

Zur Entwicklung neuer irreversibler Proteaseinhibitoren mittels dynamischer Fragmentligation

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

DANIEL BECKER

aus Berlin

Berlin 2016

Die Promotionsarbeit wurde im Zeitraum von Februar 2011 bis März 2013 am Institut für Pharmazie der Universität Leipzig und von April 2013 bis März 2015 am Institut für Pharmazie der Freien Universität Berlin unter der Leitung von Prof. Dr. Jörg Rademann durchgeführt.

Erstgutachter: Prof. Dr. Jörg Rademann

Zweitgutachter: Prof. Dr. Gerhard Wolber

Tag der Disputation: 17.02.2017

Erklärung

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

Daniel Becker

Teile der vorliegenden Arbeit wurden bereits veröffentlicht in:

Becker, D. *et al.* Irreversible inhibitors of the 3C protease of Coxsackie virus through templated assembly of protein-binding fragments. *Nature Communications* 7:12761
doi: 10.1038/ncomms12761 (2016).

Danksagung

Ich danke Prof. Dr. Jörg Rademann für die Bereitstellung des Themas, die Betreuung dieser Arbeit und für seine Unterstützung und sein Vertrauen.

Prof. Dr. Gerhard Wolber danke ich für die Bereitschaft zur Übernahme des Zweitgutachtens.

Ich bedanke mich bei meiner Kooperationspartnerin Zuzanna Kaczmarska (IRB Barcelona) für die Aufnahme und Analyse der Kristallstruktur, die Selektivitäts- sowie Stabilitäts-experimente und bei meiner Kooperationspartnerin Rachel Ulferts (Universität Utrecht) für die Durchführung der Zelltests. Außerdem danke ich Herrn Dr. Lothar Hennig für die Hilfe am NMR sowie Frau Jutta Ortwein und Herrn Dr. Andreas Schäfer für die Messung der NMR-Spektren. Herrn Dr. Andreas Springer danke ich für die Aufnahme der Protein-Massenspektren und die Unterstützung bei der Methodenfindung. Ich danke auch Frau Regina Reppich-Sacher für die Aufnahme der MALDI-Spektren und Dr. Christoph Arkona und Andrea Albrecht für die biochemische Unterstützung und die Durchführung des Ligationsscreenings. Herrn Prof. Dr. Rolf Hilgenfeld danke ich für die Bereitstellung der Proteasen sowie der C147A-Mutante. Ich danke zudem Robert Schulz für die angeregten Diskussionen rund um Docking-Studien und Kristallstrukturen und die Visualisierung der Bindungsmodi. Dank gebührt auch Sascha Weisheit für die Unterstützung bei der Synthese der Epoxidsonde im Rahmen seiner Diplomarbeit, sowie meinen Forschungspraktikanten Johannes Krieger, Benjamin Brennecke, Eric Nawrotzky und Frederic Ting.

Für das angenehme Arbeitsklima, die Hilfe in allen Bereichen und die stete Bereitschaft zu fruchtbaren Diskussionen möchte ich mich bei der gesamten Arbeitsgruppe bedanken. Besonderer Dank gilt dabei Franziska Gottschalk und Stefan Wagner, die mich äußerst freundlich in die Arbeitsgruppe aufgenommen haben und zusammen mit Lisa Redl eine stimmungsvolle Bürogemeinschaft bildeten. Stefan danke ich dazu noch für die gute Zu-

sammenarbeit als Laborkollege, die vielen angeregten Diskussionen und Hilfestellungen sowie seine Toleranz bei der Musikwahl.

Ich möchte mich bei all meinen Freunden bedanken, die mich während meines Studiums in besonderer Weise unterstützt haben und Verständnis zeigten, wenn Freizeitaktivitäten oder Ähnliches mal auf der Strecke blieben.

Nicht zuletzt bin ich meinen Eltern und meiner Familie zu tiefem Dank verpflichtet, die mich in jungen Jahren gefördert und während des Studiums und der Promotion stets unterstützt haben. Besonders möchte ich mich auch bei meiner Frau Victoria bedanken, ohne deren Halt diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Inhaltsverzeichnis

I. Allgemeiner Teil	1
1. Einleitung	3
1.1. Die Bedeutung von Proteasen für die Wirkstoffentwicklung	3
1.2. Fragment-basierte Wirkstoffentwicklung	4
1.3. Zur Rolle der irreversiblen Inhibitoren in der pharmazeutischen Forschung	6
1.4. Aktivitätsbasierte Sonden als konzeptionelle Grundlage für diese Arbeit .	7
1.5. Dynamische Fragmentligation als neue Methode zur Entwicklung kova- lenter Proteaseinhibitoren	9
1.6. Die molekularen Targets	10
1.6.1. Die West-Nil-Virus NS2B/NS3 Protease	10
1.6.2. Die Coxsackie-Virus B3 3C Protease	12
2. Zielstellung	15
II. Ergebnisse und Diskussion	17
3. Die Entwicklung der Aldehydsonden	19
3.1. Die Auswahl der elektrophilen Zentren	19
3.2. 4-Chlor-2,2-dimethyl-3-oxobutanal AS1	23
3.3. <i>E</i> -4-Oxobut-2-ensäureethylester AS2	26
3.4. 2 <i>S</i> ,3 <i>S</i> -Epoxy-4-oxobutansäureethylester AS3	26
4. Dynamisches Ligationsscreening an der West-Nil-Virus NS2B/NS3 Protease	27
4.1. Aufbau eines Assays zur dynamischen Fragmentligation	27
4.2. Dynamisches Ligationsscreening mit AS1	28

4.3.	Dynamisches Ligationsscreening mit AS2	28
4.3.1.	Synthese des Aminfragmentes F1	29
4.3.2.	Kovalente Verknüpfung von Sonde und Fragment	31
4.3.3.	Diskussion der Ergebnisse	31
5.	Dynamisches Ligationsscreening an der Coxsackie-Virus B3 3C Protease	33
5.1.	Aufbau eines Assays zur dynamischen Fragmentligation	33
5.2.	Dynamisches Ligationsscreening mit AS1	34
5.2.1.	Synthese des Aminfragmentes F2 und F3	34
5.2.2.	Kovalente Verknüpfung von Sonde und Fragment	36
5.2.3.	Validierung und Evaluierung der Ergebnisse	38
5.3.	Dynamisches Ligationsscreening mit AS2	42
5.4.	Dynamisches Ligationsscreening mit AS3	42
5.4.1.	Synthese des Aminfragmentes	43
5.4.1.1.	Analyse der Reaktionsprodukte des Ligationssassays	44
5.4.2.	Kovalente Verknüpfung von Sonde und Fragment	51
5.4.2.1.	Epoxide	51
5.4.2.2.	α,β -ungesättigte Carbonylverbindungen	56
5.4.2.3.	Vinylsulfone	61
5.4.3.	Validierung und Evaluierung der Ergebnisse	62
5.4.3.1.	Diskussion der MS-Spektren	62
5.4.3.2.	Diskussion der Reaktivität der Inhibitoren	64
5.4.3.3.	Diskussion der Kristallstruktur von EV-B93 3C ^{Pro} mit AB10	67
5.4.3.4.	Diskussion der zellulären Assays	71
5.4.3.5.	Diskussion der Selektivität der Inhibitoren	74
6.	Resümee	79

III. Experimenteller Teil	87
7. Allgemeine Vorbemerkungen	89
7.1. Instrumentelle Analytik	89
7.1.1. Kernresonanzspektroskopie	89
7.1.2. Fluoreszenz- und Absorptionsmessungen	89
7.1.3. Hochauflösungsmassenspektrometrie	89
7.1.4. Infrarotspektroskopie	90
7.1.5. Schmelzpunktbestimmung	90
7.1.6. Mikrowellen-Synthese	91
7.1.7. Röntgenkristallstrukturanalyse vom Protease-Inhibitor-Komplex .	91
7.2. Chromatographische Methoden	91
7.2.1. Dünnschichtchromatographie	91
7.2.2. Säulenchromatographie	91
7.2.3. Hochdruckflüssigchromatographie/ESI-MS (LC-MS)	92
7.2.4. Hochdruckflüssigchromatographie (HPLC)	92
7.2.5. Stabilitäts- und <i>in vitro</i> Proteolyse-Aktivitätsassays	93
7.3. Chemikalien	93
8. Enzym-Assays	95
8.1. Ermittlung der Kenngrößen der irreversiblen Inhibitoren	95
8.2. West-Nil-Virus NS2B/NS3 Protease	97
8.2.1. Fluoreszenzbasierter Assay	97
8.2.2. Absorptionsbasierter Assay	98
8.3. Coxsackie-Virus B3 3C Main Protease	98
8.3.1. FRET-basierter Assay	98
8.4. Multizyklus CPE-Reduktions Assay und zellulärer Proteaseassay	99
9. Allgemeine Synthesevorschriften	101
9.1. Allgemeines Protokoll zur Festphasenpeptidsynthese	101
9.1.1. Beladung des Rink-Amid-Harzes mit AMCA	101
9.1.2. Kupplung der ersten Aminosäure ans AMCA-Rink-Amid-Harz .	101
9.1.3. Kupplung der ersten Aminosäure ans 2-Chlortrityl-Harz	102
9.1.4. Fmoc-Entschützung	102

9.1.5. Kaisertest	102
9.1.6. Generelles Protokoll zur Peptidkupplung	102
9.1.7. Unpolare Abdeckung mit CBz	103
9.1.8. Peptidabspaltung vom Rink-Amid-Harz und Aufarbeitung	103
9.1.9. Peptidabspaltung vom 2-Chlortrityl-Harz ohne Entschützung der Seitenketten	103
10. Synthetisierte Verbindungen	105
10.1. AMCA-gelabelte Peptide	105
10.2. pNA-gelabelte Peptide	105
10.3. Aldehydsonden	107
10.3.1. Halomethylketone	107
10.3.2. Epoxide	110
10.4. Amin-Fragmente	111
10.4.1. WNV-Screening Hits	111
10.4.2. CVB3 Screening Hits	113
10.5. Inhibitoren	120
10.5.1. Chlormethylketone	120
10.5.2. Epoxide	121
10.5.3. α,β -ungesättigte Carbonylverbindungen	125
10.5.4. α,β -ungesättigte Amide	134
10.5.5. Vinylsulfone	138
Literaturverzeichnis	141
A. Tabellen und Spektren	155
A.1. NMR-Spektren ausgewählter Verbindungen	155
A.2. Kinetische Daten der Inhibitoren	177
A.3. ESI-MS-Spektren	186

Abkürzungsverzeichnis

ABPP	<i>Activity-based Protein Profiling</i>
AcOH	Essigsäure
AMCA	7-Amino-4-methylcumarin-3-essigsäure
Äq	Äquivalent
arom	aromatisch
Boc	<i>tert</i> -Butyloxycarbonyl
bm	breites Multiplett
bs	breites Singulett
CBz	Ameisensäurebenzylester
CVB3	Coxsackie-Virus B3
CPE	Zytopathischer Effekt
d	Dublett
DabcyI	4-([4-(Dimethylamino)phenyl]azo)benzoesäure
DCC	<i>N,N'</i> -Dicyclohexylcarbodiimid
DCC	<i>Dynamic Covalent Chemistry</i>
DCM	Dichlormethan
DIC	<i>N,N'</i> -Diisopropylcarbodiimid

DIPEA	<i>N,N</i> -Diisopropylethylamin
DMF	<i>N,N</i> -Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTT	Dithiothreitol
EA	Ethylacetat
Edans	5-((2-Aminoethyl)amino)naphthyl-1-sulfonsäure
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGFR	<i>Epidermal Growth Factor Receptor</i>
EOB	(<i>E</i>)-4-Oxo-but-2-ensäureethylester
ESI	Elektrospray-Ionisierung
EV	Enterovirus
Fmoc	9-Fluorenylmethoxycarbonyl
FRET	Förster-Resonanzenergietransfer
h	Heptett
H	<i>n</i> -Hexan
HATU	1-[Bis(dimethylamino)methylen]-1 <i>H</i> - 1,2,3-triazolo-[4,5- <i>b</i>]pyridinium Hexafluorophosphat-3-oxid
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HOBt	1-Hydroxybenzotriazol
HPLC	<i>high performance liquid chromatography</i>
HR	hochaufgelöst
HRV	Humanes Rhinovirus

HTS	<i>High Troughput Screening</i>
IR	Infrarotspektroskopie
m	Multipllett
MALDI	Matrix-unterstützte Laser-Desorption/Ionisation
MeCN	Acetonitril
MOPS	3-(<i>N</i> -Morpholino)propansulfonsäure
3-MPS	3-Mercaptopropionsäure
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
NMR	Kernresonanzspektroskopie
NS	<i>non structural</i>
p	Pentett
Pbf	2,2,4,6,7-Pentamethyl-2,3-dihydrobenzofuran-5-sulfonyl
pNA	4-Nitroanilin
q	Quartett
RKSA	Röntgenkristallstrukturanalyse
rpm	<i>rounds per minute</i>
s	Singulett
Smp	Schmelzpunkt
t	Triplett
TFA	Trifluoressigsäure
THF	Tetrahydrofuran
TOF	<i>time of flight</i>

TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
UHPLC	<i>ultra high performance liquid chromatography</i>
WNV	West-Nil-Virus

Zusammenfassung

Wenn kleine Molekülfragmente an Biomakromoleküle binden, können Sie mitunter als Ausgangspunkt für die Wirkstoffentwicklung dienen. Meist ist es jedoch schwierig, diese Bindung zu detektieren, da die Fragmente nur eine geringe Affinität zu ihrem Bindungspartner haben. Die vorliegende Arbeit beschreibt die Entwicklung einer Methode für den Fragment-basierten Aufbau von irreversiblen Inhibitoren auf einer Proteinoberfläche. Das aktive Zentrum einer Protease dient dabei als Schablone, in der einerseits eine dynamische Fragmentligation und andererseits eine kovalente Reaktion einer Fragment-bindenden Sonde mit dem katalytisch aktiven Nukleophil des Proteins abläuft. Die daraus resultierende Deaktivierung des Enzyms kann über den verminderten Substratumsatz spektroskopisch nachvollzogen werden, was eine Identifizierung der aktiven Fragmente ermöglicht. Diese Methode wurde für die West-Nil-Virus NS2B/NS3 Protease sowie die Coxsackie-Virus B3 3C Protease etabliert, welche beide pharmakologisch relevante Ziele darstellen, für die aber noch keine geeigneten Therapeutika vorliegen.

Die Arbeit gliedert sich in drei Teilbereiche. Der zentrale Ansatzpunkt der vorgestellten Methode war die Verwendung biselektrophiler Sonden, welche sich aus einer Aldehydgruppe für die dynamische Ligation von nukleophilen Fragmenten und einer weiteren elektrophilen Gruppe für die Reaktion mit dem katalytisch aktiven Nukleophil der Protease zusammensetzen. Die drei entwickelten Sonden sind ein Chlormethylketon, ein α,β -ungesättigter Ester sowie ein Epoxid und unterscheiden sich in Aufbau und Inhibitionsmechanismus. Eine Sonde konnte käuflich erworben werden, die anderen beiden wurden synthetisiert.

Im zweiten Teil der Arbeit wurden die Sonden genutzt, um ein günstig bindendes Aminfragment zu finden, welches die inhibitorische Aktivität der eingesetzten Sonde verstärkt. Dazu wurde eine Fragmentbibliothek aus 850 primären Aminen in einem Fluoreszenz-basierten Assay untersucht, wobei für jede Sonde je ein aktives Fragment identifiziert werden konnte.

Im dritten Teil wurden die aktiven Fragmente mit Hilfe von massenspektrometrischen Untersuchungen verifiziert und mit Docking-Studien nachvollzogen. Eine kovalente Verknüpfung der aktiven Kombinationen und eine anschließende extensive strukturelle Optimierung lieferten eine Reihe Inhibitoren, wobei die potentesten davon für die Coxsackievirus B3 3C Protease gewonnen werden konnten. Die Inhibitoren wurden spektroskopisch charakterisiert und die entsprechenden kinetischen Kenngrößen bestimmt. Darüber hinaus gelang es, die zelluläre Wirksamkeit von drei Inhibitoren zu untersuchen sowie den Bindungsmodus eines Inhibitors mit Hilfe einer Röntgenkristallstruktur aufzuklären. Ein *in vitro* Proteolyse-Aktivitätsassay mit verschiedenen viralen Proteasen zeigte, dass mit Hilfe der hier vorgestellten Methode potente, nicht-peptidische Breitspektrum-Inhibitoren entwickelt werden können.

Abstract

If small molecular fragments bind to biological macromolecules, they can sometimes serve as a starting point for drug development. The binding is usually difficult to detect since the fragments show only low affinity for their respective binding partner. The work presented here describes the development of a method for the fragment-based organization of irreversible inhibitors on a protein surface. The active site of a protease serves as a template, catalysing a dynamic fragment ligation on the one hand and a covalent reaction of the fragment binding probe with the catalytically active nucleophile of the protein on the other. The resulting deactivation of the enzyme can be traced via fluorescence spectroscopy, which allows for identification of the active fragments. The method was established for the West Nile Virus NS2B/NS3 protease and the Coxsackievirus B3 3C protease, which are both pharmacologically relevant targets, but for which there are no appropriate therapies available yet.

The work is divided into three sections. The central starting point of the presented method was the use of biselectrophilic probes which composed of an aldehyde group for dynamic ligation of nucleophilic fragments and another electrophilic group to react with the catalytically active nucleophile of the protease. The three developed probes are a chloromethyl ketone, an α,β -unsaturated ester and an epoxide and they differ in structure and mechanism of inhibition. One probe could be purchased, the other two were synthesized.

In the second part, the probes were used to find a low-binding amine fragment which enhanced the inhibitory activity of the probes. For this purpose, a fragment library of 850 primary amines has been screened in a fluorescence-based assay, where one active fragment could be identified for each probe respectively.

In the third part the active fragments were verified by means of mass spectrometry and followed with docking studies. Covalent linkage of the active combinations and subsequent extensive structural optimization delivered a set of inhibitors. The most potent ones have

been developed for the Coxsackievirus B3 3C protease. Inhibitors were characterized by spectroscopic means and the corresponding kinetic parameters have been determined. Moreover, it was possible to investigate the cellular efficacy of three inhibitors and to clarify the binding mode of one inhibitor using an X-ray crystal structure of the inhibitor-protease complex. An *in vitro* proteolysis activity assay with different viral proteases showed that non-peptidic broad-spectrum inhibitors can be developed using the method presented here.

Teil I.

Allgemeiner Teil

1. Einleitung

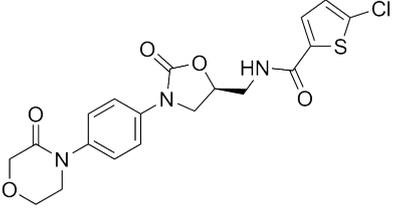
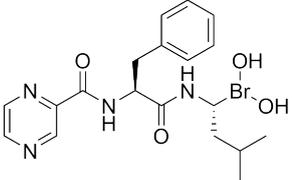
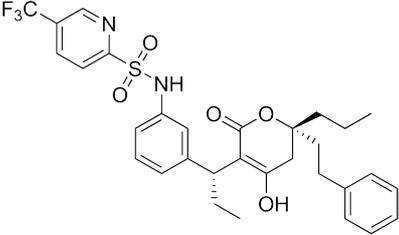
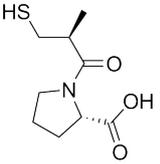
1.1. Die Bedeutung von Proteasen für die Wirkstoffentwicklung

Als Proteasen bezeichnet man Enzyme, die die Hydrolyse der Peptidbindungen von Aminosäureketten katalysieren. Die Spaltung von Peptidbindungen kann dem Abbau, der Prozessierung und der Aktivierung von Proteinen dienen. Proteasen sind ubiquitäre Bestandteile aller Organismen und aufgrund ihrer Wirkungsweise direkt für die Regulation des Proteingehalts der Zellen zuständig. Je nach katalytischem Mechanismus der Substrat-Hydrolyse unterteilt man die Proteasen dabei in Serin-, Cystein-, Threonin-, Aspartat-, Metallo- und Glutamatproteasen.^[1]

Die Geschichte der Proteasenforschung geht zurück bis ins frühe 19. Jahrhundert, als Theodor Schwann 1836 das Pepsin entdeckte.^[2] Seitdem konnte gezeigt werden, dass Proteasen in fast jedem Organismus existieren und eine Rolle in beinahe jedem biologischen Signalweg und somit praktisch jeder Krankheit spielen.^[3] Durch die intensive Erforschung der Rolle der Proteasen bei Blutgerinnungsstörungen,^[4,5] Entzündungsprozessen,^[6,7] Infektionskrankheiten^[8,9] und Krebs^[10,11] konnten einige erfolgreiche Wirkstoffe entwickelt werden, deren Wirkmechanismus auf Proteasehemmung basiert (siehe Tab. 1.1).

Es wird geschätzt, dass zur Zeit 5 - 10 % aller genutzten Wirkstofftargets Proteasen sind. Wenn man eine Protease als Zielstruktur für die pharmazeutische Forschung auswählen will, muss man sich die Komplexität der von ihnen gesteuerten biologischen Prozesse, die Mechanismen der Proteaseaktivität und die Fehlregulation im Erkrankungsfall vor Augen führen. Darüberhinaus besitzen die Signalwege der Proteasen meist einige homologe Routen mit identischen katalytischen Mechanismen und ähnlichen Substratspezifitäten. Will man spezifische Proteaseinhibitoren entwickeln, muss man deshalb oft zu großen

Tabelle 1.1. Einige Beispiele erfolgreicher Proteaseinhibitoren

Krankheit & zelluläres Target	Struktur	Name des Wirkstoffs
Blutgerinnungsstörung, Faktor Xa		Rivaroxaban (Xarelto; Bayer)
Multiples Myelom, Proteasom		Bortezomib (Velcade; Millenium)
HIV/AIDS, HIV Protease		Tipranavir (Aptivus; Pfizer)
Bluthochdruck, ACE		Captopril (Capoten; Bristol-Myers Squibb)

Peptiden oder Peptidomimetika greifen, welche meist ungeeignete Wirkstoffprofile besitzen. Der Bedarf an alternativen Entwicklungsprozessen für kleine Wirkstoffmoleküle ist deshalb groß.

1.2. Fragment-basierte Wirkstoffentwicklung

Die Ursprünge der Fragment-basierten Wirkstoffentwicklung gehen auf die Arbeiten von Jencks^[12] und Ariens^[13] zurück, welche postulierten, dass Wirkstoffmoleküle aus einzelnen Fragmenten aufgebaut werden können. Diese Fragmente sind kleiner als die typischen

Screeninghits, welche Molekülmassen von 300 bis 600 Da besitzen.^[14] Darüberhinaus verfügen die Fragmente über nur wenige funktionelle Gruppen und zeigen folglich auch geringere Bindungsaffinitäten. Jedoch sind die Interaktionen mit dem Bindungspartner meist hochwertiger, da die kleinen Fragmente für den einzelnen Bindungsort "maßgeschneidert" sind^[15] (siehe Abb. 1.1). Dies wird an einer hohen Liganden-Effizienz (*ligand efficiency*) deutlich, welche definiert wird als der Quotient der freien Gibbs-Energie ΔG und der Anzahl der Atome (außer Wasserstoff).^[16]

Eine Verknüpfung der einzelnen Fragmente liefert dann potente Wirkstoffmoleküle.^[17] Diese Methodik konnte sich durch die Verwendung von Kernresonanzspektroskopie,^[18,19] Oberflächenplasmonresonanz,^[20] Thermal Shift Assays^[21] und Röntgenkristallographie^[22] zur Detektion der aktiven Fragmente schnell etablieren. Anfänglich wurde die Fragment-basierte Wirkstoffentwicklung für Kinaseinhibitoren genutzt, da diese Proteine besonders geeignet erschienen. Es stellte sich jedoch schnell heraus, dass dieser Ansatz allgemeingültig und erfolgreich auf beinahe jede Proteinfamilie anwendbar ist.

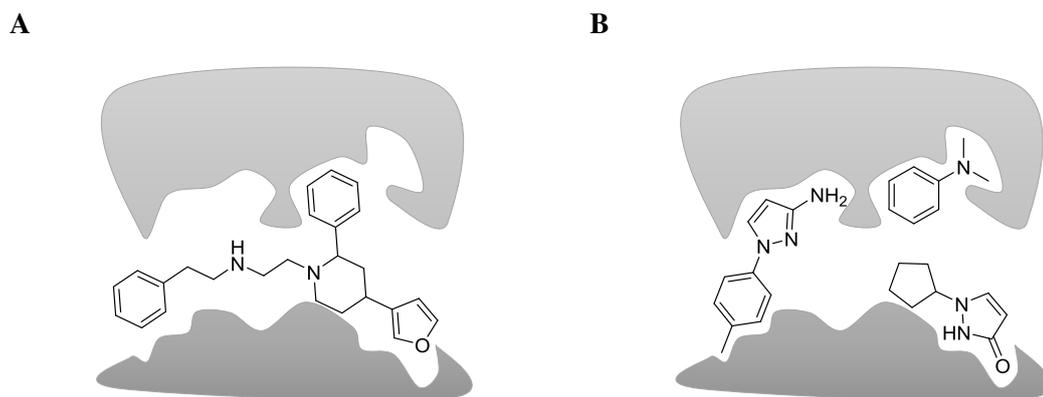


Abb. 1.1. **A** zeigt exemplarisch einen Treffer aus dem Hochdurchsatzscreening, der aufgrund einiger Wechselwirkungen mit der Enzymoberfläche (grau) identifiziert werden konnte. **B** zeigt dagegen ein potentielles Ergebnis eines Fragment-basierten Screenings. Die Fragmente weisen eine höhere Ligandeneffizienz mit optimierten Wechselwirkungen auf.^[23]

Die Fragment-basierte Wirkstoffentwicklung basiert auf der Annahme, dass kleine Molekülfragmente erst erfolgreich identifiziert und dann chemisch optimiert werden können, mit dem Ziel potente Liganden zu generieren. Damit dies gelingt, müssen gewisse Bedingungen an die Fragmente gestellt werden. Abgeleitet von Lipinskis *Rule of Five*^[24]

wurde die *Rule of Three* entwickelt, die heutzutage meist als intellektuelle Grundlage für den Aufbau einer Fragmentbibliothek dient:^[25]

- Molekülmasse des Fragments ist < 300 Da
- errechneter Verteilungskoeffizient ClogP des Fragments ist ≤ 3
- Anzahl der Wasserstoffbrückenbindungsdonatoren beträgt ≤ 3
- Anzahl der drehbaren Bindungen ist ≤ 3

Die Anzahl der *Rule of Three*-verträglichen Fragmente mit maximal 11 Atomen beträgt ungefähr 10^7 .^[26] Die Anzahl der Wirkstoff-ähnlichen Moleküle mit einem Molekulargewicht von 300 bis 500 Da wird dahingegen auf 10^{60-200} geschätzt.^[27,28] Die Möglichkeit der Kombination mehrerer Fragmente führt dazu, dass der chemische Raum deutlich besser abgedeckt werden kann, als es mit einem Hochdurchsatz-Screening mit (typischerweise) $10^5 - 10^6$ Molekülen möglich wäre.

1.3. Zur Rolle der irreversiblen Inhibitoren in der pharmazeutischen Forschung

Die Entwicklung selektiver kovalenter Enzyminhibitoren ist ein sehr attraktives Konzept, welches jedoch immer eine Gratwanderung zwischen Reaktivität und Selektivität beinhaltet. Folgen der unselektiven Reaktion mit Makromolekülen *in vivo* können vom Verlust der Wirksamkeit bis hin zu lebensbedrohlichen Nebenwirkungen reichen. Dieses hohe pharmakologische Risiko führte dazu, dass kovalente Inhibitoren in der Wirkstoffentwicklung eher gemieden wurden, auch wenn ein erfolgreicher kovalenter Wirkstoff einen hohen Nutzen verspricht. Nachdem der irreversible Wirkmechanismus bei vielen der heute eingesetzten kovalenten Inhibitoren erst festgestellt wurde, als der Wirkstoff seinen klinischen Nutzen schon lange bewiesen hatte, rückt diese Wirkstoffklasse langsam wieder in den Fokus der pharmazeutischen Forschung.^[29] Der große Vorteil der kovalenten Inhibitoren liegt in der hohen biochemischen Effizienz.^[30,31] Dies ermöglicht niedrigere Dosierungen, was wiederum weniger unerwünschte Nebenreaktionen hervorruft. Der kovalente Mechanismus führt darüber hinaus zu längeren Wirkzeiten, die in Abhängigkeit zur Resynthese des Zielenzym stehen.^[32] Ist die systemische Eliminierung des Wirkstoffes schneller als die

Resynthese des modifizierten Enzyms, bleibt der therapeutische Effekt noch bestehen, auch wenn der Wirkstoff den Körper längst verlassen hat. Das reduziert die Wahrscheinlichkeit für unerwünschte Nebenreaktionen und liefert ein breiteres therapeutisches Fenster.^[33]

Dem gegenüber stehen jedoch auch die Nachteile der kovalenten Inhibitoren, die sich ergeben, wenn das Zielenzym nur sehr kurz oder nur teilweise inhibiert werden soll.^[34] Auch besteht das Risiko eines idiosynkratischen Effekts, bei dem der Patient eine allergische Reaktion nach Einnahme eines kovalenten Inhibitors zeigt.^[35–37] Eine hochspezifische Inhibition ist also nötig, um Nebenreaktionen und somit Nebenwirkungen auszuschließen.

Trotz der bestehenden Sicherheitsrisiken gibt es eine Vielzahl an erfolgreichen kovalenten Inhibitoren. Die wohl bekanntesten sind Aspirin und Penicillin, die maßgeblich dazu beigetragen haben die Weltgesundheit zu verbessern. In jüngster Zeit wurden vor allem Tyrosinkinaseinhibitoren, wie z. B. Afatinib^[38] oder Rociletinib,^[39] zur Krebsbekämpfung zugelassen. Ihr Wirkungsort sind *epidermal growth factor*-Rezeptoren (EGFR), bei denen ein Cysteinrest über eine Michael-Addition kovalent modifiziert wird. Aber auch einige antivirale Wirkstoffe, wie z. B. Telaprevir^[40] und Boceprevir,^[41] wurden zugelassen. Diese beiden Virostatika hemmen die NS3-Protease des Hepatitis-C-Virus. Zur Zeit fokussiert sich die Entwicklung neuer irreversibler Inhibitoren auf lebensbedrohliche Indikationen, für die es noch keine effektiven Therapien gibt. Der mögliche Nutzen des Wirkstoffs wiegt die potentiellen Risiken des Wirkmechanismus dann auf.^[29]

1.4. Aktivitätsbasierte Sonden als konzeptionelle Grundlage für diese Arbeit

Seit den 80er Jahren genießen gentechnische Methoden als therapeutisches Konzept zur Unterdrückung der Aktivität bestimmter Proteine eine große Popularität. Bevor man aber Proteine zielgerichtet durch Geninaktivierung aus biologischen Systemen entfernen konnte, blockierte man ihre Aktivität mit Hilfe von kleinen Molekülen. Mit der fortschreitenden Entwicklung von Hochdurchsatzscreenings (*High Throughput Screenings*, HTS^[42]) und dem Aufkommen der chemischen Proteomik,^[43] rückt dieser Ansatz nun wieder vermehrt in das Interesse der Wirkstoffentwicklung.

Selektive chemische Sonden stellen dabei mächtige Werkzeuge zur Beeinflussung der

Proteinfunktion dar. Ein Schlüsselement bei ihrer Verwendung ist dabei das Verständnis ihres Wirkprinzips am Zielprotein. Durch die Fortschritte bei der Genomsequenzierung und die Vielzahl der zur Verfügung stehenden analytischen Methoden, ist es heutzutage möglich, die phenotypische Wirkung einer Verbindung direkt der Wechselwirkung mit einem bestimmten molekularen Ziel zuzuordnen. Eine wichtige Methode zur Entwicklung von Enzyminhibitoren ist die sogenannte aktivitätsbasierte Proteinprofilierung (*activity-based protein profiling*, ABPP).^[44–46] Mit Hilfe von kovalent-bindenden chemischen Sonden können dabei gezielt die aktiven Zentren von (z. B.) Proteasen markiert werden. Durch die Möglichkeit der Messung von Enzymaktivitäten innerhalb komplexer biologischer Systeme, Zellen und sogar lebenden Organismen konnten eine Vielzahl von Anwendungen für das ABPP erschlossen werden. Dazu zählen die Identifizierung von deregulierten Enzymen bei verschiedenen Krankheiten,^[47,48] die Lokalisierung von Enzymen *in vitro*^[49] und *in vivo*,^[50] HTS,^[51] die Charakterisierung von aktiven Zentren^[52] und die Entdeckung und Entwicklung von selektiven Enzyminhibitoren.^[53,54] Aktivitätsbasierte Sonden bestehen im Allgemeinen aus drei Bausteinen, die jeweils für die Affinität zum molekularen Ziel, die anschließende chemische Reaktion und die abschließende Detektion der markierten Produkte zuständig sind. Das vielleicht wichtigste Bauteil ist dabei die funktionelle Gruppe, die für die kovalente Reaktion mit dem Enzym verantwortlich ist. Diese Kopfgruppe (auch *warhead* genannt) besitzt in den meisten Fällen ein elektrophiles Zentrum, welches mit einem aktivierten Nukleophil des Zielproteins, aber nicht unselektiv mit freien Nukleophilen des Proteoms reagieren soll. Die Selektivität resultiert hauptsächlich aus der Bindung ans Zielprotein, die durch einen substratähnlichen Teil der Sonde zustande kommt. Bei Proteasen wird dies über eine Peptidsequenz erreicht, die aus dem natürlichen Substrat abgeleitet wird. Um die markierten Enzyme im Nachhinein identifizieren zu können, wird ein Reporterteil an die Sonde geknüpft. Häufig genutzte Reporter sind Biotin-Label,^[46] Radioisotope wie ¹²⁵Iod^[55] oder Fluorophore, wie z. B. Fluorescein.^[56] In einem biochemischen Proteaseassay lässt sich die Aktivität des Enzyms mit Hilfe eines fluorogenen Substrats verfolgen, sodass auf den Reporterteil der Sonde verzichtet werden kann.^[57]

Durch Verknüpfung des ABPP mit der dynamischen kovalenten Chemie (*Dynamic Covalent Chemistry*, DCC^[58]) sollte es möglich sein, kovalente Sonden direkt auf der Proteinoberfläche in einem Hochdurchsatzscreening aus kleineren Fragmenten aufbauen zu lassen. Dadurch erhält man kleine, nicht peptidische Moleküle, die als Leitstrukturen für neue aktivitätsbasierte Sonden dienen können.

1.5. Dynamische Fragmentligation als neue Methode zur Entwicklung kovalenter Proteaseinhibitoren

Eine der grundlegenden Voraussetzungen für die Verwendung von dynamisch kombinatorischen Bibliotheken ist die Ausnutzung eines oder mehrerer reversibler Prozesse, die kovalente Verknüpfungen, nicht kovalente Wechselwirkungen oder intramolekulare Umwandlungen beinhalten. Unter den verschiedenen reversiblen Reaktionen ist die Kondensation von Carbonylen mit Nucleophilen, wie z. B. Aminen zu Iminen von besonderer Bedeutung. Die Bildung und die anschließende Hydrolyse des Imins läuft sehr schnell ab und liegt im neutralen wässrigen Medium fast ausschließlich auf der Seite der Edukte.^[59] Wenn man die Iminstufe z. B. mit Hilfe einer Enzymoberfläche stabilisiert, kann man das Gleichgewicht weiter zur Produktseite verschieben. Dieses Prinzip wurde bereits erfolgreich für die Entwicklung von Proteinliganden verwendet.^[60,61]

Im sogenannten dynamischen Ligationsscreening wird eine Enzymreaktion genutzt, um die Bindung von Fragmenten in einem HTS zu detektieren. Durch die Verwendung von Peptidaldehyden, deren Bindungsort durch die Peptidsequenz bekannt ist, ist es möglich, gezielt nach Bindungspartnern einer definierten Proteintasche zu suchen. Dieser Ansatz wurde zuerst an der SARS-Coronavirus-Hauptprotease angewandt. Mit Hilfe eines Peptidaldehyds konnte ein in S1'-bindendes Aminfragment identifiziert werden.^[60] Aldehyd und Amin alleine zeigen nur moderate Inhibitionswerte, ein Gemisch beider Substanzen war aber deutlich potenter. Diese Methode ermöglicht somit die empfindliche und orts aufgelöste Detektion eines Fragments niedriger Affinität. Mit den bisherigen dynamischen Techniken und konventionellen Fragment-basierten Methoden waren derart niedrigaffine Fragmente nur schwierig bzw. überhaupt nicht zu detektieren. Die kovalente Verbindung und weiterführende Modifizierung beider Fragmente lieferte dann einen nichtpeptidischen SARS-Coronavirus-Inhibitor mit einem K_i -Wert von 2.9 μM .

Für die Entwicklung eines irreversiblen Proteaseinhibitors sollte anstatt eines Peptidaldehyds eine biselektrophile Sonde verwendet werden, die aus einer Aldehydfunktion zur Aminligation, sowie einem Elektrophil zur kovalenten Reaktion mit der Protease besteht. Dabei sollte die Sonde möglichst klein sein, um die stereochemischen Restriktionen während der Wechselwirkung mit dem aktiven Zentrum zu minimieren. Gleichung 1.1 beschreibt die grundlegenden Interaktionen der Sonde mit dem Enzym. Dabei wird deutlich, dass der irreversiblen Reaktion von Sonde und aktivem Zentrum ein Vorgleichgewicht zu

Grunde liegt, welches durch die fehlenden Interaktionsmöglichkeiten der kleinen Sonde mit der Enzymoberfläche weit auf Seiten der Edukte liegen sollte. Daraus resultiert eine Benachteiligung der kovalenten Reaktion, was für das Ligationsscreening essentiell ist, da potentielle Hits das Vorgleichgewicht verschieben und somit die Reaktion der Sonde mit dem aktiven Zentrum begünstigen. Dies ist möglich, da die Proteinoberfläche als eine Art Schablone fungieren kann, welche die Reaktion der Fragmente durch Stabilisierung des Bindungsortes mit Hilfe elektrostatischer Protein-Ligand-Wechselwirkungen begünstigen kann.



Im Vergleich zum konventionellen Hochdurchsatzscreening liefert das dynamische Ligationsscreening verhältnismäßig wenig Hits, da nur Fragmente mit exakt passender räumlicher Ausrichtung detektiert werden. Nanomolare Enzymkonzentrationen sind bei diesem Verfahren völlig ausreichend, da beispielsweise durch die Verwendung eines fluorogenen Substrats sehr empfindlich mit einem Fluorimeter detektiert werden kann. Die dynamische Fragmentligation stellt eine spezifische Anwendung der dynamischen kovalenten Chemie dar, welche auf der Bildung organischer Verbindungen innerhalb eines thermodynamischen Equilibriums beruht. Auch wenn Sonde und Fragmentbibliothek für die Iminbildung als Verknüpfungsreaktion ausgewählt wurden, sollten prinzipiell alle dynamischen Ligrationsreaktionen für dynamische Fragmentligationsassays anwendbar sein.

1.6. Die molekularen Targets

1.6.1. Die West-Nil-Virus NS2B/NS3 Protease

Das West-Nil-Virus ist ein tropisches RNA-Virus der Familie der Flaviviridae mit einer sich stetig vergrößernden geographischen Verteilung, welches in der Lage ist den Menschen zu infizieren.^[62–64] Die eigentlichen Reservoirwirte sind Vögel, von denen die Viren über Mücken auf die anderen Wirte übertragen werden. In 80 % der Fälle verläuft eine Infektion mit dem West-Nil-Virus beim Menschen komplikationsfrei oder unter Ausbildung eines leichten Fiebers (West-Nil-Fieber). Da das Virus jedoch in der Lage ist die

Blut-Hirn-Schranke zu überwinden, kann aus einer Infektion eine Meningitis oder Enzephalitis resultieren. Man schätzt, dass mindestens 50 % der Infektionen neuroinvasiv und davon ungefähr jede zehnte Infektion beim Menschen tödlich verläuft.^[65,66] Ältere Menschen und Personen mit einer Immunschwäche sind dabei am anfälligsten.^[67] Um die Jahrtausendwende breitete sich das Virus erstmals im nordamerikanischen Raum aus, woraufhin, bedingt durch das mediale Interesse, die Forschung nach Möglichkeiten zur Eindämmung von Ansteckung und Ausbreitung intensiviert wurden.

Ein mögliches therapeutisches Ziel ist die virale trypsinartige Serinprotease NS3, welche nur aktiv ist, wenn sie als heterodimerer Komplex mit ihrem Cofaktor NS2B vorliegt (siehe Abb. 1.2).^[68,69] Diese Protease spielt eine essentielle Rolle im Lebenszyklus des Virus und ist über das flavivirale Genus hoch konserviert.^[70] Ein erfolgreicher NS2B/NS3-Inhibitor könnte also gegen eine Vielzahl von Flaviviren effektiv sein.

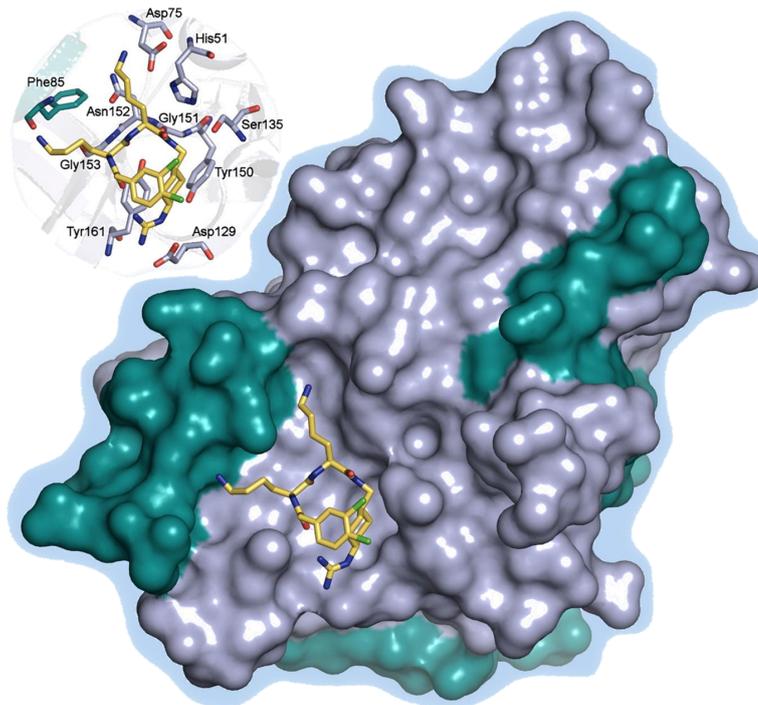


Abb. 1.2. Dargestellt ist die Kristallstruktur eines Komplexes der West-Nil-Virus NS2B-NS3 Protease mit einem Substrat-ähnlichen Inhibitor. Die NS3 Domäne ist grau gefärbt und die NS2B Domäne grün. Der Einsatz oben links zeigt ein detaillierteres Bild der den Inhibitor umgebenden Aminosäurereste. Abgebildet mit Erlaubnis des Rechteinhabers.^[71]

Das aktive Zentrum der Serinprotease besteht aus der katalytischen Triade von Ser135,

His51 und Asp75.^[72] Nach der Bindung eines Substrates an das Enzym erfolgt der nukleophile Angriff des Serins auf die Carbonylgruppe der zu spaltenden Amidbindung.^[73] Anders als bei den Cysteinproteasen muss das Ionenpaar dabei erst gebildet werden. Der Imidazolring des Histidins nimmt das freigesetzte Proton auf, während eine elektrostatische Stabilisierung und die richtige Positionierung des Imidazoliumions durch die Carbonsäureseitenkette eines Aspartats erfolgt. Wie auch bei den Cysteinproteasen stabilisiert das Oxyanionen-Loch, welches aus dem Rückgrat von Ser135 und Gly133 aufgebaut wird, das Oxyanion des tetraedrischen Intermediates. Dieses zerfällt dann durch Hydrolyse in ein Acyl-Enzym-Intermediat, wobei der Aminoteil des Substrats dissoziiert. Anschließend wird der verbliebene Serinester hydrolysiert. Der Carbonsäureteil des gespaltenen Substrats wird freigesetzt und das Enzym steht danach für den nächsten Katalysezyklus bereit.

Die Protease erkennt eine hoch konservierte Substratsequenz aus zwei basischen Aminosäuren (Lys-Arg oder Arg-Arg) zum N-Terminus und einer kurzkettigen Aminosäure (Gly oder Ala) zum C-Terminus, was eine sehr seltene Spezifität darstellt.^[74] Aus diesem Grund ist die Entwicklung von Liganden der Substratbindungstasche vielversprechender als die Entwicklungen von Inhibitoren der Protein-Protein-Wechselwirkungen von NS3 und NS2B. Die ersten Inhibitoren der NS2B/NS3-Protease waren Peptid-basierte Substratanaloga.^[75,76] Darauf aufbauend konnten z. B. Boronsäuren,^[77] Trifluormethylketone^[78] und Peptid-aldehyde^[79] als kovalente Inhibitoren identifiziert werden.^[80]

1.6.2. Die Coxsackie-Virus B3 3C Protease

Das Coxsackie-Virus ist ein global und in Ländern mit niedrigem sozioökonomischen Status besonders häufig vorkommendes RNA-Virus der Familie der Picornaviridae. Es benutzt den Menschen als Reservoirwirt, weshalb eine Infektion nur in seltenen Fällen einen letalen Krankheitsverlauf zeigt.^[81] Man unterscheidet zwischen den Stämmen Coxsackie-Virus-A und -B. Coxsackie-A-Viren führen zu Hand-, Fuß-, Mund-Erkrankungen, Herpangina und gelegentlich sogar zu meningitischen Symptomen.^[82] Coxsackie-B-Viren haben dagegen eine kardiotope Wirkung (Myokarditis und Perikarditis).^[83] Bislange gibt es weder effektive Präventivmaßnahmen noch Behandlungsmöglichkeiten für Krankheiten, die durch Coxsackie-Virus B3 ausgelöst werden.^[84]

Eine essentielle Rolle für die Replikation der Picornaviren spielt die 3C Protease. Sie ist eine ≈ 20 kDa große Chymotrypsin-artige Cysteinprotease, welche allgemein hin als

exzellentes Ziel der antiviralen Wirkstoffforschung angesehen wird.^[85] Man findet sie bei allen Zugehörigen der Picornavirusfamilie, was Inhibitoren der 3C Protease zu potentiellen Breitband-Virustatika macht. Darüberhinaus wird angenommen, dass 3C^{Pro}-Inhibitoren aufgrund der einzigartigen Erkennungssequenz der Protease eine hohe Selektivität zeigen.^[86,87]

Die 3C Protease spaltet das virale Polyprotein zwischen Gln-Gly Paaren, wobei keine humane Protease existiert, die ebenfalls zwischen Gln-Gly spaltet. Das Vorkommen von Gln-Gly Paaren allein ist jedoch nicht ausreichend für eine Spaltung durch die 3C Protease. Wichtig ist zudem noch ein kurzer, ungeladener Aminosäurerest (Thr, Ala oder Val) in P4. Die Coxsackie-Virus B3 3C Protease liegt als Monomer vor und besteht aus zwei " β -barrel"-Domänen, die das katalytische Zentrum bilden. Die Aminosäuren der katalytischen Triade sind His40, Glu71 und das katalytisch aktive Cys147, welche sich in einer Grube zwischen den zwei Domänen befinden.^[86,88] Das Oxyanionen-Loch wird durch die Amidgruppen von Gly145, Gln146 und des katalytischen Cys147 gebildet.^[89,90]

Der proteolytische Mechanismus basiert auf dem Vorhandensein eines Thiolat-Imidazolium-Ionenpaares, welches ein Cystein-Thiolat als gutes Nukleophil liefert. Der Angriff des Thiolats am Carbonylatom der Amidbindung schafft einen tetraedrischen Übergangszustand, welcher durch Wechselwirkungen im Oxyanionen-Loch stabilisiert wird. Der tetraedrische Übergangszustand zerfällt dann in eine Acyl-Enzym-Zwischenstufe und ein erstes Spaltprodukt (Amin). Anschließend wird die Acyl-Enzym-Zwischenstufe hydrolysiert, woraus ein zweites Spaltprodukt (Carbonsäure) und freies Enzym resultiert.^[91]

Die Thiolgruppe des aktiven Zentrums der Cysteinproteasen ist besser polarisierbar ("weicher" nach dem HSAB-Konzept^[92]) als die Hydroxygruppe der Serinproteasen.^[93] Dementsprechend müssen Elektrophile, die speziell für Cysteinproteasen entwickelt wurden, auch weicher als die für Serinproteasen sein. So ist E-64 aufgrund seiner Epoxysuccinylgruppe ein spezifischer Cysteinproteasehemmer und seit seiner Entdeckung 1976 umfangreich zur Erforschung der Cysteinproteasen genutzt worden.^[94] Die Epoxysuccinylgruppe, als das zentrale Strukturelement, wurde dann in verschiedenen Klassen von aktivitätsbasierten Sonden weiterverwendet.^[95,96] Auch wurden die schon erwähnten Chlormethylketone als Sonden verwendet. Eine biotinylierte Chlormethylketonsonde wurde z. B. genutzt um die Rolle der Separase während der Zellteilung zu erforschen.^[97]

Michael-Akzeptoren sind eine weitere wichtige Klasse der irreversiblen Cysteinprotease-Inhibitoren, von denen bereits einige Vertreter klinisches Potential gezeigt haben.

Häufig genutzte Michael-Systeme sind α,β -ungesättigte Carbonylverbindungen und Vinylylsulfone. Bei Inhibitoren dieser Klassen wurde die Carbonylgruppe der zu spaltenden Substrat-Amidbindung durch einen Michael-Akzeptor ersetzt, mit dem das Thiolat-Anion kovalent reagiert. Reprotonierung des α -Carbanions liefert ein stabiles Thioether-Produkt und somit eine inaktivierte Protease. Es existiert eine Vielzahl von Proteaseinhibitoren für das Humane Rhinovirus (HRV) welche auf einem α,β -ungesättigten Carbonylsystem als elektrophile Sonde basieren. Der bekannteste Vertreter dieser Klasse, Rupintrivir (AG7088), inhibiert HRV14 3C^{Pro} mit einem IC₅₀-Wert von 13 nM und zeigt einen EC₅₀-Wert im nanomolaren Bereich gegen 48 verschiedene HRV Serotypen.^[98]

Die Verfügbarkeit von kommerziell erhältlicher, rekombinanter 3C Protease führte zu einer umfassenden Entwicklung von kovalenten Inhibitoren, darunter Peptidaldehyde,^[99] Brommethylketone,^[100] α -Ketoamide^[101] und verschiedener Michael-Systeme.^[102] Bisher ist der peptidomimetische Michael-Akzeptor AG7088 (Rupintrivir) der Firma Agouron Pharmaceuticals (jetzt Pfizer) am erfolgreichsten. Der Inhibitor schaffte es bis in Phase III der klinischen Entwicklung.

2. Zielstellung

Ziel dieser Arbeit war es eine neue Methode zur Detektion niedrig affiner Proteinliganden zu entwickeln, bei der geeignete Ligandfragmente eine kleine elektrophile Sonde ins aktive Zentrum des Enzyms dirigieren sollen. Die folgende Inaktivierung des Enzyms soll analytisch nachvollziehbar sein, was eine eindeutige Identifizierung des aktiven Fragments ermöglicht. Als Zielproteine wurden die NS2B/NS3 Protease des West-Nil-Virus sowie die 3C Protease des Coxsackie-Virus B3 gewählt. Beide Proteine sind therapeutisch relevant und werden als vielversprechende Ziele für die Wirkstoffentwicklung diskutiert.^[85,103] Weder für NS2B/NS3, noch für 3C existieren zugelassene Therapeutika, was einen Bedarf an neuen Leitstrukturen schafft. Somit ergaben sich für diese Arbeit folgende Teilschritte:

Auswahl und Synthese geeigneter biselektrophiler Sonden Es handelt sich bei den Zielproteinen um eine Serin- sowie eine Cysteinprotease. Deshalb bestand der erste Schritt der vorliegenden Arbeit in der Auswahl und Synthese geeigneter biselektrophiler Sonden. Da die zu nutzende Fragmentbibliothek vorrangig aus Aminen besteht, sollte auf eine Aldehydfunktion als eines der elektrophilen Zentren zurückgegriffen werden, weil die Fragmentligation mittels Iminbildung bereits etabliert ist.^[59,61] Das zweite Elektrophil sollte dann gemäß der Anforderungen der Zielprotease ausgewählt werden.

Screening der Fragmentbibliothek Sind geeignete Aldehydsonden gefunden, sollen diese in einem biochemischen Screening-Verfahren für die Detektion niedrigaffiner Proteaseliganden verwendet werden. Dafür wurde angenommen, dass es niedermolekulare Fragmente gibt, die in der Nähe des aktiven Zentrums binden und über ihre Aminofunktion die biselektrophile Sonde so dirigieren, dass das zweite elektrophile Zentrum der Sonde mit der katalytisch aktiven Aminosäure des Enzyms reagieren kann. Das Zielprotein soll dabei als Schablone für den Ligandenaufbau dienen und zwischen passenden und unpassenden Fragmenten diskriminieren. Die Detektion der Fragmente erfolgt somit über eine kovalente

und irreversible Alkylierung des aktiven Zentrums, was sich mit Hilfe eines fluoreszenz-basierten Enzymaktivitätsassays sehr empfindlich detektieren lassen sollte. Für das Screening konnte auf eine kleine Fragmentbibliothek von 850 primären Aminen zurückgegriffen werden.^[104]

Validierung der Screeninghits und weiterführendes Inhibitor-design Nach der Identifizierung einer aktiven Kombination aus Fragment und Sonde, sollte zuerst validiert werden, ob der Assay-Effekt aus einer Reaktion der beiden Bausteine auf der Proteaseoberfläche resultiert und das aktive Zentrum blockiert wird. Anschließend folgt die Resynthese des Fragments, um dieses kovalent mit der Sonde zu verknüpfen. Ein kovalent verknüpfter, aktiver Inhibitor kann dann als Leitstruktur zur weiterführenden Entwicklung von irreversiblen Proteaseinhibitoren dienen.

Teil II.

Ergebnisse und Diskussion

3. Die Entwicklung der Aldehydsonden

3.1. Die Auswahl der elektrophilen Zentren

Die Wahl des Elektrophils der Sonde wird in Abhängigkeit des zu markierenden Ziels nach chemischer Zugänglichkeit und Reaktivität getroffen. Die Reaktivität des Elektrophils ist dabei für die selektive Reaktion der Sonde mit dem Zielprotein von besonderem Interesse. Das Markieren von zellulären Targets ist ein zweistufiger Prozess, der aus der Bindung der Sonde an das aktive Zentrum des Proteins und anschließender Reaktion mit einem Nukleophil gekennzeichnet ist. Wie in Gleichung 1.1 gezeigt, wird die Bindung der Sonde durch die Gleichgewichtskonstante K_1 beschrieben, während die kovalente Reaktion mit dem Protein mit der Geschwindigkeitskonstante k_2 ausgedrückt wird. Je nachdem in welchem Verhältnis diese beiden Werte zu einander stehen, können Selektivität und Reaktivität genau "eingestellt" werden. Dies veranschaulicht jedoch auch, dass die Kopfgruppen nicht wahllos ausgetauscht werden können, will man nicht nur selektiv, sondern auch spezifisch eine bestimmte Protease markieren. In Abhängigkeit von der Art der Protease (z. B. Serin- oder Cysteinprotease) kommen somit verschiedene elektrophile Zentren in Frage. Tabelle 3.1 zeigt eine Zusammenstellung einiger elektrophiler Zentren, die zur Markierung von Proteasen verwendet wurden.

Da Proteasen eine Rolle in nahezu allen biologischen Prozessen spielen, wird deren Fehlregulation mit der Pathogenese einer Vielzahl von Krankheiten und z. B. Bluthochdruck,^[111] Krebs^[10] und Entzündungsprozessen^[6] in Verbindung gebracht. Aus diesem Grund war das Finden geeigneter Proteaseinhibitoren seit jeher von großem Interesse für die medizinische Wirkstoffforschung. Das Hauptziel der Proteasehemmer ist das aktive Zentrum, welches im Allgemeinen auch der wahrscheinlichste Bindungsort für organische Moleküle an einer Protease ist. In einer Studie von Mattos *et al.* über die Bindungsstellen der Schweinepankreas-Elastase konnte gezeigt werden, dass kleine organische Moleküle

Tabelle 3.1. Verschiedene Arten aktivitätsbasierter Sonden

Elektrophil	Proteasetyp	Zielenzym	Lit.
Fluorphosphonate	Serin	Serinhydrolasen	[56]
4-Chlorisocoumarine	Serin	Rhomboidprotease	[105]
Diphenylphosphonate	Serin	Chymotrypsin	[106]
Chlormethylketone	Serin	Chymotrypsin	[107]
	Cystein	Papain	[108]
Acyloxymethylketone	Cystein	Caspase	[109]
α,β -ungesättigte Ketone	Cystein	Caspase	[110]
Epoxysuccinate	Cystein	Cathepsin	[95]

fast ausschließlich die Taschen des aktiven Zentrums besetzen, während zur restlichen Enzymoberfläche keinerlei Bindungsaffinität bestand.^[112,113]

Die bekanntesten aktivitätsbasierten Sonden sind Fluorphosphonate, die sehr erfolgreich für die Entdeckung neuer Enzyme genutzt wurden.^[56] Erwähnenswert sind hier die Arbeiten von Cravatt *et al.*, in denen biotinylierte Fluorphosphonate entwickelt wurden, mit denen verschiedene Serinhydrolasen aus einem komplexen Proteom detektiert, isoliert und identifiziert werden konnten.^[114] Weitere erfolgreiche aktivitätsbasierte Sonden sind Diphenylphosphonate und Isocoumarine^[105,106] oder die von Schöllmann und Shaw in den 60er Jahren entwickelten Tosylphenylalanylchlormethylketone (TPCK).^[107] Diese dienen als spezifische Inhibitoren für Trypsin und Chymotrypsin. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass Peptidyl-Chlormethylketone auch in der Lage sind Cysteinproteasen zu inhibieren. Dabei wird der Thiolrest des Cysteins, unter Ausbildung eines stabilen Thioethers, alkyliert (siehe Abb. 3.1).^[115] Aus diesem Grund wurden Chlormethylketone zur Entwicklung einer Sonde in dieser Arbeit eingesetzt.

Chlormethylketon-basierte Inhibitoren sind aufgrund ihrer hohen Reaktivität und der damit einhergehenden mangelhaften Selektivität für *in vivo* Applikationen ungeeignet. Sie reagieren nicht nur mit Cystein- und Serinproteasen sondern auch mit freien Thiolgruppen

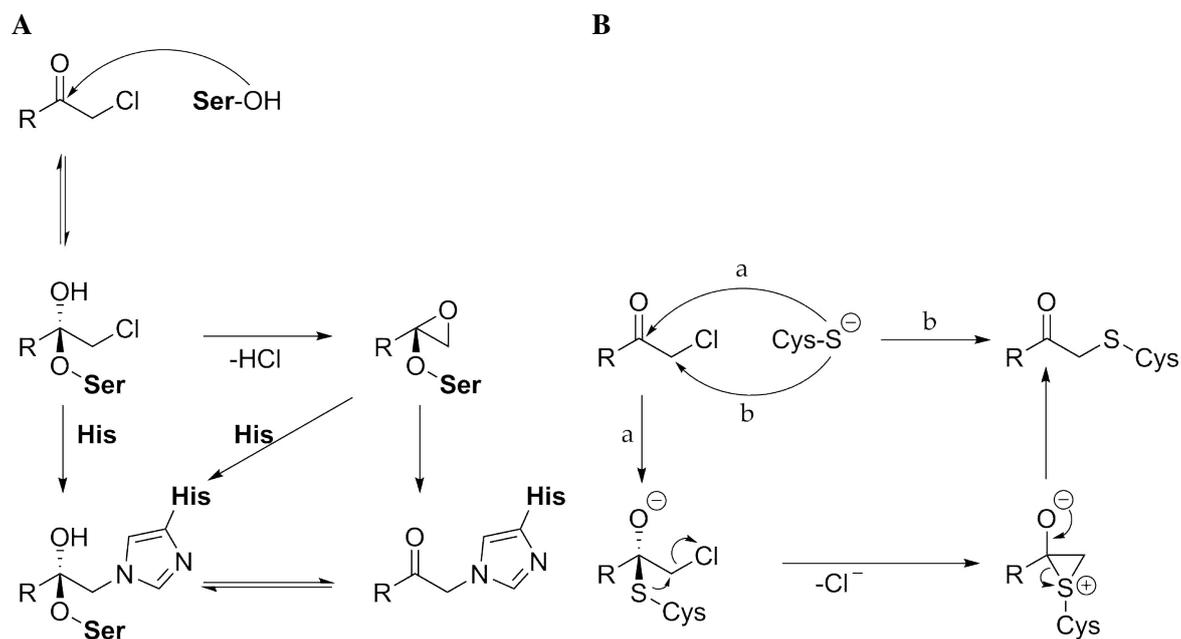
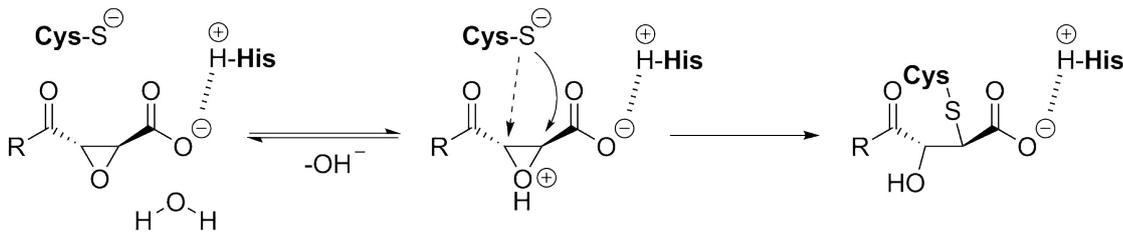


Abb. 3.1. Abgebildet ist der angenommene Mechanismus der Inhibition der Serinproteasen (**A**) sowie Cysteinproteasen (**B**) durch Chlormethylketone.^[91]

z. B. von Glutathion. Einige Erfolge konnten damit erzielt werden, wenn das Chlorid durch Fluorid ersetzt wurde. Die verringerte Reaktivität unterband die Reaktion mit Glutathion, verminderte aber auch die Reaktivität mit den Serinproteasen.^[116] Es sollte also möglich sein, einen irreversiblen Inhibitor aus dem dynamischen Ligationscreening, hinsichtlich Selektivität und Reaktivität im Nachhinein zu optimieren.

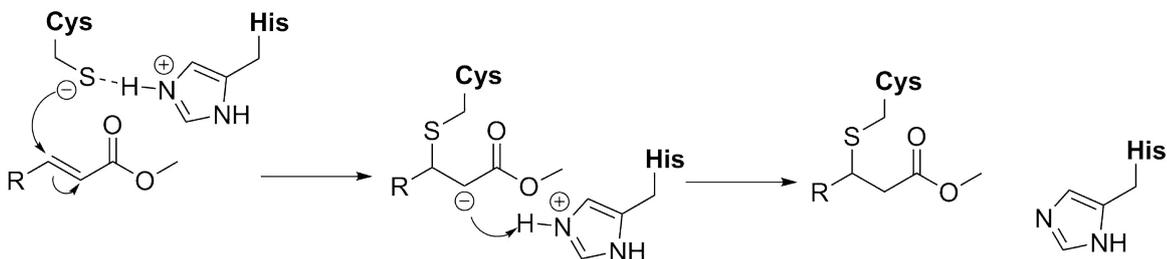
Eine weitere in dieser Arbeit verwendete Sondenart sind Oxirane bzw. Epoxysuccinate. Diese Klasse wurde 1978 von Hanada *et al.* entdeckt, als sie den peptidischen Proteaseinhibitor E-64 aus *Aspergillus japonicus* isolierten.^[117] Epoxysuccinate stellten sich als potente und spezifische Cysteinproteasehemmer heraus, die nicht mit Serin-, Aspartat- oder Metalloproteasen sowie freien Thiolen reagieren. Die symmetrische Succinat-Struktur liefert sogar zwei elektrophile Zentren, die vom Thiolat angegriffen werden können, was eine erhöhte Flexibilität im Bindungsmodus mit der Protease ermöglicht (siehe Schema 3.1). Dies macht diese Sondenart zu einem idealen Kandidaten für das dynamische Ligations-screening.

Nach der Aufklärung der Wirkungsweise von Epoxysuccinaten lag es nahe Inhibitor-Derivat zu entwickeln, bei denen die Oxirangruppe durch ein ungesättigtes Michael-System



Schema 3.1 Dargestellt ist der detaillierte Mechanismus der Inhibition einer Cysteinprotease durch ein Epoxysuccinat. Zwei elektrophile Zentren stehen für den Angriff des Thiolats zur Verfügung, nachdem das Epoxy-Sauerstoffatom durch ein Wassermolekül protoniert wurde.^[91]

ersetzt wurde. Der erste Inhibitor dieser Art war DC-11, bei dem anstatt des Epoxids ein Fumarat verwendet wurde.^[94] Ungesättigte Ester sind nicht in der Lage Serinproteasen zu inhibieren, doch neigen sie unter Assaybedingungen zur Reaktion mit einfachen Thiolen wie z. B. Mercaptoethanol. Da jedoch vielversprechende präklinische Ergebnisse mit dem Michael-System-Inhibitor Rupintrivir erzielt werden konnten,^[118] wurde eine α,β -ungesättigte Carbonylsonde für das dynamische Ligationscreening entwickelt.



Schema 3.2 Dargestellt ist der detaillierte Mechanismus der Inhibition einer Cysteinprotease durch einen α,β -ungesättigten Ester.^[91]

Als Sonde für das Hochdurchsatz-Screening wurden somit drei verschiedene Aldehyde ausgewählt, die sich in der Art des zweiten Elektrophils, welches für die Reaktion mit dem aktiven Zentrum der Protease zuständig ist, unterscheiden. Dabei handelte es sich um das Chlormethylketon 4-Chlor-2,2-dimethyl-3-oxobutanal **AS1**, den α,β -ungesättigten Ester *E*-4-Oxobut-2-ensäureethylester **AS2** und den Epoxidester 2*S*,3*S*-Epoxy-4-oxobutansäureethylester **AS3** (siehe Abb. 3.2).

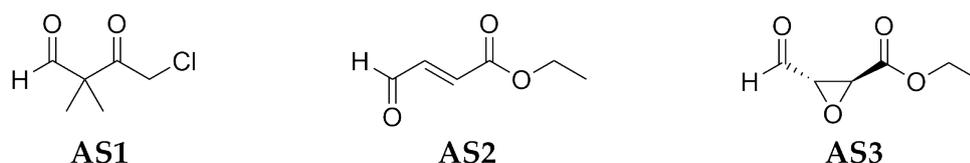


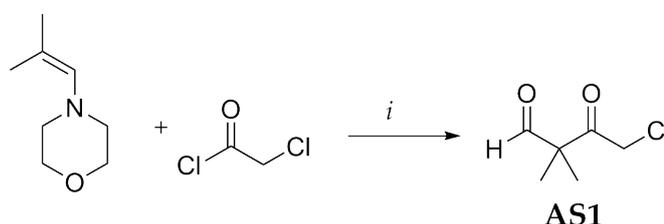
Abb. 3.2. Dargestellt sind die drei verwendeten Aldehydsonden **AS1**, **AS2** und **AS3**.

