gemisch von Aminen und Aldehyden, die mit dem Enzym Carboanhydrase (CA) inkubiert wurden. Normalerweise bilden die unterschiedlichen Amine und Aldehyde Imine in einem Gleichgewicht aus. Durch die Anwesenheit der CA wird dieses Gleichgewicht zu Gunsten jener Imine verschoben, die an das Protein binden und dadurch stabilisiert werden. Eine Herausforderung war allerdings die Detektion dieses veränderten Gleichgewichts. Huc und Lehn lösten das Problem, indem sie das Gleichgewicht einmal in Anwesenheit und einmal in Abwesenheit des Proteins generierten. Nach einer Inkubation von 24 Stunden bei 25 °C wurde das Reduktionsmittel NaCNBH₃ hinzugegeben, um die gebildeten Imine reaktiv zu aminieren und damit zu fixieren. Die Carboanhydrase wurde denaturiert, dialysiert und der Überstand in der HPLC vermessen. Der Reaktionsansatz ohne CA wurde ebenfalls in der HPLC vermessen. Im Folgenden wurden die beiden Chromatogramme verglichen. Es zeigte sich, dass in Gegenwart der CA ein Imin stärker gebildet worden war. Dieses Imin war dem 4-Sulfamoylbenzoesäurebenzylamid sehr ähnlich, einem bekannten Inhibitor der CA ($K_d \approx 1,1$ nM). Neben einer Reihe von Nachteilen wie der Einsatz des reaktiven Reduktionsmittels NaCNBH₃, das aufwendige Trennen von CA und den sekundären Aminen mittels Dialyse im Vergleich zu konventionellen HTS-Systemen sowie

die mühsame Detektion der sekundären Amine mittels HPLC, ist aber der entscheidende Nachteil, die fehlende Selektivität bezüglich des eigentlichen Ziels, des katalytischen Zentrums. Daher muss hier ausdrücklich die Künstlichkeit des von Huc und Lehn beschriebenen Experiments betont werden. Huc und Lehn haben vor dem Versuch die Zusammensetzung des Reaktionsansatzes von Aminen und Aldehyden so geschickt gewählt, dass sie mit hoher Wahrscheinlichkeit in diesem Experiment eine Verbindung fanden, die dem als aktiven Inhibitor schon lange bekannten 4-Sulfmoylbenzoesäurebenzylamid ähnlich war.

Aber dennoch konnte das Konzept der Dynamisch-Kombinatorischen Chemie bereits kommerziell erfolgreich angewandt werden. Forscher der Firma *Therascope Pharmaceuticals* (zwischenzeitlich *Alantos Pharmaceuticals*, heute *Amgen*) kreierten eine Imin-Bibliothek aus einem Inhibitor und 50 verschiedenen Ketonen in Anwesenheit des Enzyms Neuraminidase, welches bei der H5N1 Infektion eine wichtige Rolle spielt.^[22] Hierbei konnten mehrere Inhibitoren mit nanomolaren Affinitäten identifiziert werden, die im Falle viraler Resistenzen gegen das handelsübliche Tamiflu Alternativen darstellen können (siehe auch Abb. 1.10).

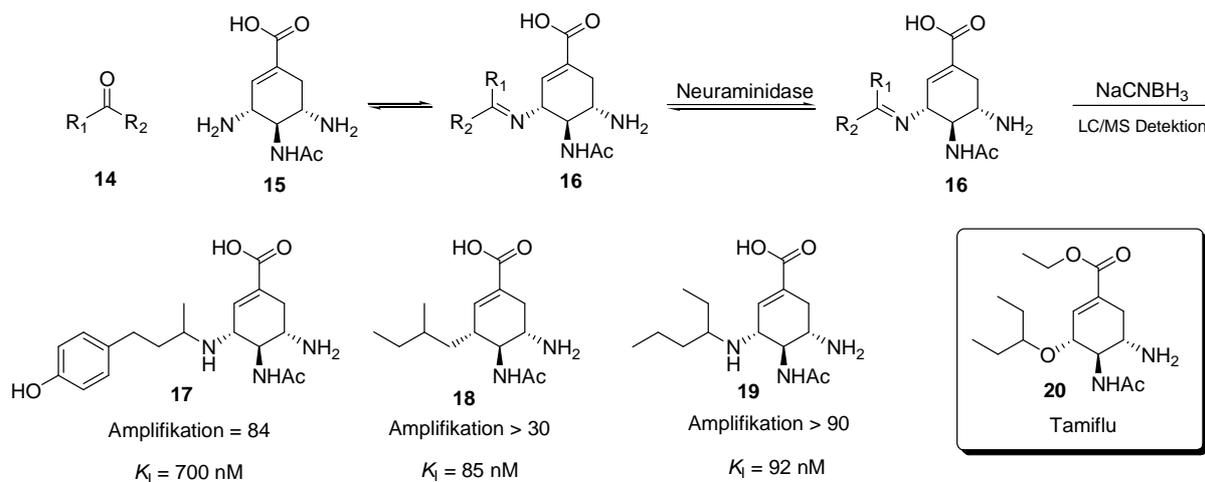


Abb. 1.10 Beispiel für die Anwendung der Dynamisch-Kombinatorischen Chemie. Ausgehend von einem bekannten Inhibitor der Neuraminidase wurde mittels Ketonfragmenten eine Subtaste gescreent. In der Abb. ebenfalls gezeigt ist die Struktur des kommerziell erhältlichen Neuraminidase-Inhibitor Tamiflu.^[22]

Dennoch zeigen sich hier entscheidende Nachteile der Methode. Zum Einen arbeitet man mit sehr hohen Konzentrationen, da die verwendeten Detektionstechniken (HPLC bzw. LC/MS) keine geringeren nachweisen können. Zum anderen korrespondiert die relative Amplifikation eines gebildeten Imins nicht mit den wahren Treffern. Die Amplifikation der Verbindung 17 erfolgte zwar am stärksten, war aber kein guter Inhibitor der Neuraminidase. Im Gegensatz dazu zeigte Verbindung 18 die beste Affinität, wurde aber im Vergleich zu 19 dreimal

schwächer amplifiziert. Hochgürtel et al. argumentieren daher, dass dieses Phänomen mit der „lock-in“ Reaktion erklärt werden könne. Die dem Gleichgewicht unterliegenden Addukte sind Imine bzw. Hemiaminale, die zur Detektion reduziert werden. Durch die veränderten, elektronischen Eigenschaften der sekundären Amine im Vergleich zu den amplifizierten Iminen kann die mangelnde Korrespondenz zwischen Amplifikation und Affinität der Treffer erklärt werden. Festzuhalten bleibt daher, dass durch die Detektion über die reduktive Aminierung die besten Binder nicht eindeutig identifiziert werden können.

1.5.4 Tethering

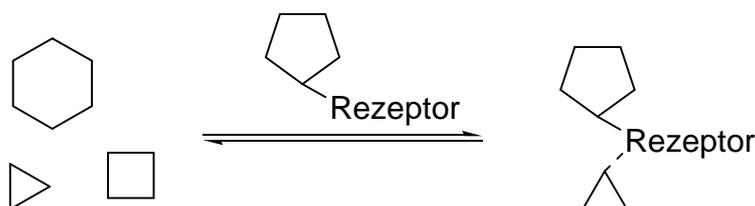


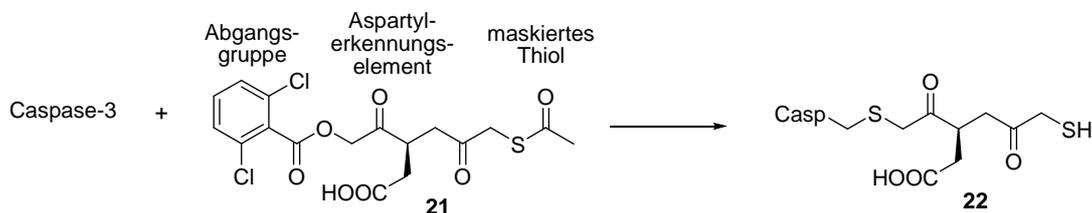
Abb. 1.11 Prinzip des *Tethering* Verfahrens, der Receptor ist bereits kovalent an ein Adressmolekül (directing probe) gebunden. Der Ligand, der mit dem kovalent gebundenen Adressmolekül wechselwirkt, muss eine Affinität für die Tasche haben, sonst kann dieser dort nicht binden.^[23]

Aufbauend auf den Erfahrungen der Dynamisch-Kombinatorischen Chemie wurde das *Tethering*-Verfahren im Jahr 2000 von der Firma *Sunesis* etabliert.^[23] Hierbei beruht die Bibliotheksgenerierung auf dem reversiblen Disulfidaustausch und der diskreten Adressierung der Subtasche des jeweiligen Targets. Am Beispiel der Cysteiny-Aspartat-Protease-3 (Caspase-3) verwendeten Erlanson et al. einen bekannten Inhibitor **21** ($K_I \approx 2,8 \mu\text{M}$), der kovalent an die Thiolgruppe des reaktiven Cysteinrestes der Caspase-3 bindet. Wie aus Abb. 1.12 hervorgeht, trägt der Inhibitor **21** eine geschützte Thiolgruppe. Nachdem der Inhibitor nun kovalent an die Caspase-3 gebunden hat, wird das Thiol entschützt. Im folgenden wurden 7.000 verschiedene Disulfide im Überschuss zu dem Reaktionsansatz gegeben. Auch hier stehen das Thiol und die Disulfide in einem Gleichgewicht, welches durch die Affinität eines bestimmten Fragments für die Tasche verschoben wird.

Anders als bei Huc und Lehn erfolgt die Detektion bei Erlanson et al. mittels Massenspektrometrie. Das gesamte Enzym mit den kovalent gebundenen Fragmenten wird vermessen. Der Nachteil dieser Methode ist die nötige Infrastruktur. Zum Einen benötigt man eine Disulfidbibliothek, die nicht kommerziell erhältlich ist und daher selbst synthetisiert werden muss. Zum Anderen stellt die Verwendung eines hochauflösenden Massenspektrometers einen hohen Kostenpunkt dar. Als Alternative zur Massenspektrometrie für die Detektion haben zum Einen Fesik et al. bereits 1996 die Struktur-Aktivitätsbeziehung

mittels NMR (*structure-activity relations by nuclear magnetic resonance*: SAR by NMR)^[16] und zum anderen Nienhaber et al. 1997 die *fragment-based high-throughput x-ray crystallography*^[17] beschrieben. Dennoch bleibt der Nachteil all dieser Methoden, dass zur Detektion finanzintensive Infrastrukturen essenziell sind. Ein weiterer und vielleicht entscheidender Nachteil ist, dass es sich bei den erhaltenen Daten ausschließlich um Angaben bezüglich der Affinität eines Fragments zu dem Protein handelt. Der Nachweis, dass diese Fragmente nachhaltig die Funktion des Enzyms inhibieren, lässt sich daraus nicht ableiten und bleibt daher fraglich. Zudem benötigt man große Proteinmengen.

1) Einführung einer Thiolgruppe nahe der gewünschten Tasche



2) Disulfidaustausch mit den eingeführten Thiol ("Tethering")

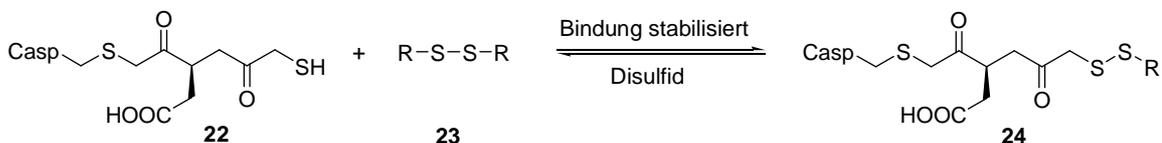


Abb. 1.12: Beispiel für *Tethering* - Annäherung. 1) Ein Adressatmolekül wird kovalent an das Wirkstoffziel diskret gebunden. 2) Das Adressatmolekül kann mittels einer Thiolgruppe mit Disulfiden wechselwirken. Nur Liganden mit Affinität zu der zu screenenden Tasche können dort binden. Die Detektion erfolgt mittels Massenspektrometrie.

1.5.5 Dynamisch-Kombinatorische Resolution (DCR)

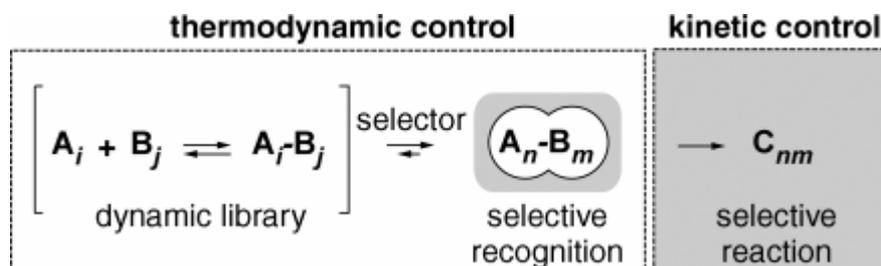


Abb. 1.13 Das Konzept der Dynamisch-Kombinatorischen Resolution. Eine dynamische Bibliothek wird aus *i* Verbindungen **A** und *j* Verbindungen **B** generiert. Die selektive Wahrnehmung von **A_n-B_m** durch den Selektor (bspw. ein Enzym) ermöglicht die Darstellung von **C_{nm}** unter kinetischer Kontrolle.

Anfang 2007 publizierte die Arbeitsgruppe von Olof Ramström das Konzept der Dynamisch-Kombinatorischen Resolution.^[24] Hierbei wird eine dynamische Bibliothek (**A_n-B_m**) generiert, die dann mit einem Selektor versetzt wird, der irreversibel (kinetisch kontrolliert) die

Reaktion eines Mitglieds der scheinbaren Bibliothek zu C_{nm} katalysiert (siehe auch Abb. 1.13). Eindeutiger Vorteil ist, dass der Selektor nur in katalytischen Mengen erforderlich ist, nicht in fast äquimolaren Verhältnissen wie bei der Dynamisch-Kombinatorischen Chemie, dem *Tethering*-Verfahren oder der strukturbioologischen Identifikation von Fragmenten. Dennoch ist eine weite Anwendung dieser Methode bisher nicht möglich. Ramström zeigte als Beispiel die Henri-Reaktion, einer Aldolreaktion mit aromatischen Aldehyden und 2-Nitropropan **28** (siehe auch Abb. I.14).

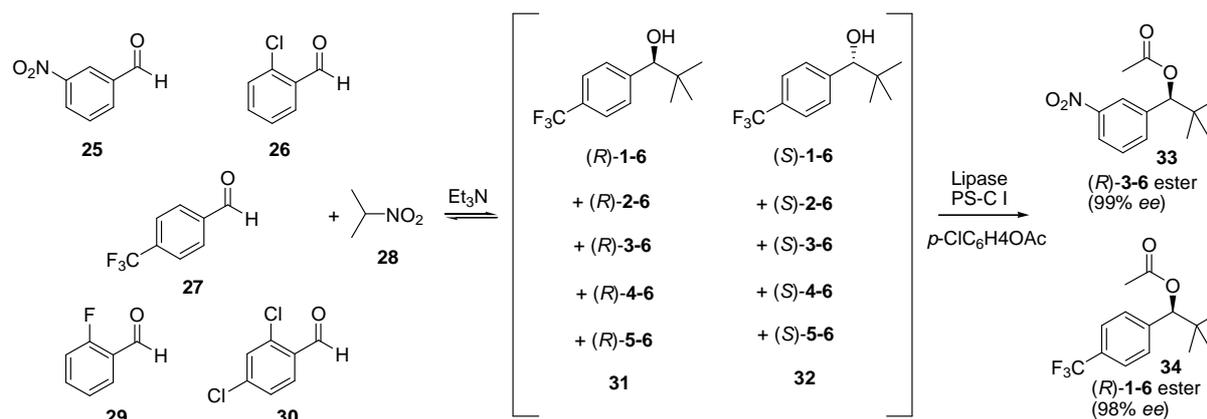


Abb. 1.14 Beispiel für Dynamisch-Kombinatorische Resolution. Grundlage ist die Erzeugung einer dynamischen Nitroaldolbibliothek und die Lipase-vermittelte Selektion des besten Substrates (Binders).

Unter Basenkatalyse wird reversibel das Nitroaldolprodukt gebildet. Die Anwesenheit der Lipase PS-C I aus *Pseudomonas cepacia* verestert vornehmlich nur eines der reversibel gebildeten Aldolprodukte und entzieht es dem Gleichgewicht. Die Idee die enzymatischen Eigenschaften des Wirkstoffziels, wie hier der Lipase, zu nutzen ist sehr gut, aber dennoch fallen erhebliche Nachteile auf. Zum Einen erfolgt die Detektion des Produkts mittels NMR, hohe Konzentrationen sind daher nötig. Außerdem kann nur mit kleinen Bibliotheken gearbeitet werden (unübersichtliche NMR-Spektren). Zudem wurde das Experiment in dem organischen Lösungsmittel Pyridin ausgeführt. Für eine breite Anwendung ist ein in wässrigen Puffer verlaufendes System wünschenswert. Es ist also festzuhalten, dass das Konzept der Dynamisch Kombinatorischen Resolution auf einer guten Idee basiert. Die Enzymfunktion der Lipase wird genutzt, um den besten Hit zu selektieren. Aber die Abhängigkeit von der Enzymfunktion limitiert das Verfahren wiederum auf Lipasen. Im Hinblick auf die gängigen Wirkstoffziele wie Rezeptoren, Kinasen oder Proteasen ist DCR nicht anwendbar. Die Frage bleibt daher, ob DCR noch weiter optimiert werden kann, um eine kommerzielle Anwendung in der Wirkstoffidentifizierung zu finden.

1.5.6 Rezeptor-vermittelte Synthese

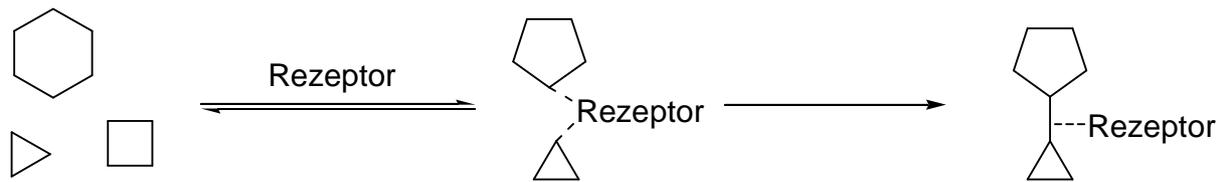


Abb. 1.15 Prinzip der Rezeptor-vermittelten Synthese. Reaktive Fragmente werden in Anwesenheit des Wirkstoffziels inkubiert. Mittels Templateffekt werden nur die irreversible Reaktion bevorzugt, deren Kombinationen durch das Templat stabilisiert werden.

Bei der Rezeptor-vermittelten Synthese wird eine Bibliothek reaktiver Verbindungen mit dem molekularen Target, einem Templat, inkubiert. Zunächst binden die reaktiven Verbindungen an das Protein, um dann in einem irreversiblen Schritt miteinander zu einem affineren Liganden zu reagieren. Grundlage dieses Konzeptes sind irreversible Reaktionen, die in Wasser nur sehr schlecht verlaufen. Durch die Zugabe eines Templates wird die Reaktion der beiden Fragmente zu dem Liganden ermöglicht. Bestes Beispiel sind die Arbeiten der Gruppe um Barry Sharpless über die *in situ click chemistry* der [3+2] dipolaren Cycloaddition.^[25] Hierbei reagieren ein Azid und ein Alkin zu einem Triazol. Normalerweise verläuft die Reaktion in Wasser Kupfer-I-katalysiert, aber durch das Entfernen des Katalysators und Zugabe des Templates können nur die Triazole entstehen, bei denen die reagierenden Fragmente durch Bindung an das Templat in räumliche Nähe und dadurch zur Reaktion gebracht werden.

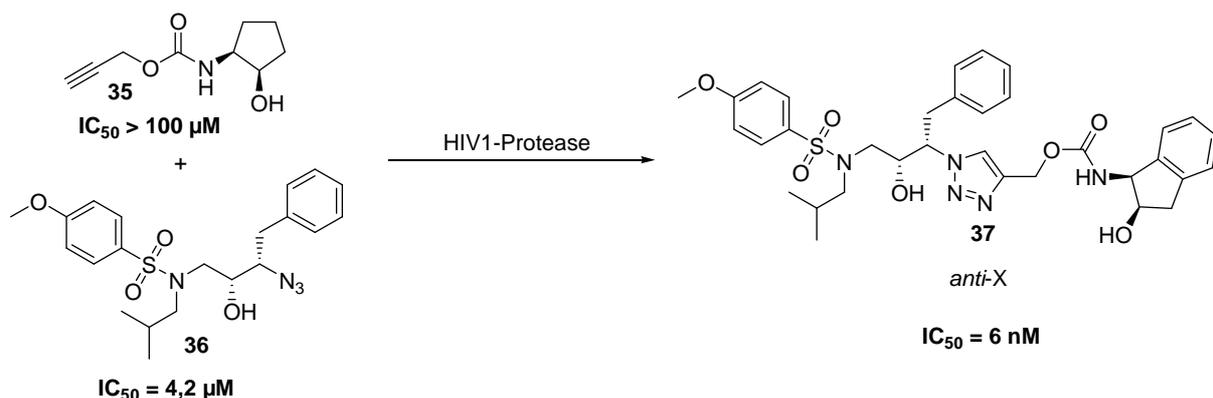


Abb. 1.16 Beispiel für die Rezeptor-vermittelte Synthese. In Anwesenheit des Templates reagieren das Azid **36** und das Alkin **35** zum Triazol.

In Abb. 1.16 ist als Beispiel eine Arbeit zur HIV1-Protease aufgeführt. In dieser wurden das Alkin **35** und das Azid **36** mit der HIV1-Protease inkubiert. Nach 24 Stunden wurde der Ansatz dialysiert und der Überstand in der LC/MS vermessen. Hier zeigte sich der erste Nachteil der Methode. Die Triazolbildung kann *syn* bzw. *anti* erfolgen. Die LC/MS-Analytik ist dafür unzureichend. Es müssen daher beide möglichen Regioisomere nachsynthetisiert

werden, um dann die hoffentlich unterschiedliche Retentionszeiten vergleichen zu können, um das bei der *in situ click chemistry* vorzugsweise gebildete Produkt identifizieren zu können.

Abschließend ist zu sagen, dass man für derartige Reaktionen bereits zwei gute Liganden benötigt. Wie aus dem Beispiel der Abb. 1.16 ersichtlich ist, reagieren dort zwei Verbindungen, die klassisch nicht als low-binder mit Aktivitäten von 100 μM und 4,2 μM bezeichnet werden. Reaktionen von nieder-affineren Edukten als 100 μM konnten bisher noch nicht beobachtet werden. Ebenso begrenzt die verwendete LC/MS-Analytik die Detektion der gebildeten Liganden einerseits von der hohen Konzentration andererseits von der verbleibenden Frage, welches Regioisomer sich gebildet hat. Dennoch ist die Grundidee gut, wenn man von der verwendeten [3+2] dipolaren Cycloaddition absieht. Bei Verwendung anderer Ligationsreaktionen (Thioester + Amin \rightarrow Amid), bei denen also ein klares Produkt entsteht, und anderer Detektionsmethoden (Strukturbiologie) könnte das Potenzial dieser Methode voll ausgeschöpft werden.

1.5.7 Pseudo-Kombinatorische Chemie

Die Pseudo-Kombinatorische Chemie beinhaltet die irreversible Synthese von Bibliotheken sowie deren Abbau in Anwesenheit eines Rezeptors. Der Term „pseudo-dynamisch“ ist angelehnt an die irreversible Synthese und den gleichzeitigen Abbau dieser, anstatt der reversiblen Generierung einer Bibliothek wie bei der Iminbildung in der Dynamisch-kombinatorischen Chemie (siehe Abb. 1.17). Nach der Synthese der Bibliothek assoziieren sich die Mitglieder mit dem Rezeptor in einem thermodynamisch-kontrollierten Prozess, gleichzeitig wird ein Abbauprozess der Bibliotheksmitglieder ausgelöst. Hoch affine Liganden aus der anfangs synthetisierten Bibliothek werden durch das Templat stabilisiert und so vor dem Abbau geschützt. Im konkreten Fallbeispiel haben Kazlauskas et al. eine Dipeptidbibliothek in gepuffertem Medium synthetisiert und anschließend die Enzyme Carboanhydrase (CA) und Pronase zugegeben.^[26] Das Enzym Pronase spaltet die Dipeptidbindung, während die CA als Rezeptor das Dipeptid vor der Spaltung schützen sollte. Letztlich erhält man so ein Dipeptid, welches eine Affinität für den Rezeptor aufweist.

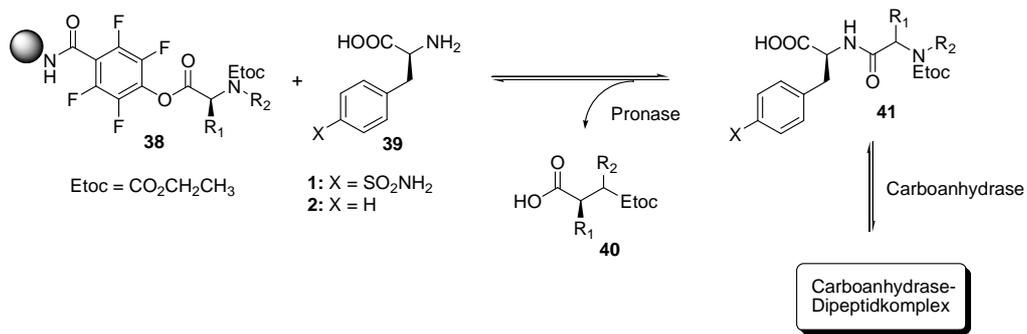


Abb. 1.17 zeigt schematisch ein Beispiel der Pseudo-Kombinatorischen Chemie. Es wird eine Bibliothek aus Dipeptiden erzeugt. Diese Dipeptide können entweder durch das anwesende Templat, die Carboanhydrase, stabilisiert werden oder durch das anwesende peptidspaltende Enzym, Pronase, abgebaut werden. Hat die Verbindung eine Affinität zum Templat, wird dieses vor der dem Abbau geschützt.

Ebenso wie in den vorangegangenen Techniken ist bei hohen Konzentrationen zu arbeiten, da der Nachweis ebenfalls über LC/MS erfolgt. Zusätzlich muss hier die Künstlichkeit des Systems erwähnt werden, erstens da für diesen Ansatz die Pronase für den Abbau essenziell ist. Das System kann aufgrund des Zusammenspiel zweier verschiedener Enzyme (Pronase und Carboanhydrase) kaum auf andere Wirkstoffziele angewandt werden. Für das Verständnis von Templat-assistierten Reaktionen ist die Pseudo-Kombinatorische Chemie wichtig, es bleibt aber fraglich, ob diese jemals in der kommerziellen Wirkstoffidentifizierung eingesetzt wird.

2. Fragestellung

Gewöhnlich werden biologisch aktive, Wirkstoff-ähnliche kleine Moleküle durch Hochdurchsatzscreening chemischer Bibliotheken identifiziert. Zusammenstellung und Durchmusterung großer chemischer Bibliotheken sind jedoch zeitaufwändig und kostspielig. Der Erfolg dieses Ansatzes hängt stark von der Qualität der verfügbaren Bibliotheken ab, und selbst die größte Bibliothek kann immer nur einen winzigen Ausschnitt des virtuellen chemischen Raumes abdecken. Aus diesen Gründen wurde im Verlauf der letzten zehn Jahre eine Reihe von Strategien vorgeschlagen wie sie in der Einleitung aufgeführt sind, die allesamt das Ziel verfolgen, den Entwicklungsprozess zu erleichtern, indem das Zielprotein als eine Schablone für den Aufbau von Liganden verwendet wird. Die Bindung niedermolekularer Fragmente kann durch die NMR-Spektroskopie oder Röntgenkristallographie direkt detektiert werden.^[16,17] Diese biophysikalischen Methoden lieferten in einigen Fällen Liganden niedriger Affinität, die als rationale Startpunkte für die schrittweise Entwicklung potenter Protein bindender Moleküle fungierten.^[18] Alternativ dazu wurden Proteinliganden aus Gemischen von Molekülen identifiziert, die sich in einem dynamischen Gleichgewicht befanden.^[22,23] In Gegenwart des Proteins wurde das Gleichgewicht verschoben, die am besten bindenden Produkte wurden in dem Gemisch angereichert und konnten durch Chromatographie, Massenspektrometrie oder NMR-Spektroskopie nachgewiesen werden.^[22,23] Alle bisherigen Fragment-basierten Methoden haben gemeinsam, dass diese alle große Proteinmengen erfordern und die Detektion der Fragmente schwierig, zeitaufwendig und teuer ist.

In der hier vorliegenden Arbeit steht daher die Detektion niedrig affiner Fragmentmoleküle durch reversible Ligationsprodukte im Mittelpunkt. Konkret wird die Frage gestellt, ob reversibel gebildete Imine, die erst durch das Wirkstoffziel (Templat) stabilisiert werden, auch die Funktion der Template beeinflussen können. Wenn dies der Fall ist, kann man mit Hilfe einfacher bekannter, biochemischer Funktionstests, sogenannten Assays, diese stabilisierten Ligationsprodukte indirekt nachweisen.

Um die oben gestellte Hypothese, den Nachweis durch das Templat-stabilisierte Ligationsprodukte mit Hilfe von Funktionstests zu beweisen, wurden zu Beginn vier therapeutisch relevante Proteine ausgewählt: Die beiden Cysteinproteasen *severe acute respiratory syndrome coronavirus main protease* (SARS-CoV M^{pro}), ein Schlüsselenzym bei dem Schweren Akuten Respiratorischen Syndrom (SARS), die Cysteinasparylprotease 3 (Caspase 3), ein Regulator der Apoptose, die Asparylprotease *human immunodeficiency virus 1 protease* (HIV1-Protease), ein zentrales Wirkstoffziel in der Behandlung von AIDS und die

Mycobacterium tuberculosis Proteintyrosinphosphatase A (MtpA), ein potenzielles Wirkstoffziel zur Behandlung der Tuberkulose. Zu jedem der genannten Wirkstoffziele soll ein neuer Assay, eine neue Methode zur Detektion niedrig affiner Fragmente entwickelt werden: Im ersten Projekt, in dem die SARS-CoV M^{pro} im Fokus steht, soll die Frage beantwortet werden, ob ein hypothetisches Ligationsprodukt aus dem natürlichen, peptischen Substrat und eines Amins in einem einfachen Enzymfunktionstest nachgewiesen werden kann. Wenn dies möglich ist, soll im Projekt der HIV1-Protease überprüft werden, ob es sich dabei um ein allgemein gültiges Prinzip handelt, also die Methode auch in diesem Fall anwendbar ist. Desweiteren soll auch die Frage geklärt werden, ob dieses Phänomen nur die Funktion eines Enzyms beeinflusst oder man auch die stärkere bzw. schwächere Bindung solcher Ligationsprodukte in Bindungsstudien nachweisen kann. Dieser Frage wird anhand der Caspase 3 nachgegangen, da die in den Bindungsstudien erhaltenen Ergebnisse wiederum in den bereits etablierten Funktionsstudien dieses Enzyms validiert werden können. Letztlich soll der Ansatz an einer anderen Enzymklasse als den Proteasen, den Phosphatasen nachgewiesen werden. Im Fallbeispiel der Phosphatasen soll auch auf das spezielle Problem bei der Entwicklung von Inhibitoren jener eingegangen werden. Zum Einen sind sich die meisten Phosphatasen auf Grund ihrer Funktion, der Hydrolyse von Phosphatester, sehr ähnlich, was dazu führt, dass die Entwicklung selektiver Inhibitoren sehr schwierig ist. Zum Anderen sind sogenannte Phosphatmimetika, Nachahmer der Phosphatestergruppe, die aber nicht hydrolysiert werden können, selten zellgängig. Für die Lösung des ersten Problems, die Entwicklung hoch selektiver Phosphataseinhibitoren soll eine dynamische Bibliothek gescreent werden, in der die erhaltenen Ligationsprodukte über einen Assay detektiert werden sollen. Die so erhaltenen Fragmente sollen später synthetisch miteinander verknüpft werden in der Hoffnung, einen selektiven Phosphataseinhibitor zu erhalten.

3 Das schwere akute respiratorische Syndrom - SARS

3.1 Schweres Akutes Respiratorisches Syndrom Coronavirus – SARS-CoV

Das Schwere Akute Respiratorische Syndrom (SARS) brach Ende des Jahres 2002 in der Provinz Guangdong im südlichen China aus. Die Krankheit wurde durch einen bis dahin unbekanntem Coronavirus ausgelöst.^[27] Sequenzuntersuchungen zeigten starke Abweichungen zu den bisher bekannten menschlichen Coronaviren.^[28] Die Suche nach dem Ursprung des Erregers begann. So konnte ein Virus aus den in Südchina frei lebenden Schleickatzen isoliert werden, der eine Sequenzidentität von mehr als 99 % zu dem SARS Coronavirus (SARS-CoV) aufweist.^[29] Der SARS-CoV zeigt eine Deletion von 29 Nukleotiden bezüglich des Virus der Schleickatzen, welches nahe legt, dass es sich um eine direkte Übertragung von der Schleickatze zum Menschen handelte. Dennoch kann nicht ausgeschlossen werden, dass die Wildkatzen gar nicht der ursprüngliche Träger des SARS-CoV gewesen sind, sondern ebenso wie der Mensch durch diesen infiziert wurde.

Erst später fand man heraus, dass nur eine vergleichsweise, kleine Mutation dieses Virus nötig war, um die Fähigkeit zur Transmission (Tröpfchenübertragung) unter Menschen zu entwickeln. Und gerade der SARS-CoV zeigte wie gefährlich ein Virus mit hoher Transmission in der heutigen, globalisierten Welt ist. Die Gefährlichkeit dieses Virus bestand in seiner schnellen Verbreitung und der von ihm verursachten hohen Mortalität, welches ihn schnell zu einer globalen Bedrohung machte. Insgesamt traten von Ende 2002 bis Juni 2003 SARS-Infektionen in 32 Ländern der Welt auf, bei der insgesamt ca. 8.500 erkrankten und davon mehr als 900 Menschen starben.^[30]

3.2 Molekulare Mechanismen der Infektion

Der SARS Coronavirus (SARS-CoV) gehört zu den Einzel(+)-Strang-RNA-Viren (ss(+)-RNA), d.h. er besitzt ein positiv einzelsträngiges RNA-Genom, welches mit ≈ 29.700 Nukleotiden das bisher größte, bekannte Virusgenom darstellt.^[31] Der Eintritt in die Wirtszelle erfolgt über die Wechselwirkungen der S1 Domäne seines S-Oberflächenproteins mit der Metallopeptidase, *angiotensin-converting enzyme 2* (ACE2) bzw. dem C-Type Lectin CD209L (auch L-SIGN genannt) menschlicher Lungenzellen. Als (ss(+)-RNA)-Virus erfolgt die Replikation des SARS-CoV über einen 30 Kilobasen langen unsegmentierten (+)-RNA-Strang, welcher in der Zelle direkt in das virale Polyprotein übersetzt wird. Dabei entsteht unter anderem die RNA-abhängige RNA-Polymerase, ein Enzym, welches die virale, genomische RNA zunächst in einen Antigenom(-)-Strang umschreibt. Von diesem werden wiederum (+)-Stränge gebildet. Mittels dieser (+)-mRNA wird das Replikasegen (> 21.000

Retroviren, bekanntestes Beispiel ist hier die HIV1-Protease, bieten diese Proteasen ideale Angriffsziele für Therapien.^[34, 35] So sind bereits seit dem Jahr 1996 Proteaseinhibitoren in der AIDS-Therapie verfügbar, die somit ein Ausschleusen und Reifung der Viren verhindern, nicht aber die Neuinfektion.

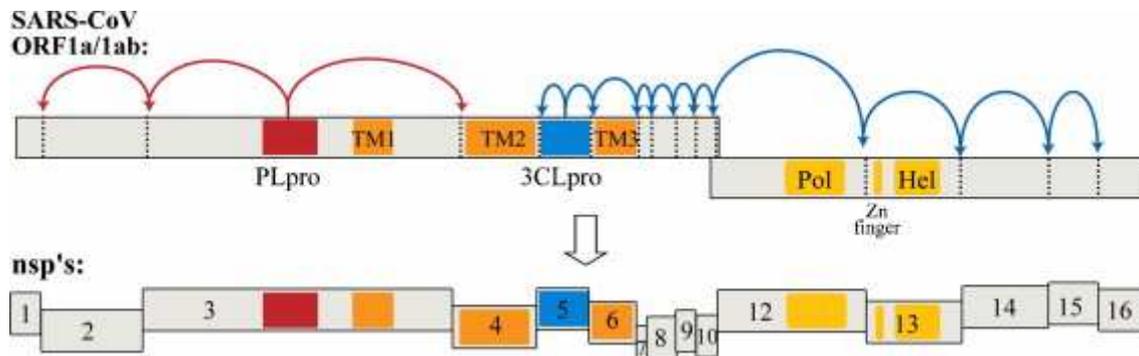


Abb. 3.2 Schematisches Diagramm des translatierten SARS-CoV Genoms. Die drei Schnittstellen der PLP2 (rot) stehen im Gegensatz zu den 11 Schnittstellen der SARS-CoV M^{pro}. Die SARS-CoV M^{pro} ist daher als Wirkstoffziel attraktiver.

Zur Zeit werden Anstrengungen unternommen, für beide Proteasen einen Inhibitor zu entwickeln. Dabei konnten Ratia et al. nachweisen, dass die PLP2 erfolgreich durch *small molecules* inhibiert wird ($IC_{50} \approx 2,3$ bis $20,1 \mu M$).^[36] Leider schneidet die PLP2 nur an drei Stellen am N-Terminus der viralen Proteine pp1a und pp1ab, während die SARS-CoV M^{pro} an mehr als 11 Stellen die viralen Proteine zu *nsp's* zerschneidet (siehe auch Abb. 3.2). Eine Inhibition der PLP2 kann demnach die Virusreifung nicht vollständig unterbinden. Dadurch, dass die Proteolyse hauptsächlich durch die SARS-CoV M^{pro} vermittelt wird, steht diese folglich im Fokus der Anti-SARS-Forschung.

3.3 Die SARS coronavirus-associated main protease (SARS CoV M^{pro})

Die SARS coronavirus-associated main protease (SARS-CoV M^{pro}) auch unter den Namen 3-Chymotrypsin-like protease (3CL^{pro}) bekannt, ist eine 33,8 kDa schwere Cysteinprotease. Die SARS-CoV M^{pro} ist für die Wirkstoffforschung interessant, da der SARS-CoV geringe Sequenzidentität mit den bisherigen humanen Coronaviren zeigte^[28, 29], aber seine *main protease* in hohem Maße homolog zu denen anderer Viren wie dem humanen Coronavirus (HCoV), dem Transmissiblen Gastroenteritis Virus (TGEV), dem Maus Hepatitis Virus und dem infektiösen Bronchitis Virus ist.^[37] Zu nennen ist dabei vor allem die große Ähnlichkeit in der Spezifität ihrer Substrate. Alle Hauptproteasen prozessieren C-terminal nach einem Glutaminrest. Entsprechend der Definition von Schechter und Berg Definition^[38] tragen alle Substrate dieser unterschiedlichen Proteasen Glutamin in der P1-Position.^[37] Diese große Ähnlichkeit bezüglich der Substratspezifität der Proteasen weist die SARS-CoV M^{pro} als

attraktives Wirkstoffziel aus. Ein Inhibitor der SARS-CoV M^{pro} müsste die Proteasen anderer Coronaviren ebenso adressieren.

Nach Informationen von Yang et al., die die Kristallstruktur der SARS-CoV M^{pro} mit dem substratanalogen, irreversibel bindenden Chlormethylketon-Inhibitor Cbz-Val-Asn-Ser-Thr-Leu-Gln-CMK bei pH 6.0, 7.6 und 8.0 lösten, bildet die SARS-CoV M^{pro} bei höheren Konzentrationen als 1 mg/ml in Lösungen ein Homodimer^[39, 40]. Die beiden Protomere werden als A und B bezeichnet und orientieren sich im rechten Winkel zueinander, welches bereits aus den Strukturen der HCoV und der TGEV M^{pro} bekannt ist (siehe auch Abb. 3.3).^[37]

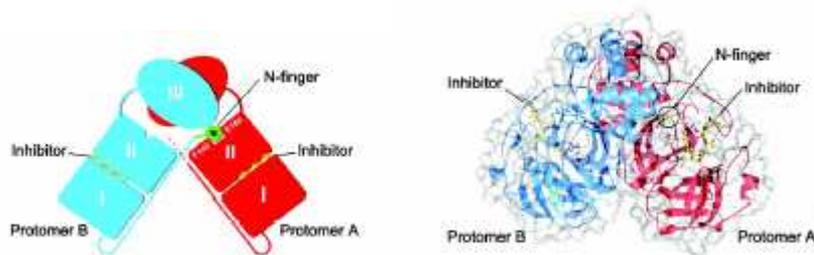


Abb. 3.3: Die SARS-CoV M^{pro} als Dimer. Links: Schematische Darstellung; Rechts: Mit Sekundärstruktur.^[37]

Ein Protomer besteht aus drei Domänen.^[39] Die Domäne I (AS 8 bis 101) und II (AS 102 bis 184) weisen eine antiparallele β -Fasstruktur auf, welche ähnlich zu anderen Coronavirus Proteasen und an die Trypsin-ähnlichen Serinproteasen erinnert. Die Domäne 3 (AS 201 bis 303) beinhaltet fünf α -Helices, welche einen antiparallelen, globulären Cluster bilden. Dieser ist mit der Domäne II über eine lange Loop-Region (AS 185 bis 200) verbunden. Die SARS-CoV M^{pro} weist eine katalytische Diade bestehend aus dem His-41 und dem Cys-145 auf. Die Substratbindungstasche liegt in einer Spalte zwischen der Domäne I und II. Für beide Protomere wird jeweils eine Substratbindestelle detektiert. Die Protomere der Kristallstrukturen, die bei pH 8,5 Bedingungen vermessen wurden, sind einander sehr ähnlich. (siehe Abb. 3.4).

