

Rationales Design, Synthese und Testung kovalent-reversibler Cysteinproteaseinhibitoren



JOHANNES GUTENBERG
UNIVERSITÄT MAINZ

Dissertation

zur Erlangung des Grades

"Doktor der Naturwissenschaften"

im Promotionsfach Pharmazeutische und Medizinische Chemie

am Fachbereich Chemie, Pharmazie und Geowissenschaften

der Johannes Gutenberg-Universität

in Mainz

Diplom-Chemiker Jochen Kesselring

geb. in Bruchsal

Mainz 2017

Eingereicht beim Fachbereich Chemie, Pharmazie und Geowissenschaften am: 15.02.2017

1. Berichterstatter: XXX

2. Berichterstatter: XXX

Tag des öffentlichen Promotionskolloquiums: 24.03.2017

... für Lisa & Jonah

Teile dieser Arbeit wurden bereits in den folgenden Publikationen veröffentlicht:

- **Quantum Chemical-Based Protocol for the Rational Design of Covalent Inhibitors.**
Tanja Schirmeister, Jochen Kesselring, Sascha Jung, Thomas H. Schneider, Anastasia Weickert, Johannes Becker, Wook Lee, Denise Bamberger, Peter R. Wich, Ute Distler, Stefan Tenzer, Patrick Johé, Ute A. Hellmich, und Bernd Engels.
Journal of the American Chemical Society, **2016**, *138* (27), 8332-8335.
- **Dipeptidyl Nitroalkenes as Potent Reversible Inhibitors of Cysteine Proteases Rhodesain and Cruzain**
Antonio Latorre, Tanja Schirmeister, Jochen Kesselring, Sascha Jung, Patrick Johé, Ute A. Hellmich, Anna Heilos, Bernd Engels, R. Luise Krauth-Siegel, Natalie Dirdjaja, Lledó Bou-Iserte, Santiago Rodríguez, and Florenci V. González.
ACS Medicinal Chemistry Letters, **2016**, *7* (12), 1073-1076.
- **Dipeptidyl Enoates as Potent Rhodesain Inhibitors that Display a Dual Mode of Action.**
Royo, S., Rodríguez, S., Schirmeister, T., Kesselring, J., Kaiser, M. und González, F. V.
ChemMedChem, **2015**, *10*, 1484–1487.
- **Synthesis and biological evaluation of novel peptidomimetics as rhodesain inhibitors**
Roberta Ettari, Santo Previti, Sandro Cosconati, Jochen Kesselring, Tanja Schirmeister, Silvana Grasso, und Maria Zappalà.
Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry, **2016**, *31* (6), 1184-1191.
- **Targeting of the *Leishmania mexicana* cysteine protease CPB2.8ΔCTE by decorated fused benzo[b]thiophene scaffold**
Scala, A.; Micale, N.; Piperno, A.; Rescifina, A.; Schirmeister, T.; Kesselring, J.; Grassi, G.
RSC Advances, **2016**, *6*, 30628-30635.

Teile dieser Arbeit wurden außerdem im Rahmen von Posterbeiträgen auf folgenden Tagungen präsentiert:

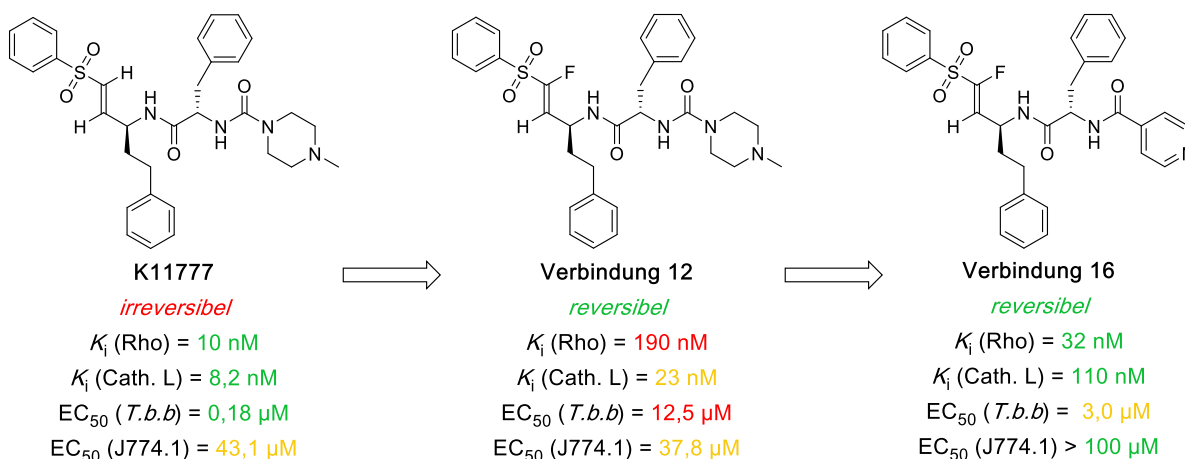
- **DPhG-Jahrestagung 2012** in Greifswald, 10.-13.10.2012: “Moleküle, Targets und Tabletten – Translationale Forschung für Arzneimittel der Zukunft” (Deutsche Pharmazeutische Gesellschaft e.V.)
- **7. Joint Ph.D. Students Meeting** in Freudenstadt/Lauterbad: “New drugs and targets to fight against infectious diseases” (SFB 766 & SFB 633).
- **DPhG-Jahrestagung 2013** in Freiburg/Breisgau, 08.-11.10.2013: “Drug Discovery inspired by Nature” (Deutsche Pharmazeutische Gesellschaft e.V.)
- **DPhG-Jahrestagung 2014** in Frankfurt a.M., 24.-26.09.2014: “Trends and Perspectives in Pharmaceutical Sciences” (Deutsche Pharmazeutische Gesellschaft e.V.)
- **8th Joint Ph.D. Students Meeting** in Retzbach, 12/2014, (SFB 630, SFB 766 und FOR 854)

Zusammenfassung

Trotz der Tatsache, dass einigen der erfolgreichsten zugelassenen Arzneistoffe ein kovalenter, irreversibler Wirkmechanismus zugrunde liegt und in den letzten Jahren einige Vorurteile gegenüber Wirkstoffkandidaten mit einem solchen Wirkmechanismus abgebaut wurden, existieren nach wie vor noch Bedenken gegenüber solchen Substanzen. So wird mit kovalenten Inhibitoren ein toxisches und immunogenes Potenzial in Verbindung gebracht, welches aus unspezifischen Reaktionen mit *off-target*-Molekülen resultieren könnte. Trotz zahlreicher positiver Eigenschaften von kovalenten Inhibitoren (u.a. erhöhte Affinität und längere Wirkdauer, Vermeidung von Resistenzentwicklung, günstige Pharmakokinetik), wurden in der Vergangenheit kaum Anstrengungen unternommen, gezielt solche kovalenten Inhibitoren zu entwickeln. Eine Möglichkeit einige der potenziellen Risiken von kovalenten Inhibitoren zu vermeiden und gleichzeitig die positiven Eigenschaften beizubehalten, besteht in der Entwicklung von kovalent-reversiblen Inhibitoren.

Im Rahmen dieser Arbeit sollten gezielt Cysteinproteaseinhibitoren mit einem solchen kovalent-reversiblen Mechanismus entwickelt werden. Der Fokus lag dabei insbesondere auf der parasitären Cysteinprotease Rhodesain, ein *target* zur Behandlung der Afrikanischen Trypanosomiasis („Schlafkrankheit“). Zum rationalen Design wurden verschiedene computergestützte Methoden wie QM/MM-Berechnungen und Methoden des molekularen Dockings eingesetzt. Basierend auf der Leitstruktur K11777 – ein kovalenter und irreversibler Inhibitor aus der Strukturklasse der Vinylsulfone – konnten so Halogen-substituierte Vinylsulfone identifiziert und synthetisiert werden, die den angestrebten kovalent-reversiblen Wirkmechanismus aufweisen. Dabei konnte die Reversibilität durch Verdünnungsassays und Dialyseexperimente nachgewiesen werden, während eine kovalente Bindung durch massenspektrometrische Untersuchungen belegt wurde.

Weiterhin wurde die peptidische Erkennungssequenz der Leitstruktur modifiziert, mit dem Ziel eine Verbesserung der Affinität zu dem Zielenzym zu erreichen. Basierend auf Dockinguntersuchungen konnten so weitere Verbindungen synthetisiert werden, die neben dem kovalent-reversiblen Wirkmechanismus eine höhere Affinität zu Rhodesain aufweisen. Des Weiteren konnten im Rahmen dieser Strukturoptimierungen Verbindungen identifiziert werden, die eine verbesserte Selektivität gegenüber der parasitären Protease im Vergleich zu den humanen Cathepsinen B und L sowie eine höhere antitrypanosomale Aktivität, bei gleichzeitig verminderter Toxizität, zeigen.

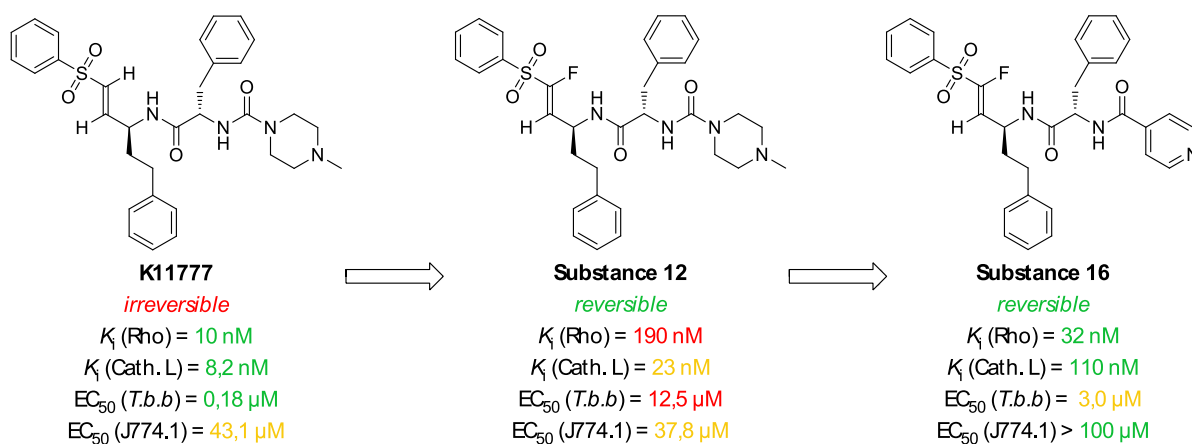


Abstract

Even though the mechanism of action of some of the most successful marketed drugs is based on an irreversible formation of a covalent bond to their respective targets and some prejudices against drug candidates with such a mechanism could be reduced in the last years, there are still some concerns about this type of inhibitors. These concerns include the potential of immunogenic and toxic reactions, arising from possible unspecific off-target reactions. Despite several positive characteristics of covalent inhibitors (e.g. better affinity, longer residence time, lowered risk of resistances, favorable pharmacokinetic profile), only few efforts have been made to rationally design such covalent inhibitors. One possibility to avoid the potential risks of covalent inhibitors, while maintaining some of the advantageous characteristics, is the design of covalent-reversible inhibitors.

The aim of this work was the rational design of cysteine protease inhibitors with such a covalent-reversible mechanism. In particular the focus was put on the parasitic cysteine protease rhodesain, a target for the treatment of African trypanosomiasis ("sleeping sickness"). For the rational design several methods of computer-aided drug design, including QM/MM-calculations and molecular docking were employed. Using these methods, halogen-substituted vinylsulfones, based on the lead structure K11777 – a covalent and irreversible inhibitor – were identified and synthesized, showing the desired covalent-reversible mechanism of action. The reversibility of the inhibition was shown by dilution assays and dialysis experiments, while the formation of a covalent bond could be proofed by mass spectrometric investigations.

Further on, the peptidic recognition unit of the lead structure was modified to achieve an increased affinity to the target enzyme. Based on docking investigations several substances were synthesized, showing not only a covalent-reversible mechanism of action, but also an increased affinity to rhodesain. Some of the substances identified in the framework of these structure optimizations additionally showed an increased selectivity against the parasitic protease compared to the human cathepsins B and L. Furthermore some of the reversible inhibitors showed an increased antitrypanosomal activity, while less toxicity was observed.



Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Proteasen als Target in der Arzneistoffentwicklung	1
1.2 Klassifizierung von Proteasen.....	3
1.3 Cysteinproteasen.....	4
1.3.1 Vorkommen und Funktionen humaner und parasitärer Cysteinproteasen der Papain-Familie	5
1.3.2 Struktur humaner und parasitärer Cysteinproteasen der Papain-Familie	7
1.3.3 Katalysemechanismus von Cysteinproteasen der Papainfamilie	9
1.4 Inhibitoren von Cysteinproteasen	11
1.4.1 Kovalente irreversible Cysteinproteaseinhibitoren.....	11
1.4.2 Kovalent-reversible Cysteinproteaseinhibitoren.....	16
1.4.3 Vergleich kovalent-reversibler und –irreversibler Inhibition	18
2. Zielsetzung	21
3. Ergebnisse: α -Nitril- <i>N,S</i> -Vinylsulfone	23
3.1 Synthese der <i>N,S</i> -Vinylsulfone	26
3.2 Biochemische und biologische Untersuchungen der <i>N,S</i> -Vinylsulfone.....	28
3.2.1 Grundlagen der Enzymkinetik: <i>Michaelis-Menten</i> -Gleichung.....	28
3.2.2 Enzymkinetik unter dem Einfluss von Inhibitoren.....	31
3.2.3 Bestimmung kinetischer Parameter in der Praxis	35
3.2.4 Testergebnisse.....	40
3.3 Diskussion: <i>N,S</i> -Vinylsulfone	42
4. Ergebnisse: α -Halogen-Vinylsulfone	48
4.1 QM-/MM-Berechnungen.....	48
4.2 Synthesen	51
4.2.1 Synthese von K11777	51
4.2.2 Synthese der α -Halogen-Vinylsulfone	54
4.3 Biochemische und biologische Untersuchungen der α -Halogen-Vinylsulfone	56
4.4 Diskussion der Ergebnisse der α -Halogen-Vinylsulfone	73
5. Variation der Erkennungseinheit der α -Halogen-Vinylsulfone.....	80
5.1 Optimierung der Erkennungseinheit durch molekulares Docking	80
5.2 Synthese der Vinylsulfone mit veränderter Erkennungseinheit	85
5.3 Biochemische und biologische Untersuchungen der Vinylsulfone mit veränderter Erkennungseinheit.....	87

5.4. Diskussion der Ergebnisse	92
6. Untersuchungen zur Reversibilität verschiedener Strukturklassen.....	96
7. Zusammenfassung.....	105
8. Experimenteller Teil	108
8.1 Messgeräte und Materialien	108
8.2 Fluorimetrische Enzymassays.....	109
8.3 Allgemeine Arbeitsmethoden	111
8.4 Allgemeine synthetische Methoden	111
8.5 Synthetisierte Verbindungen	114
8.5.1 N,S-Vinylsulfone	114
8.5.2 α -Halogen- und α -H-Vinylsulfone.....	132
9. Anhang	178
9.1 Abkürzungsverzeichnis	178
9.2 Literaturverzeichnis.....	180
Danksagung	189
Lebenslauf	190

1. Einleitung

1.1 Proteasen als Target in der Arzneistoffentwicklung

Proteasen sind Enzyme, die die Spaltung von Peptiden und Proteinen katalysieren. Die von diesen Enzymen katalysierte Reaktion ist die Hydrolyse von Peptidbindungen, weshalb sie in die Klasse der Hydrolasen eingeordnet werden. Sie spielen eine wichtige Rolle in unzähligen physiologischen und pathophysiologischen Vorgängen in praktisch allen Organismen und Viren. Die MEROPS Peptidase-Datenbank^{1,2} listet aktuell mehr als 4000 bekannte Proteasen aus verschiedenen Organismen. Durch bioinformatische Analysen des humanen Genoms konnten mindestens 500 – 600 Proteasen identifiziert werden, was ungefähr 2% des Genoms entspricht.^{3,4} Dabei wurden Proteasen lange Zeit nur als unspezifische proteinabbauende Enzyme z.B. für den Nahrungsverdau und intrazellulären Abbau von Proteinen betrachtet⁵. In heutiger Zeit ist man sich der vielfältigen Rolle von Proteasen z.B. als Signalmolekül in stark regulierten Signaltransduktionswegen bewusst und eine Beteiligung an der Kontrolle von wichtigen physiologischen Prozessen wie Proliferation, Apoptose, DNA-Replikation, Hämostase, Wundheilung und Immunantwort ist bekannt.⁶ In diesem Zusammenhang ist es nicht verwunderlich, dass eine Dysregulation von Proteaseaktivitäten mit einer Vielzahl von pathologischen Zuständen wie Krebs, Osteoporose kardiovaskulären und entzündlichen Erkrankungen in Verbindung gebracht werden kann. Diese Erkenntnisse führten auch dazu, dass Proteasen als Targets in der Arzneistoffentwicklung in den Fokus rückten. So gibt es derzeit zahlreiche Arzneistoffe, die verschiedenste Proteasen adressieren und viel mehr befinden sich in der Entwicklung⁷. Weiterhin spielen Proteasen eine wichtige Rolle bei zahlreichen viralen (z.B. HIV, HCV) und parasitären (z.B. Malaria, Denguefieber, Trypanosomiasis) Erkrankungen, sodass auch hier schon zahlreiche Arzneistoffe auf dem Markt oder in der Entwicklung sind, die die pathogenen Proteasen adressieren.

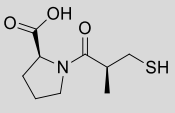
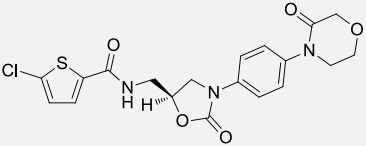
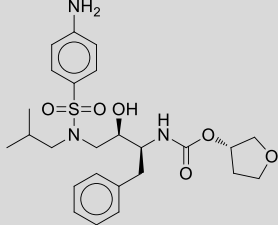
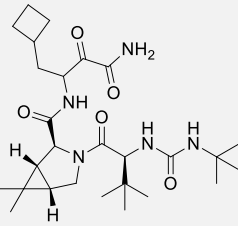
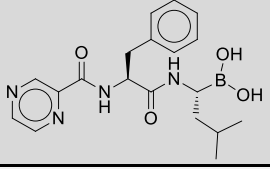
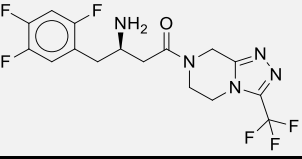
Erkrankungen, bei denen die Proteaseaktivität herabgesetzt ist, spielen eine eher untergeordnete Rolle. Zumeist ist eine gesteigerte oder unangemessene proteolytische Aktivität, hervorgerufen durch verschiedene endogene oder exogene Faktoren, ursächlich für die assoziierten Erkrankungen. Aus diesem Grunde konzentriert sich die Forschung und Entwicklung hauptsächlich auf die Entwicklung von Inhibitoren der betreffenden Proteasen.

Aktuell befinden sich Proteaseinhibitoren zur Behandlung von Bluthochdruck, Blutgerinnungsstörungen, HIV, Hepatitis C, Krebs und Diabetes auf dem Markt (siehe Tabelle 1-1). Die größte Bedeutung spielten dabei bisher Inhibitoren des Angiotensin-konvertierenden Enzyms („ACE-Hemmer“) zur Behandlung der Hypertonie und der Herzinsuffizienz. Aus dieser Klasse befinden sich mittlerweile 14 Vertreter auf dem deutschen Markt und sie zählen zu den umsatzstärksten Arzneistoffen.⁸ Auch die HIV-Proteaseinhibitoren mit zahlreichen Vertretern sind von großer Bedeutung und sind Bestandteil der antiretroviralen Standardtherapie.

Die zunehmende Bedeutung von Proteasen als Targets in der Arzneistoffentwicklung wird klar, wenn man sich in der Entwicklung befindliche Proteaseinhibitoren betrachtet. Diese sollen der Therapie

der verschiedensten Erkrankungen wie z.B. COPD, Immun- und Entzündungskrankheiten, Alzheimer-Krankheit, Malaria, SARS, virale Rhinitis, multiple Sklerose oder Krebs dienen⁷

Tabelle 1-1 Auf dem Markt befindliche Proteaseinhibitoren und einige repräsentative Vertreter

Indikation	Target (Klasse)	Arzneistoff	Struktur
Hypertonie	Angiotensin converting enzyme (ACE) (Metalloprotease)	Captopril	
Thrombose-Prophylaxe	Faktor Xa (Serinprotease)	Rivaroxaban	
AIDS	HIV-Protease (Aspartatprotease)	Amprenavir	
Hepatitis C	NS3-4A (Serinprotease)	Boceprevir	
Krebs (multiples Myelom)	Proteasom (Threoninprotease)	Bortezomib	
Diabetes mellitus Typ 2	Dipeptidylpeptidase 4 (Serinprotease)	Sitagliptin	

Wie die obigen Beispiele zeigen, gibt es schon zahlreiche erfolgreich eingesetzte Proteaseinhibitoren. Dennoch stellt deren Entwicklung nach wie vor eine große Herausforderung dar. Gründe dafür sind zum einen die komplexen Regulationsmechanismen und vielfältigen biologischen Funktionen von Proteasen, die noch nicht gänzlich aufgeklärt sind. Zum anderen bereiten ihr ubiquitäres Vorkommen und große Homologien innerhalb der verschiedenen Klassen Probleme in der Entwicklung von selektiven Inhibitoren.

1.2 Klassifizierung von Proteasen

Prinzipiell kann man Enzyme anhand der von ihnen katalysierten Reaktionen gemäß dem EC-System in sechs verschiedene Klassen einordnen: Oxidoreduktasen (EC 1), Transferasen (EC 2), Hydrolasen (EC 3), Lyasen (EC 4), Isomerasen (EC 5) und Ligasen (EC 6).⁹ Da Proteasen die Hydrolyse von Peptidbindungen katalysieren, werden sie in die Gruppe der Hydrolasen und hier in die Untergruppe EC 3.4 (Peptidasen) eingeordnet. Hier unterscheidet man weiter zwischen Endopeptidasen (spezifische Schnittstelle innerhalb der Polypeptidkette) und Exopeptidasen (Spaltung von endständigen Peptidbindungen beginnend am *N*-Terminus (Aminopeptidasen) oder *C*-Terminus (Carboxypeptidasen)).⁹

Eine weitere sinnvolle Unterteilung erfolgt gemäß dem MEROPS-System, das Proteasen anhand der chemischen Umgebung des aktiven Zentrums bzw. anhand der für den Katalysemechanismus entscheidenden Aminosäuren, in 6 große Untergruppen aufteilt: Aspartat-, Cystein-, Glutamat-, Metallo-, Serin- und Threoninproteasen.¹⁰ Weiterhin existieren Proteasen mit unbekanntem oder gemischtem Katalysemechanismus, die keiner bzw. mehreren Gruppen zugeordnet werden können. Mit der Entdeckung der Asparaginlyasen wurde kürzlich eine siebte Gruppe hinzugefügt. Vertreter dieser Gruppe sind sich selbst spaltende Proteine, die jedoch nicht der Gruppe der Hydrolasen, bzw. Peptidasen zugeordnet werden. Vielmehr handelt es sich um (Amidin-)Lyasen (EC 4.3.2).¹¹

In den einzelnen Gruppen werden die Peptidasen weiter anhand ihres evolutionären Ursprungs und ähnlicher Tertiärstrukturen in Clans und Familien unterteilt. So wird z.B. die im Folgenden näher betrachtete Gruppe der Cysteinproteasen in neun Clans (CA, CD, CE, CF, CL, CM, CN, CO, CP) und 69 Familien unterteilt.

Ein weiteres Unterscheidungsmerkmal der verschiedenen Peptidasegruppen ist der jeweilige Katalysemechanismus. Cystein-, Serin- und Threoninproteasen bedienen sich eines kovalenten Mechanismus, bei denen die namensgebende Aminosäure als Nucleophil dient, während bei Metallo- und Aspartatproteasen ein aktiviertes Wassermolekül diese Rolle einnimmt.

Das aktive Zentrum von Proteasen, sowie die Substratbindetaschen lassen sich anhand einer von *Schechter* und *Berger* eingeführten Nomenklatur beschreiben.¹² Hierbei werden die Reste der zu spaltenden Polypeptidkette ausgehend von der Spaltstelle in Richtung *N*-Terminus mit $P_1 - P_n$ (*non-primed site*), und in Richtung *C*-Terminus mit $P_1' - P_n'$ (*primed site*) bezeichnet. Analog dazu werden die entsprechenden Bindetaschen der Enzyme mit $S_1 - S_n$ bzw. $S_1' - S_n'$ benannt (Abb. 1-1). Auch der Bindemodus von Inhibitoren lässt sich gut auf diese Weise beschreiben.

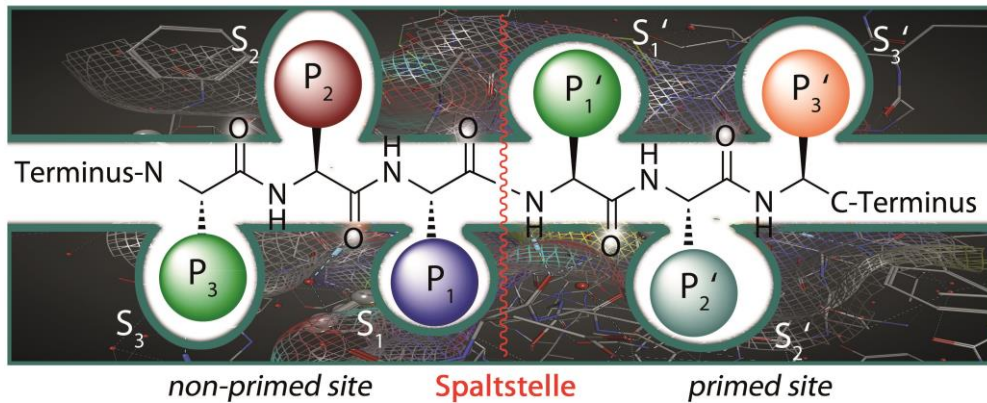


Abbildung 1-1 Nomenklatur von Proteasen und deren Substraten nach Berger und Schechter¹²

1.3 Cysteinproteasen

Cysteinproteasen konnten bisher in praktisch allen Organismen nachgewiesen werden. Wie bereits erwähnt lassen sie sich in 9 Clans und 69 Familien unterteilen. Hierbei werden alleine 36 Familien dem größten Clan CA zugeordnet. Dessen Vertreter weisen große strukturelle Ähnlichkeit zu dem Prototyp dieser Familie, dem in der Papayafrucht vorkommenden Papain auf. Proteasen dieses Clans werden daher auch als Papain-ähnlich bezeichnet. In diesem Clan finden sich viele aus pharmakologischer Sicht interessante Vertreter, wie die humanen Cathepsine B, L, K und S, innerhalb der großen Familie C1. Auch viele parasitäre oder virale Cysteinproteasen mit pharmakologischer Relevanz werden dieser Familie zugeordnet. Tabelle 1-2 gibt einen Überblick über einige wichtige Cysteinproteasen und deren Einordnung.

Tabelle 1-2 Einordnung einiger wichtiger Proteasen

Clan	Familie	Proteasen	Vorkommen
CA	C1	Papain	<i>Carica papaya</i>
		Cathepsin B	<i>Homo sapiens</i>
		Cathepsin L	<i>Homo sapiens</i>
		Rhodesain	<i>Trypanosoma brucei rhodesiense</i>
		Falcipaine 1-3	<i>Plasmodium falciparum</i>
		Cruzain	<i>Trypanosoma cruzi</i>
	C2	Calpaine	<i>Homo sapiens</i>
	C10	Steptopain	<i>Streptococcus pyogenes</i>
	C16	SARS CoV PL	<i>SARS Coronavirus</i>
CD	C47	Staphopain	<i>Staphylococcus aureus</i>
	C11	Clostripain	<i>Clostridium hystolyticum</i>
CL	C14	Caspasen	<i>Homo sapiens</i>
	C60	Sortase	<i>Staphylococcus aureus</i>
CM	C18	HCV peptidase 2	<i>Hepatitis C Virus</i>

1.3.1 Vorkommen und Funktionen humaner und parasitärer Cysteinproteasen der Papain-Familie

Zu den wichtigsten humanen Cysteinproteasen der Papain-Familie zählen die Cathepsine, von denen bisher elf Vertreter identifiziert wurden (Cathepsin B, C, F, H, K, L, O, S, V, X, W). Mit wenigen Ausnahmen findet man diese Enzyme hauptsächlich in endosomalen / lysosomalen Kompartimenten, die ein wichtiges System des intrazellulären Proteinkatabolismus darstellen. Da man hier mit einem pH-Wert von ca. 5 ein leicht saures Milieu vorfindet, entwickeln auch die meisten Cathepsine ihre maximale Aktivität unter leicht sauren Bedingungen. In neutraler oder basischer Umgebung sind diese Enzyme instabil, was einen wichtigen Regulationsmechanismus der Proteaseaktivität darstellt.¹³ Eine weitere Regulation erfolgt durch hochspezifische endogene Inhibitoren wie die Cystatine. Viele Cathepsine werden ubiquitär im humanen Gewebe exprimiert, was durch ihre Rolle im physiologischen, zellulären Proteinumsatz erklärt werden kann. Ausnahmen bilden Cathepsin K, das man hauptsächlich in Osteoklasten, Epithelzellen und Fibroblasten der Gelenkinnenhaut findet, Cathepsin W in Zellen des Immunsystems (CD8⁺- und NK-Zellen) und Cathepsin S in verschiedenen antigenpräsentierenden Zellen. Dies deutet auf eine hochspezifische Funktion dieser Enzyme in den jeweiligen Zellen / Geweben hin. Eine pathologische Überexpression von Cathepsinen konnte mit verschiedenen invasiven und degenerativen Erkrankungen wie Krebs, Osteoporose, rheumatoide Arthritis und muskulärer Dystrophie in Verbindung gebracht werden (siehe Tabelle 1-3).¹⁴⁻¹⁷

Tabelle 1-3 Physiologische Funktion von ausgewählten humanen Cysteinproteasen der Papain-Familie und assoziierte Erkrankungen

Enzym	Physiologische Funktion	Erkrankungen bei Dysregulation
Cathepsin B	Proteindegradation, Apoptose, Hormonreifung, Knochenabbau	Krebs, Alzheimer, Pankreatitis
Cathepsin L	Proteindegradation, Hormonreifung Haut-Homöostase, Antigenprozessierung	Krebs, epidermale Hyperplasie
Cathepsin K	Knochenresorption und -remodelling	Osteoporose
Cathepsin S	Antigenpräsentation, Nozizeption	Rheumatoide Arthritis

Auch bei verschiedenen protozoischen Parasiten konnten einige Cysteinproteasen der Papainfamilie identifiziert werden. Da viele dieser Proteasen wichtige Aufgaben bei der Pathogenese der assoziierten Erkrankungen sowie in der Physiologie der Erreger erfüllen, wurden sie als attraktive Ziele für die Entwicklung neuer Arzneistoffe validiert.¹⁸ Im Gegensatz zu den homologen humanen Enzymen sind viele der parasitären Proteasen auch an extrazellulären Prozessen beteiligt. Dementsprechend liegt auch das pH-Optimum einiger dieser Enzyme nicht im leicht sauren sondern

eher im neutralen Bereich. Tabelle 1-4 gibt einen Überblick über einige parasitäre Cysteinproteasen der Papain-Familie.

Tabelle 1-4 Vorkommen und Funktion einiger parasitärer Cysteinproteasen der Papain-Familie.

Erreger	Proteasen	Humanes Homolog	Funktion	Krankheit
<i>Trypanosoma brucei</i>	Rhodesain	Cath. L	Passage der Blut-Hirn-Schranke Abbau von Immunglobulinen Vermeidung von Immunantwort	Afrikanische Trypanosomiasis („Schlafkrankheit“)
	TbCatB	Cath. B	Essentiell?, Abbau von Wirt-Proteinen	
<i>Trypanosoma cruzi</i>	Cruzain	Cath. L	Essentiell in allen Stadien Vermeidung von Immunantwort Gewebeinvasion	Chagas-Krankheit
<i>Leishmanien</i>	CPA	Cath. L	Wachstum, Entwicklung, Gewebeinvasion, Wirt-Parasit-Interaktion	Leishmaniose
	CPB	Cath. L		
	CPC	Cath. B		
<i>Plasmodium falciparum</i>	Falcipain-1	Cath. L	Hämoglobinabbau, Wachstum, Wirt-Parasit-Interaktion	Malaria
	Falcipain-2	Cath. L		
	Falcipain-3	Cath. L		

Bei *Trypanosoma brucei*, dem protozoischen Erreger der Afrikanischen Schlafkrankheit, konnten zwei Papain-ähnliche Cysteinproteasen identifiziert werden, die in großer Menge von den Parasiten exprimiert werden: Rhodesain und TbCatB. Deren genaue Funktion ist noch nicht vollständig aufgeklärt, beide Proteasen scheinen aber essentiell für das Überleben der Parasiten zu sein. Weiterhin ermöglicht Rhodesain den Parasiten die Passage der Blut-Hirn-Schranke und damit das Fortschreiten der Erkrankung in eine späte, immer tödliche, Phase der Krankheit.¹⁹ Des Weiteren ist dieses Enzym an der ständigen Prozessierung von bestimmten Oberflächenproteinen (*Variant Surface Glycoproteins*) und dem Abbau von Immunglobulinen beteiligt, wodurch eine effiziente Immunantwort des Wirts verhindert wird.^{20,21} TbCatB wird hauptsächlich eine Rolle in der Ernährung des Parasiten durch Abbau von Wirt-Proteinen zugeschrieben.²² Die essentielle Rolle der beiden Enzyme konnte sowohl *in vitro* als auch *in vivo* durch spezifische Inhibitoren oder Gen-*silencing* bestätigt werden.^{23,24}

Auch in dem in Lateinamerika verbreiteten Erreger der Chagas-Krankheit – *Trypanosoma cruzi* – wurde mit Cruzain eine Cysteinprotease der Papain-Familie als essentielles Enzym identifiziert. Durch Inhibition dieses Enzyms konnte eine Heilung oder zumindest eine positive Beeinflussung des Krankheitsverlaufs in verschiedenen Tiermodellen beobachtet werden, sodass sich Inhibitoren dieses Enzyms in späten Stadien der präklinischen Entwicklung befinden.^{25–27}

In *Leishmanien* findet man neben zahlreichen anderen Cysteinproteasen mit CPA, CPB und CPC auch drei Vertreter aus der Papainfamilie. Durch *knockout* der für CPA und CPB codierenden Gene konnte eine Verringerung der Virulenz, sowie ein positive Beeinflussung des Krankheitsverlaufs in infizierten Mäusen gezeigt werden.²⁸ Auch der Einsatz von Cysteinprotease-Inhibitoren zeigte sich *in vitro* und *in vivo* als wirksam, konnte jedoch keine vollständige Heilung erzielen.²⁹⁻³²

In *Plasmodium falciparum*, dem virulentesten Erreger von Malaria wurden mit den Falcipainen 1 -3 mehrere Papain-ähnliche Cysteinproteasen identifiziert, die auch als *targets* in der Arzneimittelentwicklung diskutiert werden. Gut untersuchte Prozesse, an denen diese Enzyme beteiligt sind, sind z.B. die Hydrolyse von Hämoglobin, sowie Invasion und Auflösung von Erythrozyten des Wirts. Insbesondere die Inhibition der Hauptprotease Falcipain 2 scheint hier interessant zu sein. Verschiedene Inhibitoren dieses Enzyms waren in der Lage eine Malariainfektion im Tiermodell zu heilen oder den Krankheitsverlauf zu verlangsamen.³³

1.3.2 Struktur humaner und parasitärer Cysteinproteasen der Papain-Familie

Anhand ihrer Sequenz lassen sich die humanen Cathepsine und parasitäre Cysteinproteasen der Papain-Familie in 3 Gruppen einteilen: Cathepsin B-ähnlich, Cathepsin L-ähnlich und Cathepsin F-ähnlich. Die räumliche Struktur innerhalb der 3 Gruppen ist hierbei sehr ähnlich. Die meisten dieser Enzyme werden zunächst als inaktive Vorläufer, sogenannte Präproenzyme, exprimiert, die neben der katalytischen Domäne noch ein Signalpeptid und eine *N*-Terminalen Prodomäne besitzen.³⁴ Das Signalpeptid ermöglicht nach der ribosomalen Expression den Transport des Enzyms in das Endoplasmatische Retikulum, wo es dann abgeschnitten wird. Die Prodomäne erfüllt mehrere Aufgaben. So ist diese Domäne wichtig für die korrekte Faltung des Enzyms³⁶ und den Weitertransport des Proenzym an seinen Bestimmungsort.^{37,38} Weiterhin fungiert die Prodomäne als hochaffiner, reversibler Inhibitor der Protease, wodurch deren vorzeitige Aktivierung verhindert wird. Wie in Abbildung 1-2 am Beispiel von Procathepsin L gezeigt bindet ein Teil der Propeptidkette in den Bindungsspalt und verhindert so die Bindung von Substraten. Die Prodomänen sind dabei hochspezifisch für die Enzyme ihrer jeweiligen Subfamilie. So ist das Propeptid von Cathepsin L nur ein relativ schwacher Inhibitor von Cathepsin B, zeigt jedoch eine hohe Affinität zu vielen anderen Cathepsin L- ähnlichen Proteasen.³⁹⁻⁴¹ Nach dem Transport an ihren Bestimmungsort, im Falle der Cathepsine z.B. das Lysosom, wird das Propeptid entweder autokatalytisch oder durch andere Proteasen abgespalten, sodass das Enzym dort in der aktiven Form vorliegt.⁴²

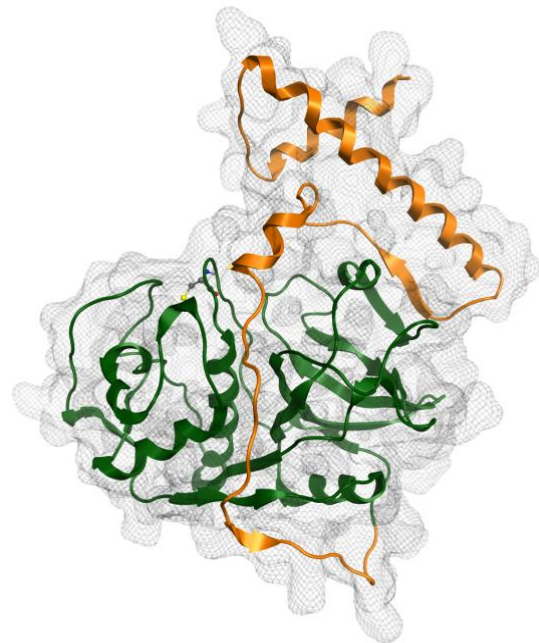


Abbildung 1-2 Procathepsin L (Prodomäne: orange, katalytische Domäne: grün) PDB: 1CJL³⁵

Wie am Beispiel von Cathepsin L (Abb. 1-3) zu sehen, besteht die räumliche Struktur der prozessierten, aktiven Proteasen der Papain-Familie aus einer L- und einer R-Domäne in deren Mitte sich der Bindungsspalt mit dem aktiven Zentrum befindet.⁴³ Der Cysteinrest des aktiven Zentrums befindet sich dabei innerhalb einer α -Helix der L-Domäne, während der für den Katalysemechanismus wichtige Histidinrest in einer β -Faltblatt-Struktur der R-Domäne zu finden ist.

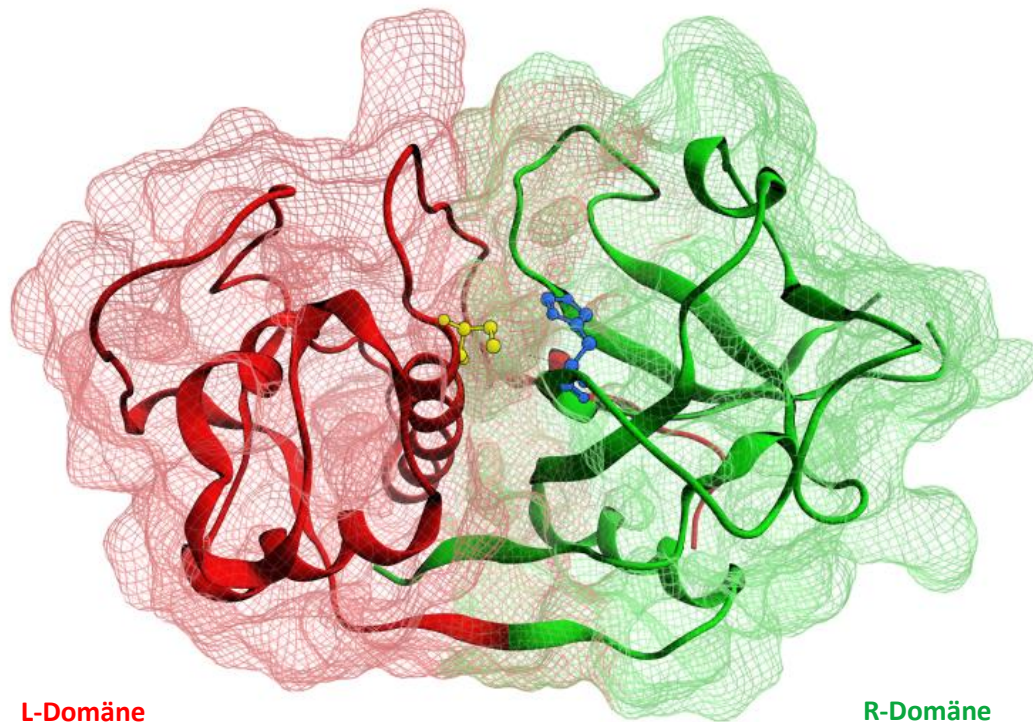


Abbildung 1-3 Räumliche Struktur von Cathepsin L. Rot: L-Domäne, grün: R-Domäne, gelb: Cys25, blau: His163. PDB: 2YJ2⁴⁴

Eine Besonderheit der Cathepsin B-ähnlichen Proteasen ist der sogenannte „occluding loop“ (siehe Abb. 1-4), der für die Dipeptidylcarboxypeptidase-Aktivität dieser Enzyme verantwortlich ist. Dabei blockiert dieses Strukturelement Teile des Bindungsspalt, während zwei positiv geladene Histidinreste die C-terminale Carboxygruppe eines Substrats in der P₂'-Position fixieren und so die Abspaltung eines C-terminalen Dipeptids ermöglichen.⁴⁶ Während dieser Mechanismus bei niedrigen pH-Werten < 5.5 auftritt, beobachtet man bei höherem pH-Wert eine Endopeptidaseaktivität von Cathepsin B und homologen Enzymen.⁴⁷ Diese Eigenschaften lassen sich auch bei der Entwicklung von selektiven Inhibitoren dieser Familie ausnutzen.

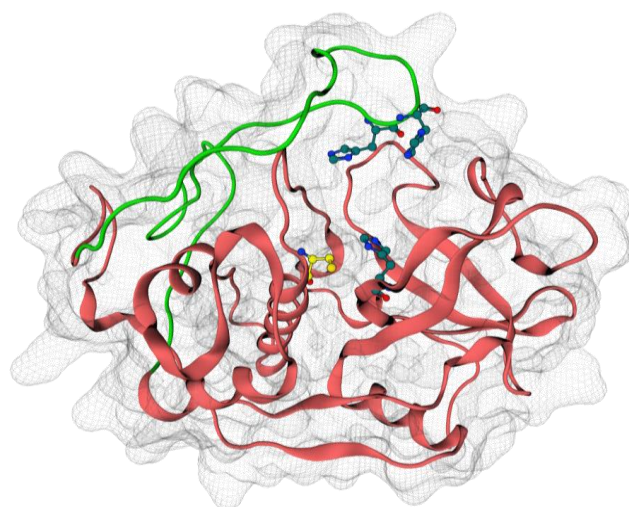


Abbildung 1-4 Räumliche Struktur von Cathepsin B mit *occluding loop* (grün); hervorgehoben: His110, His111, Cys29, His190. PDB: 1GMV⁴⁵

Die große Homologie innerhalb der verschiedenen Cathepsin-ähnlichen Familien lässt sich durch eine Überlagerung homologer Enzyme, wie in Abbildung 1-5 dargestellt, verdeutlichen.

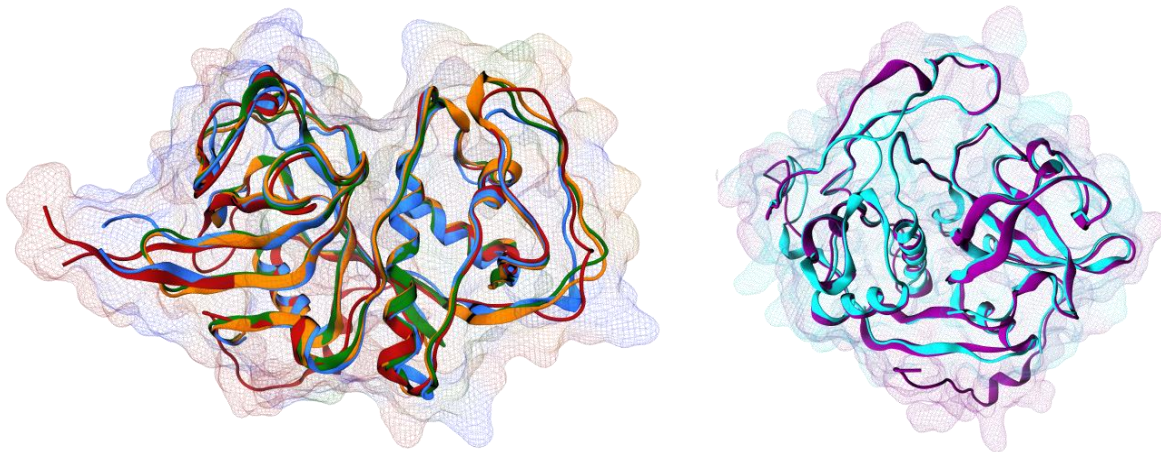


Abbildung 1-5 Überlagerung von Cathepsin L-ähnlichen (links; Cathepsin L: blau PDB: 2YJ8⁴⁴; Rhodesain: orange, PDB: 2P7U⁴⁸; Cruzain: grün, PDB: 3I06⁴⁹; Falcipain-2: rot, PDB: 3BPF⁵⁰) und Cathepsin B-ähnlichen Proteasen (rechts, Cathepsin B: cyan, PDB: 1GMV⁴⁵; TbCatB: lila, PDB: 3HHI⁵¹)

So lassen sich bei Cathepsin L und den homologen parasitären Enzymen Rhodesain, Cruzain und Falcipain-2 (Abb. 1-5, links) nur marginale Unterschiede in der räumlichen Struktur feststellen. Insbesondere der Bereich um das aktive Zentrum und den Bindungsspalt ist dabei hochkonserviert. Ein ähnliches Bild mit hoher Homologie zeigt die Überlagerung der Strukturen von Cathepsin B und dem von *Trypanosoma brucei* exprimierten homologen Enzym TbCatB (Abb. 1-5, rechts).

1.3.3 Katalysemechanismus von Cysteinproteasen der Papainfamilie

Der Mechanismus der katalytischen Hydrolyse von Peptidbindungen durch Cysteinproteasen basiert auf einer sog. katalytischen Triade. Dabei dient ein Cysteinrest im aktiven Zentrum der Protease als Nucleophil während ein Histidinrest als Protonendonor fungiert. Diese beiden Aminosäuren bilden präkatalytisch ein Ionenpaar, sodass der Cysteinrest deprotoniert als Thiolat vorliegt, während das Histidin in der protonierten Form anzutreffen ist. Eine dritte Aminosäure positioniert den Imidazolring des Histidins durch Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen in einer günstigen Stellung. Im Falle der Papain-ähnlichen Proteasen handelt es sich dabei um Asparagin, während bei anderen Proteasen oft eine der sauren Aminosäuren Asparaginsäure oder Glutaminsäure diese

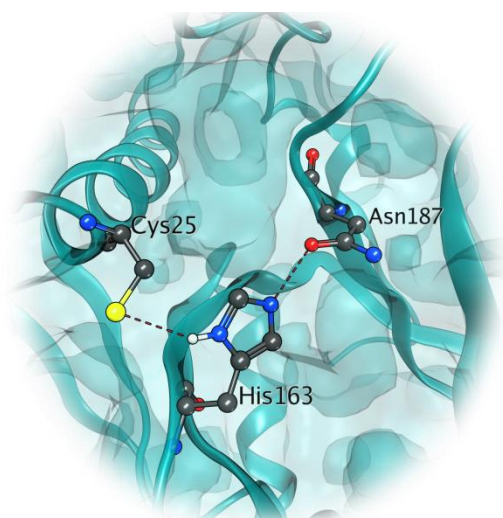


Abbildung 1-6 Katalytische Triade aus Cys25, His163 und Asn187 am Beispiel von Cathepsin L (PDB: 2YJ8⁴⁴)

Rolle einnimmt. Bemerkenswert ist die hohe Acidität des Cystein-Thiolats mit einem pK_S -Wert von ca. 4. Cystein weist normalerweise einen pK_S -Wert von ca. 8 - 9 auf. Diese ungewöhnlich hohe Acidität kann durch eine Stabilisierung des präkatalytischen Thiolat-/Imidazolium-Ionenpaars erklärt werden. Als Ursache für diese Stabilisierung werden mehrere Hypothesen diskutiert. Neben der Rolle des bereits erwähnten Asparaginrests, spielt wahrscheinlich die Lage des Cysteins am Ende einer α -Helix und das von dieser ausgehende Dipolmoment eine wichtige Rolle⁵². Weiterhin trägt vermutlich die Ausbildung eines komplexen Wasserstoffbrückennetzwerks aus mehreren Wassermolekülen und Aminosäuren in der Nähe des aktiven Zentrums zur weiteren Stabilisierung des Ionenpaares bei.^{53,54}

Im ersten Schritt des Katalysemechanismus' erfolgt der nucleophile Angriff des Cystein-Thiolats an den Carbonylkohlenstoff der zu spaltenden Peptidbindung (Abb. 1-7, A). Dies führt zu einem negativ geladenen tetraedrischen Intermediat, das durch Wasserstoffbrückenbindungen in der Oxyanionentasche („oxyanion hole“) des Enzyms stabilisiert wird (Abb 1-7, B). In der Folge ermöglicht die Protonierung der Aminofunktion durch den Histidinrest die Abspaltung des Amins aus dem Zwischenprodukt (Abb. 1-7, C) Das acylierte Enzym wird nun durch ein aktiviertes Wassermolekül nucleophil angegriffen, was zu einem zweiten tetraedrischen Intermediat führt (Abb. 1-7, D). Die Freisetzung der Carbonsäure führt schließlich zur Regeneration des freien Enzyms (Abb. 1-7, E), das nun die Hydrolyse weiterer Substrate katalysieren kann.

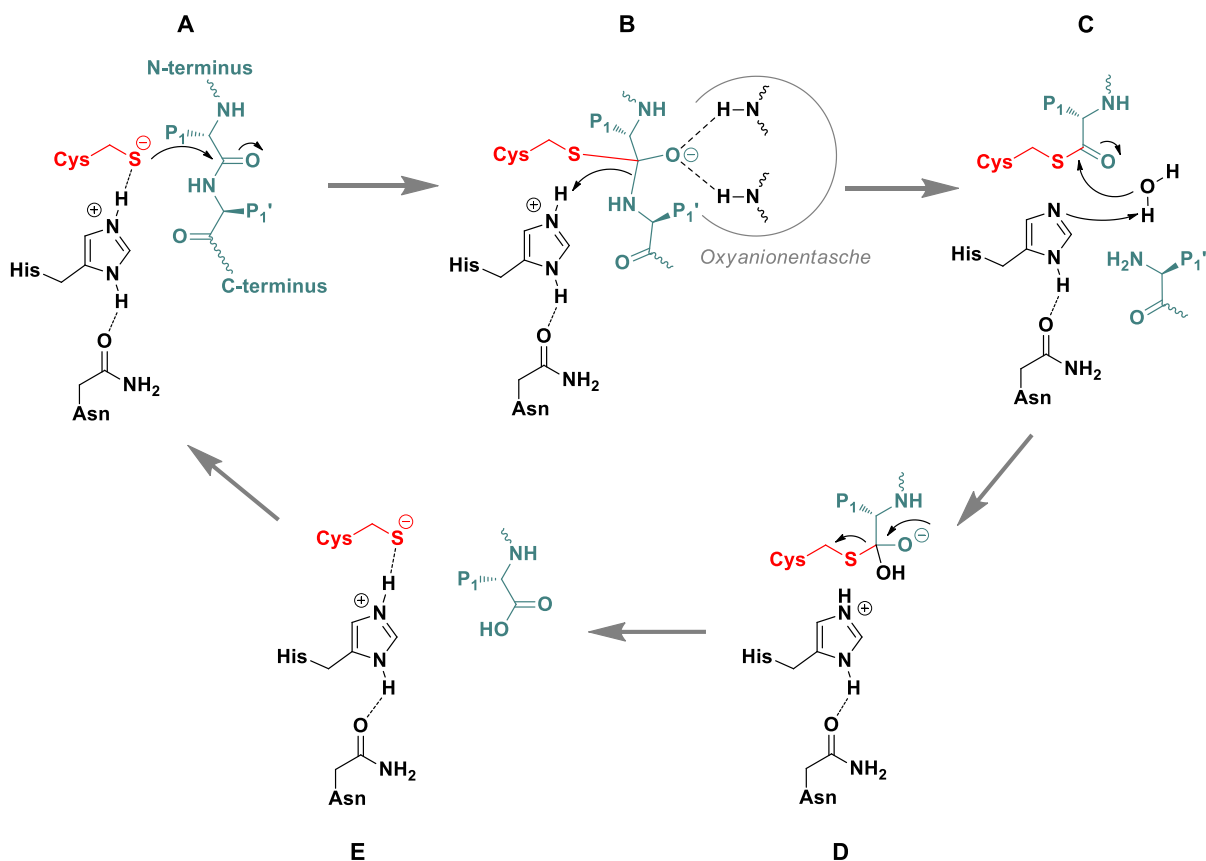


Abbildung 1-7 Mechanismus der katalytischen Hydrolyse von Peptidbindungen durch Cysteinproteasen.

1.4 Inhibitoren von Cysteinproteasen

Prinzipiell lassen sich Proteaseinhibitoren in kompetitive und nicht-kompetitive (allosterische) Inhibitoren unterteilen. Der Inhibitionsmechanismus von allosterischen Inhibitoren beruht auf der Bindung an einer Stelle abseits des aktiven Zentrums. Hierdurch hervorgerufene Konformationsänderungen des Enzyms erschweren oder verhindern die Bindung des Substrats am aktiven Zentrum. Diese Inhibitoren spielen für den Fall von Cysteinproteasen bisher eine eher untergeordnete Rolle. Bei der überwiegenden Zahl von Cysteinproteaseinhibitoren handelt es sich um kompetitive Inhibitoren. Diese können anhand der Interaktionen, die sie mit dem aktiven Zentrum eingehen, weiter in kovalente und nicht-kovalente unterschieden werden. Dabei sind bisher nur wenige nicht-kovalente Inhibitoren bekannt.^{55,56}

Der größte Teil der bekannten Cysteinproteaseinhibitoren lässt sich also der Gruppe der kompetitiven kovalenten Inhibitoren zuordnen. Diese sind oft nach dem gleichen Schema aufgebaut. Sie bestehen meist aus einer Erkennungssequenz, die verschiedene Bindetaschen des Enzyms adressiert, und einem *warhead*, der eine kovalente Bindung mit dem Cysteinrest des aktiven Zentrums eingeht. Die Erkennungssequenz ist dabei oft von peptidischer oder peptidomimetischer Natur und ist den jeweiligen natürlichen Substraten nachempfunden. Seltener kommen hier nichtpeptidische Struktureinheiten zum Einsatz. Als *warhead* wurden bisher unterschiedlichste Strukturelemente eingesetzt, deren Gemeinsamkeit ein elektrophiles Zentrum ist, das den nucleophilen Angriff des Cysteinrestes des aktiven Zentrums ermöglicht. Abhängig von der Struktur des jeweiligen *warheads* kann diese Reaktion reversibel oder irreversibel verlaufen.

1.4.1 Kovalente irreversible Cysteinproteaseinhibitoren

Halomethylketone

Diese Klasse von Inhibitoren ist meist aufgebaut aus einer Sequenz von ein bis drei Aminosäuren und einer endständigen Halomethylketon-Gruppierung. Bei dem Halogen handelt es sich meist um Chlor oder Fluor, seltener um Brom. Verbindungen dieses Aufbaus erwiesen sich als potente Inhibitoren verschiedenster humaner, parasitärer und viraler Cysteinproteasen, wobei hier eine gewisse Selektivität durch Variation der P₁- und P₂-Aminosäuren erreicht werden kann.^{57,58} Aufgrund der hohen Reaktivität des *warheads* besteht allerdings nur eine begrenzte Spezifität für Cysteinproteasen. So werden auch viele Serinproteasen wie β -Chymotrypsin gehemmt. Weiterhin sind Halomethylketone, vor allem die Chlorderivate, in der Lage mit anderen endogenen Thiolen wie Glutathion oder nicht-katalytischen Cysteinresten anderer Proteine zu reagieren.^{59,60} Die damit einhergehende Toxizität lässt diese Verbindungen als ungeeignet für *in vivo* Anwendungen erscheinen. Allerdings werden Halomethylketone nach wie vor als nützliche Instrumente zur Erforschung der Funktion von Serin- und Cysteinproteasen eingesetzt. Der Mechanismus der Inhibition (siehe Abb. 1-8) verläuft wahrscheinlich zunächst über ein tetraedrisches Intermediat. Im zweiten irreversiblen Schritt entsteht über ein intermediäres Sulfoniumion nach Eliminierung des Halogens das alkylierte Enzym.⁶¹

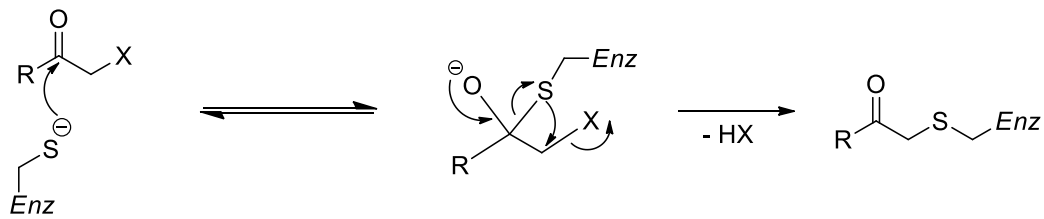


Abbildung 1-8 Mechanismus der Inhibition von Cysteinproteasen durch Halomethylketone

Diazomethylketone

Die Entdeckung von Peptidyl Diazomethanen als Cysteinproteaseinhibitoren beruht auf der Beobachtung, dass die antibiotische Wirkung der Verbindung Azaserin durch die Alkylierung von Thiolresten einer, an der Purinsynthese beteiligten, Amidotransferase hervorgerufen wird. Gleichzeitig war bekannt, dass Diazomethylketone, die in der Synthese von Chloromethylketonen (s.o.) eingesetzt wurden, keine Inhibition von Serinproteasen aufwiesen.⁶² Folglich wurde eine Reihe von Verbindungen bestehend aus zwei bis drei Aminosäuren und dem Diazomethylketon-*warhead* synthetisiert. Diese Verbindungen zeigen eine Spezifität für Cysteinproteasen und sind nicht reaktiv gegenüber einfachen Thiolen. Innerhalb der Gruppe der Cysteinproteasen lässt sich je nach Wahl des peptidischen Teils der Verbindungen, ein gewisses Maß an Selektivität gegenüber verschiedenen humanen und parasitären Cysteinproteasen erzeugen. Die Effektivität von Inhibitoren dieser Klasse gegen *Trypanosoma brucei* und verschiedene *Streptococcen* konnte *in vivo* und *in vitro* gezeigt werden.^{63,64} Allerdings wurde auch ein embryotoxisches Potential *in vitro* beschrieben⁶⁵, weshalb eine mögliche klinische Anwendung dieser Verbindungsklasse, auch aufgrund ihrer Instabilität und chemischen Reaktivität, eher kritisch gesehen wird. Der wahrscheinliche Mechanismus der Inhibition ähnelt dem der Halomethylketone. Zunächst bildet sich durch nucleophilen Angriff des Thiolats im aktiven Zentrum ein tetraedrisches Intermediat mit Hemiketal-Struktur. Dieses wird im zweiten irreversiblen und geschwindigkeitsbestimmenden Schritt durch ein Imidazoliumion im aktiven Zentrum protoniert. Im letzten Schritt bildet sich aus dem resultierenden Diazoniumion über einen dreigliedrigen Übergangszustand unter Stickstoffabspaltung das alkylierte Enzym (siehe Abb. 1-9).

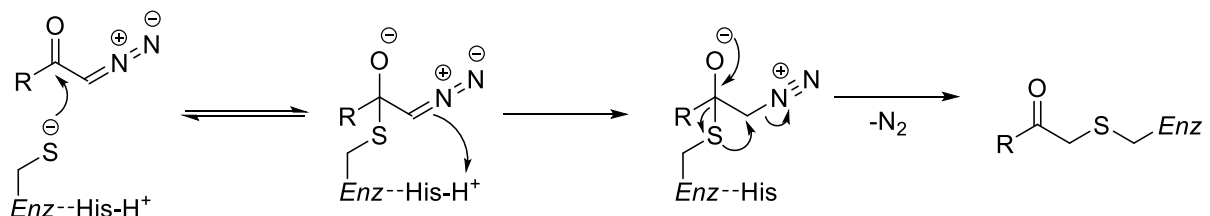


Abbildung 1-9 Wahrscheinlicher Mechanismus der Inhibition von Cysteinproteasen durch Diazomethane.

Epoxide

Als erster Vertreter dieser Klasse wurde 1978 der Naturstoff E-64 aus dem Pilz *Aspergillus japonicus* isoliert (Abb. 1-10). Diese Verbindung ist ein sehr potenter irreversibler Inhibitor mit hoher Selektivität für Cysteinproteasen der Papain-Familie. Weiterhin konnte unter physiologischen Bedingungen keine Reaktion mit einfachen Thiolen beobachtet werden.⁶⁶

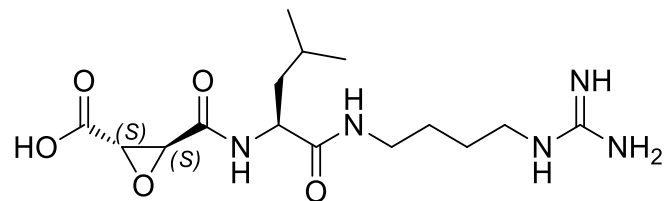


Abbildung 1-10 Struktur von E-64

Als reaktive Gruppe fungiert hier das Epoxysuccinyl-Strukturelement. Die *trans*-(2*S*,3*S*)-Konfiguration am Epoxidring, sowie die *L*-Konfiguration der benachbarten Aminosäure sind dabei wichtig für die inhibitorische Aktivität. Auf Grundlage von E-64 wurden zahlreiche Derivate synthetisiert, wobei sowohl der peptidische Teil als auch die Säurefunktion am Epoxidring modifiziert wurden. Dadurch konnten auch hier Verbindungen mit erhöhter Selektivität gegenüber einzelnen Cysteinproteasen innerhalb der Papinfamilie identifiziert werden. Die geringe Toxizität, physiologische Stabilität gute inhibitorische Aktivität und Selektivität führten schnell zu ersten biologischen Tests, zur Behandlung verschiedenster Cysteinprotease-assoziiierter Erkrankungen, wobei vielversprechende Ergebnisse erhalten wurden. Eine klinische Studie eines Derivats zur Behandlung der muskulären Dystrophie wurde jedoch aufgrund geringer Effektivität *in vivo*, sowie Hinweisen auf schwerwiegende Nebenwirkungen wie Hepatotoxizität und Teratogenität wieder eingestellt.⁶⁷ Mechanistisch verläuft die Inhibition über einen nucleophilen Angriff des Thiolats am C-3-Kohlenstoffatom des Oxiranrings unter Ringöffnung und Inversion der Konfiguration an C-3 (Abb. 1-11). Vereinzelt wurde bei bestimmten Inhibitoren, deren peptidischer Teil die *primed site* (S') von Cathepsin B adressiert, auch ein Angriff an C-2 beobachtet.⁶⁸

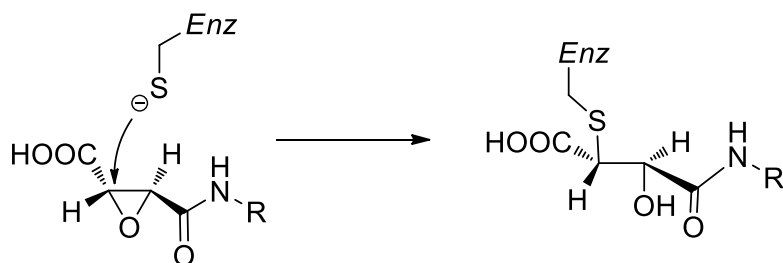
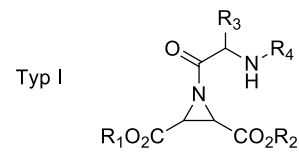


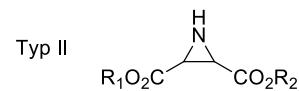
Abbildung 1-11 Mechanismus der Inhibition von Cysteinproteasen durch Epoxide

Aziridine

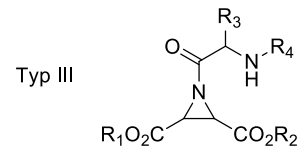
Bei dieser Klasse von Inhibitoren fungiert in Analogie zu den Epoxysuccinylderivaten eine Aziridin-2-carboxylat- oder ein Aziridin-2,3-dicarboxylat-Gruppierung als elektrophile Gruppe. Genau wie bei den Epoxysuccinylderivaten verläuft die Inhibition über einen nucleophilen Angriff des Thiolats an C-2 oder C-3 des Aziridinringes unter Ringöffnung. Durch die Einführung von Substituenten am Aziridin-Stickstoff ergeben sich im Vergleich zu den Epoxid-basierten Inhibitoren zusätzliche Möglichkeiten im Design potentieller Inhibitoren. Grundsätzlich unterscheidet man zwischen drei verschiedenen Substitutionstypen. Bei Verbindungen des Typ I handelt es sich um *N*-acylierte Aziridine mit dem Aziridinring am C-Terminus einer Aminosäure oder eines Peptids. Typ II sind *N*-unsubstituierte Derivate und bei Typ III befindet sich der *N*-acylierte Aziridinring in der Mitte einer Peptidkette.⁶⁹ Durch Wahl von geeigneten Substituenten lassen sich auch bei diesen Verbindungen Inhibitoren mit erhöhter Selektivität gegen einzelne Proteasen der Papain-Familie identifizieren. So konnten beispielsweise Aziridin-2,3-dicarboxylat-basierte Verbindungen als selektive Inhibitoren verschiedener Cysteinproteasen von *Leishmania major* mit vielversprechender antileishmanialer Wirkung entwickelt werden.^{31,32}



R₁, R₂ = H, Et, Bn, ...
 R₃ = Aminosäure (Seitenkette)
 R₄ = Aminosäure, Peptid, Schutzgruppe



R₁ = H, Et, Bn, ...
 R₂ = Aminosäure, Peptid



R₁ = H, Et, Bn, ...
 R₂ = Aminosäure, Peptid
 R₃ = Aminosäure (Seitenkette)
 R₄ = Aminosäure, Peptid, Schutzgruppe

Abbildung 1-12 Verschieden Typen von Inhibitoren mit Aziridinring.

Vinylsulfone und andere Michael-Akzeptoren

Als erster Vertreter dieser Klasse wurde ein Derivat des Inhibitors E-64c synthetisiert. Bei diesem wurde die Epoxysuccinylgruppierung durch die α,β -ungesättigte Fumarsäuregruppierung ersetzt (Abb. 1-13).⁷⁰

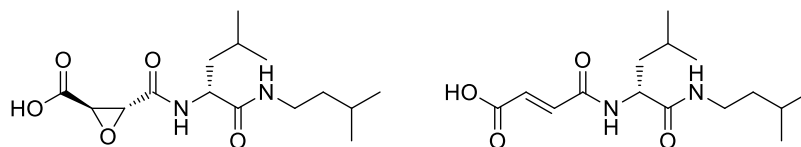


Abbildung 1-13 Struktur von E-64c (links) und dem abgeleiteten Fumarsäurederivat (rechts)

Kurze Zeit später wurden Derivate von Phenylalanin mit Michael-Akzeptor-Eigenschaften synthetisiert, die als reaktive Gruppe eine α,β -ungesättigte Carbonylverbindung oder eine Vinylsulfongruppierung enthielten und als potente und spezifische irreversible Inhibitoren zahlreicher Cysteinproteasen identifiziert wurden.^{71,72} Weiterhin wurden zahlreiche verschiedene Michael-Systeme mit unterschiedlichen elektronenziehenden Substituenten untersucht, wobei Vinylester und einfache Vinylsulfone als reaktivste Spezies gegen Papain identifiziert wurden (Abb. 1-14).⁷³

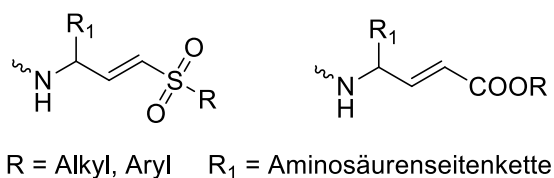


Abbildung 1-14 Allgemeine Struktur von Inhibitoren mit Vinylsulfon- (links) und Vinylester-Struktur (rechts).