3.2. 4-Chlor-2,2-dimethyl-3-oxobutanal **AS1**

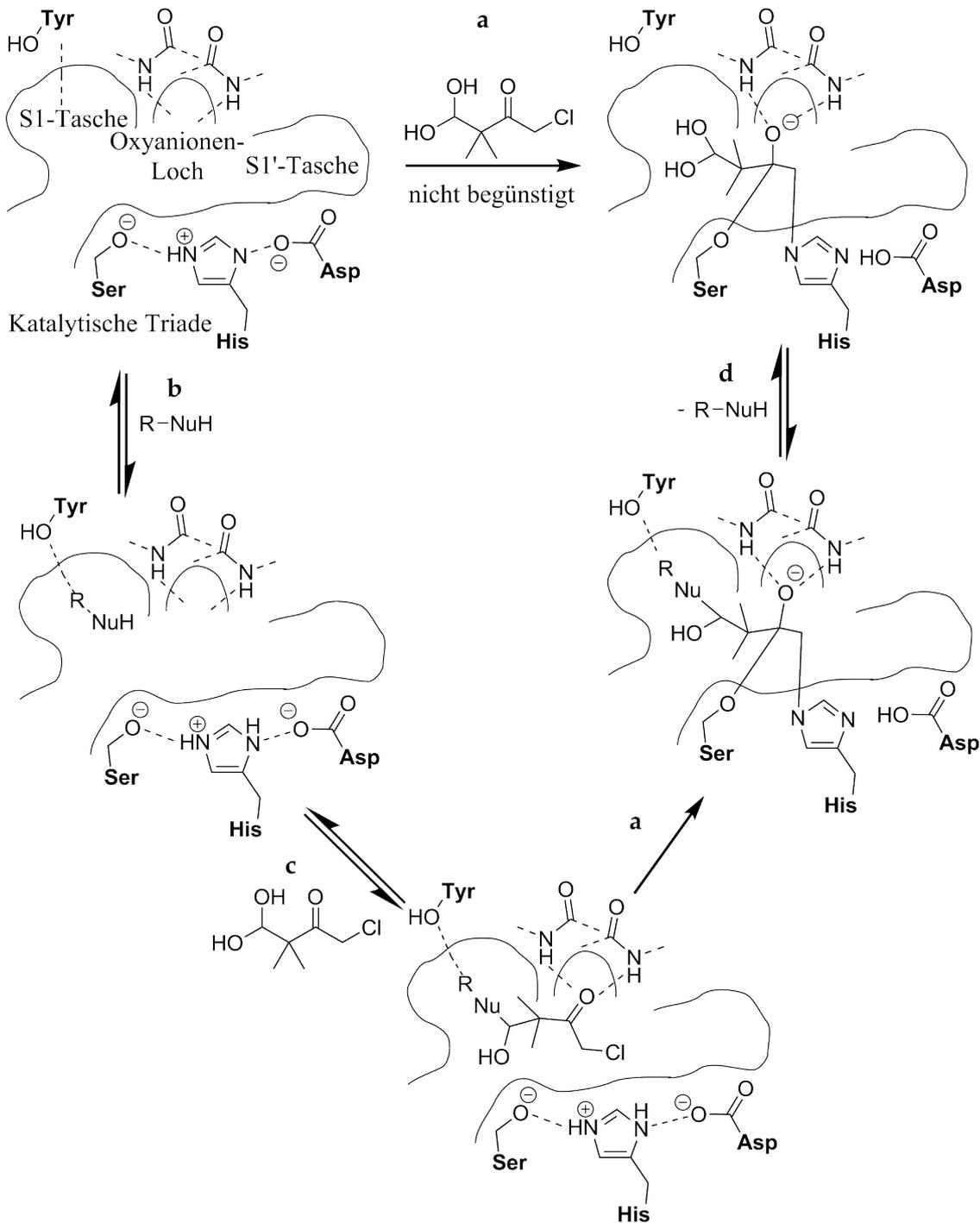
Die kleinste mögliche Chlormethylketonsonde ist Chlormethylglyoxal. Die Synthese dieser Verbindung konnte bereits etabliert werden.^[119] Jedoch zeigte sich, dass Chlormethylglyoxal nur unter sauren Bedingungen stabil ist und im basischen Milieu sehr schnell zerfällt. Da beide Proteaseassays unter schwach basischen Bedingungen durchgeführt werden, konnte Chlormethylglyoxal nicht verwendet werden.

Die nächstgrößere Sonde ist 4-Chlor-3-oxobutanal. Hier gelang die Synthese der halogenierten Spezies nur mit schlechten Ausbeuten, da die CH-azide Position 2 mit den gängigen Halogenierungsmitteln bevorzugt reagiert. Die aktivierte Position 2 ist auch verantwortlich für die Neigung zur Polymerisation durch eine intermolekulare Knoevenagel-Reaktion, weshalb 4-Chlor-3-oxobutanal nicht als Sonde verwendet werden konnte. Abhilfe schaffte eine zweifache Methylierung von Position 2, was die intermolekularen Reaktionen unterband.

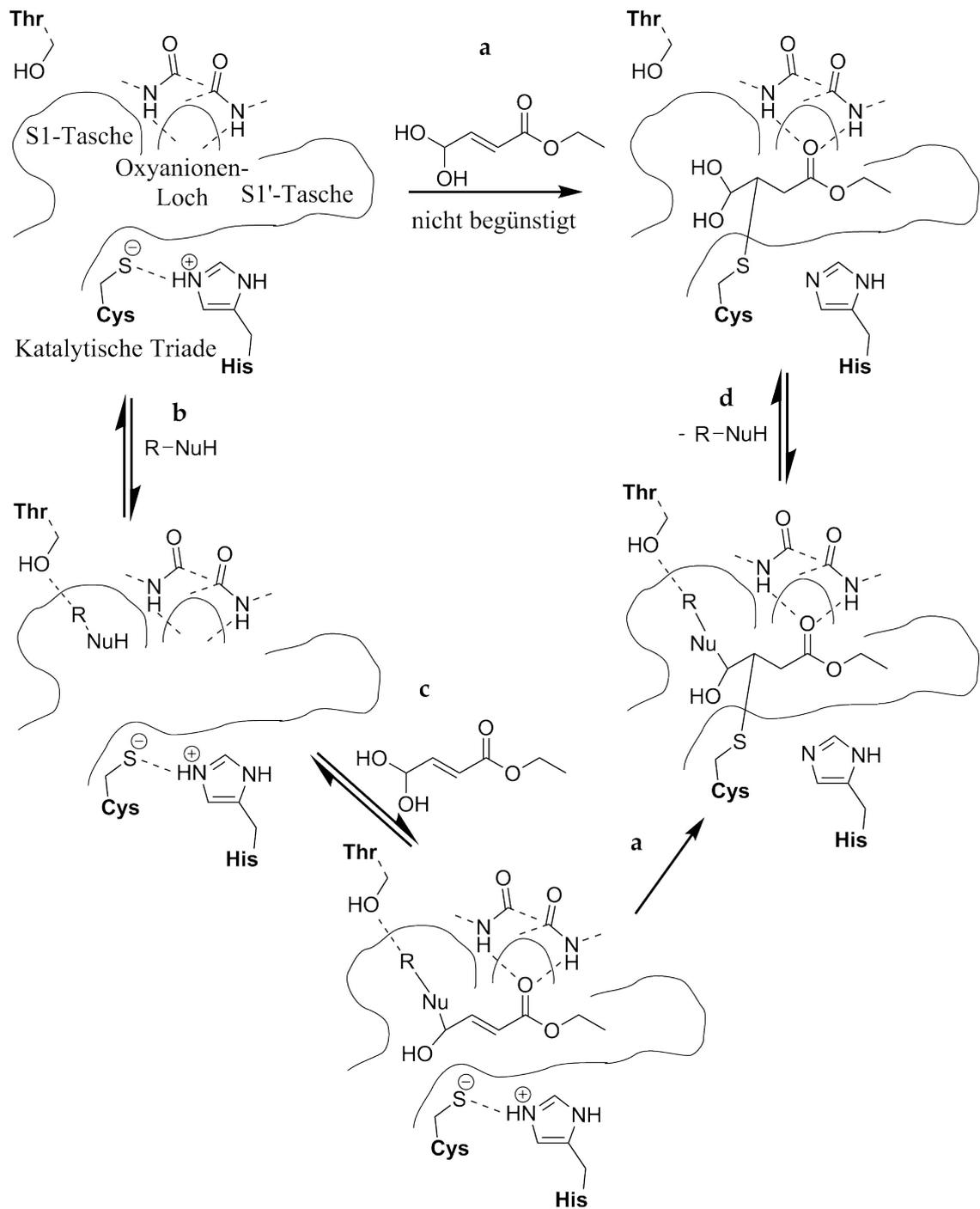
4-Chlor-2,2-dimethyl-3-oxobutanal **AS1** konnte in einer zweistufigen Synthese, ausgehend von Morpholin und Isobutanal, erhalten werden. Die Kondensation von Morpholin und Isobutanal lieferte 1-*N*-Morpholinisobuten,^[120] welches nach Ditgens *et al.* mit Chloressigsäurechlorid umgesetzt wurde.^[121] Nach wässriger Aufarbeitung und Säulen-chromatographie konnte **AS1** mit 54 % der theoretischen Ausbeute erhalten werden (siehe Schema 3.3).



Schema 3.3 Schematische Darstellung des Syntheseweges von **AS1**. Reagenzien und Bedingungen: (i) 1. Et₂O, 35 °C (reflux), 2 h; 2. H₂O, NaHCO₃, pH 4, Et₂O, 3 d.



Schema 3.4 Dargestellt ist das hypothetische Konzept der dynamischen Fragmentligation am Beispiel der NS2B/NS3 Protease des West-Nil-Virus. NuH symbolisiert ein Nukleophil. Dies kann ein z. B. ein Amin sein. **a:** Die Reaktion der biselektrophilen Sonde mit dem aktiven Zentrum (hier Serin bzw. Histidin); **b:** Bindung des nukleophilen Fragments unter Ausbildung von Interaktionen mit den Aminosäureresten der S1-Tasche (hier: z. B. Tyrosin); **c:** Dirigierung der biselektrophilen Sonde ins aktive Zentrum unter Ausbildung einer kovalenten Bindung zum Nukleophil (z. B. Iminbindung); **d:** Dissoziation des Nukleophils.



Schema 3.5 Dargestellt ist das hypothetische Konzept der dynamischen Fragmentierung am Beispiel der 3C Protease des Coxsackie-Virus. NuH symbolisiert ein Nukleophil. Dies kann ein z. B. ein Amin sein. **a:** Die Reaktion der biselektrophilen Sonde mit dem aktiven Zentrum (hier Cystein); **b:** Bindung des nukleophilen Fragments unter Ausbildung von Interaktionen mit den Aminosäureresten der S1-Tasche (hier: z. B. Threonin als Wasserstoff-Donor oder -Akzeptor); **c:** Dirigierung der biselektrophilen Sonde ins aktive Zentrum unter Ausbildung einer kovalenten Bindung zum Nukleophil (z. B. Iminbindung); **d:** Dissoziation des Nukleophils.

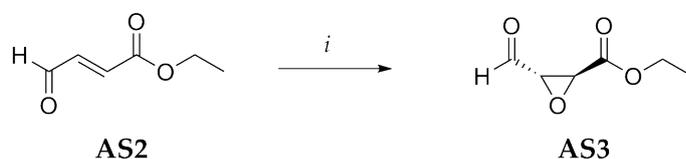
Das hypothetische Konzept der dynamischen Fragmentligation mit der Sonde **AS1** ist exemplarisch an einer Serinprotease in Schema 3.4 erläutert.

3.3. *E*-4-Oxobut-2-ensäureethylester **AS2**

Die kleinste mögliche Aldehydsonde mit einer α,β -ungesättigten Esterfunktion ist 4-Oxobut-2-ensäuremethylester. Da *E*-4-Oxobut-2-ensäureethylester **AS2** als äquivalentes Derivat kommerziell erhältlich ist, wurde auf eine Synthese verzichtet und **AS2** in 96 %iger Reinheit von Alfa Aesar bezogen. Das hypothetische Konzept der dynamischen Fragmentligation mit der Sonde **AS2** ist exemplarisch an einer Cysteinprotease in Schema 3.5 erläutert.

3.4. 2*S*,3*S*-Epoxy-4-oxobutansäureethylester **AS3**

Die kleinste Epoxidsonde ist 2,3-Epoxypropanal (Glycidal). Da aber eine stereoselektive Epoxidierung von **AS2** bekannt ist^[122] und erfolgreiche Epoxid-Inhibitoren, wie z. B. E-64,^[123] eine Epoxysuccinyl-Struktur tragen, wurde 2,3-Epoxy-4-oxobutansäureethylester als Sonde ausgewählt. Dafür wurde *E*-4-Oxobut-2-ensäureethylester **AS2** in einer asymmetrischen organokatalytischen Epoxidierung nach Marigo *et al.* mit (S)-(-)- α,α -Diphenyl-2-pyrrolidinmethanoltrimethylsilylether und Wasserstoffperoxid zu 2*S*,3*S*-Epoxy-4-oxobutansäureethylester **AS3** umgesetzt (siehe Schema 3.6). Die Synthese¹ verlief in einem Schritt mit mäßiger Ausbeute aber hoher Stereoselektivität ($dr = 88:12$), welche mittels NMR bestimmt wurde und mit dem Literaturwert übereinstimmte.^[122] Die Rolle von **AS3** während der dynamischen Fragmentligation sollte analog zu der von **AS2** sein, welche in Schema 3.5 erläutert wird.



Schema 3.6 Schematische Darstellung des Syntheseweges von **AS3**. Reagenzien und Bedingungen: (i) kat. (S)-(-)- α,α -Diphenyl-2-pyrrolidinmethanoltrimethylsilylether, H_2O_2 , DCM, RT, 4 h.

¹Die Synthese von **AS3** konnte im Rahmen der Diplomarbeit von Sascha Weisheit realisiert werden.^[124]

4. Dynamisches Ligationsscreening an der West-Nil-Virus NS2B/NS3 Protease

4.1. Aufbau eines Assays zur dynamischen Fragmentligation

Als Proteasesubstrat wurde das fluorogene Peptid Boc-Gly-Lys-Arg-AMC, mit einem experimentell ermittelten K_M -Wert von $115 \pm 15 \mu\text{M}$ bei pH 8.0, verwendet. Alternativ können aber auch folgende Substrate verwendet werden:

Cbz-Arg-Thr-Lys-Arg-AMCA-NH ₂	K_M -Wert = $60 \pm 21 \mu\text{M}$	siehe 10.1
Cbz-Gly-Lys-Arg-pNA	K_M -Wert = $75 \pm 9 \mu\text{M}$	siehe 10.2

Entgegen den allgemeinen Literaturvorschriften^[125] wurde die WNV NS2B/NS3 Protease im Assaypuffer 10 mM MOPS-NaOH bei pH 8.0 und 20 % (v/v) Glycerin gemessen. Damit sollte ein Überschuss an primären Aminen vermieden werden, der sich im späteren Ligationsscreening ungünstig auswirken könnte, da primäre Amine mit der biselektrophilen Sonde reagieren könnten. Weitere Zusätze zum Messpuffer (z. B. NaCl, KCl oder Brij 35) wurden bewusst vermieden, um das System so einfach wie möglich zu halten. DMSO im Testansatz wirkt sich deutlich inhibierend auf die Enzymaktivität aus. Da sowohl die Fragmente und Sonden, als auch die fertigen Inhibitoren in DMSO gelöst waren, musste darauf geachtet werden, möglichst wenig DMSO in die Assaylösung zu bringen (max. 5 % (v/v); siehe 8.2.1).

4.2. Dynamisches Ligationsscreening mit AS1

Wie erwartet stellt die Chlormethylketonsonde **AS1** einen schwachen, irreversiblen Inhibitor, mit einem $k_{\text{inact}}/K_{\text{I}}$ -Wert von $0.16 \pm 0.01 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ dar (siehe Abb. 4.1). Für das Ligationsscreening wurde eine Konzentration von $320 \mu\text{M}$ gewählt, da die Aktivität der Protease bei dieser Konzentration um ca. 20 % verringert wird.

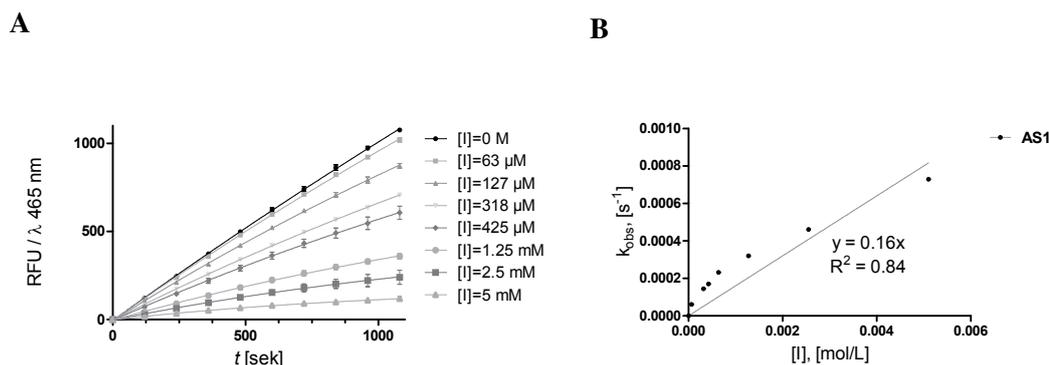


Abb. 4.1. Abgebildet ist die Fluoreszenzintensität in RFU gegen die Messzeit in Sekunden bei verschiedenen Konzentrationen von **AS1** beim NS2B/NS3 Proteaseassay (A), sowie die korrespondierenden k_{obs} -Werte, aufgetragen gegen die Inhibitorkonzentration, zur Bestimmung des $k_{\text{inact}}/K_{\text{I}}$ -Wertes (B).

Insgesamt wurden 264 primäre Amine bei einer Konzentration von $320 \mu\text{M}$ für das Ligationsscreening eingesetzt. Gemäß der Arbeitshypothese wurde ein Amin gesucht, welches die Inhibition der Aldehydsonde signifikant verstärkt (siehe Abb. 4.2). Keines der verwendeten Amine steigerte jedoch die inhibitorische Potenz der Sonde **AS1**. Das Screening wurde als erfolglos verworfen und eine andere Sonde verwendet.

4.3. Dynamisches Ligationsscreening mit AS2

α,β -ungesättigte Ester sind kovalent-bindende Cysteinproteaseinhibitoren. Eine Verwendung als Serinproteaseinhibitoren ist noch nicht bekannt. So ist es auch nicht verwunderlich, dass die Acrylsäureestersonde im WNV NS2B/NS3-Proteaseassay den kinetischen Verlauf eines reversibel-bindenden Inhibitors, mit einem IC_{50} -Wert von $3.9 \pm 0.3 \text{ mM}$, zeigt. Da das dynamische Ligationsscreening mit reversiblen peptidischen Sonden etabliert wurde, konnte **AS2** verwendet werden, um zu überprüfen, ob das Prinzip der Fragmentdetektion

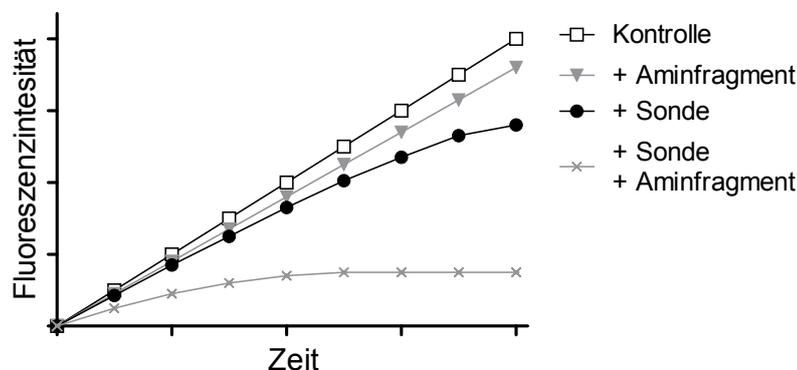


Abb. 4.2. Dargestellt ist der postulierte zeitliche Verlauf der Fluoreszenzintensität bei einem Proteaseassay während der dynamischen Fragmentligation mit einer biselektrophilen Sonde. Kontrolle steht für den Proteaseassay ohne Zusätze von Sonde oder Fragment. Die freiwerdende Fluoreszenz resultiert aus der Umsetzung eines fluorogenen Substrats durch die Protease. Die Zugabe des Aminfragments kann zu einer leichten Schwächung des Anstiegs führen, die Zugabe der biselektrophilen Sonde zum Assay, liefert ebenfalls eine Schwächung des Anstiegs sowie gegebenenfalls Plateaubildung. Gibt man eine Mischung aus Sonde und einem geeigneten Fragment zum Assay, wird kaum noch ein Fluoreszenzsignal generiert.

auch mit kleinen organischen Molekülen funktioniert, von denen der genaue Bindungsort am Enzym nicht bekannt ist. Hierbei kann jedoch eine allosterische Inhibition von Sonde und Fragment nicht ausgeschlossen werden und möglicherweise zu falsch positiven Ergebnissen führen.

Die Sonde AS2 wurde im Ligationssassay in einer Konzentration von 1.7 mM eingesetzt, was einer Proteasehemmung von ungefähr 15 % entspricht. Die Konzentration der Aminfragmente im Assay betrug 320 μM . Insgesamt wurden 823 primäre Amine gescreent, wovon eine Verbindung die Aktivität der Protease signifikant verstärkte (siehe Abb. 4.3).

4.3.1. Synthese des Aminfragmentes F1

Bei dem aktiven Aminfragment **F1** handelte es sich um *N*-Acetyl-3-amino-10,11-dihydro-5*H*-dibenz[*b,f*]azepin, welches über eine dreistufige Synthese zugänglich war. Dabei wurde zuerst das sekundäre Amin mit Essigsäurechlorid acyliert^[126] und anschließend das aromatische System in einer elektrophilen aromatischen Substitution mit einem *in situ* erzeugten Nitroniumion nitriert. Die Nitrierung verlief weitestgehend stereoselektiv, da sowohl der

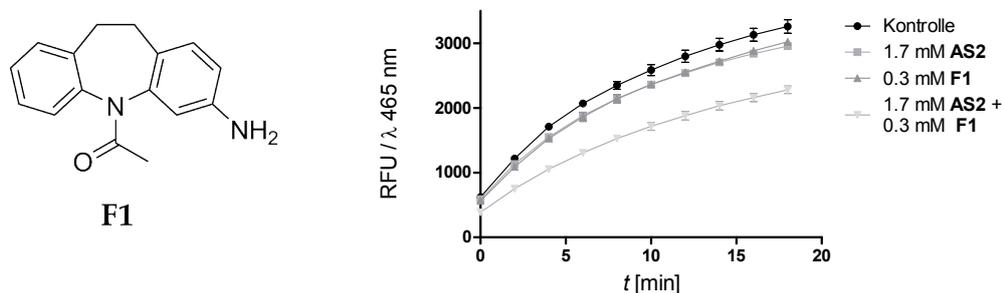
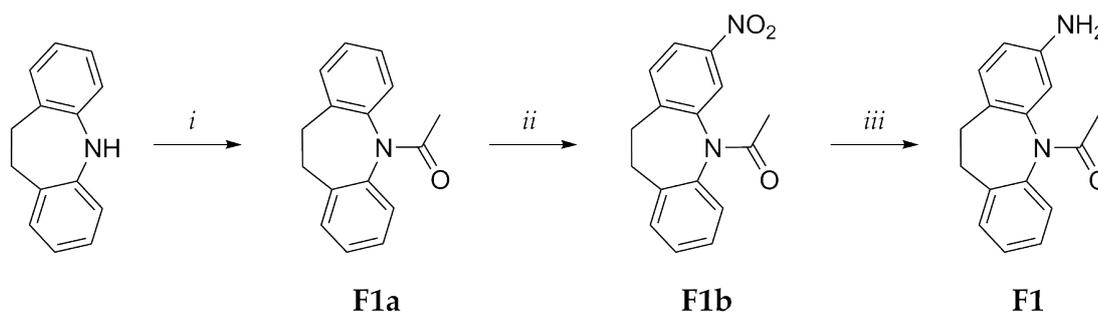


Abb. 4.3. Abgebildet ist das aktive Aminfragment **F1** (**links**), sowie der zeitliche Verlauf der Fluoreszenzintensität in RFU während des Ligationssassays bei verschiedenen Zusätzen (**rechts**). Die Positivkontrolle steht für einen uninhibierten Assay, bei dem anstatt eines Inhibitors eine äquivalente Menge DMSO verwendet wurde. Gemessen am linearisierten Anstieg inhibiert die Sonde **AS2** hier die Proteaseaktivität um ca. 11 % während das Aminfragment **F1** die Aktivität um ca. 7 % absenkt. Setzt man jedoch eine Mischung aus **F1** und **AS2** ein, ist ein überadditiver Effekt zu verzeichnen, was sich an einem Abfall der Proteaseaktivität um 27 % bemerkbar macht.

Amid- als auch der Alkylsubstituent die Nitrierung an Position 3 des Aromaten begünstigen. Die Reduktion der Nitrogruppe mit Wasserstoff und einem Palladium/Aktivkohle-Katalysator lieferte das aromatische Amin **F1** mit einer Gesamtausbeute von 26 % über drei Stufen (siehe Schema 4.1).



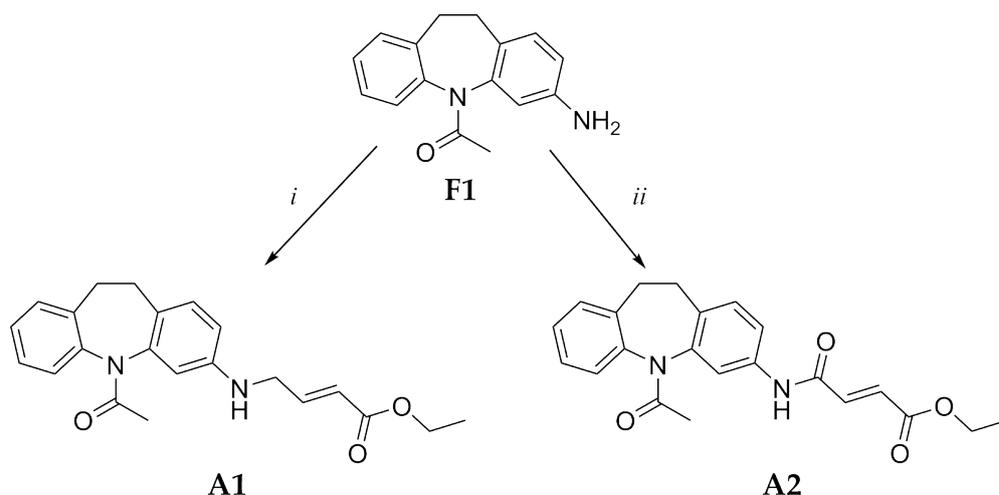
Schema 4.1 Schematische Darstellung des Syntheseweges von **F1**. Reagenzien und Bedingungen: (i) Acetylchlorid, Toluol, MW 90 °C, 1 h (ii) KNO_3 , H_2SO_4 , 0 °C, 12 h (iii) H_2 , kat. Pd/C, MeOH, 12 h.

4.3.2. Kovalente Verknüpfung von Sonde und Fragment

Um die aktive Kombination von Sonde und Fragment in einen Inhibitor umzuwandeln, mussten beide Komponenten kovalent verknüpft werden. Die Art der Verknüpfung sollte dabei möglichst nah am Zustand auf der Proteinoberfläche, während der dynamischen Fragmentligation, sein. Geht man davon aus, dass beide Komponenten ausschließlich über die Iminbildung miteinander reagieren können, sind zwei verschiedene Produkte möglich. Zum einen ein Halbaminal, welches als Zwischenstufe bei der Iminbildung durchlaufen wird, zum anderen das Imin selbst. Der bedeutendste Unterschied bei beiden Strukturen ist dabei die Hybridisierung des elektrophilen Carbonylatoms. Liegt in der Halbaminalstruktur noch eine sp^3 -Hybridisierung vor, welche wiederum zwei Stereoisomere ermöglicht, so ist das Kohlenstoffatom in der finalen Iminstruktur wieder sp^2 -hybridisiert. Daraus ergeben sich zwei verschiedene räumliche Ausrichtungen des Kohlenstoffatoms und somit mindestens drei mögliche Konformationen des Inhibitors. Aus diesem Grund mussten zwei Syntheserouten entwickelt werden, die die möglichen räumlichen Ausrichtungen berücksichtigen. Dies gelang einerseits durch eine reduktive Aminierung der beiden Assaykomponenten, andererseits durch die Acylierung von *N*-Acetyl-3-amino-10,11-dihydro-5*H*-dibenz[*b,f*]azepin mit Fumarsäuremonoethylester (siehe Schema 4.2). Die Reduktive Aminierung wurde mit Natriumcyanoborhydrid in Methanol durchgeführt und lieferte *N*-Acetyl-(10,11-dihydro-5*H*-dibenz[*b,f*]azepin-3-yl)amino-(*E*)-2-butensäureethylester **A1** in 25 % Ausbeute. Die Acylierung in Acetonitril mit *N,N'*-Dicyclohexylcarbodiimid und Fumarsäuremonoethylester lieferte *N*-Acetyl-(10,11-dihydro-5*H*-dibenz[*b,f*]azepin-3-yl)amino-4-oxo-(*E*)-2-butensäureethylester **A2** mit einer Ausbeute von 23 %.

4.3.3. Diskussion der Ergebnisse

Beide Verbindungen **A1** und **A2** stellen schwache reversible Inhibitoren der West-Nil-Virus NS2B/NS3-Protease mit IC_{50} -Werten von ca. 1 mM dar. Damit konnte durch die Verknüpfung der Sonde mit einem Fragment, der IC_{50} -Wert um den Faktor 3.5 verringert werden. Dies bestätigt die Arbeitshypothese, dass Sonde **AS2** und Fragment **F1** auf der Proteaseoberfläche miteinander reagieren und die Selbstorganisation einer inhibitorisch wirksameren Verbindung ermöglichen. Die Inhibitionswerte sind für eine vernünftige Leitstrukturentwicklung nicht ausreichend. Jedoch ist zu erwähnen, dass bei diesem Ansatz



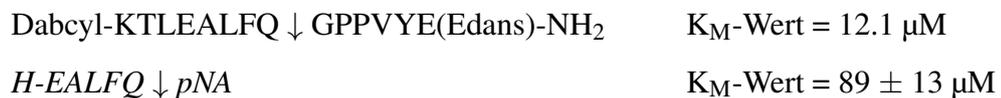
Schema 4.2 Schematische Darstellung der Synthesewege von **A1** und **A2**. Reagenzien und Bedingungen: (i) (*E*-4-Oxobut-2-ensäureethylester, NaCNBH₃, MeOH, RT, 12 h) (ii) Fumarsäuremonoethylester, DCC, NEt₃, MeCN, RT, 12 h.

keine Sonde mit bekannter Reaktivität bei Serinproteasen verwendet wurde. Nichtsdestotrotz zeigen diese Ergebnisse, dass es möglich ist den IC₅₀-Wert einer Sonde durch die Verknüpfung mit einem Fragment signifikant zu verringern. Findet man ein aktives Fragment für eine Sonde, die einen IC₅₀-Wert z. B. im µM-Bereich hat, sollte man zu Verbindungen gelangen, die für die Wirkstoffentwicklung interessant sind.

5. Dynamisches Ligationsscreening an der Coxsackie-Virus B3 3C Protease

5.1. Aufbau eines Assays zur dynamischen Fragmentligation

Essenziell für die Substratumsetzung durch die CVB3 3C Protease ist das Vorhandensein einer Gln-Gly-Spaltstelle. Darüber hinaus diskriminieren hauptsächlich die Enzymtaschen S2 und S4 zwischen geeigneten Substraten, wobei eine Präferenz der Protease für Phe in der Position P2 und für Ala in der Position P4 besteht.^[127] Die Aktivität des rekombinanten Enzyms aus *E. coli* wird *in vitro* daher mit Hilfe eines Peptidsubstrats gemessen, dessen Sequenz aus dieser Präferenz abgeleitet ist:



Beide Substrate wurden von der Firma Bachem bezogen und enthalten die Erkennungssequenz Glu-Ala-Leu-Phe-Gln. Dabcyl-KTLEALFQGPPVYE(Edans)-NH₂ ist ein FRET-Substrat¹, welches eine spezifische Eigenfluoreszenz durch den Förster-Resonanzenergietransfer unterdrückt. Nach Spaltung des Peptids durch die Protease wird der Abstand der Dabcyl-zur Edans-Gruppe zu groß, so dass eine Fluoreszenzemission mit einer Wellenlänge von 538 nm detektiert werden kann, wenn vorher mit einer Lichtquelle der Wellenlänge 355 nm angeregt wurde. Auch bei dieser Protease wurde auf Zusätze für die Pufferlösung weitestgehend verzichtet. So ist die Pufferlösung lediglich aus 100 mM HEPES-NaOH (pH

¹Der K_M-Wert wurde von Mitarbeitern der AG Hilgenfeld im Institut für Biochemie der Universität zu Lübeck bestimmt.

7.5) und 1 mM EDTA zusammengesetzt. Obwohl 3C^{Pro} eine Cysteinprotease ist, kann auf reduzierende Reagenzien wie Dithiotreitol (DTT) im Assay verzichtet werden, da dadurch die Aktivität der Protease, wenn sie frisch exprimiert wurde, nicht signifikant gesteigert wird.^[128]

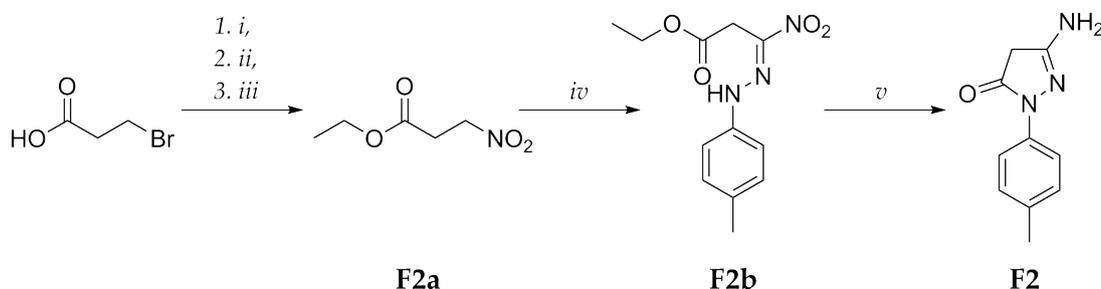
5.2. Dynamisches Ligationsscreening mit AS1

Die Chlormethylketon-Sonde **AS1** zeigte sich bei der CVB3 3C Protease deutlich aktiver als bei der WNV NS2B/NS3 Protease, was sich auch an dem höheren $k_{\text{inact}}/K_{\text{I}}$ -Wert von $29.4 \pm 0.8 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ erkennen lässt (siehe Tabellenanhang A.1, S. 177). Für das Ligationsscreening wurde **AS1** in einer Konzentration von 10 μM eingesetzt, was die Aktivität der Protease über einen Zeitraum von 10 Minuten um circa 20 % verminderte. Es wurden 750 primäre Amine bei einer Konzentration von 320 μM gescreent, wovon Fragment **F2** die Aktivität der Sonde signifikant verstärkte (siehe Abb. 5.2).

5.2.1. Synthese des Aminfragmentes F2 und F3

Das Aminfragment **F2** konnte in einer fünfstufigen Synthese ausgehend von kommerziell erhältlicher 3-Brompropansäure hergestellt werden (siehe Schema 5.1). Die erste Stufe war die Umsetzung der Carbonsäure mit Thionylchlorid und Ethanol, welche den Ethylester in 83 %iger Ausbeute lieferte. Anschließend musste der Bromsubstituent unter klassischen Finkelstein-Bedingungen^[129] durch Iodid ersetzt werden, um das Molekül für die Einführung einer Nitrogruppe reaktiv genug zu machen. Die Umhalogenierung lieferte nach Normalphasen-Chromatographie 3-Iodpropansäureethylester in 93 %iger Ausbeute. Das Iodalkan wurde dann unter Schutzgas-Atmosphäre und Lichtausschluss mit Silbernitrit (welches direkt vor der Verwendung durch Reaktion einer wässrigen Lösung von Silbernitrat mit Kaliumnitrit frisch hergestellt werden musste) in Diethylether umgesetzt, was das entsprechende Nitroalkan in 92 %iger Ausbeute lieferte. Die analytischen Daten entsprechen der Literatur.^[130] 3-Nitropropansäureethylester wurde dann in Ethanol vorgelegt und mit 2.1 Äquivalenten Natrium versetzt. Anschließend wurde eine äquimolare, wässrige Lösung des frisch hergestellten Diazoniumsalzes von *p*-Toluidin zugetropft, was nach Extraktion und Reinigung mittels HPLC 3-Nitro-3-(2-(*p*-tolyl)hydrazono)propansäureethylester lieferte. Die Reduktion der Nitroverbindung in

Methanol mit Ammoniumformiat und Zink lieferte schließlich das gewünschte Aminfragment 5-Amino-2-(*p*-tolyl)-2,4-dihydro-3*H*-pyrazol-3-on **F2** in 90 %iger Ausbeute.



Schema 5.1 Schematische Darstellung des Syntheseweges von **F2**. Reagenzien und Bedingungen: (i) SOCl_2 , EtOH, reflux, 2 h (ii) NaI, Aceton, RT, 1 h (iii) Argon-Atmosphäre, AgNO_2 , Et_2O , 0 °C, 12 h (iv) 1. Na, EtOH; 2. *p*-Toluidin, HCl, NaNO_2 , H_2O , 0 °C, 2 h (v) Ammoniumformiat, Zinkpulver, MeOH, RT, 5 d.

Mit dem synthetisierten Aminfragment **F2** konnten die Ergebnisse des Screenings nicht reproduziert werden. Eine LC/MS-Analyse des Moleküls aus der Aminbibliothek zeigte eine einheitliche Verbindung, welche aber 16 Da zu leicht für die angenommene Struktur war (siehe Abb. 5.1).

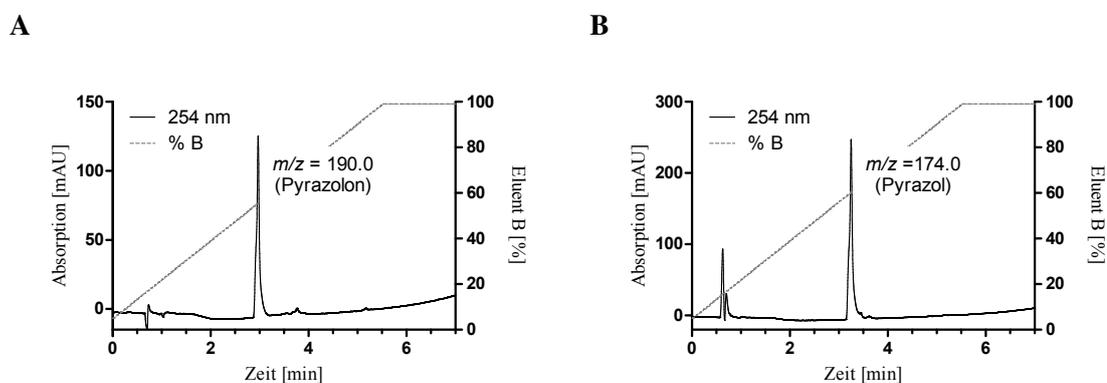
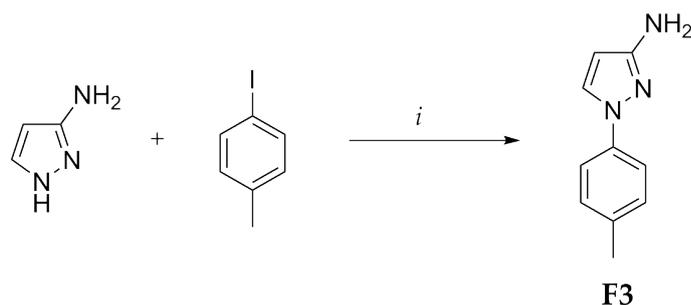


Abb. 5.1. Abgebildet ist das LC/MS-Chromatogramm des synthetisierten Amins **F2** (A), sowie das LC/MS-Chromatogramm der Verbindung aus der Substanzbibliothek (B). Beide Verbindungen unterscheiden sich sowohl in ihrem m/z -Verhältnis, als auch in ihrer Retentionszeit (verwendete Trennsäule: Zorbax-C8; siehe 7.2.3). Es handelt sich also zweifelsfrei um zwei verschiedene Substanzen.

Eine Verbindung mit der korrekten Masse stellt das entsprechende Pyrazol-Derivat

F3 dar. Ob das ursprüngliche Pyrazolon instabil ist und zum Pyrazol reduziert wurde oder es sich um einen Beschriftungsfehler handelte, konnte nicht abschließend geklärt werden. Die Synthese von **F3** konnte durch Kupfer-katalysierte *N*-Arylierung von 3-Aminopyrazol mit 4-Iodtoluol in Anlehnung an Suh *et al.* realisiert werden (siehe Schema 5.2).^[131] Die einstufige Mikrowellenreaktion lieferte 1-(*p*-Tolyl)-1*H*-pyrazol-3-amin **F3** mit 85 %iger Ausbeute.



Schema 5.2 Schematische Darstellung des Syntheseweges von **F3**. Reagenzien und Bedingungen: (i) CsCO₃, CuI, DMF, 190 °C, 20 Min.

Die übereinstimmende Identität der synthetisierten Verbindung und des Moleküls aus der Fragmentbibliothek konnte mittels LC/MS belegt werden. Auch zeigte die synthetisierte Substanz **F3** die gleiche Reaktivität wie die Probe der Fragmentbibliothek bei der dynamischen Fragmentligation (siehe Abb. 5.2).

5.2.2. Kovalente Verknüpfung von Sonde und Fragment

Die Verknüpfung von Sonde und Fragment kann, wie in Abschnitt 4.3.2 erläutert, durch reduktive Aminierung oder Acylierung ermöglicht werden. Die reduktive Aminierung von **AS1** mit **F3** führte jedoch nicht zum gewünschten Produkt. Die Reduktion des Imins liefert ein sekundäres Amin, welches in einer S_N2-Reaktion das Chlor-substituierte Kohlenstoffatom angreift und unter Ausbildung eines Pyrrolidins, intramolekular zyklisiert. Da diese unerwünschte Reaktion auch für andere Reduktionsbedingungen zu erwarten ist, wurde auf die Durchführung der reduktiven Aminierung verzichtet und sich auf die Acylierung von **F3** mit 4-Chlor-2,2-dimethylacetessigsäure **AS1d** beschränkt. **AS1d** wurde in einer vierstufigen Synthese, ausgehend von kommerziell erhältlichem Acetessigsäureethylester, in 24 % Gesamtausbeute erhalten (siehe Schema 5.3).

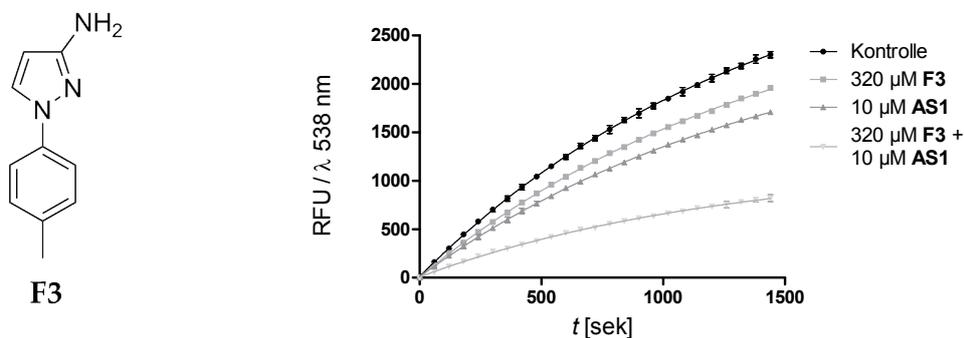
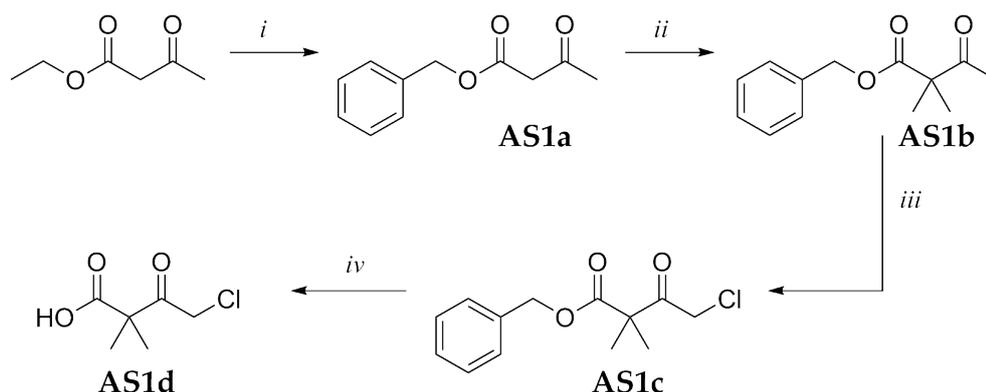


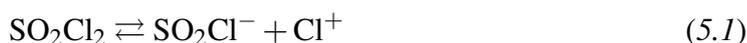
Abb. 5.2. Abgebildet ist das aktive Aminfragment **F3** (links), sowie der zeitliche Verlauf der Fluoreszenzintensität in RFU während des Ligationssassays bei verschiedenen Zusätzen (rechts). Die Positivkontrolle steht für einen uninhibierten Assay, bei dem anstatt der Sonde oder des Fragments eine äquivalente Menge DMSO verwendet wurde. **AS1** bzw. **F3** steht für den zeitlichen Verlauf des Assays bei einer Konzentration von 10 μ M **AS1** bzw. 320 μ M **F3**. Wird sowohl Sonde als auch Fragment dem Assay zugesetzt, ist die freiwerdende Fluoreszenz signifikant verringert (**AS1** + **F3**).



Schema 5.3 Schematische Darstellung des Syntheseweges von **AS1d**. Reagenzien und Bedingungen: (i) Benzylalkohol, Toluol, 105 °C, 24 h (ii) NaH, MeI, THF, RT, 1 h (iii) SO_2Cl_2 , RT, 12 h (iv) H_2 , Pd/C, EtOAc, RT, 8 h.

Die erste Stufe war die Umesterung des Ethylesters mit Benzylalkohol in Toluol. Der Benzylester wurde aufgrund der möglichen milden Spaltung gewählt, da unter den klassischen Bedingungen der Esterentschützung (wässrige Natronlauge) 4-Chlor-2,2-dimethylacetylsäure nicht stabil ist. Die Umesterung wurde unterhalb des Siedepunkts von Toluol in einem offenen Kolben durchgeführt, so dass freies Ethanol entweichen konnte und die Gleichgewichtsreaktion auf die Seite des Benzylesters verschoben wurde. Nach

24 Stunden war die Reaktion beendet und mittels Normalphasen-Chromatographie konnte Acetessigsäurebenzylester **AS1a** mit 85 % Ausbeute isoliert werden. Die zweifache Methylierung der aktivierten Methylengruppe wurde dann mit Natriumhydrid und Methyljodid realisiert, was 2,2-Dimethylacetessigsäurebenzylester **AS1c** in 72 %iger Ausbeute lieferte. Die Chlorierung erfolgte selektiv an der Methylketongruppe, die aufgrund der Keto-Enol-Tautomerie für den Angriff eines Chloronium-Ions empfänglich ist. Chloronium-Ionen sind aus Sulfurylchlorid erhältlich, welches wie in Gleichung 5.1 dargestellt, dissoziiert.^[132]



Die Ausbeute der Chlorierung war mit 40 % relativ gering, was durch Anpassungen der Reaktionsbedingungen aber sicherlich noch steigerbar ist. Als letzter Schritt wurde der Benzylester in 8 Stunden mittels Hydrogenolyse zur Carbonsäure umgesetzt. Filtration des Reaktionsgemisches zur Entfernung des Katalysators und das Belassen im Hochvakuum für mehrere Stunden zur Entfernung des Benzylalkohols, lieferte 4-Chlor-2,2-dimethylacetessigsäure **AS1d** in quantitativer Ausbeute.

AS1d wurde dann mit **F3** und dem Kupplungsreagenz *N,N'*-Dicyclohexylcarbodiimid umgesetzt, was 4-Chlor-2,2-dimethyl-1-[1-(*p*-tolyl)-1*H*-pyrazol-3-ylamino]-1,3-butandion **CK1** mit 65 % Ausbeute lieferte. **CK1** stellt einen irreversiblen Inhibitor der CVB3 3C Protease, mit einem $k_{\text{inact}}/K_{\text{I}}$ -Wert von $2.29 \pm 0.04 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, dar (siehe Abbildung 5.3).

5.2.3. Validierung und Evaluierung der Ergebnisse

Aus dem enzymkinetischen Verlauf des Proteaseassays lässt sich schließen, dass **CK1** einen irreversiblen Inhibitor darstellt. Dies zeigen auch die ESI-MS-Messungen, aus denen eine einfache kovalente Modifizierung der Protease mit 284 Da hervorgeht. Da die CVB3 3C Protease nur einen Cysteinrest besitzt, liegt es nahe, dass auch dort die Modifizierung stattfindet, da das Thiolat das stärkste Nukleophil des Proteins ist. Bei Inkubation der 3C Mutante C147A, bei der das aktive Cystein durch Alanin ersetzt wurde, konnte keine Modifizierung des Proteins mittels Massenspektrometrie nachgewiesen werden (siehe Abb. 5.4). Dies beweist eine ausschließliche Modifizierung des katalytischen Cysteins.

CK1 stellt, genau wie die Sonde **AS1**, einen irreversiblen Inhibitor der CVB3 3C Protease dar. Die Verknüpfung der Sonde mit dem Aminfragment führte jedoch zu einer Abnahme der inhibitorischen Aktivität, was durch den um den Faktor 12 kleineren

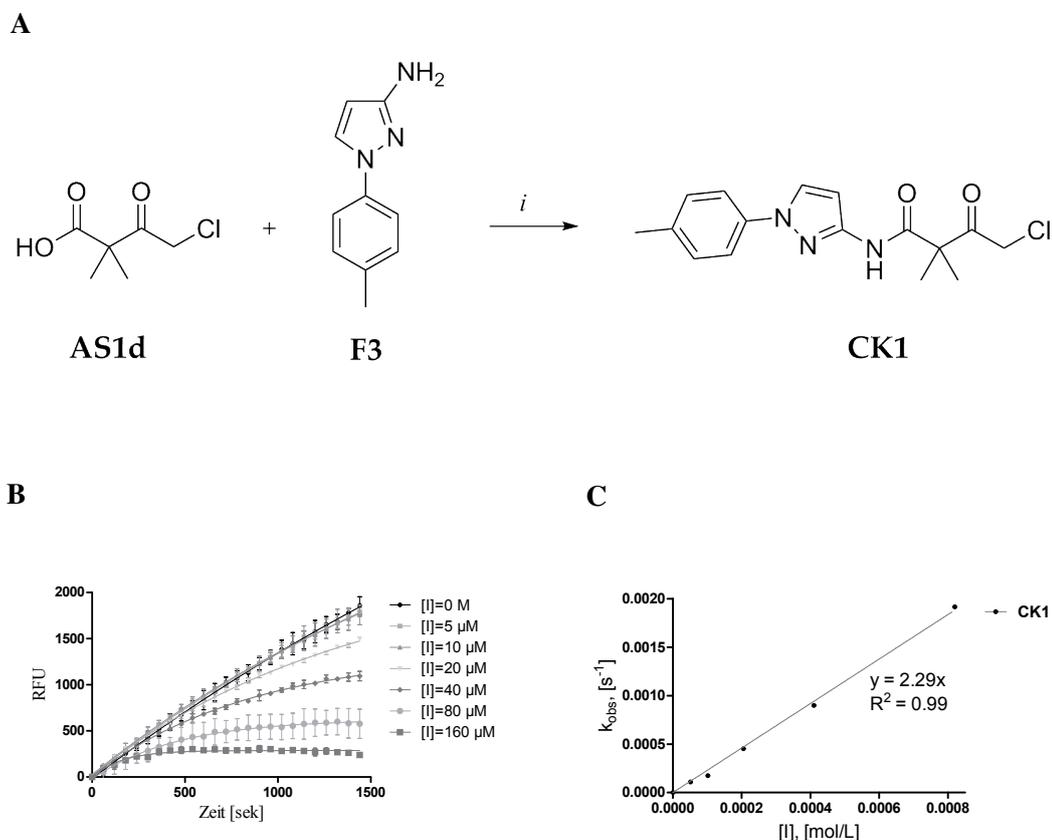


Abb. 5.3. Dargestellt ist der Syntheseweg von **CK1** (A). Reagenzien und Bedingungen: (i) DCC, DCM, RT, 0,5 h. **B** zeigt die Fluoreszenzintensität in RFU gegen die Messzeit in Sekunden bei verschiedenen Konzentrationen von **CK1** beim CVB3 3C Proteaseassay zur Bestimmung der k_{obs} -Werte. **C** zeigt die k_{obs} -Werte, aufgetragen gegen die Inhibitorkonzentration, zur Bestimmung des $k_{\text{inact}}/K_{\text{I}}$ -Wertes von **CK1**.

$k_{\text{inact}}/K_{\text{I}}$ -Wert ausgedrückt wird. Dies bedeutet, dass die Amidbindung zwischen Sonde und Fragment, nicht dem Verknüpfungszustand während der Fragmentligation im Assay entspricht. Ein Docking des Inhibitors **CK1** in die Substratbindungstasche der CVB3 3C Protease bestätigt diese Annahme, da gezeigt werden konnte, dass durch den großen sterischen Anspruch der Methylgruppen von **CK1**, der Inhibitor nicht mit der S1-Tasche wechselwirken kann. Abbildung 5.5 zeigt drei plausible Bindungsmodi des Inhibitors nach der kovalenten Reaktion mit dem Cysteinrest. Dabei ist zu erkennen, dass **CK1** keine

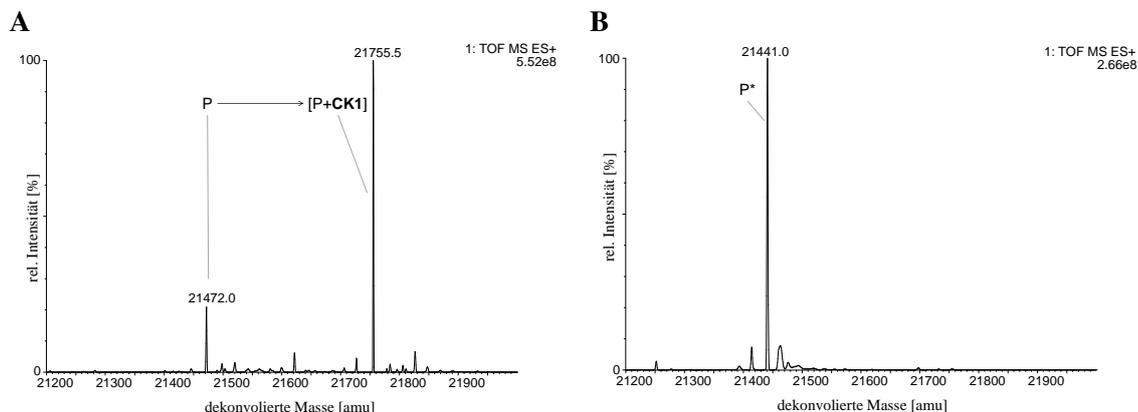


Abb. 5.4. Abgebildet sind die dekonvolvierten ESI-MS-Spektren der CVB3 3C Protease nach Inkubation mit **CK1** (A), sowie der CVB3 3C Mutante C147A nach Inkubation mit **CK1** (B).

P steht für die unmodifizierte CVB3 3C Protease, **P*** steht für die unmodifizierte CVB3 3C Protease-Mutante C147A.

Molekulargewicht CVB3 3C Protease: 21471 Da, theoretisches Molekulargewicht modifizierte Protease: 21755 Da; Molekulargewicht CVB3 3C Protease-Mutante C147A: 21439 Da, theoretisches Molekulargewicht modifizierte Protease-Mutante C147A: 21723 Da.

substratähnlichen Wechselwirkungen mit der S1-Bindungstasche des Proteins eingeht, sondern eher über hydrophobe Kontakte durch Belegung der S2-Tasche bindet.

Da eine überadditive Verstärkung bei der Fragmentzugabe im Assay zweifelsfrei gezeigt werden konnte, muss entweder ein allosterischer Effekt oder eine alternative Verknüpfungsmöglichkeit von Sonde und Fragment vorliegen. Sollte ein allosterischer Effekt dem Assayergebnis zu Grunde liegen, ließe sich das mit Hilfe eines Assays nachweisen, da die Bildungs- bzw. Zerfallsgeschwindigkeit des Enzym-Substrat-Komplexes bei der nicht kompetitiven Aktivierung (bei Zugabe des Fragments **F3**) anders ist als bei der kompetitiven Hemmung (bei Zugabe der Sonde **AS1**).^[133,134] Eine alternative Verknüpfungsmöglichkeit von Fragment und Sonde könnte ausgebildet werden, wenn das Aminopyrazol nicht wie angenommen als N- sondern als C-Nukleophil reagiert. Analog einer Aldolreaktion könnte es mit der Aldehydsonde ein Produkt liefern, welches aufgrund der unterschiedlichen Molekülgeometrie Zugang zu völlig anderen Protein-Ligand-Interaktionen hat als **CK1**. Es gelang bis jetzt noch nicht dieses Produkt nachzuweisen. ESI-MS-Messungen der Assaylösung von Sonde und Fragment zeigten nur eine Markierung des Proteins mit der

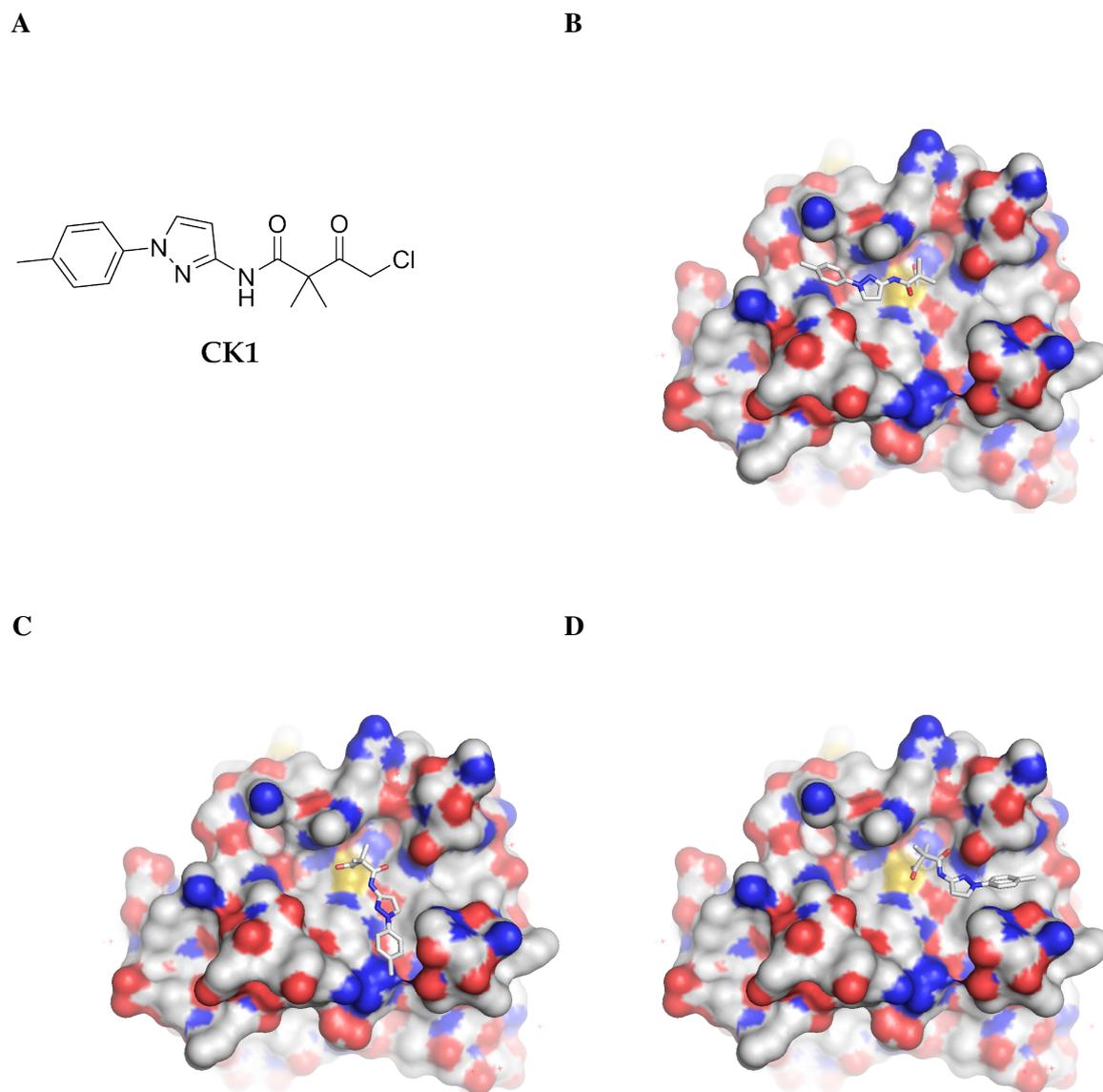


Abb. 5.5. Abgebildet sind die Strukturformel von **CK1** (**A**) sowie drei Bindungsmodi eines energieminierten Modells von **CK1** gedockt in die Substratbindungstaschen der CVB3 3C Protease (**B** bis **D**). Die Farbcodierung entspricht den Atomsorten (Kohlenstoff = grau, Sauerstoff = rot, Stickstoff = blau, Schwefel = gelb).

Sonde (siehe Tabelle A.2). Da der ESI-MS-Messung eine UHPLC² vorgeschaltet ist, besteht die Möglichkeit, dass ein labiles Produkt vor der massenspektrometrischen Analyse zerfällt und somit mit dieser Methode nicht nachweisbar ist. Eine Alternative wäre es, mögliche Ligationsprodukte mittels NMR nachzuweisen. Das Signal des Aldehydprotons der Sonde ist relativ weit im Tieffeld angesiedelt, was das Nachvollziehen einer Reaktion der Aldehydgruppe durch die Abnahme des Signals einfacher macht.

Es gelang also aus 750 getesteten Aminfragmenten eine aktive Kombination zu identifizieren, welche auch nach kovalenter Verknüpfung noch kovalent mit dem aktiven Zentrum der Protease reagiert. Dies konnte mit Hilfe von ESI-MS-Messungen nachgewiesen werden (siehe Tabelle A.2). **CK1** stellt somit eine erste Leitstruktur eines irreversiblen 3C Proteaseinhibitors dar. Dieser muss nun unter Beachtung der Ergebnisse von Docking-Studien und Proteaseassays strukturell optimiert werden.

5.3. Dynamisches Ligationsscreening mit AS2

E-4-Oxobut-2-ensäureethylester **AS2** stellt eine sehr potente Sonde dar, die bis in den einstellig nanomolaren Bereich Aktivität zeigt ($k_{\text{inact}}/K_{\text{I}} = 146600 \pm 5850 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$). Im dynamischen Ligationsscreening wurde die Sonde mit einer Konzentration zwischen 34 und 66 μM eingesetzt und mit 280 einzelnen Aminfragmenten auf Aktivitätsverstärkung hin untersucht. Es konnte jedoch keine aktive Kombination identifiziert werden, so dass das Screening mit dieser Sonde nicht weiter verfolgt wurde.

5.4. Dynamisches Ligationsscreening mit AS3

2*S*,3*S*-Epoxy-4-oxobutansäureethylester **AS3** ist ein schwacher, irreversibler CVB3 3C Proteaseinhibitor mit einem $k_{\text{inact}}/K_{\text{I}}$ -Wert von $2.4 \pm 0.1 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ (siehe Tabelle A.1). ESI-MS-Messungen belegen den irreversiblen Inaktivierungsmechanismus, da nach Inkubation der 3C Protease mit AS3 ein Massenzuwachs zu verzeichnen ist (siehe Abschnitt 5.4.1.1 für eine ausführliche Analyse des MS-Spektrums).

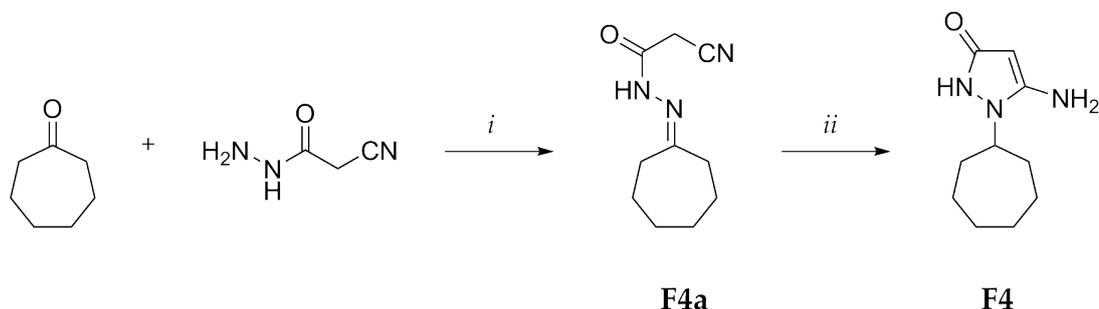
Für das Ligationsscreening wurde **AS3** in einer Konzentration von 400 μM eingesetzt,

²Die UHPLC-MS-Experimente wurden zusammen mit Dr. Andreas Springer am Gerätezentrum BioSupra-Mol der FU Berlin durchgeführt.

was die Aktivität der Protease über einen Zeitraum von 10 Minuten um circa 20 % verminderte. Es wurden 850 primäre Amine bei einer Konzentration von 320 μM getestet, wovon Fragment **F4** die inhibitorische Aktivität der Sonde signifikant verstärkte (siehe Abb. 5.6B). Um den Inhibitionswert k_{obs}/I bzw. k_{inact}/K_I des Ligationsproduktes von **AS3** und **F4** abzuschätzen, wurde eine Verdünnungsreihe aus Sonde und Aminfragment (im molaren Verhältnis von 1.25 : 1) getestet, wobei sich zeigte, dass die Kombination bis in den niedrigen zweistelligen μM -Bereich wirksam ist. Nimmt man an, dass Sonde und Fragment im Ligationsassay mit 100 %igem Umsatz ein homogenes Produkt liefern, ergibt sich dafür ein k_{inact}/K_I -Wert von $8.3 \pm 0.6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, was um den Faktor 3.5 aktiver wäre als die Sonde allein (siehe Abb. 5.6 C,D).

5.4.1. Synthese des Aminfragmentes

Das Aminfragment **F4** konnte in einer zweistufigen Synthese, ausgehend von kommerziell erhältlichem Cycloheptanon und 2-Cyanacethydrizid, hergestellt werden (siehe Schema 5.4).



Schema 5.4 Schematische Darstellung des Syntheseweges von **F4**. Reagenzien und Bedingungen: (i) EtOH, reflux, 1 h (ii) NaBH₄, H₂O, RT, 16 h.

Die erste Stufe stellt die Umsetzung des Ketons mit 2-Cyanacethydrizid in siedendem Ethanol dar, was nach Abkühlen der Reaktionslösung und Umkristallisation des entstandenen Niederschlags, das Ketimin in 73 %iger Ausbeute lieferte. Die Reduktion des Ketimins zum entsprechenden 1-alkylierten 5-Amino-1,2-dihydropyrazol-3-on wurde in Anlehnung an die Vorschrift von Gyulbudaghyan *et al.* mit einer wässrigen Lösung von Natriumborhydrid durchgeführt.^[135] Dies lieferte 5-Amino-1-cycloheptyl-1,2-dihydropyrazol-3-on **F4** in 77 %iger Ausbeute, was einer Gesamtausbeute von 56 % über beide Stufen entspricht.

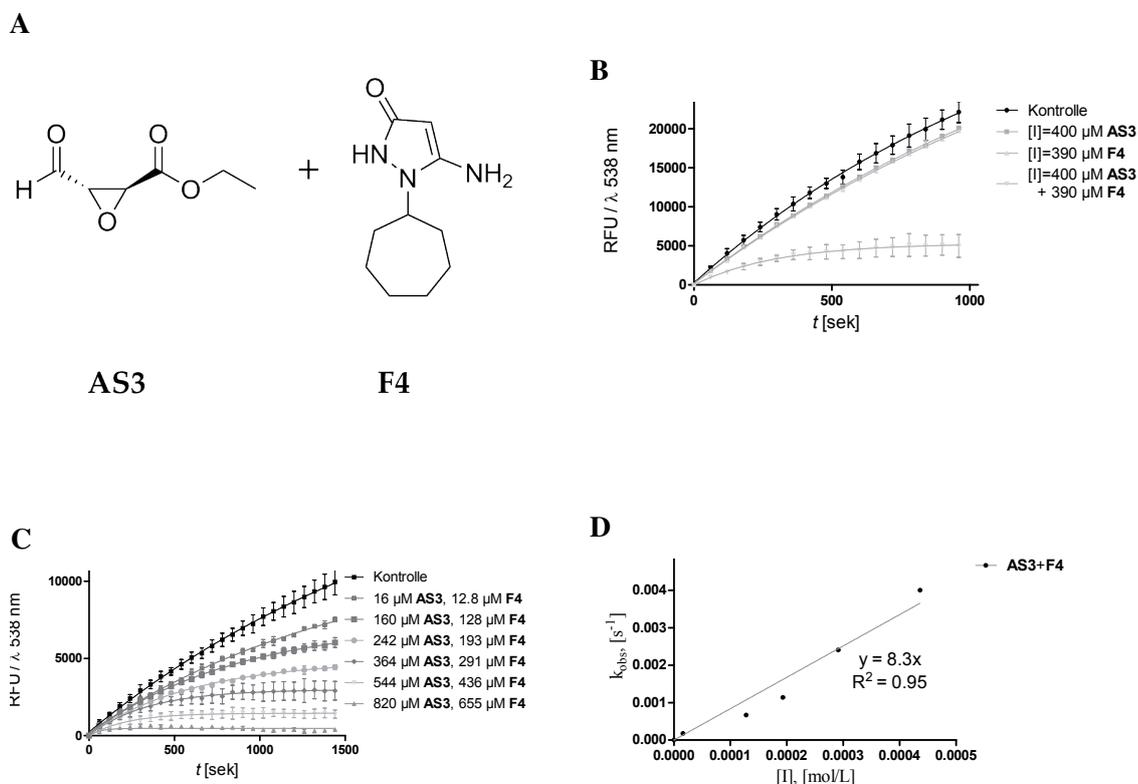


Abb. 5.6. A: AS3 und F4 B: Abgebildet ist das Ergebnis des dynamischen Ligationsscreenings für die Kombination aus Sonde **AS3** und Fragment **F4**. Aufgetragen ist die Fluoreszenzintensität in RFU bei 538 nm gegen die Messzeit in Sekunden bei verschiedenen Substanzzusätzen zur Assaylösung. **C:** Abgebildet ist die Fluoreszenzintensität in RFU bei 538 nm gegen die Messzeit in Sekunden bei verschiedenen Konzentrationen von Sonde **AS3** und Aminfragment **F4** beim 3C Proteaseassay. **D:** Abgebildet sind die zu **C** korrespondierenden k_{obs} -Werte, aufgetragen gegen die Inhibitorkonzentration des hypothetischen Produktes **EP1**, zur Bestimmung des $k_{\text{inact}}/K_{\text{I}}$ -Wertes.