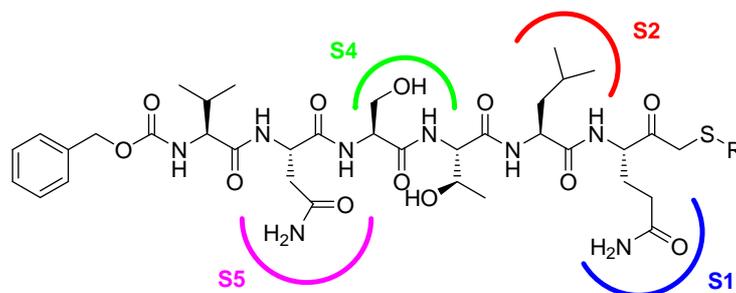


Abb. 3.4 Kanonisch-aktiver Bindungsmodus des Substratpeptides an die SARS-CoV M^{pro}. Die in Trypsin-ähnlichen Serinproteasen vorgefundenen Tasche S3 wird in der SARS-CoV M^{pro} in dieser Konformation nicht ausgebildet.

Anders verhält sich dagegen die Struktur bei pH 6.0. Die Bindestelle des Protomers A liegt hier in einer anderen, aber aktiven Konformation als die Substratbindetaschen der anderen Protomere vor. Die Bindetasche des Protomers B dagegen zeigt eine inaktive Konformation. (siehe Abb. 3.5). Durch konformative Änderung wird die Substratbindestelle blockiert und das für die Peptidhydrolyse so essenzielle Oxyanionen-Loch zur Stabilisierung des Übergangszustandes wird nicht ausgebildet. Folglich ist in dieser Kristallstruktur nur eines der beiden Protomere aktiv.

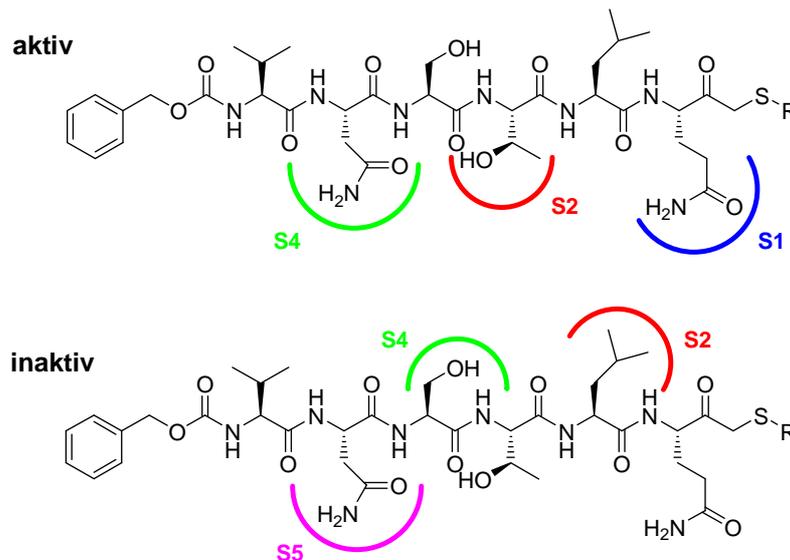


Abb. 3.5 Aktiver und inaktiver nicht-kanonischer Bindungsmodus des Substratpeptides an die SARS-CoV M^{pro}.

Man unterscheidet die aktive und inaktive Form der Protomere wie folgt: In der aktiven Form des Protomers A bindet das Glutamin P1 in die S1-Tasche. Das Leucin P2 bindet nicht in die S2 Tasche in der Nähe des Asp187, sondern verbleibt Solvens-exponiert. In die S2 Tasche bindet dagegen das Threonin P3. Hier fällt auf, dass die Spezifität der SARS-CoV M^{pro} für S2 Reste nicht so hoch ist wie bei anderen CoV M^{pro} (beschränkt auf Leucin). Letztlich bindet Asparagin P5 in die S4 Subtasche.

Im Gegensatz dazu bindet in der inaktiven Form des Protomers B das Glutamin P1 nicht in der S1 Tasche. Einzig Leucin P2 und Serin P4 zeigen in ihre entsprechenden Subtaschen. Die anderen Positionen verbleiben Solvens-exponiert.

Die bei einer Konzentration von 1 mg/ml beobachtete Dimerisierung wurde anfänglich durch die hohe Konzentration erklärt. Aber die oben genannten Bindungsmodi zeigten eindeutig, dass der N-Terminus des anderen Protomers (N-Finger) essenziell für die Ausbildung der P1-Bindungstasche des einen Protomers ist. Konkret beeinflusst die Aminogruppe des N-terminalen Serins des Protomers A die Wechselwirkung der Aminosäurereste von Phe140 und His163, was signifikant die Konformation der Reste Gly-143-Ser144-Cys145 stört. Die Folge

ist, dass der aktive Aminosäurerest des Cysteins 145 nicht mehr in der Lage ist die Peptidbindung des Substrates zu hydrolysieren.^[40] Die strukturellen Daten werden untermauert durch Mutationsstudien, in denen der N-terminale Serinrest deletiert wurde oder ein längerer GST-Tag angehängt worden ist. Alle diese Mutanten waren in Folge dessen inaktiv.^[41, 42] Die SARS-CoV M^{pro} ist also nur aktiv, wenn sie Homodimere ausbilden kann.

3.4 Entwicklung eines Inhibitors für die SARS-CoV M^{pro}

3.4.1 Synthese von Peptidaldehydinhibitoren

Zur Synthese von Peptidaldehyden gibt es zwei Möglichkeiten. Zum Einen über die Reduktion geschützter Aminosäuren oder zum Anderen über die Oxidation von Aminoalkoholen. Beide Strategien sind sowohl in Lösung^[43-46], an der Festphase^[47-50] oder mittels polymeren Reagenzien^[51, 52] möglich. In dieser Arbeit erfolgte die Synthese in Lösung sowie an der Festphase.^[53]

Zunächst wurde der Aminoaldehyd in Lösung synthetisiert (vergl. Abb. 3.6). Dazu wurde die entsprechende Aminosäure über die Aktivierung mit Isobutylchlorformiat (IBF) mit Hilfe von Natriumborhydrid zu deren Aminoalkohol reduziert.^[54, 55] Der erhaltene Aminoalkohol wurde daraufhin mit dem milden Oxidationsmittel Dess-Martin-Periodinan (DMP) zu dem Aminoaldehyd oxidiert.^[56] Der Vorteil dieser Strategie ist, dass die Konfiguration des C_α-Atoms der Aminosäure zum Aminoaldehyd bei sorgfältiger Behandlung nicht geändert wird.

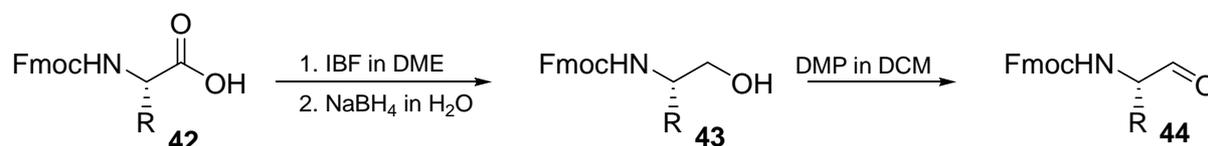


Abb. 3.6: Synthese des Aminoaldehyds ausgehend von der Aminosäure über die Reduktion zum Aminoalkohol und dessen Oxidation zum Aminoaldehyd.^[61-63]

Dann wurde analog zu den Arbeiten von Ede und Bray^[57] aus dem Jahre 1997 der Aminoaldehyd über einen Threonin-Oxazolidin-Linkern an die Festphase immobilisiert (Schritt a der Abb. 3.8). Der gebildete Oxazolidinring ist aber instabil und kann leicht hydrolysiert oder acyliert werden. In Vorarbeiten in dieser Arbeitsgruppe wurde hier eine Neuerung eingeführt. Al-Gharabli et al. acetylierten nicht den sekundären Stickstoff, schützten diesen mit Boc (Schritt b der Abb. 3.8). Die Boc-Schutzgruppe ist säurelabil und geht daher mit der Fmoc-Strategie zur Peptidsynthese einher.

An den auf diese Weise immobilisierten Fmoc-Aminoaldehyd erfolgt die Fmoc-SPPS (Schritt c der Abb. 3.8). Anschließend werden die Seitenschutzgruppen sauer abgespalten, unter anderem auch die Boc-Schutzgruppe des sekundären Stickstoffatoms des Oxazolidinringes.

Die Abspaltung des Peptidaldehydinhibitors erfolgt dann über die Hydrolyse des ungeschützten Oxazolidinringes mit einem wässrigsaurem Dichlormethan/Methanolgemisch.

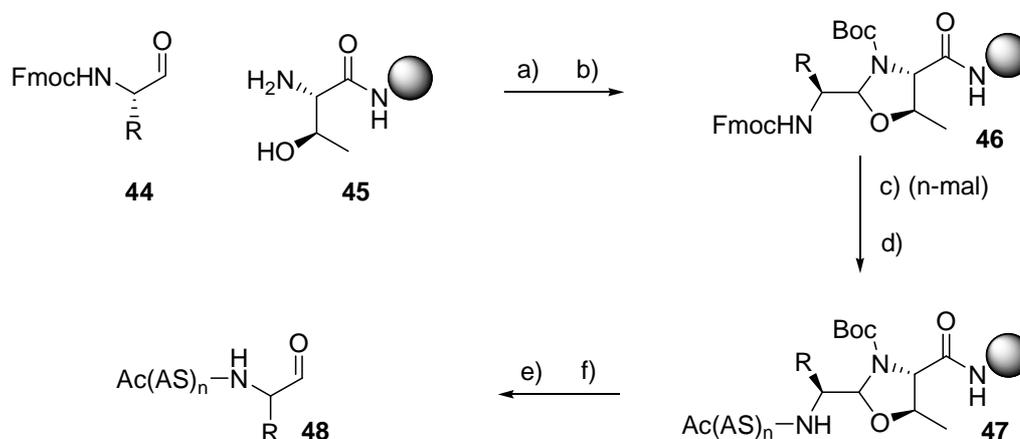


Abb.3.8: Synthese von Peptidaldehyden an der Festphase ausgehend von dem Aminoaldehyd nach Al-Gharabli et al.^[53] a) Immobilisierung des Aldehyds an Threonin via eines Oxazolidinringes. b) Boc-Schützung des Ringstickstoffes. c),d) Fmoc SPPS. e) Entschützung der säurelabilen Schutzgruppen mit TFA. f) Wässrige Abspaltung des Peptidaldehydes vom Harz.

3.4.2 Design und Evaluation der Peptidaldehydinhibitorbibliothek

Nachdem Al-Gharabli et al. die Synthese von C-terminalen Peptidaldehyden etabliert hatten, stellte sich die Frage, mit welchen Sequenzen man die Peptidaldehyde herstellen soll.

An dieser Stelle wurde eine Kooperation mit dem Arbeitskreis von Herrn Prof. Klebe (Universität Marburg) geschlossen. Prof. Klebe und seine Mitarbeiter unterzogen die Subtaschen 1 und 2 einer visuellen Inspektion und verglichen diese mit bereits bekannten Subtaschen anderer, homologer Enzyme. Über die Ähnlichkeitssuche der Subtaschen konnten sie eine Reihe von Vorschlägen machen, welche Liganden in die Subtaschen S1 und S2 binden (Tabelle IV.1 bis IV.3).^[58]

Tabelle 3.1 Aminosäurezusammensetzung der Subtaschen 1 und 2 der SARS-CoV M^{pro} (PDB Code 1uk4)

Subtasche	Zusammensetzung der SARS-CoV M ^{pro} (PDB Code 1uk4) Subtasche nach visueller Inspektion
S1	Phe140, Leu141, Ser144, His163, Glu166, His172
S2	His41, Met49, Met165, Asp187, Arg188, Gln189

Tabelle 3.2 Gruppen von Ligandfragmenten, die in ein ähnliches Umfeld wie in der S1-Subtasche der SARS-CoV M^{pro} binden.

Gebundenes Ligandfragment	Anzahl
Liganden mit Aminogruppen, basische Verbindungen	16
Aliphatische Liganden	4
Liganden mit Phosphatgruppen	19
Liganden mit Zuckern	21
Aromatische Liganden	6
Hämoglobin-artige Liganden	8
Liganden mit Alkohol- oder Säurefunktionen	13

Tabelle 3.3 Gruppen von Ligandfragmenten, die in ein ähnliches Umfeld wie in der S2-Subtasche der SARS-CoV M^{pro} binden.

Gebundene Ligandfragmente	Anzahl
Liganden mit Aminogruppen, basische Verbindungen	4
Aliphatische Liganden	28
Liganden mit Phosphatgruppen	2
Liganden mit Zuckern	8
Aromatische Liganden	49
Hämoglobin-artige Liganden	15
Liganden mit Alkohol- oder Säurefunktionen	12

Ausgehend von diesen Daten wurde die P1-Position mit Glutamin, Lysin, Leucin, Tryptophan, Aspartat und Tyrosin variiert. In der Tabelle 3.4 sind die synthetisierten Sequenzen aufgeführt.

Tabelle 3.4 Validierung der Peptidaldehydinhibitorbibliothek gegenüber der SARS-CoV M^{pro}.

Nummer	Sequenz	IC ₅₀ [μM]
48	Ac-NSTLQ-H	> 500
49	Ac-NSTLK-H	> 500
50	Ac-NSTLL-H	> 500
51	Ac-NSTLW-H	> 500
52	Ac-NSTLD-H	> 50
53	Ac-NSTLY-H	> 50
54	Ac-NSTQ-H	> 500
55	Ac-NSTAQ-H	> 50
56	Ac-NSTDQ-H	20
57	Ac-NSTSQ-H	7,5
58	Ac-NSFLQ-H	> 50
59	Ac-NSHLQ-H	> 500
60	Ac-NS(2,5-difluor-F)LQ-H	> 50
61	Ac-NS(4-Phenyl-F)LQ-H	> 500
62	Ac-NSWLQ-H	> 50
63	Ac-NS(Naphtyl)LQ-H	> 50
64	Ac-NS(4-Brom-F)LQ-H	> 50
65	Ac-NSILQ-H	> 50
66	Ac-FSTLQ-H	> 50
67	Ac-DSTLQ-H	10
68	Ac-ESTLQ-H	7,5
69	Ac-HSTLQ-H	> 50
70	Ac-QSTLQ-H	> 50
71	Ac-ESTSQ-H	> 500
72	Ac-DSFDQ-H	50

Als stärkste Inhibitoren erwiesen sich wie Tabelle 3.4 zeigt, die Sequenzen Ac-NSTDQ-H **56**, Ac-NSTSQ-H **57**, Ac-DSTLQ-H **67** und Ac-ESTLQ-H **68**. Die vier Peptidaldehydinhibitoren tragen jeweils in der P1-Position Glutamin, in der P3-Position Threonin und in der der P4-Position Serin. Nur in den Positionen P2 und P5 unterscheiden sich die Sequenzen.

Bei Betrachtung des schlechtesten Inhibitors **56** in Bezug zu **67** wird deutlich, dass Aspartat in der P5-Position eine stärkere Affinität zu dem Enzym bewirkt. Unterstützt wird dieser Gedanke, wenn man die Verbindungen **56** und die **57** betrachtet. Der bessere Inhibitor, Verbindung **57**, unterscheidet sich nur in der P2-Position von der **56**. Es scheint also, dass in der P2-Position Serin eine höhere Affinität bewirkt. Durch Vergleich des Inhibitors **67** mit der Substanz **68** wird deutlich, dass die Beobachtung, die beim Vergleich von **56** und **67** gemacht wurde, spezifiziert werden kann. **67** und **68** unterscheiden sich in der P5-Position nur durch die beiden ähnlichen Aminosäurereste Aspartat und Glutamat. Wobei der Aldehyd **68** mit Glutamat in der P5-Position eine bessere Affinität als **67** zeigt.

Ausgehend von diesen Beobachtungen wurde der Peptidaldehydinhistor mit der Sequenz

ESTSQ-H (71)

synthetisiert und getestet. Die IC_{50} -Validierung jenes Inhibitors überraschte allerdings. Der IC_{50} wurde mit über 500 μ M validiert.

Als Erklärung kann die in 3.3 diskutierte Struktur der SARS-CoV M^{pro} dienen. Die SARS-CoV M^{pro} bildet zwei Protomere aus, die einen aktiven und einen inaktiven Bindungsmodus ausbilden. Anscheinend liegt das Enzym in einem Gleichgewicht aus beiden Bindungsmodi vor.

Die in der Sequenz ESTSQ-H 71 verwendeten, additiven Effekte kommen nicht zum Tragen, da die ursprünglichen Sequenzen immer einen bestimmten Bindungsmodus adressieren. In der Sequenz ESTSQ-H 71 aber wurden die Merkmale beider Bindungsmodi vereint, was zu einer erheblichen Abschwächung der Inhibition führte.

Das Wissen, dass die SARS-CoV M^{pro} in unterschiedlichen Konformationen vorliegt, sollte nicht vernachlässigt werden, insbesondere für die weitere Inhibitorentwicklung am Computer.

3.4.3 Entwicklung eines dynamisch-kontrollierten Fragmentscreeningassays – das Dynamische Ligationsscreening (DLS)

Alle bisherigen Fragment-basierten Methoden haben gemeinsam, dass sie lediglich die Bindung, nicht aber die biologische Aktivität von Molekülen detektieren. Darüber hinaus erfordern alle diese Methoden große Proteinmengen und haben den Nachteil einer schwierigen, zeitaufwändigen und teuren Detektion der aktiven Verbindungen (siehe auch Einleitung).

Wir hatten die Idee, dass eine erheblich empfindlichere Detektion der bioaktiven Liganden realisierbar sein sollte, wenn reversibel gebildete Ligationsprodukte im dynamischen Gleichgewicht mit einem fluorogenen Reportersubstrat um ein Enzym konkurrieren (Abb. 3.9). Dieser Ansatz würde die dynamische, Protein-unterstützte Bildung der inhibitorischen Molekülspezies und die Detektion durch Fluoreszenzscreening-Techniken kombinieren wir benannten diesen Ansatz daher "dynamisches Ligationsscreening" (DLS). Im DLS-Verfahren sollten chemisch reaktive Inhibitoren als dirigierende Sonden verwendet werden können und eine Untersuchung von inhibitorischen Fragmenten für einen definierten Bindungsort auf der Proteinoberfläche ermöglichen. Eine enzymatische Reaktion könnte die Signale zur Detektion bindender Fragmente verstärken und dadurch die erforderliche Proteinmenge drastisch reduzieren. Schließlich sollte die enzymatische Detektion durch fluoreszierende Reportermoleküle das Hochdurchsatzscreening (HTS) in Mikrotiterplatten (MTPs)

ermöglichen, so dass erstmals konventionelle HTS-Techniken in der Fragment-basierten Ligandenentwicklung eingesetzt werden könnten.

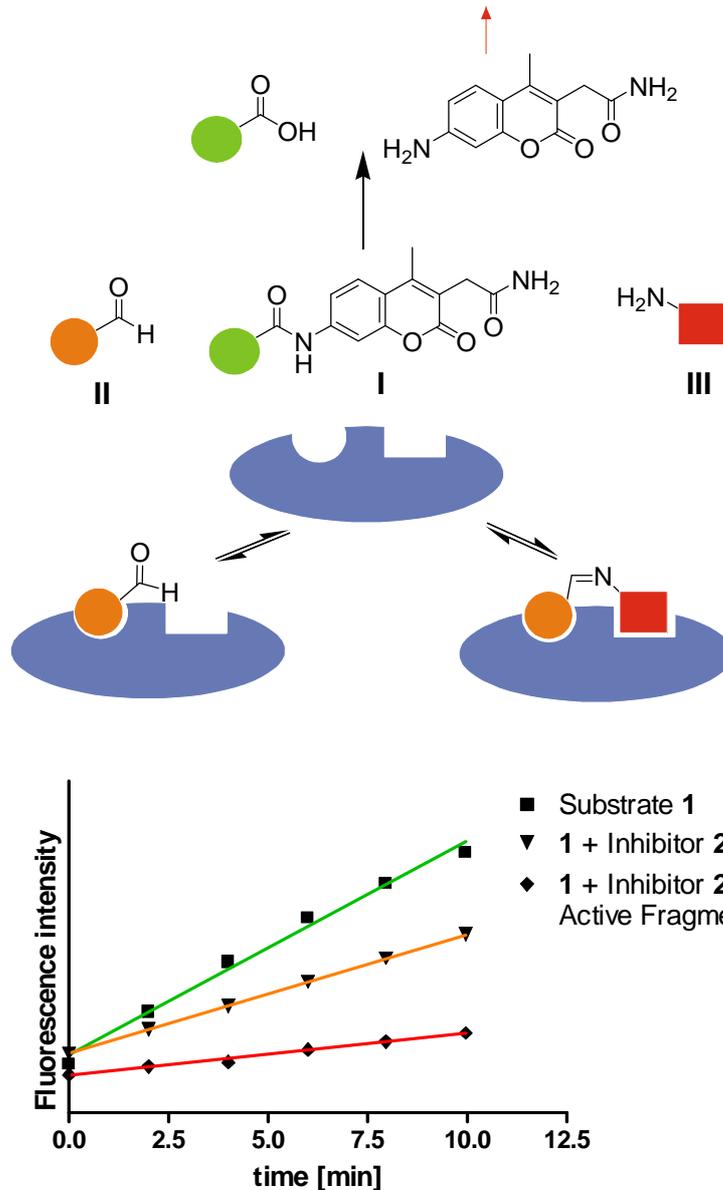


Abb.3.9 Das Konzept des dynamischen Ligationsscreenings (DLS). Substrat **I** konkurriert mit dem Peptidaldehydinhibitor **II** um die SARS-CoV-Hauptprotease (blau). Das aktive Fragment **3** sollte zu einer verstärkten Inhibition durch die Bindung des hypothetischen Iminligationsproduktes an die aktive Tasche führen.

3.4.4 Identifizierung von Fragmenten für die Subtaschen S1 und S1* ermöglichen die Entwicklung eines der besten reversiblen *drug-like* Inhibitoren der SARS-CoV M^{pro}

Zur Einführung der DLS-Methode für die zielgerichtete Identifizierung inhibitorischer Fragmente wurde zunächst ein Fluoreszenzassay für die Aktivität von SARS-CoV M^{pro} unter Verwendung des Substrates Ac-TSAVLQ-AMCA **73** entwickelt.

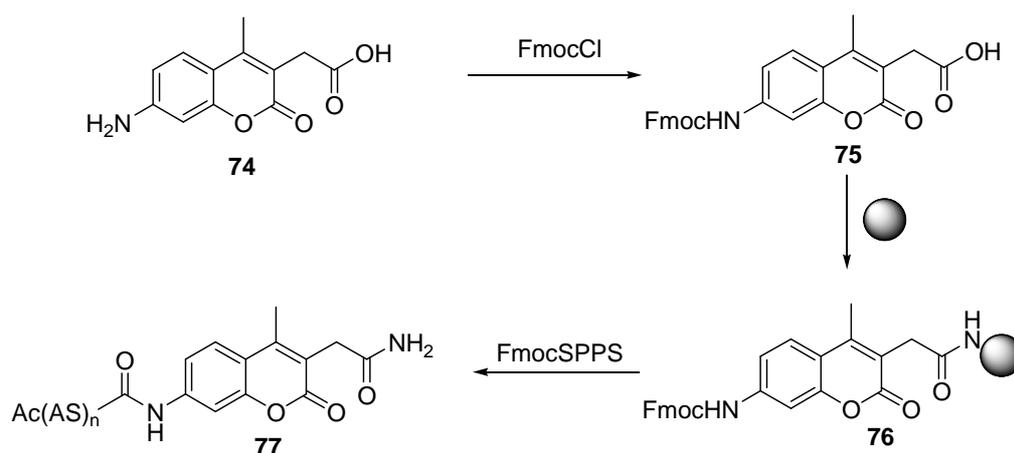


Abb. 3.10 Synthese des Fluoreszenzsubstrates Ac-TSAVLQ-AMCA **73**.

Enzymatische Spaltung von **73** setzte 2-(7-Amino-4-methyl-3-coumarinyl)acetamid frei, dessen Fluoreszenz nach Anregung bei 380 nm bei einer Wellenlänge von 460 nm detektiert wurde. Als Adressmolekül wurde der Peptidaldehydinhibitor Ac-DSFDQ-H **72** ausgewählt und auf dem geschützten Oxazolidinharz synthetisiert. Dieser Peptidaldehyd enthält einen C-terminalen Glutaminrest und liegt deshalb in wässriger Lösung im Gleichgewicht mit seinem zyklischen Kondensationsprodukt und seine Epimeren vor (Abb. 3.11).

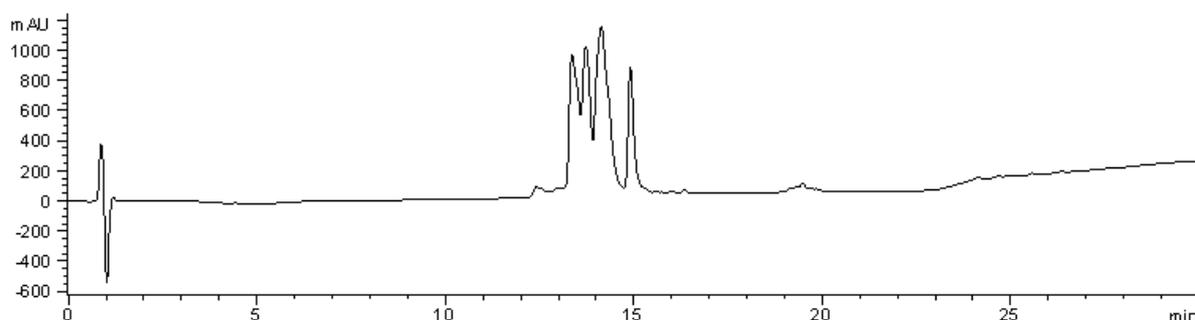


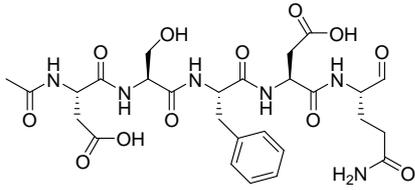
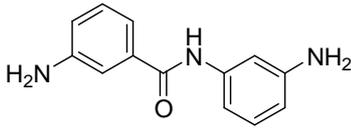
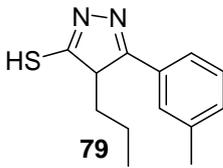
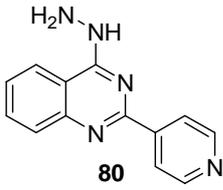
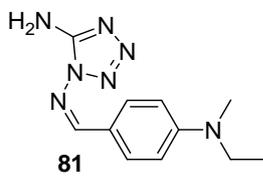
Abb. 3.11 LC-ESI-MS-Chromatogramm von Ac-DSFDQ-H **72** mit einem flachen Gradienten gefahren (0 % zu 25 % CH₃CN in 25 min). In den ersten zwei Peaks wurde das MH⁺-Signal von **72** beobachtet, in den beiden letzteren die beobachtete man die dehydrierten Massen (MH⁺-H₂O).

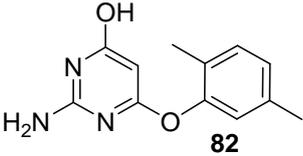
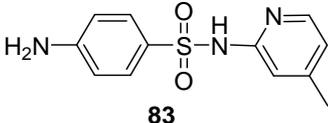
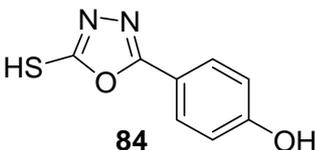
Von Arylaldehyden ist bekannt, dass sie - anders als aliphatische Aldehyde wie **72** - mit einem Überschuss primärer Amine in wässriger Lösung Imine als Hauptprodukte bilden.^[59] Daher blieb zu untersuchen, ob die hypothetischen Ligationsprodukte von Peptidaldehyd **72** und Nucleophilen auf einer Proteinoberfläche ausreichend stabilisiert werden, so dass sie in der Folge durch Konkurrenzexperimente mit Substraten detektiert werden können.

Um diese Frage zu untersuchen, wurde eine Bibliothek von 234 Nucleophilen zusammengestellt, die aromatische und aliphatische Amine, Thiole sowie Hydrazine enthielt.

Der Aldehyd **72** als dirigierende Sonde wurde sodann mit dem achtfachen Überschuss je eines nukleophilen Fragments pro Vertiefung in Gegenwart des Enzyms auf einer 384er Mikrotiterplatte inkubiert. Nach Zugabe des Reportersubstrates **73** wurden Geschwindigkeitsunterschiede bei der Umsetzung des Substrates quantifiziert, um aktive inhibitorische Fragmente auszumachen (Abb. 3.9, Tabelle 3.5). Keines der ausgewählten Fragmente zeigte im Kontrollexperiment bei einer Konzentration von 400 μM Aktivität als SARS-CoV M^{pro} -Inhibitor. Daraus konnte geschlossen werden, dass die Affinität aller Fragmente alleine im millimolaren Bereich oder noch niedriger liegt. Bei sieben Nucleophilen wurde eine deutlich stärkere Inhibition als mit dem Hemmstoff **72** alleine beobachtet (Tabelle 3.5).

Tabelle 3.5 Anfangsgeschwindigkeiten v der Substratumsetzung in Gegenwart der SARS-Hauptprotease, Substrat **73**, Peptidaldehyd **72** und aktiver nucleophiler Fragmente.

Elektrophil	Nukleophil	beobachtete v [$\mu\text{M}/\text{min}$]
--	--	$5,5 \pm 0,2$
	--	$2,8 \pm 0,1$
72		$1,0 \pm 0,1$
72		$1,0 \pm 0,1$
72		$1,6 \pm 0,1$
72		$1,9 \pm 0,1$

72	 82	$2,1 \pm 0,1$
72	 83	$2,2 \pm 0,1$
72	 84	$2,2 \pm 0,1$

Im nächsten Schritt wurde die spezifische Bindung der Trefferverbindungen an die aktive Enzymtasche der SARS-CoV Hauptprotease überprüft, um so beispielsweise eine allosterische Bindung auszuschließen. 3-Amino-*N*-(3-aminophenyl)benzamid **78** war die aktivste Verbindung und wurde für die exemplarische Bestätigung des Bindungsortes durch chemische Synthese und Modelling ausgewählt.

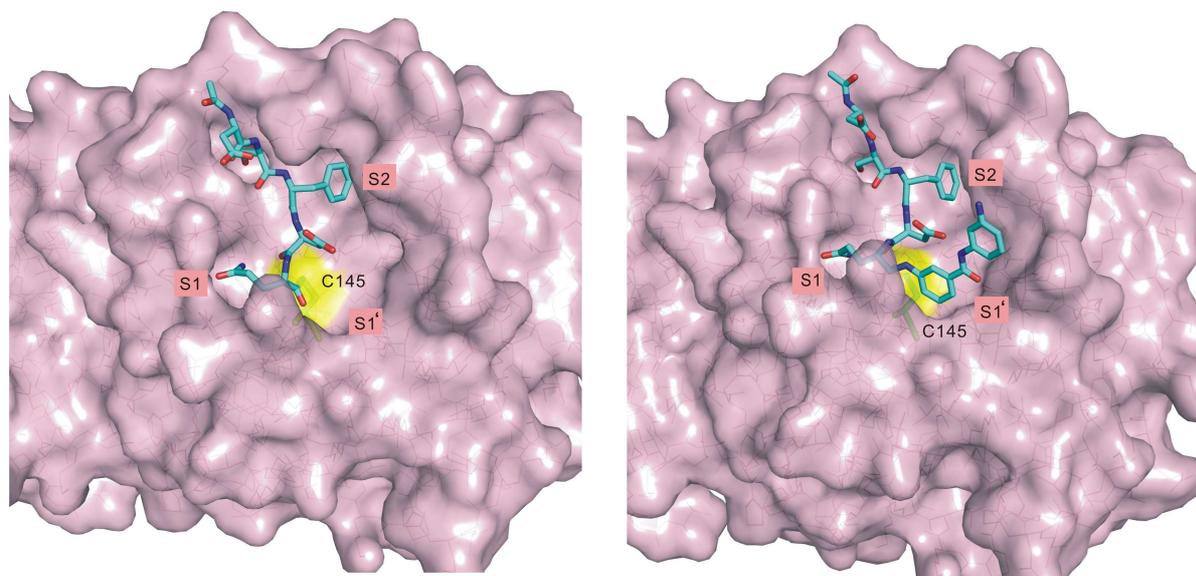


Abb. 3.11 *Molecular Model* von dem Aldehyde Ac-DSFDQ-H **72** (links) und des Schiffbasen-Ligationsproduktes von Ac-DSFDQ-H **72** mit **78**, gedockt in die Substratbindungstasche der SARS-CoV M^{pro} (rechts). Der aktive Cysteinrest 145 ist gelb markiert.

Das aus **72** und **78** gebildete Imin wurde als die aktive Spezies angenommen. Um diese Hypothese zu überprüfen, wurde zunächst das Produkt der reduzierenden Aminierung (**85**, Abb. 3.12) synthetisiert. Die Untersuchung von **85** im HPLC-Assay von Tan et al.^[60] ergab einen K_I -Wert von 50,3 μM . Der Vergleich der inhibitorischen Aktivität von **85** mit der des reduzierten Amides **86** und derjenigen der Peptide Ac-DSFDQ-OH **87**, DSFDQ-OH **88** und Ac-DSFDQ-NH₂ **89**, die alle bei 500 μM vollständig inaktiv sind, spricht ebenfalls für den

dirigierenden Effekt des Peptidaldehyds **72** und die Bindung des Fragmentes **78** in der S1*-Tasche. Die geringere Inhibition von **85** im Vergleich zu Peptidaldehyd **72** kann durch das Fehlen der elektrophilen Carbonylgruppe erklärt werden, die mit dem Cysteinrest der aktiven Tasche von SARS-CoV M^{pro} wechselwirkt.

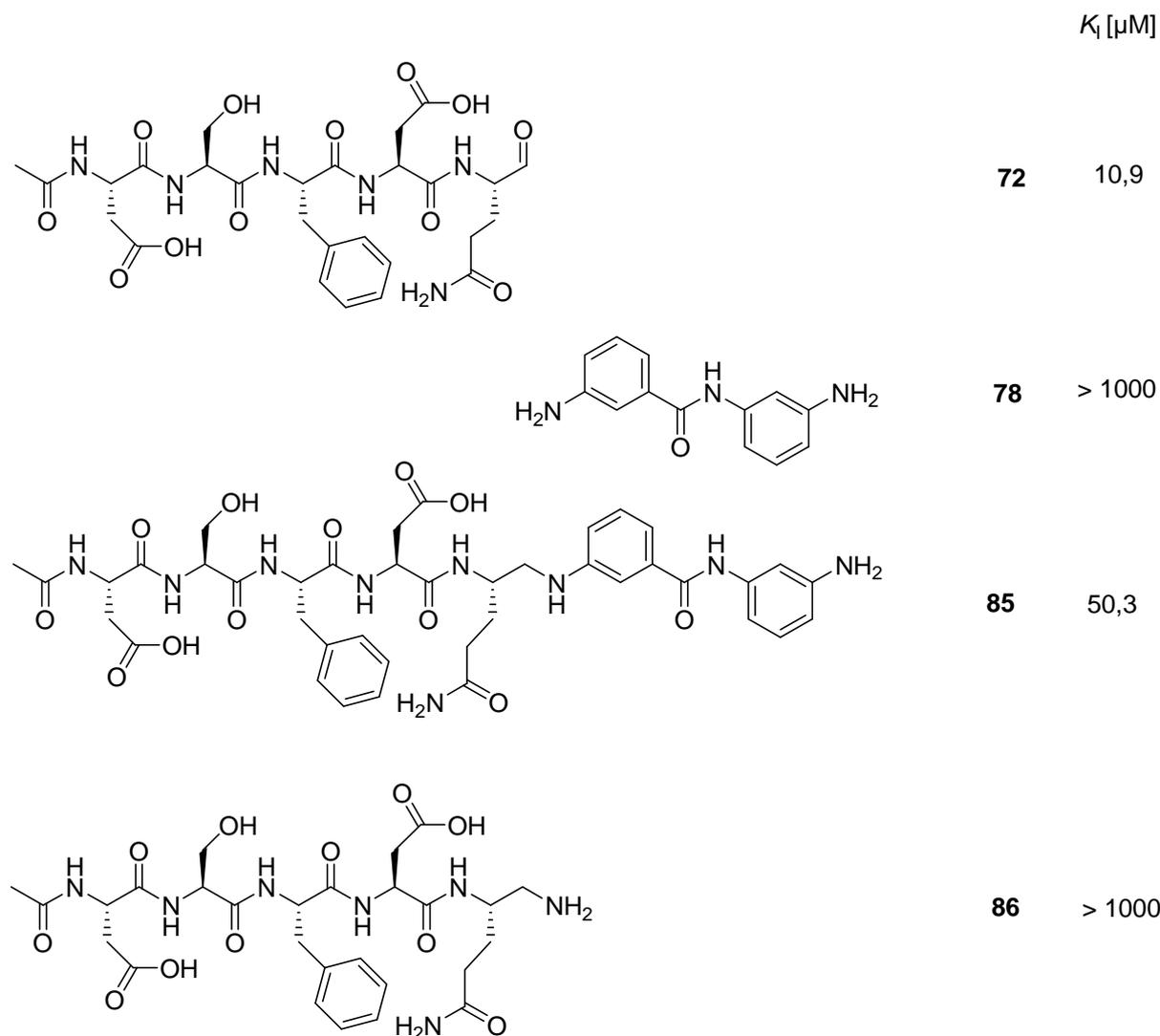


Abb. 3.12 Strukturen und Aktivitäten der Verbindungen **72**, **78**, **85** und **86**.

Ergänzend wurde die Wechselwirkung von **72** und dem mit **78** gebildeten Imin mit der SARS-CoV-Hauptprotease modelliert, woraus ein möglicher Bindungsmodus von Fragment **78** abgeleitet wurde (Abb.3.11).

Zusätzliche Belege für die Bindung von Fragment **78** in der S1*-Tasche wurden durch die Synthese und Testung der Aldehyde und 2-Ketoaldehyde **90-93** erbracht. Diese Verbindungen sind Derivative von **78**, die elektrophile reaktive Gruppen enthalten, über die sie mit dem enzymatisch aktiven Cysteinrest der Protease wechselwirken können (Abb.3.13). **90** und **91** wurden durch Oxidation der abgeleiteten Alkohole hergestellt, und die 2-Ketoaldehyde **92**

und **93** wurden durch Polymer-unterstützte C-Acylierung, Decarboxylierung und oxidative Abspaltung von einem Phosphanharz erhalten.^[61] In der Tat waren alle entworfenen Mono- und Biselektrophile aktive Inhibitoren von SARS-CoV M^{pro} (Abb.3.13). **91** und **93**, die das aktive Fragment an der gleichen Stelle relativ zum Cysteinrest im aktiven Zentrum positionieren sollten wie das anfänglich postulierte Ligationsprodukt, waren stärkere Inhibitoren als **90** und **92**. Der zur Kontrolle verwendete Benzaldehyd **94** war völlig inaktiv und lieferte damit einen weiteren Hinweis, dass die durch DLS detektierten Fragmente in der Tat spezifisch in der S1*-Tasche von SARS-CoV M^{pro} binden.

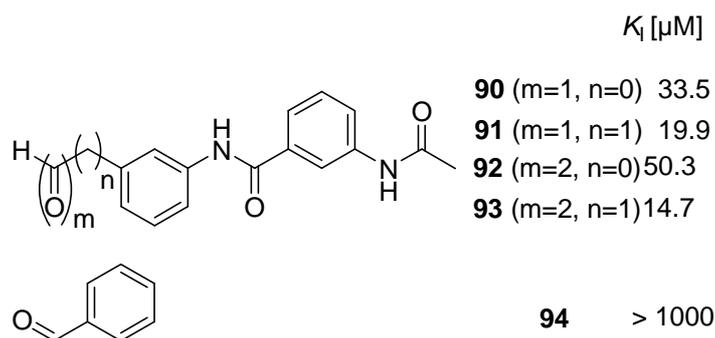
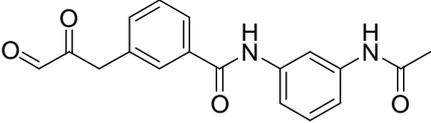
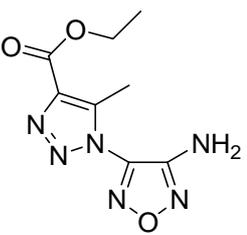
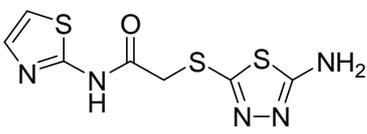
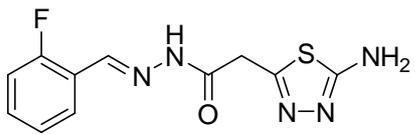


Abb. 3.13 Strukturen und Aktivitäten der Verbindungen **90** bis **94**.