Aufbauend auf diesen Ergebnissen wurden von Palmer *et al.* eine Serie hochpotenter Inhibitoren verschiedener mit Krankheiten assoziierten Cysteinproteasen wie Cathepsin B, L, K, Calpainen und Cruzain entwickelt.⁷⁴ Diese Inhibitoren zeigten einige vorteilhafte Eigenschaften wie Spezifität gegenüber Cysteinproteasen, Unreaktivität gegenüber anderen endogenen Nucleophilen wie Glutathion und hohe inhibitorische Aktivität. Die Möglichkeit der Variation von Vinylsulfonen sowohl in P als auch in P'-Richtung des Moleküls führte schließlich zur Entwicklung zahlreicher hochpotenter, spezifischer Inhibitoren von verschiedenen humanen, viralen und parasitären Cysteinproteasen.⁶⁷ Der Mechanismus der Inhibition verläuft über eine Michael-Addition. Hierbei erfolgt zunächst ein Angriff des Thiolats im aktiven Zentrum an das β -Kohlenstoffatom des Inhibitors, gefolgt von einer Protonierung am α -Kohlenstoffatom, wodurch irreversibel ein Thioetheraddukt geformt wird (Abb.1-15).⁷⁵

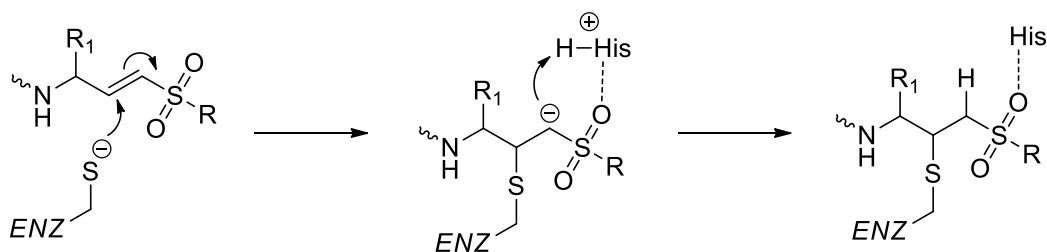


Abbildung 1-15 Mechanismus der Inhibition von Cysteinproteasen durch Vinylsulfone

Eine der am besten untersuchten Verbindungen mit Vinylsulfonstruktur ist der Inhibitor K11777 (auch: K777, Abb. 1-16). Dieser wurde zuerst von Palmer *et al.* bei *Axys Pharmaceuticals* synthetisiert.^{74,76} K11777 ist ein potenter Inhibitor zahlreicher humaner, viraler und parasitärer Cysteinproteasen mit einer Präferenz für Cathepsin L-ähnliche Proteasen.

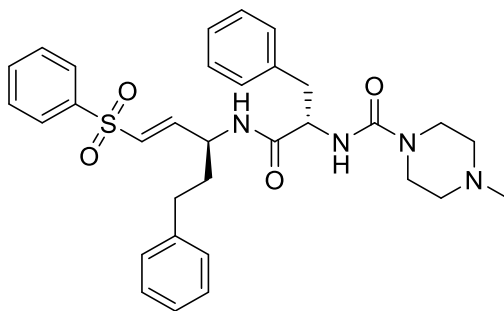


Abbildung 1-16 Struktur von K11777 - ein Inhibitor mit Vinylsulfonstruktur.

Schon früh wurde eine antiplasmodiale Wirkung *in vitro* und *in vivo* entdeckt.⁷⁶ In der Folge wurden zahlreiche weitere positive Eigenschaften des Inhibitors nachgewiesen. Er ist oral bioverfügbar, zeigt geringe Toxizität, ist selektiv für Cysteinproteasen, nicht reaktiv gegenüber Glutathion und andere freie Thiole und ist *in vitro* wirksam gegen verschiedene parasitäre Erreger wie *Schistosoma mansoni*, *Trypanosoma cruzi*, *Trypanosoma brucei*, *Plasmodium falciparum*, *Cryptosporidium parvum*.⁷⁶⁻⁷⁹ Weiterhin wurde die Verbindung in ersten klinischen Studien zur Behandlung der Chagas Krankheit untersucht.

1.4.2 Kovalent-reversible Cysteinproteaseinhibitoren

Aldehyde

Die Entwicklung von Aldehyden als Cysteinproteaseinhibitoren beruhte auf 2 verschiedenen Konzepten. Einerseits wurden sie als Analoga des bei der Substrathydrolyse auftretenden Übergangszustands entwickelt, mit der Absicht dieses tetraedrische Intermediat zu imitieren.⁸⁰ Andererseits wurden beim *screening* von Kulturfiltraten verschiedener *Streptomyces*-Stämme zahlreiche Peptidylaldehyde mit inhibitorischer Aktivität gegen Cystein- und Serinproteasen identifiziert, z.B. die Leupeptine (siehe Abb. 1-17).⁸¹ Auch wenn sich eine gewisse Selektivität gegenüber verschiedenen Enzymen durch Anpassung der Aminosäuren in P₁- und P₂- Position erreichen lässt, erwies sich die Entwicklung selektiver Cysteinproteaseinhibitoren als schwierig, da die meisten dieser Inhibitoren auch Serinproteasen wie α -Chymotrypsin, Trypsin oder Thrombin inhibieren.^{82,83} Ein klinischer Einsatz dieser Substanzklasse scheint aufgrund dieser mangelnden Selektivität unwahrscheinlich. Peptidylaldehyde werden jedoch erfolgreich als Werkzeug in der biochemischen Forschung eingesetzt. Der Mechanismus der Inhibition verläuft zunächst über den nucleophilen Angriff des Thiolats am Carbonylkohlenstoffatom. Es bildet sich reversibel ein Hemithioacetal (siehe Abb. 1-18). Analog dazu verläuft die Inhibition von Serinproteasen unter Bildung des entsprechenden Halbacetals.

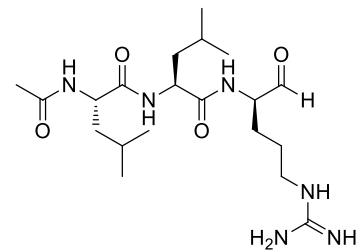


Abbildung 1-17 Struktur von Leupeptin.

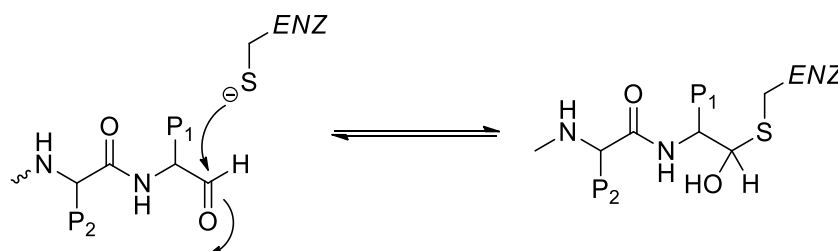


Abbildung 1-18 Mechanismus der Inhibition von Cysteinproteasen durch Peptidylaldehyde.

Semicarbazone

Der Einsatz von Peptidylsemicarbazonen bei der Synthese von Peptidylaldehyden führte zu der Entdeckung dieser Strukturklasse als Proteaseinhibitoren. Dabei sind die Semicarbazone meist weniger potent als die entsprechenden Aldehyde.⁶¹ Allerdings weisen die Semicarbazone auch einige potentielle Vorteile wie erhöhte Löslichkeit auf.⁸⁴ Weiterhin lassen sich im Gegensatz zu den Aldehyden Inhibitoren entwickeln, die sowohl die *primed-* als auch die *non-primed site* adressieren. Der Mechanismus der Inhibition verläuft vermutlich über den nucleophilen Angriff des Thiolats im aktiven Zentrum unter der Bildung eines tetraedrischen Produkts (siehe Abb. 1-19). Allerdings existieren auch Hinweise darauf, dass der aktive Inhibitor ein durch Hydrolyse des Semicarbazons gebildeter Aldehyd ist. Das Semicarbazon würde in diesem Fall als Prodrug fungieren.

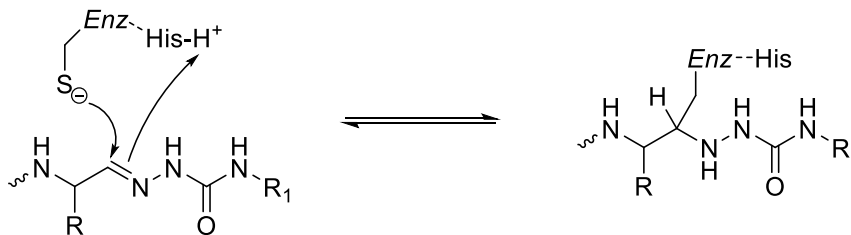


Abbildung 1-19 Wahrscheinlicher Mechanismus der Inhibition durch Semicarbazone

Weiterhin wurden Inhibitoren mit Thiosemicarbazonstruktur synthetisiert, die ähnliche Eigenschaften wie die korrespondierenden Semicarbazone aufweisen, jedoch meist potenter als diese sind.^{85,86}

Nitrile

Bereits 1971 wurden Peptidynitrile als Inhibitoren von Papain beschrieben.⁸⁷ Seither wurden zahlreiche weitere Inhibitoren mit Nitrilstruktur als *warhead* beschrieben. Hierzu zählen Cyanamide⁸⁸ und Arylnitrile wie Triazinnitrile und Purinnitrile⁸⁹⁻⁹¹, sowie Aminoacetonitrile, zu denen auch die Peptidynitrile gehören (Abb. 1-20).

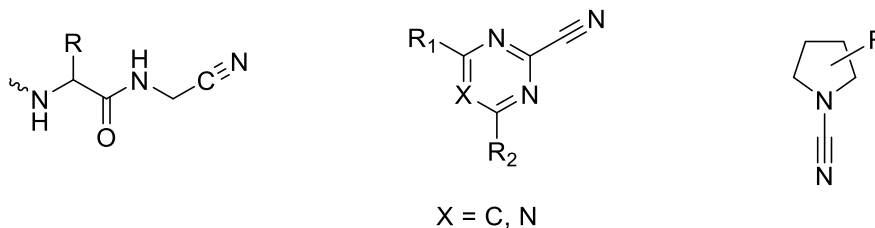


Abbildung 1-20 Klassen von Cysteinproteaseinhibitoren mit Nitrilstruktur: Aminoacetonitrile (links), Arylnitrile (Mitte) und Cyanamide (rechts).

Es existieren zahlreiche relativ selektive Inhibitoren aus dieser Strukturklasse mit ausgezeichneter Aktivität gegen verschiedenste Cysteinproteasen. So befindet sich mit Odanacatib ein selektiver Inhibitor von Cathepsin K in der späten klinischen Erforschung zur Behandlung von Osteoporose und Knochenmetastasen.⁹² Der Mechanismus der Inhibition verläuft über die nucleophile Addition des Thiolats im aktiven Zentrum an das Nitril-Kohlenstoffatom, wobei reversibel ein Isothioamid gebildet wird (Abb. 1-22). Eine weitere Hydrolyse dieses Produkts findet nicht statt.⁹³

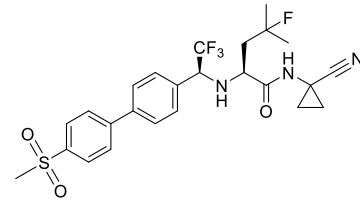


Abbildung 1-21 Odanacatib

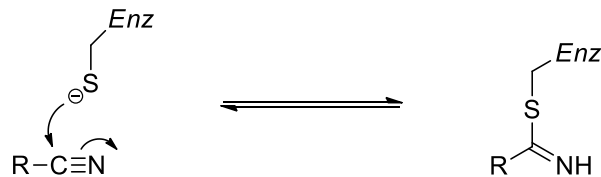


Abbildung 1-22 Mechanismus der Inhibition von Cysteinproteasen durch Nitrile

Weiterhin konnte für verschiedene Verbindungen dieser Strukturklasse auch eine Hemmung von Serinproteasen wie der Dipeptidylpeptidase IV gezeigt werden.^{94,95}

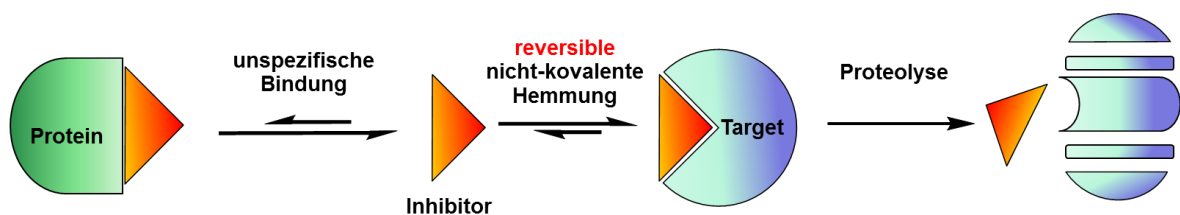
1.4.3 Vergleich kovalent-reversibler und -irreversibler Inhibition

Wie bereits erwähnt, basiert die Inhibition der Cysteinproteaseaktivität in den meisten Fällen auf einer kovalenten Modifikation des Enzyms im aktiven Zentrum. Voraussetzung dafür ist das Vorhandensein eines elektrophilen Zentrums im Inhibitor, das den nucleophilen Angriff des Thiolats im aktiven Zentrum des Enzyms ermöglicht. In Abhängigkeit von der chemischen Zusammensetzung des *warheads* kann diese kovalente Modifikation reversibel oder irreversibel verlaufen.

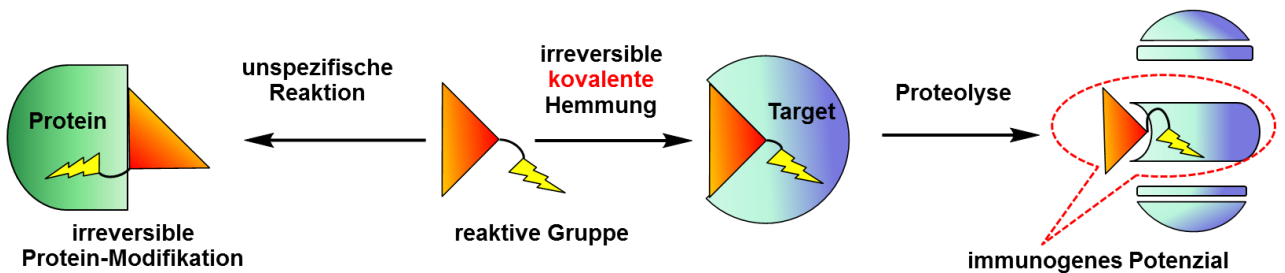
Im Vergleich zu reversiblen nicht kovalenten Inhibitoren weisen vergleichbare irreversible kovalente Inhibitoren aufgrund der zusätzlichen Bindungsenergie durch die kovalente Verknüpfung eine höhere Affinität zum Zielprotein auf. Sie sind in der Lage ein Enzym komplett zu inaktivieren. Die Halbwertszeit eines irreversiblen Enzym-Inhibitor-Komplexes ist somit im Idealfall unendlich groß, und die Enzymaktivität kann nur durch Proteolyse und Neusynthese des Enzyms wiederhergestellt werden. Dadurch ergeben sich pharmakodynamische Vorteile, wie die Möglichkeit einer geringeren Dosierung, da die Wirkung auch nach Elimination des (ungebundenen) Inhibitors aus dem Organismus erhalten bleibt.⁹⁶ Weiterhin ist die Chance, dass irreversible Inhibitoren ihre Wirksamkeit gegen Arzneimittelresistenzen, die durch Mutationen im aktiven Zentrum von Enzymen entstehen, aufrechterhalten größer, als bei entsprechenden nicht-kovalenten Inhibitoren.^{97,98} Durch solche Mutationen wird meist die Bildungsrate des Enzym-Inhibitor-Komplexes herabgesetzt, was zu einem Wirkverlust von nicht-kovalenten Inhibitoren führen kann, während irreversible Inhibitoren auch bei einer verlangsamten Bildungsrate durch die Ausbildung der kovalenten Bindung in der Lage sind eine Inaktivierung des Enzyms zu erreichen.⁹⁶

Trotz der genannten positiven Eigenschaften und zahlreichen zugelassenen irreversiblen kovalenten Inhibitoren bestanden lange Zeit Bedenken gegenüber dieser Klasse von Inhibitoren. So wurden in der pharmazeutischen Industrie lange Zeit Verbindungen mit reaktiven elektrophilen Strukturelementen, also potenzielle kovalente Modifikatoren, nicht als Arzneistoffkandidat in Betracht gezogen.⁹⁹ Viele der zugelassenen kovalenten Inhibitoren wurden zufällig entdeckt, oder der kovalente Wirkmechanismus war nicht bekannt. Diese Abneigung gegen potenziell irreversible Inhibitoren geht teilweise auf Beobachtungen zurück, dass reaktive elektrophile Metabolite von eigentlich unreaktiven Arzneistoffen für allergische Reaktionen und akute toxische Wirkungen verantwortlich sind.¹⁰⁰ Auch irreversiblen kovalenten Inhibitoren wird das Potenzial zugeschrieben, durch unspezifische Reaktion z.B. mit *off-target*-Proteinen, DNA oder freien Nucleophilen wie Glutathion, ernsthafte Nebenwirkungen zu verursachen. Weiterhin besteht die Möglichkeit, dass kovalent modifizierte Bruchstücke, die aus der Proteolyse eines kovalent inhibierten Zielproteins hervorgehen, ein immunes Potenzial aufweisen und so für eine idiosynkratische Toxizität verantwortlich sind (siehe Abb. 1-23 b).¹⁰¹

a) Reversible nicht-kovalente Hemmung



b) Irreversible kovalente Hemmung



c) Reversible kovalente Hemmung

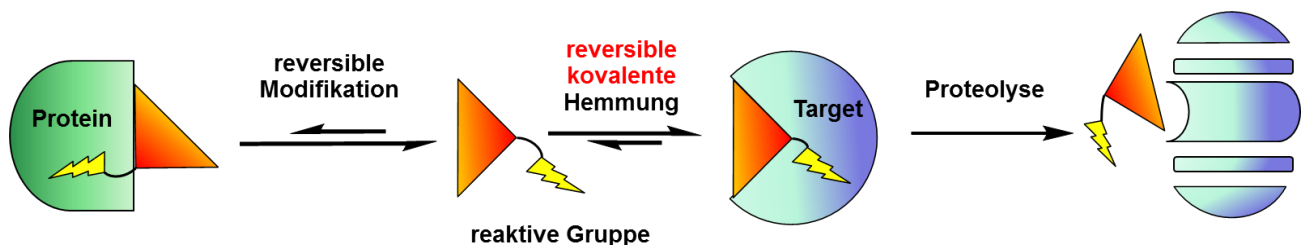


Abbildung 1-23 Darstellung verschiedener Inhibitionstypen und Nebenreaktionen (geändert nach Lee & Grossmann¹⁰¹)

Eine Möglichkeit, das potenzielle Risiko von toxischen Nebenreaktionen kovalent irreversibler Inhibitoren zu umgehen, ist die Entwicklung kovalenter, aber reversibler Inhibitoren. Dazu muss die chemische Beschaffenheit des *warheads* so gestaltet werden, dass dieser eine vergleichsweise schwache kovalente Bindung mit der Zielverbindung eingehen kann, die damit reversibel ist. Auf diese Weise lassen sich die oben erwähnten positiven Eigenschaften eines irreversiblen Inhibitors mit denen eines nicht-kovalenten reversiblen Inhibitors vereinen. Man erhält also im Idealfall einen Inhibitor hoher Potenz mit vorteilhaften pharmakodynamischen / pharmakokinetischen Eigenschaften, bei gleichzeitig vermindertem Risiko toxischer Nebenwirkungen (Abbildung 1-23 c).¹⁰¹

Interessanterweise wurden in den letzten Jahren Abneigungen gegen kovalente irreversible Inhibitoren teilweise abgebaut. Zum einen wurde festgestellt, dass das Risiko idiosynkratischer Toxizität bei kovalenten Inhibitoren nicht wesentlich höher als bei klassischen reversiblen Inhibitoren ist. Vielmehr spielen hier andere Faktoren wie die Dosierung eine wichtigere Rolle.¹⁰² Weiterhin konnten durch moderne Methoden des strukturbasierten Wirkstoffdesigns sehr zielgerichtete kovalente Inhibitoren („*targeted covalent inhibitors*“) entwickelt werden. Diese Inhibitoren sind gekennzeichnet durch einen schwach elektrophilen *warhead* der nur bei einer spezifischen, nicht-kovalenten Orientierung innerhalb des betreffenden Enzyms eine kovalente Bindung eingehen kann. Des Weiteren befinden sich zahlreiche kovalente Inhibitoren in der Entwicklung zur Behandlung von schweren und lebensbedrohlichen Erkrankungen, für die bisher keine effektive Therapie vorhanden ist, da hier der Nutzen des kovalenten Wirkmechanismus die potenziellen Risiken übersteigt.⁹⁶

2. Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit war die Entwicklung neuartiger Inhibitoren von Cysteinproteasen der Papain-Familie mit kovalent-reversiblen Wirkmechanismus. Ein Fokus sollte dabei auf Inhibitoren von Cathepsin L-ähnlichen Proteasen und hier vor allem auf dem Enzym Rhodocytin - ein *target* zur Therapie der Afrikanischen Schlafkrankheit – liegen.

In vorangegangenen Arbeiten im Arbeitskreis^{103,104} wurden auf Grundlage von quantenchemischen Berechnungen bereits erste substituierte Vinylsulfone synthetisiert (Abb. 2-1), für die ein kovalent-reversibler Inhibitionsmechanismus postuliert wurde.

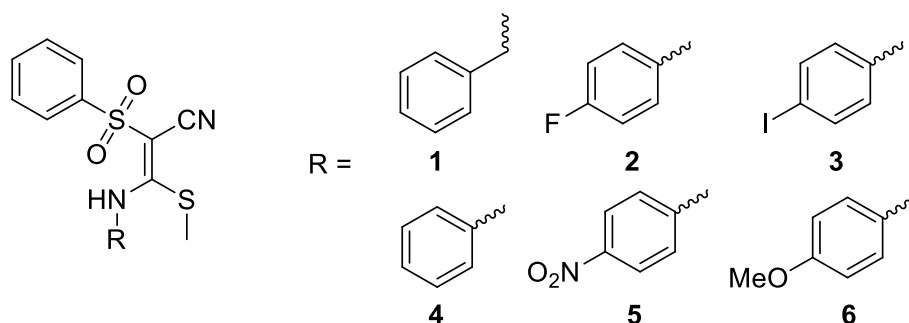


Abbildung 2-1 Vorarbeiten: Substituierte Vinylsulfone.

In ersten Versuchen, bei denen die Reaktion dieser Derivate mit Phenylethanthiol als Analogon zum Cysteinrest im aktiven Zentrum untersucht wurde, zeigte sich ein reversibler Verlauf dieser Reaktion. Allerdings wiesen diese Derivate nur eine schwache Affinität zu verschiedenen getesteten Cysteinproteasen auf. Darauf aufbauend sollten zunächst Derivate mit identischem *warhead* und peptidischen Resten synthetisiert werden, die eine höhere Affinität zu den Zielenzymen aufweisen sollten.

Weiterhin sollten, ausgehend von dem oben beschriebenen irreversiblen Cysteinproteaseinhibitor K11777 (Kapitel 1.4), weitere geeignete Substitutionsmuster der Doppelbindung der Vinylsulfonstruktur identifiziert werden, welche die Bildung einer reversiblen kovalenten Bindung mit dem Thiolat im aktiven Zentrum von Cysteinproteasen ermöglichen sollten (Abb. 2-2).

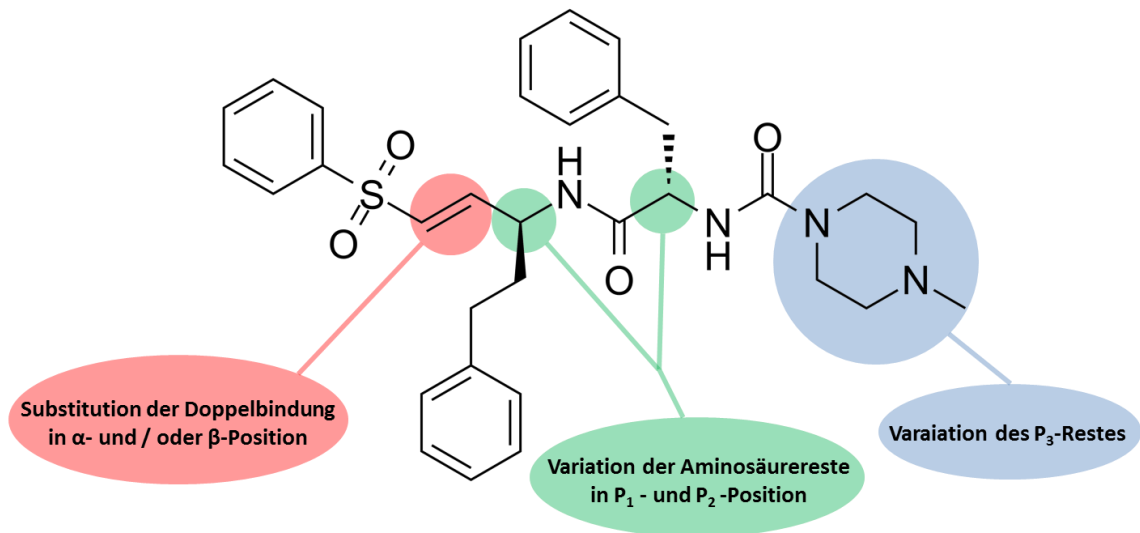


Abbildung 2-2 Struktur von K11777 und Möglichkeiten zur Strukturoptimierung

Hierzu sollten in Kooperation mit dem Arbeitskreis von Prof. Engels (Institut für Physikalische und Theoretische Chemie, Universität Würzburg) mit Hilfe von QM-/MM-Simulationen (*Quantum Mechanics / Molecular Mechanics*) geeignete Substituenten identifiziert und entsprechende Derivate synthetisiert werden. Die Affinität zu verschiedenen Cysteinproteasen sollte mittels etablierter fluoreszenzbasierter *assays* bestimmt werden. Der Mechanismus der Inhibition sollte durch geeignete Methoden hinsichtlich Reversibilität, Kovalenz und kinetischer Parameter untersucht werden. Weiterhin sollten nach erfolgreicher Identifizierung eines kovalent-reversiblen *warheads*, die nicht-kovalenten Enzym-Ligand-Wechselwirkungen durch Variation der P₁ – P₃-Reste optimiert werden. Geeignete Substituenten für die verschiedenen Positionen sollten durch Methoden des molekularen Dockings identifiziert und entsprechende Derivate synthetisiert werden. Des Weiteren sollte die Toxizität ausgewählter Substanzen gegenüber verschiedenen humanen Zelllinien, sowie die Wirkung gegen Trypanosomen ermittelt werden.

3. Ergebnisse: α -Nitril-*N,S*-Vinylsulfone

Die allgemeine Struktur dieser Verbindungsklasse (Abb. 3-1) besteht aus einem substituierten Vinylsulfongerüst, dass in α -Position mit einem Nitril-Rest, in β -Position mit einem Thiomethylrest und einem sekundären Amin substituiert ist. Strukturen dieses Typs, mit aliphatischen und aromatischen Resten, wurden in Vorarbeiten bereits synthetisiert.^{103,104}

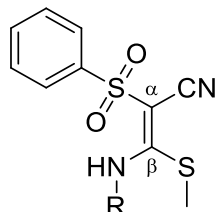


Abbildung 3-1 Allgemeine Struktur der *N,S*-Vinylsulfone.

Diese Verbindungsklasse wurde in einem computergestützten quantenchemischen Screening der Thermodynamik der Reaktion verschieden substituierter Vinylsulfone mit Thiolaten identifiziert. Betrachtet man den energetischen Verlauf einer kovalenten Inhibition (Abb. 3-2) wird deutlich, dass die Reaktion für kovalent-reversible Inhibitoren nur schwach exotherm oder thermoneutral verläuft ($\Delta G_R^0 \leq 0$), was eine Rückreaktion ermöglicht. Kovalent-irreversible Inhibitoren hingegen weisen einen stark exothermen Reaktionsverlauf auf ($\Delta G_R^0 \ll 0$).

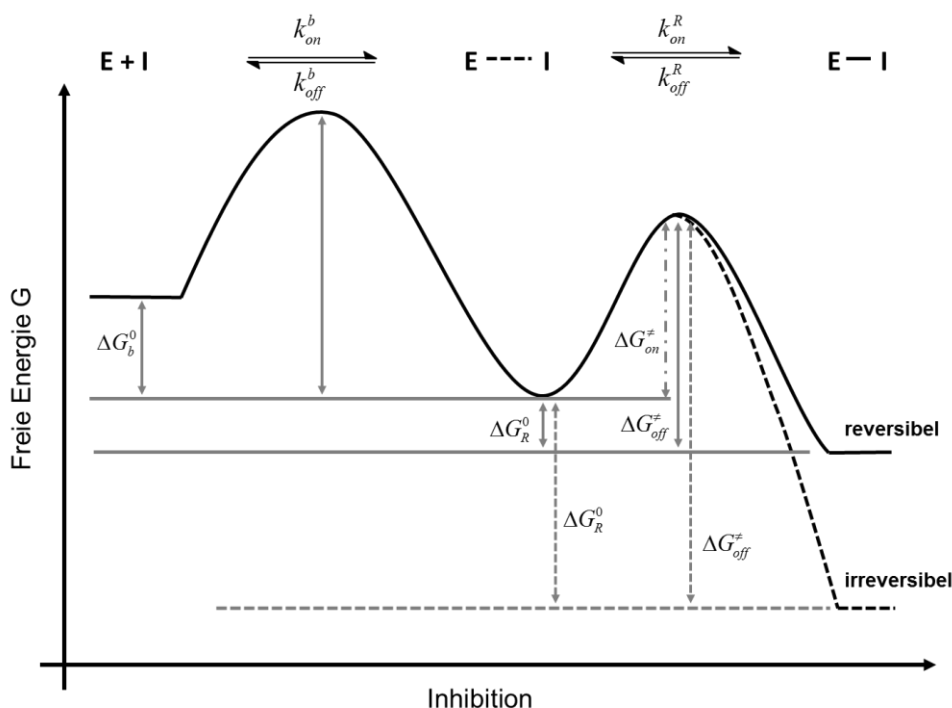


Abbildung 3-2 Energiediagramm für den Verlauf einer kovalenten Inhibition (geändert nach Schneider *et al.*¹⁰⁴)

— Kovalent-reversibel, - - - - kovalent-irreversibel

Die freien Reaktionsenergien für die Bildung des initialen nicht-kovalenten Enzym-Inhibitor-Komplexes (ΔG_b^0) sind dabei für beide Reaktionstypen gleichwertig, sodass die freie Reaktionsenergie aus der Ausbildung der kovalenten Bindung maßgeblich für die Reversibilität eines solchen Prozesses ist. Darauf aufbauend wurden zunächst Vinylsulfone untersucht, die einen Thiomethylrest in β -Position tragen. Da bei einer nucleophilen vinylischen Substitution (S_NV) eines solchen Thiomethylrest durch ein anderes Thiolat (z.B. einer Cysteinprotease), wiederum ein Alkylthiolat freigesetzt wird, verläuft eine solche Reaktion nahezu thermoneutral und damit reversibel (Abb. 3-3). Allerdings ist die Reversibilität nur solange gewährleistet, wie sich der substituierte Thiomethylrest in räumlicher Nähe zu dem Reaktionszentrum befindet. Entfernt sich dieser Rest, z.B. durch Diffusion, wird die Reaktion zunehmend irreversibel.

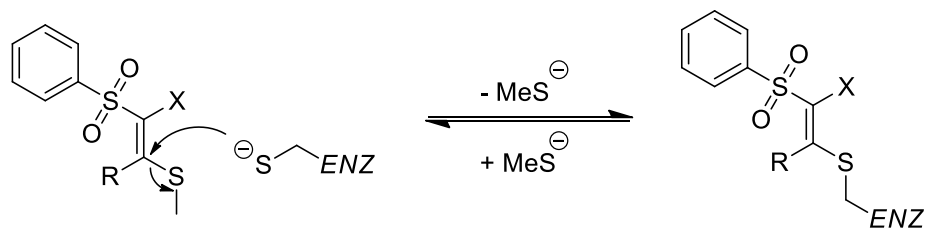


Abbildung 3-3 Nucleophile vinylische Substitution eines substituierten Vinylsulfons durch Cysteinproteasen

Da neben der nucleophilen vinylischen Substitution des Thiomethylrestes (Abb. 3-4, D) zahlreiche andere Reaktionen (Substitution Phenylsulfon (Abb. 3-4, E); Substitution Rest X (Abb. 3-4, C); Addition in α -, und β -Position (Abb. 3-4, A und B)) denkbar sind, mussten geeignete Substituenten R und X gefunden werden, die die gewünschte Reaktion D ermöglichen ($\Delta G_R^0 \leq 0$), während die Konkurrenzreaktionen (A, B, C, E) positive Reaktionsenergien aufweisen sollten ($\Delta G_R^0 > 0$).

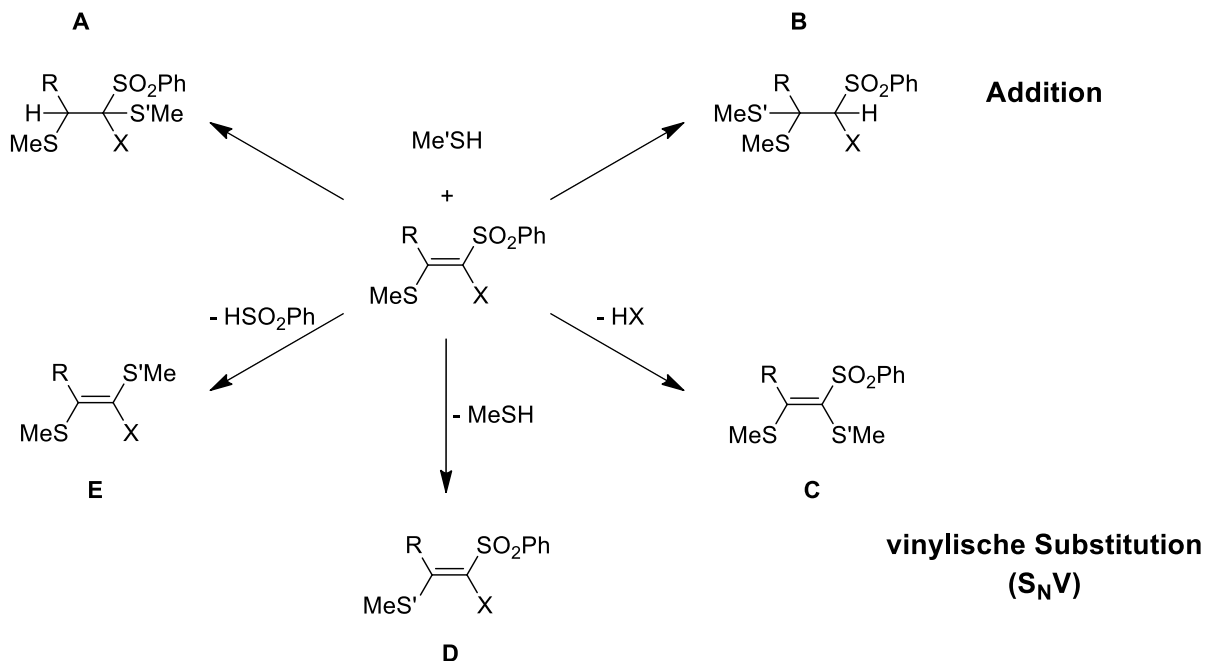
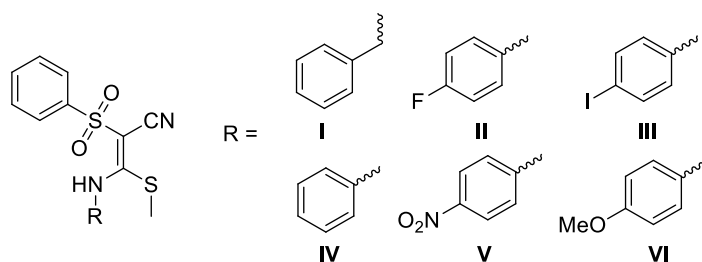


Abbildung 3-4 Mögliche Reaktionen substituierter Vinylsulfone mit Thiolen (geändert nach Schneider *et al.*¹⁰⁴)

In der Literatur wurden bereits Vinylsulfone und andere Verbindungen beschrieben, die mit Thiolen in einer leicht exothermen S_NV -Reaktion reagieren.^{105,106} Voraussetzung hierfür ist eine elektronenziehender Substituent X, z.B. ein Bromid- oder Nitrilrest. Daher wurden zunächst Reaktionsenergien für die möglichen Reaktionen von Methylthiol mit Vinylsulfonen die einen elektronenziehenden Rest X in α -Position, einen Rest R (aliphatisch, aromatisch, sekundäres Amin) und einen Methylthiolrest in β -Position tragen, berechnet. Als vielversprechendste Verbindungsklasse wurde dabei die oben beschriebenen *N,S*-Vinylsulfone mit einem Nitrilrest in α -Position und einem Aminomethylrest in β -Position identifiziert. Während die Substitution des Methylthiolrestes durch einen anderen Methylthiolrest, welcher in den Berechnungen als Modellnucleophil herangezogen wurde, per Definition thermoneutral verläuft, wurde für die möglichen Konkurrenzreaktionen ein endergoner Verlauf berechnet (ΔE_R Reaktion A = 19 kcal/mol, B = 20 kcal/mol, C = 16 kcal/mol, E = 4 kcal/mol). Bei allen anderen berechneten Konstellationen z.B. X = Br, R = Alkyl, wurde immer mindestens ein exergoner Reaktionsverlauf für eine der möglichen Konkurrenzreaktionen gefunden, weshalb diese Substitutionsmuster ungeeignet für den angestrebten Inhibitionstyp sein sollten¹⁰⁴.

Für die in Vorarbeiten synthetisierten Verbindungen dieses Typs wurde in Modellreaktionen mit Phenylethanthiol als Nucleophil eine reversibel verlaufende S_NV -Reaktion nachgewiesen. Die Verbindungen wiesen allerdings nur eine relativ schwache Hemmung von verschiedenen getesteten Cysteinproteasen auf (Abb. 3-5).¹⁰³



R =	% Hemmung bei [I] = 20 μ M			
	Falcpain 2	Rhodesain	Cath. B	Cath. L
I	30	17	40	26
II	25	31	35	26
III	16	29	24	-
IV	38	23	19	-
V	43	28	67	-
VI	22	22	29	-

Abbildung 3-5 In Vorarbeiten synthetisierte *N,S*-Vinylsulfone und prozentuale Hemmung verschiedener Cysteinproteasen.

Da die bereits synthetisierten Derivate relativ kleine Reste am Amin tragen, besteht hier noch ein großer Spielraum zur Strukturoptimierung. Zunächst sollten also Derivate mit Aminosäuren und Dipeptiden als Substituent am Stickstoff hergestellt werden. Dadurch sollte es möglich sein durch

Adressierung der verschiedenen Bindetaschen der Enzyme zusätzliche nicht-kovalente Wechselwirkungen zu erzeugen und eine gesteigerte Affinität zu verschiedenen Cysteinproteasen zu erreichen.

3.1 Synthese der N,S-Vinylsulfone

Die bereits hergestellten Verbindungen mit kleinen aliphatischen oder aromatischen Resten am Stickstoff wurden durch Reaktion von Phenylsulfonylacetonitril mit verschiedenen Isothiocyanaten und anschließender Methylierung synthetisiert (Abb. 3-6)¹⁰³.

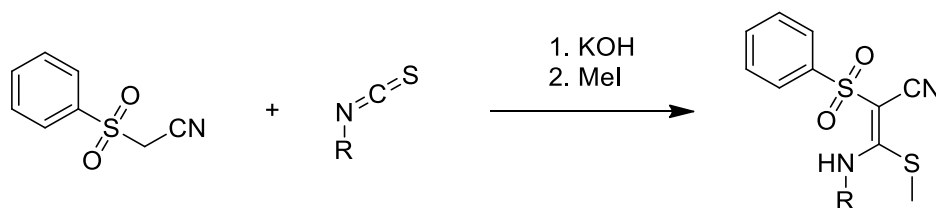


Abbildung 3-6 Synthese der N,S-Vinylsulfone mit aliphatischen und aromatischen Resten

Für die Synthese entsprechender Derivate mit Aminosäuren oder Peptiden als Rest wurde eine andere Route gewählt, um eine aufwändige Synthese der nicht kommerziell erhältlichen Isothiocyanat-Derivate von Aminosäuren zu umgehen. Stattdessen erfolgte die Synthese über das bis(thiomethyl)-Vinylsulfon. Dieses ist leicht über eine literaturbekannte Umsetzung von Phenylsulfonylacetonitril mit Kohlenstoffdisulfid und anschließender Methylierung durch Methyljodid darstellbar (Abb. 3-7).¹⁰⁷

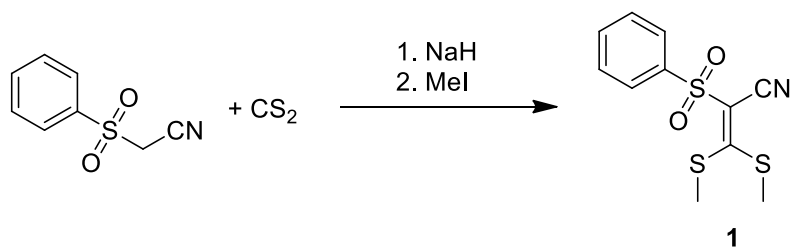


Abbildung 3-7 Synthese des bis(thiomethyl)-Vinylsulfons

Im nächsten Schritt erfolgt eine nucleophile vinylische Substitution eines Thiomethylrestes von Verbindung **1** durch die gewünschten Amine bzw. Aminosäuren oder Peptide. Auch diese Reaktion wurde bereits für verschiedene Amine und unterschiedlich substituierte Vinylsulfone beschrieben.^{107,108} Da in ersten Versuchen bei dieser Reaktion mit Aminosäurebenzylestern und Methanol als Lösemittel Umesterungen beobachtet wurden, wurde die Reaktion im Folgenden in DMF durchgeführt um diese Nebenreaktion zu vermeiden.

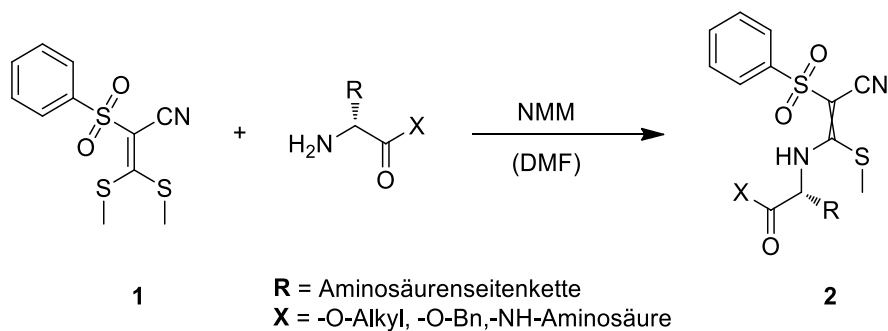


Abbildung 3-8 Synthese der N,S-Vinylsulfone mit Aminosäure- / Peptidsubstituenten.

Die Konfiguration der Doppelbindung wurde bei diesen Verbindungen nicht aufgeklärt. Da an der Doppelbindung keine Protonen vorhanden sind, war die Aufklärung der Konfiguration NMR-spektroskopisch nicht möglich. Auf eine Aufklärung mittels Röntgenstrukturanalyse wurde zu diesem Zeitpunkt verzichtet. Hinweise in der Literatur legen allerdings nahe, dass bei dieser Reaktion bevorzugt das *E*-Isomer gebildet wird, was durch die Ausbildung einer Wasserstoffbrückenbindung des Protons am Stickstoff zu einem Sauerstoffatom der Sulfonylgruppe erklärt werden kann (Abb 3-9).¹⁰⁸⁻¹¹⁰ Auch die aus den Isothiocyanaten synthetisierten Verbindungen zeigen diese Konfiguration, was durch Röntgenstrukturanalysen nachgewiesen wurde.¹⁰⁴

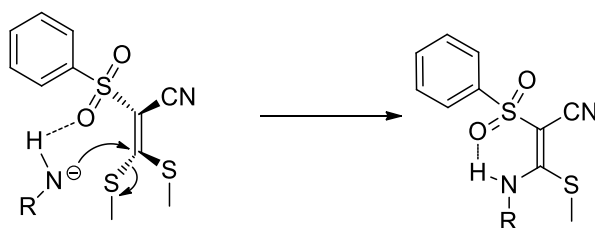


Abbildung 3-9 Wasserstoffbrückenbindung begünstigt das *E*-Isomer.

Auf diese Weise konnten zahlreiche kommerziell erhältliche Aminosäurederivate in guten Ausbeuten eingeführt werden. Die entsprechenden Peptide wurden durch Standardmethoden, die später genauer erläutert werden, synthetisiert. Auch diese Derivate mit peptidischen Resten konnten in guten Ausbeuten erhalten werden (Tabelle 3-1)

Tabelle 3-1 Synthetisierte N,S-Vinylsulfone

Verbindung	-NH-R =	Ausbeute %
	-L-Phe-OEt	72
4	-L-ILE-OMe	75
5	-L-Ala-OMe	80
6	-L-Val-OMe	70
7	-L-Leu-OBn	66
8	-L-Phe-L-Leu-OMe	64
9	-L-Phe-Gly-OBn	59
10	-L-hPhe-L-Phe-OEt	48
11	-L-hPhe-L-Phe-OBn	51

3.2 Biochemische und biologische Untersuchungen der N,S-Vinylsulfone

3.2.1 Grundlagen der Enzymkinetik: *Michaelis-Menten-Gleichung*

Enzyme sind Biokatalysatoren, die in der Lage sind, die freie Aktivierungsenthalpie ΔG^\ddagger einer Reaktion abzusenken. Diese stellt eine energetische Barriere in einem Reaktionsverlauf dar und muss aufgebracht werden, um von einem Edukt zum Produkt zu gelangen (Abb. 3-10). Je geringer die Aktivierungsenthalpie ausfällt, desto schneller kann eine Reaktion ablaufen. Enzyme erhöhen also die Reaktionsgeschwindigkeit bestimmter Reaktionen durch Absenken der Aktivierungsenthalpie. Die Geschwindigkeit enzymatisch katalysierter Reaktionen ist dabei oft um den Faktor $10^6 - 10^{12}$ größer im Vergleich zur unkatalysierten Reaktion.¹¹¹ Dadurch kann ein schneller Stoffumsatz erreicht werden, der viele biologische Prozesse erst ermöglicht.

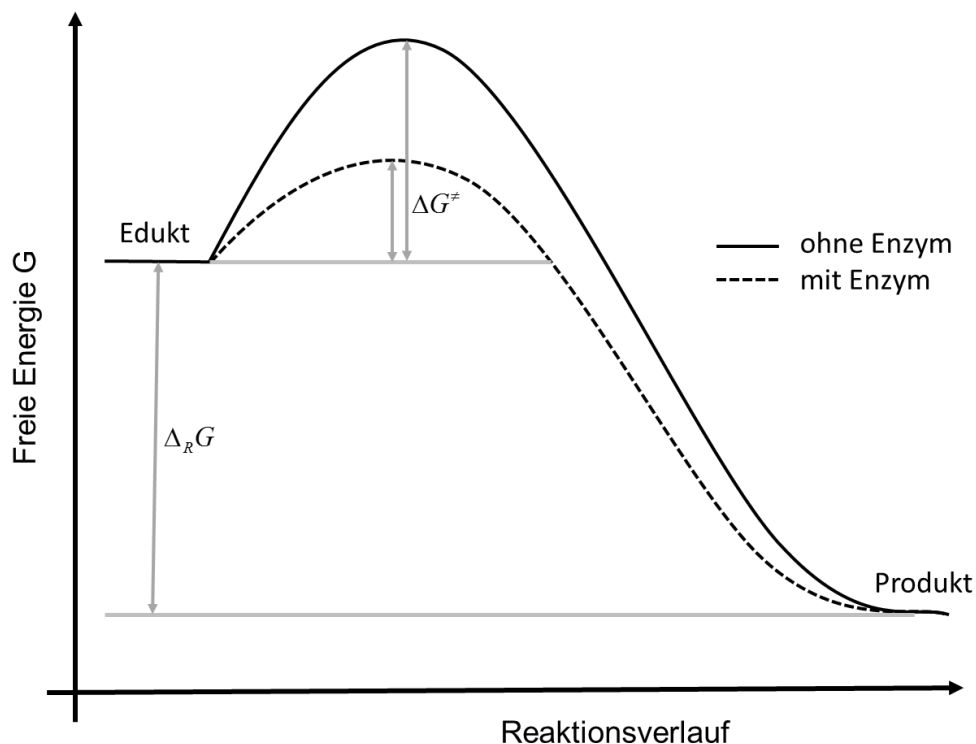


Abbildung 3-10 Einfluss enzymatischer Katalyse auf die freie Aktivierungsenthalpie

Die Enzymkinetik befasst sich im Allgemeinen mit der mathematischen Beschreibung und Quantifizierung von Reaktionsgeschwindigkeiten und -gleichgewichten sowie den verschiedenen daraus abgeleiteten kinetischen Parametern einer enzymatisch katalysierten Reaktion.

Eine enzymatische Reaktion kann allgemein durch das in Abbildung 3-11 gezeigte Schema beschrieben werden.



Abbildung 3-11 Allgemeines Schema einer enzymatisch katalysierten Reaktion

Dabei bildet sich zunächst aus dem Enzym (E) und dem Substrat (S) ein Enzym-Substrat-Komplex (ES). Die Ausbildung dieses Komplexes ist reversibel, sodass dieser auch vor dem Umsatz des Substrates zum Produkt (P) wieder zerfallen kann. Die Geschwindigkeit der einzelnen Reaktionen ist dabei durch die jeweilige Geschwindigkeitskonstante charakterisiert: k_1 und k_{-1} für die Hin- und Rückreaktion der Bildung des ES-Komplexes, k_2 und k_{-2} für Hin- und Rückreaktion der Produktbildung. Betrachtet man nun den Beginn einer Reaktion unmittelbar nach dem Mischen der Komponenten E und S ist noch kein Produkt vorhanden, sodass keine Rückreaktion stattfindet und $k_{-2} = 0$ gilt. Durch diese Vereinfachung erhält man für die zeitliche Änderung der Konzentration von ES folgende Gleichung:

$$\frac{d[ES]}{dt} = k_1[E][S] - k_{-1}[ES] - k_2[ES] \quad (1)$$

Da sich diese Gleichung nicht ohne Vereinfachung integrieren lässt, wird die Annahme gemacht, dass sich während der Reaktion ein Fließgleichgewicht („*steady state*“) einstellt, wobei die Konzentration des Enzym-Substrat-Komplexes konstant bleibt. Mit $\frac{d[ES]}{dt} = 0$ ergibt sich aus Gleichung 1:

$$k_1[E][S] = k_{-1}[ES] + k_2[ES] \quad (2)$$

Da [E] und [ES] in der Praxis nicht ohne weiteres zu bestimmen sind, verwendet man die experimentell leicht messbare Gesamt-Enzymkonzentration $[E]_T$ mit:

$$[E]_T = [E] + [ES] \quad \text{bzw.} \quad [E] = [E]_T - [ES] \quad (3)$$

Setzt man dies in Gleichung 2 ein, erhält man nach Umformung:

$$\frac{([E]_T - [ES])[S]}{[ES]} = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1} \quad (4)$$

Die Michaelis-Konstante K_M ist definiert als:

$$K_M = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1} \quad (5)$$

Eingesetzt in (4) erhält man nach Umformung:

$$[ES] = \frac{[E]_T[S]}{K_M + [S]} \quad (6)$$

Weiterhin gilt für die Anfangsgeschwindigkeit v_0 der Reaktion:

$$v_0 = \left(\frac{d[P]}{dt} \right)_{t=0} = k_2[ES] \quad (7)$$

Es folgt nach Einsetzen in (6):

$$v_0 = \frac{k_2[E]_T[S]}{K_M + [S]} \quad (8)$$

Bei hohen Substratkonzentration erreicht eine enzymatisch katalysierte Reaktion ihre Maximalgeschwindigkeit v_{max} . Unter diesen Bedingungen kann man davon ausgehen, dass das gesamte Enzym mit Substrat gesättigt ist ($[E]_T = [ES]$) und man erhält:

$$v_{max} = k_2[E]_T \quad (9)$$

Durch Kombination von (9) und (8) erhält man die *Michaelis-Menten*-Gleichung, die Grundgleichung der Enzymkinetik.^{112–114}

$$v_0 = \frac{v_{max}[S]}{K_M + [S]} \quad (10)$$

Die nichtlineare Darstellung dieser Gleichung ergibt bei Auftragung von v_0 gegen $[S]$ eine hyperbolische Sättigungsfunktion (Abb. 3-12).

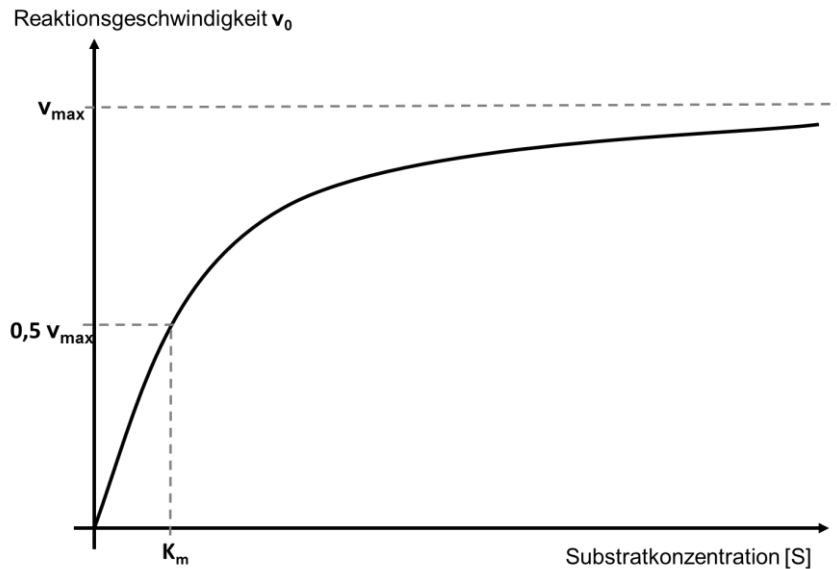


Abbildung 3-12 Nichtlineare Darstellung der *Michaelis-Menten*-Gleichung.

Dabei entspricht v_{max} dem Y-Wert, der waagerechten Asymptote an diese Funktion. Der K_M -Wert entspricht der Substratkonzentration bei halbmaximaler Geschwindigkeit ($0,5 v_{max}$). Anders ausgedrückt liegt bei der Substratkonzentration, die dem K_M -Wert entspricht, die Hälfte des vorhandenen Enzyms in Form des Enzym-Substrat-Komplexes vor.

Eine praktische Umformung der *Michaelis-Menten*-Gleichung liefert die Linearisierung nach *Lineweaver* und *Burk*:¹¹⁵

$$\frac{1}{v_0} = \frac{K_M}{v_{max}} * \frac{1}{S} + \frac{1}{v_{max}} \quad (11)$$

Trägt man $\frac{1}{v_0}$ gegen $\frac{1}{S}$ auf, erhält man einen linearen Zusammenhang aus dem sich $\frac{1}{v_{max}}$ aus dem Schnittpunkt mit der Y-Achse und $-\frac{1}{K_M}$ aus dem Schnittpunkt mit der X-Achse ergibt (Abb. 3-13). Diese doppelt-reziproke Darstellung wurde vor allem in der Vergangenheit zur schnellen grafischen Bestimmung von K_M und v_{max} benutzt, als computergestützte Methoden zur nichtlinearen Regression noch nicht verfügbar waren. Nach wie vor wird diese einprägsame Darstellung jedoch oft zur (vergleichenden) Präsentation der Ergebnisse enzymkinetischer Experimente verwendet.

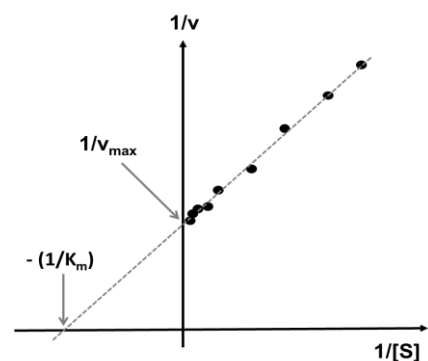


Abbildung 3-13 Linearisierte Auftragung nach *Lineweaver* und *Burk*

3.2.2 Enzymkinetik unter dem Einfluss von Inhibitoren

Im Allgemeinen sind Inhibitoren Substanzen, die in der Lage sind die Rate einer enzymatisch katalysierten Reaktion zu senken. Man kann hier zwischen verschiedenen Typen von Inhibitoren mit jeweils unterschiedlichem Einfluss auf die Kinetik einer Reaktion unterscheiden. Zunächst erfolgt eine Unterteilung in irreversible und reversible Inhibitoren. Weiterhin kann eine Unterteilung anhand des jeweiligen Mechanismus der Inhibition erfolgen.

Kompetitive reversible Hemmung

Der häufigste Typ bei den reversiblen Inhibitoren sind die kompetitiven Inhibitoren. Diese konkurrieren direkt mit dem Substrat um die Bindestelle im aktiven Zentrum eines Enzyms. Es wird ein reversibler Enzym-Inhibitor-Komplex gebildet, wodurch die Konzentration des freien, für die Substratbindung verfügbaren Enzyms erniedrigt wird. Im Gegensatz zum Substrat geht der Inhibitor keine Reaktion ein. Das allgemeine Schema einer kompetitiven Hemmung verdeutlicht Abbildung 3-14:

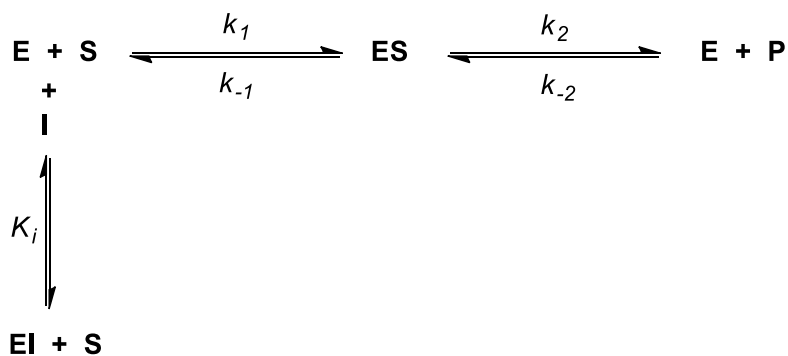


Abbildung 3-14 Reaktionsschema der kompetitiven reversiblen Hemmung.

Dabei wird wieder angenommen, dass keine Rückreaktion des Produktes zum Edukt eintritt ($k_{-2} = 0$). K_i ist dabei die aus dem Massenwirkungsgesetz abgeleitete Dissoziationskonstante der Bildung des reversiblen Enzym-Inhibitor-Komplexes und wie folgt definiert:

$$K_i = \frac{[E][I]}{[EI]} \quad (12)$$

Berücksichtigt man für die Gesamt-Enzym-Konzentration den zusätzlichen Anteil des Enzym-Inhibitor-Komplexes:

$$[E]_T = [E] + [ES] + [EI] \quad (13)$$

kann die *Michaelis-Menten*-Gleichung für kompetitive reversible Hemmung wie oben beschrieben abgeleitet werden und man erhält Gleichung 14:

$$v_0 = \frac{v_{max} [S]}{\alpha K_M + [S]} \quad \text{mit } \alpha = 1 + \frac{[I]}{K_i} \quad (14)$$

Es wird angenommen, dass diese Inhibitoren an Bereiche des Enzyms binden, die einen Einfluss auf die Substratbindung und die Katalyse haben. Analog zu den oben beschriebenen Ableitungen ergibt sich die *Michaelis-Menten*-Gleichung für nicht-kompetitive Hemmung:

$$v_0 = \frac{v_{max} [S]}{\alpha K_M + \alpha' [S]} \quad \text{mit } \alpha = 1 + \frac{[I]}{K_i} ; \quad \alpha' = 1 + \frac{[I]}{K_i'} \quad (17)$$

Die drei verschiedenen Arten der reversiblen Hemmung haben einen unterschiedlichen Einfluss auf die Parameter K_M und v_{max} (Tabelle 3-2)

Tabelle 3-2 Einfluss verschiedener Hemmtypen auf K_M und v_{max} . ↑: Wert steigt, ↓: Wert nimmt ab, →: Wert unverändert, jeweils verglichen mit ungehemmtem Enzym.

Art der Hemmung	K_M	v_{max}
kompetitiv	↑	→
unkompetitiv	↓	↓
Nicht-kompetitiv	↑ / ↓	↓

Irreversible Hemmung

Auch bei irreversiblen Inhibitoren unterscheidet man zwischen verschiedenen Hemmtypen. Meist handelt es sich jedoch um Inhibitoren, die eine Reaktion mit einem Nucleophil im aktiven Zentrum eines Enzyms eingehen – also kompetitive Inhibitoren. Kompetitive irreversible Inhibitoren bilden mit Enzymen zunächst einen reversiblen Enzym-Inhibitor-Komplex $[EI]$, dessen Bildung in Konkurrenz zur Ausbildung des Enzym-Substrat-Komplexes $[ES]$ steht. Anschließend erfolgt eine irreversible Reaktion des Inhibitors mit dem Enzym, welches dann nicht mehr für die Umsetzung von Substrat zur Verfügung steht (Abb. 3-17)

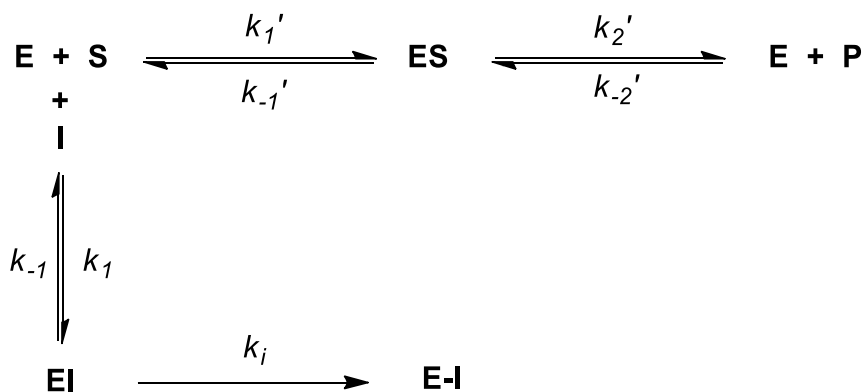


Abbildung 3-17 Reaktionsschema der irreversiblen Hemmung

Für die Gesamtmenge des Enzyms ergibt sich analog zu Gleichung 13 der folgende Term:

$$[E]_T = [E] + [EI] + [E - I] + [ES] = [E]_a + [E - I] \quad (18)$$

wobei $[E]_a$ jenen Teil der Enzyme beschreibt, der nicht irreversibel inaktiviert wurde und in der Lage ist, noch Substrat umzusetzen.

Unter Berücksichtigung der für die *Michaelis-Menten*-Kinetik gültigen Annahmen (*steady-state* → $[ES] = \text{konstant}$; keine Rückreaktion von Produkt zu Substrat) und der Annahme einer Reaktion pseudo-erster-Ordnung ($[I] \gg [E]_T$), ergibt sich für die Geschwindigkeit der Bildung des irreversiblen Enzym-Inhibitor-Addukts die folgende Gleichung:

$$\frac{d[E-I]}{dt} = -\frac{d([E]_T - [E]_a)}{dt} = k_i * [EI] \quad (19)$$

Da die Gesamtmenge an Enzym $[E]_T$ konstant ist, vereinfacht sich (19) zu:

$$-\frac{d[E]_a}{dt} = k_i * [EI] \quad (20)$$

Die Dissoziationskonstante der Bildung des reversiblen Enzym-Inhibitor-Komplex ist definiert als:

$$K_i = \frac{[E][I]}{[EI]} = \frac{k_{-1} + k_i}{k_1} \quad (21)$$

Eingesetzt in Gleichung 18 folgt nach Umformung:

$$[EI] = \frac{[E]_a}{1 + \frac{K_i}{[I]}} \quad (22)$$

Aus (22) in (20) folgt:

$$-\frac{d[E]_a}{dt} = k_i * \frac{[E]_a}{1 + \frac{K_i}{[I]}} \quad (23)$$

Durch Integration von $[E]_T$ zur Zeit $t = 0$ nach $[E]_a$ zur Zeit t :

$$-\int_{[E]_T}^{[E]_a} \frac{d[E]_a}{dt} = \int_{t=0}^t \frac{k_i [E]_a}{1 + \frac{K_i}{[I]}} \quad \text{erhält man} \quad \ln \frac{[E]_a}{[E]_T} = -\frac{k_i t}{1 + \frac{K_i}{[I]}} \quad (24)$$

Die Abnahme der Enzymaktivität erfolgt hierbei unter der Annahme von *steady-state*-Bedingungen ($[I] \gg [E]_T$) einem Mechanismus pseudo-erster-Ordnung mit der Geschwindigkeitskonstanten k_{obs} :

$$[E]_a = [E]_T e^{-k_{obs} * t} \rightarrow \ln \frac{[E]_a}{[E]_T} = -k_{obs} * t \quad (25)$$

Durch einsetzen von (25) in (24) erhält man schließlich die folgende hyperbolische Funktion:

$$-k_{obs} * t = -\frac{k_i t}{1 + \frac{K_{i app}}{[I]}} \rightarrow k_{obs} = \frac{k_i [I]}{K_{i app} + [I]} \quad (26)$$

In der Praxis erhält man k_{obs} durch Auftragung der Produktkonzentration gegen die Zeit und nicht-lineare Regression mit Gleichung 25. Den apparenten K_i -Wert ($K_{i app}$) und die Geschwindigkeitskonstante erster Ordnung k_i erhält man durch Bestimmung von k_{obs} bei verschiedenen Inhibitor-Konzentrationen, Auftragung von k_{obs} gegen $[I]$ und nicht-lineare Regression mit Gleichung 26.

Aus $K_{i app}$ lässt sich K_i mittels der *Cheng-Prussoff*-Gleichung unter Berücksichtigung von Substratkonzentration und -affinität nach Gleichung 27 berechnen.¹¹⁶

$$K_{i\text{ app}} = K_i * \left(1 + \frac{[S]}{K_M}\right) \quad (27)$$

Die charakteristischen kinetischen Konstanten einer irreversiblen Hemmung sind also:

- k_i [min^{-1}]: Die Geschwindigkeitskonstante erster Ordnung der Bildung des irreversibel modifizierten Enzyms $[E - I]$
- K_i [M]: Dissoziationskonstante des reversiblen Enzym-Inhibitor-Komplexes $[EI]$. Sie ist ein Maß für die Affinität eines Inhibitors zu einem Enzym. Je kleiner der K_i -Wert, desto höher ist die Affinität.
- k_{2nd} [$\text{M}^{-1}\text{min}^{-1}$]: Geschwindigkeitskonstante zweiter Ordnung, definiert als der Quotient aus k_i und K_i ($k_{2nd} = \frac{k_i}{K_i}$). Diese Konstante berücksichtigt also sowohl die Affinität eines Inhibitors als auch die Bildungsgeschwindigkeit des inaktivierten Enzyms. Große Werte von k_{2nd} können also sowohl durch eine hohe Affinität (K_i klein) als auch durch eine schnelle Reaktion (k_i groß) bedingt sein.

3.2.3 Bestimmung kinetischer Parameter in der Praxis

Fluorimetrischer Assay

Eine einfache und etablierte Methode um den Substratumsatz einer enzymatisch katalysierten Reaktion in der Praxis zu verfolgen, ist der Einsatz von fluorogenen Substraten. Dabei verwendet man Substrate, die bei den eingesetzten Wellenlängen selbst nur geringe Fluoreszenz zeigen, aus denen jedoch durch die enzymatische Umsetzung eine fluorophore Gruppe freigesetzt wird. Für die in dieser Arbeit untersuchten Cysteinproteasen wurde dabei ein mit einem Dipeptid verknüpft 7-Amino-4-methylcumarin-derivat verwendet (Cbz-Phe-Arg-AMC, Abb.3.18).

