

Design, Synthese und Testung von Aziridin-2,3-dicarboxylat- basierten Cysteinprotease-Inhibitoren



JOHANNES GUTENBERG
UNIVERSITÄT MAINZ

Dissertation

zur Erlangung des Grades

„Doktor der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)“

im Promotionsfach Pharmazeutische und Medizinische Chemie

am Fachbereich Chemie, Pharmazie und Geowissenschaften

der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Diplom-Chemikerin Roula Chartomatsidou

geb. in Thessaloniki

Mainz 2020

Eingereicht beim Fachbereich Chemie, Pharmazie und Geowissenschaften am:

1. Berichterstatter: [REDACTED]

2. Berichterstatter: [REDACTED]

Tag des öffentlichen Promotionskolloquiums: _____

Declaration of Authorship

I, Roula Chartomatsidou, declare that this thesis titled, "Design, synthesis and testing of aziridine-2,3-dicarboxylate-based cysteine protease inhibitors" and the work presented in it are my own. I confirm that:

- This work was done wholly while in candidature for a research degree at Johannes Gutenberg University of Mainz.
- Where any part of this thesis has previously been submitted for a degree or any other qualification at this University or any other institution, this has been clearly stated.
- Where I have consulted the published work of others, this is always clearly attributed.
- Where I have quoted from the work of others, the source is always given. Except for such quotations, this thesis is entirely my own work.
- I have acknowledged all main sources of help.
- Where the thesis is based on work done by myself jointly with others, I have made clear exactly what was done by others and what I have contributed myself.

Signed: _____

Date: _____

„If you can't explain it simply, you don't understand it well enough.“

Albert Einstein

Abstract

Department of Medicinal and Pharmaceutical Chemistry

Institute of Pharmacy and Biochemistry

Johannes Gutenberg University Mainz

Design, synthesis and testing of aziridine-2,3-dicarboxylate-based cysteine protease inhibitors

by Roula Chartomatsidou

Project I: Design, synthesis und testing of aziridine-2,3-dicarboxylate-based cysteine protease inhibitors against cathepsin B

The computational structure-based drug design of covalent drugs has become more and more favored in recent years however it is still challenging in the drug design process to identify selective, efficient covalent drugs. In many cases, covalent drugs show a higher affinity compared to non-covalent drugs, which is beneficial, but on the other hand this is also the factor, which increases the risk of side-effects and toxicity. In order to benefit of the high efficiency of covalent inhibitors their selectivity for the selected target have to be optimised very well.

The aim of this work was the computer-aided structure-based design and synthesis of new covalent, irreversible Cathepsin B (CB) inhibitors containing a *trans*-configured aziridine-2,3-dicarboxylated ring as warhead. Cathepsin B, a papain-like human cysteine protease, is an attractive drug target due to its crucial role in the invasion and metastasis of cancer tumor cells.

The so-called occluding loop (His¹¹⁰/His¹¹¹), an unique structural feature of cathepsin B among papain-like cysteine proteases, should be addressed by an ionic interaction of the carboxyl group attached to the dipeptidyl recognition moiety of the designed aziridinylpeptide inhibitors. X-ray data analysis of known epoxide-based Cathepsin B inhibitors CA074 (pdb: 1QDQ) and CA030 (pdb: 1CSB) was the basis for rational design and molecular docking (FlexX/LeadIT) of covalent irreversible Cathepsin B inhibitors. The recognition moiety of the above-mentioned lead compounds, (*S*)-Pro-(*S*)-Ile, was adopted and attached via a linker molecule to the *N*-atom of the aziridine ring. Docking calculations predict different binding modes by variation of the linker molecule and the ester groups at the aziridine ring. Also the CB selective ionic interaction with the occluding loop is given for many of the designed hit compounds. Afterwards a series of docking hit compounds were synthesized and tested against Cathepsin B, Cathepsin L, rhodesain and

cruzain. None of the compounds inhibits the main target Cathepsin B, maybe due to the flexibility of the structure of Cathepsin B. Two out of ten synthesized and tested compounds, **RC69** ($R_1 = \text{OBn}$, $R_2 = \text{OEtPh}$) and **RC75** ($R_1 = R_2 = \text{OEtPh}$), were active against human Cathepsin L and the parasitic CL-like cysteine proteases, rhodesain and cruzain. For rhodesain the K_i -values of both compounds are in a nanomolar range.

Project II: Molecular Docking und structure-activity relationships of potent and selective aziridine-2,3-dicarboxylate-based cysteine protease inhibitors against *Leishmania mexicana*

In previous works of our research group a series of potent and selective covalent cysteine protease inhibitors containing an aziridine-2,3-dicarboxylate ring as warhead were designed, synthesized and recognized as selective inhibitors of *Leishmania mexicana* cathepsin L-like cysteine protease LmCPB2.8. Parasitic and human cathepsin L-like cysteine proteases are structurally very similar posing a challenge for the selectivity of the inhibitors.

In the present work, SAR-studies were performed using computational methods of homology modelling (MOE2015), as no crystal structure is available for LmCPB2.8 so far, and molecular docking (FlexX/LeadIT) to predict binding modes of the inhibitors in cruzain and LmCPB2.8. The S2 pocket of LmCPB2.8 seems to tolerate sterically demanding, lipophilic ester groups in contrast to cruzain. An alignment of the amino acid sequences of both enzymes indicate a significant difference in the S2 pocket due to the presence of Tyr²⁰⁹ in LmCPB2.8 compared to Glu²⁰⁸ in cruzain. In addition, docking results predict a strong ionic interaction between the free carboxylic acid attached to the aziridine ring and the positive charged His¹⁶³ in the catalytic center of LmCPB2.8, which is in agreement with biological data (**PF18**, LmCPB2.8 ($K_i = 0.41 \mu\text{M}$; $k_{2\text{nd}} [\text{M}^{-1} \text{min}^{-1}] = 190,569$). Computer-based SAR-studies of this work are in agreement with biological data and suggest aziridine-based, selective PF-inhibitors of *Leishmania mexicana* as promising candidates for further optimization. This part of the PhD thesis was published recently (Fey P., Chartomatsidou R., Kiefer W., Mottram J.C., Kersten C., Schirmeister T., New aziridine-based inhibitors of cathepsin L-like cysteine proteases with selectivity for the *Leishmania* cysteine protease LmCPB2.8. *Eur J Med Chem* **2018**, 156, 587-597).

Zusammenfassung
Medizinische und Pharmazeutische Chemie
Institut für Pharmazie und Biochemie
Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Design, Synthese und Testung von Aziridin-2,3-dicarboxylat-basierten Cysteinprotease-Inhibitoren

von Roula Chartomatsidou

Teil I: Design, Synthese und Testung Aziridin-2,3-dicarboxylat-basierter Cysteinprotease-Inhibitoren gegen Cathepsin B

Das computergestützte, strukturbasierte Wirkstoffdesign von kovalenten Hemmstoffen wird in den letzten Jahren immer wichtiger, allerdings ist es immer noch eine Herausforderung, selektive und effiziente kovalent-wirkende Inhibitoren zu entwickeln. In vielen Fällen zeigen kovalente Wirkstoffe eine höhere Affinität zu ihrem Target als entsprechende nicht-kovalente Hemmstoffe, was zu einem von Vorteil ist, aber auf der anderen Seite das Risiko von *off-target*-Effekten und Toxizität erhöht. Um die hohe Effizienz kovalenter Inhibitoren optimal ausnutzen zu können, muss ihre Selektivität für das gewünschte Target optimiert werden.

Ziel dieser Arbeit war das computergestützte Design, die Synthese und Testung von neuartigen kovalent-irreversiblen Cathepsin B-Inhibitoren, die einen *trans*-konfigurierten Aziridin-2,3-dicarboxylatbasierten Ring als *warhead* tragen. Cathepsin B, eine humane Papain-ähnliche Cysteinprotease, ist ein attraktives Target aufgrund seiner Schlüsselrolle bei der Invasion und Metastase von Tumorzellen verschiedener Krebsarten.

Der sogenannte *occluding loop* (His¹¹⁰/His¹¹¹), ein einzigartiges Strukturelement unter den Papain-ähnlichen Cysteinproteasen soll mittels einer ionischen Wechselwirkung der Carboxylgruppe, die an der Dipeptid-Erkennungseinheit der entwickelten Aziridinylpeptid-Inhibitoren freigesetzt wird, adressiert werden. Untersuchungen der Kristallstrukturen von bekannten Epoxid-basierten Cathepsin B-Inhibitoren, CA074 (pdb: 1QDQ) und CA030 (pdb: 1CSB) waren die Grundlage für das rationale Design und das Molekulare Docking (FlexX/LeadIT) von potentiellen kovalent-irreversiblen Cathepsin B-Inhibitoren. Die peptidische Erkennungseinheit der oben genannten Leitstrukturen, (*S*)-Pro-(*S*)-Ile, wurde übernommen und mittels eines Linker-Moleküls mit dem *N*-Atom des Aziridinrings verknüpft. Die Docking-

Berechnungen ergaben verschiedene Bindungsmodi durch Variation des Linker-Moleküls und der Estergruppen am Aziridinring, wobei die selektive, ionische Wechselwirkung zum *occluding loop* bei vielen Hit-Substanzen vorhergesagt wurde. Eine Auswahl an Hit-Substanzen aus dem Docking wurden im Folgenden synthetisiert und auf ihre Wirksamkeit gegenüber Cathepsin B, Cathepsin L, Rhodesain und Cruzain getestet. Keine der zehn synthetisierten und getesteten Verbindungen hemmt das gewünschte Haupttarget Cathepsin B, womöglich aufgrund der Flexibilität seiner Struktur. Allerdings hemmen zwei Verbindungen, **RC69** ($R_1 = \text{OBn}$, $R_2 = \text{OEtPh}$) und **RC75** ($R_1 = R_2 = \text{OEtPh}$), humanes Cathepsin L und die parasitären CL-ähnlichen Cysteinproteasen, Rhodesain und Cruzain. Rhodesain wird von beiden Zielverbindungen im nanomolaren Bereich gehemmt.

Teil II: Molekulares Docking und Struktur-Wirkungsbeziehungen *Leishmania*-selektiver Aziridin-2,3-dicarboxylat-basierter Cysteinprotease-Inhibitoren

In vorangegangenen Arbeiten unserer Arbeitsgruppe wurde eine Serie an potenten und selektiven Cysteinprotease-Inhibitoren mit einem Aziridin-2,3-dicarboxylat-Ring als *warhead* entworfen, synthetisiert und als selektive Inhibitoren der parasitären Cathepsin-L ähnlichen Cysteinprotease LmCPB2.8 von *Leishmania mexicana* identifiziert. Parasitäre und humane Cathepsin-L ähnliche Cysteinproteasen sind sich strukturell sehr ähnlich, sodass die Herausforderung in der Selektivitätssteigerung der entwickelten Inhibitoren bestand.

Das Ziel dieser Arbeit war es, Struktur-Wirkungsbeziehungen mithilfe von computergestützten Verfahren wie *Homology Modelling* (MOE2015, da für die LmCPB2.8 noch keine Kristallstruktur vorhanden ist) und Molekularem Docking (FlexX/LeadIT) zur Vorhersage der Bindungsposen in Cruzain und LmCPB2.8 aufzustellen. Die S2-Bindetasche der LmCPB2.8 scheint im Gegensatz zu Cruzain sterisch anspruchsvollere, lipophile Estergruppen zu tolerieren. Die Überlagerung der Aminosäure-Sequenzen der beiden Enzyme zeigt einen signifikanten Unterschied in der S2-Bindetasche aufgrund des Vorhandenseins von Tyr²⁰⁹ in LmCPB2.8 anstelle von Glu²⁰⁸ in Cruzain. Desweiteren sagen Docking-Berechnungen eine starke, ionische Wechselwirkung zwischen der freien Carboxylgruppe am Aziridin-Ring und dem positiv-geladenen His²⁶³ im katalytischen Zentrum von LmCPB2.8 voraus, was in Übereinstimmung mit den biologischen Daten ist (**PF18**, LmCPB2.8 ($K_i = 0.41 \mu\text{M}$; $k_{2\text{nd}} [\text{M}^{-1} \text{min}^{-1}] = 190,569$).¹

Computergestützte Struktur-Wirkungsbeziehungen dieser Arbeit sind in Übereinstimmung mit den experimentell bestimmten Hemmdaten der *Leishmania*-selektiven PF-Inhibitoren, sodass diese als Kandidaten zur weiteren Strukturoptimierung dienen können. Die Ergebnisse dieser Arbeit wurden kürzlich veröffentlicht (Fey P., Chartomatsidou R., Kiefer W., Mottram J.C., Kersten C., Schirmeister T., New aziridine-based inhibitors of cathepsin L-like cysteine proteases with selectivity for the *Leishmania* cysteine protease LmCPB2.8. *Eur J Med Chem* **2018**, 156, 587-597).



Danksagung

Als erstes möchte ich mich ganz herzlich bei [REDACTED] für das Bereitstellen eines anspruchsvollen, interessanten Forschungsthemas für meine Dissertation bedanken. Ihrer exzellenten Betreuung und herausragenden Unterstützung während meiner besonderen persönlichen Situation habe ich zu verdanken, dass ich meine Dissertation in einem außerordentlich angenehmen Arbeitsklima fertig stellen konnte.

Weiterhin möchte mich bei [REDACTED] recht herzlich bedanken, dass er seit meiner Diplomarbeit stets ein offenes Ohr für wissenschaftliche und zwischenmenschliche Angelegenheiten hatte und mich während der ganzen Jahre stets motivierte und unterstützte.

Vielen lieben Dank an [REDACTED] für Ihre tolle Einführung in das komplexe Themengebiet des computerbasierten Wirkstoffdesigns und insbesondere [REDACTED] für seine hervorragende Unterstützung hierbei und bei allen aufkommenden Fragen.

Außerdem bedanke ich mich bei [REDACTED] für ihre Unterstützung bei der Durchführung der Enzym-Assays. Weiterhin möchte ich mich bei den Mitarbeitern und Kollegen für die hervorragende Zusammenarbeit bei der Betreuung des 1. Semesters bedanken: [REDACTED]

Für das sehr angenehme Arbeitsklima, die tolle Zusammenarbeit und die lustigen Abende möchte ich mich bei allen ehemaligen und aktuellen Mitgliedern des Arbeitskreises herzlich bedanken: [REDACTED]

Unseren Kooperationspartner [REDACTED] (Universität Würzburg) danke ich für die QM/MM-Berechnungen und [REDACTED] (University of Glasgow) für die Bereitstellung der *Leishmania*-Protease und die Zusammenarbeit zur Erstellung des Papers.

Ganz herzlich möchte ich mich außerdem bei der [REDACTED] für mein zweijähriges Forschungsstipendium bedanken.

Ein ganz großes Dankeschön geht an meine Familie und Freunde, die mich in den letzten Jahren so sehr unterstützt haben und immer für mich da waren, ohne euch wäre das alles nicht möglich gewesen!

Meinem Sohn [REDACTED] danke ich von Herzen, dass er mir jeden Tag aufs Neue soviel Kraft und Liebe schenkt!

... für [REDACTED]

Inhaltsverzeichnis

Declaration of Authorship	i
Abstract	v
Zusammenfassung	vii
Danksagung	x
1. Einleitung	1
1.1 <i>Proteasen als drug targets</i>	1
1.2 <i>Klassifizierung von Proteasen</i>	1
1.3 <i>Cysteinproteasen</i>	3
1.3.1 <i>Humane Cystein-Cathepsine</i>	3
1.3.2 <i>Cathepsin B und seine Rolle in der Krebs-Therapie</i>	4
1.3.3 <i>Parasitäre Cysteinproteasen</i>	5
1.3.4 <i>Cysteinproteasen der Leishmaniose</i>	5
1.4 <i>Struktur- und Substratspezifität der Papain-ähnlichen Cysteinproteasen</i> <i>(Clan CA, Familie C1)</i>	7
1.4.1 <i>Struktur von humanem Cathepsin B</i>	10
1.4.2 <i>Kovalente Inhibitoren von Cathepsin B</i>	11
1.5 <i>Katalysemechanismus von Cysteinproteasen</i>	15
1.6 <i>Cysteinprotease-Inhibitoren</i>	17
1.6.1 <i>Bindungskinetik von kovalenten Inhibitoren</i>	18
1.6.2 <i>Kovalente Hemmstoffe</i>	19
1.7 <i>Aziridin-2,3-dicarboxylat-basierte, irreversible Cysteinprotease-Inhibitoren</i>	23
1.8 <i>Strukturbasiertes Drug Design von kovalenten Inhibitoren</i>	26
1.8.1 <i>Molekulares Docking von kovalenten Inhibitoren</i>	27
1.8.2 <i>Molekulares Docking mit FlexX</i>	29
2. Zielsetzung	31
3. Ergebnisse und Diskussion	34

3.1	<i>Strukturbasiertes Drug Design, Synthese und Testung potentieller Aziridin-2,3-dicarboxylat-basierter Cysteinprotease-Inhibitoren gegen Cathepsin B</i>	35
3.2	<i>Molekulares Docking und Struktur-Wirkungsbeziehungen Leishmania-selektiver Aziridin-2,3-dicarboxylat-basierter Cysteinprotease-Inhibitoren</i>	49
4.	Synthetischer Teil	65
4.1	<i>Synthese der trans-konfigurierten Aziridin-2,3-dicarboxylate</i>	66
4.2	<i>Synthese von cis-konfigurierten Aziridin-2,3-dicarboxylaten</i>	70
4.3	<i>Synthese des Dipeptids (S)-Ile-(S)-Pro</i>	71
4.4	<i>Synthese des Oxalyl-Linkers und Peptidkupplung mit dem Dipeptid</i>	72
4.5	<i>Acylierung der trans-konfigurierten Aziridin-2,3-dicarboxylate</i>	73
4.6	<i>Hydrogenolyse der Zielverbindungen</i>	75
5.	Ergebnisse der Enzym-Assays	78
6.	Untersuchung der Stabilität der Zielverbindungen im enzymatischen Puffer-Milieu	83
7.	Zusammenfassung und Ausblick	85
8.	Experimenteller Teil	91
8.1	<i>Messgeräte und verwendete Chemikalien</i>	91
8.2	<i>Fluorimetrische Enzymassays</i>	93
8.3	<i>Allgemeine synthetische Methoden</i>	94
8.4	<i>Synthetisierte Verbindungen</i>	98
9.	Appendix	141
9.1	<i>Übersicht Zielverbindungen</i>	141
9.2	<i>Übersicht PF-Inhibitoren</i>	142
9.3	<i>Abkürzungsverzeichnis</i>	143
9.4	<i>Literaturverzeichnis</i>	146

1. Einleitung

1.1 Proteasen als *drug targets*

Das menschliche Genom besteht aus mindestens 569 Proteasen, darunter sind 176 Serin-, 150 Cystein-, 28 Threonin- und 21 Aspartatproteasen. Neben ihrer Funktion als Protein-degradierende Enzyme spielen Proteasen eine essentielle Rolle bei der Kontrolle vieler physiologischer Schlüsselprozesse, wie der Zellzyklus-Regulierung, DNA-Replikation, DNA-Transkription, Blutgerinnung, Angiogenese, Gewebe-Remodeling, Apoptose und der Immunantwort.² Eine übermäßige Proteolyse und Überexprimierung von bestimmten Proteasen ist die Ursache vieler Krankheiten, wie Krebs, Arthritis, Asthma, Alzheimer, Herz-Kreislauf- und Atemwegserkrankungen.^{3,3} Eine Reihe viraler und parasitärer Erkrankungen, wie HIV, Malaria, Leishmaniose und Schistosomiasis, gehen einher mit einer gestörten Proteolyse.^{5,6}

Die ersten erfolgreichen Protease-Inhibitoren gegen die HIV-Protease (Amprenavir) und das Angiotensin-konvertierende Enzym (Captopril) kamen Ende der 70er Jahre auf dem Markt und waren der Durchbruch für die Entwicklung von Protease-Inhibitoren als therapeutische Wirkstoffe.^{7,8} Eine Reihe weiterer Proteasen wurden mittlerweile als attraktive *drug targets* identifiziert, u.a. Caspasen (Rheuma), Hepatitis C NS3/4a-Protease, Dipeptidylpeptidase (DPP-IV, Diabetes), Thrombin (Thromboembolie), Renin (Hypertension), Proteasom (Krebs), Matrix-Metalloproteasen (MMP; Krebs), Cathepsin K (Osteoporose) und Cathepsin B (Krebs). Zurzeit sind mehrere potentielle Protease-Inhibitoren der obengenannten Proteasen in klinischen Phasen.^{4,9-11,12-15}

1.2 Klassifizierung von Proteasen

Im EC (*Enzyme Commission*) – System, eingeführt durch das NC-IUBMB (*Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology*) werden Enzyme anhand der von ihnen katalysierten Reaktion in folgende 6 Hauptklassen eingeteilt: Oxidoreduktasen (EC 1), Transferasen (EC 2), Hydrolasen (EC 3), Lyasen (EC 4), Isomerasen (EC 5) und Ligasen (EC 6).¹⁶ Proteasen sind Hydrolasen und gehören zur Unterklasse der Peptidasen (EC-3.4). Weiterhin unterscheidet man zwischen Endopeptidasen (EC 3.4.21-99) und Exopeptidasen (EC 3.4.11-19). Endopeptidasen spalten an spezifischen Stellen innerhalb der Peptidkette, während bei Exopeptidasen die Spaltung entweder am C-Terminus (Carboxypeptidase) oder am N-Terminus (Aminopeptidase) stattfindet.

Eine weitere Unterteilung erfolgt nach den unterschiedlichen zugrundeliegenden Katalysemechanismen. 1993 wurde von *Rawlings und Barrett* das MEROPS-System (<http://merops.sanger.ac.uk/>) eingeführt, welches Enzyme anhand ihrer strukturellen und

evolutionären Gemeinsamkeiten klassifiziert.¹⁷ Der Aufbau ihres aktiven Zentrums und der damit verbundene Katalysemechanismus unterteilt Enzyme in folgende Hauptklassen: Aspartat- (A), Cystein- (C), Serin- (S), Glutamat- (G), Metallo- (M) und Threoninproteasen (T). Aspartat-, Glutamat- und Metalloproteasen nutzen ein aktiviertes Wassermolekül als Nucleophil zum Angriff der Peptidbindung, während bei Cystein-, Serin- und Threoninproteasen die entsprechende Aminosäure im aktiven Zentrum als Nucleophil dient (Kapitel 1.5). Cysteinproteasen (EC 3.4.22) werden aufgrund ihres evolutionären Ursprungs in 9 Clans (CA, CB, CD, CF, CL, CM, CN, CO, CP) unterteilt. Die Clans werden basierend auf Homologien in der Aminosäuresequenz und Tertiärstruktur in 61 Familien und 21 Subfamilien unterteilt.^{18,19} (Tabelle 1)

Tabelle 1 : Einteilung der Cysteinproteasen nach MEROPS¹⁸

Clan	Familie	Enzym-Prototyp	Relevante Proteasen
CA	C1 (CL-ähnlich)	Papain	Papain, CL, Cruzipain, Falcipain 1-3, Rhodesain, LmCPA, LmCPB
	C1 (CB-ähnlich)	Cathepsin B	CB, TbCatB, LmCPC
	C2	Calpain 2	Calpaine 1-15
	C10	Streptopain	Streptopain
	C16	SARS CoV PL	SARS CoV PL
CD	C11	Clostripain	Clostripain
	C14	Caspase 1	Caspase 1-14
CL	C60	Sortase	Sortase A, B
CM	C18	HCV Peptidase 2	HCV Peptidasen
PA	C30	TGEV-M ^{Pro}	TGEV-M ^{Pro} , SARS-CoV-M ^{Pro}

CL = Cathepsin L, CB = Cathepsin B, LmCPA-CPC = *Leishmania mexicana* CPA-CPC, TbCatB = *Trypanosoma brucei* Cathepsin B, SARS = *severe acute respiratory syndrome corona virus*, HCV = Hepatitis-C Virus, TGEV = *transmissible gastroenteritis virus*

Die Papain-ähnlichen Cysteinproteasen der Familie C1 (Clan CA) umfassen die 11 humanen Cystein-Cathepsine (Cathepsin B, C, F, H, K, L, O, S, V, W und X) und wichtige parasitäre Cysteinproteasen, wie Cruzipain aus *Trypanosoma cruzi* (Chagas-Krankheit), Rhodesain aus *Trypanosoma brucei rhodesiense* (Afrikanische Schlafkrankheit), Falcipain aus *Plasmodium falciparum* (Malaria) und LmCPB2.8 aus *Leishmania mexicana* (Leishmaniose).²⁰⁻²⁴ Aufgrund von strukturellen Gemeinsamkeiten werden humane und parasitäre Cysteinproteasen der Familie C1A weiterhin in Cathepsin B- und Cathepsin L-ähnliche Cysteinproteasen eingeteilt (siehe Kapitel 1.4).

1.3 Cysteinproteasen

Die Papain-ähnlichen Cysteinproteasen (Clan CA, Familie C1), sowohl humanen als auch parasitären Ursprungs gelten aufgrund ihrer Schlüsselfunktion in vielen physiologischen und pathologischen Prozessen als vielversprechende *drug targets* in der Wirkstoffentwicklung.

1.3.1. Humane Cystein-Cathepsine

Zu den 11 humanen Papain-ähnlichen Cystein-Cathepsinen gehören die Cathepsine B, H, L, S, C, K, O, F, V, X und W. Sie haben ihren Namen aus dem griech. *kathepsin* („verdauen“) erhalten und ihre primäre Funktion ist es, aktiviert im leicht sauren Milieu der Lysosomen, für den nicht-selektiven Proteinabbau zu sorgen. Heute zählt man neben den lysosomalen Cystein-Cathepsinen auch die Serin-Proteasen, Cathepsin A und G, und die Aspartat-Proteasen, Cathepsin D und E, zu den Cathepsinen.^{25,26}

Cathepsine werden als inaktive Präproenzyme an den Ribosomen exprimiert. Sie bestehen aus einem Signalpeptid (15-21 AS), einem Propeptid (41-251 AS) und einer katalytisch-aktiven Domäne (214-260 AS). Das Signalpeptid sorgt für die Translokation in das Endoplasmatische Retikulum, wo es unter Bildung des inaktiven Procathepsins abgespalten wird. Das Procathepsin wird als nächstes im Golgi-Apparat an zwei Asparagin-Resten glykosyliert und zu den Lysosomen transportiert, wo die Aktivierung des Enzyms unter Abspaltung des Propeptids stattfindet. Zur Aktivierung gibt es zwei Möglichkeiten: Die autokatalytische, proteolytische Abspaltung des Propeptids unter den sauren Bedingungen des Lysosoms oder die Aktivierung durch ein anderes Cathepsin (im Fall von Cathepsin B durch Cathepsin D oder G).²⁷

Es ist mittlerweile belegt, dass Cathepsine unter bestimmten physiologischen und pathologischen Bedingungen auch außerhalb der Lysosomen zu finden sind und dort an spezifischen Zell-Prozessen, wie der Antigen-Präsentation, dem Knochenumbau, der Hormonreifung und dem Protein-Abbau von Komponenten der extrazellulären Matrix beteiligt sind (siehe Tabelle 2).^{28,29,30} Eine Überexprimierung der beteiligten Cathepsine und ihre Proteolyse-Aktivität im extrazellulären Raum ist die Ursache einer Reihe von degenerativen, invasiven und Immunsystem-betreffenden Erkrankungen. Damit dienen humane Cystein-Cathepsine, insbesondere die Cathepsine B, L und K, als attraktive *drug targets* für Erkrankungen, wie Krebs, Osteoporose, Arthritis, Alzheimer und Arteriosklerose.^{11,14,26,30-32}

Tabelle 2: Physiologische Rolle humaner Cystein-Cathepsine¹⁴

Physiologische Rolle	Beteiligte Cathepsine
Protein-Abbau/ -Umsatz	Cathepsin B, L und H
Knochenumbau	Cathepsin K
Proenzym-Aktivierung	Cathepsin B und C
Hormonreifung	Cathepsin B und L
Epidermale Homöostase	Cathepsin L
Antigen-Präsentation / -Prozessierung	Cathepsin V, L, S, und F

1.3.2. Cathepsin B und seine Rolle in der Krebs-Therapie

Cathepsin B ist an der Invasion und Metastase von verschiedenen Krebs-Tumoren, wie Brust-, Lungen-, Gehirn-, Prostata-, Magen- und Bauchspeicheldrüse-Krebs, beteiligt.³³⁻³⁶ Unter Metastase versteht man das Ablösen einzelner Krebszellen vom primären Tumor, das Durchdringen der extrazellulären Matrix (EZM) und die anschließende Anreicherung in anderen Körperregionen. Tumorzellen weisen im Vergleich zu normalen Zellen eine leicht saure extrazelluläre Umgebung auf, was die vermehrte Ausscheidung von Cathepsin B in den extrazellulären Raum begünstigt. Zum einen ist Cathepsin B aktiv an der Proteolyse und dem Abbau von extrazellulären Membran-Proteinen (Kollagen, Glykoproteine und Elastin) beteiligt und fördert somit die Invasion und Metastase von Krebszellen. Zum anderen aktiviert es die Serin-Protease Prourokinase (pro-uPA), welche eine proteolytische Kaskade unter Bildung von aktivem Plasminogen einleitet, das wiederum für den Abbau der extrazellulären Membran verantwortlich ist. Weiterhin ist Cathepsin B bei der Angiogenese von Gehirn-Tumoren beteiligt, wo es Matrix-Metalloprotease-Inhibitoren zerstört und somit den Abbau der EZM beschleunigt. Die Malignität geht mit einer Überexprimierung, Sekretion oder Membran-Assoziation von Cathepsin B einher, sodass in Tumorzellen ein 4 bis 30 Mal erhöhtes Level an Cathepsin B im Membranplasma nachweisbar ist. Cathepsin B dient somit als prognostischer Indikator für verschiedene invasive Krebsarten und als *drug target* gegen die Metastase und Angiogenese von Krebszellen.^{34,37,35,38-40}

1.3.3. Parasitäre Cysteinproteasen

Papain-ähnliche Cysteinproteasen kommen in vielen parasitären Erregern, wie Plasmodien, Trypanosomen oder Leishmanien, vor und erfüllen dort wichtige Schlüsselfunktionen im Lebenszyklus der protozoischen Parasiten.²⁴ Zu den wichtigsten parasitären Cysteinproteasen zählen Cruzain aus *Trypanosoma cruzi*, Rhodesain aus *Trypanosoma brucei*, Falcipain aus *Plasmodium falciparum* und LmCPB2.8 aus *Leishmania mexicana*. Experimentelle Studien mit Cysteinprotease-Inhibitoren an *Trypanosoma cruzi* führten zum Absterben der Trypanosomen durch Verhinderung der Zymogen-Prozessierung und zur Heilung von Infektionen *in vivo*, sodass man parasitäre, trypanosomale Cysteinproteasen als validierte *drug targets* einstufen kann.^{41,42,43}

Tabelle 3: Parasitäre Cysteinproteasen, ihre Erreger und verursachte Infektionen

Cysteinprotease	Erreger	Krankheit
Cruzain	<i>Trypanosoma cruzi</i>	Chagas-Krankheit
Rhodesain	<i>Trypanosoma brucei</i>	Afrikanische Schlafkrankheit
Falcipain	<i>Plasmodium falciparum</i>	Malaria
LmCPB2.8	<i>Leishmania mexicana</i>	Leishmaniose

1.3.4. Cysteinproteasen der Leishmaniose

Leishmaniose gehört, neben der Chagas-Krankheit und der Afrikanischen Schlafkrankheit, zu den sogenannten *neglected tropical diseases* (NTD), und kann durch Protozoeninfektion von über 17 verschiedenen Spezies des Parasiten *Leishmania* ausgelöst werden.^{44,45} Laut Schätzungen der *World Health Organization* (WHO) verursacht die Leishmaniose weltweit jährlich etwa 1,5 Millionen kutane und 0,5 Millionen viszerale Infektionen, von denen mehrere Hunderttausende tödlich enden. Risikogebiete sind vor allem arme, tropische und subtropische Gebiete wie Afrika, Südostasien, Indien und Lateinamerika, wobei in den letzten Jahren auch der Mittelmeerraum vermehrt betroffen wurde. Übertragen wird die Infektion durch den Stich weiblicher Sandmücken, wo die Parasiten als begeißelte Promastigoten im Darm des Vektors vorliegen, während sie in Säugerzellen als intrazelluläre Amastigoten in den Makrophagen lokalisiert sind.⁴⁶ Aktuell besteht die Behandlung der Leishmaniose aus Antimon(V)-haltigen Arzneistoffen (PentostamTM und Glucantime), Amphotericin B und Pentamidin. Hohe Toxizität, schwere Nebenwirkungen und vermehrte Resistenzbildung gehen mit der Behandlung einher, sodass nach Alternativen gesucht werden muss. Vielversprechend ist bei einer Antimonresistenz zurzeit die alternative Chemotherapie mit Miltefosine, einem Hexadecylphosphocholin, mit dem in der Klinischen Phase 3 282 aus 299 Patienten (94%) erfolgreich behandelt werden konnten.⁴⁷ In Indien ist Miltefosine seit März 2002 zugelassen, wo es über 700 Betroffene heilen konnte, in anderen betroffenen Regionen muss seine Wirkung noch getestet werden.⁴⁷ Das Problem der

Teratogenität ist allerdings wie bei den bisherigen Arzneistoffen immer noch vorhanden. Die Entwicklung von neuartigen Wirkstoffen gegen die Leishmaniose konzentriert sich auf die Hemmung von essentiellen *Leishmania*-Proteasen, wie Cysteinproteasen oder Kinasen, die durch Genmanipulationsversuche und experimentelle Studien mit dem Cysteinprotease-Inhibitor K11777 als potentielle *drug targets* validiert worden sind.^{45,48,49}

Im Genom der Gattung *Leishmania major* wurden 65 Cysteinproteasen identifiziert, von denen drei Cysteinproteasen aus der Papain-Familie sind und Schlüsselfunktionen im Lebenszyklus des Parasiten besitzen: CPA, CPB und CPC.⁵⁰ CPA und CPB sind Cathepsin-L-ähnliche Cysteinproteasen, während CBC eine Cathepsin-B-ähnliche Cysteinprotease ist. Die Cysteinprotease-Gruppe CPB, welche aus einem Tandem-Array aus 18 ähnlichen Genen besteht, scheint dabei die Entscheidende für die Infektiosität zu sein. CPB1 und CPB2, die ersten zwei Gene des Tandem-Arrays, werden während der Infektion exprimiert und verbleiben in den intrazellulären Amastigoten. Mutationsstudien belegen zudem, dass eine Ausschaltung der CPB-Gene die Infektion-begünstigende Th2- zu einer Th1-Immunantwort des Wirtes verschiebt und die Virulenz somit reduziert wird.⁵¹ Obwohl noch nicht alle Funktionen der Cysteinproteasen in den *Leishmania*-Erregern verstanden sind, sind sie als kritische Virulenzfaktoren der Infektion anzusehen, was sie zu attraktiven *drug targets* zur Bekämpfung der Leishmaniose macht.

Von den *Leishmania*-Cysteinproteasen existiert noch keine Kristallstruktur, allerdings zeigt die rekombinante Form CPB2.8 Δ CTE der *L. mexicana* (ohne C-terminale Verlängerung) eine hohe Sequenzähnlichkeit mit anderen Cathepsin-L-ähnlichen parasitären Cysteinproteasen der Papain-Familie.^{46,52} Die höchste Sequenzähnlichkeit besteht mit 74 % zu Cruzain, sodass zum strukturbasierten Ligandendesign ein computergestütztes Homologiemodell für die *Leishmania*-Cysteinprotease LmCPB2.8 basierend auf ihrer Protein-Sequenz und der Kristallstruktur von Cruzain erstellt werden kann (siehe Kapitel 3.2).

1.4 Struktur- und Substratspezifität der Papain-ähnlichen Cysteinproteasen (Clan CA, Familie C1)

Die Kristallstruktur von Papain, welches 1879 aus der Papaya-Frucht *Carica papaya* isoliert wurde, gehört zu den ersten Cysteinprotease-Strukturen, die aufgeschlüsselt wurden und dient als Prototyp für die Analyse der Struktur von Cysteinproteasen.⁵³ Anhand seiner 3D-Struktur haben *Schechter und Berger* eine gleichnamige Nomenklatur für Substratreste (P) und die entsprechenden Bindestellen im Enzym (S) eingeführt. Dazu werden die Aminosäuren des Substrats bzw. des Inhibitors in der Bindetasche ausgehend von der Spaltstelle in Richtung C-Terminus mit P_1' - P_n' (*primed site*) und in Richtung N-Terminus mit P_1 - P_n (*non-primed site*) bezeichnet. Die dazu entsprechenden Bindestellen im Enzym werden mit S_1' - S_n' bzw. S_1 - S_n gekennzeichnet (Abbildung 1).⁵⁴

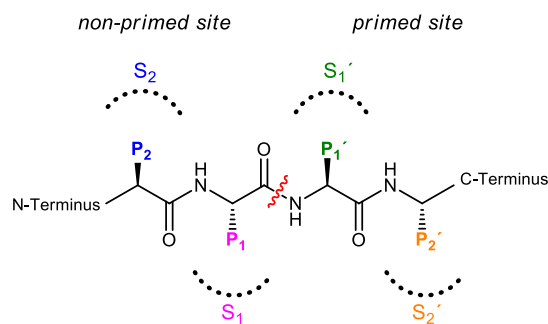


Abbildung 1: Nomenklatur nach *Schechter und Berger*⁵⁴

Die Überlagerung der Kristallstrukturen von neun Cystein-Cathepsinen (CB, CL, CK, CH, CX, CV, CC, und CF) zeigt eine hohe Konservierung ihrer katalytisch-aktiven Diade, bestehend aus dem Ionenpaar Cys²⁵ und His¹⁶³ (CL-Nummerierung).³⁰ Cathepsin L, welches als Enzym-Prototyp für Cystein-Cathepsine mit Endopeptidase-Aktivität dient, zeigt hohe Sequenz- und Strukturhomologie mit Papain. Cystein-Cathepsine zeigen die typische Papain-Faltung, die aus einer R- (*right*) und einer L-Domäne (*left*) besteht. Zwischen den beiden Domänen, die sich nach oben hin aufspalten, ist das aktive Zentrum lokalisiert. Das katalytisch-aktive Cys²⁵ befindet sich am N-Terminus der zentralen Helix der L-Domäne, während His¹⁶³ innerhalb des β -Faltblatts in der R-Domäne lokalisiert ist (siehe Abbildung 2). Das Substrat bindet entlang des aktiven Zentrums und seine Seitenketten belegen die *primed*- und *non-primed site*.

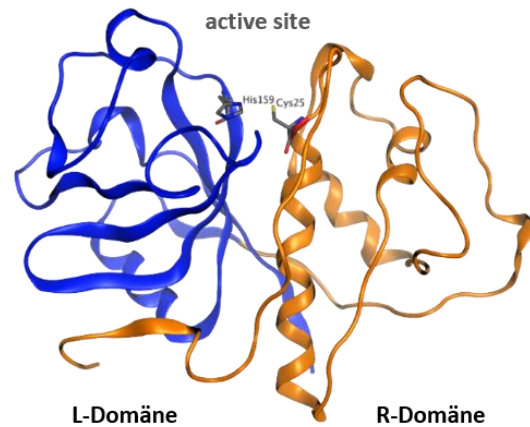


Abbildung 2: Kristallstruktur von Papain (pdb: 1PPN),⁵⁵ mit MOE2015 erstellt

Die humanen und parasitären Papain-ähnlichen Cysteinproteasen der C1-Familie werden aufgrund ihrer Strukturhomologien in zwei Gruppen unterteilt: die Cathepsin L- und Cathepsin B-ähnlichen Cysteinproteasen. Zu den Cathepsin L-ähnlichen Proteasen zählen die Cystein-Cathepsine mit reiner Endopeptidase-Aktivität (Cathepsin L, F, K, S und V) und die parasitären Cysteinproteasen LmCPB2.8, Rhodesain, Cruzain und Falcipain. Humane und parasitäre, Cathepsin L-ähnliche Cysteinproteasen zeigen eine hohe Konservierung in ihrer Aminosäuresequenz und 3D-Struktur, was für das Design von selektiven Inhibitoren eine Herausforderung darstellt. Eine Überlagerung ihrer Kristallstrukturen zeigt, dass die höchste Similarität zwischen humanem Cathepsin L und Cruzain besteht (RMSD: 1.37 Å). Die parasitären Cysteinproteasen Cruzain und Rhodesain sind sich mit einem RMSD-Wert von 0.84 Å erwartungsgemäß strukturell am ähnlichsten (siehe RMSD-Matrix, Abbildung 3).



Abbildung 3: Alignment von Cathepsin L (blau, pdb: 2XU1), Rhodesain (orange, pdb: 6EX8), Cruzain (violett, pdb: 3KKU) und Falcipain (grau, pdb: 1YVB), RMSD-Matrix aus den Überlagerungen der einzelnen Kristallstrukturen, mit MOE2015 erstellt

Cathepsin B-ähnliche Proteasen weisen im Gegensatz zu den Cathepsin L-ähnlichen ein zusätzliches Strukturelement im aktiven Zentrum auf, welches die Substratspezifität bestimmt und für die Exopeptidase-Aktivität verantwortlich ist (Abbildung 4). Cathepsin B und H zeigen sowohl Endo- als auch Exopeptidase-Aktivität, während Cathepsin C und X reine Exopeptidasen darstellen.¹⁴ In den Aminopeptidasen, Cathepsin H und Cathepsin C, blockieren Fragmente aus ihrer Proregion den Zugang zur *primed* bzw. *non-primed site*, sodass die negative Ladung einer zusätzlich eingeschobenen Aminosäure den *N*-Terminus des Substrats angreifen kann. In Cathepsin X und B sorgt ein flexibler *occluding loop* dafür, dass die *primed site* nur teilweise für Substrate zugänglich ist und positiv geladene Histidinreste können den *C*-Terminus des Substrats angreifen.²⁸

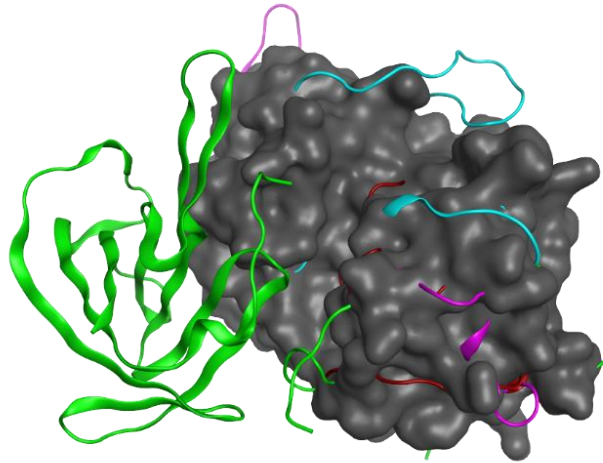


Abbildung 4: Alignment von Cathepsin L (Surface in grau, pdb: 2XU1⁵⁶), Cathepsin B (türkis, pdb: 3A18⁵⁷), Cathepsin H (rot, pdb: 1NB5⁵⁸), Cathepsin C (grün, pdb: 3PDF) und Cathepsin X (magenta, pdb: 1EF7⁵⁹), erstellt mit MOE2015

Zu den Cathepsin B-ähnlichen Cysteinproteasen zählen neben dem humanen Cathepsin B, welches als Prototyp gilt, auch die parasitären Cysteinproteasen TbCatB aus *T. brucei* und LmCPC aus *Leishmania mexicana*.^{60,61} Wie bei den Cathepsin L-ähnlichen Cysteinproteasen sind die Proteasestrukturen von humanem Cathepsin B (pdb: 3A18)⁵⁷ und parasitärem TbCatB (pdb: 3HHI)⁶² stark konserviert (siehe Alignment, Abbildung 5).

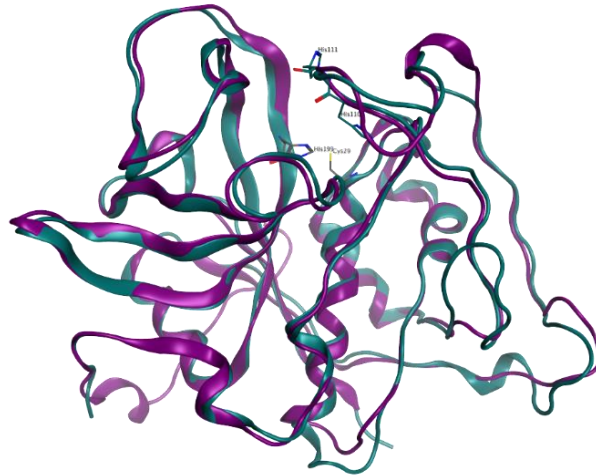


Abbildung 5: Alignment von TbCatB (violett, pdb: 3HHI) und humanem Cathepsin B (türkis, pdb: 3AI8), RMSD: 1.37 Å, erstellt mit MOE2015

1.4.1. Struktur von humanem Cathepsin B

Cathepsin B (EC 3.4.22.1) wird auf dem Rauhen Endoplasmatischen Retikulum (RER) als Präproenzym aus 339 Aminosäuren und einem Signalpeptid aus 17 Aminosäuren synthetisiert.^{30,31} Cathepsin B hat eine duale Funktion und kann je nach pH-Wert sowohl Endopeptidase- als auch als Carboxydipeptidase-Aktivität zeigen. Dafür verantwortlich ist ein unter den Cystein-Cathepsinen einzigartiges Strukturelement, der sogenannte *occluding loop*. Er befindet sich oberhalb der *primed site S2'* (AS 110-126, CB-Nummerierung) und besitzt zwei protonierte Histidine (His¹¹⁰ und His¹¹¹), welche die freie C-terminale Carboxylgruppe eines Substrates binden können. Seine duale Funktion wurde durch Mutationsstudien belegt, bei denen der *occluding loop* „gelöscht“ wurde und damit auch seine Exopeptidase-Aktivität verloren ging.^{37,63} Bei saurem pH-Wert blockiert der *occluding loop* in seiner geschlossenen Konformation den Zugang für Substrate zum aktiven Zentrum, sodass nur ein Angriff auf den Carboxy-Terminus des Substrats möglich ist.^{33,64} Bei neutralem oder höherem pH-Wert ist der loop flexibler, sodass Substrate einfacher in das aktive Zentrum gelangen können und somit die Endopeptidase-Aktivität wieder gewährleistet werden kann.⁶⁵ Der Grund für diesen Zusammenhang zwischen pH-Wert und den verschiedenen Positionierungen des *loops* liegt vermutlich an der Existenz eines Ionenpaars aus Asp²²-His¹¹⁰ im sauren Milieu. Durch die ausgebildete Salzbrücke zwischen Asp²² und His¹¹⁰ wird die geschlossene Konformation des *loops* stabilisiert und somit die Exopeptidase-Aktivität begünstigt.⁶⁶ Die Konformation der Schleife ist neben dem pH-Wert auch von der Art und Größe des gebundenen Inhibitors abhängig (siehe Kapitel 3.1).^{67,68}

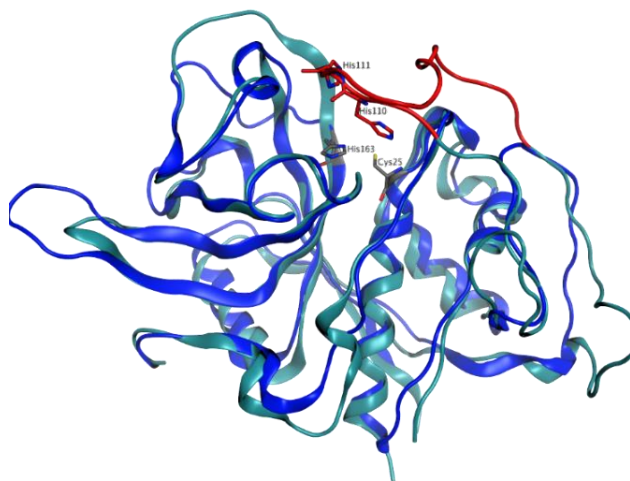


Abbildung 6: Überlagerung von Cathepsin B (türkis, pdb: 1QDQ)⁶⁹ und Cathepsin L (blau, pdb: 2XU3)⁵⁶, *occluding loop* aus His¹¹⁰ und His¹¹¹ (rot), katalytische Diade Cys²⁵/His¹⁶³ (grau, CL-Nummerierung), erstellt mit MOE2015

Die Adressierung des *occluding loops* in Cathepsin B als spezifisches Strukturelement unter den Cysteinproteasen führte zum Design von CB-spezifischen Epoxid-basierten Inhibitoren mit hoher Selektivität innerhalb der Papain-ähnlichen Cysteinproteasen.⁷⁰⁻⁷²

1.4.2. Kovalente Inhibitoren von Cathepsin B

Ausgehend von der natürlichen Leitstruktur E64, einem irreversiblen, nicht-spezifischen Cysteinprotease-Inhibitor, wurden eine Reihe von Epoxid-basierten Inhibitoren mit CB-Selektivität entwickelt: E64c, CA030, CA074 und NS-134.⁷³⁻⁷⁵ Durch Analyse ihrer Kristallstrukturen wurde ihr Bindungsmodus aufgeklärt und Struktur-Wirkungsbeziehungen aufgestellt. Die Kristallstruktur von CA030 komplexiert mit Cathepsin B zeigt, dass die Peptid-Einheit des Inhibitors entlang der *primed site* in gleicher Orientierung wie das Substrat bindet. Im Gegensatz dazu belegt die peptidische Einheit von E64 und des CB-Propeptids die *non-primed site* von Cathepsin B. Um die Spezifität und Affinität zu steigern, durch Belegung sowohl der *primed* als auch der *non-primed site*, wurden am *trans*-konfigurierten Epoxid-Ring an beiden Carbonylgruppen peptidische Erkennungseinheiten eingeführt.

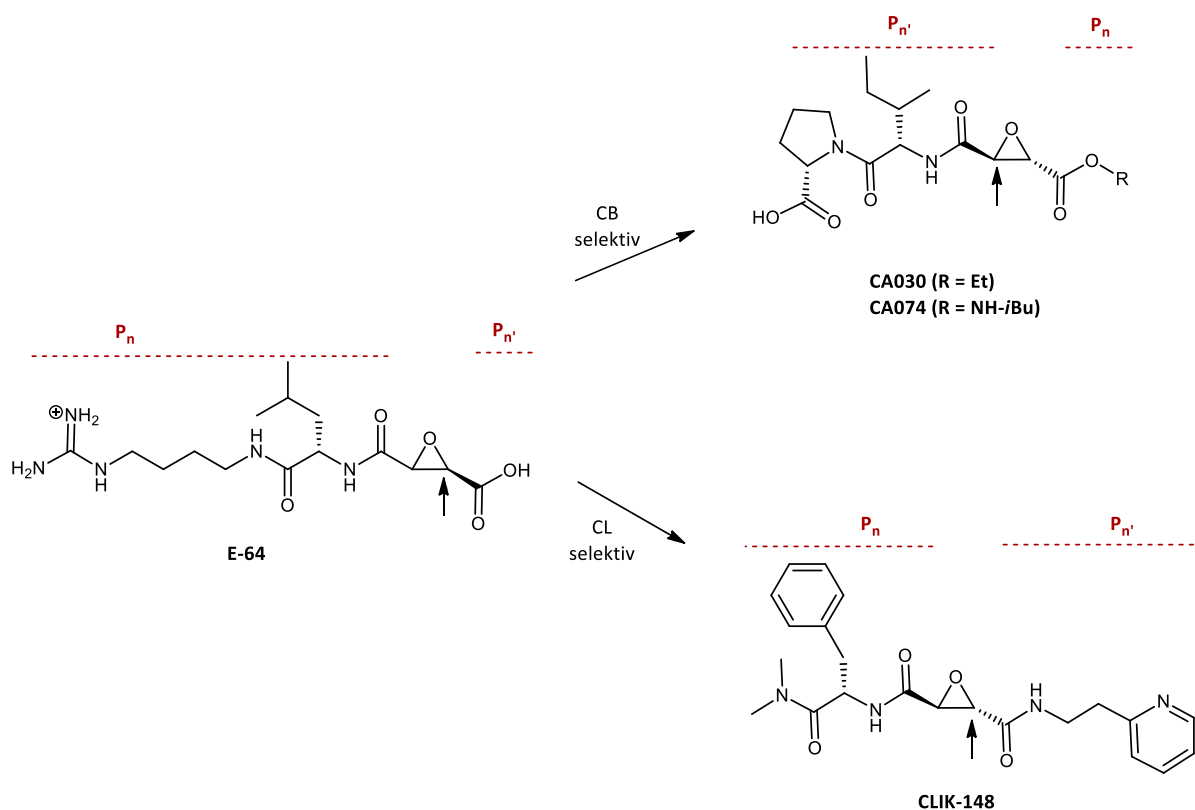


Abbildung 7: Cathepsin B- und Cathepsin L-spezifische Epoxidbasierte-Inhibitoren ausgehend vom Naturstoff E-64: CA030, CA07 und CLIK-148⁷⁵⁻⁷⁷, Bindetaschen sind in rot angedeutet; schwarze Pfeile markieren das Kohlenstoffatom, welches vom Cystein angegriffen wird

NS-134 ist ein solcher CB-selektiver Inhibitor (pdb: 1SP4, Abbildung 8) mit zwei Kopfgruppen am *trans*-konfigurierten Epoxid-Ring, die das aktive Zentrum entlang den Bindestellen S4 bis S2' bindet.⁷³ Das terminale Prolin bindet in der S2'-Bindestelle und adressiert mittels ionischer Wechselwirkungen die zwei protonierten Histidine His¹¹⁰ und His¹¹¹ des CB-spezifischen *occluding loops*. Die Leucin-Gruppe an Position P1' belegt die hydrophobe S1'-Tasche, wo sie mit Trp²²¹ und Gly¹⁹⁸ H-Brücken bildet. Der Austausch von Isoleucin (in CA030 und CA074) gegen Leucin (in NS-134) an der P1'-Stelle hat keine Auswirkungen auf den Bindungsmodus, wie das Alignment ihrer Kristallstrukturen zeigt. Der (*S,S*)-*trans*-konfigurierte Epoxid-Ring belegt die S1-Bindestelle, in der die kovalente Bindung zwischen dem C2-Atom des Epoxid-Rings und dem Sy-Atom des Cys²⁹ unter Öffnung des Rings gebildet wird. Die Stereochemie des Rings beeinflusst den Bindungsmodus und somit die Bindungsaffinität, wobei die (*S,S*)-Konfiguration am Epoxid-Ring bevorzugt wird. Die erste Carbonyl-Gruppe des Epoxid-Rings wechselwirkt in der *oxyanion hole* mit Cys²⁹ und Gln²³, während die zweite mit Gly⁷⁴ H-Brücken bildet. Die Leu-Gly-Meu-Einheit an der zweiten Carbonylgruppe, abgeleitet von dem Cathepsin B-Propeptid, belegt zwar die *non-primed site* von Cathepsin B, die bei den kleineren Inhibitoren CA030 und CA074 nicht erreicht werden kann, allerdings kommen auch hier keine wichtigen Wechselwirkungen zustande. Ziel ist es beim weiteren Ligandendesign, das negativ geladenen Glu²⁴⁵ in der S2-Tasche, welches für

Cathepsin B spezifisch ist, mittels elektrostatischer Wechselwirkungen zu adressieren, um die Affinität und Selektivität für Cathepsin B weiter zu optimieren.⁷⁸

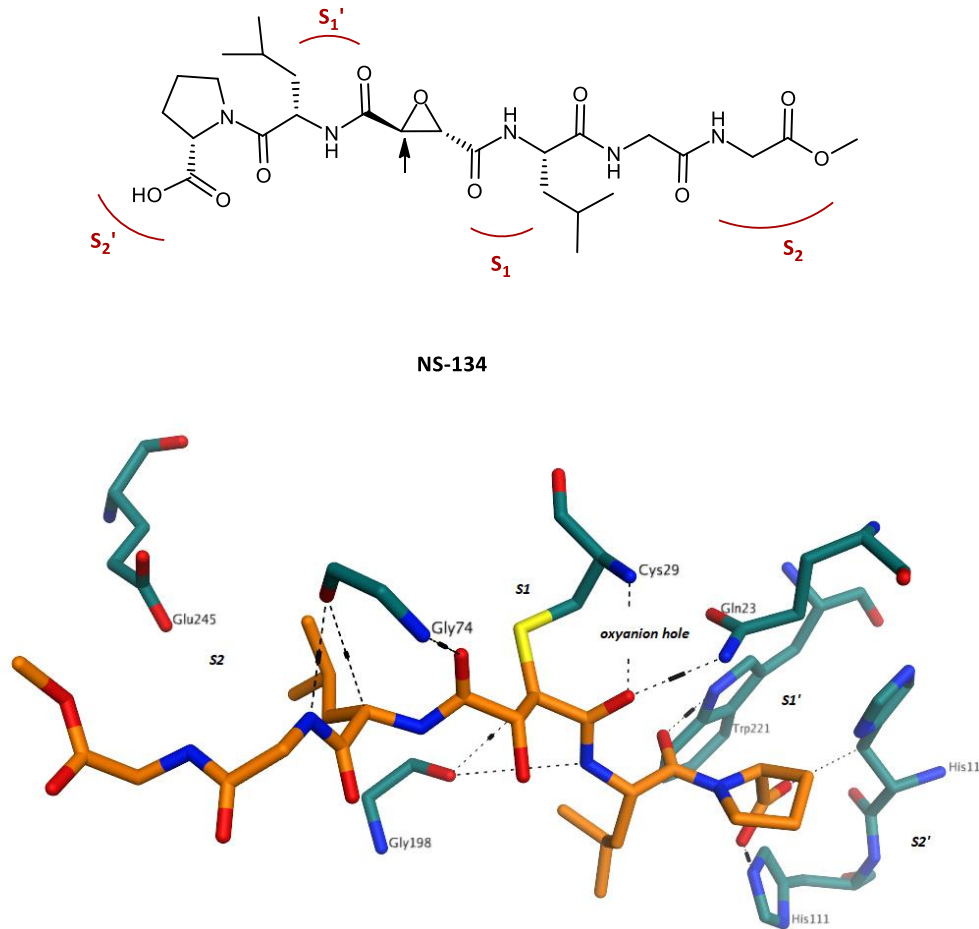


Abbildung 8: Cathepsin B-Inhibitor NS-134, Bindungsmodus und Wechselwirkungen in der aktiven Tasche von Cathepsin B (pdb: 1SP4)⁷³, der schwarze Pfeil markiert das Kohlenstoffatom, welches vom Cystein angegriffen wird, erstellt mit MOE2015