Um einen vollständig nicht-peptidischen Inhibitor der SARS-CoV M^{pro} zu erhalten, der die S1*- und S1-Tasche abdecken kann, wurde das dynamische Ligationsscreening iterativ im „umgekehrten“ Modus durchgeführt (Tabelle 3.6). Anstelle des Peptidaldehyds **72**, der auf der S-Seite der Substratbindungstasche bindet, wurde nun der 2-Ketoaldehyd **93**, der vermutlich in der S1*-Tasche bindet, als dirigierende Sonde verwendet. Für dieses Experiment wurden 110 Amine aufgrund ihrer Diversität ausgewählt und untersucht. **93** wurde mit einem Amin pro MTP-Vertiefung, der Protease und dem fluorogenen Substrat Ac-TSAVLQ-AMCA **73** inkubiert. In diesem zweiten Experiment wurden drei Fragmente identifiziert, die in Gegenwart der dirigierenden Sonde **93** aktiv waren (Tabelle 3.6). Am aktivsten war **95**, das für eine Verifizierung der Inhibitorbindung durch chemische Synthese ausgewählt wurde.

Tabelle 3.6 Ausgehend von **78** wurde der elektrophile 2-Ketoaldehydinhibitor **93** entworfen und im „umgekehrten“ DLS verwendet (Anfangsgeschwindigkeiten der Substratumsetzung (v) in Gegenwart aktiver Nucleophile).

Nukleophile	Elektrophile	beobachtete v [$\mu\text{M}/\text{min}$]
--	 93	$4,3 \pm 0,1$
 95	93	$2,0 \pm 0,05$
 96	93	$2,5 \pm 0,05$
 97	93	$3,7 \pm 0,1$

Die Verwendung der 2-Ketoaldehyde **92** und **93** schien für eine kovalente Verknüpfung vorteilhaft zu sein, da in diesen Verbindungen die Aldehydfunktion für eine reduktive Aminierung zur Verfügung steht, während die 2-Ketogruppe für eine Wechselwirkung mit dem Cystein 145 intakt bleibt. Das Amin **95** wurde hergestellt und für eine reduktive Aminierung von 2-Ketoaldehyd **92** mit Trichlorsilan als Reduktionsmittel verwendet; so wurde das 2-Aminoketon **98** als kovalentes Ligationsprodukt erhalten. **98** inhibiert SARS-CoV M^{pro} im HPLC-Assay^[60] mit einem K_I -Wert von $2,9 \mu\text{M}$.

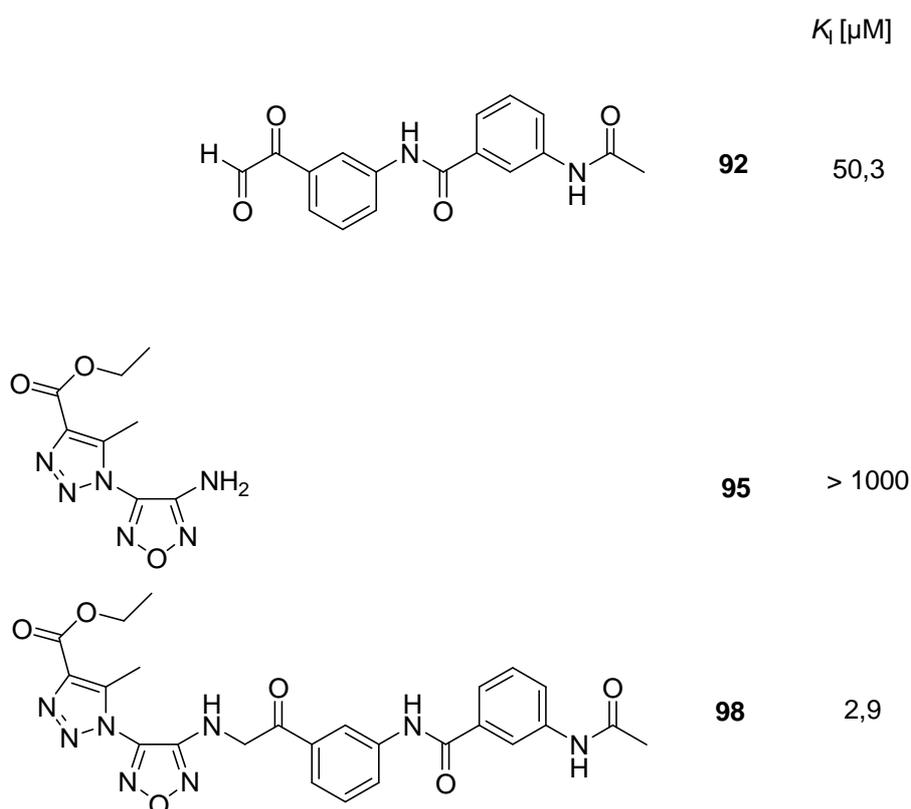


Abb.3.14 Entwicklung eines nicht-peptidischen SARS-CoV-M^{pro}-Inhibitors durch DLS. Das elektrophile Derivat **92** wurde mit dem gefundenen Amin **95** umgesetzt und lieferte den nicht-peptidischen Inhibitor **98**.

Damit haben wir gezeigt, dass das dynamische Ligationscreening (DLS) die empfindliche und ortsaufgelöste Detektion von Fragmenten niedriger Affinität mit Inhibitionskonstanten im millimolaren Konzentrationsbereich ermöglicht. Mit den bisherigen dynamischen Techniken und konventionellen Fragment-basierten Methoden sind derart niederaffine Fragmente nur schwierig oder überhaupt nicht zu detektieren. Die Methode wurde im Hochdurchsatzformat durchgeführt, und nur sehr geringe Proteinmengen wurden benötigt, da der Verstärkungseffekt durch die enzymkatalysierte Detektion genutzt wurde. Eine spezielle apparative Ausstattung war nicht erforderlich, lediglich ein standardmäßiges Mikrotiterplatten-Lesegerät. Am wichtigsten ist jedoch, dass das DLS-Verfahren iterativ in einem evolutionären Prozess durchgeführt werden konnte und die Transformation eines mäßig aktiven Peptidinhibitors in einen komplett nicht-peptischen Inhibitor mit einer Inhibitionskonstante im niedrigen mikromolaren Bereich ermöglichte. Wir haben hier das dynamische Ligationscreening für die Entwicklung eines SARS-CoV-Proteaseinhibitors vorgestellt; im Nachfolgenden wird die Anwendung leicht abgeändert auf weitere Proteasen und Phosphatasen angewandt.

4. Human Immunodeficiency Virus - HIV

4.1 AIDS und HIV

Das Humane Immundefizienz-Virus (HIV, engl.: *human immunodeficiency virus*) ist ein Virus, das zur Familie der Retroviren und zur Gattung der Lentiviren gehört. Eine Ansteckung führt nach einer unterschiedlich langen, meist mehrjährigen Inkubationszeit zu dem erworbenen Immundefektsyndrom (engl. *acquired immunodeficiency syndrome*, daher zumeist als AIDS abgekürzt) einer derzeit noch unheilbaren Immunschwächekrankheit. Bei den Erkrankten kommt es zu lebensbedrohlichen opportunistischen Infektionen und Tumoren. Bereits während der mehrjährigen, symptomfreien Latenzphase können zwar antivirale Medikamente eingesetzt werden, die die Lebenserwartung von Infizierten steigern. Eine Heilung ist jedoch nicht möglich, da die HI-Viren nicht vollständig aus dem Körper entfernt werden können.^[62]

Die Verbreitung von HIV hat sich in den letzten 25 Jahren zu einer Pandemie entwickelt, an der nach Schätzungen der Organisation UNAIDS bisher etwa 25 Millionen Menschen gestorben sind. Etwa 33,2 Millionen Menschen sind mit dem Virus infiziert. Im Jahr 2007 infizierten sich weltweit 2,7 Mio. Menschen mit HIV.^[63]

4.2 Molekulare Mechanismen der Infektion

HIV gehört mit seinem Einzel(+)-Strang-RNA-Viren (ss(+)RNA) Genom zu den Retroviren. Es ist ein Retrovirus mit Hülle, das in Abb. 4.1 dargestellt ist. Jedes Viruspartikel oder Virion enthält zwei Kopien eines RNA-Genoms, die in der infizierten Zelle in die DNA-Form überschrieben und dann ins Chromosom der Wirtszelle integriert werden. Die RNA-Transkripte, die von der integrierten viralen DNA hergestellt werden, dienen zum Einen als mRNA, welche die Synthese der viralen Proteine dirigiert, und zum Anderen später als RNA-Genom für neu gebildetet Viruspartikel. Diese werden aus der Zelle ausgeschleust, indem sie sich von der Plasmamembran abschnüren.

Die Fähigkeit von HIV, in bestimmte Zelltypen einzudringen, bezeichnet man als zellulären Tropismus des Virus. HIV nutzt spezifische Rezeptoren, die sich an der Oberfläche von diesen Zellen befinden. HIV dringt mithilfe eines Komplexes aus zwei nichtkovalent verbundenen Glykoproteinen in der Virushülle (gp120 und gp41) in die Zelle ein. Das gp120 des Virus bindet an den CD4-Rezeptor. Zur Vermehrung benötigt das Virus daher Wirtszellen, die den CD4-Rezeptor auf der Oberfläche tragen. Dies sind vor allem die CD4-tragenden T-Lymphozyten (T-Helferzellen), die beim Menschen eine wichtige Rolle sowohl in der zellulären als auch in der humoralen Immunantwort spielen und unter anderem die

Antikörperbildung unterstützen. Neben T-Lymphozyten besitzen auch Monozyten, Makrophagen und dendritische Zellen CD4-Rezeptoren. Durch die Bindung verändert sich gp120, sodass sich das Protein nun auch an einen G-Proteingekoppelten Chemokinrezeptor bindet. Dieser Rezeptor wirkt als Corezeptor für das Eindringen des Virus. Die Bindung setzt gp41 frei, das dann die Verschmelzung der Virushülle mit der Zellmembran bewirkt, so dass der Viruskern in das Zytoplasma gelangt. Dort erfolgt die sogenannte reverse Transkription. Das virale RNA-Genom wird in doppelsträngige DNA überführt und in das Genom der Wirtszelle integriert. Die Umwandlung von viraler RNA in provirale DNA im Zytoplasma der Wirtszelle durch das Enzym Reverse Transkriptase ist ein entscheidender Schritt im Reproduktionszyklus der Retroviren. Da es kein menschliches Gen gibt, das für eine Reverse Transkriptase kodiert, sondern dieses Enzym nur bei Viren wie Retro- und Hepadnaviren vorkommt, stellt die Reverse Transkriptase ein wichtiges Ziel therapeutischer Intervention dar und ist Ansatzpunkt zweier pharmakologischer Wirkstoffklassen (siehe 4.3).

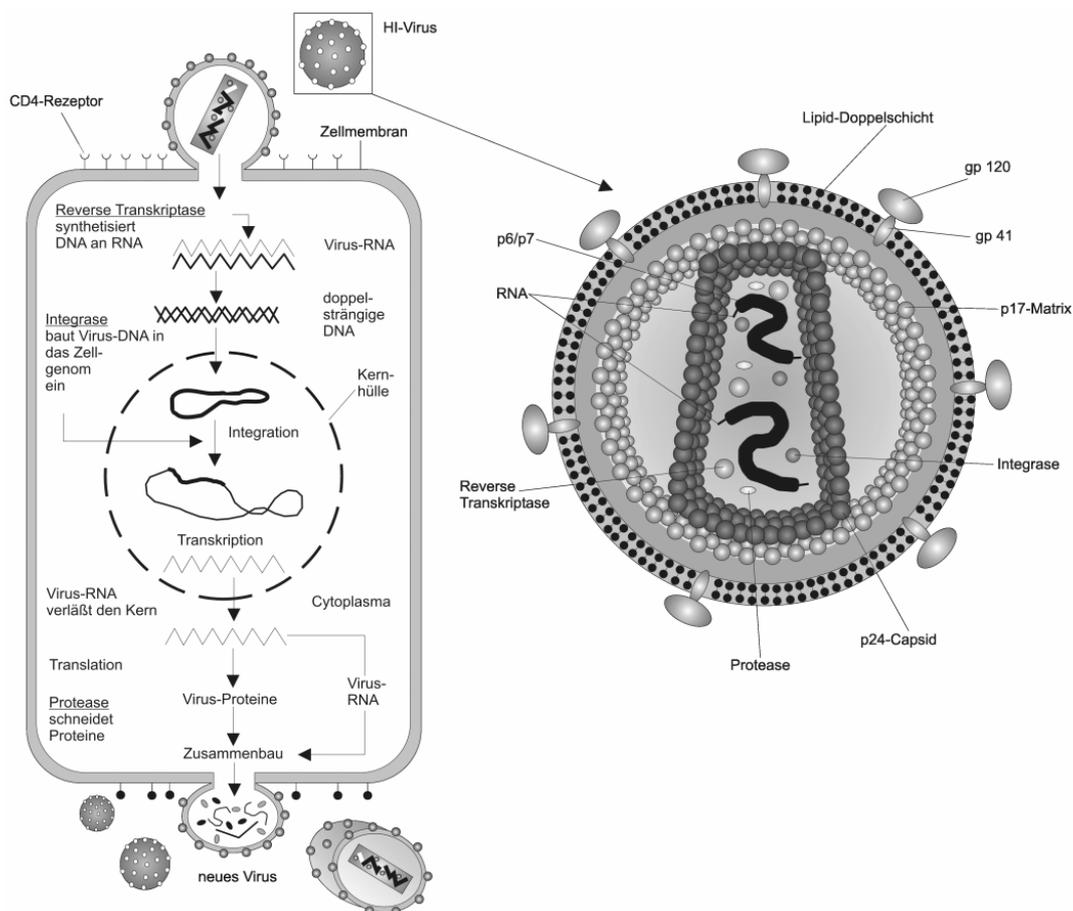


Abb. 4.1 Das Humane Immundefizienz-Virus (HIV). Rechts: Die Struktur des HI-Virus. Links: Der Replikationszyklus des HI-Virus zeigt die drei Wirkstoffziele zur Therapie auf: i) den gp120-Rezeptor, ii) die Reverse Transkriptase und iii) die HIV-Protease.^[64]

Nach reverser Transkription und Transport in den Zellkern schließt sich die Integration des Virusgenoms in das menschliche Erbgut durch ein weiteres virales Enzym, die Integrase, an.

Im weiteren Verlauf folgt die Morphogenese, das heißt über verschiedene Interaktionen finden die viralen Bestandteile wie gag-, pro-pol- und env-Vorläuferproteine sowie die RNA zusammen und formen sich zunächst zu unreifen Virionen, die sich von der Plasmamembran abschnüren. Durch weitere Reifungsprozesse entsteht das reife Viruspartikel, bereit für die Infektion der nächsten Zelle. Dazu gehört insbesondere die Spaltung der Vorläuferproteine in ihre einzelnen Bestandteile, teils durch die virale Protease, teils durch zelluläre Enzyme. Das Protein Gag wird in Matrix-, Kapsid- und Nukleokapsidprotein, das Protein Pol in Protease, Reverse Transkriptase mit RNase H und Integrase sowie Env in Oberflächen- und Transmembraneinheit prozessiert.

Bleibt die HIV-Infektion unbehandelt, sinkt die Zahl der CD4 T-Helferzellen kontinuierlich ab, und es kommt im Median neun bis elf Jahre nach der Erstinfektion zu einem schweren Immundefekt (< 200 CD4-Zellen/Mikroliter). Dieser führt in der Regel zu AIDS-definierenden Erkrankungen. Zu diesen zählen opportunistische Infektionen, die durch Viren, Bakterien, Pilze oder Parasiten bedingt sind, sowie andere Erkrankungen, wie das Kaposi-Sarkom. Nach individuell unterschiedlicher Zeit führen diese unbehandelt meist zum Tod.

4.3 Die *highly active anti-retroviral therapy* – HAART

Die *highly active anti-retroviral therapy* HAART (zu deutsch: hochaktive antiretrovirale Therapie) bezeichnet eine 1996 eingeführte Kombinationstherapie aus mindestens drei verschiedenen antiretroviralen Medikamenten zur Behandlung der HIV-Infektion.^[65]

Neuerdings wird anstatt HAART der neutralere und damit korrektere Begriff cART (*combined Anti-Retroviral Therapy*) verwendet, in Deutschland wird sie meistens nur Kombinations-Therapie genannt.

HAART besteht aus der Kombination mehrere Arzneistoffe, die jeweils unterschiedliche Wirkstoffziele wie

- Die Entry-Rezeptoren
- Die Reverse Transkriptase und
- Die Virusprotease

adressiert.

Als Inhibitoren der Entry-Rezeptoren dienen meist Peptide wie T20 oder kleine Moleküle. Im Allgemeinen ist aber zu sagen, dass Entry-Inhibitoren einer hohen Resistenzrate der Viren unterliegen und damit in der Therapie eher vernachlässigt werden.^[65]

Dagegen stellt die Reverse Transkriptase ein interessantes Wirkstoffziel dar. Die Umwandlung von viraler RNA in provirale DNA im Cytoplasma der Wirtszelle durch das

Enzym Reverse Transkriptase ist ein entscheidender Schritt im Reproduktionszyklus des HIV-Virus. Da es kein menschliches Gen gibt, das für eine Reverse Transkriptase kodiert, sondern dieses Enzym nur bei dem Virus vorkommt, stellt die Reverse Transkriptase ein wichtiges Ziel therapeutischer Intervention dar und ist Ansatzpunkt zweier pharmakologischer Wirkstoffklassen. Zum Einen werden die nukleosidische Rreverse-Transkriptase-Inhibitoren (NRTI) verwendet (Abb.4.2). Es handelt sich um Nukleosid-Analoga, die den natürlichen Nukleosiden ähneln und damit kompetitiv das Enzym inhibieren. Die katalytisch aktive Bindungsstelle wird blockiert. Im Gegensatz dazu binden die nichtnukleosidische Rreverse-Transkriptase Inhibitoren (NNRTI) nicht-kompetitiv an die Reverse Transkriptase, also abseits der Substratbindungsstelle für Nukleoside. Die Inhibition erfolgt daher allosterisch.

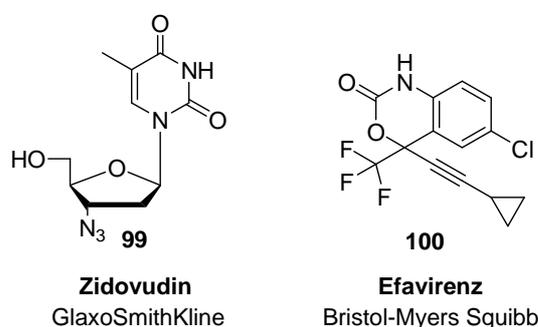


Abb. 4.2 Beispielverbindungen für kommerziell erfolgreiche, nukleosidische Rreverse-Transkriptase-Inhibitoren (NRTI) **99** und nichtnukleosidische Rreverse-Transkriptase Inhibitoren (NNRTI) **100**.

4.4 Die human immunodeficiency virus 1 protease (HIV1-Protease)

Die HIV1-Protease ist eine Aspartylprotease, die ein Homodimer aus zwei 99 Aminosäure langen Polypeptiden bildet. Die Aufgabe der HIV1-Protease ist die Prozessierung des translatierten, viralen Polyproteins, welches vor der Virusreifung geschieht. Blockiert man diese Reifung, kann kein vollständiges Virion aus der Wirtszelle abgeschnürt werden, eine weitere virale Infektion anderer Zellen ist verhindert. Aus diesem Grund ist die HIV1-Protease, als möglicher Ansatzpunkt für Medikamente gegen AIDS, von großem wissenschaftlichen Interesse. Wie in Abb. 4.3 und Abb. 4.4 erkennbar ist, leiten sich die bisherigen, marktreifen Proteaseinhibitoren stark von dem peptidischen Substrat ab.

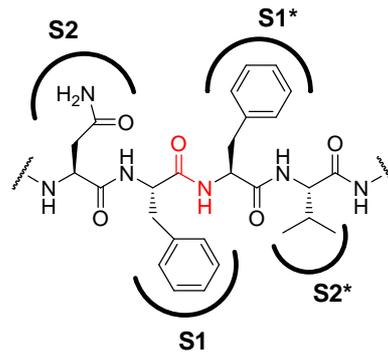


Abb. 4.3 Motiv des nativen Substrates: Asparagin-Phenylalanin-Phenylalanin-Valin

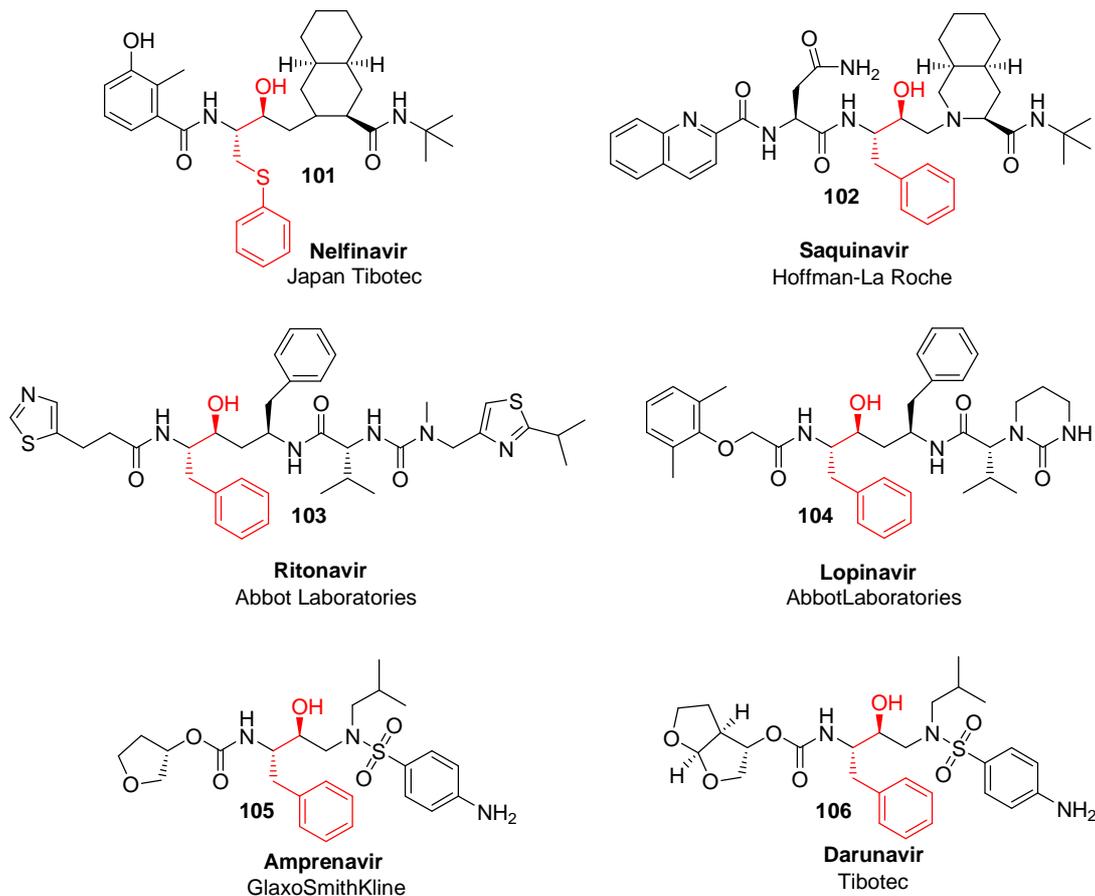


Abb. 4.4 Strukturen der kommerziell erfolgreichen HIV1-Proteaseinhibitoren sind alle von dem peptidischen Substrat abgeleitet und enthalten daher alle das Phenylalaninmotiv.

Wie aus mehreren Resistenzstudien hervorgeht, ist der Phenylalaninrest in der P1 Position essenziell. Bei Mutationen ändert sich meistens die P2- oder die P1*-Position, nicht aber die P1-Position.^[66] Erfolgt eine Mutation in der Erkennung des Phenylalaninrestes, verliert der Virus seine Fähigkeit das Polyprotein zu prozessieren. Der Replikationszyklus ist unterbrochen. Bei Patienten treten daher in der Therapie (Resistenzdruck) nur Mutationen links und rechts von dem Phenylalaninmotiv auf. Für die Medizinische Chemie bedeutet das,

dass der Phenylalaninrest beibehalten werden kann und die Flanken geändert werden müssen. Daher sind alle gezeigten Strukturen bis heute sehr erfolgreich.

4.5 Entwicklung eines HIV-1 Proteaseinhibitors mit Hilfe des Dynamischen Ligationsscreenings (DLS)

Die Aufgabe im Falle der HIV-1 Protease war es daher, einen Inhibitor mit Hilfe des Dynamischen Ligationsscreenings (DLS) zu entwickeln, der zwar noch das Phenylalaninmotiv enthält, dessen beide Flanken, die S2- bzw. die S1*-Position, aber modifiziert sind (Abb. 4.5). Es sollte gezeigt werden, dass DLS es ermöglicht schneller, einfacher und effizienter die Flanken erfolgreich zu variieren als die konventionelle Kombinatorische Chemie es vermag.

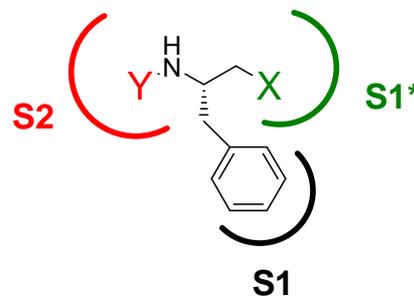


Abb. 4.5 Schematischer Aufbau des durch DLS zu entwickelnden Inhibitors. Das Phenylalaninmotiv bleibt erhalten, nur die P2- und die P1*-Position sollen variiert werden.

Als Strategie wurde das parallele Dynamische Ligationsscreening (pDLS) entwickelt. D.h. man entwickelt zwei Adressmoleküle mit jeweils einem „warhead“, einer Aldehydfunktion an der zu screenenden Stelle, die beide übereinstimmende Bindungsmotive besitzen (Abb. 4.6). Beide Adressmoleküle werden parallel in einem unter 3. entwickelten Dynamischen Ligationsscreening (DLS) verwendet und die parallel gefundenen Fragmente später synthetisch zusammengefügt. Der Ansatz soll die bisher iterative und damit zeitaufwendige Vorgehensweise ersetzen und so zu Zeitersparnis in der Inhibitorentwicklung führen.

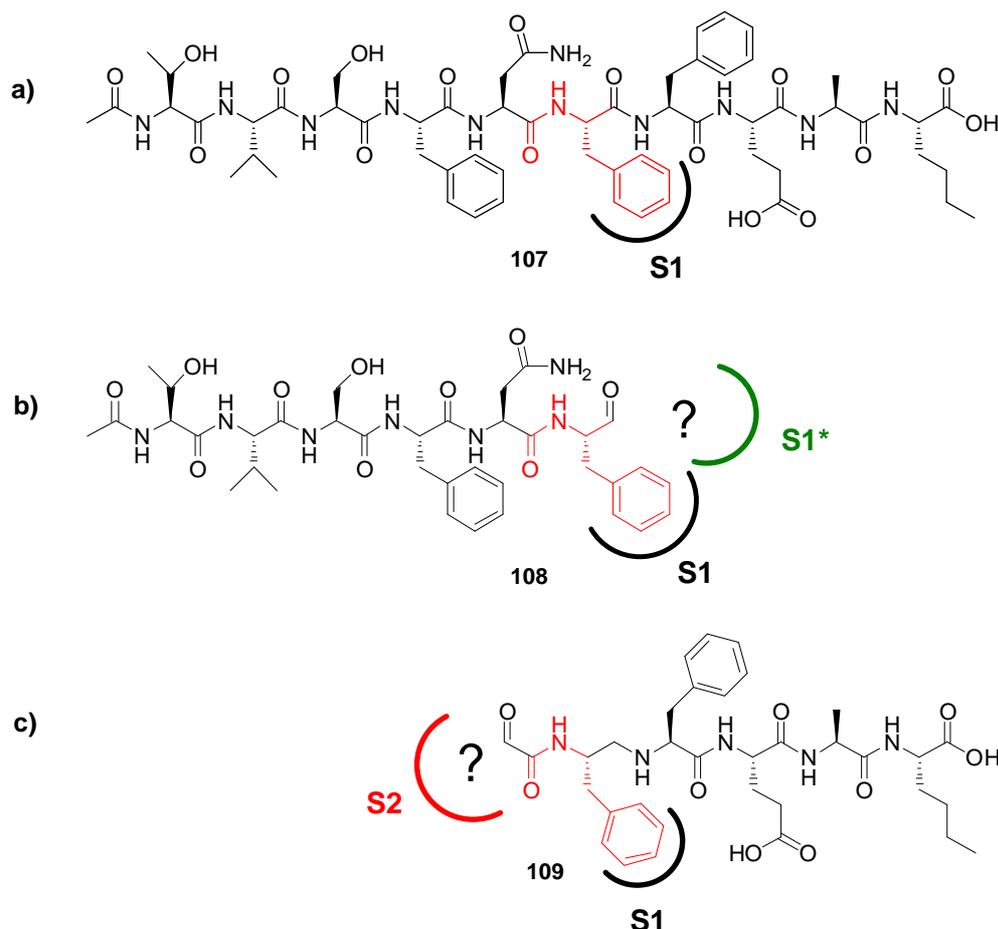


Abb. 4.6 Ausgehend von der Substratsequenz **107** wurden die beiden Adressmoleküle **108** und **109** synthetisiert. **108** soll Fragmente in die S1*-Subtasche adressieren. **109** dagegen soll Fragmente in die S2-Subtasche adressieren.

4.5.1 Dynamisches Ligationsscreening für die P1*-Position

Für das Screening der P1*-Position wurde analog zu dem im vorherigen Kapitel vorgestellten Konzept der Peptidaldehydinhibitor Ac-TVSFNF-H **108** (siehe auch Abb. 4.6b) synthetisiert (Synthese erfolgte analog zu 3.).

Der Peptidaldehydinhibitor wurde in dem kommerziell erhältlich Substratinhibitionsassay Anthranilyl-Lys-Ala-Arg-Val-Nle-(*p*-NO₂)Phe-Glu-Ala-Nle-NH₂ **110** getestet.^[67] Dort zeigte **108** einen IC₅₀-Wert von 7,8 μM (Abb. 4.7).

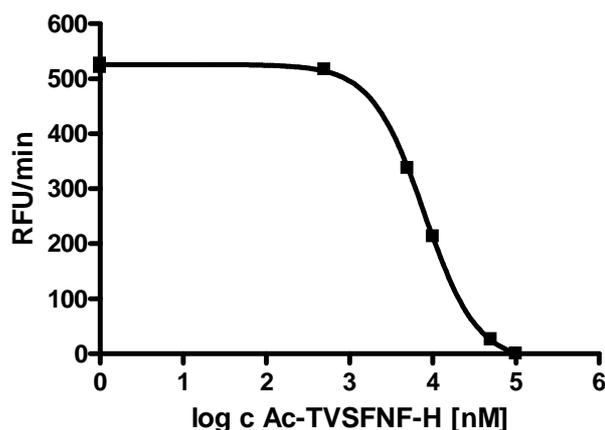


Abb. 4.7 Logarithmische Auftragung der Aktivität der HIV1-Protease in Anwesenheit verschiedener Konzentrationen des Inhibitors **108**. Der IC_{50} beträgt $7,8 \mu\text{M}$.

Ausgehend von dem Inhibitor Ac-TVSFNF-H **108** wurde unter analogen Bedingungen wie unter III. beschrieben, jeweils einzelnen **108** ($7,5 \mu\text{M}$) mit einem Überschuss von $500 \mu\text{M}$ eines zu testenden Amins für 30 min bei 37°C inkubiert und anschließend das Substrat **110** hinzu gegeben. Nach Analyse der Daten zeigte sich, dass vier Amine alleine völlig inaktiv waren, aber in Kombination mit **108** zu vollständiger Inhibition führten. Als Beispiel ist in Abb. 4.8 die Produktentwicklung nach der Zeit mit $7,5 \mu\text{M}$ Adressmolekül **108** (blau) und mit $7,5 \mu\text{M}$ Adressmolekül und Überschuss an Amin **113** (rot) gezeigt.

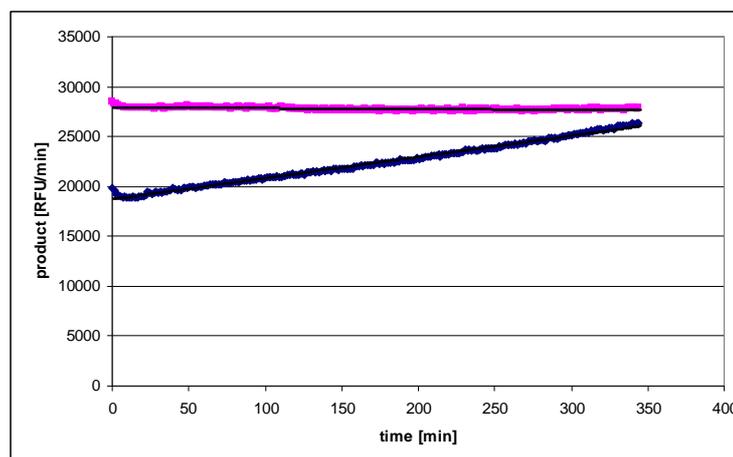


Abb. 4.8 Produktentwicklung nach der Zeit mit $7,5 \mu\text{M}$ Adressmolekül **108** (blau) und mit $7,5 \mu\text{M}$ Adressmolekül und Überschuss an Amin **113** (rot) induziert, dass sich aus **108** und **113** eine inhibitorisch stärkere Schiffbase gebildet hat.

Die vier so gefundenen Fragmente sind in Abb. 4.9 aufgeführt. Interessant ist, dass die Verbindungen **112** und **114** sich stark ähneln. Da sich aber bei beiden eine Nitrilgruppe im Molekül befindet, wurde für den weiteren Verlauf nur noch mit der Verbindung **113** gearbeitet.

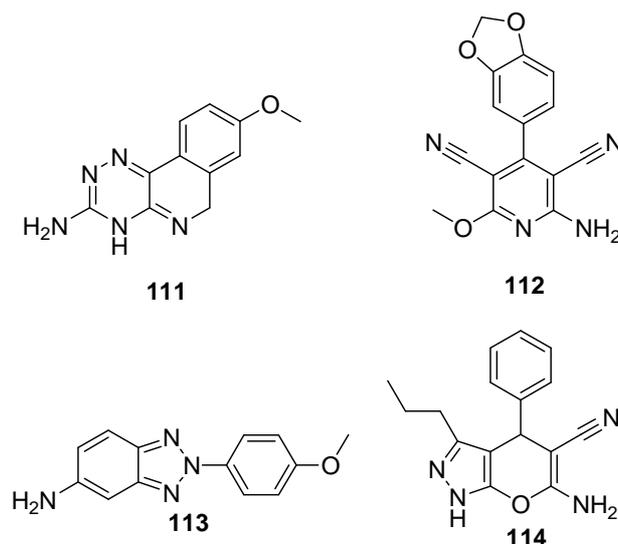


Abb. 4.9 Die über DLS identifizierte Fragmente sind allein inaktiv, nur in Anwesenheit des Adressmoleküls **108** führen alle vier zu vollständiger Inhibition der HIV-1 Protease.

4.5.2 Dynamisches Ligationsscreening für die P2-Position

Für das Screenen der P2-Position musste das Adressmolekül *N*-Glyoxylyl-Phe-ψ(CH₂-NH)-Phe-Glu-Ala-Nle-OH **109** synthetisiert werden. Hierzu wurde auf das Konzept von Melnyk et al. zurückgegriffen.^[68] Wie in Abb. 4.10 gezeigt ist, wurde zuerst die Aldehydfunktion des Bausteins Glyoxalsäure **115** zweimal mit Fmoc-Amin als *N,N*-Diacetal geschützt und dann als **116** in der Peptidsynthese eingesetzt.

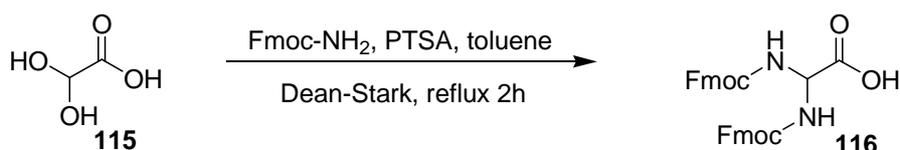


Abb. 4.10 Synthese der mit Fmoc geschützten Glyoxalsäure für die Fmoc-SPPS.

Mittels der gängigen Fmoc-SPPS wurde an Tritylharz die Aminosäuresequenz H₂N-Phe-Glu-Ala-Nle-OH synthetisiert. Als Peptidisoester wurde das reduzierte Amid gewählt. Die nächste Position wurde daher nicht acyliert, sondern mit Phenylalaninal reaktiv aminiert. Anschließend wurde die Fmoc-geschützte Glyoxylsäure acyliert und entschützt (Abb. 4.11).

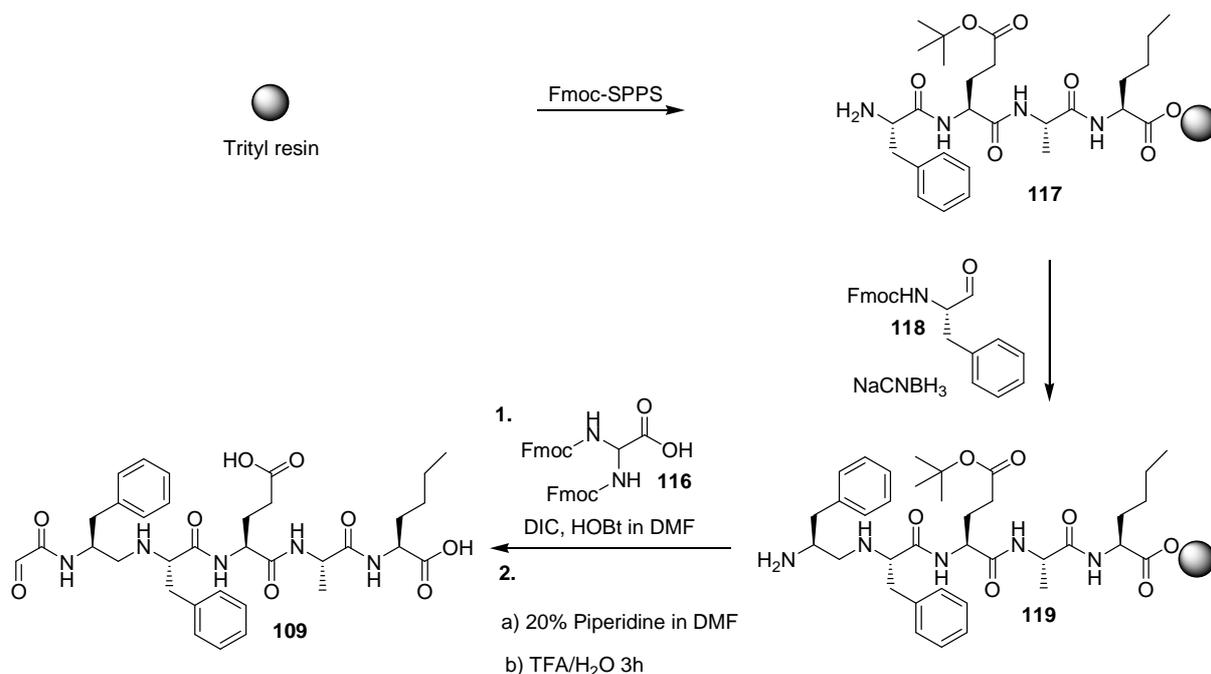


Abb. 4.11 Synthese des Adressmolekül *N*-Glyoxylyl-Phe- ψ (CH₂-NH)-Phe-Glu-Ala-Nle-OH **109**. Zuerst erfolgt die Peptidsynthese H₂N-Phe-Glu-Ala-Nle-OH an Tritylharz **117**. Gefolgt von der reduktiven Aminierung des Phenylalaninal **118** zu **119**. Zuletzt wird die geschützte Glyoxalsäure **116** acyliert und nach vollständiger Entschützung erhält man **109**.

Der IC₅₀ der Verbindung **109** wurde dann in dem Substratinhibitionsassay mit 5 μM bestimmt (Abb. 4.12).

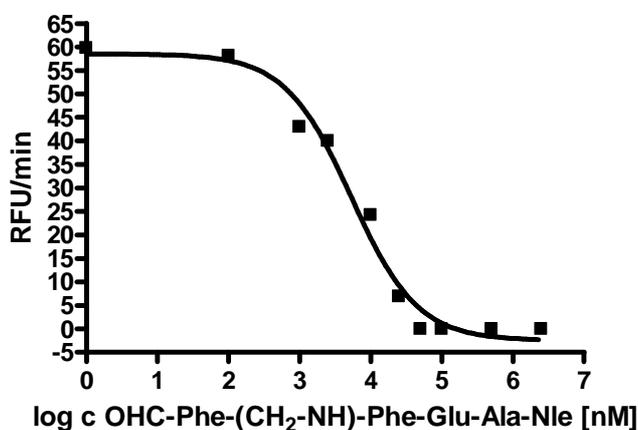


Abb. 4.12 Logarithmische Auftragung der Aktivität der HIV1-Protease in Anwesenheit verschiedener Konzentrationen des Inhibitors **109**. Der IC₅₀ beträgt 5 μM .

Es wurden 5 μM der Verbindung **109** mit einer Konzentration von 500 μM Amin für 30 min inkubiert und nach anschließender Substratzugabe die Aktivität beobachtet. Es wurden 6 Amine identifiziert, die allein gegen die HIV1-Protease inaktiv waren, aber in Anwesenheit des Adressmoleküls **109** zu vollständiger Inhibition führten (Abb. 4.13).