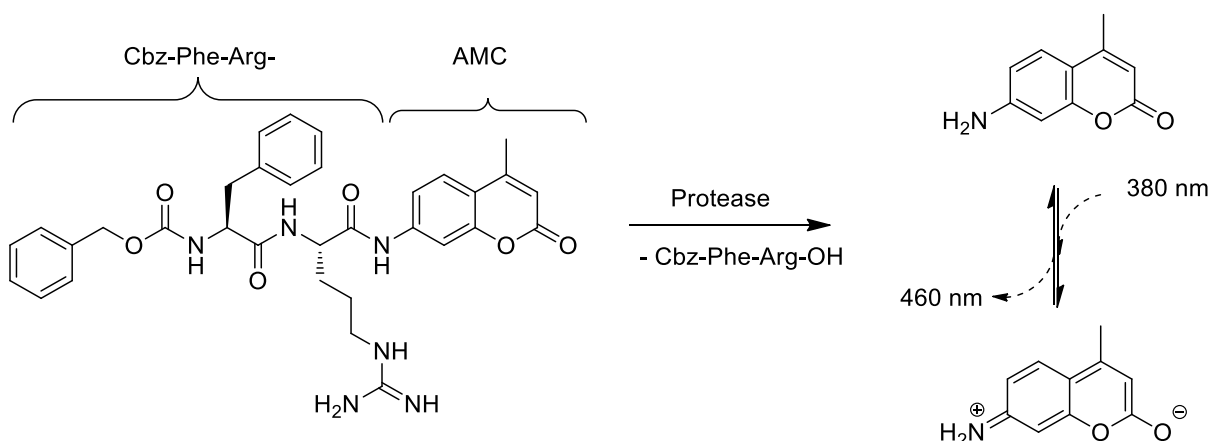


Abbildung 3-18 Enzymatische Spaltung von Cbz-Phe-Arg-AMC.

Dieses Substrat wird von den untersuchten Enzymen zwischen dem Dipeptid und der AMC-Gruppierung gespalten, wodurch das freie AMC freigesetzt wird. Dieses zeigt ein Maximum der Fluoreszenzemission bei einer Wellenlänge von $\lambda \approx 460 \text{ nm}$, wobei die Anregung im Bereich des

Absorptionsmaximums bei einer Wellenlänge von $\lambda = 380 \text{ nm}$ erfolgt. Die gemessene Fluoreszenzintensität ist dabei direkt proportional zur Menge des gebildeten Produkts.

In der Praxis kann man zunächst die prozentuale Hemmung eines Enzyms durch verschiedene Inhibitoren bei jeweils einer einzigen Inhibitorkonzentration in einem *screening* bestimmen. Inhibitoren, die einen frei definierten Schwellenwert dieser prozentualen Hemmung unterschreiten, können dann durch die Vermessung von Verdünnungsreihen des Inhibitors genauer untersucht werden.

Für reversible (bzw. zeitunabhängige (s.u.)) Inhibitoren bestimmt man zunächst den IC_{50} -Wert. Dieser ist definiert als die Inhibitorkonzentration, die eine 50 %ige Hemmung des Enzyms hervorruft. Hierzu bestimmt man die Produktbildungs- bzw. Substrathydrolyserate für verschiedene Konzentrationen des Inhibitors. Diese werden dann gegen die Inhibitorkonzentration aufgetragen, woraufhin man den IC_{50} -Wert durch nicht-lineare Regression mittels Gleichung 28 erhält. Diese entspricht Gleichung 14 ohne jedoch den Einfluss der Substratkonzentration und des K_M -Wertes zu berücksichtigen.

$$y = \frac{y_{max} - y_{min}}{1 + \left(\frac{I}{IC_{50}}\right)^s} \quad (28)$$

Dabei beschreibt y die Substrathydrolyserate, die im fluorimetrischen *assay* proportional zur Fluoreszenzzunahme pro Zeiteinheit ist [dF/min]. s ist ein *slope factor*, der die Steigung im linearen Teil der Kurve beschreibt. So erhaltene IC_{50} -Werte lassen sich nur innerhalb einer Messreihe, die unter den gleichen Bedingungen durchgeführt wurde, vergleichen. Man verwendet daher besser den K_i -Wert, der sich unter Berücksichtigung der Substratkonzentration und des K_M -Wertes aus dem IC_{50} -Wert durch die *Cheng-Prusoff*-Gleichung berechnen lässt:¹¹⁶

$$IC_{50} = K_i * \left(1 + \frac{[S]}{K_M}\right) \quad (29)$$

Bei irreversiblen (zeitabhängigen) Inhibitoren kann der K_i -Wert in einem kontinuierlichen *assay* nach *Tian* und *Tsou* bestimmt werden.¹¹⁷ Hierzu wird zunächst k_{obs} durch Auftragung der Produktbildungsrate (gemessen in Fluoreszenzeinheiten) gegen die Zeit und nicht-linearer Regression mit Gleichung 30 bestimmt:

$$[P]_t = [P]_{\infty} * (1 - e^{-k_{obs} * t}) + B \quad (30)$$

Dabei ist $[P]_t$ die Produktkonzentration zum Zeitpunkt t , $[P]_{\infty}$ ist die maximale Produktkonzentration nach unendlicher Zeit und B ein *offset*-Wert zur Korrektur von Hintergrundfluoreszenz. Durch Auftragung von k_{obs} gegen $[I]$ und nicht-lineare Regression mit Gleichung 31 (analog(26)) erhält man den apparenten K_i -Wert ($K_{i \text{ app}}$) und die Geschwindigkeitskonstante erster Ordnung k_i :

$$k_{obs} = \frac{k_i [I]}{K_{i \text{ app}} + [I]} \quad (31)$$

K_i lässt sich aus $K_{i \text{ app}}$ mit Hilfe der *Cheng-Prusoff*-Gleichung (32) unter Berücksichtigung von Substratkonzentration und –affinität berechnen:

$$K_{i\ app} = K_i * \left(1 + \frac{[S]}{K_M}\right) \quad (32)$$

Bestimmung des Bindungsmodus: Zeitabhängigkeit der Inhibition

Einen ersten Hinweis auf die Reversibilität eines Inhibitors erhält man aus den Umsatz-/Zeit-Diagrammen einer enzymatisch katalysierten Reaktion. Für reversible Inhibitoren beobachtet man entsprechend dem vorliegenden Gleichgewicht eine lineare Zunahme der Produktkonzentration – die Inhibition ist in der Regel zeitunabhängig (Abb. 3-19, links). Bei irreversiblen Inhibitoren hingegen beobachtet man meist eine Sättigungskurve der Produktbildung, da mit fortschreitender Zeit immer mehr Enzyme irreversibel gehemmt werden und dementsprechend weniger Produkt gebildet wird – man spricht von zeitabhängiger Hemmung (Abb. 3-19, rechts).

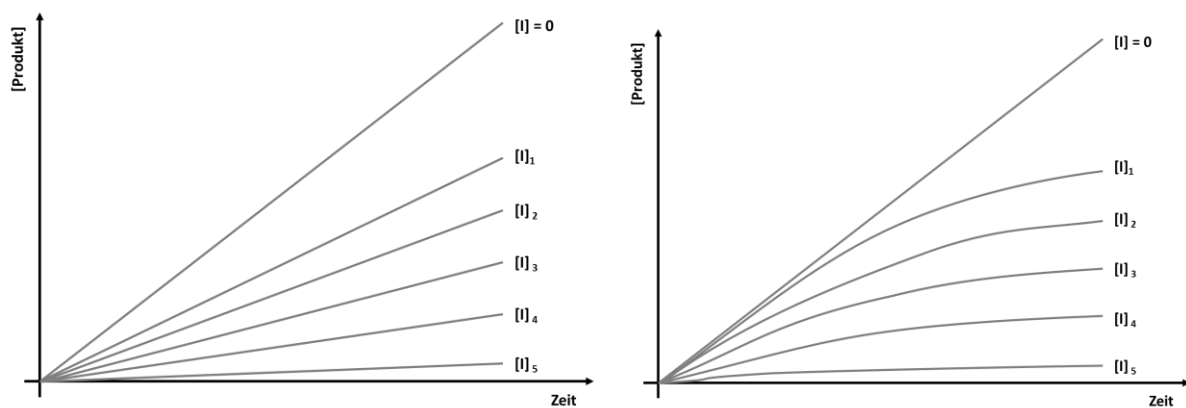


Abbildung 3-19 Vergleich zeitunabhängiger (links) und zeitabhängiger Hemmung (rechts).

$$[I]_1 < [I]_2 < [I]_3 < [I]_4 < [I]_5$$

Diese Betrachtung liefert allerdings nur einen ersten Hinweis auf die Reversibilität eines Inhibitors. So existieren beispielsweise irreversible Inhibitoren, die sehr langsam mit dem Enzym reagieren, wodurch man im betrachteten Zeitraum einen scheinbar linearen Verlauf der Produktbildung beobachtet. Dies könnte dann fälschlicherweise als zeitunabhängige Inhibition interpretiert werden. Daher verwendet man zur sicheren Aufklärung der Reversibilität einer Inhibition eine der folgenden Methoden.

Bestimmung des Bindungsmodus: Verdünnungsassay

Eine einfache Methode zur Bestimmung der Reversibilität eines Inhibitors besteht in der Durchführung eines Verdünnungsassays. Hierbei wird das Enzym mit dem Inhibitor in einer Konzentration, die zehnfach höher als dessen IC_{50} -Wert ist, inkubiert, um eine vollständige Hemmung des Enzyms zu gewährleisten. Die Enzymkonzentration wählt man dabei 100-fach höher verglichen mit den Standardbedingungen eines fluorimetrischen assays. Nach einer angemessenen Inkubationszeit wird die Mischung 100-fach verdünnt. Die Konzentration des Enzyms entspricht nun also der Standardkonzentration, während der Inhibitor in einer Konzentration von $0,1 \times IC_{50}$ vorliegt. Die Abnahme der Inhibitorkonzentration entspricht dabei einer Abnahme der prozentualen

Enzymhemmung von 91 % auf 9%. Für reversible Inhibitoren erwartet man nach der Verdünnung durch die Verschiebung der Gleichgewichte vom Enzym-Inhibitor-Komplex zum Enzym-Substrat-Komplex (vgl. Abb. 3-14) eine Wiederherstellung der Enzymaktivität. Für irreversible Inhibitoren hingegen wird dies nicht erwartet, da die Bildung des irreversibel modifizierten Enzyms keinem Gleichgewicht unterliegt und somit die Enzymaktivität durch Verdünnung nicht wiederhergestellt werden kann. Der charakteristische Verlauf eines solchen Experiments ist in Abbildung 3-20 für reversible, langsam reversible und irreversible Inhibitoren dargestellt.

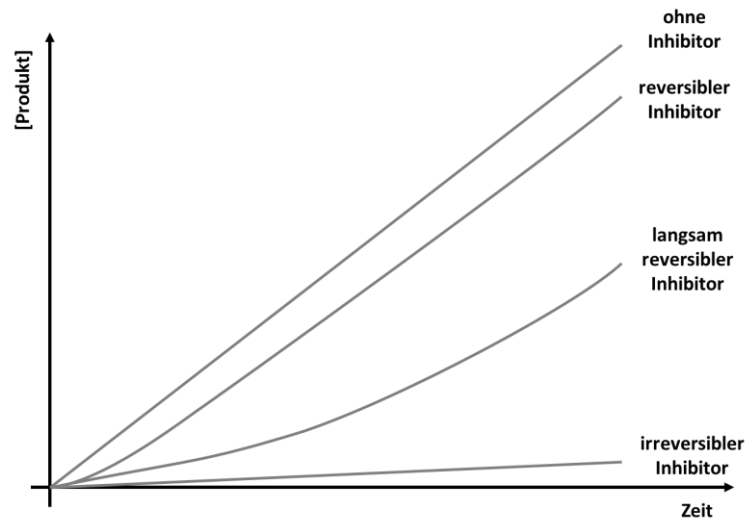


Abbildung 3-20 Charakteristischer Verlauf eines Verdünnungsassays für verschiedene Typen von Inhibitoren. (geändert nach Copeland¹¹⁸)

Bestimmung des Bindungsmodus: Dialyse

Eine weitere Möglichkeit zur Bestimmung der Reversibilität einer Inhibition bietet die Dialyse. Dabei werden Enzym und Inhibitor für eine angemessene Zeit inkubiert, um eine vollständige Hemmung des Enzyms zu gewährleisten, und anschließend über eine semipermeable Membran, die durchlässig für den Inhibitor und andere kleine Moleküle, nicht aber für das Enzym ist, dialysiert. Die Enzymaktivität wird nun nach verschiedenen Zeitabständen durch Entnahme von Aliquots bestimmt und mit der Aktivität ungehemmten Enzyms verglichen. Durch dieses Verfahren können reversible Inhibitoren aus der Reaktionsmischung abgetrennt werden und das Enzym erlangt seine Aktivität zurück. Irreversible Inhibitoren lassen sich so nicht abtrennen und das Enzym bleibt inaktiviert.

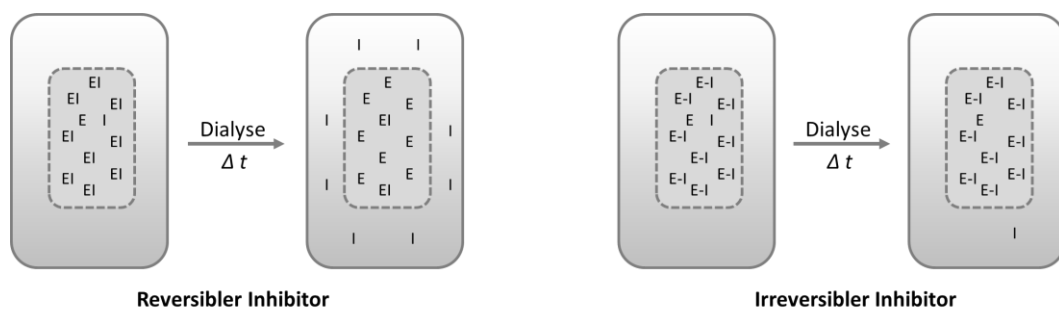


Abbildung 3-21 Schematische Darstellung der Dialyse von Enzymen mit reversiblen (links) und irreversiblen Inhibitoren (rechts).

Bestimmung des Bindungsmodus: Kompetitiv, unkompetitiv oder nicht-kompetitiv?

Ein weiterer wichtiger Aspekt zur Beschreibung des Bindungsmodus eines Inhibitors ist die Kompetitivität. Für reversible Inhibitoren lässt sich dies auf einfache Weise bestimmen. Da sowohl die Bildung des Enzym-Inhibitor-Komplexes als auch die Bildung des Enzym-Substrat-Komplexes Gleichgewichtsreaktionen sind, die dem Massenwirkungsgesetz unterliegen, lassen sich diese Gleichgewichte durch Veränderung der Substrat- oder Inhibitorkonzentration verschieben. Dabei erwartet man für die verschiedenen Bindungsmodi einen unterschiedlichen Einfluss der Substratkonzentration auf die Enzymaktivität bzw. –Hemmung. Bei kompetitiven Inhibitoren konkurrieren Substrat und Inhibitor direkt um die Bindestelle des Enzyms. Eine hohe Substratkonzentration führt also zu einer Verschiebung des Gleichgewichts zum Enzym-Substrat-Komplex und damit zu einer linearen Abnahme der Hemmung mit steigender Substratkonzentration. Unkompetitive Inhibitoren binden direkt an den Enzym-Substrat-Komplex, jedoch nicht an das freie Enzym. Liegt also bei hohen Substratkonzentrationen der überwiegende Teil des Enzyms in Form des ES-Komplexes vor, kann auch entsprechend viel Inhibitor gebunden werden. Die Hemmung des Enzyms nimmt mit steigender Substratkonzentration zu. Gemischte oder nicht-kompetitive Inhibitoren sind in der Lage, sowohl an das freie Enzym als auch an den ES-Komplex zu binden. Ist die Affinität eines Inhibitors zu beiden Formen gleich hoch, hat die Substratkonzentration keinen Einfluss auf die Inhibition des Enzyms. Bindet der Inhibitor mit höherer Affinität an das freie Enzym, beobachtet man einen nicht-linearen Abfall der Hemmung. Ist die Affinität zum ES-Komplex höher, erfolgt ein nicht-linearer Anstieg der Hemmung mit zunehmender Substratkonzentration. In der Praxis bestimmt man also das Maß der Hemmung eines Enzyms, z.B. in Form von IC_{50} -Werten, bei verschiedenen Substratkonzentrationen und trägt diese gegeneinander auf. Aus dem erhaltenen Kurvenverlauf lässt sich dann der Bindungsmodus ableiten (Abb. 3-22).

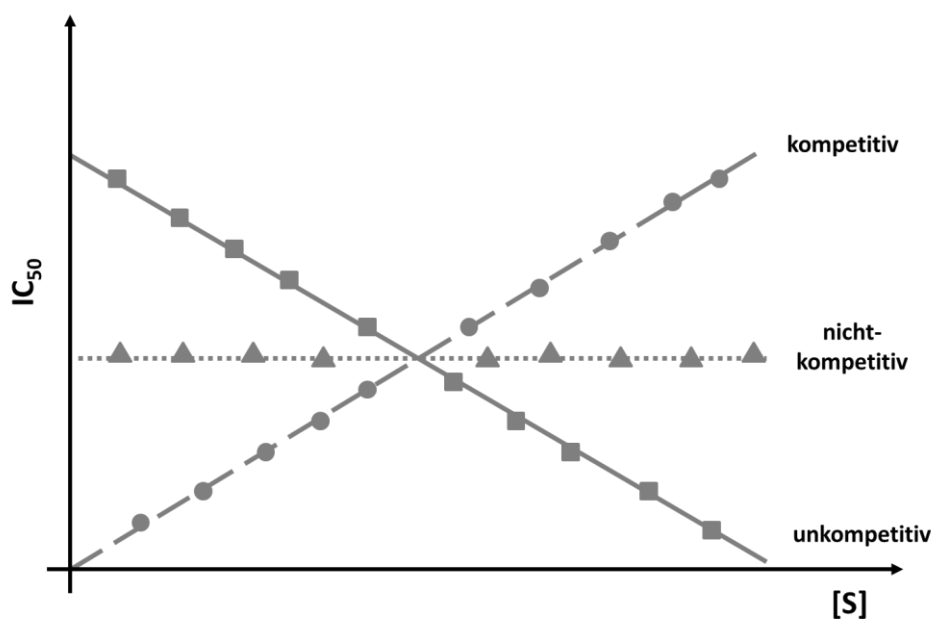


Abbildung 3-22 Einfluss der Substratkonzentration auf den IC_{50} -Wert für kompetitive, unkompetitive und nicht-kompetitive Inhibitoren (hier: gleiche Affinität zu E und ES).

3.2.4 Testergebnisse

Die Affinität der synthetisierten *N,S*-Vinylsulfone zu verschiedenen Cysteinproteasen wurde zunächst in einem *screening* durch Ermittlung der prozentualen Hemmung bei einer Inhibitorkonzentration von [I] = 20 μ M bestimmt (Tabelle 3-3).

Tabelle 3-3 Prozentuale Hemmung verschiedener Cysteinproteasen durch *N,S*-Vinylsulfone bei einer Konzentration von 20 μ M. n.b. = nicht bestimmt.

Verbindung	-NH-R=	% Hemmung [I] = 20 μ M				
		Rhodesain	Falcipain-2	Cruzain	Cath. L	Cath.B
3	-L-Phe-OEt	< 10	< 10	n.b.	< 10	< 10
4	-L-Ile-OMe	11	< 10	n.b.	< 10	< 10
5	-L-Ala-OMe	< 10	< 10	n.b.	< 10	< 10
6	-L-Val-OMe	< 10	12	n.b.	< 10	< 10
7	-L-Leu-OBn	17	n.b.	n.b.	23	13
8	-L-Phe-L-Leu-OMe	25	14	n.b.	13	< 10
9	-L-Phe-Gly-OBn	10	n.b.	n.b.	< 10	< 10
10	-L-hPhe-L-Phe-OEt	58	10	24	< 10	< 10
11	-L-hPhe-L-Phe-OBn	27	< 10	35	n.b.	n.b.

Keine der synthetisierten Verbindungen wies eine nennenswerte Aktivität auf. Die meisten Verbindungen zeigten dabei prozentuale Hemmungen der verschiedenen Enzyme von weniger als 10 %. Die höchste Aktivität konnte dabei bei den Verbindungen mit dipeptidischem Rest beobachtet werden. Genauere Untersuchungen, wie die Bestimmung von IC_{50} -Werten, wurden nur für die aktivsten Verbindungen durchgeführt (Tabelle 3-4).

Tabelle 3-4 IC_{50} -Werte der potentesten Derivate.

Verbindung	-NH-R=	IC_{50} [μ M] Rhodesain
7	-L-Leu-OBn	52
10	-L-hPhe-L-Phe-OEt	11
11	-L-hPhe-L-Phe-OBn	43

Verdünnungsassay: Reversibilität der *N,S*-Vinylsulfone

Um Informationen über die Reversibilität der Verbindungsklasse zu erhalten, wurde Verbindung **10** in einem Verdünnungsassay, wie oben beschrieben, getestet. Hierzu wurde diese in einer Konzentration von 100 μM , was ungefähr dem 10-fachen des ermittelten IC_{50} -Wertes entspricht mit der 100-fachen Standardkonzentration des Enzyms Rhodesain inkubiert und anschließend 100-fach mit Puffer, der bereits das Substrat in der gewünschten Konzentration enthielt, verdünnt. Die Produktbildung wurde über einen Zeitraum von 20 Minuten verfolgt. Als Kontrolle wurden Enzym ohne Inhibitor sowie der irreversible Inhibitor K11777 mit vermessen (Abbildung 3-23).

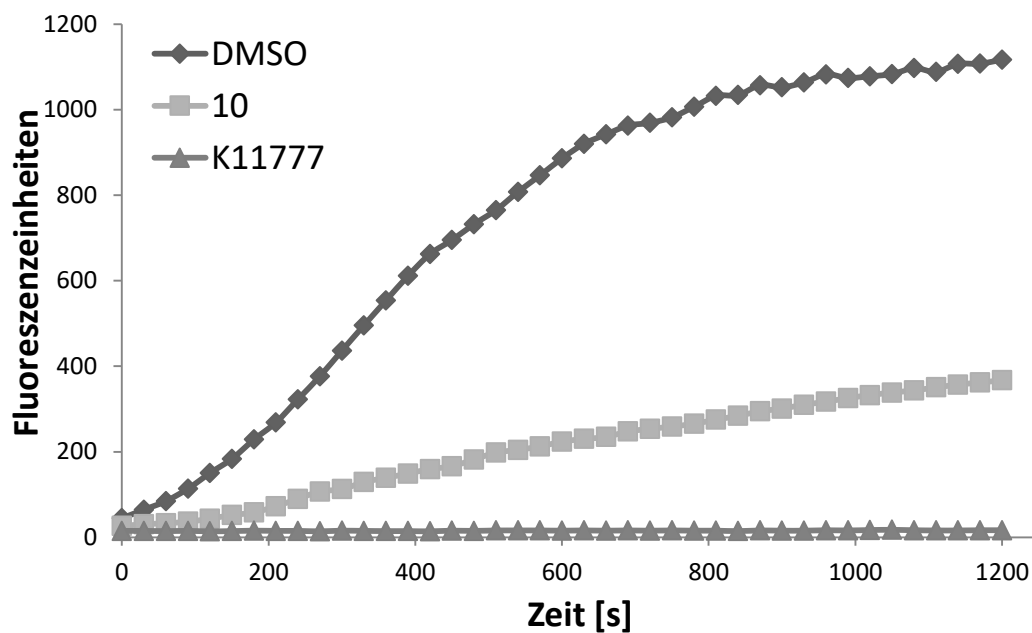


Abbildung 3-23 Ergebnis des Verdünnungsassays von Verbindung **10** und dem irreversiblen Inhibitor K11777 mit Rhodesain.

Aus dem Verlauf wird deutlich, dass die Enzymaktivität nach Inkubation mit Verbindung **10** langsam wiederhergestellt wird. Es sollte sich also um einen langsam reversiblen Inhibitor handeln, was mit den quantenmechanischen Berechnungen in Einklang steht. Bei dem Inhibitor K11777 beobachtet man - dem irreversiblen Bindungsmodus entsprechend - wie erwartet keine Wiederherstellung der enzymatischen Aktivität.

Bestimmung des Bindungsmodus: Kompetitiv?

Um den Bindungsmodus der *N,S*-Vinylsulfone hinsichtlich der Kompetitivität aufzuklären wurde der Einfluss der Substratkonzentration auf die Aktivität dieser Verbindungsklasse untersucht. Hierzu

wurden die IC_{50} -Werte der Hemmung von Rhodesain durch Verbindung **7** und **10** bei verschiedenen Substratkonzentrationen bestimmt.

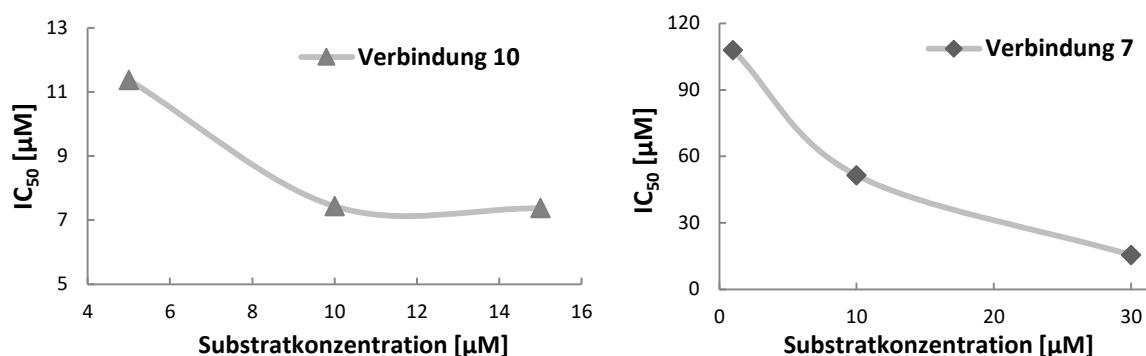


Abbildung 3-24 Einfluss der Substratkonzentration auf die Hemmung von Rhodesain durch Verbindung **11** (links) und Verbindung **7** (rechts).

Bei beiden getesteten Verbindungen beobachtet man die Tendenz eines mit steigender Substratkonzentration fallenden IC_{50} -wertes. Dies deutet darauf hin, dass die Inhibitoren nicht mit dem Substrat um die Bindestelle konkurrieren. Vielmehr deutet der Kurvenverlauf auf einen unkompetitiven oder gemischten Bindungsmodus hin (vgl. Abb. 3-22).

3.3 Diskussion: *N,S*-Vinylsulfone

Wie bereits erwähnt sollte durch die Einführung von Aminosäuren und Peptiden die Affinität der *N,S*-Vinylsulfone zu den verschiedenen Cysteinproteasen erhöht werden. Hierzu wurden zunächst verschiedene Aminosäureester als Substituent am Stickstoff eingeführt (Phe, Ile, Ala, Val, Leu). Eine Steigerung der Affinität konnte hierdurch nicht erreicht werden. Die prozentuale Hemmung der verschiedenen Cysteinproteasen liegt lediglich im einstelligen oder niedrigen zweistelligen Bereich, was keine Verbesserung im Vergleich zu den in Vorarbeiten synthetisierten Verbindungen mit kleinen aliphatischen oder aromatischen Resten darstellt. Die höchste Affinität zeigt dabei Verbindung **7**, die unter den beschriebenen Bedingungen eine 17 %ige Hemmung von Rhodesain und eine 23 %ige Hemmung von Cathepsin L bei einer Konzentration von 20 μM bewirkt.

Folglich wurden Verbindungen mit peptidischem Rest synthetisiert, die neben der S_1 -Bindetasche auch die Bindetaschen S_2 und S_3 adressieren sollten, wodurch eine Steigerung der Affinität zu den Zielenzymen erreicht werden sollte. In der Tat wird tendenziell eine Verbesserung der Affinität der Verbindungen mit peptidischem Rest beobachtet. Das potenteste Derivat (Verbindung **10**) weist an Rhodesain eine prozentuale Hemmung von 58 % und einen IC_{50} -Wert von 11 μM auf. Das Substitutionsmuster wurde dabei mit *L*-Homopheylalanin in P_1 - und Phenylalanin in P_2 -Position in

Analogie zu dem Inhibitor **K11777** gewählt. Durch Substitution des terminalen Ethylesters von **11** durch einen Benzylester sollten zusätzliche Wechselwirkungen in P₃-Position erreicht werden (Verbindung **11**). Tatsächlich verringert sich hierdurch die Affinität, was in einer 27 %igen Hemmung von Rhodesain und einem IC₅₀-Wert von 43 µM resultiert.

Um die durch die quantenchemischen Berechnungen postulierte Reversibilität dieser Verbindungsklasse zu verifizieren wurde ein Verdünnungsassay mit Verbindung **10** an Rhodesain durchgeführt (Abb. 3-23). Es zeigt sich eine langsame Wiederherstellung der Enzymaktivität, was darauf hindeutet, dass keine irreversible Bindung mit dem Enzym eingegangen wird und es sich somit um einen reversiblen Inhibitor handeln sollte.

Um den Bindungsmodus weiter aufzuklären wurde der IC₅₀-Wert der Verbindungen **7** und **10** bei verschiedenen Substratkonzentrationen ermittelt. Entgegen den Erwartungen wurden hierbei mit steigender Substratkonzentration fallende IC₅₀-Werte beobachtet, was auf einen unkompetitiven oder gemischten Bindungsmodus hinweist. Für kompetitive Inhibitoren erwartet man hingegen mit der Substratkonzentration steigende IC₅₀-Werte. Die getesteten Inhibitoren binden offenbar also nicht am aktiven Zentrum. Da aber trotzdem eine (geringe) Inhibition zu beobachten ist, ist es wahrscheinlich, dass diese Inhibitor-Klasse an eine allosterische Bindetasche bzw. unspezifisch an eine Stelle abseits des aktiven Zentrums bindet und so durch Konformationsänderungen des Proteins die Substrathydrolyse erschwert.

Durch die quantenchemischen Berechnungen wurden Reaktionsenergien berechnet, die eine Reaktion des Cysteins im aktiven Zentrum mit den Inhibitoren ermöglichen sollte. Da in der Praxis eine Reaktion im aktiven Zentrum nicht nachgewiesen werden konnte, wurden hierzu weitere Berechnungen durchgeführt. Bei den initialen Berechnungen handelte es sich lediglich um quantenmechanische Berechnungen in der Gasphase, wobei nur die Teile des Inhibitors und Enzyms berücksichtigt wurden, die unmittelbar an der Ausbildung bzw. dem Bruch von Bindungen beteiligt sind. Da jedoch sowohl das Lösemittel (Wasser) als auch die Teile des Enzyms und des Inhibitors, die nicht direkt an Bindungsprozessen beteiligt sind, einen erheblichen Einfluss auf den Verlauf der Inhibitionsreaktion haben können, wurde dieser Einfluss nun genauer durch QM-/MM-Berechnungen untersucht. Hierbei wird der rechenintensive quantenmechanische Part, wie bei den initialen Berechnungen, auf jene Teile des Systems beschränkt, die direkt an Bindungsprozessen beteiligt sind. Zusätzlich wird der restliche Teil des Systems durch einen molekularmechanischen Ansatz unter dem Einfluss eines Kraftfelds simuliert, wobei z.B. sterische und elektrostatische Interaktionen berücksichtigt werden.¹¹⁹

Während die alleinige quantenmechanische Betrachtung einen thermoneutralen Verlauf der Reaktion vorhersagt, ergeben die QM-/MM-Berechnungen einen stark endergonen Verlauf der Reaktion mit einer Reaktionsenergie von $E_R = + 45,3$ kcal/mol. Das zugehörige Energiediagramm (Abb. 3-25) bildet diesen Reaktionsverlauf ab.

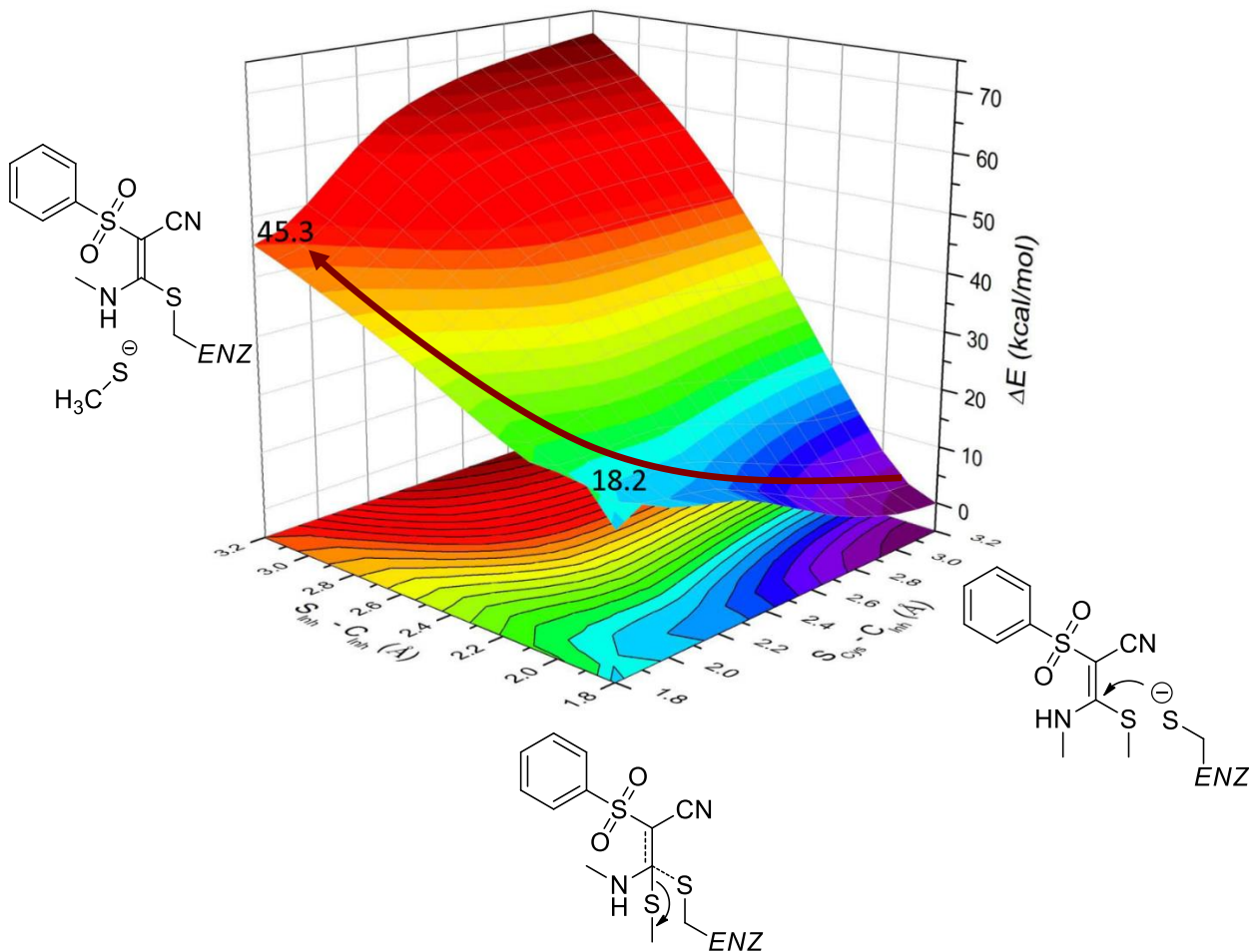


Abbildung 3-25 Energiediagramm der Inhibitionsreaktion eines *N,S*-Vinylsulfons und Rhodesain. Der Start der Inhibitionsreaktion befindet sich auf der rechten Seite des Diagramms. Der Cysteinrest des Enzyms nähert sich dabei bei der Ausbildung der kovalenten Bindung dem β -Kohlenstoffatom des Vinylsulfons an. Gleichzeitig entfernt sich der Methylthiolatrest des Inhibitors bis zum Bruch der Bindung von diesem Atom, was das Ende der Inhibitionsreaktion darstellt (links).

Die große Diskrepanz der beiden Berechnungen kann unterschiedliche Gründe haben. Am wahrscheinlichsten erscheint eine sterische Hinderung der Reaktion zwischen dem Enzym und dem Inhibitor zu sein. Im Vergleich zu dem hochpotenten irreversiblen Inhibitor K11777 befinden sich mit der Nitrilgruppe in α -Position und dem Thiomethylrest in β -Position zusätzliche Substituenten an der Doppelbindung. Zum einen kann es also zu ungünstigen Wechselwirkungen zwischen der Nitrilgruppe und dem Enzym kommen, zum anderen könnte der zusätzliche Thiomethylrest den nucleophilen Angriff des Cysteinrestes im aktiven Zentrum durch sterische Abschirmung erschweren oder verhindern. Auch der Einfluss des peptidischen Rests, der im Vergleich zu K11777 durch die unterschiedliche Verknüpfung mit dem *warhead* um ein Atom verschoben ist, könnte dazu führen, dass der Inhibitor nicht mehr gut in die Bindetasche passt, wodurch die Distanz zwischen dem Cysteinrest des Enzyms und dem β -Kohlenstoffatom des Vinylsulfons für die Ausbildung einer kovalenten Bindung zu groß wird.

Diese Überlegungen werden durch eine genauere Betrachtung mittels molekularem Docking bestätigt. Hierzu wurde die vorhandene Kristallstruktur von Rhodesain mit dem Inhibitor K11777 (PDB: 2P7U⁴⁸) herangezogen. Der Inhibitor wurde aus der Bindetasche entfernt und die

Verbindungen **7** und **11** einem Docking in dieser Bindetasche unterzogen. Die im Folgenden diskutierten Abbildungen zeigen jeweils die beste erhaltene Dockingpose, die gleichzeitig den geringsten Abstand der kovalenten Reaktionszentren (Schwefel von Cystein²⁵ und β -Kohlenstoffatom des Vinylsulfons) aufweist.

Bei Verbindung **7** (Abbildung 3-26, orange) fällt zunächst auf, dass der Leucin-Rest in P₁-Position nicht in der S₁-Tasche positioniert ist. Bei K11777 hingegen (Abbildung 3-26, grün) ist diese Tasche gut durch den Homophenylalaninrest in P₁-Position besetzt. Der Benzylrest von **7** füllt die S₁-Tasche ähnlich wie der Phenylalaninrest von K11777, wodurch hier ähnliche Wechselwirkungen zu erwarten wären. Die S₃-Tasche, die bei K11777 von dem Methylpiperazin-Rest besetzt wird, bleibt bei **7** unbesetzt.

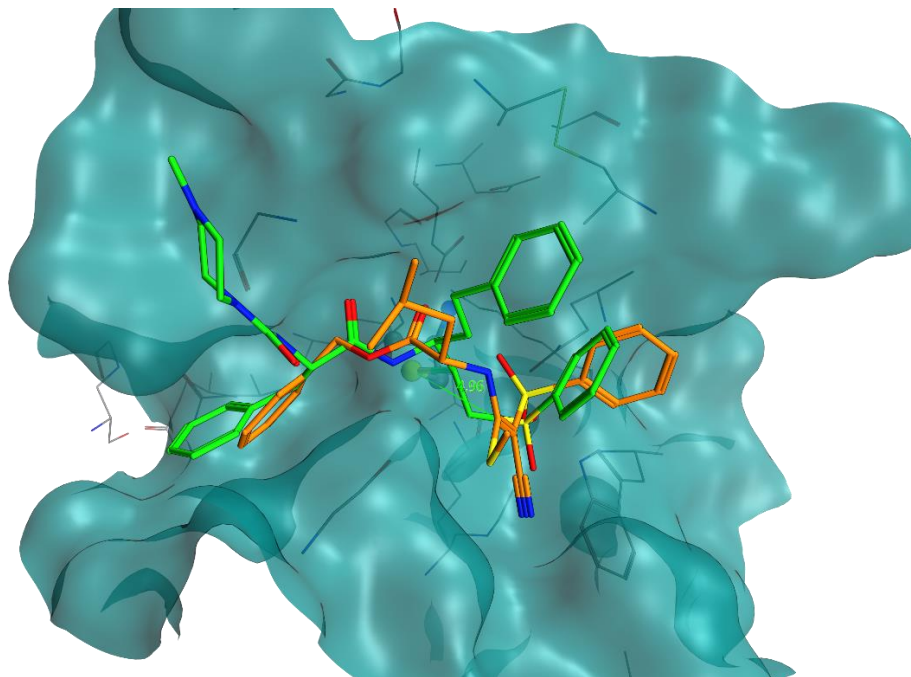


Abbildung 3-26 Überlagerung der Kristallstruktur von Rhodesain mit K11777 (grün) und Dockingpose von Verbindung **7** (orange). Der Abstand zwischen dem Schwefel von Cys²⁵ und β -Kohlenstoff von **7** beträgt 4,96 Å

Der Abstand zwischen dem Schwefelatom von Cys²⁵ und dem β -Kohlenstoffatom von **7** beträgt 4,96 Å. Für die Ausbildung einer kovalenten Bindung sollte dieser Abstand nicht größer als 3 Å sein. Dies ist in Einklang mit den erhaltenen Ergebnissen, wonach es nicht zur Ausbildung einer kovalenten Bindung im aktiven Zentrum des Enzyms kommt.

Ein ähnliches Bild ergibt sich für Verbindung **11** (Abbildung 3-27 (blau)). Hier scheint jedoch die Positionierung der einzelnen Reste besser zu sein. Der Homophenylalaninrest liegt ähnlich wie bei K11777 in der S₁-Tasche, ragt jedoch etwas weiter aus dieser heraus, der Phenylalaninrest positioniert sich wie bei K11777 in der S₂-Tasche und der Benzylrest kommt anlaog zu dem Methylpiperazinrest von K11777 in der S₃-Tasche zum liegen. Allerdings ist auch hier der Abstand zwischen den postulierten Reaktionszentren mit 4,56 Å zu groß zur Ausbildung einer kovalenten Bindung.

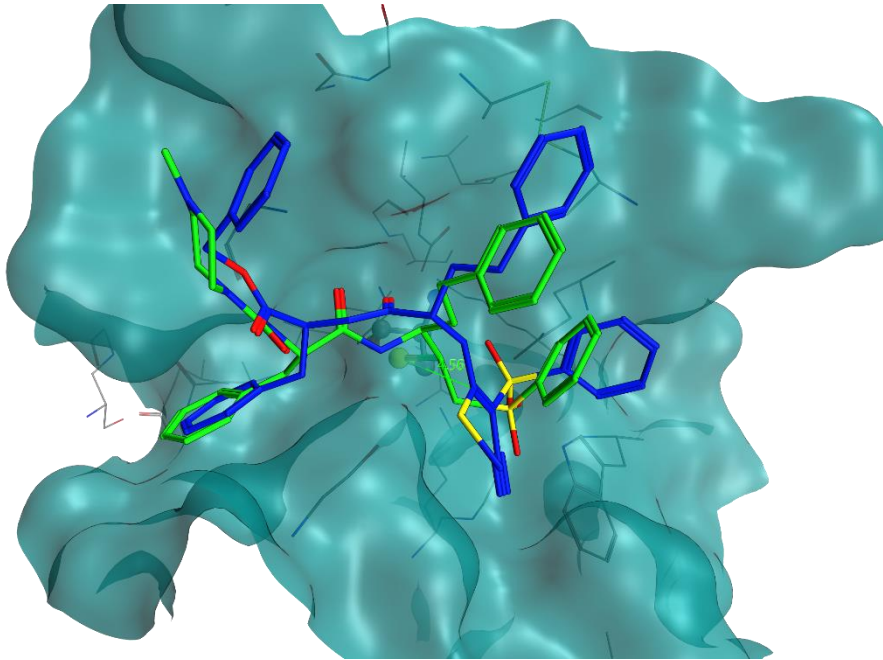


Abbildung 3-27 Überlagerung der Kristallstruktur von Rhodesain mit K11777 (grün) und Dockingpose von Verbindung 11 (blau). Der Abstand zwischen dem Schwefel von Cys25 und β -Kohlenstoff von 11 beträgt 4,56 Å

Betrachtet man die Wechselwirkungen zwischen Enzym und Inhibitor (Abbildung 3-28) wird deutlich, dass bei den Verbindungen 7 und 11 deutlich weniger konstruktive Wechselwirkungen zu beobachten sind als bei K11777. Bei diesem findet man neben der kovalenten Bindung zahlreiche Donor-Akzeptor-Wechselwirkung des peptidischen Rests mit dem Enzym, die bei 7 und 11 nicht vorhanden sind. Weiterhin werden die hydrophoben Seitenketten besser in den verschiedenen Bindetaschen positioniert, wodurch weniger negative Wechselwirkungen resultieren.

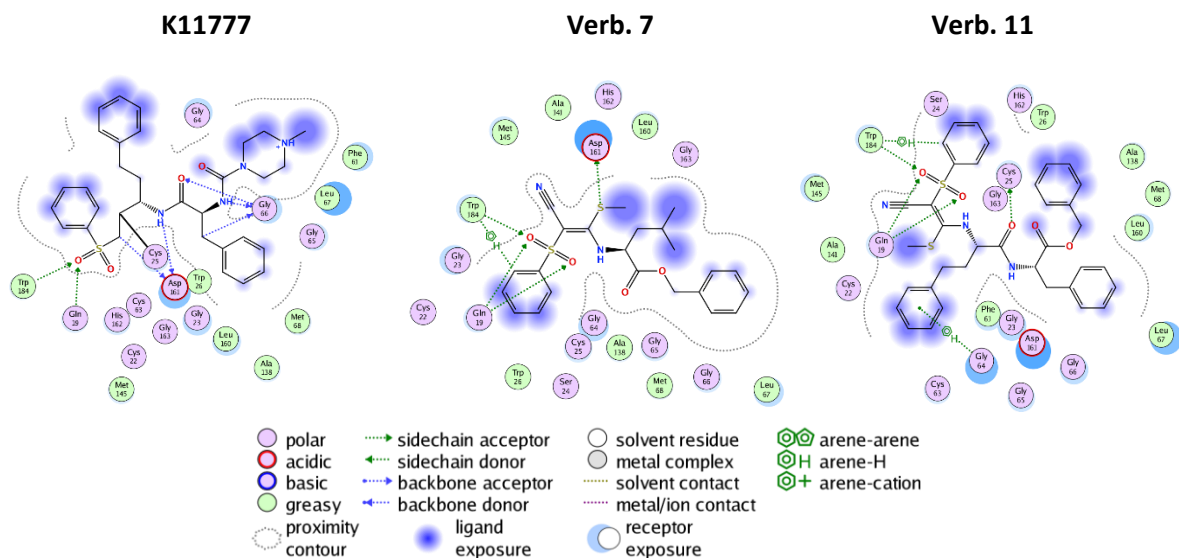


Abbildung 3-28 2-Dimensionale Darstellung der Ligand-Enzym Wechselwirkungen von K11777 (links), Verbindung 7 (Mitte) und Verbindung 11 (rechts) mit Rhodesain.

Zusammenfassung

Während die Einführung der verschiedenen Aminosäuren nicht zu einer Steigerung der Affinität der *N,S*-Vinylsulfone führte, konnte durch die Verwendung von peptidischen Resten eine leichte Verbesserung der inhibitorischen Potenz beobachtet werden. Es zeigte sich jedoch, dass diese nicht aus einer kompetitiven Hemmung bzw. der Ausbildung einer (reversiblen) kovalenten Bindung im Bereich des aktiven Zentrums resultiert. Dieses Verhalten konnte durch weitergehende Untersuchungen erklärt werden. Zum einen zeigten Untersuchungen mittels molekularem Docking eine ungünstige Positionierung der Liganden in der Bindetasche, bei dem der Abstand der jeweiligen Reaktionszentren zu dem Cysteinrest des Enzyms zu groß ist um eine kovalente Bindung auszubilden. Weiterhin lieferte eine Berechnung der Reaktionsenergie mittels QM/MM-Berechnungen einen stark endergonen Reaktionsverlauf, weshalb die zunächst propagierte Reaktion in der enzymatischen Umgebung nicht ablaufen sollte. Somit konnte in diesem Teil der Arbeit das Ziel, der Entwicklung von kovalent-reversiblen Inhibitoren, nicht erreicht werden. Durch weitergehenden Untersuchungen konnte jedoch das experimentelle Verhalten der untersuchten Verbindungsklasse erklärt werden und die so erhaltenen Erkenntnisse bildeten die Grundlage für die im Folgenden beschriebenen Untersuchungen.

4. Ergebnisse: α -Halogen-Vinylsulfone

4.1 QM-/MM-Berechnungen

Das Substitutionsmuster der in Kapitel 3 beschriebenen Vinylsulfone brachte keine erfolgversprechenden Inhibitoren hervor. Daher sollten mit Hilfe von QM-/MM-Berechnungen (durchgeführt im Arbeitskreis von Prof. Engels, Universität Würzburg) weitere Substitutionsmuster der Doppelbindung von Vinylsulfonen identifiziert werden, die den gewünschten kovalent-reversiblen Inhibitionsmechanismus ermöglichen sollten.

In einem ersten *screening* geeigneter Substituenten wurden die Reaktionsenergien für die Modellreaktion der entsprechend substituierten Vinylsulfone mit Methanthiol mit Hilfe reiner QM-Berechnungen ermittelt (Abb. 4-1). Dabei konnten Vinylsulfone, die mit einem Halogenatom in α -Position substituiert sind, als vielversprechende Kandidaten identifiziert werden. Die Reaktionsenergien für die Modellreaktion dieser Derivate liegen bei -6 bis -10 kcal/mol. Die Reaktion dieser Derivate sollte demnach deutlich weniger exotherm verlaufen als die Reaktion des unsubstituierten irreversiblen Inhibitors K11777 ($\Delta E_R = -22,6$ kcal/mol, s.u. Abb.4-2).

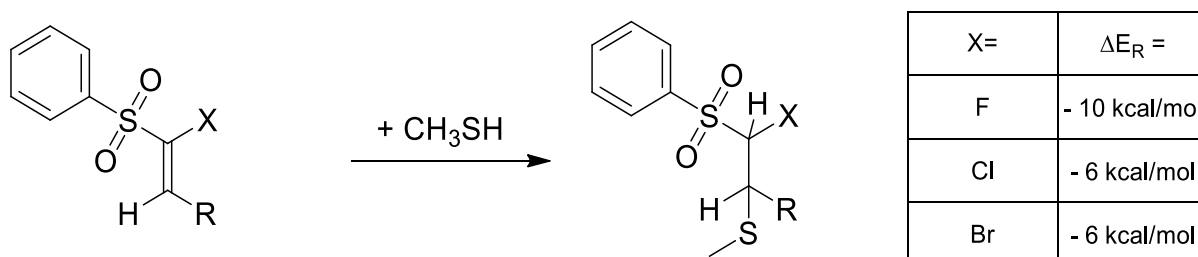


Abbildung 4-1 Modellreaktion von Vinylsulfonen mit Methanthiol und berechnete Reaktionsenergien für X= F, Cl, Br.

Wie in Kapitel 3 aufgezeigt bilden diese ersten Berechnungen jedoch nur grobe Anhaltspunkte, da bei der eigentlichen Reaktion die Enzymumgebung einen erheblichen Einfluss auf den Verlauf der Reaktion haben kann. Im nächsten Schritt wurden die identifizierten vielversprechenden Kandidaten daher einer genaueren Untersuchungen mittels QM/MM-Berechnungen unter Berücksichtigung der enzymatischen Umgebung unterzogen. Um einen Startpunkt für diese Berechnungen zu erhalten wurde zunächst die Kristallstruktur von Rhodococcus mit dem kovalent gebundenen Inhibitor K11777 (PDB: 2P7U)⁴⁸ herangezogen. Dabei wurde die Inhibitionsreaktion ausgehend von dem kovalenten Enzym-Inhibitor-Komplex (E-I) zurückgerechnet zum entsprechenden nicht-kovalenten Komplex (E---I) (Abb. 4-2)

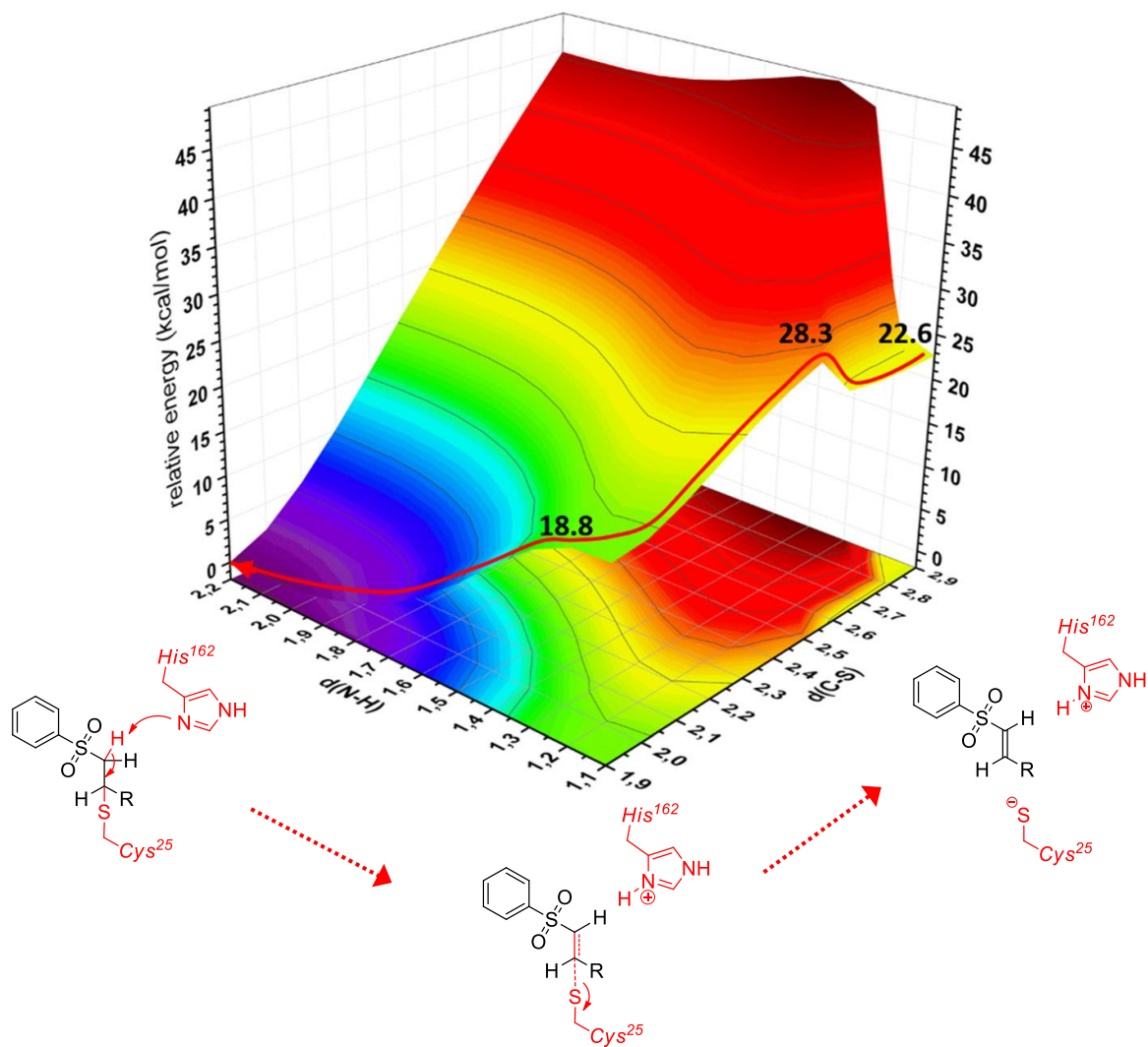


Abbildung 4-2 Potentielle Energieoberfläche für die Ausbildung der kovalenten Bindung zwischen Cys²⁵ von Rhodesain und K11777. Der Abstand $d(C-S)$ zwischen dem Schwefelatom von Cys²⁵ und dem β -Kohlenstoff von K11777 beschreibt den Angriff des Thiolats an der Doppelbindung. Der Abstand $d(N-H)$ zwischen dem Proton in α -Position und dem Imidazoliumion von His¹⁶² beschreibt die Protonierung am α -Kohlenstoff des Inhibitors.¹²⁰

Die berechnete Reaktionsenergie liegt dabei bei - 22,6 kcal/mol, wobei eine Energiebarriere von ca. 6 kcal/mol durchlaufen werden muss. Diese Energien sind in guter Übereinstimmung mit dem experimentell beobachteten Verhalten einer effizienten, irreversiblen Inhibition von Rhodesain durch K11777.

Da die im ersten Schritt identifizierten Kandidaten, abgesehen von dem Halogensubstituenten, identisch mit dem irreversiblen Inhibitor sind kann davon ausgegangen werden, dass die Wechselwirkungen im nicht-kovalenten Komplex vergleichbar sind. Daher kann ausgehend von dem berechneten nicht-kovalenten Komplex des irreversiblen Inhibitors das Wasserstoffatom in α -Position durch ein Halogenatom (F, Cl, Br) ersetzt und der kovalente Teil der Inhibitionsreaktion simuliert werden (Abb. 4-3 & Abb. 4-4).

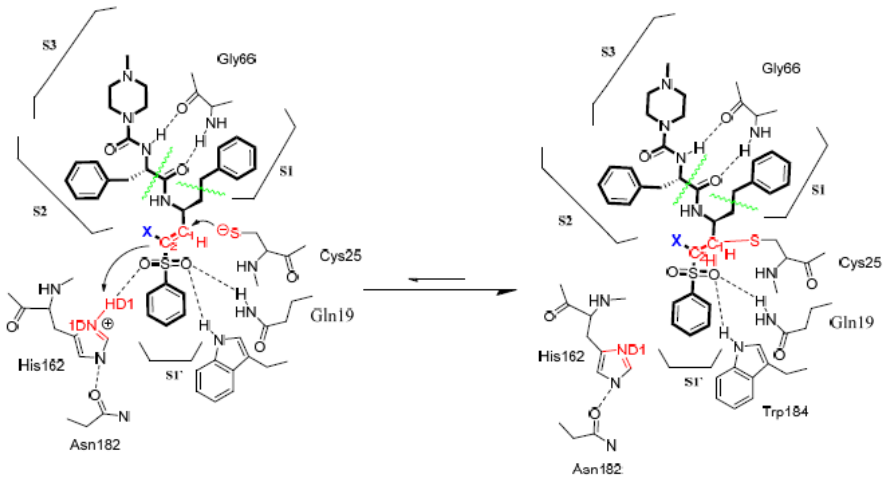


Abbildung 4-3 Zweidimensionale Darstellung der Inhibitionsreaktion von Rhodesain durch Vinylsulfone (X = H, Halogen) mit beteiligten Wechselwirkungen.¹²⁰

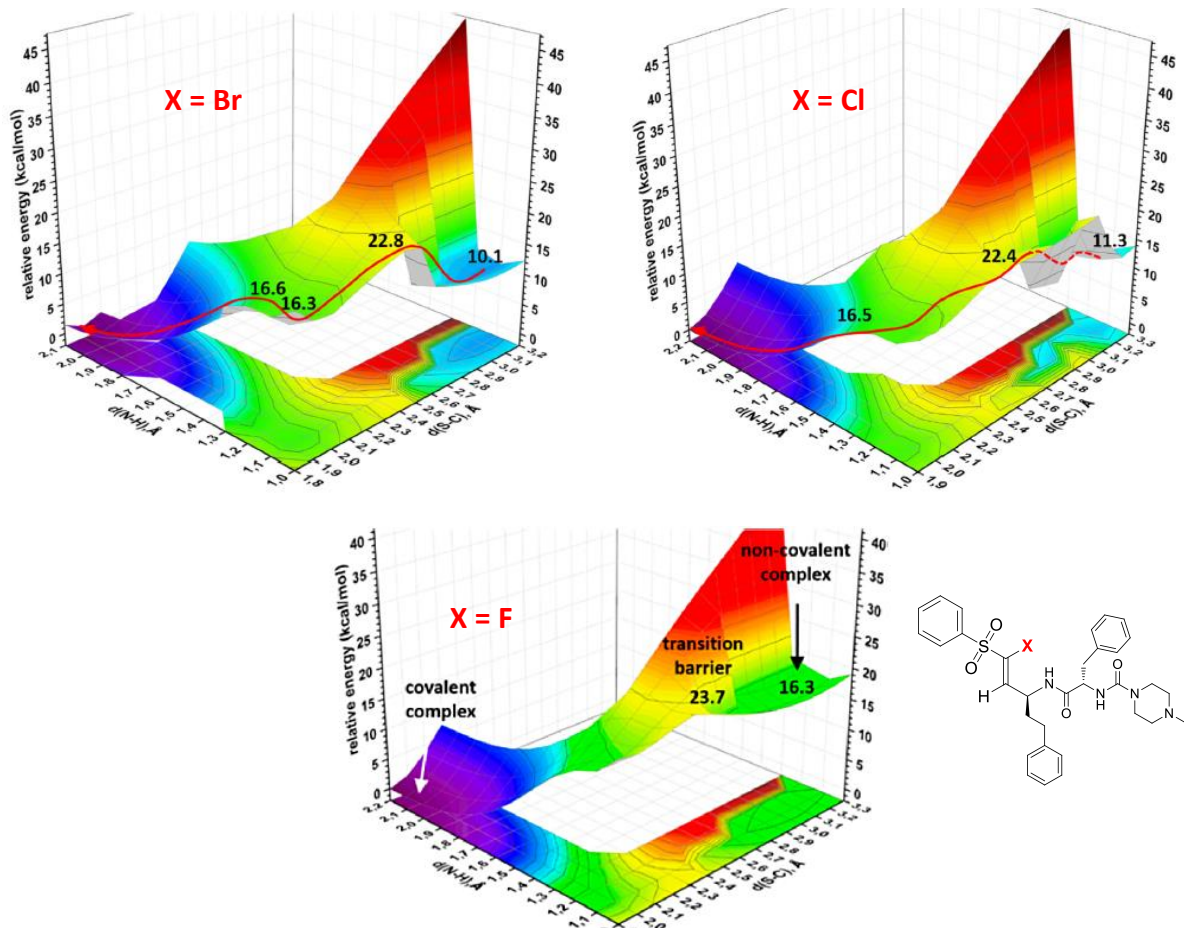


Abbildung 4-4 Potentielle Energieoberfläche für die Ausbildung der kovalenten Bindung zwischen Cys²⁵ von Rhodesain und verschiedenen Vinylsulfonen (X = Br: links; Cl: rechts; F: unten). Der Abstand $d(C-S)$ zwischen dem Schwefelatom von Cys²⁵ und dem β -Kohlenstoff von K11777 beschreibt den Angriff des Thiolats an der Doppelbindung. Der Abstand $d(N-H)$ zwischen dem Proton in α -Position und dem Imidazoliumion von His¹⁶² beschreibt die Protonierung am α -Kohlenstoff des Inhibitors.¹²⁰

Die berechneten Reaktionsenergien für die kovalente Reaktion der Halogen-substituierten Vinylsulfone mit Rhodocytin sind alle kleiner als die Reaktionsenergie für die entsprechende Reaktion des irreversiblen Inhibitors. Insbesondere die Einführung eines Brom- oder Chlor-Substituenten scheint einen positiven Einfluss auf die Reversibilität der Reaktion zu haben, da die Reaktionsenergien hier mit ca. - 10 kcal/mol (X = Br) bzw. - 11 kcal/mol (X = Cl) deutlich unter der Reaktionsenergie der irreversiblen Reaktion liegen (ca. - 23 kcal/mol, X = H). Die Fluor-substituierte Verbindung scheint einen Grenzfall hinsichtlich der Reversibilität darzustellen. Die berechnete Reaktionsenergie dieses Derivates liegt mit ca. - 16 kcal/mol nur 6 kcal/mol unter derjenigen der irreversiblen Reaktion. Um diese Berechnungen zu verifizieren wurden die entsprechenden Verbindungen im Folgenden synthetisiert und hinsichtlich Affinität, Reversibilität und weiterer Parameter genauer untersucht.

4.2 Synthesen

4.2.1 Synthese von K11777

Die Synthese des irreversiblen Inhibitors K11777 erfolgte erstmals durch Palmer et al.^{74,76,121}, wobei bis heute zahlreiche modifizierte Syntheserouten eingesetzt wurden¹²²⁻¹²⁵. Die in dieser Arbeit eingesetzte Synthese folgt mit einigen Modifikationen der Synthese von Palmer et al. (Abb 4-5).

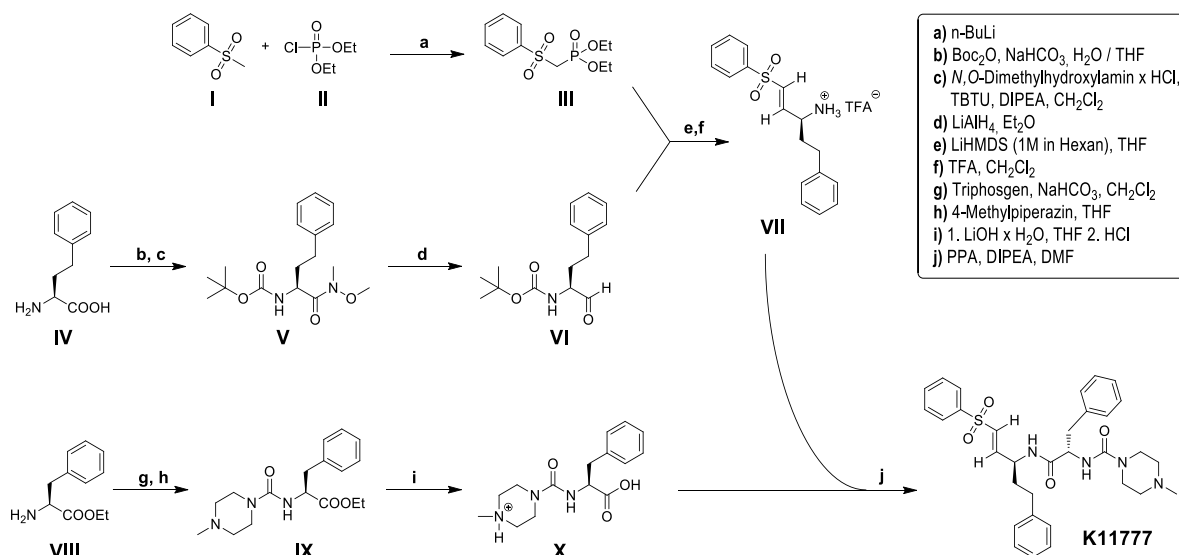


Abbildung 4-5 Synthese von K11777

Dabei wird zunächst das *Horner*-Reagenz III durch Umsetzung von Methylphenylsulfon I mit Diethylchlorophosphat II und *n*-Buthyllithium als Base in einer S_N2-Reaktion synthetisiert. Im zweiten Teil der Syntheseroute wird der Aldehyd des Homophenylalanins synthetisiert. Hierzu wird zunächst die Aminofunktion der Aminosäure durch Einführen einer *tert*-Butyloxycarbonyl-Schutzgruppe (Boc) geschützt. Anschließend wird durch Reaktion mit *N,O*-Dimethylhydroxylamin und dem

Kupplungsreagenz TBTU (*O*-(Benzotriazol-1-yl)-*N,N,N',N'*-tetramethyluroniumtetrafluoroborat) das entsprechende *Weinreb*-Amid **V** synthetisiert. Dieses kann anschließend mit Lithiumaluminiumhydrid in sehr guter Ausbeute zum Aldehyd **VI** reduziert werden.

Als Kupplungsreagenz zur Synthese des *Weinreb*-Amids wurde im Gegensatz zu einigen früher veröffentlichten Synthesen^{123,126} das moderne Kupplungsreagenz TBTU verwendet, da dessen Einsatz einige vorteilhafte Eigenschaften wie geringe Racemisierungsneigung, gut abtrennbare Nebenprodukte, hohe Ausbeuten und milde Reaktionsbedingungen aufweist. Der Mechanismus dieser Amidsynthese (Abb. 4-6) verläuft zunächst über den Angriff des Carboxylates der Aminosäure an dem Kohlenstoffatom der Uroniumgruppierung, wobei deprotoniertes Hydroxybenzotriazol (HOBt) und der aktivierte Ester der Aminosäure gebildet werden. Es folgt eine Umacylierung durch das entstandene HOBt zum Oxybenzotriazolester wobei Tetramethylharnstoff freigesetzt wird. Im letzten Schritt erfolgt ein nucleophiler Angriff des Amins an das aktivierte Carbonylkohlenstoffatom, wodurch unter Freisetzung von HOBt das Amid gebildet wird.

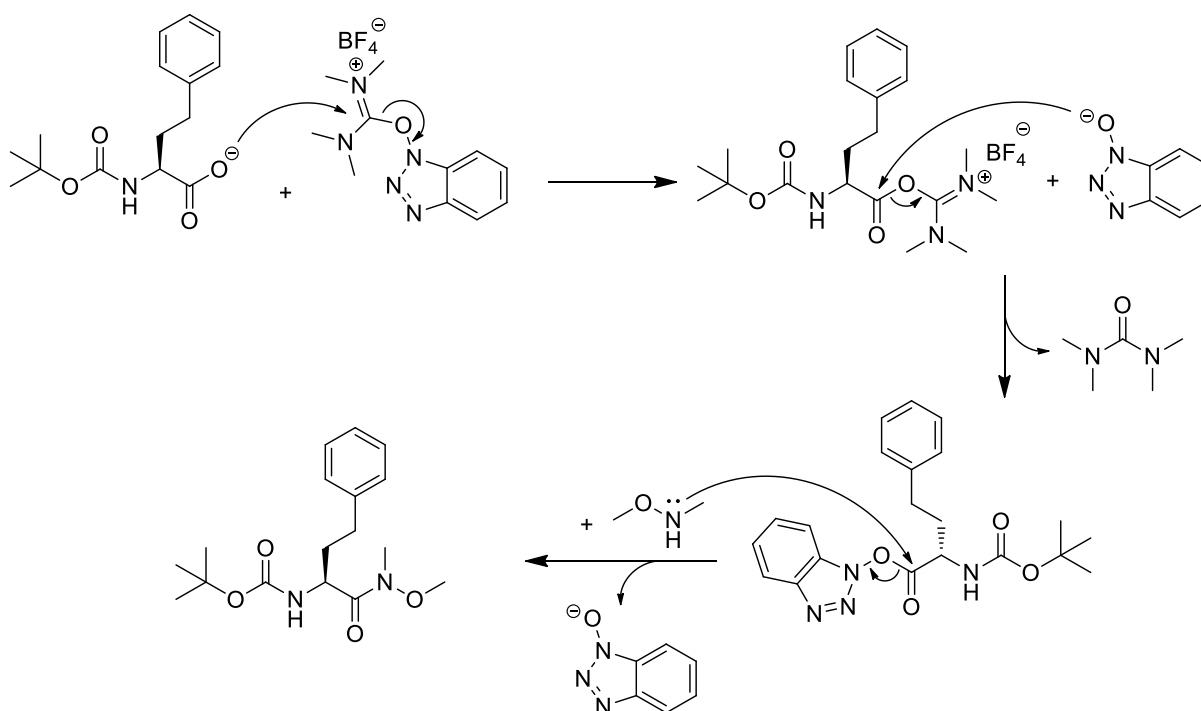


Abbildung 4-6 Mechanismus der Synthese des *Weinreb*-Amids mit TBTU.