Eine Reihe CL-spezifischer Epoxid-Inhibitoren, die sogenannten CLIK-Inhibitoren (Cathepsin L Inhibitor Katunuma), wurden von *Katunuma et al.* ausgehend von den bekannten Kristallstrukturen von CA030 und CA074 jeweils in Komplex mit Cathepsin B (pdb: 1CSB und 1QDQ)^{69,77} und E64c in Papain (pdb: 1PPP)⁷⁹ entwickelt.^{71,77} CLIK148 zeigt eine selektive Inhibition von Cathepsin L, ohne jegliche Aktivität gegenüber den anderen Cathepsinen der Papain-Familie. Aus der Kristallstrukturanalyse des Papain/CLIK148-Komplexes (pdb: 1CVZ) kann aufgrund der hohen Sequenzhomologie zwischen Cathepsin L und Papain ein möglicher Bindungsmodus für Cathepsin L vorhergesagt werden. CLIK148 bindet analog zu E64c im Anti-Substrat-Modus und belegt sowohl die *primed* als auch die *non-primed site*.⁷⁵

Die Spezifität für CL liegt an dem sperrigen Phenylalanin an Position P2, welches die tiefe, hydrophobe S2-Tasche belegt und dem Pyridin-Ring, welcher das Trp¹⁷⁷ in der S2'-Tasche adressiert.⁷⁵

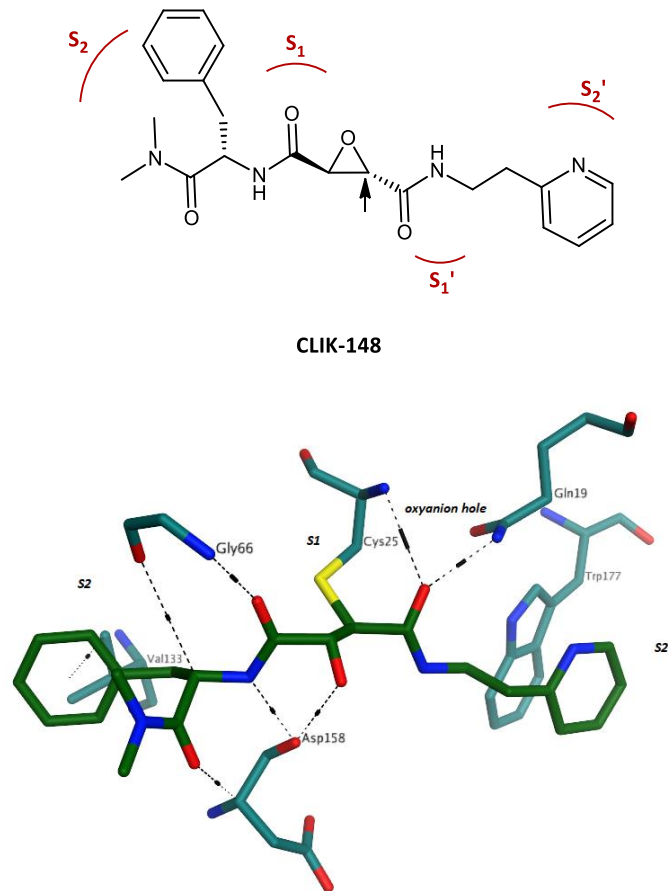


Abbildung 9: Cathepsin L-Inhibitor CLIK148, Bindungsmodus und Wechselwirkungen in der aktiven Tasche von Papain (pdb: 1CVZ)⁷⁵, der schwarze Pfeil markiert das Kohlenstoffatom, welches vom Cystein angegriffen wird, erstellt mit MOE2015

Ein Vergleich der Aminosäuresequenz und der Struktur von Cathepsin L und Cathepsin B zeigt eine hohe Konservierung der relevanten Bindetaschen beider Enzyme (siehe Tabelle 4). Wie aus den Kristallstrukturen der kovalenten Epoxid-Inhibitoren ersichtlich, ist die Spezifität für Cathepsin B auf die gezielte Adressierung der *primed site* S2' zurückzuführen. Der *occluding loop* (AS 105-125) von CB, der oberhalb der S2'-Bindetasche lokalisiert ist, ist unter den humanen Cathepsinen als einzigartiges Strukturmerkmal mittels ionischer Wechselwirkung zu erreichen und kann für CB-Selektivität sorgen.^{66,78} Glu²⁴⁵ in der S2-Bindetasche von Cathepsin B könnte ebenfalls durch elektrostatischer Wechselwirkung mit dem potentiellen Inhibitor zur Selektivitätssteigerung adressiert werden.⁷⁸

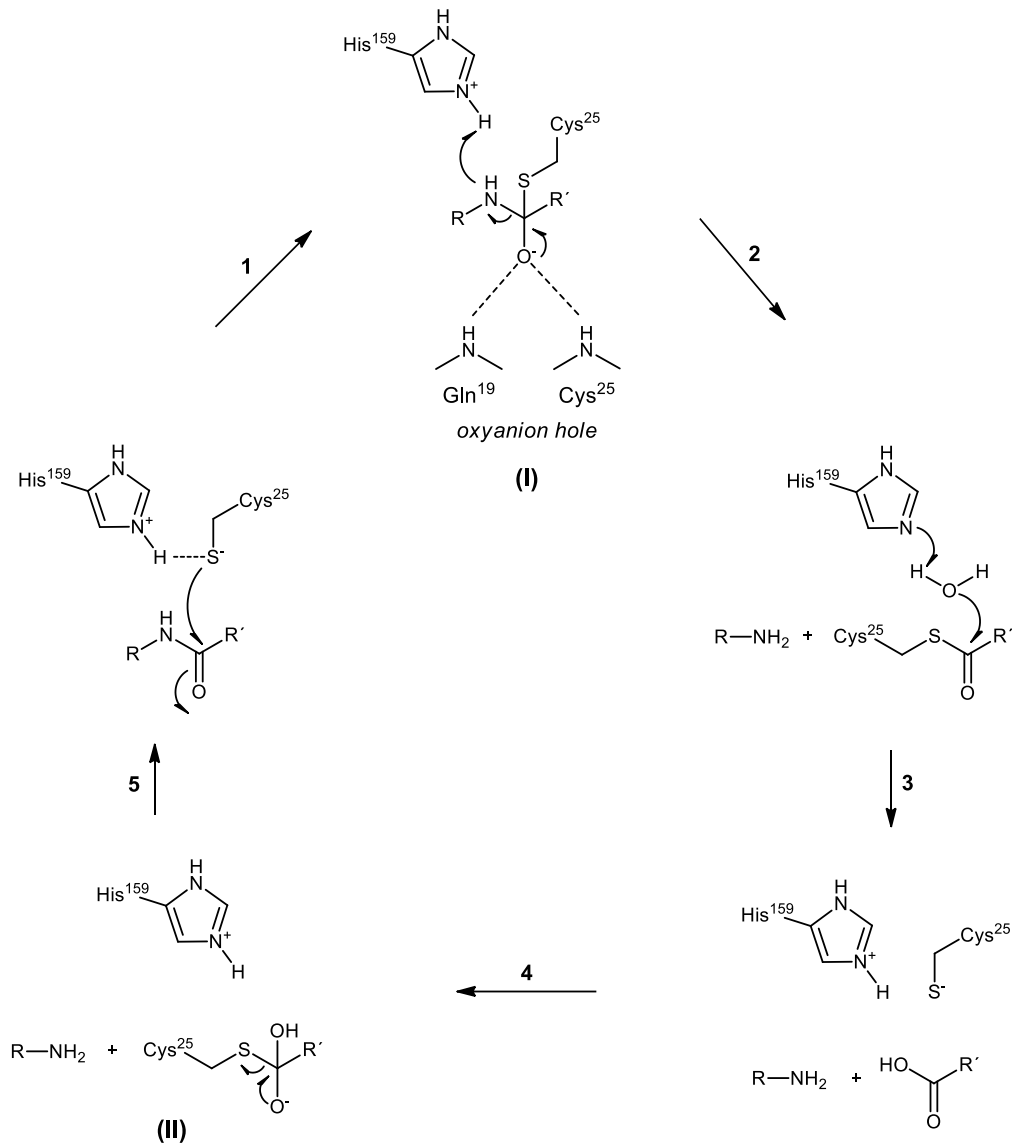
Tabelle 4: Vergleich der relevanten Aminosäuren in den jeweiligen Bindetaschen von Cathepsin B und Cathepsin L, Unterschiede in den Aminosäuren sind rot hervorgehoben, mit MOE2015 erstellt

Bindetasche	Cathepsin B	Cathepsin L
S1 → konserviert	Gln23, Cys26, Gly27, Cys29, Cys71, Asn72, Gly73, Gly74	Gln19, Cys22, Gly23, Cys25, Cys65, Asn66, Gly67, Gly68
S2 → Glu245	Tyr75, Pro76, Ala173, --- , Ala200, Glu245	Leu69, Met70, Ala135, Met161, Gly164, Ala214
S3	Asp69, Tyr75	Glu63, Leu69
S1'	Val176, Leu181, Gly198, His199, Trp221	Ala138, Leu144, Asp162, His163, Trp189
S2' → occluding loop	Gln23, Gly24, Ser25, Cys26, Gly27, Ser28, His110, His111	Gln19, Gly20, Gln21, Cys22, Gly23, Ser24, --- , ---

1.5 Katalysemechanismus von Cysteinproteasen

Die Aufklärung des Katalysemechanismus von Cysteinproteasen der Papain-Familie ist Gegenstand mehrerer experimenteller und theoretischer Studien. Die Existenz eines präkatalytischen Ionenpaars aus His¹⁵⁹⁺/Cys²⁵⁻ (katalytische Diade, Papain-Nummerierung) wurde bereits Anfang der 80er Jahre experimentell u.a. durch potentiometrische Titration, NMR-Studien und Isotopeneffekt-Messungen bestätigt.⁸⁰⁻⁸² Neuere QM/MM-Studien belegen außerdem, dass der ionische Zustand der katalytischen Diade im enzymatischen Milieu stark favorisiert wird.⁸³ Weitere Faktoren, die stabilisierend auf das Ionenpaar wirken sollen, sind das Dipolmoment der benachbarten α -Helix und ein H-Brückennetzwerk im aktiven Zentrum.^{84,85} Asn¹⁷⁵, welches zur katalytischen Triade gehört, sorgt durch H-Brückenbindung für die richtige Orientierung des His¹⁵⁹. Die Acylierung wird durch Angriff des Thiolat-Anions unter Ausbildung eines tetraedrischen Thiohemiketal-Zwischenprodukts (**I**), dessen negative Ladung durch eine *oxyanion hole* stabilisiert wird, eingeleitet. Die sogenannte *oxyanion hole* entsteht durch H-Brückenbindungen des negativ geladenen Sauerstoffatoms zu Gln¹⁹ und Cys²⁵. Die Stabilität des Thiohemiketal-Zwischenprodukts (**I**) wird in einigen Studien in Frage gestellt und eine mechanistische Alternative bestehend aus einer anfänglichen Protonierung des Amid-Sauerstoffatoms und anschließender Abspaltung des Amins wird postuliert.⁸⁶ Als nächstes wird ein Proton vom His¹⁵⁹ auf den Amid-Stickstoff übertragen und unter Abspaltung des Amins entsteht ein acyliertes Zwischenprodukt. Im Folgenden findet unter nucleophilem Angriff eines Wassermoleküls, welches zuvor von His¹⁵⁹ deprotoniert wurde, auf das Acyl-Zwischenprodukt die Deacylierung statt. Über ein weiteres tetraedrisches Zwischenprodukt (**II**), welches zur Carbonsäure und Cys²⁵⁻ hydrolysiert, schließt sich der Katalysezyklus. In Diskussion ist weiterhin

ein konzertierter Mechanismus sowohl für den Acylierungs- als auch für den Deacylierungsschritt. ^{83,87,88}



Schema 1: Postulierter Katalysemechanismus von Cysteinproteasen⁸⁴

1.6 Cysteinprotease-Inhibitoren

Grundlegend werden Inhibitoren eingeteilt in kompetitive (*active site directed*) und allosterische Inhibitoren, je nachdem ob das aktive Zentrum oder eine allosterische Stelle des Targets adressiert werden soll. Eine weitere Unterteilung erfolgt in kovalente/nicht-kovalente und reversible/irreversible Inhibitoren.^{89,90}

Kovalente Inhibitoren bestehen in den meisten Fällen aus einer peptidischen oder peptidomimetischen Erkennungssequenz, welche an der Aminosäuresequenz eines bekannten Substrats des Targets angelehnt ist. Mindestens zwei Aminosäuren des potentiellen Inhibitors wechselwirken nicht-kovalent, meistens über H-Brückenbindungen, mit den entsprechenden Aminosäuren in den Bindetaschen des aktiven Zentrums. Für eine gute Affinität und hohe Selektivität ist die Wahl einer peptidischen oder peptidomimetischen Einheit mit möglichst vielen, Target-spezifischen Wechselwirkungen entscheidend. Die Peptideinheit eines kovalent-wirkenden Inhibitors ist mit einer elektrophilen Gruppe verknüpft, dem sogenannten *warhead*, welcher im nächsten Schritt entweder eine reversible oder irreversible Bindung mit dem nucleophilen Cystein (im Falle von Cysteinprotease-Inhibitoren) des aktiven Zentrums eingeht. Die Reaktionsart der funktionellen Gruppe bestimmt, ob ein potentieller Inhibitor reversibel oder irreversibel wirken kann.

Reversible Inhibitoren binden kovalent an ihr Target und dissoziieren im zweiten Schritt mit einer Geschwindigkeit ab, die höher ist als die Umsatzgeschwindigkeit der Protease. Einen kovalent-reversiblen Mechanismus zeigen Inhibitoren mit elektrophilen Gruppen wie Aldehyde, aktivierte Ketone, Nitrile und Boronsäuren.^{91,92} Die sehr hohe Reaktivität von Aldehyden führt oft zum Selektivitätsverlust, sodass sie im Drug Design-Prozess nach und nach durch mildere elektrophile Gruppen, wie Boronsäuren, ersetzt wurden, beispielsweise bei der Entwicklung von Proteasom-Inhibitoren. Aus den ersten, unselektiven Aldehyd-basierten Proteasom-Inhibitoren wurde Bortezomib, ein zugelassener kovalent-reversibler Proteasom-Inhibitor, mit einer Boronsäure als *warhead* entwickelt.^{93,94} Weit verbreitet unter den kovalent-reversiblen Wirkstoffen sind Nitrile aufgrund ihrer mäßigen, anzupassenden Reaktivität, z.B. Saxagliptin, ein zugelassener Dipeptidylpeptidasen IV (DPP IV) -Inhibitor.^{92,95} (Struktur der Arzneistoffe, Abbildung 13)

Im Gegensatz dazu bilden irreversible Inhibitoren mit ihrem Target Addukte, die nicht wieder dissoziieren oder nur mit einer Halbwertszeit, die viel länger ist als die Synthesegeschwindigkeit des Proteins. Sie bestehen aus stärkeren, elektrophilen Gruppen, wie Epoxiden, Aziridinen, β -Lactonen, α -Halogenketonen, Acetylenen und Michael-Akzeptoren mit Acrylamid-Funktion.⁹⁶ Trotz ihrer Reaktivität gibt es eine Reihe an zugelassenen, sicheren kovalent-irreversiblen

Hemmstoffen, z.B. Azinomycin (Aziridin), Fosfomycin (Epoxid), Marizomib und Penicilin (β -Lacton).^{97,98,90,99,100} (siehe Abbildung 10)

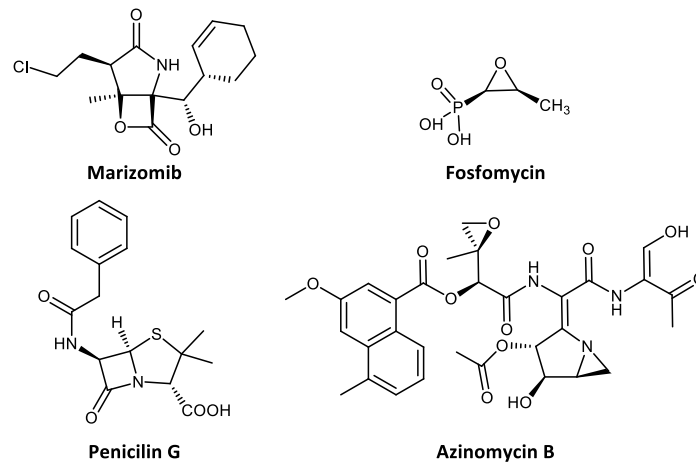
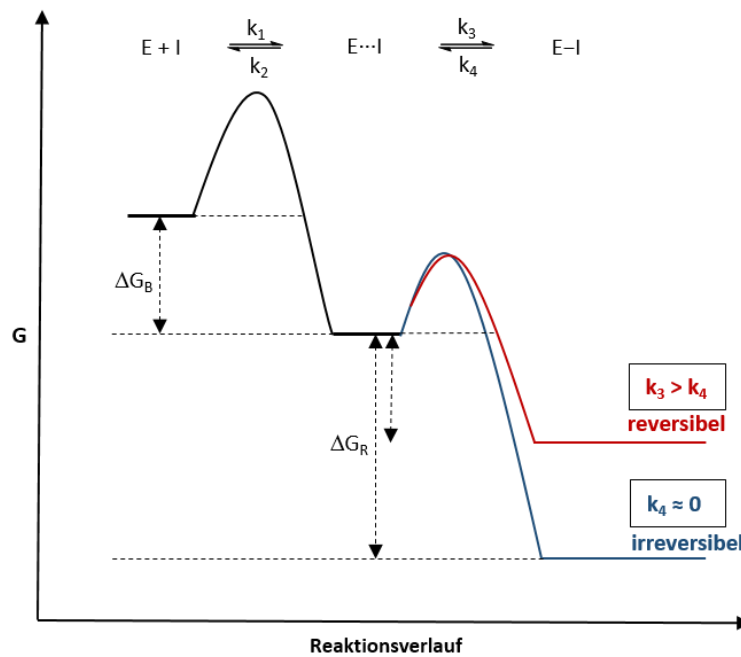


Abbildung 10: Kovalent-irreversible Hemmstoffe

1.6.1. Bindungskinetik von kovalenten Inhibitoren

In dem vereinfachten Energie-Diagramm für den Reaktionsmechanismus von kovalenten Inhibitoren wird deutlich, dass mindestens zwei Schritte bei der Bindung eines kovalenten Inhibitors durchlaufen werden müssen (Abbildung 11).^{101,102} Beim ersten Schritt entsteht durch reversible Anlagerung des Inhibitors an das Target-Enzym ein nicht-kovalenter Assoziations-Komplex EI mit der Freien Bindungsenergie ΔG_B . Seine Stabilität (ΔG_B) und Geometrie werden durch nicht-kovalente Wechselwirkungen zwischen dem Inhibitor und dem aktiven Zentrum des Enzyms bestimmt. Die Bildung eines stabilen Assoziations-Komplexes mit der notwendigen Geometrie und Positionierung innerhalb des aktiven Zentrums bestimmt, ob die folgende kovalente Reaktion stattfinden kann und ist daher von entscheidender Bedeutung. Dazu muss die elektrophile Gruppe nah genug am katalytischen Cystein-Rest platziert werden. Beim zweiten Schritt findet die kovalente Reaktion mit der Freien Reaktionsenergie ΔG_R statt, welche festlegt, ob eine Inhibierung reversibel oder irreversibel verläuft. Irreversible Reaktionen sind stark exergonisch ($k_4 = 0$), sodass keine Rückreaktion stattfinden kann. Während reversible Reaktionen schwach exergonisch sind und eine geringere Energiebarriere für die Rückreaktion aufweisen ($k_3 > k_4$).¹⁰²

Abbildung 11: Energiediagramm von reversiblen und irreversiblen Inhibitoren¹⁰²

1.6.2. Kovalente Hemmstoffe

Lange Zeit wurden kovalenten Wirkstoffen von der pharmazeutischen Industrie und Forschung kaum Beachtung geschenkt. Die Angst vor den toxikologischen Folgen aufgrund von Proteinhaptenisierung und *off-target* Effekten haben die Entwicklung von kovalent-wirkenden Arzneimitteln viele Jahre gehemmt. Die ersten zugelassenen, bekannten kovalenten Wirkstoffe waren Aspirin, Penicilin, Omeprazol und Clopidogrel.^{97,103} Sie wurden nicht als kovalent-wirkende Inhibitoren entwickelt, vielmehr wurden sie zufällig erst viele Jahre nach ihrer Zulassung als solche identifiziert. Aspirin und Penicilin sind acylierende Wirkstoffe, die bestimmte Serinreste von Proteinen verestern. Omeprazol, ein PPI-Inhibitor und Clopidogrel, ein P2Y₁₂-Rezeptor-Inhibitor, wirken dagegen als *Prodrugs* und die elektrophile Gruppe muss erst *in vivo* gebildet werden. Omeprazol bildet im sauren Medium des Targets eine Sulfenamid-Gruppe, die eine kovalente Bindung zur ATPase bilden kann. Clopidogrel wird durch P450-Enzyme metabolisiert und bildet unter darauffolgender Ringöffnung eine Thiolgruppe, welche unter Ausbildung einer Disulfidbrücke vom Cysteinrest des P2Y₁₂-Rezeptors angegriffen wird.^{97,104,105}

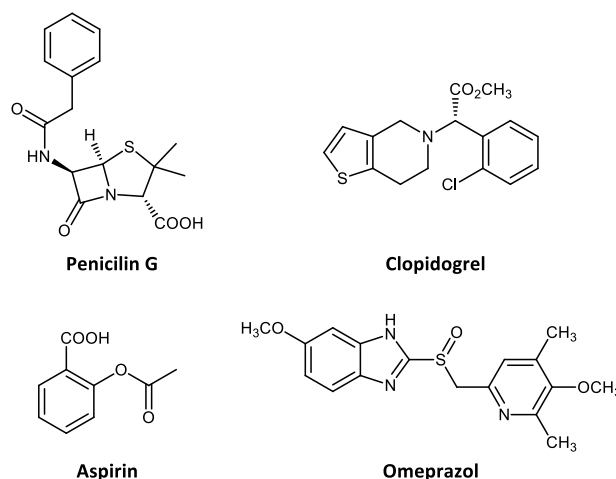


Abbildung 12: Erste, zufällig als kovalente Inhibitoren entdeckte, zugelassene Wirkstoffe

Zwei neuere im Jahr 2011 zugelassene kovalente Inhibitoren, Telaprevir und Boceprevir, sind HCV-Protease-Inhibitoren mit kovalent-reversiblen Wirkmechanismus.¹⁰⁶ Unter Ausbildung eines Halbacetals wird das Serin im katalytischen Zentrum mit einer elektrophilen α -Ketoamid-Gruppe adressiert. Erfolgreiche Proteasom-Inhibitoren, wie Bortezomib, wirken durch die eingebauten Boronsäure-Derivate ebenfalls kovalent-reversibel. Unter den DPP IV-Inhibitoren findet man weitere ebenfalls kovalent-reversible Wirkstoffe, z.B. das Nitril-enthaltende Saxagliptin.⁹⁵

Afatinib, ein kovalent-irreversibler Inhibitor des epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptors (EGFR), wurde 2013 zugelassen und ist im Gegensatz zu den EGFR-Inhibitoren erster Generation (z.B. Gefitinib) aufgrund seiner starken, permanenten Inhibierung auch gegenüber resistenten Mutanten aktiv.¹⁰⁷ Durch eine Mutation im Rezeptor wird die Affinität zu ATP, dem endogenen Substrat von EGFR, erhöht, sodass das kompetitiv-wirkende Gefitinib ineffektiv wird. Afatinib dagegen ist durch Ausbildung der kovalenten Bindung weitgehend unabhängig von der Konzentration des Substrats und behält seine Affinität auch gegenüber den Mutanten. Dieser Vorteil der reduzierten Resistenzbildung von kovalent-irreversiblen Inhibitoren wird in der Onkologie und bei parasitären Infektionen ausgenutzt.^{90,104}

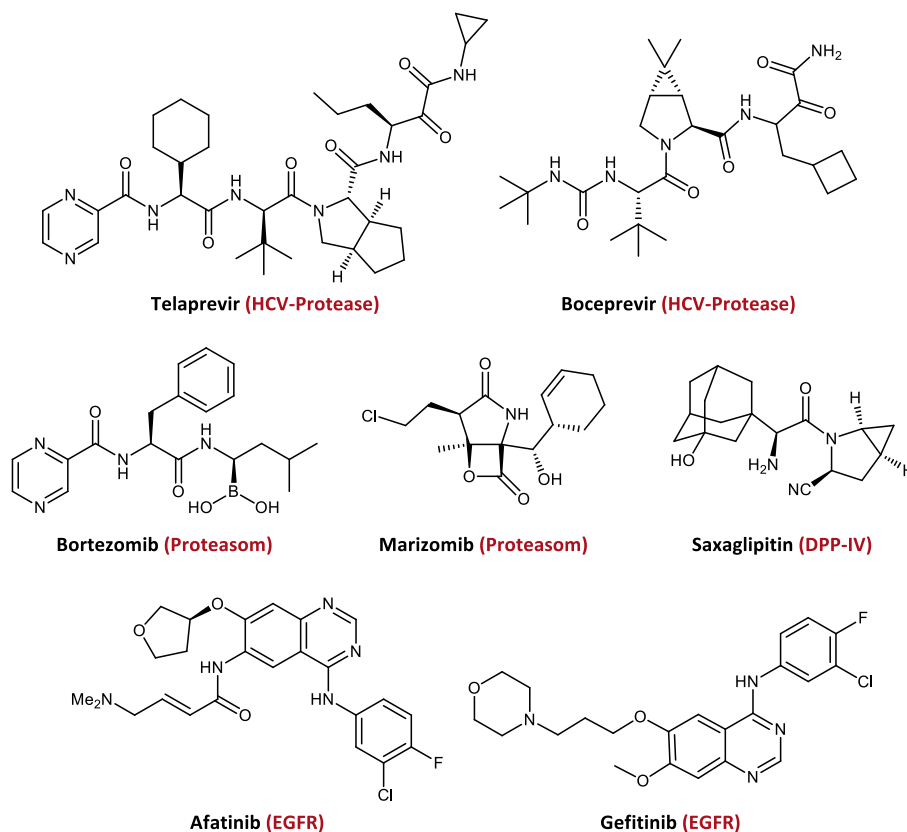


Abbildung 13: Kovalent-wirkende, zugelassene Wirkstoffe

Die hohe Effizienz von irreversiblen Wirkstoffen, die durch den energetischen Beitrag der kovalenten Bindung entsteht, kann durch reversible oder nicht-kovalente Inhibitoren kaum erreicht werden. Durch die lange Residenzzeit von irreversiblen Wirkstoffen, reduziert sich die Wirkstoffdosis und Dosisfrequenz erheblich. Beispielsweise ist die Dauer der pharmakologischen Wirkung des irreversiblen Brutons-Tyrosinkinase-Inhibitors Ibrutinib sehr viel höher als seine PK-Halbwertszeit von 3h. Nach oraler Dosisgabe von 420 mg Tag⁻¹ sind 24 Stunden später immer noch mehr als 95 % des Targets belegt.¹⁰⁸ Die pharmakokinetischen Effekte eines irreversiblen Inhibitors sind von seinen pharmakodynamischen Effekten entkoppelt.¹⁰⁴ Um diese Vorteile optimal zu nutzen und *off-target* Effekte zu vermindern, sollte der kovalente Wirkstoff allerdings eine möglichst hohe Selektivität aufweisen. Denn eine lange Residenzzeit kann auch nachteilig sein, wenn die Synthese des Proteins sehr schnell ist, kann sich dadurch die Toxizität durch kovalente Inhibitoren erhöhen.

Kovalente Wirkstoffe bieten außerdem durch ihre hohe Affinität die Möglichkeit Targets zu adressieren, deren aktives Zentrum als „*undruggable*“ eingestuft wurde. Die Bindetasche ist in diesen Fällen sehr flach und *solvent-exposed* und die durch nicht-kovalente Wechselwirkungen erreichte Affinität ist nicht effektiv genug. Ein aktuelles Beispiel ist Cathepsin K, welches eine schwer adressierbare aktive Tasche besitzt. Der Nitril-basierte Wirkstoff Odanacatib erreicht

durch kovalente Bindung eine hohe Affinität zur Cysteinprotease und befindet sich zurzeit in der Klinischen Phase III als Wirkstoff gegen Osteoporose.¹⁵

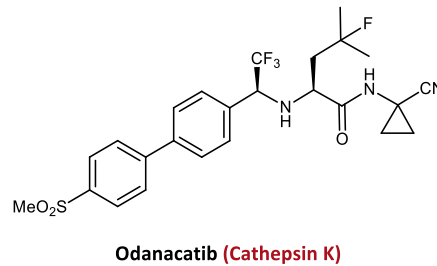


Abbildung 14: Odanacatib, kovalenter Cathepsin K-Inhibitor

Tabelle 5: Vor- und Nachteile kovalent-wirkender Wirkstoffe

Vorteile	Nachteile
hohe Bindungsaffinität - geringere Dosis	<i>off-target</i> - Effekte
lange Residenzzeit – weniger frequente Dosisgabe	erhöhtes Toxizitätsrisiko
Adressieren von schwer zu erreichbaren Bindetaschen	Protein-Haptenisierung
Reduzierte Resistenzbildung	
Geringere Sensitivität bezogen auf pharmakokinetische Parameter	

Um Toxizitätsrisiken zu verringern, sollte ein kovalenter Wirkstoff eine möglichst hohe Selektivität für das gewünschte Target aufweisen und eine hohe Effizienz, sodass die Dosis geringgehalten werden kann. Proteine mit niedrigen Umsatzgeschwindigkeiten und klar definierten nucleophilen Zentren, eignen sich besonders gut als Targets für kovalente Wirkstoffe.^{92,104}

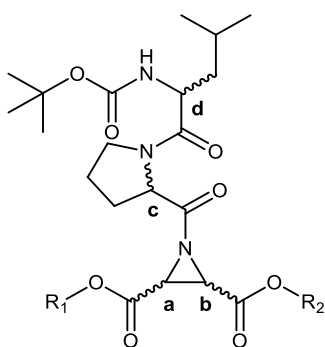
1.7 Aziridin-2,3-dicarboxylat-basierte, irreversible Cysteinprotease-Inhibitoren

Die Entdeckung des Epoxid-basierten Cysteinprotease-Inhibitors E64 war der Durchbruch für die Entwicklung weiterer kovalent-irreversibler Cysteinprotease-Inhibitoren mit einem elektrophilen heterozyklischen Ring als *warhead*.^{96,109} E64 inhibiert nicht-selektiv Papain-ähnliche Cystein-Cathepsine und Calpain und diente als Leitstruktur für *Katunuma et al.*, um die selektiven Cathepsin B-Inhibitoren CA030 und CA074 und den Cathepsin-L selektiven CLIK148 zu entwickeln.^{69,75,110,77}

Die *N*-Analoge zu den Epoxysuccinyl-Peptiden sind die Aziridinyl-Peptide, von denen die effektivsten einen *trans*-konfigurierten Aziridin-2,3-dicarboxylat-Baustein als elektrophilen *warhead* besitzen. Wie die Epoxid-basierten Inhibitoren alkylieren sie den negativ geladenen Cysteinrest des aktiven Zentrums in Cysteinproteasen und wirken somit ebenfalls als kovalent-irreversible Inhibitoren. Im Gegensatz zum Epoxid-Ring bietet der Aziridin-Ring die Möglichkeit weitere Substituenten am Stickstoff-Atom einzuführen, um somit die Affinität und Selektivität zu verbessern. Dies können peptidische Einheiten sein, die eine zusätzliche Bindestelle der Protease adressieren, biologische Marker (z.B. Biotin), Fluoreszenzfarbstoffe oder funktionelle Gruppen, die zur Analyse des Reaktionsmechanismus benötigt werden.

Schirmeister et al. haben zahlreiche selektive und effektive *N*-acylierte Aziridin-2,3-dicarboxylat-basierte Inhibitoren gegen Trypanosomen, Plasmodien, Papain, Cathepsin L und *Leishmania mexicana* LmCPB2.8 entwickelt.^{1,111-117} Dabei zeigen einige von ihnen Selektivität für Cathepsin L und parasitäre Cathepsin-L-ähnliche Cysteinproteasen.

Im Folgenden wurde der Fokus auf die Entwicklung von selektiven Inhibitoren gegen die *Leishmania*-Protease LmCPB2.8 gelegt. Die Inhibitoren erster Generation der Arbeitsgruppe Schirmeister wurden von Radim Vicik (RV-Derivate) entwickelt. Dabei stellte sich die Verbindung **RV122C** (BOC-Leu-Pro-(*R,R*)-Azi(OBn)₂) mit einer Hemmung von LmCPB2.8 ($K_i = 1.7 \mu\text{M}$) im niedermolekularen Bereich und leishmanizider Aktivität als Leitstruktur heraus.¹¹⁸ Um die Selektivität zu steigern, wurden ausgehend von **RV122C** Variationen an der Aminosäuresequenz und der Konfiguration am Aziridin-Ring durchgeführt. Aus dieser *inhouse*-Substanzbibliothek zweiter Generation wurde **CS09** als neue Leitstruktur weiterentwickelt, welche im Gegensatz zu **RV122C** einen (*S,S*)-konfigurierten Aziridin-Ring bei gleicher Aminosäuresequenz trägt. **CS09** zeigt bei ähnlich guter Affinität für LmCPB2.8 ($K_i = 3.8 \mu\text{M}$) Selektivität für parasitäre, Cathepsin L-ähnliche Cysteinproteasen.¹¹⁷ (siehe Tabelle 6)

Tabelle 6: K_i -Werte der Aziridin-2,3-dicarboxylat-basierten Inhibitoren gegen *Leishmania mexicana*^{1,113,118}

	Konfiguration a, b, c, d	R ₁	R ₂	LmCPB2.8 K_i [μ M]	CL	CB	Rho	Cruz	FP-2
RV122C	<i>S,S,R,R,S</i>	Bn	Bn	1.7	6.0	ni	1.2	0.91	209
CS09	<i>R,R,R,S</i>	Bn	Bn	3.8	ni	ni	1.7	ni	ni
PF362	<i>(SS)+(RR), R,S</i>	PropPh	PropPh	0.9	ni	ni	ni	ni	ni
PF257	<i>(SS)+(RR), R,S</i>	EtPh	EtPh	1.6	ni	ni	ni	7.7	ni
PF317	<i>(SS)+(RR), R,S</i>	Bn	PropPh	1.36	ni	ni	ni	ni	ni
PF272	<i>(SS)+(RR), R,S</i>	Bn	EtPh	1.92	ni	ni	ni	5.5	ni
PF294	<i>(SS)+(RR), R,S</i>	Bn	MeNaph	0.8	ni	ni	ni	ni	ni
PF350	<i>(SS)+(RR), R,S</i>	OH	EtPh	0.44	ni	ni	0.16	ni	1.26

ni = no inhibition bei 20 μ M, LmCPB2.8 = *Leishmania mexicana* CPB2.8, CL = Cathepsin L, CB = Cathepsin B, Rho = Rhodesain, Cruz = Cruzain, FP-2 = Falcipain-2

Die dritte Generation von Inhibitoren gegen die *Leishmania*-Protease wurde von Philipp Fey entwickelt und synthetisiert.¹ Ausgehend von dem Diastereomerenpaar **CS09/RV122C** wurden die Affinität, die Selektivität und die Hydrophilie der Inhibitoren weiter optimiert. Dazu wurden die Benzylester-Gruppen an den Carbonsäuren durch längere und voluminösere Estergruppen ersetzt, wodurch symmetrische und unsymmetrische Verbindungen entstanden, je nachdem, ob zwei gleiche oder zwei verschiedene Estergruppen am Ring angeknüpft wurden.

Ziel hierbei war es, die tiefe S2-Bindetasche der *Leishmania*-Protease gezielter und effektiver zu adressieren. Weiterhin sollte aus den unsymmetrischen Estern durch Abspaltung der Benzylestergruppe eine freie Carboxylgruppe generiert werden, die im katalytischen Zentrum eine ionische Wechselwirkung mit dem positiv-geladenen Histidinium-Ion eingehen soll, wie es

nach theoretischen Berechnungen von *Engels et al.* vorhergesagt wurde.^{119,120} Durch Einführung der Carboxylgruppe sollte außerdem die Hydrophilie des Inhibitors erhöht werden.

Der Halbester **PF350** hemmt wie erwartet die *Leishmania*-Protease LmCPB2.8 mit einer Dissoziationskonstante von 0.44 μM effektiver als sein entsprechender Diester **PF257** ($K_i = 1.6 \mu\text{M}$) und zeigt dabei eine zeit-abhängige Hemmung ($k_{2\text{nd}} = 190,560 \text{ M}^{-1} \text{ min}^{-1}$).¹ Allerdings verschlechtert sich bei Einführen einer Carboxylgruppe am Aziridin-Ring die Selektivität im Vergleich zu den Diestern. Unter den Diestern zeigen die Verbindungen mit großen, lipophilen Estergruppen (**PF294** und **PF362**) eine verbesserte Hemmung gegenüber LmCPB2.8 im Vergleich zu ihren Leitstrukturen **CS09/RV122C**, die Benzylestergruppen am *trans*-konfigurierten Aziridin-Ring tragen.

Eine Röntgenstruktur eines Aziridin-2,3-dicarboxylat-basierten Inhibitors konnte bislang mit keiner Cysteinprotease erhalten werden, sodass die Bindungsmodi mittels theoretischer Berechnungen, Docking- und SAR-Studien vorhergesagt werden müssen. Eine lineare Anordnung des Inhibitors entlang der aktiven Tasche scheint essentiell zu sein, da eine *trans*-Konfiguration am Aziridin-Ring bei den meisten Inhibitoren zu einer besseren Hemmung führt als eine *cis*-Anordnung der Liganden.¹¹⁹ SAR-Studien in der Arbeitsgruppe von Prof. Schirmeister bestätigen, dass die Aminosäuresequenz Leu-Pro für die Hemmung von Cathepsin-L-ähnlichen Cysteinproteasen am effektivsten ist.¹¹³ Weiterhin beeinflusst die Größe und Lipophilie der Estergruppen am *trans*-konfigurierten Ring die Selektivität innerhalb der parasitären Cathepsin-L-ähnlichen Cysteinproteasen. Während Ethylester keine Aktivität zeigen, hemmen Benzylester bevorzugt die parasitären Cysteinproteasen und Phenylpropylester selektiv die *Leishmania*-Protease LmCPB2.8.^{1,112,115,117}

1.8 Strukturbasiertes Drug Design von kovalenten Inhibitoren

Das computergestützte Wirkstoffdesign spielt eine immer wichtigere Rolle bei der Entwicklung neuer Arzneimittel in der Industrie und Forschung. Gegenüber dem klassischen High-Throughput-Screening (HTS-Screening), bei dem eine Vielzahl an Substanzen aus großen Bibliotheken auf ihre Wirksamkeit getestet werden, bietet die Computerchemie zeit- und kostensparende Möglichkeiten im strukturbasierten Wirkstoffdesign.^{121,122,123}

Beim strukturbasierten Wirkstoffdesign ist die dreidimensionale Struktur des Targets bekannt und dient als Startpunkt des Designzyklus. In der Protein-Datenbank (RCSB-PDB, <http://www.rcsb.org/>) hat man heute Zugriff auf über 150 000 3D-Strukturen, die hauptsächlich mittels X-ray oder NMR aufgelöst wurden. Existiert vom gewünschten Target keine 3D-Struktur, kann man aus seiner Aminosäure-Sequenz und einem strukturell verwandten Protein ein Homologiemodell erstellen (siehe Kapitel 3.1).^{124,125}

Mittels Molekularen Dockings hat man mehrere Möglichkeiten geeignete Liganden für eine gegebene Bindetasche des Proteins zu suchen.^{122,126} Beim Virtuellen Screening werden Datenbanken mit kommerziell erhältlichen Substanzen nach *druglike*-Eigenschaften gefiltert, am gewünschten Target gedockt und nach ihrem Score sortiert. Beim *de novo*-Design werden zunächst verschiedene Molekülfragmente, wie beispielsweise Carbonyl- oder Benzylgruppen, in die Bindetasche gedockt, nach ihrem Score sortiert und schließlich *in silico* zu einer möglichen Leitstruktur verknüpft, die im Anschluss synthetisiert werden muss. Der Vorteil beider Methoden ist, dass man ganz neuartige Inhibitor-Strukturen entdecken kann. Eine weitere Möglichkeit im klassischen Ligandendesign besteht darin, bereits bekannte Inhibitoren oder Substrate des Targets hinsichtlich ihrer Wechselwirkungen mit der Bindetasche zu analysieren und so zu modifizieren, dass potentere und selektivere Inhibitoren entstehen können.¹²⁶

Basierend auf den Scoring-Werten aus den Docking-Rechnungen und der Analyse der Bindungsmodi auf Plausibilität werden die „besten“ Leitstrukturen synthetisiert oder kommerziell erworben, um anschließend in Enzym-Assays auf ihre Wirksamkeit getestet zu werden. Bei Substanzen mit guter Affinität zum Target wird idealerweise die Kristallstruktur des Enzym-Inhibitor-Komplexes aufgelöst und der tatsächliche Bindungsmodus mit dem vorhergesagten Bindungsmodus aus den Docking-Berechnungen verglichen. Schließlich können Struktur-Wirkungsbeziehungen aus den experimentellen und theoretischen Daten aufgestellt werden und die neuen Hitsubstanzen bezüglich ihrer Bindungsaffinität, Selektivität und pharmakokinetischen Parameter weiter optimiert werden, indem ein neuer Designzyklus gestartet wird.

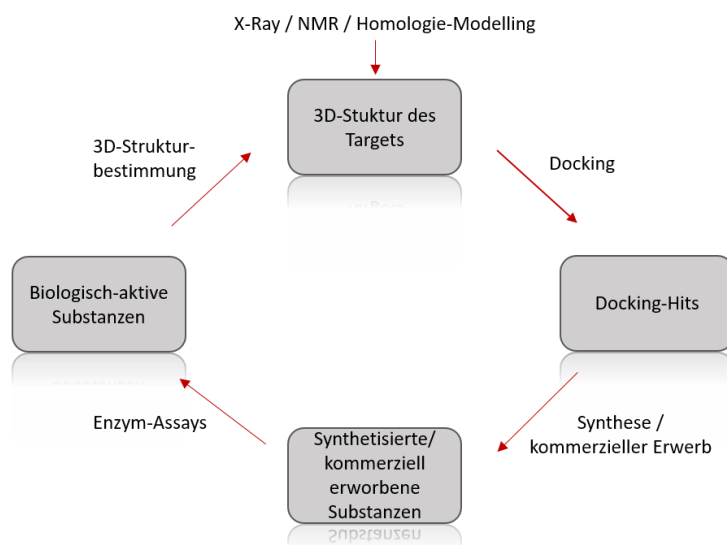


Abbildung 15: Strukturbasierter Drug-Designzyklus

1.8.1. Molekulares Docking von kovalenten Inhibitoren

Das strukturbasierte Drug Design und Screening von kovalenten Inhibitoren mittels Molekularem Docking ist immer noch eine Herausforderung. Die bekannten Docking-Programme, wie AutoDock, AutoDock Vina, FlexX, Glide und GOLD,¹²⁷⁻¹³⁰ sind vor allem für das Docking von nicht-kovalenten Inhibitoren geeignet, da hier ausschließlich die nicht-kovalenten Interaktionen zwischen Ligand und Protein in Betracht gezogen werden können. In den letzten Jahren ist das Interesse an dem Drug Design von kovalenten Inhibitoren stark angestiegen und einige kovalente Docking-Tools, wie z.B. DOCKTITE, CovalentDock, CovDock und AutoDock4, wurden entwickelt.¹³¹⁻¹³³ Das Problem beim Docking von kovalenten Inhibitoren besteht darin, dass der Energie-Beitrag ΔG_R , der sich aus der Bildung der kovalenten Bindung ergibt, nicht adäquat durch Kraftfelder oder empirische Ansätze beschrieben werden kann, wie es für nicht-kovalente Interaktionen möglich ist.^{101,122,134,135}

Beim kovalenten Docking ergibt sich die Scoring-Funktion wie beim konventionellen, nicht-kovalenten Docking aus den Beiträgen der nicht-kovalenten Wechselwirkungen (ΔG_B). Bei den meisten kovalenten Docking-Programmen wird vor dem Docking lediglich die kovalente Bindung zwischen Protein und Ligand manuell eingeführt, um dann energetisch günstige Konformationen basierend auf nicht-kovalenten Interaktionen für den Enzym-Inhibitor-Komplex zu erhalten. Der kovalente Beitrag ΔG_R wird hier also ebenfalls in der Scoring-Funktion der Docking-Berechnungen vernachlässigt, sodass das kovalente Docking kritisch betrachtet werden muss.¹³⁴ Die kovalente Bindung und die entsprechende Kinetik können nur durch quantenmechanische Berechnungen (QM/MM) beschrieben werden.^{136,137} QM-Berechnungen können allerdings nicht

ohne Weiteres in Docking-Programmen implementiert werden oder an großen Liganden-Datenbanken angewendet werden, da sie zu komplex und zeitaufwändig sind.

Ein vielversprechendes Protokoll für das Drug Design von kovalenten Inhibitoren wurde von *Engels et al.* beschrieben.¹³⁸ Es besteht aus zwei Schritten: Zunächst wird ein nicht-kovalentes Docking der kovalenten Inhibitoren durchgeführt, um den Bindungsmodus und die Bindungsaffinität des Assoziations-Komplexes zu erhalten und die Erkennungseinheit zu optimieren. Im zweiten Schritt wird durch QM/MM-Berechnungen vorausgesagt, ob die kovalente Reaktion stattfinden kann und ob die Reaktion reversibel oder irreversibel verläuft. Dazu benötigt man als Grundlage eine *x-ray* Struktur eines ähnlichen bekannten Enzym-Inhibitor-Komplexes. Es wurde erfolgreich angewandt bei der Entwicklung von reversiblen Vinylsulfon-basierten Inhibitoren für Rhodesain, ausgehend von der Kristallstruktur vom irreversibel-wirkenden K11777 (pdb: 2P7U).¹³⁸

Je nach Problemstellung ergibt sich oft die Frage, wie wichtig der kovalente Beitrag für die Target-Spezifität und für die Vorhersage der Bindungsmodi bei einem kovalenten Reaktionsmechanismus ist. Bei Ligandenbibliotheken, die aus Inhibitoren mit gleichem *warhead* bestehen und einem Target-Enzym mit klar definiertem nucleophilen Angriffspunkt ist der Energiebetrag, der aus der kovalenten Bindungsbildung entsteht, erwartungsgemäß für alle Inhibitoren in der gleichen Größenordnung. Entscheidend für die Unterschiede in der Selektivität, der Bindungsaffinität und dem Bindungsmodus sind vor allem nicht-kovalente Wechselwirkungen zwischen den Erkennungseinheiten der Inhibitoren und der Bindetasche des Enzyms. Sie sorgen für die korrekte Positionierung des nicht-kovalenten Assoziationskomplexes und orientieren im besten Fall die elektrophile Angriffsgruppe des Inhibitors so, dass sie sich in der Nähe der reaktiven katalytischen Aminosäure befindet und im nächsten Schritt eine kovalente Bindung ausgebildet werden kann. Dieser erste wichtige Reaktionsschritt, der aus nicht-kovalenten Wechselwirkungen besteht, ist demzufolge sowohl für nicht-kovalente als auch für kovalente Inhibitoren von entscheidender Bedeutung. Mit dem konventionellen, nicht-kovalenten Docking erhält man den Energiebeitrag ΔG_B aus der Bildung des nicht-kovalenten Assoziationskomplexes und kann diesen demzufolge auch für kovalente Inhibitoren zur Vorhersage des Bindungsmodus und zum Vergleich der Bindungsaffinität nutzen.

Eine einfache Strategie, um kovalente Inhibitoren nicht-kovalent zu docken, ist die „*steric clashes alleviating receptor*“ (SCAR) – Methode.¹³⁹ Dazu wird vor dem Docking der Rezeptor modifiziert, indem die Aminosäure, welche die kovalente Bindung eingehen soll, zu Alanin oder Glycin mutiert wird. So werden *clashes* vermieden, die ansonsten aufgrund der Sterik entstehen würden. Nach dem konventionellen, nicht-kovalenten Docking wird wieder zur ursprünglichen Aminosäure zurückmutiert und der Abstand zwischen den Atomen, zwischen denen im nächsten Schritt

gegebenfalls eine kovalente Bindung zustande kommen könnte, bestimmt. In der Literatur findet man einige virtuelle Screenings von kovalenten Inhibitoren, die diese einfache Alternative zum kovalenten Docking, mit Erfolg angewandt haben. *Liu et al.* haben ein virtuelles Screening mit der SCAR-Methode durchgeführt und für ein Test-Set aus 76 kovalenten Inhibitoren in über 50 % der Fälle eine gute Übereinstimmung ($\text{RMSD} < 2 \text{ \AA}$) der vorhergesagten Bindungsmodi mit den entsprechenden Kristallstrukturen erhalten.¹³⁹

1.8.2. Molekulares Docking mit FlexX

Es gibt eine große Auswahl an Docking-Programmen, wie GOLD, AutoDock, Dock, Slide oder FlexX, um ein Set aus Liganden in die Bindetasche eines Targets zu docken. Jedem Programm liegen verschiedene Algorithmen zugrunde, um Docking-Posen zu generieren, Flexibilität von Ligand und Rezeptor zu berücksichtigen und sie anhand ihres Scoring-Wertes zu bewerten. Während die Flexibilität vom Liganden von den meisten Programmen während der Docking-Berechnung mit verschiedenen zugrunde liegenden Algorithmen berücksichtigt wird, wird der Rezeptor aufgrund seiner Komplexität in den meisten Tools vereinfacht als rigide angenommen. Vereinzelt Docking-Programme, wie beispielsweise AutoDock, schließen ein Ensemble aus Kristallstrukturen mit verschiedenen Konformationen des Rezeptors als Boltzmann-gewichtete Grids in ihre Docking-Funktion ein.

FlexX verwendet die *incremental growth*-Methode, entwickelt von *Klebe* und *Böhm*,^{130,140,141} um die Flexibilität der Liganden zu berücksichtigen und verschiedene Bindungsposen zu generieren, während der Rezeptor als rigide angenommen wird. Dazu wird der Ligand an jeder nichtzyklischen Einfachbindung in kleine Fragmente geteilt. Ein Fragment des Moleküls wird zunächst als *base fragment* definiert und als erstes in die Bindetasche gedockt. Die Auswahl des *base fragments* ist ein kritischer Faktor für den Algorithmus und sollte die wichtigsten Wechselwirkungen zum Rezeptor aufweisen. Nach seiner Platzierung im aktiven Zentrum wird das Molekül wieder schrittweise aufgebaut. Dazu werden die energetisch günstigsten Torsionswinkel für jede frei drehbare Bindung aus der *Cambridge Structural Database* (CSD; <http://www.ccdc.cam.ac.uk>) entnommen. Ring-Konformationen werden mit dem Programm CORINA generiert. Bindungslängen und -winkel der Liganden (außer interne Ring-Systeme) werden aus der *input*-Datenbank ohne Änderungen von FlexX übernommen, sodass eine adäquate Energieminimierung der Strukturen vor dem Docking durchgeführt werden muss.¹³⁰

Die verschiedenen Docking-Posen werden im letzten Schritt nach ihrem FlexX-Score sortiert. Man unterscheidet zwischen empirischen und wissensbasierten Scoring-Funktionen und Scoring-Funktionen, die aus verschiedenen Kraftfeldern, wie AMBER oder CHARMM, abgeleitet wurden.¹⁴² Die Scoring-Funktion von FlexX ist eine empirische-basierte Näherungsfunktion von *Böhm et*

*al.*¹⁴³ die sich aus der Summe der Freien Energie aus H-Brückenbindungen, ionischen, aromatischen und hydrophoben Wechselwirkungen zusammensetzt. Die Koeffizienten der Terme ergeben sich aus experimentell bestimmten Bindungsenergien aus verschiedenen Protein-Ligand-Komplexen. Die Funktionen $f(\Delta R, \Delta\alpha)$ sind Penalty-Funktionen, die Abweichungen von der idealen Geometrie hinsichtlich Bindungswinkel α und Atomabstand R berücksichtigen. ΔG_0 ist ein fixer Grundterm ($\Delta G_0 = +5.4$ kJ/mol) und ΔG_{rot} soll den Entropieverlust bei Ligandenbindung durch Verhinderung der Rotation der frei-drehbaren Bindungen berücksichtigen ($\Delta G_{\text{rot}} = +1.4$ kJ/mol pro rotierbare Bindung).

$$\begin{aligned}\Delta G = & \Delta G_0 + \Delta G_{\text{rot}} \cdot N_{\text{rot}} \\ & + \Delta G_{\text{H-bonds}} \cdot \sum_{\text{H-bonds}} f(\Delta R, \Delta\alpha) \\ & + \Delta G_{\text{ion}} \cdot \sum_{\text{ion}} f(\Delta R, \Delta\alpha) \\ & + \Delta G_{\text{arom}} \cdot \sum_{\text{arom}} f(\Delta R, \Delta\alpha) \\ & + \Delta G_{\text{lipo}} \sum_{\text{lipo}} f(\Delta R, \Delta\alpha)\end{aligned}$$

Formel 1: Scoringfunktion von FlexX¹³⁰

2. Zielsetzung

Teil I: Design, Synthese und Testung Aziridin-2,3-dicarboxylat-basierter Cysteinprotease-Inhibitoren gegen Cathepsin B

Im ersten Teil dieser Arbeit sollten ausgehend von dem selektiven Epoxid-basierten Cathepsin-B-Inhibitor CA074 *trans*-konfigurierte Aziridin-(2,3)-dicarboxylierte Inhibitoren gegen humanes Cathepsin B entwickelt werden. Die bislang im AK Schirmeister synthetisierten Inhibitoren zeigen eine Präferenz für Cathepsin L und parasitäre, Cathepsin-L-ähnliche Cysteinproteasen, wie die *Leishmania mexicana* LmCPB2.8 und Papain.^{1,113,115,116,119,144,145}

Durch strukturbasiertes Drug Design wurde eine Reihe neuartiger Inhibitoren entwickelt, die selektiv den *occluding loop* von Cathepsin B, ein Strukturmerkmal, welches unter den Cathepsinen einzigartig ist, adressieren und somit die Selektivität innerhalb der Papain-ähnlichen Cysteinproteasen steigern sollen. Die positiv geladenen Histidine des *occluding loops* (His¹¹⁰/His¹¹¹) sollen mit einer freien Carboxylgruppe, die durch Abspaltung der endständigen Dipeptid-Schutzgruppe generiert wird, mittels ionischer Wechselwirkungen gezielt erreicht werden.

Durch Analyse der Kristallstrukturen bekannter Epoxid-basierter Inhibitoren (CA074, CA030, NS-134) und Docking von bisher synthetisierten Aziridin-2,3-dicarboxylierten Inhibitoren an Cathepsin B wurde eine Reihe an potentiellen Cathepsin B-Inhibitoren entwickelt, synthetisiert und getestet. Die Aminosäuresequenz L-Pro-L-Ile wurde ausgehend von CA074 und CA030 für die neuartigen Aziridinyl-Peptide als peptidische Erkennungseinheit im aktiven Zentrum von Cathepsin B übernommen.

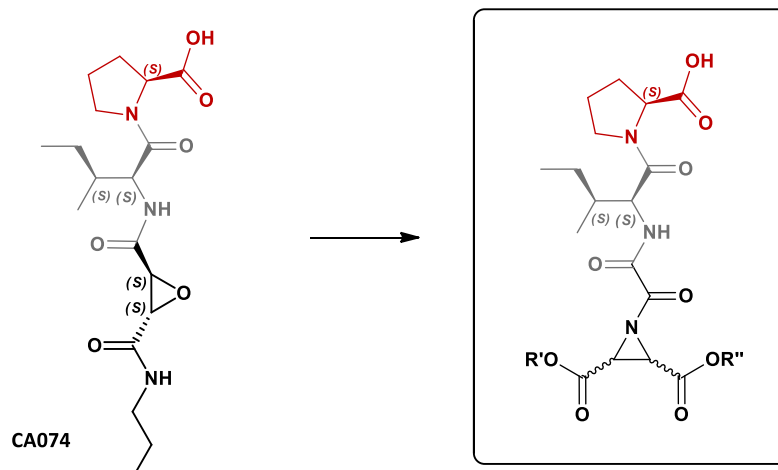


Abbildung 16: CA074 und davon abgeleitete, neuartige Aziridin-basierte Leitstruktur

Um eine freie Carboxylgruppe am endständigen Prolin zu erhalten, wurde als Schutzgruppe ein Benzylester gewählt, welcher im letzten Syntheseschritt unter milden Bedingungen hydrogenolytisch unter Palladium-Katalyse abgespalten werden kann.

Zur Verknüpfung des *N*-Terminus des Dipeptids mit dem N-Atom des Aziridin-Rings wurden verschiedene Spacer-Einheiten eingeführt und gedockt, um die optimale Linkerstruktur zu erhalten. Die Estergruppen am *trans*-konfigurierten Aziridin-Ring wurden in Länge und Lipophilie variiert, um Struktur-Wirkungsbeziehungen bezüglich der optimalen Belegung der entsprechenden Bindetaschen aufzustellen. Neben symmetrischen und unsymmetrischen Diestern, sollten analog zu Verbindung **PF350** (siehe Tabelle 6) Halbestern erhalten werden, dessen freie Carboxylgruppe das positiv geladene Histidin im katalytischen Zentrum adressieren und die Wasserlöslichkeit der Zielverbindung erhöhen soll.^{1,120}

Teil II: Molekulares Docking und Struktur-Wirkungsbeziehungen *Leishmania*-selektiver Aziridin-2,3-dicarboxylat-basierter Cysteinprotease-Inhibitoren

Im zweiten Teil meiner Arbeit wurde der Bindungsmodus *Leishmania*-selektiver Inhibitoren von Philipp Fey in Cruzain und in der *Leishmania*-Protease LmCPB2.8 mittels Molekularen Dockings untersucht.¹ Dazu wurden die PF-Inhibitoren in Cruzain (pdb: 3I06) und *Leishmania mexicana*, für welches zuvor ein Homologiemodell erstellt wurde, gedockt. Die Bindetaschen beider parasitärer Cathepsin L-ähnlicher Cysteinproteasen wurden verglichen, um Unterschiede in den Bindungsmodi und Affinitäten zu verifizieren. Dazu wurde ein Sequenz- und Struktur-Alignment beider Proteasen durchgeführt.

Eine Affinitätssteigerung bei dem Halbester **PF350** im Vergleich zu den entsprechenden Diestern aufgrund der freien Carboxylgruppe wurde hinsichtlich einer postulierten ionischen Wechselwirkung zum positiv geladenen Histidinium-Ion im katalytischen Zentrum in beiden Proteasen mittels Docking-Rechnungen untersucht.