5.4.1.1. Analyse der Reaktionsprodukte des Ligationssassays

Die Ligationreaktion wurde chromatographisch und massenspektrometrisch verfolgt (siehe Abb. 5.7). Die LC/MS-Analyse der Assaylösung zeigte zwei unabhängige Reaktionsprodukte, die bei 254 nm im Peakflächenverhältnis von 40:60 vorliegen (siehe Abb. 5.7 Peak b und c, Peak a entspricht unumgesetzten **F4**).

Beiden Peaks liegt eine Verbindung mit der Masse von 339 Da zu Grunde, wobei das Massenspektrum von Peak b zusätzlich noch einen Peak mit der Masse von 357 Da

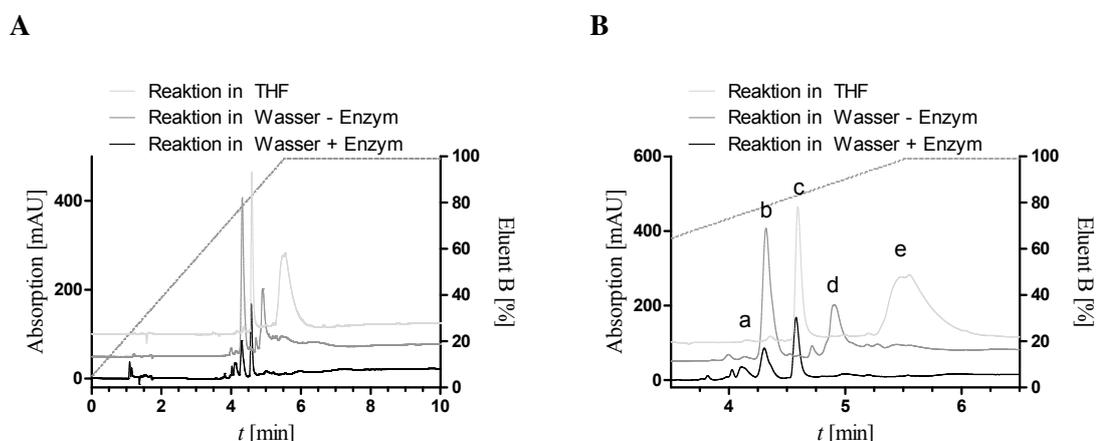


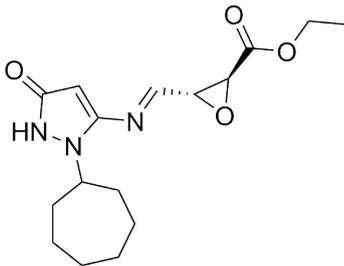
Abb. 5.7. **A:** Abgebildet ist das LC/MS-Chromatogramm der Ligationslösung von **AS3** und **F4** in Tetrahydrofuran (hellgrau) und in Wasser mit (schwarz) und ohne Zusatz von Protease (dunkelgrau). **B:** Abgebildet ist ein Ausschnitt des LC/MS-Chromatogramms des Trennlaufs. Trennsäule: Luna C-18; siehe 7.2.3.

zeigt. 339 Da entspricht der Summe der Massen von Aldehydsonde und Pyrazolon. Peak d beinhaltet Verbindungen mit den Massen 321 Da und 516 Da. Eine Abweichung von 321 Da entspricht dabei der Masse des Imins von **AS3** und **F4**. Dies ist unerwartet, da die Ausbildung eines Imins per LC/MS theoretisch nicht nachzuvollziehen ist, da das säurelabile Imin durch die stark sauren Bedingungen während der Chromatographie hydrolysiert wird. Peak e ist eine Verbindung der Masse 516 Da. Keiner der Hauptpeaks ließ sich isolieren und mittels Kernresonanzspektroskopie analysieren, da längeres Stehen, extrahieren, lyophilisieren oder auch die chromatographische Reinigung zu einer Zersetzung der beiden Verbindungen führte. Die Aufnahme eines NMR-Spektrums des Reaktionsgemisches in D_2O lieferte ein komplexes Spektrum mit einer Vielzahl von Peaks, die nicht eindeutig einer Verbindung zugeordnet werden konnten. Eine Übersicht möglicher Ligationsprodukte zeigt Abbildung 5.8.

Das Auftreten mehrerer Reaktionsprodukte ist nicht verwunderlich, da **F4** theoretisch in einem Tautomeriegleichgewicht mit fünf isomeren Strukturen vorliegt (siehe Schema 5.5). Aus diesem Schema wird ersichtlich, dass **F4** nicht einfach ein primäres Amin ist, da es ebenso als vinyloges Amid und somit Harnstoff-Derivat und als Amino-Amidin betrachtet werden kann.

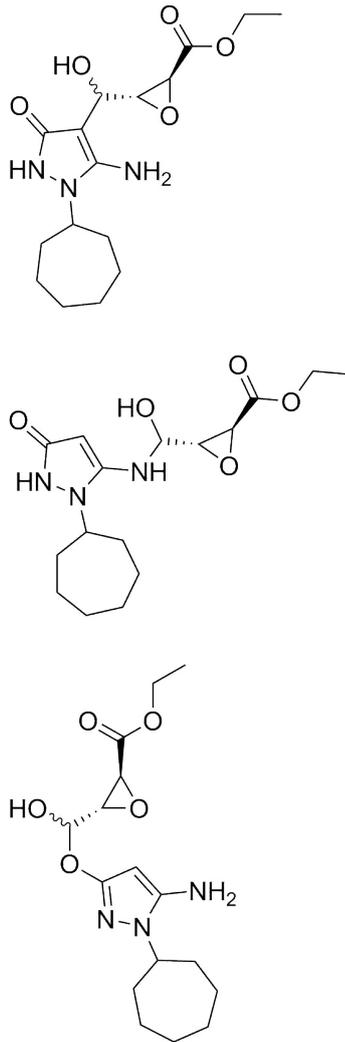
Molekulargewicht: 321.4

Peak d



Molekulargewicht: 339.4

Peak b / c



Molekulargewicht: 516.6

Peak d / e

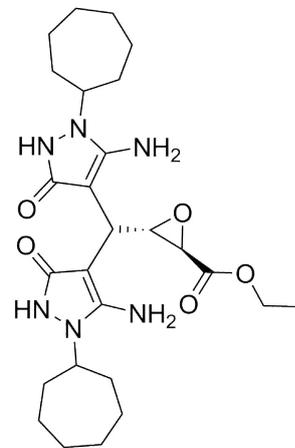
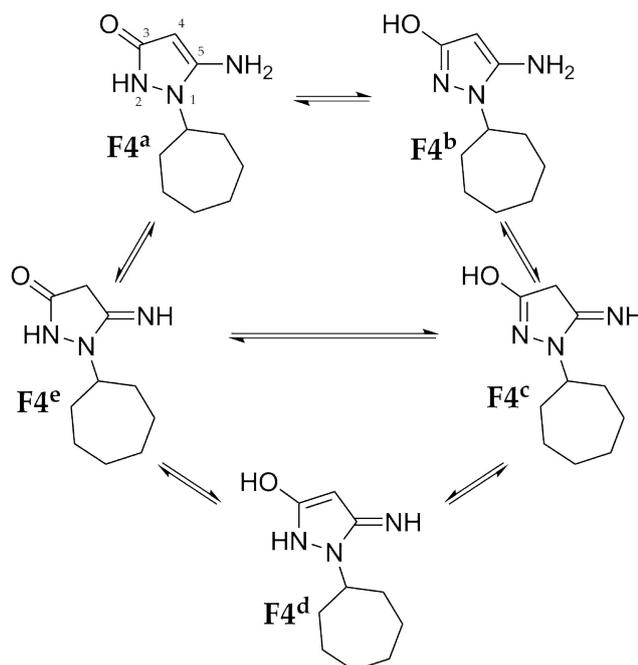


Abb. 5.8. Abgebildet sind mögliche Ligationsprodukte von **AS3** und **F4** nach Molekulargewicht sortiert.



Schema 5.5 Abgebildet sind die fünf verschiedenen tautomeren Formen von **F4**.

Mittels Kernresonanzspektroskopie konnte gezeigt werden, dass **F4** in polaren Lösungsmitteln (hier DMSO) ausschließlich in der Ketoform (**F4^a**) vorliegt. Das Proton des Stickstoffs der Amidgruppe liefert ein Signal bei ≈ 9 ppm (vgl. Abschnitt 10.4.2). Eine OH-Funktion würde ein Signal bei ≈ 11 ppm liefern. Katritzky *et al.* zeigten, dass Pyrazol-3-one in unpolaren Lösungsmitteln und als Feststoff hauptsächlich in der OH-Form (analog **F4^b**) vorliegen.^[136] Dies konnte durch die Aufnahme eines NMR-Spektrums von **F4** in deuteriertem Pyridin bestätigt werden. Die OH-Funktion von **F4^b** liegt dabei aber deprotoniert vor, woraus eine Pyrazololat-Form resultiert. Die Verbindungen **F4^{c-e}** konnten bisher noch nicht experimentell nachgewiesen werden. Trotzdem bestätigten die durchgeführten NMR-Untersuchungen die Annahme, dass ein Tautomeriegleichgewicht für **F4** existiert, was je nach Reaktionsbedingungen zu unterschiedlichen Isomeren führen kann. Dies wirkt sich auch entscheidend auf die Reaktivität der Verbindung aus.^[137] So kann man nicht davon ausgehen, dass **F4** zusammen mit Aldehydsonde **AS3** ausschließlich eine klassische Imin-Reaktion eingeht. Van Haverbeke *et al.* untersuchten das Reaktionsverhalten von 5-Amino-1-methyl-1,2-dihydropyrazol-3-on mit Carbonylverbindungen und konnten zeigen, dass diese Pyrazolonklasse vorrangig (zu 60 %) über das C-4 reagiert

und nur zu 40 % über das Amin an C-5.^[138] Die Reaktion des 5-Aminopyrazol-3-ons mit einem β -Dicarbonyl führt dann über eine zweifache Kondensationsreaktion zu einem Pyridyl-Bizyklus, wobei die monokondensierten Verbindungen nicht isolierbar waren.

Einen bedeutenden Einfluss auf den Verlauf der Ligrationsreaktion hat auch die An- bzw. Abwesenheit des Enzyms. Während bei Anwesenheit des Enzyms hauptsächlich Additionsprodukte von **F4** und **AS3** nachweisbar waren, so wird bei Abwesenheit des Enzyms ebenfalls das Additionsprodukt von Peak b gebildet, jedoch kommt es anstatt zur Bildung des zweiten Aldoladdukts zur Ausbildung eines Monokondensationsprodukts aus einem Molekül **AS3** und zwei Molekülen **F4**. Dies ist in Einklang mit den Ergebnissen von Wang *et al.*, die 3-Methyl-1-phenyl-pyrazol-5-on mit Aldehyden in Wasser umgesetzt haben.^[139] Das daraus gebildete Produkt besteht aus zwei Pyrazol-5-onen, welche über die C-4 Position unter Dehydratisierung mit einem Aldehydmolekül verknüpft sind. Diese Art von Reaktionsprodukt bildet sich auch, wenn die Ligrationsreaktion von **AS3** und **F4** in organischem Lösungsmittel (hier Tetrahydrofuran) durchgeführt wird (Peak e). Dieses Produkt ist aber unpolarer als das entsprechende Produkt der Reaktion in Wasser und besitzt einen deutlich größeren R_f -Wert. Es handelt sich also, aller Wahrscheinlichkeit nach um zwei isomere Strukturen, wie auch die beiden Peaks b und c zu sein scheinen.

Das ESI-MS-Spektrum einer Mischung von **AS3** und **F4** in THF, welches nicht chromatographisch getrennt wurde, zeigt ebenfalls nur zwei Produkte (siehe Abb. 5.9). Jedoch besitzt der Basispeak nicht das m/z -Verhältnis von 340, sondern das m/z -Verhältnis von 322, welches einem Kondensationsprodukt von **AS3** und **F4** entspricht. Eine klare Aussage über die Struktur des Ligrationsproduktes ist somit nicht möglich, da **AS3** und **F4**, wie schon erwähnt, über die C-4 Position und die Aminofunktion eine Kondensationsreaktion eingehen können.^[140] Welche der beiden Varianten hier vorliegt, wurde versucht mittels ESI-Massenspektrometrie der Assaylösung zu klären. Dazu wurden zwei gepufferte Proben der CVB3 3C Protease einmal mit **AS3**, sowie einmal mit einer Mischung aus Aldehydsonde **AS3** und Pyrazolon **F4** inkubiert. Die erste Probe zeigte im Massenspektrum erwartungsgemäß zwei Peaks. Einen für die unmodifizierte Protease und einen zweiten, der den Massenzuwachs um die Aldehydsonde anzeigte (siehe Abb. 5.10A). Die zweite Probe hätte bei Ausbildung einer Iminbindung aus Sonde und Pyrazolon, eine deutliche Verhältnissteigerung vom Protease-**AS3**-Peak zum Protease-Peak zeigen müssen, da die Ligation von **F4** und **AS3** die Reaktion der Sonde mit dem aktiven Cystein forciert. Das Imin müsste dann aber während der vorgeschalteten UHPLC hydrolysiert werden, wonach

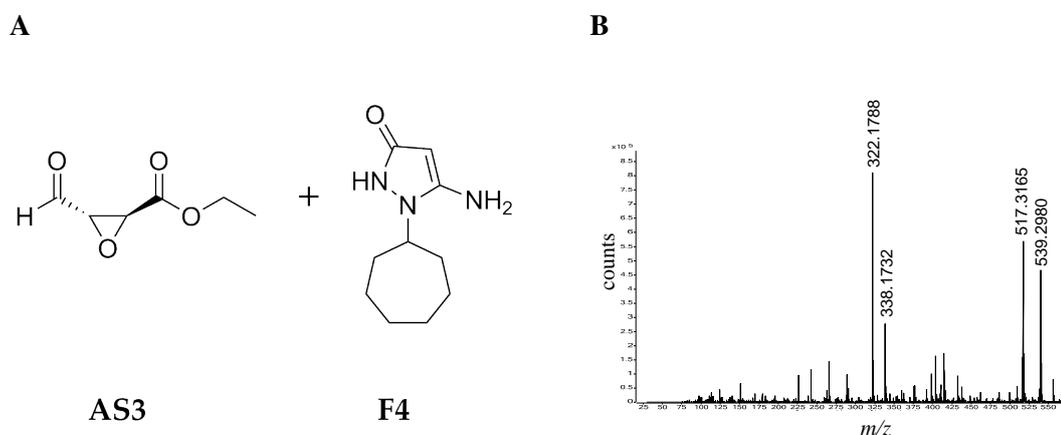


Abb. 5.9. Abgebildet sind **AS3** und **F4** (A) sowie das HR-ESI-MS-Spektrum der Reaktionslösung von **AS3** und **F4** in THF (B). Der Basispeak mit dem m/z -Verhältnis von 322 entspricht dem Kondensationsprodukt von einem Molekül **AS3** und einem Molekül **F4**. Der Peak mit dem m/z -Verhältnis von 517 entspricht dem Kondensationsprodukt von einem Molekül **AS3** und zwei Molekülen **F4**.

sich somit nur der kovalent an die Protease gebundene Teil massenspektrometrisch messen ließe. Im zweiten Spektrum ist der Protease-**AS3**-Peak jedoch gänzlich verschwunden und stattdessen ein Peak mit der Massendifferenz 339 m/z zum Protease-Peak zu erkennen (siehe Abb. 5.10B). Dies bedeutet, dass sich ein hydrolysestabiles Produkt der Masse 339 Da aus Aldehydsonde **AS3** und Pyrazolon **F4** bildet, welches als bevorzugtes Reaktionsprodukt mit der Protease reagiert. Dies widerspricht der Annahme, dass das Pyrazolon über eine Iminbindung die Aldehydsonde ins aktive Zentrum dirigiert, sondern deutet auf ein über das C-4 verknüpftes Additionsprodukt **EP1** als hauptsächliche reagierende Spezies hin (siehe Abb. 5.11). Es ist jedoch auch nicht auszuschließen, dass sich **EP1** erst nach der Reaktion des Epoxids mit der Protease bildet. Falls das Imin mit dem C-4 verknüpften Produkt um die Reaktion mit dem Thiol konkurriert und sich das Additionsprodukt auch aus Pyrazolon und abreagierter Aldehydsonde bilden kann, so wird das Massenspektrum ausschließlich eine Modifizierung mit dem Additionsprodukt zeigen. Es ist also nicht abschließend geklärt, ob der Ligation ein dynamisches Gleichgewicht aus Amin, Aldehyd und Imin zu Grunde liegt oder Sonde und Pyrazolon in einer irreversiblen Reaktion ein kovalentes Produkt bilden, welches den eigentlichen Inhibitor darstellt. Nichtsdestotrotz stellt Verbindung **EP1** einen "echten hit" dar, da die kovalente Modifizierung der Protease durch

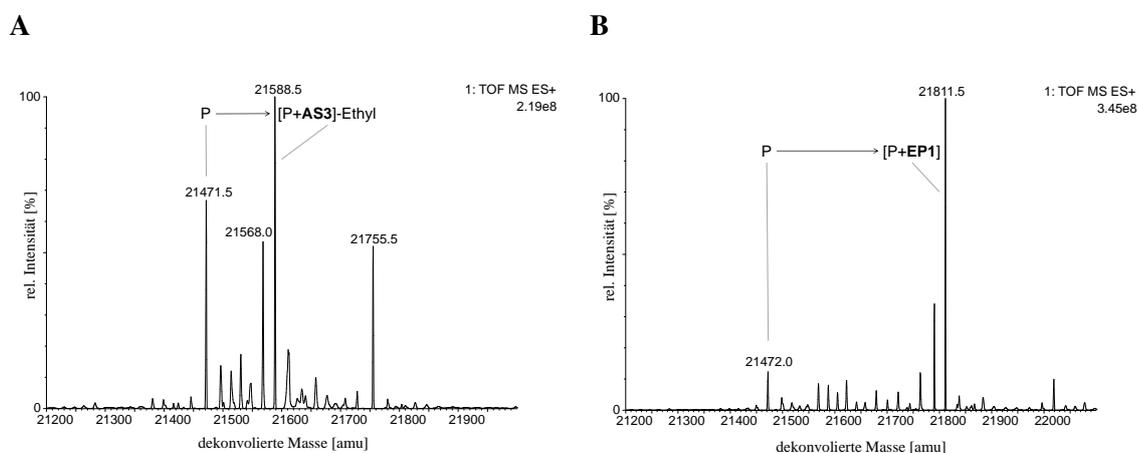


Abb. 5.10. Abgebildet sind die dekonvolvierten ESI-MS-Spektren der CVB3 3C Protease inkubiert mit **AS3** (A) und inkubiert mit einer Mischung von **AS3** und **F4** (B). Es wird deutlich, dass durch die Zugabe des Pyrazolons **F4** nicht die Bindung von **AS3** verstärkt wird, sondern dass sich ein kovalentes Additionsprodukt aus Sonde **AS3** und Pyrazolon **F4** bildet (mit dem Molekulargewicht von 339 Da), welches das einzige Produkt darstellt, welches mit der Protease eine kovalente Bindung eingeht.
 Molekulargewicht CVB3 3C Protease: 21471 Da, Molekulargewicht **AS3**: 144 Da, Molekulargewicht **F4**: 195 Da.

die Zugabe des Pyrazolons deutlich gesteigert wurde. Somit reagiert das Pyrazolon mit der Aldehydsonde zu einem Ligationsprodukt, welches eine größere inhibitorische Aktivität zeigt als die Summe der Einzelteile **AS3** und **F4**. Eine Modellierung des Bindungsmodus des hypothetischen Ligationsproduktes **EP1** im katalytischen Zentrum der Protease mit Hilfe von *Molecular Operating Environment* (MOE)^[141] zeigt, dass durch die Verknüpfung von **AS3** und **F4** am C-4 des Pyrazolons, **F4** seine eigentliche Bindungsorientierung in der S1-Tasche beibehalten kann (siehe Abb. 5.11B) und **EP1** eine rationale Erweiterung darstellt (siehe Abb. 5.11C). **EP1** imitiert die Wechselwirkungen des natürlichen Substrats (Glutamin) in S1 durch Wasserstoffbrückenbindungen mit den Seitenketten von Thr142 und His161. Nach der Reaktion mit **AS3** und auch nach der Reaktion mit dem aktiven Thiol, bleiben diese Bindungen bestehen und werden durch die Wechselwirkungen zwischen dem Carbonyl-Sauerstoff der Estergruppe und den Amidprotonen von Cys147, Gln146 und Gly145 im gebildeten Anionen-Loch ergänzt (siehe Abb. 5.11D)³. Würde

³Die Abbildungen wurden von R. Schulz (FU Berlin, AG Wolber) zur Verfügung gestellt

die Ligation zwischen **F4** und **AS3** über eine Iminbindung erfolgen, müsste sich **F4** zur Ausbildung einer kovalenten Bindung mit dem aktiven Cystein aus der S1-Tasche drehen und könnte dadurch nicht mehr die nativen Wasserstoffbrücken ausbilden. Dies würde den energetischen Zustand der Proteasebindung erheblich erhöhen und gegen die vorliegenden enzymkinetischen Daten sprechen.

EP1 besitzt drei Stereozentren, wovon zwei durch die Konfiguration der Aldehydsonde festgelegt sind. Das dritte Stereozentrum wird bei der Aldoladdition von **AS3** mit **F4** gebildet und kann folglich sowohl *S*- als auch *R*-konfiguriert sein. Abbildung 5.11A zeigt die gemäß Docking energieärmste und somit wahrscheinlichste Konfiguration der Hydroxymethylgruppe. Es wird deutlich, dass die Verdünnungsreihe aus Abb. 5.6B nur bedingt zur k_{inact}/K_i -Bestimmung taugt, da möglicherweise von mehreren Produkten des Ligationsassays auszugehen ist und nicht geklärt werden konnte, welche Verbindung zu welchem Ausmaß für die inhibitorische Aktivität verantwortlich ist und in welcher Stoffmenge sie vorliegt. Die Bestimmung der k_{inact}/K_i -Werte muss somit von stabilen, kovalent verknüpften Verbindungen aus **AS3** und **F4** erfolgen, wobei die Verknüpfung über das C-4 des Pyrazolons am wahrscheinlichsten dem Produkt der Ligationsreaktion entspricht.

5.4.2. Kovalente Verknüpfung von Sonde und Fragment

5.4.2.1. Epoxide

Geeignete Reaktionsbedingungen für die kovalente Verknüpfung von Sonde und Fragment zu finden, stellte sich als eine große Herausforderung dar. Das Additionsprodukt **EP1** war nicht stabil genug um isoliert werden zu können und zersetzte sich sogar beim Lyophilisieren. Ebenso misslang es, ein stabiles Kondensationsprodukt aus **F4** und **AS3** zu erzeugen und zu isolieren. Die Hauptprodukte der Reaktion von **AS3** mit **F4** blieben immer eine Verbindung mit der Masse 339 Da sowie 516 Da. Erst die Verwendung des Reduktionsmittels Natriumcyanoborhydrid lieferte ein stabiles Produkt. Der ursprüngliche Gedanke war es, mögliche Iminstrukturen durch reduktive Aminierung zu reduzieren und somit zu stabilisieren. Es stellte sich aber heraus, dass die Zugabe von Natriumcyanoborhydrid zu einer Deoxygenierung des Aldoladditionsproduktes führte, ähnlich wie es Ellinger *et al.*^[142] und Drage *et al.*^[143] beschrieben haben. So lieferte die reduktive Aminierung von **AS3** und **F4** (2*S*,3*R*)-3-((5-Amino-1-cycloheptyl-3-oxo-2,3-dihydro-1*H*-pyrazol-4-yl)methyl)-2-epoxycarbonsäureethylester **EP2** als Produkt in 45 %-iger Ausbeute (siehe Schema 5.6).

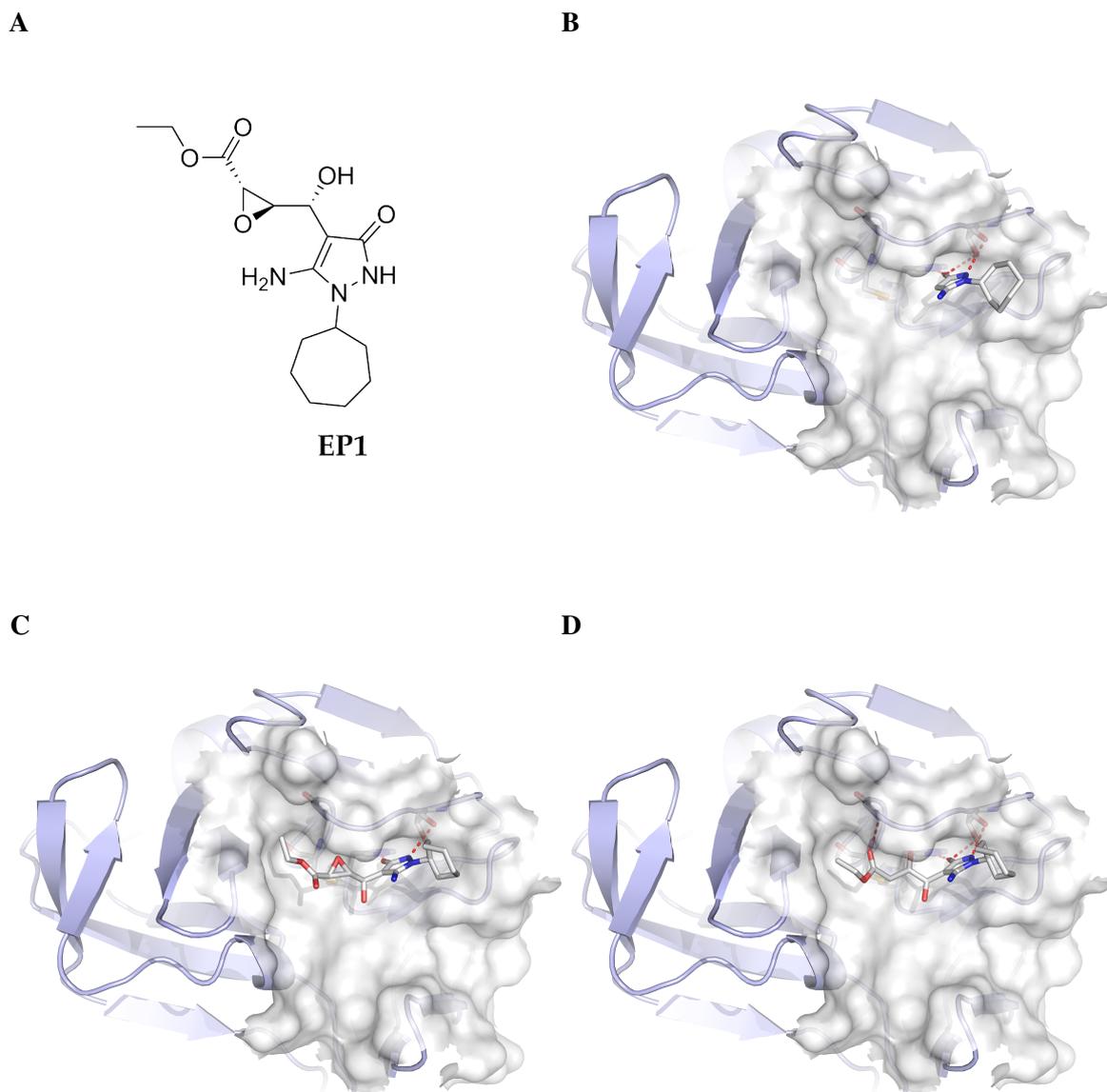
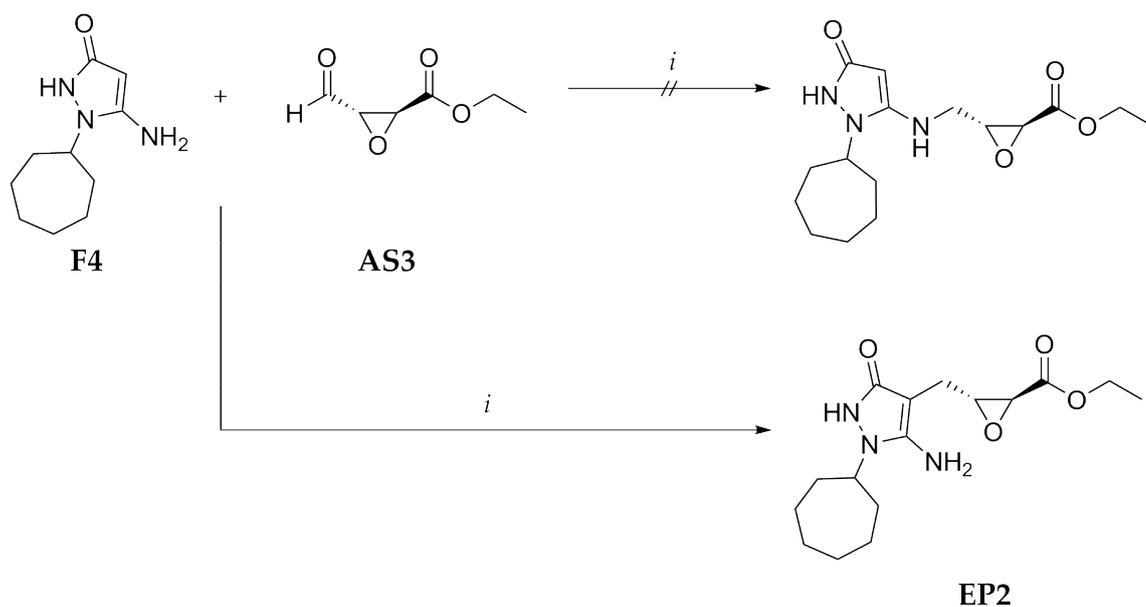


Abb. 5.11. Abgebildet sind die Strukturformel des hypothetischen Ligationsproduktes (2*S*,3*R*)-3-((*R*)-(5-Amino-1-cycloheptyl-3-oxo-2,3-dihydro-1*H*-pyrazol-4-yl)(hydroxy)methyl)-2-epoxycarbonsäureethylester **EP1** (**A**) sowie die energieärmste Dockingpose von **F4** (**B**), des hypothetischen Ligationsproduktes **EP1** vor (**C**) und nach der Reaktion mit dem aktiven Cystein (**D**), im katalytischen Zentrum der CVB3 3C Protease.

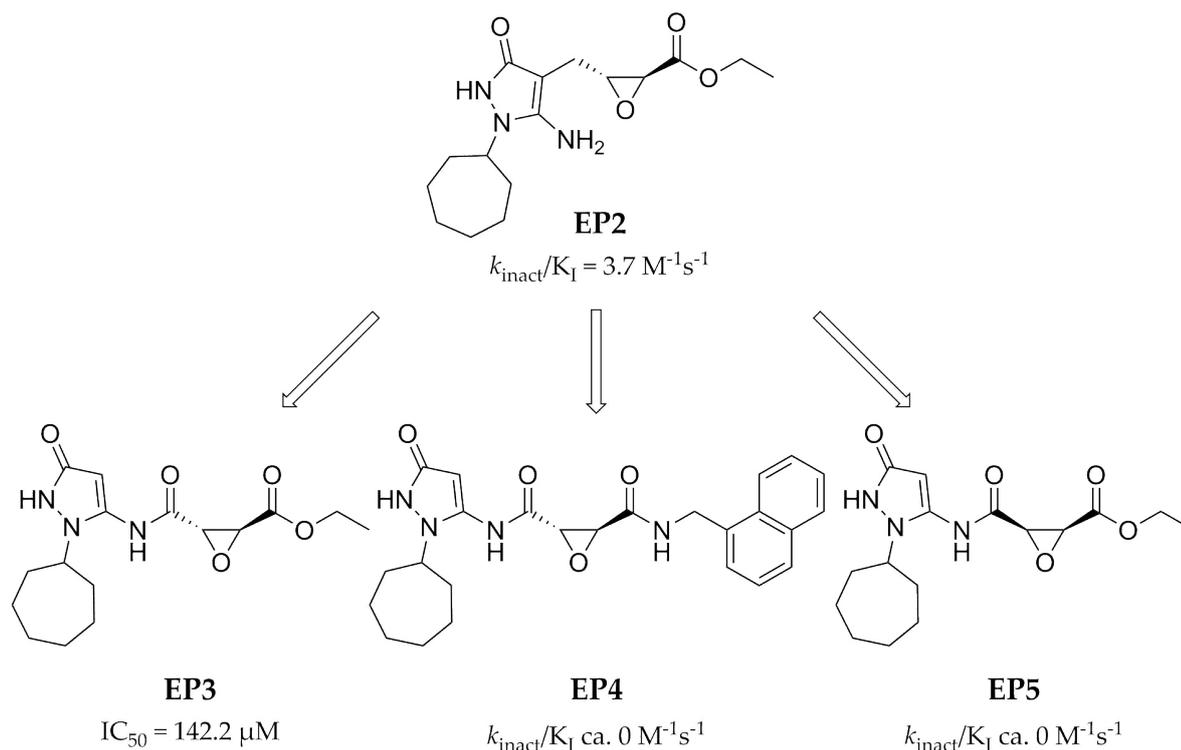
EP2 zeigt im Proteaseassay einen irreversiblen kinetischen Verlauf (siehe Tabelle A.1), der auch massenspektrometrisch bestätigt werden konnte (siehe MS Tabelle A.2). Der



Schema 5.6 Schematische Darstellung des Syntheseweges von **EP2**. Reagenzien und Bedingungen: (i) NaCNBH_3 , 1,2-Dichlorethan, MeOH, RT, 3 h.

$k_{\text{inact}}/K_{\text{I}}$ -Wert von **EP2** liegt mit $3.7 \pm 0.2 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ auch über dem Wert der Aldehydsonde **AS3**, wenn auch nicht so hoch wie die Bestimmung der Verdünnungsreihe von Sonde und Fragment ergab (siehe Abb. 5.6). Möglicherweise begünstigt eine Hydroxyfunktion an der Methylengruppe die Proteasebindung bzw. die daraus resultierende Reaktion mit dem aktiven Thiol und führt damit zu einem höheren $k_{\text{inact}}/K_{\text{I}}$ -Wert. Nichtsdestotrotz stellt **EP2** einen irreversiblen Inhibitor dar, der direkt aus der dynamischen Fragmentligation hervorgegangen ist. **EP2** erfüllt die Auswahlregeln von Lipinski^{[144][24]} und wurde deshalb als Leitstruktur ausgewählt, welche durch strukturelle Modifizierungen in ihrer inhibitorischen Aktivität und Wirkstoffähnlichkeit weiter gesteigert werden sollte. Aufgrund der besseren Zugänglichkeit, wurden weitere Derivate von **EP2** durch Acylierung der C-5 Aminofunktion synthetisiert (siehe Schema 5.7).

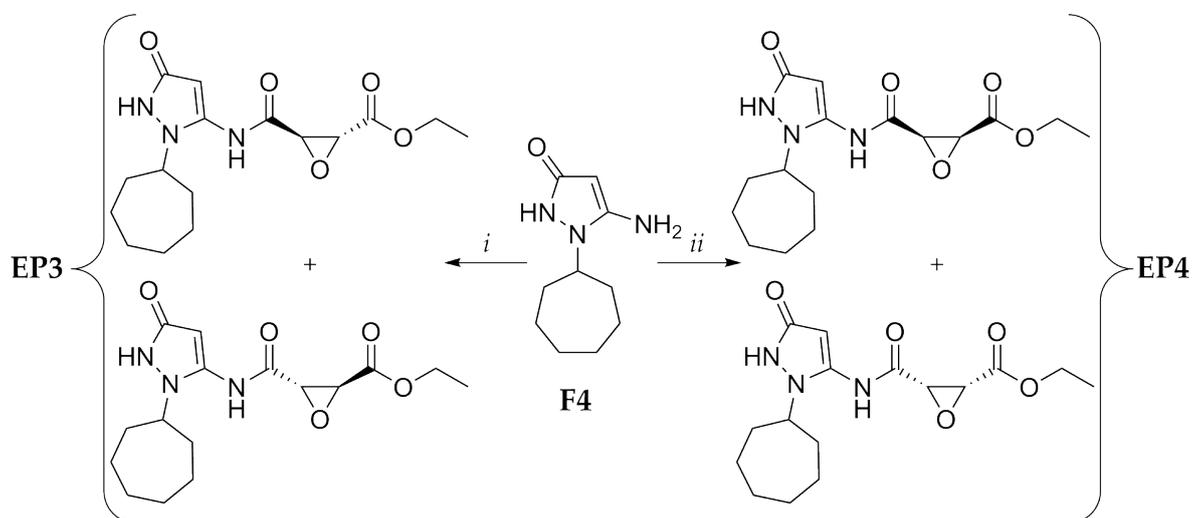
Die Acylierung des Pyrazolons wurde in Übereinstimmung mit der Stereochemie der Aldehydsonde mit *trans*-Epoxybernsteinsäure durchgeführt (siehe Schema 5.8). Kommerziell erhältliche *trans*-Epoxybernsteinsäure ist ein Enantiomergemisch aus 2*R*,3*R*- und 2*S*,3*S*-Epoxybernsteinsäure und liefert somit nach der Acylierung und anschließender Veresterung ebenfalls wieder ein Enantiomergemisch aus (2*R*,3*R*)- und (2*S*,3*S*)-3[(2-Cycloheptyl-5-oxo-1,2-dihydropyrazol-3-ylamino)carbonyl]-2-epoxy-carbonsäureethylester



Schema 5.7 Schematische Darstellung der drei synthetisierten Derivate des Epoxid-Inhibitors **EP2**. **EP3** (links), **EP4** (Mitte) und **EP5** (rechts).

EP3, welches ohne spezielle chromatographische Apparatur, wie z. B. einer chiralen HPLC-Säule, nicht zu trennen ist. Die Acylierung wurde mit *N,N'*-Dicyclohexylcarbodiimid in Pyridin und ca. drei Äquivalenten *trans*-Epoxybernsteinsäure durchgeführt, da die Acylierung als erstes am C-3 Sauerstoff und erst danach am C-5 Stickstoff erfolgt. Der Ester ließ sich nach Aufarbeitung mit Natriumhydroxid hydrolysieren, was das gewünschte Amid lieferte. **EP3** zeigt im Proteaseassay unerwarteterweise einen reversiblen kinetischen Verlauf. Der IC_{50} -Wert beträgt $142.2 \pm 5.6 \text{ } \mu\text{M}$ und deutet darauf hin, dass die Verbindung in die S1-Tasche der Protease bindet, die Epoxidfunktion jedoch nicht nah genug an der Thiolgruppe des katalytischen Cysteins ist, um eine kovalente Reaktion einzugehen. Lee *et al.* zeigten 2007, dass große hydrophobe Reste in der P1'-Position zu einer erheblichen Aktivitätssteigerung führen.^[84] Doch auch die Synthese von (2*R*,3*R*)/(2*S*,3*S*)-*N*²-(2-Cycloheptyl-5-oxo-2,5-dihydro-1*H*-pyrazol-3-yl)-*N*³-(naphthalen-1-ylmethyl)epoxy-2,3-dicarboxamid **EP4** lieferte keinen irreversiblen Inhibitor. Tatsächlich führte die Modifizierung von **EP2** mit

1-Methylnaphthalen zu einer inhibitorisch komplett inaktiven Verbindung **EP4** (siehe Tabelle A.1).



Schema 5.8 Schematische Darstellung der Synthesewege der diastereomeren Epoxidinhibitoren. Reagenzien und Bedingungen: (i) *cis*-Epoxybernsteinsäure, DCC, Pyridin, RT, 16 h; NaOH, EtOH, RT, 30 min; kat. H₂SO₄, EtOH, 90 °C, 1 h. (ii) *trans*-Epoxybernsteinsäure, DCC, Pyridin, RT, 16 h; NaOH, EtOH, RT, 30 min; kat. H₂SO₄, EtOH, 90 °C, 1 h.

Die Generierung der Diastereomere von **EP3** mit Hilfe von *cis*-Epoxybernsteinsäure lieferte ein Enantiomeregemisch aus (2*R*,3*S*)- und (2*S*,3*R*)-3[(2-Cycloheptyl-5-oxo-1,2-dihydropyrazol-3-ylamino)carbonyl]-2-epoxy-carbonsäureethylester **EP5** (siehe Abb. 5.8), welches jedoch keine nennenswerte inhibitorische Aktivität bei der CVB3 3C Protease zeigte.

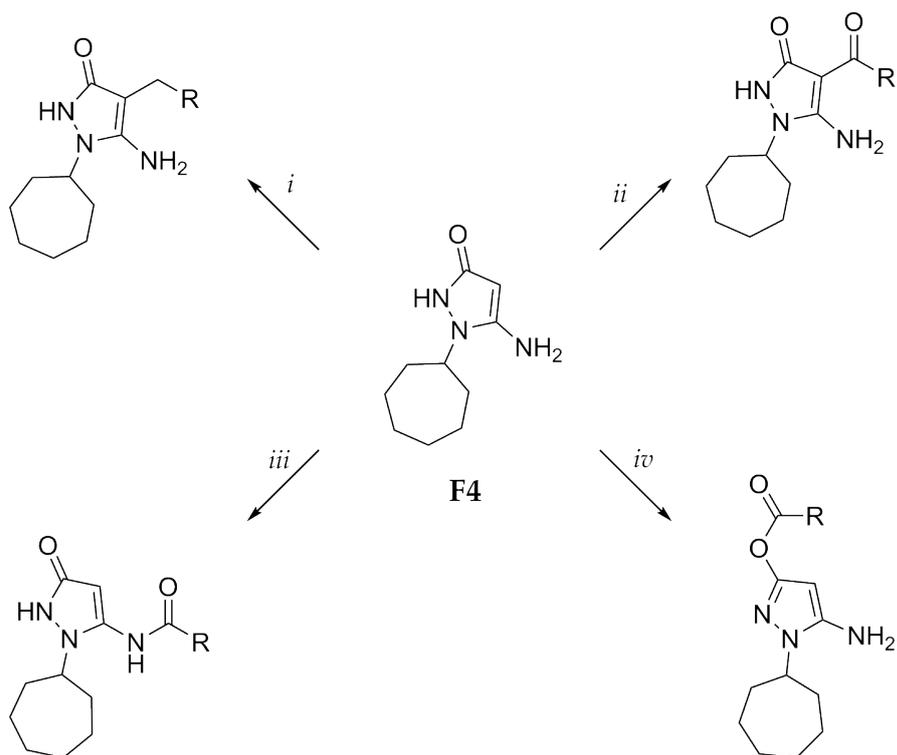
Die Acylierung des Aminfragmentes mit Epoxybernsteinsäure lieferte somit kein weiteres Molekül mit irreversibler inhibitorischer Aktivität. Aus diesem Grund wurde das elektrophile Zentrum des Inhibitors durch ein Michael-System ersetzt. Die Vorversuche der Aldehydsonden deuteten darauf hin, dass α,β -ungesättigte Carbonylverbindungen stärkere Inhibitoren der CVB3 3C Protease sind. Darüberhinaus existiert mit Rupintrivir bereits ein außerordentlich potenter, peptidbasierter Michael-Akzeptor als 3C Proteasehemmer, der es sogar bis in Phase II der klinischen Entwicklungsstudien schaffte.^[118,145] Ein weiterer Vorteil des Wechsels des elektrophilen Zentrums ist das Wegfallen der beiden Stereozentren des Epoxids. Dies ermöglicht die direkte Identifizierung der aktiven Spezies,

da die Verknüpfung von Sonde und Fragment nicht mehr zu diastereomeren Produkten führt.

5.4.2.2. α,β -ungesättigte Carbonylverbindungen

Es gelang Syntheserouten zu entwickeln, mit denen **F4** sowohl am Sauerstoff von C-3, am C-4, als auch am Stickstoff von C-5 modifizierbar ist (siehe Schema 5.9). Führt man eine Acylierung mit DCC in Pyridin durch, so wird primär der C-3 Sauerstoff modifiziert. Verwendet man dementsprechend mehr Äquivalente Carbonsäure, wird anschließend auch der C-5 Stickstoff funktionalisiert. Basenkatalysierte Hydrolyse des Esters liefert dann ein ausschließlich an C-5 modifiziertes Produkt. C-4 ist acylierbar, wenn man das Pyrazolon in heißer Essigsäure (60 °C) vorlegt und mit einem Anhydrid der zu kuppelnden Säure versetzt. Die klassischen Bedingungen der reduktiven Aminierung führen wie auch schon in Schema 5.6 durch Deoxygenierung zu einem in C-4 alkylierten Produkt.

Wenn der Epoxidester von **EP2** durch einen Vinylester ersetzt wird (**AB1**), kommt es nicht zu einer Steigerung der inhibitorischen Aktivität des Inhibitors. So zeigte **AB1** zwar den enzymkinetischen Verlauf eines irreversiblen Inhibitors (siehe Tabelle A.1), der $k_{\text{inact}}/K_{\text{I}}$ -Wert liegt mit $0.42 \pm 0.01 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ aber deutlich unter dem Wert des entsprechenden Epoxids **EP2**. Möglicherweise führt in diesem Fall der Wechsel von sp^3 - auf sp^2 -hybridisierte Kohlenstoffe zu einer ungünstigeren räumlichen Orientierung des Inhibitors. Das Einfügen einer Carbonylfunktion an der Position der Methylengruppe (**AB2**) steigerte den $k_{\text{inact}}/K_{\text{I}}$ -Wert dann wiederum um den Faktor 300. Ein ähnlicher Effekt wurde in Abschnitt 5.4.2.1, bei Inhibitor **EP2** und **EP1** bereits vermutet. **AB2** wurde als Nebenprodukt bei der Synthese von **AB10** gewonnen, was die schlechte Ausbeute von 12 % über 2 Stufen erklärt. Setzt man aber **F4** mit Maleinsäureanhydrid in heißer Essigsäure um, kann man **AB2** in fast quantitativer Ausbeute erhalten. Bei der Reaktion wird jedoch die Konfiguration der eigentlich *cis*-ständigen Doppelbindung zu *trans* umgewandelt, was an einem Anstieg der $^3J_{\text{H-H}}$ -Kopplungskonstante im $^1\text{H-NMR}$ Spektrum zu erkennen ist (siehe Abb. 5.12).^[146] Der Grund für die Umwandlung der Doppelbindung ist sicherlich im verwendeten Lösungsmittel und den Reaktionstemperaturen zu suchen, da Doppelbindungen säurekatalysiert isomerisieren können.^[147] Das *cis*-Isomer von **AB2** wurde bei der Reaktion nicht gebildet. Ersetzt man den Cycloheptylring durch einen planaren Phenylring (**AB3**), so nimmt der $k_{\text{inact}}/K_{\text{I}}$ -Wert auf ca. 10 %



Schema 5.9 Schematische Darstellung von **F4** und der verschiedenen Modifizierungsprodukte in Abhängigkeit des Synthesewegs. (i) $R\text{-CHO}$, NaCNBH_3 , 1,2-Dichlorethan, MeOH, RT, 3 h. (ii) $R\text{-CO-O-CO-R}$, AcOH, 60 °C, 12 h. (iii) $R\text{-COOH}$, DCC, Pyridin, RT, 16 h; NaOH, EtOH, RT, 30 min. (iv) $R\text{-COOH}$, DCC, Pyridin, RT, 16 h.

des Referenzwertes von **AB2** ab. Offensichtlich ist ein sperriger aliphatischer Rest einem flachen π -System vorzuziehen. Nicht möglich war es, **F4** mit dem Epoxid-Derivat des Maleinsäureanhydrids 3,6-Dioxabicyclo[3.1.0]hexan-2,4-dion umzusetzen, was ein Zugang zu (2*S*,3*R*)-3-(5-Amino-1-cycloheptyl-3-oxo-2,3-dihydro-1*H*-pyrazol-4-carbonyl)-2-epoxy-carbonsäureethylester gewesen wäre. Trotz der elektrophilen bicyklischen Struktur, wurden keine Reaktionsbedingungen gefunden unter denen 3,6-Dioxabicyclo[3.1.0]hexan-2,4-dion mit **F4** reagierte. Die Variation des Fumarsäureethylester-Motivs über die drei möglichen Bindungsstellen des Pyrazolonringes lieferte drei verschiedene Verbindungen mit signifikant unterschiedlichen Inhibitionsverhalten (siehe Schema 5.10, bzw. Tabelle A.1). Während **AB2** noch ein potenter irreversibler Inhibitor ist, ist das Sauerstoffverbrückte Derivat **AB4** nur noch ein reversibler Inhibitor, der zwar eine gewisse Affinität für die Bindung an die Proteaseoberfläche besitzt, dessen elektrophiles Zentrum jedoch

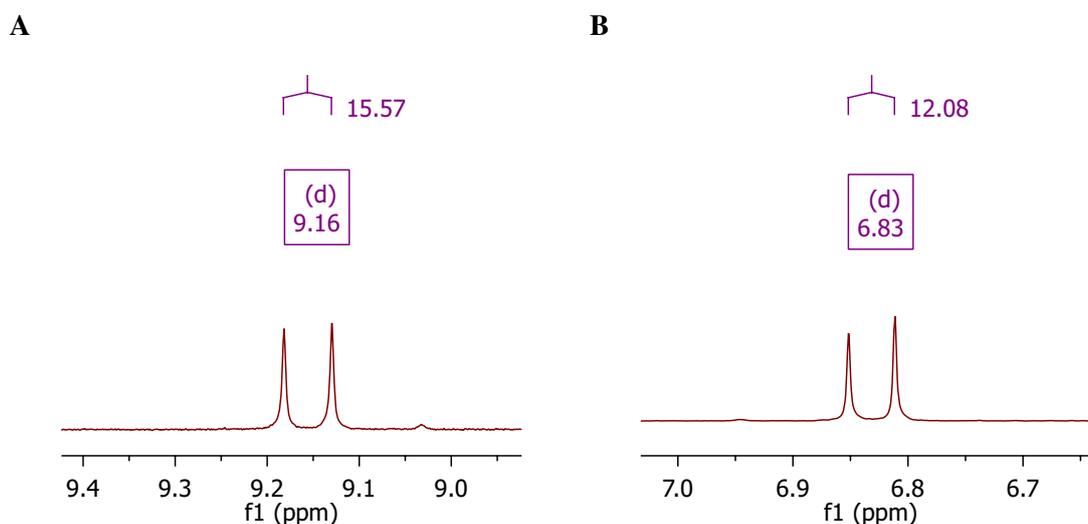
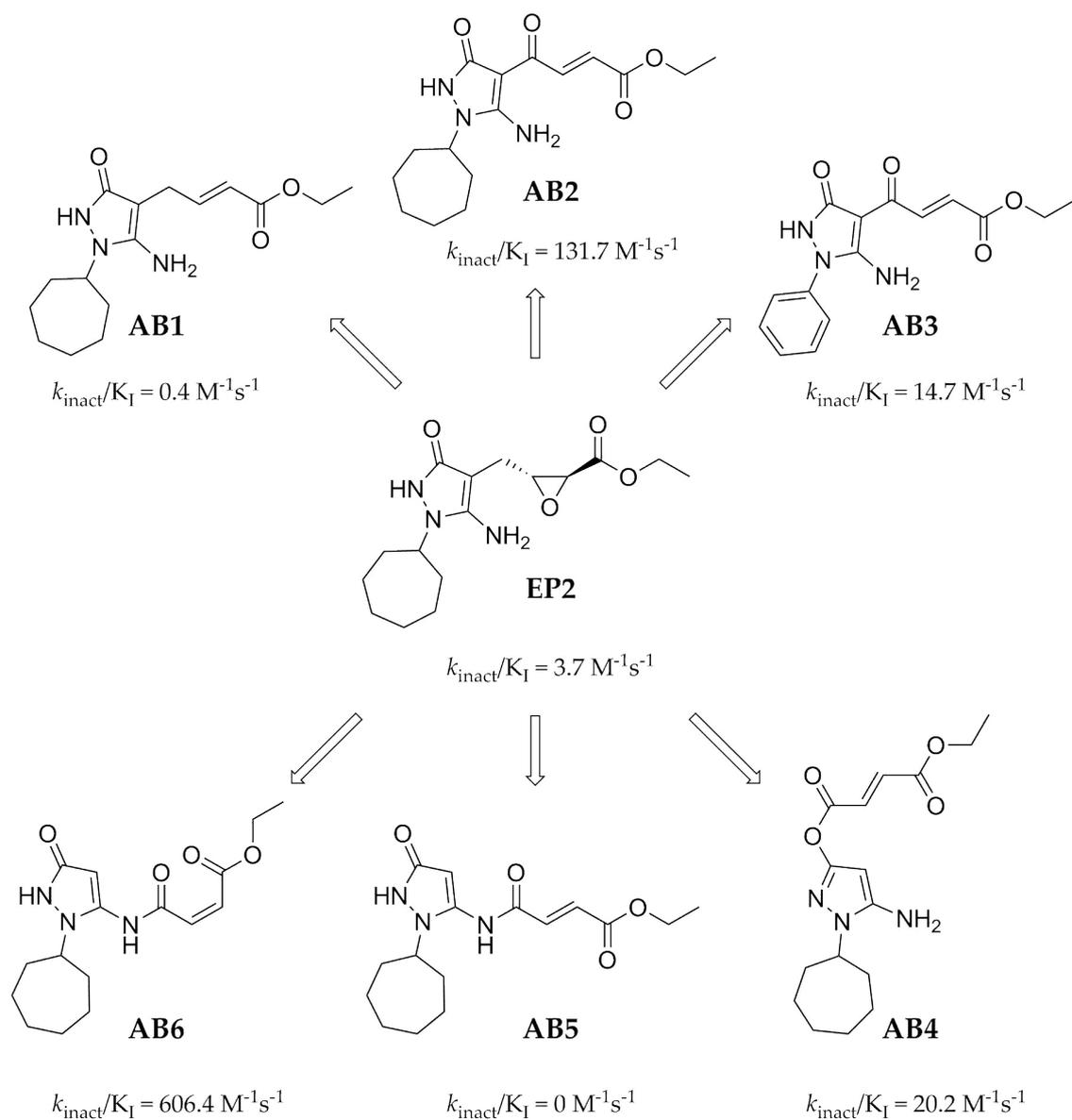


Abb. 5.12. Abgebildet sind Ausschnitte der ^1H -NMR Spektren von **AB2** (A) und **AB6** (B) in Pyridin- d_5 . Dargestellt ist jeweils ein Signal eines olefinischen Protons des Michael-Systems mit hervorgehobener $^3J_{\text{H-H}}$ -Kopplungskonstante. Für *trans*-Olefine liegt diese bei 15.6 Hz, wohingegen sie bei *cis*-ständigen Olefinen nur 12.1 Hz beträgt.

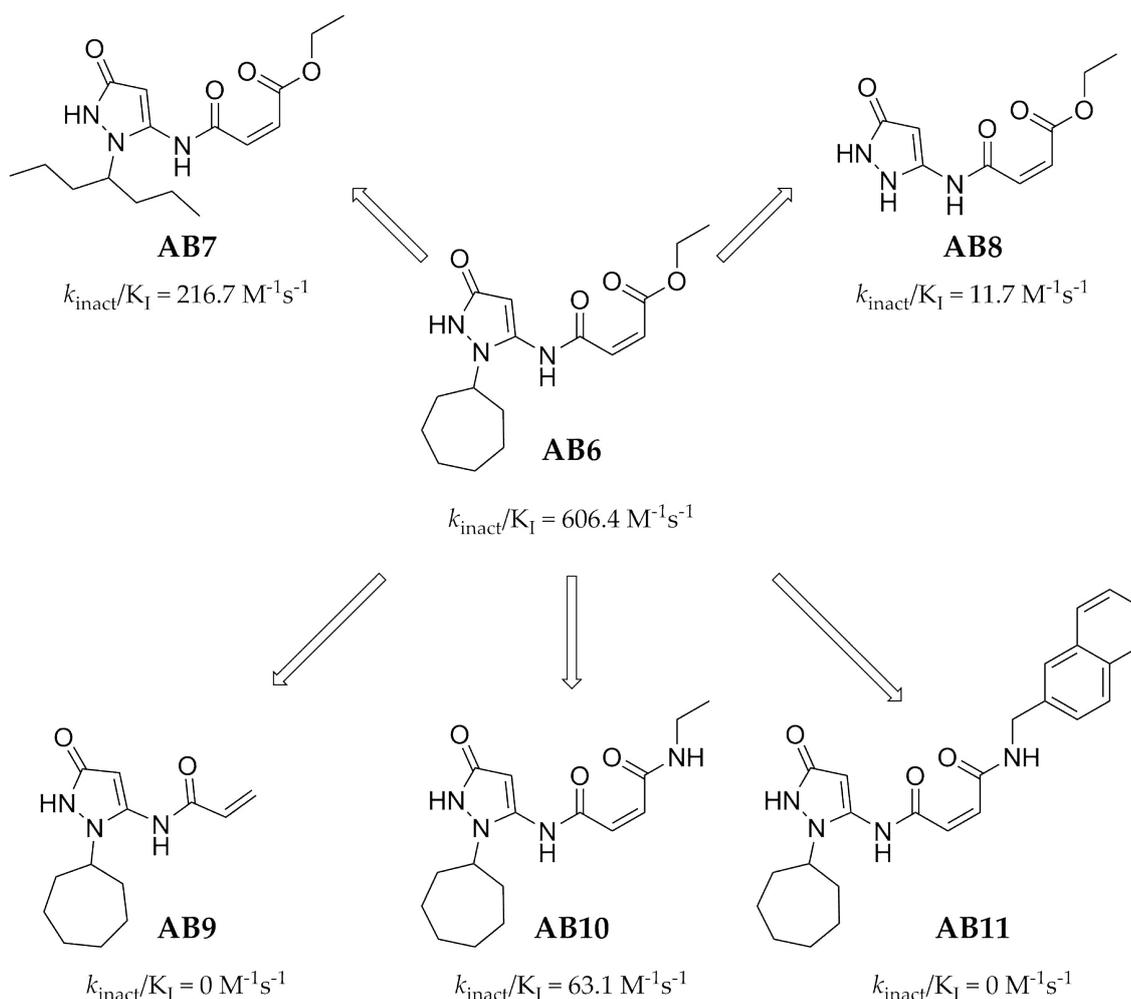
keine Reaktion mit dem Thiol der Protease eingeht. Das Stickstoff-verbrückte Derivat **AB5** ist wiederum inhibitorisch inaktiv. Da sich die intrinsische Reaktivität des Michael-Systems zwischen den drei Derivaten nur marginal unterscheidet, sind die Unterschiede im Reaktionsverhalten mit der Protease auf stereoelektronische Effekte, wie z. B. die unterschiedliche räumliche Orientierung und damit einhergehende Wechselwirkungen zwischen Inhibitor und Protease, zurückzuführen. Verändert man bei **AB5** die Konfiguration der Doppelbindung von *trans* zu *cis*, so wird aus dem zunächst inaktiven Inhibitor **AB5** ein potenter irreversibler Inhibitor, der bis in den dreistelligen nanomolaren Bereich Aktivität mit der CVB3 3C Protease zeigt (siehe Tabelle A.1). **AB6** wurde als neue Leitstruktur ausgewählt, auf dessen Basis fünf Derivate synthetisiert wurden (siehe Schema 5.11). Die Acylierung des Pyrazolons am C-5 Stickstoff wurde durch die Reaktion mit Maleinsäureanhydrid in gekühltem Eisessig durchgeführt. Die Reaktion mit Maleinsäuremonoethylester in Pyridin mit DCC ist prinzipiell auch möglich, liefert aber schlechtere Ausbeuten. Dies ist besonders der Fall, wenn amidierete Maleinsäurederivate wie z. B. *N*-Ethylmaleamidsäure



Schema 5.10 Schematische Darstellung von EP2 und der fünf daraus resultierenden α,β -ungesättigten Carbonylderivate.

verwendet wurden, da diese zur intramolekularen Zyklisierung neigen bevor sie mit dem Pyrazolon reagieren.

AB6 wurde an zwei Positionen sukzessive variiert um mehr Informationen über die



Schema 5.11 Schematische Darstellung von **AB6** und der fünf daraus abgeleiteten α,β -ungesättigten Carboxylderivate.

Struktur-Wirkungsbeziehung zu erhalten. Eine Position war die Estergruppe, als zweite Variationsmöglichkeit wurde der Cycloheptylring ausgewählt. Die Öffnung des Cycloheptylringes führte zu einer deutlichen Abnahme der inhibitorischen Aktivität. Der $k_{\text{inact}}/K_{\text{I}}$ -Wert von **AB7** beträgt nur noch 35 % des Wertes von Cycloheptylderivat **AB6**. Noch deutlicher wird dieser Effekt bei **AB8**, wo gänzlich auf eine Alkylierung des N-1 Stickstoffes verzichtet wurde. Der $k_{\text{inact}}/K_{\text{I}}$ -Wert fällt auf 2 % des Referenzwertes von **AB6** ab. Es wird deutlich, dass ein sperriger, unpolarer Rest unverzichtbar für den Inhibitor ist. **AB6** ist unter den Assaybedingungen (siehe Abschnitt 8.3.1) nicht stabil, denn die Esterfunktion wird innerhalb von zwei Stunden zur Carbonsäure hydrolysiert. Mit Umwandlung der

Estergruppe in eine Carbonsäure verschwindet auch die inhibitorische Aktivität, denn das Hydrolyseprodukt von **AB6** blockiert nicht den Substratumsatz der CVB3 3C Protease. Entfernt man den Carbonylrest vollständig, liefert das ebenfalls ein inhibitorisch inaktives Produkt **AB9**. Die Estergruppe ist offensichtlich essentiell für die inhibitorische Aktivität der Verbindung.

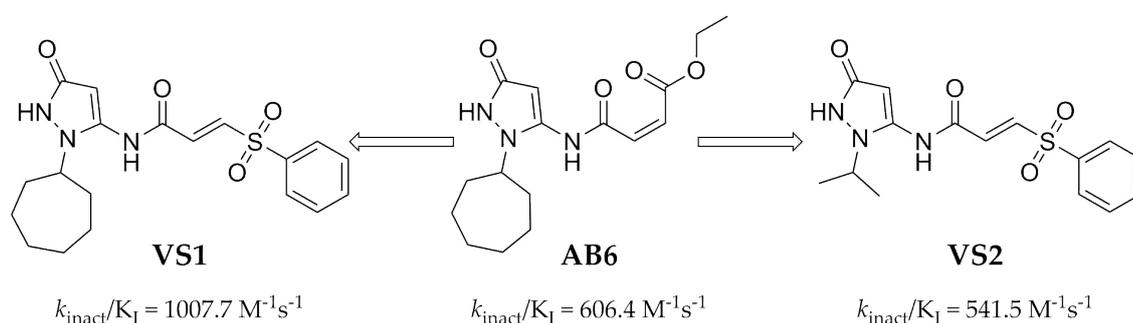
Um das Problem der Hydrolyse und den daraus resultierenden Aktivitätsverlust zu umgehen, wurde der Ester durch eine Ethylamidfunktion ersetzt, was eine Abnahme des $k_{\text{inact}}/K_{\text{I}}$ -Wertes von 90 % nach sich zog. Das Ethylamidderivat **AB10** ist jedoch noch bis in den einstelligen μM -Bereich wirksam, was Kristallisation eines Protein-Inhibitor-Produktes mit anschließender RKSA (Röntgenkristallstrukturanalyse), sowie Aktivitätstest auf zellulärer Basis ermöglichte (siehe Abschnitt 5.4.3). Ein Austausch des Ethylrestes zu 2-Methylnaphthalen, wie es Lee *et al.* 2007 vorschlugen, lieferte auch in diesem Fall keine Verbesserung.^[84] Tatsächlich führte die Modifizierung mit einem großen unpolaren Rest wie schon bei **EP4** zu einer inaktiven Verbindung (**AB11**).

Diese Ergebnisse untermauern, dass alle Derivatisierungen von **AB6** zu einer Abnahme der inhibitorischen Aktivität führen. Jedoch kann es durchaus ratsam sein, etwas Aktivität für mehr Stabilität "zu opfern". In der Wirkstoffentwicklung ist eine ausreichende Bioverfügbarkeit des aktiven Moleküls von elementarer Bedeutung. Als weitere Möglichkeit ein stabiles Derivat zu erzeugen, wurde deshalb die Einführung eines Vinylsulfons gewählt (siehe Schema 5.12).

5.4.2.3. Vinylsulfone

Vinylsulfone sind hinsichtlich nukleophiler Angriffe auf die Kohlenstoffatome der Doppelbindung etwas reaktionsträger als die vergleichbaren Maleinimide und Fumarsäure- bzw. Maleinsäureeethylester.^[148,149] Jedoch zeigte sich bei den Daten der α,β -ungesättigten Ester eine starke Abhängigkeit der Reaktivität von der räumlichen Struktur des Inhibitors (vgl. **AB5** & **AB6**). Somit ist es möglich, dass die geringere Reaktivität durch zusätzliche Wechselwirkungen des Vinylsulfons ausgeglichen wird. Um die Vinylsulfongruppe einzuführen, bot es sich an, den Baustein (*E*)-3-(Phenylsulfonyl)acrylsäure **VS1a**^[150] zur Acylierung des Pyrazolons zu verwenden. Es wurden zwei Vinylsulfonderivate hergestellt, die mit $k_{\text{inact}}/K_{\text{I}}$ -Werten von $1007.7 \pm 102.2 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ für **VS1**, bzw. $541.5 \pm 6.3 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ für **VS2** die beiden aktivsten getesteten Verbindungen darstellen. Ebenfalls bestätigten

sie die Beobachtung, dass die Verkleinerung des Cycloheptylrestes eine Abnahme der inhibitorischen Potenz nach sich zieht. Die Synthese der Vinylsulfon-Inhibitoren wurde über die doppelte Acylierung von **F4** mit **VS1a** in Pyridin mit DCC, mit anschließender basischer Hydrolyse des Vinylsulfonesters, vollzogen. Dabei konnten **VS1** und **VS2** jeweils nur in niedrigen Ausbeuten erhalten werden. Ein möglicher Weg die Ausbeuten zu steigern, wäre (*E*)-3-(Phenylsulfonyl)acrylsäure vor der Acylierung des Pyrazolons mit Hilfe von *iso*-Butylchlorformiat, in ein gemischtes Anhydrid zu überführen. Die Acylierung des Pyrazolons mit Anhydriden in Essigsäure liefert bessere Ausbeuten.



Schema 5.12 Schematische Darstellung von **AB6** und der zwei daraus abgeleiteten Vinylsulfonderivate **VS1** und **VS2**.

5.4.3. Validierung und Evaluierung der Ergebnisse

5.4.3.1. Diskussion der MS-Spektren

Die ESI-MS Messungen zeigten, dass die Protease mit der Aldehydsonde bzw. den kombinierten Fragmenten nur einmal reagiert. Das eingesetzte Protease-Konstrukt besitzt nur ein Cystein, welches als katalytisch aktive Aminosäure auch die größte Nukleophilie besitzt. Dies bedeutet, dass die eingesetzten Elektrophile ausschließlich mit dem aktiven Zentrum reagieren, selbst wenn die Sonde an sich zu klein ist, um substratähnliche Wechselwirkungen auszubilden. Ein Beweis dieser Annahme ist, dass die Inhibitoren **CK1**, **AB10** und **VS1** nicht in der Lage sind, die CVB3 3C Mutante C147A zu modifizieren, bei der das aktive Cystein durch ein nicht nukleophiles Alanin ersetzt wurde (siehe Tabelle A.2).

Aus den weiteren Messungen der Inhibitoren ging hervor, dass Estergruppen in α -Stellung zum elektrophilen Zentrum unter den Bedingungen des Assays nicht stabil sind. Der Massenzuwachs der Protease nach Inkubation mit **AS3** bzw. **AB6** entspricht

ausschließlich der korrespondierenden Carbonsäure. Da **AB6** durch die Hydrolyse seine inhibitorische Aktivität vollständig verliert, liegt es nahe, dass die Hydrolyse der Esterfunktion auch nach der Reaktion des Inhibitors mit der Protease ablaufen kann. Der Kristallstruktur von **AB10** im Komplex mit der 3C Protease ist zu entnehmen, dass die Carbonylgruppe der Esterfunktion im Oxyanionen-Loch stabilisiert wird und somit eine Hydrolyse begünstigt wird. Jedoch reicht auch schon das Lösen von **AS2** und **AB6** im schwach basischen Puffer (pH 7.5) aus, um die Esterfunktion langsam zu hydrolysieren. Ein Massenspektrum der CVB3 3C Protease mit dem intakten Inhibitor **AB6** konnte mit Hilfe einer MALDI-ToF-ToF/MS Messung erhalten werden (siehe Abb. 5.13).