Die Synthese des *Weinreb*-Amids ist erforderlich, da eine direkte Reduktion der Aminosäure **III** mit den gebräuchlichen Reagenzien nicht zum gewünschten Aldehyd **VI** führt, sondern direkt den entsprechenden Alkohol ergibt. Verwendet man stattdessen bei der Reduktion das *Weinreb*-Amid bildet sich zunächst nach nucleophilem Angriff eines Hydrids des Reduktionsmittels ein Chelatkomplex mit Lithium, der durch die Methoxygruppe stabilisiert wird (Abb. 4-7). Dieser relative stabile Komplex ist unempfindlich gegen weitere Reduktion. Der Aldehyd wird schließlich durch wässrige saure Aufarbeitung erhalten, wobei überschüssiges Reduktionsmittel durch Wasser gequenchet wird.¹²⁷

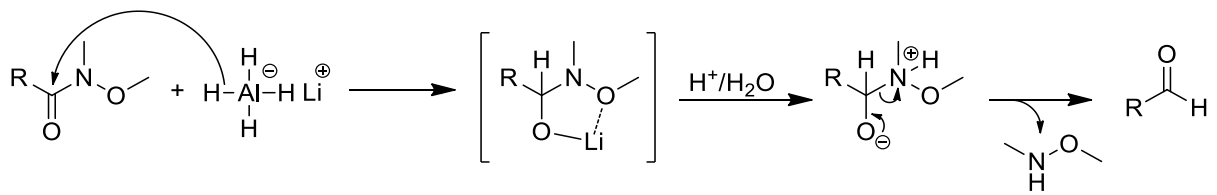


Abbildung 4-7 Mechanismus der Reduktion eines *Weinreb*-Amids zum Aldehyd.

Der Aldehyd **VI** kann nun zusammen mit dem *Horner*-Reagenz **III** in einer *Horner-Wadsworth-Emmons*-Reaktion (HWE-Reaktion) zum Vinylsulfonbaustein **VII** umgesetzt werden (Abb 4-8). Hierbei wird zunächst das *Horner*-Reagenz durch eine starke Base deprotoniert. Es folgt ein nucleophiler Angriff des resultierenden Carbanions an das Carbonylkohlenstoffatom des Aldehyds. Die hohe Affinität des Phosphors zu Sauerstoff führt schließlich zur Eliminierung von Diethylphosphat und Freisetzung des Vinylsulfons. Bei dieser Reaktion wird typischerweise bevorzugt das gewünscht *E*-Alken gebildet.

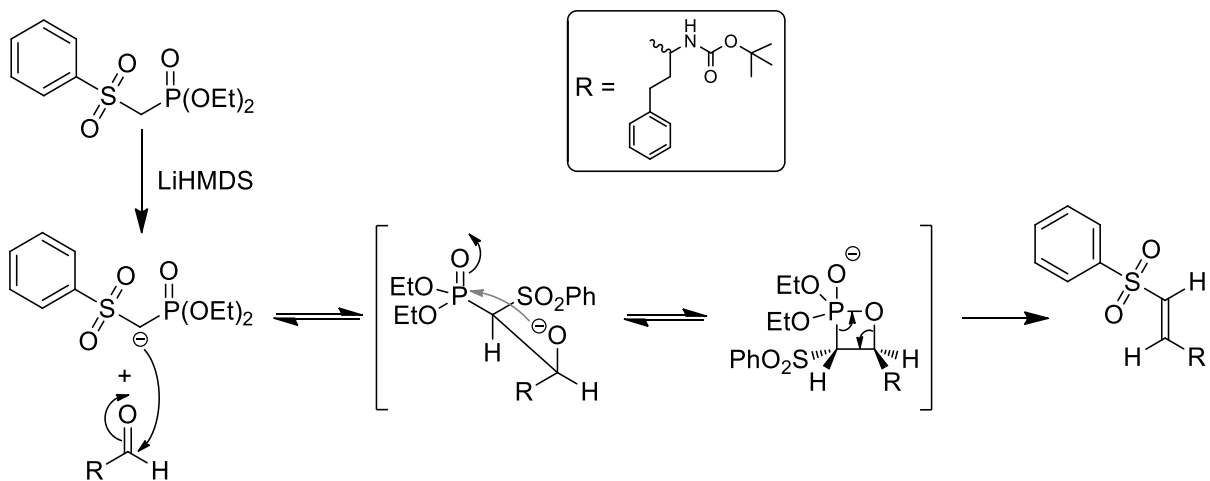


Abbildung 4-8 Mechanismus der HWE-Reaktion.

Die Boc-Schutzgruppe kann anschließend unter stark sauren Bedingungen mittels Trifluoressigsäure entfernt werden, wodurch der Vinylsulfonbaustein **VII** erhalten wird.

Im dritten Teil der Syntheseroute wird die Seitenkette ausgehend von Phenylalaninethylester **VIII** synthetisiert. Dieses wird zunächst mit Triphosgen – eine sicherere Alternative zu Phosgen – zum Isocyanat umgesetzt, welches direkt mit 4-Methylpiperazin weiter zum Harnstoffderivat **IX** umgesetzt wird (Abb. 4-9)

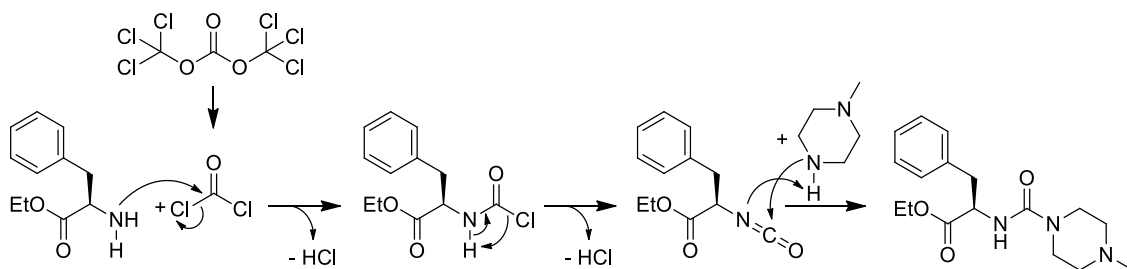


Abbildung 4-9 Synthese des Harnstoffderivates IX.

Aus **IX** wird schließlich durch eine basisch katalysierte Verseifung mit Lithiumhydroxyd die freie Säure **X** erhalten.

Der letzte Schritt der Synthese besteht in einer Peptidkupplung des Vinylsulfonbausteins **VII** (Abbildung 4-5) mit freier Aminogruppe und der Seitenkette **X** als Säurekomponente. Während in ersten Versuchen mit gängigen Kupplungsreagenzien wie EDC / HOBt oder TBTU nur sehr geringe Ausbeuten erreicht werden konnten, lieferte der Einsatz von PPA (Propylphosphonsäureanhydrid) als Kupplungsreagenz gute Ausbeuten im Bereich von 50 – 60%. PPA aktiviert dabei zunächst die Carbonsäure in Form des gemischten Phosphonsäureanhydrids. Der nucleophile Angriff der Aminkomponente an dem Carbonylkohlenstoffatom führt zur Ausbildung der Peptidbindung unter Freisetzung des Propylphosphonsäureanhydrids (Abb. 4-10). Dieses wasserlösliche Nebenprodukt lässt sich anschließend einfach durch wässrige Extraktion aus dem Reaktionsgemisch entfernen.

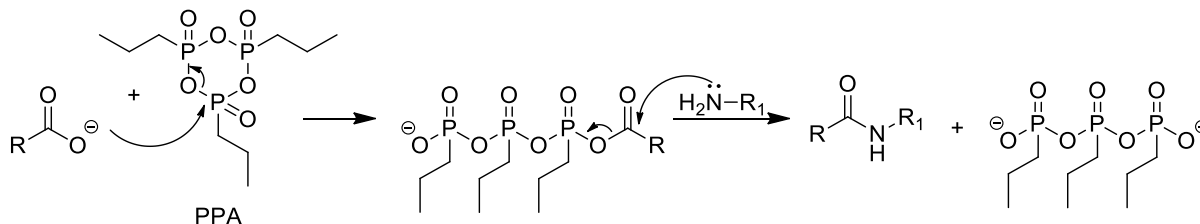


Abbildung 4-10 Mechanismus der Peptidkupplung mittels PPA.

4.2.2 Synthese der α -Halogen-Vinylsulfone

Die Synthese der Halogen-substituierten Vinylsulfone erfolgte weitgehend analog zu der oben beschriebenen Synthese von K11777. Allerdings mussten hierfür zunächst die entsprechenden Halogen-substituierten *Horner*-Reagenzien synthetisiert werden (Abb. 4-11). Für die Synthese des bromierten und fluorierten Derivats konnte dabei direkt von dem oben beschriebenen unsubstituierten Diethyl((phenylsulfonyl)methyl)phosphonat **III** ausgegangen werden. Für das Bromderivat **XI** wurde das C-H-acide Kohlenstoffatom des Phosphonats **III** mit Natriumhydrid deprotoniert und anschließend durch Zugabe elementaren Broms bromiert. Dabei fällt als Nebenprodukt u.a. das zweifach bromierte Produkt **XIa** an, welches sich durch vorsichtige Säulenchromatographie abtrennen lässt. Weiterhin ist es möglich dieses Nebenprodukt durch Reduktion mit Zinn(II)chlorid zu dem gewünschten einfach bromierten Produkt umzusetzen.

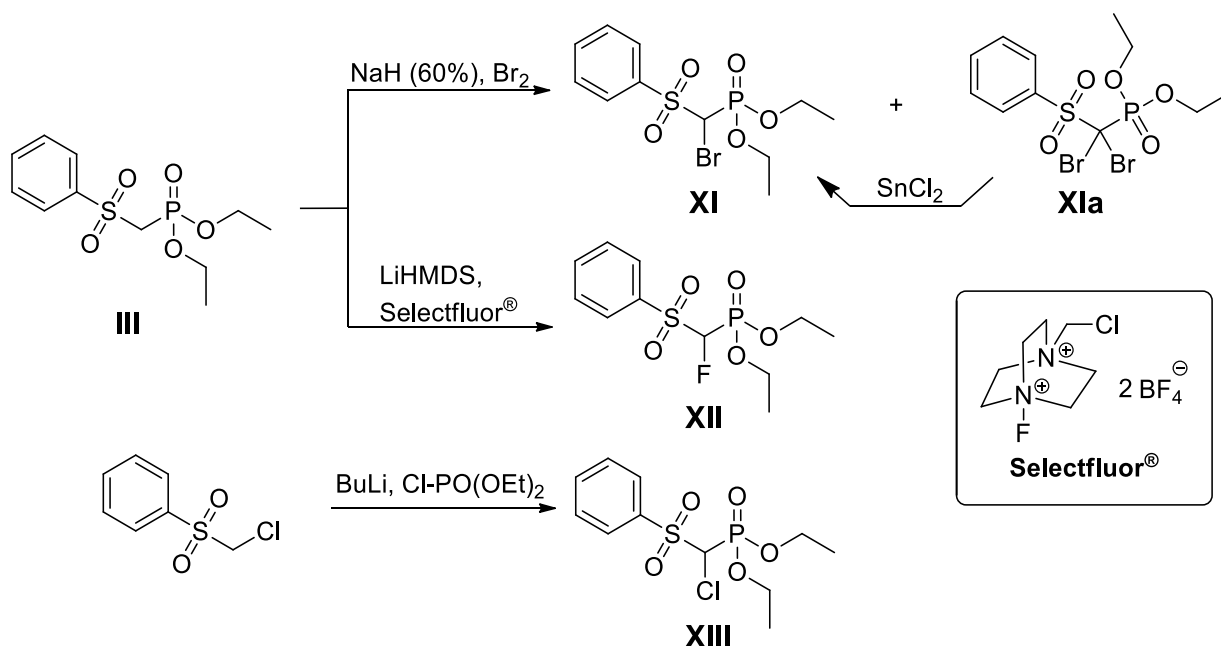


Abbildung 4-11 Synthese der halogenierten *Horner*-Reagenzien XI – XIII

Das fluorierte Derivat **XII** konnte durch eine elektrophile Fluorierung mit dem Reagenz Selectfluor[®] synthetisiert werden. Dieses Reagenz stellt eine Quelle elektrophilen (elektronenarmem) Fluors dar, wodurch das Phosphonat **III** nach Deprotonierung vermutlich über einen S_N2-Mechanismus^{128,129} fluoriert werden kann.

Das chlorierte Derivat **XIII** konnte ausgehend von dem kommerziell erhältlichen Chloromethylphenylsulfon synthetisiert werden. Dies gelang durch eine S_N2-Reaktion analog zur Synthese des unsubstituierten *Horner*-Reagenz' **III**.

Ausgehend von den halogenierten *Horner*-Reagenzien erfolgte die weitere Synthese der Zielverbindungen **12**, **13** und **14** (Abb. 4-12) analog zu der beschriebenen Route für den unsubstituierten Inhibitor: HWE-Reaktion gefolgt von Kupplung mit der peptidischen Seitenkette.

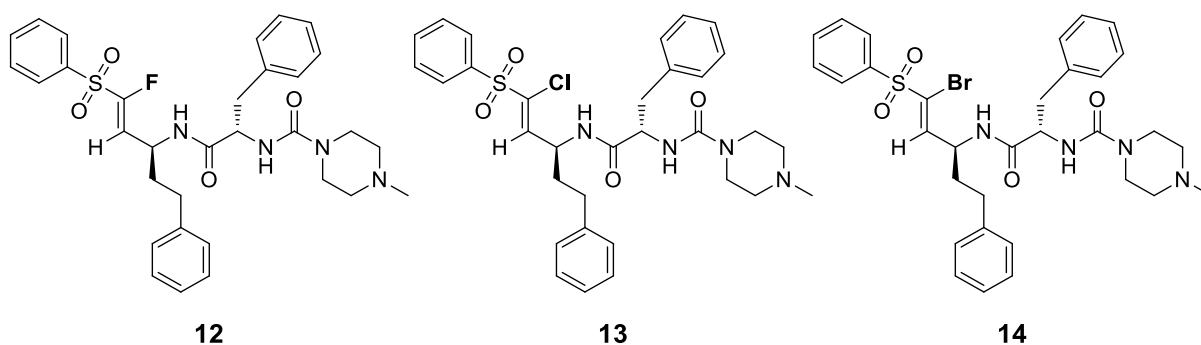


Abbildung 4-12 Struktur der halogenierten Vinylsulfone.

Weiterhin konnte der bromierte Vinylsulfonbaustein **XIV** auch in einer Eintopfsynthese hergestellt werden (Abb. 4-12) Hierzu wurde zunächst das bromierte *Horner*-Reagenz **XI** hergestellt und ohne weitere Aufarbeitung mit dem Aldehyd **VI** in einer HWE-Reaktion umgesetzt. Hierbei konnte eine akzeptable Ausbeute von 39 % erreicht werden. Dies liegt im Bereich der zweistufigen Synthese, wobei man sich eine zeitaufwändige Isolierung des Zwischenprodukts **XI** erspart.

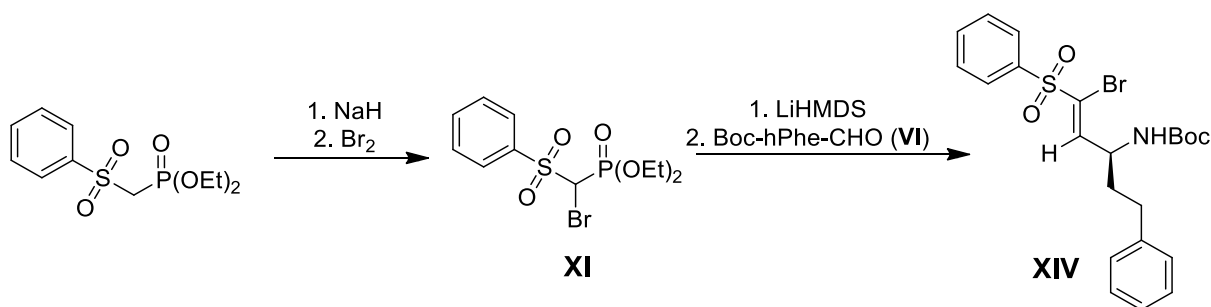


Abbildung 4-13 Eintopfsynthese des bromierten Vinylsulfonbausteins XIV

4.3 Biochemische und biologische Untersuchungen der α -Halogen-Vinylsulfone

Screening

Auch diese Substanzen wurden zunächst in einem *screening* auf ihre inhibitorische Aktivität an verschiedenen Enzymen bei einer festgelegten Inhibitorkonzentration untersucht (Tabelle 4-1).

Tabelle 4-1 Prozentuale Hemmung der Enzyme Rhodesain, Cathepsin L und B durch die α -Halogen-Vinylsulfone.

Verbindung	X =	% Hemmung [I] = 20 μ M		
		Rhodesain	Cath. L	Cath.B
12	F	97	99	98*
13	Cl	60	98	98*
14	Br	83	99	51*
K11777	H	99	99	99*

* [I] = 33 μ M

Die getesteten Verbindungen zeigten bei diesem *screening* hohe bis sehr hohe Werte der prozentualen Hemmung bei allen drei getesteten Enzymen. So war Verbindung **12** (X = F) in der Lage alle drei getesteten Enzym nahezu vollständig zu inhibieren. Verbindung **13** (X = Cl) bewirkte eine nahezu vollständige Hemmung von Cathepsin B und L, sowie eine etwas schwächere Hemmung des Enzyms Rhodocollin in Höhe von 60 %. Auch Verbindung **14** (X = Br) bewirkte eine nahezu vollständige Hemmung von Cathepsin L, während für Rhodocollin und Cathepsin B Werte in Höhe von 83% bzw. 51% beobachtet wurden. Der Inhibitor K11777 bewirkte in den verwendeten Konzentrationen wie erwartet eine vollständige Hemmung der getesteten Enzyme. Aufgrund dieser vielversprechenden Ergebnisse wurden die Verbindungen im Anschluss genaueren Untersuchungen u.a. zur Bestimmung der IC_{50} - bzw. K_i -Werte unterzogen.

Bestimmung von IC_{50} - und K_i -Werten

Zunächst wurden Verdünnungsreihen der Inhibitoren angefertigt, die einen möglichst großen Konzentrationsbereich umfassen sollten. Zum einen konnte so durch visuelle Inspektion des Kurvenverlaufs die Zeitabhängigkeit der Inhibition beurteilt werden, was erste Hinweise auf die Reversibilität der Reaktion erlaubt. Zum anderen kann anhand dieser groben Verdünnungsreihe der Konzentrationsbereich zur genauen Bestimmung der inhibitorischen Konstanten abgeschätzt werden. Dieser Bereich sollte idealer Weise so gewählt werden, dass jeweils mindestens drei Konzentrationen über- und unterhalb des jeweiligen IC_{50} - oder K_i -wertes liegen.

Bei den drei Verbindungen **12** – **14** ist, wie in Abbildung 4-14 exemplarisch für Verbindung **12** dargestellt ein annähernd linearer Verlauf der Substrathydrolyse und somit eine zeitunabhängige Hemmung zu beobachten.

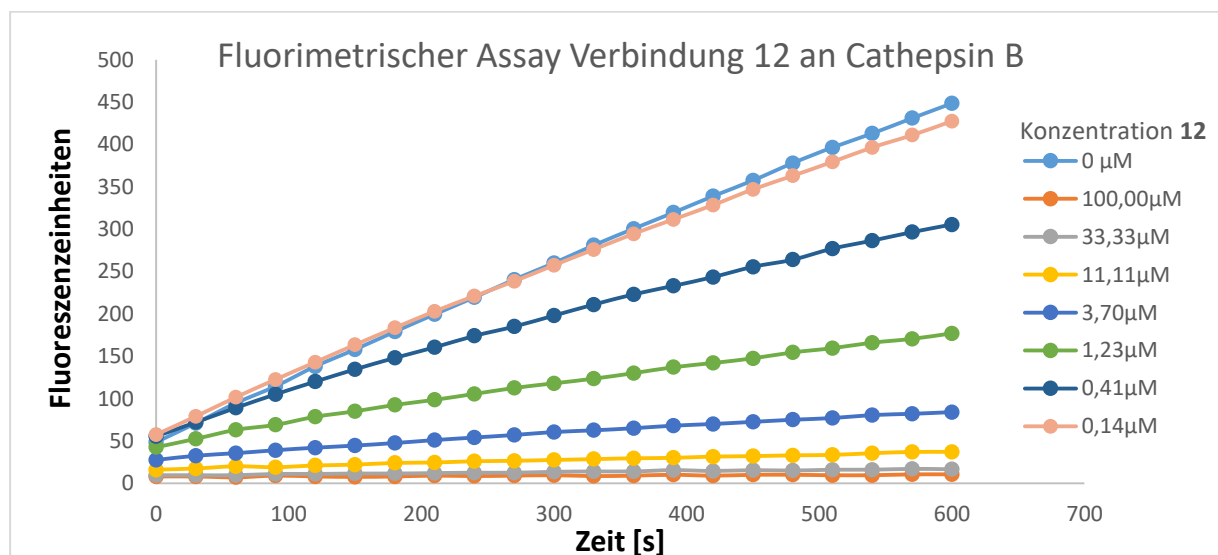


Abbildung 4-14 Verlauf der Substrathydrolyse mit verschiedenen Konzentrationen von Verbindung **12** durch Cathepsin B in einem fluorimetrischen Assay.

Bei dem irreversiblen Inhibitor **K11777** hingegen zeigte sich eine deutliche Zeitabhängigkeit der Inhibition wie in Abbildung 4-15 am Beispiel von Cathepsin B dargestellt. Dies entspricht den Erwartungen aufgrund des irreversiblen kovalenten Inhibitionsmechanismus.

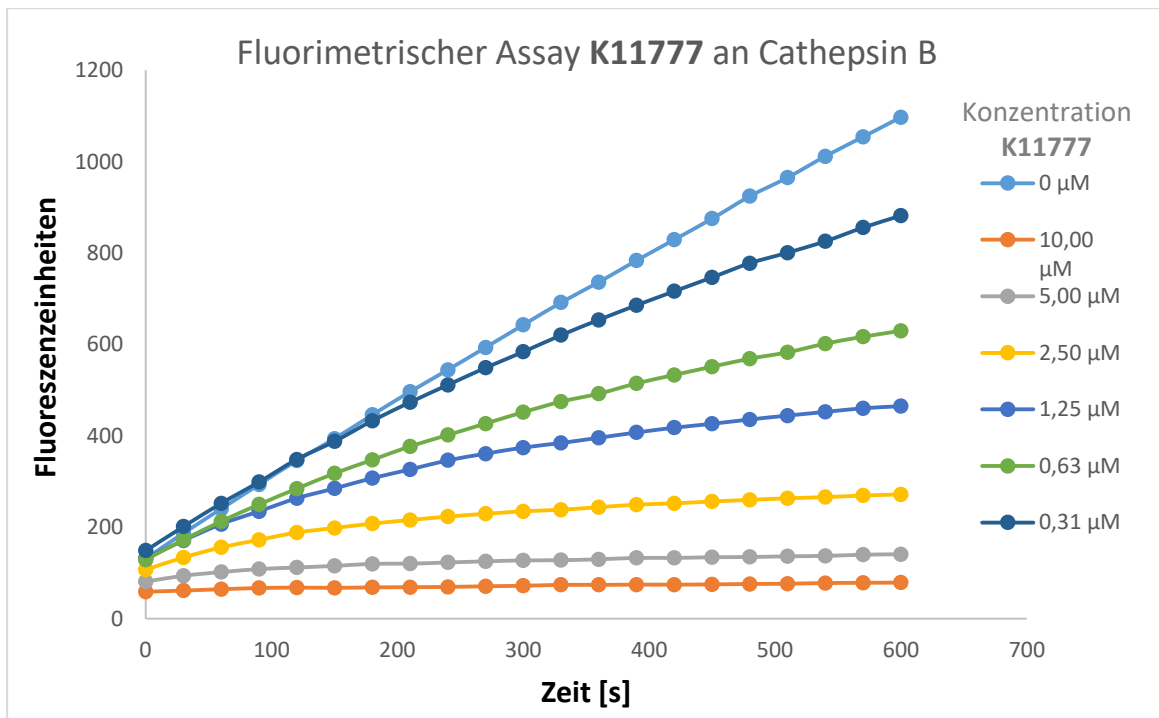


Abbildung 4-15 Verlauf der Substrathydrolyse mit verschiedenen Konzentrationen von K11777 durch Cathepsin B in einem fluorimetrischen assay.

Für die zeitunabhängigen Inhibitoren **12** – **14** wird nun die Substrathydrolyserate (gemessen in Fluoreszenzeinheiten) durch lineare Regression der Umsatz-Zeit-Kurven ermittelt. Da verschiedene Faktoren, wie die zunehmende Substrathydrolyse oder verminderte Enzymaktivität mit fortschreitender Zeit, die Linearität der Umsatz-Zeit-Kurven beeinflussen können, muss darauf geachtet werden, nur die ersten konstanten Minuten der Umsatz-Zeit-Kurven in denen *steady-state*-Bedingungen gewährleistet sind, zu berücksichtigen. Beispielhaft ist die Bestimmung der Substrathydrolyserate durch Cathepsin B mit Verbindung **12** in Abbildung 4-16 gezeigt.

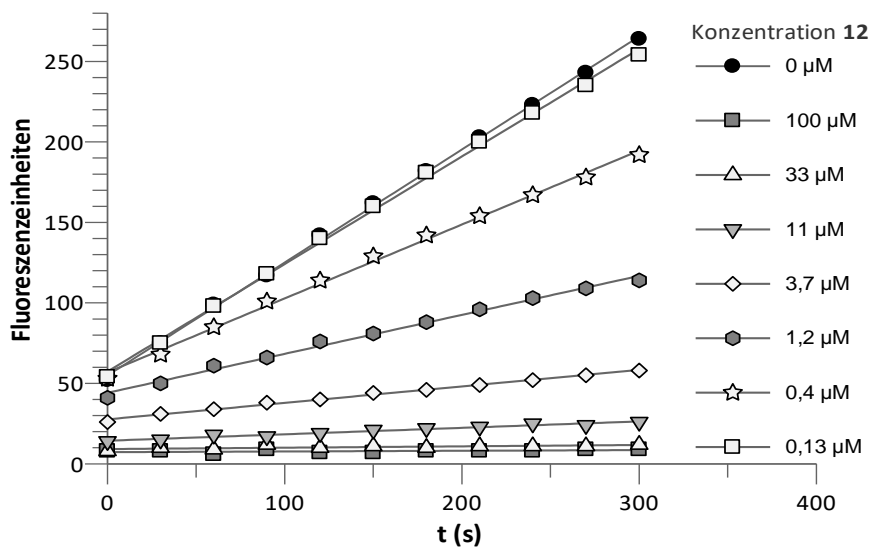


Abbildung 4-16 Bestimmung der Substrathydrolyserate durch lineare Regression am Beispiel von Verbindung 12 an Cathepsin B.

Aus den ermittelten Substrathydrolyseraten lässt sich anschließend durch Auftragung gegen die Inhibitorkonzentration und nicht-linearer Regression gemäß Gleichung 27 der IC_{50} -Wert ermitteln. Abbildung 4-17 verdeutlicht dies am Beispiel der Hemmung von Cathepsin B durch Verbindung **12**.

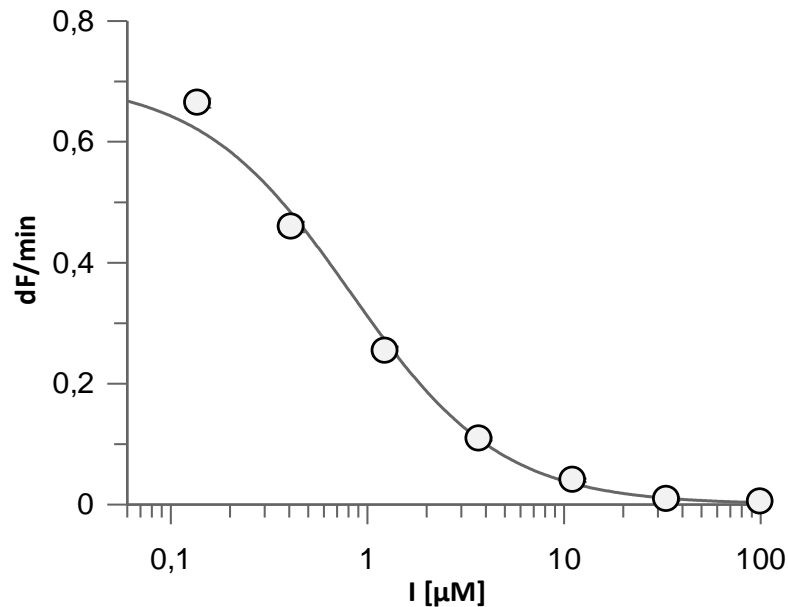


Abbildung 4-17 Auftragung der Substrathydrolyserate gegen die Inhibitorkonzentration zur Ermittlung des IC_{50} -Wertes am Beispiel von Cathepsin B mit Verbindung **12**.

Aus den so erhaltenen IC_{50} -Werten lassen sich unter Berücksichtigung der Substratkonzentration und des entsprechenden K_M -Wertes die zugehörigen K_I -Werte mit Hilfe der *Cheng-Prusoff*-Gleichung (28) berechnen. Die verwendeten Substratkonzentrationen und K_M -Werte für die verschiedenen Enzyme können Tabelle 4-2 entnommen werden.

Tabelle 4-2 Verwendete Substratkonzentrationen und K_M -Werte.

	Substratkonzentration	K_M
Rhodesain	10 μM	0,8265 μM
Cathepsin L	6,25 μM	10 μM
Cathepsin B	100 μM	150 μM

Die ermittelten IC_{50} - und K_I -Werte der Verbindungen **12** – **14** sind in Tabelle 4-3 aufgetragen. Dabei zeigt Verbindung **12** die höchsten Affinitäten mit K_I -Werten im submikromolaren Bereich zu allen drei getesteten Enzymen. Verbindung **12** und **13** weisen an Rhodesain und Cathepsin L ebenfalls K_I -Werte im niedrigen mikromolaren oder submikromolaren Bereich auf, während die Affinitäten dieser Verbindungen zu Cathepsin B mit K_I -Werten von ca. 4 bzw. 18 μM deutlich schlechter sind

Tabelle 4-3 Ermittelte IC_{50} und K_i -Werte für die Verbindungen 12 - 14 an verschiedenen Enzymen.
(Mittelwerte aus 2 unabhängigen Messungen)

Verbindung	X =	Rhodesain		Cath. L		Cath. B	
		IC_{50}	K_i	IC_{50}	K_i	IC_{50}	K_i
12	F	$2,5 \pm 0,02$	$0,19 \pm 0,002$	$0,045 \pm 0,004$	$0,023 \pm 0,002$	$0,79 \pm 0,004$	$0,48 \pm 0,002$
13	Cl	$13,2 \pm 0,66$	$1,01 \pm 0,05$	$0,31 \pm 0,04$	$0,16 \pm 0,02$	$6,7 \pm 0,003$	$4,03 \pm 0,002$
14	Br	$11,26 \pm 0,39$	$0,86 \pm 0,03$	$0,55 \pm 0,04$	$0,28 \pm 0,03$	$30,5 \pm 0,04$	$18,3 \pm 0,02$

Zur Bestimmung der kinetischen Konstanten des zeitabhängigen Inhibitors **K11777** wird zunächst die Geschwindigkeitskonstante pseudo-erster Ordnung k_{obs} durch nicht-lineare Regression der erhaltenen Umsatz-Zeitkurven mit Gleichung 29 ermittelt. Beispielhaft ist dies für die Hemmung von Cathepsin B durch **K11777** in Abbildung 4-18 dargestellt.

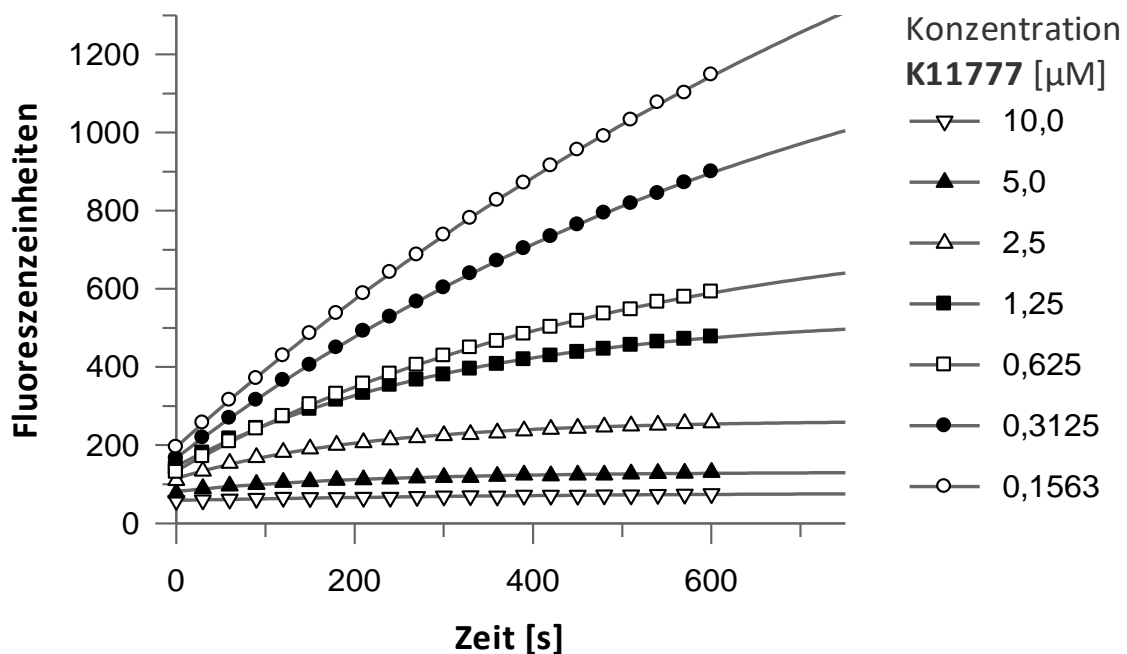


Abbildung 4-18 Nicht-lineare Regression der Umsatz-Zeitkurven mit Gleichung 29 zur Bestimmung von k_{obs} am Beispiel der Hemmung von Cathepsin B durch **K11777**.

Durch Auftragung der ermittelten k_{obs} -Werte gegen die Inhibitorkonzentration und nicht-linearer Regression mit Gleichung 30 erhält man k_i und $K_{i\ app}$.

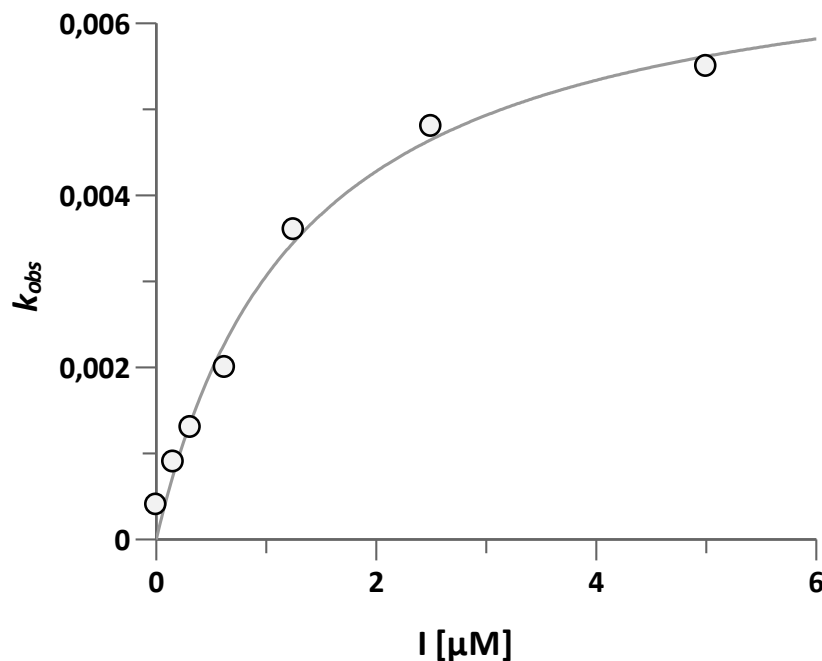


Abbildung 4-19 Nicht-lineare Regression der Auftragung von k_{obs} gegen die Inhibitorkonzentration zur Bestimmung von k_i und $K_{i\ app}$ am Beispiel der Hemmung von Cathepsin B durch K11777.

Aus $K_{i\ app}$ kann wiederum durch Berücksichtigung von Substratkonzentration und K_M -Wert (siehe Tabelle 4-2) K_i gemäß Gleichung 31 berechnet werden. Die Geschwindigkeitskonstante zweiter Ordnung ergibt sich schließlich aus dem Quotienten von k_i und K_i .

Tabelle 4-4 Übersicht der ermittelten kinetischen Konstanten von K11777 an verschiedenen Enzymen.

Verbindung	Rhodesain			Cath. L			Cath.B		
	k_i [s ⁻¹]	K_i [μM]	k_{2nd} [M ⁻¹ s ⁻¹]	k_i [s ⁻¹]	K_i [μM]	k_{2nd} [M ⁻¹ s ⁻¹]	k_i [s ⁻¹]	K_i [μM]	k_{2nd} [M ⁻¹ s ⁻¹]
K11777	0,0064	0,014 ± 0,003	5,0 × 10 ⁵	0,0075	0,0082 ± 0,002	9,2 × 10 ⁵	0,0066	0,73 ± 0,005	9,1 × 10 ³

Der irreversible Inhibitor K11777 weist in Übereinstimmung mit bekannten Literaturwerten¹³⁰ für Rhodesain und Cathepsin L K_i -Werte im niedrigen nanomolaren Bereich auf (Rho: 14 nM; Cath. L: 8,2 nM). Auch die k_{2nd} -Werte liegen mit 5×10^5 (Rho) und $9,2 \times 10^5$ (Cath. L) im Bereich der Literaturwerte. Die Affinität des Inhibitors zu Cathepsin B ist mit einem K_i -Wert von 730 nM und einem k_{2nd} -Wert von $9,1 \times 10^3$ deutlich geringer als zu den beiden anderen Enzymen.

Untersuchungen zur Reversibilität der α -Halogen-Vinylsulfone

Um die quantenmechanischen Berechnungen und die damit verbundene Hypothese der Reversibilität der Halogen-substituierten Inhibitoren zu verifizieren wurden hierzu verschiedene Untersuchungen angestellt. Zunächst wurde mit den drei Verbindungen **12** – **14** ein Verdünnungsassay wie in Kapitel 3.2.3 beschrieben durchgeführt. Hierzu wurden die 3 Verbindungen in einer Konzentration, die dem 10-fachen des jeweiligen IC_{50} -Wertes entspricht, mit der 100-fachen Standardkonzentration des Enzyms Rhodessin inkubiert und anschließend 100-fach mit Puffer, der bereits das Substrat in der gewünschten Konzentration enthielt verdünnt. Somit liegt die Inhibitorkonzentration nach der Verdünnung bei $0,1 \times IC_{50}$, während die Enzymkonzentration der standardmäßig eingesetzten Konzentration entspricht. Als Kontrolle wurden Enzym ohne Inhibitor sowie der irreversible Inhibitor K11777 mit vermessen (Abbildung 3-23).

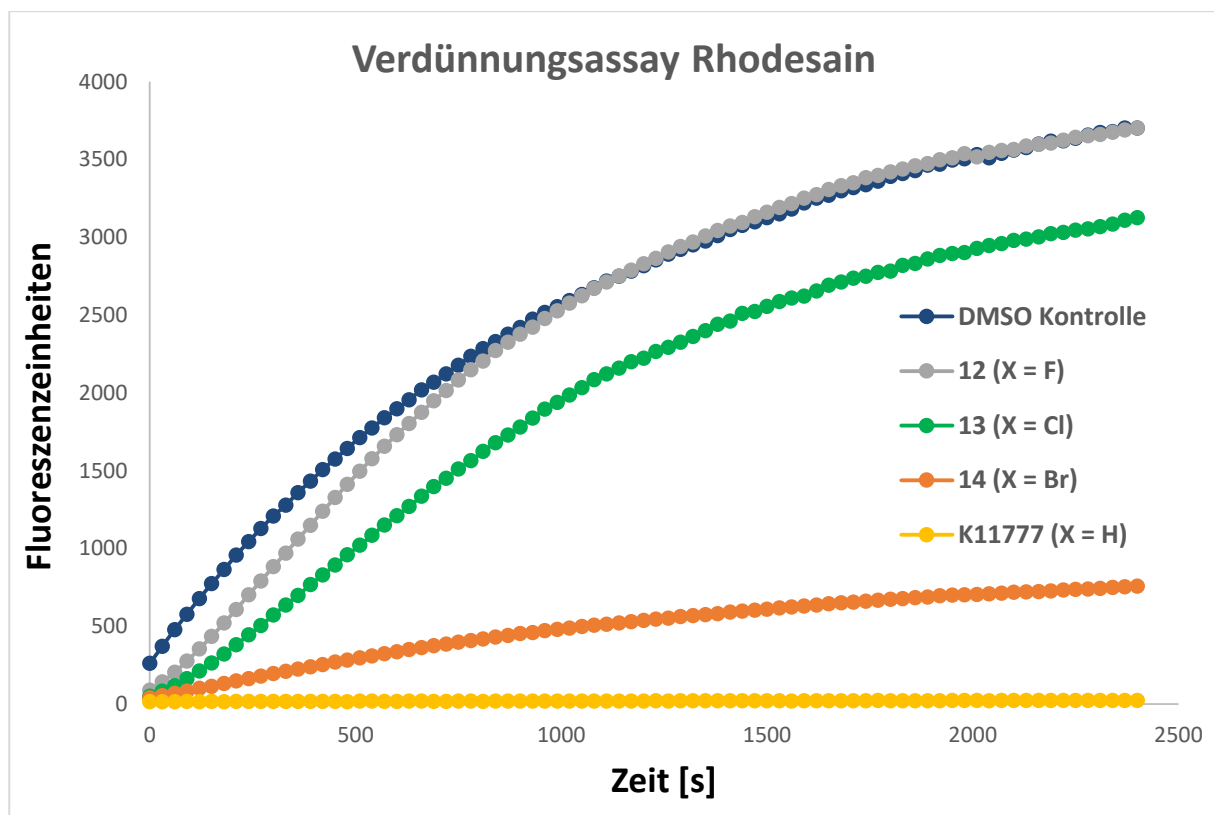


Abbildung 4-20 Verdünnungsassay zur Ermittlung der Reversibilität der Verbindungen **12** – **14** an Rhodessin. Konzentrationen vor 100-facher Verdünnung: **12**: 25 μ M; **13**: 130 μ M; **14**: 110 μ M; K11777: 0,1 μ M.

Es zeigt sich, dass Verbindung **12** voll reversibel ist, sodass das Enzym nach der Verdünnung schnell seine volle Aktivität bezogen auf die DMSO-Kontrollprobe ohne Inhibitor wiedererlangt. Auch unter dem Einfluss von Verbindung **13** kann die Enzymaktivität nach der Verdünnung größtenteils wiederhergestellt werden. Die Inhibitionsreaktion von Verbindung **14** hingegen scheint nur langsam reversibel zu sein. Im beobachteten Zeitraum erreichte das Enzym nur etwa 25% seiner Aktivität bezogen auf die DMSO-Kontrollprobe zurück. Wie erwartet ist bei **K11777** gemäß dem irreversiblen Inhibitionsmechanismus keine Wiederherstellung der Enzymaktivität nach der Verdünnung zu beobachten. Ein ähnliches Bild zeigte sich auch bei einem vergleichbaren *assay* mit Cathepsin L

(Abbildung 4-21). Da dieses Enzym aufgrund der verfügbaren Konzentration nicht 100-fach konzentriert eingesetzt werden konnte, wurden die zu testenden Verbindungen in 3-facher Konzentration des jeweiligen IC_{50} -Wertes mit dem Enzym inkubiert. Dementsprechend wurde anschließend 30-fach verdünnt, sodass die Verbindungen dann auch hier in einer Konzentration von $0,1 \times IC_{50}$ vorliegen.

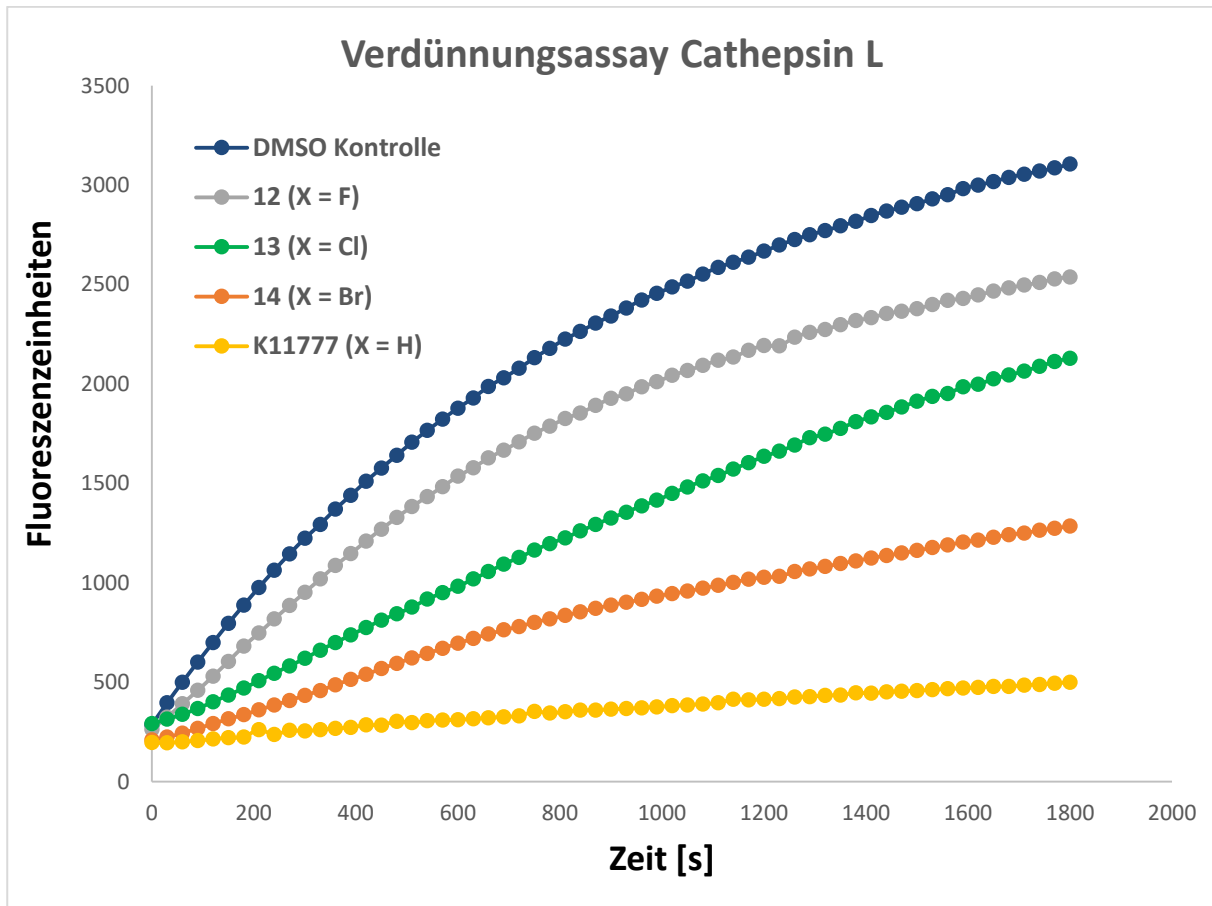


Abbildung 4-21 Verdünnungsassay zur Ermittlung der Reversibilität der Verbindungen 12 – 14 an Cathepsin L. Konzentrationen vor 30-facher Verdünnung: 12: $0,15 \mu\text{M}$; 13: $1 \mu\text{M}$; 14: $1,6 \mu\text{M}$; K11777: $0,1 \mu\text{M}$.

Um die Ergebnisse der Verdünnungsassays zu verifizieren, wurden die Verbindungen weiterhin durch das in Kapitel 3.2.3 beschriebene Verfahren der Dialyse auf eine reversible Inhibition der verschiedenen Enzyme untersucht. Hierzu wurde eine eigens angefertigte Dialysekammer verwendet, die die parallele Messung von fünf verschiedenen Proben erlaubt.¹³¹ Dazu wurde eine Dialysemembran mit einem *cut-off*-Wert von $3,5 \text{ kDa}$ so in der Apparatur platziert, dass diese ein Reservoir mit einem kontinuierlichen Strom von Assaypuffer von fünf Probengefäßen an der Oberseite der Apparatur trennt. In die Probengefäße wurde Rhodesain, das zuvor mit den verschiedenen Inhibitoren bzw. DMSO als Kontrollprobe kurz inkubiert wurde, gegeben. Die Inhibitorkonzentrationen wurden dabei so gewählt, dass das Enzym jeweils vollständig inhibiert sein sollte ($[I] \approx 10 * K_i$). Dieser Inkubationsansatz wurde dann gegen einen kontinuierlichen Strom von Assaypuffer dialysiert. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurden Aliquots entnommen und mit Substrat versetzt, um die Enzymaktivität zu bestimmen. Diese kann dann als prozentuale Aktivität in Bezug auf uninhibiertes Enzym (DMSO-Kontrollprobe) angegeben werden, wodurch sich das Maß der

Wiederherstellung der Enzymaktivität im zeitlichen Verlauf des Experiments bestimmen lässt. Da die Cathepsine B und L unter den verwendeten Bedingungen keine hinreichende Stabilität aufweisen, konnte dieses Experiment nur mit Rhodesain durchgeführt werden, welches auch bei Raumtemperatur für einen vergleichsweise langen Zeitraum stabil ist.

Für die Verbindungen **12** und **13** konnten die Ergebnisse des Verdünnungsassays in diesem Experiment bestätigt werden (Abb. 4-22). Mit zunehmender Dialysedauer gewinnt das Enzym zunehmend an Aktivität im Vergleich zu uninhibiertem Enzym. So steigt die Enzymaktivität von anfänglichen 10% auf 18% (Verbindung **12**) bzw. 29% (Verbindung **13**) nach 180 Minuten. Bei Verbindung **14** hingegen ist ein anderes Bild zu beobachten. Hier nimmt die prozentuale Enzymaktivität mit zunehmender Dialysedauer bis auf 3% nach 180 Minuten ab.

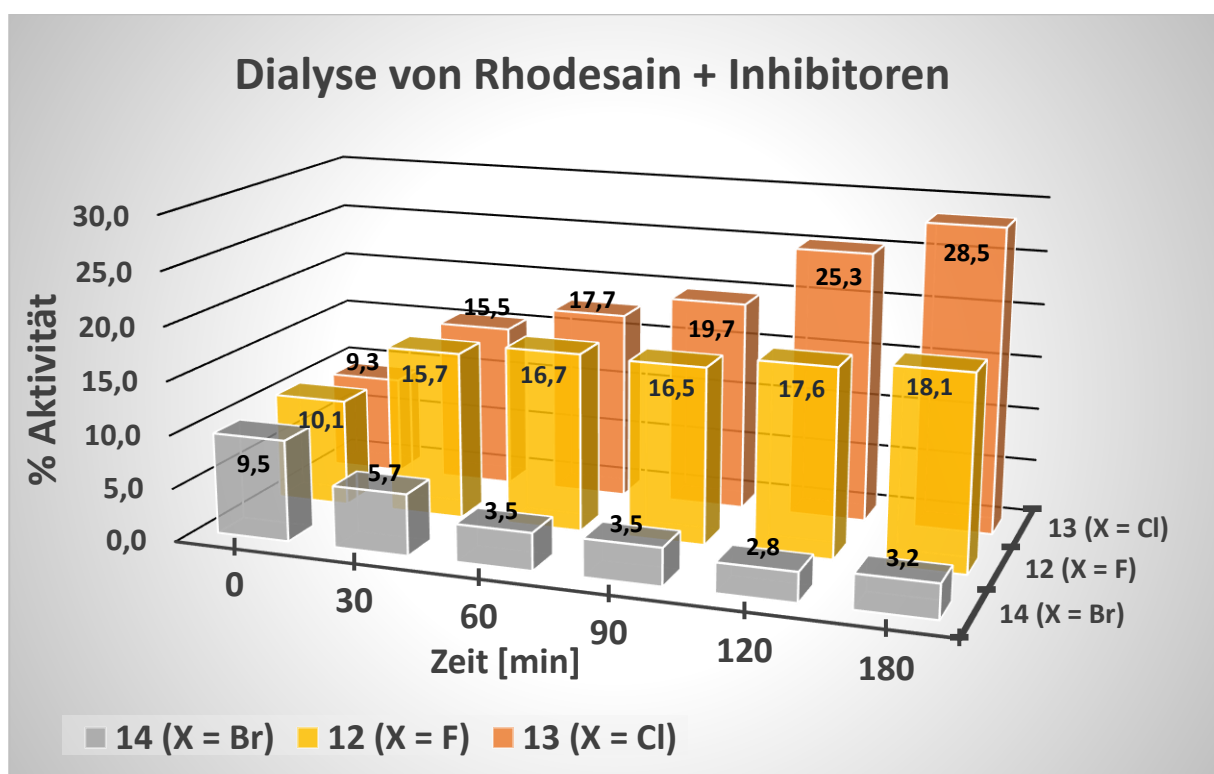


Abbildung 4-22 Enzymaktivität im zeitlichen Verlauf der Dialyse von Rhodesain, welches mit den Verbindungen 12 -14 inkubiert wurde. Ergebnisse sind in prozentualer Aktivität bezogen auf uninhibiertes Rhodesain angegeben, welches im gleichen Experiment der Dialyse unterzogen wurde.

Untersuchungen zur Bestimmung von kinetischen Konstanten mittels Surface Plasmon Resonance (SPR) Spektroskopie

Um die Kinetik der Komplexbildung der Verbindungen weiter aufzuklären sollten die k_{on} - und k_{off} -Werte der entsprechenden Inhibitionsreaktionen bestimmt werden. Eine der wenigen Methoden zur Bestimmung dieser Geschwindigkeitskonstanten ist die *surface plasmon resonance*-Spektroskopie. Hierbei wird einer der beteiligten Reaktionspartner (i.d.R. das zu untersuchende Protein) auf einer funktionalisierten Metalloberfläche immobilisiert. Durch Einstrahlung polarisierten Lichts mittels eines Prismas in Totalreflexion werden an der Grenzfläche zwischen Metalloberfläche

und Analyt sogenannte Oberflächenplasmonen angeregt. Diese sind evaneszente Oberflächenwellen, die sich nach der Anregung von freien Elektronen der Metalloberfläche parallel zur Oberfläche ausbreiten. Das Auftreten von Oberflächenplasmonen äußert sich in einem winkelabhängigen Intensitätsminimum im totalreflektierten Licht. Dabei reagiert der Winkel des Intensitätsminimums sehr sensitiv auf Veränderungen an der Metalloberfläche, wie sie z.B. bei der Adsorption eines Analyten auftreten. So ruft die Bindung eines Liganden an ein auf der Goldoberfläche immobilisiertes Protein eine lokale Änderung des Brechungsindex hervor, was einen entsprechenden Einfluss auf den Winkel des Intensitätsminimums des totalreflektierten Lichtes hat (Abb. 4-23). Dabei ist die Winkeländerung proportional zur Menge des gebundenen Liganden, die wiederum von dessen Affinität zum Zielprotein abhängt. Da es sich um eine kontinuierliche Methode handelt, können Bindungs- und Dissoziationsvorgänge verfolgt werden, was die Bestimmung der zugehörigen kinetischen Parameter erlaubt.

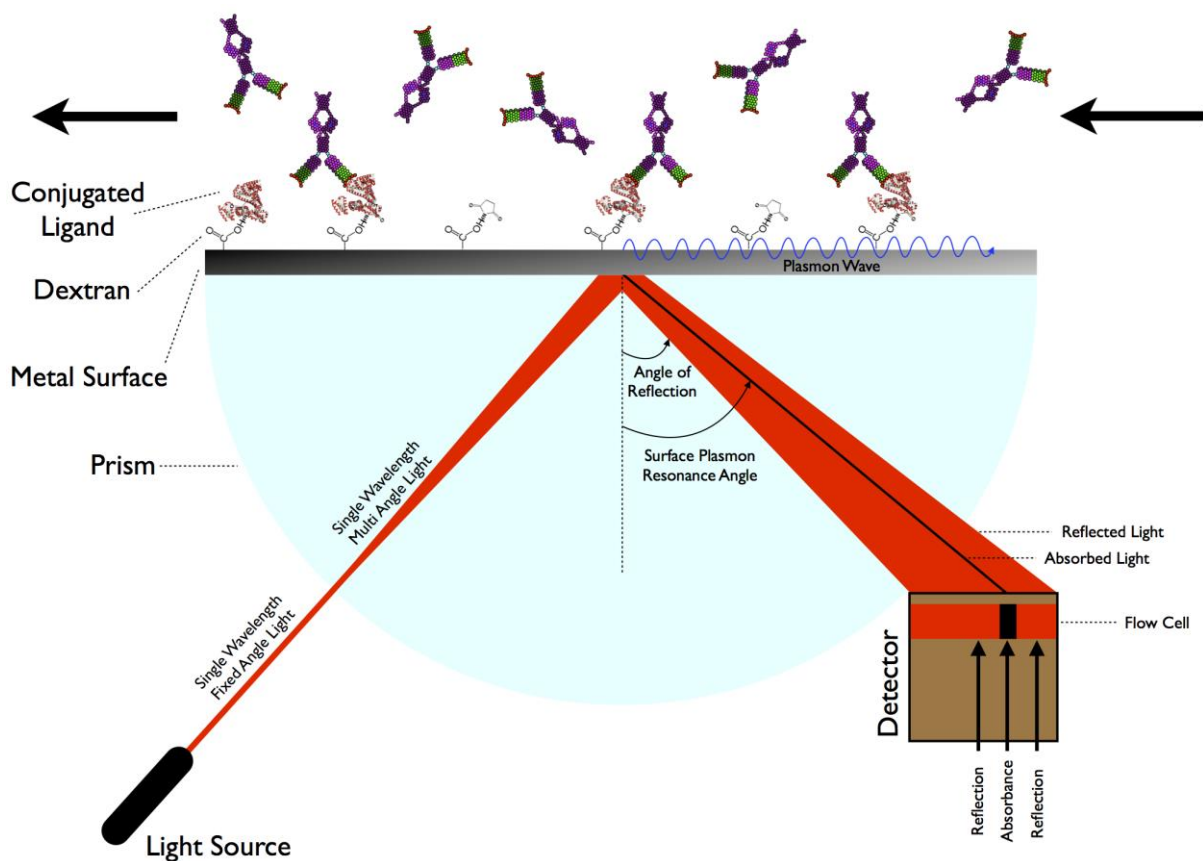


Abbildung 4-23 Schematischer Aufbau eines SPR-Experiments mit Dextran-modifizierter Metalloberfläche.¹³²

Die Messungen (s.u.) wurden am Max-Planck-Institut für Polymerforschung, Mainz an einem Versuchsaufbau, der an anderer Stelle beschrieben ist, durchgeführt¹³³. Für die Präparation des Sensorchips wurden Glasträger - nach sorgfältiger Reinigung - durch thermische Verdampfung im Hochvakuum mit einer Schicht von 1,2 nm Chrom und 47 nm Gold beschichtet. Die Chromschicht dient dabei als Haftvermittler für die Goldschicht. Die beschichteten Träger wurden anschließend in einer Mischung von 6-Mercapto-1-hexanol und 11-Mercaptoundecansäure in einem molaren

Verhältnis von 9:1 in absolutem Ethanol für ≥ 3 h inkubiert. Aufgrund der hohen Affinität von Thiolen zu Gold bildet sich spontan eine hochgeordnete selbstorganisierte Monoschicht (*self-assembled monolayer*, SAM). Dabei dient die 11-Mercaptoundecansäure zur Immobilisierung des Zielproteins, 6-Mercapto-1-hexanol dient als lateraler *spacer*, wodurch eine sterische Hinderung bei der Immobilisierung des Proteins verhindert werden soll. Zur Immobilisierung des Proteins werden die freien Säuregruppen der 11-Mercaptoundecansäure zunächst mittels 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid (EDC) und *N*-Hydroxysulfosuccinimid (sNHS) aktiviert. Der resultierende NHS-Ester kann nun mit freien Aminogruppen (z.B. von Lysin) eines Proteins reagieren, wodurch dieses kovalent gebunden wird. Zuletzt werden potentiell verbleibende NHS-Ester durch Reaktion mit Ethanolamin gequenchet. Der schematische Aufbau eines solchen Sensorchips ist in Abbildung 4-24 wiedergegeben.

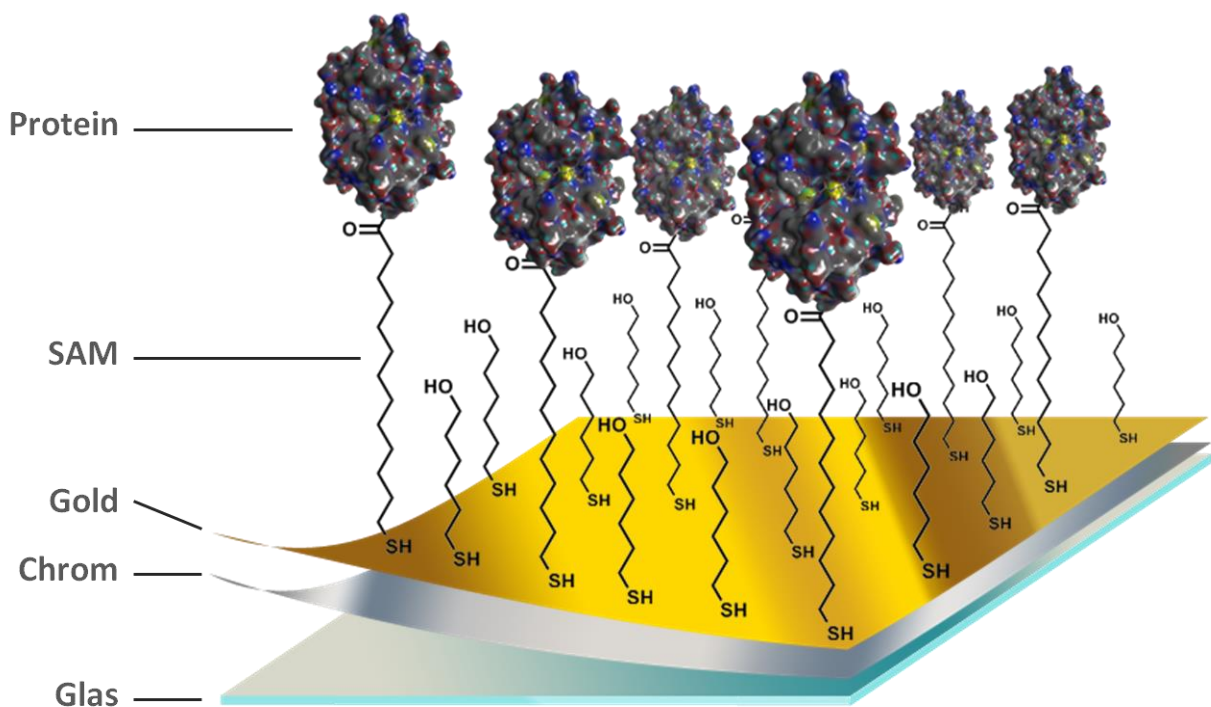


Abbildung 4-24 Schematischer Aufbau des verwendeten Sensorchips: Glasträger, Chrom (1,2 nm), Gold (47 nm) SAM (6-Mercapto-1-Hexanol + 11-Mercaptoundecansäure 9:1, gebundenes Protein).

Um die Ausbildung des SAM nachzuverfolgen wurden vor und nach der Inkubation in der Lösung der Thiole SPR-Kurven aufgenommen. Die Auswertung erfolgte mit dem Programm Winspall¹³⁴, mit dem SPR-Kurven simuliert und so die Schichtdicken von verschiedenen Komponenten ermittelt werden können. Das Beispiel in Abbildung 4-25 zeigt in schwarz die SPR-Kurve des unbehandelten Sensorchips mit einer Chromschicht (1,32 nm) und einer Goldschicht (44,54 nm). Nach der Ausbildung des SAM (rot) ist eine Verschiebung des Minimums um etwa $0,1^\circ$ zu erkennen. Die resultierende Schichtdicke des Monolayers beträgt 0,7 nm.

Um die Immobilisierung des Proteins zu verfolgen wurde die Reflektivität des eingestrahlt Lichtes bei einem festen Winkel, der einer Reflektivität von ca. 30% des Maximalwertes entspricht, gemessen. Exemplarisch ist die Immobilisierung von Papain in Abbildung 4-26 gezeigt. Hierbei resultieren die großen Differenzen der Reflektivität bei der Injektion von EDC/sNHS aus den großen Differenzen der Brechungsindizes der jeweiligen Lösung. Die Menge an immobilisiertem Papain kann

aus der Reflektivitätsdifferenz zwischen dem finalen Level und der Grundlinie zu Beginn des Experiments abgeschätzt werden.

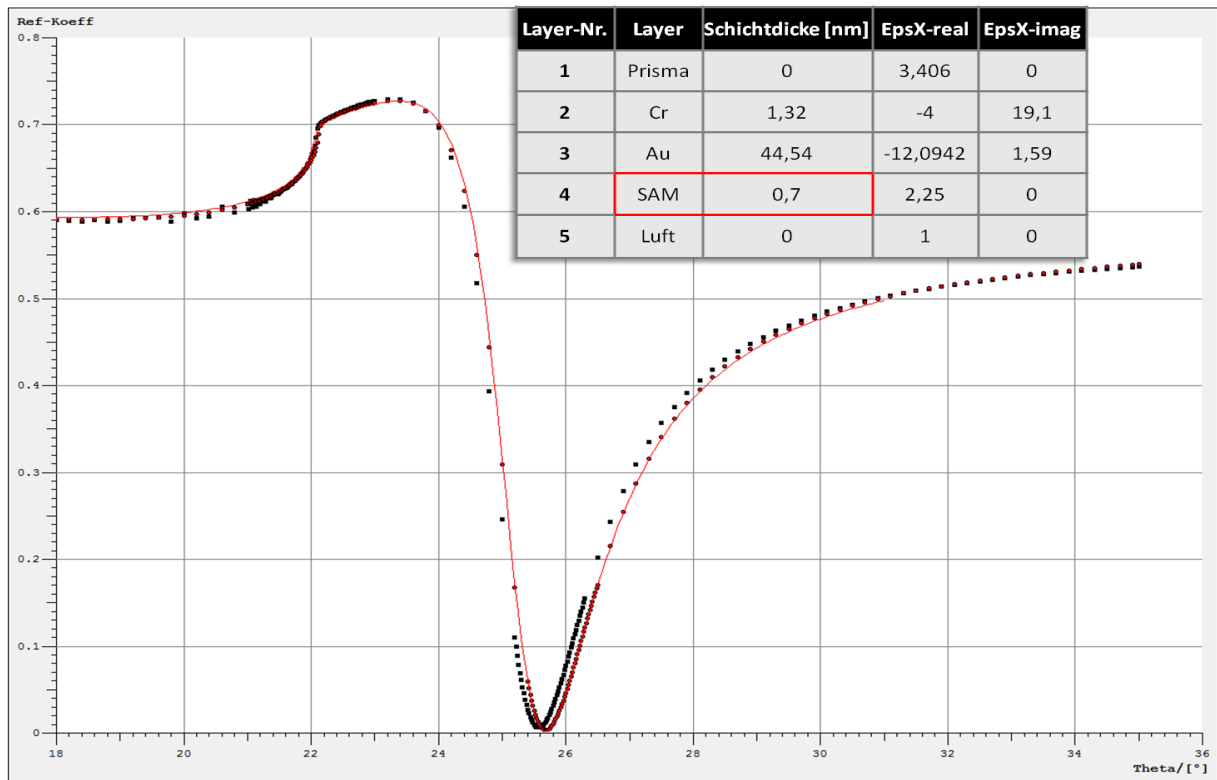


Abbildung 4-25 SPR-Kurven vor (schwarz) und nach der Ausbildung (rot) des SAM. Schichtdicken wurden durch Simulation der jeweiligen SPR-Kurven unter Angabe des realen (EpsX-real) und imaginären Teils (EpsX-imag) der Dielektrizitätskonstante der jeweiligen Schicht ermittelt.