Weiterhin wurden, ebenfalls durch Docking-Rechnungen und basierend auf den experimentell bestimmten K_i -Werten, Struktur-Wirkungsbeziehungen aufgestellt, die aus einer Variation der Estergruppen und unterschiedlicher Belegung der S_2 -Bindetaschen von Cruzain und der *Leishmania*-Protease resultieren.¹

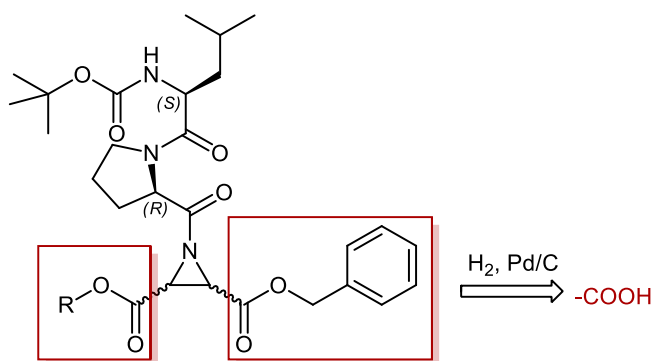


Abbildung 17: Strukturmerkmale der *Leishmania*-selektiven PF-Inhibitoren¹

3. Ergebnisse und Diskussion

Ein wirksamer, kovalenter Inhibitor muss in seiner vorreaktiven Form in der Lage sein, sich nicht-kovalent in die Bindetasche des Enzyms anzulagern, um das elektrophile Zentrum des Inhibitors in die Nähe des katalytischen Cysteins zu platzieren. Nicht-kovalente Wechselwirkungen, wie H-Brückenbindungen, van-der-Waals-, ionische, hydrophoben und Solvatations-Wechselwirkungen, sind für die richtige Positionierung des Inhibitors in die Bindetasche von entscheidender Bedeutung. Aus diesem Grund wird routinemäßig für das Molekulare Docking der Beitrag der nicht-kovalenten Wechselwirkungen sowohl für nicht-kovalente als auch für kovalente Inhibitoren in Betracht gezogen. Der Beitrag der kovalenten Bindung wird also beim konventionellen Docking vernachlässigt, da seine Berechnung nicht trivial ist.^{102,105} Durch Mutation der Aminosäure, die die kovalente Bindung ausbildet, zu beispielsweise Alanin, werden beim üblichen nicht-kovalenten Docking *clashes* zwischen Protein und Inhibitor im katalytischen Zentrum vermieden und der Beitrag der kovalenten Wechselwirkung ausgeblendet (siehe Kapitel 1.8).¹³⁹ Nach den Dockingrechnungen wird das Alanin wieder zur ursprünglichen Aminosäure zurückmutiert und der Abstand zwischen den Atomen berechnet, wo sich im nächsten Schritt die kovalente Bindung ausbilden könnte. Neben dem Scoring-Wert ΔG , der sich aus dem Docking ergibt, ist dies ein weiteres wichtiges Kriterium für eine denkbare Bindungspose. Nur solche Bindungsmodi, bei denen der Abstand weniger als 5 Å beträgt, können als mögliche Startgeometrien zur Ausbildung einer kovalenten Bindung dienen.

Das Molekulare Docking der potentiellen Aziridin-2,3-dicarboxylat-basierten Inhibitoren ist in zwei Teile gegliedert. Beim ersten Teil wurde ausgehend von der Leitstruktur **CA074**, einem bekannten Cathepsin-B-Inhibitor mit einem Epoxid als *warhead*, strukturbasiertes Drug Design von den bereits etablierten bekannten Aziridinylpeptiden durchgeführt. Beim zweiten Teil wurde der Bindungsmodus und die Struktur-Wirkungsbeziehungen *Leishmania*-selektiver Aziridin-2,3-dicarboxylat-basierter Cysteinprotease-Inhibitoren untersucht. Die in der Promotionsarbeit von Philipp Fey¹ synthetisierten und getesteten Inhibitoren wurden an Cruzain und *Leishmania mexicana* LmCPB2.8, für welches zuvor ein Homologiemodell erstellt wurde, gedockt, um Unterschiede in der Hemmung der beiden parasitären Cathepsin-L-ähnlichen Proteasen zu untersuchen.

3.1 Strukturbasiertes Drug Design, Synthese und Testung potentieller Aziridin-2,3-dicarboxylat-basierter Cysteinprotease-Inhibitoren gegen Cathepsin B

Die von dem Epoxid-basierten Inhibitor **CA074** abgeleiteten Leitstrukturen (Abbildung 16) wurden mittels konventionellem, nicht-kovalentem Docking mit der Docking-Software FlexX/LeadIT in das aktive Zentrum von Cathepsin B gedockt.¹³⁰ Dazu wurde zunächst eine Liganden-Datenbank erstellt, die Leitstrukturen bestehend aus einer Dipeptid-Einheit, zusammengesetzt aus (*S*)-Isoleucin und (*S*)-Prolin, übernommen aus dem Epoxid-basierten CB-Inhibitor **CA074**, einem Oxalyl-Linker und einem dicarboxylatbasierten Aziridin-Ring. Die erstellte Liganden-Datenbank besteht aus Verbindungen mit variierenden Estergruppen, wie Benzylester, Ethylester und Phenethylester an den Positionen R' und R'', wobei sowohl symmetrische als auch unsymmetrische Verbindungen erhalten werden können. Das aufgrund des Synthesewegs Benzylester-geschützte (*S*)-Prolin und die Benzylestergruppe am Aziridin-Ring können im letzten Synthese-Schritt gleichzeitig entfernt werden, sodass ein potentieller Inhibitor mit zwei freien Carboxylgruppen entsteht. Theoretischen Berechnungen zufolge soll die freie Carboxylgruppe am Aziridin-Ring ionische Wechselwirkungen mit His¹⁹⁹ im aktiven Zentrum von Cathepsin B eingehen können und die Carboxylgruppe am Prolin mit den Histidinen (His¹¹⁰/His¹¹¹) des CB-spezifischen *occluding loops* (Abbildung 18). Alle Inhibitoren wurden jeweils mit (*R,R*)- und (*S,S*)-konfiguriertem Aziridin-Ring gedockt, um mögliche Unterschiede im Bindungsmodus aufzuklären.

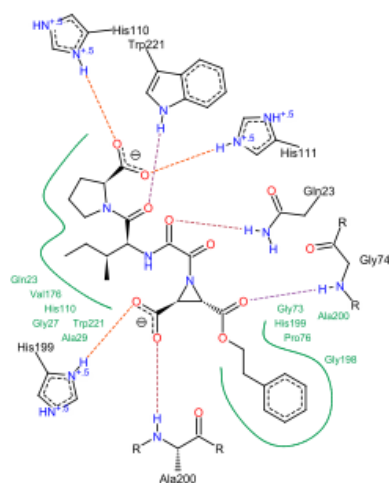
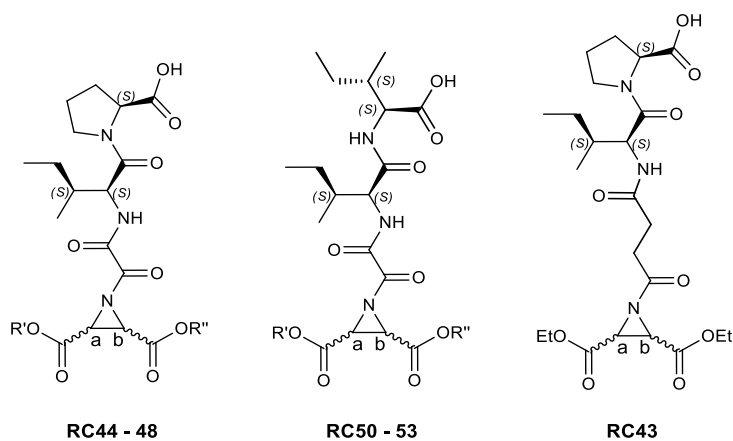


Abbildung 18: Wechselwirkungsdiagramm von Docking-Hit RC47, erstellt mit FlexX/LeadIT

Die folgende Tabelle enthält eine Übersicht von den neuartigen, an humanem Cathepsin B gedockten Aziridin-2,3-dicarboxylatbasierten Verbindungen. Der Liganden-Datenbank wurden außerdem bekannte Cathepsin B-Inhibitoren mit aufgelöster Kristallstruktur, wie **CA074**, **CA076** und **NS-134** zugefügt, um das Docking-Verfahren zu validieren und die Bindungsmodi zu vergleichen.

Tabelle 7: Liganden-Datenbank für das FlexX-Docking



	R'	R''	Konf. a, b
RC43	Et	Et	<i>S,S</i>
RC43.1	Et	Et	<i>R,R</i>
RC44	Et	Et	<i>S,S</i>
RC44.1	Et	Et	<i>R,R</i>
RC45	EtPh	EtPh	<i>S,S</i>
RC45.1	EtPh	EtPh	<i>R,R</i>
RC46	EtPh	Et	<i>S,S</i>
RC46.1	EtPh	Et	<i>R,R</i>
RC47	EtPh	OH	<i>S,S</i>
RC47.1	EtPh	OH	<i>R,R</i>
RC48	Et	OH	<i>S,S</i>
RC48.1	Et	OH	<i>R,R</i>
RC50	Et	Et	<i>S,S</i>
RC50.1	Et	Et	<i>R,R</i>
RC51	EtPh	EtPh	<i>S,S</i>
RC51.1	EtPh	EtPh	<i>R,R</i>
RC52	EtPh	Et	<i>S,S</i>
RC52.1	EtPh	Et	<i>R,R</i>
RC53	EtPh	OH	<i>S,S</i>
RC53.1	EtPh	OH	<i>R,R</i>

Von allen Liganden wurde zusätzlich die entsprechende Verbindung mit *cis*-konfigurierten Aziridin-Ring generiert und gedockt (*cis*-RCXY und *cis*-RCXY.1)

Wahl einer Kristallstruktur für Cathepsin B

In der PDB-Datenbank (<https://www.rcsb.org/>) hat man Zugriff auf über 28 Kristallstrukturen von Cathepsin B, von denen 14 aus humanem und 11 aus bovinem Vorkommen erhalten worden sind. Zunächst wurden bovines und humanes Cathepsin B bezüglich ihrer Struktur- und Sequenzähnlichkeit verglichen. Dazu wurden die Protease-Kristallstrukturen mit dem PDB-Code 2DC7 (bovines CB; Ligand **CA042**) und 1CSB (humanes CB; Ligand **CA030**), beide mit Epoxid-basierten Liganden gebunden, übereinandergelegt (Superpose und Alignment mit MOE2015). Die 3D-Strukturen von bovinem und humanem Cathepsin B unterscheiden sich dabei kaum, was sich in einem RMSD von 0.65 Å äußert (siehe Abbildung 19). Das aktive Zentrum beider Cysteinproteasen ist äußerst konserviert, was sich durch Vergleich der jeweils beteiligten Aminosäuren ergibt.

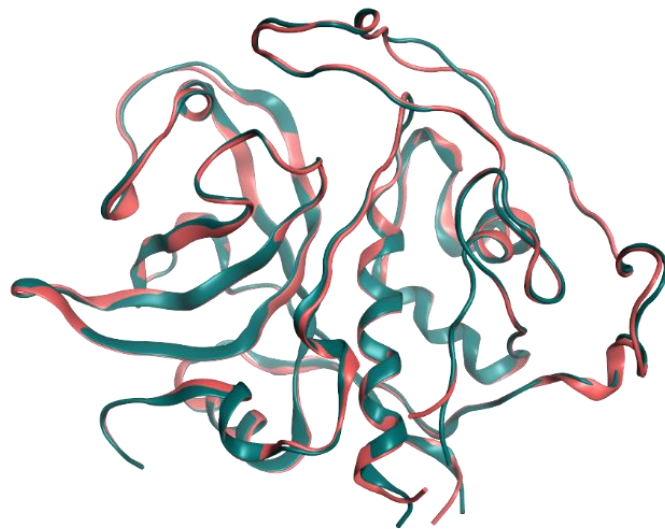


Abbildung 19: Überlagerung von bovinem Cathepsin B (türkis, pdb: 2DC7) und humanem Cathepsin B (rosa, pdb: 1CSB), RMSD = 0.65 Å, erstellt mit MOE2015

Tabelle 8: PDB-Codes der Kristallstrukturen von Cathepsin B und der entsprechende gebundene Ligand, entnommen aus der PDB-Datenbank

PDB-Code	Auflösung [Å]	Protease	Ligand
2DC6	2.3	bovines CB	CA073
2DC7	1.94	bovines CB	CA042
1SP4 ¹⁴⁶	2.2	bovines CB	NS-134
1QDQ ⁶⁹	2.18	bovines CB	CA074
1CSB ⁷⁷	2.0	humanes CB	CA030
1GMY ¹⁴⁷	1.9	humanes CB	Dipeptidyl-Nitril
3K9M ⁶⁷	2.61	humanes CB	Stefin A
1HUC ¹⁴⁸	2.1	humanes CB	-
2IPP	2.15	humanes CB	Pyridinthiol
3AI8 ⁵⁷	2.11	humanes CB	Nitroxolin
3CBJ ⁶⁸	1.80	humanes CB	Chagasin

Desweiteren wurde die Flexibilität des *occluding loops* in Abhängigkeit von der Größe des gebundenen Liganden untersucht. Dazu wurden 10 verschiedene Cathepsin B-Kristallstrukturen jeweils komplexiert mit Liganden unterschiedlicher Größe, übereinandergelegt (siehe Tabelle 8, außer 2DC6, *Superpose und Alignment* mit MOE2015). Aus diesem Protein-Alignment wird deutlich, dass der *occluding loop* ein sehr flexibles Strukturelement ist, während der Papain-ähnliche Teil des Enzyms (dunkelgrau hinterlegt in Abbildung 20) in allen Kristallstrukturen konserviert ist. Seine Konformation ist zum einen vom pH-Wert abhängig und zum anderen von der Größe des gebundenen Liganden. Mit steigendem pH-Wert wird das His¹¹⁰, welches sich in der Mitte des Loops befindet und mit Asp²² ionisch wechselwirkt, deprotoniert und die beschriebene Salzbrücke, die den Loop in einer Position fixiert, löst sich, sodass der Loop beweglich wird und die Endopeptidase-Aktivität von Cathepsin B gewährleistet wird.^{65,66,70} Aus dem *Alignment* der verschiedenen Cathepsin B-Kristallstrukturen erkennt man, dass die Konformation des *occluding loops* sich an die Größe des gebundenen Inhibitors bzw. Substrats anpassen kann. Während kleinere Inhibitoren, wie die Epoxid-basierten CA-Inhibitoren, ein Dipeptidyl-Nitril-Inhibitor oder Pyridinthiol, den *loop* in der Position belassen wie sie in der nativen Cathepsin B-Struktur (blau; pdb: 1HUC) zu finden ist, displatieren größere Substrate wie Stefin A (magenta, pdb: 3K9M)⁶⁷ oder Chagasin aus *Trypanosoma cruzi* (türkis, pdb: 3CBJ)⁶⁸ diesen, sodass sie im aktiven Zentrum binden können. Die Flexibilität des loops und seine Anpassung an den jeweiligen Liganden sorgen dafür, dass die Endopeptidase-Aktivität erhalten bleibt, indem der Zugang zum aktiven Zentrum geöffnet wird. Die Konformationsänderung hat dabei keinen Einfluss auf die Struktur des aktiven Zentrums, wie man aus dem Alignment ihrer Kristallstrukturen erkennen kann, sodass die Bindungsaffinität des Inhibitors davon nicht beeinträchtigt wird (Chagasin: K_i (CB) = 0.93 nM, Stefin A: K_i (CB) = 1.7 nM).^{67,68}

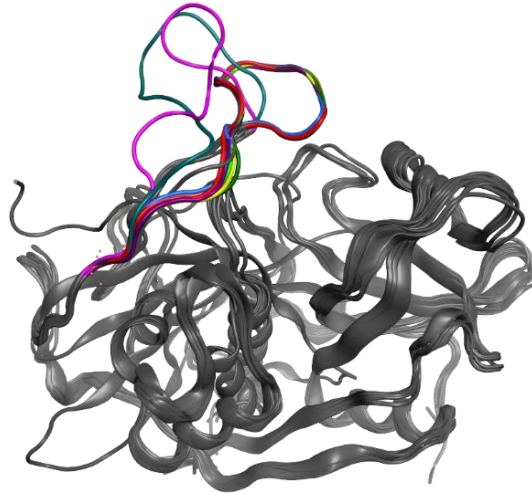


Abbildung 20: Alignment zehner verschiedener Cathepsin B-Strukturen (siehe Tabelle 8), verschiedene Konformationen des *occluding loops* sind farblich hervorgehoben, türkis, pdb: 3CBJ (Chagasin); magenta, pdb: 3K9M (Stefin A); blau, pdb: 1HUC (natives CB); erstellt mit MOE2015

Für das folgende Docking wurde eine Kristallstruktur gewählt mit einem Liganden, der eine ähnliche Struktur und Größe hat wie die Aziridinyl-Peptide. Die Cathepsin B-Kristallstruktur (pdb: 2DC7) komplexiert mit dem kovalent-gebundenen Epoxid-basierten Liganden **CA042** hat mit 1.94 Å eine gute Auflösung und einen irreversiblen Inhibitor ähnlicher Struktur wie die zu dockenden Aziridin-basierten Liganden, sodass sie für folgende Docking-Berechnungen gewählt wurde.

Validierung der FlexX-Docking-Einstellungen

Für die Docking-Berechnungen wurde das Programm FlexX-LeadIT verwendet.¹³⁰ Der interne Ring-Konformationsgenerator der FlexX-Software wurde ausgeschaltet, indem der voreingestellter Ring-Mode von 5 auf 0 gestellt wurde. Das bedeutet, dass alle Ringe in den zu dockenden Verbindungen die Konformation aus der Energieminimierung auch während den Docking-Berechnungen behalten. Beim Ring-Mode 5, würde FlexX die Aziridin-Bindung als eine klassische, planare Amid-Bindung betrachten und das Molekül an dieser Stelle fälschlicherweise „platt“ drücken. Ansonsten wurde das Standard-Protokoll der Software nicht verändert. Die Bindetasche wurde als 6 Å große Kugel um den Referenzliganden bestimmt. Die kovalente Bindung, der Referenzligand, sowie sämtliche Wassermoleküle wurden aus der Kristallstruktur entfernt und das Protein protoniert, um physiologische Bedingungen zu erhalten. Histidine wurden an beiden Imidazol-Stickstoffatomen protoniert und das katalytische Cystein zu Alanin mutiert (siehe Kap. 1.8.1. , *steric clashes alleviating receptor* - Methode zum nicht-kovalenten Docking von kovalenten Inhibitoren).¹³⁹

Um die gewählten FlexX-Einstellungen zu validieren, wird vor den Docking-Berechnungen ein sogenanntes *Redocking* durchgeführt. Dazu wird der Referenzligand aus der Kristallstruktur manuell entfernt, um ihn im nächsten Schritt mit den gewählten Docking-Einstellungen in diese zurück zu docken. Auf diese Weise stellt man sicher, dass die Docking-Software mit den gewählten Einstellungen in der Lage ist, den Referenzliganden wieder korrekt, analog zur Kristallstruktur, in die aktive Tasche zu positionieren. Der Referenzligand **CA042** aus der verwendeten Cathepsin B-Kristallstruktur 2DC7 wurde mit den gewählten FlexX-Einstellungen erfolgreich wieder zurück in die aktive Tasche gedockt (siehe Abbildung 21, RMSD: 1.12 Å; rosa: Kristallstruktur, grau: gedockter Ligand).

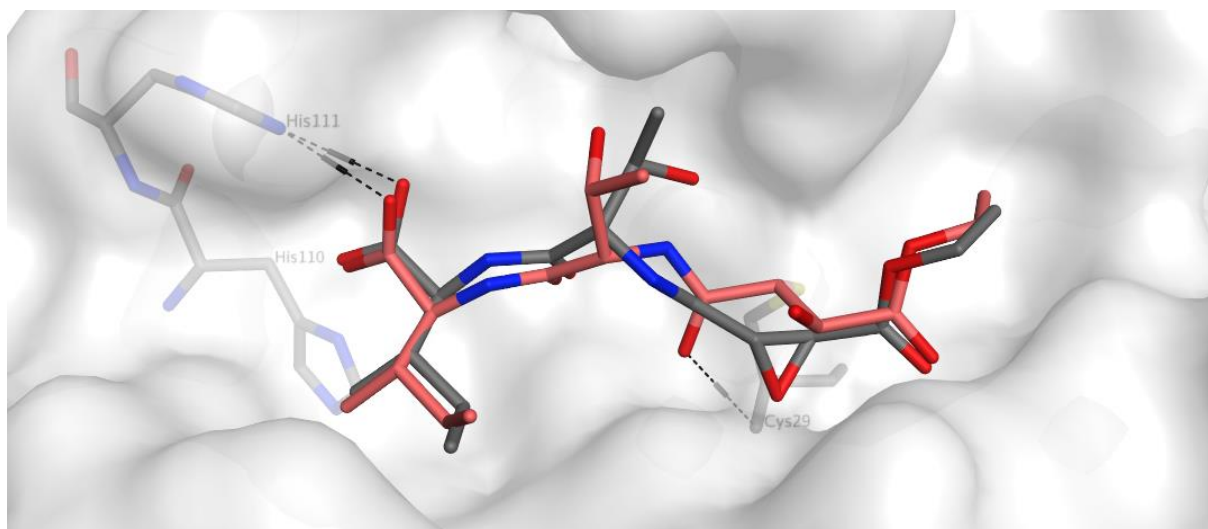


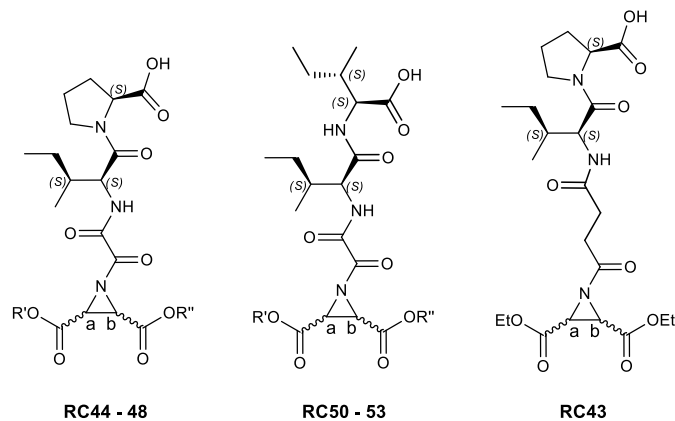
Abbildung 21: Redocking an Cathepsin B (pdb: 2DC7; rosa: Kristallstruktur, grau: gedockter Ligand, RMSD: 1.12 Å)

Erstellen der Liganden-Datenbank

Die Liganden werden vor den Docking-Berechnungen einer Energieminimierung unterzogen, um jeweils die energetisch günstigste Konformation zu erhalten. Die Aziridid-Bindung ist keine klassische, planare Amid-Bindung, der Aziridid-Winkel beträgt etwa 110°. Die Liganden wurden mit dem MMFF94-Kraftfeld in MOE2015 energieminimiert, welches im Gegensatz zum MMFF94x-Kraftfeld die konjugierten Stickstoffatome nicht automatisch als planar betrachtet.^{149,150} Jeder Ligand wurde jeweils mit (*R,R*)- und (*S,S*)-konfigurierten Aziridin-Ring in die Datenbank aufgenommen ((*R,R*):RCXY und (*S,S*):RCXY.1). Außerdem wurde zu jeder Verbindung die entsprechende *cis*-konfigurierte Aziridin-Variante gedockt.

Die folgende Tabelle ordnet die Liganden nach ihrem FlexX-Score und gibt den Abstand zwischen dem Schwefelatom des katalytischen Cystein-Rests und dem elektrophilen Kohlenstoffatom des Aziridin-Rings an (bestimmt mit MOE2015):

Tabelle 9: FlexX-Docking-Ergebnisse an humanem Cathepsin B (pdb: 2DC7), sortiert nach FlexX-Score



Ligand	R'	R''	Konf. a, b	FlexX- Score	Abstand Cys ²⁹ [Å]
<i>cis</i> -RC47	EtPh	OH	<i>S,S</i>	-43.3	1.91
E64				-37.6	6.21
<i>cis</i> -RC48	Et	OH	<i>S,S</i>	-37.4	2.04
RC47	EtPh	OH	<i>S,S</i>	-35.7	2.96
RC48	Et	OH	<i>S,S</i>	-33.2	2.99
CA074				-33.1	2.08
NS-134				-32.3	2.86
RC47.1	EtPh	OH	<i>R,R</i>	-31.5	5.00
RC44	Et	Et	<i>S,S</i>	-30.9	3.12
RC48.1	Et	OH	<i>R,R</i>	-30.8	3.95
RC46.1	Ph	Et	<i>R,R</i>	-30.5	4.20
E64c				-29.8	2.12
RC45.1	EtPh	EtPh	<i>R,R</i>	-29.6	3.51
RC44.1	Et	Et	<i>R,R</i>	-28.2	5.10
<i>cis</i> -RC53	EtPh	OH	<i>S,S</i>	-26.5	7.54
<i>cis</i> -RC48.1	Et	OH	<i>R,R</i>	-25.8	2.47
RC52	EtPh	Et	<i>S,S</i>	-25.3	5.76
RC46	EtPh	Et	<i>S,S</i>	-25.3	3.83
CA076				-25.2	1.71
RC53	EtPh	OH	<i>S,S</i>	-25.0	8.19
RC45	EtPh	EtPh	<i>S,S</i>	-23.8	2.89
RC52.1	EtPh	Et	<i>R,R</i>	-23.7	6.04
RC43	Et	Et	<i>S,S</i>	-23.0	5.94
RC50.1	Et	Et	<i>R,R</i>	-21.9	8.53
RC51	EtPh	EtPh	<i>S,S</i>	-20.8	6.77
RC50	Et	Et	<i>S,S</i>	-19.6	11.02
RC51.1	EtPh	EtPh	<i>R,R</i>	-19.4	8.54
RC54.1	Et	OH	<i>R,R</i>	-16.9	2.79
RC54	Et	OH	<i>S,S</i>	-15.7	7.02
RC53.1	EtPh	OH	<i>R,R</i>	-----	

Epoxid-Inhibitoren sind in fett gedruckt, Abstände wurden mit MOE2015 bestimmt

Austausch der Aminosäure in Position 2: Isoleucin vs. Prolin

Bei den Epoxid-Inhibitoren **CA030** (Prolin an Position P2) und **CA042** (Isoleucin an Position P2) macht der Austausch der Aminosäure kaum einen Unterschied im Bindungsmodus und der Bindungsaffinität. Bei den Aziridin-basierten Inhibitoren wurden Derivate mit Isoleucin und Prolin an Position 2 gedockt, um mögliche Unterschiede in den Bindungsmodi zu überprüfen. Die Verbindungen **RC47** (Prolin-Derivat) und **RC53** (Isoleucin-Derivat) unterscheiden sich nur an Position P2 und zeigen im Gegensatz zu den Epoxid-basierten Inhibitoren unterschiedliche Bindungsmodi. Während **RC47** (orange, FlexX-Score: -35.7, 2.96 Å) einen analogen Bindungsmodus zu **CA042** hat und den Aziridin-Ring entsprechend nahe des katalytischen Zentrums positioniert, liegt das Isoleucin-Derivat **RC53** (magenta, FlexX-Score: -25.0, 8.19 Å) umgekehrt in der Bindetasche, sodass sich der Aziridin-Ring zu weit vom Cystein-Rest befindet. Zum weiteren Ligandendesign sollen die Verbindungen demzufolge die Aminosäuresequenz (*S*)-Isoleucin-(*S*)-Prolin tragen.

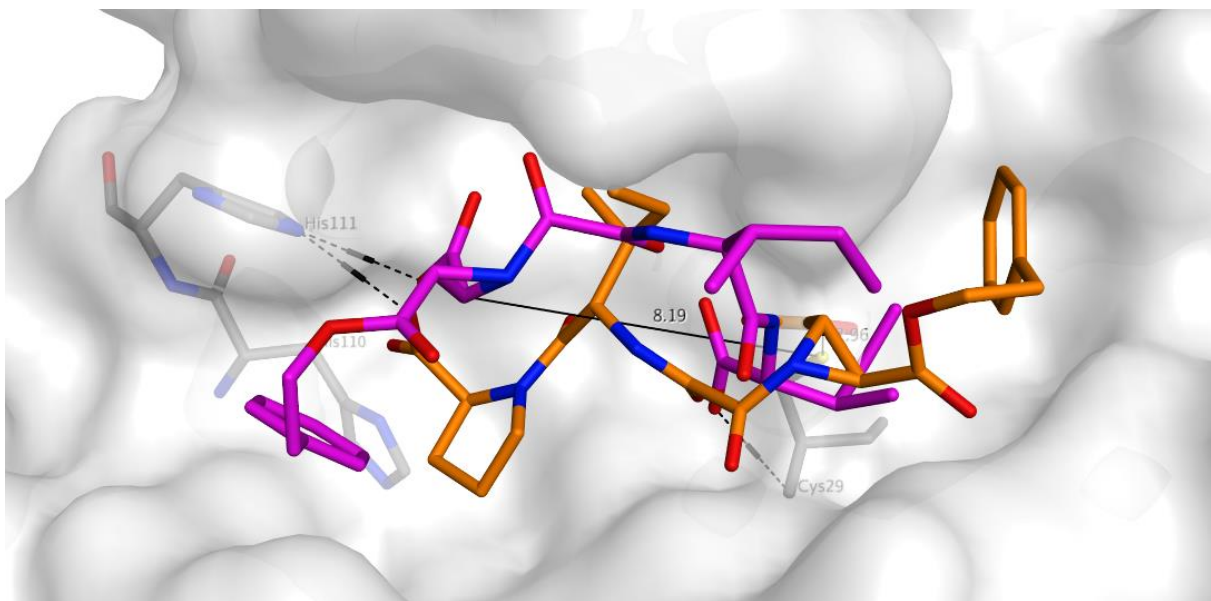


Abbildung 22: Vergleich der von FlexX postulierten Bindungsmodi von RC47 (orange, Prolin-Derivat; FlexX-Score: -35.7) und RC53 (magenta, Isoleucin-Derivat, FlexX-Score: -25.0), erstellt mit MOE2015

Auswahl eines geeigneten Linkers

Das Stickstoffatom des Aziridin-Rings und der *N*-Terminus der Dipeptid-Einheit werden über einen Linker mit zwei endständigen Carbonyleinheiten verknüpft. Um die geeignete Länge des Linkermoleküls zu ermitteln, wurden zwei verschiedene Linker an entsprechender Stelle eingefügt: entweder mit zwei Methyleneinheiten (**RC43**, lila, FlexX-Score: -23.0, 5.94 Å / 6.02 Å) oder ohne Methyleneinheit (**RC44**, türkis, FlexX-Score: -30.9, 3.12 Å / 3.89 Å) zwischen den beiden Carbonylgruppen. Die von FlexX postulierten Bindungsmodi beider Verbindungen unterscheiden sich kaum (siehe Abbildung 23). Allerdings rückt der Aziridin-Ring umso weiter vom katalytischen Cystein weg, je länger das Linkermolekül wird. Der Oxalsäure-Linker der Verbindung **RC44** hat eine geeignete Länge und Struktur und wurde für die weiteren Derivate übernommen.

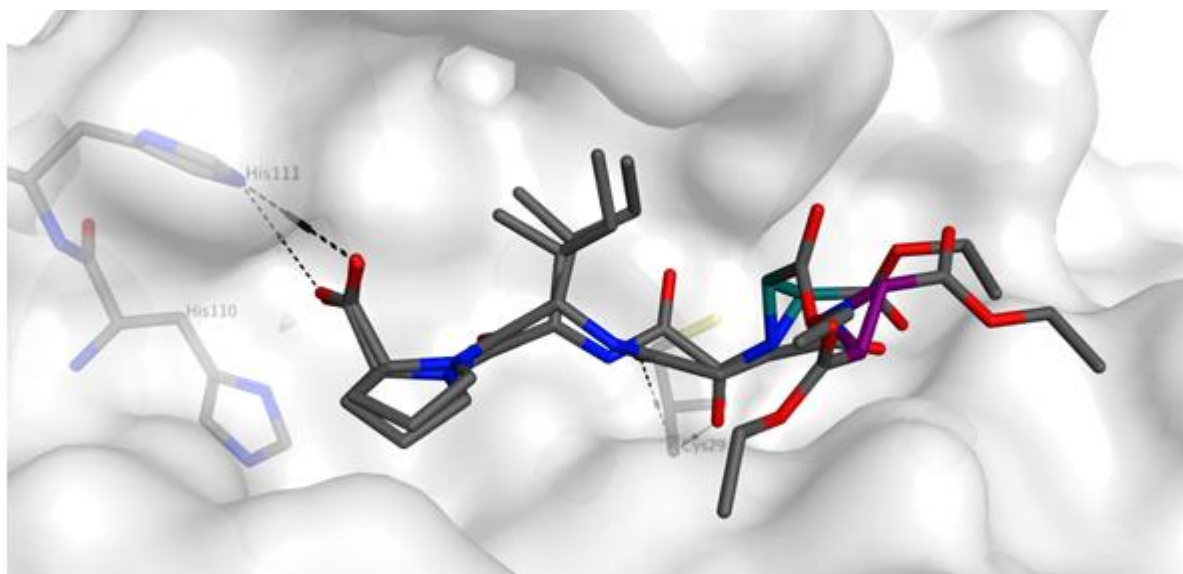


Abbildung 23: Vergleich der von FlexX postulierten Bindungsmodi von RC43 (magenta, FlexX-Score: -23.0, 5.94 Å) und RC44 (türkis, FlexX-Score: -30.9, 3.12 Å), erstellt mit MOE2015

Halbester vs. Diester

Als nächstes wurde untersucht, ob die Bindungsaffinität und der Bindungsmodus sich ändern, wenn am Aziridin-Ring eine freie Carboxylgruppe eine Estergruppe ersetzt. Die Bindungsmodi sind ähnlich und die ionische Wechselwirkung zum *occluding loop* ist bei beiden Verbindungen gegeben. Beim Halbester **RC47** (orange; R' = (OH), R'' = (OEtPh), FlexX-Score: -35.7) wird durch die freie Carboxylgruppe am Aziridin-Ring eine zusätzliche Wechselwirkung mit His¹⁹⁹ generiert und der FlexX-Score ist demzufolge höher als beim entsprechenden Diester **RC45** (grün, R' = R'' = (OEtPh)₂, FlexX-Score: -23.7).

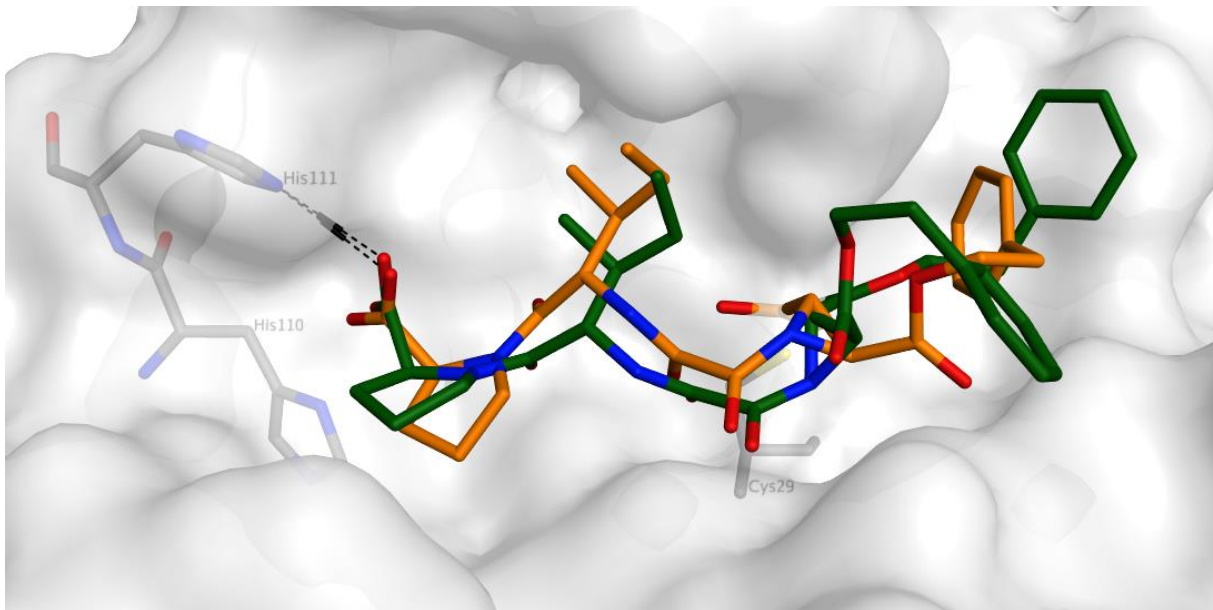


Abbildung 24: Vergleich der von FlexX postulierten Bindungsmodi von RC47 (orange, FlexX-Score: -35.7, 2.96 Å) und RC45 (grün, FlexX-Score: -23.7, 2.89 Å), erstellt mit MOE2015

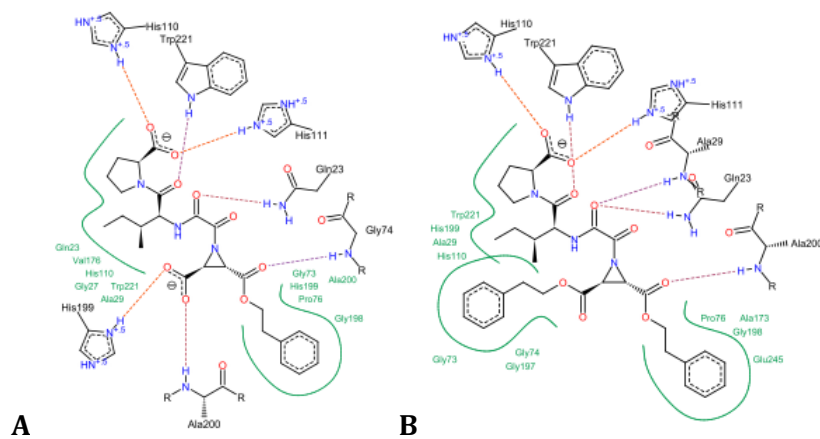


Abbildung 25: Vergleich der von FlexX postulierten Bindungsmodi von RC47 (A, orange, FlexX-Score: -35.7, 2.96 Å) und RC45 (B, grün, FlexX-Score: -23.7, 2.89 Å), erstellt mit MOE20

Vergleich der Estergruppen bei Halbester-Derivaten

Bei den Halbestern wurde untersucht, ob ein Phenylethyl-Ester **RC47** (orange, FlexX-Score: -35.7, 2.96 Å) oder ein Ethyl-Ester **RC48** (türkis, FlexX-Score: -33.2, 2.99 Å) die S2-Bindetasche besser ausfüllt. Während sich die Bindungsmodi, die Scores und der Abstand zum katalytischen Cystein-Rest kaum unterscheiden, besetzt der Phenylethyl-Ester die S2-Bindetasche nahezu vollständig, dagegen ist der Ethyl-Ester *solvent-exposed*.

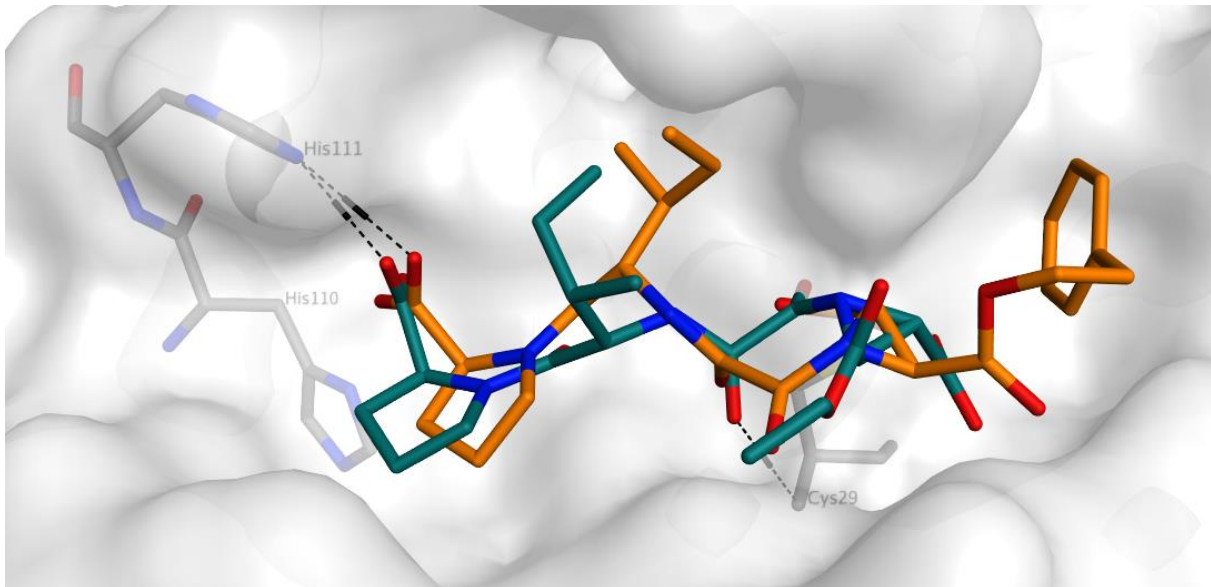


Abbildung 26: Vergleich der von FlexX postulierten Bindungsmodi von RC47 (orange, FlexX-Score: -35.7, 2.96 Å) und RC48 (türkis, FlexX-Score: -33.2, 2.99 Å), erstellt mit MOE2015

Vergleich der *cis*- und *trans*-Halbester

Die Bindungsmodi und Scores vom *trans*-Halbester **RC47** (orange, FlexX-Score: -35.7, 2.96 Å) und dem *cis*-Halbester **cis-RC47** (hellblau, FlexX-Score: -43.3, 1.91 Å) sind sehr ähnlich. Die Peptidkette liegt jeweils in der S1'-Tasche und die Carboxylgruppe am Aziridin-Ring in der S1-Tasche. Beim *cis*-Halbester ragt der Phenyl-Ring allerdings aus der S2-Tasche heraus, während er beim *trans*-Halbester **RC47** in der Bindetasche platziert ist.

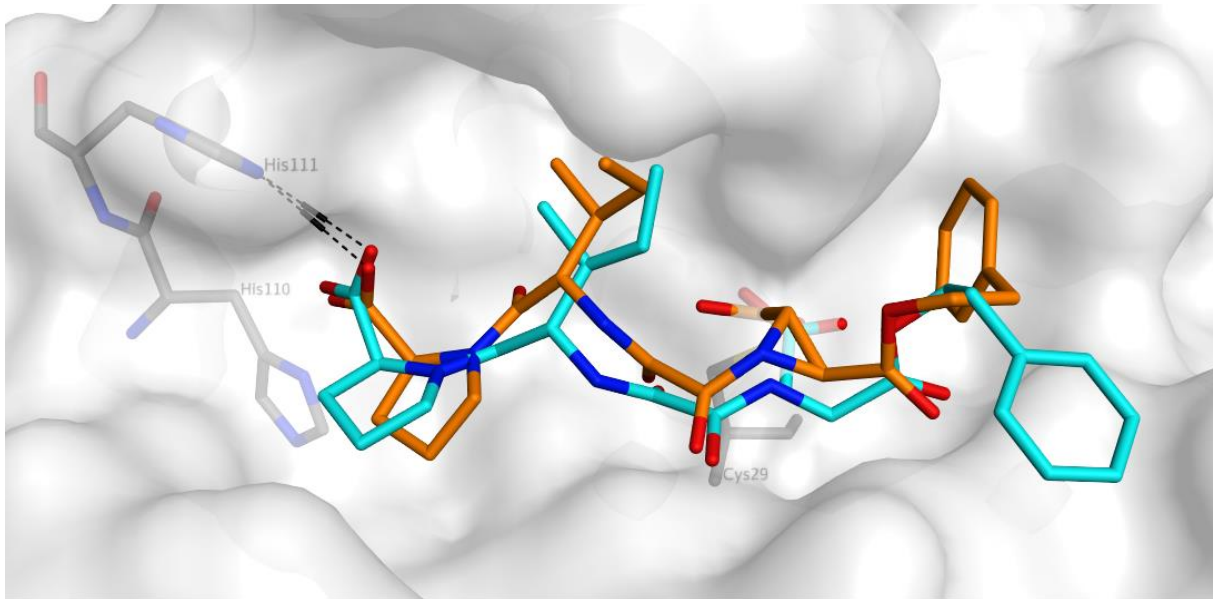


Abbildung 27: Vergleich der von FlexX postulierten Bindungsmodi von RC47 (orange, FlexX-Score: -35.7, 2.96 Å) und RC48 (türkis, FlexX-Score: -33.2, 2.99 Å), erstellt mit MOE2015

Vergleich der Konfiguration des Aziridin-Rings bei den *trans*-Halbestern

Aus der Überlagerung der Bindungsposen sieht man, dass das (*S,S*)-Derivat **RC47** (orange, FlexX-Score: -35.7, 2.96 Å) im Gegensatz zum (*R,R*)-Derivat **RC47.1** (braun, FlexX-Score: -31.5, 5.00 Å) die S2-Tasche mit dem Ester belegt und die freie Carbonsäure mit dem His¹⁹⁹ in Wechselwirkung tritt (siehe 2D-Interaktionsdiagramm Abbildung 29).

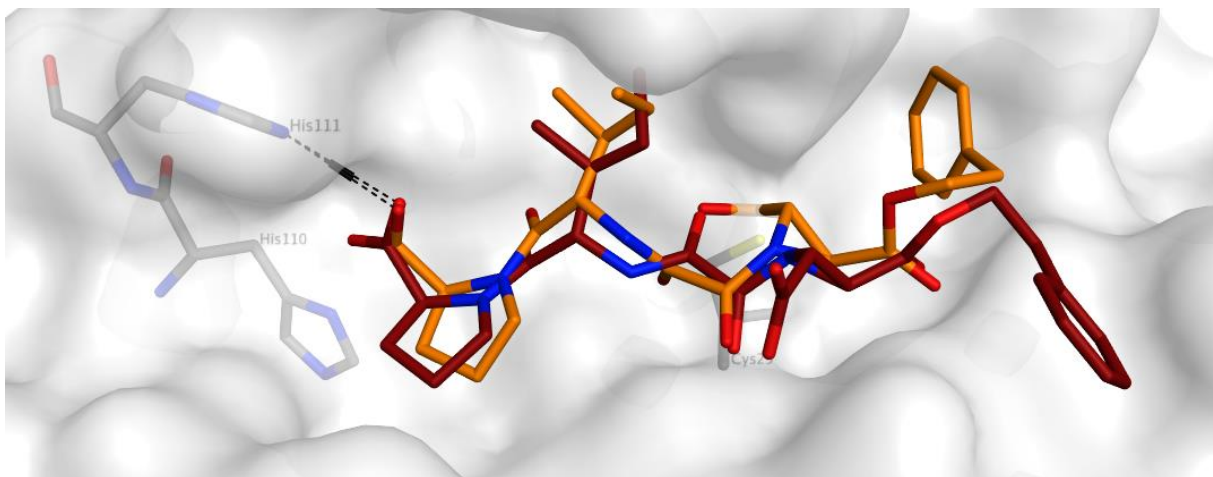


Abbildung 28: Vergleich der von FlexX postulierten Bindungsmodi von RC47 (orange, FlexX-Score: -35.7, 2.96 Å) und RC47.1 (braun, FlexX-Score: -31.5, 5.00 Å), erstellt mit MOE2015

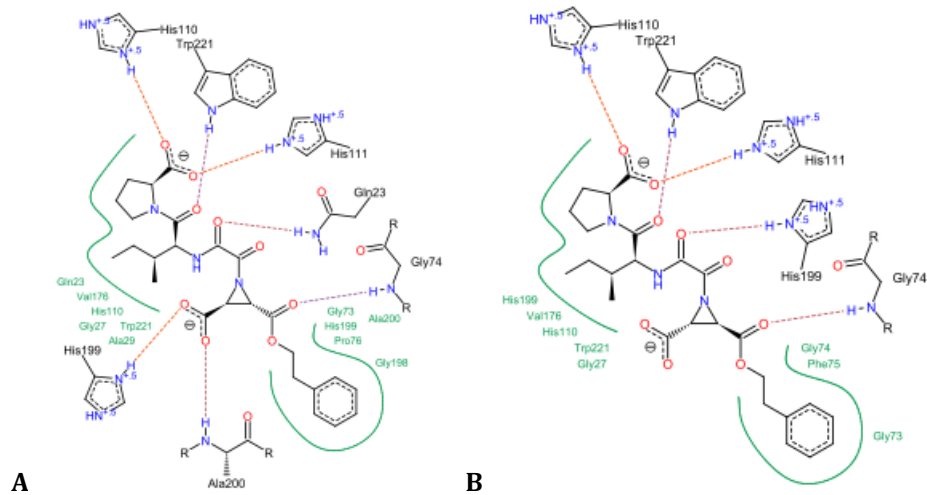


Abbildung 29: 2D-Interaktionsdiagramm von RC47 (A, (S,S)-konf. Aziridinring) und RC47.1 (B, (R,R)-konf. Aziridinring), erstellt mit FlexX/LeadIT

Vergleich von RC47 mit der Epoxid-basierten Leitstruktur CA074

Der Bindungsmodus der neuen virtuellen Hit-Substanz **RC47** ist analog zu dem Bindungsmodus ihrer Leitstruktur **CA074** (blau, FlexX-Score: -33.1, 2.08 Å), wie die Überlagerung ihrer Posen zeigt (Abbildung 30). Die favorisierte, ionische Wechselwirkung zum His^{110/111} des Cathepsin B-spezifischen *occluding loops* ist vorhanden. Die Aziridin-basierte Verbindung **RC47** hat außerdem zusätzliche Wechselwirkungen der freien Carboxylgruppe am Aziridin-Ring mit His¹⁹⁹ und Ala²⁰⁰ (siehe 2D-Interaktionsdiagramme, Abbildung 29).

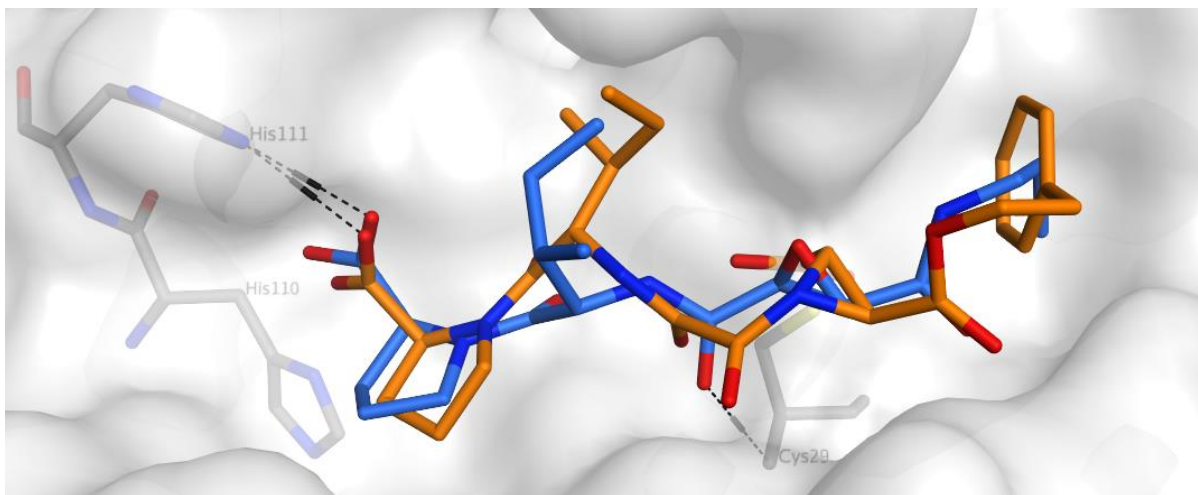


Abbildung 30: Vergleich der von FlexX postulierten Bindungsmodi von RC47 (orange) und Cathepsin B-Inhibitor CA074 (blau), erstellt mit MOE2015

Die Auswertung der FlexX-Docking-Ergebnisse an Cathepsin B haben den Halbester **RC47** und sein *cis*-Derivat **cis-RC47** als vielversprechende Hit-Substanzen ergeben. Ihre Bindungsmodi sind vergleichbar mit denen der epoxidbasierten Leitstrukturen **CA074** und **CA042**. Neben der

ionischen Wechselwirkung zum *occluding loop* wird für **RC47** eine weitere ionische Wechselwirkung mit dem His¹⁹⁹ im katalytischen Zentrum postuliert. Der FlexX-Score und der Abstand des *warheads* zum katalytischen Cystein-Rest Cys²⁹ sind als sehr günstig einzustufen (siehe Tabelle 9).

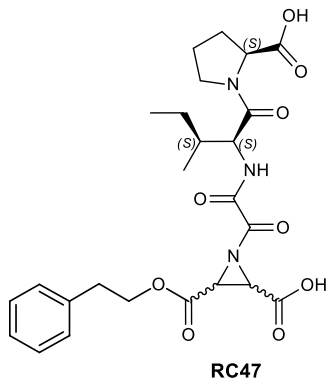
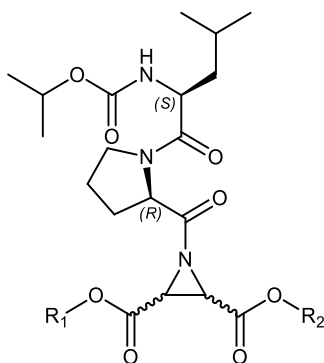


Abbildung 31: Strukturformel der Docking-Hit-Substanz RC47

Eine Auswahl an Docking-Hit-Substanzen aus dem strukturbasiertem Drug Design wurden synthetisiert und in Enzym-Assays auf ihre Wirksamkeit gegenüber Cathepsin B, Cathepsin L, Cruzain und Rhodesain getestet (siehe Kapitel 4 und 5).

3.2 Molekulares Docking und Struktur-Wirkungsbeziehungen *Leishmania*-selektiver Aziridin-2,3-dicarboxylat-basierter Cysteinprotease-Inhibitoren

Eine Reihe wirksamer Aziridin-2,3-dicarboxylat-basierter Inhibitoren gegen die parasitäre Cathepsin-L ähnliche LmCPB2.8-Protease wurden ausgehend von den Leitstrukturen **RV122C** und **CS09** von Philipp Fey im Rahmen seiner Promotionsarbeit synthetisiert und getestet.¹⁵¹ Durch Variation der Estergruppen am *warhead* sollten die Affinität und die Wasserlöslichkeit optimiert werden. Die potentiellen Inhibitoren kann man in drei Gruppen einteilen: symmetrische Ester (**PF5**, **PF12**, **PF13**, **PF14**), unsymmetrische Ester (**PF1**, **PF2**, **PF3**, **PF7**, **PF8**, **PF9**) und Halbestere (**PF15** - **19**). Beim Vergleich der K_i -Werte der symmetrischen und unsymmetrischen Ester an der *Leishmania*-Protease LmCPB2.8 und Cruzain fällt auf, dass sich die Selektivität und Affinität für die *Leishmania*-Protease mit steigender Esterlängenkette verbessert. So zeigen alle Inhibitoren (**PF3** - **14**) mit sterisch anspruchsvollen lipophilen Estergruppen eine gute Affinität und Selektivität für LmCPB2.8 (siehe Tabelle 10).

Tabelle 10: K_i -Werte an *Leishmania mexicana* LmCPB2.8 und Cruzain von *N*-acylierten Aziridin-2,3-dicarboxylat-basierten PF-Inhibitoren

	R₁	R₂	LmCPB2.8	Cruzain
			K_i [μM]	K_i [μM]
PF1	Ethyl	Benzyl	ni	ni
PF2	<i>tert</i> -Butyl	Benzyl	ni	ni
PF3	Cyclohexylmethyl	Benzyl	1.8±0.4	7.6±0.7
PF5	Benzyl	Benzyl	2.8	1.8
PF7	Naphthalene-2-yl-methyl	Benzyl	0.8	ni
PF8	2-Phenylethyl	Benzyl	1.92±0.06	5.5±0.2
PF9	3-Phenylpropyl	Benzyl	1.36±0.05	ni
PF12	Cyclohexylmethyl	Cyclohexylmethyl	0.77±0.05	ni
PF13	2-Phenylethyl	2-Phenylethyl	1.6±0.1	7.7±0.7
PF14	3-Phenylpropyl	3-Phenylpropyl	0.9±0.1	ni
PF15	Ethyl	H	ni	ni
PF16	<i>tert</i> -Butyl	H	ni	ni
PF17	Cyclohexylmethyl	H	1.79±0.43	0.71±0.015
PF18	2-Phenylethyl	H	0.44±0.022	ni
PF19	3-Phenylpropyl	H	ni	ni

ni = no inhibition (20 μ M), LmCPB2.8 = *Leishmania mexicana* CPB2.8

Mit dem Ziel, Struktur-Wirkungsbeziehungen aufzustellen und den Bindungsmodus an Cruzain und LmCPB2.8 zu untersuchen, wurden an beiden Enzymen Docking-Studien mit FlexX/LeadIT durchgeführt. Da es für LmCPB2.8 keine Kristallstruktur gibt, wurde hierfür zunächst ein Homologiemodell erstellt, an dem im Folgenden die Inhibitoren gedockt werden konnten. Desweiteren wurden einige von Philipp Fey synthetisierte PF-Inhibitoren mittels semipräparativer HPLC erfolgreich aufgereinigt (Details zu den HPLC-Methoden siehe Kapitel 8.1).

Homologiemodell der *Leishmania*-Protease LmCPB2.8

Homologiemodelle bieten eine schnelle, computergestützte Möglichkeit, die dreidimensionale Struktur eines Enzyms, von welchem keine Kristallstruktur bekannt ist, auf Basis seiner Proteinsequenz und der eines homologen Proteins nachzubilden.^{122,152} Das Homologiemodell der *Leishmania mexicana* LmCPB2.8 wurde mithilfe der *PDB-Search* Applikation von MOE 2015 (Molecular Operating Environment)¹⁵³ erstellt. Die Proteinsequenz der LmCPB2.8 mit der Uniprot-Identifizierungsnummer P36400 wurde dazu als Basis verwendet. Mit dieser vorgegebenen Proteinsequenz wurde mittels eines *Alignments* ein passendes Template aus einer Datenbank basierend auf der höchsten Sequenz-Similarität und -Identität ausgesucht. Die Kristallstruktur von Cruzain mit dem PDB-Code 3KKU¹⁵⁴ (Auflösung: 1.28 Å) zeigte mit einer Sequenz-Similarität von 74.0 % und einer Sequenz-Identität von 59.5 % die beste Übereinstimmung mit der Proteinsequenz von LmCPB2.8 und konnte somit als Template für das Homologiemodell benutzt werden (Abbildung 33).