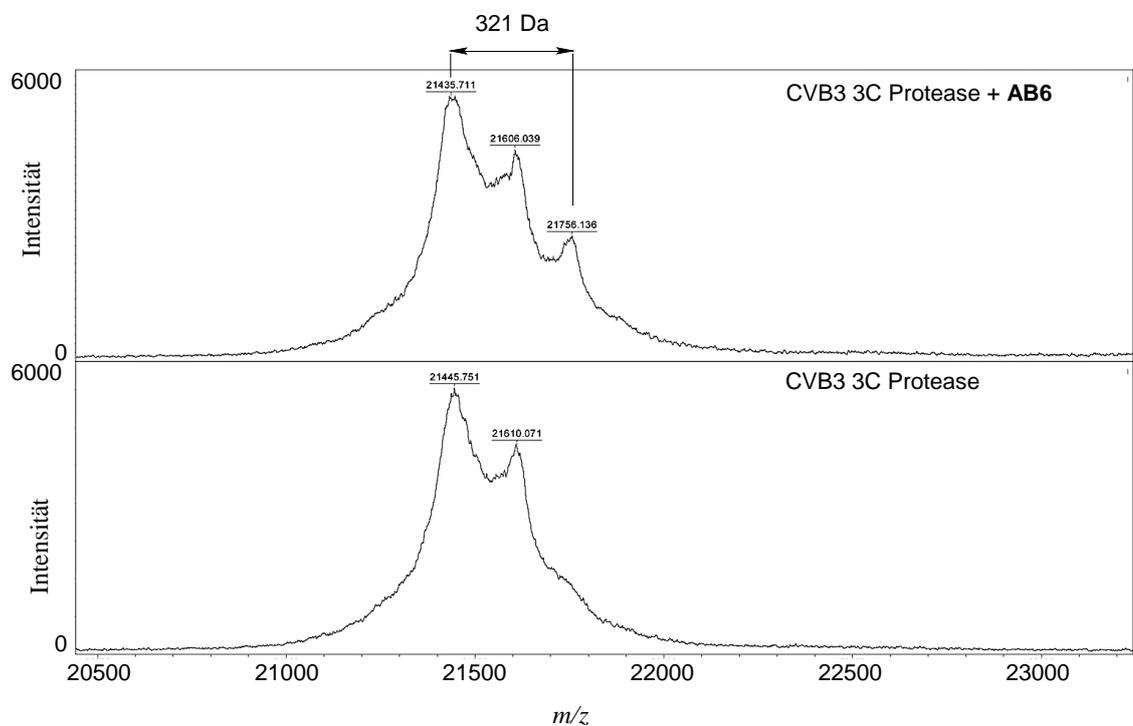


Abb. 5.13. Abgebildet ist das MALDI-ToF-ToF Massenspektrum der CVB3 3C Protease nach Inkubation mit **AB6** (oben) und ohne Zusatz des Inhibitors (unten). Die Protease wurde im Assaypuffer für 15 Minuten mit dem Inhibitor inkubiert (250 μ M) und anschließend bis zum Zeitpunkt der Messung im Tiefkühlschrank gelagert. Die Proben wurden an einer Ultraflex III ToF/ToF von Bruker Daltonics gemessen. Molekulargewicht CVB3 3C Protease: 21471 Da, Molekulargewicht **AB6**: 321 Da.

Die Vinylsulfone **VS1** und **VS2** lieferten die besten Inaktivierungsraten im Proteaseassay und die ESI-MS Messungen konnten eine kovalente Modifizierung des aktiven

Zentrums der Protease bestätigen. Jedoch beträgt der Massenshift der Protease nach der Inkubation mit **VS1** nur 258.5 Da (siehe A.2). Diese Masse entspricht nicht dem vollständigen Inhibitor (da $M(\mathbf{VS1}) = 389.5$ Da) und muss daher aus einem Bruchstück dessen hervorgehen. Da **VS1** im Assaypuffer stabil ist, muss die Fragmentierung aus einer Reaktion mit der Protease resultieren. Ob die Fragmentierung vor oder nach der Reaktion mit dem aktiven Cystein stattfindet, konnte nicht abschließend geklärt werden. Bremmer *et al.* zeigten, dass Vinylsulfone mit Natriumdithionit desulfonyliert werden können.^[151] Das Produkt dessen besäße immernoch ein intaktes Michael-System, an dem die Reaktion mit dem Thiol stattfinden kann. Das desulfonylierte Produkt von **VS1** hätte aber nicht das Molekulargewicht von 258 Da sondern nur 249 Da. Da die stark reduktiven Bedingungen der Reaktionen von Bremmer *et al.* auch im Proteaseassay vorliegen, kann ebenfalls ausgeschlossen werden. Jedoch wurde daraufhin die Reaktivität der Inhibitoren bezüglich anderen Nukleophilen und reduktiven Bedingungen näher untersucht.

5.4.3.2. Diskussion der Reaktivität der Inhibitoren

Die vergleichenden MS-Messungen der Inhibitoren mit der CVB3 3C^{Pro} und der CVB3 Mutante C147A konnten zeigen, dass die Modifizierung der Protease ausschließlich an Cys147 stattfindet. Da Cys147 aber das einzige Thiol des Proteins darstellt, kann man keine Aussagen bezüglich der Selektivität zu verschiedenen Thiolen treffen. Dies ist jedoch in vielerlei Hinsicht wichtig, da in Proteaseassays häufig Reduktionsmittel auf Thiol-Basis (z. B. DTT) verwendet werden. Darüberhinaus muss dafür gesorgt werden, dass das Molekül nicht mit den vielen zellulären Thiolen (z. B. aus Glutathion oder Humanalbumin) reagiert, um zelluläre Aktivität und eine potentielle Weiterentwicklung zum Wirkstoff sicher zu stellen.

Die unspezifische Reaktivität von **AB10** und **VS1** mit Thiolen wurde durch Inkubation einer äquimolaren Mischung (1 mM) aus Inhibitor und 3-Mercaptopropionsäure in Assaypuffer überprüft. Nach 2.5 Stunden wurde die Lösung mittels LC/MS analysiert, was bei beiden Inhibitoren eine Reaktion mit dem Thiol zeigte.

AB10 wird in den 2.5 Stunden zu 70 % umgesetzt. Es bilden sich zwei Hauptprodukte, wovon das primäre Hauptprodukt einem Addukt von 3-Mercaptopropionsäure (3-MPS) und **AB10** entspricht. Wie auch bei der Proteasereaktion greift das nukleophile Thiolat den Michael-Akzeptor an, was ein Additionsprodukt liefert. Das zweite Hauptprodukt

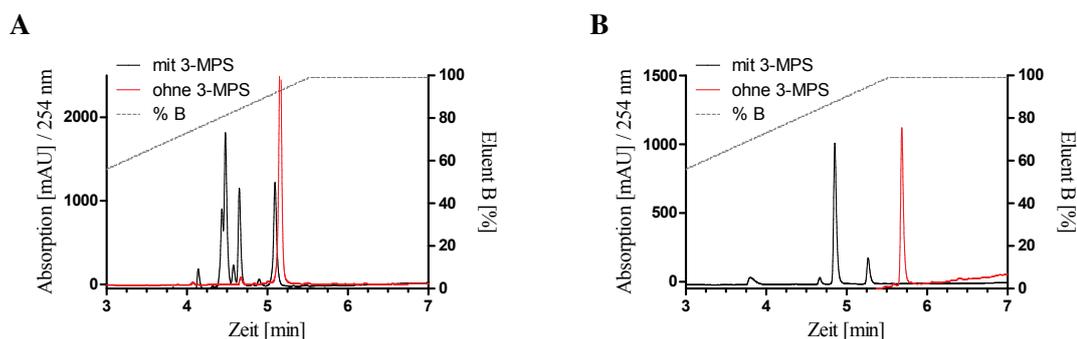


Abb. 5.14. Abgebildet ist das LC/MS-Chromatogramm von **AB10** mit und ohne Anwesenheit von 3-Mercaptopropionsäure (3-MPS) (**A**), sowie das LC/MS-Chromatogramm von **VS1** mit und ohne Anwesenheit von 3-Mercaptopropionsäure (**B**). Die Konzentration von Inhibitor und Thiol betrug 1 mM.

stellt hingegen kein eigentliches Reaktionsprodukt von 3-MPS und **AB10** dar, da es das gleiche Molekulargewicht besitzt wie **AB10**. Es handelt sich hierbei also um eine isomere Verbindung. Denkbar ist z. B. eine Isomerisierung der Doppelbindung von *cis* zu *trans*.

VS1 wird in den 2.5 Stunden vollständig umgesetzt. Es bildet sich ein Haupt- sowie ein Nebenprodukt, im Verhältnis 85:15. Beim Nebenprodukt handelt es sich um das Additionsprodukt aus 3-MPS und **VS1**, wie es auch schon bei **AB10** nachgewiesen wurde. Das Hauptprodukt der Reaktion entspricht einem Eliminierungsprodukt des Adduktes, bei dem es wahrscheinlich zum Abgang von Phenylsulfinat kommt. Eliminierungsreaktionen von Alkyl-Arylsulfonen sind prinzipiell bekannt, benötigen jedoch die Zugabe von starken Basen und hohen Reaktionstemperaturen.^[152] Für die Aufklärung des Mechanismus sind folglich noch weitere Experimente nötig. Die beobachtete Desulfonylierung ist ebenfalls im Einklang mit den MS-Ergebnissen aus Abschnitt 5.4.3.1, wo gezeigt werden konnte, dass die Protease nur mit einem Fragment von **VS1** modifiziert wird.

3-MPS wurde gewählt um freie, nicht katalytisch aktive Cysteinreste zu imitieren. Um auch die Beständigkeit gegen Thiol-basierte Reduktionsmittel zu bestimmen, wurden **EP2**, **EP3**, **AB1**, **AB6**, **AB10** und **VS1** in einer 1 mM wässrigen DTT-Lösung gelöst. Die Konzentration des Inhibitors entsprach dabei 320 μ M. Bis auf **VS1** und **EP2** konnte bei keinem Inhibitor eine Veränderung bzw. Reaktion nachgewiesen werden. Bei **EP2** bildete sich zu 36 % eine isomere Verbindung, während es bei **VS1** zur Ausbildung eines desulfonylierten Produktes kam, an das ein Molekül DTT addiert war. Es entstand somit

das analoge Produkt der Umsetzung mit 3-MPS. Obwohl die Inhibitoren unselektiv mit freien Thiolen reagieren, sind bis auf die Vinylsulfone alle zu einem gewissen Grad stabil gegenüber reduktiven Bedingungen.

Zusätzlich zu den Reaktivitätsuntersuchungen, wurde die Hydrolyseempfindlichkeit der Inhibitoren **AB6** und **AB10** in zwei typischen Assaypuffern mittels Umkehrphasen-HPLC untersucht.⁴ Als Puffer dienten einerseits ein Tris(hydroxymethyl)-aminomethan*HCl-Puffer (30 mM TRIS*HCl, pH 8.0, 50 mM NaCl) sowie ein 2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure*NaOH-Puffer (50 mM HEPES*NaOH, pH 7.4, 50 mM NaCl). Beide Inhibitoren wurden jeweils zu 50 µM in den Puffern gelöst und ihr Zustand nach drei Stunden Inkubation mit den Chromatogrammen der frisch in Puffer gelösten Inhibitoren verglichen (siehe Abb. 5.15).

Die Chromatogramme zeigen, dass **AB6** weder im Tris- noch im HEPES-Puffer stabil ist. Während es bei der Inkubation im HEPES-Puffer zu einer Hydrolyse des Ethylesters kommt, werden nach der Inkubation im Tris-Puffer weitere Abbauprodukte gebildet. Diese stammen wahrscheinlich aus der Reaktion des Inhibitors mit der primären Aminofunktion des Puffers. Zur Bildung dieser, bzw. ähnlicher Abbauprodukte kommt es auch bei **AB10**. Löst man **AB10** jedoch in HEPES-Puffer, so findet keine Zersetzungsreaktion statt. Aus diesem Grund wurde HEPES*NaOH als Puffer für alle Proteasereaktionen gewählt. Die Vinylsulfone **VS1** und **VS2** zeigten eine deutlich bessere Stabilität als die α,β -ungesättigten Carbonylverbindungen und waren weder hydrolyseempfindlich, noch gingen sie Reaktionen mit den Pufferbestandteilen ein.

Nach Erhebung dieser Daten wurden **AB6** und **AB10** im Rahmen eines *in vitro* Proteolyse-Aktivitätsassays mit der EV-B93 3C Protease per HPLC untersucht,⁵ wobei die Inkubationszeit von Protease und Inhibitor (und somit die mögliche Hydrolysezeit von **AB6**) so gering wie möglich gehalten wurde.^[128] Ein Peptid, welches die 2C↓3A Spaltstelle des Polyproteins von EV-B93 repräsentiert (Ac-RHSVGATLEALFQ↓GPPVYREIKIS-NH₂; Genepep) wurde verwendet, um die proteolytische Aktivität von 3C^{Pro} in Anwesenheit der Inhibitoren zu kontrollieren. Aussagen zur EV-B93 3C Protease sollten aufgrund der weitgehenden sequentiellen und strukturellen Übereinstimmung ebenso für die CVB3 3C Protease gelten (siehe Abb. 5.16).

⁴Diese Arbeiten wurden von Z. Kaczmarska unter der Aufsicht von Prof. M. Coll am IRB Barcelona durchgeführt.

⁵Diese Arbeiten wurden von Z. Kaczmarska unter der Aufsicht von Prof. M. Coll am IRB Barcelona durchgeführt.

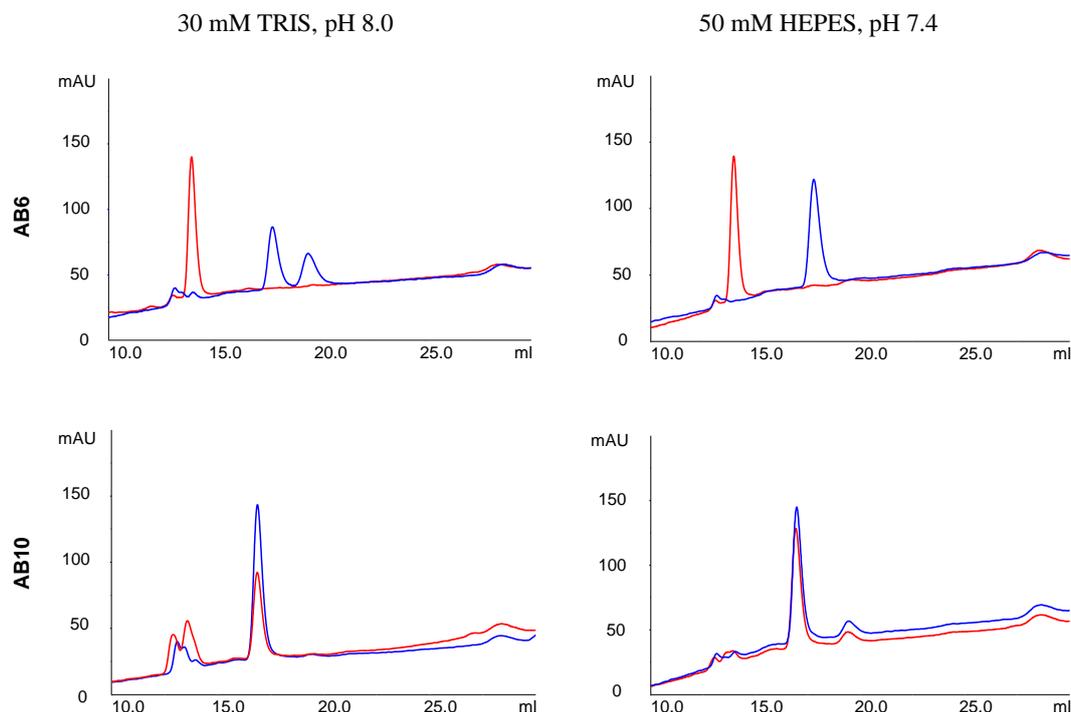


Abb. 5.15. Abgebildet sind die HPLC-Chromatogramme der Inhibitoren **AB6** und **AB10** vor und nach Inkubation in zwei verschiedenen Assaypuffern. Chromatogramme der Verbindungen vor der Inkubation sind blau gefärbt, die Chromatogramme nach dreistündiger Inkubation bei 37 °C rot. Die Konzentration der Verbindungen in Puffer war jeweils 50 μM . Die Detektion erfolgte bei 215 nm, als Trennsäule diente eine Source 5RPC ST 4.6/150 (GE Healthcare).

Die proteolytische Aktivität von EV-B93 3C^{Pro} wurde in drei verschiedenen molaren Verhältnissen von Protease und Inhibitor untersucht. Trotz der geringeren Stabilität von **AB6** zeigte sich eine deutlich geringere Substratumsetzung als bei vergleichbaren **AB10**-Konzentrationen. So reicht eine äquimole Mischung von Protease und **AB6** um den Substratumsatz komplett zum Erliegen zu bringen. Derselbe Effekt ist erst bei einem zehnfach Überschuss von **AB10** zur Protease zu verzeichnen (siehe Abb. 5.17).

5.4.3.3. Diskussion der Kristallstruktur von EV-B93 3C^{Pro} mit AB10

AB10 hat als α,β -ungesättigte Dicarboxylverbindung zwei weitgehend gleichreaktive Kohlenstoffatome, die als Elektrophil für die Reaktion mit dem aktiven Cysteinrest bereitstehen. Dies liefert etwas mehr Flexibilität, da der Inhibitor theoretisch zwei Bindungsmodi ausbilden kann, die um eine C=C-Doppelbindungslänge von 134 pm versetzt sind. Mit

5 | DYNAMISCHES LIGATIONSSCREENING AN DER COXSACKIE-VIRUS B3 3C PROTEASE

```

EVB93 3C-SEQUENZ      MKGPAFEFVAVAMMKRNASTVKTEYGEFTMLGIYDRWAVLPRHAKPGPTIL  50
CVB3 3C-SEQUENZ      -MGPAFEFVAVAMMKRNSSTVKTEYGEFTMLGIYDRWAVLPRHAKPGPTIL  49
                        *****:*****

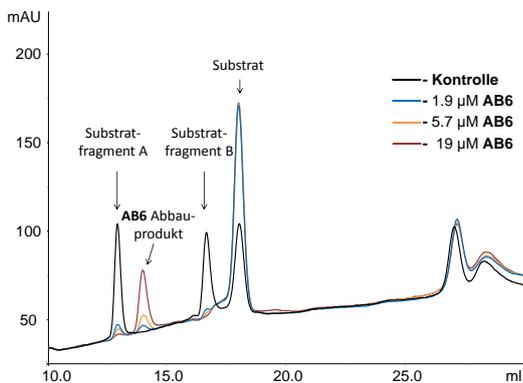
EVB93 3C-SEQUENZ      MNDQEVGLDAKELVDKDGNTLELTLKLNRRNEKFRDIRGFLAREEVEVN  100
CVB3 3C-SEQUENZ      MNDQEVGLDAKELVDKDGNTLELTLKLNRRNEKFRDIRGFLAKEEVEVN  99
                        *****:*****

EVB93 3C-SEQUENZ      EAVLAINTSKFPNMYIPVGQVTDYGFNLGGTPTKRMLVYVFPTRAGQCG  150
CVB3 3C-SEQUENZ      EAVLAINTSKFPNMYIPVGQVTEYGFNLGGTPTKRMLMYVFPTRAGQCG  149
                        *****:*****

EVB93 3C-SEQUENZ      GVLMSTGKVLGIHVGGNGHQGFSAALLRHYFNEE--QHSHHHH  191
CVB3 3C-SEQUENZ      GVLMSTGKVLGIHVGGNGHQGFSAALLKHYFNDEQLHHSHHHH  192
                        *****:*****
  
```

Abb. 5.16. Abgebildet ist der Sequenzabgleich der EV-B93 (obere Zeile) und der CVB3 (untere Zeile) 3C Protease. Aminosäuren sind im Einbuchstabencode angegeben und nach physikochemischen Eigenschaften eingefärbt: rot=kleiner hydrophober Rest, blau=sauer, magenta=basisch, grün=polare Gruppen (Hydroxyl, Sulfhydryl, Amine) und Glycin. Das multiple Sequenzalignment wurde mit ClustalW2 durchgeführt. Übereinstimmungsparameter: *identity* 97 %, *similarity* 99%.

A



B

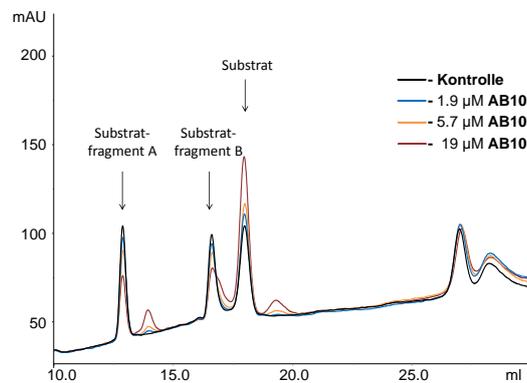


Abb. 5.17. Abgebildet sind die HPLC-Chromatogramme des Proteaseassays von EV-B93 3C Protease in Pufferlösung und Substrat (**P**) sowie die Proteaseassaylösung mit einem, drei und zehn Äquivalenten Inhibitor **AB6** (**A**) bzw. **AB10** (**B**). Enzymkonzentration: 1.9 µM; Pufferzusammensetzung: 50 mM HEPES, pH 7.4, 50 mM NaCl; Substrat: 30 µM Ac-RHSVGATLEALFQ↓GPPVYREIKIS-NH₂; detektiert bei 215 nm; Trennsäule: Source 5RPC ST 4.6/150 (GE Healthcare).

Hilfe der Kristallstruktur des EV-B93 3C^{Pro}-**AB10**-Komplexes, welcher mit einer Auflösung von 1.73 Å erhalten werden konnte, lassen sich Struktur-Wirkungsbeziehungen

ableiten und Reaktivitäten erläutern. Vergleicht man die kovalente Bindung von **AB10** mit dem Bindungsmodus des Vinylesters Rupintrivir,^[128,153] so fällt auf, dass sich beide in der Position des reaktiven Kohlenstoffatoms unterscheiden (siehe Abb. 5.18). Dadurch

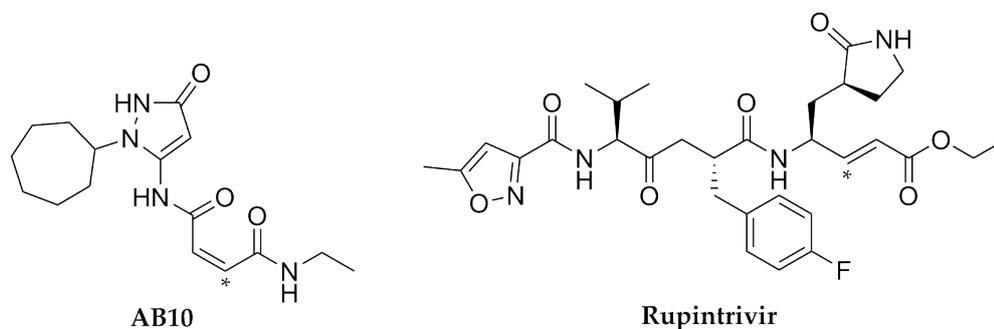


Abb. 5.18. Abgebildet sind die Strukturformeln von **AB10** und Rupintrivir (AG7088). Die mit dem aktiven Cysteinrest reagierenden Kohlenstoffatome sind mit einem Stern markiert.

dass das reaktive Kohlenstoffatom α -ständig zum Ethylamid bei **AB10** steht, kann das Sauerstoffatom der Carbonylfunktion im Oxyanionen-Loch durch Wasserstoffbrückenbindungen mit dem Proteinrückgrat von Cys147, Gln146 und Gly145 stabilisiert werden. Diese Wechselwirkungen bildet Rupintrivir nicht aus. Darüberhinaus interagiert das Amidproton der Ethylamidfunktion über ein Wassermolekül mit His40. Das Proton der weiteren Amidbindung neben der Vinylamidfunktion bildet Wasserstoffbrücken zu Arg143, Gly164 und über ein Wassermolekül zu His161 aus. Das Sauerstoffatom des Pyrazolonrings ist in der Lage substratähnliche Wechselwirkungen mit Gly164, Thr142 und über ein Wassermolekül mit Ala144 auszubilden. Die Wechselwirkung des Sauerstoffatoms ist sowohl mit der Hydroxylgruppe, als auch der Carbonylfunktion von Thr142 möglich. Daraus ergibt sich, dass man keine gesicherte Aussage über die aktive Tautomerform des Pyrazolons treffen kann. Der Pyrazolonring geht π,π -Wechselwirkungen mit den Peptidbindungen von Arg143-Ala144 und Gly164-Asn165 ein. Gln71 bildet als einzige Aminosäure der katalytischen Triade keine Interaktionen mit dem Liganden **AB10** aus. Ebenfalls ohne signifikante Wechselwirkung steht der Cycloheptylrest senkrecht von der Proteinoberfläche ins Medium. Warum ein kleinerer aliphatischer Rest zu einer merklichen Verschlechterung der Inhibitoraktivität führt, ist aus diesen Daten nicht ersichtlich. Jedoch ist die Elektronendichte der Kristallstruktur für **AB10** im Bereich des Cycloheptyl- sowie des Ethylrestes nicht vollständig definiert, was für eine starke Flexibilität der Reste spricht.

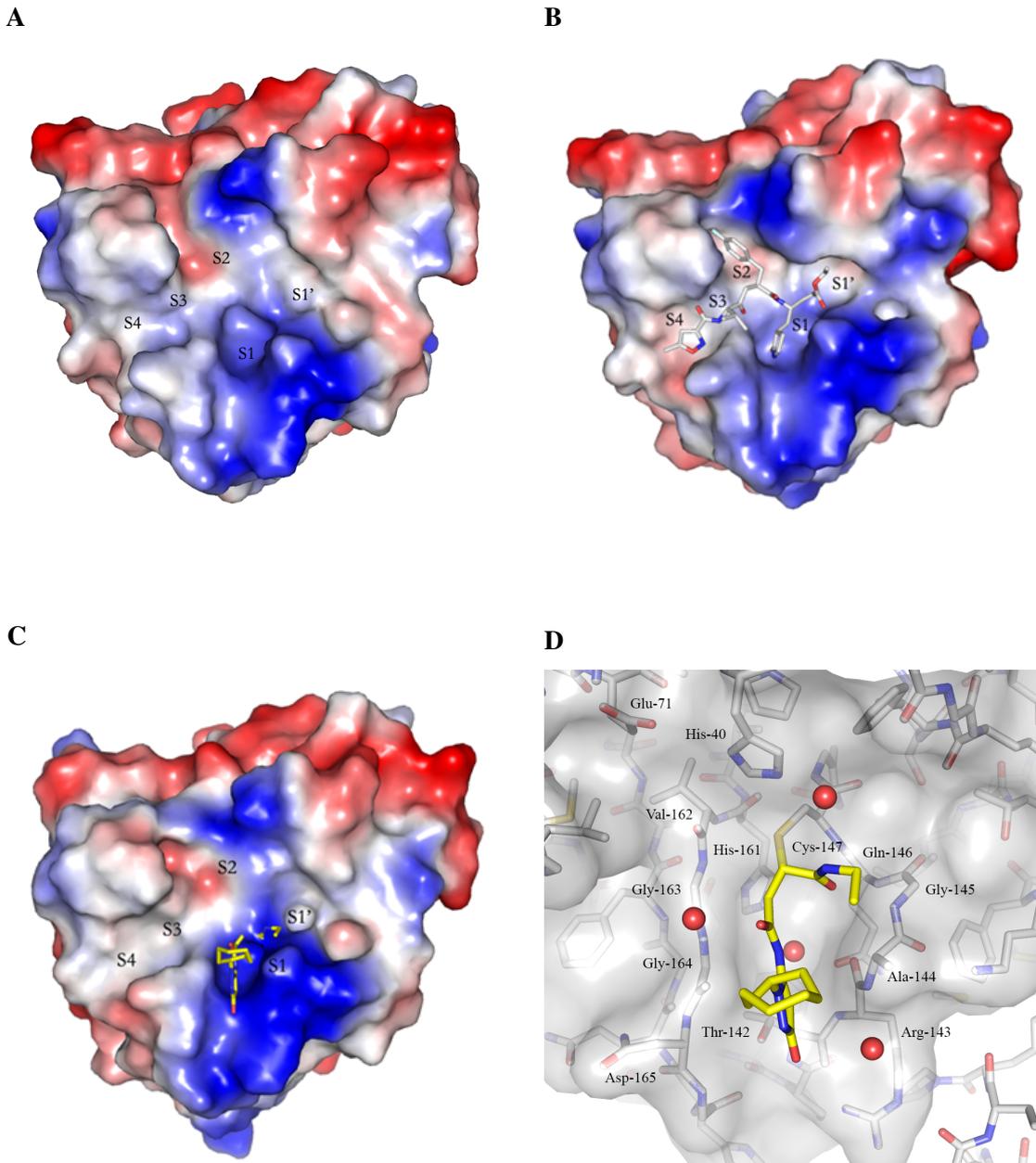


Abb. 5.19. Abgebildet sind Kristallstrukturen des aktiven Zentrums der EV-B93 3C Protease in der Totalen (**A** bis **C**) sowie in einer vergrößerten Darstellung (**D**). **A** zeigt die Protease ohne Liganden, während **B** und **C** die Protease komplexiert mit Rupintrivir bzw. **AB10** zeigt. Die Proteinoberfläche ist entsprechend des elektrostatischen Potentials gefärbt, wobei rot und blau negative bzw. positive Ladungen anzeigen. Die Inhibitoren werden als Stäbchenmodell dargestellt. Die Proteintaschen des aktiven Zentrums sind beschriftet. **D** zeigt die verfeinerte Struktur der EV-B93 3C Protease im Komplex mit **AB10**. Der Inhibitor und nahe Aminosäureseitenketten werden als Stäbchenmodell dargestellt. Rote Sphären stellen Wassermoleküle dar.

Von besonderer Beachtung ist, dass **AB10** nicht vollständig in S1 eindringt, sondern sich am Grund der Tasche ein Wassermolekül befindet, über welches beispielsweise die Amidfunktion (δ -ständig zum Ethylamid) Wasserstoffbrücken zu His161 ausbildet. Docking von **AB10** ins aktive Zentrum lieferte keinen Hinweis auf die Notwendigkeit eines Wassermoleküls in S1, da **AB10** eigentlich problemlos in S1 binden könnte. Es ist aber denkbar, dass es nach der Reaktion des aktiven Cysteins mit dem Inhibitor zu einer räumlichen Änderung von Protease oder **AB10** kommt, was dazu führt, dass der Inhibitor etwas aus der Tasche gezogen wird. Der entstehende leere Raum wird dann mit Wasser aufgefüllt. Man kann sich die Position des Wassermoleküls aber auch für die Inhibitorweiterentwicklung zu Nutze machen, indem man einen Wasserstoffbrückenakzeptor so an das Inhibitormolekül anfügt, dass er das Wassermolekül und somit die ausgebildeten Wechselwirkungen nachahmen kann. Da **AB10** ein kleines Molekül ist, welches nur S1 und S1' okkupiert, könnte **AB10** als Leitstruktur dienen und weitere Wechselwirkungen durch das Wachsen des Moleküls und Besetzen der Taschen S2, S3 und S4 gewonnen werden. S2 ist eine vergleichsweise flexible Proteintasche, die eine Vielzahl von Substraten annimmt. Eine Besetzung wäre ein vielversprechender erster Weiterentwicklungsschritt für **AB10**. Unglücklicherweise wäre der beste Weg S2 zu erreichen, über eine Modifikation des β -Kohlenstoffatoms des α,β -ungesättigten Ethylamids. Eine Modifikation der elektrophilen Doppelbindung wird aber immer ein sterisches Hindernis für die Reaktion des Thiolats darstellen und die inhibitorische Potenz erheblich einschränken. Ein Wachsen des Inhibitors in die S1'-Tasche mit großen hydrophoben Resten wurde von Lee *et al.* empfohlen, lieferte aber auch keinen Erfolg (siehe **AB11**).^[84]

5.4.3.4. Diskussion der zellulären Assays

Zur Bestimmung der zellulären Wirksamkeit, wie Zellgängigkeit, Stabilität im Zytoplasma, Inhibition des korrekten Targets und der Zytotoxizität, wurden mit ausgewählten Inhibitoren ein Multizyklus CPE-Reduktions Assay (CPE, engl. *cytopathic effect*, zytopathischer Effekt) sowie ein zellulärer Proteaseassay (engl. *subgenomic replicon assay*) durchgeführt (siehe Abb. 5.20). Eine ausführliche Aufstellung der experimentellen Materialien und Methoden ist publiziert.^[154,155]

Multizyklus CPE-Reduktions Assay

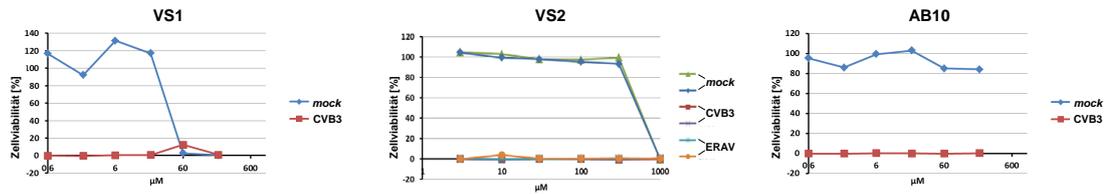
Für den Multizyklus CPE-Reduktions Assay wurden BGM-Zellen mit einem Virus (CVB3 – Gattung: Enterovirus, Art: Enterovirus B oder ERAV - Gattung: Aphthovirus, Art: Equine Rhinitis Virus A; 100 CCID₅₀ pro Well) infiziert bzw. scheininfiziert (*mock*) und mit der angegebenen Menge Inhibitor versetzt. Nach drei Tagen post-Infektion zeigten die unbehandelten Zellen einen vollständigen zytopathischen Effekt. Die Zellviabilität wurde mit Hilfe eines MTT-Assays (Farbstoff 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid) bestimmt und die Ergebnisse mit einem Mikroskop verifiziert. Im Multizyklus CPE-Reduktions Assay sollten Inhibitoren, die die Virusreplikation unterbinden, durch eine erhöhte Viabilität der Virus-infizierten Zellen detektiert werden können. Zellen, die nicht mit einem Virus infiziert wurden aber trotzdem mit Inhibitor versetzt wurden, dienten als Toxizitätskontrolle.

Bis auf **VS1** konnten die getesteten Inhibitoren das Zellsterben durch die Virusinfektion nicht verhindern. **VS1** zeigt ab einer Konzentration von 20 µM einen schwachen Anstieg an Zellviabilität für Virus-infizierte Zellen. Dieser Effekt ging dann aber ab Konzentrationen von 60 µM in Zytotoxizität über. Ebenfalls toxisch war **VS2** ab Konzentrationen von 300 µM. Auch in dieser Hinsicht stellt **VS1** somit die potentere Verbindung dar. **AB10** zeigte keine Zytotoxizität, konnte die Virusreplikation aber auch nicht eindämmen.

Zellulärer Proteaseassay

Der zelluläre Proteaseassay basiert auf dem Prinzip des Säugetier-Zwei-Hybrid-Systems^[156] und dient Identifizierung von Proteinliganden unter *in vivo* ähnlichen Bedingungen. Durch das Auslesen eines Fluoreszenzsignals kann bestimmt werden, ob die Inhibitoren in der Lage sind, die 3C Protease in lebenden Zellen zu inhibieren. Der Assay wurde mit zwei verschiedenen Enteroviren (CVB3 und EV-A71) durchgeführt und funktioniert über die Induktion der Expression eines Firefly-Luciferase Reporters durch einen chimären Transkriptionsfaktor. Der Transkriptionsfaktor besteht aus dem viralen Polyprotein (3A, 3B, 3C^{Pro} und 3D) sowie einer GAL4 DNA-Bindungsdomäne am N-Terminus und einer VP16 Transaktivierungsdomäne am C-Terminus. Eine aktive Form der Protease wird diese Domänen voneinander trennen. Wird die Protease aber inhibiert, so verbleiben die beiden Domänen im viralen Polyprotein und aktivieren die Expression des Firefly-Luciferase Reportergens. Eine Inhibition der Protease sorgt somit für ein verstärktes Firefly-Luciferase Signal.

Multizyklus CPE-Reduktions Assay



Zellulärer Proteaseassay

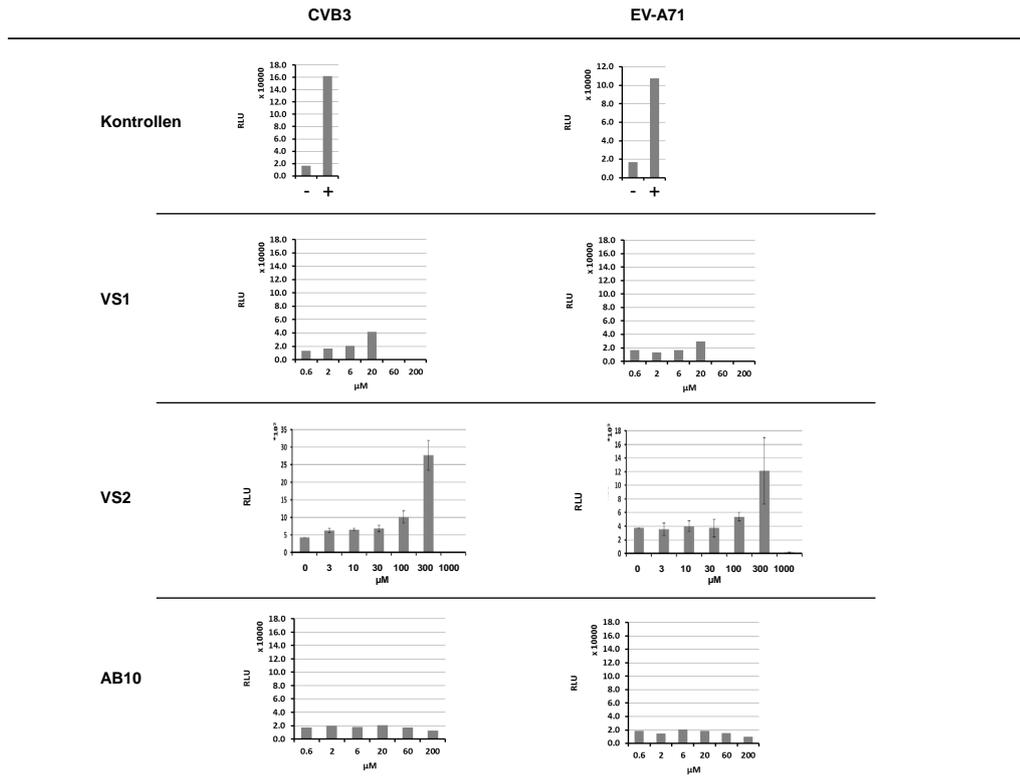


Abb. 5.20. Abgebildet sind die Ergebnisse des CPE-basierten Multizyklus Assays (oben) sowie die Ergebnisse des zellulären Proteaseassays für **VS1**, **VS2** und **AB10** (unten). (–) zeigt die Negativkontrolle an, bei der kein Inhibitor zugesetzt wurde. (+) zeigt die Positivkontrolle an, bei der der bekannte kovalente Inhibitor SG85 (50 μM)^[118] zugesetzt wurde.

Die Zellen wurden mit dem Assay-Konstrukt transfiziert und mit verschiedenen Konzentrationen der Inhibitoren **VS1**, **VS2** und **AB10** inkubiert. Nach 16 Stunden wurde die Luciferaseaktivität ausgelesen. **VS1** präzipitierte bei Konzentrationen ab 200 μM , was möglicherweise mit der Firefly-Luciferaseaktivität interferierte. Bei einer Konzentration von 20 μM im CVB3 und EV-A71 Assay konnte eine doppelt so hohe Luciferaseaktivität

wie bei der Negativkontrolle verzeichnet werden, was auf eine Inhibition der 3C Protease hindeutet. Da der CPE-Reduktions Assay bei gleicher Konzentration einen schwachen Anstieg der Zellviabilität zeigt, scheint es für **VS1** ein schmales therapeutisches Fenster zu geben, in dem die virale Replikation tatsächlich abgeschwächt wird. Der Übergang zwischen Wirksamkeit, Toxizität, Löslichkeit und Präzipitation ist aber fließend. **VS2** zeigt ebenfalls einen Anstieg des Luciferase-Signals bei einer eingesetzten Konzentration von 300 μM . Diese Inhibition ist jedoch zu schwach um im CPE-basierten Assay einen Effekt zu erzielen. Überhalb der Konzentration von 300 μM kommt es, wie auch bei **VS1**, zur Präzipitation des Inhibitors. Für **AB10** konnte eine Inhibition der zellulären Proteaseaktivität nicht nachgewiesen werden. Ob **AB10** überhaupt zellgängig ist, wurde nicht abschließend geklärt.

5.4.3.5. Diskussion der Selektivität der Inhibitoren

Dass die Abstufungen der inhibitorischen Potenz zwischen den verschiedenen Inhibitoren nicht allein aus der chemischen Reaktivität des elektrophilen Zentrums stammen, zeigte sich schon am Vergleich von **AB5** und **AB6**. Die Isomerisierung der Doppelbindung von *trans* auf *cis* hat keinen Einfluss auf die intrinsische Reaktivität des Moleküls und dennoch war ein erheblicher Aktivitätsunterschied bei der Inhibierung der 3C Protease zu verzeichnen. Um zu kontrollieren, welchen Beitrag das Fragment zur Inhibition leistet, wurden Derivate des elektrophilen Zentrums synthetisiert, bei denen der Glutamin-imitierende Pyrazolonteil fehlte. Die beiden Verbindungen **AB12** und **AB13**⁶ leiten sich von Maleinsäure- bzw. Maleamid ab und haben einen signifikant kleineren $k_{\text{inact}}/K_{\text{I}}$ -Wert als die Verbindungen, die mit dem Pyrazolon erweitert wurden (siehe Tab. 5.1). Es wird klar, dass der Rest, um den die Amidfunktion erweitert wird, die Bindung an die Proteinoberfläche deutlich verbessert und somit essentiell für eine angemessene Reaktion mit dem katalytischen Thiol ist, obwohl er auf die eigentliche Reaktivität des elektrophilen Zentrums keinen Einfluss hat.

Die aktivsten Inhibitoren **AB6**, **AB10** und **VS1** wurden ausgewählt, um ihre Aktivität an CVB3 3C^{Pro} ähnlichen Proteasen zu testen.⁷ Es wurden die 3C Proteasen von *Equine*

⁶Die Synthese von **AB13** wurde im Rahmen der Doktorarbeit von Carolin Tauber an der Freien Universität Berlin im Institut für Pharmazie durchgeführt.

⁷Diese Arbeiten wurden von Z. Kaczmarska unter der Aufsicht von Prof. M. Coll am IRB Barcelona durchgeführt.

Rhinitis Virus (ERBV-1), *Human Rhinovirus* (HRV-A49), *Enterovirus D* (EV-D68), *Aichi Virus* (AiV-1), *Sapelovirus* (PSV-1) und *Enterovirus B* (EV-B93) gewählt, die eine Sequenzähnlichkeit zwischen 99.0 % und 51.5 % gegenüber der CVB3 3C Protease haben (siehe Tab. 5.2).

Tabelle 5.1. Ein Vergleich der Inhibitionswerte zweier Inhibitoren mit und ohne gebundenes Fragment

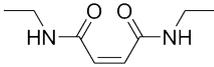
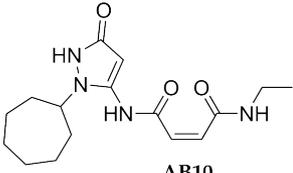
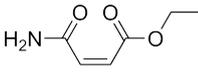
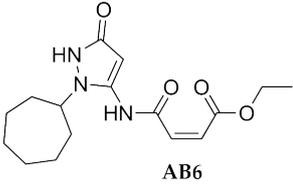
Inhibitorfragment	$k_{\text{inact}}/K_{\text{I}}\text{-Wert}$ [M ⁻¹ s ⁻¹]	Inhibitor	$k_{\text{inact}}/K_{\text{I}}\text{-Wert}$ [M ⁻¹ s ⁻¹]
 AB12	≈ 0	 AB10	63.1
 AB13	34.7	 AB6	606.4

Tabelle 5.2. Taxonomie der verwandten 3C Proteasen und Sequenzähnlichkeit zu CVB3 3C^{Pro}

Gattung	Art	Serotyp	CVB3
Enterovirus	Enterovirus B	EV-B93 ^[128]	99.0 %
Enterovirus	Enterovirus D	EV-D68 ^[157]	85.8 %
Enterovirus	Enterovirus A	EV-A71 ^[158]	84.2 %
Enterovirus	Rhinovirus A	HRV-A49 ^[159]	76.0 %
Sapelovirus	Sapelovirus A	PSV-1 ^[160]	72.8 %
Kobuvirus	Aichivirus A	AiV-1 ^[161]	55.4 %
Erbovirus	Equine Rhinitis Virus B	ERBV-1 ^[162]	51.5 %

Für ERBV-1 musste ein neues Peptidsubstrat beschafft werden, da das Substrat Ac-RHSVGATLEALFQ↓GPPVYREIKIS-NH₂ innerhalb von drei Stunden nur zu 5 %

prozessiert wurde. Als Ersatzsubstrat wurde Ac-AKDGGIFAQ↓SRDRHYLVGTV-NH₂ gewählt, welches die 2C/3A- und 3A/3B-Spaltstellen des ERBV-1 Polyproteins imitiert. Die Proteasen wurden drei Stunden bei 37 °C mit dem jeweiligen Substrat inkubiert und der Substratumsatz mittels HPLC analysiert. Diese Werte wurden dann mit dem Substratumsatz bei zwei verschiedenen Konzentrationen der zugesetzten Inhibitoren **AB6**, **AB10** und **VS1** verglichen (siehe Abb. 5.21).

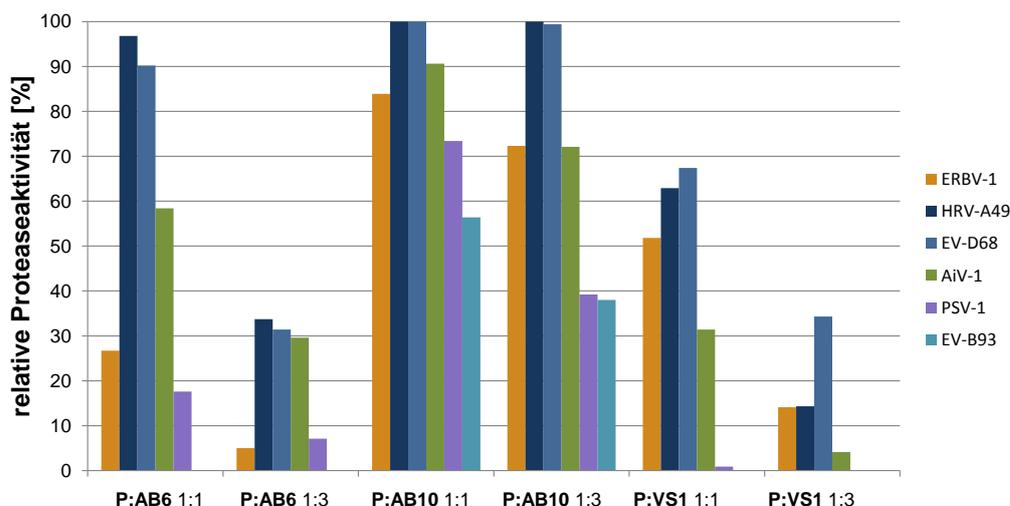


Abb. 5.21. Abgebildet sind die Ergebnisse des *in vitro* Proteolyse-Aktivitätsassays für **VS1**, **VS2** und **AB10** für sechs verschiedene 3C Proteasen.

Es zeigte sich, dass **AB6** und **VS1** bei den eingesetzten Konzentrationen den Substratumsatz bei allen Proteasen verringerten, wenn auch mit deutlichen Aktivitätsunterschieden zwischen den verschiedenen Proteasen. Wie auch bei den Messungen mit der CVB3 3C^{Pro} ist **VS1** die potenteste Verbindung, gefolgt von **AB6** und **AB10**. **AB10** war nicht in der Lage den Substratumsatz von HRV-A49 und EV-D68 zu inhibieren. Allerdings waren alle drei Inhibitoren an diesen beiden Proteasen am schwächsten. Das ist insofern überraschend, da EV-D68 eine Sequenzähnlichkeit von 85.8 % zur CVB3 3C^{Pro} aufweist. Die ERBV-1 Protease wird dahingegen trotz schwacher Sequenzähnlichkeit von knapp 50 % deutlich stärker inhibiert. An ERBV-1 zeigte sich auch der deutlichste Selektivitätsunterschied zwischen den α,β -ungesättigten Carbonylverbindungen **AB6** und **AB10** und dem Vinylsulfon **VS1**. So inhibieren **AB6** und **AB10** die 3C Protease von ERBV-1 stärker als die von AiV-1. Bei **VS1** ist es gegenteilig und AiV-1 wird stärker inhibiert als ERBV-1. Darüberhinaus ist

ERBV-1 die einzige Protease an der **AB6** aktiver ist als **VS1**. Einen weiteren Selektivitätsunterschied zwischen **AB6**, **AB10** und **VS1** gibt es, nur deutlich weniger ausgeprägt, bei HRV-A49 und EV-D68.

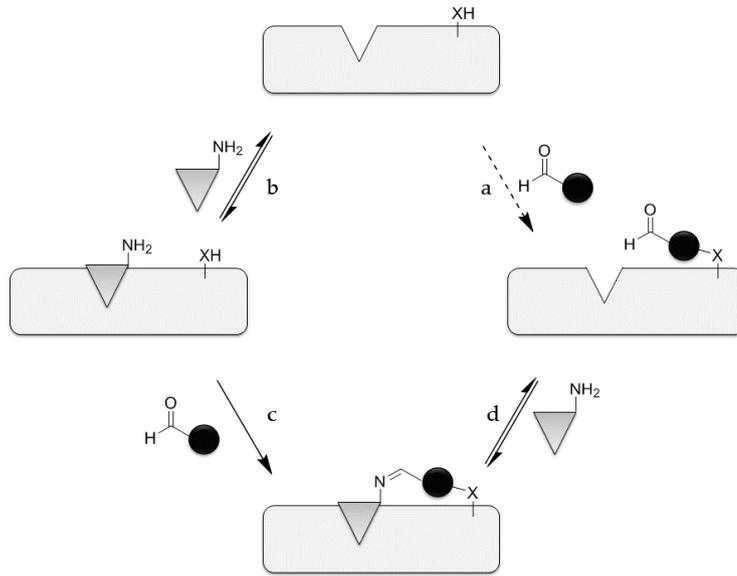
6. Resümee

Bislang wurden Proteinliganden hauptsächlich durch Screenings von Molekülbibliotheken, unter Verwendung geeigneter Bioassays entdeckt. Eine Methode, bei der sich einzelne Fragmente während des Bioassays zu einem geeigneten Proteaseinhibitor zusammensetzen, stellt nun eine verlockende, weil ressourcen- und kostensparende Weiterentwicklung dar (siehe Abb. 6.1).^[59,163–166] Die Selbstorganisation von Liganden auf Proteinoberflächen wurde bereits intensiv unter dem Namen *Dynamic Combinatorial Chemistry* erforscht, wobei reversible^[60,164,167–169] und irreversible^[170–177] Reaktionen ausgenutzt werden. Bis jetzt gingen vor allem Peptidomimetika daraus hervor, die sich auf Grund ihrer Peptidaseanfälligkeit aber nur bedingt als Arzneistoffe eignen. Somit ist der Bedarf an neuen Methoden weiterhin groß. Da fragmentbasierte Verfahren eine deutlich größere Abdeckung des chemischen Raumes und theoretisch auch qualitativ hochwertigere Ligand-Protein-Wechselwirkungen bieten, erscheint eine Kombination eines fragmentbasierten Verfahrens mit der Verwendung einer irreversibel reagierenden Stoffgruppe attraktiv. Die hier präsentierte Arbeit nutzt genau dieses Konzept und hilft dabei die methodischen Defizite zu schließen.

Der zentrale Ansatzpunkt der entwickelten Methode ist die Verwendung biselektrophiler Sonden. Es wurden drei verschiedene Sonden entwickelt, die sich in Aufbau und Inhibitor-Klasse unterscheiden. Die drei Sonden sind ein Chlormethylketon, ein α,β -ungesättigter Ester sowie ein Epoxid (siehe Abb. 6.2). Die Synthese des Chlormethylketons (Aldehydsonde 1, **AS1**) konnte, wie in der Literatur beschrieben,^[120,121] mit guten Ausbeuten durchgeführt werden. Der α,β -ungesättigte Ester **AS2** ist kommerziell erhältlich und konnte sowohl für das dynamische Ligationsscreening als auch als Ausgangsstoff für die Synthese des Epoxids **AS3** verwendet werden.^[122]

Für das dynamische Ligationsscreening wurden zwei virale Proteine ausgewählt, die sowohl therapeutisch relevant als auch vollständig charakterisiert sind. Dabei handelte es sich einerseits um die NS2B/NS3 Protease des West-Nil-Virus und andererseits um die 3C

A



B

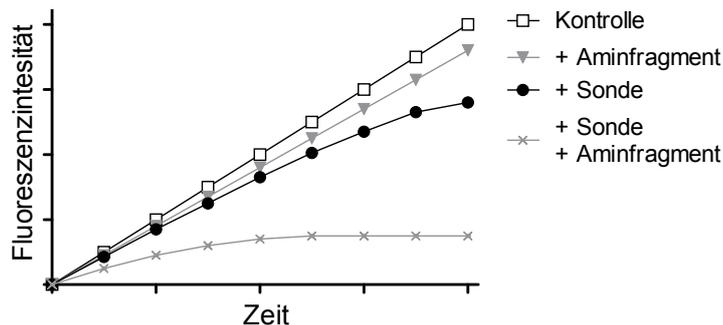


Abb. 6.1. A: Das Konzept der dynamischen Fragmentligation ist vereinfacht dargestellt. Eine Protease (graues Rechteck) kann langsam mit einer biselektrophilen Aldehydsonde (schwarzer Kreis, Reaktion *a*) reagieren. Bindet ein nukleophiles Fragment (graues Dreieck, Reaktion *b*) in einer günstigen räumlichen Anordnung, sodass die biselektrophile Sonde sowohl eine Bindung zum Fragment als auch eine kovalente Reaktion mit dem aktiven Zentrum der Protease ausbilden kann (Reaktion *c*), ist dies an einem signifikanten Rückgang des Substratumsatzes erkennbar. Dieser Effekt ist umso stärker, je besser die Bindung des Fragments an die Protease stabilisiert wird. Aufgrund der vorliegenden Gleichgewichtsprozesse und der Verknüpfung von zwei Fragmenten wird diese Methode *Dynamische Fragmentligation* genannt. **B:** Abgebildet ist der zeitliche Verlauf der Fluoreszenzintensität bei einem Proteaseassay während der dynamischen Fragmentligation. Die freiwerdende Fluoreszenz resultiert aus der Umsetzung eines fluorogenen Substrats durch die Protease. Kontrolle steht für den Proteaseassay ohne Zusatz von Sonde oder Fragment. Die Zugabe des Aminfragments kann zu einer leichten Schwächung des Anstiegs führen. Die Zugabe der biselektrophilen Sonde zum Assay liefert ebenfalls eine geringe Schwächung des Anstiegs sowie gegebenenfalls Plateaubildung. Gibt man eine Mischung aus Sonde und einem geeigneten Fragment zum Assay wird kaum noch ein Fluoreszenzsignal generiert.

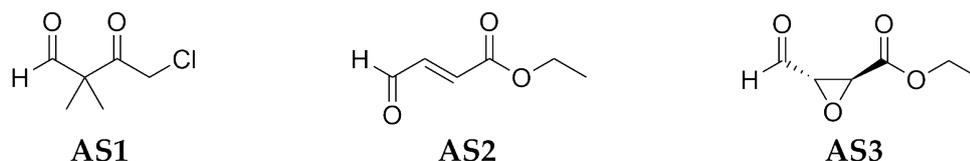


Abb. 6.2. Dargestellt sind die drei verwendeten Aldehydsonden **AS1**, **AS2** und **AS3**.

Protease des Coxsackie-Virus B3. Für beide Proteasen wurden bereits Aktivitätsassays etabliert, deren Bedingungen in Einklang mit den Anforderungen der elektrophilen Sonden und des Ligationsscreenings sind. Die erforderlichen fluorogenen Substrate wurden synthetisiert bzw. käuflich erworben. Die Sonden **AS1**, **AS2** und **AS3** wurden auf inhibitorische Aktivität getestet und zeigten bei beiden Proteasen in verschiedenen Konzentrationsabstufungen Wirksamkeit.

Das dynamische Ligationsscreening wurde an NS2B/NS3 mit **AS1** und **AS2** durchgeführt. Für **AS1** wurden 264 verschiedene primäre Amine getestet, wovon keines die Aktivität der Sonde signifikant verstärkte. Für das Screening mit **AS2** wurden 823 primäre Amine getestet und es gelang eine aktive Kombination aus Aminfragment und Sonde zu identifizieren. Eine Synthese für das Aminfragment wurde entwickelt und durchgeführt, wobei die Ausbeuten der einzelnen Stufen zwischen 52 % und 75 % lagen. Die kovalente Verknüpfung von Sonde und Fragment wurde auf zwei verschiedenen Wegen durchgeführt, jedoch führte sowohl die reduktive Aminierung als auch die Acylierung des Aminfragments mit der Sonde zu einem biochemisch inaktiven Molekül. Offensichtlich spiegeln die beiden verknüpften Verbindungen die Zustände auf der Proteaseoberfläche nicht gut genug wider. Dass es sich um einen allosterischen Effekt handelt, bei dem Aminfragment und/oder Sonde nicht im aktiven sondern in einem allosterischen Zentrum bindet, konnte nicht ausgeschlossen werden.

An CVB3 3C wurde das dynamische Ligationsscreening mit allen drei zur Verfügung stehenden Sonden durchgeführt. **AS1** wurde mit 750 Aminen getestet, wobei das reversibel gebildete Ligationsprodukt von Pyrazol-Fragment **F3** und **AS1** zu einer überadditiven Inhibition der Protease führte. Da gezeigt wurde, dass **AS1** mit dem aktiven Cystein der Protease reagiert und von keiner anderen Aminosäure der C147A-Mutante angegriffen wird, konnte die Arbeitshypothese bestätigt werden.

Das Fragment **F3** wurde nach Suh *et al.* synthetisiert^[131] und kovalent mit dem Carbonsäurederivat von **AS1** verknüpft. Eine reduktive Aminierung führte zu einem instabilen

Produkt. Das Amid-verknüpfte Molekül (Chlormethylketon 1, **CK1**) hatte jedoch eine geringere inhibitorische Aktivität als die Sonde. Zudem konnte keine rationale Bindungspose von **CK1** mit der 3C Protease ausgemacht werden, was den Verdacht nährt, dass **F3** und **AS1** nicht über die Aminofunktion des Pyrazols ligiert werden. Einen Beleg dieser Annahme könnte ein Docking und anschließende Synthese verschiedener Derivate der verknüpften Fragmente liefern.

Das Ligationsscreening mit **AS2** und 280 verschiedenen Aminfragmenten lieferte keine aktive Kombination. **AS2** zeigte eine außergewöhnlich hohe Deaktivierungsrate der Protease und es bleibt fraglich, ob so ein großer Konzentrationsunterschied zwischen Fragment und Sonde mit dem dynamischen Ligationsscreening kompatibel ist.

Auch mit Aldehydsonde **AS3** konnte die Zielstellung erreicht werden. Das dynamische Ligationsscreening mit **AS3** und 850 primären Aminen lieferte ebenfalls eine aktive Kombination, die von allen Versuchen den deutlichsten überadditiv aktivierenden Effekt zeigte. Diese Ergebnisse wurden durch ESI-MS-Messungen bestätigt. Es wurde gezeigt, dass eine Proteaseinhibition mit einer Verschiebung des Gleichgewichts hin zum Protein-Fragment-Sonde-Komplex einhergeht und somit zu einer kovalenten Modifizierung des aktiven Zentrums führt. Die Ergebnisse belegen, dass **F7** nicht ausschließlich über eine Iminbildung mit der Sonde reagieren kann, sondern dass sich noch mindestens zwei weitere reaktive Gruppen am Fragment befinden, die mit der Sonde reagieren können. Es musste also mit mehreren Reaktionsprodukten der dynamischen Fragmentligation gerechnet werden, was die Identifizierung der aktiven Spezies deutlich erschwert. Auch waren die Ligationenprodukte aufgrund ihrer Instabilität nicht isolierbar, sodass ihr struktureller Aufbau nicht bewiesen werden kann. Mit Hilfe von Computer-gestützten Docking-Experimenten konnte jedoch eine Hypothese zum hauptsächlichen Ligationprodukt (*Epoxidinhibitor1*, **EP1**) aufgestellt werden.

Ausgehend von dieser Struktur wurden vier verschiedene Epoxid-Inhibitor-derivate hergestellt, wovon **EP2** eine irreversible Enzymdeaktivierung zeigte, die sogar etwas stärker als die der Sonde **AS3** war. Die Umwandlung des Epoxidinhibitors **EP2** in den entsprechenden α,β -ungesättigten Ester **AB1** führte zu einer leichten Schwächung der inhibitorischen Aktivität, was jedoch durch die Einführung einer weiteren Carbonylfunktion (siehe **AB2**) ausgeglichen werden konnte. Ausgehend von **AB2** wurden dreizehn weitere Michael-Akzeptoren synthetisiert, um mehr Informationen zum Zusammenhang zwischen

Struktur und Wirksamkeit des Inhibitors zu sammeln. Der α,β -ungesättigte Ester **AB6** und das Vinylsulfon **VS1** waren dabei die potentesten Verbindungen (siehe 6.3).

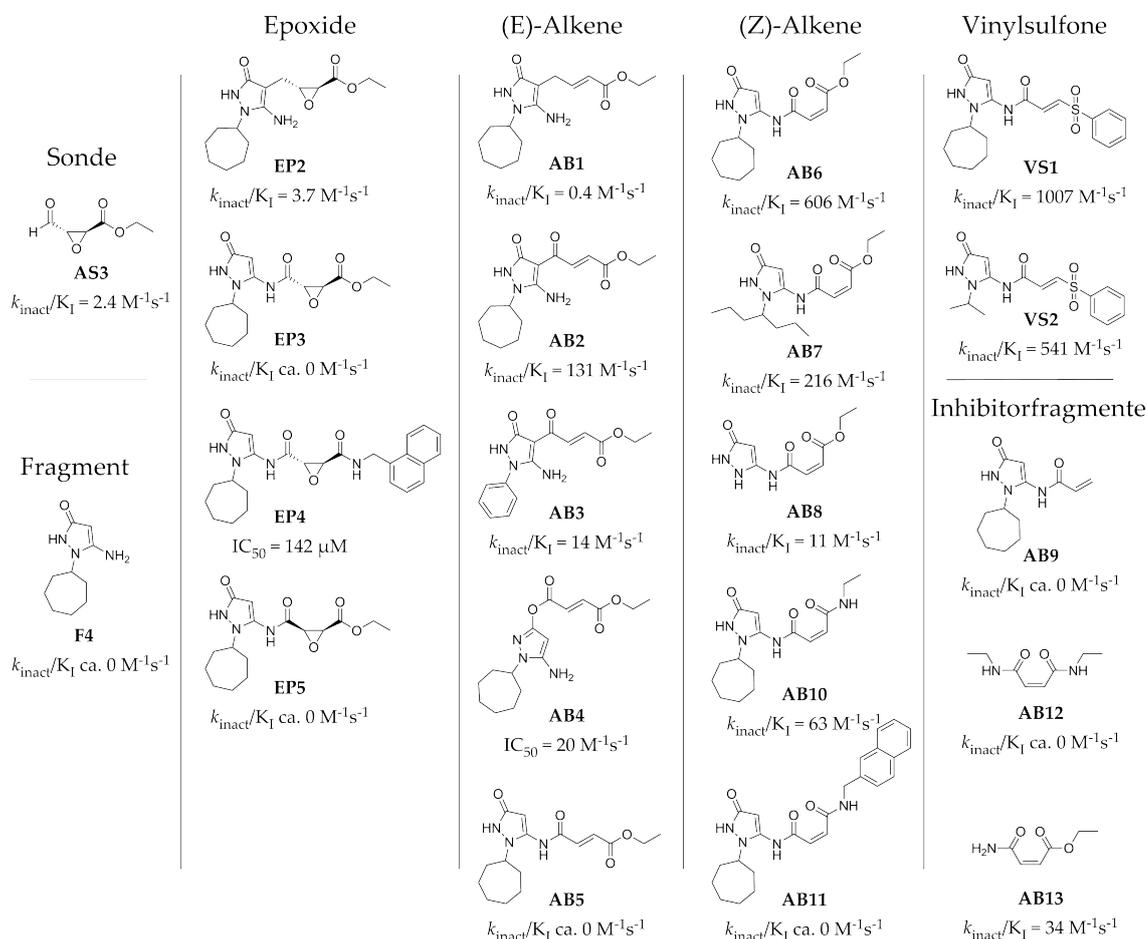


Abb. 6.3. Dargestellt sind die synthetisierten Inhibitoren mit ihren Inhibitionswerten. Die Inhibitoren wurden ausgehend von der Kombination **AS3** und **F4** (links) entwickelt.

Die Inhibitoren **AB6**, **AB10** und **VS1** wurden ausgewählt, um ihre Aktivität an einer Reihe von sechs enteroviralen Proteasen zu testen. Der potenteste Inhibitor **VS1** zeigte eine beachtliche Wirksamkeit und war noch bis in den nanomolaren Konzentrationsbereich aktiv. Es wurde deutlich, dass die drei Inhibitoren als Breitband-Inhibitoren für die genetisch verwandten Proteasen angesehen werden können und es darüber hinaus signifikante Selektivitätsunterschiede zwischen den einzelnen Inhibitorclassen hinsichtlich des Zielproteins gibt. Aufgrund der hohen Mutationsrate der Viren ist eine Breitband-Inhibition von enteroviralen Proteasen eine sehr erstrebenswerte Eigenschaft,^[178] was die

hier entwickelten Verbindungen zu vielversprechenden Kandidaten für eine weiterführende Wirkstoffentwicklung macht.

Eine Kristallstruktur von **AB10** mit EV-B93 3C^{Pro} bestätigte die Arbeitshypothese, dass Protein-bindende Fragmente mit Hilfe einer dynamischen Ligation und einer bi-selektrophilen Sonde im aktiven Zentrum einer Protease identifiziert und zu irreversiblen Inhibitoren aufgebaut werden können. Die Kristallstruktur konnte mit einer Auflösung von 1.73 Å erhalten werden und lieferte wichtige Informationen, mit Hilfe derer der Bindungsmodus sowie essentielle Wechselwirkungen zwischen Ligand und Protease aufgeklärt werden konnten. Es wurde darüber hinaus die zelluläre Wirksamkeit der Inhibitoren **AB10**, **VS1** und **VS2** getestet. **VS1** konnte bei einer Konzentration von 60 µM das Zellsterben aufgrund der Virusinfektion leicht abschwächen. Bei gesunden Zellen lag diese Konzentration jedoch schon im toxischen Bereich. Sowohl **VS1** als auch **VS2** zeigen im zellulären Proteaseassay für beide getesteten Virustypen mit steigender Konzentration einen Anstieg des Firefly-Luciferase-Signals. Dies deutet auf eine 3C^{Pro} Inhibition hin, die jedoch mit dem Bereich der Zytotoxizität bzw. Unlöslichkeit der Inhibitoren zusammenfällt, was wiederum die Validität der Daten beeinflussen kann. Diese Daten deuten aber auf ein großes Potential der Verbindungen in diesem noch frühen Entwicklungsstadium hin.

Die vorliegende Arbeit liefert nicht nur eine Vielzahl irreversibler, nicht-peptidischer Inhibitoren, sondern präsentiert eine neue, allgemeine Methode, die reversibel gebundene Fragmentligationsprodukte durch die Kombination einer dynamischen Fragmentligation mit einer irreversiblen Alkylierung des aktiven Zentrums identifizieren lässt. Diese Methode sollte auf alle Fragment-bindenden Proteinoberflächen anwendbar sein, wenn in unmittelbarer Nähe eine nukleophile Aminosäureseitenkette vorliegt.