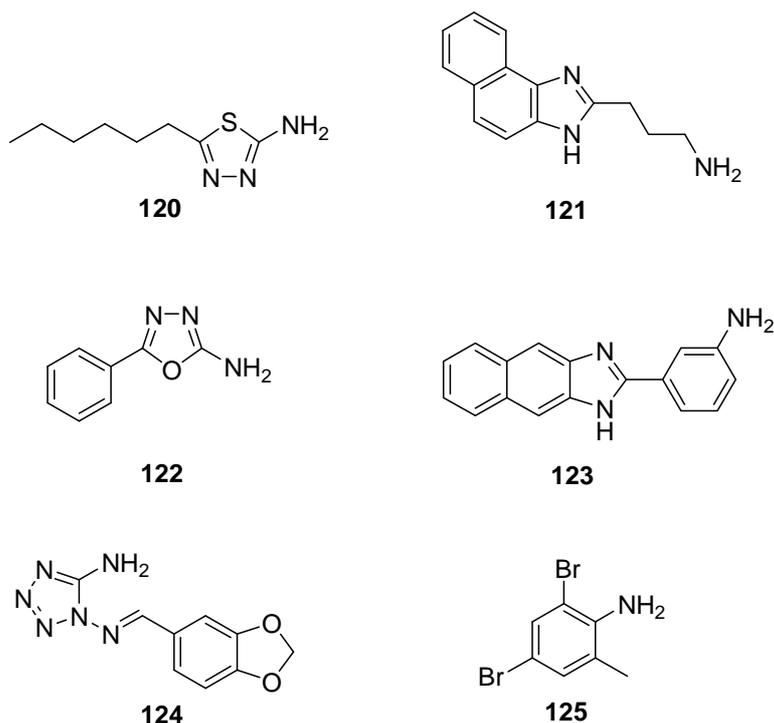


Abb. 4.13 Die über DLS identifizierte Fragmente sind alleine inaktiv, nur in Anwesenheit des Adressmolekül **109** führen alle sechs zu totaler Inhibition der HIV1-Protease.

4.6 Synthese und Evaluation des durch DLS identifizierten HIV1-Protease-Inhibitors

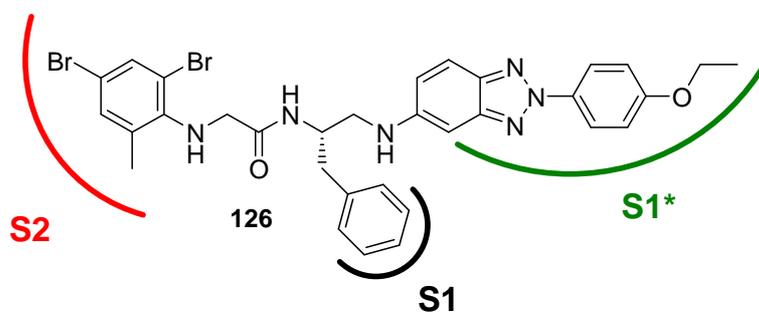


Abb. 4.14 Finale Struktur des Inhibitors **126**, der durch die parallelen DLS identifiziert wurde.

Aus den beiden Screens wurden jeweils die Hitfragmente **113** und **125** für die jeweilige Position in dem Molekül ausgewählt (Abb. 4.14). Anschließend wurde für diesen potentiellen Inhibitor **126** eine Retrosynthese entwickelt (Abb. 4.15).

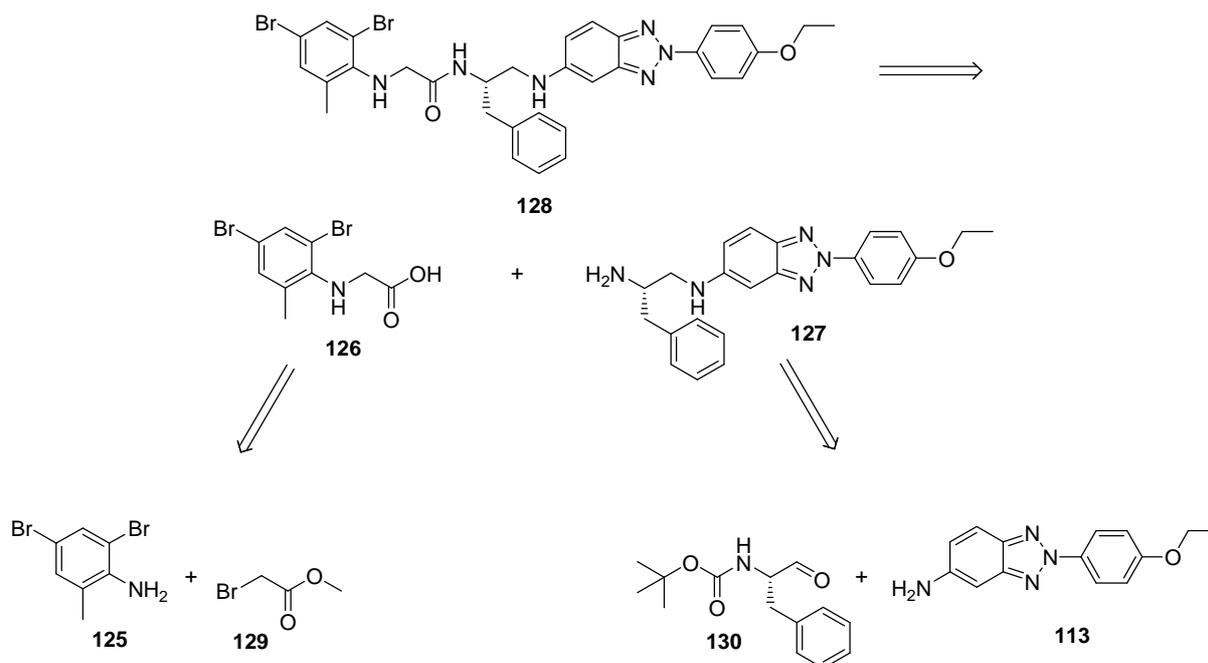


Abb. 4.15 Retrosynthese des potentiellen HIV1-Protease-Inhibitors.

Ausgehend von dem potenziellen Inhibitor **128** wurde die Amidbindung gelöst und man kommt auf die Verbindungen **126** und **127**. Die Verbindung **126** kann aus den Verbindungen **125** und **129** leicht durch eine S_N -Reaktion dargestellt werden. Die Verbindung **127** wird durch reduktiver Aminierung der Bausteine **130** und **113** erhalten:

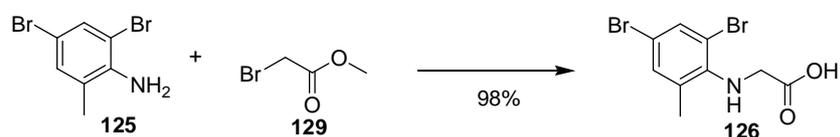


Abb. 4.16 Synthese des Bausteins **126**.

Die Synthese von **126** erfolgte unter Zugabe von jeweils einem Äquivalent Triethylamin und DMAP in Ethanol. Der Ester wurde mit 10 M NaOH entschützt. Als Ausbeute erhielt man 98 %.

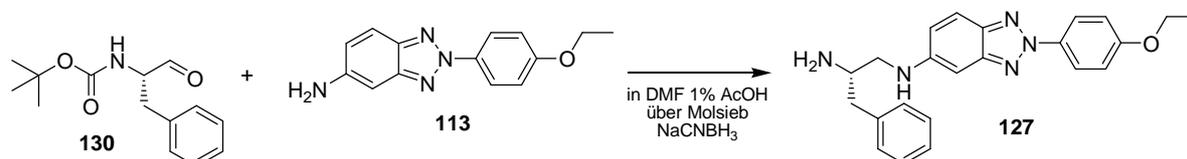


Abb. 4.17 Synthese des Bausteins **127**

Nach reduktiver Aminierung des Bausteins **113** mit dem *N*-Boc-Phenylalanylaldehyd **130** erhielt man das Produkt **127**. Nach säulenchromatographischer Reinigung erhielt man eine Ausbeute von 81 %.

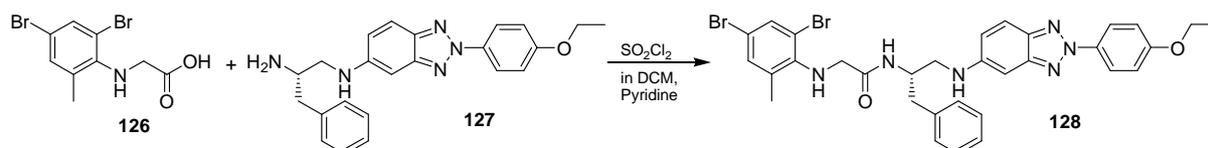


Abb. 4.18 Finaler Syntheseschritt zum potentiellen Inhibitor **128**.

Der finale Syntheseschritt der Amidbildung erfolgte über die Säurechloridaktivierung der Verbindung **126** mit SO_2Cl_2 . Danach wurde das entschützte Amin **127** zugegeben. Nach präparative HPLC erhielt man 82 % Ausbeute.

Der potentielle Inhibitor **128** wurde unter den gleichen Bindungen wie beim Screen in dem Fluoreszenzintensitätsassay validiert. **126** inhibiert die HIV1-Protease mit einem IC_{50} von 5,1 μM . Zum Vergleich die beiden Sonden **108** und **109** inhibieren die HIV1-Protease gleich gut (**109** IC_{50} = 5 μM) bzw. etwas schlechter (**108** IC_{50} = 7,8 μM) (Abb. 4.19).

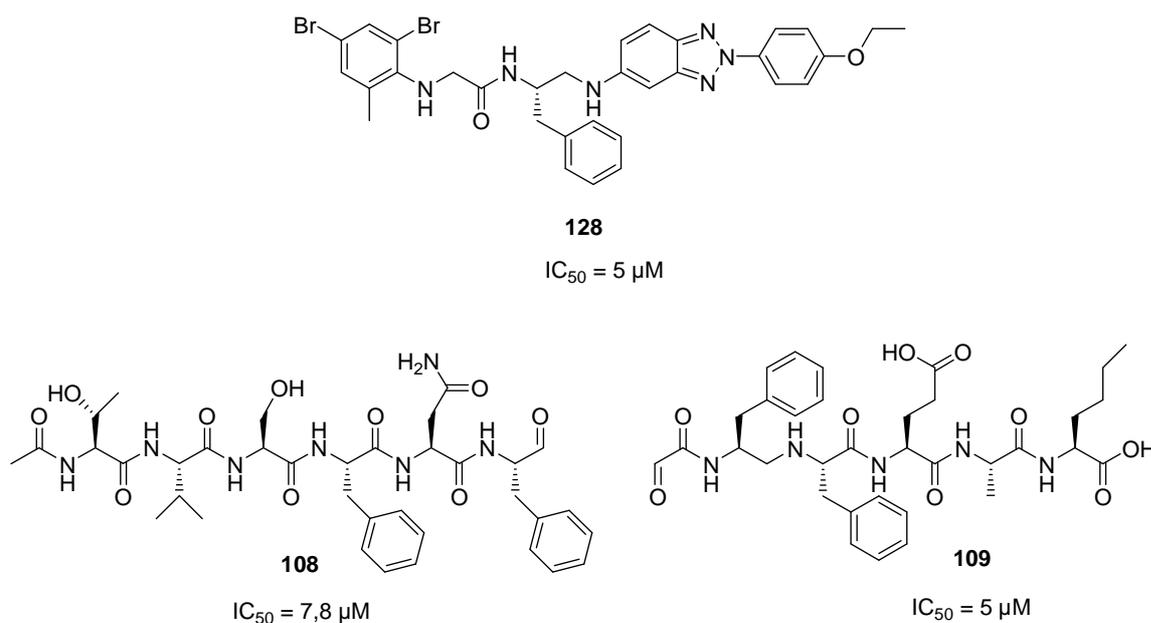
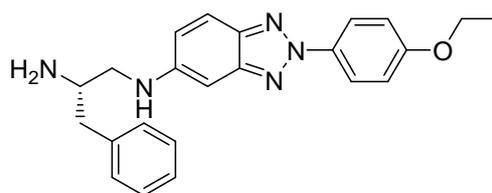


Abb. 4.19 Vergleich der Aktivitäten der beiden Sonden **108** und **109** zu dem aus dem parallelen DLS identifizierten Inhibitor **128**.

Demgegenüber besitzt die Vorläuferverbindung **127** im Vergleich zu dem Inhibitor **128** einen sehr guten IC_{50} von 890 nM. Es ist also festzuhalten, dass die Dynamische Ligation zu der Verbindung **127** sehr erfolgreich war (Sonde **109** IC_{50} = 7,8 μM zu **128** IC_{50} = 890 nM). Aber die Verknüpfung der beiden unabhängig, also parallel gefundenen Fragmente ist nicht aktiver als deren Sonden. Einzig die weitgehende peptidische Struktur ist aufgelöst.



127

IC₅₀ = 890 nM**Abb. 4.20** Struktur und Aktivität der Verbindung **127**.

Die Idee des parallelen Dynamisches Ligationsscreening (pDLS) zeigt leider nicht den gewünschten Effekt. Das Zusammensetzen zweier Fragmente aus zwei unterschiedlichen DL-Screens ist anscheinend nicht möglich. Gründe hierfür liegen wohl in der Konformationsdynamik der HIV1-Protease. Beide Adressmoleküle (**108** und **109**), so ähnlich sie auch sind, müssen mittels *induced fit* anders an die Protease binden. Bei Verknüpfung dieser erhält man keinen viel besseren Inhibitor, obwohl die Daten darauf hinwiesen. Im Gegenteil der im Nachhinein zusammengefügte Inhibitor **128** verliert Aktivität, da er in beide Bindungsmodi nicht gleichzeitig optimal binden kann. Dagegen kann der Baustein **127** nur den einen Bindungsmodus adressieren und bindet daher für ein solch kleines Molekül unglaublich gut mit einem IC₅₀ von 890 nM.

Dagegen sollte aber festgehalten werden, dass DLS geringen konformationellen Änderungen des Wirkstoffziels Rechnung trägt. Zwar kann DLS nur iterativ betrieben werden, beachtet aber anscheinend diesen bis dahin in der Wirkstoffentwicklung wenig kalkulierbaren Mechanismus des *induced fit* – die vielleicht wahre Stärke des Dynamischen Ligationsscreenings.

5. Cysteinasparylprotease 3 (Caspase 3)

5.1 Caspase 3 und Apoptose

Apoptose, der programmierte Zelltod, wird hauptsächlich durch die Aktivierung verschiedener Cysteinproteasen ausgelöst.^[69] Diese Proteasen sind homolog zueinander und werden daher in einer Enzymfamilie, den Cysteinasparylproteasen (Caspasen) zusammengefasst. Alle Caspasen besitzen als katalytisch aktives Zentrum einen Cysteinrest und prozessieren ihre Zielsubstrate charakteristisch nach einem Asparylrest. Wichtig für die Substraterkennung sind die vier N-terminalen Aminosäurereste P1 bis P4 zu der Schnittstelle.^[69]

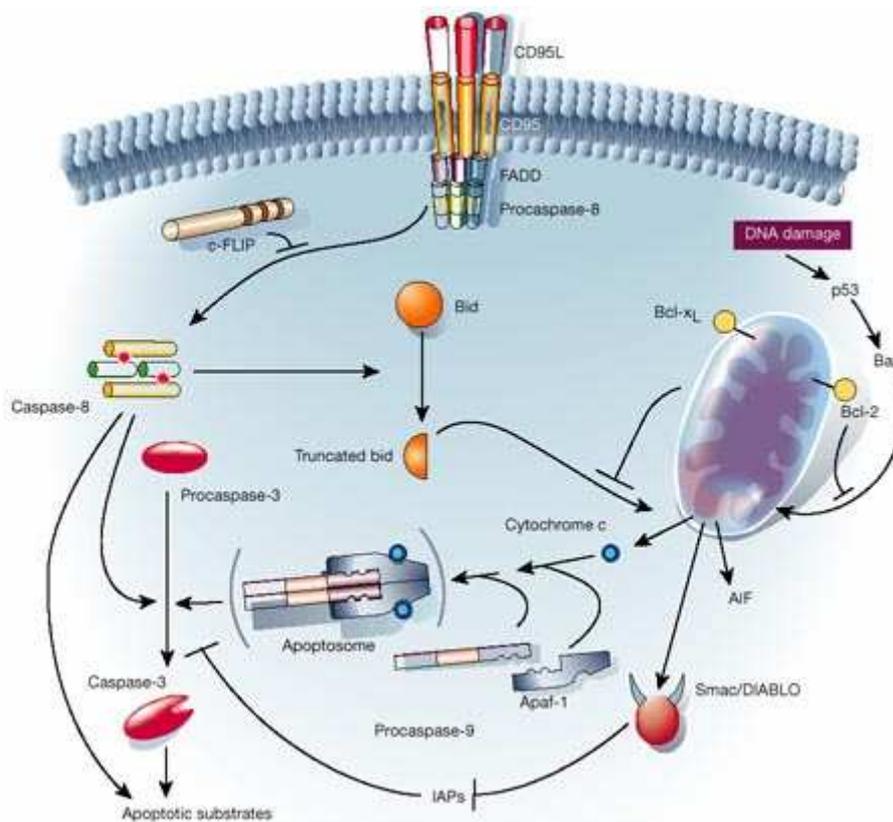


Abb. 5.1 Der apoptotische Weg in Mammalia Zellen: Die Bindung des CD96 Liganden an den CD95 Rezeptor führt zur Rekrutierung des Tod-induzierenden Komplex um das Molekül FADD. Dadurch wird die Caspase 8 aktiviert, die wiederum die Spaltung der Procaspase 3 zur Caspase 3 katalysiert. Analog kann das Signal zur Apoptose von den Mitochondrien ausgehen. Hierbei aktiviert Cytochrom c das Apoptosom, welches wiederum die Caspase 3 aktiviert. Die Caspase 3 ist das entscheidende Enzym in der Apoptose.^[69]

Caspasen werden als Zymogene, also als inaktive Vorläufer, synthetisiert, den so genannten Procaspasen. Die Procaspasen bestehen aus drei Domänen: einer N-terminalen Prodomäne sowie der p20 und der p10 Domäne. Die Procaspase wird zu der Caspase aktiviert durch die proteolytische Prozessierung zwischen der p20 und der p10 Domäne, sowie zwischen der Prodomäne und der p20 Domäne. Aus den prozessierten Polypeptiden bildet sich ein

Heterotetramer aus zwei p20/p10 Homodimeren. Es stellt sich daher die Frage, warum die Caspase damit zwei intakte, katalytisch aktive Zentren besitzt. Neuere Untersuchungen zu allosterischen Mechanismen der Caspase weisen daraufhin, dass diese zwei intakten, katalytischen Zentren Teil einer komplexen Strategie der Caspase-Regulation darstellen.^[70]

Zusätzlich ist zu erwähnen, dass die Schnittstelle meist aus einem Asp-X-Motiv besteht, welches daraufhin weist, dass die Aktivierung möglicherweise autokatalytisch verläuft. Diese Autoprozessierung wird auch als „Caspasekaskade“ bezeichnet. Hier spielen die Caspasen-3, -6 und -7 eine zentrale Rolle. Diese drei Effektoren sind hauptsächlich für die morphologischen Veränderungen in der Apoptose zuständig. So konnte gezeigt werden, dass Inhibitoren, die die Caspase 3 adressieren, Zellen vor Apoptose bewahren, ähnlich wie es Mausneuronen zeigen, denen man das Caspase 3-Gen ausgeschaltet hatte.^[71]

Aus diesem Grund erscheint die Caspase 3 als geeignetes Wirkstoffziel im Kampf gegen Krankheiten mit einem überregulierten Zelltod wie Epilepsie, Amyotrophische Laterale Sklerose (ALS) oder die Parkinsonsche Krankheit.^[72]

Die bisher bekanntesten Caspase 3 Inhibitoren sind Mimetika des peptidischen Substrates wie der Peptidaldehyd Acetyl-DEVD-H **131** oder die Peptidketone Benzyloxycarbonyl (Z)-VAD-Fluormethylketon (fmk) **132**, Z-YVAD-fmk/chlormethylketon (cmk) **133**, Z-DEVD-fmk/cmK **134** oder Z-D-cmk **135**. Diese Peptidderivate sind leider nicht spezifisch und inhibieren daher nicht nur die Caspase 3, sondern auch die meisten anderen Caspasen. Zudem kommt hinzu, dass die oben genannten Peptidderivate schlechte Zellgängigkeit besitzen.^[72-75]

5.2 Erweiterung des Dynamischen Ligationsscreening zur Unterscheidung von kompetitiven und kooperativen Bindern.

In dem unter 3. und 4. aufgeführten Konzept der Dynamischen Ligation wurden Amine, die alleine gegen das Wirkstoffziel aktiv waren, zur weiteren Verwendung ausgeschlossen. Binden diese Fragmente wirklich nicht in der untersuchten Tasche oder sind sie so gute Binder, dass sie bereits bei geringen Konzentrationen zu vollständiger Inhibition führen? Um dies beantworten zu können, haben wir in dieser Arbeit versucht, die DLS-Methode so zu adaptieren, dass bereits die Primärdaten eine Unterscheidung zwischen kompetitiven Inhibitoren und kooperativen Bindern ermöglichen. Hierzu entwickelte man einen Fluoreszenzpolarisationsassay für die Caspase 3.

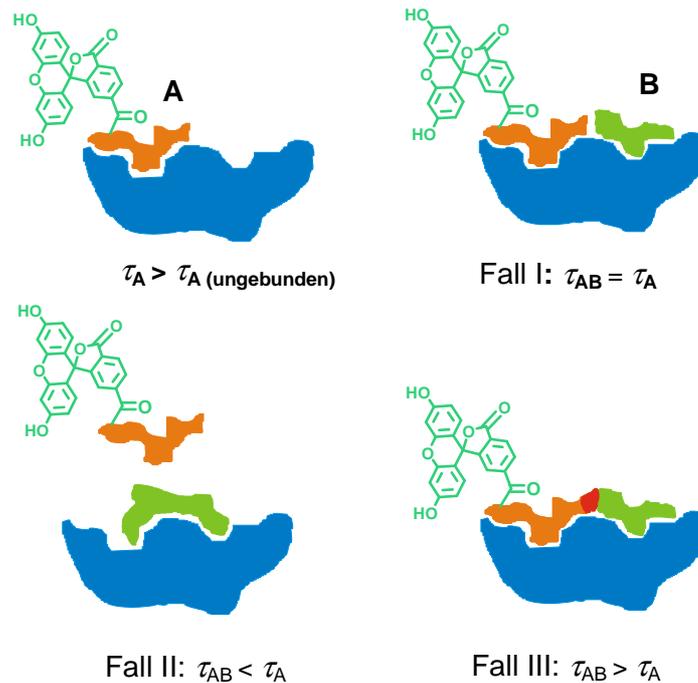


Abb.5.2 Bindet nun die Sonde an die Caspase 3, so ist die Bindung mittels Fluoreszenzpolarisation (FP) messbar. Bei Zugabe des zu testenden Amins treten drei Effekte auf: i) Es erfolgt keine Änderung der FP. Das Amin bindet vielleicht in die Tasche oder nicht. Es hat keinen Einfluss, positiv oder negativ, auf die Bindung der Sonde. ii) Die Fluoreszenzpolarisation nimmt ab. Das zu testende Amin ist ein kompetitiver Inhibitor zu der Sonde und verdrängt diese somit. Die Bindung Sonde-Protein wird unterbunden, das Fluoreszenzpolarisationssignal nimmt ab. iii) Die Fluoreszenzpolarisation und damit die Bindung verstärkt sich in Anwesenheit des zu testenden Amins. In diesem Fall ist davon auszugehen, dass das Amin und der Aldehyd der Sonde eine Schiffbase ausbilden und damit die Bindung verstärken, welches online beobachtet werden kann.

Grundlage für den Assay war ein Adressmolekül, das zum einen ein Reportermolekül (Fluorphor) trägt und zum Anderen eine reaktive Aldehydfunktion an der Stelle trägt, an der ein Fragment gefunden werden soll. Bindet nun das Adressmolekül, wie in Abb. 5.2 gezeigt ist, an die Caspase 3, so ist die Bindung mittels Fluoreszenzpolarisation (FP) messbar. Bei Zugabe des zu testenden Amins können alternativ drei Effekte auftreten: i) Es erfolgt keine Änderung der FP. Das Amin hat keinen Einfluss, positiv wie negativ, auf die Bindung des Adressmoleküls. ii) Die Fluoreszenzpolarisation nimmt ab. Das zu testende Amin ist ein kompetitiver Inhibitor zu der Sonde und kann diese daher verdrängen. Die Bindung Sonde-Protein wird unterbunden, das Fluoreszenzpolarisationssignal nimmt ab. iii) Die Fluoreszenzpolarisation und damit die Bindung verstärkt sich in Anwesenheit des zu testenden Amins. In diesem Fall ist davon auszugehen, dass das Amin und der Aldehyd des Adressmoleküls eine Schiffsche Base ausbilden und damit die Bindung verstärken, welches somit beobachtet werden kann.

Ausgehend von dieser Versuchsanordnung ist es daher möglich, die Hits aus dem klassischen DLS-Verfahren gleich nach ihrem Bindungsverhalten, kompetitiv oder kooperativ, zuzuordnen.

5.2.1 Entwicklung einer Fluoreszenzsonde für die Caspase 3

Für die Unterscheidung von kompetitiven Inhibitoren und kooperativen Bindern im Fluoreszenzpolarisationssassay wurde im Rahmen der Doktorarbeit von Herrn Dr. Adeb El-Dahshan ein peptidisches Substrat synthetisiert, welches die native Erkennungssequenz DEVD sowie einen Fluorophor und eine Ketoaldehydfunktion enthält. Demnach wurden die Moleküle *N*-5(6)-Fluoresceinylcarboxy-DEVD- α -keto-aldehyde (CF-DEVD-CHO) **136a** und das *N*-Acetylderivat **136b** synthetisiert. Man entschied sich für einen Ketoaldehyd, da ähnlich wie bei der SARS-CoV M^{pro} es sich bei der Caspase 3 um eine Cysteinprotease handelt. Das Keton wechselwirkt weiter mit dem katalytisch aktiven Cysteinrest der Caspase, während der Aldehyd mit dem potenziellen Fragment für die P1* Position interagiert.

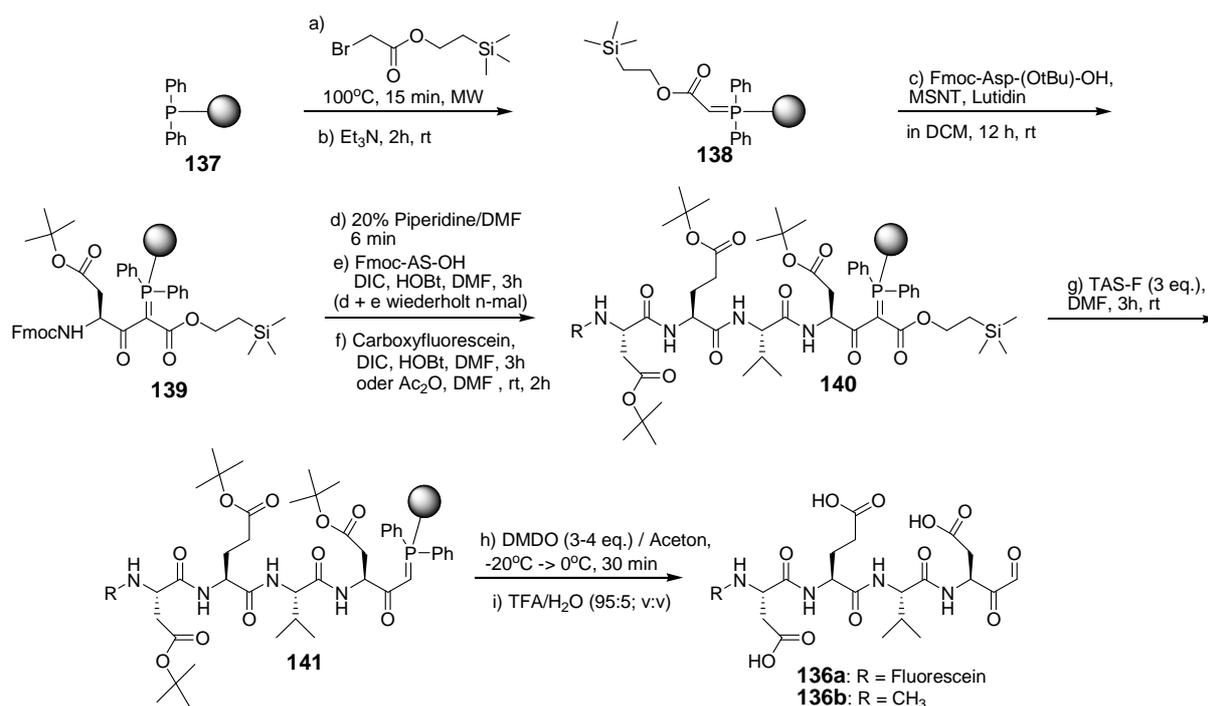


Abb. 5.3 Synthese des *N*-5(6)-fluoresceinylcarboxy-DEVD- α -keto-aldehydes (CF-DEVD-CHO) **136a** und des *N*-Acetylderivats **136b** an Triphenylphosphinharz.^[61]

Die Adressmoleküle **136a** und **136b** wurden an der Festphase mittels der C-Acylierung des Trimethylsilylethyl-/TMSE)-Phosphoranylidenacetats synthetisiert (Abb. 5.3) Die TMSE-Schutzgruppe wurde mittels des milden Fluoridreagenz Tris(dimethylamino)sulfoniumdifluorotrimethylsilikat (TAS-F) entfernt. Nach der erfolgten

Decarboxylierung wurden die Verbindungen **136a** und **136b** mittels Dimethyldioxiran (DMDO) oxidativ abgespalten.^[61]

5.2.2 Screening der FMP-Bibliothek nach kompetitiven Inhibitoren und kooperativen Bindern für die Caspase 3

Die Bindungsaffinität der Verbindung **136a** wurde mittels Fluoreszenzpolarisationstitation bestimmt. Es wurde ein K_D -wert von 15 nM bestimmt. Der Assay wurde nun zum Screenen eines Teils der FMP-Bibliothek für 384 Mikrotiterplatten adaptiert. In 10 μ l Volumen wurden 20 nM Caspase 3, 10 nM der Verbindung **136a** und 10 μ M eines Fragments inkubiert. Insgesamt wurden 7 397 Fragmente gescreent, wovon 4 019 primäre Amine waren. Wie bereits unter 5.2 diskutiert, wurden drei mögliche Szenarien erwartet: i) Es erfolgt keine Änderung der FP. Das Amin hat keinen Einfluss, positiv wie negativ, auf die Bindung der Sonde. ii) In 78 Fällen nahm die Fluoreszenzpolarisation signifikant ab. Das zu testende Amin ist ein kompetitiver Inhibitor zu dem Adressmolekül und verdrängt dieses somit. Alle 78 kompetitiven Hits wurden in dem alternativen Substrataffinitätsassay Ac-DEVD-AMCA (siehe auch 3.) getestet. Bei diesem spaltet die Caspase 3 den Fluorophor (AMCA) von dem Peptid ab und der freigewordene Fluorophor kann detektiert werden. Die Strukturen der vier besten kompetitiven Inhibitoren sind in Abb. 5.4 aufgeführt.

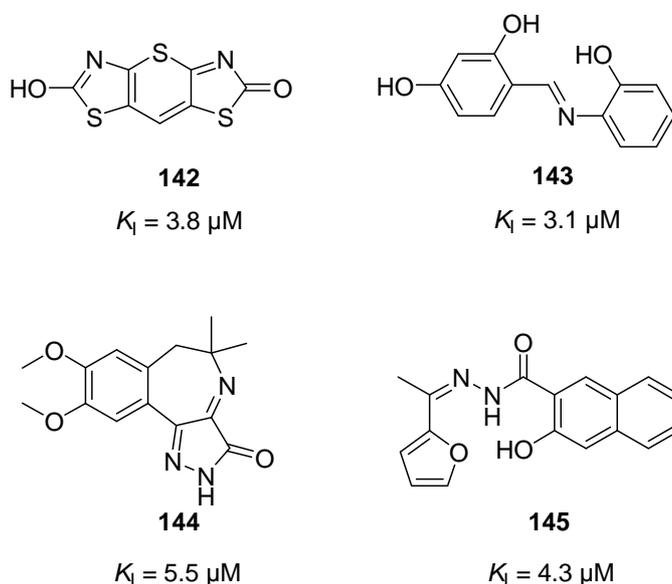


Abb. 5.4 Strukturen und Aktivitäten der identifizierten, kompetitiven Inhibitoren der Caspase 3.

Hierbei ist festzuhalten, dass es sich hierbei um die bisher besten nicht-peptidischen Inhibitoren der Caspase 3 handelt.^[73-75]

iii) Die Fluoreszenzpolarisation und damit die Bindung verstärkt sich in Anwesenheit des zu testenden Amins in insgesamt 176 Fällen um mehr als 20 %. In diesem Fall ist davon

auszugehen, dass das Amin und der Aldehyd des Adressmoleküls vermutlich eine Schiff'sche Base ausbilden und damit die Bindung verstärken. Alle 176 Fragmente wurden in dem oben beschriebenen AMCA-Assay ebenfalls validiert. Die beiden besten kooperativen Binder zeigten in diesem Assay einen K_I -Wert von 120 μM bzw. 300 μM .

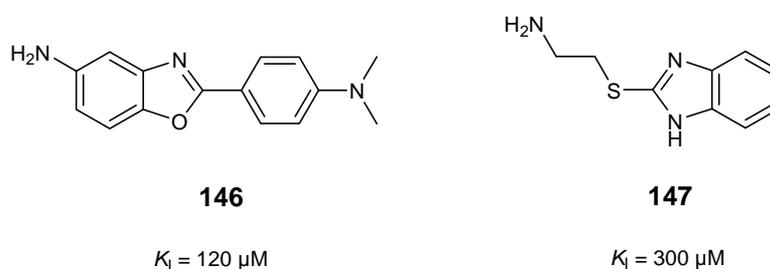


Abb. 5.5 Strukturen und Aktivitäten der identifizierten, kooperativen Binder der Caspase 3.

5.2.3 Simulation und Vergleich additiver und kooperativer Bindung

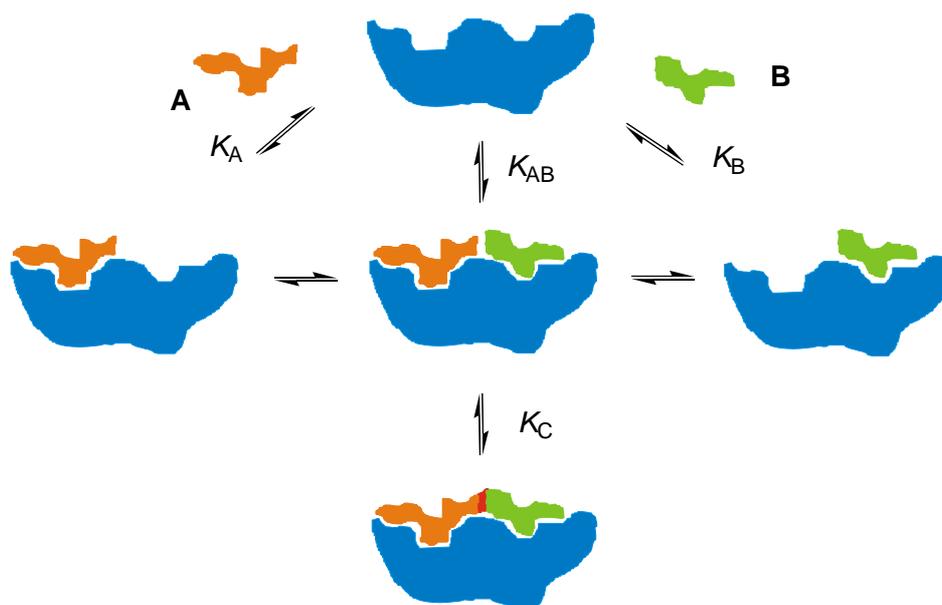


Abb. 5.6: Modell der additiven bzw. kooperativen Bindung der Verbindungen A (orange) und B (grün) zu dem Protein (blau). Im Falle additiver Bindung binden A und B unabhängig voneinander ($K_{AB} = K_A K_B$) und interagieren nicht miteinander ($K_C = 0$). Positive kooperative Bindung resultiert aus der Protein-assistierten Ligation und kann als zweistufiger Schritt beschrieben werden: (i) Additive Bindung der zwei Fragmente beschrieben durch: $K_{AB} = K_A K_B$ (Teil oben) und (ii) die Formierung des Ligationsproduktes, beschrieben durch $K_C > 0$ (Teil unten).

Um ein besseres Verständnis über die gewonnenen Daten zu erhalten, wurde das in der Abb. 5.6 beschriebene Bindungsmodell entwickelt. Dabei werden alle möglichen Bindungen beschrieben:

Die Bindung des Aldehyds A zu dem Protein kann mittels des Massenwirkungsgesetzes wie folgt beschrieben werden:

$$[PA] = [A][P] / K_A \quad (1)$$

wobei [A], [P], und [AP] die Konzentrationen von freiem A, freiem Protein P und dem Protein-A-Komplex sind. Dies wird durch die Dissoziationskonstante K_A beschrieben. Analog verhält sich die Bindung des Amins B zu dem Protein P:

$$[PB] = [B][P] / K_B \quad (2)$$

Solange von additiver Bindung ausgegangen werden kann, also beide Bindungsstellen unabhängig voneinander sind, kann man den Komplex Protein/Aldehyd/Amin als PAB mittels des Massenwirkungsgesetzes wie folgt beschreiben:

$$[PAB] = [A][B][P] / (K_A K_B) \quad (3)$$

Falls der Aldehyd und das Amin sich in dem Komplex PAB befinden, kann eine Iminbildung erfolgen. Diese wird analog mit Hilfe des Massenwirkungsgesetz als

$$[PC] = K_C [PAB] \quad (4)$$

beschrieben. Wobei die Dissoziationskonstante K_C die Konversion von PAB zu PC beschreibt. Der Massenerhaltungssatz kann für die totale Proteinkonzentration $[P]_0$ daher wie folgt beschrieben werden:

$$[P]_0 = [P] + [PA] + [PB] + [PAB] + [PC] = [P](1 + [A]/K_A + [B]/K_B + [A][B](1 + K_C)/(K_A K_B)) \quad (5)$$

Das kann ebenso für die totale Aldehydkonzentration $[A]_0$ sowie für die totale Aminkonzentration $[B]_0$ aufgestellt werden

$$[A]_0 = [A] + [PA] + [PAB] + [PC] = [A](1 + [P]/K_A + [B][P](1 + K_C)/(K_A K_B)) \quad (6)$$

$$[B]_0 = [B] + [PB] + [PAB] + [PC] = [B](1 + [P]/K_B + [A][P](1 + K_C)/(K_A K_B)) \quad (7)$$

Bei den Gleichungen (5–7) handelt es sich um ein System aus drei Gleichungen, welches numerisch für die drei freien Konzentrationen [A], [B], and [C] gelöst werden kann. Ausgehend davon erhält man die vier komplexen Konzentrationen [PA], [PB], [PAB], und [PC], die durch Einsetzen in Gleichungen 1-4 erhalten werden.

Fluoreszenzpolarisationstitrationskurven, in der die FP-Intensität gegenüber der Proteinkonzentration aufgetragen sind (Abb. 5.7), werden zuerst zu Bindungsisothermen normiert. Diese geben nun die Konzentration des freien Aldehyds als Funktion der Proteinkonzentration dar. Die Titrationskurven wurden so als sigmoide Funktion simuliert.

$$I = I_f + \frac{I_b - I_f}{1 + \exp(-k([P]_0 - [P]_0^m))} \quad (8)$$

Wobei I für die FP-Intensität steht, gemessen in Abhängigkeit der Proteinkonzentration $[P]_0$. I_f steht für die FP Intensität des freien Aldehyds (in Abwesenheit des Proteins) und I_b für die

FP-Intensität des vollständig gebundenen Aldehyds (in Anwesenheit eines Überschusses Protein). $[P]_0^m$ ist die Wendepunktkonzentration, an der die Proteinkonzentration zur Hälfte den Aldehyd gebunden hat. Der Parameter k bestimmt die Steigung der sigmoidalen Kurve. Die durch Messung erhaltenen Bindungseigenschaften des Aldehydes werden als $[A]/[A]_0$ berechnet und im folgendem für die FP-Intensitäten wie folgt gleichgesetzt:

$$\frac{[A]}{[A]_0} = \frac{l - l_b}{l_t - l_b} \quad (9)$$

Die $[A]/[A]_0$ Werte aus der Gleichung (9) wurden in Anbetracht der Gleichungen (5–7) für zwei Szenarien simuliert. Im ersten Szenario war eine Iminbildung nicht möglich, $K_C = 0$. In diesem additiven, nicht-kooperativen Fall wurde vorhergesagt, dass die Bindung des Aldehydes an das Protein in Anwesenheit des Amins keinen Einfluss hat auf $[A]/[A]_0$, da beide Bindungsstellen unabhängig voneinander sind. Tatsächlich zeigen die experimentellen Daten in Anwesenheit des Amins ($[B]_0 = 0, 100, \text{ und } 1000 \text{ nM}$) keine signifikant bessere Bindung des Aldehyds an das Protein. Die Dissoziationskonstante liegt bei 15 nM. Wird aber eine höhere Konzentration des Amins zu gegeben ($[B]_0 = 10 \mu\text{M}$) ist eine signifikant bessere Bindung des Aldehyds an das Protein erkennbar. Wenn nun die Kurven in Anbetracht von $K_C > 0$ modelliert werden, kann die bessere Bindung des Aldehyds in Anwesenheit von 10 μM Amin erklärt werden. Der K_C beträgt nach Simulation 20, was einer freien Gibbs Energie von $\Delta G^\circ = -RT \ln K_C = -7 \text{ kJ/mol}$ entspricht.