	10	20	30	40	50
MATSRAALCA	VAVVCVLA	ACAPARAIHV	GTPAAALFEE	FKRTYGRAYE	
60	70	80	90	100	
TLAEEQQLA	NFERNLELMR	EHQARNPHAQ	FGITKFFDLS	EAEFAARYLN	
110	120	130	140	150	
GAAYFAAAKR	HAAQHRYKAR	ADLSAVPDAV	DWREKGAVTP	VKDQGACGSC	
160	170	180	190	200	
WAFSAVGNIE	GQWYLAGHEL	VSLSEQQLVS	CDDMNDGCDG	GLMLQAFDWL	
210	220	230	240	250	
LQNTNGHLHT	EDSYPYVSGN	GYVPECSNSS	ELVGAQIDG	HVLIGSSEKA	
260	270	280	290	300	
MAAWLAKNGP	IAIALDASSF	MSYKSGVLT	CIGKQLNHGV	LLVGDMTGE	
310	320	330	340	350	
VPYWVIKNSW	GGDWGEQGYV	RVVMGVNACL	LSEYPVSAHV	RESAAPGTST	
360	370	380	390	400	
SSETPAPRPV	MVEQVICFDK	NCTQGCRKTL	IKANECHKNG	GGGASMIKCS	
410	420	430	440		
PQKVTMCTYS	NEFCVGGGLC	FETPDGKCAP	YFLGSIMNTC	HYT	

Abbildung 32: Aminosäuresequenz der LmCPB2.8 (Uniprot-Identifizierungsnummer P36400),¹⁵⁵ Länge: 443 AS; Masse: 47,728 Da; Signalpeptid: 1-27; Propeptid: 28-125; Chain: 126-443

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1:query_sp P...		74.0	48.1	57.4	55.9	52.3	51.8	49.6	46.1	54.2
2:3KKU.A	35.9		36.8	53.4	53.2	50.5	50.9	45.9	44.9	54.6
3:206X.A	33.6	53.0		64.6	56.8	55.1	58.6	50.8	48.1	54.2
4:4LEG.A	28.9	55.3	46.5		57.7	57.9	60.9	50.8	49.8	57.4
5:2ACT.A	27.8	54.4	40.3	57.0		63.6	52.7	53.7	49.0	60.2
6:2BDZ.A	25.3	50.2	38.1	55.6	61.8		54.5	51.2	46.5	53.7
7:8PCH.A	25.7	52.1	41.6	60.1	52.7	56.1		48.8	45.7	53.7
8:2B1M.A	27.5	52.6	40.3	56.1	60.0	58.9	54.5		47.3	63.0
9:3BWK.B	25.3	50.7	37.7	54.3	54.1	52.8	50.5	46.7		49.5
10:3U8E.A	26.4	54.9	37.7	55.6	59.1	54.2	52.7	55.3	44.0	

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1:query_sp P...		59.5	33.5	40.8	35.5	35.5	35.5	31.7	34.6	36.6
2:3KKU.A	28.9		27.1	38.6	36.4	36.4	34.5	30.9	31.7	36.6
3:206X.A	23.5	39.1		48.4	40.0	40.2	41.8	34.6	32.9	39.4
4:4LEG.A	20.5	40.0	34.8		39.1	43.5	46.4	38.2	36.2	43.1
5:2ACT.A	17.6	37.2	28.4	38.6		49.1	38.6	39.0	31.3	47.2
6:2BDZ.A	17.2	36.3	27.7	41.7	47.7		36.8	38.2	32.5	41.2
7:8PCH.A	17.6	35.3	29.7	45.7	38.6	37.9		35.8	30.5	39.8
8:2B1M.A	17.6	35.3	27.4	42.2	43.6	43.9	40.0		32.9	50.0
9:3BWK.B	19.0	35.8	25.8	39.5	34.5	36.9	33.6	32.5		34.7
10:3U8E.A	17.8	36.7	27.4	41.7	46.4	41.6	39.1	43.9	30.9	

Abbildung 33: Sequenz-Similaritäts- (oben) und Sequenz-Identitäts-Matrix (unten) des Homologie-Modellings der LmCPB2.8 (Uniprot-Identifizier-Nr.: P36400), erstellt mit MOE2015

Mit der *MOE Homology Model* Applikation wurde das Homologiemodell der LmCPB2.8 mit der Proteinsequenz P36400 und der Template-Struktur von Cruzain (pdb: 3KKU)¹⁵⁶ erstellt. Zur Energieminimierung wurde das AMBER10 *force field* verwendet.¹⁵⁰ Es wurden 10 verschiedene Modelle mithilfe einer Boltzmann-gewichteten Modelling-Berechnung konstruiert. Das endgültige Homologiemodell wurde auf Grundlage des höchsten Scoring-Werts selektiert. Die dazu verwendeten Scoring-Berechnungen basieren auf der *Generalized Born/Volume Integral (GB/VI)* - Methode.¹⁵⁷ Anschließend wurde das erstellte Homologiemodell mit der Template-Struktur überlagert (Abbildung 34, RMDS 0.54 Å).

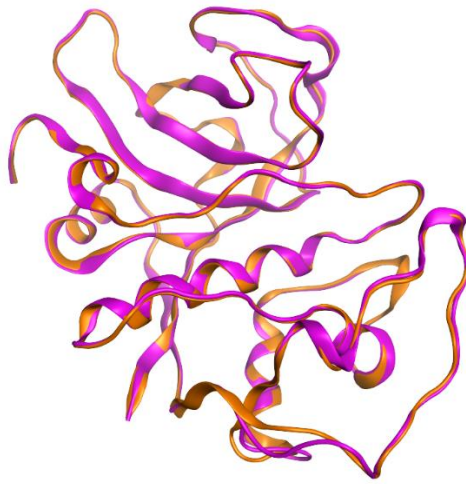


Abbildung 34: Alignment des berechneten Homologiemodells LmCPB2.8 (magenta) und der Template-Struktur von Cruzain (orange, pdb: 3KKU, RMSD 0.54 Å) erstellt mit MOE2015

Docking an Cruzain und am Homologiemodell von LmCPB2.8

Das Docking-Programm FlexX/LeadIT wurde zum nicht-kovalenten Docking der Inhibitoren in das aktive Zentrum von Cruzain (pdb: 3I06, 1.1 Å) und von *Leishmania mexicana* LmCPB2.8 (Homologiemodell) verwendet.¹³⁰ In der gewählten Kristallstruktur von Cruzain ist ein Nitril-Inhibitor kovalent an das Enzym gebunden. Die Bindetasche wurde als 6.5 Å große Kugel (*sphere*) um diesen Referenzliganden bestimmt. Die kovalente Bindung, der Referenzligand, sowie sämtliche Wassermoleküle wurden manuell aus der Kristallstruktur entfernt. Das Protein wurde protoniert, um physiologische Bedingungen bei pH 6-7 zu erhalten und das Histidin im katalytischen Zentrum wurde an beiden Imidazol-Stickstoffatomen protoniert. Schließlich wurde das katalytische Cystein zu Alanin mutiert, um "*clashes*" aufgrund der Sterik zu vermeiden.¹³⁹ Die Inhibitoren wurde jeweils als Diastereomere mit (*S,S*)- und (*R,R*)-konfiguriertem Aziridinring gedockt. Zur Energieminimierung der Liganden wurde das MMFF94 *force field* verwendet und zur Visualisierung der Bindungsposen und Bestimmung der Abstände wurde MOE 2015 verwendet.^{150,153}

Zur Validierung des FlexX-Docking-Settings für die folgenden Docking-Rechnungen der Inhibitoren wurde der Referenzligand aus der verwendeten Cruzain-Kristallstruktur (pdb: 3I06)²² entfernt und anschließend mit den getroffenen Docking-Einstellungen in das Enzym zurück gedockt („redocking“). Die Bindungspose des Referenzliganden mit dem höchsten Scoring-Wert wurde mit der ursprünglichen Bindungspose aus der Kristallstruktur verglichen und zeigte mit einem RMSD von 0.98 Å eine gute Übereinstimmung.

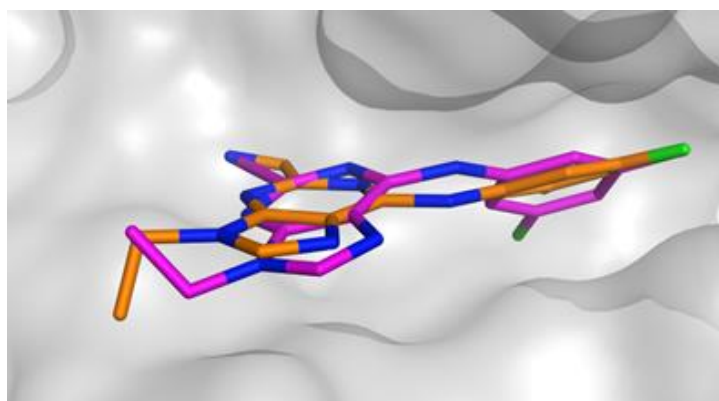


Abbildung 35: FlexX-Redocking an Cruzain (pdb: 3I06; orange: Ligand aus Kristallstruktur; magenta: Ligand aus Redocking; RMSD 0.98 Å), erstellt mit MOE 2015

FlexX-Docking-Ergebnisse und Struktur-Wirkungsbeziehungen der PF-Inhibitoren

Das Docking der symmetrischen Diester (-OBn (**PF5**), -OEtPh (**PF13**), -OPrPh (**PF14**)) in die Bindetasche von Cruzain und der *Leishmania*-Protease ist in Übereinstimmung mit den experimentellen Daten. So zeigt der selektive LmCPB2.8-Inhibitor **PF14** ($K_i = 0.9 \mu\text{M}$) gute FlexX-Scores für LmCPB2.8 (FlexX-Score: -11,83 für (*R,R*)- und -9,53 für (*S,S*)-Diastereomer), während die Scores für Cruzain (ni bei 20 μM) für beide Diastereomere viel höher sind (FlexX-Score: 1,26 für (*R,R*)- und -2,71 für (*S,S*)-Diastereomer). Eine Phenylpropyl-Estergruppe lagert sich in die tiefe, hydrophobe S2-Bindetasche der *Leishmania*-Protease, während die zweite Phenylpropyl-Estergruppe die hydrophobe S1'-Tasche besetzt. Im Gegensatz dazu wird in Cruzain die S2-Bindetasche nicht besetzt, sodass die Estergruppe *solvent-exposed* ist (siehe Abbildung 36). Die postulierten Bindungsmodi des Inhibitors **PF13**, welcher zwei Phenylethyl-Estergruppen besitzt, sind ähnlich zu denjenigen von Inhibitor **PF14**. Hier werden in der *Leishmania*-Protease ebenfalls die S2- und S1'-Bindetasche mit jeweils einer Estergruppe besetzt, während in Cruzain die S2-Bindetasche nicht besetzt wird. Aus den unterschiedlichen Bindungsmodi in Cruzain und der *Leishmania*-Protease lässt sich folgern, dass die S2-Bindetasche der LmCPB2.8 längere aromatische Estergruppen toleriert als Cruzain, was im Einklang mit den experimentell bestimmten K_i -Werten ist. Der Abstand zwischen dem Schwefel-Atom des katalytischen Cysteins und dem elektrophilen Kohlenstoff-Atom des Aziridinrings ist bei den Posen in der *Leishmania*-

Protease ebenfalls in einem Bereich, in dem eine kovalente Bindung ausgebildet werden kann (4.65 Å für *(S,S)*- und 4.92 Å für *(R,R)*-Diastereomer).

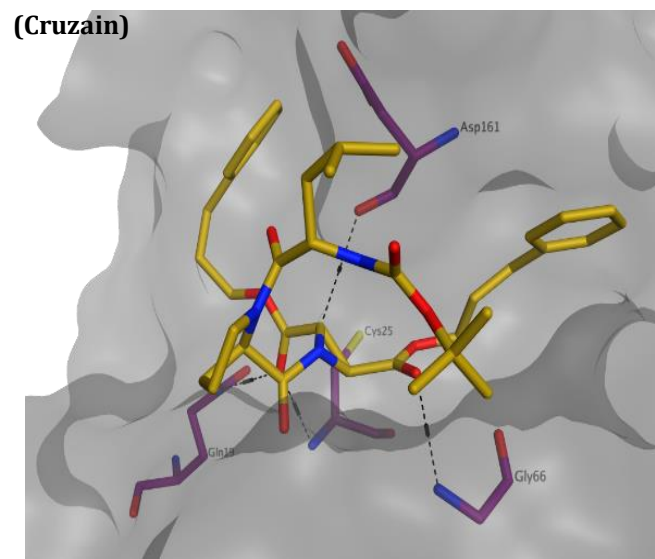
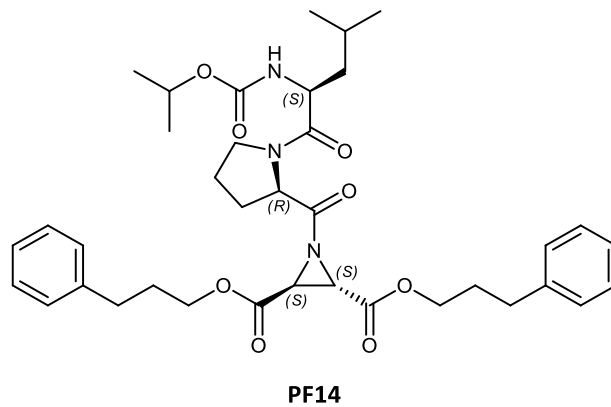
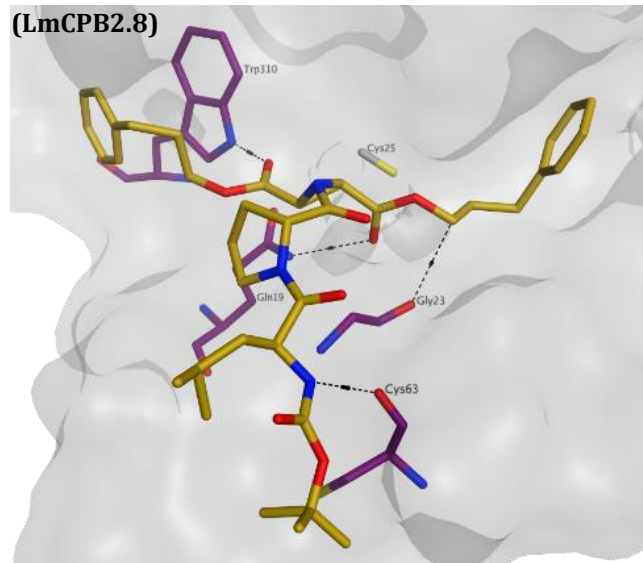


Abbildung 36: Vergleich der von FlexX postulierten Bindungsmodi von Inhibitor PF14 (*R,R*-Konfiguration), oben: in LmCPB2.8 (FlexX-Score: -11,83, 4.92 Å); unten: in Cruzain (FlexX-Score: 1,26, 9.54 Å), erstellt mit MOE2015

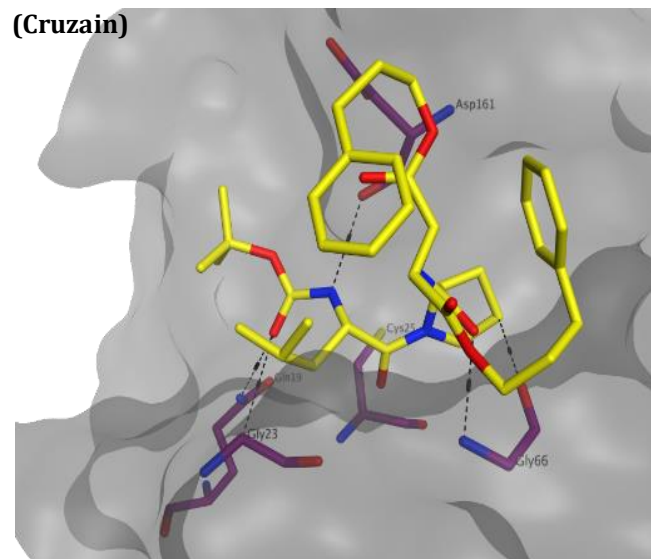
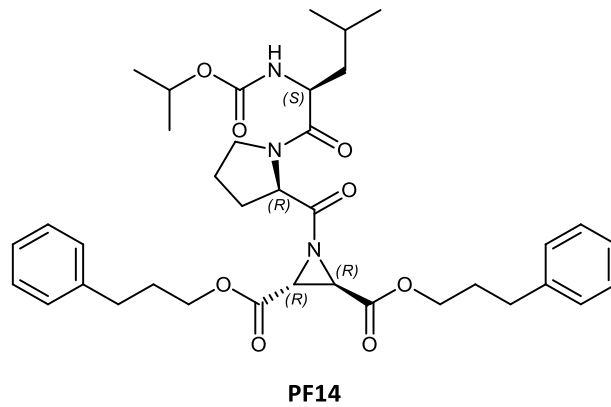
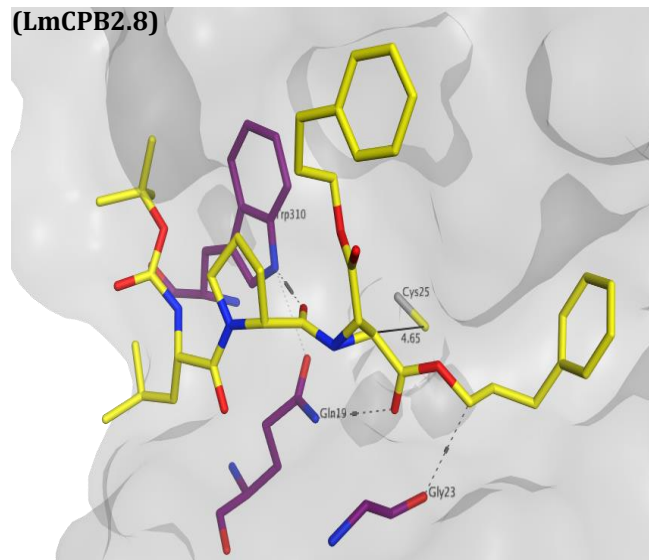


Abbildung 37: Vergleich der von FlexX postulierten Bindungsmodi von Inhibitor PF14 (*R,R*-Konfiguration), oben: in LmCPB2.8 (FlexX-Score: -11,83, 4.92 Å); unten: in Cruzain (FlexX-Score: 1,26, 9.54 Å), erstellt mit MOE2015

Die Docking-Ergebnisse für die unsymmetrischen Diester (-OMeNaph (**PF7**), -OEtPh (**PF8**), -OPrPh (**PF9**); der zweite Ester ist jeweils immer ein Benzylester) liefern ähnliche Bindungsposen wie für die symmetrischen Ester. Der LmCPB2.8-selektive Inhibitor **PF7** ($K_i = 0.8 \mu\text{M}$) mit der sterisch anspruchvollsten Methylnaphthalen-Estergruppe zeigt den besten FlexX-Score für die *Leishmania*-Protease (FlexX-Score: -14,21 für (*R,R*)- und -19,92 für (*S,S*)-Diastereomer). Beide Diastereomere platzieren die Methylnaphthalen-Estergruppe in die hydrophobe S2-Bindetasche, während die Konfiguration des Aziridinrings die Positionierung der zweiten Estergruppe bestimmt (Abbildung 38 und 39). Beim (*R,R*)-Diastereomer besetzt der Benzylester und beim (*S,S*)-Diastereomer das Prolin die S1'-Bindetasche. Im Gegensatz dazu konnte für das (*R,R*)-Diastereomer in Cruzain keine Bindungspose gefunden werden und das (*S,S*)-Diastereomer zeigt eine Bindungspose mit einem sehr moderaten FlexX-Score von nur -7.99, was in Übereinstimmung mit den experimentell bestimmten K_i -Werten ist.

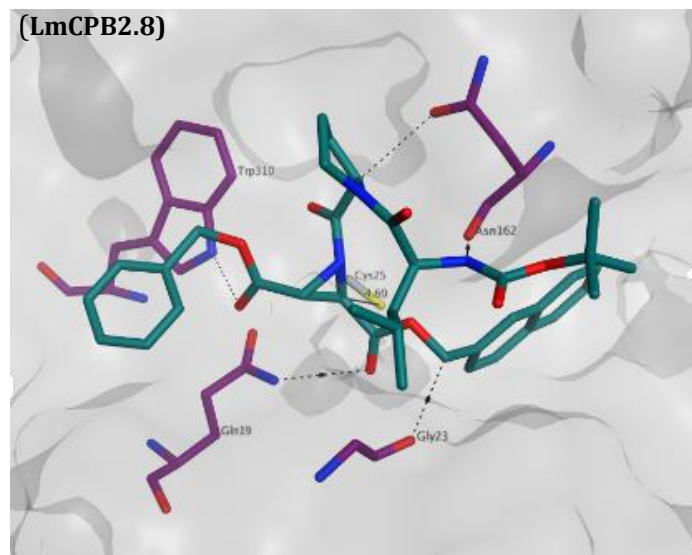
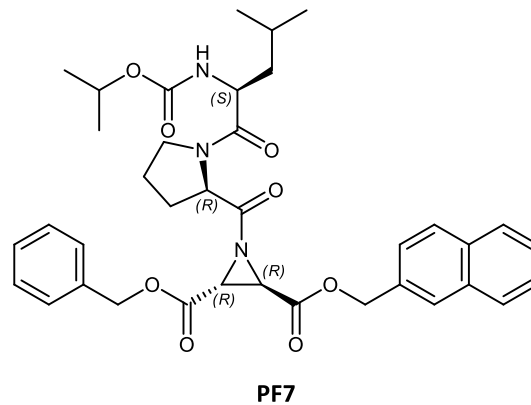


Abbildung 38: Vergleich der von FlexX postulierte Bindungsmodi von Inhibitor **PF7** (*R,R*-Konfiguration), **PF7** in LmCPB2.8 (FlexX-Score: -14,21, 4.60 Å); in Cruzain wurde keine Bindungspose gefunden, erstellt mit MOE2015

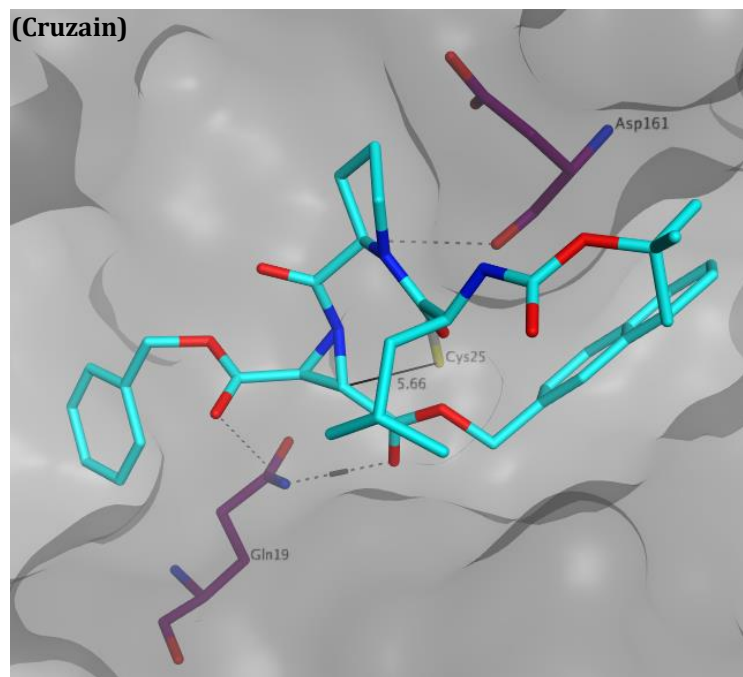
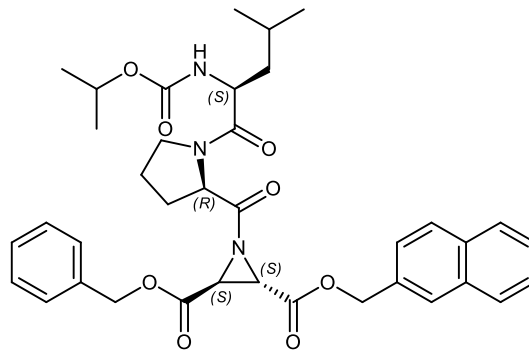
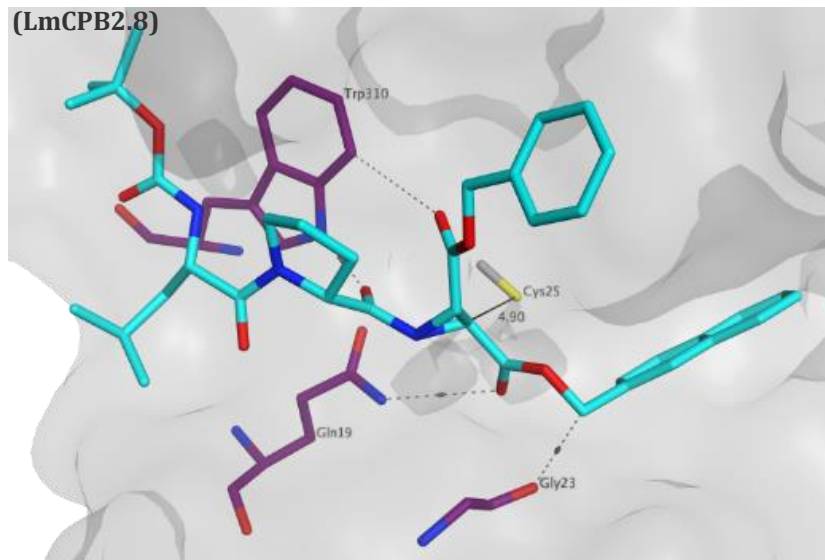


Abbildung 39: Vergleich der von FlexX postulierten Bindungsmodi von Inhibitor PF7 (*S,S*-Konfiguration), oben: in LmCPB2.8 (FlexX-Score: -19,92, 4.90 Å); unten: in Cruzain (FlexX-Score: -7,99, 5.66 Å), erstellt mit MOE2015

Für die Halbestere mit einer freien Säurefunktion (-OEt (**PF15**), -*Otert*-Butyl (**PF16**), -OMeCy (**PF17**), -OEtPh (**PF18**), -OPropPh (**PF19**)) zeigen experimentelle Untersuchungen eine zeitabhängige Inhibition des Enzyms, was für eine schnelle irreversible Inhibition spricht. Vorangegangene theoretische Studien bestätigen diese Annahmen und begründen diese durch das mögliche Auftreten einer starken, ionischen Wechselwirkung zwischen der freien Carboxylgruppe am Aziridinring und dem positiv-geladenen Histidinium-Ion His¹⁶³ im katalytischen Zentrum.¹²⁰

In den Docking-Bindungsposen beider Diastereomere des Inhibitors **PF18** ($K_i = 0.4 \mu\text{M}$) findet man für die *Leishmania*-Protease die oben genannte ionische Wechselwirkung mit dem katalytischen Histidinium-Ion His¹⁶³, die für die verbesserte Affinität im Vergleich zu dem entsprechenden Diester **PF8** ($K_i = 1.92 \mu\text{M}$) verantwortlich sein könnte. Beim (*S,S*)-Diastereomer ist die Ester-Gruppe in der S2-Tasche zu finden, während beim (*R,R*)-Diastereomer das Prolin diese Tasche belegt (Abbildung 40 und 41). Dagegen findet man beim Docking in Cruzain in keinem der postulierten Bindungsmodi eine ionische Wechselwirkung im katalytischen Zentrum, was im Einklang mit den gemessenen K_i -Werten ist (Tabelle 10).

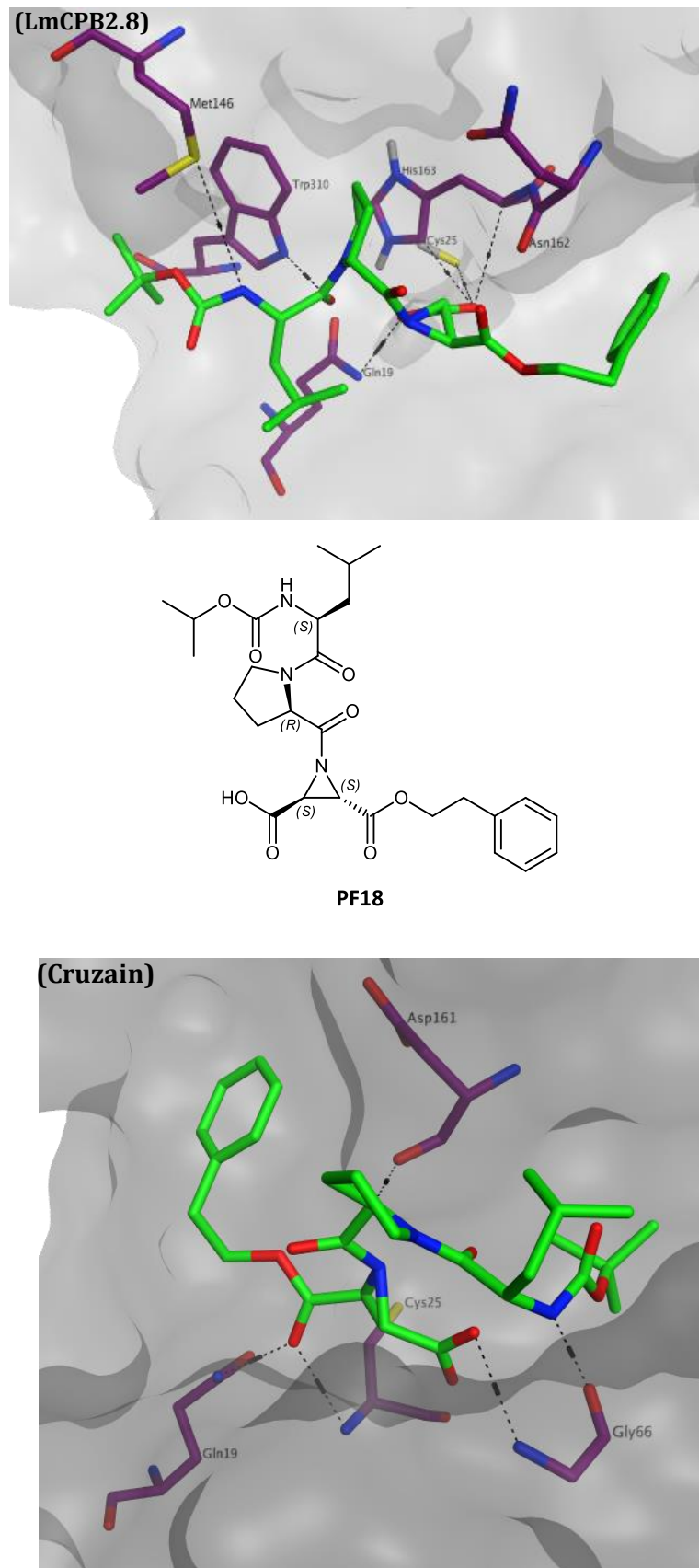


Abbildung 40: Vergleich der von FlexX postulierten Bindungsmodi von Inhibitor PF18 (*S,S*-Konfiguration), oben: in LmCPB2.8 (FlexX-Score: -13,60, 5,80 Å); unten: in Cruzain (FlexX-Score: -12,94, 4,6 Å), erstellt mit MOE2015

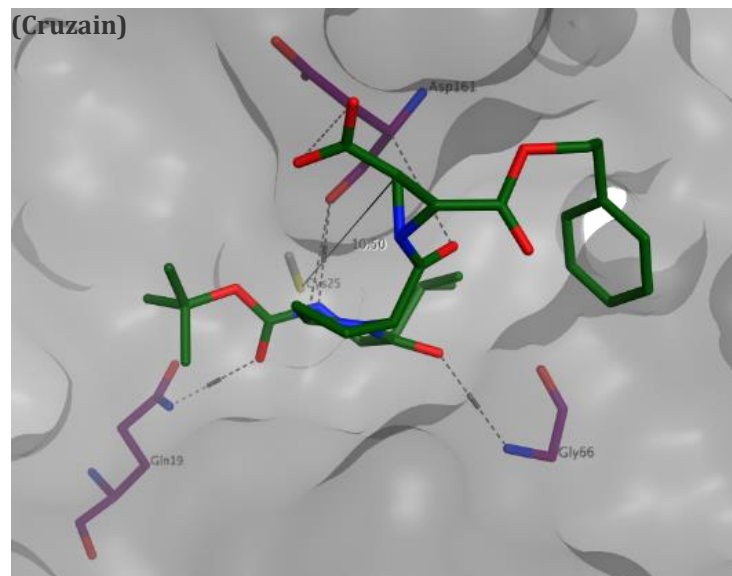
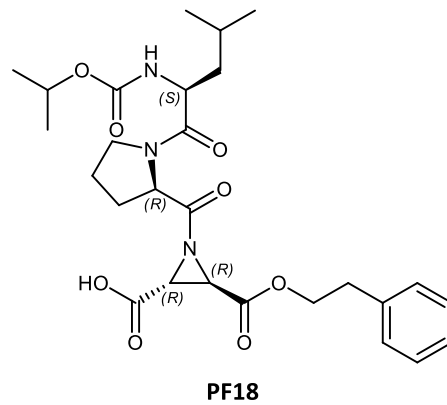
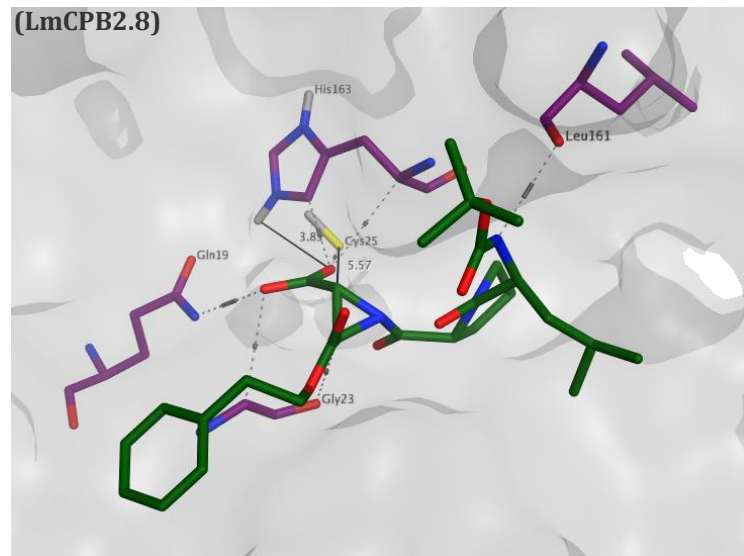


Abbildung 41: Vergleich der von FlexX postulierten Bindungsmodi von Inhibitor PF18 (*R,R*-Konfiguration), oben: in LmCPB2.8 (FlexX-Score: -11.40, 5.57 Å); unten: in Cruzain (FlexX-Score: -10,79, 10.50 Å), erstellt mit MOE2015

Vergleich der Bindetaschen von Cruzain und LmCPB2.8

Um relevante Aminosäuren in den Bindetaschen der beiden Enzyme zu identifizieren und zu vergleichen, wurde das Homologiemodell der *L. mexicana* CPB2.8 und die Kristallstruktur von Cruzain (PDB 3I06, 1.1 Å) übereinandergelegt (*Alignment* und *Superposing mit MOE2015*). Wie zu erwarten zeigen beide parasitären Cathepsin-L ähnlichen Enzyme eine hohe Similarität mit einem RMSD-Wert von 0.61 Å. Allerdings zeigt ein Vergleich der Aminosäuren in der S2-Tasche beider Enzyme einige signifikante Unterschiede. In Tabelle 11 sind die relevanten Aminosäuren der einzelnen Bindetaschen gegenübergestellt. Während die katalytische Triade, die S1- und S1'-Bindetasche, wie zu erwarten, stark konserviert sind, gibt es Unterschiede in den Aminosäuren der S2-Bindetasche. Statt Glu²⁰⁸ (Cruzain) ist in der S2-Bindetasche von LmCPB2.8 Tyr²⁰⁹, sodass für die *Leishmania*-Protease eine Präferenz für aromatische, lipophile Resten zu erwarten ist. Dies steht im Einklang mit den experimentellen Daten und den Docking-Studien. Denen zufolge wird die tiefe hydrophobe S2-Bindetasche von LmCPB2.8 bevorzugt von sterisch anspruchsvollen, aromatischen Gruppen, wie Phenylpropyl- (**PF14**; $K_i(\text{LmCPB2.8}) = 0.9 \mu\text{M}$, $K_i(\text{Cruz}) = \text{ni}$ bei 20 μM) oder Methylnaphthalenestern (**PF7**; $K_i(\text{LmCPB2.8}) = 0.8 \mu\text{M}$, $K_i(\text{Cruz}) = \text{ni}$ bei 20 μM) besetzt (K_i -Werte, siehe Tabelle 10).

Tabelle 11: Vergleich der relevanten Aminosäuren in den Bindetaschen von Cruzain und LmCPB2.8, Unterschiede in den Aminosäuren sind unterstrichen

	S2	S1	Kat. Triade	S1'
Cruzain	<u>Asn69, Glu208, Ser210</u>	Leu67, Met68, Ala138, Gly163	Cys25, His162, Asn182	Gln19, Trp184
LmCPB2.8	<u>Leu69, Tyr209, Val211</u>	Leu67, Met68, Ala139, Gly164	Cys25, His163, Asn183	Gln19, Trp185

Unterschiede in den Aminosäuren sind in rot hervorgehoben

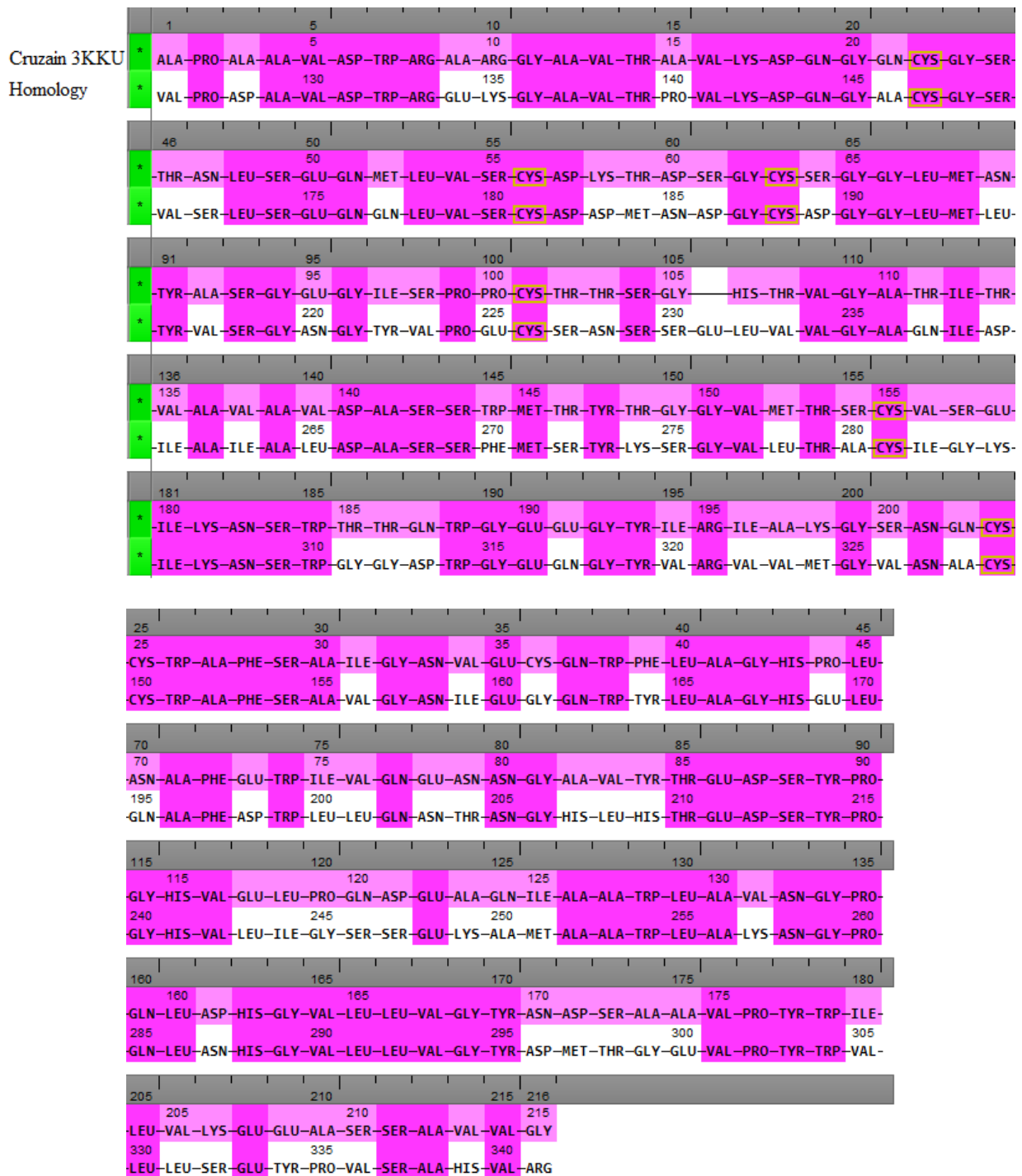


Abbildung 43: MOE-Sequenzalignment von Cruzain (pdb: 3KKU) und LmCPB2.8 (Homologiemodell), identische Aminosäuren in dunkelmagenta hervorgehoben, erstellt mit MOE2015

4. Synthetischer Teil

Die potentiellen Aziridin-2,3-dicarboxylat-basierten Cysteinprotease-Inhibitoren bestehen aus folgenden drei Bausteinen: einer Dipeptid-Erkennungssequenz, einem Oxalyl-Linker und dem *warhead*, einem *trans*-konfigurierten Aziridin-2,3-dicarboxylat.

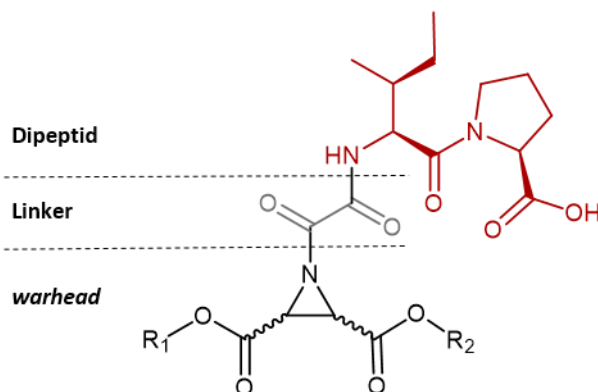
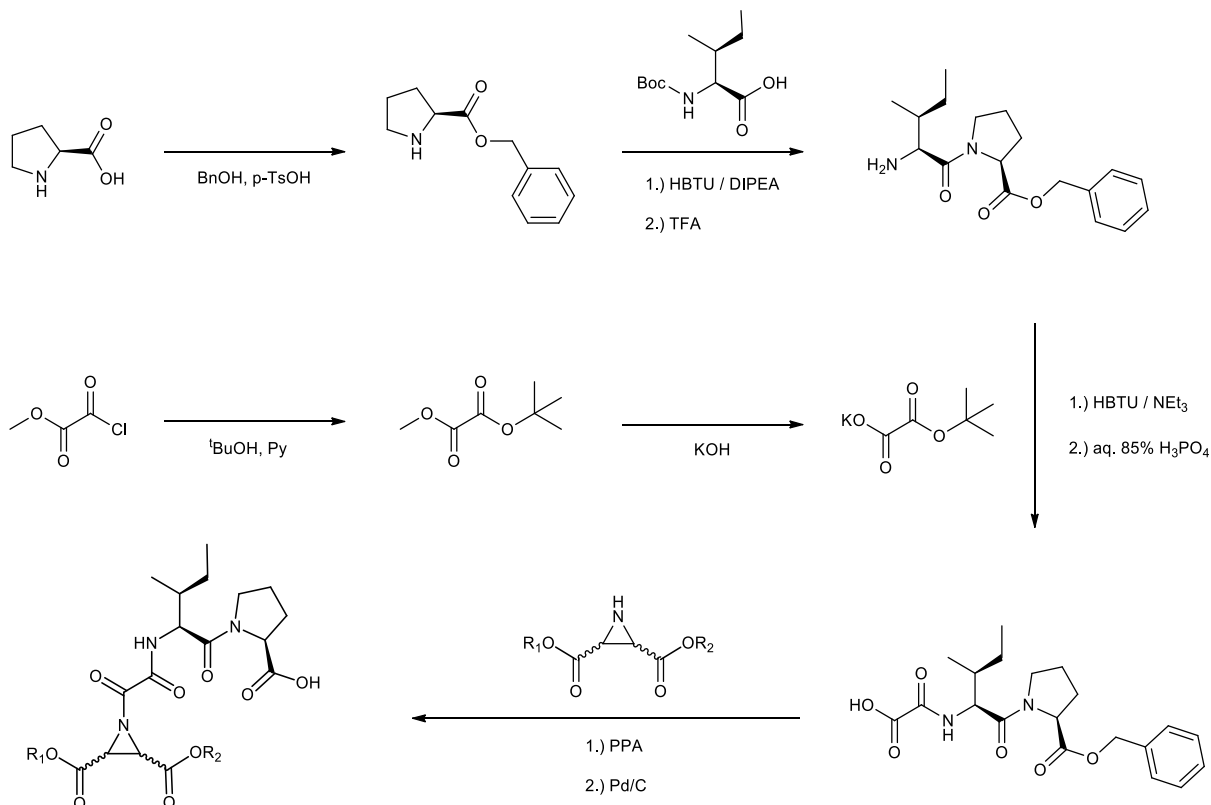


Abbildung 44: Strukturaufbau der potentiellen Cysteinprotease-Inhibitoren

Zur Darstellung des Dipeptids (*S*)-Isoleucin-(*S*)-Prolin wurde die klassische Schutzgruppenchemie angewendet. (*S*)-Prolin wurde zunächst mit einer Benzylester-Gruppe versehen, um es anschließend mit *N*-Boc-geschütztem (*S*)-Isoleucin mittels einer HBTU-vermittelten Peptidbindung zu verknüpfen.

Der Oxalyl-Linker wurde ausgehend von Methyloxalylchlorid in zwei Stufen mit den entsprechenden Schutzgruppen versehen. Im ersten Schritt wurde das Säurechlorid mittels einer *tert*-Butylgruppe verestert und im zweiten Schritt wurde die Methoxy-Gruppe im Basischen mittels KOH entfernt.

Nach Abspaltung der BOC-Schutzgruppe des Dipeptids mittels Trifluoressigsäure wurde durch eine HBTU-vermittelten Peptidbindung der Oxalyl-Linker mit dem *C*-terminal geschützten Dipeptid verknüpft. Um im nächsten Schritt das Aziridin-2,3-dicarboxylat-Molekül mittels einer PPA-vermittelten Peptidkupplung einzuführen, wurde zuvor die *tert*-Butylgruppe am Oxalyl-Gerüstende mittels Phosphorsäure abgespalten. Abschließend wurden die Benzylester-Gruppen mittels Palladium-katalysierter Hydrogenolyse abgespalten, um die freie Carboxyl-Funktion zu erhalten.

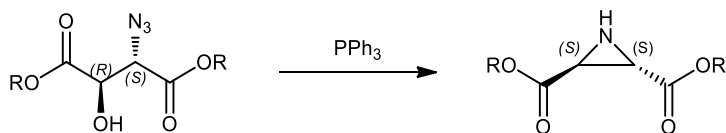


Schema 2: Syntheseroute zur Darstellung der Aziridinyl-Dipeptide

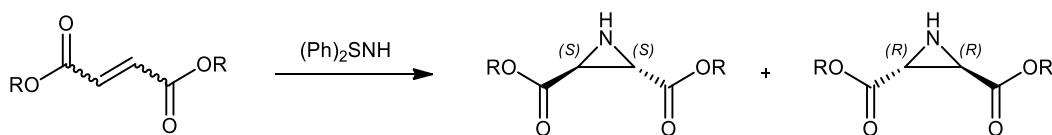
4.1 Synthese der *trans*-konfigurierten Aziridin-2,3-dicarboxylate

Zur Darstellung der *N*-unsubstituierten Aziridin-2,3-dicarboxylate wurden folgende Synthesemethoden angewendet:

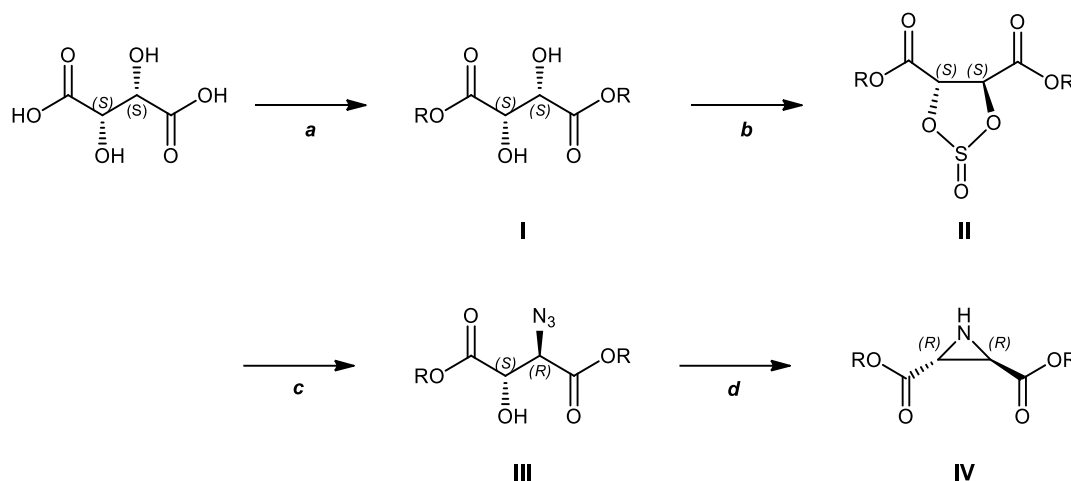
1. Staudinger-Reaktion: Stereoselektiver Ringschluss aus Azidoalkoholen mittels Triphenylphosphan¹⁵⁸



2. Michael-Addition von Diphenylsulfimin an Fumarate oder Maleate¹⁵⁹

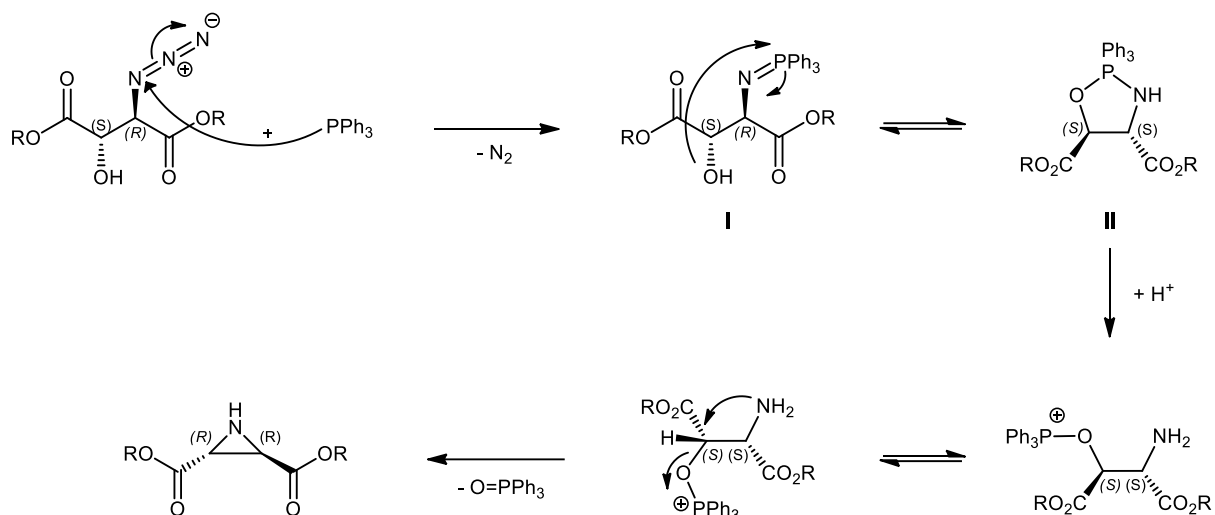


Bei der stereoselektiven Route wird der Azidoalkohol aus der entsprechenden Weinsäure dargestellt, indem zuerst das Tartrat (**I**) gebildet wird, um anschließend über eine Dioxothiolan-Zwischenstufe (**II**) zum Azidoalkohol (**III**) zu gelangen. Diese Methode eignet sich vor allem für die Darstellung von *trans*-konfigurierten, symmetrischen Aziridin-2,3-dicarboxylaten. Die stereoselektive Synthese von unsymmetrischen Diestern wird in der Literatur als sehr verlustreich beschrieben und eine Umesterung erweist sich aufgrund der reaktiven Zwischenstufen als schwierig.¹⁵⁸



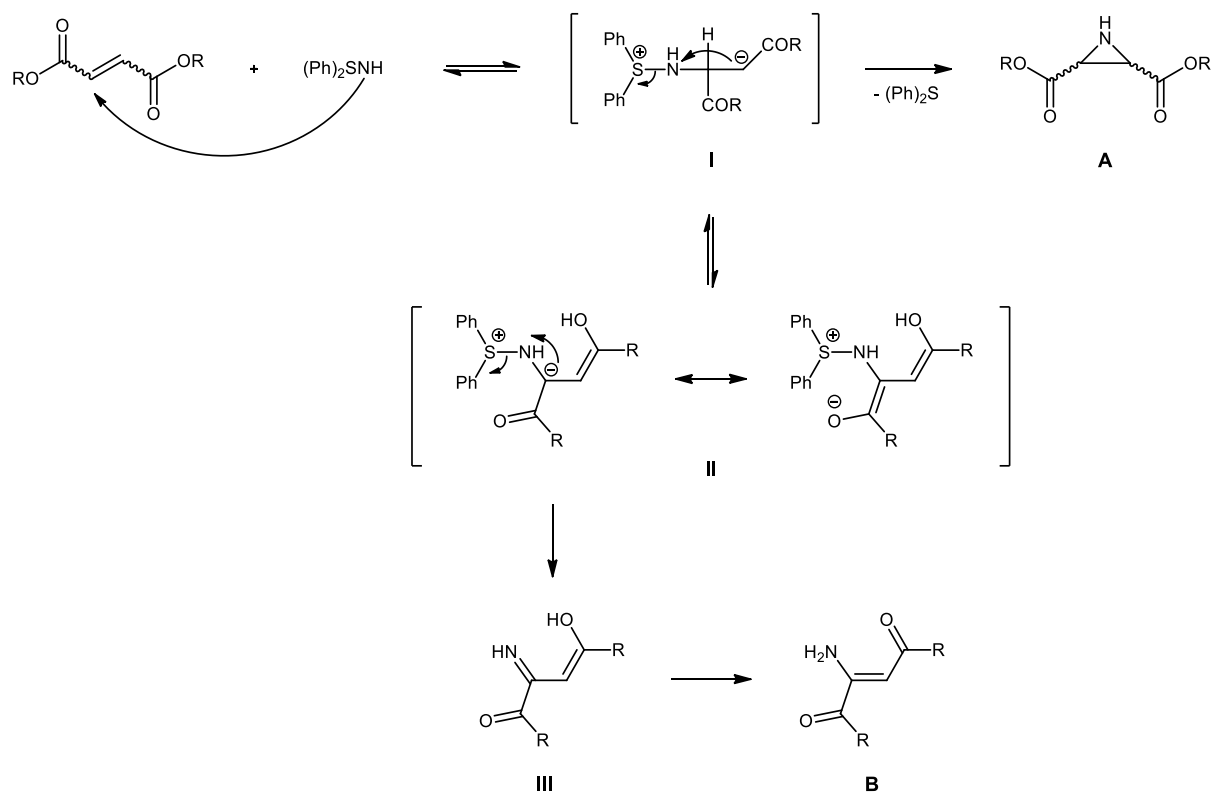
Schema 3: Stereoselektive Syntheseroute zur Darstellung von symmetrischen *trans*-konfigurierten Aziridin-2,3-dicarboxylaten, *a* 2.5 Äq. ROH, *p*-TsOH_{kat}, Toluol, 18 h reflux, *b* 1.1 Äq. SOCl₂, DMF_{kat}, DCM, 1 h 0 °C, 2 h RT, 1 h reflux, *c* 2.0 Äq. NaN₃, DMF_{abs}, 80 h RT, *d* 1.8 Äq. PPh₃, DMF_{abs}, 0.5 h 0 °C, 3 h 83 °C

Die Staudinger-Reaktion ist eine spezielle Form der Mukaiyama-Kondensation zur Darstellung von primären Aminen aus den entsprechenden Aziden. Der von *Peringer et al.*¹⁶⁰ postulierte Mechanismus startet mit dem nucleophilen Angriff des Triphenylphosphins an die Azid-Gruppe. Unter Abspaltung von Stickstoff entsteht im Folgenden ein Phosphazen (**I**). Da die Reaktion unter Ausschluss von Feuchtigkeit stattfindet, kommt es nicht, wie bei der bekannten Staudinger-Reaktion üblich, zu einer Hydrolyse zum entsprechenden Amin, sondern zur intramolekularen Addition der Hydroxylgruppe an das Phosphoratom unter Ausbildung eines Oxazaphospholidins (**II**). ³¹P-NMR Studien haben gezeigt, dass diese Verbindung in Lösung nur kurze Zeit stabil ist.¹⁶⁰ Sie reagiert im nächsten Schritt stereospezifisch unter Abspaltung von Triphenylphosphinoxid zum *trans*-konfigurierten Aziridin-2,3-dicarboxylat. Die Geschwindigkeit dieser Reaktion wird durch katalytische Mengen Säure stark erhöht, sodass man nach wenigen Minuten nur noch Triphenylphosphinoxid im ³¹P-NMR-Spektrum nachweisen kann.¹⁶⁰ Weiterhin ist aus dem Mechanismus ersichtlich, dass der letzte Schritt der Zyklisierung unter Inversion der Konfiguration am C-3-Atom verläuft.



Schema 4: Reaktionsmechanismus der Staudinger-Reaktion nach *Peringer et al.*¹⁶⁰

Bei der racemischen Route werden durch Michael-Addition von Diphenylsulfimin aus dem Fumarat bzw. Maleat in einem Schritt die gewünschten racemischen *trans*-konfigurierten Aziridin-2,3-dicarboxylat gebildet. Diese Methode eignet sich sowohl für symmetrische als auch für unsymmetrische Diester. Nach Addition von DPSI entsteht ein Carbanion **I**, welches im Folgenden durch intramolekularen Ringschluss *trans*-konfigurierte Aziridin-2,3-dicarboxylate **A** bildet. Durch Tautomerie des Carbanions kommt es zur Bildung der Zwischenstufen **II**, woraus durch Abspaltung von DPSI das thermodynamisch stabile Enamin **B** hervorgeht, welches das Hauptprodukt der Reaktion ist.¹⁶¹



Schema 5: Mechanismus der Michael-Addition von DPSI zur Darstellung von racemischen Aziridin-2,3-dicarboxylaten – 1.2 Äq. DPSI, Toluol, 24h 83 °C¹⁶¹

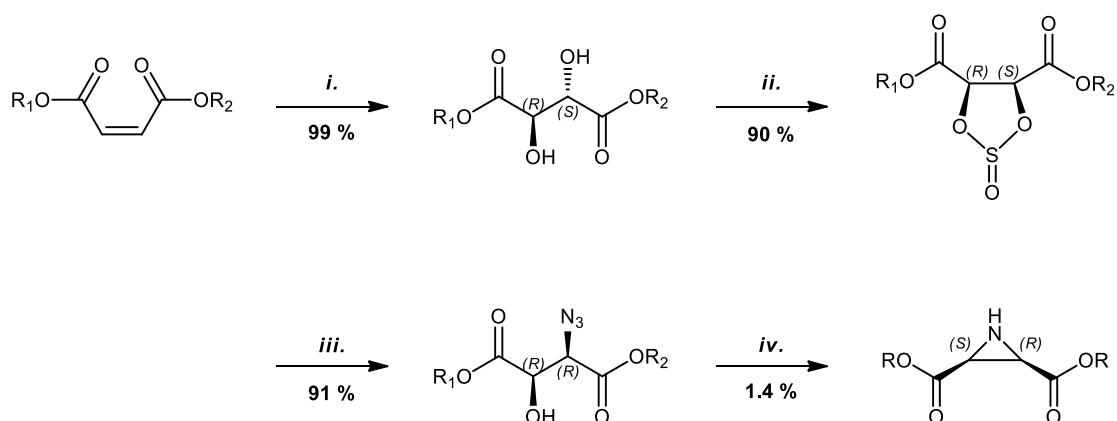
Tabelle 12: Synthetisierte *trans*-konfigurierte Aziridin-2,3-dicarboxylate

R	R'	Labor-Kürzel	Konfiguration am Aziridin-Ring	Ausbeute [%]
Et	Et	RC 97	<i>S,S</i>	24
Bn	Bn	RC 6	<i>R,R</i>	19
EtPh	EtPh	RC 92	<i>S,S</i>	34
EtPh	EtPh	RC 65	<i>R,R</i>	8
Bn	EtPh	RC66	<i>S,S + R,R</i>	33
Bn	Et	RC68	<i>S,S + R,R</i>	22
EtPh	EtPh	RC14	<i>S,S + R,R</i>	34

Symmetrische Verbindungen wurden nach der stereoselektiven Route mittels Staudinger-Reaktion; unsymmetrische Verbindungen nach der racemischen Route mit DPSI hergestellt.