2014 veröffentlichten Stefan Kathmann *et al.* ebenfalls ein Konzept zur Entwicklung kovalenter Cysteinproteasehemmer, in dem sie die einzelnen Vertreter einer Carbonsäure-Bibliothek mit einem Michael-Akzeptor-Molekül modifizierten.^[179]

Der große Vorteil des Konzeptes der hier vorliegenden Arbeit ist, dass auf eine Synthese, Isolation und Reinigung der Inhibitoren vor dem Screening verzichtet werden kann. Bei entsprechend großen Substanzbibliotheken bedeutet dies eine enorme Einsparung von Zeit und Ressourcen, da sich die aktiven Moleküle auf der Proteaseoberfläche zusammensetzen und somit auch nur die tatsächlichen Hits resynthetisiert werden müssen.

Weitere Entwicklungsmöglichkeiten liegen in der Verbesserung der Inhibitoren hinsichtlich erhöhter Stabilität und Selektivität. Es wurde deutlich, dass für eine selektive

Bindung mehr als eine Proteinbindungstasche belegt und somit der Inhibitor vergrößert werden muss.^[84] Zu einer ähnlichen Schlussfolgerung kamen auch Tan *et al.* bei ihren Arbeiten zu Peptid-basierten Proteaseinhibitoren.^[180] Da die strukturellen Weiterentwicklungen des α,β -ungesättigten Esters **AB6** nur noch Aktivitätsverluste nach sich zogen, wäre eine Möglichkeit, den Ethylester von z. B. **AB6** reduktiv in einen Aldehyd umzuwandeln und ein zweites Ligationsscreening durchzuführen (siehe 6.4).

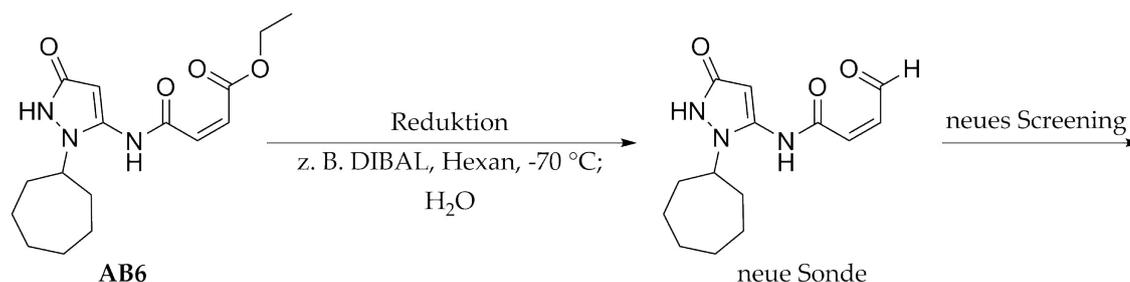


Abb. 6.4. Eine mögliche Weiterentwicklung des Inhibitors **AB6** stellt die Umwandlung in eine neue Aldehydsonde dar.

Will man den praktischen Aufwand eines manuellen Screenings minimieren, so kann man das Vergrößern des Inhibitors auch durch ein virtuelles Screening erreichen. Ausgehend von der Bindungspose von **AB10** können ungenutzte Interaktionsmöglichkeiten der Proteinoberfläche gesucht und durch entsprechende Ligandenstrukturen adressiert werden.¹

Ein alternativer Ansatz der Weiterentwicklung der Inhibitoren ist die Entfernung des elektrophilen Zentrums und somit die Umwandlung in einen reversiblen Inhibitor. Bei ausreichender Affinität des Inhibitors zum Zielmolekül können somit die Kreuzreaktionen mit "fremden" Thiolen vermieden werden, was theoretisch zu weniger Nebenwirkungen führt und die Inhibitoren für die industrielle Wirkstoffentwicklung interessant macht. Die vielversprechendsten Kandidaten für diesen Ansatz sind **AB6** und die beiden Vinylsulfone **VS1** und **VS2**. Es bleibt jedoch abzuwarten, ob eine Reduktion der Doppelbindung noch ein ausreichend affines Molekül liefert, da sich durch die Umwandlung zweier sp^2 -Zentren in sp^3 -Kohlenstoffe die Molekülgeometrie deutlich ändert.

Die Anzahl der Inhibitoren dieser Arbeit wurde durch die geringe Trefferrate des dynamischen Ligationsscreenings eingeschränkt. Da sich pro Sonde höchstens eine aktive

¹Entsprechende Arbeiten werden an der Freien Universität Berlin durch Robert Schulz aus der AG Wolber (Pharmazeutische und Medizinische Chemie; Computergestütztes Wirkstoffdesign) durchgeführt.

Kombination ergab, konnte keine Vorauswahl der Hits getroffen werden, was für eine erfolgreiche und rationale Weiterentwicklung zu Wirkstoffmolekülen aber erforderlich ist. Das Zurückgreifen auf eine größere Fragmentbank bzw. die Verwendung weiterer Sonden sollte diesem Umstand Abhilfe schaffen. Potenzielle neue Sonden könnten in den Substanzklassen Diphenylphosphonate, Coumarine oder β -Lactame gefunden werden. Auch kann das Einfügen von Spacern (z. B. Alkylketten) zwischen Sonde und Fragment etwas mehr Raum für neue Bindungsmodi schaffen und so die mögliche Trefferanzahl erhöhen.

Teil III.

Experimenteller Teil

7. Allgemeine Vorbemerkungen

7.1. Instrumentelle Analytik

7.1.1. Kernresonanzspektroskopie

Die NMR-Spektren wurden an einem Mercury 300 der Firma Varian (Darmstadt, Deutschland), einem Avance DRX-400 der Firma Bruker (Hanau, Deutschland), einem ECX400 bzw. ECP500 der Firma Jeol (Eching, Deutschland) oder einem Avance III 700 von Bruker (Hanau, Deutschland) aufgenommen. Die chemische Verschiebung δ ist in ppm angegeben und bezieht sich auf das jeweilige Lösungsmittel oder den internen Standard Tetramethylsilan. Folgende Lösungsmittel wurden verwendet: CDCl_3 , DMSO-d_6 , Pyridin- d_5 , D_2O und Acetonitril- d_3 . Für die Auswertung der NMR-Spektren wurden folgende Abkürzungen verwendet: s = Singulett, d = Dublett, dd = doppeltes Dublett, t = Triplett, q = Quartett, h = Heptett, m = Multiplett und b = breites Signal.

7.1.2. Fluoreszenz- und Absorptionsmessungen

Die enzymkinetischen Daten wurden am Fluorimeter SAFIRE II der Firma Tecan (Crailsheim, Deutschland) bestimmt. Die verwendeten 384 Well-Mikrotiterplatten waren Polystyrolplatten (Modell 3544) der Firma Corning (Corning, USA).

7.1.3. Hochauflösungsmassenspektrometrie

Hochaufgelöste Massenspektren von kleinen organischen Molekülen wurden mit einem Agilent 6210 ESI-TOF von Agilent Technologies (Santa Clara, CA, USA) gemessen. Die Flussrate betrug $4 \frac{\mu\text{L}}{\text{min}}$, die Sprayspannung 4 kV. Das Desolvatisierungsgas wurde auf 15 psi (1 bar) gesetzt. Alle anderen Parameter wurden für eine maximale Abundanz des jeweiligen $[\text{M}+\text{H}]^+$, bzw. $[\text{M}+\text{Na}]^+$ optimiert.

Für hochaufgelöste Massenspektren von Proteinproben wurde ein Synapt G2-S HDMS der Firma Waters Co. (Milford, UK), ausgestattet mit einer Acquity UHPLC und einer Phenomenex Jupiter-C18 Säule (3×250 mm, $5 \mu\text{m}$, 300 \AA), verwendet. Die Ionisations- und Transferparameter des Massenspektrometers wurden für ein Standardprotein (Insulin) optimiert und unmodifiziert angewendet.

Die wichtigsten Quellenparameter waren:

Kapillarspannung: 3.3 kV, Sampling Cone: 40 V, Source Offset: 60 V, Quelltemperatur: $100 \text{ }^\circ\text{C}$, Desolvationstemperatur: $250 \text{ }^\circ\text{C}$, Desolvationsgasfluss: $600 \frac{\text{L}}{\text{h}}$.

Die chromatographischen Bedingungen waren:

- 0 min: 95 % A
- bis 35 min linear auf 1 % A
- bis 40 min konstant 1 % A
- bis 41 min linear auf 95 % A
- bis 45 min konstant 95 % A

Laufmittel A: Wasser, 0.1 % (v/v) Ameisensäure, Laufmittel B: Acetonitril, 0.1 % (v/v) Ameisensäure; Flussrate: $0.5 \frac{\text{mL}}{\text{min}}$

Die Dekonvolution der Messdaten wurde mit der MaxEnt1 Methode der MassLynx Software von Waters (Waters Corporation, USA) durchgeführt.

7.1.4. Infrarotspektroskopie

Infrarotspektren wurden mit einem Spectrum 100FT-IR mit ATR-Aufsatz der Firma Perkin Elmer gemessen.

7.1.5. Schmelzpunktbestimmung

Schmelzpunkte wurden mit dem Büchi Melting Point B545 bestimmt und sind unkorrigiert.

7.1.6. Mikrowellen-Synthese

Mikrowellenunterstützte Synthese erfolgte entweder am SmithSynthesizer der Firma PersonalChemistry (heute Biotage, Uppsala, Schweden) oder am Initiator⁺ der Firma Biotage (Uppsala, Schweden). Die Reaktionen wurden in einem Probenvolumen von 0.5 bis 5 ml, in mit Septen verschlossenen, druckstabilen Reaktionsgefäßen durchgeführt. Ein Magnetron mit einer Leistung von bis zu 300 W (SmithSynthesizer) bzw. 400 W (Initiator⁺) erzeugte Mikrowellenstrahlung bei einer Frequenz von 2.45 GHz. Der Temperaturbereich erstreckte sich von 60 bis 250 °C bei einer Heizrate von 2 - 5 $\frac{^{\circ}\text{C}}{\text{min}}$. Der zulässige Höchstdruck im Inneren der Reaktionsgefäße betrug 20 bar.

7.1.7. Röntgenkristallstrukturanalyse vom Protease-Inhibitor-Komplex

Die Kristallzucht vom Protease-**AB10**-Komplex wurde von Zuzanna Kaczmarek, unter Aufsicht von Prof. Miguel Coll Capella, am IRB (Barcelona, Spanien) durchgeführt. Die Röntgenbeugung und Strukturbestimmung gelang Ihnen an der European Synchrotron Radiation Facility (ESRF, Grenoble, Frankreich).

7.2. Chromatographische Methoden

7.2.1. Dünnschichtchromatographie

Dünnschichtchromatogramme wurden auf mit Kieselgel beschichteten Aluminiumplatten (Schichtdicke 200 μm , Partikelgröße 10 - 12 μm , mittlerer Porendurchmesser 60 \AA) mit Fluoreszenzindikator (254 nm) der Firma Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland) durchgeführt. Die Verbindungen wurden mit UV-Licht ($\lambda = 254 \text{ nm}, 360 \text{ nm}$) detektiert und ggf. mit Hilfe von Seebach-Färbelösung (1 g CerIV-Sulfat, 2.5 g Molybdätophosphorsäure, 6 ml konzentrierte Schwefelsäure und 94 ml Wasser) entwickelt.

7.2.2. Säulenchromatographie

Als stationäre Phase wurde entweder Kieselgel 60 (Partikelgröße 35-70 μm) oder Aluminiumoxid 90 (neutral, 70 - 230 mesh, Aktivitätsstufe I) verwendet. Die Säulen wurden

mit einer Suspension aus organischem Lösungsmittel und stationärer Phase gepackt und mittels einer Überdruckapparatur mit Fließmittel gespült.

Wurde ein Mitteldruckflüssigchromatographie-System (MPLC) benutzt, so wurden bei Benutzung des Varian 971-FP-Systems die Säulen manuell, mit dem oben angegebenen Kieselgel, trocken gepackt. Bei Verwendung des Biotage Isolera One-Systems wurde auf vorgepackte Biotage-SNAP-Kartuschen zurückgegriffen.

7.2.3. Hochdruckflüssigchromatographie/ESI-MS (LC-MS)

HPLC-ESI-MS-Spektren wurden mit dem Flüssigchromatographie-Massenspektrometer (LC-MS) der Firma Agilent Technologies aufgenommen (Agilent 1100 Series). Als Trennsäulen dienten für peptidische Proben eine Agilent Zorbax-C8 300SB (4.6 × 5 mm, 3.5 µm, 300 Å) bzw. eine Agilent Pursuit XRs C8 (4.6 × 100 mm, 3 µm), für organische Moleküle eine Phenomenex Luna-C18 (4.6 × 100 mm, 3 µm, 100 Å) und für Proteinproben eine Phenomenex Jupiter-C18 (3 × 250 mm, 5 µm, 300 Å). Die Elutionsmittel waren Wasser / Ameisensäure (Laufmittel A) und Acetonitril / Ameisensäure (Laufmittel B). Der Volumenanteil von Ameisensäure betrug jeweils 0.1 %. Folgende Gradienten wurden eingesetzt:

- Zorbax: innerhalb von 5.5 Minuten von 5 % B auf 99 % B; Flussrate $1 \frac{\text{mL}}{\text{min}}$
- Luna: innerhalb von 5.5 Minuten von 5 % B auf 99 % B; Flussrate $1 \frac{\text{mL}}{\text{min}}$
- Jupiter: innerhalb von 35 Minuten von 5 % B auf 99 % B; Flussrate $0.5 \frac{\text{mL}}{\text{min}}$

Die Detektion erfolgte bei den Wellenlängen 210 nm, 254 nm und 325 nm.

7.2.4. Hochdruckflüssigchromatographie (HPLC)

Die HPLC-Reinigung der synthetisierten Substanzen erfolgte entweder an einer ProStar Varian von SpectraLab Scientific Inc. (Markham, Kanada) oder einem Agilent 1260 Infinity Binary LC System. Hierbei diente zur Trennung eine Nucleodur C18 HTec, 5 µm Trennsäule von Macherey Nagel (Düren, Deutschland). Die zu reinigenden Substanzen (maximal 100 mg) wurden in maximal 10 ml Acetonitril / Wasser (Verhältnis variabel, je nach Löslichkeit) gelöst und injiziert. Für die Trennung wurden die Eluenten Wasser / Trifluoressigsäure (Laufmittel A) und Acetonitril / Trifluoressigsäure (Laufmittel B)

verwendet. Der Volumenanteil von Trifluoressigsäure betrug jeweils 0.1 % (v/v). Folgender Gradientenverlauf wurde eingesetzt:

- 5 Minuten bei 5 % B; Flussrate 40 $\frac{\text{mL}}{\text{min}}$
- innerhalb von 25 Minuten auf 95 % B
- 5 Minuten bei 95 % B;
- innerhalb von 5 Minuten auf 5 % B

Die Detektion erfolgte bei den Wellenlängen 210 nm, 254 nm und 325 nm.

7.2.5. Stabilitäts- und *in vitro* Proteolyse-Aktivitätsassays

Die Stabilitätsprüfungen von **AB6** und **AB10**, sowie die *in vitro* Proteolyse-Aktivitätsassays mit EV-B93 wurden von Zuzanna Kaczmarska, unter Aufsicht von Prof. Miguel Coll Capella, am IRB Barcelona durchgeführt (siehe Abschnitt 5.4.3.2 und 5.4.2.2).

7.3. Chemikalien

Die Lösungsmittel wurden von VWR International GmbH (Darmstadt, Deutschland), Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe, Deutschland) und Sigma Aldrich (Steinheim, Deutschland) in p. a. Qualität bezogen. Zur HPLC- sowie MS-Analytik wurde Acetonitril von VWR International GmbH und Sigma Aldrich in HPLC- bzw. LC/MS-Reinheit benutzt. Wasser für die HPLC wurde über eine Milli Q-Anlage der Fa. Millipore (Eschborn, Deutschland) gewonnen. Für die NMR-Spektroskopie wurden deuterierte Lösungsmittel der Firma Euriso-Top GmbH (Saarbrücken, Deutschland) verwendet. Alle verwendeten Chemikalien wurden von den Firmen Sigma-Aldrich, Carl Roth GmbH & Co. KG, Merck KGaA, Alfa Aesar (Karlsruhe, Deutschland), ABCR GmbH & Co. KG (Karlsruhe), Fluka Chemie GmbH (Buchs, Schweiz) und GL Biochem Ltd. (Shanghai, China) mit dem höchstmöglichen Reinheitsgrad erworben. Wenn nicht anders beschrieben, wurden die Chemikalien und Lösungsmittel ohne weitere Aufarbeitung direkt verwendet.

8. Enzym-Assays

Die Enzym-Assays wurden unter Verwendung von rekombinant hergestellten, viralen Proteasen durchgeführt. Diese wurden exprimiert, isoliert, mit Hilfe eines Äkta-Systems gereinigt und in Stammlösungen bei -80 °C aufbewahrt.

Der allgemeine Ablauf eines Enzym-Assays gestaltete sich wie folgt: Die Mikrotiterplatten wurden mit Pufferlösung befüllt. Anschließend wurde ein μL einer Lösung eines Ligationsgemisches, eines Inhibitors, eines nukleophilen Fragments oder zur Kontrolle reines DMSO hinzugefügt. Nach Zugabe der Enzymlösung wurde die Platte für zwei Minuten bei 1400 rpm geschüttelt. Abschließend wurde Substratlösung hinzugefügt, die Platte noch einmal für zwei Minuten bei 1400 rpm geschüttelt und das generierte optische Signal im Reader ausgelesen.

Negativkontrollen (Ersatz der Enzymlösung durch Pufferlösung), Positivkontrollen (Ersatz des Inhibitors durch DMSO) und Kontrollen zur Eigenfluoreszenz von Substrat bzw. Inhibitor wurden durchgeführt. Wenn nicht anders vermerkt, interferierten die gemessenen Substanzen nicht signifikant mit der Ausgabe der Messung.

Die K_M - und V_{max} -Werte der Proteasen für die einzelnen Substrate wurden bestimmt, indem die gemessene Aktivität gegen die verwendete Substratkonzentration doppeltreziprok aufgetragen wurde (Lineweaver-Burk-Auftragung).

8.1. Ermittlung der Kenngrößen der irreversiblen Inhibitoren

Alle irreversiblen Inhibitoren inaktivieren das Zielenzym über die Ausbildung einer kovalenten Bindung. Da die Rate der Enzyminaktivierung abhängig von der Inhibitorkonzentration ist, resultiert daraus eine nichtlineare Progresskurve der Enzymreaktion (z. B. der Substratumsetzung). Sollte die Inhibitorkonzentration gleich groß bzw. größer als die

des Enzyms sein, erreicht die Progresskurve irgendwann einen Plateauwert, bei dem die Geschwindigkeit der Enzymreaktion (v_s) gleich Null wird (siehe Abb. 8.1A). Passt man den Graphen an Gleichung 8.1 an, so erhält man k_{obs} , die Geschwindigkeitskonstante der Systeminaktivierung.^[133]

$$[P] = \frac{v_i}{k_{\text{obs}}} [1 - e^{-k_{\text{obs}}t}] \quad (8.1)$$

Trägt man die verschiedenen k_{obs} -Werte, die man für jede eingesetzte Konzentration des Inhibitors bestimmt hat, gegen die Inhibitorkonzentration auf, erhält man einen ähnlichen Graphenverlauf, wie die Progresskurve der Enzymreaktion. Nach einem kurzen linearen Anstieg, bildet sich ein Plateau für hohe Werte von $[I]$ aus. Da einmal gebildete kovalente Enzym-Inhibitor-Komplexe nicht wieder dissoziieren, verläuft der Graph von k_{obs} gegen $[I]$ durch den Koordinatenursprung und lässt sich an folgende Gleichung anpassen:^[133]

$$k_{\text{obs}} = \frac{k_{\text{inact}}[I]}{K_I + [I]} = \frac{k_{\text{inact}}}{1 + \left(\frac{K_I}{[I]}\right)} \quad (8.2)$$

k_{inact} beschreibt hierbei die maximale Rate der Inaktivierung, welche bei unendlich hoher Konzentration des Inhibitors erreicht wird, während K_I als die Konzentration $[I]$ definiert ist, die benötigt wird, um eine halbmaximale Inaktivierungsrate zu erzielen. Aus diesem Grund darf sie nicht mit der Gleichgewichtskonstante K_i verwechselt werden (vgl. Gleichung 1.1). Division durch $[I]$ auf beiden Seiten von Gleichung 8.2 liefert eine vereinfachte Form:

$$\frac{k_{\text{obs}}}{[I]} = \frac{k_{\text{inact}}}{K_I + [I]} \quad (8.3)$$

Wenn man nun postuliert, dass für die Berechnung der kinetischen Daten nur Werte von Inhibitorkonzentrationen verwendet werden, die weit unter dem Sättigungsbereich ($[I] \ll K_I$) liegen, so vereinfacht sich Gleichung 8.3 weiter zu:

$$\frac{k_{\text{obs}}}{[I]} = \frac{k_{\text{inact}}}{K_I} \quad (8.4)$$

Daraus folgt, dass bei Konzentrationen weit unterhalb von K_I , die Auftragung von k_{obs} gegen $[I]$ linear sein muss. Der Anstieg wird beschrieben durch k_{inact}/K_I , was die Kenngröße für die Effektivität der irreversiblen Enzyminaktivierung darstellt (siehe Abb. 8.1B).

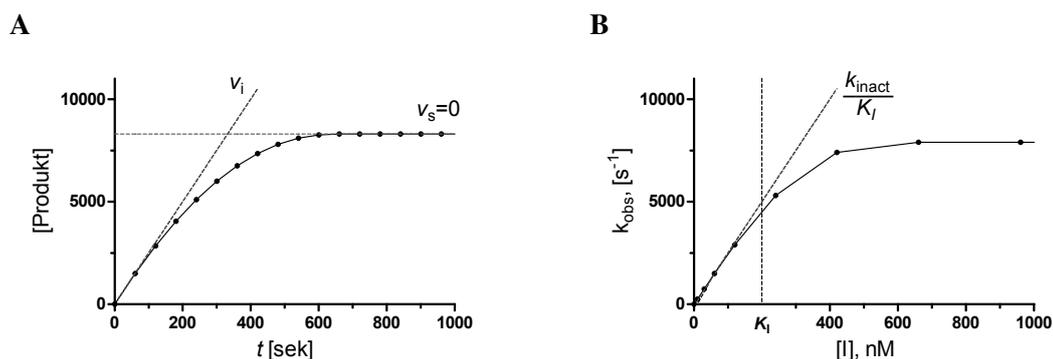


Abb. 8.1. Abgebildet ist eine typische Progresskurve einer irreversiblen Enzyminaktivierung (**A**). v_i zeigt die Region der Anfangsgeschwindigkeit, v_s die der Endgeschwindigkeit an. **B** zeigt die Auftragung von k_{obs} als Funktion der Inhibitorkonzentration $[I]$, an der die Kenngröße k_{inact}/K_I abgelesen werden kann.

8.2. West-Nil-Virus NS2B/NS3 Protease

8.2.1. Fluoreszenzbasierter Assay

Die Aktivität der NS2B/NS3 Protease wurde durch Umsetzung des fluorogenen Substrats Boc-GKR↓-(AMC) bzw. Boc-GKR↓-(AMCA)-NH₂ (**PS1**) bestimmt. Das AMCA-Substrat wurde synthetisiert (siehe 10.1), das AMC-Substrat wurde von der Firma Bachem (Bubendorf, Schweiz) bezogen. Die Probe wurde mit einer Anregungswellenlänge von 360 nm bestrahlt und das emittierte Licht bei 465 nm, in relativen Fluoreszenzeinheiten (*relative fluorescent units*, RFU) gemessen.

Für die Messungen wurden 10 μL 10 mM MOPS-NaOH-Pufferlösung (pH 8.0; 20 % (v/v) Glycerin) in einer Kavität der Messplatte vorgelegt. Dann wurden 10 μL der Enzymlösung (200 nM NS2B/NS3 in 10 mM MOPS-NaOH, pH 8.0; 20 % (v/v) Glycerin) hinzugegeben und die Messplatte für 2 Minuten bei 1400 rpm geschüttelt. Anschließend wurden 10 μL Substratlösung (200 μM in 10 mM MOPS-NaOH, pH 8.0; 20 % (v/v) Glycerin) hinzugegeben, die Platte noch einmal für 2 Minuten bei 1400 rpm geschüttelt und die Zunahme der Fluoreszenz am Fluorimeter beobachtet.

Für das dynamische Ligationscreening wurden zusätzlich 1 μL einer DMSO-Lösung

der zu testenden Sonde bzw. des zu testenden Amin-Fragments (oder eine Mischung aus beiden) hinzugefügt.¹

8.2.2. Absorptionsbasierter Assay

Für die absorptionsbasierte Messung wurde das Substrat CBz-GKR↓-pNA (**PS3**) verwendet (siehe 10.2). Die Probe wurde mit Licht der Wellenlänge 405 nm bestrahlt und die Absorption der Probe gemessen. Der Anstieg der Absorption korreliert hierbei mit der Menge an freigesetztem *para*-Nitroanilin.

Für die Messungen wurden 10 µL 10 mM MOPS-NaOH-Pufferlösung (pH 8.0; 20 % (v/v) Glycerin) in einer Kavität der Messplatte vorgelegt. Dann wurden 10 µL der Enzymlösung (200 nM NS2B/NS3 in 10 mM MOPS-NaOH pH 8.0; 20 % (v/v) Glycerin) hinzugegeben und die Messplatte für 2 Minuten bei 1400 rpm geschüttelt. Anschließend wurden 10 µL Substratlösung (10 mM in 10 mM MOPS-NaOH, pH 8.0; 20 % (v/v) Glycerin) hinzugegeben, die Platte noch einmal für 2 Minuten bei 1400 rpm geschüttelt und die Zunahme der Absorption am Plattenreader beobachtet.

8.3. Coxsackie-Virus B3 3C Main Protease

8.3.1. FRET-basierter Assay

Durch Umsetzung des FRET-Substrates Dabcyl-KTLEALFQ↓GPPVYE(Edans)-NH₂, wurde die Aktivität der 3C Protease gemessen. Das Substrat wurde von der Firma Biosyntan (Berlin, Deutschland) bezogen. Die Probe wurde mit einer Anregungswellenlänge von 355 nm bestrahlt und das emittierte Licht bei 538 nm, in relativen Fluoreszenzeinheiten (*relative fluorescent units*, RFU) gemessen.

Für die Messungen wurden 10 µL 100 mM HEPES-NaOH-Pufferlösung (pH 7.5; 1 mM EDTA) in einer Kavität der Messplatte vorgelegt. Dann wurden 10 µL der Enzymlösung (40 µM CV-B3 3C Protease in 100 mM HEPES-NaOH-Pufferlösung, pH 7.5; 1 mM EDTA) hinzugegeben und die Messplatte für 2 Minuten bei 1400 rpm geschüttelt. Anschließend wurden 10 µL Substratlösung (10 µM in 100 mM HEPES-NaOH-Pufferlösung, pH

¹Das dynamische Ligationsscreening wurde von Andrea Albrecht und Christoph Arkona, am Institut für Pharmazie der Universität Leipzig durchgeführt.

7.5; 1 mM EDTA; 50 % (v/v) DMSO) hinzugegeben, die Platte noch einmal für 2 Minuten bei 1400 rpm geschüttelt und die Zunahme der Fluoreszenz am Fluorimeter beobachtet (100 pMol gespaltenes Peptidsubstrat entsprach dabei 5000 RFU).

Für das dynamische Ligationsscreening wurden zusätzlich 1 µL einer DMSO-Lösung mit der zu testenden Sonde bzw. 0.5 µL Sonde und 0.5 µL des zu testenden Amin-Fragments (gelöst in DMSO) hinzugefügt.²

8.4. Multizyklus CPE-Reduktions Assay und zellulärer Proteaseassay

Der Multizyklus CPE-Reduktions Assay sowie der zelluläre Proteaseassay wurden von Rachel Ulferts, unter der Aufsicht von Prof. Frank van Kuppeveld, an der Universität Utrecht (Niederlande) durchgeführt.^[155]

²Das dynamische Ligationsscreening wurde von Andrea Albrecht und Christoph Arkona, am Institut für Pharmazie der Universität Leipzig durchgeführt. Die kinetischen Daten für **AS1**, **AS3**, **EP3**, **AB2**, **AB4**, **AB6** und **AB13** wurden von Christoph Arkona gemessen.

9. Allgemeine Synthesevorschriften

9.1. Allgemeines Protokoll zur Festphasenpeptidsynthese

9.1.1. Beladung des Rink-Amid-Harzes mit AMCA

125 mg (0.09 mmol) Fmoc-Rink-Amid-Harz (Beladung $0.72 \frac{\text{mmol}}{\text{g}}$) wurden in einer Fritzenspritze mit 5 mL 20 % (v/v) Piperidin in DMF geschüttelt. Nach einer Stunde wurde die Lösung abgesaugt und das Harz nacheinander mit DMF, THF und DCM gewaschen. Anschließend wurde das Harz in 5 mL DMF aufgenommen und mit 63 mg (0.27 mmol, 3 Äq) 7-Amino-4-methylcoumarin-3-essigsäure, 36.5 mg (0.27 mmol, 3 Äq) 1-Hydroxybenzotriazol und 50 μL (0.32 mmol, 3.6 Äq) Diisopropylcarbodiimid versetzt. Die Suspension wurde drei Tage geschüttelt, dann abgesaugt, mit DMF, THF, DCM gewaschen und im Vakuum getrocknet.

9.1.2. Kupplung der ersten Aminosäure ans AMCA-Rink-Amid-Harz

Fünf Äquivalente (auf die Harz-Beladung bezogen) der zu kuppelnden Aminosäure wurden in 1 mL DMF gelöst. Anschließend wurden fünf Äquivalente HATU hinzugefügt und die Lösung zum Harz gegeben. Nach der Zugabe von zehn Äquivalenten 2,6-Lutidin wurde die Suspension fünf Stunden geschüttelt. Abschließend wurde die Lösung abgesaugt und mit DMF, THF und DCM gewaschen. Die Prozedur wurde bei Bedarf wiederholt, um die Kopplungsausbeute zu steigern.

9.1.3. Kupplung der ersten Aminosäure ans 2-Chlortrityl-Harz

Das 2-Chlortrityl-Harz (Beladung $1.3 \frac{\text{mmol}}{\text{g}}$) wurde mit DCM gequollen. Anschließend wurde eine Lösung aus zwei Äquivalenten Fmoc-Aminosäure und vier Äquivalenten DIPEA in DCM hinzugefügt. Das Reaktionsgemisch wurde über Nacht geschüttelt, abgesaugt, mit DMF, THF und DCM gewaschen und im Vakuum getrocknet.

9.1.4. Fmoc-Entschützung

Nach erfolgreicher Beladung des Harzes wurde die basenlabile Fmoc-Schutzgruppe der Aminosäure, mittels einer Lösung von 20 % (v/v) Piperidin in DMF, abgespalten. Das Reaktionsgemisch wurde 10 Minuten geschüttelt, die Lösung abgesaugt und die Entschützung ein weiteres Mal durchgeführt. Abschließend wurde das Harz abgesaugt und mit DMF, THF und DCM gewaschen und im Vakuum getrocknet.

9.1.5. Kaisertest

Zur Überprüfung auf Vollständigkeit der Fmoc-Entschützung wurde der Ninhydrin-Test nach Kaiser durchgeführt.^[181]

Reagenzien:

- KCN in Pyridin (2 mL, 1 mM KCN)
- 5 % (w/v) Ninhydrin in Butanol
- 80 % (w/v) Phenol in Butanol

Zur Durchführung wurden einige Harzkügelchen in einem Eppendorf-Gefäß mit je einem Tropfen der drei Lösungen versetzt und die Suspension eine Minute mit der Heißluftpistole zum Sieden erhitzt. Waren freie Amino-Gruppen vorhanden, so trat Blaufärbung auf.

9.1.6. Generelles Protokoll zur Peptidkupplung

Die Kupplung von Aminosäuren an Peptid-beladenes Harz wurde nach Standard DIC/HOBt-Strategie durchgeführt. Dafür wurde das Harz mit der N-terminal entschützten Aminosäure für 10 Minuten in trockenem DMF gequollen. Nach Absaugen des Lösungsmittels wurde eine Lösung aus der zu kuppelnden N-terminal-geschützten Aminosäure (5 Äq. auf

Harzbeladung bezogen) und HOBt (5 Äq) in trockenem DMF hinzugefügt. Nach fünf Minuten Aktivierungszeit erfolgte die Zugabe von fünf Äquivalenten DIC. Das Reaktionsgemisch wurde drei Stunden geschüttelt und anschließend trocken gesaugt. Nach je drei Waschschrinen mit DMF, THF und DCM wurde die Prozedur bei Bedarf wiederholt.

9.1.7. Unpolare Abdeckung mit CBz

Das *N*-terminal entschützte Harz wurde in trockenem DMF gequollen. Nach Zugabe von sechs Äquivalenten DIPEA wurden fünf Äquivalente Benzylchlorformiat hinzugefügt und das Reaktionsgemisch über Nacht geschüttelt. Abschließend wurde das Lösungsmittel entfernt und das Harz mit DMF, THF und DCM gewaschen und im Vakuum getrocknet.

9.1.8. Peptidabspaltung vom Rink-Amid-Harz und Aufarbeitung

Das Harz wurde in 95 % (v/v) TFA in Wasser suspendiert (ca. 2 ml pro 100 mg Harz). Nach einer Reaktionszeit von zwei Stunden wurde die Lösung in eisgekühlten Diethylether gestürzt und zentrifugiert. Daraufhin wurde die überstehende Lösung dekantiert und das verbleibende Pellet noch zweimal mit eisgekühltem Ether (je 2 ml) gewaschen, zentrifugiert und die überstehende Lösung dekantiert. Das Peptid wurde im Stickstoffstrom getrocknet, aus Wasser (bei Löslichkeitsproblemen Zugabe von Acetonitril) lyophilisiert und mittels HPLC gereinigt.

9.1.9. Peptidabspaltung vom 2-Chlortrityl-Harz ohne Entschützung der Seitenketten

Die Abspaltung des Peptids von der Festphase wurde mit einem Gemisch aus Essigsäure, Trifluorethanol und DCM (1:1:8, v/v/v) durchgeführt. Die Abspatlösung wurde auf das mit DCM vorgequollene Harz gegeben (5 mL pro 350 mg Harz) und die Suspension eine Stunde geschüttelt. Die Suspension wurde filtriert, das Harz nochmal mit 5 mL Abspatlösung gewaschen und das Filtrat anschließend im Vakuum bis zur Trockne eingeengt.

10. Synthetisierte Verbindungen

10.1. AMCA-gelabelte Peptide

Das Rink-Amid-Harz wurde gemäß Vorschrift mit AMCA beladen und die Peptidsequenz nach den bereits genannten Methoden aufgebaut. Das Endcapping und die Abspaltung vom Harz erfolgte wie beschrieben nach 9.1.

CBz-GKR-AMC-NH₂ PS1

Ausbeute: 4 mg (16 %)

ESI-HRMS (m/z): $[M+H]^+$ berechnet für $C_{34}H_{46}N_9O_8^+$: 708.3464 Da; gefunden: 708.3475 Da

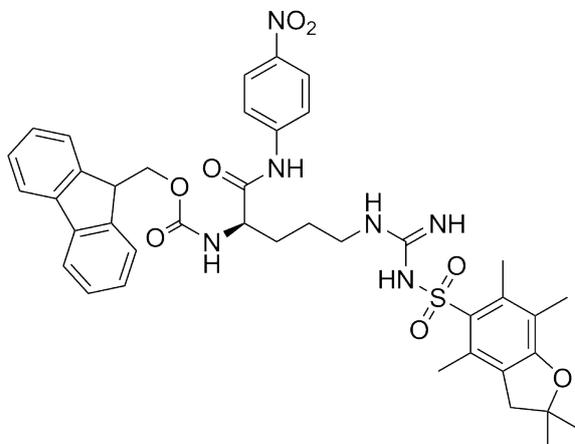
CBz-RTKR-AMC-NH₂ PS2

Ausbeute: 8 mg (24 %)

ESI-HRMS (m/z): $[M+H]^+$ berechnet für $C_{42}H_{62}N_{13}O_{10}^+$: 908.4737 Da; gefunden: 908.4761 Da

10.2. pNA-gelabelte Peptide

Um das Peptid CBz-GKR-pNA herzustellen, wurde zu erst CBz-GK(Boc)-OH, wie in den allgemeinen Arbeitsvorschriften beschrieben, synthetisiert. Parallel dazu wurde Fmoc-Arg(Pbf)-pNA hergestellt, Fmoc-entschützt und beide Aminosäure-Bausteine in Lösung gekuppelt. Abschließend wurden die Schutzgruppen abgespalten und das Produkt per HPLC gereinigt.

Fmoc-Arg(Pbf)-pNA PS3a^[182]

Zur Trocknung des Eduktes wurde die Aminosäure vor der Durchführung der Reaktion zwei mal mit Toluol versetzt und am Rotationsverdampfer bis zur Trockne eingengt. 895 mg (1.38 mmol, 1 Äq) Fmoc-Arg(Pbf)-OH und 190 mg (1.38 mmol, 1 Äq) 4-Nitroanilin wurden dann in 5 mL trockenem Pyridin gelöst und mit einer Eis/Kochsalz-Mischung auf -20 °C gekühlt. Unter Rühren wurden dann 126 µL (1.38 mmol, 1 Äq) Phosphoroxychlorid zugetropft und drei Stunden unter ständiger Kühlung gerührt. Dann wurde die Reaktionslösung mit 10 mL Eiswasser gequenchet und die wässrige Phase mit Ethylacetat gewaschen. Die organische Phase wurde eingengt und mittels Flash-Chromatographie (1 % (v/v) Triethylamin in EA) gereinigt.

Ausbeute: 598 mg (56 %)

¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ [ppm] = 10.68 (s, NH-SO₂, 1H), 8.23 (m, O₂N-C(CH)₂, 2H), 7.87 (m, ArH, 4H), 7.78 (d, Arg-N_αH, 1H), 7.72 (m, ArH, 2H), 7.41 (m, ArH, 2H), 7.32 (m, AH, 2H), 6.74 (bs, Guanidyl-NH, 1H), 6.41 (bs, 1H, Guanidyl-NH), 4.28 (m, Fluoren-CH₂, 2H), 4.22 (m, Arg-H_α, 1H), 4.18 (m, 9-Fluorenyl-H, 1H), 3.06 (m, -CH₂-Guanidyl, 2H), 2.91 (s, Furan-CH₂, 2H), 2.46 (s, 4/6-CH₃-Dihydrobenzofuran, 3H), 2.40 (s, 4/6-CH₃-Dihydrobenzofuran, 3H), 1.97 (s, 7-CH₃-Dihydrobenzofuran, 3H), 1.68 (bm, Arg-C_βH₂, 2H), 1.49 (bm, Arg-C_γH₂, 2H), 1.38 (s, 2,2-CH₃-Dihydrobenzofuran, 6H).

Drehwert α_D²⁰: -0.85° (c = 67 µM; CHCl₃)

CBz-GKR-*p*NA PS3

106 mg (0.13 mmol) Fmoc-Arg(Pbf)-*p*NA wurde in 5 mL 20 % (v/v) Piperidin in DMF gelöst und 30 Minuten gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt.

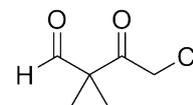
Der Rückstand wurde in DMF (5 ml) aufgenommen und mit einer Mischung aus Z-GK(Boc)-OH (30 mg, 0.069 mmol, 0.5 Äq), HATU (52.4 mg, 0.13 mmol, 1 Äq) und DIPEA (24 µl, 0.13 mmol, 1 Äq) in 5 mL DMF versehen. Die Reaktionszeit betrug eine Stunde. Daraufhin wurde das Lösungsmittel erneut bei reduziertem Druck entfernt. Das geschützte Substrat wurde mit 3 mL einer Mischung aus 95 % (v/v) TFA und Wasser für drei Stunden gerührt, um die säurelabilen Schutzgruppen zu entfernen. Das Reaktionsgemisch verfärbte sich von gelb nach intensiv rot. Danach wurde das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt und der Rückstand in 6 ml einer Lösung aus 33 % (v/v) Wasser in ACN gelöst und mittels HPLC gereinigt.

Ausbeute: 35.7 mg (13 %)

ESI-HRMS (m/z): $[M+H]^+$ berechnet für $C_{28}H_{40}N_9O_7^+$: 614.3045 Da; gefunden: 614.3034 Da

10.3. Aldehydsonden**10.3.1. Halomethylketone****4-Chlor-2,2-dimethyl-3-oxobutanal AS1**

Zu einer eisgekühlten Lösung von 556 µL (7 mmol, 2 Äq.) Chloressigsäurechlorid in 3 mL Diethylether wurde eine Lösung von 0.5 g (3.5 mmol, 1 Äq) 1-*N*-Morpholinisobuten in 3 mL Diethylether getropft. Nach der Zugabe wurde die Lösung zwei Stunden refluxiert, abgekühlt und der entstandene Niederschlag filtriert und mit Diethylether gewaschen. Der Feststoff wurde dann in 1 mL Wasser gelöst und mit gesättigter, wässriger $NaHCO_3$ -Lösung auf pH 4 eingestellt. 1 mL Diethylether wurde hinzugefügt und die Lösung drei Tage heftig gerührt. Die wässrige Phase wurde dann drei mal mit Diethylether gewaschen, die organischen Phasen vereint, mit Natriumsulfat getrocknet,



filtriert und eingengt. Flash-Chromatographie (Hexan:Ethylacetat, 1:3) lieferte 4-Chlor-2,2-dimethyl-3-oxobutanal als gelbes Öl.

Ausbeute: 280 mg (54 %), Lit.: 61 %^[121]

R_f = 0.4 (H:EA, 1:3)

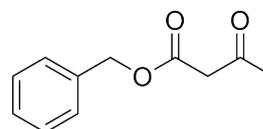
¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 9.59 (s, -CHO, 1H), 4.28 (s, -CH₂Cl, 2H), 1.42 (s, CH₃, 6H).

¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 200.2, 199.8, 59.7, 46.2, 19.7 (2).

Laborjournalnr.: DB1_50

Acetessigsäurebenzylester AS1a

Auf einen 100 mL Glaskolben wurde ein 10 cm langes, offenes Glasrohr aufgesetzt. In dem Glaskolben wurden dann 1.26 mL Acetessigsäureethylester (10 mmol, 1 Äq) und 1.56 mL (15 mmol, 1.5 Äq) Benzylalkohol in 50 mL Toluol für 24 Stunden bei 105 °C gerührt, so dass das entstehende Ethanol durch das Glasrohr entweichen konnte. Die Reaktionslösung wurde abgekühlt und eingengt. Flash-Chromatographie (H:EA, 4:1) lieferte das Produkt als farbloses Öl.



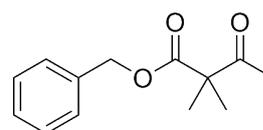
Ausbeute: 1.65 g (85 %), Lit.: 96 %^[183]

R_f = 0.25 (H:EA, 4:1)

Laborjournalnr.: DB3_110

2,2-Dimethylacetessigsäurebenzylester AS1b

1.92 g (10 mmol, 1 Äq) Acetessigsäurebenzylester wurden bei 0 °C in THF gelöst. 960 mg (24 mmol, 2.4 Äq) 60 % (w/w) Natriumhydrid in Mineralöl wurden langsam hinzugefügt und die Lösung gerührt. Nach 30 Minuten wurden 3.5 mL (56.8 mmol, 5.6 Äq) Methyljodid zugetropft und die Lösung gerührt. Nach einer Stunde wurde die Reaktion durch Zugabe von 5 mL gesättigter Ammoniumchlorid-Lösung gequencht, mit Diethylether verdünnt und anschließend je zwei mal mit 2 molarer Salzsäure, gesättigter



Natriumhydrogencarbonat-Lösung und gesättigter Kochsalzlösung gewaschen. Die organische Phase wurde mit Magnesiumsulfat getrocknet, filtriert und das Produkt als gelbes Öl mittels Flash-Chromatographie (H:EA, 10:0→9:1) gereinigt.

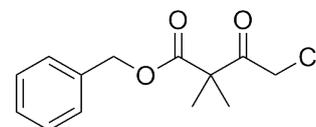
Ausbeute: 1.58 g (72 %)

R_f = 0.3 (H:EA, 9:1)

¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ [ppm] = 7.39-7.33 (m, ArH, 5H), 5.15 (s, -CH₂C₆H₅, 2H), 1.99 (s, CO-CH₃, 3H), 1.38 (s, C(CH₃)₂, 6H).

4-Chlor-2,2-dimethylacetessigsäurebenzylester AS1c

Zu 1.58 g (7.2 mmol, 1 Äq) 2,2-Dimethylacetessigsäurebenzylester wurden unter Rühren 0.58 mL (7.2 mmol, 1 Äq) Sulfurylchlorid hinzugefügt.



Nach 12 Stunden Rühren bei Raumtemperatur wurde DCM hinzugefügt und je zwei mal mit Wasser, gesättigter Natriumhydrogencarbonat-Lösung und Brine gewaschen. Nach Trocknen mit Magnesiumsulfat wurde die organische Phase mittels Flash-Chromatographie (H:EA, 4:1) gereinigt, was 4-Chlor-2,2-dimethylacetessigsäurebenzylester als gelbes Öl lieferte.

Ausbeute: 748 mg (40%)

R_f = 0.36 (H:EA, 4:1)

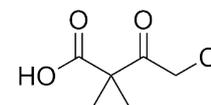
¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ [ppm] = 7.39-7.32 (m, ArH, 5H), 5.15 (s, -CH₂C₆H₅, 2H), 4.76 (s, CO-CH₂Cl, 2H), 1.38 (s, C(CH₃)₂, 6H).

¹³C-NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ [ppm] = 201.3, 173.1, 136.8, 129.6 (2), 129.3, 128.9 (2), 67.8, 55.3, 48.3, 22.8 (2).

Laborjournalnr.: DB4_2

4-Chlor-2,2-dimethylacetessigsäure AS1d

155 mg (0.6 mmol) 4-Chlor-2,2-dimethylacetessigsäurebenzylester wurden in 6 mL Ethylacetat gelöst und mit einer Spatelspitze Palladium auf Kohle (10 % w/w) versetzt. Unter Wasserstoffatmosphäre wurde 8



Stunden gerührt, der Katalysator abfiltriert und die Reaktionslösung eingedampft, was 4-Chlor-2,2-dimethylacetessigsäure als schwach gelbes Öl lieferte.

Ausbeute: 98 mg (98%)

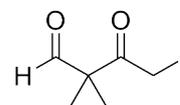
¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ [ppm] = 13.02 (bs, -COOH, 1H), 4.73 (s, -COCH₂Cl, 2H), 1.33 (s, C(CH₃)₂, 6H).

¹³C-NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ [ppm] = 200.7, 173.9, 53.9, 47.2, 21.7 (2).

Laborjournalnr.: DB4_7

4-Iod-2,2-dimethyl-3-oxobutanal AS1e

Zu 180 mg (1.2 mmol, 1.5 Äq) Natriumiodid in 1.5 mL Aceton, wurden 118 mg (0.8 mmol, 1 Äq) 4-Chlor-2,2-dimethyl-3-oxobutanal gegeben. Nach 90 Minuten Rühren wurden der entstandene Niederschlag abfiltriert und mit Aceton gewaschen.



Das Filtrat wurde mit Wasser verdünnt und zwei mal mit Ethylacetat gewaschen. Die organische Phase wurde mit Natriumsulfat getrocknet und anschließend im Vakuum eingengt, wobei 4-Iod-2,2-dimethyl-3-oxobutanal als rotes Öl zurückblieb.

Ausbeute: 158 mg (85 %)

R_f = 0.3 (H:EA, 4:1)

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 9.57 (s, -CHO, 1H), 3.97 (s, -CH₂I, 2H), 1.46 (s, CH₃, 6H).

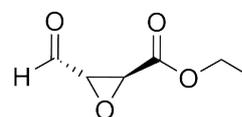
¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 201.5, 199.9, 60.1, 20.3 (2), 2.6.

Laborjournalnr.: DB1_51

10.3.2. Epoxide

2S,3S-Epoxy-4-oxobutansäureethylester AS3

In einem Rundkolben wurden 300 μ L (2.5 mmol, 1 Äq) *E*-4-Oxobut-2-ensäureethylester in 2 mL DCM gelöst. Nach Zugabe von 81.5 mg *S*-(-)- α,α -Diphenyl-2-pyrrolidinmethanoltrimethylsilylether (0.25 mmol, 0.1 Äq) in 1 mL DCM verfärbte sich die Lösung leicht orange. Anschließend wurden 335 μ L einer Lösung von Wasserstoffperoxid in Wasser (30 % (w/w), 3.24 mmol, 1.3 Äq) tropfenweise der Lösung hinzugefügt und



die Mischung kräftig für 4 h gerührt. Das Zweiphasensystem wurde eingengt und mit Hilfe einer kurzen Kieselgelsäule (DEE:H, 1:1) gereinigt. Nach einer zusätzlichen Flashchromatographie (DEE:H, 4:1) wurde die zähflüssige Substanz in Chloroform mit Molekularsieb (3 Å) über Nacht (16 h) getrocknet. Filtration und Verdampfen des Lösungsmittels lieferte das gewünschte Produkt als halbfeste Masse.

Ausbeute: 150 mg (42 %), Lit.: 60 %^[122]

R_f = 0.23 (DEE:H, 4:1)

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 9.06 (d, ³J_{H-H} = 6.2 Hz, -CHO, 1H), 4.30 (q, -CH₂, 2H), 3.75 (d, ³J_{H-H} = 1.8 Hz, -CH-O-CH-COOEt, 1H), 3.62 (dd, ³J_{H-H} = 6.2 Hz, 1.8 Hz, CHO-CH-O-CH-, 1H), 1.34 (t, CH₃, 3H).

¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 195.1, 166.3, 69.2, 57.6, 50.9, 14.1.

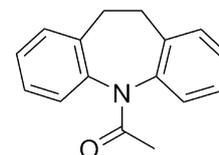
Laborjournalnr.: DB4_51

10.4. Amin-Fragmente

10.4.1. WNV-Screening Hits

N-Acetyl-10.11-dihydro-5*H*-dibenz[*b,f*]azepin F1a

1 g (5 mmol, 1 Äq) 10.11-Dihydro-5*H*-dibenz[*b,f*]azepin wurde in einem Mikrowellengefäß in 5 mL Toluol gelöst und 535 µL (7.5 mmol, 1.5 Äq) Acetylchlorid hinzugefügt. Das Reaktionsgemisch wurde für eine Stunde bei 90 °C im Mikrowellenreaktor gerührt, abgekühlt und drei mal mit Wasser gewaschen. Die organische Phase wurde mit Magnesiumsulfat getrocknet, eingengt und der Rückstand aus Diethylether umkristallisiert.



Ausbeute: 0.98 g (83 %), Lit.: 75 %^[126]

ESI-MS (*m/z*): [M+H]⁺ berechnet für C₁₆H₁₆NO⁺: 238.1 Da; gefunden: 238.0 Da

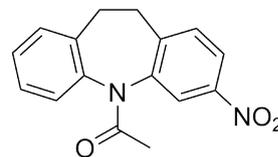
¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ [ppm] = 7.45 (m, ArH, 1H), 7.34-7.26 (m, ArH, 4H), 7.19 (m, ArH, 3H), 3.35-3.19 (m, CH₂, 2H), 2.87-2.71 (m, CH₂, 2H), 1.91 (s, -CH₃, 3H).

¹³C-NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ [ppm] = 169.1, 136.9, 134.8, 130.3, 129.9, 128.7, 128.3, 127.8, 127.2, 127.1, 126.1, 30.1, 29.6, 22.4.

Laborjournalnr.: DB1_79A

***N*-Acetyl-3-nitro-10.11-dihydro-5*H*-dibenz[*b,f*]azepin F1b**

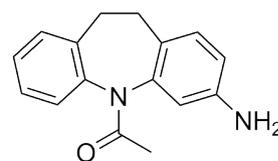
1.18 g (5 mmol) *N*-Acetyl-10.11-dihydro-5*H*-dibenz[*b,f*]azepin wurde unter Eiskühlung in 25 mL konz. Schwefelsäure gelöst. Bei 0 °C und unter Rühren wurden langsam 556 mg (5.5 mmol, 1.1 Äq) Kaliumnitrat hinzugefügt. Die Lösung wurde über Nacht gerührt und dabei auf Raumtemperatur gebracht. Das Reaktionsgemisch wurde in Eiswasser gestürzt und der entstandene Niederschlag filtriert und mit Wasser gewaschen. Flash-Chromatographie (H:EA, 1:1) lieferte das gewünschte Produkt als einen braunen Feststoff, von dem sich unumgesetztes Edukt nicht vollständig abtrennen ließ.

**Ausbeute:** 845 mg (60 %)**R_f**= 0.26 (H:EA, 1:1)**ESI-MS** (*m/z*): [M+H]⁺ berechnet für C₁₆H₁₅N₂O₃⁺: 283.1 Da; gefunden: 283.0 Da**¹H-NMR** (400 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 8.34 (bs, ArH, 3H), 7.46 (s, ArH, 1H), 7.30-7.01 (m, ArH, 3H), 3.33-3.15 (m, CH₂, 2H), 2.78-2.74 (m, CH₂, 2H), 1.97 (s, -CH₃, 3H).**¹³C-NMR** (100 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 172.4, 141.6, 140.1, 137.0, 135.1, 132.5, 130.0, 129.5, 129.4, 128.0, 127.6, 123.2, 122.8, 30.8, 29.7, 22.5.

Laborjournalnr.: DB1_85

***N*-Acetyl-3-amino-10.11-dihydro-5*H*-dibenz[*b,f*]azepin F1**

930 mg (3 mmol) *N*-Acetyl-3-nitro-10.11-dihydro-5*H*-dibenz[*b,f*]azepin wurde in 15 mL Methanol gelöst und mit einer Spatelspitze Palladium auf Aktivkohle (10 % (w/w)) versetzt. Durch die Reaktionslösung wurde fünf Minuten lang Wasserstoff geleitet und anschließend, mit Hilfe eines Ballons, eine Wasserstoffatmosphäre geschaffen. Die Lösung wurde 12 Stunden gerührt, durch Celite gefiltert und eingengt. Flash-Chromatographie lieferte *N*-Acetyl-3-amino-10.11-dihydro-5*H*-dibenz[*b,f*]azepin als gelben Feststoff.

**Ausbeute:** 400 mg (52 %)

$R_f = 0.3$ (EA:H, 9:1)

ESI-MS (m/z): $[M+H]^+$ berechnet für $C_{16}H_{17}N_2O^+$: 253.1 Da; gefunden: 253.3 Da

1H -NMR (300 MHz, DMSO- d_6): δ [ppm] = 7.36-7.16 (m, ArH, 4H), 6.95-6.80 (m, ArH, 1H), 6.56-6.41 (m, ArH, 2H), 5.05 (bs, NH_2 , 2H), 3.18-3.13 (m, CH_2 , 2H), 2.75-2.65 (m, CH_2 , 2H), 1.90 (s, $-CH_3$, 3H).

^{13}C -NMR (75 MHz, DMSO- d_6): δ [ppm] = 168.8, 147.9, 142.7, 140.6, 130.3, 130.1, 130.0, 128.5, 126.9, 125.9, 113.8, 113.3, 112.2, 30.5, 28.5, 22.0.

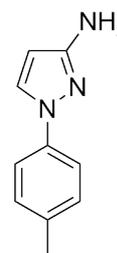
Smp.: Zers. > 80 °C

Laborjournalnr.: DB1_81

10.4.2. CVB3 Screening Hits

1-(*p*-Tolyl)-1*H*-pyrazol-3-amin F3

100 mg (1.2 mmol, 1 Äq) 3-Aminopyrazol, 390 mg (1.2 mmol, 1 Äq) Caesiumcarbonat, 392 mg (1.2 mmol, 1 Äq) 4-Iodtoluol, 23 mg (0.12 mmol, 0.1 Äq) Kupfer(I)-iodid und 3.5 mL DMF wurden in ein Mikrowellen-Vial gefüllt, verschlossen und in die Mikrowelle eingebracht. Nach Bestrahlung bei 190 °C für 20 Minuten wurde abgekühlt, mit Wasser verdünnt und mit Ethylacetat extrahiert. Die organische Phase wurde eingeeengt und das Reaktionsprodukt mittels HPLC gereinigt, was 1-(*p*-Tolyl)-1*H*-pyrazol-3-amin als weißen Feststoff lieferte.



Ausbeute: 178 mg (85 %)

ESI-MS (m/z): $[M+H]^+$ berechnet für $C_{10}H_{12}N_3^+$: 174.1 Da; gefunden: 174.1 Da

1H -NMR (300 MHz, DMSO- d_6): δ [ppm] = 8.24 (d, $^3J_{H-H} = 2.6$ Hz, $-NCHCH$, 1H), 7.57 (d, $^3J_{H-H} = 8.5$ Hz, $NC(ArH)_2$, 2H), 7.30 (bs, NH_2 , 2H), 7.24 (d, $^3J_{H-H} = 8.5$ Hz, $NC(ArH)_2(ArH)_2$, 2H), 6.01 (d, $^3J_{H-H} = 2.6$ Hz, $-NCHCH$, 1H), 2.31 (s, CH_3 , 3H).

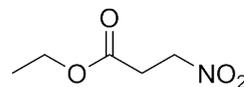
^{13}C -NMR (75 MHz, DMSO- d_6): δ [ppm] = 151.0, 137.3, 134.2, 129.7 (2), 128.5 (2), 117.1, 97.9, 20.3.

Smp.: 98 °C

Laborjournalnr.: DB3_52

3-Nitropropansäureethylester F2a

Zu 1.22 g (8 mmol, 1 Äq) 3-Brompropansäure in 10 mL Ethanol wurden 726 μ L (10 mmol, 1.25 Äq) Thionylchlorid getropft und die Lösung zwei Stunden refluxiert. Nach Abkühlen der Lösung



wurde mit Diethylether verdünnt und mit Wasser, gesättigter NaHCO_3 -Lösung und Brine gewaschen. Trocknen mit Magnesiumsulfat, Filtrieren und Entfernen des Lösungsmittels lieferte 1.2 g (6.6 mmol, 83 %) 3-Brompropansäureethylester als gelbes Öl.

Zu 1.45 g (8 mmol, 1 Äq) 3-Brompropansäureethylester in 10 mL Aceton wurden 2.0 g (14 mmol, 1.75 Äq) Natriumiodid gegeben. Nach einer Stunde Rühren wurde die Lösung filtriert, eingengt, in Diethylether aufgenommen und mit kaltem Wasser gewaschen. Trocknen mit Magnesiumsulfat, Einengen und Flash-Chromatographie (H:EA, 95:5) lieferte 1.7 g (7.4 mmol, 93 %) 3-Iodpropansäureethylester als gelbes Öl.

Unter Argon-Atmosphäre wurden in einem braunen Kolben 461 mg (3 mmol, 1.2 Äq) Silbernitrit in 10 mL trockenem Diethylether vorgelegt. Die Lösung wurde mit Hilfe eines Eisbads auf 0 °C gekühlt und es wurden 570 mg (2.5 mmol, 1 Äq) 3-Iodpropansäureethylester in 1 mL Diethylether hinzugegeben. Nach der Zugabe wurde das Eisbad entfernt und die Lösung über Nacht heftig gerührt. Die Reaktionslösung wurde filtriert, das Filtrat mit Diethylether gewaschen und die vereinigten organischen Phasen am Rotationsverdampfer eingengt, um 3-Nitropropansäureethylester als blass-oranges Öl zu liefern.

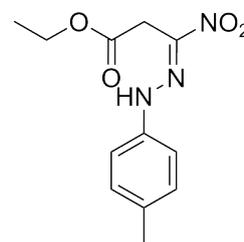
Ausbeute: 340 mg (92 %)

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 4.66 (t, $^3J_{\text{H-H}} = 6$ Hz, NO_2CH_2 , 2H), 4.20 (q, $^3J_{\text{H-H}} = 7.2$ Hz, CH_2CH_3 , 2H), 2.97 (t, $^3J_{\text{H-H}} = 6$ Hz, $\text{NO}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$, 2H), 1.28 (t, $^3J_{\text{H-H}} = 7.2$ Hz, CH_3 , 3H).

Laborjournalnr.: DB2_89

3-Nitro-3-(2-(*p*-tolyl)hydrazono)propansäureethylester F2b

246 mg (2.3 mmol, 1 Äq) *p*-Toluidin wurden bei 0 °C in einer Mischung aus 1.4 mL Wasser und 0.6 mL konzentrierter Salzsäure gelöst. Dann wurden 158 mg (2.3 mmol, 1 Äq) Natriumnitrit in 0.5 mL Wasser langsam dazu getropft. Die Lösung wurde anschließend zu einer eisgekühlten Mischung aus 115 mg (5 mmol, 2.1 Äq) Natrium in 5 mL Ethanol und 340 mg (2.3 mmol, 1 Äq) 3-Nitropropansäureethylester getropft. Die tiefrote Lösung wurde zwei Stunden gerührt, mit Dichlormethan extrahiert, eingengt und mittels HPLC gereinigt, was das gewünschte Produkt als orangen Feststoff lieferte.



Ausbeute: 60 mg (10 %)

ESI-MS (m/z): $[M-H]^-$ berechnet für $C_{12}H_{14}N_3O_4^-$: 264.0 Da; gefunden: 264.0 Da

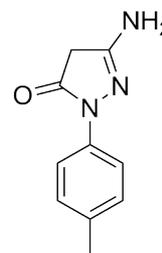
1H -NMR (300 MHz, DMSO- d_6): δ [ppm] = 10.80 (s, -NH, 1H), 7.21 (d, $^3J_{H-H}$ = 8.8 Hz, $CH_3C(ArH)_2$, 2H), 7.18 (d, $^3J_{H-H}$ = 8.8 Hz, $NC(ArH)_2$, 2H), 4.14 (q, $^3J_{H-H}$ = 7.1 Hz, CH_3CH_2 , 2H), 4.11 (s, $COCH_2$, 2H), 2.27 (s, CH_3 , 3H), 1.2 (t, CH_3 , 3H).

^{13}C -NMR (75 MHz, DMSO- d_6): δ [ppm] = 167.4, 140.4, 139.2, 132.1, 129.9 (2), 114.6 (2), 67.1, 31.4, 20.3, 14.0.

Laborjournalnr.: DB2_90

5-Amino-2-(*p*-tolyl)-2.4-dihydro-3H-pyrazol-3-on F2

50 mg (0.18 mmol, 1 Äq) **F2b** wurde in 10 mL Methanol gelöst und mit 0.2 g (3 mmol, 16 Äq) Ammoniumformiat versetzt. Nach der Zugabe einer Spatelspitze Zinkpulver wurde das Reaktionsgemisch 10 Minuten im Ultraschallbad gelassen. Die Lösung wurde mit $NaHCO_3$ -Lösung neutralisiert und fünf Tage stehen gelassen. Das Produkt wurde dann mittels HPLC gereinigt, was 5-Amino-2-(*p*-tolyl)-2.4-dihydro-3H-pyrazol-3-on als gelben Feststoff lieferte.



Ausbeute: 32 mg (90 %)

ESI-MS (m/z): $[M-H]^-$ berechnet für $C_{10}H_{12}N_3O_4^-$: 190.0 Da; gefunden: 190.0 Da

1H -NMR (300 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 7.66 (d, $^3J_{H-H}$ = 8.3 Hz, $-NC(ArH)_2$, 2H), 7.17

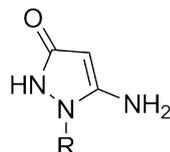
(d, $^3J_{\text{H-H}} = 8.3$ Hz, $\text{CH}_3\text{C}(\text{ArH})_2$, 2H), 3.54 (s, CH_2 , 2H), 2.33 (s, CH_3 , 3H).

Laborjournalnr.: DB2_92

1-Alkyl-substituierte 5-Amino-1.2-dihydropyrazol-3-one

Generelle Synthesevorschrift:

Eine äquimolare Mischung aus Keton und Cyanacethydrazid (synthetisiert nach Al-Hazmi *et al.*^[184]) in Ethanol (1 mL pro mmol Edukt) wurde eine Stunde unter Rückfluss



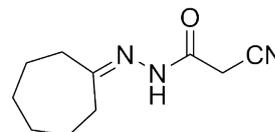
R = - Cycloheptyl
- 4-Heptyl
- Isopropyl

erhitzt. Nach Abkühlen der Lösung bildete sich ein farbloser Niederschlag. Dieser wurde abfiltriert, gewaschen, aus Ethanol umkristallisiert und im Hochvakuum getrocknet. Das Filtrat wurde über Nacht im Kühlschrank gelagert, mit dem sich daraus abgeschiedenen Feststoff wurde wie oben verfahren.

2-Cyano-N-cycloheptylidenacethydrazid F4a

Ausbeute: 1.8 g (73 %)

ESI-MS (m/z): $[\text{M-H}]^-$ berechnet für $\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{N}_3\text{O}^-$: 192.1 Da; gefunden: 192.0 Da



$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ [ppm] = 10.52 (s, -NH, 1H), 4.02 (s, NC- CH_2 , 2H), 2.38 (m, NC(CH_2) $_2$, 4H), 1.50-1.65 (m, CH_2 , 8H).

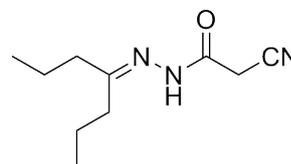
$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ [ppm] = 165.1, 160.4, 116.3, 36.6, 29.8 (2), 26.9 (2), 24.6 (2).

Laborjournalnr.: DB2_107a

2-Cyano-N-4-heptylidenacethydrazid F5a

Ausbeute: 1.2 g (65 %)

ESI-MS (m/z): $[\text{M-H}]^-$ berechnet für $\text{C}_{10}\text{H}_{16}\text{N}_3\text{O}^-$: 194.1 Da; gefunden: 194.1 Da



$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ [ppm] = 10.78 (s, -NH, 1H), 4.0 (s, NC- CH_2 , 2H), 2.26-2.14 (m, NC(CH_2) $_2$, 4H), 1.53-1.36 (m, NC(CH_2) $_2$ (CH_2) $_2$, 4H), 0.88 (s, CH_3 , 3H), 0.87 (s, CH_3 , 3H).

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ [ppm] = 165.2, 157.5, 116.2, 38.1, 24.6, 18.8 (2), 13.7 (2).

Smp.: 139 °C

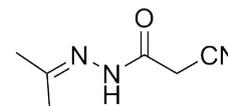
Laborjournalnr.: DB5_1a

2-Cyano-*N*-isopropylidenacethydrazid F6a

Ausbeute: 3.6 g (95 %)

ESI-MS (m/z): $[\text{M-H}]^-$ berechnet für $\text{C}_6\text{H}_8\text{N}_3\text{O}^-$: 138.1 Da;

gefunden: 138.1 Da



$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ [ppm] = 10.59 (s, -NH, 1H), 4.01 (s, 2H, NC- CH_2 , 2H), 1.90 (s, CH_3 , 3H), 1.85 (s, CH_3 , 3H).

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ [ppm] = 164.9, 152.4, 116.2, 25.1, 24.5, 17.4.

Smp.: 85 °C

Laborjournalnr.: DB5_2a

Generelle Vorschrift zur Reduktion der Hydrazide zum Pyrazolon:

In einem großen Glaskolben wurde das Ketimin vorgelegt und mit Wasser suspendiert (10 mL Wasser pro 1 mmol Edukt). Unter heftigem Rühren wurden 0.55 Äquivalente Natriumborhydrid hinzugefügt. Nach 16 Stunden wurde der Feststoff filtriert und mit Wasser gewaschen. Lyophilisation aus Dioxan/Wasser lieferte das Pyrazolon als weißen Feststoff.

5-Amino-1-cycloheptyl-1.2-dihydropyrazol-3-on F4

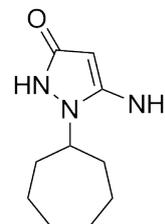
Ausbeute: 151 mg (77 %), weißer Feststoff

ESI-HRMS (m/z): $[\text{M}+\text{Na}]^+$ berechnet für $\text{C}_{10}\text{H}_{17}\text{N}_3\text{NaO}^+$:

218.1264 Da; gefunden: 218.1258 Da

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ [ppm] = 8.91 (bs, -NH, 1H), 5.66 (s, - NH_2 , 2H), 4.30 (s, COCH, 1H), 3.86 (m, NCH(CH_2) $_2$, 1H), 1.70-1.35 (m, CH_2 , 12H).

$^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, Pyridin- d_5): δ [ppm] = 166.0, 152.4, 76.9, 58.4, 34.0 (2), 28.2 (2), 25.4 (2).