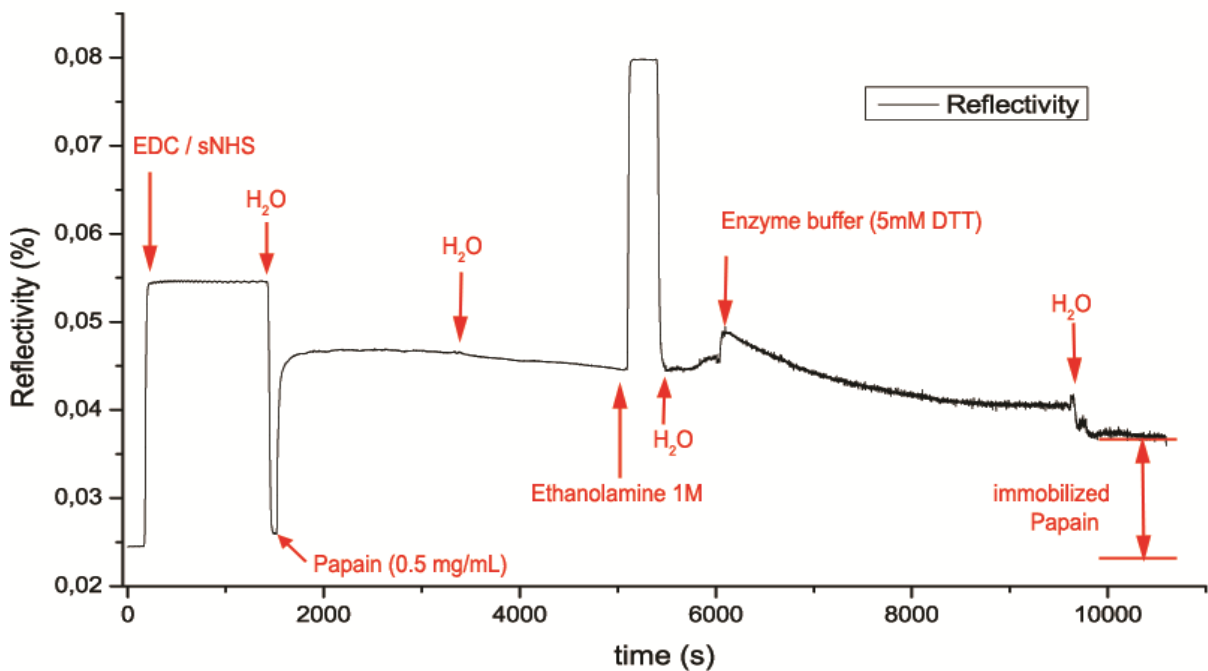


Abbildung 4-26 Kinetik der Immobilisierung von Papain: 1. Aktivierung der Säuregruppen des Monolayers mit EDC/sNHS 2. Spülen mit H₂O 3. Injektion von Papain 4. Spülen mit H₂O 5. Quenchen von nicht-reagierten NHS-Estern mit Ethanolamin 6. Spülen mit H₂O 7. Aktivierung von Papain mit Enzympuffer 8. Spülen mit H₂O.

Während die Immobilisierung von Papain gut gelang, konnte dies für Rhodesain nicht erreicht werden. Hierfür wurden mehrere Gründe verantwortlich gemacht: Zum einen verfügt Rhodesain nur über sehr wenige Lysinreste an der Oberfläche, die zur Kupplung an den funktionalisierten Chip zur Verfügung stehen. Zum anderen weist Rhodesain einen sehr geringen isoelektrischen Punkt auf ($pI \approx 4$). Dies ist für die Kupplung mittels EDC / NHS nachteilig, da die Effizienz der Kupplungsreaktion im basischen Bereich (pH 8-9) am höchsten ist. Das Protein muss jedoch in einer Pufferlösung vorgelegt werden, deren pH-Wert idealerweise unter dem pI des Proteins liegt. Es wurden verschiedenste Bedingungen mit unterschiedlichen Puffern, Proteinkonzentrationen und Inkubationszeiten getestet, von denen keine eine ausreichende Immobilisierung des Proteins lieferte. Des Weiteren wurde versucht, durch Modifikation des Proteins die Immobilisierung zu erreichen. Zunächst wurden freie Carboxylgruppen an der Oberfläche des Proteins nach Aktivierung mit NHS / EDC durch Reaktion mit Ethylendiamin maskiert. Zwar konnte auf diese Weise das Protein immobilisiert werden, jedoch war nach der Modifikation keinerlei enzymatische Aktivität im fluorimetrischen Assay nachweisbar. In einem zweiten Ansatz wurde das Protein mit einem Biotinderivat konjugiert. Dieses sollte dann an Streptavidin, welches zuvor problemlos auf einem Sensorchip immobilisiert werden konnte, binden. Allerdings konnte auch auf dieses Weise aus ungeklärten Gründen keine Immobilisierung von Rhodesain erreicht werden.

Zu den weiteren Untersuchungen zur Bestimmung der k_{on} - und k_{off} -Werte wurde daher Papain als Modellenzym verwendet. Die Bestimmung der kinetischen Parameter erwies sich jedoch als schwierig. Die erhaltenen Sensogramme der Bindung der Inhibitoren an das immobilisierte Protein waren aus verschiedenen Gründen schlecht reproduzierbar und quantifizierbar. So verfügte der apparative Aufbau nur über eine einzige Durchflusszelle. Optimalerweise sollte mindestens eine weitere Zelle zur Verfügung stehen, die nicht mit Protein beladen wird und so als Referenzzelle dient. So könnten unspezifische Signale, wie sie z.B. bei minimalen Differenzen des Brechungsindex von verschiedenen Probenlösungen auftreten, erfasst werden. Exemplarisch zeigt Abbildung 4-27 das

Sensogramm der Bindung von Verbindung **12** an Papain. Zu sehen ist eine relativ langsame Assoziation des Inhibitors bis zum Erreichen eines Gleichgewichts. Eine Dissoziation des Inhibitors, die durch das Spülen mit Puffer eingeleitet werden sollte, ist im beobachteten Zeitraum nicht zu erkennen. Die relativ große Abnahme des Signals bei der Injektion der Pufferlösung ist wahrscheinlich auf eine Brechungsindexdifferenz der Puffer- und Probenlösung zurückzuführen.

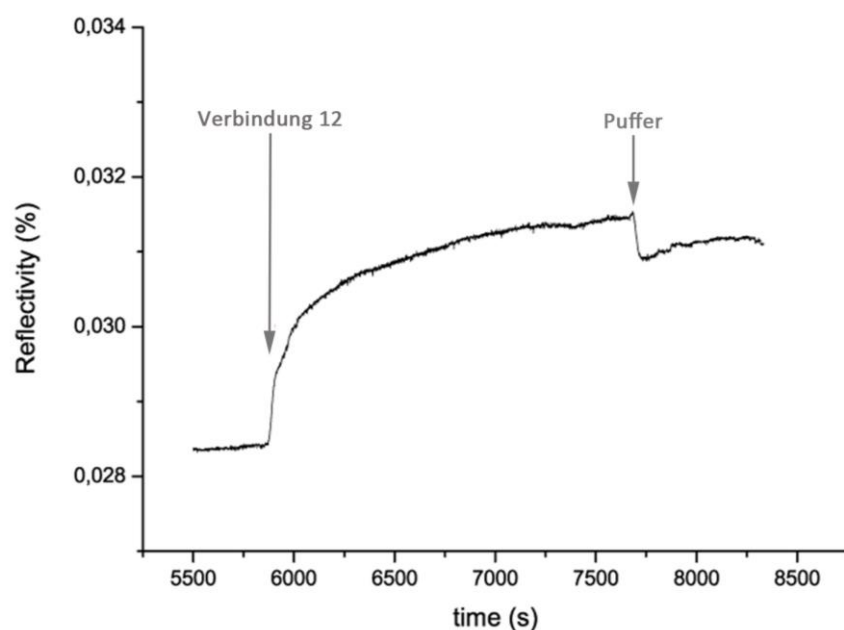


Abbildung 4-27 SPR-Sensogramm der Bindung von 11 an Papain.

Untersuchungen zum Hemmtyp der α -Halogen-Vinylsulfone

Da sich bei den in Kapitel 3 beschriebenen *N,S*-Vinylsulfonen herausstellte, dass es sich bei dieser Verbindungsklasse nicht um kompetitive Inhibitoren handelt, wurden auch die α -Halogen-Vinylsulfone genauer im Hinblick auf ihren Hemmtyp untersucht. Zwar lassen die vielfach höhere Affinität sowie die größere Ähnlichkeit zu dem bekanntermaßen kompetitiven Inhibitor K11777 vermuten, dass der Inhibition durch diese Verbindungen ein kompetitiver Mechanismus zugrunde liegt, Klarheit liefert jedoch nur eine Betrachtung des Einflusses der Substratkonzentration auf die Inhibitionsreaktion (vgl. Abb.3-22). Daher wurde auch für diese Verbindungen der IC_{50} -Wert bei verschiedenen Substratkonzentrationen bestimmt.

Für alle drei Substanzen **12** – **14** wurde eine lineare Abhängigkeit des IC_{50} -Wertes von der Substratkonzentration gefunden. So beobachtet man mit steigender Substratkonzentration steigende IC_{50} -Werte, was auf kompetitive Hemmung schließen lässt. Exemplarisch ist dieser Zusammenhang für Verbindung **14** mit Rhodesain und Cathepsin L in Abbildung 4-28 dargestellt.

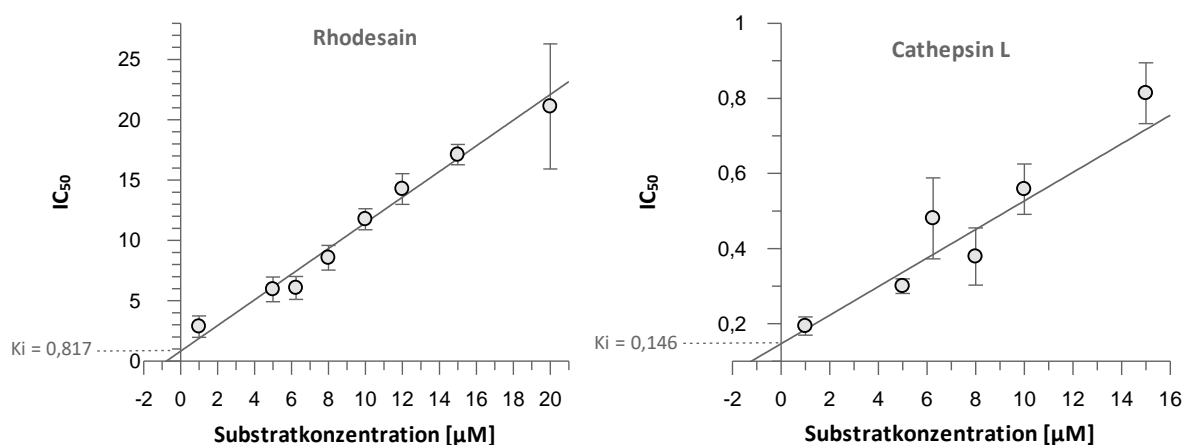


Abbildung 4-28 Einfluss der Substratkonzentration auf den IC_{50} -Wert von Verbindung **14** an Rhodesain (links) und Cathepsin L (rechts).

Weiterhin kann aus dieser Auftragung der K_i -Wert ermittelt werden. Dieser entspricht dem y-Achsenabschnitt der Regressionsgeraden und ist in beiden Fällen in relativ guter Übereinstimmung mit den zuvor ermittelten Werten.

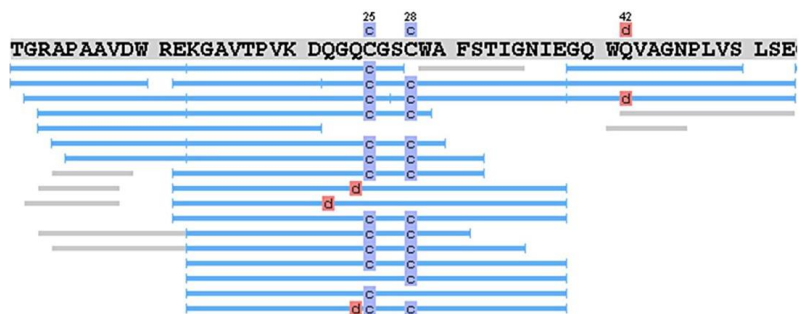
Massenspektroskopische Untersuchungen zum Nachweis eines kovalenten Bindungsmodus'

Um die propagierte Ausbildung einer kovalenten Bindung zwischen Inhibitor und Enzym nachzuweisen, existieren verschiedene Methoden. Am weitesten verbreitet ist hier die Kristallstrukturanalyse. Eine Schwierigkeit dieser Methode ist das Züchten geeigneter Kristalle des Enzym-Inhibitor-Komplexes. Da dies für die in dieser Arbeit behandelten Verbindungen bisher noch nicht gelang, sollte der Nachweis der kovalenten Bindung zwischen Enzym und Inhibitor alternativ durch massenspektrometrische Untersuchungen geführt werden. Diese Untersuchungen wurden freundlicherweise in der Gruppe von Prof. Dr. Stefan Tenzer (Universitätsmedizin, Mainz) durchgeführt.

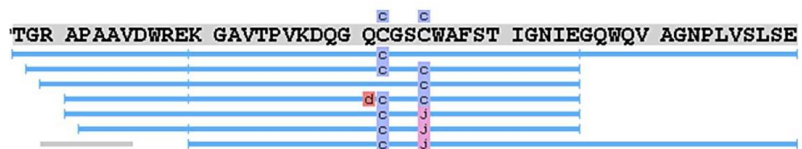
Hierzu wird das Enzym (Rhodesain) mit dem Inhibitor (**14**) in einem molaren Verhältnis von 1:1 inkubiert, um die Ausbildung eines möglichen kovalenten Komplexes zu ermöglichen. Anschließend wird das Enzym einem proteolytischen Verdau mit der Endopeptidase GluC unterzogen, wodurch verschiedene peptidische Fragmente erhalten werden. Nach geeigneter Probenvorbereitung erfolgt dann die Analyse dieser Fragmente mittels LC-MS/MS (Flüssigchromatographie gekoppelt mit Tandem-Massenspektroskopie). Da die Sequenz von Rhodesain sowie die spezifischen Schnittstellen der Endopeptidase bekannt sind, können nun durch den Abgleich der erhaltenen Fragmentmassen mit einer Datenbank, die diese Informationen sowie die molekulare Masse des Inhibitors, möglicher Derivate und Verunreinigungen enthält, Fragmente identifiziert werden, die kovalent mit dem Inhibitor modifiziert wurden. Sollte also tatsächlich eine kovalente Reaktion zwischen Inhibitor und Enzym stattgefunden haben, findet man Fragmente mit einer Masse, die um den Betrag der molekularen Masse des Inhibitors erhöht ist. Zum Vergleich wurden außerdem Rhodesain ohne Inhibitor sowie Rhodesain mit K11777 vermessen.

Betrachtet man die Probe von Rhodesain, welches nicht mit Inhibitor behandelt wurde (Abb. 4-29a), fällt zunächst auf, dass zahlreiche Peptide, die das aktive Zentrum enthalten, identifiziert werden konnten. Viele davon tragen Modifikationen wie carbamidomethylierte Cysteinreste. Diese wurden im Verlauf des Experiments durch Zugabe des alkylierenden Reagenzes Iodacetamid gebildet um die Ausbildung störender Disulfidbrücken zu verhindern. Weiterhin werden vereinzelt desamidierte Glutaminreste beobachtet, was unter den verwendeten Bedingungen auftreten kann.

a) Rhodesain ohne Inhibitor



b) Rhodesain + K11777



c) Rhodesain + Verbindung 14



Abbildung 4-29 Sequenzabdeckung des N-terminalen Bereichs von Rhodesain a) ohne Inhibitor b) nach Inkubation mit K11777 c) nach Inkubation mit 14. Modifikationen: c: Carbamidomethylcystein; d: Desamidierung; j: Modifikation mit K11777 k: Modifikation mit 14.

Im Falle des mit K11777 inkubierten Rhodesains (Abb.4-29b) finden sich einige Peptide, bei denen das Cystein des aktiven Zentrums kovalent mit dem Inhibitor verknüpft ist. Dies war aufgrund des kovalenten Inhibitionsmechanismus zu erwarten und dient zur Validierung der Methode.

Für das mit Verbindung **14** (X = Br) inkubierte Enzym (Abb. 4-29c) findet man Peptide, deren Cystein im aktiven Zentrum kovalent mit **14** modifiziert wurde, was als Nachweis eines kovalenten Bindungsmodus' dienen kann. Überraschenderweise konnten hier auch einige Peptide identifiziert werden, die am Cystein des aktiven Zentrums eine kovalente Modifikation tragen, deren Masse derjenigen von K11777 entspricht. Da dieser Inhibitor in diesem Teil des Experiments nicht verwendet wurde, kann dies nur durch eine Dehydrohalogenierung, also einer Eliminierung von HBr, aus Verbindung **14** erklärt werden, wodurch die Struktur von K11777 erhalten wird.

¹⁹F-NMR-Spektroskopische Untersuchungen

Eine weitere Methode, die Hinweise auf die Ausbildung einer kovalenten Bindung liefern kann, ist die ¹⁹F-NMR-spektroskopische Untersuchung. Hierfür bietet sich entsprechend die Fluor-substituierte Verbindung **12** an. Hierzu wird zunächst ein ¹⁹F-NMR-Spektrum des Inhibitors aufgenommen, anschließend ein Spektrum des Enzyms (Rhodesain), welches zuvor mit dem Inhibitor in einem molaren Verhältnis von 1:1 inkubiert wurde. Veränderungen der chemischen Verschiebung sowie Veränderungen der *peak*-Form im Vergleich zum Spektrum des reinen Inhibitors erlauben Rückschlüsse auf eine Bindung des Inhibitors an das Enzym. Die folgende Messung wurde freundlicherweise von Prof. Ute Hellmich (Institut für Pharmazie und Biochemie, Universität Mainz) durchgeführt.

Abbildung 4-30 zeigt in schwarz das ¹⁹F-Signal von Verbindung **12**. Eingesetzt wurde hier eine Mischung aus *E*- und *Z*-Isomer. Nach Inkubation mit Rhodesain (rot) sind eine deutliche Linienverbreiterung sowie eine deutliche Veränderung der chemischen Verschiebung zu beobachten. Weiterhin sind hier keine Signale des freien Inhibitors mehr zu erkennen, was die Ausbildung eines stabilen Komplexes bestätigt. Interessanterweise waren offenbar beide Isomere des Inhibitors in der Lage an das Protein zu binden.

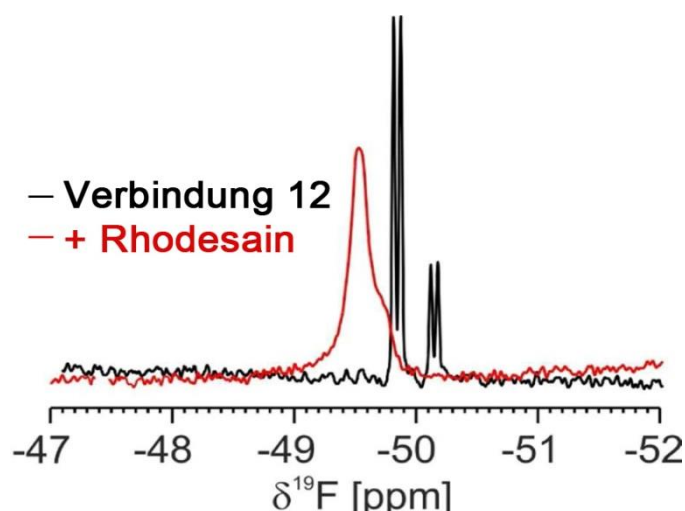


Abbildung 4-30 ¹⁹F NMR-Spektrum von Verbindung 11 ohne (schwarz) und mit Rhodocytin (rot).

Bestimmung der antitrypanosomalen Aktivität und Zytotoxizität

Im Rahmen des Sonderforschungsbereichs 630 wurden die synthetisierten Verbindungen im Institut für Molekulare Infektionsbiologie der Universität Würzburg hinsichtlich ihrer antitrypanosomalen Aktivität sowie Zytotoxizität untersucht. Hierzu wurden die EC₅₀-Werte *in vitro* mit Hilfe eines Alamar Blue®-Assay¹³⁵ bestimmt. Dabei dient der wasserlösliche, ungiftige Farbstoff Alamar Blue® (Resazurin) als Redox-Indikator. In normal arbeitenden Zellen wird dieser Farbstoff durch Reduktion zu dem rosafarbenen fluoreszierenden Resorufin umgesetzt. Unter dem Einfluss von zytotoxischen Substanzen kommt es zu einer Abnahme der metabolischen Aktivität und des Redox-Potenzials der Zellen, wodurch die Reduktion des Farbstoffs verlangsamt wird oder vollständig zum Erliegen kommt. Die Konzentration der reduzierten Form des Farbstoffs korreliert also mit der Viabilität der Zellen und kann durch Messung der Absorption quantifiziert werden. Durch den Vergleich mit einer Kontrollprobe ohne Wirkstoff kann dann die Zytotoxizität ermittelt werden. Zur Bestimmung der Zytotoxizität wurde die Makrophagenzelllinie J774.1 verwendet, die antitrypanosomale Aktivität wurde an Trypanosomen der Linie *T. brucei brucei* TC211 bestimmt. Die Messungen erfolgten als Doppelbestimmung mit verschiedenen Inhibitorkonzentrationen. Die optische Dichte wurde dabei nach 24 – 72 h nach der Zugabe von Alamar Blue® bestimmt. Die ermittelten Werte für die Verbindungen **12 - 14** sowie **K11777** sind in Tabelle 4-5 aufgeführt.

Tabelle 4-5 Antitrypanosomale Aktivität und Zytotoxizität der Verbindungen 12 - 14 und K11777.

Verbindung	X =	<i>T.b.b.</i> EC ₅₀ [μM]		Zytotoxizität (J774.1) EC ₅₀ [μM]
		48 h	72 h	
12	F	12,48 ± 0,39	16,57 ± 0,98	37,8
13	Cl	13,26 ± 0,28	17,22 ± 0,87	22,6
14	Br	3,32 ± 0,35	3,10 ± 0,07	16,9
K11777	H	0,18 ± 0,03	0,16 ± 0,02	41,3

4.4 Diskussion der Ergebnisse der α -Halogen-Vinylsulfone

Da sich bei den in Kapitel 3 beschriebenen *N,S*-Vinylsulfonen herausstellte, dass diese Verbindungen nicht kompetitiv mit den untersuchten Enzym interagieren und zudem nur sehr geringe Affinitäten zu den verschiedenen Enzymen aufwiesen, wurde nach neuen Substitutionsmustern der Vinylsulfonstruktur gesucht, die einen kovalent-reversiblen Inhibitionsmechanismus ermöglichen sollten.

In einem ersten groben *in silico-screening* neuer Substituenten mittels reiner QM-Berechnungen zeigte sich, dass die Einführung eines Halogensubstituenten in α -Position der Vinylsulfonstruktur die Reaktionsenergie in der zugrundeliegenden Modellreaktion mit Methanthiol auf -6 bis -10 kcal/mol erhöht. Dies liegt klar im Bereich einer reversiblen Bindung, während die Berechnungen für den unsubstituierten *warhead* eine Energie von -22 kcal/mol ergeben, was im Einklang mit dem bekannten irreversiblen Mechanismus dieses Inhibitors ist.

Da bei diesen ersten Berechnungen der Einfluss der Enzymumgebung nicht berücksichtigt wird, bilden diese nur einen groben Anhaltspunkt und können wie in Kapitel 3 für die *N,S*-Vinylsulfone aufgezeigt, falsch positive Ergebnisse produzieren. Daher wurden für die neu identifizierten Vinylsulfone mit Halogen-Substituent in α -Position im Anschluss QM/MM-Berechnungen durchgeführt, die unter Berücksichtigung der Enzymumgebung eine bessere Prognose der tatsächlich auftretenden Energien liefern.

Auch hier zeigt sich, dass die enzymatische Umgebung einen nicht zu unterschätzenden Einfluss auf den Verlauf der Inhibitionsreaktion hat, sodass hier Reaktionsenergien von -10 (**14** X=Br) - 11 (**13** X=Cl) und -16 (**12** X = F) kcal/mol berechnet wurden, was deutlich von den reinen QM-Berechnungen abweicht. Die Unterschiede fallen jedoch deutlich geringer aus, als bei den *N,S*-Vinylsulfonen und liegen zumindest für die Verbindungen **14** und **13** noch im reversiblen Bereich, während Verbindung **12** einen Grenzfall darstellt und schon Richtung irreversible Bindung tendiert.

Diese vielversprechenden Ergebnisse rechtfertigten die Synthese der Verbindungen, die angelehnt an die literaturbekannte Synthese von K11777 durchgeführt wurde. Die als Startmaterial nötigen halogenierten *Horner*-Reagenzien konnten problemlos auf verschiedenen Wegen dargestellt werden, sodass die Zielverbindungen in akzeptablen Ausbeuten erhalten wurden.

Ein *screening* der inhibitorischen Potenz der synthetisierten Verbindungen an den Enzymen Rhodesain, Cathepsin L und B zeigte eine relativ hohe Affinität der Verbindungen insbesondere zu Cathepsin L und dem homologen Rhodesain, woraufhin die IC_{50} - und K_i -Werte der Verbindungen zu diesen Enzymen bestimmt wurden.

Hierbei erwies sich Verbindung **12** (X = F) als potentestes Derivat mit K_i -Werten im unteren bis mittleren nanomolaren Bereich. Dabei liegt die Affinität zu Cathepsin L mit einem K_i -Wert von 23 nM im Bereich des irreversiblen Inhibitors K11777 ($K_i = 8,2$ nM), während an Cathepsin B mit einem K_i -Wert von 490 nM sogar eine höhere Potenz als bei K11777 ($K_i = 730$ nM) beobachtet werden kann. Hingegen liegt die Hemmung von Rhodesain mit einem K_i -Wert von 190 nM eine Größenordnung über dem Wert des irreversiblen Inhibitors ($K_i = 14$ nM).

Ein ähnlicher Trend zeigt sich bei Verbindung **13** (X = Cl), die ebenfalls die höchste Affinität zu Cathepsin L zeigt ($K_i = 0,16 \mu\text{M}$), während die Affinitäten zu Rhodesain ($K_i = 1,1 \mu\text{M}$) und Cathepsin B ($K_i = 4,3 \mu\text{M}$) deutlich geringer ausfallen.

Auch bei Verbindung **14** findet sich dieses Bild mit K_i -Werten von $0,28 \mu\text{M}$ (Cathepsin L), $0,86 \mu\text{M}$ (Rhodesain) und $18,3 \mu\text{M}$ (Cathepsin B).

Im Allgemeinen lassen sich also zwei Trends feststellen: Zum einen nimmt die Affinität der Verbindungen zu den Enzymen in der Reihe Cath.L > Rhodesain > Cath. B ab, wobei die Potenz der Verbindungen in der Reihe **K11777** (H) \geq **12** (F) > **13** (Cl) \geq **14** (Br) abnimmt.

Dabei korreliert der zweite Trend mit verschiedenen physikochemischen Trends innerhalb der Reihe der Halogene. So zeigt sich z.B. eine relativ gute Korrelation der mit steigendem Van-der-Waals-Radius des Halogens steigenden K_i -Werte (Abb. 4-31).

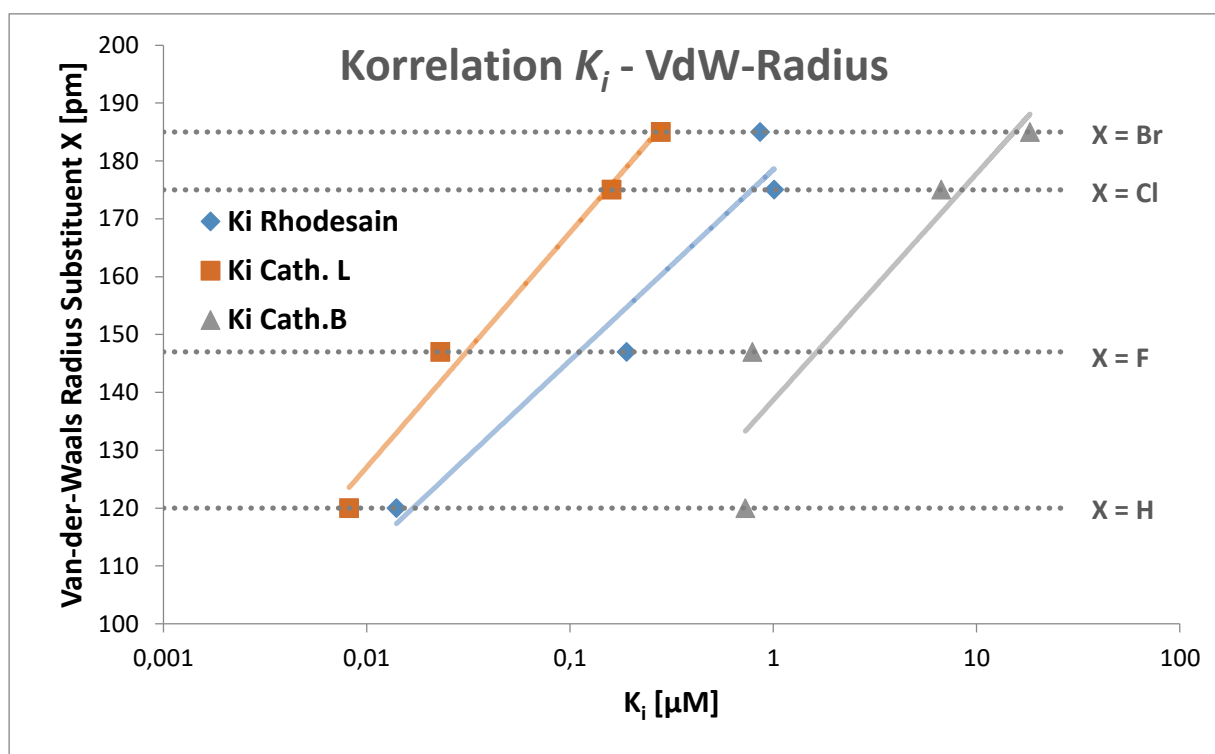


Abbildung 4-31 Korrelation der K_i -Werte mit dem Van-der-Waals-Radius des Substituenten X.

Dieses Verhalten lässt sich durch Betrachtung der Kristallstruktur von Rhodesain mit gebundenem K11777 erläutern (Abb. 4-32). Ersetzt man in dieser Kristallstruktur das Wasserstoffatom in α -Position des Vinylsulfons durch die entsprechenden Halogen-Substituenten, wird klar, dass diese mit zunehmender Größe mit der Oberfläche des Enzyms kollidieren. Dadurch kommt es zu negativen Wechselwirkungen, bzw. einer ungünstigeren Anordnung des Inhibitors in der Bindetasche, was mit dem Verlust von konstruktiven Wechselwirkungen und einer entsprechenden Erhöhung des K_i -Wertes einhergeht.

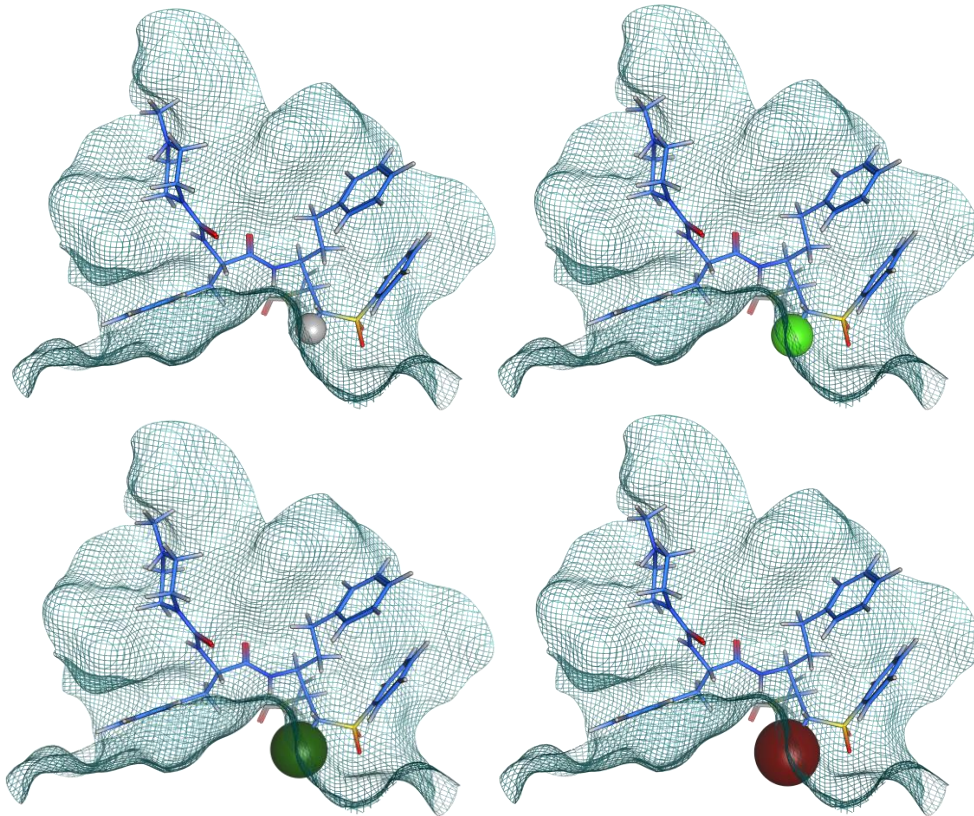


Abbildung 4-32 Illustration der verschiedenen Van-der-Waals-Radien der Substituenten der Vinylsulfone: o.l., grau: -H; o.r., hellgrün: -F; u.l., dunkelgrün: -Cl; u.r., rot: -Br. In der Kristallstruktur von Rhodesain im Komplex mit K11777 wurde das Wasserstoffatom in α -Position durch die jeweiligen Halogene ersetzt. Energieminimierungen wurden dabei nicht vorgenommen.

Kompetitivität der Inhibition

Bei der Betrachtung der Substratabhängigkeit der Inhibitionsreaktion zeigte sich ein linearer Zusammenhang zwischen den mit steigender Substratkonzentration steigenden IC_{50} -Werten. Auf diese Weise konnte eine kompetitive Hemmung der getesteten Enzyme durch die Inhibitoren und die Bindung im Bereich des aktiven Zentrums nachgewiesen werden. Eine direkte Folge dieser kompetitiven Hemmung ist die deutlich erhöhte Potenz der Verbindungen **12** -**14** im Vergleich zu den unkompetitiven *N,S*-Vinylsulfonen, deren geringe Aktivität vermutlich aus unspezifischen Wechselwirkungen abseits des aktiven Zentrums resultiert.

Untersuchungen zum Nachweis einer reversiblen kovalenten Bindung

Die Reversibilität der Inhibitionsreaktionen wurde zunächst mit Hilfe eines Verdünnungsassays mit Rhodesain untersucht. Hierbei zeigte sich bei Verbindung **12** nach der Verdünnung schon nach kurzer Zeit eine vollständige Wiederherstellung der enzymatischen Aktivität. Auch bei Verbindung **13** wurde eine nahezu vollständige Wiederherstellung der Enzymaktivität beobachtet. Ein anderes Bild zeigt sich bei Verbindung **14**: Hier steigt die enzymatische Aktivität auch längere Zeit nach der Verdünnung

nur auf einen Wert von ca. 20 % der Kontrollprobe an. Ein analoges Verhalten zeigte sich auch im Verdünnungsassay mit Cathepsin L.

Die Dialyse von Rhodesain, welches zuvor mit den Verbindungen **12** – **14** inkubiert wurde, bestätigt die Ergebnisse der Verdünnungsassays. Hierbei zeigte sich bei allen drei Verbindungen zunächst eine Restaktivität von ca. 10% bezogen auf die Kontrollprobe ohne Inhibitor. Während die relative Enzymaktivität bei den Inkubationsansätzen der Verbindungen **12** und **13** mit zunehmender Dialysedauer stetig zunimmt, beobachtet man bei Verbindung **14** keine Regeneration der enzymatischen Aktivität im beobachteten Zeitraum.

Während also die Verbindungen **12** und **13** in beiden Experimenten ein klar reversibles Verhalten aufwiesen, ist die Situation bei Verbindung **14** nicht eindeutig: Im Verdünnungsassay war eine sehr langsame Regeneration der Enzymaktivität zu beobachten, während dies bei der Dialyse nicht eindeutig bestätigt werden konnte.

Eine mögliche Ursache des abweichenden Verhaltens von Verbindung **14** könnte in einer unterschiedlichen Bindungskinetik liegen. So wurde zunächst vermutet, dass diese Verbindung im Vergleich zu den anderen beiden Inhibitoren einen verhältnismäßig kleinen k_{off} -Wert aufweisen könnte. Dieser Wert beschreibt die Zerfallsgeschwindigkeit des Enzym-Inhibitor-Komplexes:



Bei einem kleinen k_{off} -Wert wäre also die Geschwindigkeit der Dissoziation des Enzym-Inhibitor-Komplexes relativ gering, was dazu führt, dass diese in der begrenzten Beobachtungsdauer nicht registriert werden kann.

Um diese Hypothese einer verhältnismäßig langsamen Dissoziationsgeschwindigkeit des Komplexes von Rhodesain und Verbindung **14** zu verifizieren, wurde angestrebt die k_{on} und k_{off} -Werte dieser Reaktion mittels SPR-Messungen zu bestimmen. Dies gelang jedoch aus den verschiedenen bereits genannten Gründen nicht. Allerdings konnte für Verbindung **14** in den im folgenden diskutierten massenspektrometrischen Untersuchungen ein abweichender Hemmmechanismus identifiziert werden und so das Verhalten in den Untersuchungen zur Reversibilität erklärt werden.

Die **massenspektrometrischen Untersuchungen** sollten zum Nachweis einer kovalenten Bindung der Inhibitoren an Rhodesain dienen. Für den irreversiblen Inhibitor K11777 wurden wie erwartet nach dem Verdau mittels einer Peptidase zahlreiche Fragmente des Enzyms identifiziert, die das aktive Zentrum beinhalten, deren Masse jedoch um die Masse des Inhibitors erhöht ist ($M + 574,26$ Da). Dies belegt die kovalente Bindung des Inhibitors im Bereich des aktiven Zentrums. Auch für Verbindung **14** wurden entsprechende Fragmente identifiziert, deren Masse um diejenige des Inhibitors erhöht waren ($M + 652,17$ Da), was auch hier eine kovalente Bindung des Inhibitors beweist. Überraschenderweise wurden zusätzlich Fragmente gefunden, deren Masse um $574,26$ Da erhöht war, was genau der Masse von K11777 entspricht. Dies kann nur durch eine Dehydrohalogenierungsreaktion erklärt werden. Durch die Eliminierung von HBr aus Verbindung **14** wird dann die Struktur erhalten, die derjenigen von K11777 entspricht.

Um weitere Einsichten in einen möglichen Mechanismus dieser Reaktion zu erhalten, wurde die Eliminierungsreaktion durch QM/MM-Berechnungen in der Umgebung des Enzyms simuliert (durchgeführt in der Gruppe von Prof. Engels, Universität Würzburg). Grundsätzlich sind zwei

Mechanismen denkbar. Im ersten Fall wird der kovalent gebundene Inhibitor durch Histidin¹⁶² in β -Position deprotoniert. Aus dem resultierenden Carbanion wird anschließend unter Ausbildung einer Doppelbindung Bromid eliminiert (Abbildung 4-33). Es handelt sich hierbei also um eine basenkatalysierte β -Eliminierung nach einem E1_{cb}-Mechanismus.

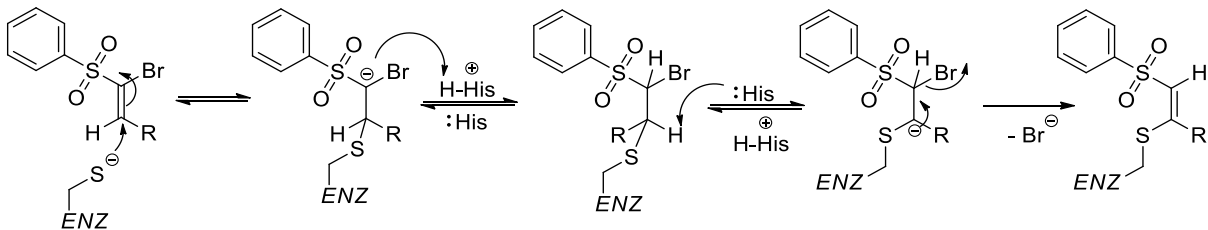


Abbildung 4-33 Möglicher Mechanismus der Eliminierungsreaktion nach einem basenkatalysierten E1_{cb}-Mechanismus

Ein zweiter möglicher Mechanismus besteht in der konzertierten Abspaltung von Proton und Bromid unter Ausbildung der Doppelbindung nach einem E2-Mechanismus (Abbildung 4-34).

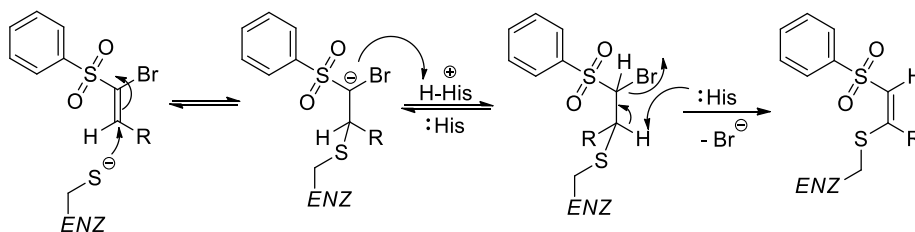


Abbildung 4-34 Möglicher Mechanismus der Eliminierungsreaktion nach einem E2-Mechanismus.

Zur Simulation des erstgenannten Mechanismus wurde ausgehend von dem berechneten kovalenten Enzym-Inhibitor-Komplex I (Abbildung 4-35) das β -Proton auf Histidin¹⁶² übertragen und anschließend die Distanz zwischen Bromid und α -Kohlenstoffatom vergrößert. Nach einer Geometrieoptimierung wird schließlich das Intermediat II (Abbildung 4-35) erhalten. Dieses stellt ein lokales Minimum der potentiellen Energieoberfläche der Eliminierungsreaktion dar. Hier wird das Bromid-Ion nach der Eliminierung durch ein Wassermolekül komplexiert und bildet eine Wasserstoffbrückenbindung zu dem positiv geladenen Tryptophan¹⁸⁴ aus. Das Intermediat liegt dabei energetisch ca. 3 kcal/mol höher als der kovalente Enzym-Inhibitor-Komplex I. Aufgrund der geringen Energiedifferenz sollte es sich um eine reversible Reaktion handeln, bei der das Gleichgewicht auf der Seite der Edukte, also dem kovalenten Enzym-Inhibitor-Komplex, liegt. Da das Bromid-Ion sich jedoch durch Diffusion von dem Reaktionszentrum entfernt, wird die Reaktion irreversibel.

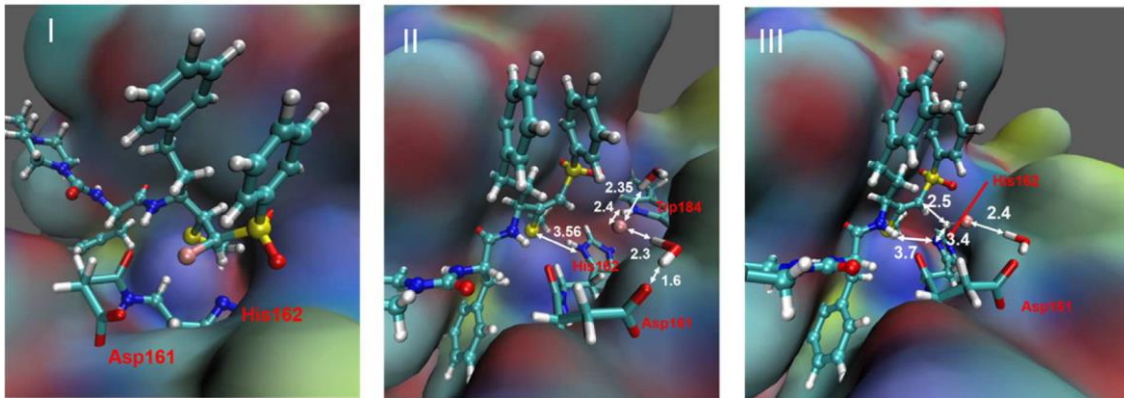


Abbildung 4-35 Kovalenter Enzym-Inhibitor-Komplex von Verbindung **14** (I) und zwei mögliche Intermediate der HBr-Eliminierung. Intermediat II resultiert aus der Eliminierung nach einem E1_{cb}-Mechanismus, wobei das Proton auf Histidin¹⁶² übertragen wird. Intermediat II resultiert aus der konzertierten Eliminierung nach einem E2-Mechanismus.

Um die Eliminierung gemäß dem zweiten möglichen Mechanismus zu simulieren, wurden ausgehend von dem kovalenten Enzym-Inhibitor-Komplex I die Bindungslängen des Bromids und des Protons in β -Position gleichermaßen vergrößert, wobei die beiden Atome in räumlicher Nähe platziert wurden. Das nach einer Geometrieoptimierung erhaltene Intermediat III (Abbildung 4-35) stellt ein weiteres lokales Minimum auf der potentiellen Energieoberfläche der Eliminierungsreaktion dar. Hier wird das eliminierte HBr-Molekül durch ein Wassermolekül komplexiert, das Proton bildet außerdem eine Wasserstoffbrückenbindung zu dem Stickstoffatom von Histidin¹⁶². Dieses Intermediat liegt allerdings 12 kcal/mol über dem kovalenten Enzym-Inhibitor-Komplex und 9 kcal/mol über dem Intermediat II. Gemäß diesen Berechnungen sollte die Eliminierungsreaktion also nach dem erstgenannten E1_{cb}-Mechanismus ablaufen.

Die Eliminierung von HBr aus dem kovalenten Komplex von Verbindung **14** mit Rhodessain führt also schließlich zu einer irreversiblen Hemmung des Enzyms. Diese Erkenntnis erlaubt auch die bessere Interpretation der Resultate der Verdünnungs- und Dialyse-Experimente. Die vermeintlich langsam reversible Inhibitionsreaktion von Verbindung **14** ist also nicht wie zunächst vermutet einer langsamen Dissoziationsgeschwindigkeit des kovalenten Komplexes geschuldet (k_{off} groß). Vielmehr bildet sich mit zunehmender Inkubationsdauer durch zunehmende Eliminierung von HBr aus dem zunächst kovalent-reversiblen Komplex immer mehr irreversibel gehemmtes Enzym, wodurch die Enzymaktivität schließlich gegen Null tendiert. Zwar konnten bisher keine Daten aus massenspektroskopischen Untersuchungen der Verbindungen **12** und **13** erhalten werden, jedoch liegt die Vermutung nahe, dass diese aufgrund der deutlich schlechteren Abgangsgruppen (**12** = F, **13** = Cl) keiner Eliminierungsreaktion unterliegen. Dies zeigt sich auch in der nahezu vollständigen Reversibilität der Inhibitionsreaktionen dieser Verbindungen.

Für Verbindung **12** konnte weiterhin die Ausbildung einer stabilen Interaktion mit Rhodessain durch ¹⁹F-NMR-Spektroskopie nachgewiesen werden. Nach der Zugabe von Rhodessain zu einer Lösung des Inhibitors sind eine deutliche Linienverbreiterung sowie eine Änderung der chemischen Verschiebung der ¹⁹F-Signale zu beobachten. Bei dem eingesetzten molaren Verhältnis von Enzym und Inhibitor von 1:1 sind keine Signale des freien Inhibitors mehr zu beobachten. Dies spricht für die Ausbildung eines sehr stabilen Komplexes durch starke Wechselwirkungen, wie sie z.B. durch eine kovalente Bindung auftreten, wenngleich eine solche durch diese Methode nicht eindeutig nachgewiesen werden kann.

Antitrypanosomale Aktivität und Zytotoxizität

Alle drei synthetisierten Verbindungen weisen schlechtere antitrypanosomale Eigenschaften als die Leitstruktur K11777 auf. Während diese EC₅₀-Werte von 0,18 µM nach 48 h und 0,16 µM nach 72 h aufweist, findet man bei den Verbindungen **12** und **13** lediglich EC₅₀-Werte von ca. 13 µM nach 48 h und ca. 17 µM nach 72 h. Dies ist zum einen auf die geringere Affinität der Verbindungen zu dem Zielenzym zurückzuführen, zum anderen könnte es der Tatsache geschuldet sein, dass es sich um reversible Inhibitoren handelt. Es besteht also ein Gleichgewicht zwischen freiem Inhibitor und Enzym-Inhibitor-Komplex. Der freie Inhibitor ist dabei anfällig für metabolischen Abbau und Biotransformationsprozesse, wodurch dieser dem Gleichgewicht entzogen wird und das Zielenzym zunehmend an Aktivität gewinnt. Bei dem irreversiblen Inhibitor, der an das Zielenzym gebunden hat, kann die enzymatische Aktivität nur durch Proteolyse und Neusynthese des Enzyms wiederhergestellt werden. Diese Hypothese wird durch die Tatsache unterstützt, dass die EC₅₀-Werte bei **12** und **13** mit der Zeit zunehmen, während diese bei K11777 konstant bleiben. In dieses Bild passt auch das Verhalten von Verbindung **14**. Man beobachtet hier EC₅₀-Werte von 3,3 µM nach 48 h und 3,1 µM nach 72 h. Die antitrypanosomale Aktivität ist also deutlich besser als bei **12** und **13** und bleibt zudem über die Zeit konstant, was ein Ausdruck der zunehmenden Irreversibilität der Inhibition durch diese Substanz ist. Bei der Zytotoxizität liegen die drei Substanzen mit 38 µM (**12**), 23 µM (**13**) und 17 µM (**14**) im Bereich von K11777 (41 µM). Die Selektivität gegenüber den Trypanosomen fällt jedoch aufgrund der schlechteren antitrypanosomalen Wirkung entsprechend geringer aus ($EC_{50}(J774.1) / EC_{50}(T.b.b.) = 230$ (K11777); 5 (**14**); 1,7 (**13**); 3 (**12**)). Weiterhin muss erwähnt werden, dass die antitrypanosomale Aktivität von K11777 wahrscheinlich nicht alleine auf der Hemmung von Rhodesain beruht. So wurden weitere zelluläre *targets* dieses Inhibitors, wie beispielsweise die parasitäre Cathepsin B-ähnliche Cysteinprotease TbCatB, identifiziert. So könnte die verminderte Aktivität der Verbindungen **12** – **14** auch aus einer geringeren Hemmung eines anderen *targets* resultieren.

Zusammenfassung der Ergebnisse

Basierend auf den durchgeführten QM/MM-Berechnungen wurden neue substituierte Vinylsulfone mit einem Halogensubstituenten in α-Position identifiziert, die die definierten Ziele eines kovalent-reversiblen und kompetitiven Inhibitors erfüllen sollten. Nach der Synthese der Verbindungen konnte dieser gewünschte Wirkmechanismus insbesondere für die Verbindungen **12** und **13** experimentell nachgewiesen werden. Verbindung **14** zeigt hingegen die Besonderheit, dass die Inhibitionsreaktion durch die Eliminierung von HBr zunehmend irreversibel wird, was durch massenspektrometrische Untersuchungen nachgewiesen wurde und im Einklang mit weitergehenden QM/MM-Berechnungen steht. Die Affinitäten der Verbindungen zu Rhodesain und Cathepsin L liegen im nanomolaren oder niedrigen mikromolaren Bereich, während die Affinitäten zu Cathepsin B deutlich darüber liegen. Insbesondere Verbindung **12** zeigte an den getesteten Enzymen eine hohe Potenz, die im Bereich von K11777 liegt. Hingegen zeigte sich bei allen Verbindungen eine signifikant verminderte antitrypanosomale Aktivität bei vergleichbarer Zytotoxizität verglichen mit der Leitstruktur. Dies könnte zumindest teilweise dem reversiblen Wirkmechanismus geschuldet sein und bedarf einer genaueren Untersuchung z.B. in Bezug auf ein verändertes pharmakokinetisches Profil der neuen Verbindungen.

5. Variation der Erkennungseinheit der α -Halogen-Vinylsulfone

In Kapitel 4 konnten mit den drei Halogen-substituierten Vinylsulfonen Verbindungen identifiziert werden, die den gewünschten kompetitiven kovalent-reversiblen Inhibitionsmechanismus aufweisen. Um dies zu erreichen, wurde bei den Verbindungen lediglich die reaktive Kopfgruppe verändert, während die Erkennungseinheit in Form der peptidischen Seitenkette von der Leitstruktur identisch übernommen wurde. Jedoch leistet auch diese Erkennungseinheit durch nicht-kovalente Wechselwirkungen einen erheblichen Beitrag zur Bindungsenergie der Inhibitoren. Durch Optimierung der Erkennungseinheit und den damit verbundenen Wechselwirkungen lässt sich also möglicherweise eine weitere Affinitätssteigerung erreichen. Zudem wurde gezeigt, dass die Verbindungen durch die Einführung der größeren Substituenten eine geringfügig veränderte Positionierung innerhalb der Bindetasche des Enzyms einnehmen müssen. Dies eröffnet weiteres Potenzial für die Optimierung der Erkennungseinheit in Bezug auf die leicht veränderte Ausrichtung der Liganden.

5.1 Optimierung der Erkennungseinheit durch molekulares Docking

Zur Identifizierung vielversprechender Strukturen mit veränderter Erkennungseinheit wurden verschiedene Methoden des molekularen Dockings eingesetzt. Diese Untersuchungen wurden vom Autor der vorliegenden Dissertation und Sascha Jung, AK Schirmeister durchgeführt. Zunächst wurde eine standardmäßige (nicht-kovalente) Dockingprozedur mit dem Programm *FlexX/LeadIT* (Version 2.1.3)¹³⁶ durchgeführt. Hierzu wurde die Kristallstruktur von Rhodesain im Komplex mit K11777 (PDB: 2P7U) herangezogen.⁴⁸ Der Inhibitor und vorhandene Wassermoleküle wurden mit Ausnahme von H₂O-512 entfernt, da dieses Wassermolekül eine Wasserstoffbrückenbindung zwischen Inhibitor und Peptidrückgrat des Enzyms vermittelt. Die Bindetasche wurde mit einem Radius von 6,5 Å um den gebundenen Inhibitor definiert. Die Erstellung von 3D-Koordinaten und Geometrieoptimierungen der Liganden wurden zuvor mit dem Programm *Molecular Operating Environment* (MOE, Version 2012:10) im MMFF94x-Kraftfeld durchgeführt.¹³⁷ Zur Evaluation und Visualisierung der Ergebnisse wurden die Dockingposen mit dem höchsten Hyde-Score aus einer Liste der Posen mit den zehn höchsten FlexX-Scores ausgewählt.

In einem zweiten Schritt wurden die durch das nicht-kovalente Docking identifizierten Strukturen einem kovalenten Docking unterzogen, um den Einfluss der kovalenten Bindung zu berücksichtigen. Hierzu wurde das MOE-Plugin *DOCKTITE* (Version 1.2) verwendet.¹³⁸ Dabei wurden die α -Halogenvinylsulfon-Strukturen in die Bibliothek der *warheads* des Programms implementiert. Die Geometrie der Liganden wurden im MMFF94x-Kraftfeld optimiert, das Docking wurde dann im Amber12:EHT-Kraftfeld durchgeführt. Die Ergebnisse des Dockings wurden mit den MOE-eigenen *Scoring*-Funktionen *Affinity dG* und *London dG* und zusätzlich mit der externen, empirischen *Scoring*-Funktion DSX bewertet, wobei die Posen mit den höchsten DSX-Werten ausgewählt wurden.

Um die Validität der verwendeten Methoden zu bestätigen wurde zunächst ein *Redocking* des Inhibitors K11777 durchgeführt und die Ergebnisse mit der Kristallstruktur verglichen (Abbildung 5-1).

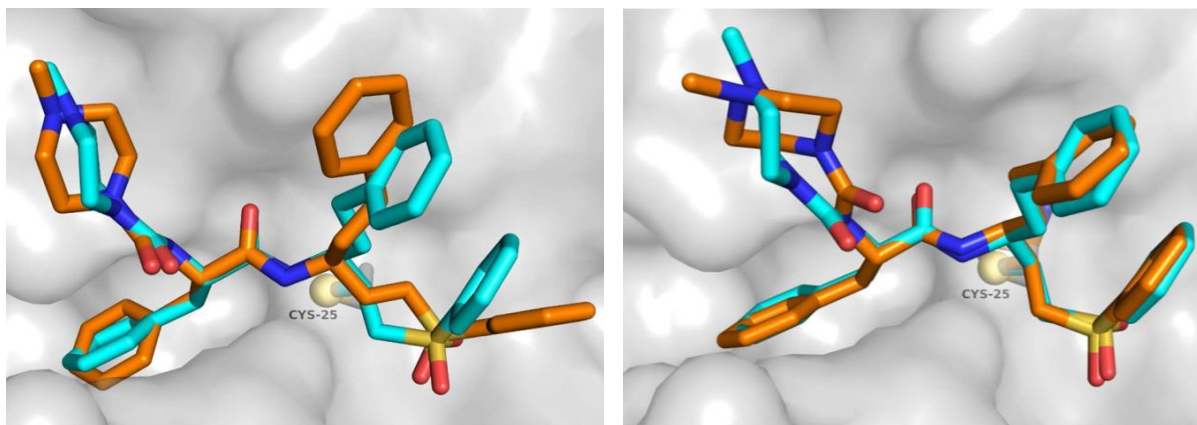


Abbildung 5-1 Ergebnisse des nicht-kovalenten (links) und kovalenten (rechts) Redockings von K11777. Dockingposen sind in orange dargestellt, der Inhibitor aus der Kristallstruktur in cyan.

Dabei zeigte sich sowohl beim nicht-kovalenten als auch beim kovalenten Docking eine gute Übereinstimmung der Dockingposen mit der tatsächlichen Lage des Inhibitors in der Kristallstruktur. Dies gilt insbesondere für die beste Pose des kovalenten Dockings, sodass hier nur kleinere Abweichungen bei dem flexiblen 4-Methylpiperazinrest, der die S_3 -Tasche adressiert, auftreten. Auch der konventionelle Ansatz liefert eine realistische Pose des Inhibitors, bei dem alle Reste in den richtigen Bindetaschen positioniert werden. Bei der jeweiligen Ausrichtung sind jedoch kleinere Differenzen im Vergleich zur Kristallstruktur zu beobachten. Dies zeigt die prinzipielle Validität der beiden Methoden in dem verwendeten System.

Variation des P_3 -Substituenten

Nach der abgeschlossenen Validierung sollten im Anschluss Verbindungen mit verbesserten Wechselwirkungen der Seitenkette identifiziert werden. Dabei wurde sich zunächst auf eine Variation des P_3 -Substituenten konzentriert, da die entsprechende S_3 -Bindetasche nicht sehr tief ausgebildet ist und somit hier viel Spielraum für eine Optimierung bestehen sollte. Als vielversprechendster Ersatz für den 4-Methylpiperazinrest wurden dabei Verbindungen mit einem 4-Pyridylrest identifiziert. Beispielhaft sind in Abbildung 5-2 die besten Dockingposen aus kovalentem und nicht-kovalentem Docking von Verbindung 5 mit 4-Pyridylrest in P_3 -Position und Fluor als Substituent in α -Position des Vinylsulfons abgebildet.

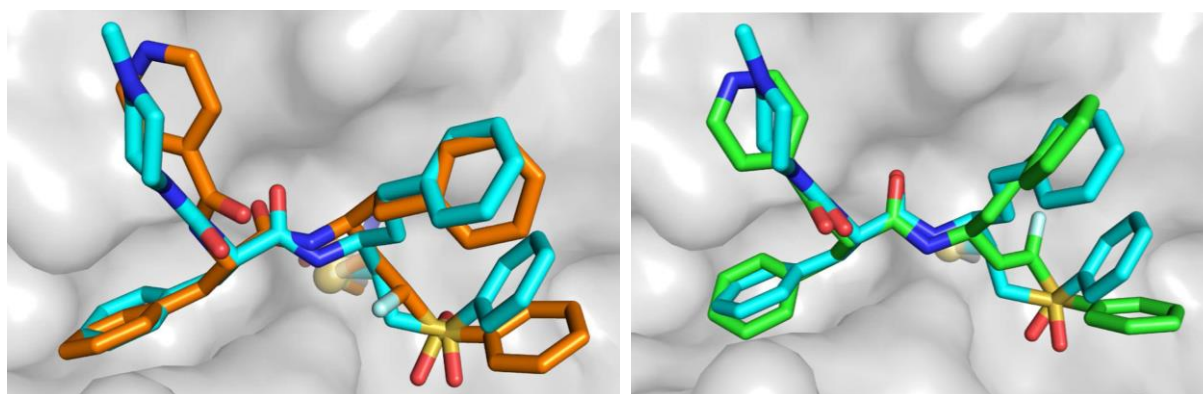
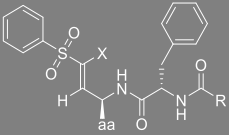


Abbildung 5-2 Beste Dockingposen von Verbindung 5 (vgl. Tabelle 5-1) aus dem kovalenten (links, orange) und nicht kovalenten Docking (rechts, grün). Zum Vergleich ist jeweils die Kristallstruktur von K11777 (cyan) abgebildet.

Sowohl das kovalente als auch das nicht-kovalente Docking liefert eine plausible Positionierung des Liganden in der Bindetasche. Der neu eingeführte Pyridylrest in P₃-Position wird dabei in einer ähnlichen Weise wie der 4-Methylpiperazinrest in der S₃-Tasche positioniert. Auch die P₁- und P₂-Substituenten adressieren die entsprechenden Taschen in ähnlicher Weise wie die Leitstruktur, sodass insgesamt bei beiden Methoden eine hohe Übereinstimmung der Dockingposen mit der Lage von K11777 aus der Kristallstruktur zu beobachten ist.

Zur Evaluation der besten Dockingposen wurden verschiedenen *scoring*-Funktionen herangezogen (Tabelle 5-1). Dabei zeigte sich beim nicht-kovalenten Docking der bereits synthetisierten Verbindungen **12** - **14** eine gute Korrelation des *FlexX*-scores und des *Hyde*-scores mit den erhaltenen *K_i*-Werten (X = H < F < Br ≈ Cl). Beim kovalenten Docking spiegelt sich diese Korrelation nicht wieder. So wird bei dem empirischen *DSX*-score für Verbindung **14** eine deutlich höhere Affinität als für die beiden anderen Halogen-substituierten Vinylsulfone vorhergesagt. Dies muss jedoch kein Widerspruch sein: Während sich der experimentell bestimmte *K_i*-Wert aus verschiedenen Größen wie der nicht-kovalenten Affinität des Liganden, der Thermodynamik und Kinetik der kovalenten Reaktion und der Affinität bzw. Geometrie des finalen Protein-gebundenen Liganden ergibt, berücksichtigen die verschiedenen Methoden jeweils nur einen Teil der tatsächlichen Wechselwirkungen. So ist es prinzipiell möglich, dass bei Verbindung **14** (X=Br) im kovalenten Komplex günstigere Wechselwirkungen auftreten als bei Verbindung **12** (X=F), was durch die jeweiligen *DSX*-scores propagiert wird. Nichtsdestotrotz kann Verbindung **12** insgesamt eine höhere Potenz aufweisen, da sie eine höhere nicht-kovalente Affinität zeigt (vgl. *FlexX*- und *Hyde*-score) und außerdem die Thermodynamik der kovalenten Reaktion günstiger sein könnte (vgl. auch Abbildung 4-4). So erlaubt die Kombination beider Docking-Methoden detaillierte Erkenntnisse über die möglichen Wechselwirkungen neuer Derivate.

Tabelle 5-1 Beste Hits des virtuellen screenings neuer Verbindungen durch kovalentes und klassisches nicht-kovalentes Docking. Für das kovalente Docking sind die Werte der MOE-eigenen *scoring*-Funktionen *Affinity dG* und *London dG*, sowie Werte des externen empirischen *DSX*-scores¹³⁹ angegeben. Die Ergebnisse des nicht-kovalenten Dockings sind in Form des *FlexX*-scores und des *Hyde*-scores¹⁴⁰ angegeben.

			Kovalentes docking (Docktite / MOE)			Nicht-kovalentes docking (FlexX)		
Verbindung	X =	R =	Affinity dG score	London dG score	DSX score	FlexX score	Hyde score (ΔG in kJ/mol)	Distanz (Å) β-C zu Cys-S
K11777	H	Me-Pip	- 6,9356	- 11,0131	-155,868	-27,79	-38	3,05
12	F	Me-Pip	-6,1142	-9,7737	-132,963	-27,98	-36	3,01
13	Cl	Me-Pip	-5,4185	-12,4002	-132,995	-23,03	-25	3,19
14	Br	Me-Pip	-3,774	-11,9287	-145,341	-22,53	-24	3,41
15	H	4-Pyr	-5,2260	-11,7019	-157,770	-19,81	-39	2,95
16	F	4-Pyr	-5,6740	-12,0026	-158,593	-28,02	-38	2,90
17	Cl	4-Pyr	-3,0607	-10,6499	-133,434	-28,84	-31	3,12

Für die Derivate mit 4-Pyridylrest werden insbesondere für Verbindungen mit X = H und X = F hohe Affinitäten bei beiden Docking-Methoden vorhergesagt. Diese liegen deutlich über den korrespondierenden Verbindungen mit 4-Methylpiperazinrest im Bereich des irreversiblen Inhibitors oder sogar leicht darüber. Hingegen scheint ein Chlor-Substituent vor allem beim kovalenten Docking etwas ungünstiger zu sein, sodass Affinitäten vorhergesagt werden, die im Bereich der entsprechenden Verbindung mit 4-Methylpiperazinrest liegen. Jedoch sollte gemäß dem *Hyde*-Score auch hier eine Verbesserung der nicht-kovalente Affinität durch die Einführung des 4-Pyridylsubstituenten auftreten.

Variation des P_1 -Substituenten

Weitere Modifikationen der Seitenkette sollten in P_1 -Position vorgenommen werden. Zum einen sollten Derivate mit Methionin in P_1 -Position synthetisiert werden, da diese Aminosäure auch in natürlichen Substraten von Rhodesain an dieser Position toleriert wird. Weitere Derivate sollten einen Benzylcysteinrest an dieser Stelle tragen. Dieser kann als Analogon des Homophenylalanins mit verlängerter Seitenkette angesehen werden, wodurch zusätzliche Wechselwirkungen durch bessere Ausfüllung der S_1 -Tasche sowie zusätzliche Wechselwirkungen mit dem Schwefelatom auftreten könnten. Um dies genauer zu untersuchen wurden die möglichen Derivate einem nicht-kovalenten Docking unterzogen (Abbildung 5-3: P_1 =BnCys, X=F, Abbildung 5-4: P_1 =Met, X=F)

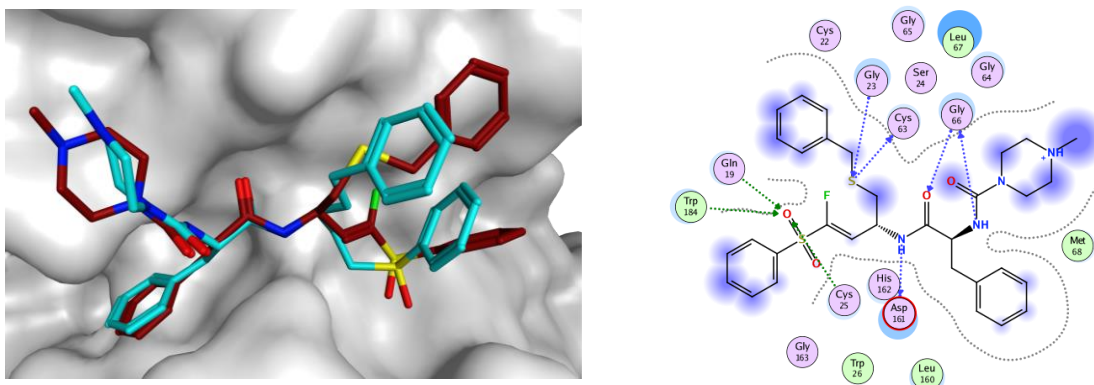


Abbildung 5-3 Beste Dockingpose von Verbindung 20 (rot, K11777: cyan) und 2D-Wechselwirkungsdiagramm.