Da die Simulation mit den experimentellen Daten übereinstimmt, scheint die Iminbildung auf dem Wirkstoffziel analog nach dem in Abb. 5.6 postulierten Mechanismus abzulaufen. Beide Liganden A und B binden zuerst an das Templat und bilden in einem anschließenden Schritt (K_C) das Imin aus. Für die weitere Anwendung von DLS war es wichtig zu wissen, ob die Iminbildung in Lösung oder auf dem Templat verläuft. Durch den Vergleich der experimentellen Daten mit der Simulation nach dem oben genannten Postulat scheint die Iminbildung erst auf dem Templat abzulaufen. Eine zentrale Frage der Dynamischen Ligation ist damit beantwortet.

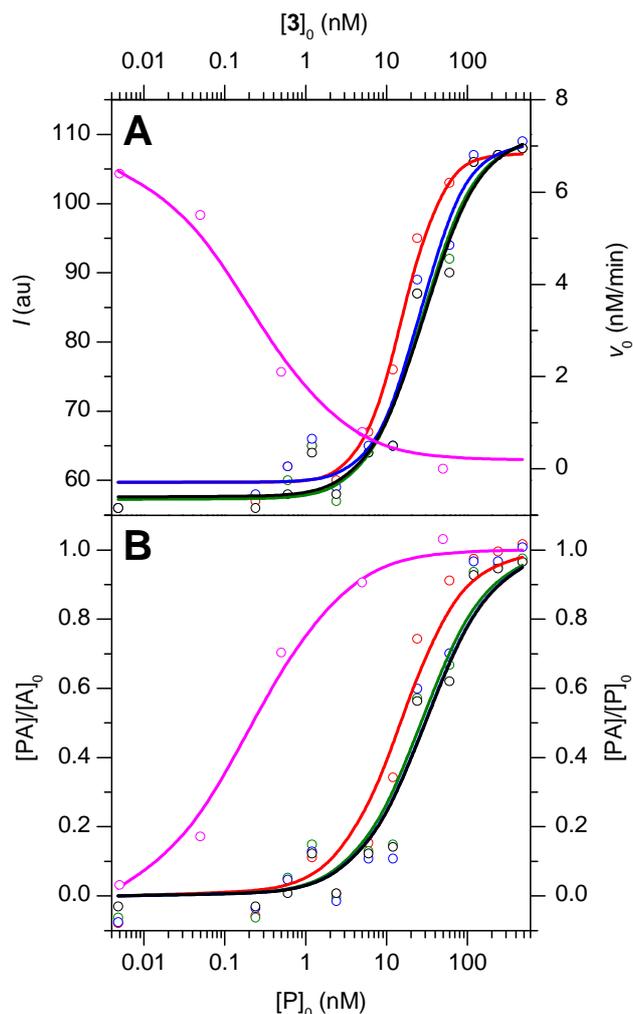


Abb. 5.7 Titrationsexperimente. (A) Rohdaten (Symbole) und Simulation (Linien). FP wurde beobachtet bei Zugabe von Caspase 3 (P, untere x-Achse) bei 10 nM **136a** allein (schwarz) oder in der Anwesenheit von **146** bei Konzentrationen von 100 nM (blau), 1 μ M (grün), und 10 μ M (rot). I ist das FP-Signal (linke y-Achse). Enzyminhibition wurde bestimmt in Anwesenheit verschiedener Konzentrationen von **148** (obere x-Achse) zu 3 nM Caspase 3 und 5 μ M Ac-DEVD-AMCA (magenta). v_0 ist die enzymatische Aktivität (rechte y-Achse). (B) Normalisierte Titrationsdaten und beste Simulationen.

5.2.4 Synthese und Evaluierung eines Caspase 3 Inhibitors bei irreversibler Verknüpfung des identifizierten, kooperativen Fragments und dem nativen Bindungsmotiv

Zur Bestätigung des Screens wurde das Fragment **146** mit der Verbindung **136b** in einer reduktiven Aminierung umgesetzt. (Abb. 5.8) Die reduktive Aminierung erfolgte in trockenem DMF/MeOH (v:v; 1:1) über Molsieb mit dem Reduktionsmittel Trimethylsilan. Die resultierende Verbindung **148** wurde gegen die Caspase 3 in dem Substrataktivitätsassay Ac-DEVD-AMCA evaluiert.

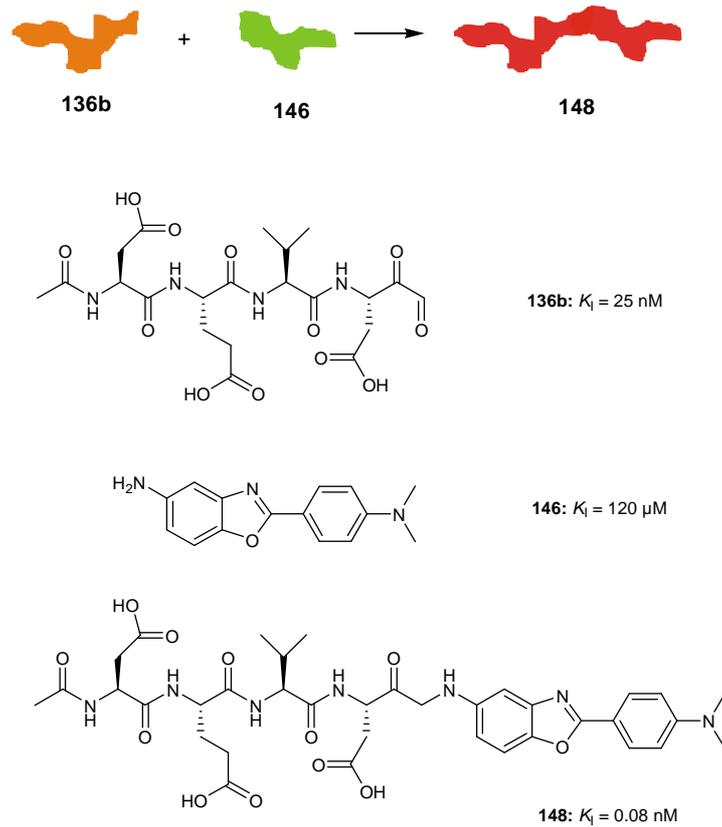


Abb. 5.8 Der α -Keto-aldehydinhibitor **136b** wurde synthetisch mit dem Amin **146** mittels reduktiver Aminierung verknüpft. Man erhielt die Verbindung **148**, welche in dem Ac-DEVD-AMCA-Assay einen K_I -Wert von 0,08 nM zeigte.

Ein K_I Wert von 0,08 nM wurde für **148** gemessen. Obwohl die Verbindung immer noch peptidischen Charakter hat, ist sie die bisher aktivste, die gegen die Caspase 3 bekannt ist.^[73-75] Im Vergleich dazu besitzt die Ausgangsverbindung **136b** eine Affinität von 25 nM. Die Aktivität hat sich mehr als verzehnfacht.

Interessant ist, dass der Peptidaldehyd Ac-DEVD-H **131** dagegen eine Aktivität von 0,2 nM zeigt. Die Einführung einer Ketongruppe führt zu erheblichen Aktivitätsverlusten, die aber das gefundene Fragment ausgleichen konnte. Die hier synthetisierte Verbindung ist immer noch dreimal besser als der Peptidaldehyd Ac-DEVD-H **131**.

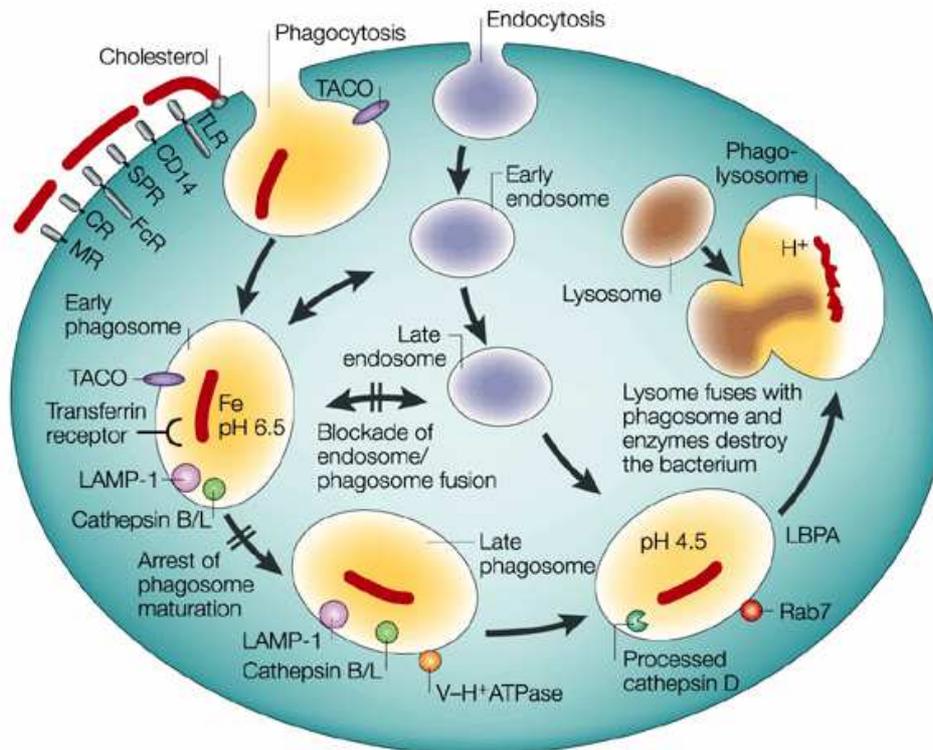
Viel wichtiger ist aber, dass die DLS-Anwendung mit Hilfe der Fluoreszenzpolarisation funktioniert hat. Man konnte erfolgreich kompetitive Inhibitoren und kooperative Binder im Primärscreen unterscheiden. Die Ergebnisse wurden durch den Sekundärassay Ac-DEVD-AMCA bestätigt. DLS ist damit nicht mehr an eine enzymatische Funktion geknüpft wie unter 3. und 4. bereits beschrieben. Hiermit öffnet sich der DLS-Technologie das weite und schwierige Feld der Protein-Protein-Interaktionen

6. *Mycobacterium tuberculosis* Proteintyrosinphosphatase A (MptpA)

6.1 Tuberkulose und MptpA

Die Tuberkulose (TBC) ist eine bakterielle Infektionskrankheit, die meist durch das *Mycobacterium tuberculosis*, seltener durch *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium africanum* oder *Mycobacterium microti* verursacht wird. Die Tuberkulose befällt am häufigsten die Lungen.^[76] Sie führt die weltweite Statistik der tödlichen Infektionskrankheiten an und wird nach Schätzungen der Weltgesundheitsorganisation (WHO) in den nächsten zehn Jahren 30 Millionen Menschenleben fordern.^[77] Nur etwa fünf bis zehn Prozent der mit *Mycobacterium tuberculosis* Infizierten erkranken im Laufe ihres Lebens an Tuberkulose, betroffen sind besonders Menschen mit geschwächtem Immunsystem oder einer genetisch bedingten Anfälligkeit. Die Übertragung erfolgt in der Regel durch Tröpfcheninfektion von erkrankten Menschen in der Umgebung. Zur Therapie stehen verschiedene, speziell gegen die Erreger wirksame Antibiotika zur Verfügung, die unter dem Begriff Antituberkulotika zusammengefasst werden. Diese müssen zur Vermeidung von Resistenzentwicklungen und Rückfällen unbedingt in Kombination und nach Vorgabe der WHO über mindestens ein halbes Jahr, also weit über das Bestehen der Beschwerden hinaus, eingenommen werden. Die Bazillen ändern nämlich ihren Aktivitätszustand. Alternative Stoffwechselwege ohne großen Sauerstoffverbrauch werden beschritten und so an die unwirtliche Situation erfolgreich angepasst. *M. tuberculosis* legt sich sozusagen schlafen. Immunologen sprechen vom Zustand der Dormanz und von Persistenz, wenn Bakterien in Gegenwart eines aktiven Immunsystems überleben. Deshalb ist auch die Therapie mit Antibiotika so langwierig.^[77]

Der wichtigste Erreger der Tuberkulose, *Mycobacterium tuberculosis*, ist ein aerobes gram-positives Stäbchen-Bakterium, welches durch Tröpfcheninfektion übertragen wird. Durch Einatmen gelangt es in die Lungen. Dort bindet das Mykobakterium Cholesterin-vermittelt an diverse Zellrezeptoren. Dadurch erfolgt die Phagozytose, die Aufnahme des Mykobakteriums in die Zelle. *Mycobacterium tuberculosis* ist ein zellulärer Parasit, der sich in den Phagosomen der Wirtszelle aufhält. Der Parasit hat dort Zugang zu Nährstoffen und vermehrt sich dadurch, was schließlich zur Nekrose bzw. Lyse der Wirtszelle führt. Allerdings kann das Mykobakterium auch in den Phagosomen unbemerkt verbleiben und erst später zur Infektion, dem Ausbruch der Tuberkulose führen. Die Gründe hierfür sind bisher unerforscht. Da das Mykobakterium sich in den Zellen befindet, ist der Zugang von Antibiotika erschwert, was die Therapie behindert. Es ist daher in Zeiten von Antibiotikaresistenzen notwendig, alternative Wirkstoffziele des *Mycobacterium tuberculosis* zu adressieren.



Nature Reviews | Immunology

Abb. 6.1 Der intrazelluläre Lebenszyklus des *Mycobacterium tuberculosis*^[76]

Als eines der alternativen Wirkstoffziele zur Behandlung der Tuberkulose wird die *Mycobacterium tuberculosis* Proteintyrosinphosphatase A (MtpA) genannt. Es konnte gezeigt werden, dass MtpA die Reifung des frühen Phagosoms, in dem das Mykobakterium sich befindet, zu dem späten Phagosom bzw. Phagolysosom inhibiert.^[78] Die behinderte Reifung des Phagosoms schützt das Mykobakterium. Durch die Reifung verändert sich der pH-Wert von 6,5 über 4 zu fast 3. Diese pH-Änderung ist tödlich für das Mykobakterium. Daher sekretiert das Mykobakterium nach Eintritt in die Wirtszelle aus dem frühen Phagosom in das Cytosol die 18 kDa schwere MtpA. Dort dephosphoryliert sie das Protein *vacuolar protein sorting 33 homolog B* (VPS33B), welches ein Mitglied des Klasse-C-Komplexes ist, der allgegenwärtig exprimiert wird und essentiell für den Vesikeltransport in der Zelle ist. Durch das Ausschalten von VPS33B kann die Reifung des frühen Phagosoms zum Phagolysosom verhindert werden. Der Parasit *Mycobacterium tuberculosis* greift aktiv in den Vesikeltransport des Wirtes ein, um ungestört im frühen Phagosom zu verbleiben. Inhibiert man nun die MtpA mit einem niedermolekularen Wirkstoff, könnte dies zur vollständigen Reifung des Phagolysosoms führen und das Mykobakterium wird ausgeschaltet. Ziel ist es daher, einen zellgängigen MtpA-Inhibitor zu entwickeln.

6.2 Entwicklung eines Dynamischen Ligationssubstratscreening Assays zur simultanen Identifizierung kompetitiver Inhibitoren und kooperativer Binder

Wie bereits im vorherigen Kapitel 5 beschrieben ist es wünschenswert, im Primärscreen den Treffer seiner Eigenschaft nach als kompetitiven Inhibitor oder kooperativen Binder zuordnen zu können. In Kapitel 5 wurde hierzu die Bindung in einem Fluoreszenzpolarisationsassay untersucht. Alternativ soll im Folgenden die Möglichkeit geprüft werden, diese Unterscheidung auch in einem Substrataktivitätsassay zu detektieren. Hierzu wurde die *Mycobacterium tuberculosis* Proteintyrosinphosphatase (MtpA), die Proteintyrosinphosphatase 1B (PTP1B), die Proteintyrosinphosphatase RR (PTPRR), die Proteintyrosinphosphatase N7 (PTPN7) sowie die SH-Phosphatase-2 (SHP2) ausgewählt und gegen eine Diversitätsauswahl von 110 Aminen gescreent.

Bei der Entwicklung von PTP-Inhibitoren treten in der Regel zwei Probleme auf: Zum Einen die mangelnde Selektivität eines Inhibitors gegenüber einer bestimmten Phosphatase, zum Anderen die negative Ladung des Phosphatmimetikums, die bisher die Entwicklung wirkstoff-ähnlicher PTP-Inhibitoren behinderten. Neben MtpA wurden die PTPs PTP1B, PTPRR, PTPN7 und SHP2 ausgewählt, um bereits im Screen Selektivitäten von Fragmenten gegenüber einer bestimmten Phosphatase zu erkennen. MtpA ist wie bereits erwähnt verantwortlich für die Unterbrechung der Reifung vom Phagosom zum Phagolysosom. Damit kann das Mykobakterium ungestört als Parasit im Phagosom verbleiben. Die Funktion von PTP1B ist die Dephosphorylierung des Insulinrezeptors. Dadurch wird das Insulinsignal in der Zelle unterbrochen. Die Inhibition und damit die Verstärkung des Insulinsignales steht im Zusammenhang mit der Behandlung von Diabetes Typ II und Fettleibigkeit. So zeigt eine PTP1B-*knock-out* Maus eine Resistenz gegenüber Fettleibigkeit bei stark fetthaltiger Ernährung.^[79] PTPRR und PTPN7 gehören zu einer Familie von PTPs, die ein aus 16 Aminosäuren bestehendes KIM (Kinase-Interaktionsmotiv) tragen. Sie binden daher an die Mitglieder der MAPK (Mitogen-aktivierte Proteinkinasen) Familie. Die MAPK-Familie steht im Mittelpunkt einer der wichtigsten Signalwege der Zelle. Es ist daher kein Wunder, dass PTPRR im Nervenwachstum und PTPN7 bei myeloblastischer Leukaemie eine Rolle spielen.^[80] SHP2 gilt als potentielles Wirkstoffziel zur Verhinderung von Metastasen.^[81] Die Auswahl umfasst daher interessante Wirkstoffziele aus der PTP-Familie.

Ziel dieser Arbeit war es daher, zu eruieren, inwiefern das Dynamische Ligationscreening (DLS) geeignet ist, durch das Durchmustern von Fragmenten, die benachbart zum aktiven Zentrum binden, selektive Inhibitoren zu entwickeln.

Zur Durchführung dieses DLS-Ansatzes wurde ein Substrat als Adressmolekül entworfen, der Phosphorsäure-4-hydroxybenzaldehyd **152**. Ausgehend von 4-Hydroxybenzaldehyd **149** wurde mittels des Reagenz Diethylchlorophosphat verestert. Im folgenden Schritt wurden die Ethylschutzgruppen entfernt (Abb. 6.2).

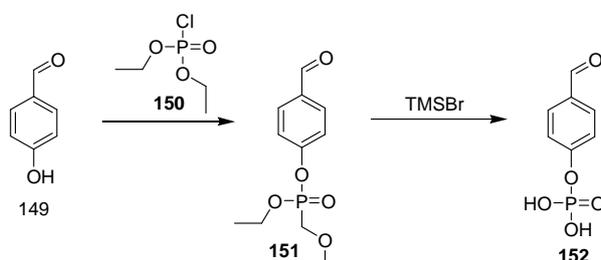


Abb. 6.2 Synthese der Aktivitätssonde Phosphorsäure-4-hydroxybenzaldehyd

Das Substrat **152** wird mit einem Überschuss des zu testenden Amins inkubiert. Anschließend erfolgt die Zugabe der jeweiligen Proteintyrosinphosphatase. Durch die Umsetzung des Substrats durch die jeweilige PTP wird Phosphat gebildet. Die Phosphatentstehung wird durch einen optisch aktiven Molybdänkomplex detektiert. Drei mögliche Versuchsausgänge werden erwartet: i) Die Phosphatbildung ist geringer als in der Kontrolle ohne Amin. Das Amin wirkt als kompetitiver Inhibitor der getesteten PTP. ii) Die Phosphatbildung ist gleich der Kontrolle ohne Amin. Das Amin scheint keine Affinität zu dem Wirkstoffziel zu besitzen. iii) Es wird mehr Phosphat gebildet als in der Kontrolle ohne Amin. Das Amin bildet, anscheinend stabilisiert durch die PTP, ein Imin mit dem Substrat, welches wiederum dadurch stärker umgesetzt wird. Das Amin ist ein kooperativer Binder (siehe auch Abb. 6.3).

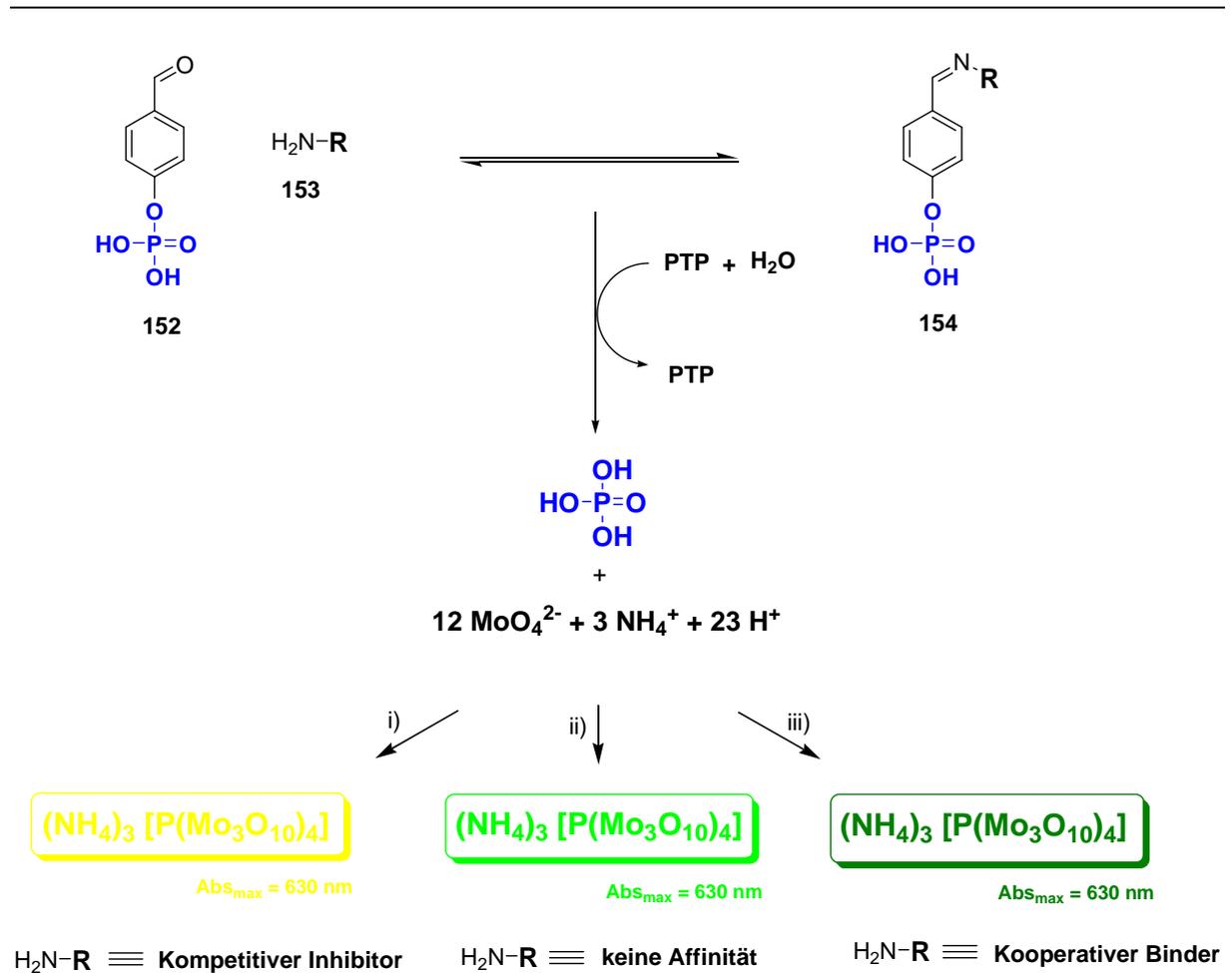


Abb. 6.3 Prinzip des Dynamischen Substratlignationsscreenings. Das Substrat **152** wird mit der PTP und einem Amin inkubiert. Ist das Amin ein kompetitiver Inhibitor, verdrängt es das Substrat, weniger Phosphat entsteht (i). Hat das Amin keine Affinität, entsteht soviel Phosphat wie in der Kontrolle (ii). Reagiert das Amin aber kooperativ mit dem Substrat zu einer Schiff'schen Base, wird mehr Phosphat gebildet (iii).

6.3.1 Untersuchung der Fragmentbibliothek im Substratligationsassay mit MtpA

Die Assaykonditionen wurden vorab für MtpA bestimmt. Daher wurde die Untersuchung unter folgenden Bedingungen durchgeführt: 5 µg/ml MtpA, 250 µM Substrat **152**, 500 µM Amin, 60 min Inkubationszeit in 50 mM Tris-HCl pH 7,0. Danach erfolgte die Zugabe von Malachitgrün. Das Ergebnis ist in Abb. 6.4 zu sehen.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
A	0,7211	0,5959	0,6217	0,5992	0,6459	0,6061	0,6657	0,6111	0,6691	0,5757	0,7165	0,5741	0,6451	0,5963	0,7279	0,5455	0,6136	0,5483	0,6447	0,5284	0,6208	0,5764	0,6216	0,5637
B	0,5753	0,5692	0,5608	0,5065	0,5216	0,5369	0,7196	0,5621	0,5511	0,5718	0,6023	0,5582	0,6608	0,5586	0,6000	0,5578	0,5312	0,5641	0,7055	0,5683	0,6951	0,5611	0,6379	1,5193
C	0,7473	0,7648	0,6805	0,6766	0,7618	0,7958	0,7152	0,6594	0,6851	0,6577	0,8087	0,6755	0,7357	0,7041	1,8321	0,5994	0,6762	0,6382	0,6625	0,5814	0,6811	0,6224	0,7217	0,7331
D	0,6294	0,7909	0,6275	0,6939	0,6688	0,6128	0,6844	0,6181	0,6486	0,6450	0,9617	0,5234	0,6942	1,0289	0,5787	0,6576	0,6251	0,6082	0,7219	0,6696	0,6238	0,5634	0,6471	0,7328
E	0,8869	0,8297	0,7241	0,7064	0,7368	0,6103	0,6917	1,4074	0,7135	0,6977	0,7097	0,8114	0,6747	0,7743	0,6233	0,6615	0,7102	0,6813	0,6855	0,6579	0,7115	0,6465	0,6613	0,6369
F	0,6706	0,6725	0,6639	0,6905	0,6923	0,6619	0,6897	0,6340	0,8325	0,6479	0,5807	0,6095	0,6623	0,6428	0,5987	0,6329	1,5528	0,6214	0,6045	0,6427	0,6764	0,6247	0,6254	0,6091
G	0,5937	0,5648	0,5714	0,5418	0,5714	0,5938	0,5700	0,6016	0,5676	0,5465	0,5461	0,5326	0,5496	0,5003	0,5069	0,4947	0,5180	0,4834	0,5158	0,4890	0,5025	0,4833	0,4851	0,4849
H	0,5723	0,5087	0,5454	0,5141	0,5912	0,4729	0,5401	0,5218	0,5659	0,5095	0,5718	0,5221	0,5669	0,5271	0,5522	0,5189	0,5712	0,5024	0,5823	0,5188	0,5749	0,5262	0,5789	0,5137
I																								
J																								
K																								
L		> 1,5																						
M		1,0 < 1,5																						
N		0,8 < 1,0																						
O		0,6 < 0,8																						
P		< 0,6																						

Abb. 6.4 Ergebnis der Mikrotiterplatte nach Zugabe des Malachitgrüns für MtpA. Von A1 bis E14 sind die zu testenden Amine aufgetragen. Von E15 bis F24 ist die Kontrolle, also MtpA und 250 µM Substrat **152** aufgetragen. In G1 bis H24 wurde der Hintergrund aufgetragen, also nur 250 µM Substrat **152**.

Die Durchmusterung nach Fragmenten für MtpA ergab acht Verbindungen, die die Enzymaktivität stimulierten und eine Verbindung, die die Phosphatase inhibierte. Die acht identifizierten, kooperativen Binder wurden anschließend allein gegen die MtpA getestet. Keine dieser acht Verbindungen zeigte alleine irgendeine Wirkung gegen MtpA.

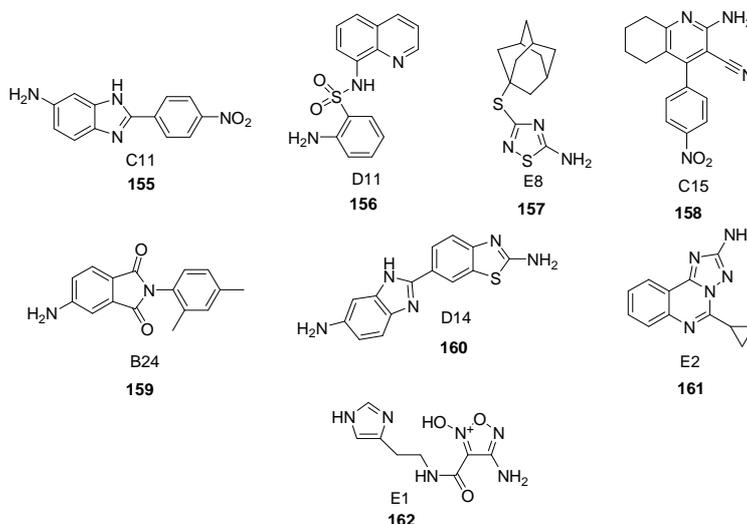


Abb. 6.5 Die Strukturen der kooperativen Binder der MtpA.

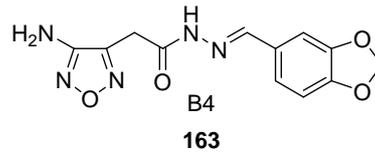


Abb. 6.6 Struktur des identifizierten, kompetitiven Inhibitors der MtpA.

6.3.2 Untersuchung der Fragmentbibliothek im Substratligationsassay mit PTPN7

Die Assaykonditionen wurden vorab für PTPN7 bestimmt. Daher wurde die Untersuchung unter folgenden Bedingungen durchgeführt: 10 µg/ml PTPN7, 250 µM Substrat **152**, 500 µM Amin, 60 min Inkubationszeit in 50 mM Tris-HCl pH 7,0. Danach erfolgte die Zugabe von Malachitgrün. Das Ergebnis ist in Abb. 6.7 zu sehen.

<>	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
A	1,4055	0,9878	1,5291	0,6256	1,4284	1,2555	1,5879	0,8201	0,7161	0,9645	1,1676	1,2687	0,5488	0,6275	1,2955	0,9832	1,2008	1,2775	1,3959	1,2026	0,9936	1,1452	1,1335	0,9129
B	1,2031	1,0366	0,7779	0,6653	0,5200	1,1887	1,7340	1,1929	0,5454	1,0603	0,6004	1,2741	1,4025	1,0970	0,5983	0,7273	0,7196	1,2693	1,3165	0,6926	1,1990	1,0626	1,1715	0,8231
C	1,3285	1,1656	1,5120	1,4440	1,4528	1,3309	0,7174	1,4825	1,4457	1,3148	1,6999	1,5270	1,6938	1,3382	1,3120	1,3851	1,4305	1,2040	1,0033	1,1022	1,3453	1,1310	1,1455	1,0896
D	1,3119	1,3230	1,4840	1,1965	1,1828	0,7647	1,6720	1,4755	1,4439	1,5183	1,6238	1,4425	1,2502	1,4640	1,1950	1,3794	1,3678	1,3331	1,0080	1,1908	1,0927	0,6895	0,5537	0,9262
E	1,4062	1,5218	1,9844	1,6518	1,5075	1,6337	1,4700	1,6508	1,2408	1,4924	1,3642	1,4126	0,8261	1,1797	1,1675	1,1616	1,0495	1,0904	1,0836	0,9367	0,9649	1,0026	0,9292	0,8475
F	0,7816	1,0380	0,9771	1,1776	1,0932	1,2720	1,1663	1,1822	1,0507	1,2154	0,9758	1,4315	1,2418	1,4370	0,9957	1,0790	0,9182	1,3213	0,9918	0,9303	0,8920	0,9334	0,8591	0,8028
G	0,4624	0,5195	0,5460	0,5698	0,5778	0,5660	0,6044	0,5739	0,5961	0,5913	0,6055	0,5720	0,5825	0,5506	0,5548	0,5542	0,5543	0,5904	0,5862	0,5768	0,5761	0,5671	0,5662	0,4595
H	0,4508	0,4289	0,4535	0,4987	0,5118	0,5431	0,5636	0,5379	0,5330	0,5423	0,5485	0,5504	0,5341	0,5364	0,5291	0,5576	0,5523	0,5549	0,5389	0,5537	0,5478	0,5458	0,5262	0,4075
I																								
J																								
K																								
L		> 1,6																						
M		1,5 < 1,6																						
N		1,3 < 1,5																						
O		0,6 < 1,3																						
P		< 0,6																						

Abb. 6.7 Ergebnis der Mikrotiterplatte nach Zugabe des Malachitgrüns für PTPN7. Von A1 bis E14 sind die zu testenden Amine aufgetragen. Von E15 bis F24 ist die Kontrolle, also MtpA und 250 µM Substrat **152** aufgetragen. In G1 bis H24 wurde der Hintergrund aufgetragen, also nur 250 µM Substrat **152**.

Die Durchmusterung nach Fragmenten für PTPN7 ergab sechs Verbindungen, die die Enzymaktivität stimulierten und sechs Verbindungen, die die Phosphatase inhibierten. Die sechs identifizierten, kooperativen Binder wurden anschließend allein gegen die PTPN7 getestet. Keine dieser sechs Verbindungen zeigte alleine irgendeine Wirkung gegen PTPN7.

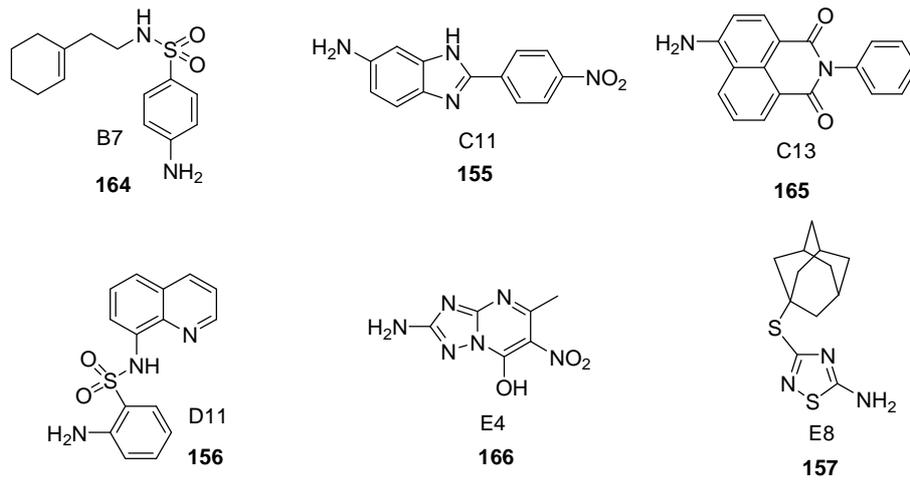


Abb. 6.8 Die Strukturen der kooperativen Binder der PTPN7.

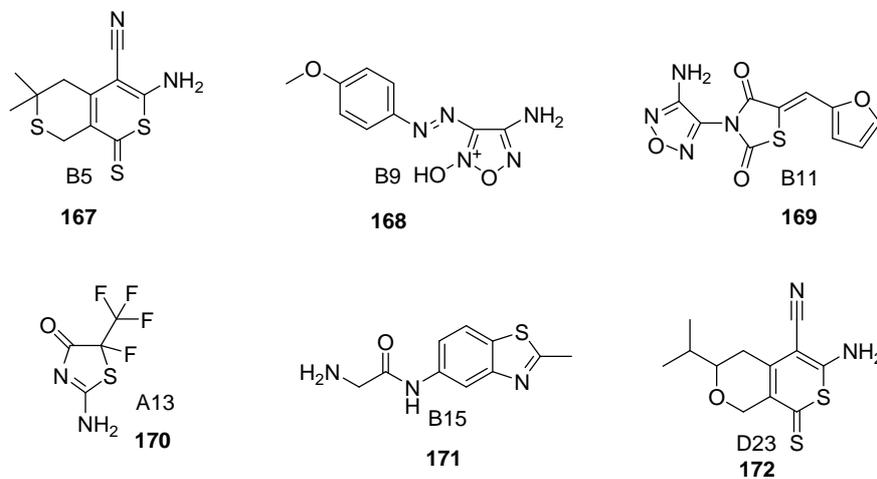


Abb. 6.9 Strukturen der identifizierten, kompetitiven Inhibitoren der PTPN7.

6.3.3 Untersuchung der Fragmentbibliothek im Substratligationsassay mit SHP2

Die Assaykonditionen wurden vorab für SHP2 bestimmt. Daher wurde die Untersuchung unter folgenden Bedingungen durchgeführt: 5 µg/ml SHP2, 250 µM Substrat **152**, 500 µM Amin, 60 min Inkubationszeit in 50 mM Tris-HCl pH 7,0. Danach erfolgte die Zugabe von Malachitgrün. Das Ergebnis ist in Abb. 6.10 zu sehen.

<>	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
A	2,9881	2,0217	2,6068	2,5993	2,4375	2,4316	2,6336	2,5940	1,0463	2,2433	2,6284	2,3310	1,7510	2,5740	2,6360	2,6167	2,4994	2,2567	2,2365	2,3284	2,3084	2,4449	2,5845	2,6091
B	2,0881	2,1558	2,4946	1,6083	1,6156	2,4678	2,4919	2,4692	1,2371	2,3963	0,5969	2,4521	2,4623	2,4519	2,3559	2,2400	2,0658	2,3210	2,2515	1,4767	2,4184	2,3463	2,4345	2,5028
C	2,4556	2,1437	2,2128	1,8010	2,1889	2,2264	2,1192	2,2308	2,2592	2,1885	2,2473	2,2111	2,1324	2,1912	2,2153	2,1801	1,7103	1,6113	2,1410	2,1040	2,1606	1,8475	2,2029	2,2249
D	2,3830	1,9625	2,2372	2,2094	2,2107	2,1780	2,2233	2,2065	2,1985	2,1805	2,1890	2,2177	2,1896	2,1911	2,2170	2,1908	2,2033	1,8946	2,1231	1,7530	2,0167	1,7836	1,0095	2,2300
E	2,4442	1,9515	2,2025	1,9701	2,1324	2,2455	2,2309	2,2320	2,1772	2,1914	2,2013	2,1810	2,1234	2,1346	2,1759	2,1699	2,0454	2,0325	2,1242	1,9848	2,0848	1,9364	2,1954	2,2202
F	2,3821	1,5273	2,1715	1,9232	2,0976	2,1931	2,1917	2,1756	2,1706	2,1679	2,1427	2,1686	2,1610	2,1610	2,1717	2,1644	2,1468	1,9392	2,0417	1,9622	2,1540	2,0172	2,1831	2,2072
G	0,3914	0,3854	0,4102	0,3977	0,3910	0,3968	0,4575	0,4431	0,3863	0,3915	0,3889	0,3897	0,3907	0,3867	0,3793	0,3801	0,4732	0,4662	0,4921	0,4681	0,4837	0,4826	0,4534	0,4639
H	0,3763	0,3857	0,3775	0,5123	0,3875	0,3947	0,4420	0,4355	0,3770	0,3824	0,3753	0,3881	0,3756	0,3753	0,3735	0,3731	0,4580	0,4564	0,4655	0,4732	0,4532	0,5003	0,4383	0,4476
I																								
J																								
K																								
L																								
M																								
N																								
O																								
P																								

Abb. 6.10 Ergebnis der Mikrotiterplatte nach Zugabe des Malachitgrüns für SHP2. Von A1 bis E14 sind die zu testenden Amine aufgetragen. Von E15 bis F24 ist die Kontrolle, also MtpA und 250 μ M Substrat **152** aufgetragen. In G1 bis H24 wurde der Hintergrund aufgetragen, also nur 250 μ M Substrat **152**.

Die Durchmusterung nach Fragmenten für SHP2 ergab sieben Verbindungen, die die Enzymaktivität stimulierten und vier Verbindungen, die die Phosphatase inhibierten. Die sieben identifizierten, kooperativen Binder wurden anschließend allein gegen die SHP2 getestet. Keine dieser sechs Verbindungen zeigte alleine irgendeine Wirkung gegen SHP2.