IR (ATR): $\tilde{\nu}$ = 3112 (w, br, N-H), 2927 (w, =C-H), 2857 (w, -C-H), 1594 (s, C=C-C=O), 1558 (s, C=C-C=O), 1501, 1449, 1004 (m, =C-H δ) cm^{-1}

Smp.: Zers. > 223 °C

Laborjournalnr.: DB2_107

5-Amino-1-(heptan-4-yl)-1.2-dihydropyrazol-3-on F5

Ausbeute: 1.0 g (80 %), weißer Feststoff

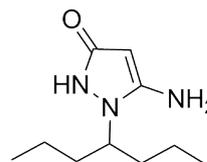
ESI-MS (m/z): $[\text{M}-\text{H}]^-$ berechnet für $\text{C}_{10}\text{H}_{18}\text{N}_3\text{O}^-$: 196.1 Da;
gefunden: 196.1 Da

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ [ppm] = 9.54 (s, -NH, 1H), 5.29 (s, -NH $_2$, 2H), 4.37 (s, COCH, 1H), 3.82 (tt, NCH(CH $_2$) $_2$, 1H), 1.65-1.58 (m, CH $_2$, 2H), 1.43-1.35 (m, CH $_2$, 2H), 1.20-1.13 (m, CH $_2$, 2H), 1.13-1.03 (m, CH $_2$, 2H), 0.81 (t, (CH $_3$) $_2$, 6H).

$^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ [ppm] = 162.9, 151.1, 73.3, 54.5, 36.3 (2), 18.9 (2), 13.9 (2).

Smp.: Zers. > 208 °C

Laborjournalnr.: DB5_1



5-Amino-1-isopropyl-1.2-dihydropyrazol-3-on F6

Ausbeute: 151 mg (77 %), weißer Feststoff

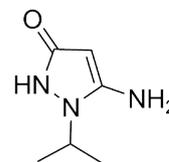
ESI-MS (m/z): $[\text{M}-\text{H}]^-$ berechnet für $\text{C}_6\text{H}_{10}\text{N}_3\text{O}^-$: 140.1 Da;
gefunden: 140.2 Da

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ [ppm] = 9.02 (s, -NH, 1H), 5.66 (s, -NH $_2$, 2H), 4.32 (s, COCH, 1H), 4.03 (hept, NCH(CH $_3$) $_2$, 1H), 1.09 (d, (CH $_3$) $_2$, 6H).

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ [ppm] = 166.6, 155.1, 75.2, 47.5, 19.8 (2).

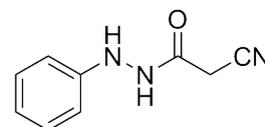
Smp.: Zers. > 275 °C

Laborjournalnr.: DB5_2



2-Cyano-*N'*-phenylacethydrazid F7a

Zu einer eisgekühlten Lösung von 2.4 g (28 mmol, 1 Äq) Cyansigsäure und 2.81 mL (28 mmol, 1 Äq) Phenylhydrazin wurde 5.9 g (28 mmol, 1 Äq) *N,N'*-Dicyclohexylcarbodiimid in 10 mL THF getropft. Nach 30 Minuten Rühren wurde die Suspension filtriert und der Niederschlag mit THF gewaschen. Das Lösungsmittel wurde am Rotationsverdampfer entfernt und der Rückstand mit DEE aufgenommen. Nochmaliges Filtrieren und einengen lieferte 2-Cyano-*N'*-phenylacethydrazid als schwach orangen Feststoff.



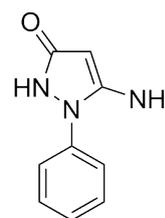
Ausbeute: 2.5 g (55 %)

ESI-MS (m/z): $[M+H]^+$ berechnet für $C_9H_{10}N_3O^+$: 176.1 Da; gefunden: 176.1 Da

Laborjournalnr.: DB3_73B

5-Amino-1-phenyl-1.2-dihydropyrazol-3-on F7

In 20 mL Ethanol wurde unter Eiskühlung 356.5 mg (15.5 mmol, 1 Äq) frisch geschnittenes Natrium gelöst. Anschließend wurden 2.7 g (15.5 mmol, 1 Äq) 2-Cyano-*N'*-phenylacethydrazid hinzugefügt und die Lösung 12 Stunden gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt und der Rückstand mittels Flash-Chromatographie (H:EA, 1:0 → 0:1) gereinigt.



Ausbeute: 1 g (37 %)

R_f = 0.25 (DCM:MeOH, 9:1)

ESI-MS (m/z): $[M+H]^+$ berechnet für $C_9H_{10}N_3O^+$: 176.1 Da; gefunden: 176.1 Da

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ [ppm] = 9.70 (s, -NH, 1H), 7.51-7.48 (m, ArH, 2H), 7.43-7.38 (m, ArH, 2H), 7.22-7.17 (m, ArH, 1H), 5.43 (s, -NH₂, 2H), 4.80 (s, COCH, 1H).

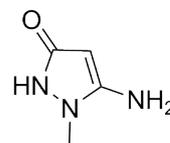
¹³C-NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆): δ [ppm] = 162.8, 149.4, 139.7, 129.0 (2), 124.9, 121.9 (2), 76.8.

Smp.: 157 °C

Laborjournalnr.: DB3_75

2-Cyano-*N*-methylacethydrazid F8

1 mL Methylhydrazin (19 mmol, 1 Äq) wurde in einem 5 mL Glaskolben mit 2.4 mL Cyanoessigsäureethylester (19 mmol, 1 Äq) unter Eisbadkühlung gemischt. Die Lösung wurde auf Raumtemperatur gebracht und über Nacht gerührt. Anschließend wurde das Gemisch mittels Flash-Chromatographie gereinigt (DCM:MeOH, 8:2, 1% NEt₃), was das gewünschte Produkt als fahl-weißen Feststoff lieferte.



Ausbeute: 0.75 g (35 %)

ESI-MS (m/z): $[M+H]^+$ berechnet für C₄H₈N₃O⁺: 114.1 Da; gefunden: 114.2 Da

¹H-NMR (300 MHz, Pyridin-*d*₅): δ [ppm]= 9.19 (bs, NH, 1H), 6.04 (bs, NH₂, 2H), 5.32 (s, CH, 1H), 3.59 (s, CH₃, 3H).

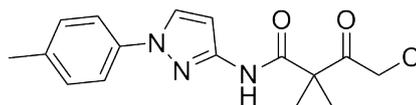
¹³C-NMR (75 MHz, Pyridin-*d*₅): δ [ppm]= 163.9, 151.2, 76.3, 34.6.

Smp.: 165-170 °C

Laborjournalnr.: DB4_36

10.5. Inhibitoren**10.5.1. Chlormethylketone****4-Chlor-2,2-dimethyl-1-[1-(*p*-tolyl)-1*H*-pyrazol-3-ylamino]-1,3-butandion CK1**

Zu einer Lösung aus 10 mg (61 μ mol, 1,05 Äq) 4-Chlor-2,2-dimethylacetessigsäure und 10 mg (58 μ mol, 1 Äq) 1-(*p*-Tolyl)-1*H*-pyrazol-3-amin in 2 mL DCM wurden 12 mg (58 μ mol, 1 Äq) *N,N'*-Dicyclohexylcarbodiimid gegeben. Nach 30 Minuten Rühren wurde die Lösung fil-



triert, eingengt und mittels HPLC gereinigt, was 4-Chlor-2,2-dimethyl-1-[1-(*p*-tolyl)-1*H*-pyrazol-3-ylamino]-1,3-butandion als braunen Feststoff lieferte.

Ausbeute: 12 mg (65 %)

ESI-HRMS (m/z): $[M+Na]^+$ berechnet für C₁₆H₁₈ClN₃NaO₂⁺: 342.0980 Da; gefunden: 342.0976 Da

¹H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ [ppm] = 10.50 (s, NH, 1H), 8.34 (d, ³J_{H-H} = 2.6

Hz, NNCHCHC, 1H), 7.64 (d, $^3J_{\text{H-H}} = 8.5$ Hz, NC(CH)₂, 2H), 7.28 (d, $^3J_{\text{H-H}} = 8.5$ Hz, NC(CH)₂(CH)₂, 2H), 6.74 (d, $^3J_{\text{H-H}} = 2.5$ Hz, NNCHCHC, 1H), 4.81 (s, CH₂Cl, 2H), 2.32 (s, Ar-CH₃, 3H), 1.46 (s, C(CH₃)₂, 6H).

¹³C-NMR (125 MHz, DMSO-*d*₆): δ [ppm] = 201.8, 171.0, 148.5, 137.2, 135.0, 129.8 (2), 127.8, 117.7 (2), 99.9, 55.3, 47.5, 21.8, 20.3 (2).

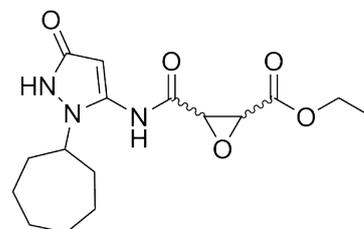
Smp.: 75 °C

Laborjournalnr.: DB4_10

10.5.2. Epoxide

3[(2-Cycloheptyl-5-oxo-1,2-dihydropyrazol-3-ylamino)carbonyl]-2-oxirancarbonsäureethylester EP3 & EP5

5-Amino-1-cycloheptyl-1,2-dihydropyrazol-3-on wurde in 10 mL Pyridin (10 mL pro 0.5 g Pyrazolon) gelöst und nacheinander 2.95 Äq. 2,3-Epoxybernsteinsäure und 2.95 Äq. DCC hinzugefügt. Die Suspension wurde über Nacht gerührt und anschließend das Lösungsmittel am Hochvakuum entfernt. Der Rückstand wurde in



Ethanol gelöst und mit 2 Äq. NaOH (aus 2 M NaOH-Lösung) versetzt. Nach 30 Minuten Rühren wurde das Reaktionsgemisch unter vermindertem Druck eingeeengt und der Rückstand mit wässrigem Acetonitril aufgenommen, filtriert und mittels HPLC gereinigt, was 3[(2-Methyl-5-oxo-1,2-dihydropyrazol-3-ylamino)carbonyl]-2-oxirancarbonsäure als farblosen Feststoff lieferte. Dieser wurde in Ethanol gelöst, mit katalytischen Mengen konzentrierter Schwefelsäure versetzt und 60 Minuten bei 90 °C in einem Mikrowellenreaktor bestrahlt. Anschließend wurde abgekühlt, das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt und das Produkt per HPLC gereinigt.

Je nach Konfiguration der eingesetzten 2,3-Epoxybernsteinsäure (*cis*- oder *trans*-), wird das Produkt als Enantiomergemisch ((*2R,3S*)/(*2S,3R*)) aus *cis*-Epoxybernsteinsäure, bzw. (*2R,3R*)/(*2S,3S*) aus *trans*-Epoxybernsteinsäure erhalten.

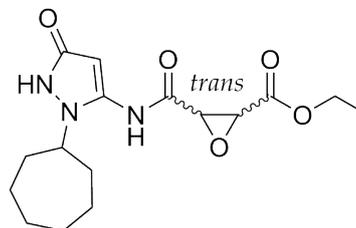
(2*R*,3*R*)/(2*S*,3*S*)-3[(2-Cycloheptyl-5-oxo-1,2-dihydropyrazol-3-ylamino)carbonyl]-2-oxirancarbonsäureethylester EP3**Ausbeute:** 48.8 mg (62 %)**ESI-MS** (*m/z*): [M+H]⁺ berechnet für C₁₆H₂₄N₃O₅⁺: 338.2 Da; gefunden: 338.2 Da

¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ [ppm] = 10.34 (s, NH, 1H), 10.02 (s, NH, 1H), 5.48 (s, NHCOCH, 1H), 4.21 (q, ³J_{H-H} = 7.2 Hz, CH₃CH₂, 2H), 4.14 (m, CH(CH₂)₂, 1H), 3.92 (d, ³J_{H-H} = 1.8 Hz, NHCOCHOCHCOOEt, 1H), 3.73 (d, ³J_{H-H} = 1.8 Hz, NHCOCHOCHCOOEt, 1H), 1.86-1.40 (m, Cycloheptyl-CH₂, 12H), 1.25 (t, ³J_{H-H} = 7.1 Hz, CH₃CH₂, 3H).

¹³C-NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ [ppm] = 167.0, 163.7, 159.2, 133.4, 84.2, 61.6, 56.5, 53.0, 51.5, 34.2 (2), 27.9 (2), 23.9 (2), 13.9.

Smp.: Zers. > 250 °C

Laborjournalnr.: DB3_44B

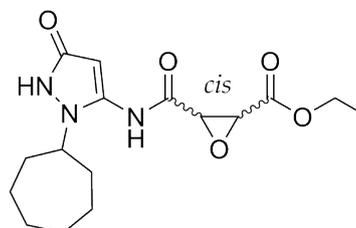
**(2*R*,3*S*)/(2*S*,3*R*)-3[(2-Cycloheptyl-5-oxo-1,2-dihydropyrazol-3-ylamino)carbonyl]-2-oxiran-carbonsäureethylester EP5****Ausbeute:** 43,8 mg (25 %)**ESI-HRMS** (*m/z*): [M+H]⁺ berechnet für C₁₆H₂₄N₃O₅⁺: 338,1710 Da; gefunden: 338,1734 Da

¹H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ [ppm]= 10.13 (s, NNHCO, 1H), 9.58 (s, CNHCO, 1H), 5.30 (s, NNHCOCH, 1H), 4.13 (q, ³J_{H-H} = 7.1 Hz, CH₃CH₂, 2H), 4.11 (m, CH(CH₂), 1H), 3.99 (s, NHCOCHOCHCOOEt, 2H), 1.81-1.42 (m, Cycloheptyl-CH₂, 12H), 1.18 (t, ³J_{H-H} = 7.1 Hz, CH₃CH₂, 3H).

¹³C-NMR (125 MHz, DMSO-*d*₆): δ [ppm]= 166.1, 163.8, 160.5, 134.8, 84.8, 61.1, 56.4, 53.7, 52.4, 34.3, 34.2, 27.8 (2), 23.9 (2), 13.9.

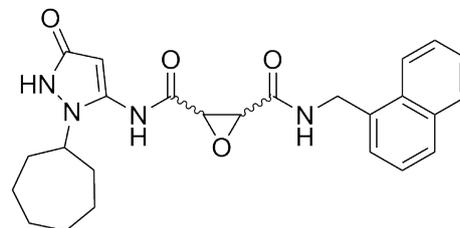
Smp.: 70 °C

Laborjournalnr.: DB5_35



(2R,3R)/(2S,3S)-N²-(2-Cycloheptyl-5-oxo-2,5-dihydro-1H-pyrazol-3-yl)-N³-(naphth-1-ylmethyl)oxiran-2,3-dicarboxamid EP4

200 mg (1.5 mmol, 1.25 Äq) *trans*-Epoxybernsteinsäure und 258 mg (1.25 mmol, 1 Äq) DCC wurden in 15 mL DMF vorgelegt. Zu dieser Mischung wurden 183 µL (1.25 mmol, 1 Äq) 1-Naphthylmethylamin getropft. Nach dem sich ein weißer Niederschlag entwickelte, wurde die Reaktionslösung filtriert, eingengt und über eine kurze Kieselgelsäule (DCM:MeOH, 9:1) gereinigt, was 240 mg (0.88 mmol) (2R,3R)/(2S,3S)-3-((Naphth-1-ylmethyl)carbamoyl)oxiran-2-carbonsäure als weißen Feststoff lieferte. Dieser wurde in 10 mL Pyridin gelöst, 86 mg (0.44 mmol, 0.5 Äq) **F4** und 181 mg (0.88 mmol, 1 Äq) DCC hinzugefügt und die resultierende Suspension 16 Stunden gerührt. Die Reaktionslösung wurde am Vakuum eingengt, filtriert und restliches Lösungsmittel mit Toluol koevaporiert. Der Rückstand wurde mit Toluol und Ethylacetat gewaschen, in Ethanol gelöst und 17.5 mg (0.44 mmol, 1 Äq) Natriumhydroxid hinzugefügt. Nach einer Stunde Rühren wurde die Reaktionslösung filtriert und der Rückstand mit Ethylacetat gewaschen. Säulenchromatographie mit Hexan:Ethylacetat (1:0 → 0:1) lieferte **EP4** als gelben Feststoff.



Ausbeute: 18 mg (10 %)

ESI-MS (*m/z*): [M+H]⁺ berechnet für C₂₂H₂₉N₄O₄⁺: 449.2 Da; gefunden: 449.3 Da

¹H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ [ppm]= 10.33 (s, ArNHCOCH, 1H), 9.62 (s, NNHCOCHC, 1H), 9.09 (t, ³J_{H-H} = 5.8 Hz, CONHCH₂, 1H), 8.08 (dd, ³J_{H-H} = 8.3, 1.3 Hz, ArH, 1H), 7.97 (dd, ³J_{H-H} = 7.8, 1.9 Hz, ArH, 1H), 7.88 (dd, ³J_{H-H} = 6.5, 3.1 Hz, ArH, 1H), 7.57 (m, ArH, 2H), 7.49 (m, ArH, 2H), 5.47 (s, NNHCOCHC, 1H), 4.81 (d, ³J_{H-H} = 5.7 Hz, NHCH₂Naphthyl, 2H), 4.16 (tt, ³J_{H-H} = 9.0, 5.3 Hz, NCH(CH₂)₂, 1H), 3.89 (d, ³J_{H-H} = 1.8 Hz, CH_{Oxiran}, 1H), 3.70 (d, ³J_{H-H} = 1.8 Hz, CH_{Oxiran}, 1H), 1.88 – 1.63 (m, Cycloheptyl-CH₂, 6H), 1.58 (m, Cycloheptyl-CH₂, 2H), 1.55 – 1.37 (m, Cycloheptyl-CH₂, 4H).

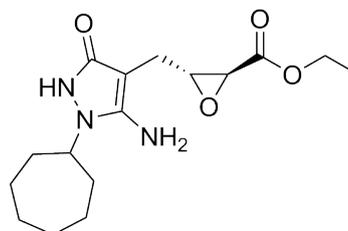
¹³C-NMR (125 MHz, DMSO-*d*₆): δ [ppm]= 165.9, 164.9, 134.2, 134.0, 133.8, 131.3, 129.1, 128.4, 126.9, 126.4, 125.9, 123.9, 57.0, 53.5, 52.9, 40.9, 34.7 (2), 28.3 (2), 24.4 (2). Zwei Carbonyle, sowie das CH-des Pyrazolons konnten nicht aufgelöst werden.

Smp.: 141 °C

Laborjournalnr.: DB5_58

(2*S*,3*R*)-3-[(2-cycloheptyl-5-oxo-1,2-dihydropyrazol-3-ylamino)methyl]-2-oxirancarbonsäureethylester EP2

50 mg (0.34 mmol, 1 Äq) (2*S*,3*S*)-3-Formyloxiran-2-carbonsäureethylester wurde in 5 mL 1,2-Dichlorethan gelöst. Nach Zugabe von 50 mg (0.25 mmol, 0.75 Äq) 5-Amino-1-cycloheptyl-1,2-dihydropyrazol-3-on **F4** in 1 mL Methanol wurden 62 mg (1 mmol, 3 Äq) Natriumcyanoborhydrid hinzugefügt und die Lösung drei Stunden gerührt. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und der Rückstand mittels HPLC gereinigt, was (2*S*,3*R*)-3-[(2-cyclohexyl-5-oxo-1,2-dihydropyrazol-3-ylamino)methyl]-2-oxirancarbonsäureethylester als farblosen Feststoff lieferte.



Ausbeute: 48 mg (45 %)

ESI-HRMS (m/z): $[M+Na]^+$ berechnet für $C_{16}H_{25}N_3NaO_4^+$: 324.1918 Da; gefunden: 324.1927 Da

1H -NMR (500 MHz, MeCN- d_3): δ [ppm] = 4.16 (qd, $^3J_{H-H} = 7.1$ Hz, 3.7 Hz, $COOCH_2CH_3$, 2H), 4.10 (m, $NCH(CH_2)_2$, 1H), 3.23 (m, $CHOCHCOOEt$, 2H), 2.70 (dd, $^3J_{H-H} = 16.0$ Hz, 3.6 Hz, $NHCOCCH_2$, 1H), 2.55 (dd, $^3J_{H-H} = 16.0$ Hz, 3.6 Hz, $NHCOCCH_2$, 1H), 1.94 - 1.89 (m, Cycloheptyl- CH_2 , 2H), 1.79 - 1.72 (m, Cycloheptyl- CH_2 , 4H), 1.65 - 1.63 (m, Cycloheptyl- CH_2 , 2H), 1.60 - 1.51 (m, Cycloheptyl- CH_2 , 4H), 1.23 (t, $^3J_{H-H} = 7.1$ Hz, $COOCH_2CH_3$, 3H).

^{13}C -NMR (125 MHz, MeCN- d_3): δ [ppm] = 169.6, 160.7, 152.5, 82.8, 62.3, 59.8, 57.6, 53.1, 33.2 (2), 28.1 (2), 25.1 (2), 22.8, 14.4.

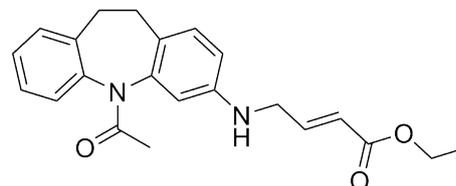
Smp.: 90 °C

Laborjournalnr.: DB6_31

10.5.3. α,β -ungesättigte Carbonylverbindungen

N-Acetyl-(10,11-dihydro-5*H*-dibenz[*b,f*]azepin-3-yl)amino-(*E*)-2-butensäureethylester **A1**

58 mg (0.23 mmol) **F1** wurden in 5 mL MeOH gelöst und bei Raumtemperatur gerührt. Nach Zugabe von 28 μ L (0.23 mmol) **AS2** und 31 mg (0.5 mmol, 2.1 Äq) Natriumcyanoborhydrid wurde 16 Stunden gerührt, eingengt und der Rückstand in Acetonitril:Wasser (3:7 v/v) aufgenommen. Reinigung mittels HPLC lieferte *N*-Acetyl-(10,11-dihydro-5*H*-dibenz[*b,f*]azepin-3-yl)amino-(*E*)-2-butensäureethylester **A1** als weißen Feststoff.



Ausbeute: 22 mg (25 %)

ESI-MS (m/z): $[M+H]^+$ berechnet für $C_{22}H_{25}N_2O_3^+$: 365.2 Da; gefunden: 365.0 Da

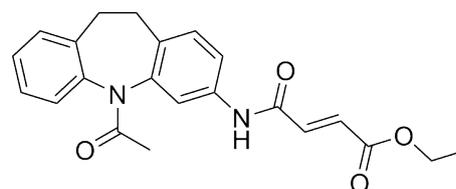
1H -NMR (300 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 7.34 – 7.25 (m, ArH, 1H), 6.99 (d, $^3J_{H-H} = 15.7$ Hz, CHCHCOOEt, 1H), 7.22 – 6.93 (m, ArH, 4H), 6.51 (d, $^3J_{H-H} = 6.9$ Hz, ArH, 2H), 6.01 (d, $^3J_{H-H} = 15.9$ Hz, CHCHCOOEt, 1H), 4.18 (q, $^3J_{H-H} = 7.2$ Hz, COOCH₂H₃, 2H), 3.91 (m, NHCH₂CH, 2H), 3.41 – 3.13 (m, ArCH₂, 2H), 2.91 – 2.62 (m, ArCH₂, 2H), 2.03 (d, $^3J_{H-H} = 13.6$ Hz, COCH₃, 3H), 1.27 (t, $^3J_{H-H} = 7.2$ Hz, COOCH₂H₃, 3H).

Laborjournalnr.: DB2_39

N-Acetyl-(10,11-dihydro-5*H*-dibenz[*b,f*]azepin-3-yl)amino-4-oxo-(*E*)-2-butensäureethylester **A2**

70 mg (0.28 mmol) **F1** und 38 μ L (0.28 mmol, 1 Äq) Triethylamin wurden in 5 mL Acetonitril gelöst und bei Raumtemperatur gerührt. Nach Zugabe von 50 mg (0.35 mmol, 1.25 Äq) Fumarsäuremonoethylester und 57.3 mg (0.28 mmol, 1 Äq) DCC wurde 16 Stunden gerührt, filtriert, eingengt und der Rückstand in Acetonitril:Wasser (3:7 v/v) aufgenommen. Reinigung mittels HPLC lieferte *N*-Acetyl-(10,11-dihydro-5*H*-dibenz[*b,f*]azepin-3-yl)amino-4-oxo-(*E*)-2-butensäureethylester **A2** als weißen Feststoff.

Ausbeute: 23 mg (23 %)



ESI-MS (m/z): $[M+H]^+$ berechnet für $C_{22}H_{23}N_2O_4^+$: 379.2 Da; gefunden: 379.1 Da

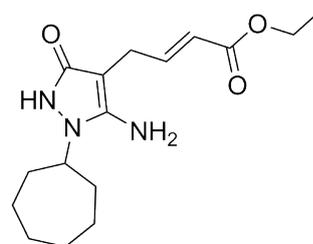
1H -NMR (300 MHz, $DMSO-d_6$, 90 °C): δ [ppm] = 10.33 (s, NH, 1H), 7.72 (d, $^3J_{H-H}$ = 2.2 Hz, ArH, 1H), 7.46 (dd, $^3J_{H-H}$ = 8.3, 2.2 Hz, ArH, 1H), 7.38 – 7.30 (m, ArH, 1H), 7.28 – 7.20 (m, ArH, 4H), 7.16 (d, $^3J_{H-H}$ = 15.5 Hz, NHCOC CH COOEt, 1H), 6.71 (d, $^3J_{H-H}$ = 15.5 Hz, NHCOC CH COOEt, 1H), 4.24 (q, $^3J_{H-H}$ = 7.1 Hz, 2H), 3.36 – 3.16 (m, ArCH $_2$, 2H), 2.87 – 2.73 (m, ArCH $_2$, 2H), 1.94 (s, NCOCH $_3$, 3H), 1.29 (t, $^3J_{H-H}$ = 7.1 Hz, COOCH $_2$ H $_3$, 3H).

Smp.: 174 °C

Laborjournalnr.: DB3_106

**(E)-4-(5-Amino-1-cycloheptyl-3-oxo-1,2-dihydropyrazol-4-yl)-2-butensäureethylester
AB1**

100 mg (0.5 mmol, 1 Äq) **F4** wurde mit 62 μ L (0.5 mmol, 1 Äq) **AS2** in 15 mL MeOH vorgelegt. Nach Zugabe von 63 mg (1 mmol, 2 Äq) Natriumcyanoborhydrid wurde 12 Stunden gerührt, mit Wasser gequench, einrotiert und der Rückstand in Acetonitril:Wasser (3:7) gelöst. HPLC Reinigung lieferte **AB1** als weißen Feststoff.



Ausbeute: 32 mg (20 %)

ESI-HRMS (m/z): $[M+H]^+$ berechnet für $C_{16}H_{26}N_3O_3^+$: 308.1969 Da; gefunden: 308.1993 Da

1H -NMR (700 MHz, MeCN- d_3): δ [ppm] = 6.88 (dt, $^3J_{H-H}$ = 15.6, 5.8 Hz, CHCHCOOEt, 1H), 5.76 (dt, $^3J_{H-H}$ = 15.6, 1.8 Hz, CHCHCOOEt, 1H), 5.31 (s, NNHCOC CH , 1H), 4.13 (q, $^3J_{H-H}$ = 7.1 Hz, CH $_2$ CH $_3$, 2H), 4.11 – 4.06 (m, NCH(CH $_2$) $_2$, 1H), 3.12 (dd, $^3J_{H-H}$ = 5.8, 1.8 Hz, CH $_2$ CHCHCOOEt, 2H), 1.93 – 1.89 (m, Cycloheptyl-CH $_2$, 4H), 1.80 – 1.72 (m, Cycloheptyl-CH $_2$, 4H), 1.68 – 1.60 (m, Cycloheptyl-CH $_2$, 2H), 1.60 – 1.47 (m, Cycloheptyl-CH $_2$, 2H), 1.23 (t, $^3J_{H-H}$ = 7.1 Hz, COOCH $_2$ CH $_3$, 3H).

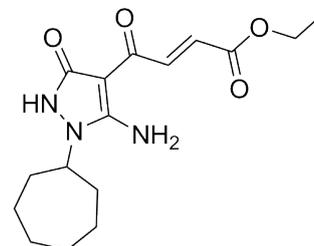
^{13}C -NMR (175 MHz, MeCN- d_3): δ [ppm] = 167.0, 161.5, 152.4, 146.1, 122.4, 84.4, 61.1, 59.9, 33.1 (2), 28.2 (2), 25.1 (2), 23.4, 14.6.

Smp.: 89 °C

Laborjournalnr.: DB6_36

(E)-4-(5-Amino-1-cycloheptyl-3-oxo-1,2-dihydropyrazol-4-yl)-4-oxo-2-butensäure-ethylester AB2

120 mg (0.61 mmol, 1 Äq) Pyrazolon wurde in 5 mL Essigsäure gelöst und im Eisbad gekühlt. 120 mg (1.22 mmol, 2 Äq) Maleinsäureanhydrid wurde hinzugefügt und die Lösung über Nacht gerührt. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und der Rückstand mittels Flash-Chromatographie gereinigt (DCM:MeOH, 95:5), was (E)-4-(5-Amino-1-cycloheptyl-3-oxo-1,2-dihydropyrazol-4-yl)-4-oxo-2-butensäure als Nebenprodukt lieferte.



Die Carbonsäure wurde in 5 mL Ethanol gelöst und mit 2 Tropfen konzentrierter Schwefelsäure versetzt. Die Lösung wurde 60 Minuten bei 90 °C im Mikrowellenreaktor erhitzt. Entfernung des Lösungsmittels im Vakuum und Reinigung mittels HPLC lieferte (E)-4-(5-Amino-1-cycloheptyl-3-oxo-1,2-dihydropyrazol-4-yl)-4-oxo-2-butensäureethylester als gelben Feststoff.

Ausbeute: 25 mg (12 %)

ESI-MS (m/z): $[M+H]^+$ berechnet für $C_{16}H_{24}N_3O_4^+$: 322.1 Da; gefunden: 322.1 Da

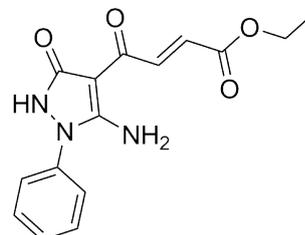
1H -NMR (300 MHz, Pyridin- d_5): δ [ppm] = 11.60 (s, NNHCO, 1H), 9.16 (d, $^3J_{H-H}$ = 15.6 Hz, CCOCHCHCOOEt, 1H), 8.36 (s, NH_2 , 2H), 7.39 (d, $^3J_{H-H}$ = 15.6 Hz, CCOCHCHCOOEt, 1H), 4.35 (tt, $^3J_{H-H}$ = 9.4 Hz, 4.9 Hz, NCH(CH $_2$) $_2$, 1H), 4.20 (q, $^3J_{H-H}$ = 7.1 Hz, COOCH $_2$ CH $_3$, 2H), 2.16 – 1.89 (m, Cycloheptyl-CH $_2$, 4H), 1.72 – 1.55 (m, Cycloheptyl-CH $_2$, 2H), 1.47 – 1.30 (m, Cycloheptyl-CH $_2$, 4H), 1.28 (m, Cycloheptyl-CH $_2$, 2H), 1.14 (t, $^3J_{H-H}$ = 7.1 Hz, COOCH $_2$ CH $_3$, 3H).

^{13}C -NMR (75 MHz, Pyridin- d_5): δ [ppm] = 181.2, 166.6, 165.4, 161.5, 141.0, 128.3, 95.3, 60.8, 57.5, 33.2 (2), 28.2 (2), 24.7 (2), 14.2.

Laborjournalnr.: DB4_16B

(E)-4-(5-Amino-1-phenyl-3-oxo-1,2-dihydropyrazol-4-yl)-4-oxo-2-butensäureethylester AB3

175 mg (1 mmol, 1 Äq) **F7** wurden in 7 mL 1,4-Dioxan in einem Mikrowellengefäß vorgelegt. 147 mg (1.5 mmol, 1. Äq) Maleinsäureanhydrid wurden hinzugefügt, das Gefäß drucksticher verschlossen und die Lösung für 20 min bei 90 °C in einen Mikrowellenreaktor gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel entfernt, der Rückstand in 15 mL EtOH gelöst und mit katalytischen Mengen Schwefelsäure 12 Stunden unter Rückfluss erhitzt. Entfernen des Lösungsmittels und HPLC-Reinigung des Rückstandes lieferte **AB3** als blass-gelben Feststoff.



Ausbeute: 13 mg (10 %)

ESI-HRMS (m/z): $[M+H]^+$ berechnet für $C_{15}H_{16}N_3O_4^+$: 302.1135 Da; gefunden: 302.1139 Da

1H -NMR (300 MHz, DMSO- d_6): δ [ppm] = 10.9 (s, NNHCO, 1H), 8.15 (d, $^3J_{H-H}$ = 15.6 Hz, CHCHCOOEt, 1H), 7.61 (s, NH₂, 2H), 7.56 – 7.43 (m, PhenylH, 3H), 7.46 – 7.35 (m, PhenylH, 2H), 6.65 (d, $^3J_{H-H}$ = 15.8 Hz, CHCHCOOEt, 1H), 4.21 (q, $^3J_{H-H}$ = 7.1 Hz, COOCH₂CH₃, 2H), 1.26 (t, $^3J_{H-H}$ = 7.1 Hz, COOCH₂CH₃, 3H).

^{13}C -NMR (175 MHz, MeCN- d_3): δ [ppm] = 180.1, 165.5, 139.3, 129.6 (2), 129.4, 127.6, 127.4, 123.5 (2), 93.7, 60.7, 14.1.

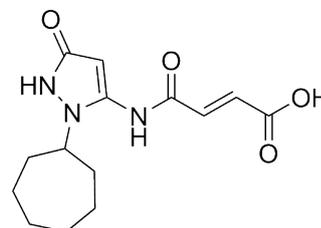
2 Carbonyle konnten nicht aufgelöst werden.

Smp.: Zers. > 220 °C

Laborjournalnr.: DB3_81C

(E)-4-(2-Cycloheptyl-5-oxo-1,2-dihydropyrazol-3-ylamino)-4-oxo-2-butensäure AB5a

66 mg (0.34 mmol, 1 Äq) **F4** wurden in 3 mL Pyridin gelöst und nacheinander 206 mg (1 mmol, 3 Äq) DCC und 143 mg (1 mmol, 3 Äq) Fumarsäuremonoethylester hinzugefügt. Nach 2 Stunden wurden 5 mL 2M NaOH hinzugegeben und die Lösung über Nacht gerührt. Die Reaktionslösung wurde filtriert, mit verdünnter Salzsäure auf pH 1 gebracht und mit Ethylacetat extrahiert.



Entfernen des Lösungsmittel und HPLC-Reinigung lieferte (E)-4-(2-Cycloheptyl-5-oxo-1,2-dihydropyrazol-3-ylamino)-4-oxo-2-butensäure als schwach gelben Feststoff.

Ausbeute: 95 mg (95 %)

ESI-MS (m/z): $[M+H]^+$ berechnet für $C_{14}H_{20}N_3O_4^+$: 294.1 Da; gefunden: 294.1 Da

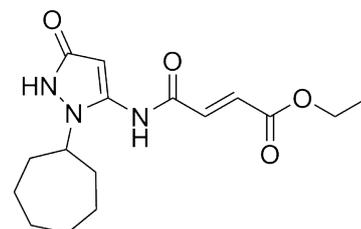
1H -NMR (300 MHz, Pyridin- d_5): δ [ppm] = 11.63 (s, NNHCO, 1H), 7.76 (d, $^3J_{H-H}$ = 15.4 Hz, CHCHCOOEt, 1H), 7.52 (d, $^3J_{H-H}$ = 15.4 Hz, CHCHCOOEt, 1H), 7.37 (s, CNHCO, 1H), 6.41 (s, COCHCNH, 1H), 4.56 (tt, $^3J_{H-H}$ = 9.4 Hz, 4.8 Hz, CCH(CH $_2$) $_2$, 1H), 2.32 - 2.20 (m, Cycloheptyl-CH $_2$, 2H), 2.11 - 2.01 (m, Cycloheptyl-CH $_2$, 2H), 1.73 - 1.64 (m, Cycloheptyl-CH $_2$, 2H); 1.44 - 1.41 (m, Cycloheptyl-CH $_2$, 4H), 1.36 - 1.26 (m, Cycloheptyl-CH $_2$, 2H).

^{13}C -NMR (75 MHz, Pyridin- d_5): δ [ppm] = 168.4, 163.6, 161.8 (2), 136.4, 133.9, 86.2, 58.4, 35.5 (2), 29.1 (2), 25.1 (2).

Laborjournalnr.: DB3_116

(E)-4-(2-Cycloheptyl-5-oxo-1,2-dihydropyrazol-3-ylamino)-4-oxo-2-butensäureethylester **AB5**

20.8 mg (70 μ mol, 1 \ddot{A} q) **AB5a** wurde in 20 mL Ethanol gelöst, 2 μ L DMF wurde hinzuge tropft und unter heftigem Rühren wurden 7.2 μ L (84 μ mol, 1.2 \ddot{A} q) Oxalylchlorid hinzugefügt. Die Lösung wurde über Nacht gerührt, das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und das Reaktionsprodukt mittels HPLC gereinigt, was E-4-(2-Cycloheptyl-5-oxo-1,2-dihydropyrazol-3-ylamino)-4-oxo-2-butensäureethylester als farblosen Feststoff lieferte.



Ausbeute: 15 mg (65 %)

ESI-MS (m/z): $[M+H]^+$ berechnet für $C_{16}H_{24}N_3O_4^+$: 322.1 Da; gefunden: 322.1 Da

1H -NMR (300 MHz, Pyridin- d_5): δ [ppm] = 11.62 (s, NNHCO, 1H), 7.58 (d, $^3J_{H-H}$ = 15.4 Hz, NHCOCHCHCOOEt, 1H), 7.25 (d, $^3J_{H-H}$ = 15.4 Hz, NHCOCHCHCOOEt, 1H), 7.15 (s, CNHCO, 1H), 6.44 (s, COCHCNH, 1H), 4.55 (tt, $^3J_{H-H}$ = 9.4 Hz, 4.8 Hz, CCH(CH $_2$) $_2$, 1H), 4.13 (q, $^3J_{H-H}$ = 7.1 Hz, COOCH $_2$ CH $_3$, 2H), 2.35 - 2.19 (m, Cycloheptyl-CH $_2$, 2H), 2.13 - 1.99 (m, Cycloheptyl-CH $_2$, 2H), 1.77 - 1.60 (m, Cycloheptyl-CH $_2$, 2H), 1.47 - 1.37 (m, Cycloheptyl-CH $_2$, 4H), 1.39 - 1.20 (m, Cycloheptyl-CH $_2$, 2H), 1.10 (t, $^3J_{H-H}$ = 7.1 Hz, COOCH $_2$ CH $_3$, 3H).

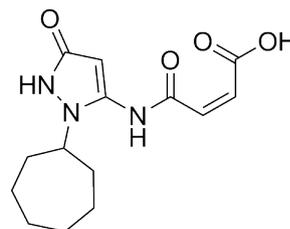
$^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, Pyridin- d_5): δ [ppm] = 165.8, 162.8, 161.9, 137.1, 131.6, 123.8, 86.1, 61.5, 58.4, 35.5 (2), 29.0 (2), 25.1 (2), 14.4.

Smp.: Zers. > 225 °C

Laborjournalnr.: DB4_3

(Z)-4-(2-Cycloheptyl-5-oxo-1,2-dihydropyrazol-3-ylamino)-4-oxo-2-butensäure AB6a

120 mg (0.61 mmol) Pyrazolon wurde in 5 mL Essigsäure gelöst und im Eisbad gekühlt. 120 mg (1.22 mmol, 2 Äq.) Maleinsäureanhydrid wurde hinzugefügt und die Lösung über Nacht gerührt. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und der Rückstand mittels Flash-Chromatographie gereinigt, was (E)-4-(2-Cycloheptyl-5-oxo-1,2-dihydropyrazol-3-ylamino)-4-oxo-2-butensäure als schwach gelben Feststoff lieferte.



Ausbeute: 48 mg (62 %)

R_f = 0.2 (DCM:MeOH, 4:1)

ESI-MS (m/z): $[\text{M}+\text{H}]^+$ berechnet für $\text{C}_{14}\text{H}_{20}\text{N}_3\text{O}_4^+$: 294.1 Da; gefunden: 294.1 Da

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, Pyridin- d_5): δ [ppm] = 13.66 (bs, NNHCOCH , 1H), 7.68 (bs, NCNH , 1H), 6.63 (d, $^3J_{\text{H-H}} = 13.1$ Hz, NHCOCHCHCOOH , 1H), 6.58 (s, COCHCNH , 1H), 6.50 (d, $^3J_{\text{H-H}} = 13.1$ Hz, NHCOCHCHCOOH , 1H), 4.75 (tt, $^3J_{\text{H-H}} = 9.3$ Hz, 4.8 Hz, $\text{NCH}(\text{CH}_2)_2$, 1H), 2.37 – 2.20 (m, Cycloheptyl- CH_2 , 5H), 1.78 – 1.63 (m, Cycloheptyl- CH_2 , 2H), 1.53 – 1.39 (m, Cycloheptyl- CH_2 , 5H)

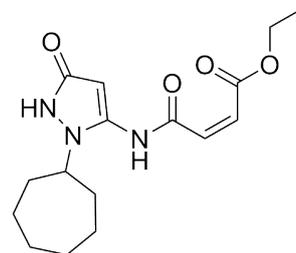
$^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, Pyridin- d_5): δ [ppm] = 161.8 (3), 149.5, 136.9, 135.2, 67.5, 58.1, 35.4 (2), 29.1 (2), 25.2 (2).

Smp.: Zers. > 200 °C

Laborjournalnr.: DB4_34

(Z)-4-(2-Cycloheptyl-5-oxo-1,2-dihydropyrazol-3-ylamino)-4-oxo-2-butensäureethylester AB6

100 mg (0.34 mmol) Carbonsäure wurden in 5 mL Ethanol gelöst und mit 2 Tropfen konzentrierter Schwefelsäure versetzt. Die Lösung wurde 60 Minuten bei 90 °C im Mikrowellenreaktor erhitzt. Entfernung des Lösungsmittels im Vakuum und Reinigung mittels HPLC lieferte (Z)-4-(2-Cycloheptyl-5-oxo-1,2-dihydropyrazol-3-ylamino)-4-oxo-2-butensäureethylester als schwach gelben Feststoff.



Ausbeute: 95 mg (85 %)

ESI-HRMS (m/z): $[M+H]^+$ berechnet für $C_{16}H_{24}N_3O_4^+$: 322.1761 Da; gefunden: 322.1668 Da

1H -NMR (300 MHz, Pyridin- d_5): δ [ppm] = 11.54 (s, NNHCO, 1H), 8.54 (s, CNHCO, 1H), 6.83 (d, $^3J_{H-H} = 12.1$ Hz, NHCOCHCHCOOEt, 1H), 6.38 (d, $^3J_{H-H} = 12.1$ Hz, NHCOCHCHCOOEt, 1H), 6.33 (s, COCHCNH, 1H), 4.23 (q, $^3J_{H-H} = 7.2$ Hz, COOCH₂CH₃, 2H), 4.17 – 4.04 (m, NCH(CH₂)₂, 1H), 2.43 – 1.96 (m, Cycloheptyl-CH₂, 4H), 1.81 – 1.26 (m, Cycloheptyl-CH₂, 8H), 1.16 (t, $^3J_{H-H} = 7.1$ Hz, COOCH₂CH₃, 3H)

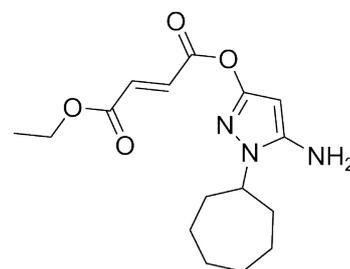
^{13}C -NMR (75 MHz, Pyridin- d_5): δ [ppm] = 166.6, 164.2, 161.8, 135.6, 135.3, 128.3, 85.9, 61.5, 58.1, 35.6 (2), 28.9 (2), 25.1 (2), 14.4.

Smp.: 148 °C

Laborjournalnr.: DB3_103_7

5-Amino-1-cycloheptyl-1H-pyrazol-3-ylfumarsäureethylester AB4

66 mg (0.34 mmol, 1 Äq) Pyrazolon wurden in 3 mL Pyridin gelöst und nacheinander 68 mg (0.34 mmol, 1 Äq) DCC und 47 mg (0.34 mmol, 1 Äq) Fumarsäuremonoethylester hinzugefügt. Die Lösung wurde über Nacht gerührt, filtriert und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Reinigung des Rückstands mittels HPLC lieferte 5-Amino-1-cycloheptyl-1H-pyrazol-3-ylfumarsäureethylester als gelben Feststoff.



Ausbeute: 48 mg (43 %)

ESI-MS (m/z): $[M+H]^+$ berechnet für $C_{16}H_{24}N_3O_4^+$: 322.1 Da; gefunden: 322.1 Da

1H -NMR (300 MHz, Pyridin- d_5): δ [ppm] = 7.13 (d, $^3J_{H-H}$ = 15.6 Hz, $OCOCHCHCOOEt$, 1H), 7.13 (d, $^3J_{H-H}$ = 15.8 Hz, $OCOCHCHCOOEt$, 1H), 5.88 (s, $NNCCHCNH_2$, 1H), 5.87 (s, NH_2 , 2H), 4.54 (tt, $^3J_{H-H}$ = 9.4 Hz, 4.8 Hz, $NCH(CH_2)_2$, 1H), 4.17 (q, $^3J_{H-H}$ = 7.1 Hz, $COOCH_2CH_3$, 2H), 2.30 – 2.15 (m, Cycloheptyl- CH_2 , 2H), 2.14 – 2.02 (m, Cycloheptyl- CH_2 , 2H), 1.77 – 1.64 (m, Cycloheptyl- CH_2 , 2H), 1.50 – 1.41 (m, Cycloheptyl- CH_2 , 4H), 1.41 – 1.29 (m, Cycloheptyl- CH_2 , 2H), 1.15 (t, $^3J_{H-H}$ = 7.1 Hz, $COOCH_2CH_3$, 3H).

^{13}C -NMR (75 MHz, Pyridin- d_5): δ [ppm] = 165.0, 163.1, 154.2, 147.1, 135.5, 133.1, 80.6, 61.8, 57.7, 35.0 (2), 28.8 (2), 25.0 (2), 14.4.

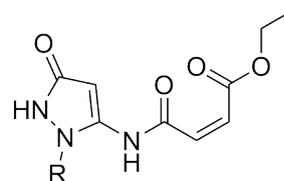
Smp.: 128 °C

Laborjournalnr.: DB3_103_12

Generelle Synthese unterschiedlich substituierter 5-Amino-1H-pyrazol-3-ylmaleinsäureethylester

Das entsprechende Pyrazolon wurde in Essigsäure (5 mL pro 0.5 mmol Edukt) gelöst und im Eisbad gekühlt. 2.2 Äq. Maleinsäureanhydrid wurden hinzugefügt und die Lösung über Nacht gerührt. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und der Rückstand in Ethanol (5 mL pro 0,5 mmol Edukt) gelöst.

Nach Zugabe von 1.5 Äq. Thionylchlorid wurde die Lösung über Nacht gerührt. Entfernung des Lösungsmittels im Vakuum und Reinigung mittels HPLC lieferte den entsprechenden (Z)-Butensäureethylester.

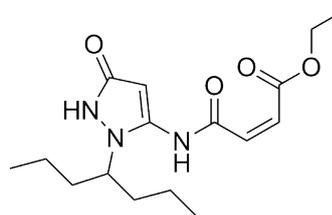


(Z)-4-(4-Heptyl-5-oxo-1,2-dihydropyrazol-3-ylamino)-4-oxo-2-butensäureethylester AB7

Ausbeute: 65 mg (33 %)

ESI-MS (m/z): $[M+H]^+$ berechnet für $C_{16}H_{26}N_3O_4^+$: 324.2 Da; gefunden: 324.2 Da

1H -NMR (500 MHz, DMSO- d_6): δ [ppm] = 10.04 (s, $NHCOCHCHCOOEt$, 1H), 6.55 (d, $^3J_{H-H}$ = 11.9 Hz, $NHCOCHCHCOOEt$, 1H), 6.38 (d, $^3J_{H-H}$ = 11.9 Hz, $NHCOCHCHCOOEt$, 1H), 5.50 (s, $NNHCOCHCN$, 1H), 4.12 (q, $^3J_{H-H}$ = 7.2 Hz,



COOCH₂CH₃, 2H), 4.09 (m, NCH(CH₂)₂, 1H), 3.50 (s, NNHCO, 1H), 1.69 (m, Heptyl-CH₂, 2H), 1.57 – 1.46 (m, Heptyl-CH₂, 2H), 1.19 (t, ³J_{H-H} = 7.1 Hz, COOCH₂CH₃, 3H), 1.17 – 1.09 (m, Heptyl-CH₂, 2H), 1.00 – 0.90 (m, Heptyl-CH₂, 2H), 0.79 (t, ³J_{H-H} = 7.4 Hz, Heptyl-CH₃, 6H).

¹³C-NMR (125 MHz, DMSO-*d*₆): δ [ppm] = 165.8, 162.3, 159.4, 136.0, 131.7, 129.1, 83.4, 60.3, 55.5, 36.8 (2), 18.7 (2), 13.9, 13.8 (2).

Laborjournalnr.: DB4_42

(Z)-4-(4-Isopropyl-5-oxo-1,2-dihydropyrazol-3-ylamino)-4-oxo-2-butensäureethylester AB14

Ausbeute: 70 mg (30 %)

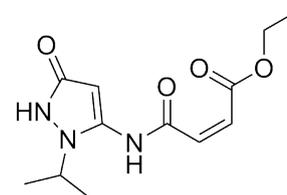
ESI-HRMS (*m/z*): [M+H]⁺ berechnet für C₁₂H₁₈N₃O₄⁺: 268.1292 Da; gefunden: 268.1293 Da

¹H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ [ppm] = 10.19(s, NHCOCHCHCOOEt, 1H), 6.56 (d, ³J_{H-H} = 11.9 Hz, NHCOCHCHCOOEt, 1H), 6.38 (d, ³J_{H-H} = 11.9 Hz, NHCOCHCHCOOEt, 1H), 5.48 (s, NNHCOCHCN, 1H), 4.41 (h, NCH(CH₃)₂, 1H), 4.12 (q, ³J_{H-H} = 7.1 Hz, COOCH₂CH₃, 2H), 4.00 (s, NNHCOCH, 1H), 1.25 (d, ³J_{H-H} = 6.5 Hz, Isopropyl-CH₃, 6H), 1.19 (t, ³J_{H-H} = 7.1 Hz, COOCH₂CH₃, 3H).

¹³C-NMR (125 MHz, DMSO-*d*₆): δ [ppm] = 165.8, 162.7, 159.3, 134.4, 132.1, 129.0, 84.2, 60.4, 47.4, 22.1 (2), 13.9.

Smp.: 132 °C

Laborjournalnr.: DB4_45



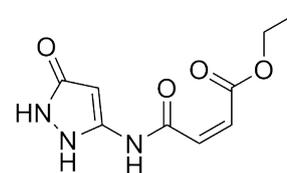
(Z)-4-oxo-4-((5-oxo-2,5-dihydro-1H-pyrazol-3-yl)amino)-2-butensäureethylester AB8

AB8 wurde aus 5-Amino-1,2-dihydro-3H-pyrazol-3-on^[185] hergestellt.

Ausbeute: 80 mg (10 %)

ESI-MS (*m/z*): [M+H]⁺ berechnet für C₉H₁₂N₃O₄⁺: 226.1 Da; gefunden: 226.0 Da

¹H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ [ppm] = 11.21 (s, NH, 1H), 10.91 (s, NH, 1H), 6.37



(d, $^3J_{\text{H-H}} = 12.0$ Hz, COCHCHCOOEt, 1H), 6.34 (d, $^3J_{\text{H-H}} = 12.0$ Hz, COCHCHCOOEt, 1H), 4.91 (s, NHNHCOCHC, 1H), 4.02 (q, $^3J_{\text{H-H}} = 7.1$ Hz, COOCH₂CH₃, 2H), 1.14 (t, $^3J_{\text{H-H}} = 7.1$ Hz, COOCH₂H₃, 3H).

¹³C-NMR (125 MHz, DMSO-*d*₆): δ [ppm] = 166.5, 166.1, 165.3, 158.3, 131.3, 128.9, 60.3, 33.9, 13.8.

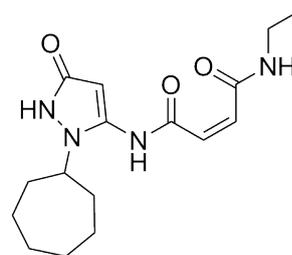
Smp.: 63 °C

Laborjournalnr.: DB6_7

10.5.4. α,β -ungesättigte Amide

(Z)-1-(2-Cycloheptyl-5-oxo-1,2-dihydropyrazol-3-ylamino)-4-(ethylamino)-2-buten-1,4-dion AB10

50 mg (0.17 mmol, 1 Äq) (Z)-4-(2-Cycloheptyl-5-oxo-1,2-dihydropyrazol-3-ylamino)-4-oxo-2-butensäure **AB6a** wurde unter Argon-Atmosphäre in 5 mL THF gelöst. Nach Zugabe von 18 μ L (2.5 mmol, 1.4 Äq) Thionylchlorid und 100 μ L DMF wurde die Lösung 10 Minuten gerührt. Anschließend wurde 1 mL einer 30 %-igen, wässrigen Ethylamin-Lösung hinzugegeben, die Lösung zwei Stunden gerührt und dann das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Reinigung mittels HPLC lieferte (Z)-1-(2-Cycloheptyl-5-oxo-1,2-dihydropyrazol-3-ylamino)-4-(ethylamino)-2-buten-1,4-dion als blass gelben Feststoff.



Ausbeute: 15 mg (28 %)

ESI-HRMS (*m/z*): [M+Na]⁺ berechnet für C₁₆H₂₄N₄NaO₃⁺: 343.1741 Da; gefunden: 343.1743 Da

¹H-NMR (300 MHz, Pyridin-*d*₅): δ [ppm] = 13.93 (bs, NNHCOCH, 1H), 9.97 (bs, CNHCO, 1H), 7.85 (bs, CONHEt, 1H), 6.76 (s, COCHCN, 1H), 6.51 (d, $^3J_{\text{H-H}} = 13.4$ Hz, COCHCHCONHEt, 1H), 6.46 (d, $^3J_{\text{H-H}} = 13.4$ Hz, COCHCHCONHEt, 1H), 4.84 (tt, $^3J_{\text{H-H}} = 9.3$ Hz, 4.5 Hz, CCH(CH₂), 1H), 3.43 (qd, $^3J_{\text{H-H}} = 7.3$ Hz, 5.4 Hz, CONHCH₂CH₃, 2H), 2.41 – 2.18 (m, Cycloheptyl-CH₂, 4H), 1.90 – 1.74 (m, Cycloheptyl-CH₂, 2H), 1.75 – 1.59 (m, Cycloheptyl-CH₂, 2H), 1.59 – 1.36 (m, Cycloheptyl-CH₂, 4H), 1.15

(t, $^3J_{\text{H-H}} = 7.3$ Hz, CONHCH₂CH₃, 3H).

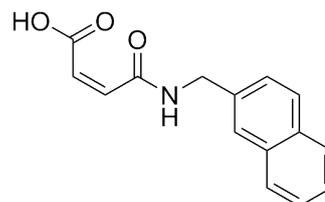
$^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, Pyridin-*d*₅): δ [ppm] = 166.4, 165.6, 161.9, 161.8, 136.9, 130.4, 83.9, 58.1, 35.6 (2), 35.4, 28.8 (2), 25.5 (2), 14.5.

Smp.: 118 °C

Laborjournalnr.: DB4_39

(Z)-4-((Naphthalen-2-ylmethyl)amino)-4-oxobut-2-ensäure AB11a

500 mg (3.1 mmol, 1 Äq) 2-(Aminomethyl)naphthalen wurden in 10 mL DCM gelöst. Nach Zugabe von 310 mg (3.1 mmol, 1 Äq) Maleinsäureanhydrid wurde die Lösung über Nacht gerührt, dann das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Reinigung mittels Flash-Chromatographie (DCM:MeOH 100:0 → 90:10) lieferte (Z)-4-((Naphthalen-2-ylmethyl)amino)-4-oxobut-2-ensäure als farblosen Feststoff.



Ausbeute: 790 mg (98 %)

ESI-MS (*m/z*): [M+H]⁺ berechnet für C₁₅H₁₄NO₃⁺: 256.0 Da; gefunden: 256.0 Da

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ [ppm] = 9.53 (t, $^3J_{\text{H-H}} = 5.8$ Hz, NH, 1H), 7.94 – 7.84 (m, ArH, 2H), 7.83 (s, ArH, 1H), 7.54 – 7.44 (m, ArH, 2H), 7.43 – 7.37 (m, ArH, 2H), 6.49 (d, $^3J_{\text{H-H}} = 12.4$ Hz, COCHCHCO, 1H), 6.28 (d, $^3J_{\text{H-H}} = 12.4$ Hz, COCHCHCO, 1H), 4.57 (d, $^3J_{\text{H-H}} = 5.8$ Hz, CONHCH₂, 2H).

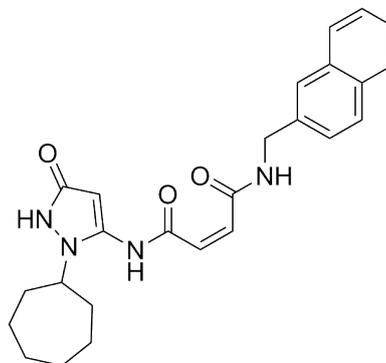
Das azide Proton der Carbonsäure wurde nicht aufgelöst.

$^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, DMSO-*d*₆): δ [ppm] = 165.8, 165.3, 135.6, 132.9, 132.2, 131.7, 128.2, 128.1, 127.8, 127.6, 127.5, 126.3, 126.1, 125.9, 42.8.

Laborjournalnr.: DB5_77

(Z)-1-(2-Cycloheptyl-5-oxo-1,2-dihydropyrazol-3-ylamino)-4-[(2-naphthyl)methyl]amino-2-buten-1,4-dion AB11

100 mg (0.5 mmol) **F4** wurde in 10 mL Pyridin gelöst. Nach Zugabe von 306 mg (1.2 mmol, 2.4 Äq) (Z)-4-((Naphthalen-2-ylmethyl)amino)-4-oxobut-2-ensäure, 1.2 mg (0.01 mmol, 0.02 Äq) 4-(Dimethylamino)-pyridin und 248 mg (1.2 mmol, 2.4 Äq) DCC wurde die Lösung über Nacht gerührt. Anschließend wurde die Lösung filtriert, mit Toluol koevaporiert und mit 10 mL Ethanol aufgenommen. Nach Zugabe von 112 µL (0.56 mmol, 1.1 Äq) 5 M NaOH-Lösung, wurde 30 Minuten gerührt, eingeeengt und der Rückstand mittels HPLC gereinigt, was (Z)-1-(2-Cycloheptyl-5-oxo-1,2-dihydropyrazol-3-ylamino)-4-[(2-naphthyl)methyl]amino-2-buten-1,4-dion als blass gelben Feststoff lieferte.



Ausbeute: 30 mg (13 %)

ESI-MS (m/z): $[M+H]^+$ berechnet für $C_{25}H_{29}N_4O_3^+$: 433.2 Da; gefunden: 433.0 Da

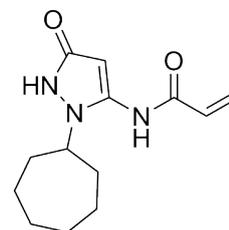
1H -NMR (500 MHz, DMSO- d_6): δ [ppm] = 10.47 (s, NNHCO, 1H), 8.39 (t, $^3J_{H-H}$ = 6.0 Hz, NHCH₂, 1H), 7.91 – 7.79 (m, ArH, 2H), 7.69 (s, ArH, 1H), 7.53 – 7.41 (m, ArH, 2H), 7.46 – 7.35 (m, ArH, 2H), 7.36 (s, NNHCOCHC, 1H), 5.55 (d, $^3J_{H-H}$ = 13.5 Hz, NHCOCHCHCONH, 1H), 5.54 (d, $^3J_{H-H}$ = 13.5 Hz, NHCOCHCHCONH, 1H), 4.48 (dd, $^3J_{H-H}$ = 15.6, 6.4 Hz, NHCH₂, 1H), 4.35 (dd, $^3J_{H-H}$ = 15.7, 5.6 Hz, NHCH₂, 1H), 4.20 (tt, $^3J_{H-H}$ = 9.1, 4.3 Hz, CH(CH₂)₂, 1H), 1.88 – 1.78 (m, Cycloheptyl-CH₂, 4H), 1.77 – 1.62 (m, Cycloheptyl-CH₂, 2H), 1.62 – 1.54 (m, Cycloheptyl-CH₂, 4H), 1.55 – 1.36 (m, Cycloheptyl-CH₂, 2H).

Ein Aminoproton wurde nicht aufgelöst.

Laborjournalnr.: DB5_79

1-(2-Cycloheptyl-5-oxo-1,2-dihydropyrazol-3-ylamino)-2-propen-1-on AB9

100 mg (0.5 mmol, 1 Äq) **F4** wurden mit 150 mg (1.1 mmol, 2.2 Äq) HOBt in 10 mL Pyridin gelöst. Nach Zugabe von 226 mg (1.1 mmol, 2.2 Äq.) DCC wurden 75 μ L (1.1 mmol, 2.2 Äq) Acrylsäure hinzugegeben und die Lösung über Nacht gerührt. Das Reaktionsgemisch wurde in *n*-Hexan gestürzt und der entstandene Niederschlag abfiltriert, getrocknet und in Ethanol aufgenommen. Nach Zugabe von 1 mL 1 M NaOH-Lösung wurde die Lösung drei Stunden gerührt und anschließend am Rotationsverdampfer eingengt. Flash-Chromatographie (DCM:MeOH, 100:0 \rightarrow 90:10) lieferte 1-(2-Cycloheptyl-5-oxo-1,2-dihydropyrazol-3-ylamino)-2-propen-1-on als farblosen Feststoff.



Ausbeute: 25 mg (25 %)

ESI-HRMS (m/z): $[M+H]^+$ berechnet für $C_{13}H_{20}N_3O_2^+$: 250.1550 Da; gefunden: 250.1555 Da

1H -NMR (500 MHz, DMSO- d_6): δ [ppm] = 10.45 (s, NNHCO, 1H), 9.68 (s, NCNHCO, 1H), 7.88 (dd, $^3J_{H-H}$ = 24.9, 8.6 Hz, NHCOCHCH₂, 1H), 5.59 (d, $^3J_{H-H}$ = 8.1 Hz, NHCOCHCH₂, 1H), 5.28 (s, NNHCOCH, 1H), 4.74 (t, $^3J_{H-H}$ = 6.3 Hz, NHCOCHCH₂, 1H), 4.17 (tt, $^3J_{H-H}$ = 9.3, 4.9 Hz, CH(CH₂)₂, 1H), 1.81 – 1.70 (m, Cycloheptyl-CH₂, 4H), 1.72 – 1.59 (m, Cycloheptyl-CH₂, 2H), 1.61 – 1.55 (m, Cycloheptyl-CH₂, 4H), 1.54 – 1.37 (m, Cycloheptyl-CH₂, 2H).

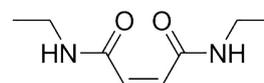
^{13}C -NMR (125 MHz, DMSO- d_6): δ [ppm] = 170.8, 162.9, 154.9, 124.9, 114.6, 83.2, 56.3, 33.7 (2), 27.7 (2), 24.1 (2).

Smp.: 230 °C

Laborjournalnr.: DB5_61

 N^1,N^4 -Diethylmaleamid AB12

421 mg (2.5 mmol, 1 Äq) *N*-Ethylmaleinsäure wurden mit 1.7 mL Diisopropylethylamin (10 mmol, 4 Äq) in 10 mL DMF vorgelegt. 205 mg Ethylamin Hydrochlorid (2.5 mmol, 1 Äq) und 1,425 g HATU (3.75 mmol, 1.5 Äq) wurden hinzugefügt und die Lösung vier Stunden



gerührt. Anschließend wurde mit Ethylacetat verdünnt, sechs mal mit 5 %iger K_2CO_3 -Lösung (w/v) gewaschen, die organische Phase mit Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel entfernt. Flash-Chromatographie (DCM:MeOH, 95:5) des Rückstands lieferte N^1,N^4 -Diethylmaleamid als farbloses Öl.

Ausbeute: 110 mg (25 %)

1H -NMR (400 MHz, DMSO- d_6): δ [ppm] = 9.18 (s, NH, 2H), 6.08 (s, CHCONH, 2H), 3.13 (q, $^3J_{H-H} = 7.3$ Hz, NHCH $_2$ CH $_3$, 4H), 1.05 (t, $^3J_{H-H} = 7.3$ Hz, NHCH $_2$ CH $_3$, 6H).

^{13}C -NMR (100 MHz, DMSO- d_6): δ [ppm] = 164.4 (2), 131.8 (2), 33.6 (2), 14.4 (2).

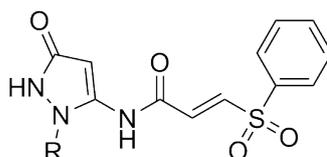
Laborjournalnr.: DB6_16

10.5.5. Vinylsulfone

2-Alkyl-substituierte Vinylsulfone VS1 & VS2

Generelle Synthesevorschrift:

Ein Äquivalent 5-Amino-1-Alkyl-1,2-dihydropyrazol-3-on wurde in Pyridin (20 mL pro mmol Edukt) gelöst und zwei Äquivalente DCC und zwei Äquivalente (*E*)-3-



R = - Cycloheptyl
- Isopropyl

(Phenylsulfonyl)acrylsäure (hergestellt nach^[150]) wurden nacheinander zugefügt. Die Lösung wurde über Nacht gerührt, filtriert und zu 1.1 Äquivalenten Natriumhydroxid gegeben. Nach zwei Stunden Rühren wurde die Lösung filtriert, mit Toluol koevaporiert und mittels HPLC gereinigt, was (*E*)-1-(2-Alkyl-5-oxo-1,2-dihydropyrazol-3-ylamino)-3-phenylsulfonyl-2-propen-1-on als gelben Feststoff lieferte.

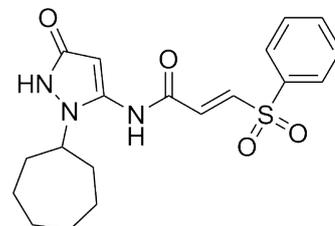
(E)-1-(2-Cycloheptyl-5-oxo-1,2-dihydropyrazol-3-ylamino)-3-(phenylsulfonyl)-2-propen-1-on VS1**Ausbeute:** 20 mg (10 %)**ESI-HRMS** (*m/z*): [M+Na]⁺ berechnet für C₁₉H₂₃N₃NaO₄S⁺: 412.1301 Da; gefunden: 412.1292 Da

¹H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ [ppm] = 10.52 (s, NCNHCO, 1H), 9.66 (s, NNHCO, 1H), 8.02 – 7.93 (m, PhenylH, 2H), 7.84 – 7.76 (m, PhenylH, 1H), 7.72 (m, PhenylH, 2H), 7.68 (d, ³J_{H-H} = 15.0 Hz, NHCOCHCHSO₂Ph, 1H), 7.34 (d, ³J_{H-H} = 15.0 Hz, NHCOCHCHSO₂Ph, 1H), 5.60 (s, NNHCOCH, 1H), 4.25 (tt, ³J_{H-H} = 8.7, 5.5 Hz, NCH(CH₂)₂, 1H), 1.81 (m, Cycloheptyl-CH₂, 4H), 1.77 - 1.64 (m, Cycloheptyl-CH₂, 2H), 1.66 - 1.56 (m, Cycloheptyl-CH₂, 2H), 1.54 – 1.38 (m, Cycloheptyl-CH₂, 4H).

¹³C-NMR (125 MHz, DMSO-*d*₆): δ [ppm] = 159.4, 159.3, 140.1, 138.7, 134.5 (2), 134.2 (2), 133.9, 129.9, 127.8, 83.6, 56.5, 34.3 (2), 27.9 (2), 23.9 (2).

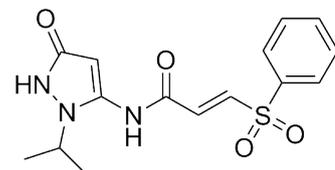
Smp.: Zers. > 250 °C

Laborjournalnr.: DB5_60

**(E)-1-(2-Isopropyl-5-oxo-1,2-dihydropyrazol-3-ylamino)-3-(phenylsulfonyl)-2-propen-1-on VS2****Ausbeute:** 115 mg (35 %)**ESI-HRMS** (*m/z*): [M+H]⁺ berechnet für C₁₅H₁₈N₃O₄S⁺: 336.1013 Da; gefunden: 336.1014 Da

¹H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ [ppm] = 10.82 (s, NCNHCO, 1H), 10.56 (s, NNHCO, 1H), 7.89 (m, J_{H-H} = 10.8, 8.5, 1.3 Hz, PhenylH, 2H), 7.84 – 7.75 (m, PhenylH, 1H), 7.70 (d, ³J_{H-H} = 15.1 Hz, NHCOCHCHSO₂Ph, 1H), 7.59 – 7.52 (m, PhenylH, 2H), 6.71 (d, ³J_{H-H} = 15.1 Hz, NHCOCHCHSO₂Ph, 1H), 4.58 (m, NCH(CH₃)₂, 1H), 1.22 (d, ³J_{H-H} = 6.6 Hz, Isopropyl-CH₃, 6H).