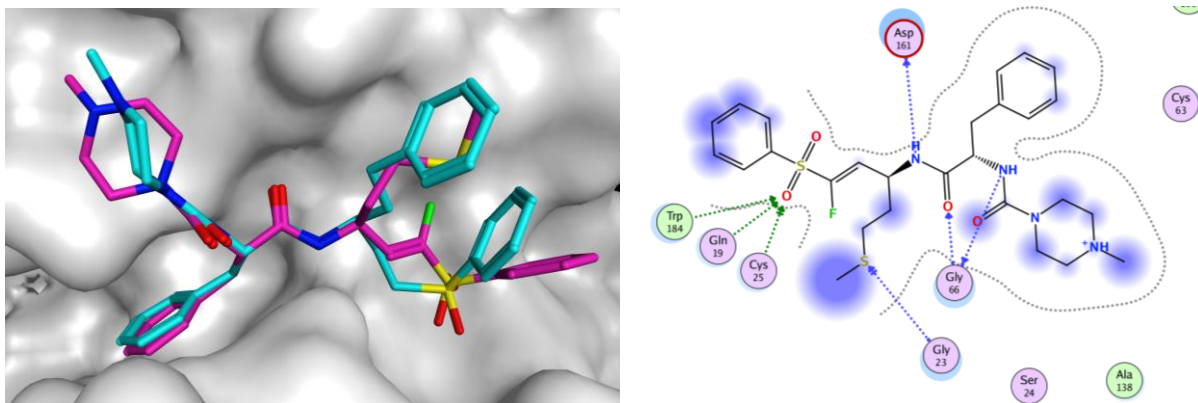


Abbildung 5-4 Beste Dockingpose von Verbindung 18 (pink, K11777: cyan) und 2D-Wechselwirkungsdiagramm.

Für beide Verbindungen mit verändertem P_1 -Substituenten werden plausible Dockingposen gefunden, wobei alle Substituenten die richtigen Bindetaschen adressieren und in ähnlicher Weise wie die Leitstruktur in der Kristallstruktur positioniert sind. Wie in den 2D-Wechselwirkungsdiagrammen zu sehen, werden für beide Verbindungen zusätzliche Wechselwirkungen durch das jeweilige Schwefelatom vorhergesagt, was sich positiv auf die Affinität der Verbindungen auswirken könnte.

Variation von P_2 - und P_3 -Substituent

In vorangegangenen Arbeiten im Arbeitskreis wurde, basierend auf einem virtuellen *de novo*-design alternativer P_3 -/ P_2 -Substituenten die Verbindung **CG12** identifiziert (Abbildung 5-5).¹⁴¹

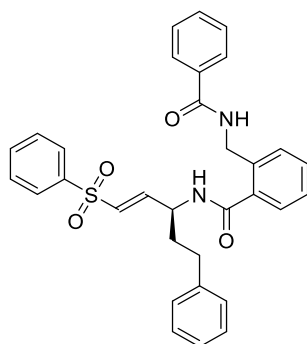


Abbildung 5-5 Strukturformel von CG12

Dieser irreversible Inhibitor weist an Rhodesain einen vielversprechenden K_i -Wert von $0,1 \mu\text{M}$ auf, weshalb dieser durch Einführung von Halogensubstituenten in α -Position des Vinylsulfons in einen reversiblen Inhibitor überführt werden sollte.

5.2 Synthese der Vinylsulfone mit veränderter Erkennungseinheit

Die Synthese der neu identifizierten Derivate konnte weitgehend analog zu den in Kapitel 4 synthetisierten Verbindungen erfolgen. Die Einführung des 4-Pyridyl-Restes in P₃-Position gelang in nahezu quantitativer Ausbeute durch Reaktion des kommerziell erhältlichen Isonicotinoylchlorids mit *L*-Phenylalaninmethylester. Die restliche Synthese der Zielverbindungen erfolgte dann gemäß der in Kapitel 4 gezeigten Syntheseroute.

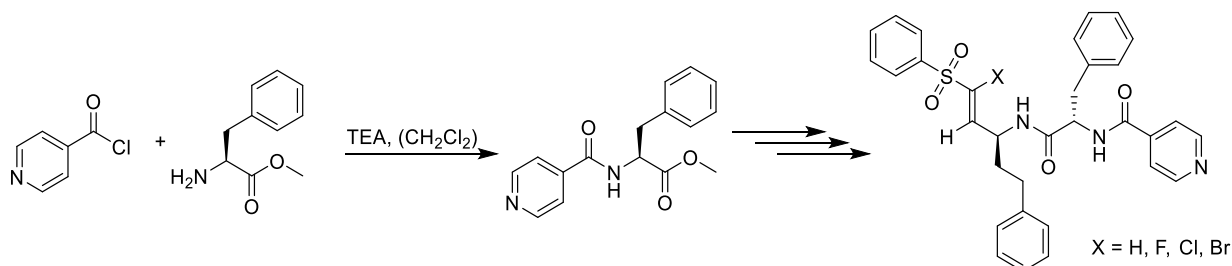


Abbildung 5-6 Synthese der Derivate mit 4-Pyridyl-Rest in P₃-Position.

Die Derivate mit neuen Aminosäureresten in P₁-Position konnten gemäß dem bekannten Schema durch Reduktion der entsprechenden Weinreb-Amide zu den Aldehyden und anschließende HWE-Reaktion synthetisiert werden (Abbildung 5-7).

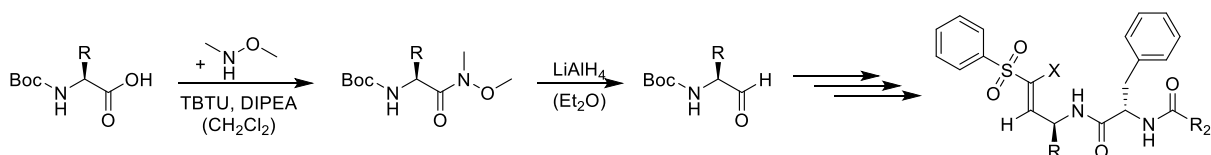


Abbildung 5-7 Einführung von neuen Aminosäuren in P₁-Position.

Das Aminosäurederivat Benzylcystein, das in P₁-Position eingeführt wurde, konnte durch Reaktion von *L*-Cystein mit Benzylbromid in einer S_N2-Reaktion gewonnen werden. Nach Einführung der Boc-Schutzgruppe kann dieses Derivat ebenfalls über das entsprechende Weinreb-Amid reduziert werden und dann in der etablierten Syntheseroute in P₁-Position eingeführt werden (Abbildung 5-8)

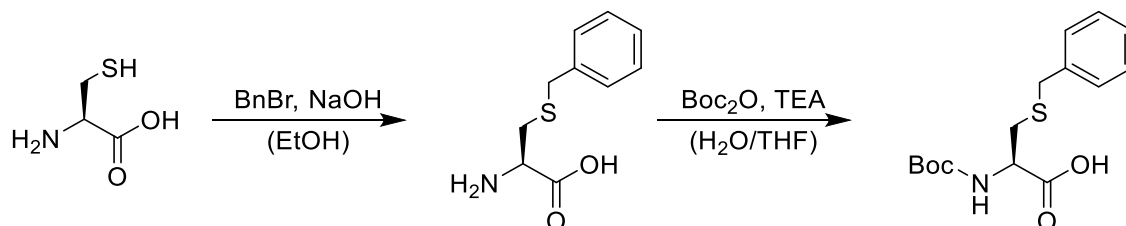


Abbildung 5-8 Synthese von Boc-geschütztem Benzylcystein.

Die auf der Verbindung CG12 basierenden Derivate mit nicht-peptidischer Seitenkette wurden nach einer etablierten Syntheseroute für CG12 synthetisiert (Abbildung 5-9).¹⁴¹

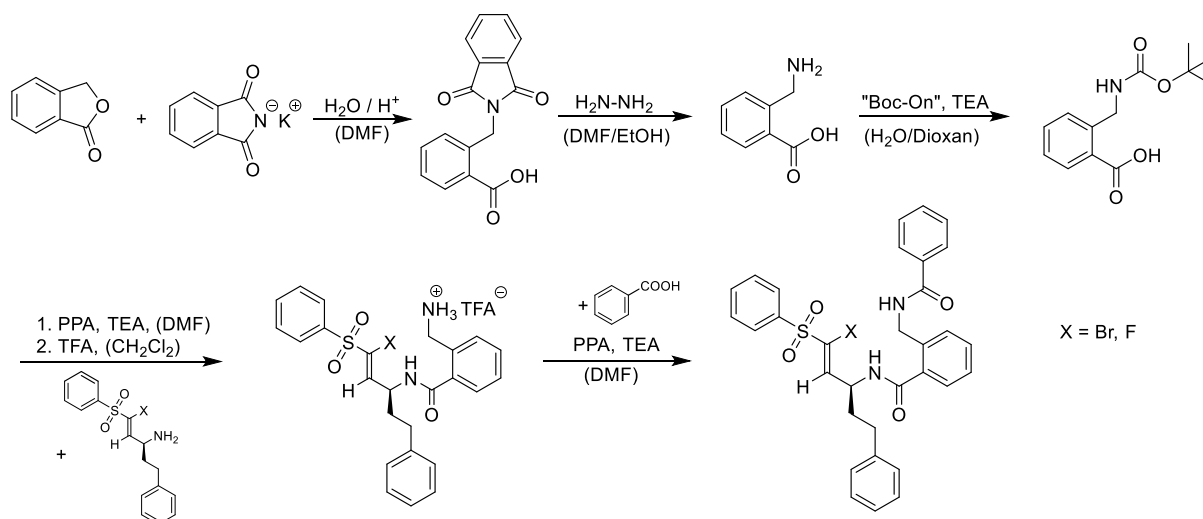


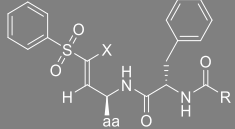
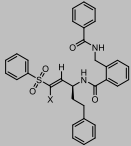
Abbildung 5-9 Synthese der halogenierten Derivate von CG12 mit nicht-peptidischer Seitenkette

Bei dieser Synthese wird zunächst das kommerziell erhältliche Phthalid in einer Gabriel-Synthese mit Kaliumphthalimid und Hydrazin zur 2-(Aminomethyl)benzoesäure umgesetzt. Nach Einführung der Boc-Schutzgruppe kann diese dann in einer PPA-vermittelten Peptidkupplung mit den halogenierten *warheads* verknüpft werden. Nach Abspaltung der Schutzgruppe erhält man die Zielverbindungen schließlich durch PPA-vermittelte Kupplung mit Benzoesäure.

5.3 Biochemische und biologische Untersuchungen der Vinylsulfone mit veränderter Erkennungseinheit

Da für die neu synthetisierten Derivate nur die schon bekannten *warheads* eingesetzt wurden, konnte an dieser Stelle auf eine genauere Untersuchung des Inhibitionsmechanismus verzichtet werden. So kann davon ausgegangen werden, dass es sich bei den Derivaten mit veränderter Erkennungseinheit ebenfalls um kovalente, kompetitive Inhibitoren handelt. So wurden zunächst die K_i -Werte der neu synthetisierten Verbindungen **15 - 22** bestimmt (Tabelle 5-2).

Tabelle 5-2 K_i -Werte der Verbindungen **15 - 22**. Zum Vergleich sind die K_i -Werte der Verbindungen **12 - 14**, sowie **CG12** und **K11777** angegeben. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte aus mindestens 2 unabhängigen Messungen. *n.b.* = nicht bestimmt (keine nennenswerte Hemmung bei $I = 20 \mu\text{M}$).

				K_i [μM]		
Verbindung	X =	R =	aa =	Rho	Cath. L	Cath. B
12	F	Me-Pip	hPhe	0,190 $\pm 0,002$	0,023 $\pm 0,002$	0,47 $\pm 0,002$
13	Cl	Me-Pip	hPhe	1,01 $\pm 0,05$	0,16 $\pm 0,02$	4,03 $\pm 0,002$
14	Br	Me-Pip	hPhe	0,860 $\pm 0,03$	0,20 $\pm 0,03$	18,3 $\pm 0,02$
15	H	4-Pyr	hPhe	0,0037 $\pm 0,00025$	0,0089 $\pm 0,002$	0,758 $\pm 0,215$
16	F	4-Pyr	hPhe	0,032 $\pm 0,002$	0,11 $\pm 0,004$	3,13 $\pm 0,23$
17	Cl	4-Pyr	hPhe	0,190 $\pm 0,03$	1,14 $\pm 0,23$	27,5 $\pm 1,35$
18	F	Me-Pip	Met	0,352 $\pm 0,007$	0,173 $\pm 0,02$	1,20 $\pm 0,02$
19	F	4-Pyr	Met	0,056 $\pm 0,003$	0,577 $\pm 0,02$	6,17 $\pm 0,09$
20	F	Me-Pip	Cys-Bn	0,630 $\pm 0,23$	0,628 $\pm 0,08$	8,62 $\pm 0,17$
21	Br		hPhe	<i>n.b.</i>	<i>n.b.</i>	<i>n.b.</i>
22	F		hPhe	<i>n.b.</i>	<i>n.b.</i>	<i>n.b.</i>
CG12	H		hPhe	0,10	1,98	1,49
K11777	H	Me-Pip	hPhe	0,01 $\pm 0,005$	0,0082 $\pm 0,002$	0,73 $\pm 0,06$

Die K_i -Werte der Verbindungen **15 – 20** liegen bei Rhodesain allesamt im submikromolaren Bereich. Auch bei Cathepsin L werden hauptsächlich Werte im submikromolaren Bereich gefunden. Im Falle von Cathepsin B bewegen sich die Werte im niedrigen bis mittleren mikromolaren Bereich. Hingegen

weisen die Verbindungen **21** und **22** als Analoga der Verbindung **CG12** keine nennenswerte Inhibition von allen drei getesteten Enzymen auf. K_i -Werte wurden für diese Verbindungen nicht bestimmt, da sie bei einem *screening* an den verschiedenen Enzymen keine nennenswerte Inhibition bei einer Konzentration von 20 μM zeigten.

Untersuchungen zur Reversibilität

Um den Einfluss der veränderten Seitenkette auf die Reversibilität der Inhibitionsreaktion zu untersuchen, wurden einige Verbindungen durch das bereits beschriebene Verfahren der Dialyse auf eine reversible Inhibition von Rhodesain untersucht (Abbildung 5-10). Zum Vergleich sind hier ebenfalls die Verbindungen **12** – **14** aufgetragen.

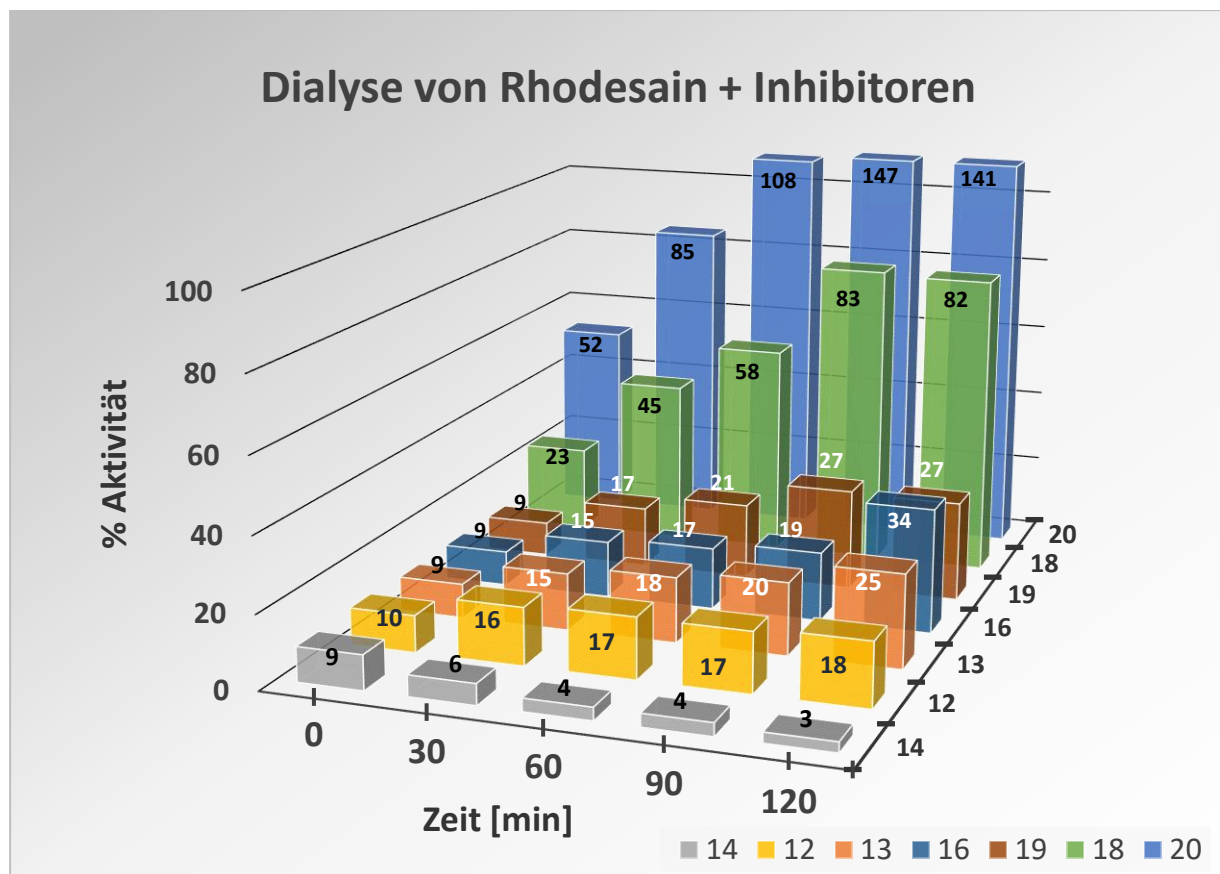


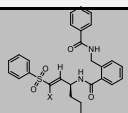
Abbildung 5-10 Enzymaktivität im zeitlichen Verlauf der Dialyse von Rhodesain, welches mit den verschiedenen Inhibitoren inkubiert wurde. Die Enzymaktivität wurde alle 30 Minuten durch die Entnahme von Aliquots bestimmt. Die Ergebnisse sind in prozentualer Aktivität bezogen auf uninhibiertes Rhodesain angegeben, welches im gleichen Experiment der Dialyse unterzogen wurde. Die Konzentration der Inhibitoren wurde jeweils im Bereich von ca. $10 \times K_i$ gewählt um eine vollständige Inhibition des Enzyms vor der Dialyse zu gewährleisten.

Bei allen getesteten Verbindungen zeigt sich mit zunehmender Dialysedauer ein Anstieg der prozentualen Enzymaktivität bezogen auf uninhibiertes Rhodesain. Besonders deutlich fällt dieser Anstieg bei Verbindung **18** aus. Hier steigt die prozentuale Aktivität von anfängliche 23% bis auf 82% nach 120 Minuten. Die Verbindungen **16** und **19** weisen einen Anstieg von anfänglich 9% auf 34% (**16**) und 27% (**19**) auf. Dies liegt im Bereich der zuvor getesteten Verbindungen **12** und **13**. Bei Verbindung **20** ist überraschenderweise ein Anstieg bis auf 141% zu beobachten. Allerdings lag hier die prozentuale Aktivität schon zu Beginn bei 52%. Dieses Verhalten könnte auf eine höhere Enzymkonzentration (z.B. durch einen Pipettierfehler) zurückzuführen sein, sodass Werte > 100% bezogen auf die Kontrollprobe erhalten werden. Der Trend ist jedoch mit einer Verdreifachung der prozentualen Aktivität vergleichbar mit den anderen getesteten Verbindungen.

Bestimmung der antitrypanosomalen Aktivität und Zytotoxizität

Die Effektivität der neuen Verbindungen gegen Trypanosomen des Stammes *T. brucei brucei* TC211 wurde *in vitro* mittels des schon beschriebenen Alamar Blue®-Assays bestimmt (vgl. S. 72). Auf die gleiche Weise wurde auch die Zytotoxizität an der Makrophagenzelllinie J774.1 bestimmt. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind in Tabelle 5-3 aufgetragen. Außerdem ist hier die Selektivität der Inhibitoren als Quotient der EC₅₀-Werte an Trypanosomen und Makrophagen angegeben.

Tabelle 5-3 Antitrypanosomale Aktivität und Zytotoxizität der Verbindungen 12 - 22, CG12 und K11777. Bei einigen Verbindungen liegt der EC₅₀-Wert der Zytotoxizität oberhalb der maximalen eingesetzten Inhibitorkonzentration von 100 µM (EC₅₀ > 100 µM). n.b. = nicht bestimmt.

Verbindung	X =	R =	aa =	<i>T.b.b.</i> EC ₅₀ [µM]		Zytotoxizität (J774.1) EC50 [µM]	Selektivität EC ₅₀ T.b.b. / EC ₅₀ J774.1
				48 h	72 h		
12	F	Me-Pip	hPhe	12,48 ± 0,39	16,57 ± 0,98	37,8	3
13	Cl	Me-Pip	hPhe	13,26 ± 0,28	17,22 ± 0,87	22,6	2
14	Br	Me-Pip	hPhe	3,32 ± 0,35	3,10 ± 0,07	16,9	5
15	H	4-Pyr	hPhe	1,70 ± 0,40	2,99 ± 0,32	8,6	5
16	F	4-Pyr	hPhe	3,01 ± 0,41	3,62 ± 0,16	> 100	> 33
17	Cl	4-Pyr	hPhe	3,14 ± 0,18	2,98 ± 1,97	> 100	> 33
18	F	Me-Pip	Met	14,05 ± 0,62	17,14 ± 0,01	43,02	3
19	F	4-Pyr	Met	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
20	F	Me-Pip	Cys-Bn	2,98 ± 0,07	3,52 ± 0,02	8,69	3
21	Br		hPhe	2,83 ± 0,26	3,51 ± 0,16	11,7	4
22	F		hPhe	3,28 ± 0,10	3,61 ± 0,08	> 100	> 30
CG12	H		hPhe	3,63 ± 0,46	4,95 ± 0,75	> 100	> 28
K11777	H	Me-Pip	hPhe	0,18 ± 0,03	0,16 ± 0,02	41,3	258

Die antitrypanosomalen Aktivitäten der neue synthetisierten Verbindungen **15 -22** liegen allesamt im niedrigen mikromolaren Bereich. Lediglich Verbindung **18** weist einen etwas höheren EC_{50} -Wert von ca. $14 \mu\text{M}$ auf während die Werte der restlichen Verbindungen im Bereich von $2 - 3 \mu\text{M}$ liegen. Bei der Zytotoxizität ergibt sich ein relativ heterogenes Bild. Insbesondere die Verbindungen **16, 17** und **22** weisen in diesem Bereich mit EC_{50} -Werten $> 100 \mu\text{M}$ ein günstiges Profil auf. Hingegen zeigen die Verbindungen **15, 20** und **21** eine relativ hohe Toxizität gegenüber der verwendeten Zelllinie mit Werten im Bereich von $10 \mu\text{M}$ und entsprechend schlechter Selektivität.

Zum Vergleich wurde die Zytotoxizität einiger Verbindungen auch an *HeLa*-Zellen bestimmt (durchgeführt von Dr. Denise Bamberger, AK Prof. Peter Wich, Universität Mainz). Hierzu wurde die Zellviabilität unter dem Einfluss der verschiedenen Inhibitoren mit Hilfe eines *MTT-assays* bestimmt. Dabei wird der wasserlösliche gelbe Farbstoff 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT) eingesetzt. Dieser unterliegt in lebenden Zellen einer NAD(P)H-abhängigen enzymatischen Reduktion zum entsprechenden wasserunlöslichen, violetten Formazan (Abbildung 5-11).

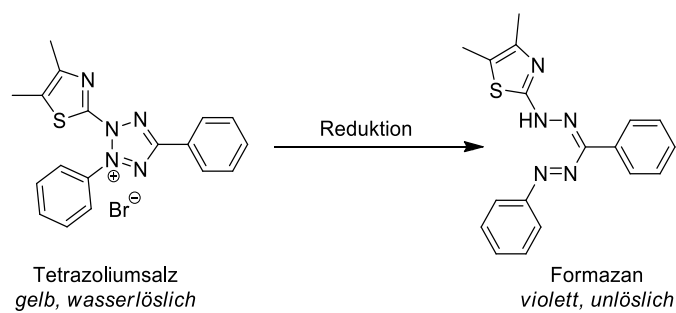
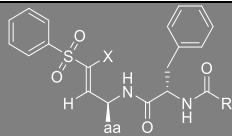
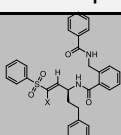


Abbildung 5-11 Reduktion des Tetrazoliumsalzes MTT (gelb) zum entsprechenden Formazan (violett).

Unter definierten Bedingungen korreliert das Maß der MTT-Reduktion mit der Viabilität der Zellen und kann durch Absorptionsmessung in Bezug auf eine Vergleichsprobe quantifiziert werden. Bestimmt man auf diese Weise die Zellviabilität bei verschiedenen Inhibitorkonzentrationen, lassen sich die zugehörigen EC_{50} -Werte durch Auftragung der Zellviabilität gegen die Inhibitorkonzentration und nicht-lineare Regression mit Gleichung 27 (Kapitel 3.2.3) bestimmen (Tabelle 5-4).

Tabelle 5-4 Zytotoxizität an HeLa-Zellen. Bei einigen Verbindungen liegt der EC₅₀-Wert oberhalb der maximalen eingesetzten InhibitorKonzentration von 500 µM (EC₅₀ > 500 µM). n.b. = nicht bestimmt.

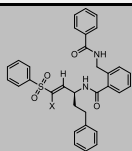
				Zytotoxizität (HeLa) EC ₅₀ [µM]
Verbindung	X =	R =	aa =	
12	F	Me-Pip	hPhe	10 ± 2,0
13	Cl	Me-Pip	hPhe	19 ± 1,5
14	Br	Me-Pip	hPhe	8 ± 0,2
15	H	4-Pyr	hPhe	11 ± 2,6
16	F	4-Pyr	hPhe	> 500
17	Cl	4-Pyr	hPhe	> 500
18	F	Me-Pip	Met	77 ± 8,1
19	F	4-Pyr	Met	n.b.
20	F	Me-Pip	Cys-Bn	8 ± 0,4
21	Br		hPhe	60 ± 35,3
22	F		hPhe	> 500
CG12	H		hPhe	n.b.
K11777	H		Me-Pip	hPhe

Die Ergebnisse der Zytotoxizitätsbestimmung an HeLa-Zellen bestätigen die zuvor beschriebenen Werte für J774.1 Makrophagen (Tabelle 5-3). Auch hier weisen die Verbindungen **16** und **17** mit 4-Pyridylrest und Halogen-Substituent die geringsten Toxizitäten auf. Die übrigen Verbindungen weisen Werte im niedrigen mikromolaren Bereich auf und liegen damit im Bereich von K11777.

Untersuchungen zur Selektivität

Um die Selektivität gegenüber anderen Proteasen zu evaluieren, wurde eine mögliche Hemmung der proteolytischen Aktivität des Proteasoms untersucht. Das Proteasom ist ein großer Multiproteinkomplex der maßgeblich an wichtigen Prozessen, wie der physiologischen Proteindegradation und der Proteinqualitätskontrolle beteiligt ist. Es verfügt über verschiedene Zentren proteolytischer Aktivität, die in verschiedenen Untereinheiten lokalisiert sind. Bei den einzelnen Untereinheiten handelt es sich jeweils um Threoninproteasen, die gemäß der jeweiligen Substratspezifität in eine Caspase-ähnliche, Trypsin-ähnliche und Chymotrypsin-ähnliche Aktivität unterteilt werden. Aufgrund der unterschiedlichen Substratspezifitäten können die katalytischen Aktivitäten durch die Wahl von geeigneten spezifischen, fluorogenen Substraten jeweils einzeln in einem fluorimetrischen *assay* bestimmt werden. Tabelle 5-5 gibt einen Überblick über die prozentuale Hemmung der verschiedenen katalytischen Aktivitäten des Proteasoms durch die verschiedenen Vinylsulfone.

Tabelle 5-5 Screening der Inhibition der verschiedenen katalytischen Aktivitäten des Proteasoms durch die Verbindungen 12 – 22 sowie K11777 bei konstanter Inhibitorkonzentration von 11 μM .
(*n.b.* = nicht bestimmt)

Verbindung	X =	R =	aa =	Prozentuale Hemmung [I] = 11 μM		
				„Trypsin“	„Caspase“	„Chymotrypsin“
12	F	Me-Pip	hPhe	4	16	13
13	Cl	Me-Pip	hPhe	0	23	43
14	Br	Me-Pip	hPhe	9	71	53
15	H	4-Pyr	hPhe	8	45	10
16	F	4-Pyr	hPhe	0	41	10
17	Cl	4-Pyr	hPhe	0	25	0
18	F	Me-Pip	Met	6	18	3
19	F	4-Pyr	Met	<i>n.b.</i>	<i>n.b.</i>	<i>n.b.</i>
20	F	Me-Pip	Cys-Bn	14	2	71
21	Br		hPhe	0	50	0
22	F		hPhe	0	25	0
CG12	H		hPhe	<i>n.b.</i>	<i>n.b.</i>	<i>n.b.</i>
K11777	H	Me-Pip	hPhe	3	10	24

Bei diesem *screening* war nur vereinzelt eine geringe Hemmung einzelner katalytischer Aktivitäten zu beobachten. Insbesondere die Trypsin-ähnliche Aktivität wurde von keiner der untersuchten Substanzen maßgeblich beeinflusst. Auch auf die Chymotrypsin-ähnliche Aktivität hatten die meisten Substanzen keinen nennenswerten Einfluss. Lediglich die Verbindungen **22** und **14** zeigten hier eine prozentuale Hemmung > 50%. Bei der Caspase-ähnlichen Aktivität zeigte ebenfalls Verbindung **14** eine relativ hohe Hemmung von 71%, während die restlichen Verbindungen eine geringere Affinität im Bereich $\leq 50\%$ aufweisen.

5.4. Diskussion der Ergebnisse

Nach der Synthese der Verbindungen, die problemlos nach etablierten Schemata durchgeführt werden konnte, wurden die K_i -Werte der verschiedenen Verbindungen bestimmt. Im Allgemeinen wurden dabei die Vorhersagen der Dockingstudien bestätigt. Gemäß diesen Untersuchungen sollte sich die Substitution des Methylpiperazinrestes in P_3 -Position durch einen 4-Pyridylrest positiv auf die Affinität der Inhibitoren zu dem Zielenzym Rhodocytin auswirken. Tatsächlich bewirkt die Einführung des Pyridinrestes bei K11777 eine Steigerung der Affinität um den Faktor 2,7 (K_i (**15**) = 3,7 nM; K_i (**K11777**) = 10 nM). Noch deutlicher fällt diese Affinitätssteigerung bei den Verbindungen **16** (X=F) und **17** (X=Cl) mit Halogensubstituent aus. Hier beobachtet man eine Steigerung der Affinität um

einen Faktor von 5 – 6 verglichen mit den analogen Verbindungen mit Methylpiperazinrest, sodass hier K_i -Werte von 32 nM (**16**) und 190 nM (**17**) erhalten werden.

Hingegen konnte durch die Einführung eines alternativen Restes in P_1 -Position keine Affinitätssteigerung erreicht werden. So steigt der K_i -Wert durch die Substitution des Homophenylalanins durch Benzylcystein von 190 nM (**12**) auf 630 nM (**20**). Die Einführung eines Methioninrestes an dieser Stelle hat einen Anstieg auf 360 nM (**18**) zur Folge. Allerdings konnte auch bei dieser Verbindung durch die Einführung eines 4-Pyridylrestes in P_3 -Position eine ca. 6-fache Steigerung der Affinität auf 56 nM (**19**) erreicht werden.

Bei den Cathepsinen B und L zeigt sich ein etwas anderes Bild: hier bewirkten alle Veränderungen der Leitstrukturen eine Verminderung der Affinität zu diesen Enzymen. Während die Substitution des Methylpiperazinrestes von **K11777** durch einen 4-Pyridylrest (Verbindung **15**) nur eine sehr geringe Auswirkung auf den jeweiligen K_i -Wert hat, wird diese Veränderung von Verbindungen mit Halogensubstituent offenbar schlechter toleriert. Dies unterstreicht den großen Einfluss der Erkennungseinheit auf die Positionierung des gesamten Liganden in der Bindetasche. So können auch kleinere Veränderungen der Seitenkette in P_3 -Position zu einer leicht veränderten Positionierung des *warheads* führen, die sich insbesondere bei den Halogen-substituierten Verbindungen negativ auswirkt. Wie schon bei Rhodesain konnte auch bei den Cathepsinen B und L durch die beiden neu eingeführten Substituenten in P_1 -Position keine Affinitätssteigerung erreicht werden. Diese verminderte Aktivität steht jedoch nicht im Widerspruch zu den zuvor durchgeführten Dockinguntersuchungen, da hier nur Rhodesain als Zielenzym betrachtet wurde. Trotz der hohen Homologie zwischen Rhodesain und Cathepsin L existieren kleinere Unterschiede in der Sequenz und räumlichen Struktur zwischen den Enzymen, welche für das unterschiedliche Verhalten der Inhibitoren verantwortlich gemacht werden können.

Weiterhin ist eine verminderte Affinität zu Cathepsinen B und L besonders im Hinblick auf die Entwicklung von Rhodesaininhibitoren zur Behandlung der Schlafkrankheit als positiv zu bewerten, da hier eine Selektivität gegenüber dem parasitären Enzym wünschenswert ist. Während beispielsweise Verbindung **12** eine höhere Affinität zu Cathepsin L als zu Rhodesain aufweist, findet sich bei der analogen Verbindung mit 4-Pyridylrest (**16**) das umgekehrte Bild. Noch deutlicher ist dieses Muster in Bezug auf Cathepsin B ausgeprägt, sodass Verbindung **16** mit nahezu 100-fach höherer Affinität an Rhodesain bindet. Dieser Trend findet sich auch bei den restlichen Verbindungen mit 4-Pyridylrest in P_3 -Position, sodass allgemein formuliert werden kann, dass die Einführung dieses Restes die Selektivität der Inhibitoren zu Rhodesain gegenüber Cathepsin B und L erhöht.

Überraschenderweise zeigten die zu **CG12** analogen Verbindungen mit Brom- (**21**) und Fluor-Substituent (**22**) keine nennenswerte Hemmung der getesteten Enzyme. Zwar verursacht die Einführung eines Halogensubstituenten auch bei den zuvor synthetisierten Verbindungen eine Verminderung der Affinität zu den Zielenzymen, jedoch geht dies nicht mit einem vollständigen Wirkverlust einher. Vermutlich bewirkt hier die nicht-peptidische Seitenkette eine stark veränderte Positionierung des Liganden in der Bindetasche, bei der Halogensubstituenten in α -Position des Vinylsulfons nicht toleriert werden. Weiterhin wurden für Verbindung **CG12** keine genaueren Untersuchungen zum Wirkmechanismus angestellt, weshalb hier auch ein alternativer Mechanismus denkbar wäre, bei dem die Halogensubstituenten einen negativen Einfluss haben.

Um einen möglichen Einfluss der Erkennungseinheit auf die **Reversibilität** der Inhibitionsreaktion zu untersuchen wurden die verschiedenen Verbindungen mit Fluorsubstituent und unterschiedlich beschaffener Erkennungseinheit in einem Dialyseexperiment betrachtet. So konnte sowohl bei Verbindungen mit alternativem P₃-Substituenten (**16**) als auch bei den Verbindungen mit alternativen P₁-Substituenten eine Wiederherstellung der enzymatischen Aktivität im Verlauf der Dialyse beobachtet werden. Auch bei einer Kombination von alternativen Substituenten in P₁- und P₃-Position (Verbindung **19**) war dieses Verhalten zu beobachten. Im Gegensatz zu den Affinitäten der verschiedenen Verbindungen wird die Eigenschaft der Reversibilität also den Erwartungen entsprechend hauptsächlich von der Konstitution des *warheads* beeinflusst, während die Erkennungseinheit einen geringen Einfluss auf diese Eigenschaft hat.

Bei der Bestimmung der **antitrypanosomalen Aktivität** wurden für alle Verbindungen Werte im niedrigen mikromolaren Bereich erhalten. Dies stellt somit einen deutlichen Wirkverlust der Verbindungen verglichen mit **K11777** (EC₅₀ = 0,18 µM) dar. Allerdings weisen die Verbindungen **16** und **17** mit P₃ = 4-Pyridyl eine deutlich verbesserte antitrypanosomale Aktivität auf, als die analogen Verbindungen mit Methylpiperazin in P₃-Position (**12**, **13**). Dennoch ist aus diesen Daten keine klare Korrelation zwischen der Inhibition von Rhodesain und der antitrypanosomalen Aktivität ersichtlich. Dies fällt insbesondere bei Verbindung **15** auf. Dieses irreversible 4-Pyridylanalogon von K11777 weist zwar den niedrigeren K_i-Wert an Rhodesain auf, die antiparasitäre Aktivität ist jedoch deutlich vermindert. Dies unterstützt erneut die Vermutung, dass die antitrypanosomale Aktivität von K11777 nicht alleine auf eine Inhibition von Rhodesain zurückzuführen ist. Bei den Verbindungen **21** und **22** zeigen sich antitrypanosomale Aktivitäten, die mit EC₅₀-Werten von ca. 3 µM im Bereich des korrespondierenden irreversiblen Inhibitors **CG12** liegen. Da für diese Verbindungen keine nennenswerte Hemmung von Rhodesain zu beobachten war, resultiert deren antitrypanosomale Aktivität jedoch nicht aus einer Hemmung dieses Enzyms und bedarf einer genaueren Aufklärung.

Bezüglich der **Zytotoxizität** der neuen Verbindungen erbrachte die Einführung des 4-Pyridylsubstituenten eine signifikante Reduktion der Zytotoxizität. So war bei den reversiblen Inhibitoren **16** und **17** mit diesem Strukturelement kein zytotoxisches Potenzial gegenüber J774.1 Makrophagen im verwendeten Konzentrationsbereich bis 100 µM messbar. Das gleiche Bild zeigt sich auch beim MTT-assay mit *HeLa*-Zellen. Auch hier war bei den höchsten Inhibitorkonzentrationen von 500 µM nur ein geringer toxischer Effekt messbar. Hingegen zeigt die korrespondierende irreversible Verbindung **15** an beiden Zelllinien eine deutliche Toxizität (EC₅₀(J774.1) = 8,6 µM; EC₅₀(*HeLa*) = 11 µM). Die toxischen Eigenschaften von **15** scheinen also eine direkte Folge der Irreversibilität dieses Inhibitors zu sein, da die analogen reversiblen Verbindungen nur eine sehr geringe Toxizität aufweisen.

Bei Verbindung **18** mit Methionin als alternativem P₁-Substituenten ist eine geringfügige Reduktion der Zytotoxizität (EC₅₀(J774.1) = 43 µM; EC₅₀(*HeLa*) = 77 µM) verglichen mit der analogen Verbindung mit Homophenylalaninrest (**12**, (EC₅₀(J774.1) = 37 µM; EC₅₀(*HeLa*) = 10 µM)) zu beobachten. Hingegen wirkt sich ein Benzylcysteinrest an dieser Position negativ auf die Toxizität aus (EC₅₀(J774.1) = EC₅₀(*HeLa*) ≈ 8 µM)).

Bei der Untersuchung der **Selektivität** der synthetisierten Verbindungen gegenüber anderen Proteasen zeigte sich nur vereinzelt eine nennenswerte Inhibition der verschiedenen katalytischen Aktivitäten des Proteasoms. Insbesondere weist keine der getesteten Verbindungen eine Hemmung

der Trypsin-ähnlichen Aktivität auf. Auch bei der Chymotrypsin-ähnlichen Aktivität zeigen lediglich die Verbindungen **14** und **20** eine etwas höhere prozentuale Hemmung. Insgesamt werden die höchsten Hemmwerte bei der Caspase-ähnlichen Aktivität beobachtet, wobei auch hier bei Verbindung **14** mit einer Hemmung von 71% der höchste Wert zu beobachten ist. Auch hier liegt die prozentuale Hemmung durch die übrigen Verbindungen in einen Bereich $\leq 50\%$. Angesichts der submikromolaren K_i -Werte an Rhodesain und Cathepsin L lässt sich somit insgesamt eine deutlich ausgeprägte Selektivität der untersuchten Verbindungen gegenüber den Cathepsin L-ähnlichen Proteasen feststellen.

Zusammenfassung

Durch zwei unterschiedliche Dockingmethoden wurden vielversprechende Kandidaten mit alternativem Substituenten in P_3 -Position identifiziert, für die gemäß den verschiedenen Scoringfunktionen eine gesteigerte Affinität zu Rhodesain erwartet wurde. In der Tat konnte durch die Substitution des Methylpiperazinrestes der Verbindungen **12** und **13** durch einen 4-Pyridylrest (Verbindung **16** und **17**) eine fünf- bis sechsfache Affinitätssteigerung zu Rhodesain erreicht werden. Hingegen nimmt die Affinität zu den Cathepsinen B und L ab, was jedoch hinsichtlich einer Steigerung der Selektivität positiv bewertet werden kann. Auch die antitrypanosomale Aktivität konnte durch diese Modifikation leicht erhöht werden, wenngleich immer noch eine deutlich niedrigere Potenz verglichen mit dem irreversiblen Inhibitor K11777 beobachtet wird. Gleichzeitig weisen die Verbindungen mit 4-Pyridylrest jedoch eine deutlich geringere Toxizität gegenüber den beiden getesteten Zelllinien auf als K11777 oder die korrespondierenden Verbindungen. Interessanterweise scheint hier ein direkter Zusammenhang der Toxizität mit der Reversibilität der Verbindungen zu bestehen, da der analoge irreversible Inhibitor **15** ein ausgeprägtes zytotoxisches Potenzial aufweist. Weiterhin fällt bei dieser Verbindung eine deutlich verringerte antitrypanosomale Aktivität verglichen mit K11777 auf, obwohl eine höhere Affinität zu Rhodesain zu beobachten war. Dies deutet daraufhin, dass das antitrypanosomale Potenzial von K11777 nicht alleine aus der Hemmung von Rhodesain resultiert. Eine Variation der Substituenten in P_1 - und P_2/P_3 - Position brachte keine Vorteile hinsichtlich der Affinität zu den verschiedenen Enzymen oder der antitrypanosomalen Aktivität. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass die Zusammensetzung der Erkennungseinheit keinen nennenswerten Einfluss auf die Reversibilität der Inhibitoren hat und nur die Beschaffenheit des *warheads* für diese Eigenschaft ausschlaggebend ist. Weiterhin konnte durch ein *screening* der Proteasominhibition eine ausgeprägte Selektivität der untersuchten Vinylsulfone gegenüber den Cathepsin L-ähnlichen Cysteinproteasen gezeigt werden.

6. Untersuchungen zur Reversibilität verschiedener Strukturklassen

Außer den schon beschriebenen Vinylsulfonen, wurden im Rahmen dieser Arbeit auch zahlreiche andere Cysteinproteaseinhibitoren mit verschiedenen reaktiven Strukturelementen hinsichtlich der Reversibilität untersucht. Diese Verbindungen wurden im Arbeitskreis von Prof. Florenci V. González an der Universität Jaume I in Castelló, Spanien synthetisiert.^{142,143} Der Aufbau der untersuchten Verbindungen ähnelt dabei demjenigen der Vinylsulfone. Sie setzen sich aus einer peptidischen Erkennungseinheit und einer reaktiven Kopfgruppe zusammen. Als *warhead* wurden hier verschiedene Michael-Akzeptoren wie ungesättigte Ester oder Nitroalkene eingesetzt. Auch einige Verbindungen mit eher ungewöhnlichen Strukturelementen wie Acrylnitrile oder substituierte Epoxide wurden untersucht (Abbildung 6-1).

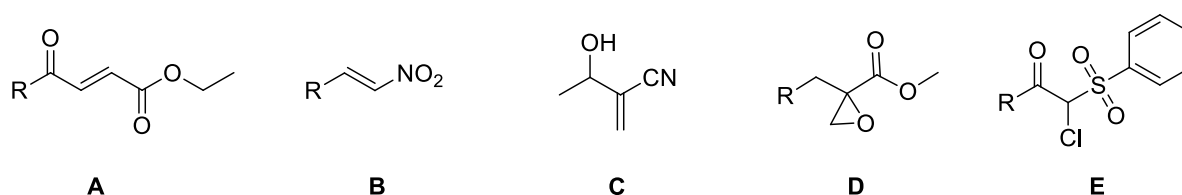


Abbildung 6-1 Verschiedene *warheads* der untersuchten Verbindungen. A: ungesättigter Ester, B: Nitroalkene, C: Acrylnitrile, D: Epoxide, E: substituiertes Halomethylketon

Vinylester

Diese Verbindungen mit Vinylester ähneln in ihrer Struktur den bekannten irreversiblen Cysteinproteaseinhibitoren mit α,β -ungesättigter Carbonylstruktur wie z.B. den Fumarsäurederivaten⁷⁰ (vgl. Abbildung 1-13, Abbildung 1-14). Anstelle eines Amids oder Alkyrestes ist hier jedoch mit der Ketongruppierung in γ -Position eine weitere elektronenziehende Gruppe vorhanden. Dementsprechend verändern sich auch die elektronischen Verhältnisse im *warhead*, was einen Einfluss auf die Reversibilität der kovalenten Inhibitionsreaktion haben kann. Die untersuchten Verbindungen sind in Abbildung 6-2 dargestellt.

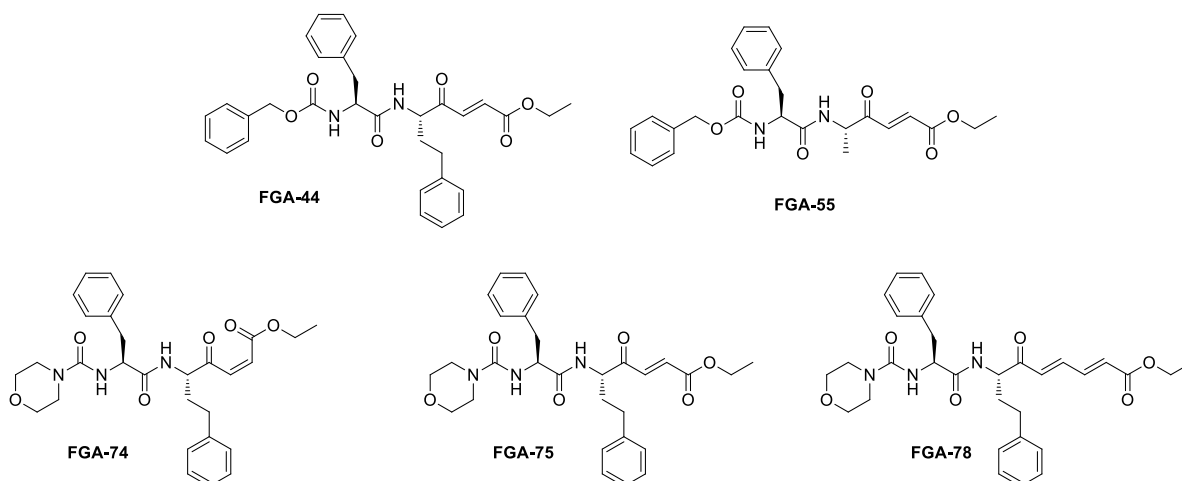
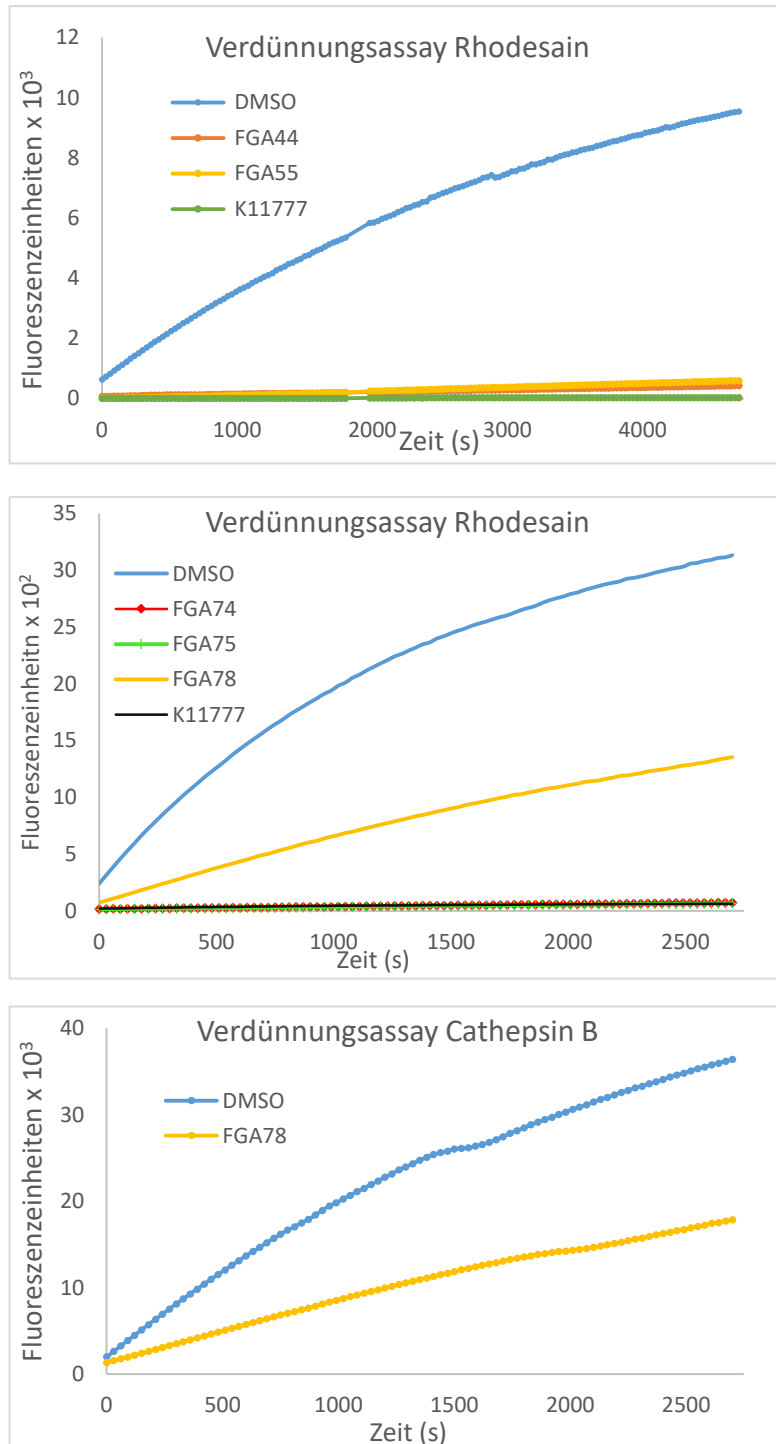


Abbildung 6-2 Strukturformeln der untersuchten Verbindungen mit ungesättigtem Ester.

Im Vergleich zu den übrigen Verbindungen unterscheidet sich **FGA-78** durch eine zusätzliche Doppelbindung, es handelt sich also um einen zweifach ungesättigten Ester. Zur Untersuchung der Reversibilität der Verbindungen wurden Verdünnungsassays mit den Enzymen Rhodesein und Cathepsin B durchgeführt (Abbildung 6-3). Die Durchführung erfolgte dabei, wie zuvor für die Vinylsulfone beschrieben (vgl. S. 37).



Die Verdünnungsassays zeigen für die Verbindungen **FGA-44**, **-55**, **-74** und **-75** keine nennenswerte Wiederherstellung der enzymatischen Aktivität. Bei den Verbindungen **FGA-44** und **-55** ist lediglich ein minimaler Anstieg der Enzymaktivität zu beobachten, die im beobachteten Zeitraum lediglich einen Wert von ca. 5% der DMSO-Kontrollprobe erreicht (Abbildung 6-3, oben). Wurden die Verbindungen höher konzentriert eingesetzt, war auch dieser minimale Anstieg nicht zu beobachten (Daten nicht gezeigt). Bei den Verbindungen **FGA-74** und **-75** ist ebenfalls keinerlei Wiederherstellung der Enzymaktivität zu beobachten. Diese liegt für die beiden Verbindungen im Bereich des irreversiblen Inhibitors (Abbildung 6-3, Mitte). Bei diesen Verbindungen mit Vinylester-Struktur sollte es sich also um irreversible Inhibitoren handeln. Hingegen ist bei der Verbindung **FGA-78**, die als Strukturelement einen zweifach ungesättigten Ester aufweist, eine deutliche Wiederherstellung der Enzymaktivität von Rhodesein zu beobachten (Abbildung 6-3, Mitte). Diese steigt im Verlauf des Experiments bis auf einen Wert von ca. 43% der Kontrollprobe an. Dieser Befund konnte mit Cathepsin B bestätigt werden. Auch hier steigt die Aktivität des Enzyms nach der Verdünnung bis auf einen Wert von ca. 49% an (Abbildung 6-3, unten). Die Inhibition durch diesen Inhibitor verläuft also langsam reversibel.

Abbildung 6-3 Verdünnungsassays der Verbindungen mit ungesättigtem Ester mit Rhodesein und Cathepsin B. Die Verbindungen wurden in einer Konzentration 10 x IC₅₀ (Rhodesein) bzw. 5 x IC₅₀ (Cath. B) mit den Enzymen inkubiert und 100-fach bzw. 50-fach (Cath.B) verdünnt.

Das reversible Verhalten von **FGA-78** kann also direkt auf die zusätzliche Doppelbindung zurückgeführt werden, was in einem abweichenden Inhibitionsmechanismus resultiert. Eine mögliche Erklärung liefert das ausgeprägte konjugierte System dieser Verbindung. Nach dem nucleophilen Angriff des Thiolats des Enzyms ist die resultierende negative Ladung stark delokalisiert. Die vergleichsweise hohe Stabilität (und damit Lebensdauer) des mesomeriestabilisierten Carbanions macht so eine Rückreaktion wahrscheinlicher. Weiterhin resultiert die Stabilisierung des Carbanions in einer vergleichsweise geringen Basizität dieses Intermediats, wodurch eine Protonierung zum irreversiblen Produkt erschwert wird.

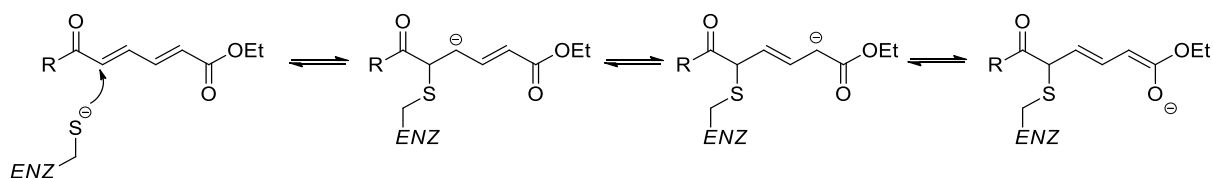


Abbildung 6-4 Konjugiertes System von FGA-78 und Delokalisation der negativen Ladung nach Addition des Thiolats.

Weiterhin ist auch ein nucleophiler Angriff an einer anderen Stelle des konjugierten Systems oder eine Mischung verschiedener Mechanismen denkbar. Hier könnten weitergehende Untersuchungen z.B. durch QM/MM-Berechnungen Hinweise auf den tatsächlichen Mechanismus liefern.

Nitroalkene

Als zweite Verbindungsklasse wurden Nitroalkene untersucht. Auch diese Verbindungen weisen einen ähnlichen Aufbau wie die bekannten Vinylsulfone auf: eine peptidische Erkennungseinheit und ein elektrophiler *warhead*. Dieser besteht in diesem Fall aus der Nitroalkengruppierung die analog zu den Vinylsulfonen als Michael-Akzeptor fungiert.

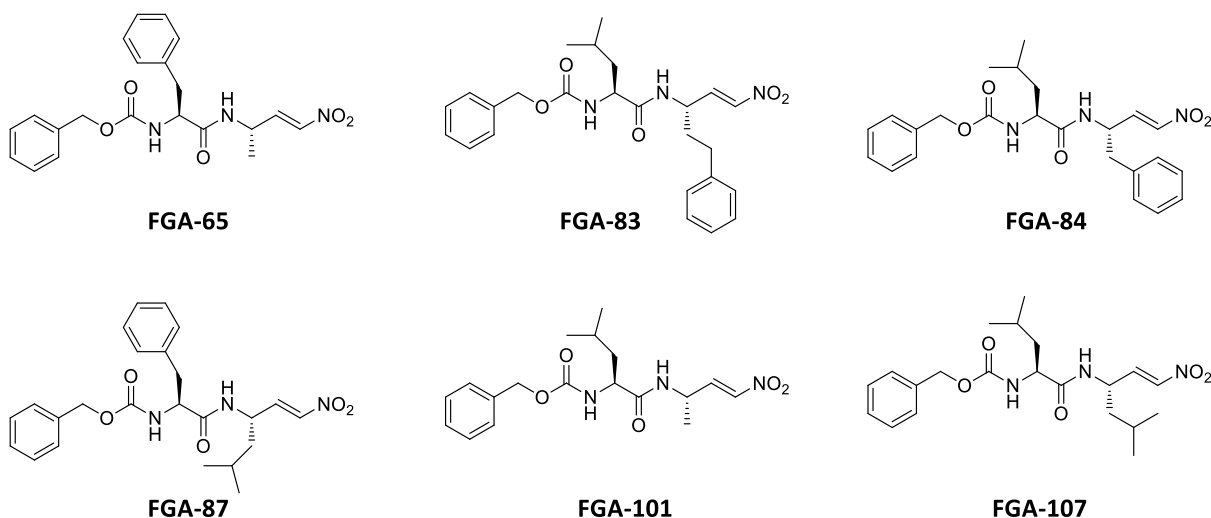


Abbildung 6-5 Strukturformeln der untersuchten Verbindungen mit Nitroalkenstruktur.

Im Gegensatz zu den Vinylestern zeigen die Verdünnungsassays der Nitroalkene eine deutlich ausgeprägte Reversibilität an den verschiedenen getesteten Enzymen. Insbesondere bei **FGA-83** ist nach der Verdünnung eine sehr schnelle Wiederherstellung der Enzymaktivität von Cathepsin L zu beobachten. So wird schon nach kurzer Zeit eine Aktivität vergleichbar mit der DMSO-Kontrollprobe erreicht. Auch die restlichen Verbindungen zeigen ein reversibles Verhalten, wenngleich dieses hier weniger stark ausgeprägt ist. Bei diesen Verbindungen erreicht die Enzymaktivität Werte von 65% (**FGA-65**), 35% (**FGA-107**) und 25% (**FGA-87**) der Kontrollprobe (Abbildung 6-6). Ein ähnliches Bild zeigt sich bei Cathepsin B, wo sich eine Wiederherstellung der Enzymaktivität in Höhe von 46% (**FGA-107**) und 32% (**FGA-101**) beobachten lässt (Abbildung 6-7).

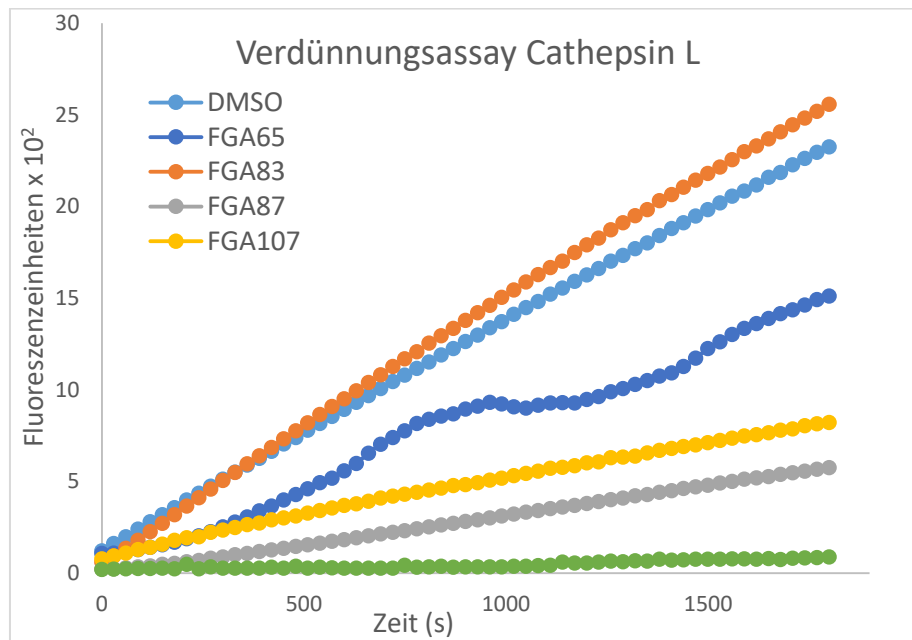


Abbildung 6-6 Verdünnungsassay einiger Nitroalkene mit Cathepsin L. Die Verbindungen wurden in einer Konzentration von $5 \times IC_{50}$ mit dem Enzym inkubiert und 50-fach verdünnt.

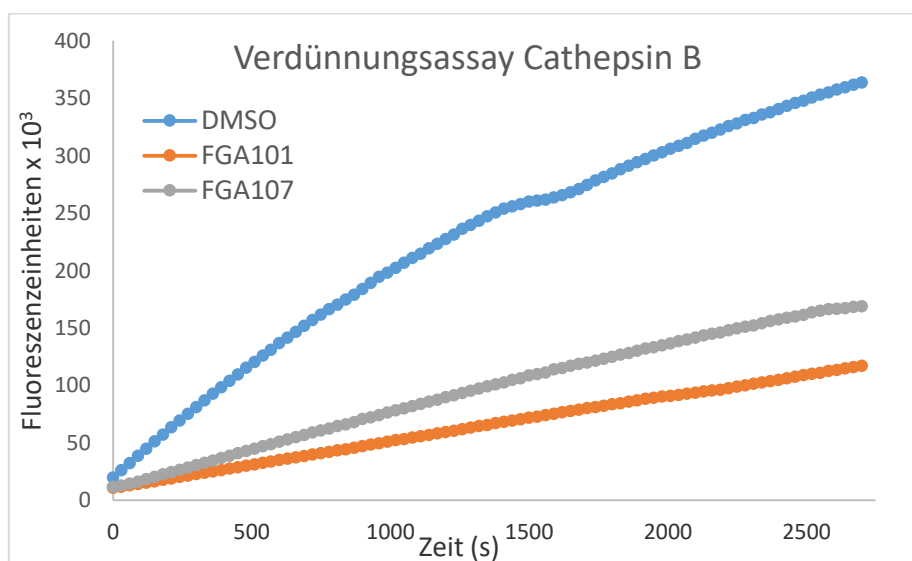


Abbildung 6-7 Verdünnungsassay einiger Nitroalkene mit Cathepsin B. Die Verbindungen wurden in einer Konzentration von $5 \times IC_{50}$ mit dem Enzym inkubiert und 50-fach verdünnt.

Weiterhin konnte eine reversible Inhibition von Rhodesain durch die Verbindungen **FGA-84**, **-87** und **-107** durch ein Dialyseexperiment nachgewiesen werden (Abbildung 6-8). Die Durchführung erfolgte dabei wie für die Vinylsulfone beschrieben (vgl. S. 38, S. 75).

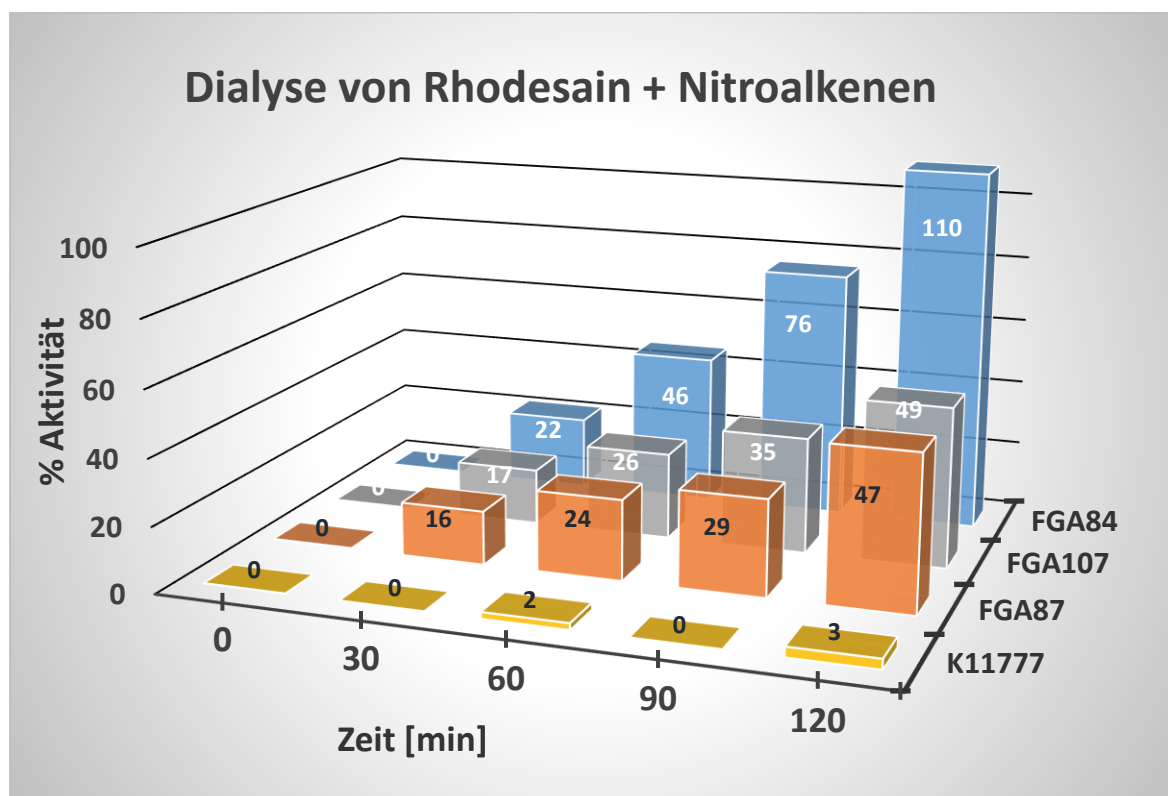


Abbildung 6-8 Dialyse von Rhodesain welches mit den Nitroalkenen FGA-84, FGA-87 und FGA-107 sowie K11777 inkubiert wurde. Die Inhibitoren wurden in einer Konzentration von 1 μM eingesetzt, was einem Vielfachen der jeweiligen IC_{50} / K_i -Werte entspricht, die allesamt im niedrigen nanomolaren Bereich liegen.

Auch hierbei zeigt sich für die Verbindungen ein etwas unterschiedliches Bild. Bei Verbindung **FGA-84** wird nach 120 Minuten die volle enzymatische Aktivität verglichen mit der Kontrollprobe erreicht. Hingegen steigt dieser Wert bei **FGA-87** und **FGA-107** nur auf ca. 50%. Bei allen Verbindungen handelt es sich also um reversible Inhibitoren von Rhodesain, wobei das Ausmaß der Reversibilität, bzw. die Geschwindigkeit der Rückreaktion unterschiedlich ausgeprägt ist.

Zusammenfassend zeigen also alle getesteten Nitroalkene ein reversibles Inhibitionsverhalten in den verschiedenen Experimenten. Die Ursache dieser Reversibilität kann auf die elektronenziehende Nitrogruppe als Substituent an der Doppelbindung zurückgeführt werden. So entsteht auch hier nach dem nucleophilen Angriff des Thiolats ein mesomeriestabilisiertes Carbanion von vergleichsweise hoher Stabilität und damit geringer Basizität, wodurch eine Rückreaktion ermöglicht wird und die Protonierung zum irreversiblen Produkt erschwert wird.

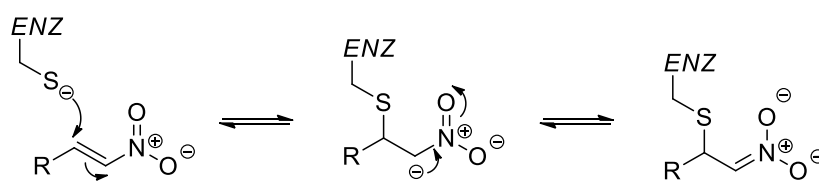


Abbildung 6-9 Stabilisiertes Carbanion nach nucleophilem Angriff eines Thiolats.

Diese Überlegungen werden durch QM/MM-Berechnungen unterstützt, die für die Reaktion eines Nitroalkens mit dem Cystein im aktiven Zentrum von Rhodesain, eine Reaktionsenergie von -12 kcal/mol vorhersagen.¹⁴³ Diese liegt im Bereich der reversiblen substituierten Vinylsulfone (vgl. Abbildung 4-4), und deutlich unter der Reaktionsenergie von K11777 (ca. -23 kcal/mol). Somit konnten auch hier durch QM/MM-Berechnungen verlässliche Aussagen über die Reversibilität der Inhibitionsreaktion getroffen werden.

Epoxide

Schon vor einiger Zeit wurden Epoxide wie E-64 (vgl. S. 13) als irreversible Cysteinproteaseinhibitoren beschrieben. Von diesen bekannten Inhibitoren unterscheiden sich die im Folgenden untersuchten Verbindungen durch das Substitutionsmuster am Epoxidring. Während E-64 und davon abgeleitete Inhibitoren eine *trans*-(2*S*,3*S*)-Konfiguration am Epoxidring aufweisen, tragen die folgenden Verbindungen beide Substituenten in Position 2 des Epoxids (Abbildung 6-10)

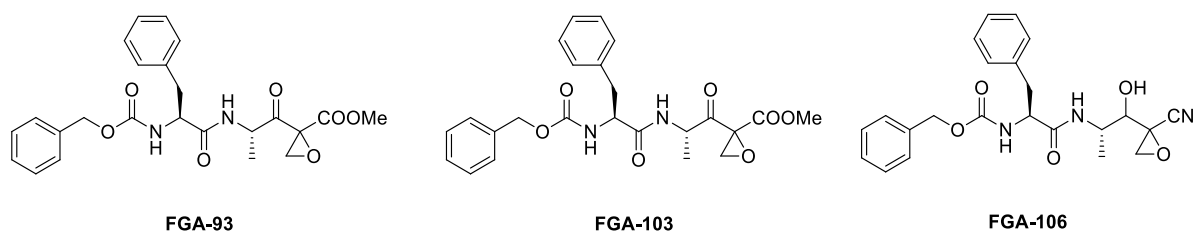


Abbildung 6-10 Verbindungen mit Epoxidstruktur.