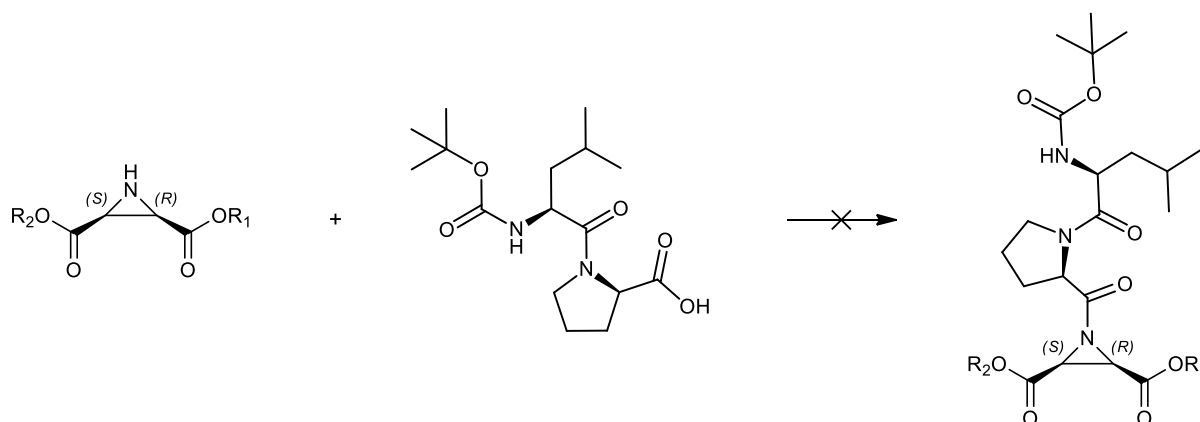
4.2 Synthese von *cis*-konfigurierten Aziridin-2,3-dicarboxylaten

Die Darstellung von racemischen, *cis*-konfigurierten Aziridin-2,3-dicarboxylaten verläuft in ähnlicher Weise wie die Synthese der *trans*-konfigurierten Aziridin-2,3-dicarboxylate über die entsprechenden Azidoalkohole mittels Staudinger-Reaktion. Man beginnt die Synthese mit (2*Z*)-But-2-endioaten, die über *cis*-Dihydroxylierung in die entsprechenden *anti*-Tartrate umgesetzt werden. Man überführt diese im nächsten Schritt mittels Thionylchlorid zu Dioxathiolan-Zwischenstufen, welche durch Umsetzung mit Natriumazid die gewünschten *syn*-Azidoalkohole ergeben. Im letzten Schritt findet die Staudinger-Reaktion mit sehr geringen Ausbeuten von nur 1-2 % zu den racemischen, unsymmetrischen *cis*-konfigurierten Aziridin-2,3-dicarboxylaten statt.



Schema 6: Darstellung von racemischen, unsymmetrischen *cis*-konfigurierten Aziridin-2,3-dicarboxylaten (die entsprechenden Isomere sind wegen der besseren Übersichtlichkeit nicht aufgeführt), R₁= Benzyl, R₂= Phenethyl - *i.* 0.2 mol % K₂O₈, 1.1 Äq. NMO, 0.75 Äq. Zitronensäure, H₂O/*tert*-Butanol [1:1], 24h RT, *ii.* 1.1 Äq. SOCl₂, 2.7 mol % DMF_{kat}, DCM, 1h 0 °C, 2h RT, 1h 50 °C, *iii.* 2 Äq. NaN₃, DMF_{abs}, 72h RT, *iv.* 1.1 Äq. PPh₃, DMF_{abs}, 4h 83 °C

Die Darstellung der *cis*-konfigurierten Aziridinylpeptide durch PPA-vermittelte Peptidkupplung war aufgrund der schlechten Ausbeuten und den geringen Mengen an eingesetztem *cis*-konfigurierten Aziridin-2,3-dicarboxylat nicht erfolgreich.

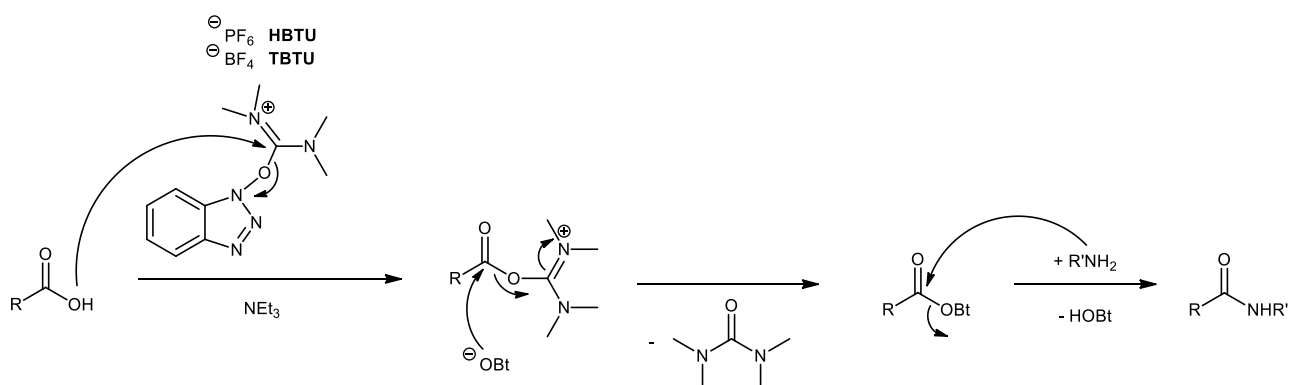


Schema 7: Darstellung von racemischen, unsymmetrischen *cis*-konfigurierten Aziridinylpeptiden (die entsprechenden Isomere sind wegen der besseren Übersichtlichkeit nicht aufgeführt)

4.3 Synthese des Dipeptids (*S*)-Ile-(*S*)-Pro

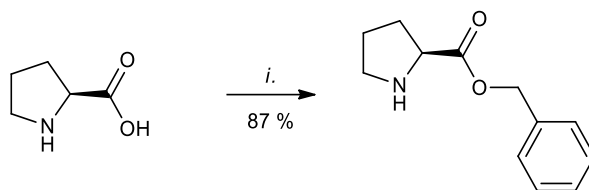
Die Darstellung des Dipeptids erfolgte über klassische Peptidkupplung mit HBTU/HOBt als Kupplungsreagenz.¹⁶² Der *C*-Terminus des Prolins wurde zuvor mittels eines Benzylesters und der *N*-Terminus des Isoleucins mittels einer Boc-Schutzgruppe geschützt, die anschließend mit Trifluoressigsäure wieder entfernt wurde.

Bei der HBTU-vermittelten Kupplung greift die Carbonsäure am Carbeniumion unter Freisetzung von HOBt an, welches wiederum nucleophil den gebildeten Ester angreift und somit eine Umesterung zum aktivierten Benzotriazolester stattfindet. Die Aminokomponente kann im letzten Schritt diesen nucleophil angreifen unter Rückbildung von HOBt.



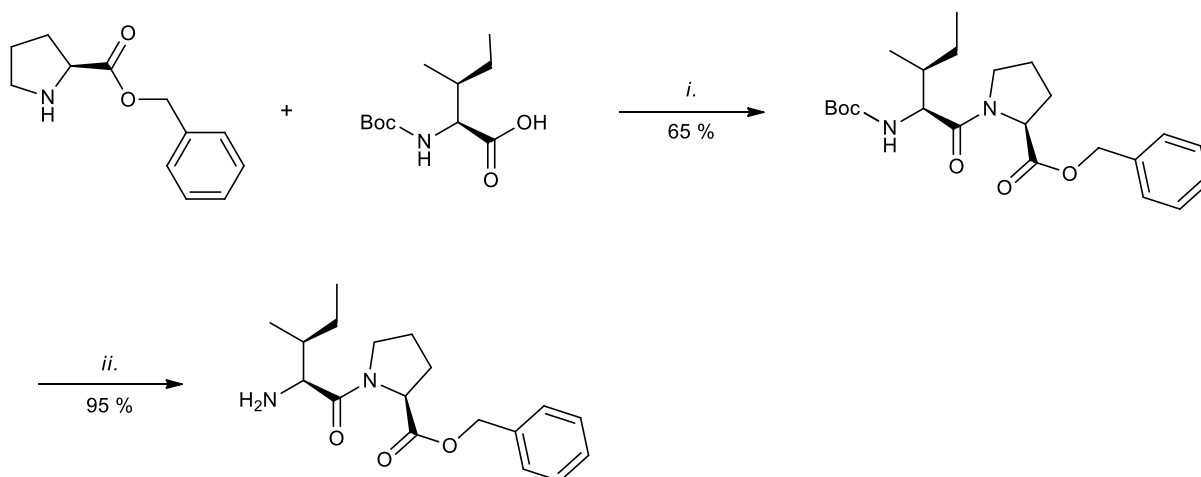
Schema 8: Reaktionsmechanismus der HBTU/HOBt-vermittelten Peptidkupplung¹⁶²

(*S*)-Prolinbenzylester-*p*-tosylat wurde aus (*S*)-Prolin und Benzylalkohol mit *para*-Toluensulfonsäure als Katalysator mit einer Ausbeute von 87 % hergestellt.



Schema 9: Darstellung von (*S*)-Prolinbenzylester-*p*-tosylat – *i.* 3.9 Äq. Benzylalkohol, 1.02 Äq. *para*-Toluolsulfonsäure, Toluol, 24h unter Rückfluss

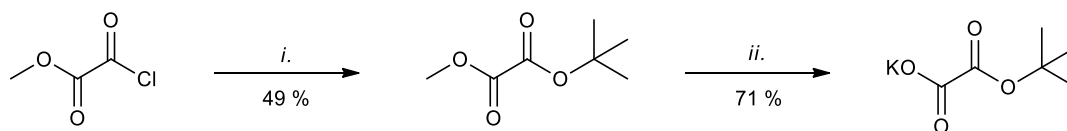
Das Dipeptid wurde aus *N*-(*tert*-Butyloxycarbonyl)-(*S*)-Isoleucin, welches kommerziell erworben wurde, und (*S*)-Prolinbenzylester-*p*-tosylat mittels HBTU-vermittelter Peptidkupplung in einer Ausbeute von 65 % gewonnen. Anschließend wurde die Boc-Schutzgruppe mittels TFA abgespalten.



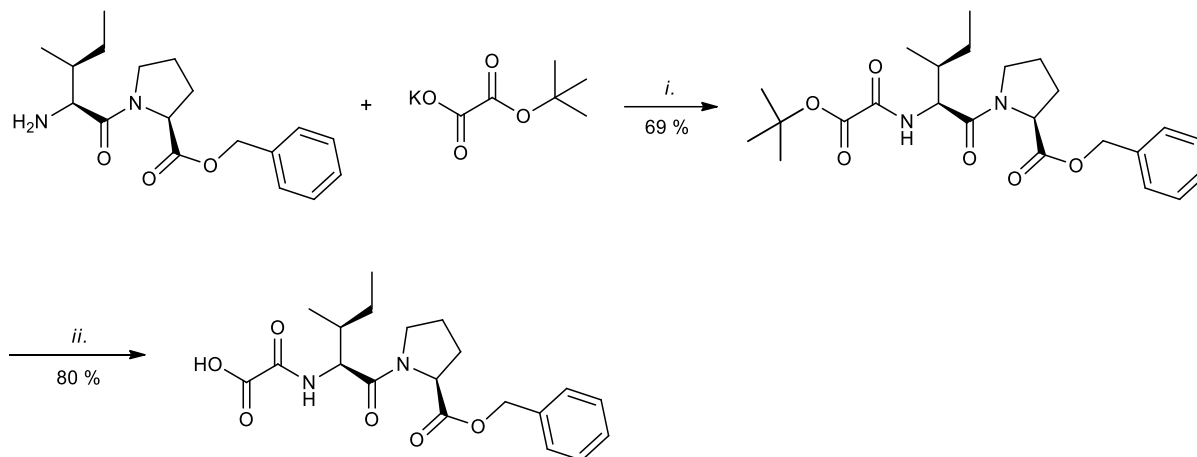
Schema 10: Darstellung von *N*-(*tert*-Butoxycarbonyl)-(*S*)-leucin-(*S*)-prolinbenzylester – *i.* 1.2 Äq. HBTU, 3.5 Äq. DIPEA, DCM, 48h RT, *ii.* 10 Äq. TFA, DCM_{abs}, 1h 0 °C, 4h RT

4.4 Synthese des Oxalyl-Linkers und Peptidkupplung mit dem Dipeptid

Der Oxalyl-Linker als Bindeglied zur Verknüpfung des Dipeptids mit dem *N*-Terminus des Aziridinrings wurde ausgehend von Methyloxalylchlorid in zwei Stufen synthetisiert. Die einseitige Veresterung mit *tert*-Butanol an der Säurechlorid-Gruppe gelang in 49 %iger Ausbeute, gefolgt von einer basischen Verseifung der Methoxygruppe mit Kaliumhydroxid zur Erhaltung einer freien Carboxylgruppe, die anschließend in einer HBTU-vermittelten Peptidkupplung mit dem Dipeptid umgesetzt wurde.¹⁶³ Anschließend wurde die *tert*-Butyl-Schutzgruppe mit 85%iger Phosphorsäure bei Raumtemperatur mit einer Ausbeute von 71 % abgespalten.



Schema 11: Darstellung des Oxalyl-Linkers, *i.* 2 Äq. *tert*-Butanol, 2 Äq. Pyridin_{abs}, Et₂O_{abs}, 2h RT, *ii.* 1 Äq. KOH, ACN/H₂O [1:1], 1h RT



Schema 12: Kupplung des Oxalyl-Linkers mit dem Dipeptid, *i.* 1.2 Äq. HBTU, 3. Äq. NEt₃, ACN, *ii.* 5 Äq. 85 %ige Phosphorsäure, Toluol, 3h RT

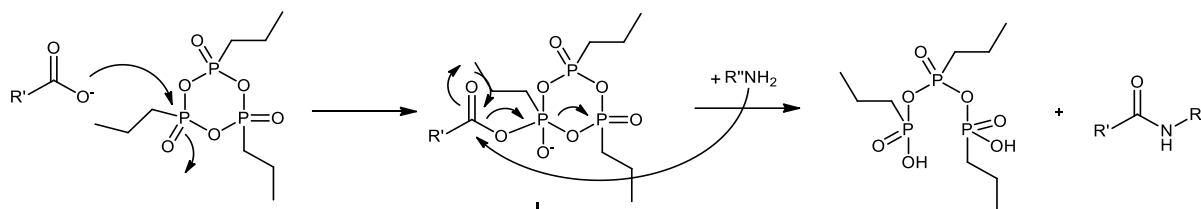
4.5 Acylierung der *trans*-konfigurierten Aziridin-2,3-dicarboxylate

Für die Kupplung der Dipeptid-Linker-Einheit mit den *trans*-konfigurierten *N*-unsubstituierten Aziridin-2,3-dicarboxylaten ist bei der Wahl des Kupplungsreagenzes die geringe Nucleophilie des Aziridin-Stickstoffatoms zu beachten. Es kommen nur solche Kupplungsreagenzien in Frage, die bei der Acylierung sehr reaktive Zwischenstufen bilden. Die Versuche der *N*-Acylierung mit üblichen Peptidkupplungs-Reagenzien über symmetrische Anhydride, Hydroxysuccinimidester oder DCC/HOBT waren in vorangegangenen Arbeiten nicht erfolgreich.

Die geringe Nucleophilie des Aziridin-Stickstoffatoms lässt sich auf die Besonderheit der Geometrie des Aziridinrings zurückführen. Der Bindungswinkel im Dreiring beträgt etwa 60 °, was zu Ringspannung und zu einem höheren *p*-Anteil in der Elektronenverteilung innerhalb des Rings führt. Das freie Elektronenpaar des Stickstoffatoms weist dagegen mehr *s*-Charakter auf, was zur verminderten Nucleophilie führt.¹⁶⁴ Die elektronenziehenden Carboxyl-Gruppen am Ring verstärken diesen Effekt zusätzlich, sodass die Reaktivität des Stickstoffatoms stark vermindert ist. Die Basizität des Aziridins mit einem pK_a -Wert des Aziridinium-Ions von 8.0 spricht ebenfalls für eine sp^2 -Hybridisierung des Stickstoffatoms und ist im Vergleich viel niedriger als die Basizität von entsprechenden größeren *N*-Heterozyklen. Die Bindungslängen im Ring, sowohl die C-N- als

auch die C-C-Bindung, sind ebenfalls kürzer als in aliphatischen Verbindungen. Eine Tatsache, die ebenfalls den sp^2 -Charakter bestätigt. Ebenfalls konnte in Aziridinen durch IR-Spektroskopie eine pyramidale Struktur beim Stickstoff-Atom gefunden werden, im Gegensatz zu den klassischen planar angeordneten Amid-Bindungen. Die oben beschriebene Bindungssituation führt demzufolge zu einer Hydrolyselabilität der Aziridid-Bindung sowohl im sauren als auch im basischen Milieu.¹⁶⁵

Propylphosphonsäureanhydrid (PPA) hat sich als geeignet für die *N*-Acylierung am Stickstoffatom des Aziridin-Rings herausgestellt. Die Zwischenstufe, die durch Angriff der freien Carboxygruppe der Aminosäure am Propylphosphonanhydrid (**I**) entsteht, ist stark aktiviert, sodass ein nucleophiler Angriff des schwach reaktiven Stickstoffatoms ermöglicht wird. Als Nebenprodukt entsteht die entsprechende Propylphosphonsäure, die aufgrund ihrer Wasserlöslichkeit leicht aus der Reaktionsmischung entfernt werden kann.¹⁶⁶



Schema 13: Mechanismus der PPA-vermittelten Peptidkupplung

In Vorarbeiten wurden bereits die Reaktionsbedingungen der PPA-vermittelten Peptidkupplung optimiert. Die Ausbeuten wurden durch Steigerung der PPA-Äquivalente auf 3.0 Äq. verbessert und liegen je nach Symmetrie und Raumanpruch der Ester-Gruppen am Aziridin-2,3-dicarboxylat zwischen 20-75 %.

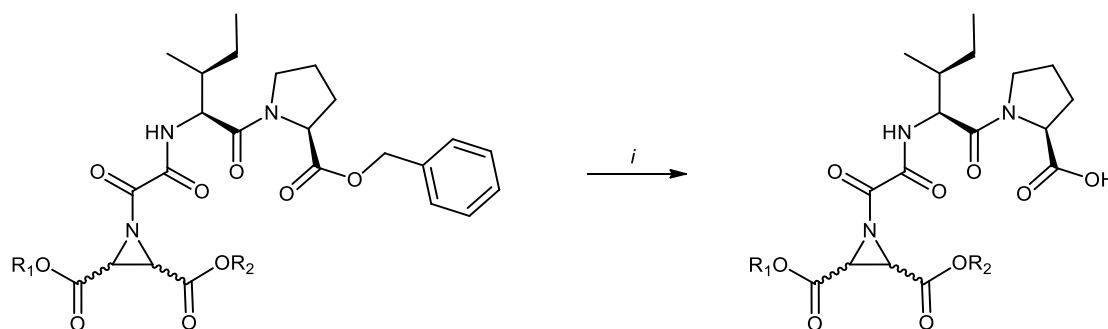
Tabelle 13: Ausbeuten und LC-MS-Reinheit der Zielverbindungen nach PPA-Kupplung

		Ausbeute	LC-MS Reinheit
RC 69	(S)-Pro-OBn-(S)-Ile-CO-CO-(S,S)+(R,R)-Azi(OEtPh)(OBn)	55 %	78 %
RC 71	(S)-Pro-OBn-(S)-Ile-CO-CO-(S,S)+(R,R)-Azi(OEt)(OBn)	60 %	97 %
RC 73	(S)-Pro-OBn-(S)-Ile-CO-CO-(R,R)-Azi(OEt) ₂	46 %	96 %
RC 86	(S)-Pro-OBn-(S)-Ile-CO-CO-(S,S)-Azi(OEt) ₂	36 %	98 %
RC 93	(S)-Pro-OBn-(S)-Ile-CO-CO-(R,R)-Azi(OBn) ₂	32 %	94 %
RC 85	(S)-Pro-OBn-(S)-Ile-CO-CO-(R,R)-Azi(OEtPh) ₂	75 %	87 %
RC 75	(S)-Pro-OBn-(S)-Ile-CO-CO-(S,S)-Azi(OEtPh) ₂	21 %	99 %

Reaktionsbedingungen - 1.2 Äq. (OBn)-(S)-Pro-(S)-Isoleu-Oxalyl (RC59), 3.0 Äq. PPA in EA (50%), 1.0 Äq. Aziridin-2,3-dicarboxylat, 1h bei 0 °C, 2-7 Tage bei RT, Verbindungen RC75 und RC85 wurden von Kamil Jastrzembski im Rahmen seiner Masterarbeit synthetisiert.

4.6 Hydrogenolyse der Zielverbindungen

Der letzte Schritt zur Synthese der Aziridinyldipeptide besteht aus einer palladiumkatalysierten Hydrogenolyse zur Abspaltung der Benzylestergruppen am endständigen Prolin und an den Carbonyleinheiten des Aziridinrings.



Schema 14: Hydrogenolyse unter Abspaltung einer Benzylester-Gruppe - *i*. 100 mg/mmol Pd/C (10 %), MeOH_{abs}, 5 bar H₂, 30 Min. - 3h

Ziel war es in einem Schritt alle vorhandenen Benzylestergruppen am Molekül zu entfernen, um dort freie Carboxylgruppen zu generieren. Dabei sind Estergruppen, wie Ethyl- oder Phenethyl-Ester stabil gegenüber Hydrogenolyse, sodass diese am Aziridinring erhalten bleiben. Die Abspaltung der Benzylester-Schutzgruppe am Prolin unter Erhaltung der hydrierungsstabilen Estergruppen (OEt/OEtPh) am Dreiring konnte erfolgreich mit Ausbeuten zwischen 70 und 80 % durchgeführt werden. Dazu wurde das Edukt in abs. Methanol gelöst, mit Palladium auf Aktivkohle versetzt und in einem Mini-Autoklaven (5 bar H₂) bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktion wurde mittels Dünnschichtchromatographie auf Vollständigkeit überprüft.

Die Reaktionszeit schwankt zwischen 30 Minuten und drei Stunden, je nach Inhibitor und Konzentration. Anschließende Aufarbeitung bestand aus Abfiltrieren des Katalysators und Entfernen des Lösungsmittels unter verminderten Druck.

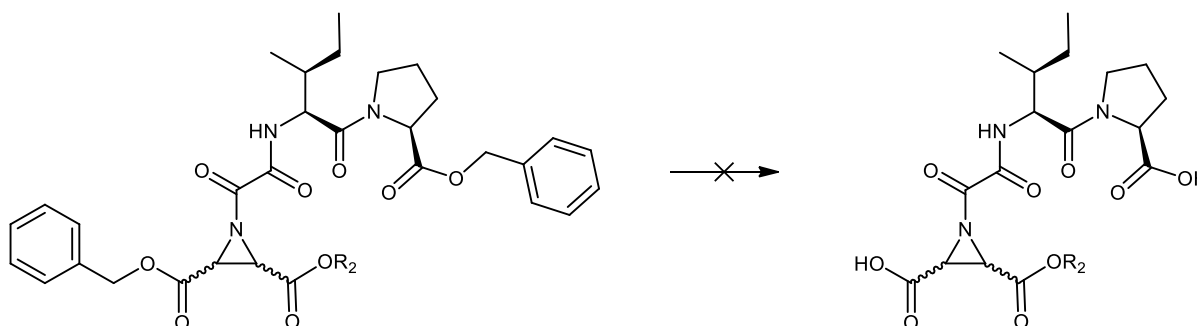
Tabelle 14: Ausbeuten und LC-MS-Reinheit der Verbindungen nach der Hydrogenolyse

		Ausbeute	LC-MS Reinheit
RC70	(<i>S</i>)-Pro-OH-(<i>S</i>)-Ile-CO-CO-(<i>S,S</i>)+(<i>R,R</i>)-Azi(OEtPh)(OH)	---	---
RC72	(<i>S</i>)-Pro-OH-(<i>S</i>)-Ile-CO-CO-(<i>S,S</i>)+(<i>R,R</i>)-Azi(OEt)(OH)	---	---
RC74	(<i>S</i>)-Pro-OH-(<i>S</i>)-Ile-CO-CO-(<i>R,R</i>)-Azi(OEt) ₂	76 %	79 %
RC87	(<i>S</i>)-Pro-OH-(<i>S</i>)-Ile-CO-CO-(<i>S,S</i>)-Azi(OEt) ₂	80 %	99 %
RC94	(<i>S</i>)-Pro-OH-(<i>S</i>)-Ile-CO-CO-(<i>R,R</i>)-Azi(OH) ₂	---	---
RC88	(<i>S</i>)-Pro-OH-(<i>S</i>)-Ile-CO-CO-(<i>R,R</i>)-Azi(OEtPh) ₂	84 %	90 %

Reaktionsbedingungen - 100 mg/mmol Pd/C (10 %), MeOH_{abs}, 5 bar H₂, 30 min. - 3h RT

Als problematisch erwies sich die gleichzeitige Abspaltung von zwei oder mehr Benzylestergruppen unter den oben beschriebenen Bedingungen der Hydrierung mit Pd/C. Obwohl die Reaktionskontrolle mittels LC-MS nach 30 Minuten zeigt, dass sich das gewünschte Produkt gebildet hat und das Edukt nicht mehr in der Reaktionslösung vorhanden war, konnte nach der Aufarbeitung und erneuter Analyse mittels LC-MS das Produkt nicht mehr charakterisiert werden.

Ursache hierfür könnte seine Instabilität und Hydrolyse-Empfindlichkeit sein, sodass es bei zu langer Verweildauer auf der Säule des Massenspektrometers zerfällt. Die notwendige, auch wenn nur geringe Säurezugabe, zu den Laufmitteln der LC/MS könnten ebenfalls den Zerfall des Produkts fördern. Möglicherweise war das eingesetzte abs. Methanol nicht trocken genug oder eignet sich nicht als Lösungsmittel für die Hydrogenolyse.



Schema 15: Hydrogenolyse unter gleichzeitiger Abspaltung zweier Benzylester-Gruppen - 100 mg/mmol Pd/C (10 %), MeOH_{abs}, 5 bar H₂

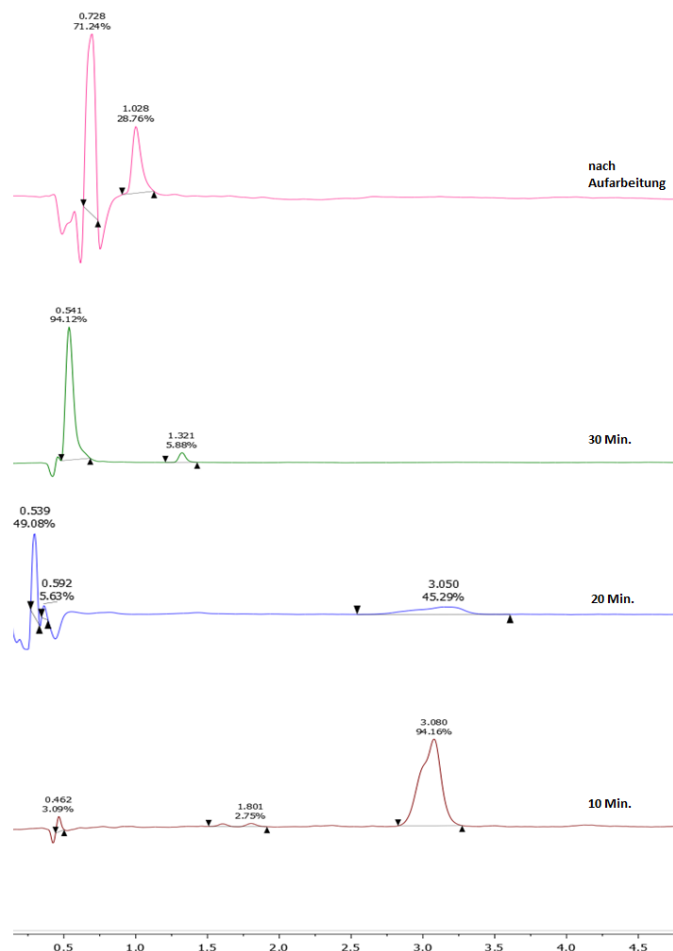


Abbildung 45: LC-MS-Reaktionskontrolle der Hydrogenolyse von RC71 ($R_t = 3.080$ Min.) zu RC72 ($R_t = 0.541$ Min.), UV-Chromatogramm bei 254 nm, isokratisch 45:55 (H_2O/ACN)

Im 1H -NMR-Spektrum des Hydrogenolyse-Produkts **RC72** konnten zwar alle Protonen zugeordnet werden, allerdings muss zur vollständigen Charakterisierung ein ^{13}C -NMR-Spektrum hinzugezogen werden, welches bei den kleinen Substanzmengen und der Größe des Moleküls ein zu großes Signal/Rausch-Verhältnis aufzeigte. Das Vorhandensein von mindestens zwei Diastereomeren erschwerte die Auswertung des Spektrums zusätzlich, sodass hieraus keine eindeutigen Schlüsse gezogen werden konnten, ob das gewünschte Produkte entstanden ist. Andere MS-Verfahren mit mildereren Ionisationsmethoden könnten ebenfalls zur Charakterisierung des Produkts ausprobiert werden.

5. Ergebnisse der Enzym-Assays

Zunächst wurde mit allen synthetisierten Zielverbindungen ein Screening bei einer InhibitorKonzentration von 20 μM an Cathepsin B, Cathepsin L, Rhodesain und Cruzain durchgeführt. Bei den Zielverbindungen, die im Screening bei einer InhibitorKonzentration von 20 μM eine Hemmung von mindestens 50 % aufzeigten, wurden mittels einer Verdünnungsreihe (bestehend aus sieben verschiedenen InhibitorKonz. zw. 50 - 0.1 μM) in einer zweifachen Doppelbestimmung die IC_{50} -Werte [μM] erhalten und daraus die entsprechenden K_i -Werte [μM] mithilfe der *Cheng-Prusoff*-Gleichung berechnet.¹⁶⁷ Die Verbindungen **RC69** und **RC75** hemmen humanes Cathepsin L und die parasitären Cathepsin L-ähnlichen Cysteinproteasen Rhodesain und Cruzain, während keine der Zielverbindungen das Haupttarget-Enzym Cathepsin B hemmt.

$$\text{IC}_{50} = K_i \cdot \left(\frac{[S]}{K_M} \right)$$

Formel 2: *Cheng-Prusoff*-Gleichung

Tabelle 15: IC_{50} -Werte und berechnete K_i -Werte [μM] der Zielverbindungen an Cathepsin B, Cathepsin L, Rhodesain und Cruzain

	Cathepsin B	Cathepsin L	Rhodesain	Cruzain
RC69	ni			
K_i [μM]		1.068	0.018	0.875
IC_{50} [μM]		2.093	0.237	3.764
RC71	ni	ni	ni	ni
RC73	ni	ni	ni	ni
RC74	ni	ni	ni	ni
RC75	ni			
K_i [μM]		1.079	0.090	1.697
IC_{50} [μM]		2.076	1.174	7.295
RC85	ni	ni	ni	ni
RC88	ni	ni	ni	ni
RC86	ni	ni	ni	ni
RC87	ni	ni	ni	ni
RC93	ni	ni	ni	ni

ni = no inhibition bei 20 μM

Die Hemmdaten für Cathepsin B korrelieren nicht mit den Docking-Rechnungen am Enzym. Wie bereits in Kapitel 1.4 beschrieben, besitzt Cathepsin B im Gegensatz zu den Cathepsin L-ähnlichen Cysteinproteasen ein flexibles Strukturelement nahe des katalytischen Zentrums, den sogenannte *occluding loop*, welcher für eine effektive und selektive Hemmung mittels einer starken ionischen Wechselwirkung adressiert werden sollte. Seine Flexibilität erschwert die Aussagekraft der Docking-Berechnungen, da der Rezeptor hierbei stets als rigide angenommen wird. Um das Protein flexibel zu behandeln, müsste man quantenmechanische Berechnungen hinzuziehen oder das konventionelle Docking an allen verfügbaren Cathepsin B-Strukturen, die jeweils eine andere Konformation des *loops* besitzen, durchführen und die Ergebnisse vergleichen.

Eine weitere Erklärung für die nicht vorhandene Hemmung von Cathepsin B, könnte am Vorhandensein von insgesamt drei protonierten Histidin-Reste in seiner Struktur liegen, von denen eins im katalytischen Zentrum sitzt (His¹⁹⁹) und zwei innerhalb des *occluding loops* (His¹¹⁰/His¹¹¹). Die freie Carboxylgruppe am Prolin, die laut Docking-Berechnungen mit den protonierten Histidinen des *occluding loops* ionisch wechselwirkt, könnte auch mit dem katalytischen His¹⁹⁹ in Wechselwirkung treten und damit den warhead zu weit weg vom katalytischen Cys²⁹ rücken. Da das Generieren von zwei freien Carboxylgruppen aufgrund der Hydrogenolyse gescheitert ist, ist es nicht möglich alle Histidine in bevorzugter Weise zu adressieren. Verbindungen **RC74**, **RC88** und **RC87**, die jeweils nur eine Carboxylgruppe am endständigen Prolin besitzen, könnten sich demzufolge durch Wechselwirkung mit dem katalytischen His¹⁹⁹ in einem nicht erwünschten Bindungsmodus positionieren.

Verbindungen **RC69** (R₁ = OBn, R₂ = OEtPh) und **RC75** (R₁ = R₂ = OEtPh) hemmen humanes Cathepsin L und die parasitären Cathepsin L-ähnlichen Proteasen Rhodesain und Cruzain. Die S₂-Bindetasche von Cathepsin L zeigt eine Präferenz für lange aromatische Substituenten, sodass die Phenylethyl-Estergruppe womöglich dort positioniert wird. Rhodesain und Cruzain zeigen einen ähnlichen Aufbau der S₂-Bindetaschen wie humanes Cathepsin L, sodass ein ähnlicher Bindemodus für alle Cathepsin L-ähnliche Cysteinproteasen zu erwarten ist. Rhodesain wird in nanomolaren Bereich am stärksten von beiden Verbindungen gehemmt. Das nicht-kovalente Docking mit FlexX/LeadIT der Verbindungen **RC69** und **RC75** (jeweils mit (*R,R*)- und (*S,S*)-konfigurierten Aziridin-Ring) an Rhodesain (pdb: 2P7U)¹⁶⁸ zeigt wie erwartet, zum einen, dass die Konfiguration des Aziridin-Rings den Bindungsmodus bestimmt.

Verbindung **RC69** wurde als Diastereomeregemisch (im Verhältnis von 45/55) synthetisiert und hemmt Rhodesain in nanomolaren Bereich ($K_i = 0.018 \mu\text{M}$). Die Docking-Berechnungen postulieren, dass bei der Verbindung **RC69** mit (*R,R*)-konfigurierten Aziridin-Ring, der Benzylester in der S₂-Tasche positioniert wird, während beim (*S,S*)-konfigurierten Aziridin-Ring der Phenylester dort platziert wird (Abbildung 46 und 47). Die FlexX-Scores und Abstände zum katalytischen Cystein-Rest haben für beide Diastereomere ähnlich gute Werte (Tabelle 16). Beide Diastereomere scheinen laut Docking-Berechnungen trotz unterschiedlicher Bindungsmodi die Bindetaschen von Rhodesain adäquat zu adressieren. Durch Trennung der Diastereomere und erneuter Testung am Enzym könnte man diese Annahme verifizieren.

Verbindung **RC75** wurde stereoselektiv mit einem (*S,S*)-konfigurierten Aziridin-Ring synthetisiert und hemmt Rhodesain mit einem K_i -Wert von $0.090 \mu\text{M}$. Die entsprechende Verbindung **RC85** mit (*R,R*)-konfigurierten Aziridin-Ring zeigt allerdings keine Hemmung von Rhodesain. Die postulierten Bindungsmodi der beiden Verbindungen unterscheiden sich stark.

Während bei Verbindung **RC75** ähnlich wie bei **RC69** (*(S,S)*-Konfiguration) der Phenylethyl-Ester die hydrophobe S2-Tasche belegt, ist bei **RC85** Isoleucin am Anfang der S2-Tasche positioniert, sodass der Aziridin-Ring weiter vom katalytischen Cystein-Rest weg rückt (4.59 Å). Der größere Abstand könnte ein Grund sein, weshalb hier keine kovalente Bindung zustande kommt und keine Hemmung von Rhodesain und verwandten Cysteinproteasen erfolgt. Obwohl der Beitrag der nicht-kovalenten Wechselwirkungen (siehe FlexX-Scores, Tabelle 16) für alle vier Verbindungen in der selben Größenordnung liegen, muss bei kovalenten Inhibitoren der Abstand zum nukleophilen Zentrum bei der Bewertung der Bindungsposen berücksichtigt werden.

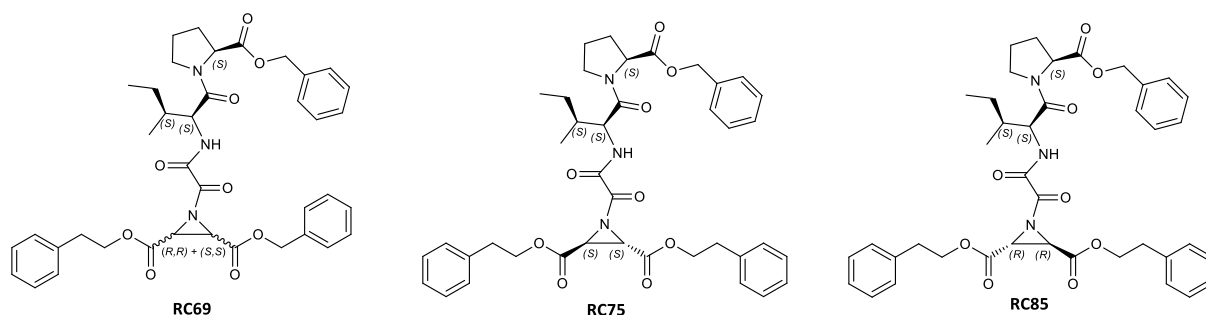


Tabelle 16: FlexX-Scores und K_i -Werte von Verbindungen RC69, RC75 und RC85

	K_i [μM]	FlexX-Score	Abstand zum Cys25 [Å]
RC69 (<i>R,R</i>)	0.018*	-18.97	2.95
RC69 (<i>S,S</i>)	0.018*	-14.87	2.55
RC85 (<i>R,R</i>)	ni	-17.85	4.59
RC75 (<i>S,S</i>)	0.090	-22.45	3.49

*als Diastereomergemisch

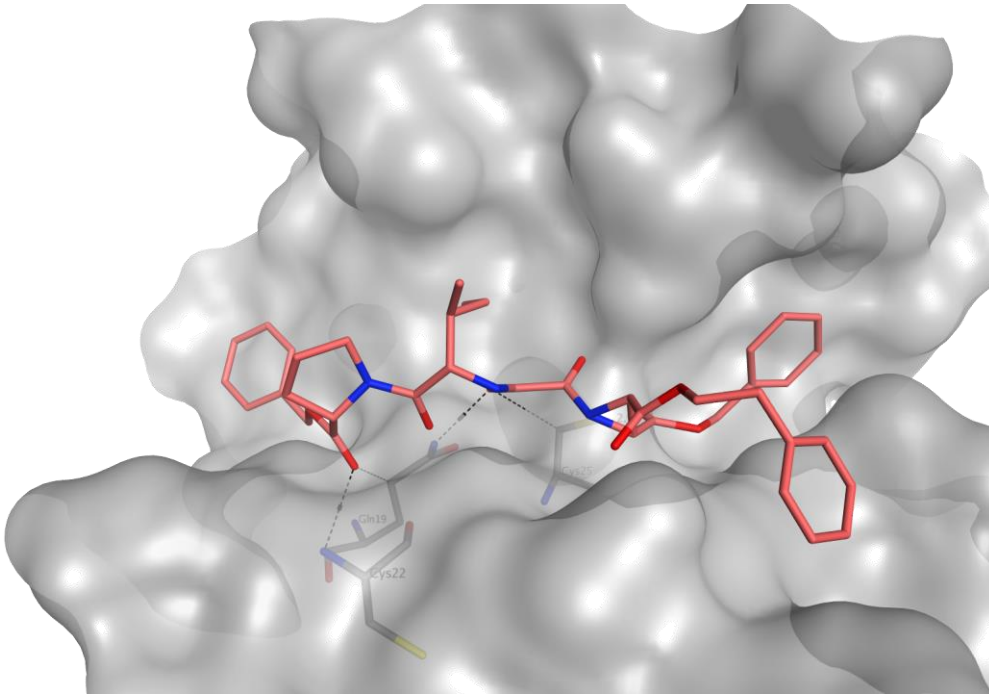


Abbildung 46: Von FlexX postulierter Bindungsmodus von Verbindung RC69 (*R,R*-Konfiguration), in Rhodesain (pdb: 2P7U, FlexX-Score: -18.97, 2.95 Å), erstellt mit MOE2015

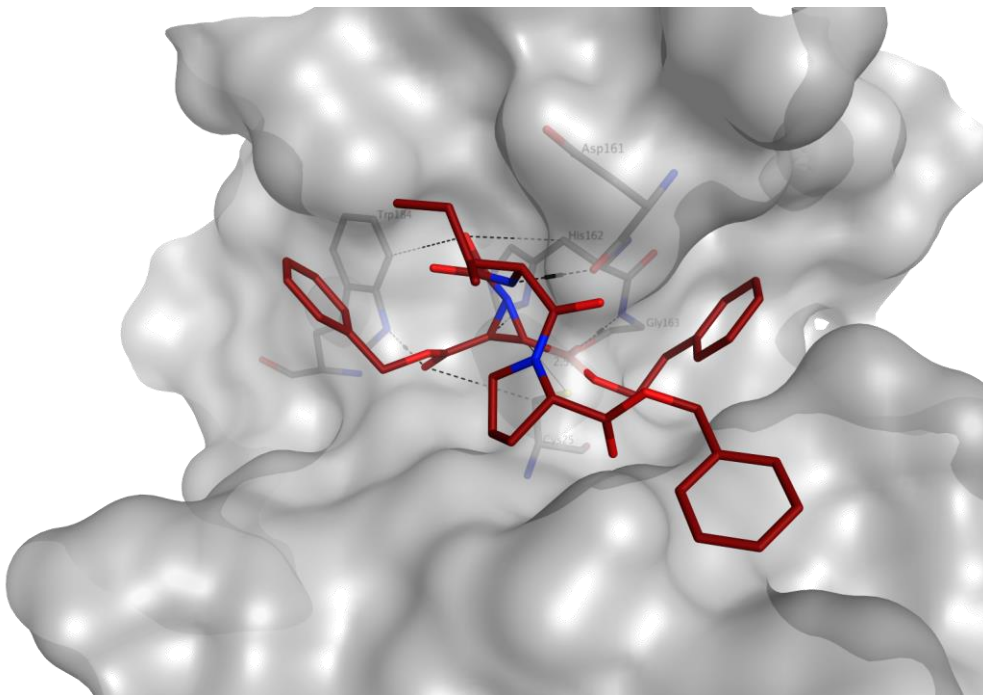


Abbildung 47: Von FlexX postulierter Bindungsmodus von Verbindung RC69 (*S,S*-Konfiguration), in Rhodesain (pdb: 2P7U, FlexX-Score: -14.87, 2.55 Å), erstellt mit MOE2015

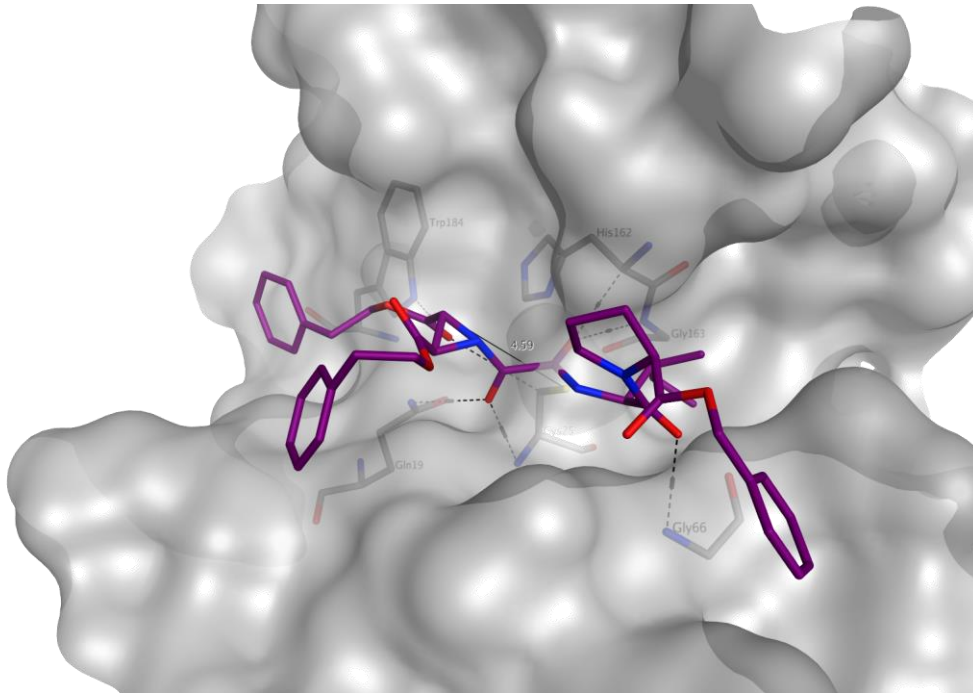


Abbildung 48: Von FlexX postulierter Bindungsmodus von Verbindung RC85 (*R,R*-Konfiguration), in Rhodesain (pdb: 2P7U, FlexX-Score: -17.85, 4.59 Å), erstellt mit MOE2015

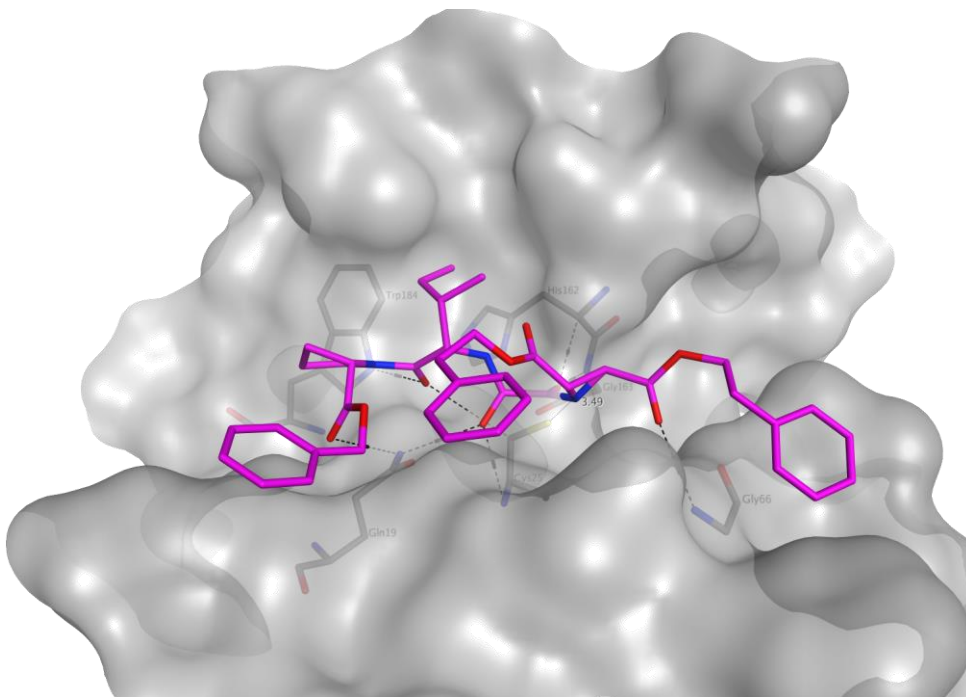


Abbildung 49: Von FlexX postulierter Bindungsmodus von Verbindung RC75 (*S,S*-Konfiguration), in Rhodesain (pdb: 2P7U, FlexX-Score: -22.45, 3.49 Å), erstellt mit MOE2015

6. Untersuchung der Stabilität der Zielverbindungen im enzymatischen Puffer-Milieu

Wie bereits beschrieben ist die Aziridid-Bindung sowohl im sauren als auch im basischen Milieu labil (siehe Kapitel 4.5). Um die Stabilität der synthetisierten und getesteten Zielverbindungen im enzymatischen Milieu zu untersuchen, wurde Verbindung **RC73** unter den Bedingungen des verwendeten Enzym-Assays (ohne Substrat) mittels LC-MS-Spektroskopie über einen Zeitraum von 4 h vermessen. Für die Messungen wurde die Assay-Zusammensetzung aus dem durchgeführten Screening der Substanzen verwendet: 180 µL Assay-Puffer, 5 µL Enzym-Puffer, 10 µL Inhibitor (400 µM) und 5 µL DMSO (entspricht einer Inhibitor-Endkonzentration von 20 µM). Für Cathepsin B und Cathepsin L wurde ein Tris-Puffer (pH 6.5) und für Rhodesain und Cruzain ein Acetat-Puffer (pH 5.5) verwendet (siehe Tabelle 17).

Tabelle 17: Enzyme und ihre jeweiligen Assay-Puffer

Enzym	Puffer
Cathepsin B (human)	Tris-Puffer (pH 6.5)
Cathepsin L (human)	Tris-Puffer (pH 6.5)
Rhodesain (<i>Trypanosoma brucei rhodesiense</i>)	Acetat-Puffer (pH 5.5)
Cruzain (<i>Trypanosoma cruzi</i>)	Acetat-Puffer (pH 5.5)

Tris-Puffer: 50 mM Tris, 5 mM EDTA, 200 mM NaCl, 2mM DTT,

Acetat-Puffer: 50 mM Natriumacetat, 5 mM EDTA, 200 mM NaCl, 5 mM DDT

Die LC-MS-Messungen der Verbindung **RC73** im Tris- und Acetat-Puffer zeigen, dass die Verbindung über einen Zeitraum von 4 Stunden noch äußerst stabil ist. Nach 30 Minuten, die für die Durchführung eines Enzym-Assays ausreichend sind, sind noch 92 % (Tris-Puffer) bzw. 86 % (Acetat-Puffer) des Ursprungssignals detektiert worden (siehe Abbildung 50 und 51).

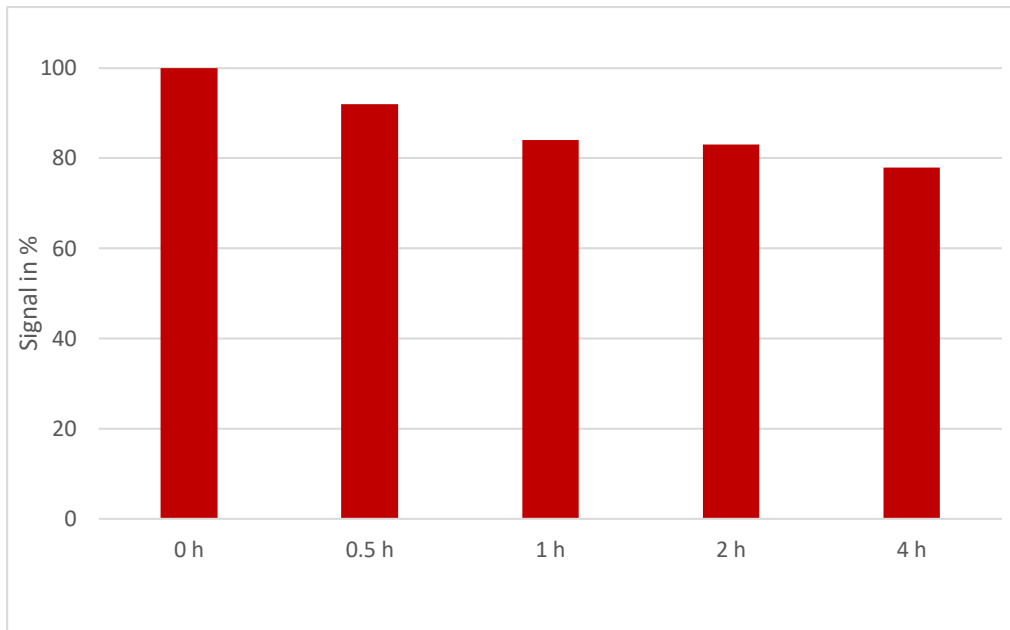


Abbildung 50: Überprüfung der Stabilität von Verbindung RC73 im Tris-Puffer (pH = 6.5) per LC-MS, Signal im UV-Chromatogramm bei 254 nm ($R_t = 1.7$ Min. / Isokratisch 30:70 (H₂O:ACN))

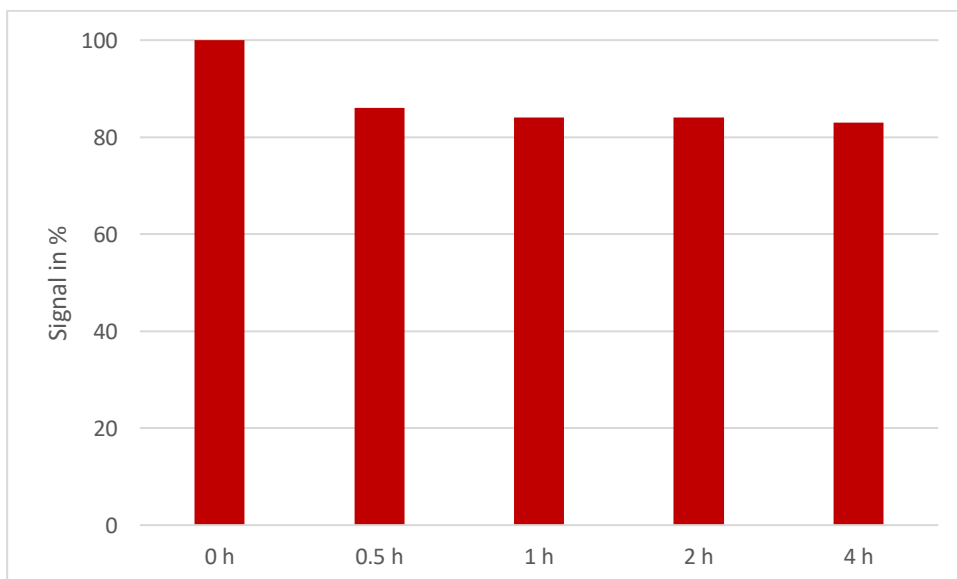


Abbildung 51: Überprüfung der Stabilität von Verbindung RC73 im Acetat-Puffer (pH = 5.5) per LC-MS, Signal im UV-Chromatogramm bei 254 nm ($R_t = 1.7$ Min. / Isokratisch 30:70 (H₂O:ACN))

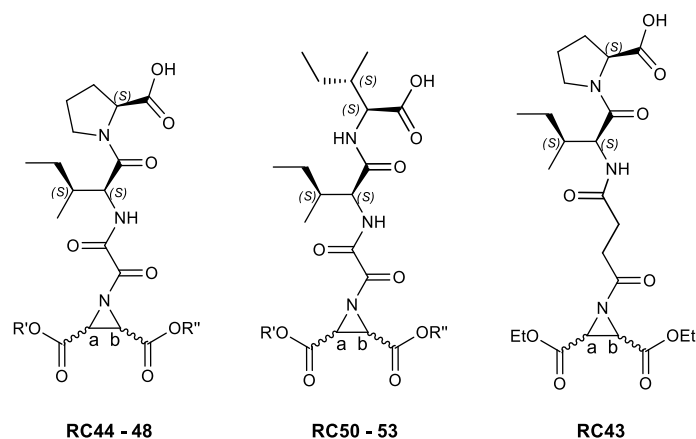
7. Zusammenfassung und Ausblick

Teil I: Design, Synthese und Testung Aziridin-2,3-dicarboxylat-basierter Cysteinprotease-Inhibitoren gegen Cathepsin B

Mittels computergestütztem strukturbasiertem Drug Design wurden ausgehend von dem selektiven Epoxid-basierten Cathepsin-B Inhibitor **CA074** eine Reihe an potentiellen *trans*-konfigurierten Aziridin-basierten Inhibitoren zur Hemmung von humanem Cathepsin B entwickelt. Durch Einführen einer Carboxylgruppe an der Dipeptid-Sequenz der neuartigen Inhibitoren soll mittels Generierung einer ionischen Wechselwirkung zum einzigartigen Strukturelement von Cathepsin B, einem *occluding loop*, bestehend aus zwei positiv geladenen Histidin-Resten (His¹¹⁰/His¹¹¹), Selektivität unter den Papain-ähnlichen Cysteinproteasen erreicht werden.

Es wurde Molekulares Docking der Aziridin-2,3-dicarboxylatbasierten Zielverbindungen mit FlexX/LeadIT an Cathepsin B (pdb: 2DC7) durchgeführt und die postulierten Bindungsmodi mit der Kristallstruktur von bekannten hochaffinen Epoxid-Inhibitoren, wie **CA030** (pdb: 1CSB), **CA042** (pdb: 2DC7) und **NS-134** (pdb: 1SP4), verglichen. Die Aminosäuresequenz (S)-Pro-(S)-Ile aus der Leitstruktur CA030 wurde aufgrund der plausiblen Bindungsmodi und höheren FlexX-Scores im Vergleich zu den (S)-Ile-(S)-Ile-Derivaten (**RC50 - 54**) für die neuartigen Aziridinyl-Peptide übernommen. Als geeignete Größe für das Linker-Molekül hat sich ein Oxalyl-Linker herausgestellt, um einen optimalen Abstand des *warheads* zum katalytischen Cystein zu erhalten. Unter Beibehaltung der Dipeptid-Sequenz und des Linkers wurden eine Reihe an Zielverbindungen mit variierenden Estergruppen (**RC44 - 48**) in die Datenbank aufgenommen. Analog zu den PF-Inhibitoren wurden ebenfalls Halbester in Betracht gezogen, die eine zusätzliche, ionische Wechselwirkung zum katalytischen Histidinium-Kation eingehen sollen.