¹³C-NMR (125 MHz, DMSO-*d*₆): δ [ppm] = 164.5, 142.2, 138.4, 134.5, 132.5, 129.8, 128.9, 127.9, 127.8, 124.4, 123.4, 85.9, 48.5, 19.68 (2).

Smp.: 110 °C

Laborjournalnr.: DB6_24

Literaturverzeichnis

- [1] N. D. Rawlings, A. J. Barrett, *Biochem. J.* **1993**, 290(Pt 1), 205–218.
- [2] T. Schwann, *Archiv f. Anatomie. Physiol. u. wiss. Medicin* **1836**, 90–138.
- [3] B. Turk, *Nat. Rev. Drug Discov.* **2006**, 5(9), 785–799.
- [4] E. W. Davie, K. Fujikawa, K. Kurachi, W. Kisiel, „The Role of Serine Proteases in the Blood Coagulation Cascade“ in *Advances in enzymology and related areas of molecular biology, Bd. 48 von Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.* (Hrsg.: A. Meister), Wiley, New York, **1979**, S. 277–318.
- [5] P. N. Walsh, S. S. Ahmad, *Essays Biochem.* **2002**, 38, 95–111.
- [6] F. Safavi, A. Rostami, *Exp. Mol. Pathol.* **2012**, 93(3), 428–433.
- [7] M. I. Barnhart, C. Quintana, H. L. Lenon, G. B. Bluhm, J. M. Riddle, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1968**, 146(2 Chemistry, Ph), 527–539.
- [8] M. H. Beltrame, A. B. W. Boldt, S. J. Catarino, H. C. Mendes, S. E. Boschmann, I. Goeldner, I. Messias-Reason, *Mol. Immunol.* **2015**, 67(1), 85–100.
- [9] A. Rahman, M. Iqbal Choudhary, *Frontiers in Anti-Infective Drug Discovery*, Bentham Science Publishers, **2012**.
- [10] J. E. Koblinski, M. Ahram, B. F. Sloane, *Clin. Chim. Acta* **2000**, 291(2), 113–135.
- [11] S. Rakashanda, F. Rana, S. Rafiq, A. Masood, S. Amin, *Biotechnol. Mol. Biol. Rev.* **2012**, 7(4), 90–101.
- [12] W. P. Jencks, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1981**, 78(7), 4046–4050.

- [13] P. S. Farmer, E. J. Ariëns, *Trends Pharmacol. Sci.* **1982**, *3*, 362–365.
- [14] D. C. Rees, Miles Congreve, C. W. Murray, R. Carr, *Nat. Rev. Drug Discov.* **2004**, *3*(8), 660–672.
- [15] C. W. Murray, D. C. Rees, *Nat. Chem.* **2009**, *1*(3), 187–192.
- [16] I. D. Kuntz, K. Chen, K. A. Sharp, P. A. Kollman, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1999**, *96*(18), 9997–10002.
- [17] C. L. Verlinde, G. Rudenko, W. G. Hol, *J. Comput.-Aided Mol. Des.* **1992**, *6*(2), 131–147.
- [18] S. B. Shuker, P. J. Hajduk, R. P. Meadows, S. W. Fesik, *Science* **1996**, *274*(5292), 1531–1534.
- [19] M. Pellecchia, D. S. Sem, K. Wüthrich, *Nat. Rev. Drug Discov.* **2002**, *1*(3), 211–219.
- [20] S. Perspicace, D. Banner, J. Benz, F. Müller, D. Schlatter, W. Huber, *J. Biomol. Screen.* **2009**, *14*(4), 337–349.
- [21] J. K. Kranz, C. Schalk-Hihi, *Meth. Enzymol.* **2011**, *493*, 277–298.
- [22] P. Kuhn, K. Wilson, M. G. Patch, R. C. Stevens, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2002**, *6*(5), 704–710.
- [23] D. E. Scott, A. G. Coyne, S. A. Hudson, C. Abell, *Biochemistry* **2012**, *51*(25), 4990–5003.
- [24] C. A. Lipinski, F. Lombardo, B. W. Dominy, P. J. Feeney, *Adv. Drug Delivery Rev.* **1997**, *23*(1-3), 3–25.
- [25] M. Congreve, R. Carr, C. Murray, H. Jhoti, *Drug Discov. Today* **2003**, *8*(19), 876–877.
- [26] T. Fink, J.-L. Reymond, *J. Chem. Inf. Model.* **2007**, *47*(2), 342–353.
- [27] R. S. Bohacek, C. McMartin, W. C. Guida, *Med. Res. Rev.* **1996**, *16*(1), 3–50.
- [28] P. Ertl, *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* **2003**, *43*(2), 374–380.

- [29] J. Singh, R. C. Petter, T. A. Baillie, A. Whitty, *Nat. Rev. Drug Discov.* **2011**, *10*(4), 307–317.
- [30] R. Mah, J. R. Thomas, C. M. Shafer, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2014**, *24*(1), 33–39.
- [31] D. C. Swinney, *Nat. Rev. Drug Discov.* **2004**, *3*(9), 801–808.
- [32] R. A. Copeland, D. L. Pompliano, T. D. Meek, *Nat. Rev. Drug Discov.* **2006**, *5*(9), 730–739.
- [33] D. S. Johnson, E. Weerapana, B. F. Cravatt, *Future Med. Chem.* **2010**, *2*(6), 949–964.
- [34] S. Ohlson, *Drug Discov. Today* **2008**, *13*(9-10), 433–439.
- [35] J. Uetrecht, *Chem. Res. Toxicol.* **2008**, *21*(1), 84–92.
- [36] S. N. Lavergne, B. K. Park, D. J. Naisbitt, *Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol.* **2008**, *8*(4), 299–307.
- [37] J. Uetrecht, *Chem. Res. Toxicol.* **2009**, *22*(1), 24–34.
- [38] N. Minkovsky, A. Berezov, *Curr. Opin. Investig. Drugs* **2008**, *9*(12), 1336–1346.
- [39] L. V. Sequist, J.-C. Soria, J. W. Goldman, H. A. Wakelee, S. M. Gadgeel, A. Varga, V. Papadimitrakopoulou, B. J. Solomon, G. R. Oxnard, R. Dziadziuszko, D. L. Aisner, R. C. Doebele, C. Galasso, E. B. Garon, R. S. Heist, J. Logan, J. W. Neal, M. A. Mendenhall, S. Nichols, Z. Piotrowska, A. J. Wozniak, M. Raponi, C. A. Karlovich, S. Jaw-Tsai, J. Isaacson, D. Despain, S. L. Matheny, L. Rolfe, A. R. Allen, D. R. Camidge, *New Engl. J. Med.* **2015**, *372*(18), 1700–1709.
- [40] C. Lin, A. Kwong, R. Perni, *Infect. Disord.: Drug Targets* **2006**, *6*(1), 3–16.
- [41] F. G. Njoroge, K. X. Chen, N.-Y. Shih, J. J. Piwinski, *Acc. Chem. Res.* **2008**, *41*(1), 50–59.
- [42] R. Macarron, M. N. Banks, D. Bojanic, D. J. Burns, D. A. Cirovic, T. Garyantes, D. V. S. Green, R. P. Hertzberg, W. P. Janzen, J. W. Paslay, U. Schopfer, G. S. Sittampalam, *Nat. Rev. Drug Discov.* **2011**, *10*(3), 188–195.

- [43] U. Rix, G. Superti-Furga, *Nat. Chem. Biol.* **2009**, 5(9), 616–624.
- [44] B. F. Cravatt, A. T. Wright, J. W. Kozarich, *Annu. Rev. Biochem.* **2008**, 77, 383–414.
- [45] Y. Liu, M. P. Patricelli, B. F. Cravatt, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1999**, 96(26), 14694–14699.
- [46] A. E. Speers, G. C. Adam, B. F. Cravatt, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, 125(16), 4686–4687.
- [47] D. K. Nomura, J. Z. Long, S. Niessen, H. S. Hoover, S.-W. Ng, B. F. Cravatt, *Cell* **2010**, 140(1), 49–61.
- [48] N. Jessani, M. Humphrey, W. H. McDonald, S. Niessen, K. Masuda, B. Gangadharan, J. R. Yates, B. M. Mueller, B. F. Cravatt, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2004**, 101(38), 13756–13761.
- [49] J. W. Chang, R. E. Moellering, B. F. Cravatt, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, 51(4), 966–970.
- [50] L. E. Edgington, A. B. Berger, G. Blum, V. E. Albrow, M. G. Paulick, N. Lineberry, M. Bogyo, *Nat. Med.* **2009**, 15(8), 967–973.
- [51] D. A. Bachovchin, S. J. Brown, H. Rosen, B. F. Cravatt, *Nat. Biotechnol.* **2009**, 27(4), 387–394.
- [52] G. C. Adam, J. Burbaum, J. W. Kozarich, M. P. Patricelli, B. F. Cravatt, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, 126(5), 1363–1368.
- [53] D. Leung, C. Hardouin, D. L. Boger, B. F. Cravatt, *Nat. Biotechnol.* **2003**, 21(6), 687–691.
- [54] W. Li, J. L. Blankman, B. F. Cravatt, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, 129(31), 9594–9595.
- [55] J.-P. Falgueyret, W. C. Black, W. Cromlish, S. Desmarais, S. Lamontagne, C. Mellon, D. Riendeau, S. Rodan, P. Tawa, G. Wesolowski, K. E. Bass, S. Venkatraman, M. D. Percival, *Anal. Biochem.* **2004**, 335(2), 218–227.

- [56] M. P. Patricelli, D. K. Giang, L. M. Stamp, J. Burbaum, *Proteomics* **2001**, *1*(9), 1067–1071.
- [57] L. E. Sanman, M. Bogyo, *Annu. Rev. Biochem.* **2014**, *83*, 249–273.
- [58] S. J. Rowan, S. J. Cantrill, G. R. L. Cousins, J. K. M. Sanders, J. F. Stoddart, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*(6), 898–952.
- [59] O. Ramström, J.-M. Lehn, *Nat. Rev. Drug Discov.* **2002**, *1*(1), 26–36.
- [60] M. F. Schmidt, A. Isidro-Llobet, M. Lisurek, A. El-Dahshan, J. Tan, R. Hilgenfeld, J. Rademann, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*(17), 3275–3278.
- [61] M. F. Schmidt, A. El-Dahshan, S. Keller, J. Rademann, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*(34), 6346–6349.
- [62] L. Gould, E. Fikrig, *J. Clin. Invest.* **2004**, *113*(8), 1102–1107.
- [63] M. Suthar, M. Diamond, M. Gale, *Nat. Rev. Microbiol.* **2013**, *11*(2), 115–128.
- [64] M. Brinton, *Annu. Rev. Microbiol.* **2002**, *56*, 371–402.
- [65] W. M. Chung, C. M. Buseman, S. N. Joyner, S. M. Hughes, T. B. Fomby, J. P. Luby, R. W. Haley, *JAMA, J. Am. Med. Assoc.* **2013**, *310*(3), 297–307.
- [66] J. M. Vyas, R. G. González, V. M. Pierce, *N. Engl. J. Med.* **2013**, *368*(20), 1919–1927.
- [67] L. Petersen, *Ann. Intern. Med.* **2002**, *137*(3), 173.
- [68] J. Bazan, R. Fletterick, *Virology* **1989**, *171*(2), 637–639.
- [69] B. Falgout, M. Pethel, Y. M. Zhang, C. J. Lai, *J. Virol.* **1991**, *65*(5), 2467–2475.
- [70] T. J. Chambers, R. C. Weir, A. Grakoui, D. W. McCourt, J. F. Bazan, R. J. Fletterick, C. M. Rice, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1990**, *87*(22), 8898–8902.
- [71] M. Z. Hammamy, C. Haase, M. Hammami, R. Hilgenfeld, T. Steinmetzer, *Chem-MedChem* **2013**, *8*(2), 173.

- [72] G. Robin, K. Chappell, M. J. Stoermer, S.-H. Hu, P. R. Young, D. P. Fairlie, J. L. Martin, *J. Mol. Biol.* **2009**, 385(5), 1568–1577.
- [73] J. J. Perona, C. S. Craik, *Protein Sci.* **1995**, 4(3), 337–360.
- [74] T. Nall, K. Chappell, M. Stoermer, N. Fang, J. Tyndall, P. Young, D. Fairlie, *J. Biol. Chem.* **2004**, 279(47), 48535–48542.
- [75] S. Chanprapaph, P. Saparpakorn, C. Sangma, P. Niyomrattanakit, S. Hannongbua, C. Angsuthanasombat, G. Katzenmeier, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2005**, 330(4), 1237–1246.
- [76] D. Leung, K. Schroder, H. White, N. X. Fang, M. J. Stoermer, G. Abbenante, J. L. Martin, P. R. Young, D. P. Fairlie, *J. Biol. Chem.* **2001**, 276(49), 45762–45771.
- [77] D. S. Matteson, *Med. Res. Rev.* **2008**, 28(2), 233–246.
- [78] B. Imperiali, R. H. Abeles, *Biochemistry* **1986**, 25(13), 3760–3767.
- [79] R. M. McConnell, G. E. Barnes, C. F. Hoyng, J. M. Gunn, *J. Med. Chem.* **1990**, 33(1), 86–93.
- [80] Z. Yin, S. Patel, W. Wang, G. Wang, W. Chan, K. Rao, J. Alam, D. Jeyaraj, X. Ngew, V. Patel, D. Beer, S. Lim, S. Vasudevan, T. Keller, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2006**, 16(1), 36–39.
- [81] B. N. Fields, *Fields Virology*, Raven Press, New York, NY, **1985**.
- [82] G. L. Repass, W. C. Palmer, F. F. Stancampiano, *Cleve. Clin. J. Med.* **2014**, 81(9), 537–543.
- [83] H. W. Kiehl, *Kompendium Infektiologie & Infektionsschutz*, 14. Aufl., Hoffmann, Berlin, **2009**.
- [84] E. S. Lee, W. G. Lee, S.-H. Yun, S. H. Rho, I. Im, S. T. Yang, S. Sellamuthu, Y. J. Lee, S. J. Kwon, O. K. Park, E.-S. Jeon, W. J. Park, Y.-C. Kim, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2007**, 358(1), 7–11.
- [85] Q. May Wang, S.-H. Chen, *Curr. Protein Pept. Sci.* **2007**, 8(1), 19–27.

- [86] D. Matthews, W. Smith, R. Ferre, B. Condon, G. Budahazi, W. Slsson, J. Villafranca, C. Janson, H. McElroy, C. Gribskov, S. Worland, *Cell* **1994**, 77(5), 761–771.
- [87] L. E. Leong, P. A. Walker, A. G. Porter, *J. Biol. Chem.* **1993**, 268(34), 25735–25739.
- [88] C.-C. Lee, C.-J. Kuo, T.-P. Ko, M.-F. Hsu, Y.-C. Tsui, S.-C. Chang, S. Yang, S.-J. Chen, H.-C. Chen, M.-C. Hsu, S.-R. Shih, P.-H. Liang, A. H.-J. Wang, *J. Biol. Chem.* **2009**, 284(12), 7646–7655.
- [89] Z. Sárkány, L. Polgár, *Biochemistry* **2003**, 42(2), 516–522.
- [90] K. Cheah, L. Leong, A. Porter, *J. Biol. Chem.* **1990**, 265(13), 7180–7187.
- [91] J. C. Powers, J. L. Asgian, Ö. D. Ekici, K. E. James, *Chem. Rev.* **2002**, 102(12), 4639–4750.
- [92] R. G. Pearson, *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, 85(22), 3533–3539.
- [93] B. Saville, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1967**, 6(11), 928–939.
- [94] A. J. Barrett, A. A. Kembhavi, M. A. Brown, H. Kirschke, C. G. Knight, M. Tamai, K. Hanada, *Biochem. J.* **1982**, 201(1), 189–198.
- [95] D. Greenbaum, K. F. Medzihradzky, A. Burlingame, M. Bogyo, *Chemistry & Biology* **2000**, 7(8), 569–581.
- [96] S. H. Verhelst, M. Bogyo, *ChemBioChem* **2005**, 6(5), 824–827.
- [97] F. Uhlmann, D. Wernic, M.-A. Poupart, E. V. Koonin, K. Nasmyth, *Cell* **2000**, 103(3), 375–386.
- [98] A. K. Patick, S. L. Binford, M. A. Brothers, R. L. Jackson, C. E. Ford, M. D. Diem, F. Maldonado, P. S. Dragovich, R. Zhou, T. J. Prins, S. A. Fuhrman, J. W. Meador, L. S. Zalman, D. A. Matthews, S. T. Worland, *Antimicrob. Agents Chemother.* **1999**, 43(10), 2444–2450.
- [99] S. E. Webber, K. Okano, T. L. Little, S. H. Reich, Y. Xin, S. A. Fuhrman, D. A. Matthews, R. A. Love, T. F. Hendrickson, A. K. Patick, J. W. r. Meador, R. A. Ferre, E. L. Brown, C. E. Ford, S. L. Binford, S. T. Worland, *J. Med. Chem.* **1998**, 41(15), 2786–2805.

- [100] H. L. Sham, W. Rosenbrook, W. Kati, D. A. Betebenner, N. E. Wideburg, A. Saldivar, J. J. Plattner, D. W. Norbeck, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1995**, (9), 1081.
- [101] S.-H. Chen, J. Lamar, F. Victor, N. Snyder, R. Johnson, B. A. Heinz, M. Wakulchik, Q. Wang, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2003**, 13(20), 3531–3536.
- [102] S. Liu, R. P. Hanzlik, *J. Med. Chem.* **1992**, 35(6), 1067–1075.
- [103] K. J. Chappell, M. J. Stoermer, D. P. Fairlie, P. R. Young, *Curr. Med. Chem.* **2008**, (15), 2771–2784.
- [104] M. Lisurek, B. Rupp, J. Wichard, M. Neuenschwander, J. P. v. Kries, R. Frank, J. Rademann, R. Kuhne, *Mol Divers.* **2010**, 14(2), 401–408.
- [105] O. Vosyka, K. R. Vinothkumar, E. V. Wolf, A. J. Brouwer, R. M. Liskamp, S. H. Verhelst, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2013**, 110(7), 2472–2477.
- [106] A. S. Abuelyaman, D. Hudig, S. L. Woodard, J. C. Powers, *Bioconjugate Chem.* **1994**, 5(5), 400–405.
- [107] G. Schoellmann, E. Shaw, *Biochemistry* **1963**, 2(2), 252–255.
- [108] J. S. Bond, P. E. Butler, *Annu. Rev. Biochem.* **1987**, 56, 333–364.
- [109] N. A. Thornberry, E. P. Peterson, J. J. Zhao, A. D. Howard, P. R. Griffin, K. T. Chapman, *Biochemistry* **1994**, 33(13), 3934–3940.
- [110] K. B. Sexton, D. Kato, A. B. Berger, M. Fonovic, S. H. Verhelst, M. Bogyo, *Cell Death Differ.* **2007**, 14(4), 727–732.
- [111] J. C. Williams, R. C. Falcone, M. L. Do, D. D. Lindstrom, B. B. Howe, *Pharmacology* **1991**, 43(4), 199–209.
- [112] C. Mattos, B. Rasmussen, X. Ding, G. A. Petsko, D. Ringe, *Nat. Struct. Mol. Biol.* **1994**, 1(1), 55–58.
- [113] C. Mattos, D. Ringe, *Nat. Biotechnol.* **1996**, 14(5), 595.
- [114] D. Kidd, Y. Liu, B. F. Cravatt, *Biochemistry* **2001**, 40(13), 4005–4015.

- [115] E. Shaw, „Cysteinyln Proteinases and Their Selective Inactivation“ in *Advances in Enzymology and Related Areas of Molecular Biology* (Hrsg.: A. Meister), John Wiley & Sons, Inc, Hoboken, NJ, USA, **1990**, S. 271–347.
- [116] A. Meister, *Advances in Enzymology and Related Areas of Molecular Biology*, John Wiley & Sons, Inc, Hoboken, NJ, USA, **1990**.
- [117] K. Hanada, M. Tamai, M. Yamagishi, S. Ohmura, J. Sawada, I. Tanaka, *Agric. Biol. Chem.* **1978**, 42(3), 523–528.
- [118] C. Lacroix, S. George, P. Leyssen, R. Hilgenfeld, J. Neyts, *Antimicrob. Agents Chemother.* **2015**, 59(9), 5814–5818.
- [119] R. V. J. Chari, J. W. Kozarich, *J. Org. Chem.* **1982**, 47(12), 2355–2358.
- [120] E. Benzing, *Angew. Chem.* **1959**, 71(15-16), 521.
- [121] K. Ditgens, W. Krämer, H.-L. Elbe, „Keto-aldehyde derivatives and process for their preparation.“, **1983**, DE3224130 (A1), Bayer AG.
- [122] M. Marigo, J. Franzén, T. B. Poulsen, W. Zhuang, K. A. Jørgensen, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, 127(19), 6964–6965.
- [123] K. I. Varughese, F. R. Ahmed, P. R. Carey, S. Hasnain, C. P. Huber, A. C. Storer, *Biochemistry* **1989**, 28(3), 1330–1332.
- [124] S. Weisheit, Diplomarbeit, Universität Leipzig, **2012**.
- [125] P. A. Johnston, J. Phillips, T. Y. Shun, S. Shinde, J. S. Lazo, D. M. Huryn, M. C. Myers, B. I. Ratnikov, J. W. Smith, Y. Su, R. Dahl, N. Cosford, S. A. Shiryaev, A. Y. Strongin, *Assay Drug Dev. Technol.* **2007**, 5(6), 737–750.
- [126] P. Dostert, „3-Cyano-N-(N,N-dimethylaminopropyl)-iminodibenzyl and salts thereof“, **1979**, US 4.138.482 A1, Hoffmann-La Roche Inc.
- [127] K. Miyashita, J. Okunishi, R. Utsumi, T. Komano, T. Tamura, N. Satoh, *Biosci., Biotechnol., Biochem.* **1996**, 60(4), 705–707.

- [128] L. Costenaro, Z. Kaczmarska, C. Arnan, R. Janowski, B. Coutard, M. Sola, A. E. Gorbalenya, H. Norder, B. Canard, M. Coll, *J. Virol.* **2011**, 85(20), 10764–10773.
- [129] H. Finkelstein, *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1910**, 43(2), 1528–1532.
- [130] J. K. Addo, P. Teesdale-Spittle, J. O. Hoberg, *Synthesis* **2005**, 2005(12), 1923–1925.
- [131] J.-H. Suh, H.-S. Kang, J.-E. Kim, E.-K. Yum, *Bull. Korean Chem. Soc.* **2012**, 33(6), 2067–2070.
- [132] D. Masilamani, M. M. Rogic, *J. Org. Chem.* **1981**, 46(22), 4486–4489.
- [133] R. A. Copeland, *Evaluation of Enzyme Inhibitors in Drug Discovery*, John Wiley & Sons, Inc, Hoboken, NJ, USA, **2013**.
- [134] H. Bisswanger, *Enzymkinetik: [Theorie und Methoden]*, 3. Aufl., Wiley-Interscience, Hoboken, NJ, **2000**.
- [135] A. L. Gyulbudaghyyan, M. E. Hakopyan, R. S. Vartanyan, M. A. Sheyranyan, *Chem. J. Arm.* **2002**, (55), 58–62.
- [136] A. R. Katritzky, F. W. Maine, *Tetrahedron* **1964**, 20(2), 315–322.
- [137] M. A. Metwally, S. A. Bondock, S. I. El-Desouky, M. M. Abdou, *Int. J. Mod. Org. Chem.* **2012**, 1(1), 19–54.
- [138] Y. van Haverbeke, A. Maquestiau, J. J. Vanden Eynde, *J. Heterocycl. Chem.* **1979**, 16(4), 773–777.
- [139] W. Wang, S.-X. Wang, X.-Y. Qin, J.-T. Li, *Synth. Commun.* **2005**, 35(9), 1263–1269.
- [140] D. Binder, C. R. Noe, G. Habison, *Arch. Pharm. Pharm. Med. Chem.* **1979**, 312(10), 853–856.
- [141] Chemical Computing Group Inc., 1010 Sherbooke St. West, Suite #910. Montreal Canada, H3A 2R7, „Molecular Operating Environment (MOE), 2013.08“, **2016**.
- [142] C. A. Elliger, *Synth. Commun.* **2007**, 15(14), 1315–1324.

- [143] J. S. Drage, R. A. Earl, K. P. C. Vollhardt, *J. Heterocycl. Chem.* **1982**, 19(3), 701–702.
- [144] C. A. Lipinski, *Drug Discov. Today: Technol.* **2004**, 1(4), 337–341.
- [145] X. Zhang, Z. Song, B. Qin, X. Zhang, L. Chen, Y. Hu, Z. Yuan, *Antiviral Res.* **2013**, 97(3), 264–269.
- [146] M. Hesse, H. Meier, B. Zeeh, *Spektroskopische Methoden in der organischen Chemie: 102 Tabellen*, 7. Aufl., Thieme, Stuttgart, **2005**.
- [147] J. Clayden, *Organic chemistry*, Oxford University Press, Oxford, New York, **2001**.
- [148] D. P. Nair, M. Podgórski, S. Chatani, T. Gong, W. Xi, C. R. Fenoli, C. N. Bowman, *Chem. Mater.* **2014**, 26(1), 724–744.
- [149] J. W. Chan, C. E. Hoyle, A. B. Lowe, M. Bowman, *Macromolecules* **2010**, 43(15), 6381–6388.
- [150] Z.-H. Guan, W. Zuo, L.-B. Zhao, Z.-H. Ren, Y.-M. Liang, *Synthesis* **2007**, 2007(10), 1465–1470.
- [151] J. Bremner, M. Julia, M. Launay, J.-P. Stacino, *Tetrahedron Lett.* **1982**, 23(32), 3265–3266.
- [152] A. Colter, Miller, Jr., Ralph, *J. Org. Chem.* **1971**, 36(14), 1898–1903.
- [153] Dragovich, P. S. et al., *J. Med. Chem.* **1999**, 42(7), 1213–1224.
- [154] C. Ferrer-Orta, A. Arias, C. Escarmís, N. Verdaguer, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2006**, 16(1), 27–34.
- [155] van der Linden, Lonneke et al., *PLoS Pathog.* **2015**, 11(3).
- [156] B. Stynen, H. Tournu, J. Tavernier, P. van Dijck, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **2012**, 76(2), 331–382.
- [157] „EVA Portal: recombinant enterovirus D68 3C protease“, <http://www.european-virus-archive.com/protein/>

- recombinant-enterovirus-d68-3c-protease, zuletzt abgerufen am: 30.06.2016.
- [158] „EVA Portal: recombinant enterovirus A71 3C protease“, <http://www.european-virus-archive.com/protein/recombinant-enterovirus-a71-3c-protease>, zuletzt abgerufen am: 30.06.2016.
- [159] „EVA Portal: recombinant Rhinovirus 49 3C protease“, <http://www.european-virus-archive.com/protein/recombinant-rhinovirus-49-3c-protease>, zuletzt abgerufen am: 30.06.2016.
- [160] „EVA Portal: recombinant SMEDI A virus 3C protease“, <http://www.european-virus-archive.com/protein/recombinant-smedi-virus-3c-protease>, zuletzt abgerufen am: 30.06.2016.
- [161] „EVA Portal: recombinant Aichivirus 3C protease“, <http://www.european-virus-archive.com/protein/recombinant-aichivirus-3c-protease>, zuletzt abgerufen am: 30.06.2016.
- [162] „EVA Portal: recombinant Eq. rhinitis virus 3C protease“, <http://www.european-virus-archive.com/protein/recombinant-eq-rhinitis-virus-3c-protease>, zuletzt abgerufen am: 30.06.2016.
- [163] M. Mondal, A. K. H. Hirsch, *Chem. Soc. Rev.* **2015**, 44(8), 2455–2488.
- [164] M. F. Schmidt, J. Rademann, *Trends Biotechnol.* **2009**, 27(9), 512–521.
- [165] P. T. Corbett, J. Leclaire, L. Vial, K. R. West, J.-L. Wietor, J. K. M. Sanders, S. Otto, *Chem. Rev.* **2006**, 106(9), 3652–3711.
- [166] A. Herrmann, *Chem. Soc. Rev.* **2014**, 43(6), 1899–1933.
- [167] O. S. Miljanic, *Nat. Chem.* **2011**, 3(12), 909–910.
- [168] E. Burda, J. Rademann, *Nat. Commun.* **2014**, 5, 5170.

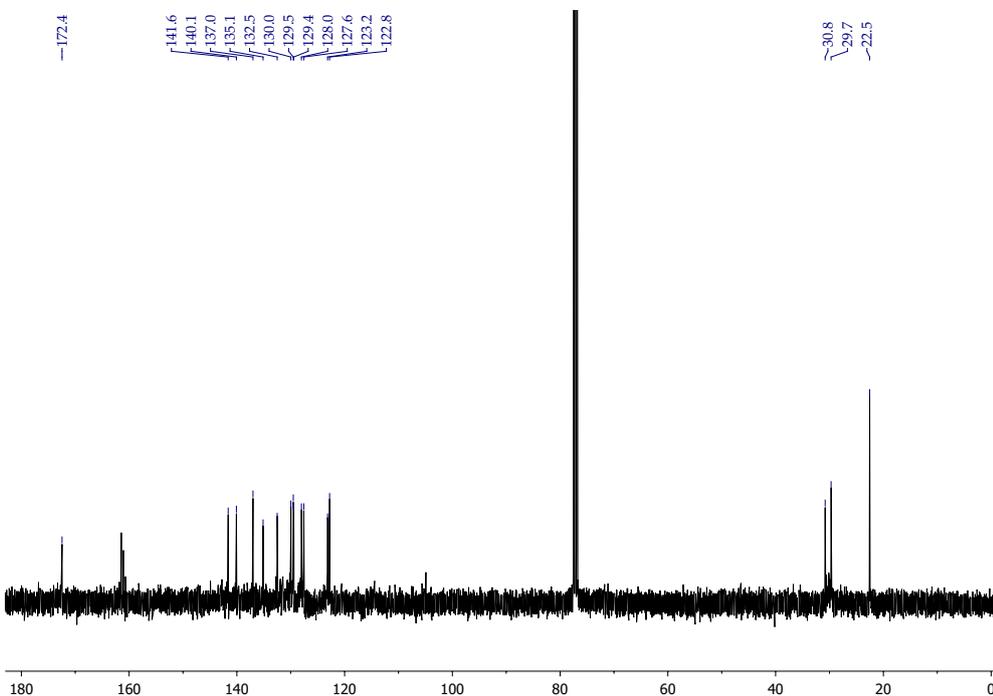
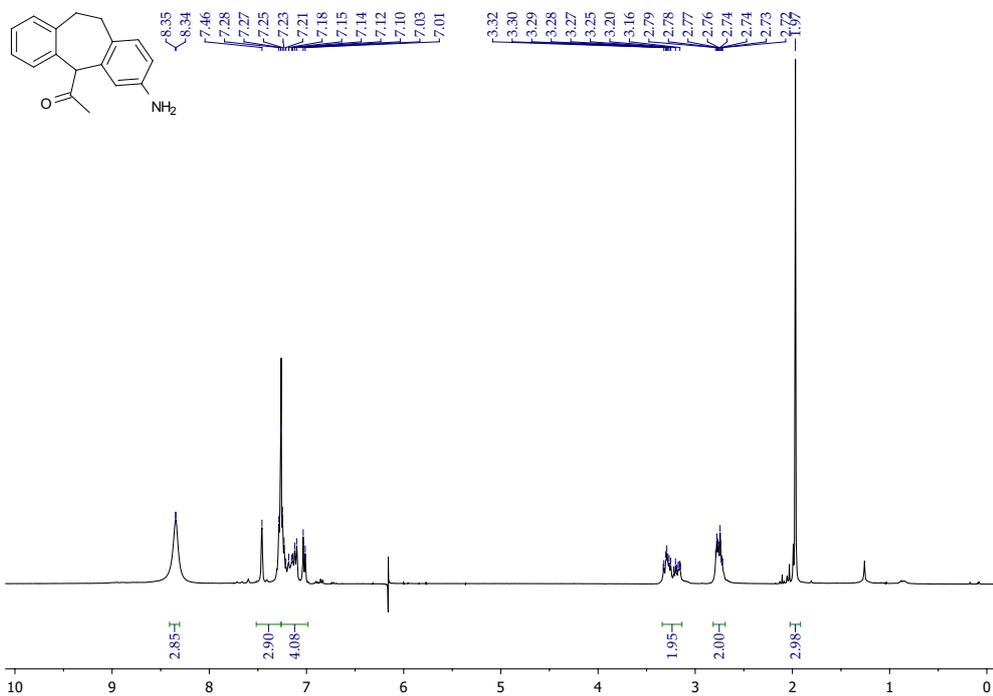
- [169] V. T. Bhat, A. M. Caniard, T. Luksch, R. Brenk, D. J. Campopiano, M. F. Greaney, *Nat. Chem.* **2010**, 2(6), 490–497.
- [170] X. Hu, J. Sun, H.-G. Wang, R. Manetsch, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, 130(42), 13820–13821.
- [171] D. A. Erlanson, A. C. Braisted, D. R. Raphael, M. Randal, R. M. Stroud, E. M. Gordon, J. A. Wells, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2000**, 97(17), 9367–9372.
- [172] E. Oueis, F. Nachon, C. Sabot, P.-Y. Renard, *Chem. Commun.* **2014**, 50(16), 2043–2045.
- [173] W. G. Lewis, L. G. Green, F. Grynszpan, Z. Radic, P. R. Carlier, P. Taylor, M. G. Finn, K. B. Sharpless, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, 41(6), 1053–1057.
- [174] A. Krasinski, Z. Radic, R. Manetsch, J. Raushel, P. Taylor, K. B. Sharpless, H. C. Kolb, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, 127(18), 6686–6692.
- [175] M. Whiting, J. Muldoon, Y.-C. Lin, S. M. Silverman, W. Lindstrom, A. J. Olson, H. C. Kolb, M. G. Finn, K. B. Sharpless, J. H. Elder, V. V. Fokin, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, 45, 1435–1439.
- [176] T. Suzuki, Y. Ota, Y. Kasuya, M. Mutsuga, Y. Kawamura, H. Tsumoto, H. Nakagawa, M. G. Finn, N. Miyata, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, 49(38), 6817–6820.
- [177] M. T. Cancilla, M. M. He, N. Viswanathan, R. L. Simmons, M. Taylor, A. D. Fung, K. Cao, D. A. Erlanson, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2008**, 18(14), 3978–3981.
- [178] U. Bacha, J. Barrila, S. B. Gabelli, Y. Kiso, L. Mario Amzel, E. Freire, *Chem. Bio. Drug Des.* **2008**, 72(1), 34–49.
- [179] S. G. Kathman, Z. Xu, A. V. Statsyuk, *J. Med. Chem.* **2014**, 57(11), 4969–4974.
- [180] J. Tan, S. George, Y. Kusov, M. Perbandt, S. Anemüller, J. R. Mesters, H. Norder, B. Coutard, C. Lacroix, P. Leyssen, J. Neyts, R. Hilgenfeld, *J. Virol.* **2013**, 87(8), 4339–4351.
- [181] E. Kaiser, R. L. Colescott, C. D. Bossinger, P. I. Cook, *Anal. Biochem.* **1970**, 34(2), 595–598.

- [182] D. T. Rijkers, H. P. Adams, H. C. Hemker, G. I. Tesser, *Tetrahedron* **1995**, *51*(41), 11235–11250.
- [183] C. Mottet, O. Hamelin, G. Garavel, J.-P. Deprés, A. E. Greene, *J. Org. Chem.* **1999**, *64*(4), 1380–1382.
- [184] G. Al-Hazmi, A. El-Asmy, *J. Coord. Chem.* **2009**, *62*(2), 337–345.
- [185] R. G. Dickinson, N. W. Jacobsen, *Aust. J. Chem.* **1975**, *28*(11), 2435.

A. Tabellen und Spektren

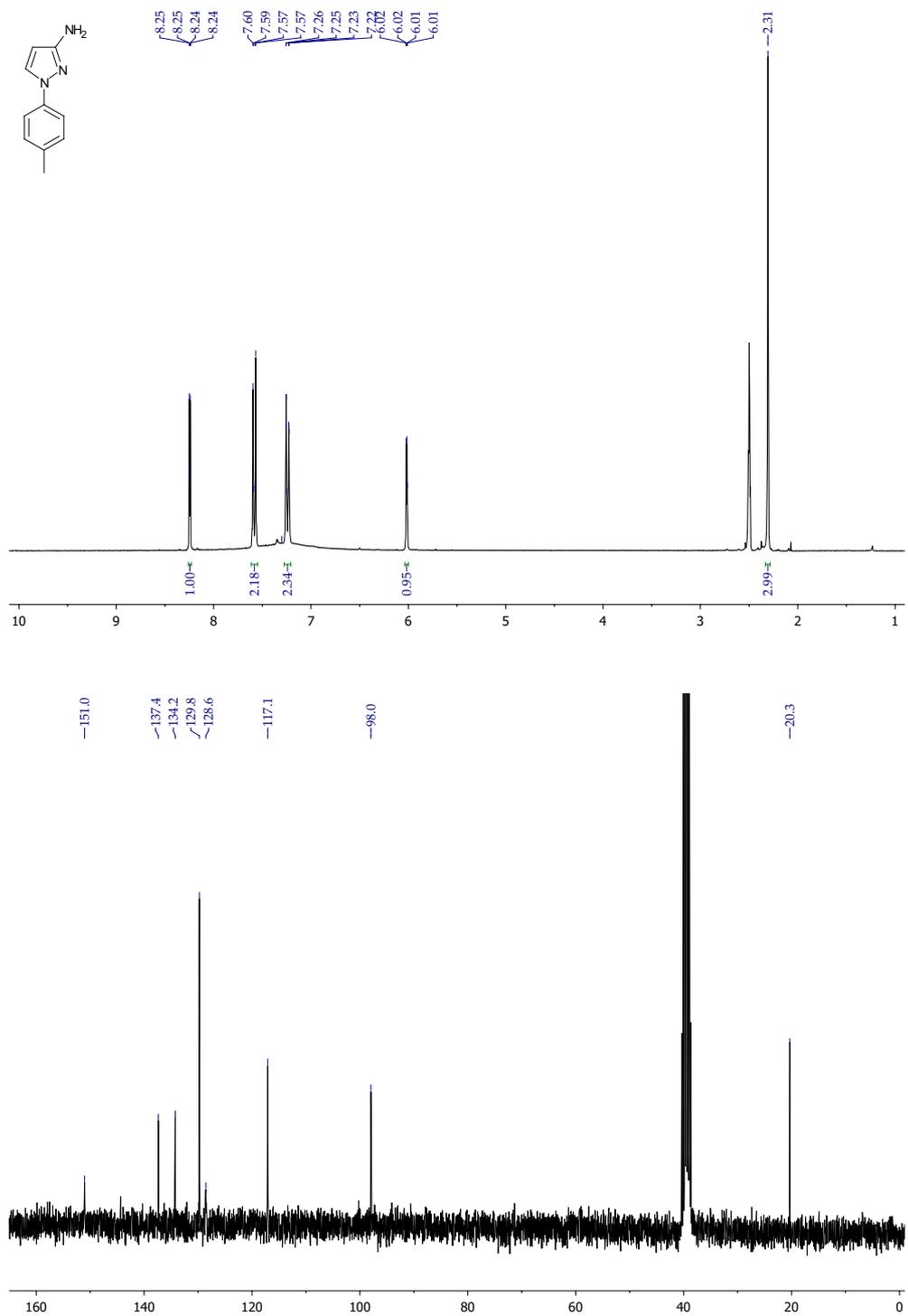
A.1. NMR-Spektren ausgewählter Verbindungen

F1



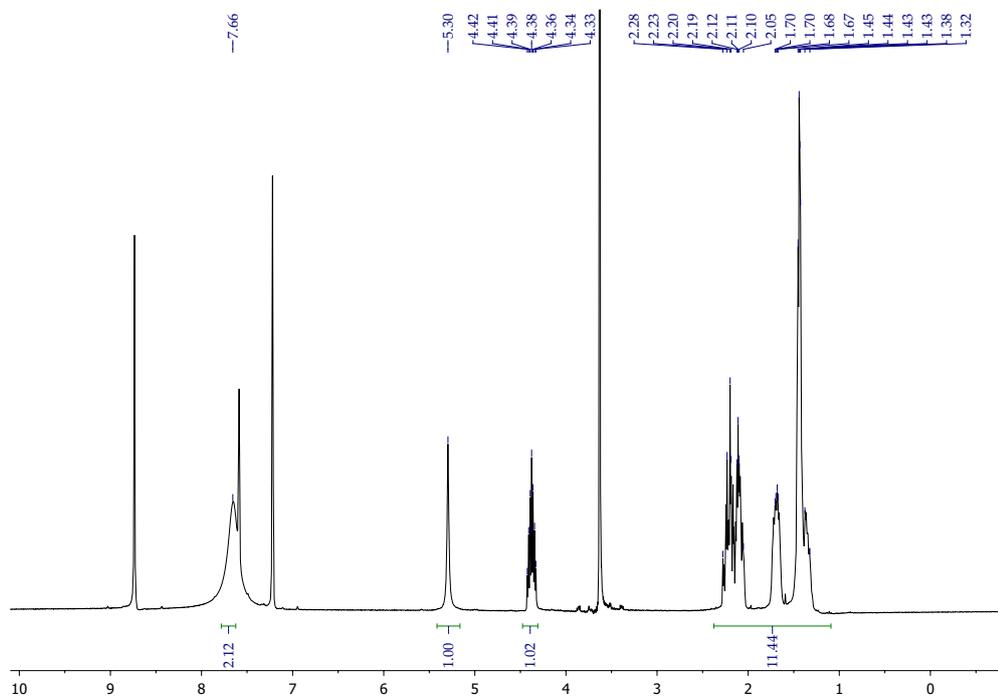
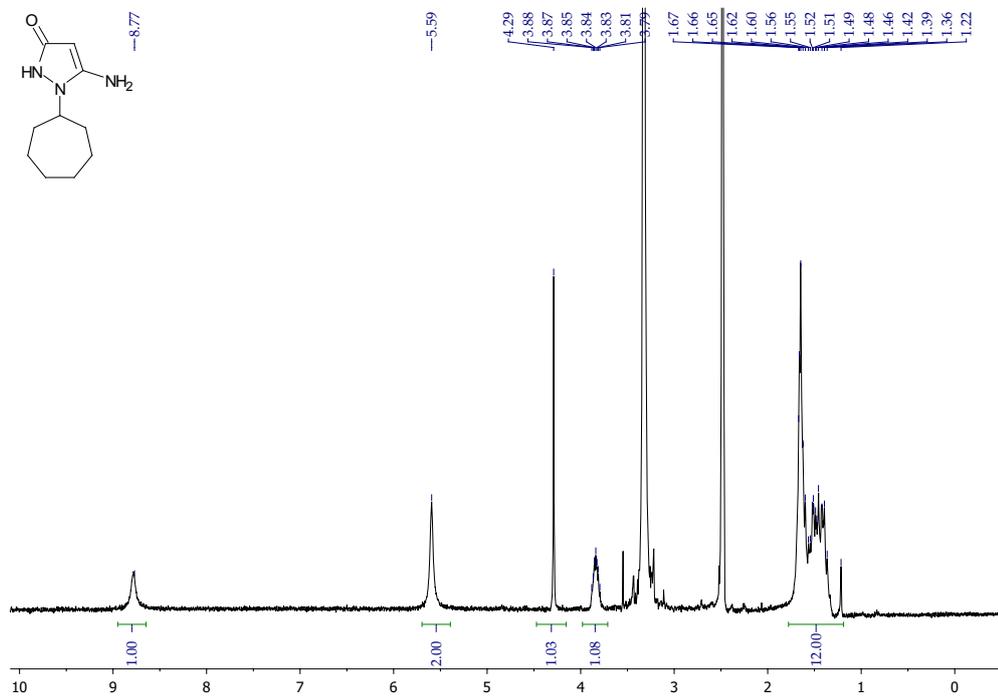
¹H-NMR-Spektrum (400 MHz, CDCl₃) und ¹³C-NMR-Spektrum (100 MHz, CDCl₃) von **F1**

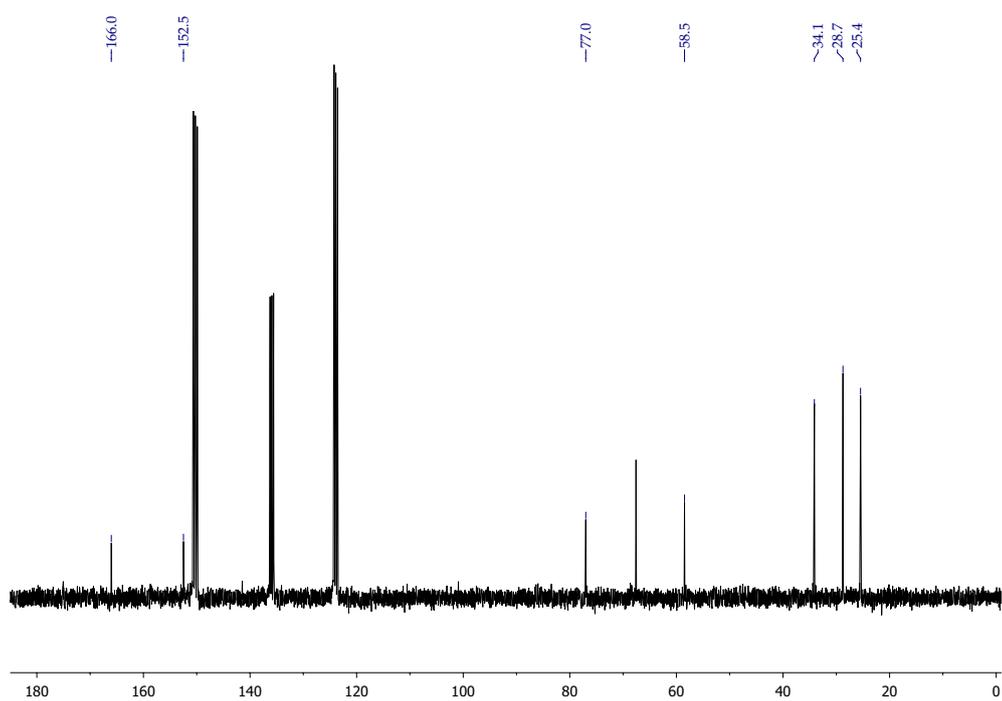
F3



¹H-NMR-Spektrum (300 MHz, DMSO-*d*₆) und ¹³C-NMR-Spektrum (75 MHz, DMSO-*d*₆) von F3

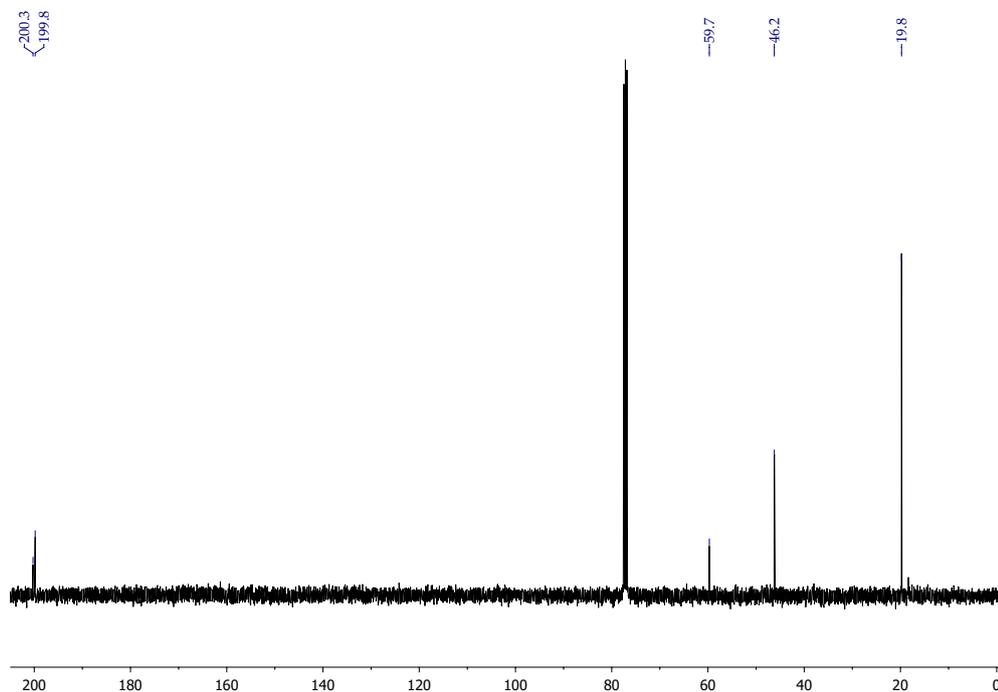
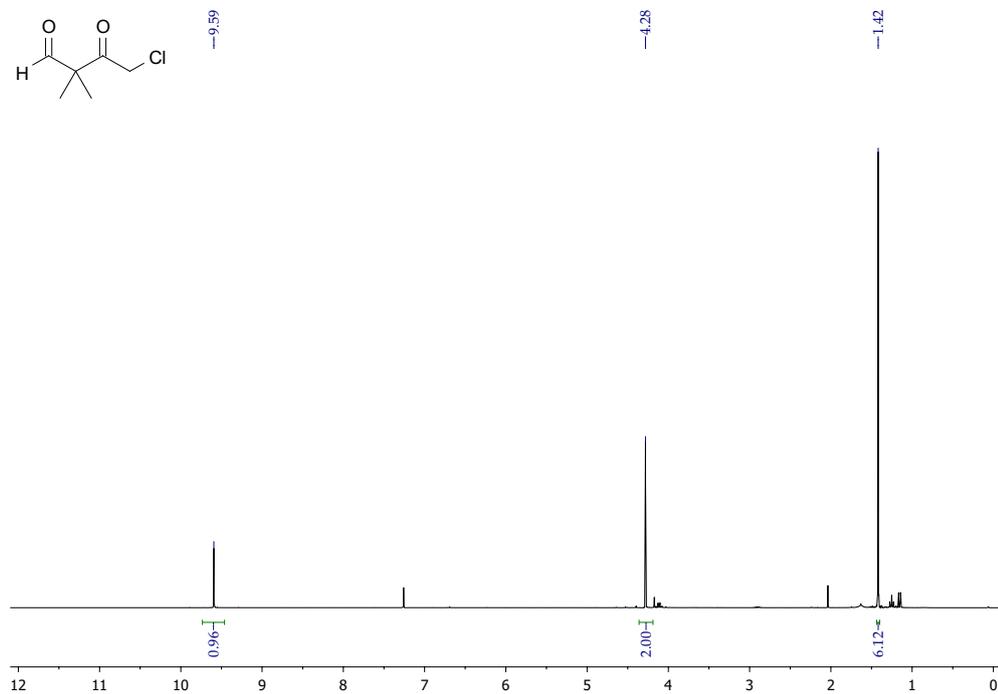
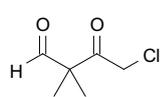
F4





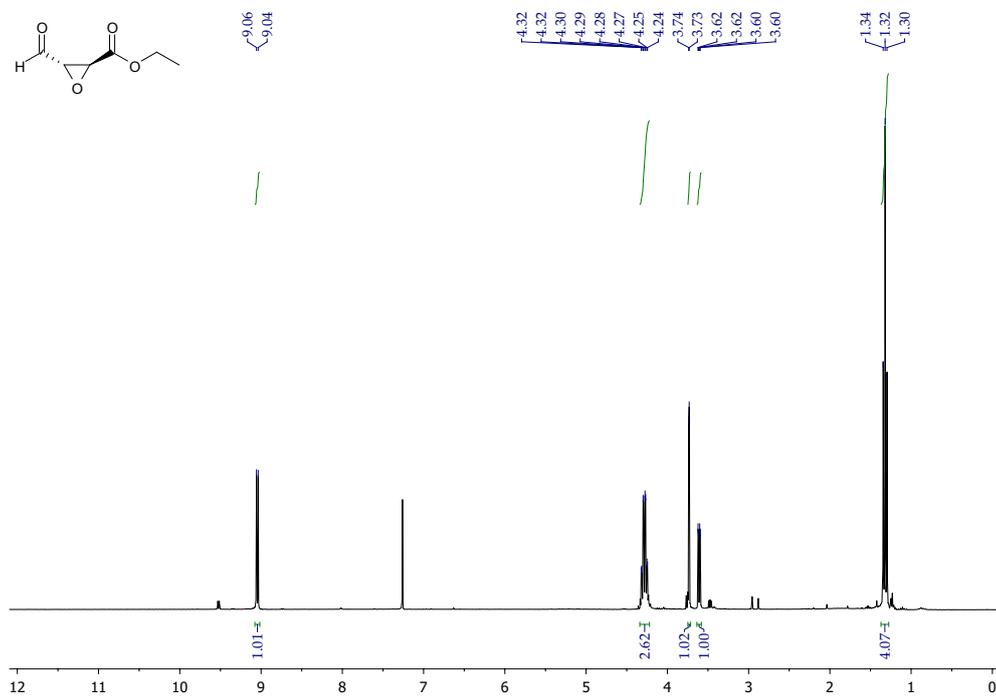
^1H -NMR-Spektrum (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$ und 300 MHz, Pyridin- d_5) und ^{13}C -NMR-Spektrum (75 MHz, Pyridin- d_5) von **F4**

AS1



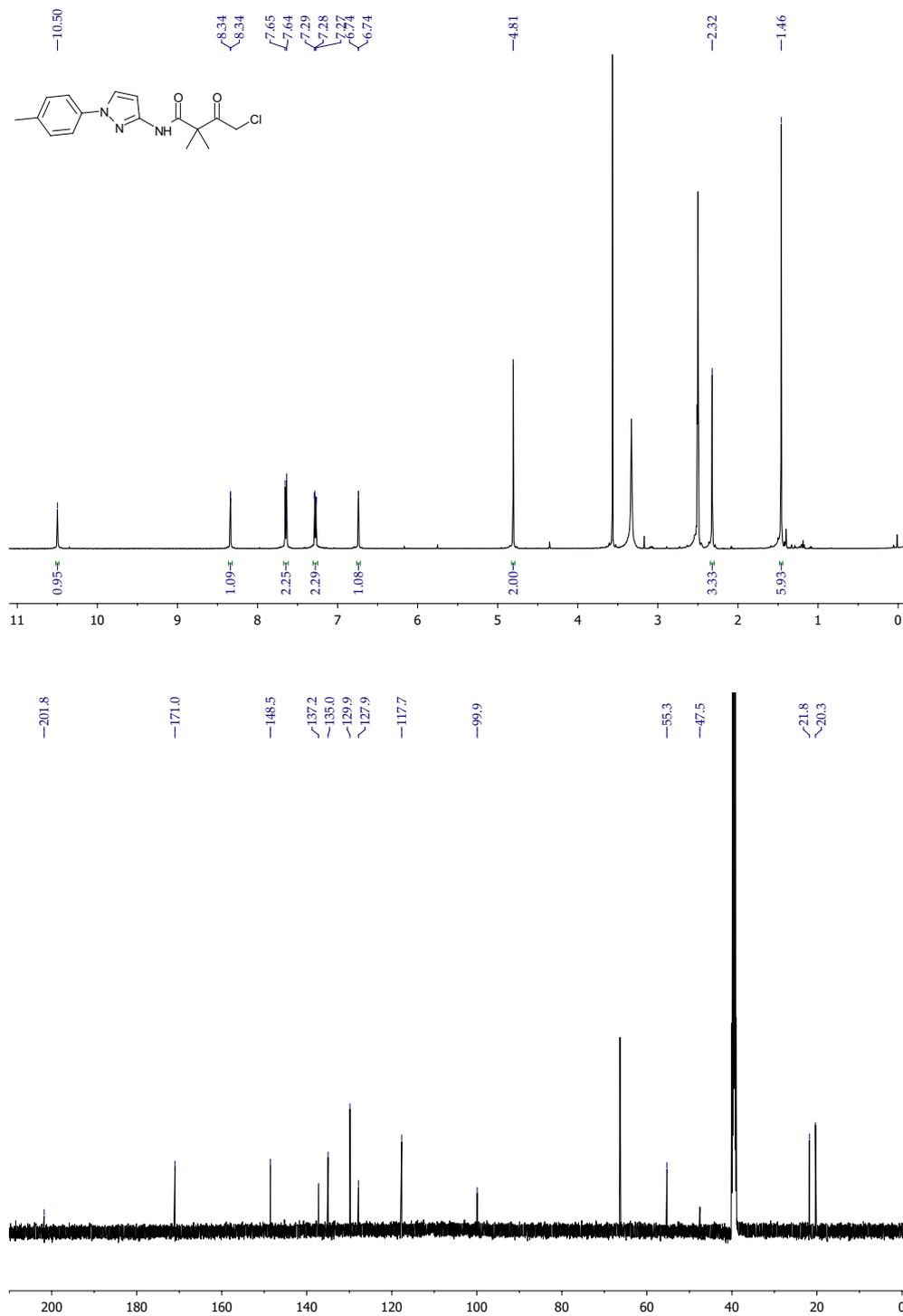
^1H -NMR-Spektrum (300 MHz, CDCl_3) und ^{13}C -NMR-Spektrum (100 MHz, CDCl_3) von AS1

AS3



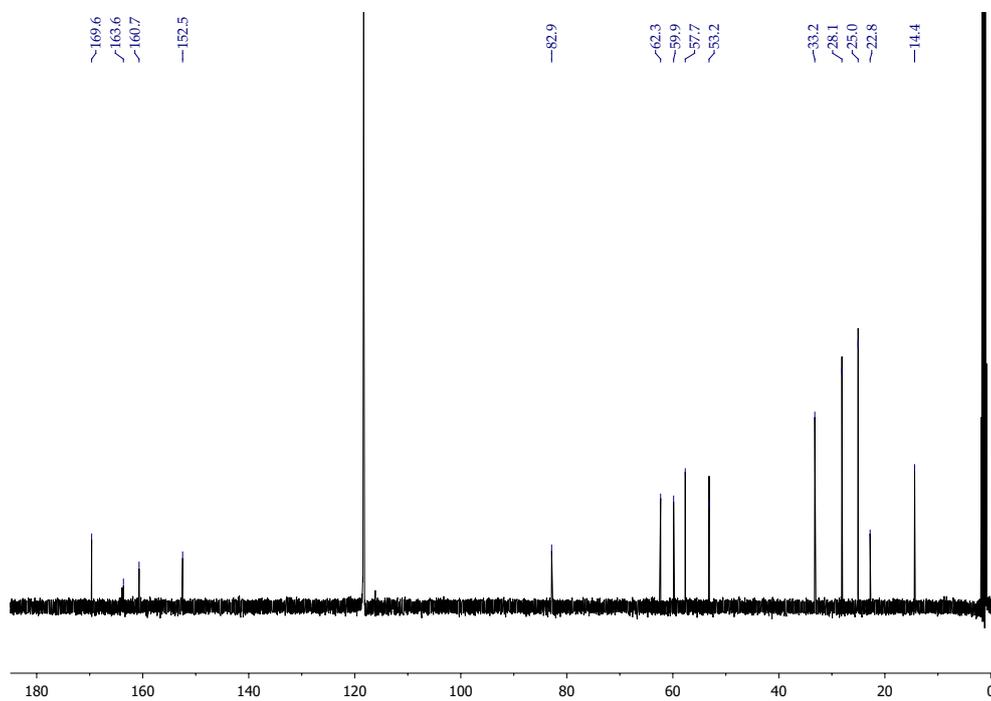
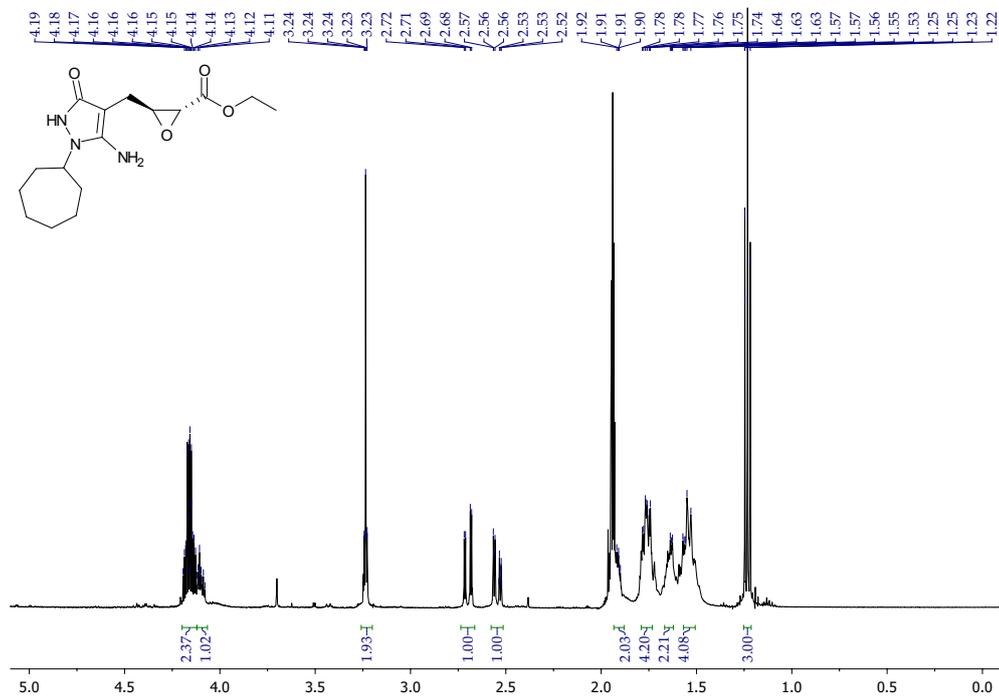
^1H -NMR-Spektrum (300 MHz, CDCl_3) von AS3

CK1



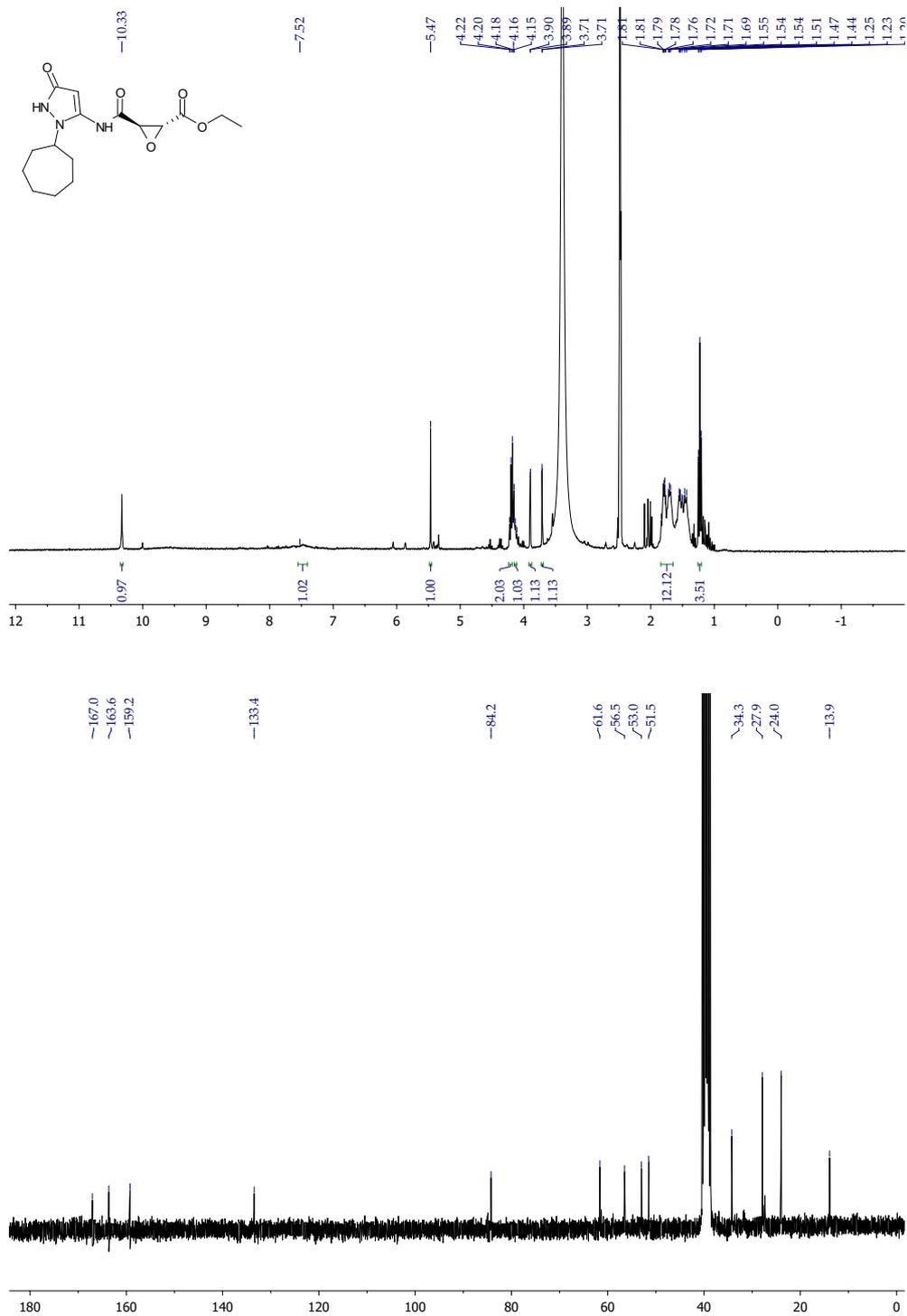
¹H-NMR-Spektrum (500 MHz, DMSO-*d*₆) und ¹³C-NMR-Spektrum (125 MHz, DMSO-*d*₆) von CK1

EP2



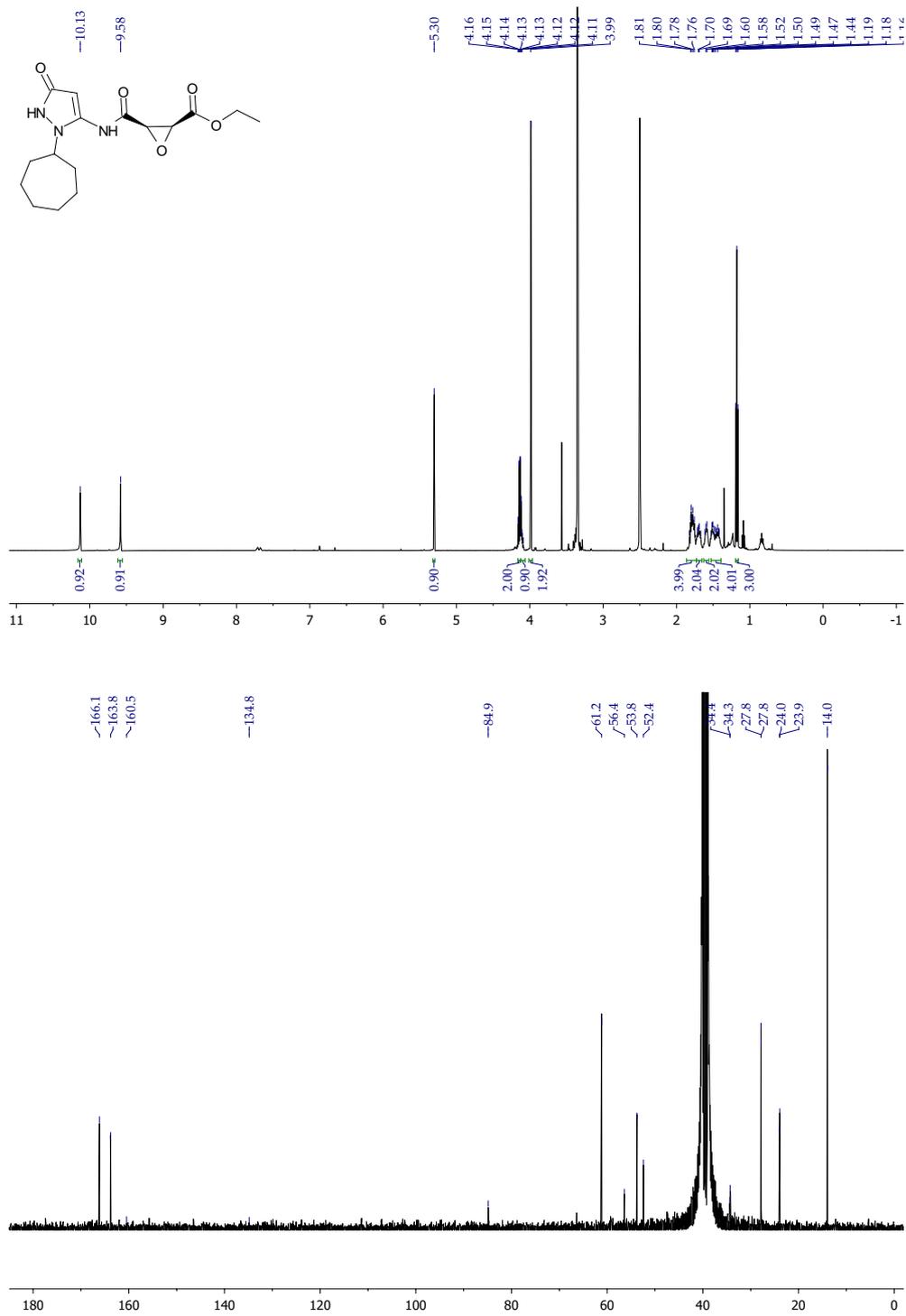
^1H -NMR-Spektrum (500 MHz, CD_3CN) und ^{13}C -NMR-Spektrum (125 MHz, CD_3CN) von **EP2**