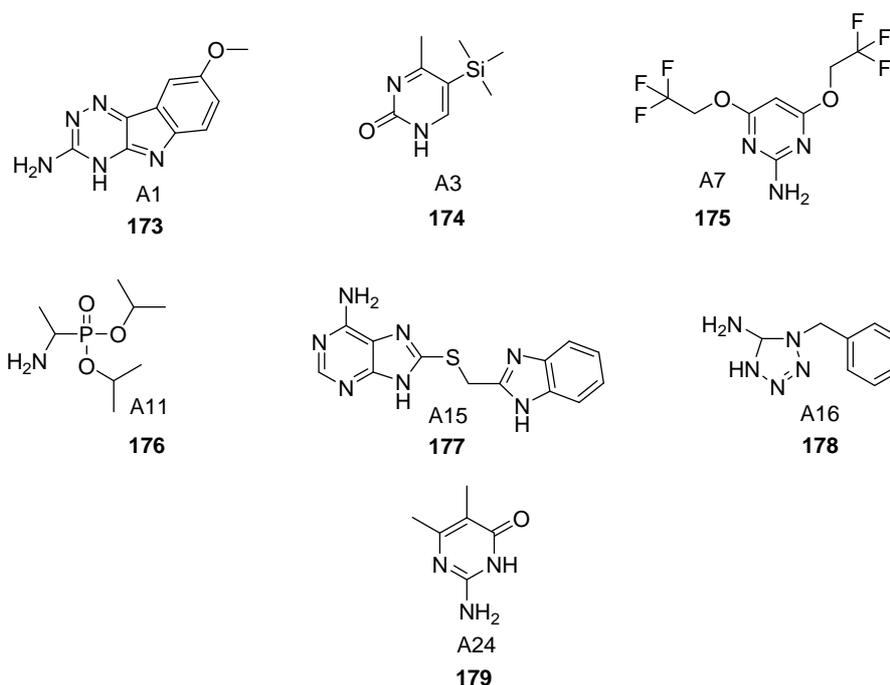


Abb. 6.11 Die Strukturen der kooperativen Binder der SHP2.

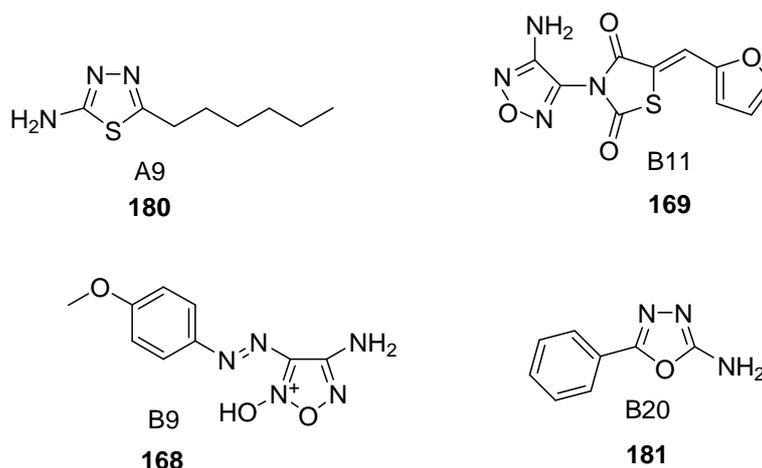


Abb. 6.12 Strukturen der identifizierten, kompetitiven Inhibitoren der SHP2.

6.3.4 Untersuchung der Fragmentbibliothek im Substratligationsassay mit PTPRR

Die Assaykonditionen wurden vorab für PTPRR bestimmt. Daher wurde die Untersuchung unter folgenden Bedingungen durchgeführt: 50 µg/ml PTPRR, 250 µM Substrat **152**, 500 µM Amin, 60 min Inkubationszeit in 50 mM Tris-HCl pH 7,0. Danach erfolgte die Zugabe von Malachitgrün. Das Ergebnis ist in Abb. 6.13 zu sehen.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
A	0,4961	0,5221	0,5254	0,5228	0,5351	0,5449	0,5247	0,4972	0,4689	0,4976	0,5178	0,4837	0,4679	1,0849	0,5107	0,5165	0,5270	0,5200	0,5225	0,5210	0,5250	0,5189	0,4958	0,4995
B	0,4782	0,4491	0,4706	0,4418	0,4455	0,4358	0,5036	0,4983	0,4387	0,5063	0,4935	0,4964	0,5003	0,4824	0,4553	0,4491	0,4714	0,4829	0,5050	0,4499	0,4970	0,4851	0,5757	0,4793
C	0,5240	0,5415	0,5441	0,5415	0,5451	0,5359	0,4945	0,5454	0,5242	0,5406	0,5450	0,5391	0,5555	0,5587	0,5374	0,5382	0,5221	0,5443	0,5100	0,6481	0,5591	0,5454	0,5598	0,6642
D	0,5154	0,5133	0,5188	0,4906	0,5424	0,5342	0,5247	0,5339	0,4896	0,5218	0,5164	0,5163	0,5062	0,4859	0,5324	0,5354	0,4987	0,5259	0,5756	0,5160	0,6565	0,4865	0,4729	0,4877
E	0,4960	0,5011	0,5577	0,5424	0,5467	0,5207	0,5089	0,5357	0,5329	0,5339	0,5243	0,5570	0,5119	1,0087	0,5330	0,4999	0,5248	0,5269	0,5221	0,5291	0,5221	0,5328	0,5246	0,5161
F	0,5354	0,5010	0,5235	0,4986	0,5085	0,4933	0,5306	0,4993	0,5182	0,4842	0,5118	0,4831	0,4996	0,4994	0,5231	0,4978	0,5192	0,5064	0,5311	0,5208	0,5229	0,5098	0,5068	0,6200
G	0,5164	0,5219	0,5234	0,5119	0,5224	0,5123	0,5221	0,5221	0,5038	0,5078	0,5355	0,5059	0,5269	0,4991	0,4823	0,4969	0,4918	0,4796	0,4985	0,4996	0,4938	0,4880	0,4946	0,4993
H	0,4921	0,4814	0,4795	0,4678	0,4849	0,4848	0,4872	0,4573	0,4835	0,4887	0,4784	0,4799	0,4590	0,4831	0,4718	0,4726	0,4794	0,4808	0,4878	0,4938	0,4763	0,4913	0,4828	0,4785
I																								
J																								
K																								
L																								
M																								
N																								
O																								
P																								

Abb. 6.13 Ergebnis der Mikrotiterplatte nach Zugabe des Malachitgrüns für PTPRR. Von A1 bis E14 sind die zu testenden Amine aufgetragen. Von E15 bis F24 ist die Kontrolle, also MtpA und 250 µM Substrat **152** aufgetragen. In G1 bis H24 wurde der Hintergrund aufgetragen, also nur 250 µM Substrat **152**.

Die Durchmusterung nach Fragmenten für PTPRR ergab zwei Verbindungen, die die Enzymaktivität stimulierten und keine Verbindung, die die Phosphatase inhibierte. Die beiden identifizierten, kooperativen Binder wurden anschließend allein gegen die PTPRR getestet. Keine der beiden Verbindungen zeigte alleine irgendeine Wirkung gegen PTPRR.

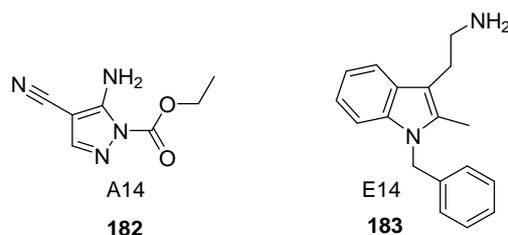


Abb. 6.14 Die Strukturen der kooperativen Binder der PTPRR.

6.3.5 Untersuchung der Fragmentbibliothek im Substratligationsassay mit PTP1B

Die Assaykonditionen wurden vorab für PTP1B bestimmt. Daher wurde die Untersuchung unter folgenden Bedingungen durchgeführt: 50 µg/ml PTP1B, 250 µM Substrat **152**, 500 µM Amin, 15 min Inkubationszeit in 50 mM Tris-HCl pH 7,0. Danach erfolgte die Zugabe von Malachitgrün. Das Ergebnis ist in Abb. 6.15 zu sehen.

<>	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
A	0,8848	0,9727	0,9987	0,8429	1,0138	0,9030	1,0334	0,8747	0,4609	0,7952	1,0618	0,5636	0,7163	0,9672	0,9369	0,8730	1,0428	0,9431	0,9331	0,8026	0,9264	0,7196	0,9522	0,7410
B	1,7951	0,7806	0,9409	0,5894	0,8923	0,7362	1,0091	0,7893	0,8687	0,7104	0,4453	0,7669	0,9320	0,7784	0,9805	0,5449	0,8717	0,8125	0,8530	0,4865	0,8754	0,7862	1,0491	0,7994
C	1,0422	0,9867	1,0648	0,9720	1,1094	0,8504	0,4980	0,9781	1,2787	0,8580	1,0945	0,9462	1,0789	0,9796	0,9156	0,9304	1,0398	0,9519	0,9377	1,0249	0,9958	0,8921	0,7508	0,9568
D	0,9917	0,8546	0,9568	0,9307	0,9579	0,8946	0,9689	0,8938	0,8607	0,7782	0,9320	0,6514	0,8486	0,8961	0,9117	0,8650	0,8379	0,8744	0,9447	0,8366	0,8413	0,6006	0,5121	0,7564
E	1,0571	1,1752	1,1335	1,0916	1,1146	1,3409	1,5024	1,0846	1,0418	0,9962	1,0898	1,0928	1,1576	0,9732	1,0621	1,0161	1,0117	1,0561	1,0274	1,0240	1,0126	0,9928	1,0023	1,0019
F	0,9859	0,9543	0,8447	0,9851	0,9451	1,0320	0,9971	1,0656	0,9179	0,9395	0,9454	0,9516	0,8928	0,9468	0,9290	0,9629	0,9124	0,9744	0,8956	0,9457	0,8938	0,9084	0,8544	0,9523
G	0,4502	0,4119	0,4360	0,4157	0,4284	0,4200	0,4533	0,4287	0,4454	0,4458	0,4415	0,4280	0,4295	0,4304	0,4206	0,4143	0,4204	0,4247	0,4293	0,4034	0,4143	0,4081	0,4196	0,4082
H	0,4048	0,4165	0,3874	0,3898	0,4077	0,4066	0,4257	0,3934	0,4006	0,3842	0,3989	0,3825	0,3870	0,3913	0,3939	0,3791	0,3855	0,3847	0,3830	0,3786	0,3820	0,3790	0,3759	0,3526
I																								
J																								
K																								
L		> 1,5																						
M		1,1 < 1,5																						
N		0,8 < 1,1																						
O		0,5 < 0,8																						
P		< 0,5																						

Abb. 6.15 Ergebnis der Mikrotiterplatte nach Zugabe des Malachitgrüns für PTP1B. Von A1 bis E14 sind die zu testenden Amine aufgetragen. Von E15 bis F24 ist die Kontrolle, also MtpA und 250 µM Substrat **152** aufgetragen. In G1 bis H24 wurde der Hintergrund aufgetragen, also nur 250 µM Substrat **152**.

Die Durchmusterung nach Fragmenten für PTP1B ergab zwei Verbindungen, die die Enzymaktivität stimulierten und vier Verbindungen, die die Phosphatase inhibierten. Die beiden identifizierten, kooperativen Binder wurden anschließend allein gegen PTP1B getestet. Keine der beiden Verbindungen zeigte alleine irgendeine Wirkung gegen PTP1B.

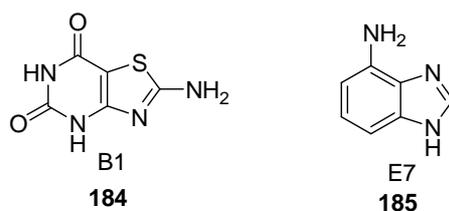


Abb. 6.16 Die Strukturen der kooperativen Binder der PTP1B.

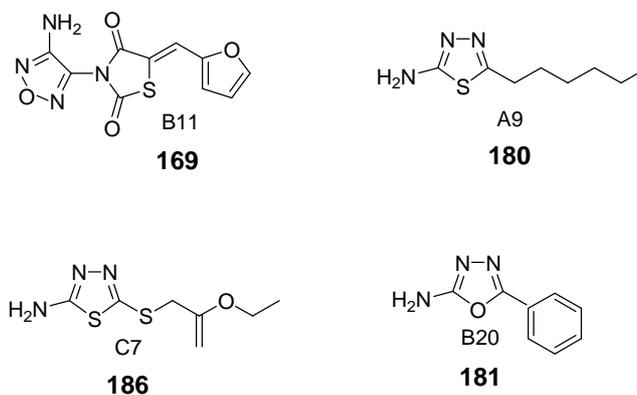


Abb. 6.17 Strukturen der identifizierten, kompetitiven Inhibitoren der PTP1B.

Sieht man sich in den Tabellen 6.1 und 6.2 die identifizierten, kompetitiven Inhibitoren und kooperativen Binder an, so fällt auf, dass viel weniger kompetitive Inhibitoren gefunden worden sind als kooperative Binder. Zudem zeigten die gefundenen, kompetitiven Inhibitoren oft, dass sie gleich mehrere Phosphatasen inhibierten, so zum Beispiel die Verbindung **169** (siehe Abb 6.17). Diese Verbindung ist möglicherweise auf Grund seiner Struktur als Michael-Akzeptor ein irreversibler Inhibitor. Sein Michaelsystem wird wahrscheinlich kovalent an den aktiven Cysteinrest der jeweiligen Phosphatase gebunden. Das könnte auch sein unselektives Binden an gleich drei Phosphatasen erklären.

Tabelle 6.1 Auflistung aller kompetitiver Inhibitoren und deren Zielphosphatasen.

Position	Nummer	MtpA	PTPN7	SHP2	PTPRR	PTP1B
A9	180			X		X
A13	170		X			
B4	163	X				
B5	167		X			
B9	168		X	X		
B11	169		X	X		X
B15	171		X			
B20	181			X		X
C7	186					X
D23	172		X			

Tabelle 6.2 Auflistung aller kooperativer Binder und deren Zielphosphatasen.

Position	Nummer	MtpA	PTPN7	SHP2	PTPRR	PTP1B
A1	173			X		
A3	174			X		
A7	175			X		
A11	176			X		
A14	182				X	
A15	177			X		
A16	178			X		
A24	179			X		
B1	184					X
B7	164		X			
B24	159	X				
C11	155	X	X			
C13	165		X			
C15	158	X				
D11	156		X			
D14	160	X				
E1	162	X				
E2	161	X				
E4	166		X			
E7	185					X
E8	157	X	X			
E14	183				X	

Im Gegensatz dazu wurden weit mehr kooperative Binder identifiziert. Es gibt hier nur wenige Treffer, die an mehrere Phosphatasen binden. Als Ausnahmen fallen nur die Verbindungen **155** und **157** (Abb. 6.5) auf, die an MtpA und PTPN7 binden. Interessant ist hierbei, dass es sich bei beiden Treffer um Strukturen handelt, die jeweils das gleiche Phosphatasenpaar binden (jeweils die Kombination MtpA und PTPN7). Dennoch kann bereits nach Auswertung der Primärdaten gesagt werden, dass das Ziel, die Identifizierung selektiver Binder, mit Hilfe der Durchmusterung von Fragmenten für die zum aktiven Zentrum benachbarte Tasche erreicht wurde. Es bleibt noch zu klären, ob diese Bindungsinformationen von dem Substratassay auf die Synthesen von spezifischen Inhibitoren übertragen werden kann. Deshalb wurde im Folgenden der kooperative Binder **159** (Abb. 6.5) ausgewählt. **159** wurde mit einem Phosphotyrosinmimetikum kovalent verknüpft und gegen MtpA getestet.

6.4 Synthese und Evaluierung des potenziellen MptpA Inhibitors

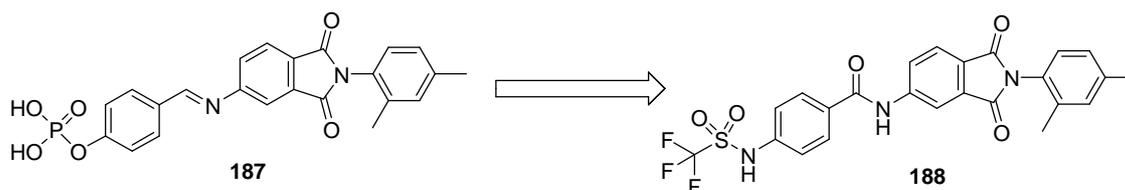


Abb. 6.18 Konversion des vermeintlichen guten Substrates **187** zu dem Inhibitor **188**.

In der Abb. 6.18 ist das vermutete Imin **187** gezeigt, welches in dem MptpA-Screen zu erhöhter Substratumsetzung führte. Dieses soll nun zum Einen kovalent verknüpft werden (aus der Schiff'schen Base wird ein Amid) und zum Anderen durch die Substitution der zu hydrolysierenden Phosphatgruppe durch ein einfaches, bekanntes Phosphatmimetikum^[82], das Trifluorsulfonamid, um den Inhibitor **188** zu erhalten. Zur Synthese von **188** wurde eine Synthesestrategie entwickelt, die in Abb. 6.19 gezeigt ist.

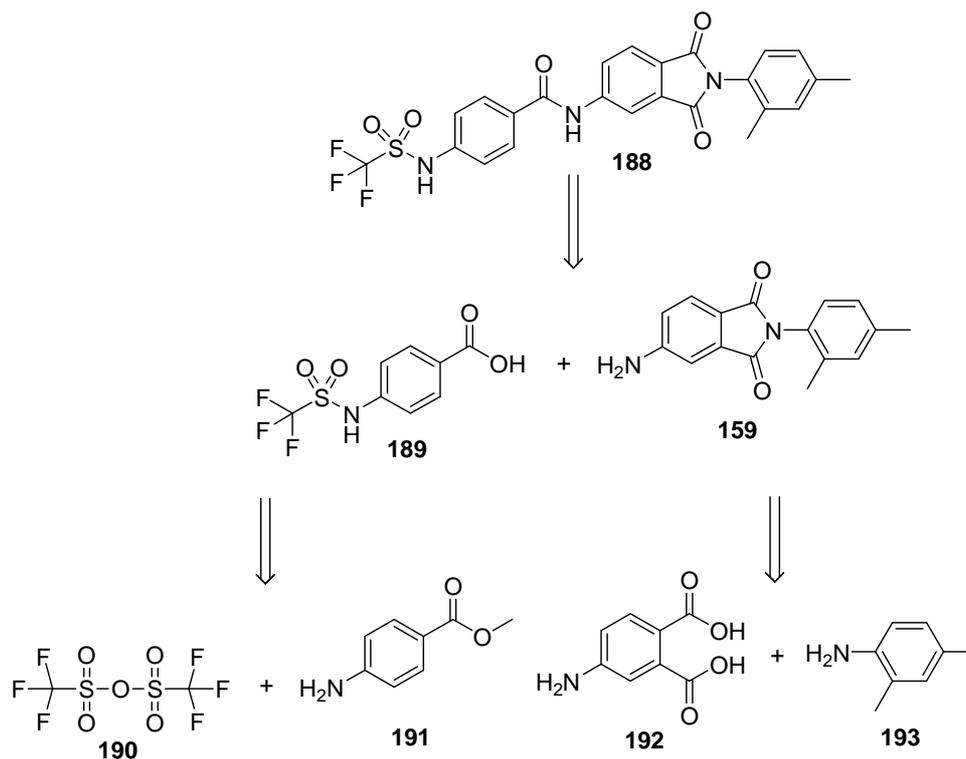


Abb. 6.19 Entwickelte Retrosynthese zu Verbindung **188**.

Nach der in Abb 6.19 gezeigten Retrosynthese wurde begonnen, die Verbindung **191** zum Trifluormethylsulfonamid **189** umzusetzen. Die Reaktion erfolgte in trockenem Dichlormethan mit einem Äquivalent Pyridin. Die Umsetzung verläuft quantitativ (Abb. 6.20).

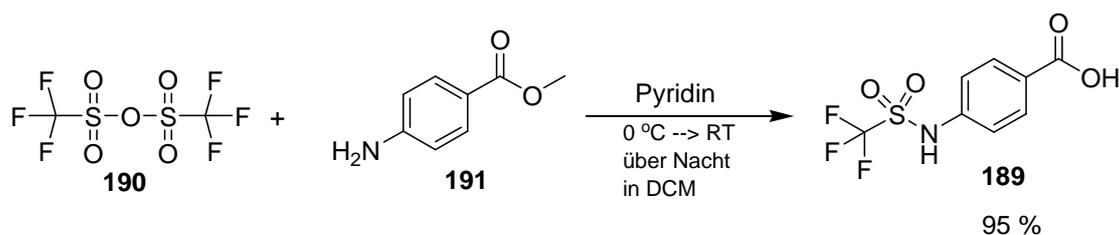


Abb. 6.20 Umsetzung von **191** mit Trifluormethansulfonsäureanhydrid **190** zu **189**.

Gleichzeitig wurde die Phthalsäure **192** in einem zehnfachen Überschuss des Anilins **193** gelöst und für 60 min bei 200 °C in der Mikrowelle erhitzt. Die Verbindung **159** wurde anschließend säulenchromatographisch gereinigt (Toluol/Aceton 4:1). Die Ausbeute betrug 64 %.

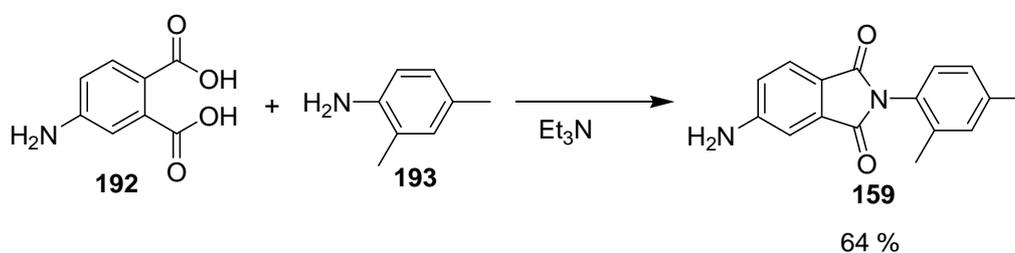


Abb. 6.21 Umsetzung der Phthalsäure **192** zu dem Phthalimid **159**.

Der finale Schritt war die Amidkupplung von **189** mit **159** zu dem potenziellen Inhibitor **188**. Die Verbindung **189** wurde in SO_2Cl_2 für 2 h gekocht und das verbliebene SO_2Cl_2 im Vakuum entfernt. Das so gewonnene Säurechlorid der Verbindung **189** wurde in trockenem Dichlormethan gelöst, anschließend wurden 1,5 Äquivalente des Amins **159** zugegeben. Der Ansatz wurde über Nacht bei Raumtemperatur gerührt und mittels präparativer HPLC gereinigt. Man erhielt eine Ausbeute von 43 %.

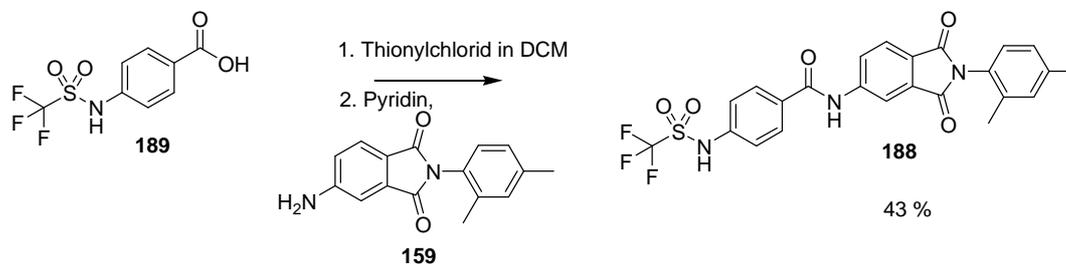


Abb. 6.22 Amidkupplung der Bausteine **189** und **159** zu dem potentiellen Inhibitor **188**.

Letztlich wurde der potenzielle Inhibitor **188** in einem Sekundärassay, dem *para*-Nitrophenolphosphat (*p*NPP)-Assay^[83] getestet. Gleichzeitig wurde die Vorläuferverbindung **189** auch getestet, da diese das Bioisoster der Phosphatgruppe enthält. Das Ergebnis war

eindrucksvoll, die Verbindung **188** inhibiert die MtpA mit einem K_I -Wert von 10 μM , während der Baustein **189** nur einen K_I -Wert von etwa 300 μM zeigt. Die Verbindung **188** ist demnach dreissigmal besser als der reine Phosphatmimetikumbaustein **189**.

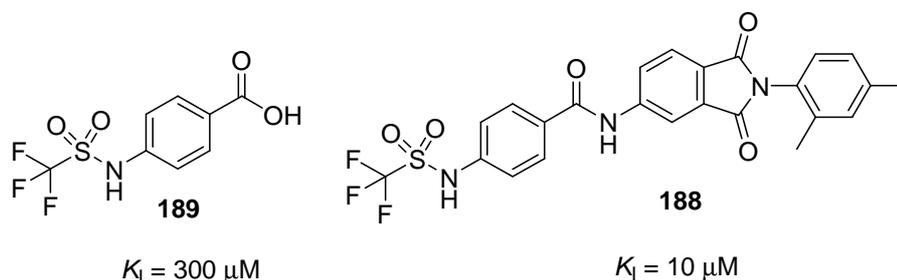


Abb. 6.23 Strukturen und Aktivitäten des Phosphatmimetikumbausteines **189** und des MtpA-Inhibitors **188**.

Der Dynamische Substrataktivitätsassay war damit erfolgreich. Durch diese Art des Screenings kann man kompetitive Inhibitoren wie kooperative Binder bereits im Primärscreen unterscheiden. Außerdem ist es gelungen, einen potenten und selektiven MtpA-Inhibitor zu entwickeln, indem man sich nicht die eigentliche Substratbindungstasche angesehen hat, sondern eine Nachbartasche. Die Substratbindungstaschen aller Phosphatasen sind sich aufgrund ihrer Aufgabe, Hydrolyse einer Phosphatbindung, sehr ähnlich. Die hier identifizierten, kompetitiven Inhibitoren zeigen, dass dadurch kaum selektive Inhibitoren gefunden werden können (siehe Verbindung **169**). Dies ist eines der zentralen Probleme bei der Entwicklung von Inhibitoren für PTPs. Gerade deswegen ist es bemerkenswert, dass das Konzept, Dynamische Ligation zur Identifikation von Bindern für die Nachbartasche zu nutzen, so erfolgreich war. Verlässt man die Phosphotyrosinbindungstasche, ist es einfach, selektive Liganden für Proteintyrosinphosphatasen zu finden. Im Falle der MtpA wurde Verbindung **159** als starker kooperativer Binder identifiziert. Diese Information wurde genutzt, um den Inhibitor **188** zu entwickeln. Die Validierung von **188** gegenüber MtpA zeigte eine Aktivität von 10 μM . Dagegen ist dieser bei 500 μM im *p*NPP-Assay gegenüber den anderen Phosphatasen inaktiv. Zusätzlich wurde auch die Verbindung **159** im *p*NPP-Assay gegen MtpA getestet. Als Ergebnis konnte festgehalten werden, dass **159** vollkommen inaktiv ist. Der Phosphotyrosinmimetikumbaustein **189** dagegen zeigt eine Aktivität von 300 μM , d.h. durch die kovalente Verknüpfung mit dem selektiven Binder **159** verstärkt sich die Aktivität um den Faktor 30.

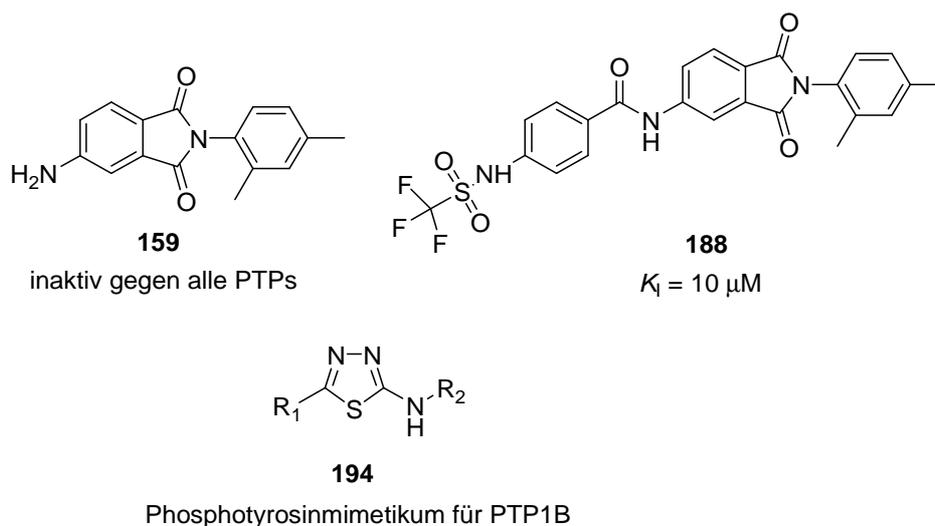


Abb. 6.24 Struktur des identifizierten, kooperativen MtpA-Binders **159**, Struktur und Aktivität des entwickelten MtpA-Inhibitors **188** sowie die Struktur eines neuen, hier entdeckten Phosphatmimetikums **194** für PTP1B.

Die Verbindung **189** wurde daher in einer Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Stefan Kaufmann am Max-Planck-Institut für Infektionsbiologie Berlin im Zellassay gegen das Mykobakterium getestet. Leider war die Verbindung dort inaktiv. Der Grund hierfür ist vielleicht das gewählte Phosphatmimetikum. Das Sulfonamid kann in eukaryontischen Zellen durch Hydrolasen gespalten werden. Es entsteht das positiv geladene Amin, welches nicht mehr als Phosphatmimetikum dienen kann. Für die weitere Planung ist es daher günstig, die Trifluormethansulfonamidgruppe gegen ein stabileres Phosphatmimetikum auszutauschen. Zudem konnte in diesem Projekt ein Phosphatmimetikum für PTP1B gefunden werden. Ausgehend von den identifizierten Verbindungen **180**, **181** und **186** ist klar erkennbar, dass das Thiadiazolgrundgerüst **194** als Phosphatmimetikum dient. Ziel ist es daher in den folgenden Arbeiten, die hier entwickelte Idee, Fragmente für die Nachbartaschen der Aktivtasche zu identifizieren, für dieses Mimetikum zu nutzen. Die Reste 1 und 2 der Verbindung **194** (siehe Abb. 6.24) sollen mit Hilfe der Dynamischen Ligation so variiert werden, dass ein selektiver und zellgängiger PTP1B-Inhibitor erhalten werden kann.

7. Zusammenfassung

In der hier vorliegenden Arbeit stand die Detektion niedrig affiner Fragmentmoleküle über Templat-stabilisierte Ligationsprodukte im Mittelpunkt. Konkret wurde die Frage gestellt, ob Imine, die erst durch das Wirkstoffziel (Templat) stabilisiert werden, auch die Funktion der Template beeinflussen. Wenn dies der Fall ist, kann man mit Hilfe einfacher bekannter, biochemischer Funktionstests, sogenannten Assays, diese stabilisierten Ligationsprodukte indirekt nachweisen und diese Information für die Inhibitorentwicklung nutzen.

Die oben gestellte Hypothese konnte bestätigt werden. Die auf dem Wirkstoffziel reversibel gebildeten Ligationsprodukte hatten einen Einfluss auf die Funktion des Proteins. Es war daher möglich, diese Ligationsprodukte mit bekannten, biochemischen Funktions- und Bindungsstudien zu detektieren. Diese Strategie, dynamisch gebildete Ligationsprodukte mit Hilfe biochemischer Funktionstest zu identifizieren, wurde daher dynamisches Ligationscreening (DLS) genannt.

Das dynamische Ligationscreening wurde in dieser Arbeit an mehreren Wirkstoffzielen erprobt. So konnte im Falle der SARS-Hauptprotease (SARS-CoV M^{pro}) der nicht-peptidische Inhibitor **98** mit einem K_I -Wert von 2,9 μM entwickelt werden. Dieser gehört zu den bisher besten Inhibitoren, die gegen die SARS-CoV M^{pro} bekannt sind. Im Gegensatz dazu waren die gefundenen Verbindungen gegen die HIV1-Protease nicht so aktiv wie die in der Literatur beschriebenen. Dennoch kann die Verbindung **128** mit einer Aktivität von 890 nM in Zukunft als potentielle Leitstruktur dienen und damit gegen aufkommende Resistenzen eine Alternative darstellen. Das Ergebnis der Arbeiten zu der Caspase 3 war die Verbindung **148**. Diese stellte mit einer Aktivität von 0,08 nM den bisher besten bekannten Inhibitor dar. Zusätzlich konnte durch Simulationen der dynamischen Ligation im Vergleich zu experimentellen Daten auch ein Einblick gewonnen werden, wie das Ligationsprodukt wahrscheinlich auf der Oberfläche des Proteins gebildet wird und nicht schon in Lösung.

Letztlich konnte die Verbindung **188** auch Lösungsansätze für das Problem der Entwicklung von Phosphataseinhibitoren bieten. Durch das DLS wurden im Falle der MtpA Fragmente für die benachbarte Tasche zum aktiven Zentrum identifiziert. Durch synthetische Verknüpfung des gefundenen Fragments **159** mit einem Phosphotyrosinmimetikum **189** konnte der hoch selektive MtpA-Inhibitor **188** entwickelt werden. Dieser zeigte eine Inhibitionskonstante von 10 μM gegen MtpA und bei einer Konzentration von 500 μM fast gar keine Inhibition gegen die PTPs SHP2, PTP1B, PTPN7 und PTPRR. Leider war auf Grund des verwendeten Phosphatmimetikums der Inhibitor **188** nicht zellgängig. Das Problem kann aber durch die Verwendung zellgängiger Phosphatmimetika behoben werden. Für

PTP1B wurde ein solcher gefunden. Die Verbindung **194** kann als Startpunkt für die Entwicklung eines selektiven und zellgängigen PTP-Inhibitors dienen.

Als Fazit ist daher zu ziehen, dass der Nachweis von nieder affinen Fragmente über Templat-stabilisierte Ligationsprodukte durch biochemische Funktions- und Bindungsstudien möglich ist. Die allgemeine Anwendung dieser Methode, des dynamischen Ligationscreenings (DLS), zur kostengünstigen und schnellen Identifizierung neuer Leitstrukturen für potentielle Wirkstoffziele konnte erfolgreich etabliert werden.

Summary

Specific protein ligands are crucial for the modulation of protein activities in medicinal chemistry and chemical biology. This dissertation presents a concept for the discovery and development of small molecule fragments binding to defined protein sites: Dynamic Ligation Screening enables the rapid and site-directed identification of low-affinity binders in protein activity and fluorescence polarization experiment by exploiting template-assisted fragment assembly. Dynamic Ligation Screening (DLS) was conducted with libraries of 100-7000 fragments consuming only minor amounts of enzyme: A fluorogenic protease substrate competed with an equilibrium of nucleophilic fragments and a designed peptide electrophile for the active-site. Decreased initial rates of product formation in the fluorophore-based enzyme assay indicated the inhibitory activity of the reversibly formed ligation product. One selected hit was modified synthetically in order to verify the binding site. Via an iterative scanning of different binding sites on the protein surface, moderately active peptidic inhibitors could be transformed into entirely non-peptidic inhibitors with a low μM K_I .

The concept was established for the development of a non-peptidic SARS coronavirus main protease (SARS-CoV M^{Pro}) inhibitor. This enzyme has been identified as a drug target of SARS being essential for replication of the virus inside the infected host cell. Thermodynamics of protein-assisted fragment ligations were studied for caspase-3, the cellular switch for apoptosis, the programmed cell death. As a result a model for the additivity of binding contributions of reversibly ligated fragments is proposed and the most active inhibitor reported to date was developed. The method was further extended to phosphatases. Herein, a substrate activity ligation screen enables the development of a highly selective inhibitor for the *Mycobacterium tuberculosis* proteintyrosin phosphatase A (MptpA). The general application of dynamic ligation screening (DLS) for the detection of low affinity binders could be established.

8. Experimenteller Teil

8.1 Materialien

Die Lösungsmittel wurden von Fluka (Neu-Ulm), Merck (Darmstadt), Riedel de Haen (Seelze), Lancaster (Mühlheim am Main), Acros (Ulm) und Aldrich (Taufkirchen) in p. a. Qualität bezogen. Die wasserfreien Lösungsmittel DCM, DMF, THF, DMSO, Methanol, Toluol, Diethylether und Benzol stammen von Fluka (Neu-Ulm). Acetonitril und Methanol zur HPLC- sowie MS-Analytik wurden von Fluka (Neu-Ulm) bezogen. Wasser für die HPLC wurde über eine Milli Q-Anlage der Fa. Millipore (Eschborn) gewonnen.

Für die NMR-Spektroskopie wurden deuterierte Lösungsmittel der Firma Deutero GmbH (Herresbach) verwendet.

Das mit Phenylalaninaldehyd vorbeladene Harz „H-Phe-H NovaSyn[®] TG resin“ sowie alle restlichen Harze für die Peptidsynthese wurden von der Firma Merck Biosciences Novabiochem (Läufelfingen, Schweiz) bezogen.

Die Enzyme Caspase 3 und HIV1-Protease wurden von der Firma Merckbioscience (Läufelfingen, Schweiz) bezogen. Die SARS-CoV M^{pro} wurde von unserem Kooperationspartner Herrn Prof. Dr. Rolf Hilgenfeld (Universität Lübeck) geliefert. Die hier verwendeten Proteintyrosinphosphatasen (PTPs) wurden im Rahmen des PTP-Konsortiums von den Arbeitsgruppen um Herrn Prof. Dr. Walter Birchmeier (MDC Berlin) (SHP2), um Herrn Dr. Stefan Knapp (Universität Oxford) (PTPN7, PTPRR, PTP1B) und um Herrn Prof. Dr. Stefan H. E. Kaufmann (MPI für Infektionsbiologie Berlin) (MptpA) gestellt.

Alle anderen Chemikalien und Reagenzien stammen von ABCR (Karlsruhe), Acros (Ulm), Aldrich (Steinheim), Bachem (Bubendorf, Schweiz), Fluka (Neu-Ulm), Lancaster (Mühlheim am Main), Merck (Darmstadt), Merckbioscience/Novabiochem (Läufelfingen, Schweiz) und wurden ohne weitere Reinigung eingesetzt.

8.2 Geräte und analytische Methoden

8.2.1 Dünnschichtchromatographie (DC)

Dünnschichtchromatogramme wurden auf DC-PET-Folien-Kieselgel (Schichtdicke 0,25 mm, mittlerer Porendurchmesser 60 Å, 4 x 8 cm) mit Fluoreszenzindikator 254 nm der Firma Fluka durchgeführt. Die Verbindungen wurden mit UV-Licht ($\lambda = 254$ nm) detektiert und mit Hilfe wässriger KMnO₄-Lösung (3 g KMnO₄, 20 g K₂CO₃ und 5 ml 5%-ige NaOH in 300 ml Wasser) entwickelt.

8.2.2 Kernresonanzspektroskopie (NMR)

Eindimensionale ^1H - und ^{13}C - sowie zweidimensionale NMR-Spektren wurden an einem Kernresonanzspektroskop Bruker AMX 300 MHz (Bruker Analytik, Bremen) aufgenommen. Als Lösungsmittel wurden DMF- d_7 , DMSO- d_6 , CDCl_3 , D_2O und MeOD- d_4 verwendet. Die Spektren wurden bei 25 °C aufgenommen. Die chemische Verschiebung ist in ppm relativ zum jeweiligen Lösungsmittel oder TMS als internen Standard angegeben. Die Kopplungskonstante ist in Hertz (Hz) angegeben. Die Signalmultiplizitäten sind wie folgt abgekürzt: Singulett (s), Dublett (d), Triplett (t), Multiplett (m), breites Signal (br).

8.2.3 HPLC/ESI/MS-Kupplung

HPLC/ESI/MS-Spektren wurden mit dem Liquidchromatographie/Massenspektrometer (LC/MS) der Firma Agilent Technologies aufgenommen (Agilent 1100 Series). Als Trennsäule diente eine Eclipse XDB-C8, Analytical Guard Column, 4,6*12,5 mm, 5 μm , der Firma Agilent Technologies. Die Elutionsmittel waren ACN / 0,1 % HCOOH (Laufmittel A) und H_2O / 0,1 % HCOOH (Laufmittel B) bei einer Flussrate 1,0 ml/min $^{-1}$. Es wurden je nach Trennproblem, folgende Gradienten eingesetzt:

- 5 % B auf 80 % B innerhalb 10 min, weitere 5 min auf 80 % B, danach innerhalb von 5 min auf 100 % B für weitere 5 min.
- 5 % B auf 100 % B innerhalb von 15 min, weitere 3 min auf 100 % B.

Die Detektion erfolgte bei den Wellenlängen 214 nm, 254 nm, 280 nm und 360 nm.

8.2.4 Hochauflösungsmassenspektrometrie

Die ESI-FTICR-MS-Messungen wurden an einem Ionspec QFT-7 (Varian), mit einer Z-Spray-ESI-Quelle (Micromass, Altrincham, UK) durchgeführt. Die Fragmentierung erfolgte mittels IRMPD.

8.2.5 Präparative Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC)

Für die präparative Reinigung wurde die Anlage mit dem UV-Detektor (SDD-6A), Systemkontroller (SCL-8A) und dem *preparativ liquid chromatograph* (LC.8A) der Firma Shimadzu verwendet. Die Trennsäule für die präparative Reinigung war eine Grom-SIL 300 ODS-5 ST RP-C18 (10 μm , 250 x 20 mm).

Für die Trennung wurde, wenn nicht anders vermerkt, ein Gradient von Wasser / 0,1 % TFA (v/v) (Laufmittel A) und Acetonitril / 0,1 % TFA (v/v) (Laufmittel B) bei einer Flussrate von 10 ml/min gefahren. Die UV-Detektion erfolgte bei $\lambda = 214$ nm bzw. 254 nm. Die für die Trennung erforderlichen Gradienten wurden mittels analytischer Läufe bestimmt.

8.2.6 UV/Vis-Spektroskopie

Die UV/Vis-Spektren wurden an dem Lambda 2 UV/Vis-Spektrometer (Jasco Deutschland) mit Quarzküvetten Suprasil 0,1 (cm) durchgeführt.