Tabelle 18: FlexX-Docking-Ergebnisse an humanem Cathepsin B (pdb: 2DC7), sortiert nach FlexX-Score



Ligand	R'	R''	Konf. a, b	FlexX-Score	Abstand Cys ²⁹ [Å]
<i>cis</i> -RC47	EtPh	OH	<i>S,S</i>	-43.3	1.91
E64				-37.6	6.21
<i>cis</i> -RC48	Et	OH	<i>S,S</i>	-37.4	2.04
RC47	EtPh	OH	<i>S,S</i>	-35.7	2.96
RC48	Et	OH	<i>S,S</i>	-33.2	2.99
CA074				-33.1	2.08
NS-134				-32.3	2.86
RC47.1	EtPh	OH	<i>R,R</i>	-31.5	5.00
RC44	Et	Et	<i>S,S</i>	-30.9	3.12
RC48.1	Et	OH	<i>R,R</i>	-30.8	3.95
RC46.1	Ph	Et	<i>R,R</i>	-30.5	4.20
E64c				-29.8	2.12
RC45.1	EtPh	EtPh	<i>R,R</i>	-29.6	3.51
RC44.1	Et	Et	<i>R,R</i>	-28.2	5.10
<i>cis</i> -RC53	EtPh	OH	<i>S,S</i>	-26.5	7.54
<i>cis</i> -RC48.1	Et	OH	<i>R,R</i>	-25.8	2.47
RC52	EtPh	Et	<i>S,S</i>	-25.3	5.76
RC46	EtPh	Et	<i>S,S</i>	-25.3	3.83
CA076				-25.2	1.71
RC53	EtPh	OH	<i>S,S</i>	-25.0	8.19
RC45	EtPh	EtPh	<i>S,S</i>	-23.8	2.89
RC52.1	EtPh	Et	<i>R,R</i>	-23.7	6.04
RC43	Et	Et	<i>S,S</i>	-23.0	5.94
RC50.1	Et	Et	<i>R,R</i>	-21.9	8.53
RC51	EtPh	EtPh	<i>S,S</i>	-20.8	6.77
RC50	Et	Et	<i>S,S</i>	-19.6	11.02
RC51.1	EtPh	EtPh	<i>R,R</i>	-19.4	8.54
RC54.1	Et	OH	<i>R,R</i>	-16.9	2.79
RC54	Et	OH	<i>S,S</i>	-15.7	7.02
RC53.1	EtPh	OH	<i>R,R</i>	-----	

Epoxid-Inhibitoren sind in fett gedruckt, Abstände wurden mit MOE2015 bestimmt

Die beste Docking-Hitsubstanz ist die Zielverbindung **RC47** und ihr *cis*-Derivat *cis*-**RC47**. Der Halbester **RC47** ist mit einer Phenylethylgruppe versehen, die die tiefe S2-Tasche vollständig belegt. Die freie Carboxylgruppe am Aziridin-Ring generiert eine ionische Wechselwirkung zum His¹⁹⁹ im katalytischen Zentrum von Cathepsin B und die Carboxylgruppe am Dipeptid-Ende tritt,

wie erwartet, mit dem *occluding loop* in ionische Wechselwirkung (siehe Interaktionsdiagramm, Abbildung 52). Der FlexX-Score beträgt -35.7 und der Abstand zum katalytische Cys²⁹ beträgt 2.96 Å, sodass im nächsten Schritt eine kovalente Bindungsbildung möglich wäre (Tabelle 18).

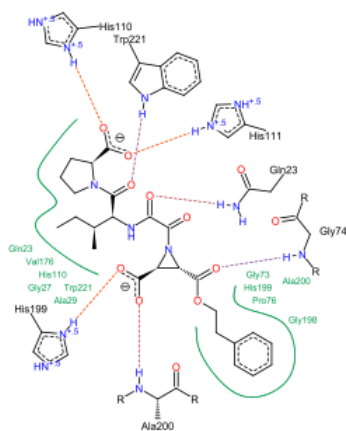


Abbildung 52: 2D-Interaktionsdiagramm von RC47 (mit *(S,S)*-konf. Aziridinring), erstellt von FlexX/LeadIT

Eine Überlagerung des postulierten Bindungsmodus von **RC47** mit der Leitstruktur **CA042** verdeutlicht die Ähnlichkeit der Bindungsposen und Wechselwirkungen beider Verbindungen im aktiven Zentrum von humanem Cathepsin B (Abbildung 53).

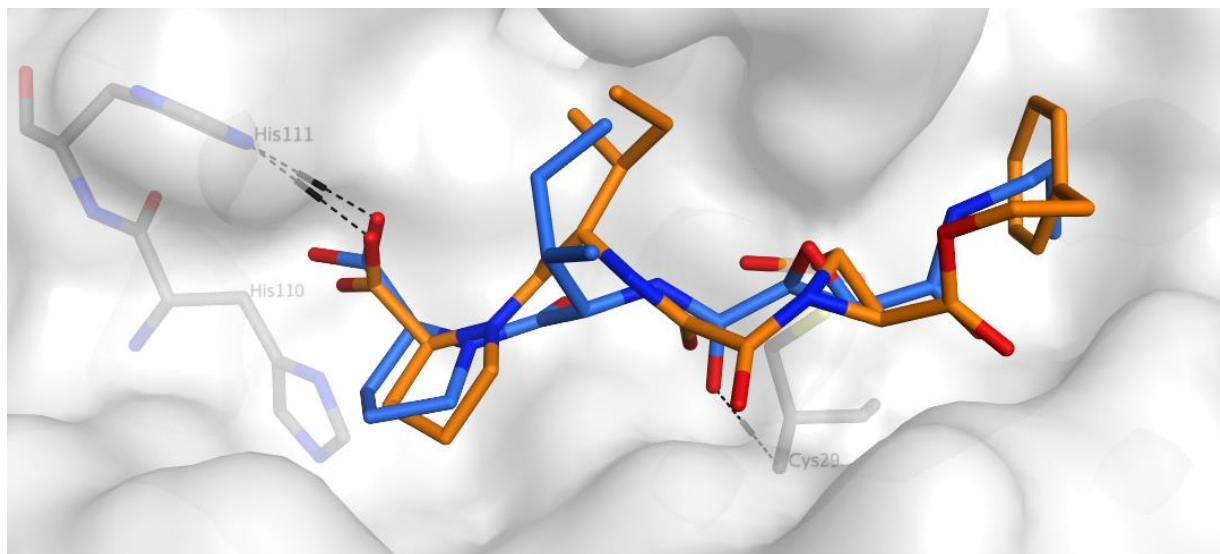


Abbildung 53: Vergleich der von FlexX postulierten Bindungsmodi von RC47 (orange) und Cathepsin B-Inhibitor CA074 (blau), erstellt mit MOE2015

Der entsprechende symmetrische Diester **RC45** mit zwei Phenylethylgruppen am Aziridin-Ring zeigt einen ähnlichen Bindungsmodus wie der Halbester **RC47** mit einem guten FlexX-Score von -23.8 und einem Abstand von 2.89 Å zum katalytischen Cystein-Rest. Allerdings fehlt hier die ionische Wechselwirkung zum katalytischen His¹⁹⁹ durch das Nichtvorhandensein der Carboxylgruppe am Aziridin-Ring. Die zweite Phenylethylgruppe ist vielmehr *solvent-exposed* (Abbildung 54).

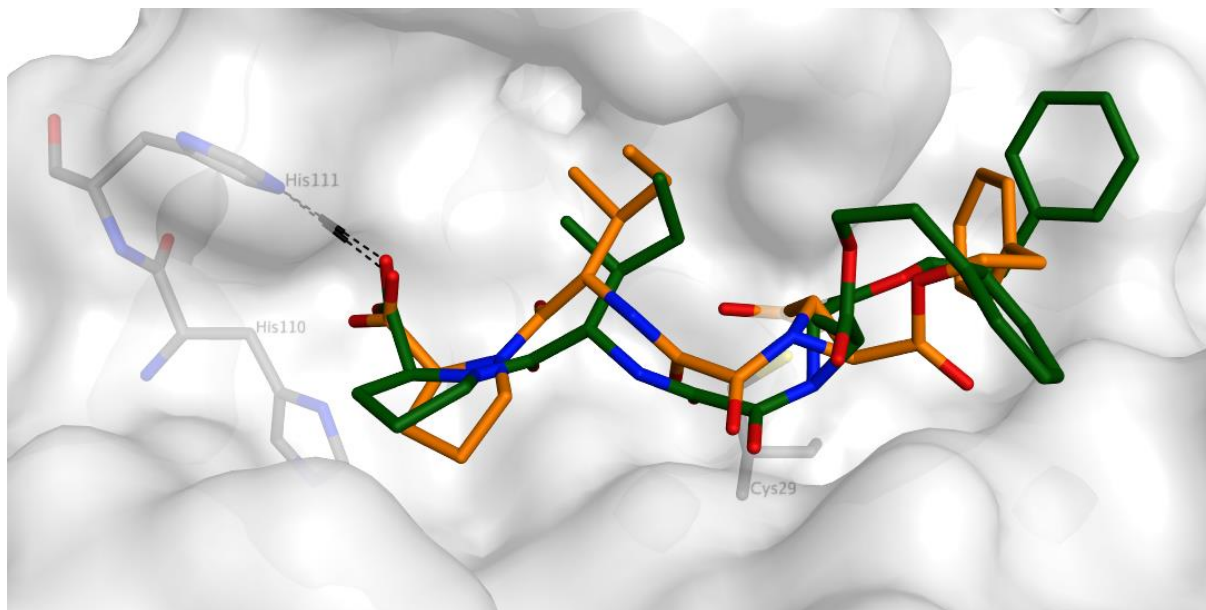


Abbildung 54: Vergleich der von FlexX postulierten Bindungsmodi vom Halbester RC47 (orange) und Diester RC45 (grün), erstellt mit MOE2015

Eine Auswahl an Docking-Hit-Substanzen wurde im Folgenden synthetisiert und auf ihre Wirksamkeit getestet (Tabelle 15). Die 10-stufige racemische bzw. 13-stufige stereoselektive Syntheseroute wurde etabliert und konnte erfolgreich durchgeführt werden. Als kritischer Schritt hat sich die finale, palladiumkatalysierte Hydrogenolyse herausgestellt. Während die Hydrogenolyse zur Erhaltung der Diester-Derivate unter Abspaltung der Benzylester-Gruppe am endständigen Prolin problemlos funktionierte, gab es Probleme bei der gleichzeitigen Abspaltung von zwei Benzylester-Gruppen zur Erhaltung der Halbester-Derivate.

Um das Scheitern der gleichzeitigen Hydrogenolyse zweier Benzylester-Gruppen zu untersuchen, wurde eine LC-MS-Reaktionskontrolle von Verbindung **RC71** durchgeführt (siehe Abbildung 45). Dazu wurde alle zehn Minuten eine Probe aus der Reaktionsmischung entnommen und ein LC-MS-Spektrum aufgenommen. Nach 30 Minuten zeigt das LC-MS-Spektrum die gewünschte Masse des Produkts. Nach der Aufarbeitung, welche das Abfiltrieren des Katalysators und Entfernung des Lösungsmittels unter vermindertem Druck beinhaltet, wurde das Produkt mittels $^1\text{H-NMR}$ -Spektroskopie und erneut mit der LC-MS charakterisiert. Überraschenderweise war das Produkt im Massenspektrum nicht mehr zu finden, obwohl im $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum alle Protonen des Produkts zugeordnet werden konnten. Das Produkt scheint sehr instabil zu sein aufgrund der labilen Aziridid-Bindung. Für die Zukunft sollte man die Hydrogenolyse oder vielmehr die Aufarbeitung unter Inertgas-Atmosphäre durchführen. Weiterhin sollten alle verwendeten Lösungsmittel bei der Reaktionsführung und der Charakterisierung beispielsweise durch die LC-MS frei von Wasser und Säuren sein. Andere milde Formen der Hydrogenolyse mit anderweitigen Lösungsmitteln sollten ebenfalls ausprobiert werden.

Mittels eines fluorimetrischen Enzym-Assays wurden die synthetisierten Zielverbindungen auf ihre inhibitorische Wirksamkeit gegenüber Cathepsin B, Cathepsin L, Cruzain und Rhodesain getestet. Keine der zehn Zielverbindungen hemmt das gewünschte Target Cathepsin B. Dies ist womöglich auf die Flexibilität des *occluding loops* zurückzuführen, welche das Docking erschwert, da sie nicht berücksichtigt werden kann. Dazu muss man quantenmechanische Rechnungen durchführen, die für solche große Molekülsysteme sehr komplex und zeitaufwendig sind. Zwei Verbindungen, **RC69** ($R_1=OBn$, $R_2=OEtPh$) und **RC75** ($R_1=R_2=OEtPh$), zeigen eine Selektivität für Cathepsin L. Sie hemmen humanes Cathepsin L und die parasitären Cathepsin L-ähnlichen Cysteinproteasen Rhodesain und Cruzain. Rhodesain wird von beiden Verbindungen am stärksten gehemmt mit einem K_i -Wert im nanomolaren Bereich (siehe Tabelle 15).

Teil II: Molekulares Docking und Struktur-Wirkungsbeziehungen *Leishmania*-selektiver Aziridin-2,3-dicarboxylat-basierter Cysteinprotease-Inhibitoren

Selektive, kovalent-irreversible Aziridin-basierte Inhibitoren der *Leishmania mexicana* Cystein-Protease LmCPB2.8 wurden von Philipp Fey im Rahmen seiner Dissertation entwickelt. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden mittels Molekularen Dockings (FlexX/LeadIT) am computergestützten Homologie-Modell der LmCPB2.8 (MOE2015) und am strukturell verwandten Cruzain die Bindungsmodi der PF-Inhibitoren untersucht. PF-Inhibitoren mit der höchsten Potenz und Selektivität für die *Leishmania*-Protease zeigten gute FlexX-Scores und plausible Bindungsmodi in der aktiven Tasche des Homologiemodells der LmCPB2.8 im Gegensatz zu den Docking-Ergebnissen an Cruzain. Ein Vergleich und eine Überlagerung der relevanten Aminosäuren in den Bindetaschen der beiden parasitären Cysteinproteasen zeigt trotz der hohen Konservierung einen Unterschied in der S2-Bindetasche. Während in LmCPB2.8 ein Tyrosin in der tiefen S2-Tasche zu finden ist, ist in Cruzain an gleicher Stelle ein Glutamat-Rest. Die tiefe S2-Tasche der *Leishmania*-Protease ermöglicht eine Besetzung mit lipophilen, aromatischen und voluminösen Estergruppen, wie Methylnaphthalen oder Phenylethyl-Estergruppen, was sowohl aus den vorgeschlagenen Docking-Bindungsmodi als auch aus den experimentellen Hemmdaten dieser Inhibitoren hervorgeht. Dagegen sind die genannten Estergruppen der entsprechenden PF-Inhibitoren in Cruzain eher dem Lösungsmittel zugewandt oder es konnten keine Bindungsmodi vom Docking-Programm vorhergesagt werden.

Der selektive und hochaffine Halbesther **PF18** mit einer Dissoziationskonstante von $0.441 \mu\text{M}$ für LmCPB2.8 zeigt die höchste Potenz innerhalb der PF-Reihe und eine zeitabhängige Inhibierung ($k_{2\text{nd}} [\text{M}^{-1} \text{min}^{-1}] = 190.569$). Die aus dem Docking vorhergesagte Bindungsmodi und entsprechende Wechselwirkungen für diesen Inhibitor im aktiven Zentrum zeigen eine ionische Wechselwirkung der freigesetzten Carboxylgruppe am Aziridin-Ring mit dem katalytischen

His¹⁶³. Diese starke, ionische Wechselwirkung könnte der Grund für die hohe Affinität und schnelle, irreversible Hemmung sein. Entsprechende Diester-Inhibitoren können diese ionische Wechselwirkung nicht eingehen und zeigen im Vergleich zu ihren Halbestern niedrigere FlexX-Scores, was im Einklang mit den biologischen Daten ist.

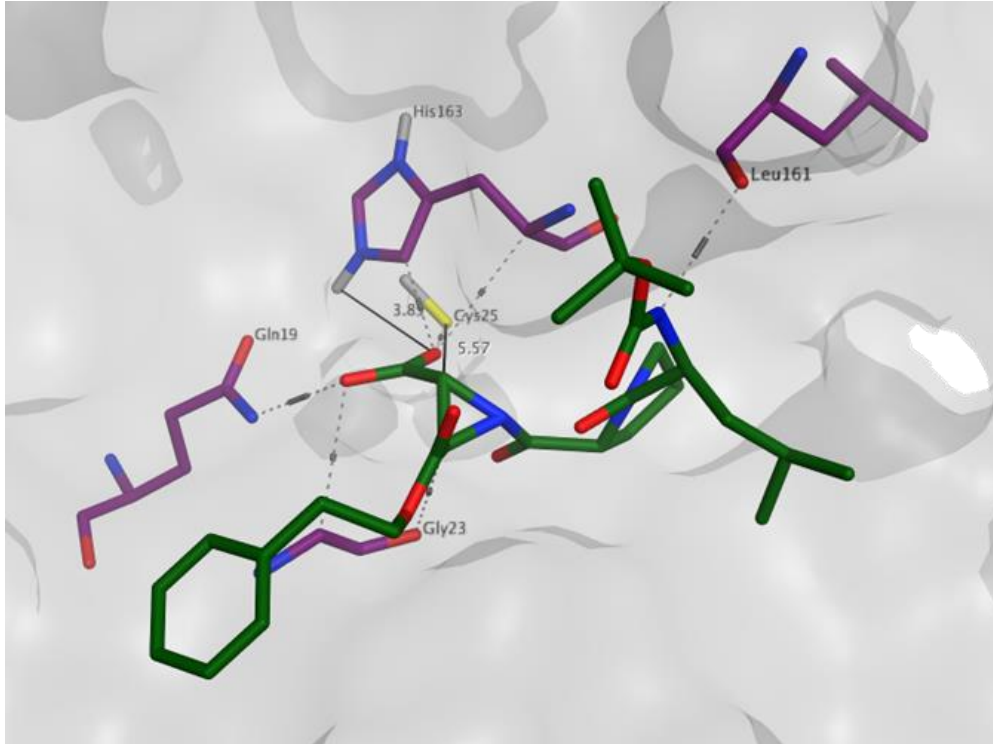


Abbildung 55: Von FlexX postulierter Bindungsmodus der Leitstruktur PF18 ((*R,R*)-konfigurierter Aziridin-Ring) in LmCPB2.8 (Homologiemodell); FlexX-Score: -11.40, 5.57 Å; schwarz gestrichelte Linien sind H-Brücken-Wechselwirkungen, durchgezogene Linien sind ionische Wechselwirkungen mit den entsprechenden Aminosäuren (magenta) im aktiven Zentrum vom *L. mexicana*, erstellt mit MOE2015

Zusammenfassend kann man sagen, dass das konventionelle, nicht-kovalente Docking mit FlexX/LeadIT in der Lage ist, plausible Bindungsposen und Bindungsenergien für kovalente Aziridin-basierte Inhibitoren vorherzusagen, deren Trends mit den experimentell-bestimmten K_i -Werte gut einhergehen. Weiterhin bietet das Erstellen eines computergestützten Homologiemodells mittels der Software MOE2015 eine zufriedenstellende Möglichkeit, beim Fehlen der gewünschten Kristallstruktur die 3D-Struktur eines Proteins auf Grundlage ihre Protein-Sequenz nachzubilden, wie am Beispiel der *Leishmania*-Protease im Rahmen dieser Arbeit erfolgreich demonstriert wurde.

Weitere Ziele zur Optimierung der Inhibitoren ist die Auflösung einer Kristallstruktur der *Leishmania*-Protease idealerweise gebunden mit einem PF-Inhibitor, um die vorhergesagten Bindungsmodi zu verifizieren. Auf Grundlage, der in dieser Arbeit erstellen Struktur-Wirkungsbeziehungen können die PF-Halbestern-Inhibitoren einer Strukturoptimierung unterzogen werden, um pharmakokinetische Parameter und Affinität weiter zu optimieren.

8. Experimenteller Teil

8.1 Messgeräte und verwendete Chemikalien

Magnetische Kernresonanzspektroskopie ($^1\text{H-NMR}$ / $^{13}\text{C-NMR}$)

Die NMR-Messungen erfolgten an einem *Fourier 300*-Magnetresonanzspektrometer der Firma *Bruker Biospin GmbH*. Die chemische Verschiebungen δ sind in parts per million (ppm) und die Kopplungskonstanten J in Hertz (Hz) angegeben. Als interner Standard dienen die Resonanzsignale der Restprotonen der deuterierten Lösungsmittel. Folgende Lösungsmittel wurden hierzu verwendet: CDCl_3 ($\delta = 7.26$ ppm (^1H) / 77.16 ppm (^{13}C)), DMSO-d_6 ($\delta = 2.50$ ppm), CD_3OD ($\delta = 3.31$ ppm), D_2O ($\delta = 4.79$ ppm). Die Multiplizität der Signale wurde wie folgt abgekürzt: s (Singulett), d (Duplett), dd (Dublett vom Dublett), t (Triplet), q (Quartett), m (Multipllett) und br (broad).

Infrarotspektroskopie

Die IR-Spektren wurden an einem *Nicolet Avatar 330* Fouriertransformations-Infrarot-Spektrometer mit ATR-Aufsatz (*attenuated total reflection*) der Firma *Thermo electron corporation* aufgenommen. Die Werte werden in Wellenzahlen $\tilde{\nu}$ (cm^{-1}) angegeben. Folgende Abkürzungen werden für die Bandenintensitäten verwendet: vs (very strong), s (strong), m (medium), w (weak) und br (broad). Zur Reaktionskontrolle wurde der *Reaction Monitoring Quick Guide des Typs MB 3000* der Firma *ABB* verwendet.

Schmelzpunktbestimmung

Die Schmelzpunkte wurden an einem Schmelzpunktgerät *SMP10* der Firma *Stuart* bestimmt. Bei den angegebenen Schmelzpunkten handelt es sich um unkorrigierte Werte.

Hochleistungsflüssigkeitschromatographie

Die verwendete HPLC-Anlage des Typs *Varian Prostar* besteht aus einem analytischen/semipräparativen Upscale-System (0.05-50 mL/Min bei max. Gegendruck von 275 bar mit Scale Up-Mast) und einem 2-Kanal UV-Detektor. Zum Einsatz kamen folgende Säulen: Phenomenex Hyperclone 5u 0DS (C18) 120A (250mm x 4.6mm) 5 Micron (analytisch) / VARIAN DYNAMAX 250x21.4 MM (LxID) Microsorb 60-8 C18 (semipräparativ). Die Zusammensetzung der mobilen Phase bestehend aus Acetonitril und Millipore Wasser versetzt mit 0.1 % Ameisensäure wurde dem Trennproblem angepasst und entsprechend optimiert. Die folgende Tabelle gibt eine Übersicht der verwendeten semipräparativen isokratischen HPLC-Methoden (Konz.: 10 mg/mL; Flow: 7 mL/Min) zur Aufreinigung der Zielverbindungen (Konz.: 10 mg/mL; Flow: 7 mL/Min).

Tabelle 19: Semipräparative HPLC-Methoden

Labornr.		HPLC-Methode A / B [%]	Retentionszeit R _t [Min]	Reinheit [%]
PF1	PF270	60 / 40	30	98
PF3	PF253	70 / 30	49	98
PF8	PF272	60 / 40	55	95
PF13	PF257	60 / 40	19	100

Säule: VARIAN DYNAMAX 250x21.4 MM (LxID) Microsorb 60-8 C18, Laufmittel A: Acetonitril HPLC grade, 0.1 % Ameisensäure, B: Millipore Wasser

Säulenchromatographie

Als stationäre Phase wurde Kieselgel 60 (Korndurchmesser: 0.063-0.2 mm / 0.040-0.063 mm) der Firma *Macherey-Nagel* verwendet. Durchmesser und Länge der Schwerkraftsäule wurden dem Trennverhalten und der Menge des Substanzgemisches angepasst. Die Laufmittelzusammensetzung ist jeweils in Volumenanteilen angegeben.

Dünnschichtchromatographie

Es wurden DC-Fertigfolien des Typs *ALUGRAM Xtra SIL G/UV₂₅₄* der Firma *Macherey-Nagel* verwendet mit einer Beschichtung aus 0.20 mm Kieselgel 60 F254. Zur Detektion wurden folgende Farbe-Reagenzien verwendet: Ehrlich-Reagenz (Aziridine/Amine), gesättigte wässrige Kaliumpermanganat-Lösung, Vanillin-Reagenz (Amine, Aminosäuren), Ioddampf und Ninhydrin-Reagenz (Aminosäuren, Peptide). Der R_F-Wert ergibt sich aus dem Quotienten der Laufstrecke der Substanz und der Laufstrecke der Fließmittelfront.

Massenspektrometrie

Die LC-MS-Spektren zur Reinheitsbestimmung wurden an einer *HP Agilent 1100 Series* HPLC-Anlage mit Dioden-Array-Detektor, welche an einem LC/MSD-Trap-Massenspektrometer (*Agilent Technologies, LC/MSD Ion Trap*) gekoppelt ist, gemessen. Bei der Säule handelte es sich um eine Phenomenex® Gemini 5 µm C18 (150 x 2.00 mm) 110A. Die mobile Phase bestand aus Acetonitril/Wasser versetzt mit 0.1% Ameisensäure. Die Proben hatten eine Konzentration von 0.1 mg/L.

Polarimetrie

Die spezifischen Drehwerte $[\alpha]^{20^\circ\text{C}}$ wurden bei einer Wellenlänge von $\lambda = 589 \text{ nm}$ (Natrium-D-Linie) an einem Polarimeter des Typs P3000 der Firma *A. Krüss Optronik* bestimmt. Die Konzentration wird in mg/mL Lösemittel angegeben.

Verwendete Chemikalien

Alle verwendeten Chemikalien wurden, wenn nicht anders angegeben, von *Alfa Aesar*, *Sigma-Aldrich*, *Fluka*, *Roth*, *Acros Organics* oder *Merck* kommerziell erworben. Lösungsmittel wurden vor Benutzung mittels Destillation gereinigt. Absolutierte Lösungsmittel wurden kommerziell erworben oder mit dem entsprechenden Trocknungsmittel behandelt, destilliert und unter Argon-Atmosphäre über Molekularsieb gelagert.

8.2 Fluorimetrische Enzymassays

Die Fluoreszenzintensitäten wurden an einem Infinite F200 Pro Fluorimeter der Firma *Tecan* bei 25 °C, mit einer Anregungswellenlänge von 380 nm und einer Detektionswellenlänge von 460 nm gemessen. Als Substrat für alle fluorimetrischen Enzymassays wurde Z-Phe-Arg-7-amino-4-methylcumarin von *Bachem* verwendet.

Zunächst wurde ein Screening an den Enzymen bei einer Inhibitorkonzentration von jeweils 20 µM durchgeführt. Für die Assays wurden jeweils folgende Volumina verwendet: 180 µL Puffer, 5 µL Enzym, 5 µL Substrat, 10 µL DMSO bzw. 400 µM Inhibitor. Jede Probe wurde doppelt gemessen und jeweils der Mittelwert gebildet. Die DMSO-Negativkontrolle wurde ebenfalls doppelt bestimmt. Bei den Verbindungen, die im Screening eine Hemmung von mindestens 50 % zeigen, wird der IC₅₀-Wert mittels Verdünnungsreihen (sieben Inhibitorkonzentrationen zw. 50 µM und 0.1 µM) in einer zweifachen Doppeltbestimmung ermittelt und daraus der K_i-Wert über die Cheng-Prusoff-Gleichung berechnet (siehe Kap. 5, Formel 2).

Tabelle 20: Verwendete Enzyme, Puffer, Substratkonzentrationen und jeweiliger K_m-Wert

Enzym	Puffer	[S]	K _m
Cathepsin B (human)	Tris-Puffer (pH 6.5)	100	150 µM
Cathepsin L (human)	Tris-Puffer (pH 6.5)	6.25	6.5 µM
Rhodesain (<i>Trypanosoma brucei rhodesiense</i>)	Acetat-Puffer (pH 5.5)	10	826.5 nM
Cruzain (<i>Trypanosoma cruzi</i>)	Acetat-Puffer (pH 5.5)	5	1.5 µM

Tris-Puffer: 50 mM Tris, 5 mM EDTA, 200 mM NaCl, 2mM DTT

Acetat-Puffer: 50 mM Natriumacetat, 5 mM EDTA, 200 mM NaCl, 5 mM DDT

8.3 Allgemeine synthetische Methoden

Methode A: Einführung eines Benzylesters

A1: Säurekatalysierte Veresterung

1.0 Äq. Aminosäure, 3.9 Äq. Benzylalkohol und 1.02 Äq. *para*-Toluolsulfonsäure Monohydrat wurden in Toluol gelöst und solange am Wasserabscheider unter Rückfluss erhitzt, bis sich kein Wasser mehr gebildet hat. Nach Entfernen des Lösemittels wurde Diethylether hinzugegeben, um das Produkt als viskoses Öl auszufällen. Dieses wurde anschließend in Ethylacetat aufgenommen, mit Natriumsulfat getrocknet und das Lösemittel unter reduziertem Druck entfernt.

A2: Veresterung mittels DCC

1.0 Äq. Säure, 1.0 Äq. Alkohol und 0.1 Äq. DMAP wurden in Dichlormethan gelöst, auf 0 °C abgekühlt und schrittweise mit 1.1 Äq. DCC versetzt. Es wurde eine Stunde bei 0 °C und mind. weitere 72 Stunden bei Raumtemperatur gerührt (Reaktionskontrolle mittels DC). Anschließend wurde das Reaktionsgemisch einmal mit 10%iger Salzsäure, zweimal mit gesättigter Natriumhydrogencarbonat-Lösung und einmal mit Wasser gewaschen. Nach Trocknung mit Natriumsulfat und Entfernen des Lösemittels unter reduziertem Druck wurde das Rohprodukt mittels Säulenchromatographie aufgereinigt.

Methode B: Einführung eines *tert*-Butylesters

Zu einer Lösung aus 2.0 Äq. *tert*-Butanol und 2.0 Äq. absolutiertes Pyridin in absolutiertem Diethylether wurde unter Argon-Atmosphäre tropfenweise 1.0 Äq. Säurechlorid zugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde 2 Stunden bei Raumtemperatur gerührt und nach vollständiger Umsetzung mit Wasser und Natriumhydrogencarbonat gewaschen. Das Produkt wurde nach Entfernen des Lösemittels unter reduziertem Druck erhalten.

Methode C: Entfernen eines Benzylesters

1.0 Äq. des Edukts wurde in wasserfreiem Methanol gelöst und mit 100 mg/mmol Pd/C (10 %) versetzt. In einem Mini-Autoklaven wurde das Reaktionsgemisch bei Raumtemperatur und 5 bar H₂ für 30 Minuten bis 3 Stunden bis zur vollständigen Umsetzung gerührt (Reaktionskontrolle mittels DC). Der Katalysator wurde abfiltriert und das Lösemittel unter reduziertem Druck entfernt.

Methode D: Entfernen eines *tert*-Butylesters

1.0 Äq. des Edukts wurde in Toluol gelöst und bei Raumtemperatur tropfenweise mit 5.0 Äq. 85%ige Phosphorsäure versetzt. Das Reaktionsgemisch wurde bis zur vollständigen Umsetzung bei Raumtemperatur gerührt (Reaktionskontrolle mittels DC). Anschließend wurde Wasser

dazugegeben, dreimal mit Ethylacetat extrahiert und mit Magnesiumsulfat getrocknet. Das Produkt kann nach Entfernen des Lösemittels unter reduziertem Druck ohne weitere Aufarbeitung umgesetzt werden.

Methode E: Entfernen einer BOC-Schutzgruppe

1.0 Äq. des Edukts wurde in Dichlormethan gelöst und bei 0 °C tropfenweise mit 10.0 Äq. Trifluoressigsäure versetzt. Das Reaktionsgemisch wurde eine Stunde bei 0 °C und weitere 4 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Nach Entfernen des Lösemittels unter reduziertem Druck wurde durch mehrmalige Zugabe von Dichlormethan überschüssige Trifluoressigsäure azeotrop entfernt.

Methode F: Entfernen eines Methylesters

1.0 Äq. des Edukts wurden in einem Lösemittel-Gemisch aus Acetonitril und Wasser (1:1) gelöst und mit 1.0 Äq. Kaliumhydroxid versetzt. Bei Raumtemperatur wurde bis zur vollständigen Umsetzung gerührt (2-3 Stunden) und anschließend das Lösemittel unter reduziertem Druck entfernt.

Methode G: Peptidkupplung mittels PPA

1.0 Äq. *N*-geschütztes Dipeptid und 1.2 Äq. Aziridin-2,3-dicarboxylat wurden in Ethylacetat gelöst und bei 0 °C schrittweise mit 3.0 Äq. PPA (50% in Ethylacetat) versetzt. Die Reaktionslösung wurde eine Stunde bei 0 °C und weitere 7 Tage bei Raumtemperatur unter Argon-Atmosphäre gerührt. Anschließend wurde Ethylacetat dazugegeben, zweimal mit halbgesättigter Natriumhydrogencarbonat-Lösung und einmal mit Wasser gewaschen. Die vereinigten wässrigen Phasen wurden zwei weitere Male mit Ethylacetat extrahiert. Anschließend wurden die vereinigten organischen Phasen nochmals mit halbgesättigter Natriumhydrogencarbonat-Lösung gewaschen und mit Natriumsulfat getrocknet. Das Rohprodukt wurde nach Entfernen des Lösemittels mittels Säulenchromatografie aufgereinigt.

Methode H: Peptidkupplung mittels HBTU

1.0 Äq. Säure, 1.1 Äq. *C*-geschütztes Dipeptid und 1.2 Äq. HBTU wurden in Acetonitril gelöst und bei 0 °C tropfenweise mit 3.0 Äq. Triethylamin versetzt. Die Reaktionslösung wurde eine Stunde bei 0 °C und weitere vier Tage bei Raumtemperatur gerührt. Nach Entfernen des Lösemittels wurde der Rückstand in Ethylacetat und Wasser aufgenommen. Die wässrige Phase wurde dreimal mit Ethylacetat extrahiert und die vereinigten organischen Phasen anschließend mit Ammoniumchlorid-, Natriumhydrogencarbonat- und Natriumchlorid-Lösung gewaschen und mit Natriumsulfat getrocknet. Nach Entfernen des Lösemittels unter reduziertem Druck wurde das Rohprodukt mittels Säulenchromatografie aufgereinigt.

Synthese von Aziridin-2,3-dicarboxylaten

1. Stereoselektive Route

Methode Ia: Synthese von symmetrischen (2E)-But-2-endioaten

Die Reaktionslösung aus 1.0 Äq. Fumarsäure, 2.5 Äq. Alkohol und 0.1 Äq. *para*-Toluolsulfonsäure in Toluol wurde am Wasserabscheider unter Rückfluss erhitzt, bis sich kein Wasser mehr gebildet hat (etwa 24 Stunden). Das Lösemittel wurde unter reduziertem Druck entfernt und der Rückstand in Diethylether aufgenommen. Die organische Phase wurde mit gesättigter Natriumhydrogencarbonat-Lösung und Wasser gewaschen. Anschließend wurde durch Zugabe von Petrolether das Produkt als pulvriger Feststoff ausgefällt. Nach Abfiltrieren und Trocknen des Produkts konnte es ohne weitere Aufreinigung umgesetzt werden.

Methode Ib: Synthese des Dioxathiolans

1.0 Äq. But-2-endioat wurde in Dichlormethan gelöst und tropfenweise mit 1.1 Äq. Thionylchlorid und 0.02 Äq. absolutiertem Dimethylformamid versetzt. Die Reaktionslösung wurde 30 Minuten bei 50 °C und weitere zwei Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Entstehendes HCl-Gas wurde durch Einleiten eines Stickstoffstroms entfernt. Anschließend wurde das Lösemittel unter reduziertem Druck entfernt. Das Produkt kann ohne weitere Aufreinigung umgesetzt werden.

Methode Ic: Synthese des Azidoalkohols

Eine Suspension aus 1.0 Äq. Dioxathiolan und 2.0 Äq. Natriumazid in absolutiertem Dimethylformamid wurde 24 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Nach Zugabe von Dichlormethan/Wasser (im Verhältnis 2/1) wurde zwei weitere Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde mit Dichlormethan extrahiert und die organischen Phasen mit Wasser und gesättigter Natriumchlorid-Lösung gewaschen. Nach Trocknen der Lösung mit Natriumsulfat wurde das Lösemittel unter reduziertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde ohne weitere Aufarbeitung umgesetzt.

Methode Id: Staudinger-Reaktion

Unter Argonatmosphäre wurde 1.0 Äq. Azidoalkohol in abs. Dimethylformamid gelöst und die Reaktionslösung auf 0 °C abgekühlt. 1.8 Äq. Triphenylphosphin, gelöst in Dimethylformamid, wurden tropfenweise zugegeben. Nach beendeter Zugabe wurde 3-6 Stunden (Kontrolle mittels DC) bei 80 °C gerührt. Anschließend wurde das Rohprodukt mittels Säulenchromatografie aufgereinigt.

2. Racemische Route

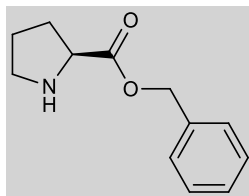
Methode J: Ringschluss mittels Diphenylsulfimin (DPSI)

1.0 Äq. But-2-endioat und 1.2 Äq. DPSI wurden für 24 Stunden bei 83 °C in Toluol gerührt. Anschließend wurde das Lösemittel unter reduziertem Druck entfernt und das Rohprodukt mittels Säulenchromatographie aufgereinigt.

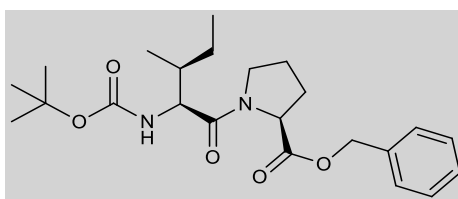
8.4 Synthetisierte Verbindungen

Synthese von Dipeptid und Linker

(S)-Prolinbenzylester-p-Tosylat (RC54)

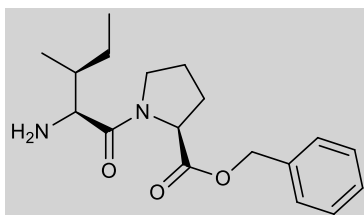


Methode:	A
Ansatz:	10.00 g, 0.08 mol (1 Äq.) (S)-Prolin 36.60 g, 0.33 mol (3.9 Äq.) Benzylalkohol 16.80 g, 0.08 mol (1.02 Äq.) <i>para</i> -Toluolsulfonsäure-Monohydrat 200 mL Toluol
R _f -Wert:	0.65 (Cyclohexan/Ethylacetat [1:1])
<u>Ausbeute:</u>	<u>28.64 g, 0.07 mol, 87 %, dunkelgelbe hochviskose Flüssigkeit</u>
¹ H-NMR:	(CDCl ₃ , 300 MHz), δ [ppm] = 7.74 (d, J = 8 Hz, 2H, 2 x Tos-ortho-CH), 7.36–7.28 (m, 5H, C ₆ H ₅), 7.15 (d, J = 8 Hz, 2H, 2 x Tos-meta-CH), 5.13 (dd, ² J = 12.1 Hz, 2H, CO ₂ CH ₂ Ph), 4.69 (s, 1H, Pro-α-CH), 3.59–3.40 (m, 2H Pro-δ-CH ₂), 2.34 (s, 3H, Tos-CH ₃), 2.13–1.83 (m, 4H, Pro-β-CH ₂ , Pro-γ-CH ₂).
¹³ C-NMR:	(CDCl ₃ , 75 MHz), δ [ppm] = 168.9, 141.5, 140.6, 134.6, 129.0, 128.7, 128.6, 127.1, 126.0, 68.3, 65.4, 46.4, 28.8, 23.6, 21.4.
FT-IR:	ν [cm ⁻¹] = 3432, 2979, 2773, 2567, 1736, 1453, 1208, 1152, 1121, 1032, 1008, 816, 738, 682.

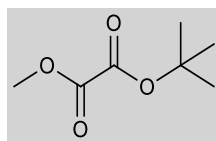
***N*-(*tert*-Butoxycarbonyl)-(*S*)-isoleucinyl-(*S*)-prolinbenzylester (RC60)**

Methode:	H
Ansatz:	1.8 g, 0.005 mol (1.1 Äq.) (<i>S</i>)-Prolinbenzylester- <i>p</i> -Tosylat 1.0 g, 0.004 mol (1 Äq.) <i>N</i> -(<i>tert</i> -Butyloxycarbonyl)-(<i>S</i>)-Isoleucin 1.8 g, 0.005 mol (1.2 Äq.) HBTU 6.4 g, 0.014 mol (3.5 Äq) DIPEA 80 mL Dichlormethan
R _f -Wert:	0.4 (Cyclohexan/Ethylacetat [2:1])
Ausbeute:	1.08 g, 2.58 mmol, 65 %, farblose, hochviskose Flüssigkeit
¹ H-NMR:	(CDCl ₃ , 300 MHz), δ [ppm] = 7.37–7.25 (m, 5H, C ₆ H ₅), 5.13–5.02 (d, J = 1.7 Hz, 2H, PhCH ₂), 4.62–4.55 (m, 1H, Pro-α-CH), 4.28 (dd, J = 9.5, 7.3 Hz, 1H, Ile-α-CH), 3.87–3.76 (m, 1H, Pro-δ-CH), 3.71–3.61 (m, 1H, Pro-δ'-CH), 2.31–2.13 (m, 1H, Pro-β-CH), 2.07–1.91 (m, 3H, Pro-β'-CH, Pro-γ-CH ₂), 1.76–1.68 (m, 1H, Ile-β-CH), 1.66–1.51 (m, 1H, Ile-γ-CH), 1.42 (s, 9H, C(CH ₃) ₃), 1.17–1.02 (m, 1H, Ile-γ' CH), 0.97 (d, J = 6.8 Hz, 3H, Ile C(CH ₃)(CH ₂ CH ₃)), 0.87 (t, J = 7.4 Hz, 3H, Ile C(CH ₃)(CH ₂ CH ₃)).
¹³ C-NMR:	(CDCl ₃ , 75 MHz), δ [ppm] = 172.3, 171.4, 155.7, 135.6, 128.5, 128.2, 128.1, 79.8, 66.8, 58.9, 56.2, 47.2, 37.9, 29.0, 28.3, 24.8, 24.2, 15.2, 11.5.
FT-IR:	ν [cm ⁻¹] = 3063, 2970, 1708, 1443, 1237, 1087, 971, 781, 765, 741, 699.

(2*R*,3*S*)-1-((*S*)-2-((Benzyloxy)carbonyl)pyrrolidin-1-yl)-3-methyl-1-oxopentan-2-ammonium-2,2,2-trifluoroacetat (RC55)



- Methode: E
- Ansatz: 1.08 g, 2.58 mmol (1.0 Äq.) *N*-(*tert*-Butoxycarbonyl)-(*S*)-isoleucinyll-(*S*)-prolinbenzylester (RC60)
2.94 g, 25.8 mmol (10 Äq.) Trifluoressigsäure
20 mL abs. Dichlormethan
- Ausbeute: 0.78 g, 2.45 mmol 95 %, gelbe hochviskose Flüssigkeit**
- ¹H-NMR: (CDCl₃, 300 MHz), δ [ppm] = 7.36–7.25 (m, 5H, C₆H₅), 5.23–5.11 (m, 2H, PhCH₂), 4.64–4.51 (m, 1H, Pro-α-CH), 4.14 (d, J = 5.5 Hz, 1H, Ile-α-CH), 3.78–3.64 (m, 1H, Pro-δ-CH), 3.62–3.49 (m, 1H, Pro-δ'-CH), 2.38–2.17 (m, 1H, Pro-β-CH), 2.09–1.89 (m, 4H, Pro-β'-CH, Pro-γ CH₂, Ile-β-CH), 1.65–1.48 (m, 1H, Ile-γ-CH), 1.21–1.10 (m, 1H, Ile-γ'-CH), 1.02 (d, J = 6.9 Hz, 3H, Ile C(CH₃)(CH₂CH₃)), 0.89 (t, J = 7.3 Hz, 3H, Ile C(CH₃)(CH₂CH₃)).
- ¹³C-NMR: (CDCl₃, 75 MHz), δ [ppm] = 208.5, 171.1, 168.3, 135.3, 128.6, 128.6, 128.4, 127.2, 67.3, 59.8, 56.2, 47.8, 36.7, 31.1, 25.0, 23.9, 14.5, 11.2.
- FT-IR: ν [cm⁻¹] = 2970, 2916, 2882, 1742, 1673, 1516, 1455, 1201, 1181, 1135, 721.

***tert*-Butylmethyloxalat (RC56)**

Ansatz: 1.00 g, 0.75 mL, 8.2 mmol (1.0 Äq.) Methyloxalylchlorid
 1.21 g, 1.55 mL, 16.4 mmol (2.0 Äq.) *tert*-Butanol
 1.29 g, 1.30 mL, 16.4 mmol (2.0 Äq.) abs. Pyridin
 60 mL abs. Diethylether

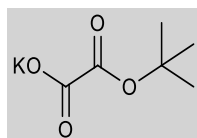
R_F-Wert: 0.3 (Dichlormethan/Ethylacetat [1:2])

Ausbeute: **489 mg, 4.0 mmol, 49 %, farbloses Öl (Lit.: 53%)**¹⁶⁹

¹H-NMR: (CDCl₃, 300 MHz), δ [ppm] = 3.85 (s, 3H, CH₃), 1.54 (s, 9H, C(CH₃)₃).

¹³C-NMR: (CDCl₃, 75 MHz), δ [ppm] = 159.0 (1C, CO₂-), 156.7 (1C, CO₂C(CH₃)₃), 85.0 (1C, C(CH₃)₃), 53.2 (1C, CH₃), 27.7 (3C, C(CH₃)₃).

FT-IR: $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 2985, 2937, 1736, 1371, 1215, 1148, 839, 796.

***tert*-Butyl-Kaliumoxalat (RC57)**

Methode: F

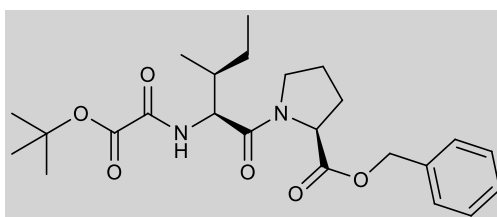
Ansatz: 489 mg, 4.00 mmol (1.0 Äq.) *tert*-Butylmethyloxalat
 224 mg, 4.00 mmol (2.0 Äq.) Kaliumhydroxid
 8 mL Acetonitril
 8 mL dest. Wasser

Ausbeute: **520 mg, 2.83 mmol, 71 %, farbloser Feststoff (Lit.: 93%)**¹⁶⁹

¹H-NMR: (CDCl₃, 300 MHz), δ [ppm] = 1.52 (s, 9H, (CH₃)₃).

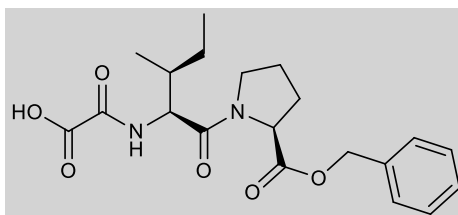
¹³C-NMR: (CDCl₃, 75 MHz), δ [ppm] = 165.3 (CO₂-), 164.0 (CO₂C(CH₃)₃), 84.2 (1C, C(CH₃)₃), 27.0 (3C, C(CH₃)₃).

FT-IR: $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 2978, 2933, 1720, 1644, 1392, 1365, 1229, 1151, 895, 853, 786.

Benzyl-(2-(*tert*-butoxy)-2-oxoacetyl)-(S)-alloisoleucyl-(S)-prolin (RC58)

Methode:	H
Ansatz:	1.12 g, 2.60 mmol (1.1 Äq.) (2 <i>R</i> ,3 <i>S</i>)-1-((<i>S</i>)-2-((benzyloxy)carbonyl)pyrrolidin-1-yl)-3-methyl-1oxopentan-2-ammonium-2,2,2-trifluoroacetat 0.43 g, 2.40 mmol (1.0 Äq.) <i>tert</i> -Butyl-Kaliumoxalat 1.09 g, 2.88 mmol (1.2 Äq.) HBTU 0.71 g, 0.98 mL, 7.10 mmol (3.0 Äq.) Triethylamin 100 mL Acetonitril
Ausbeute:	<u>0.69 g, 1.50 mmol, 69 %, farbloses Öl</u>
R _f -Wert:	0.2 (Cyclohexan/Ethylacetat [2:1])
SC:	Cyclohexan/Ethylacetat [5:1]
¹ H-NMR:	(CDCl ₃ , 300 MHz), δ [ppm] = 7.53 (d, J = 9.3 Hz, 1H, NH), 7.39–7.28 (m, 5H, C ₆ H ₅), 5.25–5.10 (m, 2H, PhCH ₂), 4.61–4.51 (m, 2H, Pro-α-CH, Ile-α-CH), 3.93–3.79 (m, 1H, Pro-δ-CH), 3.75–3.63 (m, 1H, Pro-δ'-CH), 2.29–2.13 (m, 1H, Pro-β-CH), 2.08–1.80 (m, 3H, Pro-β'-CH, Pro-γ-CH ₂), 1.76–1.64 (m, 1H, Ile-β-CH), 1.63–1.57 (m, 1H, Ile-γ-CH), 1.54 (s, 9H, C(CH ₃) ₃), 1.21 – 1.06 (m, 1H, Ile-γ'-CH), 0.99 (d, J = 6.8 Hz, 3H, Ile C(CH ₃)(CH ₂ CH ₃)), 0.88 (t, J = 7.4 Hz, 3H, Ile C(CH ₃)(CH ₂ CH ₃)).
¹³ C-NMR:	(CDCl ₃ , 75 MHz), δ [ppm] = 171.7, 170.0, 159.1, 157.4, 135.7, 128.7, 128.4, 128.3, 84.8, 67.0, 59.2, 55.5, 47.5, 37.8, 29.2, 27.8, 25.0, 24.7, 15.1, 11.0.
FT-IR:	ν [cm ⁻¹] = 2968, 2877, 1745, 1697, 1639, 1514, 1439, 1369, 1275, 1210, 1161, 842, 735, 698.

2-(((2*R*,3*S*)-1-((*S*)-2-((benzyloxy)carbonyl)pyrrolidin-1-yl)-3-methyl-1-oxopentan-2-yl)amino)-2-oxoessigsäure (RC59)



Methode: D

Ansatz: 435 mg, 1.12 mmol (1.0 Äq.) Benzyl-(2-(*tert*-butoxy)-2-oxoacetyl)-D - alloisoleucyl-(*S*)-prolin

540 mg, 5.60 mmol (5.0 Äq.) *ortho*-Phosphorsäure

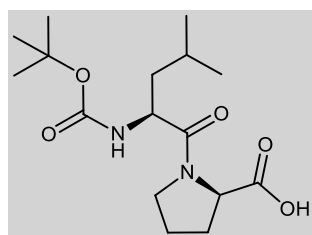
10 mL Toluol

Ausbeute: 374 mg, 0.96 mmol, 80 %, hellgelbes Öl

¹H-NMR: (CDCl₃, 300 MHz), δ [ppm] = 8.28 (d, J = 9.3 Hz, 1H, NH), 7.40–7.28 (m, 5H, C₆H₅), 5.24–5.07 (m, 2H, PhCH₂), 4.66–4.52 (m, 2H, Pro-α-CH, Ile-α-CH), 3.98–3.84 (m, 1H, Pro-δ-CH), 3.76–3.66 (m, 1H, Pro-δ'-CH), 2.33–2.13 (m, 1H, Pro-β-CH), 2.11–1.84 (m, 4H, Pro-β'-CH, Pro-γ-CH₂, Ile-β-CH), 1.68–1.47 (m, 1H, Ile-γ-CH), 1.21–1.06 (m, 1H, Ile-γ'-CH), 0.97 (d, J = 6.7 Hz, 3H, Ile-C(CH₃)(CH₂CH₃)), 0.87 (t, J = 7.4 Hz, 3H, Ile C(CH₃)(CH₂CH₃)).

¹³C-NMR: (CDCl₃, 75 MHz), δ [ppm] = 171.9, 169.7, 162.5, 159.0, 136.3, 128.8, 128.4, 128.2, 66.3, 59.1, 55.2, 47.5, 36.4, 29.1, 25.0, 24.6, 15.0, 11.0.

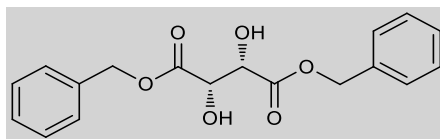
FT-IR: ν [cm⁻¹] = 3394, 3288, 2964, 2877, 1741, 1692, 1633, 1526, 1453, 1351, 1274, 1207, 1169, 910, 729, 697.

***N*-(*tert*-Butoxycarbonyl)-(*S*)-leucyl-(*R*)-prolin (RC82)**

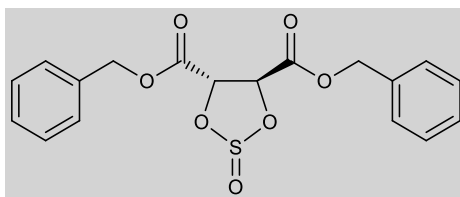
- Methode: C
- Ansatz: 560 mg, 1.34 mmol (1.0 Äq.) *N*-(*tert*-Butoxycarbonyl)-(*S*)-leucyl-(*R*)-prolinbenzylester
100 mg, Pd/C (10%)
6 mL Methanol
- Ausbeute: 422 mg, 1.29 mmol, 96 %, gelbes Öl**
- ¹H-NMR: (CDCl₃, 300 MHz), δ [ppm] = 4.64–4.43 (m, 2H, Pro-α-CH, Leu-α-CH), 3.96–3.81 (m, 1H, Pro-δ-CH₂), 3.52–3.41 (m, 1H, Pro-δ'-CH₂), 2.54–2.49 (m, 1H, Pro-β-CH₂), 2.15–1.87 (m, 4H, Pro-β-CH₂, Pro-γ-CH₂, Leu-β-CH₂), 1.73–1.66 (m, 1H, Leu-β-CH₂), 1.58–1.53 (m, 1H, Leu-γ-CH) (m, 9H, C(CH₃)₃), 0.98 (d, 3H, Leu-δ-CH₃, J = 6.6 Hz), 0.93 (d, 3H, Leu-δ'-CH₃, J = 6.7 Hz).
- ¹³C-NMR: (CDCl₃, 75 MHz), δ [ppm] = 174.13, 172.98, 155.73, 80.05, 60.00, 50.60, 47.42, 41.45, 39.21, 28.32, 28.26, 28.20, 28.16, 28.11, 28.04, 24.67, 22.24.
- FT-IR: ν [cm⁻¹] = 3305, 2957, 1704, 1635, 1515, 1450, 1391, 1366, 1248, 1161, 1045, 1021, 920, 871, 778.

Aziridin-2,3-dicarboxylate und ihre Vorstufen

(2*S*,3*S*)-Dibenzyltartrat (RC3)



Methode:	Ia
Ansatz:	30.0 g, 100 mmol (1.0 Äq.) (<i>S,S</i>)-Weinsäure; 27.0 g, 250 mmol (2.5 Äq.) Benzylalkohol; 1.75 g, 10 mmol p-Toluolsulfonsäure 100 mL abs. Dichlormethan
R _f -Wert:	0.33 (Petrolether/Ethylacetat [3:1])
Ausbeute:	<u>32.73 g, 99 mmol, 99 %, farbloser Feststoff</u>
Smp.:	61 °C, (Lit.: 62-64 °C) ¹⁷⁰
¹ H-NMR:	(CDCl ₃ , 300 MHz), δ [ppm] = 7.43-7.35 (m, 10H, 2 x C ₆ H ₅), 5.31 (t, 4H, 2 CH ₂), 4.61 (s, 2H, 2 x CH), 2.61 (s br., 2H, 2 OH).
¹³ C-NMR:	(CDCl ₃ , 75 MHz), δ [ppm] = 171.39, 134.77, 128.73, 128.44, 72.08, 68.13, 26.94.
FT-IR:	$\tilde{\nu}$ [cm ⁻¹] = 3452, 1736, 1450, 1405, 1262, 1192, 1131, 1082, 959, 730, 690.

(2*S*,3*S*)- Dibenzyl-1,3,2-dioxathiolan-2-oxo-4,5-dicarboxylat (RC4)

Methode: Ib

Ansatz: 32.7 g, 99 mmol (1.0 Äq.) (2*S*,3*S*)-Dibenzyltartrat

12.9 g, 109 mmol (1.1 Äq.) Thionylchlorid

0.14 g, 2 mmol (0.02 Äq.) abs. DMF

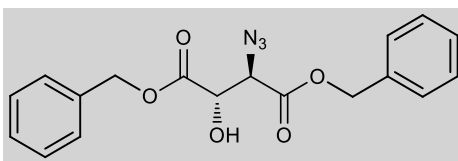
40 mL abs. Dichlormethan

R_F-Wert: 0.45 (Cyclohexan/Ethylacetat [3:1])

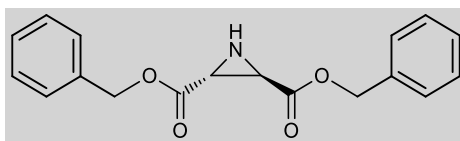
Ausbeute: 34.45 g, 91.5 mmol, 92 %, dunkelgelbe, hochviskose Flüssigkeit

¹H-NMR: (CDCl₃, 300 MHz), δ [ppm] = 7.38–7.27 (m, 10H, 2 x C₆H₅), 5.79 (d, 1H, CH, J = 3.56 Hz), 5.31 (s, 4H, CH₂Ph), 4.60 (d, 1H, CH, J = 7.19 Hz).

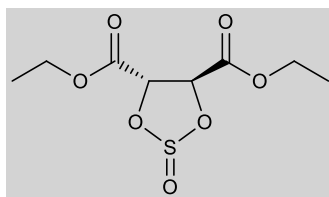
FT-IR: $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3495, 3027, 1742, 1661, 1496, 1451, 1382, 1257, 1209, 1054 (s, S=O), 1001, 960, 736, 695.