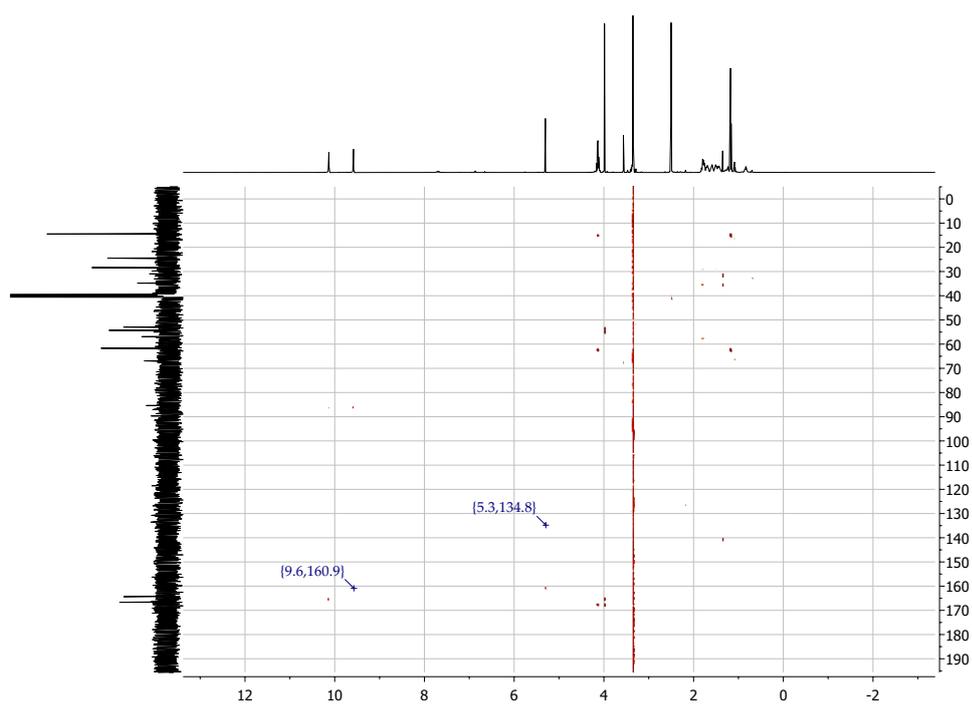
EP3



¹H-NMR-Spektrum (300 MHz, DMSO-*d*₆) und ¹³C-NMR-Spektrum (75 MHz, DMSO-*d*₆) von EP3

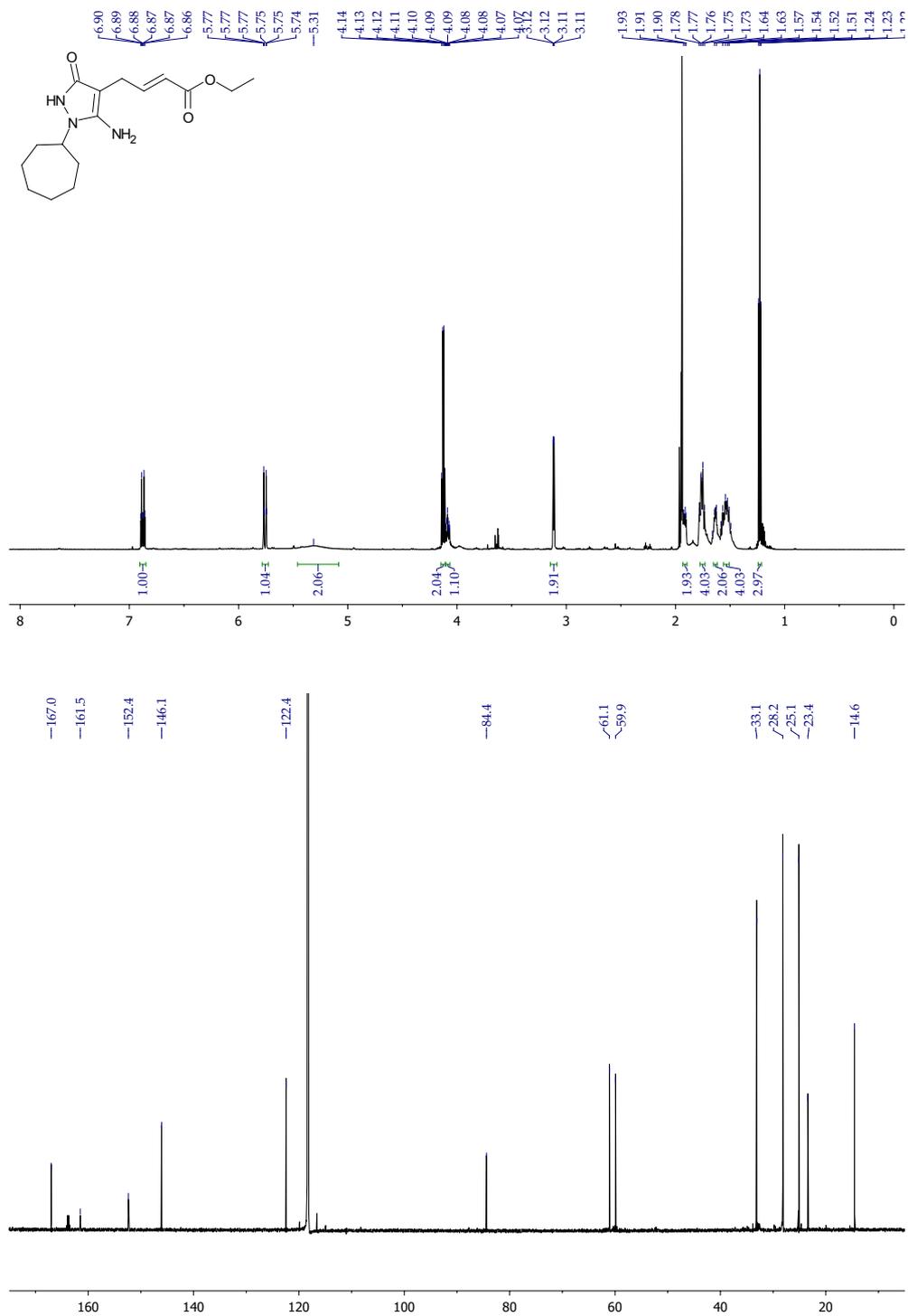
EP5





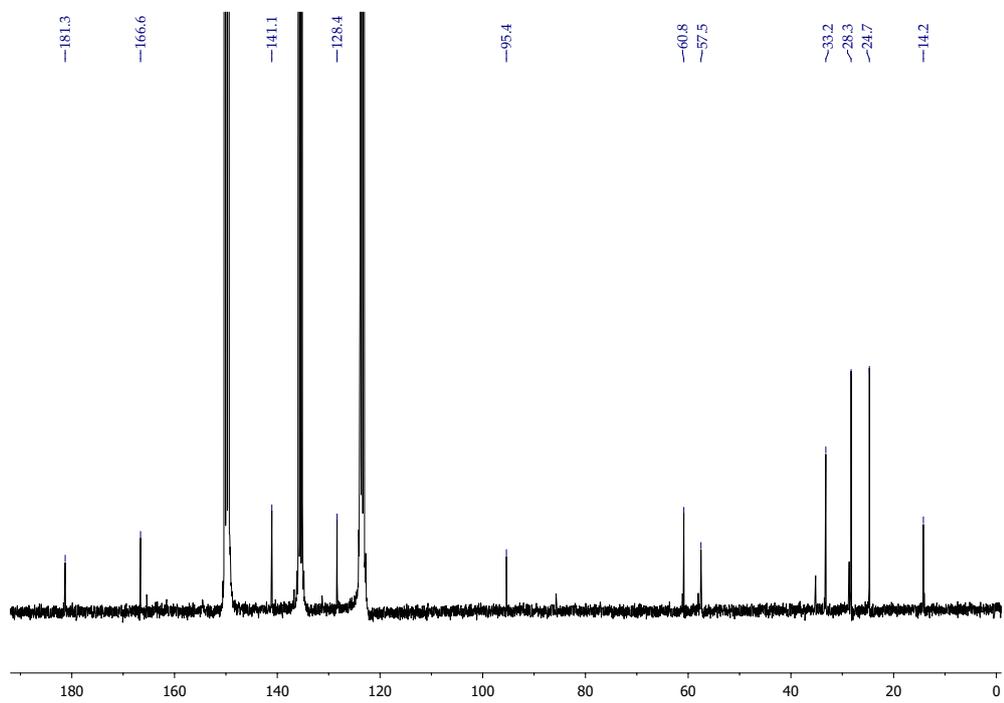
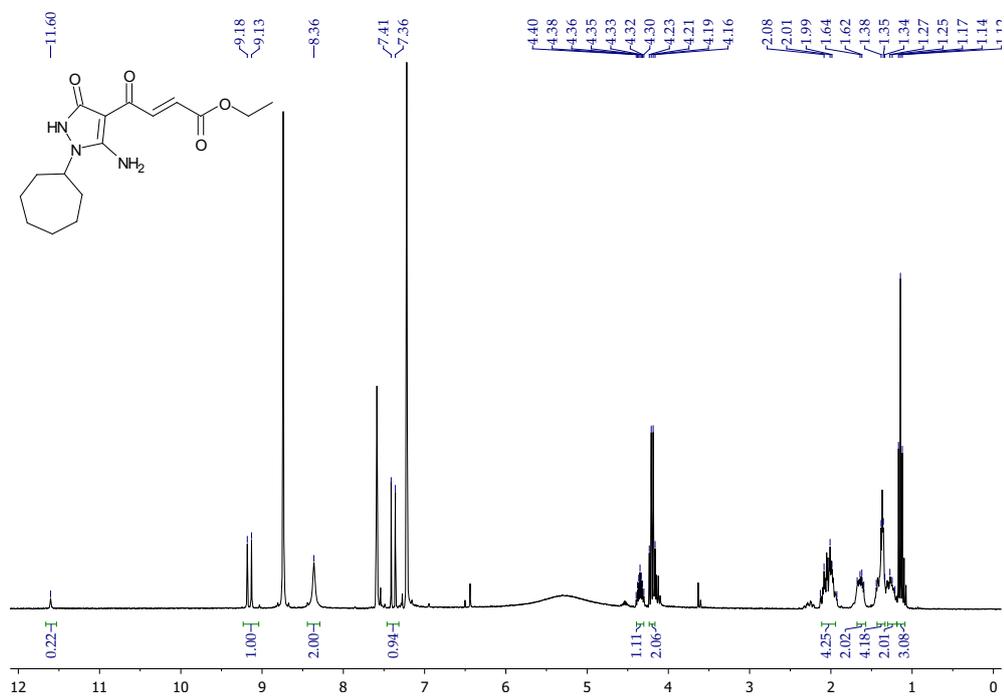
^1H -NMR-Spektrum (500 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) und ^{13}C -NMR-Spektrum (125 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) sowie [^1H , ^{13}C]-HSQC-NMR-Spektrum von **EP5**

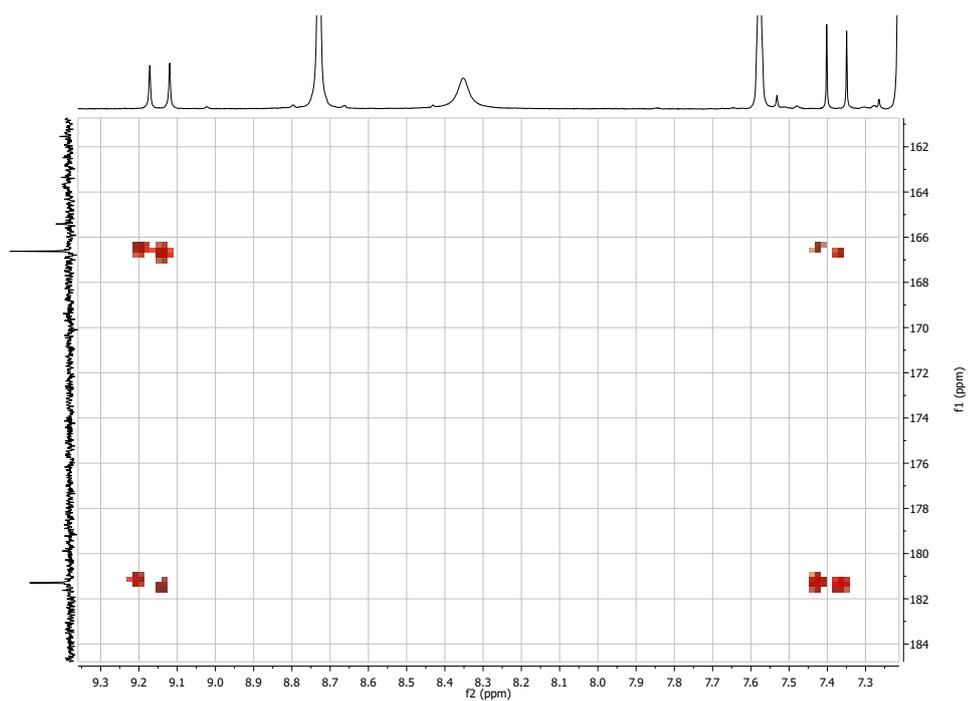
AB1



¹H-NMR-Spektrum (700 MHz, CD₃CN) und ¹³C-NMR-Spektrum (175 MHz, CD₃CN) von **AB1**

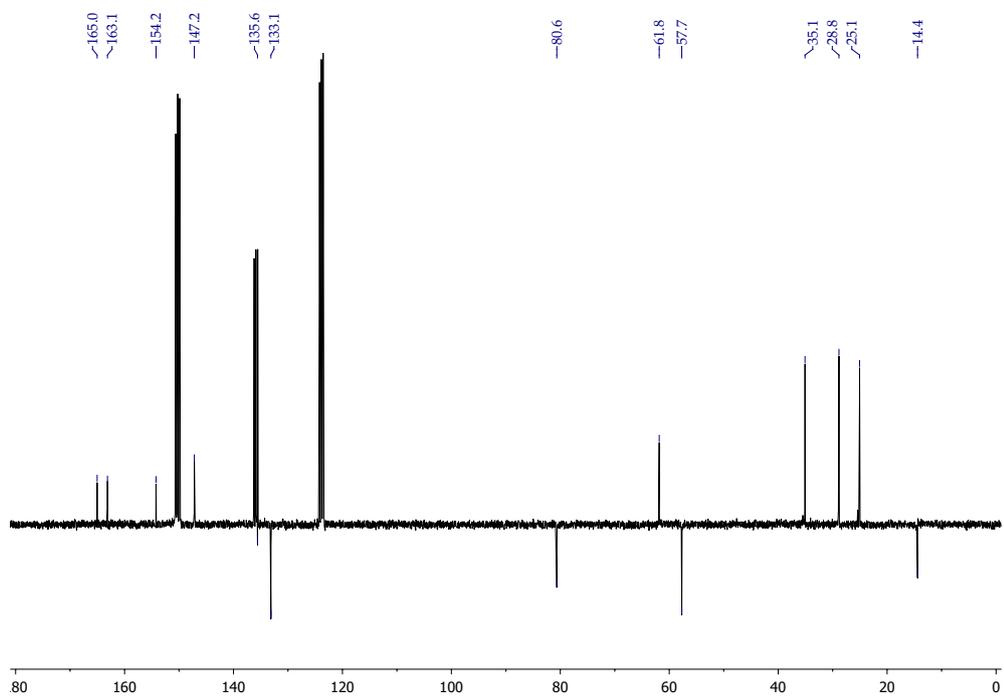
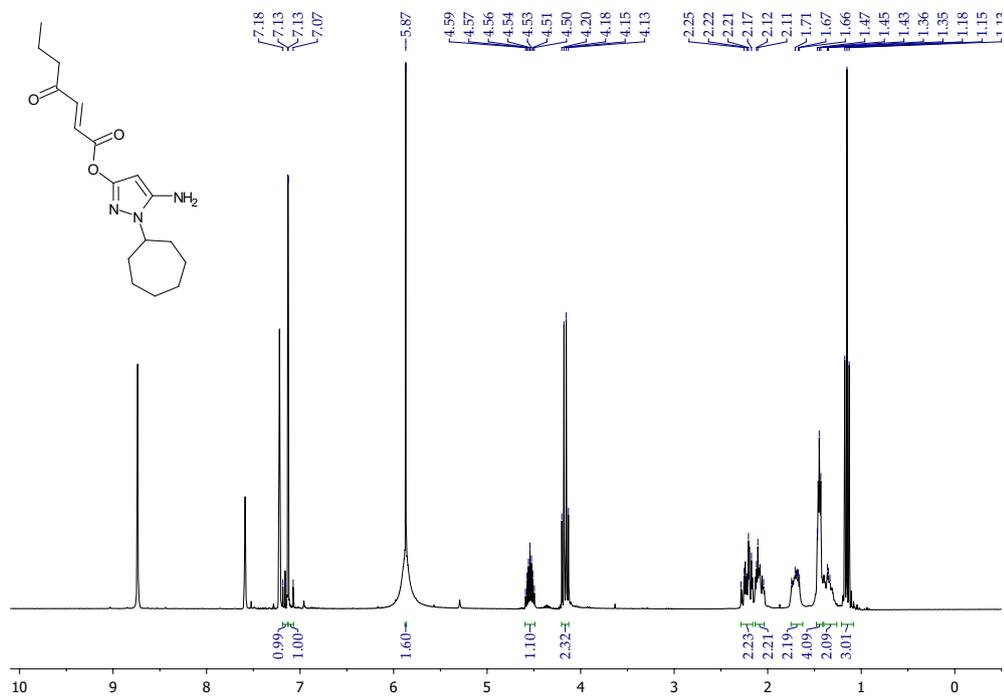
AB2





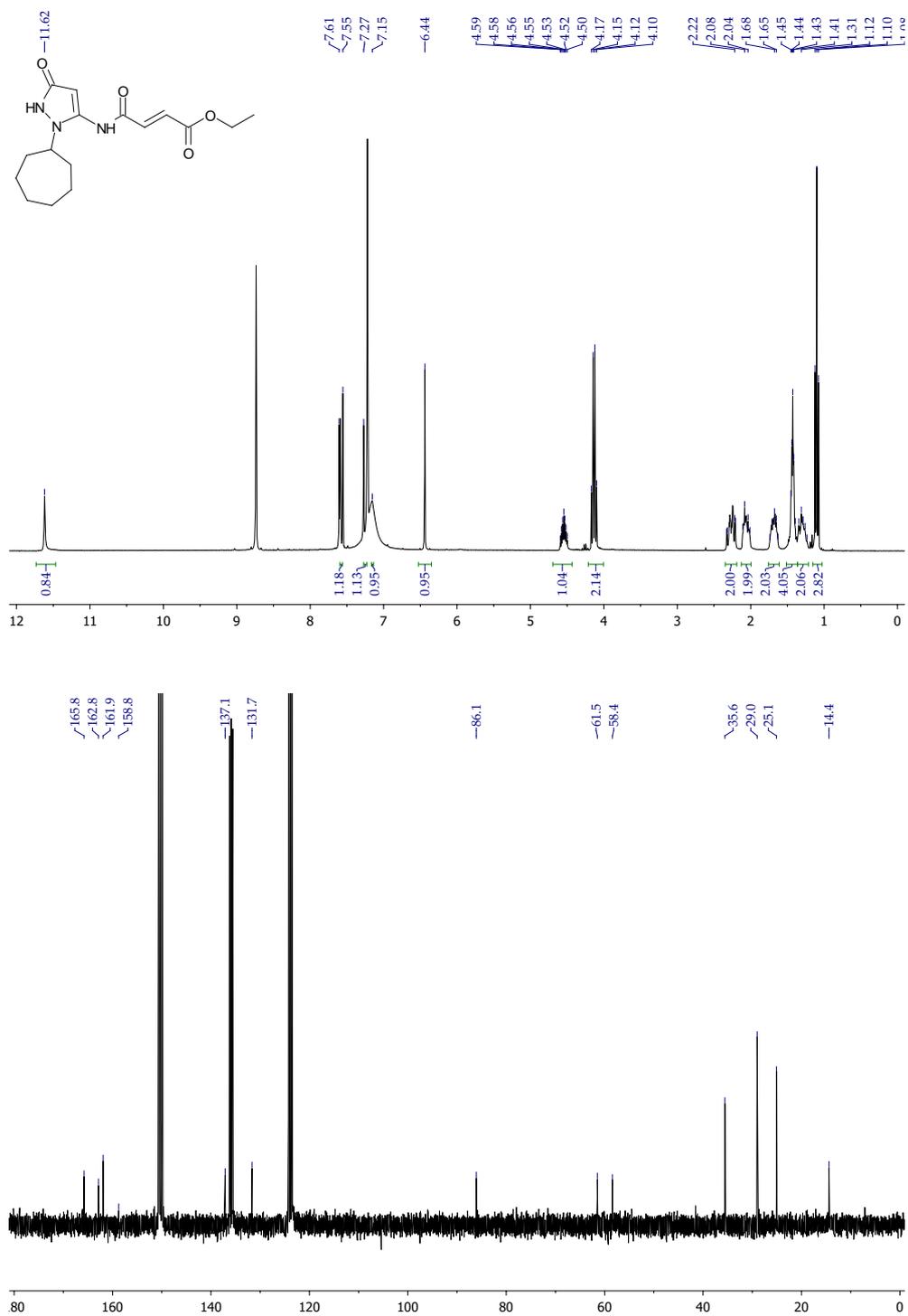
^1H -NMR-Spektrum (300 MHz, Pyridin- d_5) und ^{13}C -NMR-Spektrum (75 MHz, Pyridin- d_5) sowie [^1H , ^{13}C]-HMBC-NMR-Spektrum von **AB2**

AB4



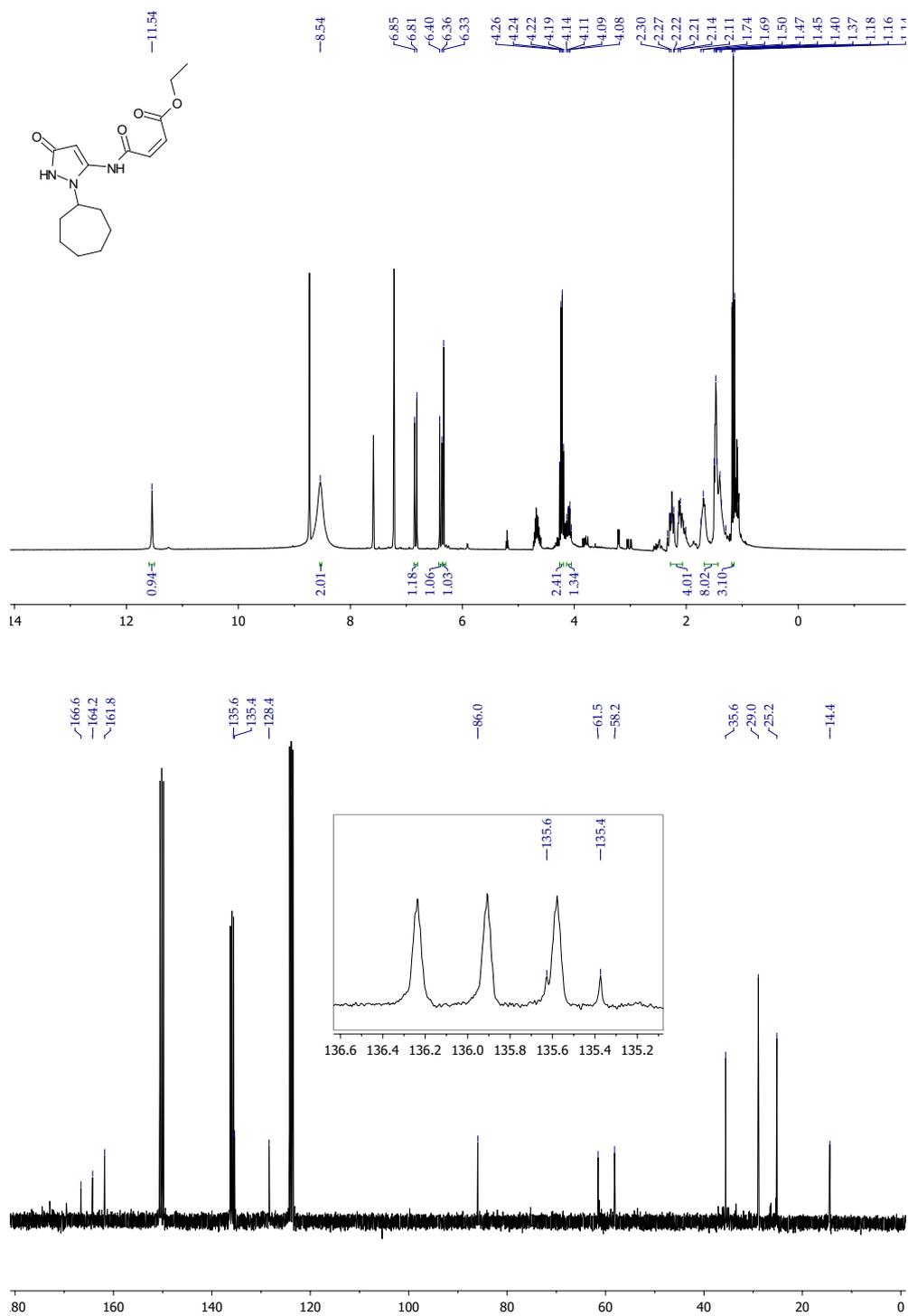
¹H-NMR-Spektrum (300 MHz, Pyridin-*d*₅) und ¹³C-NMR-Spektrum (75 MHz, Pyridin-*d*₅) von **AB4**

AB5



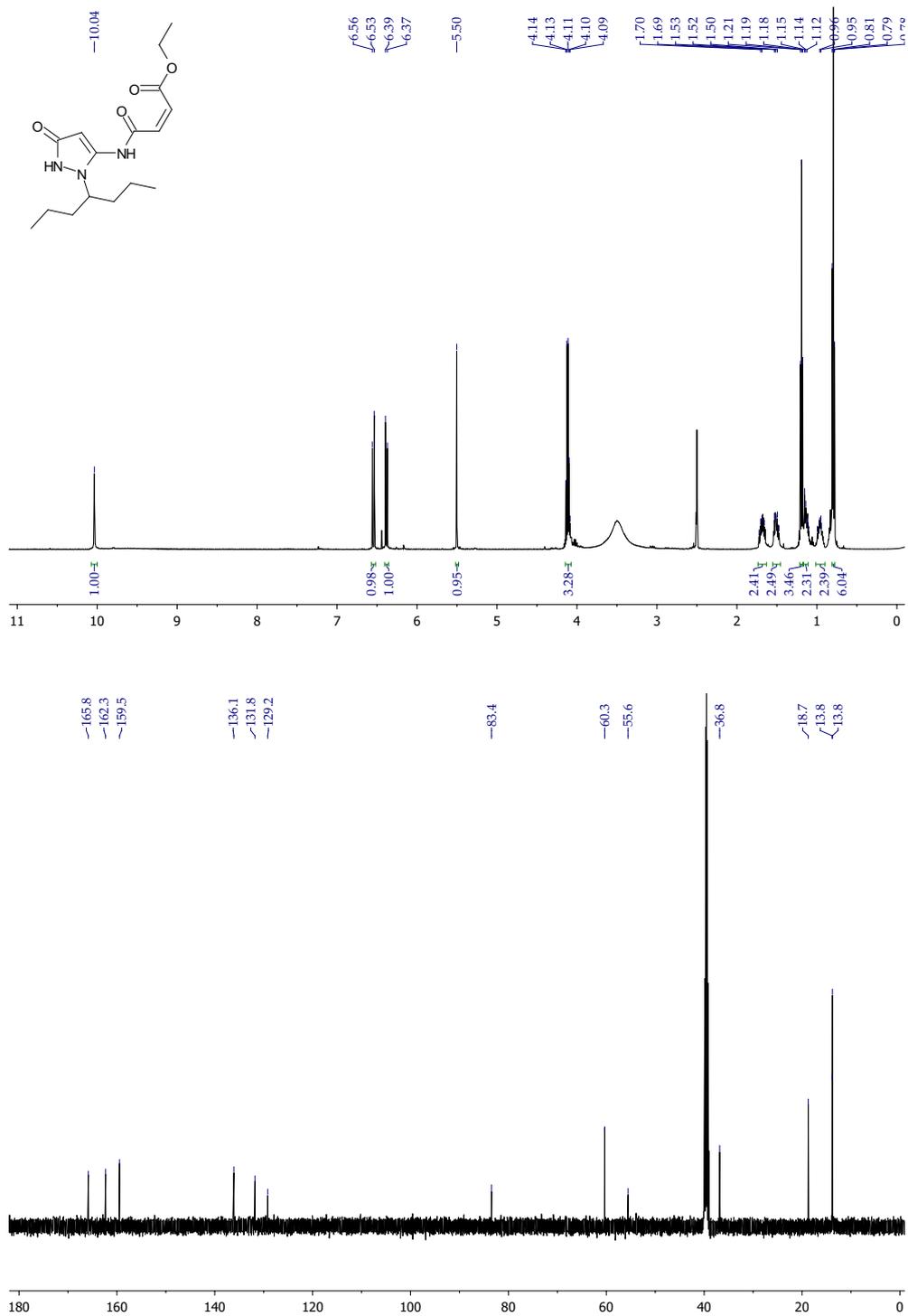
¹H-NMR-Spektrum (300 MHz, Pyridin-d₅) und ¹³C-NMR-Spektrum (75 MHz, Pyridin-d₅) von **AB5**

AB6



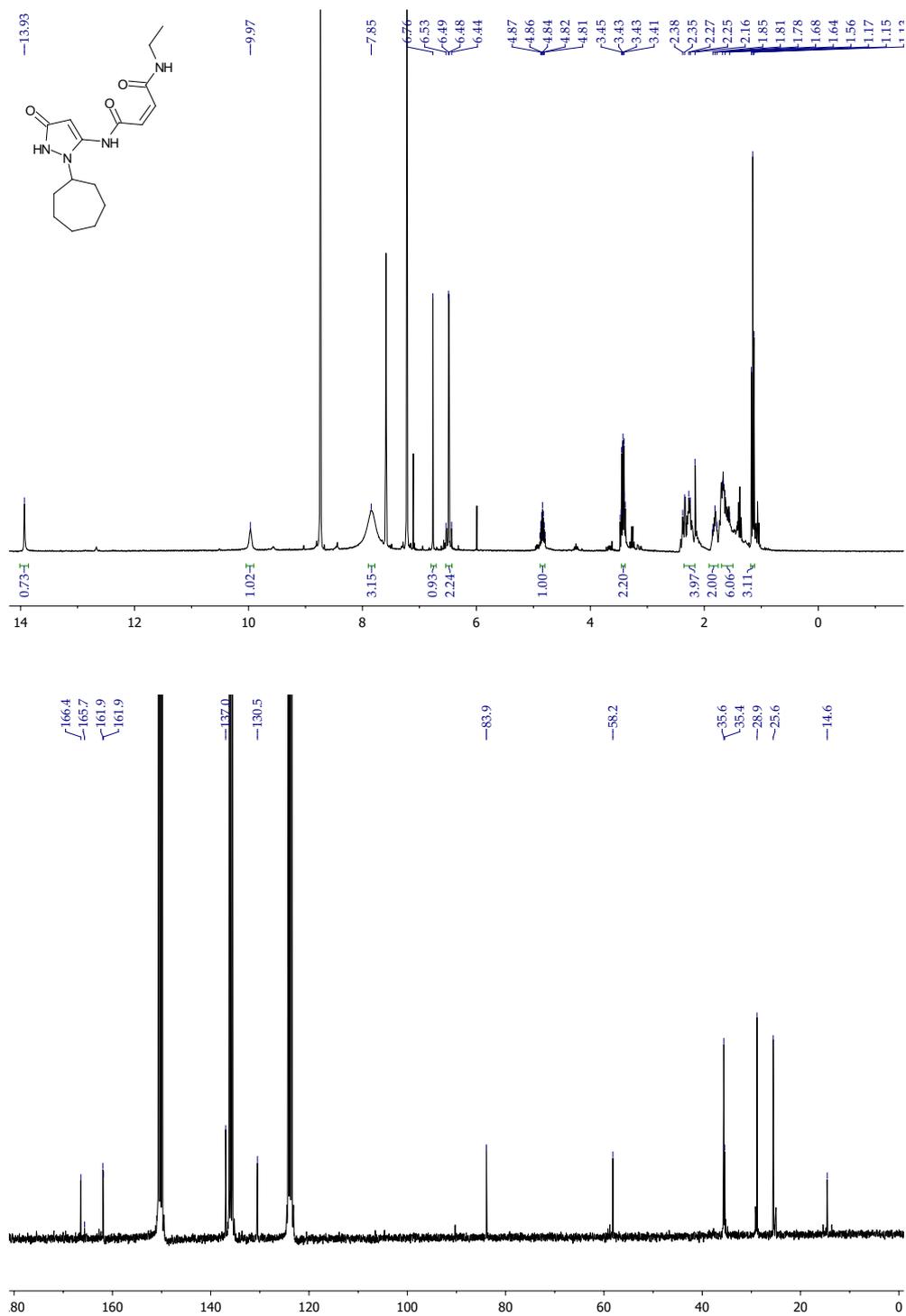
¹H-NMR-Spektrum (300 MHz, Pyridin-*d*₅) und ¹³C-NMR-Spektrum (75 MHz, Pyridin-*d*₅) von AB6

AB7



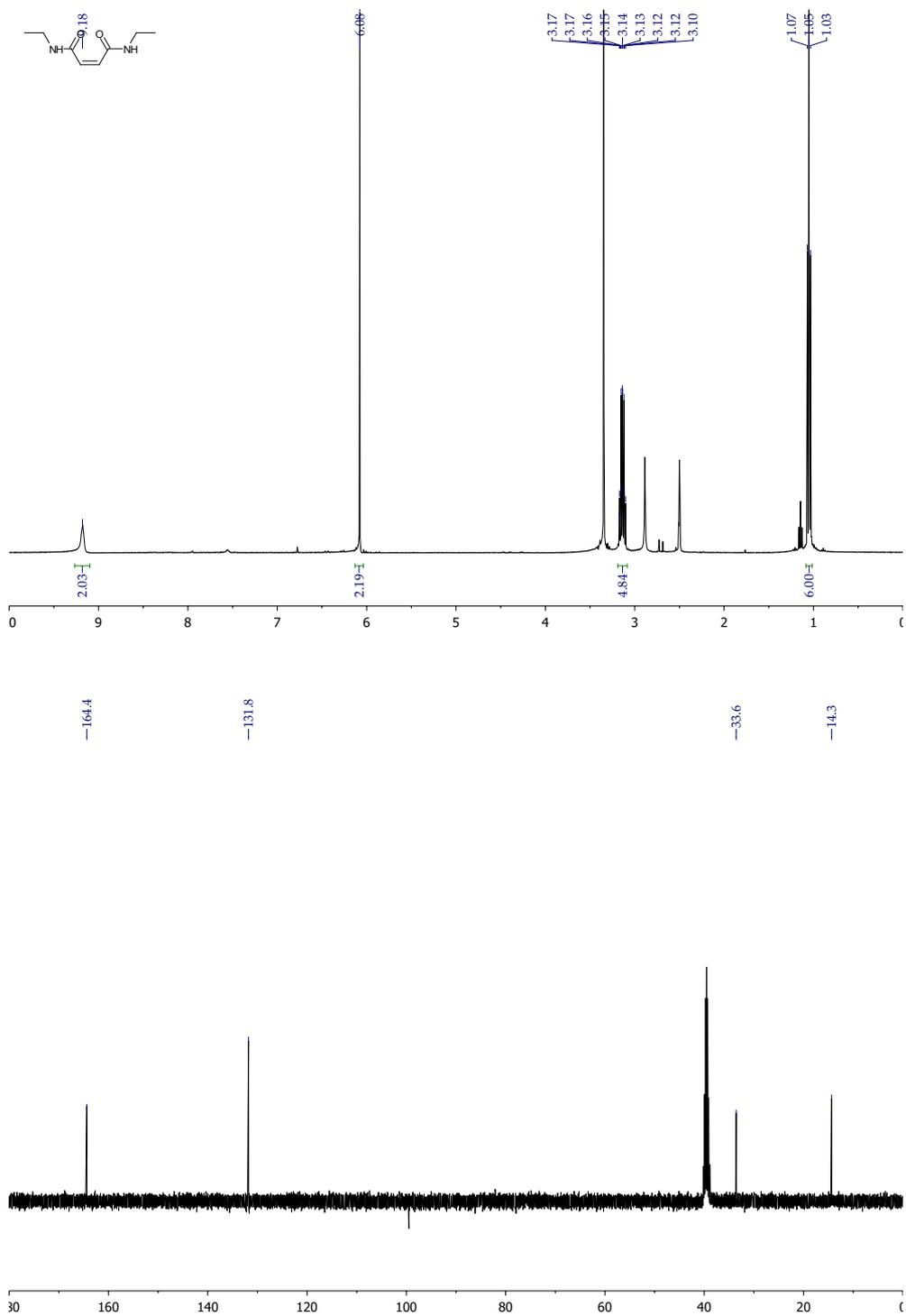
¹H-NMR-Spektrum (500 MHz, DMSO-d₆) und ¹³C-NMR-Spektrum (125 MHz, DMSO-d₆) von **AB7**

AB10



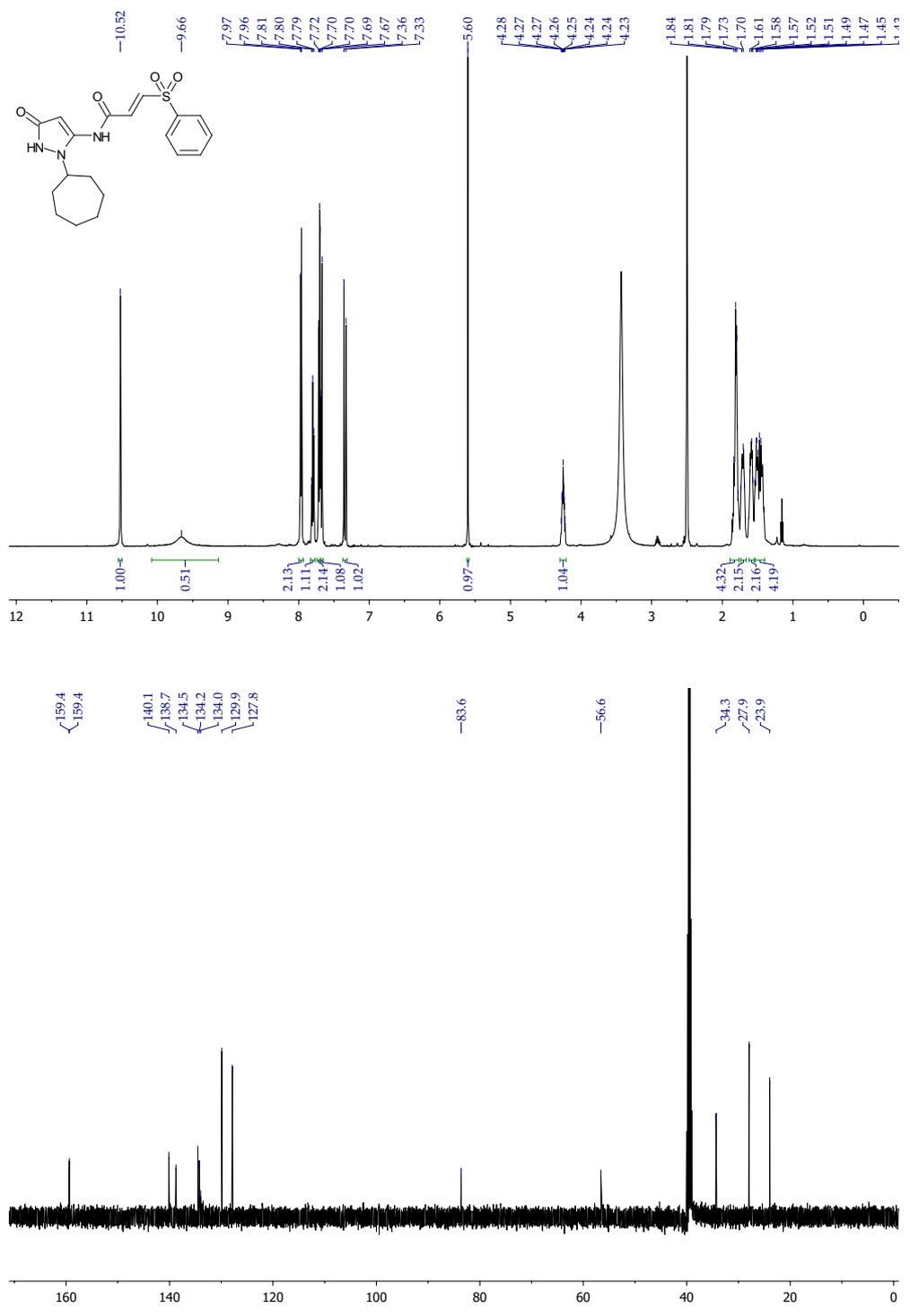
¹H-NMR-Spektrum (300 MHz, Pyridin-d₅) und ¹³C-NMR-Spektrum (75 MHz, Pyridin-d₅) von **AB10**

AB12



¹H-NMR-Spektrum (500 MHz, DMSO-*d*₆) und ¹³C-NMR-Spektrum (125 MHz, DMSO-*d*₆) von **AB12**

VS1



¹H-NMR-Spektrum (500 MHz, DMSO-d₆) und ¹³C-NMR-Spektrum (125 MHz, DMSO-d₆) von VS1

A.2. Kinetische Daten der Inhibitoren

Tabelle A.1. Synthetisierte Inhibitoren und ihre enzymkinetischen Kenngrößen mit der CVB3 3C Protease

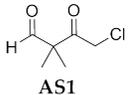
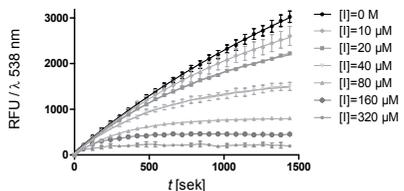
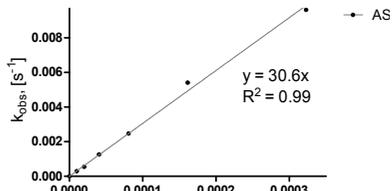
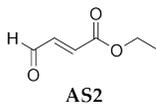
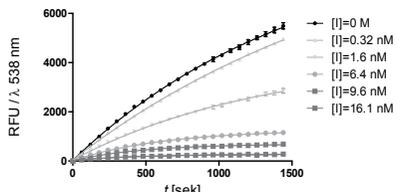
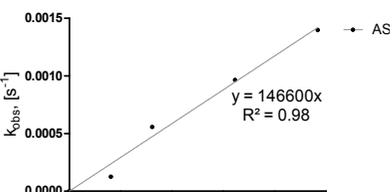
Inhibitor	k_{inact}/K_I -Wert bzw. IC_{50} -Wert	enzymkinetischer Verlauf	Bestimmung der Inhibitionskenngroße
<p>Aldehydsonden</p>  <p>AS1</p>	30.6 ± 0.6 $M^{-1}s^{-1}$		
 <p>AS2</p>	146600 ± 5850 $M^{-1}s^{-1}$		

Tabelle A.1. Synthetisierte Inhibitoren und ihre enzymkinetischen Kenngrößen - Fortsetzung

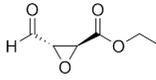
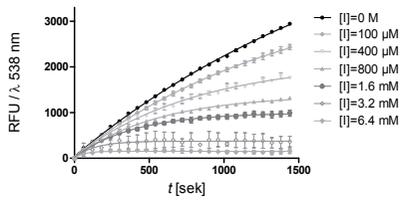
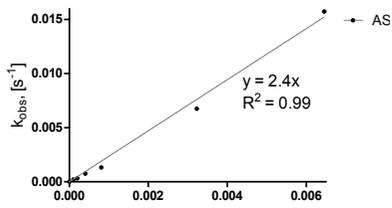
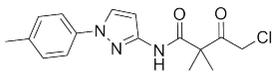
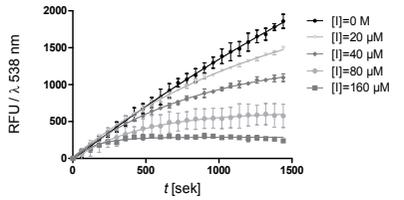
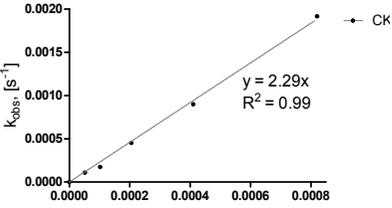
Inhibitor	k_{inact}/K_I -Wert bzw. IC_{50} -Wert	enzymkinetischer Verlauf	Bestimmung der InhibitionskenngroÙe
 AS3	2.4 ± 0.1 $M^{-1}s^{-1}$		
Chlormethylketone			
 CK1	2.3 ± 0.1 $M^{-1}s^{-1}$		

Tabelle A.1. Synthetisierte Inhibitoren und ihre enzymkinetischen Kenngrößen - Fortsetzung

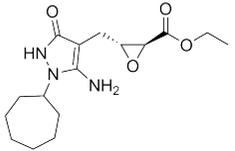
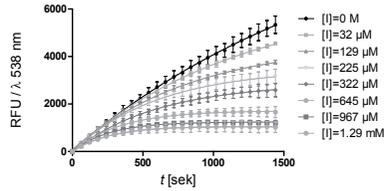
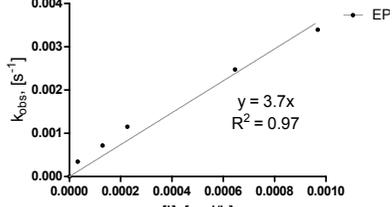
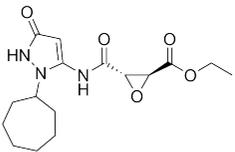
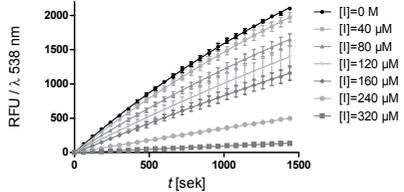
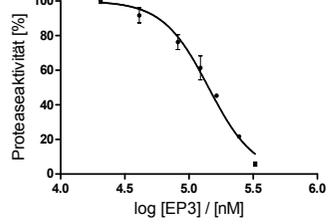
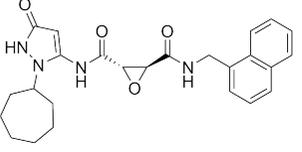
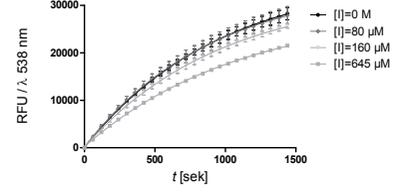
Inhibitor	k_{inact}/K_I -Wert bzw. IC_{50} -Wert	enzymkinetischer Verlauf	Bestimmung der Inhibitions Kenngröße
<p>Epoxide</p>  <p>EP2</p>	3.7 ± 0.2 $M^{-1}s^{-1}$		
 <p>EP3</p>	$142.2 \pm 5.6 \mu M$		
 <p>EP4</p>	≈ 0		

Tabelle A.1. Synthetisierte Inhibitoren und ihre enzymkinetischen Kenngrößen - Fortsetzung

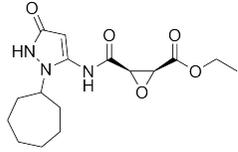
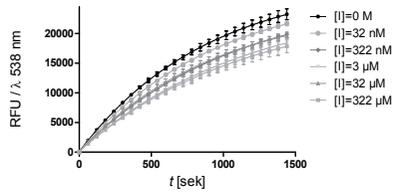
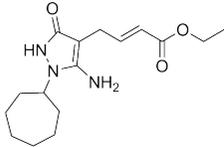
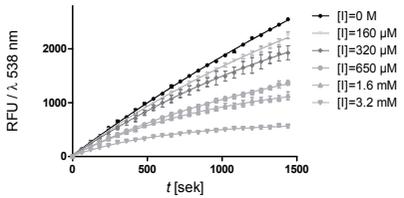
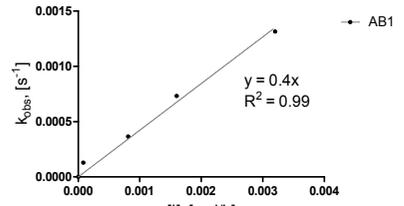
Inhibitor	$k_{\text{inact}}/K_{\text{I}}$ -Wert bzw. IC_{50} -Wert	enzymkinetischer Verlauf	Bestimmung der InhibitionskenngroÙe
 EP5	≈ 0		
α, β -ungesättigte Carbonylverbindungen			
 AB1	0.42 ± 0.01 $\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$		

Tabelle A.1. Synthetisierte Inhibitoren und ihre enzymkinetischen Kenngrößen - Fortsetzung

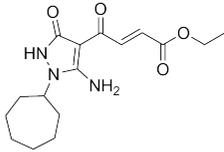
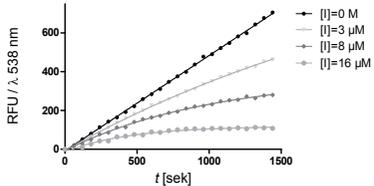
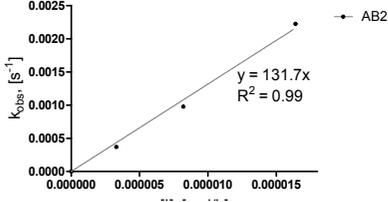
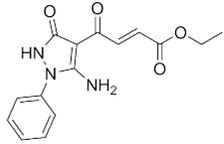
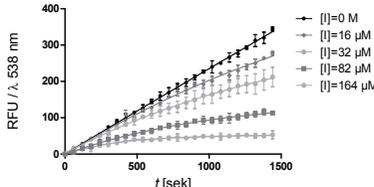
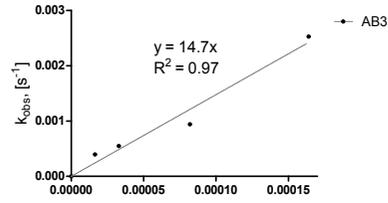
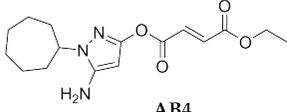
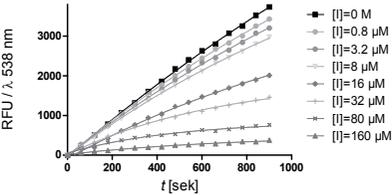
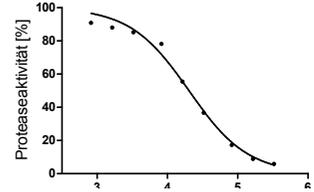
Inhibitor	k_{inact}/K_I -Wert bzw. IC_{50} -Wert	enzymkinetischer Verlauf	Bestimmung der InhibitionskenngroÙe
 AB2	131.7 ± 4.2 $M^{-1}s^{-1}$		
 AB3	14.7 ± 0.9 $M^{-1}s^{-1}$		
 AB4	$20.2 \pm 1.6 \mu M$		

Tabelle A.1. Synthetisierte Inhibitoren und ihre enzymkinetischen Kenngrößen - Fortsetzung

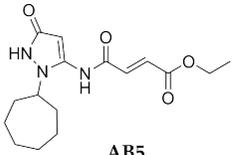
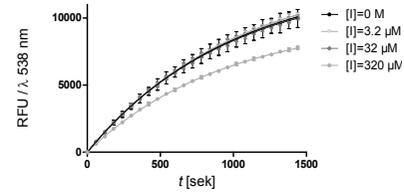
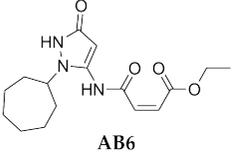
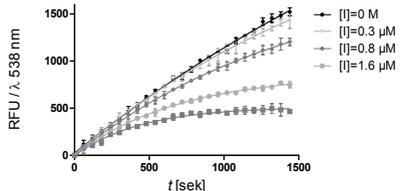
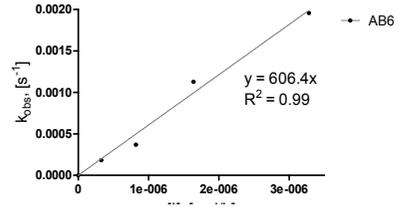
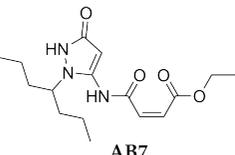
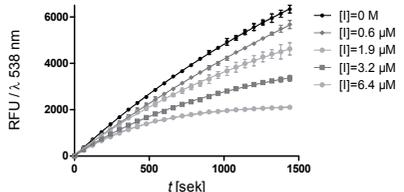
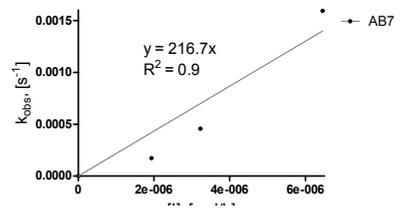
Inhibitor	k_{inact}/K_I -Wert bzw. IC_{50} -Wert	enzymkinetischer Verlauf	Bestimmung der InhibitionskenngroÙe
 AB5	≈ 0		
 AB6	606.4 ± 24.9 $M^{-1}s^{-1}$		
 AB7	216.7 ± 30.7 $M^{-1}s^{-1}$		

Tabelle A.1. Synthetisierte Inhibitoren und ihre enzymkinetischen Kenngrößen - Fortsetzung

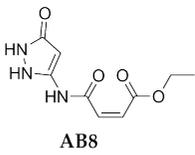
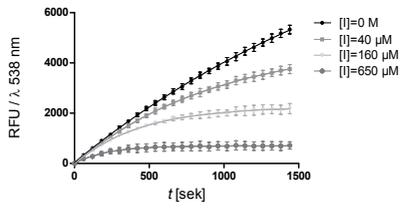
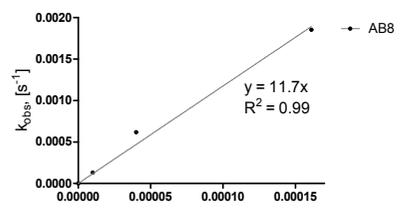
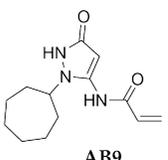
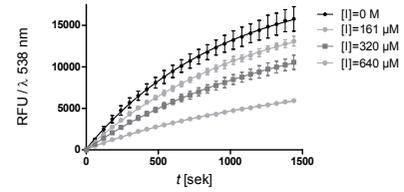
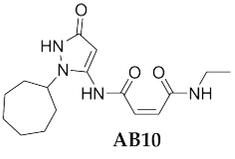
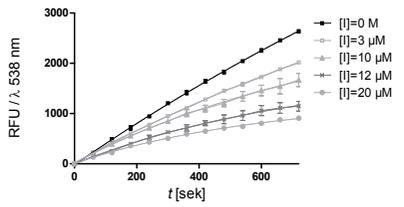
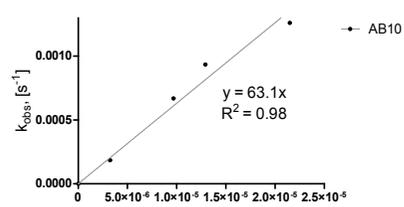
Inhibitor	k_{inact}/K_I -Wert bzw. IC_{50} -Wert	enzymkinetischer Verlauf	Bestimmung der InhibitionskenngroÙe
 <p>AB8</p>	11.7 ± 0.5 $M^{-1}s^{-1}$		
 <p>AB9</p>	≈ 0		
 <p>AB10</p>	63.1 ± 3.1 $M^{-1}s^{-1}$		

Tabelle A.1. Synthetisierte Inhibitoren und ihre enzymkinetischen Kenngrößen - Fortsetzung

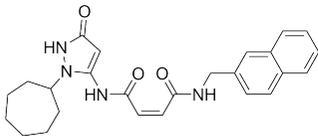
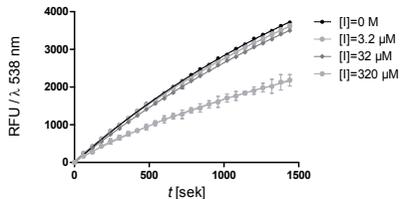
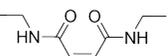
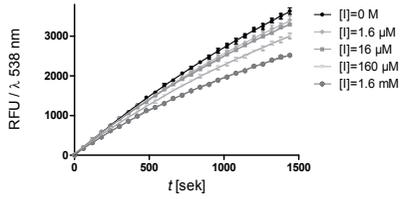
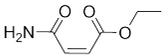
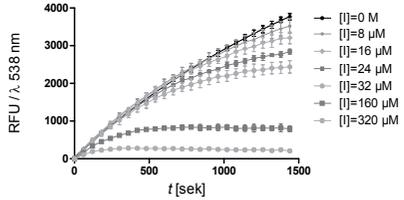
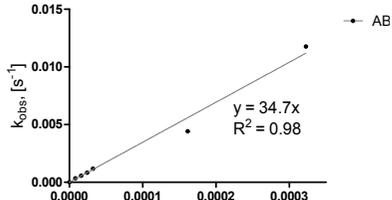
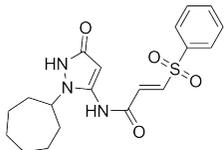
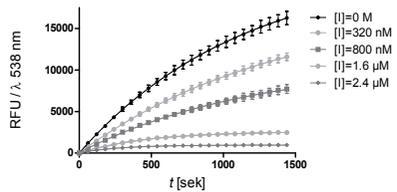
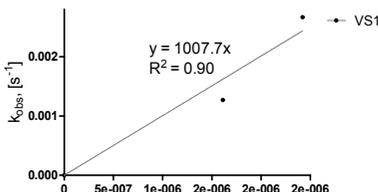
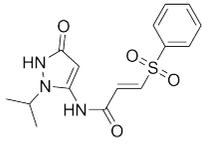
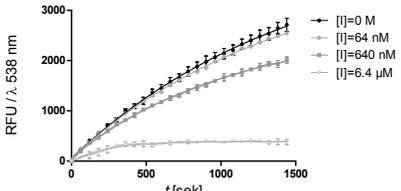
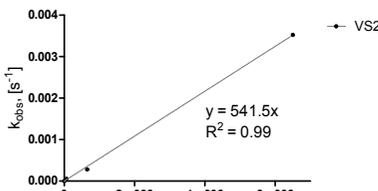
Inhibitor	k_{inact}/K_I -Wert bzw. IC_{50} -Wert	enzymkinetischer Verlauf	Bestimmung der InhibitionskenngroÙe
 AB11	≈ 0		
 AB12	≈ 0		
 AB13	34.7 ± 1.5 $M^{-1}s^{-1}$		

Tabelle A.1. Synthetisierte Inhibitoren und ihre enzymkinetischen Kenngrößen - Fortsetzung

Inhibitor	k_{inact}/K_I -Wert bzw. IC_{50} -Wert	enzymkinetischer Verlauf	Bestimmung der InhibitionskenngroÙe
<p>Vinylsulfone</p>  <p>VS1</p>	1007.7 ± 102.2 $M^{-1}s^{-1}$		
 <p>VS2</p>	541.5 ± 6.3 $M^{-1}s^{-1}$		

A.3. ESI-MS-Spektren

Tabelle A.2. ESI-Massenspektren von CVB3 3C^{Pro} und der Mutante CVB3 3C^{Pro} C147A ohne und mit Inhibitor

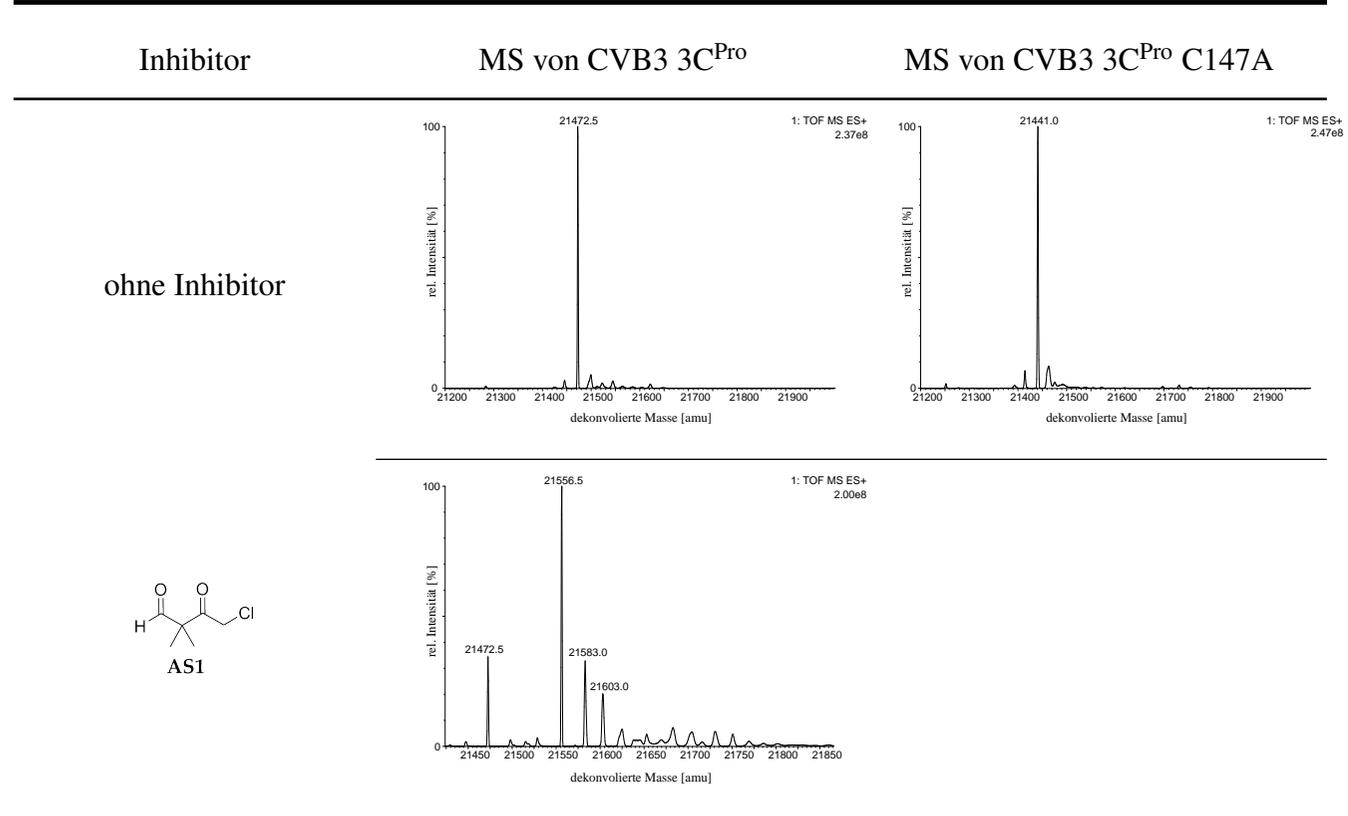


Tabelle A.2. Massenspektren CVB3 3C^{Pro} und CVB3 3C^{Pro} C147A - Fortsetzung

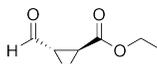
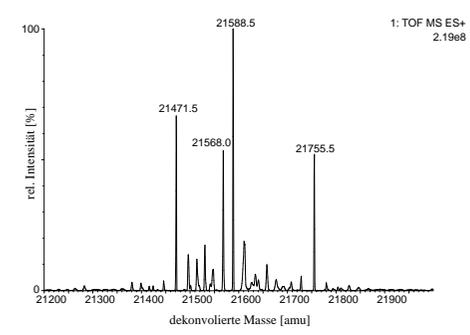
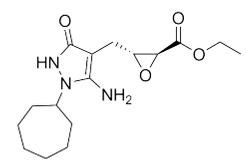
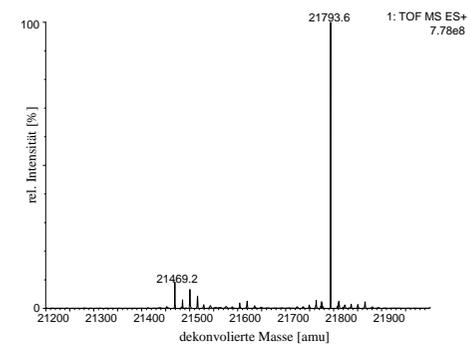
Inhibitor	MS von CVB3 3C ^{Pro}	MS von CVB3 3C ^{Pro} C147A
 AS3	 <p>1: TOF MS ES+ 2.19e8</p>	
 EP2	 <p>1: TOF MS ES+ 7.78e8</p>	

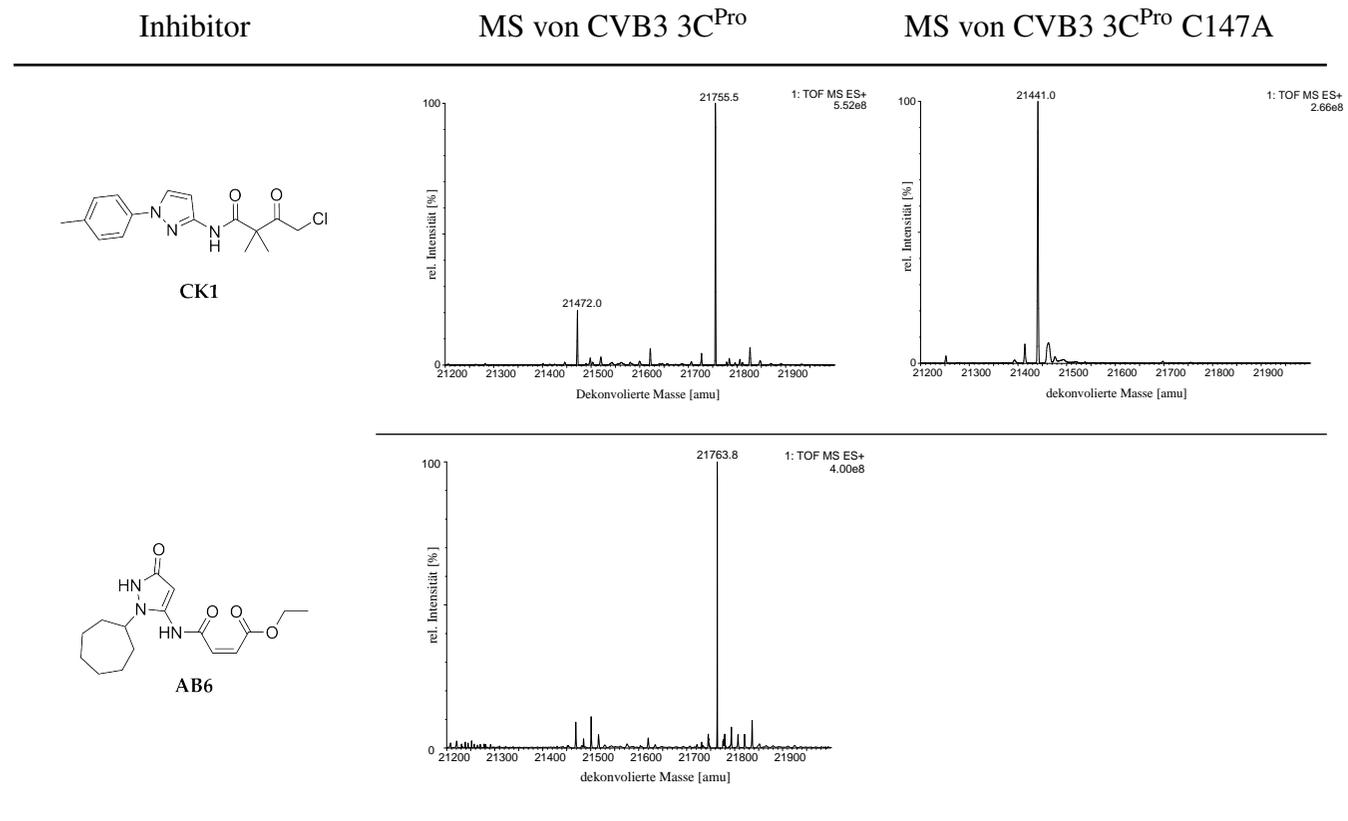
Tabelle A.2. Massenspektren CVB3 3C^{Pro} und CVB3 3C^{Pro} C147A - Fortsetzung

Tabelle A.2. Massenspektren CVB3 3C^{Pro} und CVB3 3C^{Pro} C147A - Fortsetzung