Dabei weisen alle Verbindungen die gleiche peptidische Erkennungseinheit auf **FGA-93** und **FGA-103** tragen als zweiten Substituenten eine Methylcarboxylatgruppierung, bei **FGA-106** ist an dieser Stelle ein Nitril zu finden. Außerdem wurde bei dieser Verbindung die benachbarte Ketongruppe durch eine Hydroxyfunktion ersetzt.

Im Verdünnungsassay mit Cathepsin L erwiesen sich alle drei Verbindungen als voll reversibel. Die Enzymaktivität erreicht bei allen Verbindungen nach der Verdünnung Werte im Bereich der DMSO-Kontrollprobe.

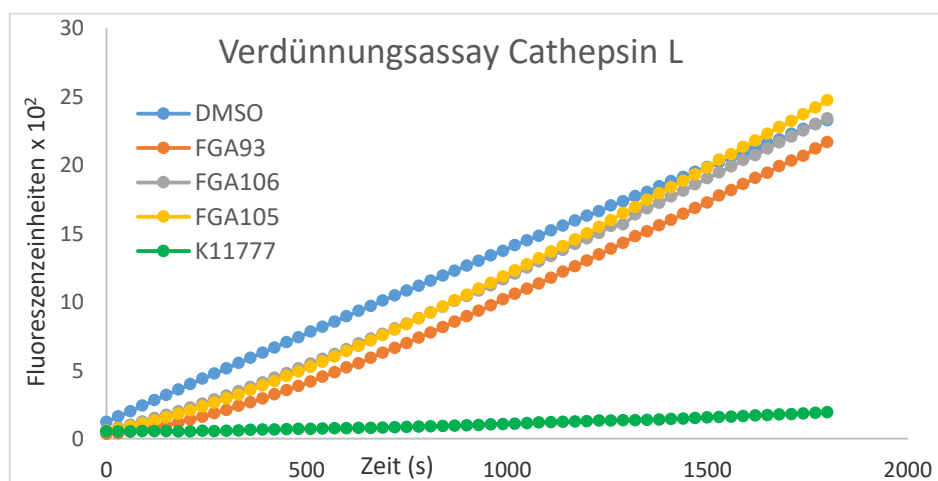


Abbildung 6-11 Verdünnungsassay der Epoxide mit Cathepsin L. [I] = 5 x IC₅₀. Verdünnung: 50-fach.

Zwar weisen die Verbindungen **FGA-93** und **FGA-103** ein reversibles Verhalten auf, ob es sich jedoch um kovalente Inhibitoren handelt, ist angesichts des ungewöhnlichen Substitutionsmusters des Epoxids fraglich. Auch die vergleichsweise niedrigen Affinitäten dieser Verbindungen ($IC_{50}(\text{Cath.L}) = 2 \mu\text{M}$ (**FGA-93**) bzw. $5 \mu\text{M}$ (**FGA-103**)) deuten eher auf ein nicht-kovalentes Verhalten hin, was jedoch genauer untersucht werden müsste. Hingegen weist **FGA-106** mit einem IC_{50} -Wert von 70 nM an Cathepsin L eine vielfach höhere Affinität auf. Hierfür könnte der Nitrilsubstituent verantwortlich sein. Diese funktionelle Gruppe wurde in zahlreichen kovalent-reversiblen Cysteinproteaseinhibitoren eingesetzt (vgl. S.17) und würde auch hier die vergleichsweise hohe Affinität bei gleichzeitiger Reversibilität erklären.

Acrylnitrile

Bei diesen Verbindungen bestehen prinzipiell zwei Möglichkeiten des nucleophilen Angriffs durch das Thiolat einer Cysteinprotease. So wäre zum einen eine Reaktion mit dem Nitril zum Thioimidat möglich, zum anderen eine Michael-artige Addition an der Doppelbindung (Abbildung 6-12).

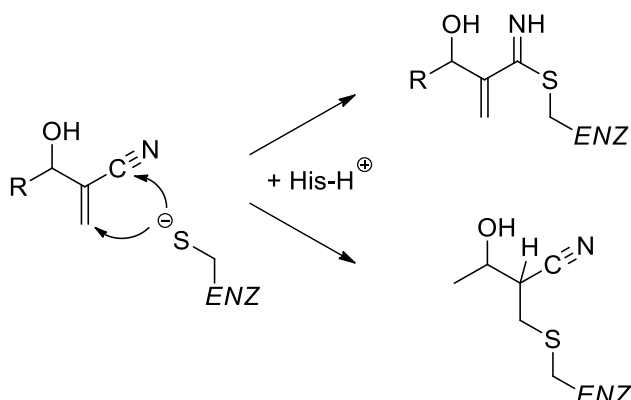


Abbildung 6-12 Mögliche Mechanismen der Inhibition durch Acrylnitrile.

Auch diese Verbindungen zeigen den gleichen prinzipiellen Aufbau aus *warhead* und peptidischer Erkennungseinheit (Abbildung 6-13).

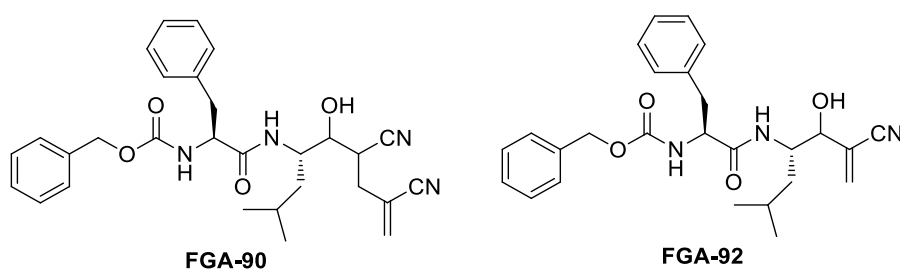


Abbildung 6-13 Untersuchte Acrylnitrile.

Diese Strukturklasse zeigte in den durchgeführten Verdünnungsassays ebenfalls ein voll reversibles Verhalten, sodass die Enzymaktivität nach der Verdünnung jeweils Werte im Bereich der Kontrollprobe annimmt (Abbildung 6-14). Allerdings weist Verbindung **FGA-90** nur eine vergleichsweise geringe Affinität zu den verschiedenen Enzymen auf ($IC_{50}(\text{Cath. L}) = 17 \mu\text{M}$) weshalb hier ein kovalenter Mechanismus auch aufgrund des ungewöhnlichen und sterisch anspruchsvollen *warheads* fraglich ist. Hingegen zeigt **FGA-92** mit einem IC_{50} von $0,4 \mu\text{M}$ an Rhodesain eine deutlich bessere Affinität. Die reversible Inhibition von Rhodesain legt eine Reaktion mit dem Nitril nahe, da eine solche reversible Reaktion für zahlreiche andere Nitrile beobachtet wurde (vgl. S. 17). Auch eine Michael-Addition an der Doppelbindung wäre denkbar, die aufgrund der elektronenziehenden Nitrilgruppe reversibel verlaufen könnte. Auch hier könnten weitere Untersuchungen durch QM/MM-Berechnungen Hinweise auf den tatsächlichen Reaktionsverlauf liefern.

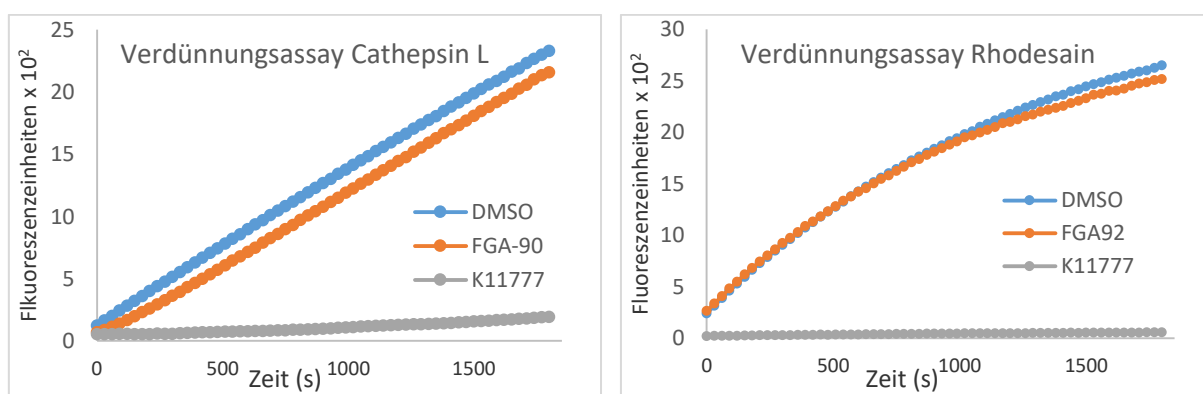


Abbildung 6-14 Verdünnungsassay der Acrylnitrile mit Cathepsin L (links) und Rhodesain (rechts) $[I] = 5 \times IC_{50}$. Verdünnung: 50-fach.

Halomethylketone

Zuletzt wurde mit **FGA-98** (Abbildung 6-15) eine Verbindung, die von den Halomethylketonen abgeleitet wurde, untersucht (vgl. S. 11). Diese trägt mit dem Phenylsulfon-Rest an der Methylengruppe einen zusätzlichen elektronenziehenden Substituenten. Ähnlich wie bei den Vinylsulfonen könnte dies einen entsprechenden Einfluss auf die Reversibilität der Inhibition haben.

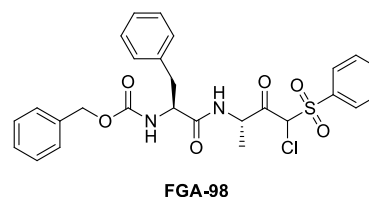


Abbildung 6-15 Strukturformel von FGA-98.

In der Tat wird für diese Verbindung eine reversible Inhibition von Rhodesain und Cathepsin B beobachtet (Abbildung 6-16).

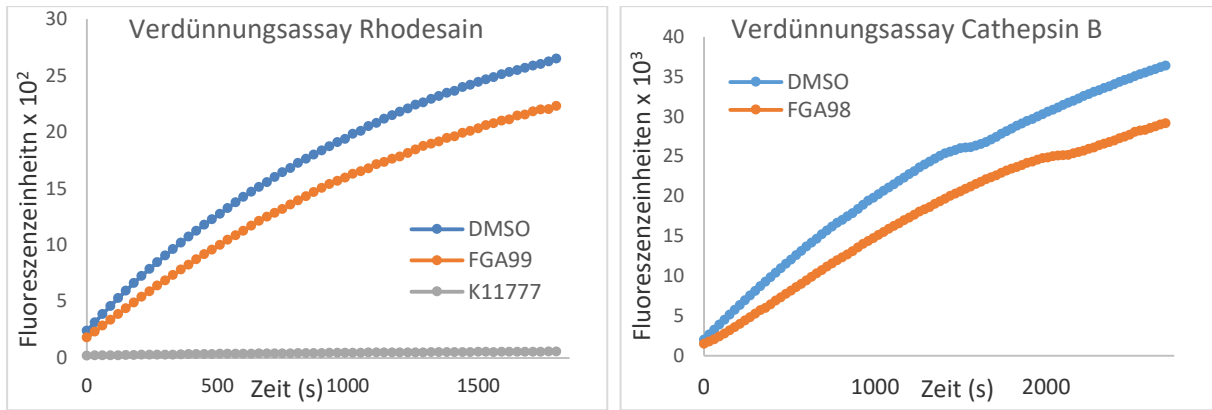


Abbildung 6-16 Verdünnungsassay von FGA-98 mit Rhodesain (links) und Cathepsin B (rechts) $[I] = 5 \times IC_{50}$. Verdünnung: 50-fach.

Während die irreversible Inhibition durch unsubstituierte Halomethylketonen mit der Eliminierung des Halogenatoms einhergeht (vgl. Abbildung 1-8, S. 12), muss für die untersuchte Verbindung ein anderer Mechanismus vorliegen, da die Eliminierung des Chloratoms eine irreversible Reaktion darstellt. Möglicherweise findet hier keine Reaktion zum Sulfoniumion unter Eliminierung des Chlorids statt. Stattdessen könnte die Reaktion auf der Stufe des reversiblen tetraedrischen Komplexes, bzw. nach Protonierung des Sauerstoffs, auf der Stufe des reversiblen Hemithioacetals enden (Abbildung 6-17). Auch ein nicht-kovalenter Mechanismus wäre denkbar, da eine kovalente Bindung für diese Verbindung noch nicht nachgewiesen wurde.

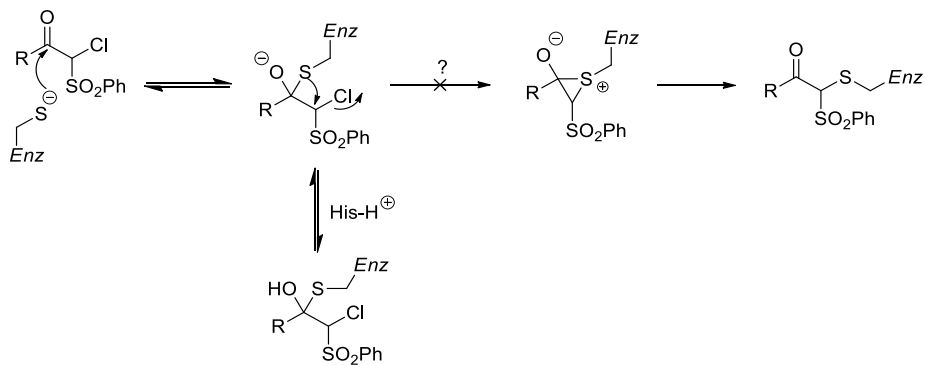


Abbildung 6-17 Möglicher Mechanismus der Inhibition durch FGA-98.

7. Zusammenfassung

Auch wenn in den letzten Jahren einige Vorurteile gegenüber Wirkstoffkandidaten mit einem kovalenten irreversiblen Wirkmechanismus abgebaut wurden und zahlreiche erfolgreiche Arzneistoffe mit einem solchen Mechanismus zugelassen wurden, existieren nach wie vor noch Bedenken gegenüber solchen Substanzen. So wird mit den Verbindungen ein toxisches und immunogenes Potenzial in Verbindung gebracht, welche aus unspezifischen Reaktionen mit *off-target*-Molekülen resultieren könnten. Trotz zahlreicher positiver Eigenschaften von kovalenten Inhibitoren (u.a. gesteigerte Affinität und Wirkdauer, Vermeidung von Resistenzentwicklung, günstige Pharmakokinetik), wurden in der Vergangenheit kaum Anstrengungen unternommen, gezielt solche kovalenten Inhibitoren zu entwickeln. Ziel dieser Arbeit war daher die rationale Entwicklung von kovalent-reversiblen Inhibitoren. Diese sollten einige der positiven Eigenschaften von kovalenten Inhibitoren mit dem sicheren Wirkprofil von (nicht-kovalenten) reversiblen Inhibitoren vereinen. Als *target* dienten in dieser Arbeit Cysteinproteasen aus der Papain-Familie, wobei der Fokus auf der Cathepsin L-ähnlichen parasitären Cysteinprotease Rhodesain lag. Diese ist eine der Hauptproteasen von *Trypanosoma brucei rhodesiense*, dem Erreger der afrikanischen Schlafkrankheit. In verschiedenen Modellen konnte gezeigt werden, dass die Hemmung dieses Enzyms einen positiven Einfluss auf den Krankheitsverlauf haben kann.

Für die Entwicklung von kovalent-reversiblen Inhibitoren dieses Enzyms wurde der irreversible kovalente Inhibitor **K11777** aus der Substanzklasse der Vinylsulfone als Leitstruktur gewählt. Durch geeignete Modifikationen des elektrophilen *warheads* dieses Inhibitors sollte zunächst ein Substitutionsmuster aufgefunden werden, welches die Reaktionsenergie der kovalenten Reaktion mit dem Enzym herabsetzt und so zu einer reversiblen Reaktion führt. Um geeignete Veränderungen aufzufinden, wurden in Kooperation mit dem Arbeitskreis von Prof. Engels (Universität Würzburg) die Reaktionsenergien von verschiedenen substituierten Vinylsulfonen durch quantenmechanische Berechnungen ermittelt. Hierbei wurden zunächst die in Kapitel 3 beschriebenen *N,S*-Vinylsulfone mit einem Nitril-Substituenten in α -Position als vielversprechendste Verbindungen identifiziert (Abbildung 7-1). Bereits in Vorarbeiten konnte eine reversible Reaktion dieser Verbindungsklasse mit Modellnucleophilen nachgewiesen werden, jedoch zeigten diese Verbindungen keine nennenswerten Affinitäten zu den Zielenzymen. Daher wurde zunächst versucht durch die Einführung von verschiedenen Aminosäuren und Peptiden, die die verschiedenen Bindetaschen der Zielenzyme adressieren sollten, eine gesteigerte Affinität zu erreichen. Tatsächlich führte die Einführung von peptidischen Resten, deren Struktur sich an der Erkennungseinheit der Leitstruktur orientierte, zu einer geringfügigen Steigerung der inhibitorischen Aktivität. Nichtsdestotrotz lag diese mit IC_{50} -Werten im mittleren mikromolaren Bereich noch sehr deutlich unter den entsprechenden Werten der Leitstruktur. Durch eine Betrachtung der Substratabhängigkeit der Inhibition wurde in der Folge entdeckt, dass der geringen Hemmung der Enzyme ein nicht-kompetitiver Mechanismus zu Grunde liegt. Die Diskrepanz zwischen QM-Berechnungen und experimentellem Verhalten konnte durch die Berücksichtigung der enzymatischen Umgebung im Zuge von QM/MM-Berechnungen erklärt werden. Hierbei wurde eine stark endergone Reaktionsenergie für die entsprechende Reaktion berechnet, weshalb diese Reaktion in der Praxis nicht ablaufen sollte.

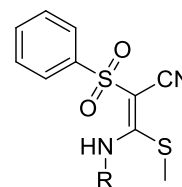


Abbildung 7-1
N,S-Vinylsulfone

Aufgrund dieser Erfahrungen wurden im nächsten Teil dieser Arbeit die Berechnungen zur Identifikation von geeigneten Substituenten stets unter Einbeziehung der enzymatischen Umgebung mit Hilfe von QM/MM-Berechnungen durchgeführt. Hierbei wurden die α -Halogen-Vinylsulfone als weitere vielversprechende Verbindungsklasse identifiziert. Die berechneten Reaktionsenergien lagen dabei deutlich unter derjenigen der irreversiblen Leitstruktur im Bereich einer reversiblen kovalenten Reaktion. In der Folge wurden diese Verbindungen synthetisiert, wobei die peptidische Erkennungseinheit identisch von der Leitstruktur übernommen wurde, während der *warhead* mit den verschiedenen Halogenen in α -Position ausgestattet wurde. Die Affinität dieser Derivate lag mit K_i -Werten im niedrigen mikromolaren bis nanomolaren Bereich eine bis zwei Größenordnungen über der Affinität der Leitstruktur. Hierbei nahm die Affinität in der Reihe $X = F > Cl > Br$ ab, was mit der zunehmende Größe der Substituenten korreliert und durch zunehmende sterische Hinderung erklärt werden kann. Im Gegensatz zu den *N,S*-Vinylsulfonen konnte für diese Verbindungen eine lineare Abhängigkeit der mit steigender Substratkonzentration steigenden IC_{50} -Werte gezeigt werden, wodurch die Kompetitivität dieser Inhibitoren belegt wurde. Für die Verbindungen **12** ($X=F$) und **13** ($X=Cl$) konnte weiterhin durch Verdünnungsassays und Dialyseexperimenten eine schnelle Reversibilität der Inhibitionsreaktion ermittelt werden. Hingegen zeigte Verbindung **14** ($X=Br$) nur ein langsam reversibles oder irreversibles Verhalten. Dies konnte im Zuge massenspektrometrischer Untersuchungen erklärt werden. Hierbei wurde entdeckt, dass in der enzymatischen Umgebung eine Eliminierung von HBr stattfindet, was schließlich in einer irreversiblen Hemmung des Enzyms resultiert. Die Plausibilität einer solchen Eliminierung konnte durch weitergehende QM/MM-Berechnungen bestätigt werden. Weiterhin konnte im Zuge der massenspektrometrischen Untersuchungen auch eine kovalente Bindung zwischen Verbindung **14** und Rhodesain nachgewiesen werden. Für Verbindung **12** konnte außerdem mittels ^{19}F -NMR-spektroskopischer Untersuchungen ein sehr stabiler Komplex mit Rhodesain nachgewiesen werden, was als Hinweis auf eine kovalente Bindung gedeutet werden kann. Die drei Verbindungen zeigten weiterhin antitrypanosomale Aktivitäten im niedrigen mikromolaren Bereich, was eine bis zwei Größenordnungen über dem Wert von K11777 liegt. Die Ermittlung der Zytotoxizität an J774.1-Makrophagen lieferte Werte im zweistelligen mikromolaren Bereich, was vergleichbar mit der Leitstruktur ist.

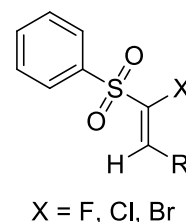


Abbildung 7-2
 α -Halogen-VS

In diesem Teil der Arbeit konnte also durch ein rationales Design mit Hilfe von QM/MM-Berechnungen Modifikationen der Leitstruktur identifiziert werden, die den gewünschten kovalent-reversiblen und kompetitiven Mechanismus zur Folge haben. Da mit diesen Modifikationen jedoch auch die Affinität zu den verschiedenen Enzymen abnimmt, wurden im nächsten Teil der Arbeit Modifikationen der peptidischen Erkennungseinheit vorgenommen, mit dem Ziel durch verbesserte nicht-kovalente Wechselwirkungen mit dem Enzym eine gesteigerte Affinität zu erreichen. Durch verschiedene Methoden des klassischen und kovalenten Dockings konnten verschiedene Kandidaten identifiziert werden, für die verbesserte Wechselwirkungen vorhergesagt wurden. So wurden zunächst Verbindungen synthetisiert, bei denen der *N*-Methylpiperazinrest in P_3 -Position der Leitstruktur durch einen 4-Pyridylrest ersetzt wurde. Weitere Modifikationen wurden in P_1 -Position vorgenommen, sodass hier der Homophenylalaninrest gegen Methionin oder *S*-Benzylcystein ausgetauscht wurde. Bei diesen Veränderungen erwies sich insbesondere der 4-Pyridylrest als vorteilhaft, sodass durch dessen Einführung eine Affinitätssteigerung um den Faktor fünf bis sechs erreicht werden konnte. Weiterhin zeigten die Verbindungen mit diesem Rest eine höhere Selektivität gegenüber Rhodesain im Vergleich zu den Cathepsinen B und L. Auch die Derivate mit

alternativer P₁-Aminosäure zeigten hohe Aktivitäten im mittleren nanomolaren Bereich, erbrachten jedoch keine Steigerung der Affinität im Vergleich zu den Derivaten mit Homophenylalaninrest. Die Einführung eines nicht-peptidischen Restes in P₂/P₃-Position, basierend auf einer zuvor im Arbeitskreis identifizierten irreversiblen Leitstruktur, führte in Kombination mit einem Halogen-Substituenten zu einem völligen Wirkverlust. Zur Untersuchung der Selektivität gegenüber anderen Proteasen wurde eine mögliche Hemmung der verschiedenen enzymatischen Aktivitäten des Proteasoms durch die verschiedenen Verbindungen untersucht, wobei keine nennenswerten Aktivitäten beobachtet wurden. In Bezug auf die antitrypanosomale Wirkung zeigten die Verbindungen mit 4-Pyridylrest die höchsten Aktivitäten. Im Vergleich zu den analogen Verbindungen mit *N*-Methylpiperazinrest konnte hier eine Steigerung um den Faktor drei bis vier erreicht werden. Gleichzeitig zeigte sich bei den reversiblen (Halogen-substituierten) Derivaten mit 4-Pyridylrest keinerlei Zytotoxizität an verschiedenen Zelllinien, während diese bei dem irreversiblen Analogon deutlich ausgeprägt war. Somit scheint hier ein direkter Zusammenhang zwischen Toxizität und Irreversibilität zu bestehen. Abbildung 7-3 gibt einen Überblick über die Auswirkungen der wichtigsten Modifikationen die im Zuge dieser Arbeit an der Leitstruktur vorgenommen wurden.

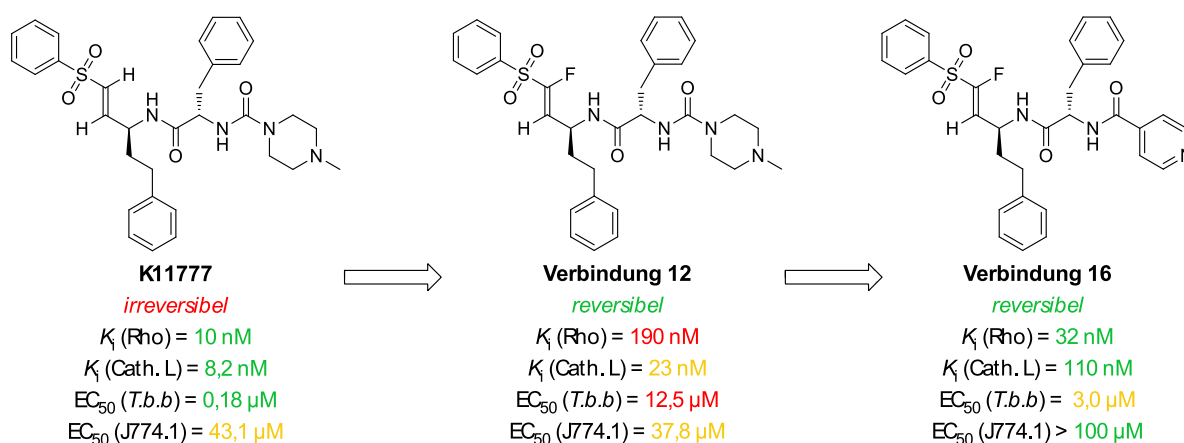


Abbildung 7-3 Auswirkung der verschiedenen Modifikationen im Zuge der Entwicklung von kovalent-reversiblen Inhibitoren.

Im letzten Teil dieser Arbeit (Kapitel 6) wurden zahlreiche Verbindungen aus unterschiedlichen Strukturklassen bezüglich einer reversiblen Hemmung der verschiedenen Cysteinproteasen untersucht. Hierbei wurde für Verbindungen aus der Klasse der Vinylester ein irreversibles Verhalten nachgewiesen, während Nitroalkene, Epoxide, Acrylnitrile und substituierte Halomethylketone als reversible Inhibitoren identifiziert wurden. Diese Strukturklassen sind weitere Beispiele für die Möglichkeit, durch gezielte Modifikation von bekannten irreversiblen Inhibitoren, eine reversible Hemmung zu erreichen.

8. Experimenteller Teil

8.1 Messgeräte und Materialien

Schmelzpunkte

Die Schmelzpunkte der Verbindungen wurden in offener Kapillare an dem Schmelzpunktmessgerät *SMP10* der Firma *Stuart* durchgeführt. Die erhaltenen Werte sind in °C angegeben und unkorrigiert.

Infrarotspektroskopie (IR)

Die Infrarotspektren wurden an einem *Nicolet Avatar 330 Fourier-Transformations-Infrarotspektrometer* der Firma *Thermo electron corporation* aufgenommen. Die Messung erfolgte mittels ATR-Technik (*attenuated total reflection*) an einem Diamantkristall. Die Angabe der Werte erfolgt in Wellenzahlen $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹].

Magnetische Kernresonanzspektroskopie (¹H- und ¹³C-NMR)

Die NMR-Spektren wurden an einem *Fourier300*-Magnetresonanzspektrometer der Firma *Bruker Biospin GmbH* bei einer Frequenz von 300 MHz (¹H) bzw. 75 MHz (¹³C) und einer magnetischen Feldstärke von 7,05 Tesla aufgenommen. Die chemische Verschiebung δ ist in *parts per million* (ppm) angegeben, die Kopplungskonstanten *J* in Hertz (Hz). Als interner Standard dienen die Signale der Restprotonen der verwendeten deuterierten Lösungsmittel¹⁴⁴:

- Chloroform-*d* (CDCl₃): $\delta = 7,26$ ppm (¹H) / 77,16 ppm (¹³C)
- Dimethylsulfoxid-*d*6 (DMSO-*d*6): $\delta = 2,50$ ppm (¹H-NMR) / 39,52 ppm (¹³C)
- Methanol-*d*4 (CD₃OD): $\delta = 3,31$ ppm (¹H) / 49,00 ppm (¹³C)
- Dichlormethan-*d*2 (CD₂Cl₂): $\delta = 5,32$ ppm (¹H) / 54,00 ppm (¹³C)

Die Multiplizität der Signale ist in den folgenden Abkürzungen angegeben: s = Singulett, d = Dublett, t = Triplett, q = Quartett, p = Pentett, dd = Dublett vom Dublett, dt = Dublett vom Triplett, dq = Dublett vom Quartett, td = Triplett vom Dublett, m = Multipllett. Zusätzlich sind breite Signale durch die Abkürzung br = *broad* gekennzeichnet.

Die Zuordnung der NMR-Signale erfolgte, falls erforderlich, über DEPT45-, DEPT90-, DEPT135-Spektren und 2D-Korrelationspektren (COSY-, HMQC- und HMBC-Spektren).

Polarimetrie

Spezifische Drehwerte $[\alpha]_{D20}^{\circ C}$ wurden an dem Polarimeter des Typs P3000 der Firma *A. Krüss Optronic* bestimmt (Natrium-D-Linie: $\lambda = 589$ nm). Die Konzentration wird in g/100 mL Lösemittel angegeben. Die jeweilige Messtemperatur wird mit angegeben.

Massenspektrometrie

Elektronenspray-Ionisations- (ESI-) Spektren wurden an einem *Micromass LCT* Spektrometer der Firma *Waters*, *Field Desorption*- (FD-) Spektren an einem *MAT 95* Massenspektrometer der Firma *Finnigan* am Institut für Organische Chemie, Universität Mainz aufgenommen. Hochaufgelöste ESI-Massenspektren wurden dort an einem *Q-TOF-Ultima 3* Massenspektrometer der Firma *Waters* aufgenommen.

Dünnschichtchromatographie (DC)

Es wurden DC-Fertigfolien vom Typ *ALUGRAM® XtraSIL G/UV₂₅₄* der Firma *Macherey-Nagel* verwendet. Diese enthalten Kieselgel 60 in einer Schichtdicke von 0,02 und einen Fluoreszenzindikator auf einer Aluminiumträgerfolie. Zur Detektion diente die Fluoreszenzlöschung bei 254 nm oder ggf. eine Eigenfluoreszenz bei 366 nm. Eine Detektion durch Anfärben erfolgte durch Besprühen mit Lösungen gebräuchlicher Färbereagenzien wie Ninhydrin (Amine, Aminosäuren, Peptide), Kaliumpermanganat (unspezifisch), Anisaldehyd/Schwefelsäure (Aldehyde, Alkohole, Amine) oder Vanillin (Amine, Aminosäuren). Die Zusammensetzung des Fließmittels ist in Volumenanteilen angegeben. Die R_F -Werte berechnen sich aus dem Quotienten der Laufstrecke der Substanzen und der Laufstrecke der Fließmittelfront.

Säulenchromatographie (SC)

Zur Auftrennung von Substanzgemischen mittels Säulenchromatographie wurde als stationäre Phase

- Kieselgel 60 der Firma *Merck* mit einem Korndurchmesser von 0,063 – 0,2 mm oder
- Kieselgel 60 M mit einem Korndurchmesser von 0.040 - 0.063 mm der Firma *Macherey-Nagel*

verwendet. Gegebenenfalls wurde bei letzterem Kieselgel ein leichter Überdruck von 200 – 300 mbar angelegt. Säulengröße und –durchmesser wurden abhängig von Trennverhalten und Menge des Substanzgemisches gewählt. Die Säulen wurden nass mit einer Suspension des Kieselgels in dem verwendeten Fließmittel befüllt. Die Zusammensetzung des Fließmittels ist in Volumenanteilen angegeben.

Reinheit

Die Reinheit der Endverbindungen wurde durch hochaufgelöste Massenspektrometrie (HR-MS) (Verbindung **12** – **22**) und / oder HPLC (Verbindung **3** – **22**) überprüft und war, wenn nicht anders angegeben, > 95 %.

8.2 Fluorimetrische Enzymassays

Die verschiedenen Enzymassays wurden an einem Fluorimeter des Typs *Infinite F200 Pro* der Firma *Tecan* bei einer Temperatur von 25°C durchgeführt. Hierzu wurden weiße 96-Well-Mikrotiterplatten verwendet. Die Anregungswellenlänge lag bei $\lambda = 380$ nm, die Detektionswellenlänge bei $\lambda = 460$ nm.

Bei den zunächst durchgeführten *screenings* an den verschiedenen Enzymen wurde eine Inhibitorkonzentration von 20 μM eingesetzt. Zur Bestimmung der verschiedenen kinetischen Konstanten wurden Verdünnungsreihen der Inhibitoren angefertigt. Die Konzentrationen wurden dabei so gewählt, dass möglichst jeweils drei Messwerte oberhalb und unterhalb des zu erwartenden IC_{50} - oder K_i -Wertes lagen. Alle Messungen wurden als unabhängige Doppelbestimmungen durchgeführt. Die angegebenen Werte bilden den Mittelwert von mindestens 2 unabhängigen Messungen ab. Weiterhin wurde jeweils eine Negativkontrolle ohne Inhibitor vermessen. Bei allen Enzymassays wurde ein Gesamtvolumen von 200 μL pro *well* eingesetzt welches sich wie folgt zusammensetzt:

- 180 μL Assaypuffer
- 5 μL Enzym in Enzympuffer
- 10 μL DMSO mit oder ohne Inhibitor
- 5 μL Substrat

Die einzelnen Bestandteile wurden in der angegebenen Reihenfolge zusammengegeben und möglichst rasch nach Zugabe des Substrates fluorimetrisch vermessen. Die Zusammensetzung der einzelnen Bestandteile ist in Tabelle 8-1 angegeben.

Tabelle 8-1 Verwendete Enzyme, Substrate, Puffer und deren Zusammensetzung

Rhodesain	
Enzym	Rhodesain 4 mg/mL, Verdünnung: 1 μL ad 900 μL Enzympuffer
Substrat	Z-Phe-Arg-AMC * HCl (10 μM in DMSO), $K_M = 826.5 \mu\text{M}$
Assaypuffer	Acetat-Puffer (pH 5,5): 50 mM Natriumacetat, 5 mM EDTA, 200 mM NaCl, 0,005% Brij 35
Enzympuffer	Acetat-Puffer (pH 5,5): 50 mM Natriumacetat, 5 mM EDTA, 200 mM NaCl

Cathepsin L	
Enzym	Cathepsin L aus humaner Leber, 0,5 U/mg, Verdünnung 2 μL ad 100 μL Enzympuffer
Substrat	Z-Phe-Arg-AMC * HCl (6.25 μM in DMSO), $K_M = 6.5 \mu\text{M}$
Assaypuffer	Tris-Puffer (pH 6.5): 50 mM Tris, 5 mM EDTA, 200 mM NaCl, 0.005 % Brij 35
Enzympuffer	Tris-Puffer (pH 6.5): 50 mM Tris, 5 mM EDTA, 200 mM NaCl

Cathepsin B	
Enzym	Cathepsin B aus humaner Leber, $\geq 1,500$ U/mg, Verdünnung 2 μL ad 100 μL Enzympuffer
Substrat	Z-Phe-Arg-AMC * HCl (100 μM in DMSO), $K_M = 150 \mu\text{M}$
Assaypuffer	Tris-Puffer (pH 6.5): 50 mM Tris, 5 mM EDTA, 200 mM NaCl, 0.005 % Brij 35
Enzympuffer	Tris-Puffer (pH 6.5): 50 mM Tris, 5 mM EDTA, 200 mM NaCl

Proteasom	
Enzym	20S Proteasom aus humanen Erythrozyten, 0,5 mg/mL, Verdünnung: 1 μL ad 100 μL Puffer
Substrat 1	Boc-Leu-Arg-Arg-AMC*HCl (85 μM in DMSO), Trypsin-ähnliche Aktivität
Substrat 2	Succ-Leu-Leu-Val-Tyr-AMC*HCl (75 μM in DMSO) Chymotrypsin-ähnliche Aktivität
Substrat 3	Z-Leu-Leu-Glu-AMC*HCl (80 μM in DMSO) Caspase-ähnliche Aktivität
Enzym-/ Assaypuffer 1	Tris-Puffer (pH 7,4): 50 mM Tris, 50 mM NaCl, 0,5 mM EDTA (für Trypsin-ähnl. Aktivität)
Enzym-/ Assaypuffer 2	Tris-Puffer (pH 7,5): 50 mM Tris, 25 mM KCl, 10 mM NaCl, 1 mM MgCl_2 , 0,03% SDS (für Chymotrypsin- und Caspase-ähnl. Aktivität)

Die verwendeten Substrate wurden von der Firma *Bachem*, Cathepsin B und L von *Sigma-Aldrich* und Proteasom von *Biomol* erworben. Rhodesain wurde rekombinant in *Pichia Pastoris* exprimiert (Uwe Dietzel, AK Kisker, Universität Würzburg und Patrick Johe, AK Schirmeister, Universität Mainz).

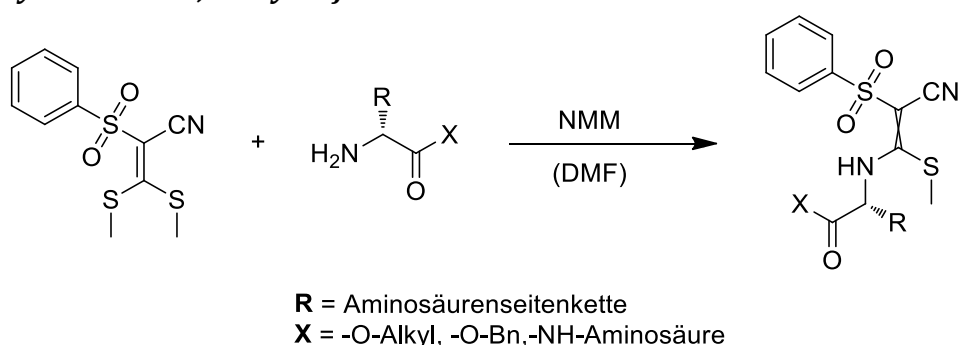
8.3 Allgemeine Arbeitsmethoden

Alle Reagenzien und Lösemittel wurden von den Firmen *Sigma-Aldrich*, *Alfa Aesar*, *Acros Organics*, *abcr*, *Merck*, *TCI* oder *Bachem* erworben. Lösemittel wurden vor dem Einsatz durch Destillation gereinigt. Absolute Lösemittel wurden durch mehrstündiges refluxieren mit gängigen Trocknungsmitteln (Natrium, Calciumhydrid, Phosphorpentoxid, Kaliumhydroxid) und anschließender Destillation nach Literaturmethoden hergestellt. Für eine spätere Verwendung wurden diese über Molekularsieb 4 Å unter Argonatmosphäre gelagert. Reaktionen wurden, falls erforderlich, unter Argon- oder Stickstoffatmosphäre unter *Schlenk*-Bedingungen durchgeführt. Reaktionen bei verminderte Temperatur wurden durch Kühlung mittels Eis/Wasser/ Kochsalzmischungen im Bereich bis - 20 °C, oder durch, mit flüssigem Stickstoff abgekühltes, Ethanol im Bereich bis - 80 °C durchgeführt.

8.4 Allgemeine synthetische Methoden

Die im Folgenden beschriebenen Methoden wurden zur Synthese verschiedener Verbindungen unter identischen Bedingungen verwendet, sodass diese allgemeingültig formuliert wurden. Bei der Beschreibung der einzelnen Verbindungen wird dann auf die entsprechende Methode verwiesen.

Synthese der N,S-Vinylsulfone – Methode A



Zu einer Lösung von 1,0 Äq. 3,3-Bis(methylthio)-2-(phenylsulfonyl)acrylonitrile in DMF werden 1,0 Äq. Aminosäure oder Peptid und 2,1 Äq. *N*-Methylmorpholin gegeben. Die Reaktionsmischung wird für 12 – 24 h gerührt und mit Dichlormethan (DCM) (50 mL) verdünnt. Die Reaktionsmischung wird je 2-mal mit HCl (1M), ges. NaHCO₃-Lösung und ges. NaCl-Lösung gewaschen. Die organische Phase wird abgetrennt, mit Na₂SO₄ getrocknet und das Lösemittel im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wird säulenchromatographisch aufgereinigt.

Peptidkupplung mit HBTU oder TBTU – Methode B

Eine Lösung von 1,0 Äq. einer Carbonsäure in DCM wird mit 1,0 Äq. HBTU oder TBTU und 3,0 Äq. Diisopropylethylamin versetzt und auf 0 °C gekühlt. Nach 30 minütigem Rühren wird 1,0 Äq. eines Amins (Aminosäure, Peptid) zugegeben und die Reaktionsmischung 12 – 24 h gerührt, wobei die Mischung langsam auf Raumtemperatur erwärmt wird. Die Reaktionsmischung wird je 2-mal mit HCl (1 M), ges. NaHCO₃-Lösung und ges. NaCl-Lösung gewaschen. Die organische Phase wird abgetrennt, mit Na₂SO₄ getrocknet und das Lösemittel im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wird säulenchromatographisch oder durch Umkristallisation aufgereinigt.

Peptidkupplung mit Propylphosphonsäureanhydrid (PPA) – Methode C

Zu einer Lösung von 1,0 Äq. eines Amins, 1,1 Äq. einer Carbonsäure und 4,1 Äq. DIPEA in DMF wird bei 0 °C tropfenweise PPA zugegeben. Die Reaktionsmischung wird 12 – 24 h gerührt und anschließend mit 50 mL Wasser versetzt und 3-mal mit Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Extrakte werden je 3-mal mit einer ges. NaHCO₃-Lsg. Und einer ges. NaCl-Lösung gewaschen. Die organische Phase wird abgetrennt, mit Na₂SO₄ getrocknet und das Lösemittel im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wird säulenchromatographisch aufgereinigt.

Einführung der tert-Butyloxycarbonyl-Schutzgruppe (Boc) – Methode D

Zu einer Lösung von 1 Äq. der Aminosäure in THF (10 mL) werden 1,1 Äq. K₂CO₃ in 50 mL Wasser gegeben. Zu dieser Mischung wird eine Lösung von 1,1 Äq. Di-tert-butylidicarbonat in 50 mL THF tropfenweise zugegeben. Die Reaktionsmischung wird 12 – 24 h gerührt und anschließend 2-mal mit DCM extrahiert. Die wässrige Phase wird mit einer Lösung von KHSO₄ (1 M) auf pH 3 eingestellt und 3-mal mit 50 mL DCM extrahiert. Die vereinigten organischen Extrakte werden 2-mal mit einer ges. NaCl-Lösung gewaschen, mit Na₂SO₄ getrocknet und das Lösemittel im Vakuum entfernt.

Abspaltung der Boc-Schutzgruppe – Methode E

Zu einer Lösung des Boc-geschützten Aminosäurederivates in Dichlormethan (10 mL) wird bei 0 °C tropfenweise Trifluoressigsäure (TFA) gegeben. Die Reaktionsmischung wird 1 - 3 h bis zur vollständigen Abspaltung der Schutzgruppe gerührt. Das Lösemittel wird im Vakuum entfernt und der Rückstand erneut in DCM gelöst. Erneut wird das Lösemittel im Vakuum entfernt, wobei dieser Vorgang so lange wiederholt wird, bis der Rückstand keine Reste von TFA mehr enthält. Das erhaltene Salz wird zur Aufreinigung mit Diethylether im Ultraschallbad gewaschen.

Reduktion der Weinreb-Amide zu Aldehyden – Methode F

Zu einer Lösung von 1 Äq. des Weinreb-Amids in wasserfreiem Diethylether (50 mL) werden bei 0 °C 1,25 Äq Lithiumaluminiumhydrid in kleinen Portionen gegeben. Nach beendeter Gasentwicklung werden weitere 100 mL Diethylether und 50 mL einer Lösung von KHSO_4 (1 M) gegeben. Die wässrige Phase wird abgetrennt und 3-mal mit Diethylether extrahiert. Die vereinigten organischen Extrakte werden je 2-mal mit HCl (1 M), ges. NaHCO_3 -Lsg. und ges. NaCl-Lösung gewaschen. Die organische Phase wird abgetrennt, mit Na_2SO_4 getrocknet und das Lösemittel im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wird säulenchromatographisch aufgereinigt.

Horner-Wadsworth-Emmons-Reaktion (HWE-Reaktion) – Methode G

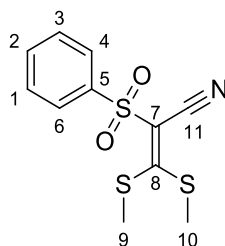
Zu einer Lösung von 1 Äq. des jeweiligen Phosphonats in wasserfreiem THF wird bei – 80 °C tropfenweise Lithium-bis(trimethylsilyl)amid (LiHMDS) als 1 M Lösung in THF gegeben. Nach 30 Minuten bei dieser Temperatur wird 1 Äq. des Aldehyds als Lösung in THF tropfenweise zugegeben. Die Reaktionsmischung wird 12 – 24 h gerührt, wobei die Temperatur langsam bis auf Raumtemperatur erhöht wird. Das Lösemittel wird im Vakuum entfernt, der Rückstand in DCM aufgenommen und je 2-mal mit einer gesättigten NaHCO_3 -Lsg. und einer ges. NaCl-Lösung gewaschen. Die organische Phase wird abgetrennt, mit Na_2SO_4 getrocknet und das Lösemittel im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wird säulenchromatographisch aufgereinigt.

8.5 Synthetisierte Verbindungen

Die Verbindungen **1** – **17** wurden bereits vorab veröffentlicht.¹²⁰

8.5.1 N,S-Vinylsulfone

3,3-Bis(methylthio)-2-(phenylsulfonyl)acrylonitril¹⁴⁵



Ansatz:

Substanz	Äquivalente	M [g/mol]	n [mmol]	m [g]	V [mL]
2-Phenylsulfonylacetonitril	1	181,21	50	9,06	-
Natriumhydrid (60%)	2	23,99	100	4,00	-
Kohlenstoffdisulfid	1	76,14	50	3,81	3,02
Methyliodid	2	141,94	100	14,20	6,26

Zu einer Lösung von 2-Phenylsulfonylacetonitril in DMSO (50 mL) wird Natriumhydrid in kleinen Portionen zugegeben. Nach 30 min wird Kohlenstoffdisulfid tropfenweise zugegeben und die Reaktionsmischung für 1 h gerührt. Nach 2 h wird Methyliodid tropfenweise zugegeben und die resultierende Suspension für weitere 2 h gerührt bevor Wasser (50 mL) zugegeben wird. Die Reaktionsmischung wird gefiltert und das Präzipitat mit kaltem Wasser gewaschen. Nach Umkristallisation aus Ethanol wird das Produkt in Form von gelben Nadeln erhalten.

Ausbeute: 10,20 g, 35,7 mmol, 71 %, blassgelbe Nadeln.

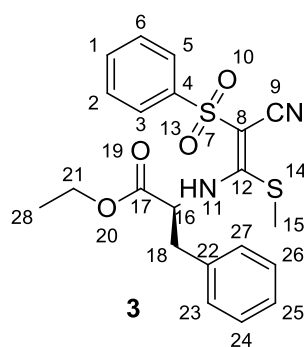
Smp.: 104 – 105 °C (Ethanol), Lit.: 102 – 103 °C¹⁰⁷

R_f: 0,33 (DCM)

¹H-NMR: (300 MHz, CDCl₃) δ 8.08 – 8.01 (m, 2H, H-4, H-6), 7.72 – 7.52 (m, H-1, H-2, H-3), 2.70 (s, 3H, H-9), 2.55 (s, 3H, H-10).

¹³C-NMR: (75 MHz, CDCl₃) δ 177.61 (C-8), 140.03 (C-5), 134.35 (C-2), 130.88 (C-1, C-3), 129.36 (C-6), 128.34 (C-4), 114.11 (C-11), 110.69 (C-8), 77.16 (C-7), 20.69 (C-9), 18.91 (C-10).

(S,E)-Ethyl 2-((2-cyano-1-(methylthio)-2-(phenylsulfonyl)vinyl)amino)-3-phenylpropanoat



Methode: A

Ansatz:

Substanz	Äquivalente	M [g/mol]	n [mmol]	m [g]	V [mL]
3,3-Bis(methylthio)-2-(phenylsulfonyl)acrylonitril	1	285,41	3,50	1	-
L-Phenylalaninethylester*HCl	1,00	229,70	3,50	1,69	-
N-Methylmorpholin	2,10	101,15	7,36	0,74	0,81

Ausbeute: 1,08 g, 2,52 mmol, 72 %, blassgelber Feststoff

SC: Petrolether/EtOAc 2:1

R_f: 0,44 (Petrolether/EtOAc 2:1)

Smp.: 64 – 65 °C (EtOAc).

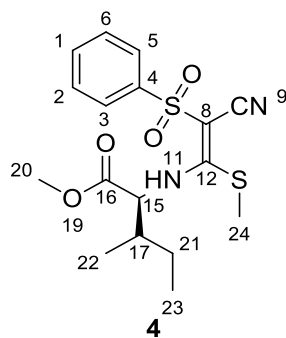
[α]_D²²: - 111 ° (c = 1, CHCl₃).

FTIR: $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3266, 2980, 2359, 2193, 1746, 1683, 1541, 1445, 1347, 1289, 1188, 1137, 1079, 1030, 977, 880, 818, 720, 698, 686.

¹H NMR: (300 MHz, CDCl₃) δ 8.80 (d, J = 7.9 Hz, 1H, H-11), 7.76 – 7.65 (m, 2H, H-Ar), 7.59 – 7.49 (m, 1H, H-Ar), 7.45 – 7.36 (m, 2H, H-Ar), 7.31 – 7.18 (m, 3H, H-Ar), 7.17 – 7.05 (m, 2H, H-Ar), 4.99 – 4.81 (m, 1H, H-16), 4.17 (q, J = 7.1 Hz, 2H, H-21), 3.11 (ddd, J = 22.7, 14.1, 6.6 Hz, 2H, H-18), 2.22 (s, 3H, H-15), 1.20 (t, J = 7.1 Hz, 3H, H-28).

¹³C NMR: (75 MHz, CDCl₃) δ 169.88 (C-12), 168.21 (C-17), 141.57 (C-4), 135.27 (C-22), 134.73 (C-1), 133.56 (C-25), 130.75 (C-Ar), 129.42 (C-Ar), 129.29 (C-Ar), 129.04 (C-Ar), 127.73 (C-Ar), 126.77 (C-Ar), 115.87 (C-9), 86.31 (C-8), 62.41 (C-21), 59.96 (C-16), 39.20 (C-18), 18.31 (C-15), 14.15 (C-28).

(2S,3S)-Methyl 2-(((E)-2-cyano-1-(methylthio)-2-(phenylsulfonyl)vinyl)amino)-3-methylpentanoat



Methode: A

Ansatz:

Substanz	Äquivalente	M [g/mol]	n [mmol]	m [g]	V [mL]
3,3-Bis(methylthio)-2-(phenylsulfonyl)acrylonitril	1	285,41	3,50	1	-
L-Isoleucinmethylester*HCl	1,00	181,61	3,50	0,64	-
N-Methylmorpholin	2,10	101,15	7,36	0,74	0,81

Ausbeute: 1,00 g, 2,63 mmol, 75 %, blassgelber Feststoff

SC: Petrolether/EtOAc 2:1

R_f: 0,54 (Petrolether/EtOAc 2:1)

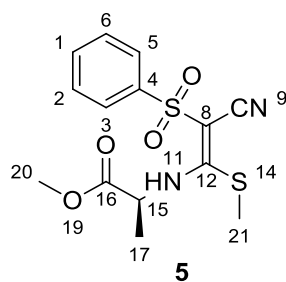
Smp.: 58 – 59 °C

[α]_D²²: - 76 ° (c = 1, CHCl₃)

¹H NMR: (300 MHz, CDCl₃) δ 8.99 (d, J = 8.0 Hz, 1H, H-11), 8.03 – 7.92 (m, J = 7.6 Hz, 2H, H-3, H-5), 7.69 – 7.50 (m, 3H, H-1, H-2, H-6), 4.66 (dd, J = 8.4, 4.5 Hz, 1H, H-15), 3.79 (s, 3H, H-20), 2.52 (s, 3H, H-24), 2.15 – 1.94 (m, 1H, H-17), 1.56 – 1.22 (m, 2H, H-21), 1.04 – 0.90 (m, 6H, H-22, H-23).

¹³C NMR: (75 MHz, CDCl₃) δ 170.59 (C-8), 168.69 (C-16), 141.76 (C-4), 133.72 (C-1), 129.46 (C-2, C-6), 127.00 (C-3, C-5), 116.05 (C-9), 86.20 (C-12), 63.37 (C-15), 52.86 (C-20), 38.63 (C-17), 25.20 (C-21), 18.58 (C-24), 15.84 (C-22), 11.81 (C-23).

(S,E)-Methyl 2-((2-cyano-1-(methylthio)-2-(phenylsulfonyl)vinyl)amino)propanoat



Methode: A

Ansatz:

Substanz	Äquivalente	M [g/mol]	n [mmol]	m [g]	V [mL]
3,3-Bis(methylthio)-2-(phenylsulfonyl)acrylonitril	1,00	285,41	3,50	1,00	
L-Alaninmethylester*HCl	1,00	139,58	3,50	0,49	
N-Methylmorpholin	2,1	101,15	7,36	0,74	0,81

Ausbeute: 0,95 g, 2,80 mmol, 80 % farbloser Feststoff.

SC: Petrolether/EtOAc 2:1

R_f: 0,28 (Petrolether/EtOAc 2:1)

Smp.: 102 – 103 °C

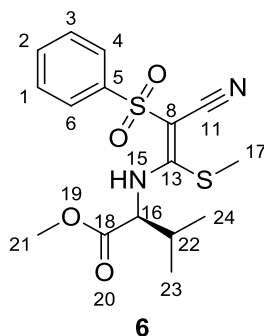
[α]_D²²: - 71° (c = 1, CHCl₃)

FTIR: $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3270, 2980, 2360, 2193, 1746, 1683, 1541, 1446, 1347, 1288, 1187, 1136, 1079, 1030, 977, 879, 818, 719, 697, 686.

¹H NMR: (300 MHz, CDCl₃) δ 8.83 (d, J = 6.6 Hz, 1H, H-11), 7.93 – 7.91 (m, 2H, H-Ar), 7.66 – 7.37 (m, 3H, H-Ar), 4.65 (p, J = 7.2 Hz, 1H, H-15), 3.74 (s, 3H, H-20), 2.46 (s, 3H, H-21), 1.51 (d, J = 7.1 Hz, 3H, H-17).

¹³C NMR: (75 MHz, CDCl₃) δ 171.65 (C-12), 168.37 (C-16), 141.70 (C-4), 133.74 (C-1), 129.44 (C-2, C-6), 127.01 (C-3, C-5), 115.91 (C-9), 86.36 (C-8), 54.31 (C-15), 53.23 (C-20), 19.24 (C-17), 18.56 (C-21)

(S,E)-Methyl 2-((2-cyano-1-(methylthio)-2-(phenylsulfonyl)vinyl)amino)-3-methylbutanoat



Methode: A

Ansatz:

Substanz	Äquivalente	M [g/mol]	n [mmol]	m [g]	V [mL]
3,3-Bis(methylthio)-2-(phenylsulfonyl)acrylonitril	1,00	285,41	3,50	1,00	-
L-Valinmethylester*HCl	1,00	167,63	3,50	0,59	-
N-Methylmorpholin	2,1	101,15	7,36	0,74	0,81

Ausbeute: 0,90 g, 2,45 mmol, 70 % blassgelber Feststoff

SC: Petrolether/EtOAc 2:1

R_f: 0,39 (Petrolether/EtOAc 2:1)

Smp.: 70 – 71 °C

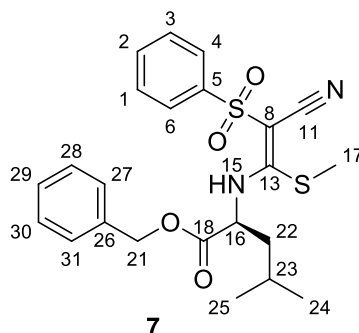
[α]_D²²: - 81° (c = 1, CHCl₃)

FTIR: $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3264, 2965, 2883, 2191, 1727, 1561, 1439, 1421, 1362, 1345, 1283, 1218, 1183, 1130, 1075, 990, 945, 911, 842, 778, 758, 685,

¹H NMR: (300 MHz, CDCl₃) δ 8.96 (d, J = 8.2 Hz, 1H, H-15), 8.12 – 7.80 (m, 2H, H-Ar), 7.72 – 7.39 (m, 3H, H-Ar), 4.60 (dd, J = 8.4, 4.5 Hz, 1H, H-16), 3.78 (s, 3H, H-21), 2.49 (s, 3H, H-17), 2.38 – 2.22 (m, 1H, H-22), 1.02 (d, J = 6.9 Hz, 6H, H-23, H-24).

¹³C NMR: (75 MHz, CDCl₃) δ 171.65 (C-13), 168.37 (C-18), 141.70 (C-5), 133.74 (C-2), 129.44 (C-1, C-3), 127.01 (C-4, C-6), 115.91 (C-11), 86.36 (C-13), 54.31 (C-16), 53.23 (C-21), 32.7 (C-22) 19.24 (C-23, C-24), 18.56 (C-17)

(S,E)-Benzyl 2-((2-cyano-1-(methylthio)-2-(phenylsulfonyl)vinyl)amino)-4-methylpentanoate



Methode: A

Ansatz:

Substanz	Äquivalente	M [g/mol]	n [mmol]	m [g]	V [mL]
3,3-Bis(methylthio)-2-(phenylsulfonyl)acrylonitril	1,00	285,41	1,90	0,54	-
L-Leucinbenzylester* <i>p</i> -TosOH	1,00	393,50	1,90	0,74	-
N-Methylmorpholin	2,1	101,15	3,97	0,40	0,44

Ausbeute: 0,58 g, 1,25 mmol, 66% blassgelber Feststoff

SC: Petrolether/Ethylacetat 2:1

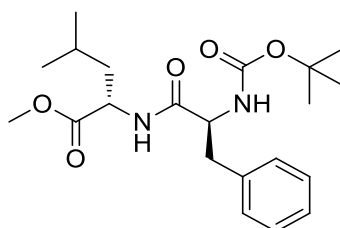
R_F: 0,56 (Petrolether/Ethylacetat 2:1)

Smp.: 61 – 62 °C (Petrolether/Ethylacetat)

¹H NMR: (300 MHz, CDCl₃) δ 8.83 (d, J = 7.7 Hz, 1H, H-15), 7.99 – 7.91 (m, 2H, H-Ar), 7.66 – 7.50 (m, 3H, H-Ar), 7.36 (m, 5H, H-Ar), 5.20 (s, 2H, H-21), 4.70 (td, J = 5,90, 7,97, 8,01 Hz, 1H, H-16), 2.39 (s, 3H, H-17), 1.79 (dd, J = 9.7, 4.7 Hz, 2H, H-22), 0.97 (d, J = 6.3 Hz, 3H, H-25), 0.95 (d, J = 6.3 Hz, 3H, H-24).

¹³C NMR: (75 MHz, CDCl₃) δ = 171.5 (C-13), 168.6 (C-18), 140.2 (C-26), 135.0 (C-5), 130.7 (C-Ar), 129.5(C-Ar), 129.3 (C-Ar), 129.1 (C-Ar), 128.9 (C-Ar), 126.8 (C-Ar), 115.7 (C-11), 86.7 (C-8), 68.0 (C-21), 57.8 (C-16), 41.0 (C-22), 24.5 (C-23), 22.7 (C-25), 21.4 (C-24), 18.0 (C-17).

Boc-L-Phe-L-Leu-OMe



Methode: B

Ansatz:

Substanz	Äquivalente	M [g/mol]	n [mmol]	m [g]	V [mL]
Boc-L-Phe-OH	1,00	265,35	3,77	1,00	-
L-Leu-OMe*HCl	1,00	181,66	3,77	0,68	-
HBTU	1	379,24	3,77	1,42	-
DIPEA	3	129,25	11,31	1,46	1,92

Ausbeute: 1,23 g, 3,13 mmol, 83 %, farblose nadelförmige Kristalle.

*Die analytischen Daten stimmen mit der Literatur überein.*¹⁴⁶

Smp: 113 -116°C, Lit.: 108 – 110 °C.¹⁴⁷

SC: Petrolether/EtOAc 2:1

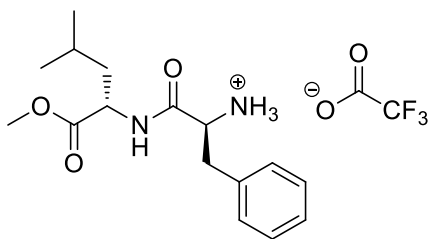
R_f: 0,33 (Petrolether/EtOAc 2:1)

FT-IR: $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3338, 2966, 1744, 1687, 1634, 1634, 1511, 1364, 1266, 1152, 743, 702.

¹H NMR: (300 MHz, CDCl₃) 7.25 (m, 5H), 6.18 (d, *J* = 8,2 Hz, 1H); 5.02 (s, 1H), 4.53 (s, 1H), 4.37 (s, 1H), 3.70 (s, 3H), 3.06 (d, *J*=6,9 Hz, 2H), 1.66 (s, 2H), 1.40 (s, 9H); 0.85 (s, 6H).

¹³C-NMR: (75 MHz, CDCl₃) δ 173.15, 171.14, 136.76, 129.40, 128.80, 127.04, 52.36, 50.75, 41.46, 38.57, 28.35, 24.67, 22.85, 21.91.

H-L-Phe-L-Leu-OMe*TFA



Methode: E

Ansatz:

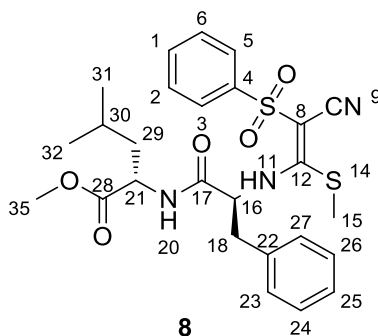
Substanz	Äquivalente	M [g/mol]	n [mmol]	m [g]	V [mL]
<i>Boc-L-Phe-L-Leu-OMe</i>	1,00	392,49	2,04	0,80	-

Ausbeute: 0,81 g, 2,00 mmol, 98 % farbloser Feststoff

FT-IR: $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3354, 3195, 2962, 1732, 1675, 1556, 1434, 1368, 1274, 1197, 1152, 747, 702, 678.

¹H NMR: (300 MHz, CDCl₃) δ 7.60 (d, *J*=8,3 Hz, 1H), 7.28 (m, 5H), 4.61 (t, *J*=8,6 Hz, 3H), 3.73 (s, 3H), 3.63 (dd, *J*=9,6 Hz, 4,3 Hz, 1H), 3.29 (dd, 1H, *J*=13,8 Hz, 4,0 Hz, 1H); 2.68 (dd, 1H, *J*=13,7 Hz, 9,7 Hz, 1H), 1.62 (m, 3H); 0.93 (d, 6H *J*=5,5 Hz, 6H)

(S)-Methyl 2-(((S)-2-(((E)-2-cyano-1-(methylthio)-2-(phenylsulfonyl)vinyl)amino)-3-phenylpropanamido)-4-methylpentanoate



Methode: A

Ansatz:

Substanz	Äquivalente	M [g/mol]	n [mmol]	m [g]	V [mL]
3,3-bis(methylthio)-2-(phenylsulfonyl)acrylonitril	1,0	285,41	1,87	0,53	-
H-L-Phe-L-Leu-OMe*TFA	1,0	406,40	1,87	0,76	-
N-Methylmorpholin	2,0	101,15	5,34	0,54	0,59

Ausbeute: 0,90 g, 1,69 mmol, 64%, farblose, nadelförmige Kristalle

SC: Petrolether/Ethylacetat 1:1

R_f: 0,23 (Petrolether/EtOAc 2:1)

[α]_D²²: 0,30 ° (c = 1, CHCl₃)

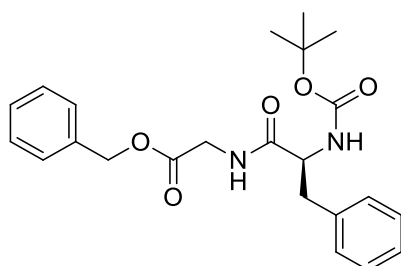
Smp.: 167 – 169 °C (Petrolether/Ethylacetat)

FT-IR: $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3334, 3220, 2954, 2186, 1741, 1684, 1540, 1414, 1300, 1216, 1140, 1075, 745, 688.

¹H NMR: (300 MHz, CDCl₃) δ 8.82 (d, *J* = 6.9 Hz, 1H, H-11), 7.76 (d, *J* = 7.8 Hz, 2H, H-Ar), 7.59 – 7.50 (m, 1H, H-Ar), 7.49 – 7.39 (m, 2H, H-Ar), 7.33 – 7.13 (m, 5H, H-Ar), 5.96 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H, H-20), 4.77 (dd, *J* = 7.3 Hz, 1H, H-21), 4.52 (dd, *J* = 13.5, 8.3 Hz, 1H, H-16), 3.67 (s, 3H, H-35), 3.10 (ddd, *J* = 21.8, 14.0, 7.2 Hz, 2H, H-18), 2.33 (s, 3H, H-15), 1.58 – 1.43 (m, 1H, H-30), 1.43 – 1.24 (m, 2H, H-29), 0.83 (pt, *J* = 5.2 Hz, 6H, H-31, H-32).

¹³C NMR: (75 MHz, CDCl₃) δ 172.94 (C-12), 169.10 (C-17), 168.31 (C-28), 141.57 (C-4), 135.22 (C-22), 133.67 (C-1), 129.48 (C-Ar), 129.45 (C-Ar), 129.24 (C-Ar), 127.81 (C-Ar), 126.99 (C-Ar), 115.91 (C-9), 86.56 (C-8), 61.50 (C-16), 52.63 (C-21), 51.05 (C-35), 41.34 (C-29), 40.17 (C-18), 24.83 (C-30), 22.83 (C-32), 21.88 (C-31), 18.57 (C-15).

Boc-L-Phe-Gly-OBn



Ansatz:

Substanz	Äquivalente	M [g/mol]	n [mmol]	m [g]	V [mL]
Boc-L-Phe-Gly-OH	1,00	322,36	1,55	0,50	-
Benzylbromid	1,10	171,04	1,71	0,292	0,20
Cs ₂ CO ₃					

Durchführung:

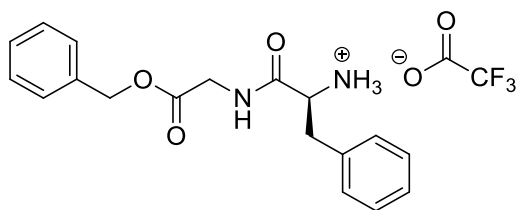
Zu einer Lösung des Peptids in 20 mL Wasser und 2 mL Methanol wird eine wässrige Lösung von Cs₂CO₃ (20 %) getropft bis die Mischung einen pH = 7 erreicht. Das Lösemittel wird im Vakuum entfernt und der Rückstand in 5 mL DMF suspendiert. Zur Reaktionsmischung wird tropfenweise Benzylbromid gegeben und nach 12 – 24 h wird mit 50 mL Ethylacetat verdünnt. Es wird je 2-mal mit Wasser, ges. NaHCO₃-Lösung und ges. NaCl-Lösung gewaschen. Die organische Phase wird abgetrennt, mit Natriumsulfat getrocknet und das Lösemittel im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wurde ohne weitere Aufreinigung verwendet.

Ausbeute: 0,64 g, 1,55 mmol, 100 % farbloser Feststoff

Smp.: 136 – 138 °C (Petrolether/Ethylacetat), Lit.: 131 – 132 °C¹⁴⁸

¹H NMR: (300 MHz, CDCl₃) δ 7.35 – 7.09 (m, 10H), 6.49 (s, br., 1H), 5.07 (s, 2H), 4.97 (d, J = 6.7 Hz, 1H), 4.30 (d, J = 6.3 Hz, 1H), 4.04 – 3.81 (m, 2H), 2.96 (ddd, J = 21.3, 13.9, 6.8 Hz, 2H), 1.28 (s, 9H).