(2*S*,3*R*)-Dibenzyl-3-azido-2-hydroxysuccinat (RC5)

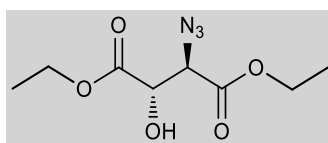
Methode:	Ic
Ansatz:	10.1 g, 26.8 mmol (1.0 Äq.) (2 <i>S</i> ,3 <i>S</i>)-Dibenzyl-1,3,2-dioxathiolan-2-oxo-4,5-dicarboxylat 3.5 g, 53.7 mmol (2.0 Äq.) Natriumazid 20 mL abs. DMF 40 mL Dichlormethan
R _F -Wert:	0.5 (Cyclohexan/Ethylacetat [3:1])
SC:	Petrolether/Ethylacetat [3:1]
Ausbeute:	2.66 g, 7.48 mmol, 28 %, farblose viskose Flüssigkeit
¹ H-NMR:	(CDCl ₃ , 300 MHz), δ [ppm] = 7.36-7.28 (m, 10H, 2 C ₆ H ₅), 5.01-5.14 (m, 4H, 2 x CH ₂), 4.69 (d, 1H, J = 2.6 Hz, CH), 4.37 (d, 1H, J = 2.6 Hz, CH), 3.33 (s, 1H, OH).
FT-IR:	$\tilde{\nu}$ [cm ⁻¹] = 3062, 2112, 1747, 1666, 1494, 1454, 1386, 1256, 1190, 1095, 737, 697, 659.

(2*R*,3*R*)-Dibenzylaziridin-2,3-dicarboxylat (RC6)

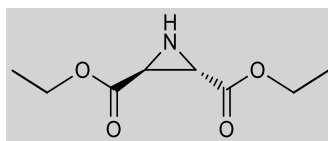
Methode:	Id
Ansatz:	1.67 g, 4.7 mmol (1.0 Äq.) (2 <i>S</i> ,3 <i>R</i>)-Dibenzyl-3-azido-2-hydroxysuccinat 2.22 g, 8.5 mmol (1.8 Äq.) Triphenylphosphan 30 mL abs. DMF
R _f -Wert:	0.3 (Cyclohexan/Ethylacetat [3:1])
SC:	Petrolether/Ethylacetat [3:1]
Ausbeute:	0.28 g, 0.89 mmol, 19 %, gelber kristalliner Feststoff
Smp.:	58 °C (Lit.: 59-60 °C) ¹⁵⁸
[α] ²⁴ :	-66.5 ° (c = 1.00; MeOH) (Lit.: [α] ²⁰ : -79.8 ° (c = 1.00; MeOH)) ¹⁵⁹
¹ H-NMR:	(CDCl ₃ , 300 MHz), δ [ppm] = 7.42-7.32 (m, 10H, 2 x C ₆ H ₅), 5.19 (m, 4H, 2 x CH ₂ Ph), 2.95 (s, 2H, Azi-CH), 1.83 (s, 1H, NH).
¹³ C-NMR:	(CDCl ₃ , 75 MHz), δ [ppm] = 35.93, 67.83, 68.56, 128.77, 134.90, 169.54.
FT-IR:	$\tilde{\nu}$ [cm ⁻¹] = 325, 2884, 2361, 1723, 1499, 1454, 1380, 1270, 1168, 963, 865, 743, 702.

(4*R*,5*R*)-Diethyl-1,3,2-dioxathiolan-2-oxo-4,5-dicarboxylat (RC95)

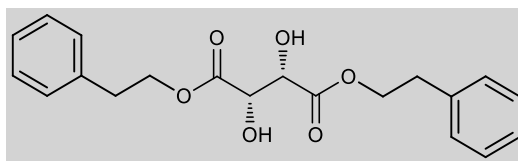
Methode:	Ib
Ansatz:	48.1 g, 0.23 mol (1.0 Äq.) (<i>R,R</i>)-Diethyltartrat 32.8 g, 8.5 mol (1.8 Äq.) Thionylchlorid 0.48 g, 6.50 mol, abs. DMF 150 mL Dichlormethan
R _f -Wert:	0.4 (Cyclohexan/Ethylacetat [2:1])
Ausbeute:	55.5 g, 0.22 mmol, 96 %, orangene viskose Flüssigkeit
¹ H-NMR:	(CDCl ₃ , 300 MHz), δ [ppm] = 5.65 (d, J = 3 Hz, 1H, CH), 5.19 (d, J = 3 Hz, 1H, CH), 4.26 (q, 6 Hz, 4H, 2 x CH ₂), 1.27 (t, 6 Hz, 6H, 2 x CH ₃).
¹³ C-NMR:	(CDCl ₃ , 75 MHz), δ [ppm] = 171.58, 166.45, 79.89, 79.27, 63.18, 63.16, 14.12, 14.01.
FT-IR:	$\tilde{\nu}$ [cm ⁻¹] = 2985, 1738, 1371, 1211, 1018, 994, 730.

(2*S*,3*R*)-Diethyl-3-azido-2-hydroxysuccinat (RC96)

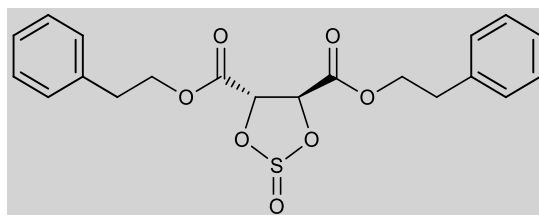
Methode:	Ic
Ansatz:	24.4 g, 96.7 mmol (1.0 Äq.) (4 <i>R</i> ,5 <i>R</i>)-Diethyl-1,3,2-dioxathiolan-2-oxo-4,5-dicarboxylat 12.5 g, 192.3 mmol (2.0 Äq.) Natriumazid 60 mL, abs. DMF 150 mL Dichlormethan
R _f -Wert:	0.3 (Cyclohexan/Ethylacetat [3:1])
Ausbeute:	16.8 g, 72.6 mmol, 75 %, hellgelbe viskose Flüssigkeit
¹ H-NMR:	(CDCl ₃ , 300 MHz), δ [ppm] = 4.56 (s, 1H, CH-N ₃), 4.25 (m, 4H, 2 x CH ₂ CH ₃), 3.22 (s, 1H, CH-OH), 1.25 (m, 6H, 2 x CH ₂ CH ₃).
¹³ C-NMR:	(CDCl ₃ , 75 MHz), δ [ppm] = 170.79, 166.96, 72.09, 64.47, 62.76, 62.39, 14.04.
FT-IR:	$\tilde{\nu}$ [cm ⁻¹] = 3478, 2984, 2114 (N ₃), 1733, 1446, 1371, 1196, 1108, 1025, 860.

Diethylaziridin-(2*S*,3*S*)-dicarboxylat (RC97)

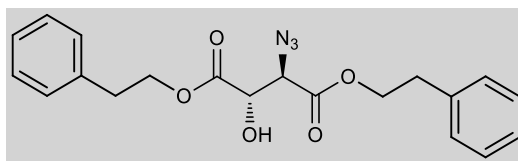
Methode:	Id
Ansatz:	16.8 g, 72.7 mmol (1.0 Äq.) (2 <i>S</i> ,3 <i>R</i>)-Diethyl-3-azido-2-hydroxysuccinat 20.8 g, 79.3 mmol (1.8 Äq.) Triphenylphosphan 80 mL abs. DMF
R _f -Wert:	0.35 (Cyclohexan/Ethylacetat [2:1])
SC:	Cyclohexan/Ethylacetat [5:1]
Ausbeute:	0.48 g, 17.4 mmol, 24 %, gelbe viskose Flüssigkeit
[α] ²⁰ :	113 ° (c = 1.00; CHCl ₃) (Lit.: 128 °, CHCl ₃) ¹⁴⁴
¹ H-NMR:	(CDCl ₃ , 300 MHz), δ [ppm] = 4.25 (m, 4H, 2 x CH ₂), 2.89 (s, 2H, Azi-CH), 1.78 (s, 1H, NH), 1.32 (t, 6H, 2 x CH ₃).
¹³ C-NMR:	(CDCl ₃ , 75 MHz), δ [ppm] = 169.71, 62.00, 35.75, 14.10.
FT-IR:	$\tilde{\nu}$ [cm ⁻¹] = 3276, 2982, 1725, 1371, 1336, 1180, 1030, 857, 746, 697.

(2S,3S)-Diphenethyl-2,3-dihydroxisuccinat (RC61)

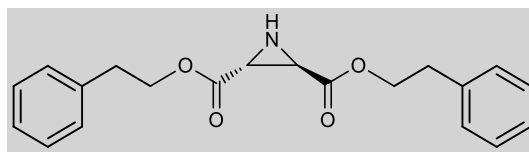
Methode:	Ia
Ansatz:	15.00 g, 100 mmol (1.0 Äq.) (2S, 3S)-Weinsäure 30.50 g, 250 mmol (2.5 Äq.) 2-Phenylethanol 1.72 g, 10 mmol (0.1 Äq.) p-Toluolsulfonsäure 100 mL Toluol
R _f -Wert:	0.3 (Petrolether/Ethylacetat [3:1])
Ausbeute:	<u>16.98 g, 47.4 mmol, 47 %, farbloser kristalliner Feststoff</u>
¹ H-NMR:	(CDCl ₃ , 300 MHz), δ [ppm] = 7.38-7.21 (m, 10 H, 2 x C ₆ H ₅), 4.54-4.39 (m, 4H, 2 x CH ₂), 3.14 (s, 2H, 2 x CH), 2.99 (t, J = 7.0 Hz, 4H, 2 x CH ₂).
¹³ C-NMR:	(CDCl ₃ , 75 MHz), δ [ppm] = 171.45, 137.15, 128.89, 128.67, 126.83, 71.97, 66.76, 34.98, 26.95.
FT-IR:	$\tilde{\nu}$ [cm ⁻¹] = 3647, 3029, 2860, 2688, 2512, 2358, 2331, 2155, 2038, 2023, 1958, 1735, 1496, 1239, 1188, 1120, 1080, 979, 900, 822, 741, 696, 667.

(2*S*,3*R*)-Diphenethyl-1,3,2-dioxathiolan-2-oxo-4,5-dicarboxylat (RC63)

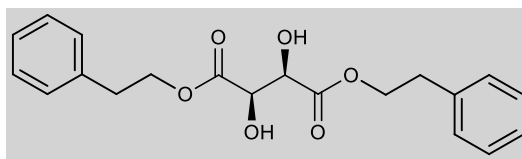
Methode:	Ib
Ansatz:	6.00 g, 16.8 mmol (1.0 Äq.) (2 <i>S</i> ,3 <i>S</i>)-Diphenethyl-2,3-dihydroxisuccinat 2.19 g, 18.4 mmol (1.1 Äq.) Thionylchlorid 0.0245 g, 0.335 mmol (0.02 Äq.) abs. DMF 30 mL Dichlormethan
R _f -Wert:	0.6 (Petrolether/Ethylacetat [3:1])
Ausbeute:	4.53 g, 14.9 mmol, 89 %, gelbe viskose Flüssigkeit
¹ H-NMR:	(CDCl ₃ , 300 MHz), δ [ppm] = 7.30-7.14 (m, 10H, 2 x C ₆ H ₅), 4.60-4.40 (m, 6H, 2 x CH ₂ Ph, 2 x CH), 3.02 (t, J = 7.0 Hz, 4H, 2 x OCH ₂ CH ₂).
¹³ C-NMR:	(CDCl ₃ , 75 MHz), δ [ppm] = 173.36, 138.23, 127.73, 127.61, 126.69, 70.93, 68.95, 36.76, 28.93.
FT-IR:	$\tilde{\nu}$ [cm ⁻¹] = 2957, 1732, 1495, 1454, 1401, 1305, 1274, 1238, 1190, 1120, 1080, 1049, 1026, 978, 900, 820, 741, 696.

(2*S*,3*R*)-Diphenethyl-2-azido-3-hydroxysuccinat (RC64)

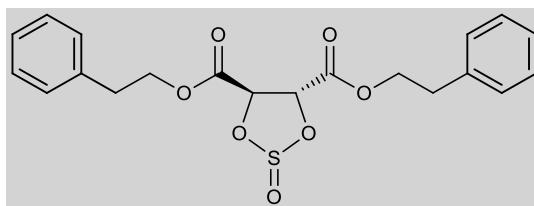
Methode:	Ic
Ansatz:	3.20 g, 8 mmol (1.0 Äq.) (4 <i>S</i> , 5 <i>S</i>)-Diphenethyl-1,3,2-dioxathiolan-2-oxo-4,5-dicarboxylat 1.04 g, 16 mmol (2.0 Äq.) Natriumazid 20 mL abs. DMF
R _f -Wert:	0.5 (Petrolether/Ethylacetat [3:1])
Ausbeute:	2.01 g, 5.25 mmol, 66 %, brauner Feststoff
¹ H-NMR:	(CDCl ₃ , 300 MHz), δ [ppm] = 7.35-7.17 (m, 10H, 2 x C ₆ H ₅), 4.68-4.66 (m, 2H, 2 x CH ₂), 4.38 (q, J = 7.3 Hz, 4H, 2 x CH ₂), 3.04-2.87 (m, 4H, 2 x CH ₂).
¹³ C-NMR:	(CDCl ₃ , 75 MHz), δ [ppm] = 170.4, 169.6, 136.1, 135.9, 133.8, 133.7, 127.7, 127.6, 125.8, 125.7, 71.0, 65.8, 65.7, 63.4, 33.9, 33.7.
FT-IR:	$\tilde{\nu}$ [cm ⁻¹] = 3489, 3063, 3029, 2958, 2116, 1734, 1603, 1496, 1454, 1402, 1305, 1274, 1237, 1123, 1049, 1029, 1003, 978, 901, 820, 742, 697.

(2*R*,3*R*)-Diphenylethyl-aziridin-2,3-dicarboxylat (RC65)

Methode:	Id
Ansatz:	1.00 g, 2.6 mmol (1.0 Äq.) (2 <i>S</i> ,3 <i>R</i>)-Diphenethyl-2-azido-3-hydroxysuccinat 1.30 g, 4.8 mmol (2.0 Äq.) Triphenylphosphin 20 mL abs. DMF
R _f -Wert:	0.2 (Petrolether/Ethylacetat [5:1])
Ausbeute:	72 mg, 0.2 mmol, 8 %, hellgelber Feststoff
[α] ²⁰ :	85° (c = 9.9 mg/mL; EtOAc)
¹ H-NMR:	(CDCl ₃ , 300 MHz), δ [ppm] = 7.72 - 6.92 (m, 10H, 2 x C ₆ H ₅), 4.49- 4.35 (m, 4H, 2 x CH ₂), 3.00 (t, J = 7.0 Hz, 4H, 2 x CH ₂), 2.93 - 2.77 (s, 2H, Azi-CH), 1.98 (br. s, 1H, NH).
¹³ C-NMR:	(CDCl ₃ , 75 MHz), δ [ppm] = 168.5, 137.2, 128.9, 128.7, 126.8, 66.3, 35.8, 35.0.
FT-IR:	$\tilde{\nu}$ [cm ⁻¹] = 2968, 1743, 1726, 1634, 1498, 1455, 1389, 1277, 1173, 1085, 1049, 1011, 952, 880, 744, 696.

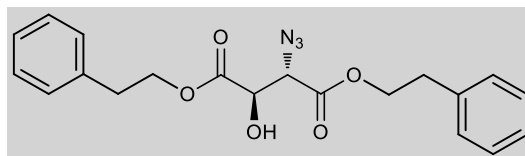
(2*R*,3*R*)-Diphenethyl-2,3-dihydroxysuccinat (RC89)

Methode:	Ia
Ansatz:	15.00 g, 100 mmol (1.0 Äq.) (2 <i>R</i> ,3 <i>R</i>)-Weinsäure 30.50 g, 250 mmol (2.5 Äq.) 2-Phenylethanol 1.72 g, 10 mmol (0.1 Äq.) p-Toluolsulfonsäure 100 mL Toluol
R _f -Wert:	0.3 (Petrolether/Ethylacetat [3:1])
Ausbeute:	14.57 g, 47.4 mmol, 41 %, farbloser kristalliner Feststoff
¹ H-NMR:	(CDCl ₃ , 300 MHz), δ [ppm] = 7.38-7.21 (m, 10 H, 2 x C ₆ H ₅), 4.54- 4.39 (m, 4H, 2 x CH ₂), 3.14 (br. s, 2H, 2 x CH), 2.99 (t, J = 7.0 Hz, 4H, 2x CH ₂ -8,8')
¹³ C-NMR:	(CDCl ₃ , 75 MHz), δ [ppm] = =171.5, 137.2, 128.9, 128.7, 126.8, 72.0, 66.7, 35.0.
FT-IR:	$\tilde{\nu}$ [cm ⁻¹] = 3493, 3064, 3030, 2959, 1731, 1602, 1495, 1461, 1454, 1327, 1239, 1190, 1120, 1081, 1050, 1031, 1004, 978, 908, 788, 741, 697.

(4*R*,5*R*)-Diphenethyl-1,3,2-dioxathiolan-2-oxo-4,5-dicarboxylat (RC90)

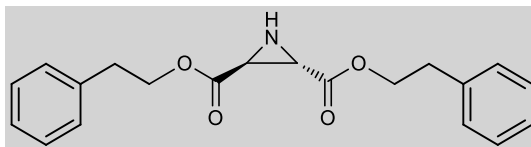
Methode:	Ib
Ansatz:	7.50 g, 21 mmol (1.0 Äq.) (2 <i>R</i> , 3 <i>R</i>)-Diphenethyl-2,3-dihydroxisuccinat (RC89) 2.74 g, 23 mmol (1.1 Äq.) Thionylchlorid 0.031 g, 0.419 mmol (0.02 Äq.) abs. DMF 40 mL Dichlormethan
R _f -Wert:	0.6 (Petrolether/Ethylacetat [3:1])
Ausbeute:	5.83 g, 19 mmol, 91 %, gelbe viskose Flüssigkeit
¹ H-NMR:	(CDCl ₃ , 300 MHz), δ [ppm] = 7.33- 7.16 (m, 10H, 2 x C ₆ H ₅), 4.61- 4.40 (m, 6H, 2 x CH ₂ Ph, 2 x CH), 3.04 (t, J = 7.0 Hz, 4H, 2 x OCH ₂ CH ₂).
¹³ C-NMR:	(CDCl ₃ , 75 MHz), δ [ppm] = 171.42, 137.14, 127.83, 128.61, 126.79, 71.95, 66.73, 34.89, 26.93.
FT-IR:	$\tilde{\nu}$ [cm ⁻¹] = 3491, 3063, 3037, 2959, 2876, 1730, 1603, 1495, 1461, 1450, 1326, 1239, 1190, 1120, 1100, 1081, 1050, 1003, 976, 908, 789, 740, 695.

(2*R*,3*S*)-Diphenethyl-2-azido-3-hydroxysuccinat (RC91)



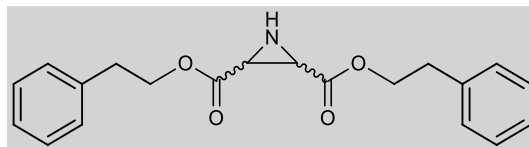
Methode:	Ic
Ansatz:	4.04 g, 10.1 mmol (1.0 Äq.) (4 <i>S</i> ,5 <i>S</i>)-Diphenethyl-1,3,2-dioxathiolan-2-oxo-4,5-dicarboxylat 1.31 g, 20.2 mmol (2.0 Äq.) Natriumazid 20 mL abs. DMF
R _F -Wert:	0.5 (Petrolether/Ethylacetat [3:1])
Ausbeute:	2.61 g, 6.81 mmol, 67 %, brauner Feststoff
¹ H-NMR:	(CDCl ₃ , 300 MHz), δ [ppm] = 7.35-7.17 (m, 10H, 2 x C ₆ H ₅), 4.68-4.66 (m, 2H, 2 x CH ₂), 4.38 (q, J = 7.3 Hz, 4H, 2 x CH ₂), 3.04-2.87 (m, 4H, 2 x CH ₂).
¹³ C-NMR:	(CDCl ₃ , 75 MHz), δ [ppm] = 170.4, 169.6, 136.1, 135.9, 133.8, 133.7, 127.7, 127.6, 125.8, 125.7, 71.0, 65.8, 65.7, 63.4, 33.9, 33.7.
FT-IR:	$\tilde{\nu}$ [cm ⁻¹] = 3489, 3063, 3029, 2958, 2116, 1734, 1603, 1496, 1454, 1402, 1305, 1274, 1237, 1123, 1049, 1029, 1003, 978, 901, 820, 742, 697.

(2*S*,3*S*)-Diphenylethyl-aziridin-2,3-dicarboxylat (RC92)



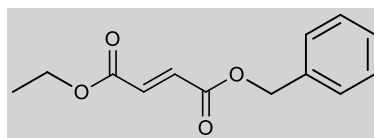
Methode:	Id
Ansatz:	0.50 g, 1.4 mmol (1.0 Äq.) (2 <i>R</i> ,3 <i>S</i>)-Diphenethyl-2-azido-3-hydroxysuccinat (RC91) 0.65 g, 2.4 mmol (1.8 Äq.) Triphenylphosphin 20 mL abs. DMF
R _f -Wert:	0.2 (Petrolether/Ethylacetat [5:1])
Ausbeute:	<u>159 mg, 0.47 mmol, 34 %, hellgelbes Öl</u>
[α] ²⁰ :	-71 ° (c = 9.9 mg/mL; EtOAc)
¹ H-NMR:	(CDCl ₃ , 300 MHz), δ [ppm] = 7.72-6.92 (m, 10H, 2 x C ₆ H ₅), 4.49- 4.35 (m, 4H, 2 x CH ₂), 3.01 (t, J = 7.0 Hz, 4H, 2 x CH ₂), 2.93 - 2.77 (br. s, 2H, CH), 1.982 (br. s, 1H, NH).
¹³ C-NMR:	(CDCl ₃ , 75 MHz), δ [p.p.m] = 168.5, 137.2, 128.9, 128.7, 126.8, 66.3, 35.8, 35.0.
FT-IR:	$\tilde{\nu}$ [cm ⁻¹] = 2968, 1743, 1726, 1634, 1498, 1455, 1389, 1277, 1173, 1085, 1049, 1011, 952, 880, 744, 696.

(2*S*,3*S*)+(2*R*,3*R*)-Bis(2-phenylethyl)-aziridin-2,3-dicarboxylat (RC14)



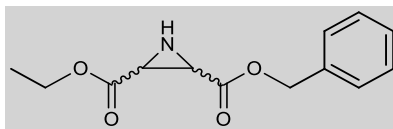
Methode:	J
Ansatz:	1.31 g, 4.05 mmol (1.0 Äq.) Bis(2-phenylethyl)-(2E)-but-2-endioat 0.98 g, 4.86 mmol (1.2 Äq.) (S, S)-Diphenylsulfimin 15 mL Toluol
SC:	Cyclohexan/Ethylacetat [9:1]
R _F -Wert:	0.39 (Cyclohexan/Ethylacetat [3:1])
Ausbeute:	0.46 g, 1.36 mmol, 33 %, farbloser Feststoff
[α] ²⁰ :	49 ° (c = 6.3 mg/mL; EtOAc)
Smp.:	88 °C
¹ H-NMR:	(CDCl ₃ , 300 MHz), δ [ppm] = 7.40-7.10 (m, 10H, 2 x C ₆ H ₅), 4.52-4.22 (m, 4H, 2 x CO ₂ CH ₂), 2.98 (t, 4H, 2 x CO ₂ CH ₂ CH ₂ , J = 7.1 Hz), 2.81 (s, 2H, 2 x Azi-CH), 1.73 (s, 1H, NH).
¹³ C-NMR:	(CDCl ₃ , 75 MHz), δ [ppm] = 169.48, 137.28, 129.03, 128.75, 126.92, 66.43, 36.06, 35.04.
FT-IR:	$\tilde{\nu}$ [cm ⁻¹] = 3182, 1732, 1450, 1388, 1343, 1270, 1229, 1172, 1004, 955, 869, 747, 706.

1-Benzyl-4-ethyl-(2E)-but-2-endioat (RC67)



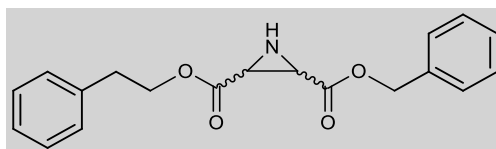
Methode:	A2
Ansatz:	2.50 g, 17.3 mmol (1.0 Äq.) Fumarsäuremonoethylester 1.78 g, 17.3 mmol (1.0 Äq.) Benzylalkohol 3.93 g, 19 mmol (1.1 Äq.) DCC 0.21 g, 1.73 mmol (0.1 Äq.) DMAP 100 mL Dichlormethan
SC:	Petrolether/Ethylacetat [9:1]
R _F -Wert:	0.8 (Petrolether/Ethylacetat [4:1])
Ausbeute:	1.24 g, 5.3 mmol, 31 %, farblose Flüssigkeit
¹ H-NMR:	(CDCl ₃ , 300 MHz), δ [ppm] = 7.46-7.30 (m, 5H, C ₆ H ₅), 6.89 (s, 2H, CH=CH), 5.23 (s, 2H, CO ₂ CH ₂ Ph), 4.25 (q, 2H, CO ₂ CH ₂ CH ₃ , J = 7.1 Hz), 1.31 (t, 3H, CO ₂ CH ₂ CH ₃ , J = 7.1 Hz).
¹³ C-NMR:	(CDCl ₃ , 75 MHz), δ [ppm] = 164.90, 164.82, 135.29, 134.16, 133.31, 128.69, 128.56, 128.39, 67.10, 61.41, 14.14.
FT-IR:	$\tilde{\nu}$ [cm ⁻¹] = 3064, 3035, 2978, 1711, 1642, 1454, 1368, 1290, 1254, 1147, 1033, 976, 690.

(2*S*,3*S*)+(2*R*,3*R*)-2-Benzyl-3-ethyl-aziridin-2,3-dicarboxylat (RC68)



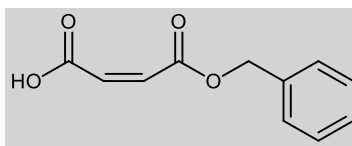
Methode:	J
Ansatz:	900 mg, 3.84 mmol (1.0 Äq.) 1-Benzyl-4-ethyl-(2 <i>E</i>)-but-2-endioat 1.02 g, 4.65 mmol (1.2 Äq.) (<i>S,S</i>)-Diphenylsulfimin 20 mL Toluol
SC:	Petrolether/Ethylacetat [7:1]
R _F -Wert:	0.16 (Petrolether/Ethylacetat [4:1])
Ausbeute:	212 mg, 850 μmol, 22 %, farbloser Feststoff
Smp.:	55 °C (Lit. 52 °C) ¹¹²
¹ H-NMR:	(CDCl ₃ , 300 MHz), δ [ppm] = 7.40-7.10 (m, 5H, C ₆ H ₅), 5.18 (m, 2H, Ar-CH ₂) 4.25 (m, 2H, CH ₂ CH ₃), 2.85 (s, 2H, 2 x Azi-CH), 1.73 (s, 1H, NH), 1.32 (t, 6H, CH ₃).
FT-IR:	$\tilde{\nu}$ [cm ⁻¹] = 3146, 2972, 1726, 1742, 1454, 1375, 1345, 1274, 1181, 1191, 1029, 990, 955, 913, 867, 836, 750, 701.

(2*S*,3*S*)+(2*R*,3*R*)-2-Benzyl-3-(2-phenylethyl)-aziridin-2,3-dicarboxylat (RC66)



Methode:	J
Ansatz:	1.17 g, 3.77 mmol (1.0 Äq.) 1-Benzyl-4-phenylethyl-(2 <i>E</i>)-but-2-endioat 1.00 g, 4.56 mmol (1.2 Äq.) (<i>S,S</i>)-Diphenylsulfimin 25 mL Toluol
SC:	Petrolether/Ethylacetat [9:1]
R _f -Wert:	0.4 (Petrolether/Ethylacetat [2:1])
Ausbeute:	405 mg, 1.24 mmol, 33 %, farblose, viskose Flüssigkeit
¹ H-NMR:	(CDCl ₃ , 300 MHz), δ [ppm] = 7.25-7.09 (m, 10H, 2 x C ₆ H ₅), 5.16-5.00 (m, 2H, CO ₂ CH ₂ Ph), 4.36-4.17 (m, 2H, CO ₂ CH ₂ CH ₂), 2.91-2.82 (m, 2H, CO ₂ CH ₂ CH ₂), 2.80-2.67 (m, 2H, 2 x Azi-CH), 1.71 (s, 1H, NH).
¹³ C-NMR:	(CDCl ₃ , 75 MHz), δ [ppm] = 169.63, 137.08, 134.78, 128.81, 128.62, 128.53, 128.48, 128.45, 126.71, 67.66, 66.21, 35.69 (Azi-CH), 34.73.
FT-IR:	$\tilde{\nu}$ [cm ⁻¹] = 3275, 3023, 1729, 1499, 1452, 1384, 1330, 1254, 1176, 1080, 996, 855, 744, 699.

Racemisches *cis*-konfiguriertes Aziridin-2,3-dicarboxylat

4-Benzyloxy-4-oxo-(2Z)-but-2-ensäure (RC53)

Ansatz: 24.5 g, 250 mmol (1.0 Äq.) Maleinsäureanhydrid

27.0 g, 250 mmol (1.0 Äq.) Benzylalkohol

27.8 g, 216 mmol (1.1 Äq.) Triethylamin

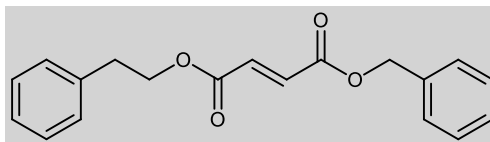
Ausbeute: 34.1 g, 165 mmol, 66 %, farbloser Feststoff

¹H-NMR: (CDCl₃, 300 MHz), δ [ppm] = 7.30-7.24 (m, 5H, C₆H₅), 6.34 (d, 1H, CH, J = 12.5 Hz), 6.37 (d, 1H, CH, J = 12.5 Hz), 5.16 (s, 2H, CO₂CH₂Ph).

¹³C-NMR: (CDCl₃, 75 MHz), δ [ppm] = 208.47, 167.71, 166.89, 166.50, 165.11, 135.15, 134.28, 133.95, 130.09, 129.90, 128.94, 128.80, 128.78, 128.63, 128.59, 128.52, 127.14, 68.37, 67.21.

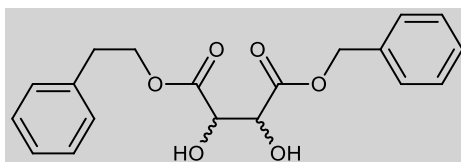
FT-IR: $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3062, 2962, 1723, 1695, 1648, 1454, 1419, 1372, 1251, 1190, 1157, 998, 961, 916, 824, 812, 749, 733, 695, 675.

1-Benzyl-4-(2-phenylethyl)-(2Z)-but-2-endioat (RC77)



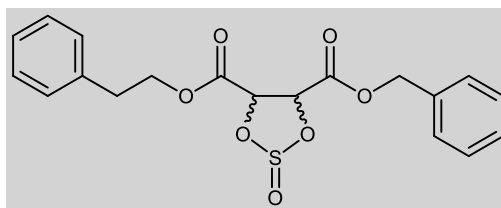
Methode:	A2
Ansatz:	33.75 g, 164 mmol (1.0 Äq.) 4-Benzyloxy-4-oxo-(2Z)-but-2-ensäure 19.00 g, 155 mmol (0.95 Äq.) 2-Phenylethanol 33.75 g, 164 mmol (1.0 Äq.) DCC 2.00 g, 16.4 mmol (0.1 Äq.) DMAP 125 mL Dichlormethan
SC:	Petrolether/Ethylacetat [9:1]
R _F -Wert:	0.4 (Petrolether/Ethylacetat [2:1])
Ausbeute:	<u>17.26 g, 55.6 mmol, 34 %, farbloses Öl</u>
¹ H-NMR:	(CDCl ₃ , 300 MHz), δ [ppm] = 7.45-7.17 (m, 10H, 2 x C ₆ H ₅), 6.30, 6.28 (je d, 2 H, CH=CH, J = 9.7 Hz), 5.23 (s, 2H, CO ₂ CH ₂ Ph), 4.36 (t, 2H, CO ₂ CH ₂ CH ₂ , J = 7.2 Hz), 2.97 (t, 2H, CO ₂ CH ₂ CH ₂ , J = 7.2 Hz).
¹³ C-NMR:	(CDCl ₃ , 75 MHz), δ [ppm] = 165.17, 164.96, 137.49, 135.22, 130.36, 129.38, 128.92, 128.63, 128.56, 128.51, 126.65, 67.14, 65.69, 34.79.
FT-IR:	$\tilde{\nu}$ [cm ⁻¹] = 3029, 1723, 1647, 1497, 1454, 1403, 1366, 1252, 1212, 1195, 1156, 998, 961, 914, 812, 749, 696.

(2S,3R)+(2R,3S)-1-Benzyl-4-(2-phenylethyl)-tartrat (RC78)



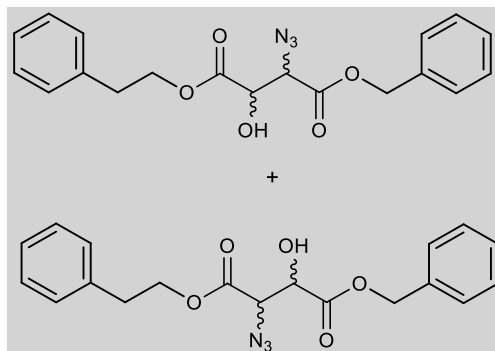
- Ansatz: 9.00 g, 29 mmol (1.0 Äq.) 1-Benzyl-4-(2-phenylethyl)-(2Z)-but-2-endioat (RC77)
 22 mg, 60 μ mol (0.2 mol %) Kaliumosmat(VI)dihydrat
 7.50 g, 32 mmol (1.1 Äq.) NMO (50 % in H₂O)
 4.60 g, 24 mmol (0.75 Äq.) Zitronensäure
 30 mL Wasser/*tert*-Butanol (1:1)
- R_f-Wert: 0.25 (Petrolether/Ethylacetat [2:1])
- Ausbeute: 9.98 g, 29 mmol, 99 %, farbloser Feststoff**
- ¹H-NMR: (CDCl₃, 300 MHz), δ [ppm] = 7.30-7.08 (m, 10H, 2 x C₆H₅), 5.12-4.97 (m, 2H, CO₂CH₂Ph), 4.52-4.45 (m, 2H, 2 x CHOH), 4.16 (t, 2H, CO₂CH₂CH₂, J = 7.2 Hz), 3.39 (s, 2H, 2 x CHOH), 2.71 (t, 2H, CO₂CH₂CH₂, J = 7.2 Hz)
- ¹³C-NMR: (CDCl₃, 75 MHz), δ [ppm] = 208.13, 170.92, 170.87, 136.94, 134.55, 128.78, 128.68, 128.61, 126.80, 72.95, 68.14, 66.46, 34.69.
- FT-IR: $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3355, 1737, 1700, 1455, 1269, 1241, 1210, 1190, 1122, 1103, 1031, 999, 961, 897, 764, 732, 694.

(4S,5R)+(4R,5S)-4-Benzyl-5-(2-phenylethyl)-1,3,2-dioxathiolan-

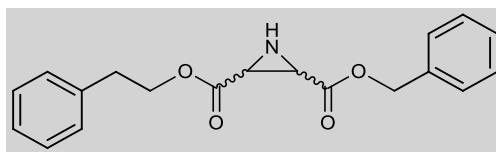
2-oxo-4,5-dicarboxylat (RC79)

Methode:	Ib
Ansatz:	8.00 g, 23 mmol (1.0 Äq.) (2S,3R)+(2R,3S)-1-Benzyl-4-(2-phenylethyl)-tartrat (RC78) 3.04 g, 26 mmol (1.2 Äq.) Thionylchlorid 45.57 mg, 0.048 mL, (2.7 mol %) DMF 25 mL Dichlormethan
R _f -Wert:	0.7 (Cyclohexan/Ethylacetat [2:1])
Ausbeute:	8.06 g, 21 mmol, 91 %, braunes Öl
¹ H-NMR:	(CDCl ₃ , 300 MHz), δ [ppm] = 7.49-7.10 (m, 10H, 2 x C ₆ H ₅), 5.10-5.26 (je d, 2H, 2 x Thio-CH, J = 7.1 Hz), 4.56-4.64 (je d, 2H, CO ₂ CH ₂ Ph, J = 12.0 Hz), 4.23-4.36 (je t, 2H, CO ₂ CH ₂ CH ₂ , J = 7.2 Hz), 2.79-2.91 (t, 2 H, CO ₂ CH ₂ CH ₂ , J = 7.1 Hz).
¹³ C-NMR:	(CDCl ₃ , 75 MHz), δ [ppm] = 208.88, 208.53, 170.92, 128.78, 128.68, 128.61, 126.80, 72.95, 68.15.
FT-IR:	$\tilde{\nu}$ [cm ⁻¹] = 3355, 1747, 1737, 1497, 1455, 1269, 1240, 1210, 1190, 1120, 1103, 999, 960, 920, 764, 732, 694.

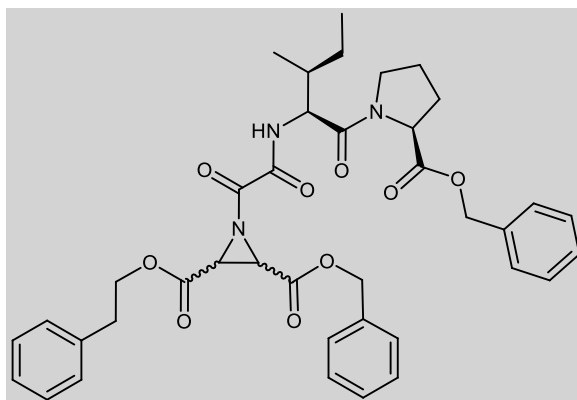
(2S,3S)+(2R,3R)-1-Benzyl-4-(2-phenylethyl)-3-azido-2-hydroxysuccinat und

(2*S*,3*S*)+(2*R*,3*R*)-4-Benzyl-1-(2-phenylethyl)-3-azido-2-hydroxysuccinat (RC80)

- Methode: Ic
- Ansatz: 2.80 g, 7 mmol (1.0 Äq.) (4*S*,5*R*)+(4*R*,5*S*)-4-Benzyl-5-(2-phenylethyl)-1,3,2-dioxathiolan-2-oxo-4,5-dicarboxylat (RC79)
0.92 g, 14 mmol (2.0 Äq.) Natriumazid
10 ml DMF_{abs}
- R_f-Wert: 0.3 (Cyclohexan/Ethylacetat [2:1])
- Ausbeute: 1.97 g, 5 mmol, 71 %, braunes Öl**
- ¹H-NMR: (CDCl₃, 300 MHz), δ [ppm] = 7.62-7.47 (m, 10H, 2 x C₆H₅), 5.44-5.75 (m, 2H, CO₂CH₂Ph), 4.63-4.79 (m, 2H, CH-OH, CH-N₃), 4.36-4.62 (m, 2H, COCH₂CH₂), 3.05-3.49 (m, 3H, CO₂CH₂CH₂, CH-OH).
- ¹³C-NMR: (CDCl₃, 75 MHz), δ [ppm] = 166.12, 163.12, 135.22, 130.34, 130.31, 127.23, 127.21, 126.98, 126.97, 71.87, 71.77, 68.24, 68.21, 66.98, 66.97, 62.87, 34.23.
- FT-IR: $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3463, 3030, 2120, 1792, 1736, 1497, 1454, 1173, 1188, 1105, 1047, 1029, 909, 747, 696.

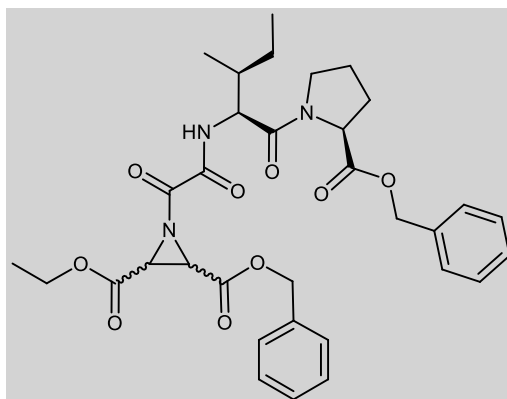
(2*S*,3*R*+2*R*,3*S*)-2-Benzyl-3-(2-phenylethyl)-aziridin-2,3-dicarboxylat (RC81)

- Methode: Id
- Ansatz: 1.8 g, 4.9 mmol (1.0 Äq.) (2*S*,3*S*) + (2*R*,3*R*)-1-Benzyl-4-(2-phenylethyl)-3-azido-2-hydroxysuccinat und (2*S*,3*S*) + (2*R*,3*R*)-4-Benzyl-1-(2-phenylethyl)-3-azido-2-hydroxysuccinat (RC 80)
- 1.4 g, 5.4 mmol (1.1 Äq.) Triphenylphosphin
- 50 mL abs. Dimethylformamid
- SC: Cyclohexan/Ethylacetat [5:1]
- R_f-Wert: 0.6 (Cyclohexan/Ethylacetat [3:1])
- Ausbeute:** **22.0 mg, 68 µmol, 1.4 %, gelbes Öl**
- ESI-MS: ber. f. C₁₉H₁₉NO₄, 325.17; gef.: 326.18 [M+H]⁺;
- ¹H-NMR: (CDCl₃, 300 MHz), δ [ppm] = 7.53-7.11 (m, 10H, 2 x C₆H₅), 7.25-7.09 (m, 5.34-5.11 (m, 2H, CO₂CH₂Ph), 4.55-4.18 (m, 2 H, CH₂Ph), 3.12-2.83 (m, 4H, 2 x Azi-CH, CO₂CH₂CH₂), 1.65 (s, 1H, NH).
- ¹³C-NMR: (CDCl₃, 75 MHz) = 171.22, 169.73, 135.34, 135.23, 135.37, 134.97, 128.83, 128.64, 128.54, 126.83, 126.55, 67.01, 65.43, 35.12, 33.93.

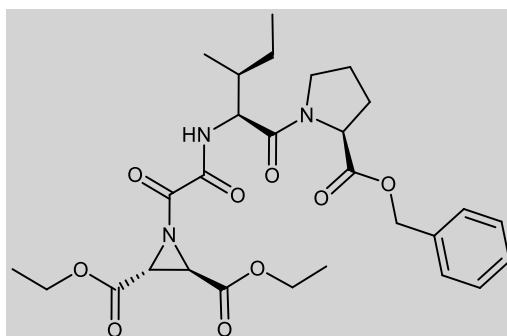
Aziridin-2,3-dicarboxylat-basierte Inhibitoren**(S)-Pro-OBn-(S)-Ile-CO-CO-(2S,3S)+(2R,3R)-2-Benzyl-3-(2-phenylethyl)-aziridin-2,3-dicarboxylat (RC69)**

- Methode: G
- Ansatz: 73 mg, 0.22 mmol (1.0 Äq.) (2S,3S)+(2R,3R)-2-Benzyl-3-(2-phenylethyl)-aziridin-2,3-dicarboxylat (RC66)
- 105 mg, 0.27 mmol (1.2 Äq.) 2-(((2R,3S)-1-((S)-2-((Benzyloxy)carbonyl)pyrrolidin-1-yl)-3-methyl-1-oxo-pentan-2-yl)amino)-2-oxoessigsäure (RC59)
- 418 mg, 0.66 mol (3.0 Äq.) PPA (50% in Ethylacetat)
- 15 mL Ethylacetat
- R_f-Wert: 0.2 (Cyclohexan/Ethylacetat [2:1])
- SC: Cyclohexan/Ethylacetat [7:1]
- Ausbeute:** **84 mg, 0.12 mmol, 55 %, dunkelgelbes Öl**
- ESI-MS: ber. f. C₃₉H₄₃N₃O₉, 697.30; gef. 698.31 [M+H]⁺;
Reinheit 78 % (Diastereomer 1 (35 %): R_t=1.8 Min.; Diastereomer 2 (43 %): R_t=2.3 Min.; Isokratisch 30/70 (H₂O/ACN), 254 nm)
- ¹H-NMR: (CDCl₃, 300 MHz), δ [ppm] = 7.38-7.23 (m, 10H, 2 x C₆H₅), 5.02-5.20 (m, 2H, CO₂CH₂Ph), 4.55-4.35 (m, 2H, Pro-α-CH, Isoleu-α-CH), 4.23-4.11 (m, 2H, CO₂CH₂CH₂Ph), 3.28-3.73 (m, 4H, 2 x Azi-CH, Pro-δ-CH₂), 2.83-2.77 (m, 2H, COCH₂CH₂Ph), 2.32-1.77 (m, 4H, Pro-β-CH₂, Pro-γ-CH₂), 1.58-1.54 (m, 1H, Isoleu-β-CH), 1.31-1.23 (m, 2H, Isoleu-γ-CH₂), 1.09-0.88 (m, 1H, Isoleu-γ-CH₂), 0.89-0.76 (m, 6H, 2 x Isoleu-CH₃).
- ¹³C-NMR: (CDCl₃, 75 MHz), δ [ppm] = 171.5, 168.5, 166.3, 166.2, 157.2, 137.0, 135.6, 128.5, 128.5, 128.3, 128.2, 126.5, 66.9, 66.8, 59.4, 59.1, 54.9, 47.2, 42.9, 37.9, 37.8, 33.7, 29.0, 24.3, 24.0, 15.2, 14.5, 10.3, 9.9.

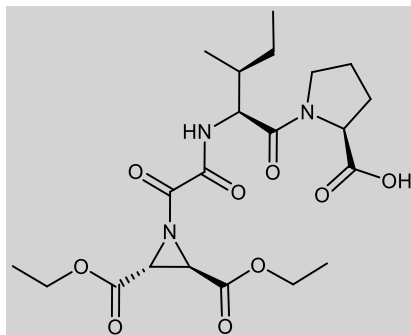
Aufgrund der geringen Substanzmenge konnte kein Drehwert und IR-Spektrum gemessen werden.

(S)-Pro-OBn-(S)-Ile-CO-CO-(2S,3S)+(2R,3R)-2-Benzyl-3-ethyl-aziridin-2,3-dicarboxylat (RC71)

- Methode: G
- Ansatz: 225 mg, 580 μmol (1.0 Äq.) (2S,3S)+(2R,3R)-2-Benzyl-3-ethyl-aziridin-2,3-dicarboxylat (RC68)
 120 mg, 480 μmol (1.2 Äq.) 2-(((2R,3S)-1-((S)-2-((Benzyloxy)-carbonyl)pyrrolidin-1-yl)-3-methyl-1-oxopentan-2-yl)amino)-2-oxoessigsäure (RC59)
 916 mg, 1.44 mmol (3.0 Äq.) PPA (50% in Ethylacetat)
 10 mL Ethylacetat
- R_f-Wert: 0.2 (Cyclohexan/Ethylacetat [3:1])
- SC: Petrolether/Ethylacetat [5:1]
- Ausbeute: 215 mg, 346 μmol , 60 %, farbloses Öl**
- $[\alpha]^{20}$: -59° (c = 17 mg/mL; CHCl₃)
- ESI-MS: ber. f. C₃₃H₃₉N₃O₉, 621.27; gef.: [M+H]⁺ = 622.2; [M+Na]⁺ = 644.3;
 Reinheit 97 % (Epimer 1 (95 %): R_t=1.1 Min.; Epimer 2 (2 %): R_t=1.5 Min.;
 Isokratisch 20/80 (H₂O/ACN), 254 nm)
- ¹H-NMR: (CDCl₃, 300 MHz), δ [ppm] = 7.22-7.36 (m, 10H, 2 x C₆H₅), 5.02-5.20 (m, 2H, CO₂CH₂Ph), 4.39-4.55 (m, 2H, Pro- α -CH, Isoleu- α -CH), 4.07-4.19 (m, 2H, CO₂CH₂CH₃), 3.33-3.74 (m, 4H, 2 x Azi-CH, Pro- δ -CH₂), 1.77-2.23 (m, 4H, Pro- β -CH₂, Pro- γ -CH₂), 1.40-1.56 (m, 1H, Isoleu- β -CH), 1.14-1.28 (m, 4H, CO₂CH₂CH₃, Isoleu- γ -CH₂), 0.98-1.09 (m, 1H, Isoleu- γ -CH₂), 0.73-0.95 (m, 6H, 2 x Isoleu-CH₃).
- ¹³C-NMR: (CDCl₃, 75 MHz), δ [ppm] = 170.58, 170.54, 168.54, 168.30, 166.37, 165.72, 165.12, 164.88, 156.04, 134.53, 133.45, 127.83, 127.74, 127.69, 127.64, 127.55, 127.53, 127.47, 127.40, 127.30, 127.16, 67.13, 65.92, 61.53, 58.00, 54.37, 54.08, 46.29, 36.95, 36.77, 28.67, 28.04, 23.87, 23.35, 23.13, 14.17, 14.01, 12.96, 10.03, 9.84.
- FT-IR: $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 2964, 1736, 1692, 1645, 1516, 1498, 1437, 1378, 1327, 1273, 1170, 1094, 1028, 910, 820, 749, 697, 665.

(S)-Pro-OBn-(S)-Ile-CO-CO-(2R,3R)-Diethylaziridin-aziridin-(2,3)-dicarboxylat (RC73)

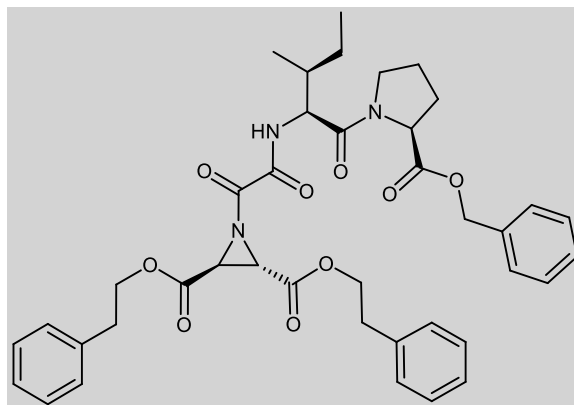
- Methode: G
- Ansatz: 96 mg, 427 μmol (1.0 Äq.) (2R,3R)-Diethylaziridin-aziridin-(2,3)-dicarboxylat (CS121)
- 200 mg, 513 μmol (1.2 Äq.) 2-(((2R,3S)-1-((S)-2-((Benzyloxy)-carbonyl)pyrrolidin-1-yl)-3-methyl-oxopen-tan-2-yl)amino)-2-oxoessigsäure (RC59)
- 812 mg, 1.28 mmol (3.0 Äq.) PPA (50% in Ethylacetat)
- 10 mL Ethylacetat
- R_F-Wert: 0.5 (Cyclohexan/Ethylacetat [2:1])
- Ausbeute:** **115 mg, 197 μmol , 46 %, gelber Feststoff**
- [α]_D²⁰: 91 ° (c = 7.3 mg/mL; CHCl₃)
- ESI-MS: ber. f. C₂₈H₃₇N₃O₉, 559.25; gef.: [M+H]⁺ = 560.2; [M+Na]⁺ = 582.3;
- Reinheit 96 % (R_t=0.9 Min.; Isokratisch 20/80 (H₂O/ACN), 254 nm)
- ¹H-NMR: (CDCl₃, 300 MHz), δ [ppm] = 7.15-7.39 (m, 5H, Ar-CH), 5.02-5.18 (m, 2H, CO₂CH₂Ph), 4.42-4.53 (m, 2H, Pro- α -CH, Isoleu- α -CH), 3.99-4.26 (m, 4H, 2 x CO₂CH₂CH₃), 3.42-3.70 (m, 4H, 2 x Azi-CH, Pro- δ -CH₂), 1.79-2.23 (m, 4H, Pro- β -CH₂, Pro- γ -CH₂), 1.43-1.69 (m, 1H, Isoleu- β -CH), 1.15-1.29 (t, 2 x 3H, CO₂CH₂CH₃, ³J = 7.1 Hz; m, 1H, Isoleu- γ' -CH₂), 0.99-1.11 (m, 1H, Isoleu- γ -CH₂), 0.75-0.95 (m, 6H, 2 x Isoleu-CH₃).
- ¹³C-NMR: (CDCl₃, 75 MHz), δ [ppm] = 208.13, 172.05, 169.98, 167.31, 166.54, 136.03, 129.09, 128.86, 128.72, 67.49, 63.05, 59.55, 55.88, 47.86, 47.59, 38.39, 29.57, 25.39, 24.91, 15.65, 14.48, 11.51.
- FT-IR: $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 2970, 1734, 1685, 1646, 1509, 1437, 1369, 1341, 1267, 1224, 1200, 1166, 1112, 1076, 1031, 994, 967, 887, 853, 740, 713, 668.

(S)-Pro-OH-(S)-Ile-CO-CO-(2R,3R)-Diethylaziridin-aziridin-(2,3)-dicarboxylat (RC74)

Methode:	C
Ansatz:	29.0 mg, 51.8 μmol (1.0 Äq.) (S)-Pro-OBn-(S)-Ile-CO-CO-(2R,3R)-Diethylaziridin-aziridin-(2,3)-dicarboxylat (RC73) 6.8 mg Pd/C 5 mL abs. Methanol
Ausbeute:	18.4 mg, 39.2 μmol, 76 %, gelbes Öl
ESI-MS:	ber. f. $\text{C}_{21}\text{H}_{31}\text{N}_3\text{O}_9$, 469.21; gef.: $[\text{M}+\text{H}]^+ = 470.2$; $[\text{M}+\text{Na}]^+ = 492.2$; Reinheit 79 % (Epimer 1 (49 %): $R_t=1.0$ Min.; Epimer 2 (30 %): $R_t=1.4$ Min.; Isokratisch 45/55 ($\text{H}_2\text{O}/\text{ACN}$), 254 nm)
$^1\text{H-NMR}$:	(CD_3OD , 300 MHz), δ [ppm] = 4.24-4.59 (m, 2H, Pro- α -CH, Isoleu- α -CH), 4.04-4.20 (m, 4H, 2 x $\text{CO}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 3.21-3.81 (m, 4H, 2 x Azi-CH, Pro- δ - CH_2), 1.80-2.21 (m, 4H, Pro- β - CH_2 , Pro- γ - CH_2), 1.39-1.59 (m, 1H, Isoleu- β -CH), 1.14-1.25 (m, 7H, 2 x $\text{CO}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$, Isoleu- γ - CH_2), 0.99-1.11 (m, 1H, Isoleu- γ - CH_2), 0.75-1.10 (m, 6H, 2 x Isoleu- CH_3).
$^{13}\text{C-NMR}$:	(CD_3OD , 75 MHz), δ [ppm] = 173.69, 170.01, 169.12, 167.25, 166.20, 157.76, 93.41, 62.25, 61.04, 60.75, 59.21, 55.40, 47.34, 47.06, 46.78, 36.76, 29.32, 28.88, 24.45, 24.24, 14.15, 12.98, 12.92, 9.68.
FT-IR:	$\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] = 3255, 2965, 2357, 2334, 2161, 1729, 1683, 1628, 1501, 1448, 1375, 1279, 1192, 1021, 860, 668.

Aufgrund der geringen Substanzmenge konnte kein Drehwert gemessen werden.

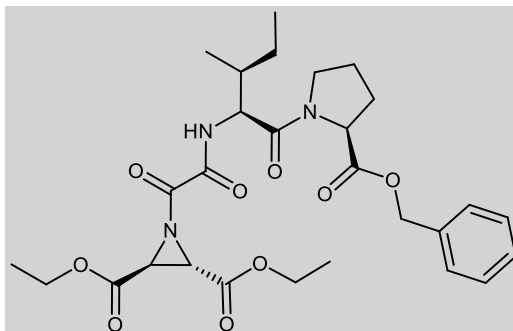
**(S)-Pro-OBn-(S)-Ile-CO-CO-(2R,3R)-Diphenylethyl-aziridin-2,3-dicarboxylat
(RC75)**



- Methode: G
- Ansatz: 100 mg, 295 μmol (1.0 Äq.) (2R,3R)-Diphenylethyl-aziridin-2,3-dicarboxylat (RC65)
 138 mg, 354 μmol (1.2 Äq.) 2-(((2R,3S)-1-((S)-2-((Benzyloxy)-carbonyl)pyrrolidin-1-yl)-3-methyl1-oxopen-tan-2-yl)amino)-2-oxoessigsäure (RC59)
 280 mg, 885 μmol (3.0 Äq.) PPA (50% in Ethylacetat)
 10 mL Ethylacetat
- R_f-Wert: 0.1 (Cyclohexan/Ethylacetat [3:1])
- Ausbeute:** **44.8 mg, 62.9 μmol , 21 %, gelbes Öl**
- ESI-MS: ber. f. C₄₀H₄₅N₃O₉, 711.31; gef.: [M+H]⁺ = 712.32; [M+Na]⁺ = 734.31;
 Reinheit 99 % (R_t=2.4 Min.; Isokratisch 30/70 (H₂O/ACN), 254 nm)
- ¹H-NMR: (CDCl₃, 300 MHz), δ [ppm] = 7.11-7.37 (m, 15H, Ar-CH), 5.11-5.22 (m, 2H, CO₂CH₂Ph), 4.52-4.59 (m, 2H, Pro- α -CH, Isoleu- α -CH), 4.29-4.45 (m, 4H, 2 x CO₂CH₂CH₂), 3.32-3.81 (m, 4H, 2 x Azi-CH, Pro- δ -CH₂), 2.96 (t, 4H, 2 x CO₂CH₂CH₂, ³J = 7.1 Hz), 1.62-2.04 (m, 4H, Pro- β -CH₂, Pro- γ -CH₂), 1.42-1.52 (m, 1H, Isoleu- β -CH), 1.14-1.28 (m, 1H, Isoleu- γ' -CH₂), 0.96-1.08 (m, 1H, Isoleu- γ' -CH₂), 0.73-0.95 (m, 6H, 2 x Isoleu-CH₃).
- ¹³C-NMR: (CDCl₃, 75 MHz), δ [ppm] = 171.6, 171.2, 169.6, 167.3, 166.2, 157.11, 137.0, 135.6, 128.9, 128.7, 128.7, 128.6, 128.5, 128.3, 128.2, 126.9, 67.0, 66.8, 60.4, 59.1, 55.2, 47.4, 43.2, 37.8, 34.9, 29.1, 24.9, 24.2, 15.1, 10.9.

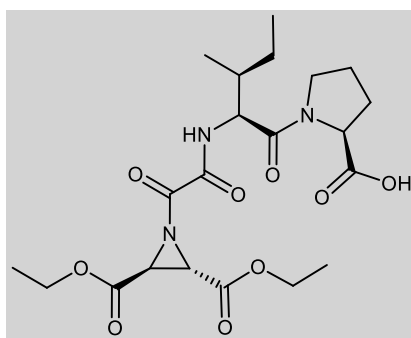
Aufgrund der geringen Substanzmenge konnte kein Drehwert und IR-Spektrum gemessen werden.