Zur Bestimmung der Harzbelegung von Fmoc-Aminosäuren wurden ca. 5 mg trockenes Harz in einen 10 ml-Messkolben eingewogen, mit 20 %igen Piperidin in DMF aufgefüllt und 90 min bei RT inkubiert. Im aufgenommenen UV-Spektrum der Abspaltungslösung wurde anhand der drei Absorptionsmaxima des *N*-(9-Fluorenylmethyl)-piperidinadduktes bei 267 nm, 289 nm und 301 nm der Belegungsgrad des Harzes bestimmt^[84]. Die wahre Beladung B wurde als Mittelwert der drei Maxima angenommen. Unter Berücksichtigung der Umrechnungsfaktoren und Küvettenabmessungen ergibt sich die Beladung B nach dem Lambert-Beer'schen Gesetz zu:

$$B = \frac{100000 \cdot E_{\lambda}}{\epsilon_{\lambda} \cdot m_{(\text{Harzeinwaage})}} = [\text{mmol/g}] \quad (10)$$

Extinktionskoeffizienten:

$$\epsilon_{267\text{nm}} = 17500 \text{ cm}^2/\text{mol}, \epsilon_{289\text{nm}} = 5800 \text{ cm}^2/\text{mol}, \epsilon_{301\text{nm}} = 7800 \text{ cm}^2/\text{mol}$$

8.2.7 Ninhydrin-Test nach Kaiser – Nachweis primärer Amine

Zur Überprüfung der Fmoc-Entkupplung auf Vollständigkeit erfolgt der Ninhydrin-Test nach Kaiser^[85]:

Reagenzien:

- Lösung 1: KCN in Pyridin (2 ml 0,001 M KCN in 98 ml Pyridin gelöst)
- Lösung 2: 5 % Ninhydrin in Butanol (w/v)
- Lösung 3: 80 % Phenol in Butanol (w/v)

Zur Durchführung wurden wenige Harzkügelchen in einem Eppendorf-Gefäß mit je einem Tropfen der drei Lösungen versetzt und die Suspension 5 min bei 110 °C erhitzt. Waren freie Amino-Gruppen vorhanden, so trat Baufärbung auf.

8.2.8 Mikrotiterplattenphotometer „SAFIRE II®“ der Firma TECAN

Die Enzymkinetiken sowie Fluoreszenzpolarisationsexperimente wurden an dem ELISA-Reader „SAFIRE II® 384-well plate reader“ der Firma Tecan Seriennummer 12901300124, Crailsheim, Germany, aufgenommen.

8.2.9 Mikrowellenunterstützte Synthese

Mikrowellenunterstützte Synthese erfolgte mittels SmithSynthesizer™ der Firma Personal Chemistry, Uppsala, Schweden heute Biotage. Es handelt sich um ein Single-Mode Gerät, dessen Steuerung Software-unterstützt erfolgt. Das Probenvolumen beträgt 0,5 bis 5 ml in mit Septen verschlossen, druckstabilen Reaktionsgefäßen. Ein Magnetotron mit einer Leistung von 15-300 W erzeugt Mikrowellenstrahlung bei einer Frequenz von 2,45 GHz. Der Temperaturbereich erstreckt sich von 60 bis 250 °C bei einer Heizrate von 2-5 °C / min. Der zulässige Druck im Inneren der Reaktionsgefäße beträgt 20 bar. Während der Reaktion wird die Temperatur im Reaktionsgefäß durch kurze Mikrowellenimpulse konstant gehalten. Schnelles Abkühlen nach der Reaktion wird mit Druckluft erreicht.

8.3 Synthesevorschriften

8.3.1 Allgemeines Protokoll der Festphasensynthese.

8.3.1.1 Belegung von 2-Chlortriphenylmethylchloridharz mit Fmoc-Aminosäuren.

Das verwendete 2-Chlortriphenylmethylchloridharz (Belegung 1,6 mmol/g) (1eq.) wurde zweimal mit DMF gewaschen, 10 min mit DCM aufgequollen und anschließend abgesaugt. Zwei Äquivalente wurden in einer Mischung von trockenen DCM und trockenen DMF (1:1) suspendiert, mit sechs Äquivalenten DIPEA versetzt, auf das Harz gegeben und eine Stunde auf dem Schüttler reagieren lassen. Das Harz wurde zunächst dreimal mit DMF und anschließend dreimal mit DCM gewaschen, im Vakuum getrocknet und der Belegungsgrad mittels Fmoc-Bestimmung eruiert. Bei zu geringem Belegungsgrad ($B < 0,4$ mmol/g) wurde abermals nach obiger Anleitung belegt. Im Anschluss an die Belegung wurden nicht umgesetzte Chlorid-Funktionen durch fünf- bis zehnminütige Reaktion mit zehn Äquivalenten MeOH gesättigt („Capping“).

8.3.1.2 Fluorenylmethoxycarbonyl-(Fmoc)-Entschützung.

Nach erfolgreicher Belegung des Harzes wurde die basenlabile 9-Fluorenylmethoxycarbonyl (Fmoc)-Schutzgruppe mittels 20 %iger Piperidin/DMF-Lösung (v/v) abgespalten. Die Abspaltung erfolgte durch Zugabe des Piperidin-Reagenzes zweimal für jeweils 5 min. Anschließend wurde das Harz zunächst dreimal mit DMF und anschließend dreimal mit DCM gewaschen.

8.3.1.3 Peptidkupplungsprotokoll.

Das Harz mit der N-terminalen, entschützten, belegten Aminosäure (1 eq.) wurde für 10 min in trockenem DMF gequollen. Währenddessen wurde die zu kuppelnde N-terminal-geschützte Aminosäure (5 eq.) mit dem Aktivierungsreagenz 1-Hydroxybenzotriazol (HOBt) (5 eq.) in der nötigen Menge trockenem DMF gelöst. Nach 5 min erfolgte die Zugabe des Kupplungsreagenzes *N,N*-Diisopropylcarbodiimid (DIC) (5 eq.). Während der nun folgenden 10 min Aktivierungszeit wurde das Harz trocken gesaugt. Im Anschluss wurde der in DMF gelöste Ansatz aus Fmoc-Aminosäuren, HOBt und DIC auf das Harz gegeben und drei Stunden geschüttelt. Nach dieser Reaktionszeit wurde das Harz trocken gesaugt und zunächst dreimal mit DMF und anschließend dreimal mit DCM gewaschen. Die Schritte 8.3.1.2 und 8.3.1.3 wurden beliebig wiederholt.

8.3.1.4 Acetylierung des N-Terminus.

Nach erfolgreicher Peptidkupplung wurde die N-terminale Fmoc-Schutzgruppe nach 8.3.1.2 abgespalten und der nun freie N-Terminus durch die Zugabe von 5 Äquivalenten Essigsäureanhydrid in DMF acetyliert. Die Reaktion erfolgte zweimal für etwa 20 min.

8.3.1.5 Acylierung des N-Terminus mit 5-(6)-Carboxyfluorescein.^[86]

Nach erfolgreicher Peptidkupplung wurde die N-terminale Fmoc-Schutzgruppe nach 8.3.1.2 abgespalten. Das Harz mit der N-terminalen, entschützten, belegten Aminosäuren (1eq.) wurde für 10 min in trockenem DMF gequollen. Währenddessen wurde das zu kuppelnde 5-(6)-Carboxyfluorescein (5 eq.) mit dem Aktivierungsreagenz 1-Hydroxybenzotriazol (HOBt) (5 eq.) in der nötigen Menge trockenem DMF gelöst. Nach 5 min erfolgte die Zugabe des Kupplungsreagenzes *N,N*-Diisopropylcarbodiimid (DIC) (5 eq.). Während der nun folgenden 10 min Aktivierungszeit wurde das Harz trocken gesaugt. Im Anschluss wurde der in DMF gelöste Ansatz aus 5-(6)-Carboxyfluorescein, HOBt und DIC auf das Harz gegeben und drei Stunden geschüttelt. Nach dieser Reaktionszeit wurde das Harz trocken gesaugt und zunächst

dreimal mit DMF gewaschen. Anschließend wurde das Harz trocken gesaugt und dreimal für je 20 min mit 20 % Piperidin in DMF geschüttelt.

8.3.1.6 Peptidabspaltung und Aufarbeitung.

Das Harz wurde in 95 % TFA/Wasser (v/v) suspendiert (ca. 2 ml pro 100 mg Harz). Bei Trt-geschützten Seitenketten wurde eine Abspaltlösung von 95 % TFA, 2,5 % H₂O und 2,5 % Triisopropylsilan als *scavenger* des Tritylkations verwendet. In Anwesenheit von schwefelhaltigen Seitenketten wurde mit 92,5 % TFA, 2,5 % H₂O, 2,5 % Triisopropylsilan und 2,5 % Ethandiol oder wahlweise Thioanisol abgespalten. Die generelle Zugabe von Wasser sollte dazu dienen eventuelles Trifluoressigsäureanhydrid zu entfernen. Nach einer Reaktionszeit von 3 Stunden wurde die Lösung abfiltriert.

Die Abspaltlösung wurde mit dest. Wasser verdünnt und am Rotationsverdampfer eingengt. Anschließend wurde die Trockne mit eisgekühltem Diethylether resuspendiert. Dabei fiel das Peptid aus. Zur Verbesserung der Fällung wurde der Ansatz 20 min ins Eiskühlfach gestellt. Daraufhin wurde die Suspension zentrifugiert und die überstehende Lösung dekantiert. Das verbleibende Pellet wurde im Ultraschallbad noch zweimal mit eisgekühltem Ether (je 2 ml) ausgewaschen, zentrifugiert und die überstehende Lösung dekantiert.

Anschließend wurde das Peptid in Wasser (bei Löslichkeitsproblemen: Zugabe von Acetonitril oder Dioxan) aufgenommen, eingefroren und lyophilisiert.

8.3.2 7-Amino-4-methyl-3-coumarinessigsäure (AMCA)-gelabelte Peptide.

8.3.2.1 N-Fmoc-7-amino-4-methyl-3-coumarinessigsäure (75).

7-Amino-4-methyl-3-coumarinylelessigsäure (AMCA) (0,5 g, 2,15 mmol, 1 eq.) wurde in 12 ml H₂O suspendiert. Es wurden nachfolgend NaHCO₃ (180 mg, 2,15 mmol, 1 eq.) und 12 ml Aceton zugegeben. Die Lösung wurde klar. Der Ansatz wurde gekühlt und Fmoc-Cl (530 mg, 2,05 mmol, 0,9 eq.) wurden portionsweise zugegeben. Es wurde über Nacht gerührt. Das Aceton wurde im Vakuum entfernt. Die verbleibende wässrige Phase wurde gegen Ethylacetat ausgeschüttet. Die organische Phase wurde getrocknet und im Vakuum eingengt.

Ausbeute: 930 mg (95 %).

ESI-MS: berechnet [M = C₂₇H₂₁NO₆], 455,46 Da; gefunden (M+H⁺), *m/z* 456,46 Da.

$^1\text{H-NMR}$: (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): $\delta = 2,33$ (s, 3 H, CH_3), 3,51 (m, 2 H, CH_2), 4,34 (m, 1 H, Fmoc CH), 4,52 (m, 2 H, Fmoc CH_2), 7,33- 7,44 (m, 4 H, Fmoc arom. CH), 7,56 (s, 1 H, AMCA arom. CH), 7,62 (m, 2 H, AMCA arom. CH), 7,78- 7,85 (m, 4 H, Fmoc arom. CH), 10,19 (s, 1 H, CONH) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$: (75 MHz $\text{DMSO-}d_6$): $\delta = 15,16$ (AMCA CH_3), 33,28 (AMCA CH_2), 46,80 (Fmoc CH), 66,21 (Fmoc CH_2), 106,58 (AMCA arom. CH) 116,17 (AMCA arom. CH), 117,68 (AMCA arom. quat C), 119,93 (Fmoc arom. CH), 122,06 (AMCA arom. quat C), 124,85 (Fmoc arom. CH), 127,28 (Fmoc arom. CH), 127,70 (Fmoc arom. CH), 128,30 (AMCA arom. CH), 141,06 (AMCA CNH), 142,36 (Fmoc quat C), 143,90 (Fmoc quat C), 145,47 (AMCA arom. quat CCH_3), 153,53 (Fmoc CO), 161,14 (AMCA arom. CO), 171,81 (AMCA COO) ppm.

8.3.2.2 Immobilisierung von *N*-Fmoc-7-amino-4-methyl-3-coumarinessigsäure (Fmoc-AMCA) an Rink Amid Harz.

(4-(2',4'-Dimethoxyphenyl)-Fmoc-aminomethyl-phenoxyacetamino-norleucylaminomethyl-Harz (1 g, Rink Amid Amresin; Polymermatrix: Copolystyrene – 1% DVB (200-400 mesh); Belegung: 0,7 mmol/g) wurde zweimal mit DMF gewaschen und 10 min mit DCM aufgequollen und jeweils abgesaugt. Im Anschluss wurde die Fmoc-Schutzgruppe mittels zweifacher Zugabe von 20 % Piperidin in DMF (v/v) für jeweils 10 min abgespalten. Das Piperidin und die abgespaltene Fmoc-Schutzgruppe wurden durch fünfmaliges Waschen mit DMF entfernt.

Fmoc-AMCA (1,27 g, 2,8 mmol, 4 eq.) sowie HOBt (379 mg, 2,8 mmol, 4 eq.) wurden in 5 ml DMF gelöst. Dazu wurde das Aktivierungsreagenzes DIC (448 μl , 2,8 mmol, 4 eq.) hinzupipettiert. Diese Lösung wurde auf das entschützte Harz gegeben und für drei Stunden geschüttelt. Danach wurde abgesaugt und das Harz mehrmals mit DMF und DCM gewaschen. Zur Prüfung auf Vollständigkeit der Reaktion wurde ein Kaiser-Test gemacht. War dieser positiv, wurde die Kupplung wiederholt.

8.3.2.3 Fmoc-SPPS an *N*-Fmoc-AMCA belegten Rink Amid Harz.^[87]

Das vollständig mit Fmoc-AMCA belegte Rink Amid Harz (1 eq. 1 g; B = 0,7 mmol/g) wurde wie oben bereits beschrieben Fmoc entschützt. 4 Äquivalente der zu kuppelnden Aminosäure (2,8 mmol) werden mit 8 eq. Collidin (5,6 mmol) und mit 4 eq. HATU (2,8 mmol) in DMF gelöst und auf das Harz gegeben. Die Reaktion schüttelte über Nacht. Anhand UV-spektrometrischer Bestimmung der Fmoc-Funktion wurde die Vollständigkeit der Reaktion

geprüft. Die Synthese der weiteren Aminosäuresequenz erfolgte nach dem Standardkupplungsprotokoll (siehe 8.3.1).

Ac-TSAVLQ-AMCA (73):

Ausbeute: 374 mg (61 %)

HR-ESI-MS: berechnet [$M = C_{40}H_{59}N_9O_{13}$], 873,42323 Da; gefunden ($M+H^+$), m/z 874,4160Da.

Ac-DEVDA-AMCA (131):

Ausbeute: 379 mg (74 %)

HR-ESI-MS: berechnet [$M = C_{32}H_{40}N_6O_{14}$], 732,26025 Da; gefunden ($M+H^+$), m/z 733,26038 Da.

8.3.3 Peptidaldehydinhhibitoren.

8.3.3.1 Reduktion von Fmoc-Aminosäure zu Fmoc-Aminoalkohol.

Die jeweilige Fmoc-Aminosäure (25 mmol, 1 eq.) wurde unter Rühren in 50 ml wasserfreiem Dimethoxyethan (DME) gelöst. Die Lösung wurde unter Stickstoff gesetzt und mit einer Eis/Kochsalzmischung auf $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$ gekühlt. Es wurden nacheinander 4-Methylmorpholin (NMM) (2,78 ml, 25 mmol, 1eq.) und Isobutylchlorformiat (ICF) (3,40 ml, 25 mmol, 1 eq.) tropfenweise zugegeben. Es wurde die Bildung eines farblosen Niederschlages von NMM-Hydrochlorid beobachtet. Der Ansatz wurde durch Entfernen des Kältebads auf RT erwärmt.

Anschließend wurde das ausgefallene NMM-Hydrochlorid vorsichtig in einen vorher mit Stickstoff gespültem Kolben abfiltriert. Das erhaltene Filtrat wurde ebenfalls unter Stickstoff gesetzt und zusätzlich mittels einer Eis-Kochsalzmischung auf $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$ gekühlt. Daneben wurden in 12,5 ml entgastem dest. Wasser NaBH_4 (1,42 g, 37,5 mmol, 1,5 eq.) gelöst. Die entstehende Lösung oder Suspension wurde sofort und auf einmal unter Stickstoff-Gegenstrom zu der gekühlten Lösung des Anhydrids gegeben. Die Lösung wurde für 30 sec – 1 min gerührt. Anschließend wurden 625 ml dest. Wassers unter Rühren zugegeben. Es entstand dabei ein farbloser Niederschlag des gewünschten Fmoc-Aminoalkohols. Dieser wurde abfiltriert und mit Wasser und Hexan gewaschen.

Die Reinigung der Fmoc-Aminosäure erfolgte über eine Kieselgelfiltration. Hierbei wurde die Fmoc-Aminosäure in AcOEt:DCM (1:1, 0,3 % NEt_3) gelöst und über eine mit diesem Lösungsmittelgemisch aufgeschlämmte Kieselgelphase filtriert. Im Anschluss wurde das

Eluat im Scheidetrichter mit 8 %iger Citronensäure ausgeschüttelt. Die organische Phase wurde gesammelt, über Na₂SO₄ getrocknet, filtriert und am Rotationsverdampfer zur Trockne eingengt.

Fmoc-(Trt)Gln-ol (161):

Ausbeute: 11,2 g (85 %)

ESI-MS: berechnet [M = C₄₀H₃₈N₂O₃], 596,76 Da; gefunden (M+H⁺), *m/z* 597,76 Da.

¹H-NMR: (300 MHz): δ = 1,79 [m, 4 H, CH₂], 2,0 [br, 1 H, OH], 2,18 (t, 3 H, CH₂), 3,63 (br m, 2 H, CH₂-OH), 3,67 (m, 1 H, CHNH), 4,46 (t, 1 H, Fmoc CH), 4,70 (m, 2 H, Fmoc CH₂), 7,06 (d, 2 H, Trt arom. CH), 7,07 (d, 2 H, Trt arom. CH), 7,14 (d, 2 H, Trt arom. CH), 7,26 (d, 2 H, Fmoc arom. CH), 7,58 (d, 2 H, Fmoc arom. CH), 7,76 (d, 2 H, Fmoc arom. CH), 8,0 (br, 1 H, NH) ppm.

¹³C-NMR: (75 MHz): δ = 27,1 (CH₂CH), 32,0 (CH₂CO), 47,0 (Fmoc CH), 51,7 (CHNH), 65,4 (CH₂OH), 67,4 (Fmoc CH₂), 72,7 (Trt CNH), 126,3 (Trt arom. CH), 126,4 (Fmoc arom. CH), 128,4 (Fmoc arom. CH), 129,3 (Trt arom. CH), 141,0, 142,8 (Fmoc arom. quat C), 145,0 (Trt arom. quat C), 157,0 (Fmoc CO), 173,0 (Gln CO) ppm.

Fmoc-Phe-ol (162):

Ausbeute: 9,8 g (89 %)

ESI-MS: berechnet [M = C₄₀H₃₈N₂O₃], 373,44 Da; gefunden (M+H⁺), *m/z* 374,32 Da.

¹H-NMR: (300 MHz): δ = 2,62 (br, CH₂-OH), 3,04 (m CH₂), 3,44 (m CH₂-OH), 3,56 (m NHCH), 4,16 (t, Fmoc arom. CH, *J* = 0,2 Hz), 4,39 (d, Fmoc CH₂, *J* = 1,8 Hz), 5,75 (br, NHCO), 7,01 (m, Phe arom. CH), 7,05 (m, Fmoc arom. CH), 7,19 (t, Fmoc arom. CH, *J* = 3,1 Hz), 7,28 (d, Phe arom. CH, *J* = 0,8 Hz), 7,60 (m, Fmoc arom. CH), 7,66 (m, Fmoc arom. CH), 7,72 (Fmoc arom. CH) ppm. ¹³C-NMR: (75 MHz): δ = 37,71 (CH₂CO), 47,20 (Fmoc CH), 53,58 (CHNH), 65,39 (CH₂OH), 67,26 (Fmoc CH₂), 119,93 (Fmoc arom. CH), 124,93 (Fmoc arom. CH), 127,42 (Phe arom. CH), 127,70 (Phe arom. CH), 129,33 (Phe arom. CH), 135,94 (Phe arom. quat C), 141,85 (Fmoc arom. quat C), 143,56 (Fmoc arom. quat C), 157,35 (Fmoc CO) ppm.

8.3.3.2 Oxidation von Fmoc-Aminoalkohol zu Fmoc-Aminoaldehyd.

Der jeweilige Fmoc-Aminoalkohol (5,36 mmol, 1 eq.) wurden in ca. 200 ml trockenem DCM gelöst. Es wurde Dess-Martin-Periodinan (DMP) (4,77 g, 11,3 mmol, 2,1 eq.) zugegeben. Zusätzlich wurden 200 µl Wasser zu gegeben und bei RT gerührt. Nach einer Stunde wurde

weiteres DMP (4,77 g, 11,3 mmol, 2,1 eq.) sowie 200 μ l Wasser zugegeben und über Nacht bei RT gerührt. Dünnschichtchromatographie (DC) am nächsten Morgen zeigte vollständige Umsetzung. Die Reaktionsmischung wurde mit 150 ml Diethylether verdünnt. Man gab vorsichtig soviel einer 80 %-gesättigten Natriumthiosulfat-Pentahydrat-Lösung hinzu bis der Reaktionsansatz klar wurde. Die wässrige Phase wurde abgetrennt und mit 300 ml Diethylether extrahiert. Die vereinigten, organischen Phasen wurden mit je 200 ml gesättigter NaHCO_3 -Lösung (1 x), Wasser (2x) und gesättigter NaCl -Lösung (2x) gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel am Vakuum entfernt.

Fmoc-(Trt)Gln-al (163):

Ausbeute: 2,05 g (85 %)

ESI-MS: berechnet [$\text{M} = \text{C}_{40}\text{H}_{38}\text{N}_2\text{O}_3$], 594,76 Da; gefunden ($\text{M}+\text{H}^+$), m/z 595,76 Da. $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = 15,5^\circ$.

$^1\text{H-NMR}$: (300 MHz): $\delta = 2,12$ [m, 4 H, CH_2], 2,18 (m, 3 H, CH_2), 4,45 (m, 1 H, CHNH), 4,46 (t, 1 H, Fmoc CH), 4,70 (m, 2 H, Fmoc CH_2), 7,06 (m, 10 H, Trt arom. CH), 7,14 (m, 6 H, Trt arom. CH), 7,14 (m, 6 H, Trt arom. CH), 7,28 (d, 2 H, Fmoc arom. CH), 7,58 (d, 2 H, Fmoc arom. CH), 7,84 (d, 2 H, Fmoc arom. CH), 8,0 (br, 1 H, NH), 9,72 (br, CHO) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$: (75 MHz): $\delta = 24,2$ (CH_2CH), 32,0 (CH_2CO), 47,0 (Fmoc CH), 52,7 (CHNH), 67,4 (Fmoc CH_2), 72,7 (Trt CNH), 126,3 (Trt arom. CH), 126,4 (Fmoc arom. CH), 128,4 (Fmoc arom. CH), 129,3 (Trt arom. CH), 141,0, 142,8 (Fmoc arom. quat C), 145,0 (Trt arom. quat C), 157,0 (Fmoc CO), 173,0 (Gln CO), 200,2 (CHO) ppm.

Fmoc-Phe-al (118)

Ausbeute: 1,98 g (83 %)

ESI-MS: berechnet [$\text{M} = \text{C}_{40}\text{H}_{38}\text{N}_2\text{O}_3$], 371,42 Da; gefunden ($\text{M}+\text{H}^+$), m/z 372,41 Da. $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = 51,2^\circ$

$^1\text{H-NMR}$: (300 MHz): $\delta = 3,04$ (m CH_2), 3,56 (m NHCH), 4,16 (t, Fmoc arom. CH , $J = 0,2$ Hz), 4,39 (d, Fmoc CH_2 , $J = 1,8$ Hz), 5,75 (br, NHCO), 7,01 (m, Phe arom. CH), 7,05 (m, Fmoc arom. CH), 7,19 (t, Fmoc arom. CH , $J = 3,1$ Hz), 7,28 (d, Phe arom. CH , $J = 0,8$ Hz), 7,60 (m, Fmoc arom. CH), 7,66 (m, Fmoc arom. CH), 7,72 (Fmoc arom. CH), 9,50 (br, CHO) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$: (75 MHz): $\delta = 37,71$ (CH_2CO), 47,20 (Fmoc CH), 63,65 (CHNH), 67,26 (Fmoc CH_2), 119,93 (Fmoc arom. CH), 124,93 (Fmoc arom. CH), 127,42 (Phe arom. CH), 127,70

(Phe arom. CH), 129,33 (Phe arom. CH), 135,94 (Phe arom. quat C), 141,85 (Fmoc arom. quat C), 143,56 (Fmoc arom. quat C), 157,35 (Fmoc CO), 200,21 (CHO) ppm.

8.3.3.3 Synthese der Peptidaldehydinhhibitoren an der Festphase.

Die Synthese des Peptidaldehyds erfolgte an der Festphase. Hierzu wurde ein mit ungeschütztem Threonin beladenes NovaSyn[®] TG Harz der Firma Merckbiosciences Novabiochem (Läufelfingen, Schweiz) (1eq.) in DCM vorgequollen. Nachdem das Harz trocken gesaugt wurde, wurden 5 eq. des jeweiligen Fmoc-Aminoaldehyds in einer Lösung aus MeOH/DCM/DMF/AcOH (30:3:2:0,35) gelöst und auf das Harz gegeben. Die Reaktion erfolgte bei RT über Nacht. Am nächsten Morgen wurde das Harz zunächst dreimal mit DMF und anschließend dreimal mit DCM gewaschen. Es wurden dann 10 eq. Boc₂O und 10 eq. DIPEA zu dem Harz gegeben und 4 h bei 60 °C geschüttelt. Im Anschluss wurde das Harz wie obig beschrieben gewaschen und die gewünschte Aminosäuresequenz wie unter 8.3.1 beschrieben gekuppelt.

Die Abspaltung der Seitenkettenschutzgruppen erfolgte in 95:2,5:2,5 TFA/DCM/TIS für eine Stunde. Anschließend wurde das Harz dreimal für 20 min mit DCM/MeOH/AcOH/H₂O (12:5:2:1) behandelt und abfiltriert. Die vereinigten Filtrate wurden im Vakuum eingengt. Die Trockne wurde in Wasser resuspendiert und lyophilisiert.

Ac-DSFDQ-H (72)

Ausbeute: 111 mg (69 %)

HR-ESI-MS: berechnet [M = C₂₇H₃₆N₆O₁₂], 636,23184 Da; gefunden (M-H⁺), *m/z* 635,2356, dehydriertes Produkt ESI-MS: (MH⁺-H₂O), *m/z* 618,2 Da.

Ac-TVSFNF-H (108)

Ausbeute: 68 mg (40 %)

HR-ESI-MS: berechnet [M = C₃₆H₄₉N₇O₁₀], 739,8236 Da; gefunden (M+H⁺), *m/z* 740,8234 Da.

8.3.4 Reduktive Aminierung von *N*-Fmoc-Aminoaldehyden auf freie *N*-Termini von Peptidbausteinen am Harz.

Das vollständig mit einer Fmoc-Aminosäuresequenz belegte 2-Chlortriphenylmethylchloridharz (1 eq. 1 g; B = 0,7 bis 1,4 mmol/g) wurde wie oben bereits beschrieben Fmoc entschützt. 4 Äquivalente des zu kuppelnden Fmoc-Aminoaldehydes

wurden in trockenem DMF / 1 % AcOH gelöst und auf das Harz gegeben. Nach 15 min. wurden 10,5 eq. NaCNBH₃ ebenfalls in trockenem DMF / 1 % AcOH gelöst zu dem Ansatz gegeben und für 3 h bei Raumtemperatur geschüttelt. Anhand UV-spektrometrischer Bestimmung der Fmoc-Schutzgruppe wurde die Vollständigkeit der Reaktion geprüft.

***N*-Glyoxylyl-Phe-ψ(CH₂-NH)-Phe-Glu-Ala-Nle-OH (109)**

Ausbeute: 72 mg (40 %)

HR-ESI-MS: berechnet [M = C₃₄H₄₅N₅O₉], 667,3317 Da; gefunden (M+H⁺), *m/z* 668,3311

Da.

8.3.5 3-(Acetylamino)-*N*-(3-formylphenyl)-benzamid (90).

3-Acetylamino-*benzoesäure* (197 mg, 1,1 mmol, 1 eq.) und EDC (170 mg, 1,1 mmol, 1 eq.) wurden in DCM (6 ml) suspendiert und für 10 min gerührt. Anschließend wurde der 3-Aminobenzylalkohol (135 mg, 1,1 mmol, 1eq.) zugegeben und über Nacht gerührt. Es wurde mit 30 ml AcOEt verdünnt und die organische Phase dreimal mit 25 ml 0,1 N HCl und dreimal mit 25 ml gesättigter Na₂CO₃ Lösung gewaschen. Die organische Phase wurde über MgSO₄ getrocknet und im Vakuum bis zur Trockne eingengt. Man erhielt 3-Acetylamino-*N*-[3-(2-hydroxymethyl)phenyl]-benzamid (0,17 mmol, 48 mg). Dieses Benzamid wurde mit Dess-Martin-Periodinan (0,9 mmol, 382 mg, 5 eq.) in 5 ml DCM suspendiert, gefolgt von der Zugabe von 500 µl Wasser. Die Suspension wurde unter DC-Kontrolle bis zur vollständigen Oxidation gerührt. Die Aufarbeitung erfolgte mittels der Zugabe von 30 ml AcOEt. Die organische Phase wurde jeweils zweimal mit gesättigter NaHCO₃-Lösung, Wasser und gesättigter NaCl-Lösung gewaschen anschließend über MgSO₄ getrocknet und eingengt.

Ausbeute: 24,8 mg (52 %).

ESI/MS: berechnet [M = C₁₆H₁₄N₂O₃], 282,1 Da; gefunden (M+H⁺), *m/z* 283,0 Da.

¹H-NMR: (300 MHz): δ = 2,85 (s, 3 H, CH₃), 7,42- 7,48 (dd, 1 H, arom. CH, *J* = 8,0 Hz, *J*' = 8,0 Hz), 7,56- 7,67 (m, 3 H, arom. CH), 7,80- 7,83 (d, 1 H, arom. CH, *J* = 8,1 Hz), 8,03- 8,06 (d, 1 H, arom. CH, *J* = 8,1 Hz), 8,10 (s, 1 H, arom. CH), 8,36 (s, 1 H, arom. CH), 10,00 (s, 1 H, NH), 10,13 (s, 1 H, NH), 10,50 (s, 1 H, CH), ppm.

¹³C-NMR: (75 MHz): δ = 23,95 (CH₃), 118,51; 120,08; 121,94; 122,14; 125,34; 126,02; 128,73; 129,53; 135,24; 136,66; 139,49; 139,94; 16,83 (CONH₂), 168,52 (CONH₂), 193,01 (CHO).

8.3.6 3-(Acetylamino)-*N*-[3-(2-oxoethyl)-phenyl]-benzamid (91).

3-Acetylamino-*benzoesäure* (197 mg, 1,1 mmol, 1eq.) und EDC (170 mg, 1,1 mmol, 1eq.) wurden in DCM (6 ml) suspendiert und für 10 min gerührt. Anschließend wurde der 2-(3-Aminophenyl)-ethanol (151 mg, 1,1 mmol, 1eq.) zugegeben und über Nacht gerührt. Es wurde mit 30 ml AcOEt verdünnt und die organische Phase dreimal mit 25 ml 0,1 N HCl und dreimal mit 25 ml gesättigter Na₂CO₃ Lösung gewaschen. Die organische Phase wurde über MgSO₄ getrocknet und im Vakuum bis zur Trockne eingengt. Man erhielt 3-Acetylamino-*N*-[3-(2-hydroxyethyl)phenyl]-benzamid (0,16 mmol, 48 mg). Dieses Benzamid wurde mit Dess-Martin-Periodinan (0,8 mmol, 339 mg, 5 eq.) in 5 ml DCM suspendiert, gefolgt von der Zugabe von 500 µl Wasser. Die Suspension wurde unter DC-Kontrolle bis zur vollständigen Oxidation gerührt. Die Aufarbeitung erfolgte mittels der Zugabe von 30 ml AcOEt. Die organische Phase wurde jeweils zweimal mit gesättigter NaHCO₃-Lösung, Wasser und gesättigter NaCl-Lösung gewaschen anschließend über MgSO₄ getrocknet und eingengt.

Ausbeute: 8,9 mg (19 %).

ESI-MS: berechnet [M = C₁₇H₁₆N₂O₃], 296.1 Da; gefunden (M+H⁺), *m/z* 297.0 Da.

¹H-NMR: (300 MHz): δ = 2,07 (s, CH₃), 3,74 (s, CH₂), 6,96-6,99 (d, arom. CH, *J* = 7,2 Hz), 7,29- 7,32 (dd, arom. CH, *J* = 2,7 Hz, *J'* = 2,7 Hz), 7,40- 7,45 (dd, arom. CH, *J* = 7,8 Hz, *J'* = 7,8 Hz), 7,58- 7,61 (d, arom. CH, *J* = 7,5 Hz), 7,65-7,67 (m, arom. CH), 7,79-7,81 (d, arom. CH, *J* = 7,5 Hz), 8,05 (s, arom. CH), 9,69; 10,11; 10,16; 10,23 ppm.

¹³C-NMR: (75 MHz): δ = 23,95 (CH₃), 49,66 (CH₂), 118,48; 118,91; 121,43; 121,87; 125,02; 128,64; 128,94; 133,10; 135,61; 139,41; 165,55 (CONH₂), 168,48 (CONH₂), 200,27 (CHO) ppm.

8.3.7 3-(Acetylamino)-*N*-[3-(2-oxoacetyl)-phenyl]-benzamid (92).

N-Fmoc-3-Aminobenzoesäure (2,01 g, 5,6 mmol, 7 eq.) wurde mit BTFFH (1,77 g, 5,6 mmol, 7 eq.) und DIPEA (1,95 ml, 11,2 mmol, 14 eq.) in 8,5 ml trockenem DMF gelöst und auf 700 mg 2-Phosphoranylidenessigsäure-Harz (0,8 mmol, 1 eq.) gegeben und 24 h geschüttelt. Anschließend wurde das Harz mit DMF und DCM gewaschen und im Vakuum getrocknet. Die Beladung wurde mittels Fmoc-Abspaltung mit 1,37 mmol/g bestimmt. Der freie N-Terminus wurde mit 3-Acetylamino-*benzoesäure* acyliert. Hierzu wurde die 3-Acetylamino-*benzoesäure* (1 g, 5,6 mmol, 7 eq.), BTFFH (1,77 g, 5,6 mmol, 7 eq.) und DIPEA (1,95 ml, 11,2 mmol, 14 eq.) in 6 ml trockenem DMF gelöst und für 6 h auf das Fmoc-entschützte Harz gegeben. Nachdem das Harz mit DMF und DCM gewaschen worden

war, wurde das Harz 18 h mit 6 ml TFA:DCM (95:5) geschüttelt, um die *tert*-Butylgruppe zu entfernen. Nach fünfmaligem Waschen mit DCM und Neutralisierung mit DIPEA:DCM (1:9, v/v) (3 x 5 min), gefolgt von nochmaligem Waschen mit DCM, wurde die Verbindung vom Harz abgespalten. Man suspendierte 350 mg der Harzkügelchen in einem Minimum an DCM und gab 5 eq. DMDO (507,5 mg, 6,6 mmol) hinzu und schüttelte den Ansatz für 1 h bei 0 °C. Das Filtrat wurde im Vakuum eingeengt und in H₂O:AcCN (1:1, v/v) wieder gelöst, eingefroren und lyophilisiert. Als Rohprodukt erhielt man einen gelben Feststoff. Dieser wurde mittels präparativer HPLC aufgereinigt und mittels LC/MS und NMR charakterisiert.

Ausbeute: 80,3 mg (80 %).

ESI/MS: berechnet [M = C₁₇H₁₄N₂O₆], 310,3 Da; gefunden (M+H⁺), *m/z* 311,2 Da.

¹H-NMR: (300 MHz): δ = 2,20 (s, 3 H, CH₃), 7,42- 7,48 (dd, 1 H, arom. CH, *J* = 8,0 Hz, *J'* = 8,0 Hz), 7,56- 7,67 (m, 3 H, arom. CH), 7,80- 7,83 (d, 1 H, arom. CH, *J* = 8,1 Hz), 8,03- 8,06 (d, 1 H, arom. CH, *J* = 8,1 Hz), 8,10 (s, 1 H, arom. CH), 8,36 (s, 1 H, arom. CH), 9,04 (s, 2 H, NH), 9,64 (s, 1 H, CH), ppm.

¹³C-NMR: (75 MHz): δ = 23,49 (OCH₃), 117,08; 120,35; 120,38; 124,36; 125,40; 125,44; 128,41; 130,16; 133,81; 134,71; 137,68; 138,85; 164,10 (CO), 168,29 (NHCO), 189,89 (CHO), 190,86 (CHOCO) ppm.

8.3.8 3-Acetamido-*N*-[3-(2-oxo-acetyl)-phenyl]-benzamid (93).

N-Fmoc-3-Aminophenyllessigsäure (2,27 g, 5,6 mmol, 7 eq.), BTFFH (1,77 g, 5,6 mmol, 7 eq.) und DIPEA (1,95 ml, 11,2 mmol, 14 eq.) wurden in 8,5 ml trockenem DMF gelöst und auf 700 mg 2-Phosphoranylidenessigsäure-Harz (0,8 mmol, 1 eq.) gegeben und 24 h geschüttelt. Anschließend wurde das Harz mit DMF und DCM gewaschen und im Vakuum getrocknet. Die Beladung wurde mittels Fmoc-Abspaltung mit 1,37 mmol/g bestimmt. Der freie N-Terminus wurde mit 3-Acetylaminobenzoessäure acyliert. Hierzu wurde die 3-Acetylaminobenzoessäure (1 g, 5,6 mmol, 7 eq.), BTFFH (1,77 g, 5,6 mmol, 7 eq.) und DIPEA (1,95 ml, 11,2 mmol, 14 eq.) in 6 ml trockenem DMF gelöst und für 6 h auf das Fmoc-entschützte Harz gegeben. Nachdem das Harz mit DMF und DCM gewaschen worden war, wurde das Harz 18 h mit 6 ml TFA:DCM (95:5) geschüttelt, um die *tert*-Butylgruppe zu entfernen. Nach fünfmaligen Waschen mit DCM und Neutralisierung mit DIPEA:DCM (1:9, v/v) (3 x 5 min), gefolgt von nochmaligem Waschen mit DCM, wurde die Verbindung vom Harz abgespalten. Man suspendierte 350 mg der Harzkügelchen in einem Minimum an DCM und gab 5 eq. DMDO (507,5 mg, 6,6 mmol) hinzu und schüttelte den Ansatz für 1 h bei 0 °C.

Das Filtrat wurde im Vakuum eingengt und in H₂O:AcCN (1:1, v/v) wieder gelöst, eingefroren und lyophilisiert. Man erhielt als Rohprodukt einen gelben Feststoff. Dieser wurde mittels präparativer HPLC aufgereinigt und mittels LC/MS und NMR charakterisiert.

Ausbeute: 96 mg (75 %).

ESI-MS: berechnet [M = C₁₈H₁₆N₂O₆], 324,3 Da; gefunden (M+H⁺), *m/z* 325,4 Da.

¹H-NMR: (300 MHz): δ = 2,17 (s, CH₃), 3,74 (s, CH₂), 6,96-6,99 (d, arom. CH, *J* = 7,2 Hz), 7,29- 7,32 (dd, arom. CH, *J* = 2,7 Hz, *J'* = 2,7 Hz), 7,40- 7,45 (dd, arom. CH, *J* = 7,8 Hz, *J'* = 7,8 Hz), 7,58- 7,61 (d, arom. CH, *J* = 7,5 Hz), 7,65-7,67 (m, arom. CH), 7,79-7,81 (d, arom. CH, *J* = 7,5 Hz), 8,05 (s, arom. CH), 9,69; 10,11; 10,16; 10,23 ppm.

¹³C-NMR: (75 MHz): δ = 23,49 (OCH₃), 48,61 (CH₂), 117,08; 120,35; 120,38; 124,36; 125,40; 125,44; 128,41; 130,16; 133,81; 134,71; 137,68; 138,85; 164,10 (CO), 168,29 (NHCO), 189,89 (CHO), 190,86 (CHOCO) ppm.

8.3.9 1-(4-Amino-furazan-3-yl)-5-methyl-1H-[1,2,3]triazol-4-carbonsäureethylester (95).

3-Amino-4-azidofurazan (100 mg, 0,8 mmol, 1eq.) und Acetessigsäureethylester (100,4 µl, 0,8 mmol, 1 eq.) wurden in Wasser bei Anwesenheit 1 eq. des Katalysators Triethylamin (Et₃N) (110,5 µl, 0,8 mmol) gelöst und gerührt bis das Produkt ausfällt. Dieses wurde abfiltriert und getrocknet. Schmelzpunkt: 86,5 – 87,5 °C wie in der Literatur beschrieben.^[88]

3,4-Diaminofurazan (1 g, 10 mmol, 1 eq.) wurde in der kleinst möglichen Menge konz. Schwefelsäure (H₂SO₄) gelöst. Dazu wurden 10 ml einer 1 N NaNO₂ konz. H₂SO₄ Lösung zugegeben. Bei 5 °C der Mischung wurde das gleiche Volumen an Eisessig zugegeben. Anschließend wurden tropfenweise 1,5 eq. NaN₃ (975 mg, 15 mmol) zugegeben, die vorher in 20 ml Wasser gelöst worden waren. Es wurde für weitere 30 min auf Eis gerührt.

Das entstandene 3-Amino-4-azidofurazan wurde mit Ether aus der wässrigen Phase extrahiert. Der Ether wurde in Vakuum einrotiert und der Rest wurde aus Tetrachlorkohlenstoff (CCl₄) umkristallisiert.

Ausbeute: 120 mg (92 %)

ESI-MS: berechnet. [M = C₈H₁₀N₆O₃], 238,2 Da; gefunden (M+H⁺), *m/z* 239,2 Da.

Schmelzpunkt: 138 °C wie in der Literatur beschrieben.^[89]

8.3.10 1-(4-{2-[3-(3-Acetylamino-benzoylamino)-phenyl]-2-oxo-ethylamino}-furazan-3-yl)-5-methyl-1H-[1,2,3]triazol-4-carbonsäureethylester (98).

Der α -Ketoaldehyd 3-(Acetylamino)-*N*-[3-(2-oxoacetyl)-phenyl]-benzamid (**92**) (13 mg, 38,9 μ mol, 1 eq.) wurde mit 1-(4-amino-furazan-3-yl)-5-methyl-1H-[1,2,3]triazole-4-carbonsäureethylester (**95**) (9,3 mg, 38,9 μ mol, 1 eq.) in trockenem DMF/MeOH (1:1, v/v) mit 1% AcOH über Molsieb für 3 h gerührt. Es folgte die Zugabe von 5 eq. Trichlorsilan (Cl_3SiH) (15 μ l, 195 μ mol). Es wurde für eine weitere Stunde gerührt. Das Molsieb wurde abfiltriert und das Filtrat im Vakuum eingengt. Das Rohprodukt wurde mittels präparativer HPLC aufgereinigt.

Ausbeute: 6 mg (29 %)

ESI/MS: berechnet [$\text{M} = \text{C}_{25}\text{H}_{24}\text{N}_8\text{O}_6$], 532,5 Da; gefunden ($\text{M}+\text{H}^+$), m/z 533,5 Da.

$^1\text{H-NMR}$: (300 MHz): $\delta = 1,48$ (t, CH_2CH_3 $J = 5,8$ Hz), 2,20 (s, COCH_3), 2,72 (s, CH_3), 3,74 (s, CH_2), 4,56 (q, CH_2 , $J = 7,1$ Hz), 6,96-6,99 (d, arom. CH , $J = 7,2$ Hz), 7,29- 7,32 (dd, arom. CH , $J = 2,7$ Hz, $J' = 2,7$ Hz), 7,40- 7,45 (dd, arom. CH , $J = 7,8$ Hz, $J' = 7,8$ Hz), 7,46 (s, 3H, NH), 7,58- 7,61 (d, arom. CH , $J = 7,5$ Hz), 7,65-7,67 (m, arom. CH), 7,79-7,81 (d, arom. CH , $J = 7,5$ Hz), 8,05 (s, arom. CH) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$: (75 MHz): $\delta = 7,99$ (arom. CH_3), 13,87 (CH_3), 23,49 (COCH_3), 60,72 (OCH_2), 117,10, 120,98, 124,36, 125,40, 127,12, 129,48, 130,16, 134,67, 134,71, 138,85, 141,53, 144,23, 162,93 (COO), 164,10 (CONH), 168,29 (COCH_3), 168,47 (NHCOCH_2) ppm.

8.3.11 Bis-(9H-floren-9-ylmethoxycarbonylamino)-essigsäure (116).

9H-Fluorenylmethylcarbammat (1 g, 4,18 mmol, 2 eq.), Glyoxalsäuremonohydrat (192 mg, 2,09 mmol, 1 eq.) und *para*-Toluolsulfonsäure (PTSA) (3,8 mg, 20 μ mol) wurden in 200 ml Toluol gelöst und für 2 h unter Rückfluss gerührt. Die Reaktionslösung wurde auf RT abgekühlt. Der Niederschlag wurde abfiltriert, mit Toluol gewaschen und im Vakuum getrocknet.

Ausbeute: 1,06 g (95 %)

ESI/MS: berechnet [$\text{M} = \text{C}_{32}\text{H}_{26}\text{N}_2\text{O}_6$], 534,5 Da; gefunden ($\text{M}+\text{H}^+$), m/z 535,5 Da.

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, DMF-*d*7) δ in ppm 4,17 (m, 6H, CH_2), 5,59 (t, 1H, $J = 7,8$ Hz, CH-COOH), 7,19 (t, 4H, $J = 7,2$ Hz, arom. CH), 7,29 (t, 4H, $J = 7,2$ Hz, arom. CH), 7,65 (d, 4H, $J = 7,2$ Hz, arom. CH), 7,79 (d, 4H, $J = 7,2$ Hz, arom. CH), 8,13 (d, 2H, $J = 8,1$ Hz, NH) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, DMF-*d*7) δ 47,6 (CH_2), 60,8 (CH-COOH), 67,3 (CH), 120,7 (CH), 126,1 (CH), 127,8 (CH), 128,4 (CH), 141,8 (C), 144,8 (C), 156,5 (CO), 170,6 (CO) ppm.

8.3.12 (2,4-Dibrom-6-methyl-phenylamino)-essigsäure (126).

2,4-Dibrom-6-methylanilin (2g, 7,6 mmol, 1 eq.) wurden mit Et_3N (770 mg, 7,6 mmol, 1eq.) und DMAP (928 mg, 7,6 mmol, 1 eq.) in Ethanol gelöst und unter Reflux gerührt. Es folgte die Zugabe von 1,2 eq. Bromessigsäureethylester (838 μl , 9,12 mmol). Der Ansatz wurde unter DC-Kontrolle bis zur Vollständigkeit gerührt. Die Aufarbeitung erfolgte in zwei Schritten. Zuerst wurde der Ansatz mit 2 M HCl verdünnt und gegen Ethylacetat ausgeschüttelt. Die organische Phase wurde über MgSO_4 getrocknet und im Vakuum eingeeengt. Anschließend wurde das eingedampfte Rohprodukt in 10 M LiOH Lösung gelöst, um den Ester zu verseifen. Nach vollständiger Verseifung wurde der Ansatz mit 10 M HCl angesäuert und gegen Ethylacetat ausgeschüttelt. Die organische Phase wurde über MgSO_4 getrocknet und im Vakuum eingeeengt.

Ausbeute: 1,27 g (52 %)

ESI/MS: berechnet [$\text{M} = \text{C}_9\text{H}_9\text{Br}_2\text{NO}_2$], 322,9 Da; gefunden (M-H^+), m/z 321,8 Da.

$^1\text{H-NMR}$: (300 MHz): $\delta = 2,32$ (s, CH_3 3H), 3,71 (br, NHCO 1H), 4,41 (s, CH_2 2H), 6,98 (s, arom. CH 1H), 7,33 (s, arom. CH 1H) 8,94 (br, COOH 1H) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$: (75 MHz): $\delta = 20,57$ (arom. CH_3), 45,6 (CH_2), 109,3 (arom. C-Br), 113,6 (arom. C-Br), 131,78 (arom. C- CH_3), 132,70 (arom. C), 137,78 (arom. C), 142,15 (arom. C-NH), 170,53 (COOH) ppm.

8.3.13 *N*-((*S*)-1-Benzyl-2-oxo-ethyl)-2-(2,4-dibrom-6-methyl-phenylamino)-acetamid (127).

2-(4-Ethoxy-phenyl)-2*H*-benzotriazol-5-ylamin (**113**) (50 mg, 0,19 mmol, 1 eq.) und *N*-Boc-Phenylalaninals (74 mg, 0,30 mmol, 1,5 eq.) wurden in 0,5 ml trockenem DMF / 1 % AcOH über Molsieb (3 Å) gelöst und über Nacht bei Raumtemperatur unter Stickstoff gerührt. Es folgte die Zugabe von NaCNBH_3 (60 mg, 0,95 mmol, 5 eq.). Das Molsieb wurde abfiltriert und das DMF im Vakuum eingeeengt. Anschließend wurde das Molekül mit TFA:Wasser (1:1 v/v) Boc-entschützt. Das Rohprodukt wurde mittels präparativer HPLC aufgereinigt.

Ausbeute: 46 mg (62 %)

ESI/MS: berechnet [$M = C_{23}H_{25}N_5O$], 387,4 Da; gefunden ($M+H^+$), m/z 388,4 Da.

1H -NMR: (300 MHz): $\delta = 1,33$ (t, CH_2CH_3 $J = 2,8$ Hz 3H), 2,51 (m, CH_2 2H), 3,01 (m, CH_2 2H), 3,57 (br, $NHCO$, 1H), 3,71 (m. CH 1H), 3,96 (q, CH_2CH_3 , $J = 2,1$ Hz), 5,36 (br, NH_2 , 2H), 6,22 (s, arom. CH 1H), 6,81 (m, arom. CH , 3H), 6,98 (m, arom. C, 5H), 7,17 (m, arom. CH 3H) ppm.

^{13}C -NMR (75 MHz): $\delta = 14,71$ (CH_2-CH_3), 64,15 (CH_2-CH_3), 93,65 (arom. C-CNH), 116,40; 116,83; 118,11; 124,54; 132,60; 134,89; 142,89; 156,54 (arom. C), 168,03 (CO) ppm.

8.3.14 *N*-{(S)-1-Benzyl-2-[2-(4-ethoxy-phenyl)-2*H*-benzotriazol-5-ylamino]-ethyl}-2-(2,4-dibrom-6-methyl-phenylamino)-acetamid (128).

(2,4-Dibrom-6-methyl-phenylamino)-essigsäure (**126**) (50 mg, 0,16 mmol, 1 eq.) wurde in trockenem DCM unter Zugabe von Thionylchlorid (120 μ l, 1,6 mmol, 10 eq.) unter Stickstoff gelöst. Der Ansatz wurde bei 60 °C für 6 h gerührt. Anschließend wurde der Ansatz im Vakuum eingengt. *N*-((S)-1-Benzyl-2-oxo-ethyl)-2-(2,4-dibrom-6-methyl-phenylamino)-acetamid (**127**) (74 mg, 0,19 mmol, 1,2 eq.) und Pyridin (16 μ l, 0,19 mmol, 1,2 eq.) wurden in trockenem DCM gelöst. Das eingedampfte Rohprodukt wurde ebenfalls in trockenem DCM unter Stickstoff gelöst und langsam zu der *N*-((S)-1-Benzyl-2-oxo-ethyl)-2-(2,4-dibrom-6-methyl-phenylamino)-acetamid (**127**) Lösung zugetropft. Der Ansatz wurde über Nacht bei Raumtemperatur gerührt und im Vakuum eingengt. Das Rohprodukt wurde mittels präparativer HPLC aufgereinigt.

Ausbeute: 79 mg (72 %)

ESI/MS: berechnet [$M = C_{32}H_{32}Br_2N_6O_2$], 692,4 Da; gefunden ($M+H^+$), m/z 693,4 Da.

1H -NMR: (300 MHz): $\delta = 1,33$ (t, CH_2CH_3 $J = 2,8$ Hz 3H), 2,32 (s, CH_3 , 3H), 2,51 (m, CH_2 2H), 3,01 (m, CH_2 2H), 3,57 (br, $NHCO$, 1H), 3,71 (m. CH 1H), 3,96 (q, CH_2CH_3 , $J = 2,1$ Hz 2H), 4,11 (s, $NHCH_2CO$, 2H), 4,97 (br, $NHCH_2$), 5,36 (br, NH_2 , 2H), 6,22 (s, arom. CH 1H), 6,81 (m, arom. CH , 3H), 6,98 (m, arom. CH , 5H), 7,09 (br, $NHCO$, 1H), 7,17 (m. arom. CH 4H), 7,54 (s, arom. CH , 1H) ppm.

^{13}C -NMR (75 MHz): $\delta = 14,71$ (CH_2-CH_3), 20,57 (arom. C- CH_3), 38,06 ($C_\alpha H-CH_2$), 43,29 ($NH-CH_2-CO$), 46,15 ($C_\alpha H$) 50,96 (CH_2-NH), 64,15 (CH_2-CH_3), 92,14 (arom. C-CNH), 110,10; 113,13 (C-Br), 116,83; 118,11; 119,11; 124,54; 127,44; 132,32; 132,60; 134,89; 137,40; 138,29; 140,35; 143,71; 144,49; 156,54 (arom. C), 168,03 (CO) ppm.

8.3.15 Phosphorsäuremono-(4-formyl-phenyl)-ester (152).^[90]

Diethylchlorophosphat (2,73 ml, 16,4 mmol, 1 eq.) wurden tropfenweise zu der 0 °C kalten Lösung des 4-Hydroxybenzaldehydes (2 g, 16,4 mmol, 1 eq.) und Et₃N (2,3 ml, 19,7 mmol, 1,2 eq.) in trockenem DCM zugegeben. Die Reaktion wurde bis RT erwärmt und bis zur Vollständigkeit gerührt (3-6h). Die Reaktionsmischung wurde mit 1 M HCl und gesättigter Na₂CO₃-Lösung gewaschen. Die organische Phase wurde über MgSO₄ getrocknet und im Vakuum eingeeengt.

Ein Mikrowellengefäß wurde mit dem geschützten Phosphatester (300 mg, 1,14 mmol, 1 eq.) befüllt und Trimethylsilylbromid (300 µl, 2,3 mmol, 2 eq.) zugegeben. Dazu wird Acetonitril zum besseren Lösen gegeben. Danach wurde der Ansatz für 10 min bei 60 °C in der Mikrowelle erhitzt. Dies wurde dreimal wiederholt, jedesmal mit der neuen Zugabe von 2 eq. TMSBr. Anschließend wurde MeOH:H₂O (95:5) (v/v) im Überschuss zugegeben und einrotiert bzw. lyophilisiert

Ausbeute: 3,1 g (91 %)

ESI/MS: berechnet [M = C₇H₇O₅P], 202,1 Da; gefunden (M-H⁺), *m/z* 201,1 Da.

¹H-NMR: (300 MHz DMSO-d₆): δ = 2,02 (br, 2H; PO(OH)₂), 6,92 (d, *J* = 2 Hz, 2H; CH), 7,64 (d, *J* = 2 Hz, 2H; CH), 9,87 (br, 1H; CHO) ppm.

¹³C-NMR: (75 MHz DMSO-d₆): δ = 116,4; 129,5; 131,3; 156,1; 191,0 (CHO) ppm.

³¹P-NMR (121 MHz, DMSO-d₆): δ = 22.3 ppm.

8.3.16 5-Amino-2-(2,4-dimethyl-phenyl)-isoindol-1,3-dion (159).

Ein Mikrowellengefäß wurde mit der 3-Aminophtalsäure (200 mg, 1,1 mmol, 1 eq.) befüllt und 2,4-Dimethylanilin (1,36 ml, 11 mmol, 10 eq.) und Triethylamin (1,53 ml, 11 mmol, 10 eq.) zugegeben. Danach wurde der Ansatz für 30 min bei 160 °C in der Mikrowelle erhitzt. Anschließend wurde der Ansatz einrotiert und säulenchromatographisch getrennt (Toluol:Aceton 4:1 v/v).

Ausbeute: 229 mg (78 %)

ESI/MS: berechnet [M = C₁₆H₁₄N₂O₂], 266,3 Da; gefunden (M+H⁺), *m/z* 267,3 Da.

¹H-NMR: (300 MHz): δ = 2,10 (s, CH₃), 2,25 (s, CH₃), 4,60 (br, NH₂), 7,04 (s, arom. CH), 7,25 (m, arom. CH), 7,45 (s, arom. CH), 7,47 (s, arom. CH) ppm.

^{13}C -NMR: (75 MHz): $\delta = 17,75; 20,75$ (arom. CH_3), 115,23; 115,81; 119,28; 121,16; 121,83; 123,37; 126,75; 131,32; 131,55 (arom. C), 143,67 (arom. C-N), 153,26 (arom. C-NH₂), 166,04; 167,06 (CO) ppm.

8.3.17 *N*-[2-(2,4-Dimethyl-phenyl)-1,3-dioxo-2,3-dihydro-1*H*-isoindol-5-yl]-4-trifluormethanesulfonylamino-benzamid (188).

4-Trifluormethansulfonylaminobenzoessäure (**189**) (50 mg, 0,19 mmol, 1 eq.) wurde in trockenem DCM unter Zugabe von Thionylchlorid (140 μl , 1,6 mmol, 10 eq.) unter Stickstoff gelöst. Der Ansatz wurde bei 60 °C für 6 h gerührt. Anschließend wurde der Ansatz im Vakuum eingengt. 5-Amino-2-(2,4-dimethyl-phenyl)-isoindol-1,3-dion (**159**) (61 mg, 0,23 mmol, 1,2 eq.) und Pyridin (19 μl , 0,23 mmol, 1,2 eq.) wurden in trockenem DCM gelöst. Die oben genannte Trockne wurde ebenfalls in trockenem DCM unter Stickstoff gelöst und langsam zu der 5-Amino-2-(2,4-dimethyl-phenyl)-isoindol-1,3-dion (**159**) Lösung zugetropft. Der Ansatz wurde über Nacht bei Raumtemperatur gerührt und im Vakuum eingengt. Das Rohprodukt wurde mittels präparativer HPLC aufgereinigt.

Ausbeute: 41 mg (43 %)

ESI/MS: berechnet [$\text{M} = \text{C}_{24}\text{H}_{18}\text{F}_3\text{N}_3\text{O}_5\text{S}$], 517,5 Da; gefunden ($\text{M}+\text{H}^+$), m/z 518,4 Da.

^1H -NMR: (300 MHz): $\delta = 2,10$ (s, CH_3 , 3H), 2,25 (s, CH_3 , 3H), 7,04 (s, arom. CH 2H), 7,25 (d, arom. CH 1H), 7,68 (br, NHSO_2), 7,83 (m, arom. CH, 4H), 7,89 (s, arom. CH 1H), 7,92 (s, arom. CH 1H), 8,11 (d, arom. CH 1H $J = 3,9$ Hz), 8,34 (s, arom. CH, 1H), 9,55 (br, CONH, 1H) ppm.

^{13}C -NMR: (75 MHz): $\delta = 17,75; 20,75$ (arom. CH_3), 106,21; 110,39; 114,56; 118,73 (CF_3), 115,81; 120,01; 121,16; 121,47; 124,76; 125,30; 126,75; 128,71; 131,55; 131,68; 132,72 (arom. C), 142,25 (arom. C-N), 143,48 (arom. C-NH), 164,39 (NHCO), 166,04; 167,06 (CO) ppm.

8.3.18 4-Trifluormethansulfonylaminobenzoessäure (189).

4-Aminobenzoessäuremethylester (1 g, 6,7 mmol, 1 eq.) und Pyridin (540 μl , 6,7 mmol, 1 eq.) wurden in 150 ml trockenem DCM unter Stickstoff gelöst. Der Ansatz wurde auf 4 °C gekühlt. Nachfolgend wurden tropfenweise Trifluormethansulfansäureanhydrid (5,96 ml, 35 mmol, 5 eq.) zugegeben. Die Mischung wurde auf Raumtemperatur erwärmt und für eine weitere Stunde gerührt. Die organische Phase wird zweimal mit 5 % HCl-Lösung und zweimal mit Wasser gewaschen. Die verbleibende organische Phase wird eingengt und in 50

ml 0,1 M LiOH-Lösung gelöst und über Nacht gerührt. Der Ansatz wird über Ionenaustauscher gewaschen und anschließend lyophilisiert.

Ausbeute: 3,3 g (95 %)

ESI/MS: berechnet [M = C₈H₆F₃NO₄S], 269,2 Da; gefunden (M-H⁺), *m/z* 268,0 Da.

¹H-NMR: (300 MHz): δ = 7,60 (d, arom. CH 2H *J* = 3,2 Hz), 7,68 (br, NHSO₂ 1H), 7,96 (d, arom. CH 2H *J* = 2,6 Hz), 12,41 (br, COOH 1H) ppm.

¹³C-NMR: (75 MHz): δ = 106,21; 110,39; 114,56; 118,73 (CF₃), 121,19; 121,92; 133,74; 144,10 (arom. C), 169,80 (COOH) ppm.

8.3.19 3-Aminophtalsäure (192).

3-Nitrophtalsäure (25 g, 118 mmol, 1 eq.) wurde vorsichtig in 150 ml konz. HCl unter starkem Rühren gelöst. Anschließend wurden portionsweise SnCl₂ (94,5 g, 50 mmol, 2 eq.) zugegeben und bis zur vollständigen Reduktion gerührt. Anschließend wurde der Ansatz über nacht bei 4 °C gelagert. Das ausgefallene Produkt wurde abfiltriert.

Ausbeute: 13,7 g (64 %)

ESI/MS: berechnet [M = C₈H₇NO₄], 181,2 Da; gefunden (M-H⁺), *m/z* 180,0 Da.

¹H-NMR: (300 MHz): δ = 5,5 (br, NH₂), 6,55 (d, H₂N-C-CH-CH, *J* = 3,8 Hz), 6,74 (s, arom. CH), 7,76 (d, H₂N-C-CH-CH, *J* = 3,6 Hz), 9,09 (br, COOH), 10,15 (br, COOH) ppm.

¹³C-NMR: (75 MHz): δ = 115,06; 117,92; 123,20; 130,42; 131,56 (arom. C), 152,68 (arom. CNH₂), 167,95; 170,86 (COOH) ppm.

8.4 Assaybeschreibungen

8.4.1 SARS-CoV M^{pro}

8.4.1.1 AMCA Assay.

Die Aktivität der SARS-CoV M^{pro} konnte bestimmt werden durch die Freisetzung des Fluorophors AMCA. Die Probe wurde mit einer Excitation von 380 nm bestrahlt und im rechten Winkel dazu wurde das emittierte Licht bei 460 nm gemessen. Dabei war die relative Fluoreszenzeinheit (*relative fluorescence unit* RFU bei Emmission 460nm 63,861 RFU/ μM AMCA). Die Sequenz des Fluoreszenzsubstrates war Ac-TSAVLQ↓AMCA (**73**). Final wurden bei 298 K 1 μM SARS-CoV M^{pro}, und verschiedene Konzentrationen an Substrat (0,05 mM – 2,5 mM) in 100 mM MES pH 7,0 in einem Totalvolumen von 20 μl inkubiert und die Zunahme der Fluoreszenz beobachtet. Die *K_M* und *V_{max}* Werte der SARS-CoV M^{pro}

wurden bestimmt, indem man die gemessene Aktivität gegen die verwendete Substratkonzentration doppelreziprok aufgetragen hat (Lineweaver-Burk-Auftragung).

8.4.1.2 HPLC-Assay.

Die gefundenen Inhibitoren wurden in dem HPLC-basierten Assay von Tan et al.^[86] getestet. Die Sequenz des Peptidsubstrates war SWTSAVLQ↓SGFRKWA-NH₂. Bei 298 K wurden 1 μM SARS-CoV M^{pro}, 0,5 mM Peptide in 100 mM MES pH 7,0 und einem Totalvolumen von 20 μl inkubiert. Nach 10, 20, 30, 45 min wurde die Reaktion mit der Zugabe von 80 μl Acetonitril gestoppt und schockgefroren. Die Ansätze wurden zentrifugiert und die Überständen wurden in der HPLC (reverse-phase HPLC, C18 column (3.9 x 150 mm), Gradient 15 min, 5–60 % linear Acetonitril mit 0,1 % TFA) vermessen. Die Absorption wurde bei 280 nm beobachtet und die Integrale der Peaks berechnet.

8.4.2 HIV1-Protease

8.4.2.1 FRET-Assay.

Die Aktivität der HIV-1 Protease wurde mittels eines Fluoreszenzresonanzenergietransfer-(FRET)-Substrates bestimmt. Hierzu wurde das bekannte FRET-Substrat Anthranil-Ala-Arg-Val-Nle-(*p*-NO₂)-Phe-Glu-Ala-Nle-NH₂ von der Firma Sigma Aldrich (Steinheim, Deutschland) gekauft. Als Puffer wurde 50 mM MES, 1 mM EDTA, 0,9 M NaCl, 10 % Glycerol und 0,1 % Triton X-100 pH 6,0 verwendet. Final wurden 25 U HIV-1 Protease und 10 μM des FRET-Substrates zuerst für 10 min bei 298 K in einem Totalvolumen von 20 μl inkubiert. Die Zunahme der Fluorezenz wurde bei einer Excitation von 340 nm und einer Emission von 490 nm gemessen.

8.4.3 Caspase 3

8.4.3.1 Flureszezpolarisationsassay.

Die Fluoreszenzpolarisationsexperimente wurden in 50 mM HEPES pH 7,4, 100 mM NaCl, 0,5 % CHAPS and 1 mM EDTA ausgeführt. Das Adressmolekül, der peptidische α-Ketoaldehyde *N*-5(6)-carboxyfluoresceinyl-DEVD-CHO (**81**) wurde mit einer Konzentration von 10 nM gegen verschiedene Konzentrationen von Caspase 3 (0 nM bis 100 nM) in einem Volumen von 10 μl titriert. Die Excitation war 485 nm und die Emission war 535 nm.

Für die Durchmusterung wurden 20 nM Caspase 3, 4 nM des Adressmolekül *N*-5(6)-carboxyfluoresceinyl-DEVD-CHO (**81**) 1 μM der zu testenden Substanz verwendet. Als Puffer wurde der oben Genannte verwendet.

8.4.3.2 AMCA Assay.

Die Aktivität der Caspase 3 konnte bestimmt werden durch die Freisetzung des Fluorophors AMCA. Die Probe wurde mit einer Excitation von 380 nm bestrahlt und im rechten Winkel dazu wurde das emittierte Licht bei 460 nm gemessen. Dabei war die relative Fluoreszenzeinheit (*relative fluorescence unit* RFU bei Emmission 460nm 176,63 RFU/ μM AMCA). Die Sequenz des Fluoreszenzsubstrates war Ac-DEVD↓AMCA. Final wurden bei 298 K 3 nM Caspase 3, und verschiedene Konzentrationen an Substrat (1 μM – 250 μM) in 50 mM HEPES pH 7,4, 100 mM NaCl, 0,5 % CHAPS and 1 mM EDTA in einem Totalvolumen von 20 μl inkubiert und die Zunahme der Fluoreszenz beobachtet. Die K_M und V_{\max} Werte der Caspase 3 wurden bestimmt, indem man die gemessene Aktivität gegen die verwendete Substratkonzentration doppelreziprok aufgetragen hat (Lineweaver-Burk-Auftragung).

8.4.4 Proteintyrosinphosphatasen (PTP)

8.4.4.1 Nachweis von anorganischem Phosphat mit Malachitgrün.

Zur Bestimmung der Konzentration an anorganischem Phosphat (P_i) wurde der Malachitgrünassay verwendet.^[91]

- a) Puffer: 50 mM Tris-HCl pH 7,5
- b) Substratlösung: 50 mM Tris-HCl pH 7,5 sowie 250 μM Substrat **152**
- c) Enzymlösung: 50 mM Tris-HCl pH 7,5
 - MptpA: 5 $\mu\text{g/ml}$
 - SHP2: 5 $\mu\text{g/ml}$
 - PTP1B: 50 $\mu\text{g/ml}$
 - PTPN7: 10 $\mu\text{g/ml}$
 - PTPRR: 50 $\mu\text{g/ml}$
- d) Farbreagenz: 1,22 g/l Malachitgrün-Oxalat in 2,4 M Schwefelsäure
- e) Farblösung: 1,5 % Ammoniummolybdat und 0,16 % Tween20
- f) Verbindungslösungen: 10 mM in DMSO

Es wurde eine Phosphatstandardreihe in Puffer (unter a) beschrieben) auf jeder Platte aufgenommen. Mit den folgenden Konzentrationen 500, 400 300, 200, 100, 50 und 0 μM P_i . Es wurden je 20 μl dieser Phosphatlösungen eingesetzt.

Für den Assay wurden zunächst 5 μl Puffer, 1 μl der zu testenden Verbindung und 4 μl Enzym vorgelegt. Anschließend wurden 10 μl Substrat (**152**) dazu pipettiert. Die Platten werden im Brutschrank bei 37 °C inkubiert (je nach PTP: MptpA 60min.; PTPN7 60 min.; SHP2 60 min.; PTPRR 60 min.; PTP1B 15 min.).

Nach Ablauf dieser Zeit wurden 50 μl destilliertes Wasser und 20 μl Farblösung zugegeben. Es wurden anschließend 10 min gewartet und dann die Platten im TECAN SAFIRE2 bei 630 nm vermessen.

8.4.4.2 Substrataktivitätsnachweis über 4-Nitrophenolphosphat (*p*-NPP).

Die Aktivitäten der einzelnen PTPs wurden mit dem Substrat 4-Nitrophenolphosphat (*p*-NPP) bestimmt. Die Absorption wurde bei 405 nm gemessen. Final wurden bei 298 K verschiedene Konzentrationen an Substrat (1 mM – 25 mM) in 50 mM Tris-HCl pH 7 in einem Totalvolumen von 20 μl inkubiert und die Zunahme der Absorption beobachtet. Es wurden für die jeweilige PTP folgende Konzentrationen benutzt: MptpA 5 ng/ μl , SHP2 10 ng/ μl , PTP1B 3 ng/ μl , PTPRR 3 ng/ μl sowie PTPN7 3 ng/ μl . Die K_M und V_{\max} Werte der PTPs wurden bestimmt, indem man die gemessene Aktivität gegen die verwendete Substratkonzentration doppelreziprok aufgetragen hat (Lineweaver-Burk-Auftragung). Die Inhibitionskonstanten wurden über einen Dixon-Auftragung bestimmt.

9. Literaturverzeichnis

- [1] Watson JD & Crick FHC, *Nature*, 171, 737-738 (1953).
- [2] Crick FHC, *Nature*, 227, 561 (1970).
- [3] Clardy J & Walsh C, *Nature*, 432, 829-837 (2004).
- [4] Silverman RB *Medizinische Chemie für Organiker, Biochemiker und pharmazeutische Chemiker*, VCH, Weinheim, New York, Basel, Cambridge, Tokyo (1994).
- [5] Böhm HJ, Klebe G & Kubinyi H *Wirkstoffdesign*, Spektrum-Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, Oxford (1996).
- [6] Hansch C, Maloney PP, Fujita T & Muir RM, *Nature*, 194, 178 (1962).
- [7] Lipinsky CA, Lombardo F, Dominy BW & Feeney PJ, *Adv. Drug Del. Rev.*, 23, 3 (1997).
- [8] Rishton GM, *Drug Discov. Today*, 8, 86-96 (2003).
- [9] Pearlman RS & Smith KM, *Persp. Drug Design Discov.*, 9, 339 (1998).
- [10] Bemis GW & Murcko MA, *J. Med. Chem.*, 39, 2887 (1996).
- [11] Hajduk PJ & Bures M, *J. Comb. Chem.*, 43, 3443 (2000).
- [12] Veber DF, Johnson SR, Cheng HY, Smith BR, Ward KW & Kopple KD, *J. Med. Chem.*, 45, 2615 (2002).
- [13] Ajay A, Walters WO & Murcko MA, *J. Med. Chem.*, 41, 3314 (1998).
- [14] Sadowski J & Kubinyi H, *J. Med. Chem.*, 41, 3325 (1998).
- [15] Jung G *Combinatorial Chemistry: Synthesis, Analysis, Screening*, VCH, Weinheim, New York, Basel, Cambridge, Tokyo (2000).
- [16] Shuker SB, Hajduk PJ, Meadows RP & Fesik SW, *Science*, 274, 1531-1534 (1996).
- [17] Blundell TL & Patel S, *Cur Opin. Pharm.*, 4, 490-496 (2004).
- [18] Gill AL et al., *J. Med. Chem.*, 48, 414-426 (2005).
- [19] Wood WJL, Patterson AW, Tsuruoka H, Jain RK & Ellman JA, *J. Am. Chem. Soc.*, 127, 15521-15527 (2005).
- [20] Huc I & Lehn JM, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94, 2106-2110 (1997).
- [21] Le Chatelier HL & Hebd CR, *Seances Acad. Sci.*, 99, 786 – 788 (1884).
- [22] Hochgürtel M, Kroth H, Piecha D, Hofmann MW, Nicolau C, Krause S, Schaaf O, Sonnenmoser G & Eliseev AV., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 99, 3382-3387 (2002).
- [23] Erlanson, DA, Wells, JA, Braisted, A., *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, 33, 199-223 (2004).

-
- [24] Vongvilai P, Angelin M, Larsson R & Ramström O, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 46, 948 – 950 (2007).
- [25] Whiting M, Muldoon J, Lin YC, Silverman SM, Lindstrom W, Olson AJ, Kolb HC, Finn MG, Sharpless KB, Elder JH & Fokin VV, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 46, 1435-1439 (2006).
- [26] Corbett AD, Cheeseman JD, Kazlauskas RJ & Gleason JL, *Angew. Chem Int. Ed.*, 43, 2432-2436 (2004).
- [27] Drosten et al., *N. Engl. J. Med.*, 348, 1967-1976 (2003).
- [28] Marra MA et al., *Science*, 300, 1399-1404 (2003).
- [29] Rota PA et al., *Science*, 300, 1394-1399 (2003).
- [30] <http://www.who.int/csr/sars/en/en/>
- [31] Guan Y, Zheng BJ, He YQ, Liu XL, Zhuang ZX, Cheung CL, Luo SW, Li PH, Zhang LJ, Guan YJ, Butt KM, Wong KL, Chan KW, Lim W, Shortridge KF, Yuen KY, Peiris JS & Poon LL, *Science*, 302, 276-278 (2003).
- [32] Groneberg DA, Hilgenfeld R & Zabel P, *Respiratory Research*, 6, 8-17 (2005).
- [33] Yang ZY, Huang Y, Ganesh L, Leung K, Kong WP, Schwartz O, Subbarao K & Nabel GJ, *J. Virol.*, 78, 5642-5650 (2004).
- [34] Anand K, Palm GJ, Mesters JR, Siddel SG, Ziebuhr J & Hilgenfeld R, *EMBO J.*, 21, 3213-3224 (2002).
- [35] Grum-Tokars V, Ratia K, Begaye A, Baker SC & Mesecar AD, *Virus Res.*, 133, 63-73 (2008).
- [36] Ratia K et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 105, 16119-16124 (2008).
- [37] Anand K, Ziebuhr J, Wadhvani P, Mesters JR & Hilgenfeld R, *Science*, 300, 1763-1767 (2003).
- [38] Schechter I & Berg A, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 27, 157-162 (1967).
- [39] Yang H, Yang M, Ding Y, Liu Y, Lou Z, Sun L, Mo L, Ye S, Pang H, Gao GF, Anand K, Bartlam M, Hilgenfeld R & Rao Z, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 100, 13190-13195, (2003).
- [40] Xue X, Yang H, Shen W, Zhao Q, Li J, Yang K, Chen C, Jin Y, Bartlam M & Rao Z, *J. Mol. Biol.* 366, 965-975 (2007).
- [41] Chen S, Chen L, Tan J, Chen J, Du L, Sun T, Shen J, Chen K, Jiang H & Shen X, *J. Biol. Chem.*, 280, 164–173 (2005).
- [42] Xue X, Yang H, Shen W, Zhao Q, Li J, Yang K, Chen C, Jin Y, Bartlam M & Rao Z, *J. Mol. Biol.*, 366, 965-975 (2007).

-
- [43] Kawamura K, Kondo S, Maeda K & Umezawa H, *Chem. Pharm. Bull.*, 17, 1902 (1969).
- [44] Someno T & Ishii SI, *Chem. Pharm. Bull.*, 34, 1748-1754 (1986).
- [45] Murphy AM, Dagnino R, Vallar PL, Trippe AJ, Sherman SL, Lumpkin RH, Tamura SY & Webb TR, *J. Am. Chem. Soc.*, 114, 3156-3157 (1992).
- [46] Fehrentz JA, Paris M, Heitz A, Velek J, Liu CF, Winternitz F & Martinez J, *Tetrahedron Lett.*, 36, 7871-7874 (1995).
- [47] Gros C, Boulegue C, Galeotti N, Niel G & Jouin P, *Tetrahedron*, 58, 2673-2680 (2002).
- [48] Lelievre D, Turpin O, El Kazzouli S & Delmas A, *Tetrahedron*, 58, 5525-5533 (2002).
- [49] Melnyk O, Bossus M, David D, Rommens C & Gras-Masse H, *J. Pept. Res.*, 52, 180-184 (1998).
- [50] Rademann J, Meldal M & Bock K, *Chem. Eur. J.*, 5, 1218-1225 (1999).
- [51] Sorg G, Mengel A, Jung G, Rademann J, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 40, 4395-4397 (2001).
- [52] Sorg G, Thern B, Mader O, Rademann J & Jung G, *J. Pept. Sci.*, 11, 142-152 (2005).
- [53] Al-Gharabli SI, Ali Shah ST, Weik S, Schmidt MF, Mesters JR, Kuhn D, Klebe G, Hilgenfeld R & Rademann J, *ChemBioChem*, 7, 1048-1055 (2006).
- [54] Boeijen A; van Ameijde J & Liskamp RMJ, *J. Org. Chem.*, 66, 8454-8462 (2001).
- [55] Rodriguez M, Llinaris M, Doulut S, Heitz A & Martinez J, *Tetrahedron Lett.*, 32, 923-926 (1991).
- [56] Myers AG, Zhong B, Movassaghi M, Kung DW, Lanman BA & Kwon S, *Tetrahedron Lett.*, 41, 1359-1362 (2000).
- [57] Ede NJ & Bray AM, *Tetrahedron Lett.*, 38, 7119-7122 (1997).
- [58] Kuhn D, Weskamp N, Schmitt S, Hüllermeier E & Klebe G, *J. Mol. Biol.*, 359, 1023-1044 (2006).
- [59] Godoy-Alcantar C, Yatsimirsky AK & Lehn J-M, *J. Phys. Org. Chem.*, 18, 979-985 (2005).
- [60] Tan J et al., *J. Mol. Biol.*, 354, 25-40 (2005).
- [61] El-Dahshan A, Weik S & Rademann J, *Org. Lett.*, 9, 949-952 (2007).
- [62] Weiss RA, *Nature*, 410, 963-967 (2001).
- [63] www.unaids.org
- [64] www.wikipedia.org

- [65] Richman DD, *Nature*, 410, 995-1001 (2001).
- [66] Weber J et al., *J. Mol. Biol.*, 324, 739-754 (2002).
- [67] Short GF III., Laikhter AL, Lodder M, Shayo M, Arslan T & Hecht SM, *Biochemistry*, 39, 8768-8781 (2000).
- [68] Far S & Melnyk O, *Tetrahedron Lett.*, 45, 1271-1273 (2004).
- [69] Hengartner O, *Nature*, 407, 770-776 (2000).
- [70] Scheer JM, Romanowski MJ & Wells JA, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 103, 7595-7600 (2006).
- [71] Nicholson DW et al., *Nature*, 376, 37-43 (1995).
- [72] Nicholson DW, *Nature*, 407, 810-816 (2000).
- [73] Garcia-Calvo M, Peterson EP, Leiting P, Ruel R, Nicholson DW & Thornberry NA, *J. Biol. Chem.*, 273, 32608-32613 (1998).
- [74] Han BH et al., *J. Biol. Chem.*, 277, 30128-30136 (2002).
- [75] Lee D et al., *J. Biol. Chem.*, 275, 16007-16014 (2000).
- [76] Kaufmann SHE, *Nat. Rev. Immun.*, 1, 20-30 (2001).
- [77] www.who.int/gtb/index.htm
- [78] Bach H, Papavinasasundaram KG, Wong D, Hmama Z & Av-Gay Y, *Cell Host & Microbe*, 3, 316-322 (2008).
- [79] Elchebly M et al., *Science*, 283, 1544-1548 (1999).
- [80] Eswaran J et al., *Biochem. J.*, 395, 483-491 (2006).
- [81] Hellmuth K, Grosskopf S, Lum CT, Würtele M, Röder N, von Kries JP, Rosario M, Rademann J & Birchmeier W, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 105, 7275-7280 (2008).
- [82] Huang P, Ramphal J, Wei J, Liang C, Jallal B, McMahon G & Tang C, *Bioorg. Med. Chem.*, 11, 1835-1849 (2003).
- [83] Montalibet J, Skorey KI & Kennedy BP, *Methods*, 35, 2-8 (2005).
- [84] Carpino LA & Han GY, *J. Org. Chem.*, 37, 3404-3409 (1972).
- [85] Kaiser E, Colescott RL, Bossinger CD & Cook PI, *Anal. Biochem.*, 34, 595-598 (1970).
- [86] Weber PJA, Bader JE, Folkers G & Beck-Sickinger AG, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 8, 597-600 (1998).
- [87] Harris JL, Backes BJ, Leonetti F, Mahrus S, Ellman JA & Craik CS, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 97, 7754-7759 (2000).
- [88] Tselinski V, Mel'nikova SF & Vergizov SN, *Org. Khim.*, 17, 1123-1124 (1981).
- [89] Batog LV, Rozhkov VY & Struchkova MI, *Mendeleev Commun.*, 12, 159-162 (2002).

-
- [90] Kishore Kumar GD, Saenz D, Lokesh GL & Natarajan A, *Tetrahedron Lett.*, 47, 6281-6284 (**2006**).
- [91] Baykov AA, Evtushenko OA & Avaeva SM, *Anal. Biochem.*, 171, 266-270 (**1988**).