**(S)-Pro-OBn-(S)-Ile-CO-CO-(2S,3S)-Diethylaziridin-aziridin-2,3-dicarboxylat
(RC86)**



- Methode: G
- Ansatz: 28 mg, 149 μmol (1.0 Äq.) (2S,3S)-Diethylaziridin-aziridin-2,3-dicarboxylat (RC97)
- 71 mg, 182 μmol (1.2 Äq.) 2-(((2R,3S)-1-((S)-2-((Benzyloxy)-carbonyl)pyrrolidin-1-yl)-3-methyl-1-oxopen-tan-2-yl)amino)-2-oxoessigsäure (RC59)
- 288 mg, 454 μmol (3.0 Äq.) PPA (50% in Ethylacetat)
- 5 mL Ethylacetat
- R_f-Wert: 0.5 (Cyclohexan/Ethylacetat [2:1])
- Ausbeute: 25 mg, 53.3 μmol , 36 %, gelbes Öl**
- ESI-MS: ber. f. C₂₈H₃₇N₃O₉, 559.25; gef.: [M+H]⁺ = 560.4;
Reinheit 98 % (R_t=0.8 Min.; Isokratisch 20/80 (H₂O/ACN), 254 nm)
- ¹H-NMR: (CDCl₃, 300 MHz), δ [ppm] = 7.23-7.33 (m, 5H, Ar-CH), 5.02-5.18 (m, 2H, CO₂CH₂Ph), 4.43-4.55 (m, 2H, Pro- α -CH, Isoleu- α -CH), 4.04-4.31 (m, 4H, 2 x CO₂CH₂CH₃), 3.37-3.79 (m, 4H, 2 x Azi-CH, Pro- δ -CH₂), 1.87-2.26 (m, 4H, Pro- β -CH₂, Pro- γ -CH₂), 1.55-1.85 (m, 1H, Isoleu- β -CH), 1.11-1.27 (m, 7H, CO₂CH₂CH₃, Isoleu- γ' -CH₂), 0.98-1.09 (m, 1H, Isoleu- γ' -CH₂), 0.74-0.94 (m, 6H, 2 x Isoleu-CH₃).
- ¹³C-NMR: (CDCl₃, 75 MHz), δ [ppm] = 208.16, 172.22, 169.97, 167.34, 166.52, 136.11, 129.09, 128.83, 128.75, 67.52, 63.04, 59.55, 55.89, 47.93, 47.66, 38.39, 29.58, 25.45, 24.95, 15.68, 14.48, 11.53.
- FT-IR: $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 2964, 1736, 1692, 1645, 1516, 1498, 1437, 1378, 1378, 1327, 1273, 1170, 1094, 1028, 910, 820, 749, 697, 665.

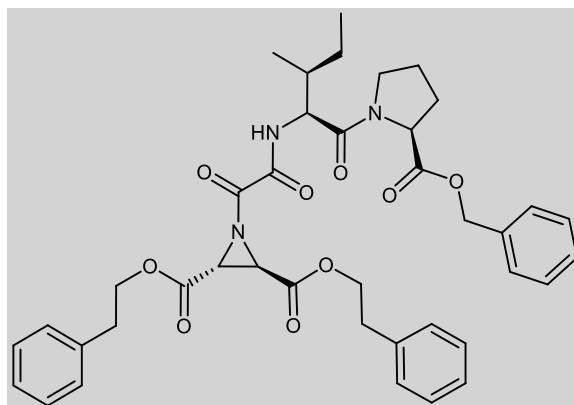
Aufgrund der geringen Substanzmenge konnte kein Drehwert gemessen werden.

(S)-Pro-OH-(S)-Ile-CO-CO-(2S,3S)-Diethylaziridin-aziridin-2,3-dicarboxylat (RC87)

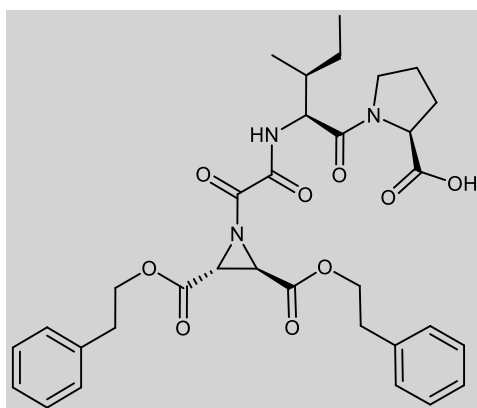
- Methode: C
- Ansatz: 10 mg, 17.9 μmol (1.0 Äq.) (S)-Pro-OBn-(S)-Ile-CO-CO-(2S,3S)-Diethylaziridin-aziridin-2,3-dicarboxylat (RC86)
3 mg Pd/C
4 mL abs. Methanol
- Ausbeute: 7 mg, 14.9 μmol , 80 %, farbloses Öl**
- $[\alpha]^{20}$: 149° (c = 2.3 mg/mL; MeOH)
- ESI-MS: ber. f. $\text{C}_{21}\text{H}_{31}\text{N}_3\text{O}_9$, 469.21; gef.: $[\text{M}+\text{H}]^+ = 470.2$; $[\text{M}+\text{Na}]^+ = 492.2$;
Reinheit 99% (Epimer 1 (6 %): $R_t=0.8$ Min.; Epimer 2 (93 %): $R_t=1.0$ Min.;
Isokratisch 45/55 ($\text{H}_2\text{O}/\text{ACN}$), 254 nm)
- $^1\text{H-NMR}$: (CD_3OD , 300 MHz), δ [ppm] = 4.24-4.54 (m, 2H, Pro- α -CH, Isoleu- α -CH), 3.98-4.199 (m, 4H, 2 x $\text{CO}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 3.21-3.81 (m, 4H, 2 x Azi-CH, Pro- δ - CH_2), 1.80-2.21 (m, 4H, Pro- β - CH_2 , Pro- γ - CH_2), 1.39-1.59 (m, 1H, Isoleu- β -CH), 1.14-1.25 (m, 7H, 2 x $\text{CO}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$, Isoleu- γ' - CH_2), 0.98-1.09 (m, 1H, Isoleu- γ' - CH_2), 0.75-1.10 (m, 6H, 2 x Isoleu- CH_3).
- $^{13}\text{C-NMR}$: (CD_3OD , 75 MHz), δ [ppm] = 167.77, 166.39, 157.62, 156.71, 62.25, 61.60, 60.18, 55.31, 47.31, 47.03, 46.75, 36.93, 29.04, 26.52, 24.40, 23.86, 14.23, 12.91, 9.65.

Aufgrund der geringen Substanzmenge konnte kein IR-Spektrum gemessen werden.

(S)-Pro-OBn-(S)-Ile-CO-CO-(2S,3S)-Diphenylethyl-aziridin-2,3-dicarboxylat (RC85)

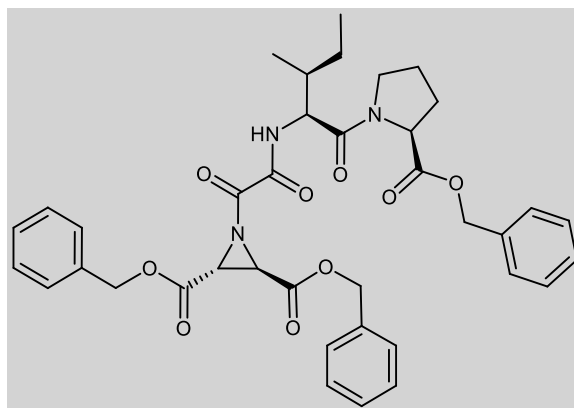


Methode:	G
Ansatz:	100 mg, 295 μmol (1.0 Äq.) (2S,3S)-Diphenylethyl-aziridin-2,3-dicarboxylat (RC 92) 138 mg, 354 μmol (1.2 Äq.) 2-(((2R,3S)-1-((S)-2-((Benzyloxy)-carbonyl)pyrrolidin-1-yl)-3-methyl-1-oxopent-2-yl)amino)-2-oxoessigsäure (RC59) 561 mg, 885 μmol (3.0 Äq.) PPA (50% in Ethylacetat) 20 mL Ethylacetat
R _F -Wert:	0.1 (Cyclohexan/Ethylacetat [3:1])
Ausbeute:	157 mg, 221 μmol, 75 %, gelbes Öl
[α] ²⁰ :	-33 ° (c = 9.9 mg/mL; CHCl ₃)
ESI-MS:	ber. f. C ₄₀ H ₄₅ N ₃ O ₉ , 711.32; gef.: [M+H] ⁺ = 712.5; Reinheit 87 % (R _t = 2.1 Min.; Isokratisch 30/70 (H ₂ O/ACN), 254 nm)
¹ H-NMR:	(CDCl ₃ , 300 MHz), δ [ppm] = 7.01-7.37 (m, 15H, Ar-CH), 4.99-5.17 (m, 2H, CO ₂ CH ₂ Ph), 4.36-4.55 (m, 2H, Pro- α -CH, Isoleu- α -CH), 4.17-4.36 (m, 4H, 2 x CO ₂ CH ₂ CH ₂), 3.27-3.80 (m, 4H, 2 x Azi-CH, Pro- δ -CH ₂), 2.83-2.97 (t, 4H, 2 x CO ₂ CH ₂ CH ₂ , ³ J = 7.1 Hz), 1.64-2.04 (m, 4H, Pro- β -CH ₂ , Pro- γ -CH ₂), 1.44-1.52 (m, 1H, Isoleu- β -CH), 1.14-1.28 (m, 1H, Isoleu- γ' -CH ₂), 0.98-1.09 (m, 1H, Isoleu- γ' -CH ₂), 0.73-0.95 (m, 6H, 2 x Isoleu-CH ₃).
¹³ C-NMR:	(CDCl ₃ , 75 MHz), δ [ppm] = 175.97, 171.59, 169.35, 166.74, 165.92, 157.09, 136.88, 135.57, 128.94, 128.70, 128.61, 128.36, 128.22, 126.91, 66.96, 66.81, 59.00, 55.41, 47.45, 47.32, 38.02, 34.81, 28.96, 24.83, 24.38, 21.80, 15.22, 11.08.
FT-IR:	$\tilde{\nu}$ [cm ⁻¹] = 2961, 1737, 1692, 1645, 1497, 1453, 1383, 1328, 1272, 1182, 1087, 1048, 817, 747, 698.

(S)-Pro-OH-(S)-Ile-CO-CO-(2S,3S)-Diphenylethyl-aziridin-2,3-dicarboxylat (RC88)

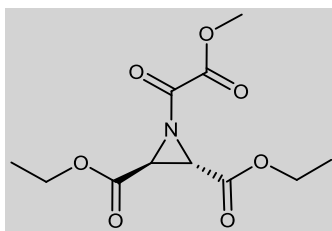
- Methode: C
- Ansatz: 44.8 mg, 63.1 μmol (1.0 Äq.) (S)-Pro-OBn-(S)-Ile-CO-CO-(2S,3S)-Diphenylethyl-aziridin-2,3-dicarboxylat (RC85)
7.0 mg Pd/C
8 mL abs. Methanol
- Ausbeute: 33 mg, 53.1 μmol , 84 %, farbloses Öl**
- $[\alpha]^{20}$: 28° (c = 8.4 mg/mL; MeOH)
- ESI-MS: ber. f. $\text{C}_{33}\text{H}_{39}\text{N}_3\text{O}_9$, 621.27; gef.: $[\text{M}+\text{H}]^+ = 622.2$; $[\text{M}+\text{Na}]^+ = 644.3$;
Reinheit 90 % ($R_t = 0.8$ Min.; Isokratisch 20/80 ($\text{H}_2\text{O}/\text{ACN}$), 254 nm)
- $^1\text{H-NMR}$: (CD_3OD , 300 MHz), δ [ppm] = 7.03-7.27 (m, 10H, Ar-CH), 4.36-4.55 (m, 2H, Pro- α -CH, Isoleu- α -CH), 4.17-4.36 (m, 4H, 2 x $\text{CO}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$), 3.27-3.80 (m, 4H, 2 x Azi-CH, Pro- δ - CH_2), 2.83-2.97 (t, 4H, 2 x $\text{CO}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$, $^3J = 7.1$ Hz), 1.62-2.01 (m, 4H, Pro- β - CH_2 , Pro- γ - CH_2), 1.47-1.56 (m, 1H, Isoleu- β -CH), 1.16-1.28 (m, 1H, Isoleu- γ' - CH_2), 1.01-1.13 (m, 1H, Isoleu- γ' - CH_2), 0.72-0.99 (m, 6H, 2 x Isoleu- CH_3).
- $^{13}\text{C-NMR}$: (CD_3OD , 75 MHz), δ [ppm] = 186.34, 177.07, 166.01, 157.78, 137.33, 128.68, 128.61, 128.24, 126.38, 66.59, 59.35, 55.42, 47.33, 47.04, 46.76, 36.74, 34.36, 24.34, 14.15, 9.68.

Aufgrund der geringen Substanzmenge konnte kein IR-Spektrum gemessen werden.

(S)-Pro-OBn-(S)-Ile-CO-CO-(2R,3R)-Dibenzylaziridin-aziridin-2,3-dicarboxylat (RC93)

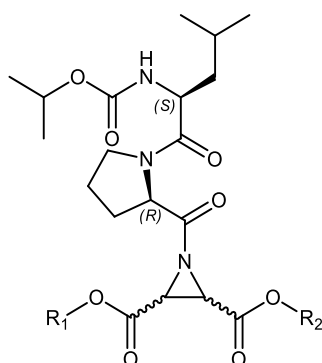
- Methode: G
- Ansatz: 33 mg, 106 μmol (1.0 Äq.) (2R,3R)-Dibenzylaziridin-aziridin-2,3-dicarboxylat (RC6)
- 50mg, 128 μmol (1.2 Äq.) 2-(((2R,3S)-1-((S)-2-((Benzyloxy)-carbonyl)pyrrolidin-1-yl)-3-methyl-oxopen-tan-2-yl)amino)-2-oxoessigsäure (RC59)
- 203 mg, 320 μmol (3.0 Äq.) PPA (50% in Ethylacetat)
- 10 mL Ethylacetat
- R_F-Wert: 0.2 (Cyclohexan/Ethylacetat [2:1])
- Ausbeute:** **23 mg, 197 μmol , 32 %, farbloses Öl**
- ESI-MS: ber. f. C₃₈H₄₁N₃O₉, 683,28; gef.: [M+H]⁺ = 684.2; [M+Na]⁺ = 706.3;
- Reinheit 94 % (R_t = 3.4 Min.; Isokratisch 30/70 (H₂O/ACN), 254 nm)
- ¹H-NMR: (CDCl₃, 300 MHz), δ [ppm] = 7.11-7.42 (m, 15H, Ar-CH), 4.96-5.18 (m, 6H, CO₂CH₂Ph), 4.36-4.52 (m, 2H, Pro- α -CH, Isoleu- α -CH), 3.36-3.67 (m, 4H, 2 x Azi-CH, Pro- δ -CH₂), 1.69-2.15 (m, 4H, Pro- β -CH₂, Pro- γ -CH₂), 1.38-1.51 (m, 1H, Isoleu- β -CH), 1.09-1.24 (m, 1H, Isoleu- γ' -CH₂), 0.92-1.09 (m, 1H, Isoleu- γ' -CH₂), 0.68-0.93 (m, 6H, 2 x Isoleu-CH₃).
- ¹³C-NMR: (CDCl₃, 75 MHz), δ [ppm] = 171.70, 169.36, 166.79, 165.98, 157.12, 135.65, 134.49, 128.88, 128.82, 128.78, 128.69, 128.61, 128.44, 128.30, 68.26, 67.05, 59.12, 55.54, 47.41, 38.14, 27.03, 25.01, 24.45, 15.34, 11.22.

Aufgrund der geringen Substanzmenge konnte kein Drehwert und IR-Spektrum gemessen werden.

(2S,3S)-Diethyl-1-[N-methoxyoxalyl]-aziridindicarboxylat (RC98)

- Ansatz: 250.0 mg, 1.3 mmol (1.0 Äq.) (2*R*,3*R*)-Diphenylethyl-aziridin-2,3-dicarboxylat (RC65)
239.8 mg, 2.0 mmol (1.5 Äq.) Methyloxalylchlorid
204.4 mg, 2.0 mmol (1.5 Äq.) Triethylamin
8 mL Dichlormethan
- R_F-Wert: 0.41 (Cyclohexan/Ethylacetat [2:1])
- Ausbeute:** **46.0 mg, 0.17 mmol, 13 %, farbloser Feststoff**
- ¹H-NMR: (DMSO, 300 MHz), δ [ppm] = 4.20 (q, 4H, J = 9Hz, 2 x CH₂CH₃), 3.79 (s, 3H, O-CH₃), 3.67 (s, 2H, 2 x Azi-CH), 1.24 (t, 6H, J = 9 Hz, -CH₂CH₃).
- ¹³C-NMR: (CDCl₃, 75 MHz), δ [ppm] = 166.01 (O-C=O), 163.43 (N-C=O), 158.34 (N-CO-CO), 62.80 (C-5), 53.59 (O-CH₃), 40.45 (CH-N), 13.99 (-CH₂-CH₃).
- FT-IR: $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 2984, 1728, 1444, 1373, 1331, 1268, 1197, 1232, 860.

9.2 Übersicht PF-Inhibitoren



Compound Docking-Nr.	Labor- Nr.	R ₁	R ₂	LmCPB2.8 <i>K_i</i> [μM] ¹	Cruzain <i>K_i</i> [μM] ¹
PF1	PF270	Ethyl	Benzyl	ni	ni
PF2	PF289	<i>tert</i> -Butyl	Benzyl	ni	ni
PF3	PF253	Cyclohexylmethyl	Benzyl	1.8±0.4	7.6±0.7
PF5	PF180	Benzyl	Benzyl	2.8	1.8
PF7	PF294	Naphthalene-2-yl- methyl	Benzyl	0.8	ni
PF8	PF272	2-Phenylethyl	Benzyl	1.92±0.06	5.5±0.2
PF9	PF317	3-Phenylethyl	Benzyl	1.36±0.05	ni
PF12	PF258	Cyclohexylmethyl	Cyclohexylmethyl	0.77±0.05	ni
PF13	PF257	2-Phenylethyl	2-Phenylethyl	1.6±0.1	7.7±0.7
PF14	PF362	3-Phenylpropyl	3-Phenylpropyl	0.9±0.1	ni
PF15	PF349	Ethyl	H	ni	ni
PF16	PF382	<i>tert</i> -Butyl	H	ni	ni
PF17	PF345	Cyclohexylmethyl	H	1.79±0.43	0.71±0.015
PF18	PF350	2-Phenylethyl	H	0.44±0.022	ni
PF19	PF400	3-Phenylpropyl	H	ni	ni

9.3 Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
abs.	Absolut
Ac	Acetyl
AcOH	Essigsäure
Ala	Alanin
Arg	Arginin
Asn	Asparagin
Asp	Aspartat
AS	Aminosäure
Azi	Aziridin
Äq.	Äquivalent
aq.	aqueous
ber.	berechnet
Bn	Benzyl
BnOH	Benzylalkohol
Boc	<i>tert</i> -Butoxycarbonyl
CB	Cathepsin B
CL	Cathepsin L
Cbz	Benzyloxycarbonyl
CP	Cysteinprotease
CPI	Cysteinprotease-Inhibitor
Cys	Cystein
d	<i>distance</i>
DC	Dünnschichtchromatographie
DCC	Dicyclohexylcarbodiimid
DCM	Dichlormethan
DEAD	Diethylazodicarboxylat
DIPEA	Diisopropylethylamin
4-DMAP	4-(Dimethylamino)-pyridin
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DPSI	(<i>S,S</i>)-Diphenylsulfimin
DTPA	Diethylentriaminpentaessigsäure
EA	Ethylacetat
EDC	1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid
ESI	<i>electron spray ionization</i>
Et	Ethyl
<i>et al.</i>	<i>et alii</i> (und andere)
EtOH	Ethanol
ER	Endoplasmatisches Reticulum
Fmoc	Fluorenylmethoxycarbonyl
GB/VI methodology	Generalized Born/Volume Integral methodology
gef.	gefunden
ges.	gesättigt
Glu	Glutaminsäure
h	Stunde
HBTU	(2-(1H-Benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium-hexafluorophosphat)
HCl	Hydrogenchlorid

His	Histidin
HOBT	<i>N</i> -Hydroxybenzotriazol
HPLC	<i>high performance liquid chromatography</i>
Hz	Hertz
iBu	<i>iso</i> -Butyl
i. Vak.	im Vakuum
J	Kopplungskonstante
K _i	Dissoziationskonstante
K _M	Michaelis-Menten-Konstante
kat.	katalytisch
konz.	konzentriert
LmCPB2.8	Leishmania Cysteine Protease B2.8
Leu	Leucin
Lit.	Literatur
Lsg.	Lösung
Lsm.	Lösungsmittel
MD	<i>Molecular Dynamics</i>
MeOH	Methanol
Min.	Minute
MMFF94	<i>Merck Molecular Force Field</i>
MOE	<i>Molecular Operating Environment</i>
MS	Massenspektrometrie
m/z	Masse-Ladungsverhältnis
NEt ₃	Triethylamin
NHS	<i>N</i> -Hydroxysuccinimid
NMM	<i>N</i> -Methylmorpholin
NMR	<i>Nuclear Magnetic Resonance</i>
ni	<i>no inhibition</i>
nd	<i>not determined</i>
Pd/C	Palladium auf Aktivkohle
PDB	<i>Protein Data Base</i>
Ph	Phenyl
pm	Pikometer
PPA	Propylphosphonsäureanhydrid
Pro	Prolin
p-TsOH	<i>p</i> -Toluolsulfonsäure
QM/MM	<i>quantum mechanics/molecular mechanics</i>
R	Rest
Rho	Rhodesain
Rf	Retentionsfaktor
RMSD	<i>root mean square deviation</i>
RT	Raumtemperatur
R _t	Retentionszeit
SAR	<i>structure activity relationships</i>
SC	Säulenchromatographie
Smp.	Schmelzpunkt
S _n	Nucleophile Substitution
T.b.b.	<i>Trypanosoma brucei brucei</i>
TbCatB	<i>Trypanosoma brucei</i> cathepsin B
^t Bu	<i>tert</i> -Butyl
^t BuOH	<i>tert</i> -Butanol
TBTU	2-(1H-Benzotriazole-1-yl)-1,1,3,3-tetramethylaminium tetrafluoroborat
TEA	Triethylamin

TFA	Trifluoressigsäure
THF	Tetrahydrofuran
Trp	Tryptophan
Ts	Tosyl
ZNS	Zentrales Nervensystem
$\tilde{\nu}$	Wellenzahl
λ	Wellenlänge

9.4 Literaturverzeichnis

1. Fey, P. *et al.* New aziridine-based inhibitors of cathepsin L-like cysteine proteases with selectivity for the Leishmania cysteine protease LmCPB2.8. *Eur. J. Med. Chem.* **156**, (2018).
2. López-Otín, C. & Bond, J. S. Proteases: Multifunctional enzymes in life and disease. *J. Biol. Chem.* **283**, 30433–30437 (2008).
3. Manuscript, Deu, E. Inhibitor Design , Drug Discovery and Probe Development. *Nat Struct Mol Biol* **19**, 9–16 (2013).
4. Rakash, S. Role of proteases in cancer: A review. *Biotechnol. Mol. Biol. Rev.* **7**, 90–101 (2012).
5. McKerrow, J. H., Caffrey, C., Kelly, B., Loke, P. & Sajid, M. Proteases in Parasitic Diseases. *Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.* **1**, 497–536 (2006).
6. Brik, A. & Wong, C. H. HIV-1 protease: Mechanism and drug discovery. *Org. Biomol. Chem.* **1**, 5–14 (2003).
7. Luque, M. *et al.* Effects of captopril related to increased levels of prostacyclin and angiotensin-(1-7) in essential hypertension. *Journal of Hypertension* vol. 14 799–805 (1996).
8. Fung, H. B., Kirschenbaum, H. L. & Hameed, R. Amprenavir: A new human immunodeficiency virus type 1 protease inhibitor. *Clin. Ther.* **22**, 549–572 (2000).
9. Byun, H. S. *et al.* Caspase-8 has an essential role in resveratrol-induced apoptosis of rheumatoid fibroblast-like synoviocytes. *Rheumatology* **47**, 301–308 (2008).
10. Almond, J. B. & Cohen, G. M. The proteasome: a novel target for cancer chemotherapy. *Leuk. Off. J. Leuk. Soc. Am. Leuk. Res. Fund, U.K* **16**, 433–443 (2002).
11. Stoch, S. A. & Wagner, J. A. Cathepsin K inhibitors: A novel target for osteoporosis therapy. *Clin. Pharmacol. Ther.* **83**, 172–176 (2008).
12. Brown, P. D. Ongoing trials with matrix metalloproteinase inhibitors. *Expert Opin. Investig. Drugs* **9**, 2167–2177 (2000).
13. Green, B. D., Flatt, P. R. & Bailey, C. J. Dipeptidyl peptidase IV (DPP IV) inhibitors: A newly emerging drug class for the treatment of type 2 diabetes. *Diabetes Vasc. Dis. Res.* **3**, 159–165 (2006).
14. Barrett, A. J. & Kirschke, H. [41] Cathepsin B, cathepsin H, and cathepsin L. in *Proteolytic Enzymes, Part C* vol. 80 535–561 (Elsevier, 1981).
15. Gauthier, J. Y. *et al.* The discovery of odanacatib (MK-0822), a selective inhibitor of cathepsin K. *Bioorganic Med. Chem. Lett.* **18**, 923–928 (2008).
16. Bairoch, A. The ENZYME database in 2000. *Nucleic Acids Res.* **28**, 304–305 (2000).
17. Rawlings, N. D., Waller, M., Barrett, A. J. & Bateman, A. MEROPS: The database of proteolytic enzymes,

- their substrates and inhibitors. *Nucleic Acids Res.* **42**, 503–509 (2014).
18. Rawlings, N. D., Barrett, A. J. & Bateman, A. MEROPS. *Nucleic Acids Res.* **38**, D227-33 (2010).
 19. Rawlings, N. D. & Barrett, A. J. [32] Families of cysteine peptidases. in *Proteolytic Enzymes: Serine and Cysteine Peptidases* vol. 244 461–486 (Elsevier, 1994).
 20. Doyle, P. S. *et al.* The Trypanosoma cruzi protease cruzain mediates immune evasion. *PLoS pathog.* **7**, e1002139 (2011).
 21. Caffrey, C., Scory, S. & Steverding, D. Cysteine Proteinases of Trypanosome Parasites Novel Targets for Chemotherapy. *Curr. Drug Targets* **1**, 155–162 (2005).
 22. Mott, B. T. *et al.* Identification and optimization of inhibitors of trypanosomal cysteine proteases: Cruzain, rhodesain, and TbCatB. *J. Med. Chem.* **53**, 52–60 (2010).
 23. Gelhaus, C., Vicik, R., Schirmeister, T. & Leippe, M. Blocking effect of a biotinylated protease inhibitor on the egress of Plasmodium falciparum merozoites from infected red blood cells. *Biol. Chem.* **386**, 499–502 (2005).
 24. Atkinson, H. J., Babbitt, P. C. & Sajid, M. The global cysteine peptidase landscape in parasites. *Trends Parasitol.* **25**, 573–581 (2009).
 25. Mohamed, M. M. & Sloane, B. F. Cysteine cathepsins: Multifunctional enzymes in cancer. *Nat. Rev. Cancer* **6**, 764–775 (2006).
 26. Gocheva, V. *et al.* Distinct roles for cysteine cathepsin genes in multistage tumorigenesis. *Genes Dev.* **20**, 543–556 (2006).
 27. Turk, B., Turk, D. & Turk, V. Lysosomal cysteine proteases. *Biochim. Biophys. Acta - Protein Struct. Mol. Enzymol.* **1477**, 98–111.
 28. Turk, B., Turk, V. & Turk, D. Structural and functional aspects of papain-like cysteine proteinases and their protein inhibitors. *Biol. Chem.* **378**, 141–150 (1997).
 29. Yan, S., Sameni, M. & Sloane, B. F. Cathepsin B and human tumor progression. *Biol. Chem.* **379**, 113–123 (1998).
 30. Turk, V. *et al.* Cysteine cathepsins: From structure, function and regulation to new frontiers. *Biochim. Biophys. Acta - Proteins Proteomics* **1824**, 68–88 (2012).
 31. Turk, B., Turk, D. & Turk, V. Lysosomal cysteine proteases: More than scavengers. *Biochim. Biophys. Acta - Protein Struct. Mol. Enzymol.* **1477**, 98–111 (2000).
 32. Gole, B. *et al.* The regulation of cysteine cathepsins and cystatins in human gliomas. *Int. J. Cancer* **131**, 1779–1789 (2012).

33. Rozhin, J., Sameni, M., Ziegler, G. & Sloane, B. F. Pericellular pH affects distribution and secretion of cathepsin B in malignant cells. *Cancer Res.* **54**, 6517–6525 (1994).
34. Roshy, S., Sloane, B. F. & Moin, K. Pericellular cathepsin B and malignant progression. *Cancer Metastasis Rev.* **22**, 271–286.
35. Guicciardi, M. E. *et al.* Cathepsin B contributes to TNF-alpha-mediated hepatocyte apoptosis by promoting mitochondrial release of cytochrome c. *J. Clin. Invest.* **106**, 1127–1137 (2000).
36. Mueller-Steiner, S. *et al.* Anti-amyloidogenic and neuroprotective functions of cathepsin B. *Neuron* **51**, 703–714 (2006).
37. Michaud, S. & Gour, B. J. Cathepsin B inhibitors as potential anti-metastatic agents. *Expert Opin. Ther. Pat.* **8**, 645–672 (1998).
38. Halangk, W. *et al.* Role of cathepsin B in intracellular trypsinogen activation and the onset of acute pancreatitis. *J. Clin. Invest.* **106**, 773–781 (2000).
39. Bröker, L. E. *et al.* Cathepsin B Mediates Caspase-Independent Cell Death Induced by Microtubule Stabilizing Agents in Non-Small Cell Lung Cancer Cells. *Cancer Res.* **64**, 27–30.
40. Sloane, B. F. *et al.* Cathepsin B activity in B16 melanoma cells. *Cancer Res.* **42**, 980–986 (1982).
41. Engel, J. C., Doyle, P. S., Hsieh, I. & McKerrow, J. H. Cysteine Protease Inhibitors Cure an Experimental *Trypanosoma cruzi* Infection. *J. Exp. Med.* **188**, 725–734.
42. Engel, J. C. *et al.* Cysteine protease inhibitors alter Golgi complex ultrastructure and function in *Trypanosoma cruzi*. *J. Cell Sci.* **111**, 597–606 (1998).
43. McKerrow, J. H. Development of cysteine protease inhibitors as chemotherapy for parasitic diseases : insights on safety , target validation , and mechanism of action. **29**, 833–837 (1999).
44. Huppatz, C. & Durrheim, D. N. Control of neglected tropical diseases [10]. *N. Engl. J. Med.* **357**, 2407–2408 (2007).
45. Croft, S. L. & Coombs, G. H. Leishmaniasis – current chemotherapy and recent advances in the search for novel drugs. **19**, 502–508 (2003).
46. Kima, P. E. *et al.* Internalization of *Leishmania mexicana* complex amastigotes via the Fc receptor is required to sustain infection in murine cutaneous leishmaniasis. *J. Exp. Med.* **191**, 1063–1067 (2000).
47. England, T. N. Oral Miltefosine for Indian Visceral Leishmaniasis. *English J.* **346**, 305–310 (2002).
48. Barrett, M. P., Mottram, J. C. & Coombs, G. H. Recent advances in identifying and validating drug targets in trypanosomes and leishmaniasis. 82–88 (1999).
49. Kerr, I. D. *et al.* Vinyl sulfones as antiparasitic agents and a structural basis for drug design. *J. Biol. Chem.*

- 284**, 25697–25703 (2009).
50. Mottram, J. C., Brooks, D. R. & Coombs, G. H. Roles of cysteine proteinases of trypanosomes and Leishmania in host-parasite interactions. *Curr. Opin. Microbiol.* **1**, 455–460 (1998).
 51. Buxbaum, L. U. *et al.* Cysteine Protease B of Leishmania mexicana Inhibits Host Th1 Responses and Protective Immunity. *J. Immunol.* **171**, 3711–3717 (2003).
 52. Juliano, M. A. *et al.* Differences in substrate specificities between cysteine protease CPB isoforms of Leishmania mexicana are mediated by a few amino acid changes. *Eur. J. Biochem.* **271**, 3704–3714 (2004).
 53. Kamphuis, I. G., Kalk, K. H., Swarte, M. B. A. & Drenth, J. Structure of papain refined at 1.65 Å resolution. *J. Mol. Biol.* **179**, 233–256 (1984).
 54. Schechter, I. & Berger, A. On the active site of proteases. III. Mapping the active site of papain; specific peptide inhibitors of papain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **32**, 898–902.
 55. Pickersgill, R. W., Harris, G. W. & Garman, E. Structure of monoclinic papain at 1.60 Å resolution. *Acta Crystallogr. Sect. B* **48**, 59–67 (1992).
 56. Hardegger, L. A. *et al.* Systematic investigation of halogen bonding in protein-ligand interactions. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **50**, 314–318 (2011).
 57. Mirković, B. *et al.* Novel Mechanism of CathepsinB Inhibition by Antibiotic Nitroxoline and Related Compounds. *ChemMedChem* **6**, 1351–1356 (2011).
 58. Jenko, S. *et al.* Crystal structure of stefin A in complex with cathepsin H: N-terminal residues of inhibitors can adapt to the active sites of endo- and exopeptidases. *J. Mol. Biol.* **326**, 875–885 (2003).
 59. Gunčar, G. *et al.* Crystal structure of cathepsin X: A flip-flop of the ring of His23 allows carboxy-monopeptidase and carboxy-dipeptidase activity of the protease. *Structure* **8**, 305–313 (2000).
 60. Mott, B. T. *et al.* Identification and optimization of inhibitors of Trypanosomal cysteine proteases. *J. Med. Chem.* **53**, 52–60 (2010).
 61. McKerrow, J. H. The diverse roles of cysteine proteases in parasites and their suitability as drug targets. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **12**, e0005639 (2018).
 62. Kerr, I. D., Wu, P., Marion-Tsukamaki, R., Mackey, Z. B. & Brinen, L. S. Crystal structures of TbCatB and rhodesain, potential chemotherapeutic targets and major cysteine proteases of Trypanosoma brucei. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **4**, 1–9 (2010).
 63. Mort, J. S. Cathepsin B. in *Handbook of Proteolytic Enzymes 1784-1791* TS-CrossRef (Elsevier, 2013). doi:10.1016/B978-0-12-382219-2.00406-3 M4 - Citavi.
 64. Halangk, W. *et al.* Role of cathepsin B in intracellular trypsinogen activation and the onset of acute

- pancreatitis. *J. Clin. Invest.* **106**, 773–781 (2000).
65. Cathers, B. E., Barrett, C., Palmer, J. T. & Rydzewski, R. M. pH dependence of inhibitors targeting the occluding loop of cathepsin B. *Bioorg. Chem.* **30**, 264–275 (2002).
66. Krupa, J. C., Hasnain, S., Nägler, D. K., Ménard, R. & Mort, J. S. S'2 substrate specificity and the role of His110 and his111 in the exopeptidase activity of human cathepsin B. *Biochem. J.* **361**, 613–619 (2002).
67. Renko, M., Pogan, U., Majera, D. & Turk, D. Stefin A displaces the occluding loop of cathepsin B only by as much as required to bind to the active site cleft. *FEBS J.* **277**, 4338–4345 (2010).
68. Redzynia, I. *et al.* Displacement of the occluding loop by the parasite protein, chagasin, results in efficient inhibition of human cathepsin B. *J. Biol. Chem.* **283**, 22815–22825 (2008).
69. Yamamoto, A. *et al.* Substrate Specificity of Bovine Cathepsin B and Its Inhibition by CA074, Based on Crystal Structure Refinement of the Complex. *J. Biochem.* **127**, 635–643.
70. Aronson, N. N. & Barrett, A. J. The specificity of cathepsin B. Hydrolysis of glucagon at the C-terminus by a peptidyl dipeptidase mechanism. *Biochem. J.* **171**, 759–765 (1978).
71. Towatari, T. *et al.* Novel epoxysuccinyl peptides A selective inhibitor of cathepsin B, in vivo. *FEBS Lett.* **280**, 311–315.
72. Montaser, M., Lalmanach, G. & Mach, L. CA-074, but not its methyl ester CA-074Me, is a selective inhibitor of cathepsin B within living cells. *Biol. Chem.* **383**, 1305–1308 (2002).
73. Stern, I., Schaschke, N., Moroder, L. & Turk, D. Crystal structure of NS-134 in complex with bovine cathepsin B. *Biochem J* **381**, 511–517 (2004).
74. Yamamoto, A. *et al.* Crystallization and preliminary X-ray study of the cathepsin B complexed with CA074, a selective inhibitor. *J. Mol. Biol.* **227**, 942–944 (1992).
75. Tsuge, H. *et al.* Inhibition mechanism of cathepsin L-specific inhibitors based on the crystal structure of papain-CLIK148 complex. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **266**, 411–416 (1999).
76. Steverding, D. The Cathepsin B-Selective Inhibitors CA-074 and CA-074Me Inactivate Cathepsin L Under Reducing Conditions. *Open Enzym. Inhib. J.* **4**, 11–16 (2011).
77. Turk, D. *et al.* Crystal Structure of Cathepsin B Inhibited with CA030 at 2.0-Å resolution: A Basis for the Design of Specific Epoxysuccinyl Inhibitors. *Biochemistry* **34**, 4791–4797 (1995).
78. Choe, Y. *et al.* Substrate profiling of cysteine proteases using a combinatorial peptide library identifies functionally unique specificities. *J. Biol. Chem.* **281**, 12824–12832 (2006).
79. Kim, M. J. *et al.* Crystal structure of papain-E64-c complex: Binding diversity of E64-c to papain S 2 and S 3 subsites. *Biochem. J.* **287**, 797–803 (1992).

80. Lewis, S. D., Johnson, F. A. & Shafer, J. A. Potentiometric Determination of Ionizations at the Active Site of Papain. *Biochemistry* **15**, 5009–5017 (1976).
81. Lewis, S. D., Johnson, F. A. & Shafer, J. A. Effect of Cysteine-25 on the Ionization of Histidine-159 in Papain As Determined by Proton Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy. Evidence for a His-159-Cys-25 Ion Pair and Its Possible Role in Catalysis. *Biochemistry* **20**, 48–51 (1981).
82. Vernet, T. *et al.* Structural and functional roles of asparagine 175 in the cysteine protease papain. *Journal of Biological Chemistry* vol. 270 16645–16652 (1995).
83. Harrison, M. J., Burton, N. A. & Hillier, I. H. Catalytic mechanism of the enzyme papain: Predictions with a hybrid quantum mechanical/molecular mechanical potential. *J. Am. Chem. Soc.* **119**, 12285–12291 (1997).
84. Mladenovic, M., Fink, R. F., Thiel, W., Schirmeister, T. & Engels, B. On the origin of the stabilization of the zwitterionic resting state of cysteine proteases. *J. Am. Chem. Soc.* **130**, 8696–8705 (2008).
85. Hol, W. I. M. G. J. EFFECTS OF THE α -HELIX DIPOLE UPON THE FUNCTIONING AND STRUCTURE OF PROTEINS AND PEPTIDES Laboratory of Chemical Physics , Department of Chemistry , University of Groningen , Nijenborgh , Groningen , The Netherlands. *Adv. Biophys.* **19**, 133–165 (1985).
86. Arad, D., Langridge, R. & Kollman, P. A. A Simulation of the Sulfur Attack in the Catalytic Pathway of Papain Using Molecular Mechanics and Semiempirical Quantum Mechanics. *J. Am. Chem. Soc.* **112**, 491–502 (1990).
87. Wei, D., Huang, X., Liu, J., Tang, M. & Zhan, C. G. Reaction pathway and free energy profile for papain-catalyzed hydrolysis of N-acetyl-phe-Gly 4-nitroanilide. *Biochemistry* **52**, 5145–5154 (2013).
88. Štrajbl, M., Florián, J. & Warshel, A. Ab initio evaluation of the potential surface for general base-catalyzed methanolysis of formamide: A reference solution reaction for studies of serine proteases. *J. Am. Chem. Soc.* **122**, 5354–5366 (2000).
89. Otto, H.-H. & Schirmeister, T. Cysteine Proteases and Their Inhibitors. *Chem. Rev.* **97**, 133–172.
90. Cesco, S., Kurian, J., Dufresne, C., Mittermaier, A. K. & Moitessier, N. Covalent inhibitors design and discovery. *Eur. J. Med. Chem.* **138**, 96–114 (2017).
91. Lagoutte, R., Patouret, R. & Winssinger, N. Covalent inhibitors. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **39**, 54–63 (2017).
92. De Cesco, S., Kurian, J., Dufresne, C., Mittermaier, A. K. & Moitessier, N. Covalent inhibitors design and discovery. *Eur. J. Med. Chem.* **138**, 96–114 (2017).
93. Trippier, P. C. & McGuigan, C. Boronic acids in medicinal chemistry: Anticancer, antibacterial and antiviral applications. *Medchemcomm* **1**, 183–198 (2010).
94. Curran, M. P. & McKeage, K. Bortezomib: A review of its use in patients with multiple myeloma. *Drugs*

- 69, 859–888 (2009).
95. DeFronzo, R. A. *et al.* The Efficacy and Safety of Saxagliptin When Added to Metformin Therapy in. *Emerg. Treat. Technol.* **32**, 1649–1655 (2009).
 96. Schirmeister, T. & Klockow, A. Cysteine Protease Inhibitors Containing Small Rings. *Mini Rev. Med. Chem.* **3**, 585–596.
 97. Bauer, R. A. Covalent inhibitors in drug discovery: From accidental discoveries to avoided liabilities and designed therapies. *Drug Discov. Today* **20**, 1061–1073 (2015).
 98. Eschenburg, S., Priestman, M. & Schönbrunn, E. Evidence that the fosfomycin target Cys115 in UDP-N-acetylglucosamine Enolpyruvyl Transferase (MurA) is essential for product release. *J. Biol. Chem.* **280**, 3757–3763 (2005).
 99. C. Potts, B. *et al.* *Marizomib, a Proteasome Inhibitor for All Seasons: Preclinical Profile and a Framework for Clinical Trials.* *Current Cancer Drug Targets* vol. 11 (2011).
 100. Kelly, G. T., Liu, C., Smith, R., Coleman, R. S. & Watanabe, C. M. H. Cellular Effects Induced by the Antitumor Agent Azinomycin B. *Chem. Biol.* **13**, 485–492 (2006).
 101. Sotriffer, C. Docking of Covalent Ligands. *Mol. Inform.* **37**, e1800062 (2018).
 102. Schmidt, T. C. *et al.* Protocol for rational design of covalently interacting inhibitors. *Chemphyschem* **15**, 3226–3235 (2014).
 103. Gilard, M., Arnaud, B., Le Gal, G., Abgrall, J. F. & Boschhat, J. Influence of omeprazol on the antiplatelet action of clopidogrel associated to aspirin [8]. *J. Thromb. Haemost.* **4**, 2508–2509 (2006).
 104. Baillie, T. A. Zielgerichtete kovalente Inhibitoren für das Wirkstoffdesign. *Angew. Chemie* **128**, 13606–13619 (2016).
 105. Sotriffer, C. Docking of Covalent Ligands: Challenges and Approaches. *Mol. Inform.* **37**, (2018).
 106. Hézode, C. *et al.* Effectiveness of telaprevir or boceprevir in treatment-experienced patients with HCV genotype 1 infection and cirrhosis. *Gastroenterology* **147**, 132-142.e4 (2014).
 107. Janjigian, Y. Y. *et al.* Dual inhibition of EGFR with afatinib and cetuximab in kinase inhibitor-resistant EGFR-mutant lung cancer with and without T790M mutations. *Cancer Discov.* **4**, 1036–1045 (2014).
 108. Parmar, S., Patel, K. & Pinilla-Ibarz, J. Ibrutinib (Imbruvica): A novel targeted therapy for chronic lymphocytic leukemia. *P T* **39**, 483–488 (2014).
 109. Moldoveanu, T., Campbell, R. L., Cuerrier, D. & Davies, P. L. Crystal structures of calpain-E64 and -leupeptin inhibitor complexes reveal mobile loops gating the active site. *J. Mol. Biol.* **343**, 1313–1326 (2004).

110. Yamamoto, A. *et al.* Binding Mode of CA074, a Specific Irreversible Inhibitor, to Bovine Cathepsin B as Determined by X-Ray Crystal Analysis of the Complex. *J. Biochem.* **121**, 974–977.
111. Schirmeister, T. & Peric, M. Aziridinyl peptides as inhibitors of cysteine proteases. *Bioorg. Med. Chem.* **8**, 1281–1291.
112. Schirmeister, T. New peptidic cysteine protease inhibitors derived from the electrophilic alpha-amino acid aziridine-2,3-dicarboxylic acid. *J. Med. Chem.* **42**, 560–572 (1999).
113. Vicik, R. *et al.* Aziridine-2,3-dicarboxylate inhibitors targeting the major cysteine protease of *Trypanosoma brucei* as lead trypanocidal agents. *Bioorg Med Chem Lett* **16**, 2753–2757 (2006).
114. Buback, V., Mladenovic, M., Engels, B. & Schirmeister, T. Rational design of improved aziridine-based inhibitors of cysteine proteases. *J Phys Chem* **113**, 5282–5289 (2009).
115. Schad, C. *et al.* Development of a New Antileishmanial Aziridine-2,3-Dicarboxylate-Based Inhibitor with High Selectivity for Parasite Cysteine Proteases. *Antimicrob. Agents Chemother.* **60**, 797–805 (2016).
116. Schurigt, U. *et al.* Aziridine-2,3-dicarboxylate-based cysteine cathepsin inhibitors induce cell death in *Leishmania major* associated with accumulation of debris in autophagy-related lysosome-like vacuoles. *Antimicrob. Agents Chemother.* **54**, 5028–5041 (2010).
117. Vicik, R. *et al.* Aziridine-based inhibitors of cathepsin L. *ChemMedChem* **1**, 1126–1141 (2006).
118. Ponte-Sucre, A., Vicik, R., Schultheis, M., Schirmeister, T. & Moll, H. Aziridine-2,3-dicarboxylates, peptidomimetic cysteine protease inhibitors with antileishmanial activity. *Antimicrob. Agents Chemother.* **50**, 2439–2447 (2006).
119. Vicik, R., Helten, H., Schirmeister, T. & Engels, B. Rational design of aziridine-containing cysteine protease inhibitors with improved potency: Studies on inhibition mechanism. *ChemMedChem* **1**, 1021–1028 (2006).
120. Schirmeister, T. & Peric, M. Aziridinyl peptides as inhibitors of cysteine proteases: Effect of a free carboxylic acid function on inhibition. *Bioorganic Med. Chem.* **8**, 1281–1291 (2000).
121. Klebe, G. *Wirkstoffdesign*. (Springer Verlag, 2009).
122. Lindvall, M. Molecular Modeling in Cysteine Protease Inhibitor Design. *Curr. Pharm. Des.* **8**, 1673–1681 (2005).
123. Leach, A. R. Molecular modelling.pdf. *Chemie unserer Zeit* (2001).
124. Sánchez, R. & Šali, A. Advances in comparative protein-structure modelling. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **7**, 206–214 (1997).
125. Schmidt, T., Bergner, A. & Schwede, T. Modelling three-dimensional protein structures for applications

- in drug design. *Drug Discov. Today* **19**, 890–897 (2014).
126. Hopkins, J. Structure-based drug design L Mario Amzel. 366–369 (1998).
 127. Trott, O. & Olson, A. Autodock vina: improving the speed and accuracy of docking. *J. Comput. Chem.* **31**, 455–461 (2010).
 128. Friesner, R. A. *et al.* Glide: A New Approach for Rapid, Accurate Docking and Scoring. 1. Method and Assessment of Docking Accuracy. *J. Med. Chem.* **47**, 1739–1749 (2004).
 129. Verdonk, M. L., Cole, J. C., Hartshorn, M. J., Murray, C. W. & Taylor, R. D. Improved protein-ligand docking using GOLD. *Proteins Struct. Funct. Genet.* **52**, 609–623 (2003).
 130. Kramer, B., Rarey, M. & Lengauer, T. Evaluation of the FlexX incremental construction algorithm for protein- ligand docking. *Proteins Struct. Funct. Genet.* **37**, 228–241 (1999).
 131. Jones, G., Willett, P. & Glen, R. C. Molecular recognition of receptor sites using a genetic algorithm with a description of desolvation. *J. Mol. Biol.* **245**, 43–53 (1995).
 132. Scholz, C., Knorr, S., Hamacher, K. & Schmidt, B. DOCKTITE-A highly versatile step-by-step workflow for covalent docking and virtual screening in the molecular operating environment. *J. Chem. Inf. Model.* **55**, 398–406 (2015).
 133. McMartin, C. & Bohacek, R. S. QXP: Powerful, rapid computer algorithms for structure-based drug design. *J. Comput. Aided. Mol. Des.* **11**, 333–344 (1997).
 134. Kumalo, H. M., Bhakat, S. & Soliman, M. E. S. Theory and applications of covalent docking in drug discovery: Merits and pitfalls. *Molecules* **20**, 1984–2000 (2015).
 135. Schröder, J. *et al.* Docking-based virtual screening of covalently binding ligands: An orthogonal lead discovery approach. *J. Med. Chem.* **56**, 1478–1490 (2013).
 136. Murphy, R. B., Philipp, D. M. & Friesner, R. A. Mechanics (QM / MM) Method for Large-Scale Modeling of Chemistry in Protein Environments. *J. Comput. Chem.* **21**, 1442–1457 (2000).
 137. Liu, H. *et al.* Quantum mechanics simulation of protein dynamics on long timescale. *Proteins Struct. Funct. Genet.* **44**, 484–489 (2001).
 138. Schirmeister, T. *et al.* Quantum Chemical-Based Protocol for the Rational Design of Covalent Inhibitors. *J. Am. Chem. Soc.* **138**, 8332–8335 (2016).
 139. Ai, Y., Yu, L., Tan, X., Chai, X. & Liu, S. Discovery of Covalent Ligands via Noncovalent Docking by Dissecting Covalent Docking Based on a ‘Steric-Clashes Alleviating Receptor (SCAR)’ Strategy. *J. Chem. Inf. Model.* **56**, 1563–1575 (2016).
 140. Bohm, H. J. The computer program LUDI: a new method for the de novo design of enzyme inhibitors. *J.*

- Comput. Aided. Mol. Des.* **6**, 61–78 (1992).
141. Böhm, H. J. LUDI: rule-based automatic design of new substituents for enzyme inhibitor leads. *J. Comput. Aided. Mol. Des.* **6**, 593–606 (1992).
 142. Huang, S. Y., Grinter, S. Z. & Zou, X. Scoring functions and their evaluation methods for protein-ligand docking: Recent advances and future directions. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **12**, 12899–12908 (2010).
 143. Böhm, H. J. The development of a simple empirical scoring function to estimate the binding constant for a protein-ligand complex of known three-dimensional structure. *J. Comput. Aided. Mol. Des.* **8**, 243–256 (1994).
 144. Schirmeister, T. Aziridine-2,3-dicarboxylic Acid Derivatives as Inhibitors of Papain. *Arch. Pharm.* **329**, 239–244.
 145. Schirmeister, T. Inhibition of cysteine proteases by peptides containing aziridine-2,3-dicarboxylic acid building blocks. *Biopolymers* **51**, 87–97.
 146. Štern, I., Schaschke, N., Moroder, L. & Turk, D. Crystal structure of NS-134 in complex with bovine cathepsin B: A two-headed epoxysuccinyl inhibitor extends along the entire active-site cleft. *Biochem. J.* **381**, 511–517 (2004).
 147. Greenspan, P. D. *et al.* Identification of dipeptidyl nitriles as potent and selective inhibitors of cathepsin B through structure-based drug design. *J. Med. Chem.* **44**, 4524–4534 (2001).
 148. Musil, D. *et al.* The refined 2.15 Å X-ray crystal structure of human liver cathepsin B: the structural basis for its specificity. *EMBO J.* **10**, 2321–2330 (1991).
 149. Halgren, T. A. Merck molecular force field. I. Basis, form, scope, parameterization, and performance of MMFF94. *J. Comput. Chem.* **17**, 490–519.
 150. Wang, J., Wolf, R. M., Caldwell, J. W., Kollman, P. A. & Case, D. A. Development and testing of a general amber force field. *J. Comput. Chem.* **25**, 1157–1174 (2004).
 151. Fey, P. *Dissertation: Neue wasserlösliche Cystein-Protease-Inhibitoren mit Aziridin-2,3-dicarbonsäure-Baustein.*
 152. Cavasotto, C. N. & Phatak, S. S. Homology modeling in drug discovery: current trends and applications. *Drug Discov. Today* **14**, 676–683 (2009).
 153. Vilar, S., Cozza, G. & Moro, S. Medicinal Chemistry and the Molecular Operating Environment (MOE): Application of QSAR and Molecular Docking to Drug Discovery. *Curr. Top. Med. Chem.* **8**, 1555–1572 (2008).
 154. Ferreira, R. S. *et al.* Complementarity between a docking and a high-throughput screen in discovering new cruzain inhibitors. *J. Med. Chem.* **53**, 4891–4905 (2010).

155. Apweiler, R. *et al.* Activities at the Universal Protein Resource (UniProt). *Nucleic Acids Res.* **42**, 191–198 (2014).
156. Ferreira, R. S. *et al.* Complementarity between a docking and a high-throughput screen in discovering new cruzain inhibitors. *J. Med. Chem.* **53**, 4891–4905 (2010).
157. Labute, P. The generalized Born/volume integral implicit solvent model. *J Comput Chem* **29**, 1693–1698 (2008).
158. Breuning, A., Vicik, R. & Schirmeister, T. An improved synthesis of aziridine-2,3-dicarboxylates via azido alcohols—epimerization studies. *Tetrahedron-Asymmetr* **14**, 3301–3312.
159. Furukw, N. & OAE, S. The Michael Type Addition of Free Sulfilimine. *Synthesis (Stuttg)*. **1976**, 30–32.
160. Pöchlauer, P., Müller, E. P. & Peringer, P. Zum Mechanismus der Aziridinsynthese aus 2-Azidoalkoholen und Triphenylphosphin. *Helv. Chim. Acta* **67**, 1238–1247 (1984).
161. Furukawa, N., Ohtsu, M., Akasaka, T. & OAE, S. One step synthesis of aziridines by the Michael type addition of free sulfimides. *Tetrahedron* **36**, 73–80.
162. Sureshbabu, V. V., Lalithamba, H. S., Narendra, N. & Hemantha, H. P. New and simple synthesis of acid azides, ureas and carbamates from carboxylic acids: Application of peptide coupling agents EDC and HBTU. *Org. Biomol. Chem.* **8**, 835–840 (2010).
163. Cox, R. J. & Wang, P. S. H. Synthesis and in vitro enzyme activity of aza, oxa and thia derivatives of bacterial cell wall biosynthesis intermediates†. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* 2022–2034 (2001) doi:10.1039/B105117M M4 - Citavi.
164. Clayden. *Organic Chemistry*. (2012).
165. Stanković, S. *et al.* Regioselectivity in the ring opening of non-activated aziridines. *Chem. Soc. Rev.* **41**, 643–665 (2012).
166. Wissmann, H. & Kleiner, H. -J. New Peptide Synthesis. *Angew. Chemie Int. Ed. English* **19**, 133–134 (1980).
167. Yung-Chi, C. & Prusoff, W. H. Relationship between the inhibition constant (KI) and the concentration of inhibitor which causes 50 per cent inhibition (I50) of an enzymatic reaction. *Biochem. Pharmacol.* **22**, 3099–3108 (1973).
168. Kerr, I. D. *et al.* Vinyl sulfones as antiparasitic agents and a structural basis for drug design. *J. Biol. Chem.* **284**, 25697–25703 (2009).
169. Cox, R. J. & Wang, P. S. H. Synthesis and in vitro enzyme activity of aza, oxa and thia derivatives of bacterial cell wall biosynthesis intermediates. *J. Chem. Soc. Perkin 1* **1**, 2022–2034 (2001).
170. Hu, Y., Yamada, K. A., Chalmers, D. K., Annavajjula, D. P. & Covey, D. F. Enantioselective synthesis of

cyclothiazide analogues: Novel probes of the stereospecific actions of benzothiadiazines at AMPA-type glutamate receptors. *J. Am. Chem. Soc.* **118**, 4550–4559 (1996).

Roula Chartomatsidou

Persönliche Daten

Anschrift: Theodor-Körner-Str. 9, 65428 Rüsselsheim

Email: Roula.Chartomatsidou@web.de

Telefon (Mobil): +49178 8510793

Geburtsdatum/-ort: 13.08.1986 / Thessaloniki, Griechenland

Akademischer und schulischer Werdegang

- seit 04/2013 Promotion in der Pharmazeutischen und Medizinischen Chemie
Arbeitsgruppe von Univ.-Prof. Tanja Schirmeister
Institut für Pharmazie und Biochemie
Johannes Gutenberg-Universität Mainz
Schwerpunkte: Organische Synthese, Analytik (LC-MS, NMR, HPLC, FT-IR)
computergestütztes Wirkstoffdesign (MOE, LeadIT)
- 12/2013 - 06/2015 Mutterschutz und Elternzeit
- 04/2013 - 10/2019 Wissenschaftliche Mitarbeiterin in Forschung und Lehre
Betreuung von Laborpraktika, Seminaren, Bachelor- und Masterarbeiten
- 06/2012 - 03/2013 Diplomarbeit in der Pharmazeutischen und Medizinischen Chemie
Arbeitsgruppe von Univ.-Prof. Tanja Schirmeister
Institut für Pharmazie und Biochemie
Johannes Gutenberg-Universität Mainz
Schwerpunkte: organische Synthese, Analytik (LC-MS, NMR, FT-IR)

- 08/2011 - 02/2012 Erasmus-Forschungssemester
Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Garrigues Mateo
Department of Analytical Chemistry
University of Valencia, Spain
Schwerpunkte: Lebensmittelanalytik (GC-MS, LC-MS, FT-IR)
- 10/2006 - 03/2013 Studium der Diplom-Chemie
Johannes Gutenberg-Universität Mainz
Abschluss: Dipl.-Chemikerin (Note: 1.7)
- 08/1993 - 06/2006 Max-Planck-Gymnasium Rüsselsheim
Allgemeine Hochschulreife

Wissenschaftliche Publikationen und Stipendium

- 08/2018 Fey P., Chartomatsidou R., Kiefer W., Mottram J.C., Kersten C., Schirmeister T., New aziridine-based inhibitors of cathepsin L-like cysteine proteases with selectivity for the Leishmania cysteine protease LmCPB2.8. *Eur J Med Chem* **2018**, 156, 587-597.
- 04/2013 – 04/2015 Stipendium der Dr. Georg-Scheuing-Stiftung

Weitere Qualifikationen

- EDV-Kenntnisse MS-Office, LeadIT, MOE, ChemDraw, MestreNova
- Sprachen Deutsch, Englisch, Griechisch (Muttersprache)

Mainz, den

Roula Chartomatsidou