H-L-Phe-Gly-OBn*TFA



Methode: E

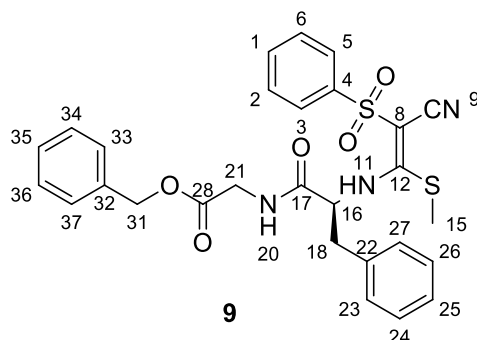
Ansatz:

Substanz	Äquivalente	M [g/mol]	n [mmol]	m [g]	V [mL]
<i>Boc-L-Phe-Gly-OBn</i>	1,00	285,41	3,50	1,00	-

Ausbeute: 0,65 g, 1,52 mmol, 98% farbloser Feststoff

¹H NMR: (300 MHz, CD₂Cl₂) δ 7.54 (t, *J* = 5.5 Hz, 1H), 7.45 – 7.06 (m, 10H), 4.93 (s, 2H), 4.34 (t, *J* = 7.1 Hz, 1H), 3.84 (ddd, *J* = 22.7, 18.0, 5.5 Hz, 2H), 3.20 – 2.92 (m, 2H).

(*S,E*)-Benzyl 2-(2-((2-cyano-1-(methylthio)-2-(phenylsulfonyl)vinyl)amino)-3-phenylpropanamido)acetat



Methode: A

Ansatz:

Substanz	Äquivalente	M [g/mol]	n [mmol]	m [g]	V [mL]
3,3-bis(methylthio)-2-(phenylsulfonyl)acrylonitril	1	285,41	1,52	0,43	-
<i>L</i> -Phenylalaninethylester*HCl	1,00	229,70	1,52	0,65	-
N-Methylmorpholin	2,10	101,15	3,19	0,32	0,35

Ausbeute: 0,49 g, 0,89 mmol, 59 %, farbloser Feststoff

SC: DCM/MeOH 50:1

R_F: 0,44 (Ethylacetat/Petrolether 2:1)

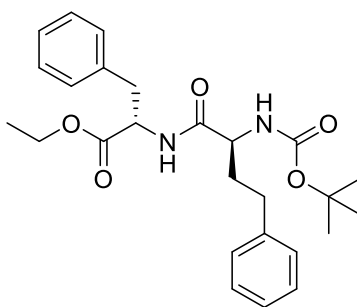
Smp.: 54 – 56 °C (DCM/MeOH)

[α]_D²²: - 26° (c = 1, CHCl₃)

FTIR: $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3270, 2980, 2359, 2193, 1746, 1682, 1542, 1446, 1347, 1288, 1187, 1136, 1079, 1030, 977, 879, 818, 719, 697, 686.

¹H NMR: (300 MHz, CD₂Cl₂) δ 8.86 (d, *J* = 6.8 Hz, 1H, H-11), 7.77 (d, *J* = 7.6 Hz, 2H, H-Ar), 7.69 – 7.57 (m, 1H, H-Ar), 7.56 – 7.46 (m, 2H, H-Ar), 7.43 – 7.25 (m, 8H, H-Ar), 7.24 – 7.14 (m, 2H, H-Ar), 6.09 (t, *J* = 4.9 Hz, 1H, H-20), 5.17 (s, 2H, H-31), 4.84 (dd, *J* = 13.7, 7.5 Hz, 1H, H-16), 4.16 – 3.95 (m, 2H, H-21), 3.28 – 2.95 (m, 2H, H-18), 2.32 (s, 3H, H-15).

¹³C NMR: (75 MHz, CD₂Cl₂) δ 171.53 (C-12), 169.51 (C-28), 168.83 (C-17), 142.19 (C-4), 140.33 (-32), 136.26 (C-22), 134.25 (C-1), 129.98 (C-Ar), 129.80 (C-Ar), 129.22 (C-Ar), 129.20 (C-Ar), 128.86 (C-Ar), 127.81 (C-Ar), 127.35 (C-Ar), 127.02 (C-Ar), 116.27 (C-9), 86.75 (C-8), 62.48 (C-31), 59.67 (C-16), 38.10 (C-21), 35.73 (C-18), 18.90 (C-15).

Boc-L-hPhe-L-Phe-OEt**Methode:** B**Ansatz:**

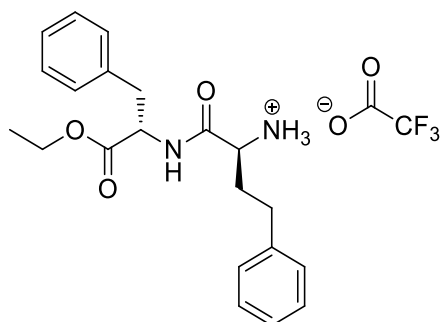
Substanz	Äquivalente	M [g/mol]	n [mmol]	m [g]	V [mL]
<i>Boc-L-hPhe-OH</i>	1,00	279,33	3,58	1,000	-
<i>L-Leu-OMe</i> *HCl	1,00	229,70	3,58	0,822	-
HBTU	1,01	379,24	3,62	1,371	-
DIPEA	2,3	129,25	8,23	1,064	1,92

Ausbeute: 1,30 g, 2,86 mmol, 80 %, farbloser Feststoff.**SC:** Petrolether/EtOAc 2:1**R_F:** 0,40(Petrolether/EtOAc 2:1)

¹H NMR: (300 MHz, CD₂Cl₂) δ 7.47 – 7.02 (m, 10H), 6.43 (d, *J* = 7.7 Hz, 1H), 4.99 (s, br, 1H), 4.76 (q, *J* = 6.4 Hz, 1H), 4.15 (q, *J* = 7.1 Hz, 2H), 4.01 (d, *J* = 7.2 Hz, 1H), 3.10 (ddt, *J* = 13.9, 6.0 Hz, 2H), 2.63 (t, *J* = 7.9 Hz, 2H), 2.08 (td, *J* = 14.1, 7.7, 7.3 Hz, 1H), 1.82 (td, *J* = 15.2, 7.9 Hz, 1H), 1.59 (s, br, 1H), 1.43 (s, 9H), 1.23 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H).

¹³C NMR: (75 MHz, CD₂Cl₂) δ 171.85, 171.67, 141.61, 136.64, 129.91, 129.00, 128.95, 127.53, 126.57, 62.07, 54.72, 54.56, 54.36, 54.18, 54.00, 53.81, 53.64, 53.28, 38.37, 34.61, 32.16, 28.56, 14.46.

H-L-hPhe-L-Phe-OEt*TFA



Methode: E

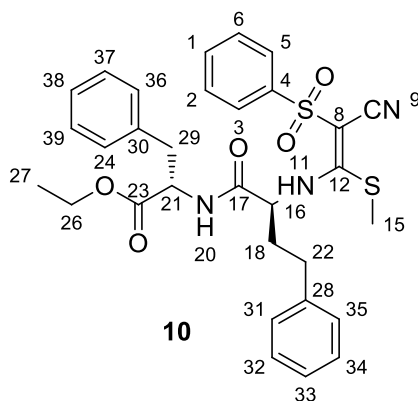
Ansatz:

Substanz	Äquivalente	M [g/mol]	n [mmol]	m [g]	V [mL]
<i>Boc-L-hPhe-L-Phe-OMe</i>	1,00	454,57	2,86	1,30	-

Ausbeute: 1,28 g, 2,73 mmol, 95 %, gelblicher Feststoff

¹H NMR: (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8.98 (d, *J* = 7.3 Hz, 1H), 8.25 (s, 3H), 7.42 – 7.10 (m, 11H), 4.64 – 4.49 (m, 2H), 4.06 (q, *J* = 7.1 Hz, 2H), 3.91 (t, *J* = 5.8 Hz, 1H), 3.17 – 2.92 (m, 2H), 2.76 – 2.56 (m, 2H), 2.12 – 1.90 (m, 3H), 1.08 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H).

(S)-Ethyl 2-((S)-2-(((E)-2-cyano-1-(methylthio)-2-(phenylsulfonyl)vinyl)amino)-4-phenylbutanamido)-3-phenylpropanoate



Methode: A

Ansatz:

Substanz	Äquivalente	M [g/mol]	n [mmol]	m [g]	V [mL]
3,3-bis(methylthio)-2-(phenylsulfonyl)acrylonitril	1,0	285,41	1,75	0,500	-
L-hPhe-L-Phe-OMe*TFA	1,00	468,47	1,75	0,821	-
NMM	2,1	101,50	3,68	0,372	0,40

Ausbeute: 0,50 g, 0,84 mmol, 48 %, farbloser Feststoff

SC: Petrolether / Ethylacetat 1:1

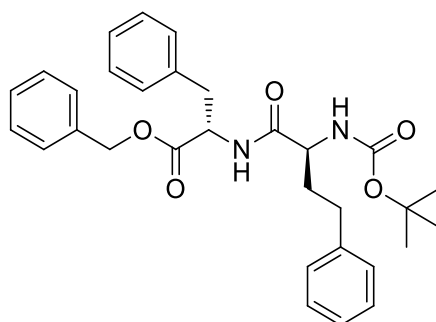
R_F: 0,33 (Ethylacetat/Petrolether 2:1)

Smp.: 56 -57 °C (Petrolether / Ethylacetat)

[α]_D²²: 30° (c = 1, CHCl₃)

¹H NMR: (300 MHz, CD₂Cl₂) δ 8.85 (d, *J* = 6.3 Hz, 1H, H-11), 8.05 – 7.88 (m, 2H, H-Ar), 7.73 – 7.45 (m, 3H, H-Ar), 7.37 – 7.03 (m, 10H, H-Ar), 6.11 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H, H-20), 4.83 (dd, *J* = 13.3, 6.5 Hz, 1H, H-21), 4.43 (dd, *J* = 13.3, 6.8 Hz, 1H, H-16), 4.21 (q, *J* = 7.1 Hz, 2H, H-26), 3.14 (ddd, *J* = 20.5, 14.0, 6.1 Hz, 2H, H-29), 2.64 (t, *J* = 7.7 Hz, 2H, H-22), 2.40 (s, 3H, H-15), 2.29 – 1.95 (m, 2H, H-18), 1.27 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H, H-27).

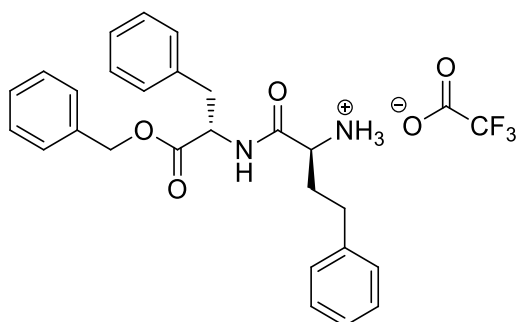
¹³C NMR: (75 MHz, CD₂Cl₂) δ 171.53 (C-12), 169.51 (C-23), 168.83 (C-17), 142.19 (C-4), 140.33 (C-28), 136.26 (C-30), 134.25 (C-1), 129.98 (C-Ar), 129.80 (C-Ar), 129.22 (C-Ar), 129.20 (C-Ar), 128.86 (C-Ar), 127.81 (C-Ar), 127.35 (C-Ar), 127.02 (C-Ar), 116.27 (C-9), 86.75 (C-8), 62.48 (C-26), 59.67 (C-16), 54.00 (C-21), 38.10 (C-29), 35.73 (C-18), 31.51 (C-22), 18.90 (C-15), 14.49 (C-27).

Boc-L-hPhe-L-Phe-OBn**Methode:** B**Ansatz:**

Substanz	Äquivalente	M [g/mol]	n [mmol]	m [g]	V [mL]
<i>Boc-L-hPhe-OH</i>	1,00	279,33	3,90	1,000	-
<i>L-Phe-OBn</i> *HCl	1,00	256,32	3,90	1,09	-
HBTU	1,10	379,24	4,30	1,63	-
DIPEA	3	129,25	11,7	1,51	2,00

Ausbeute: 1,55 g, 3,00 mmol, 77 %, farbloser Feststoff.**SC:** Petrolether/EtOAc 2:1**R_f:** 0,45 (Petrolether/EtOAc 2:1)**¹H NMR:** (300 MHz, CD₂Cl₂) δ 7.43 – 7.10 (m, 14H), 7.09 – 6.99 (m, 2H), 6.48 (d, J = 7.3 Hz, 1H), 5.13 (s, 2H), 5.03 (d, J = 7.1 Hz, 1H), 4.90 – 4.77 (m, 1H), 4.10 – 3.94 (m, 1H), 3.10 (td, J = 13.9, 6.0 Hz, 2H), 2.61 (t, J = 7.9 Hz, 2H), 2.15 – 1.73 (m, 2H), 1.43 (s, 9H).

H-L-hPhe-L-Phe-OBn*TFA



Methode: E

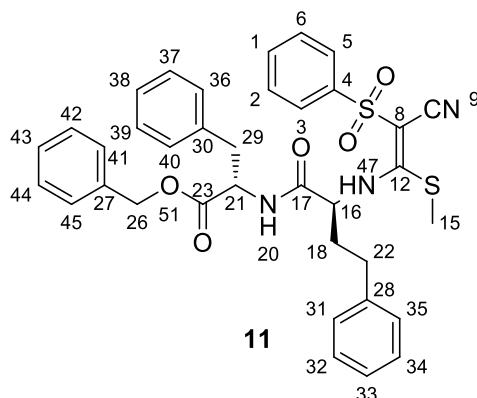
Ansatz:

Substanz	Äquivalente	M [g/mol]	n [mmol]	m [g]	V [mL]
<i>Boc-L-hPhe-L-Phe-OBn</i>	1,00	516,63	3,00	1,55	-

Ausbeute: 1,28 g, 2,73 mmol, 95 %, farbloser Feststoff

¹H NMR: (300 MHz, CD₂Cl₂) δ 7.34 – 7.16 (m, 11H), 7.07 (d, *J* = 6.5 Hz, 2H), 6.99 (dd, *J* = 6.1, 2.8 Hz, 2H), 6.83 (d, *J* = 7.2 Hz, 1H), 5.18 – 4.95 (m, 2H), 4.78 (pq, *J* = 6.4 Hz, 1H), 4.01 (pt, *J* = 6.3 Hz, 1H), 3.20 – 2.95 (m, 2H), 2.71 – 2.54 (m, 2H), 2.20 – 2.00 (m, 2H).

(S)-Benzyl 2-((S)-2-(((E)-2-cyano-1-(methylthio)-2-(phenylsulfonyl)vinyl)amino)-4-phenylbutan-amido)-3-phenylpropanoat



Methode: A

Ansatz:

Substanz	Äquivalente	M [g/mol]	n [mmol]	m [g]	V [mL]
3,3-bis(methylthio)-2-(phenylsulfonyl)acrylonitril	1,0	285,41	1,75	0,50	-
L-hPhe-L-Phe-OMe*TFA	1,00	532,55	1,75	0,93	-
NMM	2,1	101,50	3,68	0,37	0,40

Ausbeute: 0,58 g, 0,89 mmol, 51 %, farbloser Feststoff

SC: Petrolether/ Ethylacetat 2:1

R_f: 0,56 (Petrolether/ Ethylacetat 2:1)

Smp.: 54 -56 °C

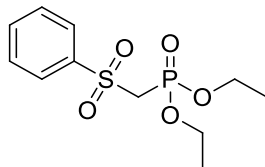
[α]_D²²: -35° (c = 1, CHCl₃)

¹H NMR: (300 MHz, CD₂Cl₂) δ 8.75 (d, J = 7.1 Hz, 1H, H-47), 7.96 – 7.72 (m, 1H, H-Ar), 7.59 – 7.51 (m, 1H, H-Ar), 7.50 – 7.41 (m, 1H, H-Ar), 7.35 – 7.05 (m, 11H, H-Ar), 7.05 – 6.85 (m, 4H, H-Ar), 6.13 (d, J = 7.7 Hz, 1H, H-20), 5.17 – 4.99 (m, 2H, H-26), 4.81 (pq, J = 13.6, 6.6 Hz, 1H, H-21), 4.34 (pq, J = 13.2, 7.1 Hz, 1H, H-16), 3.05 (td, J = 20.7, 14.0, 6.2 Hz, 2H, H-18), 2.63 – 2.40 (m, 2H, H-29), 2.27 (s, 3H, H-15), 2.16 – 1.84 (m, 2H, H-22).

¹³C NMR: (75 MHz, CD₂Cl₂) δ 170.86 (C-12), 169.06 (C-23), 168.34 (C-17), 141.62 (C-4), 139.76 (C-28), 135.53 (C-30), 135.11 (C-Ar), 133.69 (C-Ar), 129.42 (C-Ar), 129.21 (C-Ar), 128.69 (C-Ar), 128.63 (C-Ar), 128.31 (C-Ar), 127.25 (C-Ar), 126.78 (C-Ar), 126.45 (C-Ar), 115.73 (C-9), 86.17 (C-8), 67.56 (C-26), 59.09 (C-16), 54.12 (C-21) 37.45 (C-29), 35.14 (C-18), 30.95 (C-22), 18.31 (C-15)

8.5.2 α -Halogen- und α -H-Vinylsulfone

Diethyl ((phenylsulfonyl)methyl)phosphonat



Ansatz:

Substanz	Äquivalente	M [g/mol]	n [mmol]	m [g]	V [mL]
Methylphenylsulfon	1,00	156,20	24,39	3,81	-
Diethylchlorophosphat	1,10	172,55	26,83	4,63	-
<i>n</i> -BuLi (2,5 M in Hexan)	1,2	2,5 M	29,27	-	11,70

Durchführung:

Zu einer auf $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gekühlten Lösung von Methylphenylsulfon in wasserfreiem THF wird tropfenweise *n*-BuLi in Hexan gegeben. Die Reaktionsmischung wird 30 min bei dieser Temperatur gerührt, bevor tropfenweise Diethylchlorophosphat zugegeben wird. Es wird weitere 2 h gerührt, wobei die Mischung langsam auf Raumtemperatur erwärmt wird. Anschließend werden 50 mL einer ges. NH_4Cl -Lösung zugegeben. Die organische Phase wird abgetrennt und die wässrige Phase 3-mal mit Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Extrakte werden 2-mal mit gesättigter NaCl -Lösung gewaschen und mit Natriumsulfat getrocknet. Das Lösemittel wird im Vakuum entfernt und das Rohprodukt säulenchromatographisch gereinigt.

Ausbeute: 5,11 g, 17,48 mmol, 72 %, farbloses Öl (erstarrt nach mehrtägigem Stehen).

SC: Petrolether/Ethylacetat 1:5

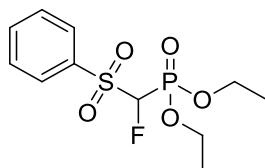
R_f: 0,68 (Petrolether/Ethylacetat 1:5)

FT-IR: $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] = 2987, 2954, 2904, 1475, 1442, 1397, 1306, 1250, 1156, 1115, 1054, 1025, 980, 960, 837, 821, 786, 748.

^1H NMR: (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 8.00 – 7.90 (m, 2H), 7.79 – 7.70 (m, 1H), 7.69 – 7.59 (m, 2H), 4.44 (d, $J = 17.0$ Hz, 2H), 4.10 – 3.88 (m, 4H), 1.15 (t, $J = 7.0$ Hz, 6H).

^{13}C NMR: (75 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 140.48, 140.46, 133.78, 129.01, 127.82, 62.38, 62.30, 52.35, 50.60, 39.52, 16.00, 15.91.

Diethylfluoro(phenylsulfonyl)methylphosphonat



Ansatz:

Substanz	Äquivalente	M [g/mol]	n [mmol]	m [g]	V [mL]
Diethyl((phenylsulfonyl)methyl)phosphonat	1,00	292,29	6,16	1,800	
LiHMDS (1M in THF)	1,25	1 M	7,70	-	7,70
Selectfluor®	1,50	354,26	9,24	3,272	

Durchführung:

Zu einer auf $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gekühlten Lösung von Diethyl((phenylsulfonyl)methyl)phosphonat in wasserfreiem THF wird tropfenweise LiHMDS gegeben. Nach 30 min bei dieser Temperatur, wird Selectfluor® in 10 mL DMF zugegeben und die Reaktionsmischung für 3 h gerührt, wobei langsam auf Raumtemperatur erwärmt wird. Anschließend werden 15 mL einer gesättigten NH_4Cl -Lösung zugegeben und das THF im Vakuum entfernt. Der Rückstand wird 3-mal mit DCM extrahiert und die vereinigten organischen Extrakte werden je 2-mal mit einer gesättigten NaHCO_3 -Lösung und einer gesättigten NaCl -Lösung gewaschen und mit Natriumsulfat getrocknet. Das Lösemittel wird im Vakuum entfernt und das Rohprodukt säulenchromatographisch gereinigt.

Ausbeute: 1,33 g, 4,30 mmol, 82 %, farbloser Feststoff

SC: Petrolether/Ethylacetat 1:6

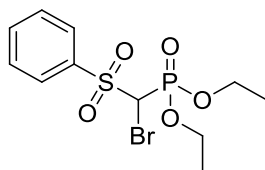
R_F: 0,60 Petrolether/Ethylacetat 1:6

Smp.: $62\text{ }^{\circ}\text{C}$

$^1\text{H NMR}$: (300 MHz, CDCl_3) δ 7.94 (d, $J = 7.5\text{ Hz}$, 2H), 7.67 (m, 1H), 7.54 (t, $J = 7.7\text{ Hz}$, 2H), 5.33 (dd, $J = 45.5, 6.6\text{ Hz}$, 1H), 4.34 – 4.08 (m, 4H), 1.28 (t, $J = 7.1\text{ Hz}$, 6H).

$^{13}\text{C NMR}$: (75 MHz, CDCl_3) δ 136.29, 136.26, 135.11, 129.90, 129.35, 100.01, 97.90, 96.96, 94.85, 77.58, 77.36, 77.16, 76.74, 65.21, 65.12, 65.01, 16.46, 16.38.

Diethyl bromo(phenylsulfonyl)methylphosphonat



Ansatz:

Substanz	Äquivalente	M [g/mol]	n [mmol]	m [g]	V [mL]
Diethyl((phenylsulfonyl)methyl)phosphonat	1,00	292,29	5,40	2,00	-
NaH (60 % in Mineralöl)	1,10	24	5,92	0,237	-
Brom	1,05	159,81	5,67	0,904	0,290

Durchführung:

Zu einer auf 0 °C gekühlten Lösung von Diethyl((phenylsulfonyl)methyl)phosphonat in wasserfreiem THF wird nAtriumhydrid in kleinen Portionen gegeben. Nach 30 min, tropfenweise Brom zugegeben und die Reaktionsmischung für 3 h gerührt. Anschließend werden 10 mL einer Na₂S₂O₃-Lösung (5%) zugegeben und das THF im Vakuum entfernt. Der Rückstand wird 3-mal mit DCM extrahiert und die vereinigten organischen Extrakte werden je 2-mal mit einer gesättigten NaHCO₃-Lösung und einer gesättigten NaCl-Lösung gewaschen und mit Natriumsulfat getrocknet. Das Lösemittel wird im Vakuum entfernt und das Rohprodukt säulenchromatographisch gereinigt.

Ausbeute: 0,602g, 1,62 mmol, 30 %, farbloses Öl

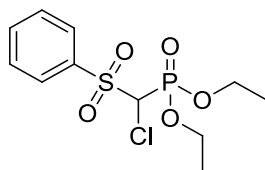
SC: Petrolether/Ethylacetat 5:4

R_f: 0,45 Petrolether/Ethylacetat 5:4

¹H NMR: (300 MHz, DMSO) δ 8.01 – 7.91 (m, 2H), 7.84 – 7.75 (m, 1H), 7.73 – 7.64 (m, 2H), 6.42 (d, *J* = 12.5 Hz, 1H), 4.19 – 4.00 (m, 4H), 1.20 (t, *J* = 7.1 Hz, 6H).

¹³C NMR: (75 MHz, DMSO) δ 137.32, 135.16, 129.99, 129.48, 64.64, 64.55, 54.77, 52.95, 16.52, 16.44.

Diethylchloro(phenylsulfonyl)methylphosphonat



Ansatz:

Substanz	Äquivalente	M [g/mol]	n [mmol]	m [g]	V [mL]
Chloromethylphenylsulfon	1,00	190,65	7,87	1,50	
<i>n</i> -BuLi (2,5 M in Hexan)	2,00	2,50 M	15,74	-	6,29
Diethylchlorophosphat	1,15	172,55	9,05	1,56	1,31

Durchführung:

Die Durchführung erfolgte analog zur Synthese des unchlorierten Phosphonats.

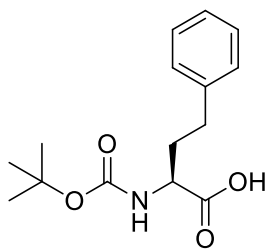
Ausbeute: 1,27 g, 3,89 mmol, 49 %, farbloses Öl.

SC: Petrolether/Ethylacetat 1:5

R_F: 0,63 (Petrolether/Ethylacetat 1:5)

¹H NMR: (300 MHz, Chloroform-*d*) δ 8.11 – 7.94 (m, 2H), 7.79 – 7.67 (m, 1H), 7.62 – 7.54 (m, 2H), 4.88 (d, *J* = 12.9 Hz, 1H), 4.40 – 4.18 (m, 4H), 1.31 – 1.37 (m, 6H).

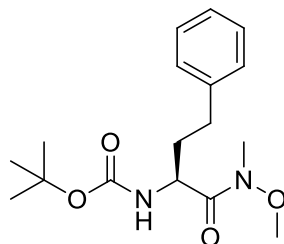
¹³C NMR: (75 MHz, CDCl₃) δ 136.15, 136.13, 134.97, 130.42, 129.03, 67.36, 65.44, 65.40, 65.33, 65.31, 16.46, 16.44, 16.38, 16.35.

Boc-L-hPhe-OH**Methode:** D**Ansatz:**

Substanz	Äquivalente	M [g/mol]	n [mmol]	m [g]	V [mL]
L-Homophenylalanin	1,00	197,22	25,35	5	-
K ₂ CO ₃	1,10	138,21	27,89	3,85	-
Di-tert-butylidicarbonat	1,10	218,25	27,89	6,09	-

Ausbeute: 5,70 g, 20,40 mmol, 81 %, farbloser Feststoff**SC:** DCM/Methanol 19:1**R_f:** 0,20 (DCM/Methanol 19:1)**¹H NMR:** (300 MHz, DMSO) δ 12.47 (s, 1H), 7.39 – 7.07 (m, 6H), 3.83 (m, 1H), 2.77 – 2.53 (m, 2H), 1.87 (m, 2H), 1.37 (s, 9H).**¹³C NMR:** (75 MHz, DMSO) δ 174.21, 155.67, 141.22, 128.41, 128.34, 125.91, 78.03, 67.04, 52.97, 39.52, 32.70, 31.67, 28.24, 25.15.

(S)-tert-Butyl (1-(methoxy(methyl)amino)-1-oxo-4-phenylbutan-2-yl)carbamate



Methode: B

Ansatz:

Substanz	Äquivalente	M [g/mol]	n [mmol]	m [g]	V [mL]
<i>Boc-L-hPhe-OH</i>	1,00	279,33	17,90	5,00	-
<i>N,O</i> -Dimethylhydroxylamin*HCl	1,10	97,54	19,69	1,92	-
TBTU*BF ₄	1,10	321,09	19,69	6,32	-
DIPEA	2,10	129,25	37,59	4,86	6,39

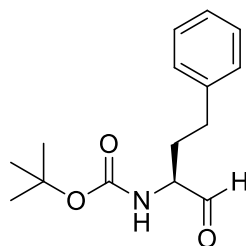
Ausbeute: 5,66 g, 17,54 mmol, 98 %, gelbes Öl

R_f: 0,75 (Petrolether/Ethylacetat 1:2)

FT-IR: $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3312, 2975, 2920, 2351, 1708, 1651, 1489, 1343, 1245, 1168, 990, 755, 701

¹H NMR: (300 MHz, DMSO) δ 7.46 – 7.18 (m, 5H), 5.28 (d, *J* = 9.3 Hz, 1H), 4.73 (s, 1H), 3.67 (s, 3H), 3.21 (s, 3H), 2.88 – 2.61 (m, 2H), 2.18 – 1.79 (m, 2H), 1.52 (s, 9H).

(S)-tert-Butyl (1-oxo-4-phenylbutan-2-yl)carbamat



Methode: F

Ansatz:

Substanz	Äquivalente	M [g/mol]	n [mmol]	m [g]	V [mL]
<i>Boc-L-hPhe-CO-NCH₃-OCH₃</i>	1,00	322,40	17,06	5,50	-
LiAlH ₄	1,25	37,95	21,32	0,81	-

Ausbeute: 4,18 g, 15,87 mmol, 93 %, farbloses Öl, kristallisiert nach einigen Tagen.

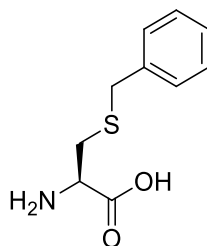
SC: Petrolether/Ethylacetat 2:1

R_F: 0,66 (Petrolether/Ethylacetat 2:1)

¹H NMR: (300 MHz, DMSO) δ 12.47 (s, 1H), 7.39 – 7.07 (m, 6H), 3.83 (m, 1H), 2.77 – 2.53 (m, 2H), 1.87 (m, 2H), 1.37 (s, 9H).

¹³C NMR: (75 MHz, DMSO) δ 174.21, 155.67, 141.22, 128.41, 128.34, 125.91, 78.03, 52.97, 39.52, 32.70, 31.67, 28.24.

(R)-2-Amino-3-(benzylthio)propanoic acid (S-Benzyl-L-cystein)



Ansatz:

Substanz	Äquivalente	M [g/mol]	n [mmol]	m [g]	V [mL]
L-Cystein*HCl	1,00	157,62	32,99	5,20	-
Benzylbromid	1,00	171,04	32,99	5,64	3,92

Durchführung:

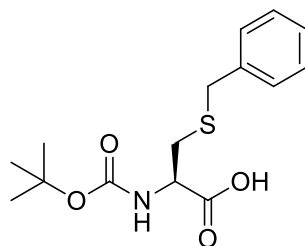
Zu einer Lösung von L-Cystein Hydrochlorid in 60 mL 2 N NaOH und 150 mL Ethanol wird tropfenweise Benzylbromid gegeben. Nach 1 h wird die Reaktionsmischung mit konzentrierter HCl neutralisiert (pH 6-7). Das dabei gebildete Präzipitat wird abfiltriert und sukzessive mit jeweils kaltem Wasser, Ethanol und Diethylether gewaschen. Das Produkt wird als farbloses Pulver erhalten und wird ohne weitere Aufreinigung verwendet.

Ausbeute: 6,37 g, 30,15 mmol, 91 %, farbloser Feststoff

¹H NMR: (300 MHz, D₂O) δ 7.50 – 7.24 (m, 5H), 4.17 (q, *J* = 6.5, 5.2 Hz, 1H), 3.88 – 3.71 (s, 2H), 3.09 – 2.87 (m, 2H).

¹³C NMR: (75 MHz, D₂O) δ 171.7, 138.2, 129.25, 129.07, 127.82, 51.82, 35.47, 30.66.

Boc-S-Benzyl-L-Cystein



Methode: D

Ansatz:

Substanz	Äquivalente	M [g/mol]	n [mmol]	m [g]	V [mL]
S-Benzyl-L-cystein	1,00	211,28	14,20	3,00	-
Di-tert-butylidicarbonat	1,05	218,25	14,91	3,25	-
K ₂ CO ₃	1,50	138,20	21,30	2,94	-

Ausbeute: 3,05 g, 9,80 mmol, 69 %, farbloser Feststoff

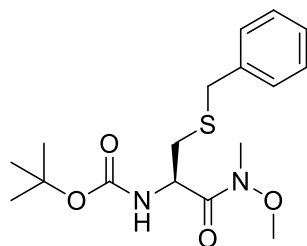
SC: DCM/Methanol 19:1

R_F: 0,33 (DCM/Methanol 19:1)

¹H NMR: (300 MHz, DMSO) δ 7.38 – 7.03 (m, 5H), 4.14 – 4.02 (m, 1H), 3.71 (s, 2H), 2.67 (m, 2H), 1.35 (s, 9H).

¹³C NMR: (75 MHz, DMSO) δ 172.57, 155.41, 138.30, 128.89, 128.39, 126.89, 78.26, 53.17, 39.52, 35.22, 32.36, 28.21.

(R)-tert-Butyl (3-(benzylthio)-1-(methoxy(methyl)amino)-1-oxopropan-2-yl)carbamate



Methode: B

Ansatz:

Substanz	Äquivalente	M [g/mol]	n [mmol]	m [g]	V [mL]
<i>Boc-S-Benzyl-L-Cystein-OH</i>	1,00	311,40	9,63	3,00	-
<i>N,O</i> -Dimethylhydroxylamin*HCl	1,10	97,54	10,60	1,03	-
TBTU*BF ₄	1,10	321,09	10,60	3,40	-
DIPEA	2,10	129,25	20,23	2,62	3,441

Ausbeute: 3,25 g, 9,17 mmol, 95 %, farbloses Öl

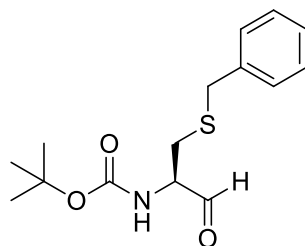
SC: Petrolether/Ethylacetat 1:2

R_F: 0,66 (Petrolether/Ethylacetat 1:2)

¹H NMR: (300 MHz, CDCl₃) δ 7.42 – 7.15 (m, 5H), 5.28 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H), 4.84 – 4.59 (m, 1H), 3.67 (s, 3H), 3.21 (s, 3H), 2.83 – 2.54 (m, 2H), 2.15 – 1.77 (m, 2H), 1.50 (s, 9H).

¹³C NMR: (75 MHz, CDCl₃) δ 173.19, 155.72, 141.28, 128.65, 128.47, 126.09, 61.59, 50.21, 38.80, 34.70, 31.79, 28.48.

(R)-tert-Butyl(1-(benzylthio)-3-oxopropan-2-yl)carbamate



Methode: F

Ansatz:

Substanz	Äquivalente	M [g/mol]	n [mmol]	m [g]	V [mL]
Boc-S-Bn-L-Cys-CO-NCH ₃ -OCH ₃	1,00	354,46	8,46	3,000	-
LiAlH ₄	1,30	37,95	11,00	0,418	-

Ausbeute: 1,70 g, 5,75 mmol, 68 %, farbloses Öl.

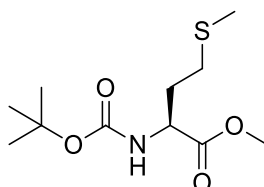
SC: Petrolether/Ethylacetat 2:1

R_f: 0,63 Petrolether/Ethylacetat 2:1

¹H NMR: ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 9.46 (s, 2H), 7.32 – 7.21 (m, 13H), 5.29 (d, *J* = 21.5 Hz, 2H), 4.32 – 4.16 (m, 2H), 3.67 (s, 5H), 2.86 – 2.70 (m, 5H), 1.39 (s, 24H).

¹³C NMR: (75 MHz, CDCl₃) δ 198.84, 137.66, 129.09, 128.83, 127.53, 80.59, 77.16, 59.26, 37.07, 30.83, 28.42.

(S)-Methyl 2-((tert-butoxycarbonyl)amino)-4-(methylthio)butanoat
(Boc-L-Methioninmethylester)



Methode: D

Ansatz:

Substanz	Äquivalente	M [g/mol]	n [mmol]	m [g]	V [mL]
L-Methioninmethylester*HCl	1,00	199,70	12,52	2,500	-
Di-tert-butylidicarbonat	1,05	218,25	13,14	2,869	-
K ₂ CO ₃	1,50	138,20	18,78	2,595	-

Ausbeute: 1,80 g, 6,84 mmol, 55 %, farbloser Feststoff

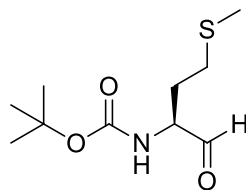
SC: Petrolether/Ethylacetat 2:1

Rf: 0,5 (Petrolether/Ethylacetat 2:1)

¹H NMR: (300 MHz, CDCl₃) δ 5.13 (d, *J* = 6.9 Hz, 1H), 4.35 (d, *J* = 4.9 Hz, 1H), 3.68 (s, 3H), 2.47 (t, *J* = 7.5 Hz, 2H), 2.03 (s, 3H), 2.17 – 1.77 (m, 2H), 1.46 (s, 3H), 1.38 (s, 9H).

¹³C NMR: (75 MHz, CDCl₃) δ 155.38, 146.78, 80.03, 77.16, 52.78, 52.44, 32.19, 30.01, 28.34, 27.45, 15.50.

(S)-tert-Butyl (4-(methylthio)-1-oxobutan-2-yl)carbamat



Ansatz:

Substanz	Äquivalente	M [g/mol]	n [mmol]	m [g]	V [mL]
Boc-L-Methionin-OMe	1,00	263,35	6,83	1,800	-
DiBAL-H (1 M in Toluol)	2,00	1 M	13,67	-	13,63

Durchführung:

Zu einer auf $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gekühlten Lösung von Boc-L-Methionin-OMe in wasserfreiem Toluol wird tropfenweise Diisobutylaluminiumhydrid (1 M Lösung in Toluol) gegeben. Es wird 2 Stunden bei dieser Temperatur gerührt bevor Essigsäure (20 mL, 5 M in Toluol) zugegeben wird. Die Reaktionsmischung wird anschließend in 20 mL Weinsäurelösung (10 %) gegossen und mit 3-mal mit Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Extrakte werden mit einer ges. NaCl-Lösung gewaschen, mit Natriumsulfat getrocknet und das Lösemittel im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wird säulenchromatographisch gereinigt.

Ausbeute: 0,75 g, 3,21 mmol, 47 %, farbloser Feststoff

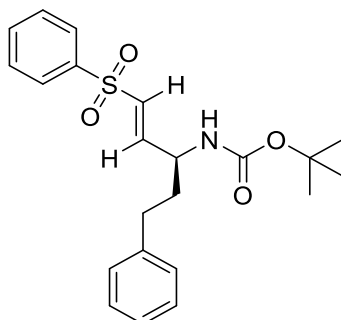
SC: Petrolether/Ethylacetat 2:1

R_f: 0,33 (Petrolether/Ethylacetat 2:1)

¹H NMR: ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 9.63 (s, 1H), 5.21 (s, 1H), 4.30 (d, *J* = 5.1 Hz, 1H), 2.56 (t, *J* = 7.3 Hz, 2H), 2.07 (s, 3H), 2.32 – 1.82 (m, 2H), 1.44 (s, 9H).

¹³C NMR: (75 MHz, CDCl₃) δ 199.22, 155.63, 80.40, 77.16, 59.16, 29.94, 28.86, 28.39, 15.49.

(S,E)-tert-Butyl (5-phenyl-1-(phenylsulfonyl)pent-1-en-3-yl)carbamate



Methode: G

Ansatz:

Substanz	Äquivalente	M [g/mol]	n [mmol]	m [g]	V [mL]
Diethyl ((phenylsulfonyl)methyl)phosphonat	1,00	292,29	1,71	0,500	
LiHMDS (1M in THF)	1,10	1M	1,88	-	1,88
BOC-L-hPhe-CHO	1,10	263,34	1,88	0,496	

Ausbeute: 0,35 g, 0,87 mmol, 51 %, farbloser Feststoff

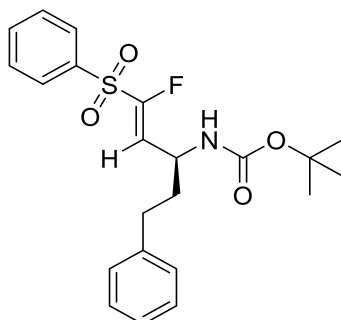
SC: Petrolether/Ethylacetat 2:1

R_f: 0,45 (Petrolether/Ethylacetat 2:1)

¹H NMR: (300 MHz, Chloroform-*d*) δ 7.87 (m, 2H), 7.64-7.59 (m, 1H), 7.55-7.50 (m, 2H), 7.31-7.12 (m, 5H), 6.89 (dd, J = 15.1 Hz, J = 4.7 Hz), 6.42 (d, J = 15.1 Hz), 4.54 (s, 1H), 4.44-4.29 (m, 1H), 2.76-2.59 (m, 2H), 1.99-1.76 (m, 2H), 1.39 (s, 9H).

¹³C NMR: (75 MHz, CDCl₃) δ 155.08, 147.34, 141.14, 140.32, 133.68, 129.87, 129.62, 128.33, 128.31, 127.14, 125.89, 78.24, 50.42, 34.82, 31.52, 28.12.

(S,E)-tert-Butyl (1-fluoro-5-phenyl-1-(phenylsulfonyl)pent-1-en-3-yl)carbamate



Methode: G

Ansatz:

Substanz	Äquivalente	M [g/mol]	n [mmol]	m [g]	V [mL]
Diethyl(fluoro(phenylsulfonyl)methyl)phosphonat	1,00	310,28	3,71	1,150	-
LiHMDS (1M in THF)	1,05	1 M	3,89	-	3,89
BOC-L-hPhe-CHO	1,00	263,33	3,71	0,976	-

Ausbeute: 0,87 g, 2,07 mmol, 56 %, farbloser Feststoff

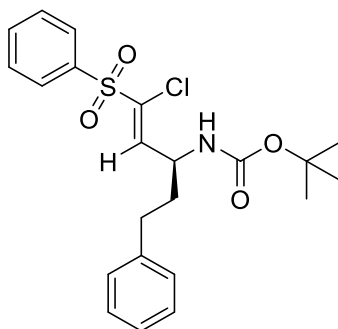
SC: Petrolether/Ethylacetat 3:1

R_f: 0,40 (Petrolether/Ethylacetat 3:1)

¹H NMR: (300 MHz, Chloroform-*d*) δ 7.95 (*pt*, *J* = 8.2 Hz, 2H), 7.77 – 7.52 (m, 4H), 7.32 – 7.05 (m, 5H), 6.19 (d, *J* = 30.7 Hz, 1H), 4.67 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H), 4.46 (br m, 1H), 2.54 – 2.70 (m, 2H), 1.82 – 1.97 (m, 2H), 1.38 (s, 9H).

¹³C NMR: (75 MHz, CDCl₃) δ 154.82, 140.37, 137.13, 134.84, 134.55, 129.49, 129.05, 128.68, 128.58, 128.30, 126.29, 118.37, 118.31, 77.47, 77.25, 77.05, 76.62, 46.33, 36.07, 31.83, 28.21.

(S,Z)-tert-Butyl (1-chloro-5-phenyl-1-(phenylsulfonyl)pent-1-en-3-yl)carbamate



Methode: G

Ansatz:

Substanz	Äquivalente	M [g/mol]	n [mmol]	m [g]	V [mL]
Diethyl(chloro(phenylsulfonyl)methyl)phosphonat	1,00	326,73	3,83	1,25	-
LiHMDS (1M in THF)	1,05	1 M	4,02	-	4,02
BOC-L-hPhe-CHO	1,00	263,33	3,83	1,00	-

Ausbeute: 0,99 g, 2,27 mmol, 59 %, farbloser Feststoff

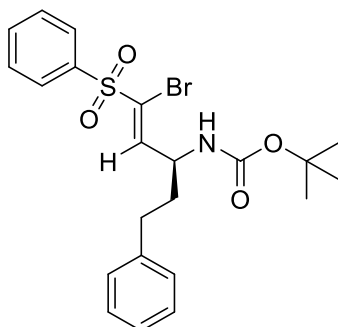
SC: Petrolether/Ethylacetat 3:1

R_F: 0,40 (Petrolether/Ethylacetat 3:1)

¹H NMR: (300 MHz, CD₂Cl₂) δ 7.96 – 7.85 (m, 2H), 7.77 – 7.64 (m, 1H), 7.64 – 7.51 (m, 2H), 7.32 – 7.23 (m, 2H), 7.22 – 7.13 (m, 3H), 7.09 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H), 4.79 (s, 1H), 4.39 (s, 1H), 2.81 – 2.50 (m, 2H), 1.98 – 1.72 (m, 2H), 1.40 (s, 9H).

¹³C NMR: (75 MHz, CD₂Cl₂) δ 155.35, 141.17, 137.67, 134.82, 133.62, 129.86, 129.36, 129.02, 128.87, 126.73, 54.00, 50.18, 35.66, 32.23, 28.53.

(S,Z)-tert-Butyl (1-bromo-5-phenyl-1-(phenylsulfonyl)pent-1-en-3-yl)carbamat



Methode: G

Ansatz:

Substanz	Äquivalente	M [g/mol]	n [mmol]	m [g]	V [mL]
Diethyl(bromo(phenylsulfonyl)methyl)phosphonat	1,00	371,18	0,91	0,336	-
LiHMDS (1M in THF)	1,10	1 M	1,00	-	1,0
BOC-L-hPhe-CHO	1,00	263,33	0,91	0,238	-

Ausbeute: 238 mg, 0,50 mmol, 54 %, farbloser Feststoff

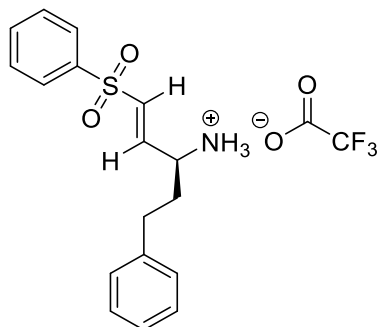
SC: Petrolether/Ethylacetat 5:2

R_f: 0,64 (Petrolether/Ethylacetat 5:2)

¹H NMR: (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8.03 (m, 2H), 7.80 (m, 1H), 7.67 (m, 2H), 7.24 (m, 6H), 6.68 (d, *J* = 9.7 Hz, 1H), 5.53 – 5.31 (m, 1H), 2.83 – 2.54 (m, 2H), 1.94 – 1.62 (m, 2H), 1.42 (s, 9H).

¹³C NMR: (75 MHz, DMSO-*d*₆) δ 149.83, 141.62, 137.86, 135.26, 130.01, 128.95, 128.79, 128.75, 126.35, 78.94, 36.42, 31.88, 28.63, 14.56.

(S,E)-5-Phenyl-1-(phenylsulfonyl)pent-1-en-3-aminium trifluoroacetat



Methode: E

Ansatz:

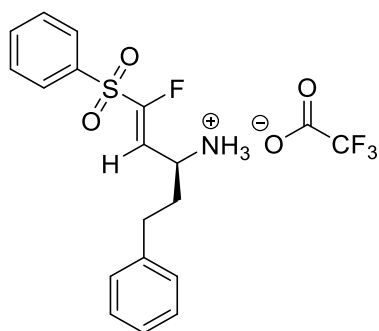
Substanz	Äquivalente	M [g/mol]	n [mmol]	m [g]	V [mL]
VS-Boc-L-hPhe	1,00	401,52	0,97	0,35	-

Ausbeute: 391 mg, 0,94 mmol, 97 %, farbloser Feststoff

¹H NMR: (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8.35 (s, 3H), 7.98 – 7.85 (m, 2H), 7.83 – 7.73 (m, 1H), 7.74 – 7.63 (m, 2H), 7.37 – 7.24 (m, 2H), 7.25 – 7.08 (m, 4H), 6.88 (dd, *J* = 15.2, 6.9 Hz, 1H), 4.00 (bs, 1H), 2.60 – 2.51 (m, 2H), 2.12 – 1.83 (m, 2H).

¹³C NMR (75 MHz, DMSO) δ 158.85, 141.32, 140.69, 140.01, 134.55, 134.39, 130.22, 128.96, 128.62, 127.87, 126.66, 115.20, 50.63, 33.97, 30.96, 15.63.

(S,E)-1-Fluoro-5-phenyl-1-(phenylsulfonyl)pent-1-en-3-aminium trifluoroacetate



Methode: E

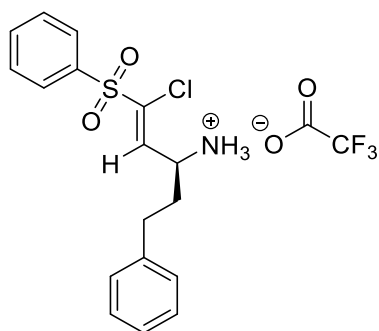
Ansatz:

Substanz	Äquivalente	M [g/mol]	n [mmol]	m [g]	V [mL]
<i>F-VS-Boc-L-hPhe</i>	1,00	419,16	2,08	0,87	-

Ausbeute: 884 mg, 2,04 mmol, 98 %, farbloser Feststoff

¹H NMR: (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8.17 (s, 3H), 8.02 – 7.91 (m, 2H), 7.89 – 7.78 (m, 1H), 7.74 – 7.68 (m 2H), 7.21 – 7.11 (m, 3H), 7.04 – 6.94 (m, 2H), 6.38 (dd, *J* = 32.5, 9.8 Hz, 1H), 3.95 (m, 1H), 2.41 – 2.25 (m, 2H), 1.94 (m, 2H).

(S,Z)-1-Chloro-5-phenyl-1-(phenylsulfonyl)pent-1-en-3-aminium trifluoroacetat



Methode: E

Ansatz:

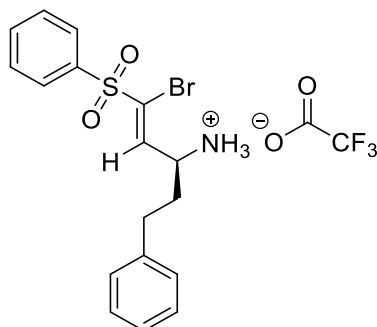
Substanz	Äquivalente	M [g/mol]	n [mmol]	m [g]	V [mL]
<i>Cl-VS-Boc-L-hPhe</i>	1,00	435,96	1,15	0,50	-

Ausbeute: 500 mg, 1,11 mmol, 97 %, farbloser Feststoff

¹H NMR: (300 MHz, Chloroform-*d*) δ 8.25 (s, 3H), 7.94 – 7.85 (m, 2H), 7.76 – 7.64 (m, 1H), 7.62 – 7.49 (m, 2H), 7.42 (d, *J* = 9.2 Hz, 1H), 7.24 – 7.11 (m, 3H), 7.05 – 7.02 (m, 2H), 4.30 – 4.16 (m, 1H), 2.61 (t, *J* = 7.9 Hz, 2H), 2.40 – 2.07 (m, 2H).

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 161.74, 161.23, 138.81, 138.16, 135.54, 135.16, 133.57, 129.71, 129.26, 128.87, 128.27, 126.84, 77.16, 50.34, 33.85, 31.14.

(S,Z)-1-Bromo-5-phenyl-1-(phenylsulfonyl)pent-1-en-3-aminium trifluoroacetat



Methode: E

Ansatz:

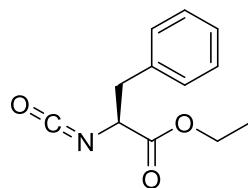
Substanz	Äquivalente	M [g/mol]	n [mmol]	m [g]	V [mL]
Br-VS-Boc-L-hPhe	1,00	480,42	0,50	0,238	-

Ausbeute: 242 mg, 0,49 mmol, 99 %, farbloser Feststoff

¹H NMR: (300 MHz, Methylene Chloride-*d*₂) δ 8.02 – 7.78 (m, 2H), 7.75 – 7.60 (m, 2H), 7.55 (pt, *J* = 7.7 Hz, 2H), 7.25 – 7.11 (m, 3H), 7.11 – 7.00 (m, 2H), 4.14 (pq, *J* = 7.6 Hz, 1H), 2.86 – 2.46 (m, 2H), 2.39 – 1.97 (m, 2H).

¹³C NMR (75 MHz, CD₂Cl₂) δ 139.81, 138.65, 136.40, 135.33, 130.03, 129.70, 129.34, 129.15, 128.76, 127.04, 52.69, 34.34, 31.50.

(S)-Ethyl 2-isocyanato-3-phenylpropanoat



Ansatz:

Substanz	Äquivalente	M [g/mol]	n [mmol]	m [g]	V [mL]
L-Phenylalaninethylester*HCl	1,00	215,68	9,27	2,00	-
Triphosgen	0,33	296,75	3,09	0,92	

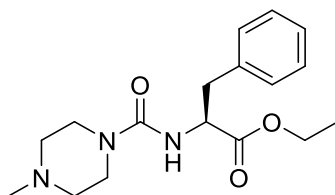
Durchführung:

Zu einer Suspension von L-Phenylalaninmethylester Hydrochlorid in DCM werden 25 mL einer ges. NaHCO₃-Lösung gegeben. Bei 0 °C wird Triphosgen zugegeben und die Reaktionsmischung 30 Minuten bei dieser Temperatur gerührt. Die organische Phase wird abgetrennt und die wässrige Phase 3-mal mit DCM extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden mit einer ges. NaCl-Lösung gewaschen, mit Natriumsulfat getrocknet und das Lösemittel im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt, welches als farbloses Öl erhalten wurde, wird ohne weitere Aufreinigung in der nächsten Stufe umgesetzt.

Ausbeute: 1,85 g, 9,02 mmol, 97 %, farbloses Öl.

Die Verbindung wurde aufgrund ihrer Reaktivität ohne genauere Charakterisierung in der nächsten Stufe eingesetzt, wobei von einer quantitativen Umsetzung ausgegangen wurde.

Ethyl (4-methylpiperazin-1-carbonyl)-L-phenylalaninat



Ansatz:

Substanz	Äquivalente	M [g/mol]	n [mmol]	m [g]	V [mL]
(S)-Ethyl 2-isocyanato-3-phenylpropanoat	1,00	205,21	9,02	1,85	-
N-Methylpiperazin	1,05	100,16	9,50	0,95	1,05
DIPEA	2	129,25	18,03	2,33	3,10

Durchführung:

Zu einer Lösung von (S)-Methyl 2-isocyanato-3-phenylpropanoat und DIPEA in wasserfreiem THF wird bei 0°C tropfenweise N-Methylpiperazin gegeben. Die Reaktionsmischung wird 12 h gerührt bevor das Lösemittel im Vakuum entfernt wird. Der ölige Rückstand wird in Wasser aufgenommen und 3-mal mit Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Extrakte werden mit einer ges. NaHCO₃-Lösung und einer ges. NaCl-Lösung gewaschen, mit Natriumsulfat getrocknet und das Lösemittel wird im Vakuum entfernt.

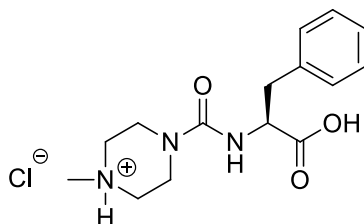
Ausbeute: 2,55 g, 8,35 mmol, 91 %, farbloser Feststoff.

SC: Dichlormethan / Methanol 9:1

R_F: 0,21 DCM / Methanol 9:1

¹H NMR: (300 MHz, Chloroform-*d*) δ 7.34 – 7.22 (m, 3H), 7.16 – 7.06 (m, 2H), 4.92 (d, *J* = 7.5 Hz, 1H), 4.77 (dt, *J* = 7.5, 5.8 Hz, 1H), 4.17 (q, *J* = 7.1 Hz, 2H), 3.48 – 3.28 (m, 4H), 3.12 (d, *J* = 5.8 Hz, 2H), 2.39 (t, *J* = 5.2 Hz, 4H), 2.32 (s, 3H), 1.25 (t, *J* = 7.2 Hz, 3H).

(S)-4-((1-Carboxy-2-phenylethyl)carbamoyl)-1-methylpiperazin-1-ium chlorid



Ansatz:

Substanz	Äquivalente	M [g/mol]	n [mmol]	m [g]	V [mL]
Ethyl (4-methylpiperazine-1-carbonyl)-L-phenylalaninat	1,00	305,72	8,36	2,55	-
LiOH x H ₂ O	3,50	41,96	29,19	1,22	-

Durchführung:

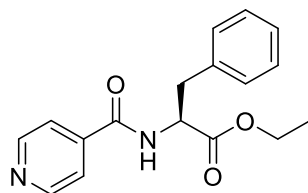
Zu einer Lösung von Methyl (4-methylpiperazine-1-carbonyl)-L-phenylalaninat in THF wird Lithiumhydroxid gegeben und die Reaktionsmischung wird 18 h bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösemittel wird im Vakuum entfernt und der Rückstand in wenig Wasser aufgenommen. Der pH-Wert der Lösung wird mit 1 M HCl auf 2 eingestellt. Das Produkt wird bei 4 °C kristallisiert, wobei auch etwas LiCl auskristallisiert. Dieses wird durch mehrmaliges Umkristallisieren aus Methanol entfernt.

Ausbeute: 2,60 g, 7,94 mmol, 95%, farbloser Feststoff.

¹H NMR: (300 MHz, DMSO) δ 7.33 – 7.05 (m, 5H), 6.68 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H), 5.55 (s, br, 2H), 4.28 – 4.09 (m, 1H), 3.50 – 3.16 (m, 4H), 2.98 (ddd, *J* = 23.1, 13.5, 7.1 Hz, 2H), 2.46 – 2.30 (m, 4H), 2.25 (s, 3H).

¹³C NMR: (75 MHz, DMSO) δ 174.63, 157.14, 138.96, 129.37, 128.01, 126.11, 56.01, 53.71, 44.81, 42.73, 39.52, 36.89.

Ethyl isonicotinoyl-L-phenylalaninat



Ansatz:

Substanz	Äquivalente	M [g/mol]	n [mmol]	m [g]	V [mL]
L-Phenylalaninethylester*HCl	1,0	229,70	10,88	2,50	-
Isonicotinoylchlorid*HCl	1,0	178,02	10,88	1,94	-
Triethylamin	3,0	101,19	32,65	3,30	4,54

Durchführung:

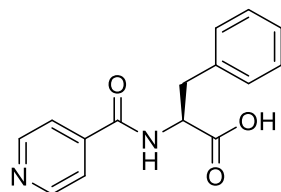
Zu einer Lösung von L-Phenylalaninethylester*HCl und Triethylamin in DCM wird in kleinen Portionen Isonicotinoylchlorid*HCl gegeben. Die Reaktionsmischung wird 3 h gerührt und anschließend mit einer ges. NaHCO₃-Lösung gewaschen. Die organische Phase wird mit Natriumsulfat getrocknet und das Lösemittel im Vakuum entfernt. Das Produkt wird ohne weitere Aufreinigung in der nächsten Stufe eingesetzt.

Ausbeute: 2,84 g, 9,52 mmol, 87%, gelbes Öl (kristallisiert nach mehreren Tagen).

¹H NMR: (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 9.18 (d, *J* = 7.7 Hz, 1H), 8.73 (d, *J* = 5.2 Hz, 2H), 7.69 (d, *J* = 5.2 Hz, 2H), 7.37 – 7.12 (m, 5H), 4.75 – 4.57 (m, 1H), 4.10 (q, *J* = 7.1 Hz, 2H), 3.05 – 3.21 (m, 2H), 1.14 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H).

¹³C NMR: (75 MHz, DMSO) δ 171.32, 164.99, 150.31, 140.59, 137.43, 129.10, 128.28, 126.58, 121.29, 60.74, 54.42, 45.70, 39.52, 36.22, 14.00.

Isonicotinoyl-L-phenylalanin



Ansatz:

Substanz	Äquivalente	M [g/mol]	n [mmol]	m [g]	V [mL]
Methyl (4-methylpiperazine-1-carbonyl)-L-phenylalaninat	1,00	298,34	9,52	2,84	-
LiOH x H ₂ O	3,00	41,96	28,6	1,20	-

Durchführung:

Zu einer Lösung von Ethyl isonicotinoyl-L-phenylalaninat in einer Mischung aus THF (30 mL) und Wasser (30 mL) wird Lithiumhydroxid gegeben und die Reaktionsmischung wird 2 h bei Raumtemperatur gerührt. Das organische Lösemittel wird im Vakuum entfernt und die wässrige Phase mit 1 M HCl neutralisiert. Das Produkt wird bei 4 °C kristallisiert, wobei auch etwas LiCl auskristallisiert. Dieses wird durch mehrmaliges Umkristallisieren aus Methanol entfernt.

Ausbeute: 1,59 g, 5,88 mmol, 62 %, farblose Kristalle

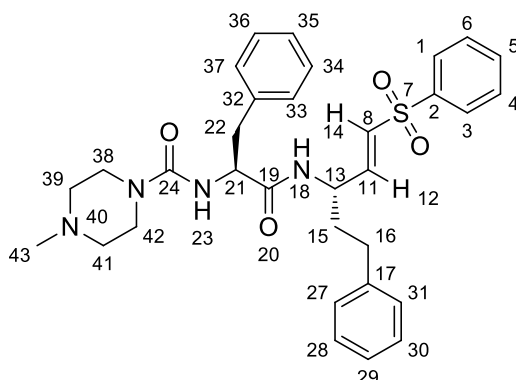
R_f: 0,1 DCM/MeOH 9:1

¹H NMR: (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8.76 – 8.57 (m, 2H), 8.22 (d, *J* = 7.3 Hz, 1H), 7.71 – 7.57 (m, 2H), 7.25 – 6.99 (m, 5H), 4.26 (td, *J* = 7.4, 4.6 Hz, 1H), 3.27 – 2.95 (m, 3H).

¹³C NMR: (75 MHz, DMSO) δ 171.94, 163.41, 150.17, 142.06, 139.49, 129.37, 127.69, 125.64, 120.99, 56.14, 37.24.

K11777

4-methyl-N-((S)-1-oxo-3-phenyl-1-(((S,E)-5-phenyl-1-(phenylsulfonyl)pent-1-en-3-yl)amino)propan-2-yl)piperazin-1-carboxamid



Methode: C

Ansatz:

Substanz	Äquivalente	M [g/mol]	n [mmol]	m [g]	V [mL]
VS(H)-hPhe*TFA	1,00	415,43	1,20	0,50	
MePip-CO-L-Phe-COOH*HCl	1,50	270,28	1,81	0,49	
PPA (50% in DMF)	3,00	318,20	3,61	2,30	
DIPEA	4,50	129,25	5,42	0,70	0,92

Ausbeute: 0,48 g, 0,84 mmol, 70 %, farbloser Feststoff

SC: DCM / Methanol 19:1

R_f: 0,45 (DCM / Methanol 19:1)

Smp.: 74 -76 °C (MeOH/DCM)

[α]_D²²: -2° (c = 1, CHCl₃)

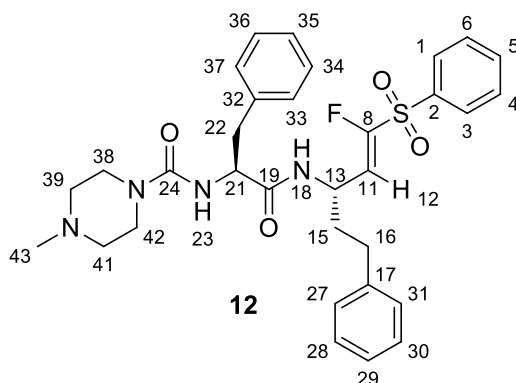
FT-IR: 3280, 3060, 3026, 2928, 2854, 2792, 1661, 1618, 1531, 1496, 1445, 1409, 1291, 1262, 1237, 1143, 1085, 1000, 748, 719, 698, 687.

¹H NMR: (300 MHz, Chloroform-*d*) δ 7.92 – 7.77 (m, 2H, H-Ar), 7.70 – 7.46 (m, 3H, H-Ar), 7.26 – 7.12 (m, 8H, H-Ar), 7.11 – 6.94 (m, 2H, H-Ar), 6.78 (dd, *J* = 15.0, 4.7 Hz, 1H, H-14), 6.37 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H, H-18), 6.10 (dd, *J* = 15.1, 1.7 Hz, 1H, H-12), 4.94 (d, *J* = 7.2 Hz, 1H, H-23), 4.70 – 4.53 (m, 1H, H-13), 4.44 (pq, *J* = 7.5 Hz, 1H, H-21), 3.28 – 3.36 (m, 4H, H-38, H-42), 3.03 (d, *J* = 7.4 Hz, 2H, H-22), 2.68 – 2.46 (m, 2H, H-16), 2.42 – 2.32 (m, 4H, H-39, H-41), 2.28 (s, 3H, H-43), 1.98 – 1.58 (m, 2H, H-15).

¹³C NMR: (75 MHz, Chloroform-*d*) δ 171.80 (C-19), 157.10 (C-24), 145.58 (C-8), 140.54 (C-2), 140.33 (C-17), 136.86 (C-32), 133.61 (C-5), 130.70 (C-11), 129.43 (C-Ar), 129.32 (C-Ar), 128.99 (C-Ar), 128.73 (C-Ar), 128.50 (C-Ar), 127.81 (C-Ar), 127.36 (C-Ar), 126.44 (C-Ar), 56.32 (C-21), 54.52 (C-39, C-41), 49.24 (C-13), 46.02 (C-43) 43.76 (C-38, C-42), 38.19 (C-22), 35.83 (C-15), 31.88 (C-16).

HR-MS (ESI⁺): *m/z* ber. [M+Na]⁺: 597.2511, gef.: 597.2497

***N*-((*S*)-1-(((*S,E*)-1-fluoro-5-phenyl-1-(phenylsulfonyl)pent-1-en-3-yl)amino)-1-oxo-3-phenylpropan-2-yl)-4-methylpiperazin-1-carboxamid (*Verbindung 12*)**



Methode: C

Ansatz:

Substanz	Äquivalente	M [g/mol]	n [mmol]	m [g]	V [mL]
<i>VS(F)-hPhe</i> *TFA	1,00	433,42	0,43	0,188	-
MePip-CO- <i>L</i> -Phe-COOH*HCl	1,50	327,81	0,65	0,213	-
PPA (50% in DMF)	3,00	318,20	1,30	0,828	-
DIPEA	4,50	129,25	1,95	0,252	0,332

Ausbeute: 156 mg, 0,26 mmol, 61 %, farbloser Feststoff

SC: DCM / Methanol 9:1

R_f: 0,40 (DCM / Methanol 9:1)

Smp.: 100 – 101 °C

[α]_D²²: 3° (c = 0,33, CHCl₃)

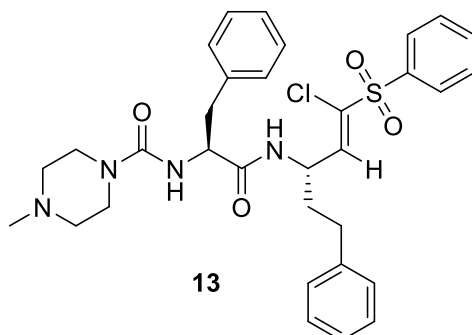
FT-IR: 3267, 3061, 3028, 2936, 2855, 2794, 1657, 1617, 1584, 1537, 1496, 1413, 1334, 1292, 1263, 1237, 1160, 1084, 1030, 1001, 749, 720, 699, 685.

¹H NMR: (300 MHz, CD₂Cl₂) δ 8.02 – 7.85 (m, 2H, H-Ar), 7.78 – 7.68 (m, 1H, H-Ar), 7.66 – 7.57 (m, 2H, H-Ar), 7.33 – 7.11 (m, 8H, H-Ar), 7.10 – 6.97 (m, 3H, H-Ar), 6.04 (dd, *J* = 32.4, 8.8 Hz, 1H, H-12), 5.12 (d, *J* = 7.7 Hz, 1H, H-18), 4.69 – 4.55 (m, 2H, H-21, H-13), 3.34 – 3.21 (m, 4H, H-38, H-42), 3.10 – 2.90 (m, 2H, H-22), 2.55 – 2.30 (m, 2H, H-16), 2.34 – 2.24 (m, 4H, H-39, H-41), 2.22 (s, 3H, H-43), 1.92 – 1.68 (m, 2H, H-15).

¹³C NMR: (75 MHz, CD₂Cl₂) δ 172.21 (C-19), 157.55 (C-24), 157.00, 153.04 (C-8), 141.17 (C-2), 137.75 (C-17), 137.68 (C-32), 135.19 (C-5), 130.12 (C-Ar), 129.93 (C-Ar), 129.11 (C-Ar), 128.95 (C-Ar), 128.84 (C-Ar), 127.41 (C-Ar), 126.63 (C-Ar), 118.53 (C-11), 56.25 (C-21), 55.01 (C-39, C-41), 46.31 (C-43), 45.12 (C-38), 45.09 (C-42), 44.28 (C-13), 38.96 (C-22), 36.18 (C-15), 32.15 (C-16).

HR-MS (ESI⁺): *m/z* ber. [M+Na]⁺: 615.2417, gef.: 615.2413

***N*-((*S*)-1-(((*S*,*Z*)-1-chloro-5-phenyl-1-(phenylsulfonyl)pent-1-en-3-yl)amino)-1-oxo-3-phenylpropan-2-yl)-4-methylpiperazin-1-carboxamid (*Verbindung 13*)**



Methode: C

Ansatz:

Substanz	Äquivalente	M [g/mol]	n [mmol]	m [g]	V [mL]
<i>VS(Cl)-hPhe</i> *TFA	1,00	449,87	0,67	0,300	-
MePip-CO- <i>L</i> -Phe-COOH*HCl	1,30	327,81	0,87	0,284	-
PPA (50% in DMF)	3,00	318,20	2,00	1,273	-
DIPEA	4,50	129,25	3,00	0,388	0,510

Ausbeute: 295 mg, 0,48 mmol, 73 %, farbloser Feststoff

SC: DCM / Methanol 9:1

R_F: 0,45 (DCM / Methanol 9:1)

Smp.: 92 – 95 °C

[α]_D²²: 6° (c = 1, CHCl₃)

FT-IR: 3270, 3061, 3028, 2936, 2853, 2793, 1657, 1617, 1584, 1537, 1496, 1447, 1412, 1333, 1292, 1262, 1237, 1159, 1085, 1030, 1001, 749, 699, 686.

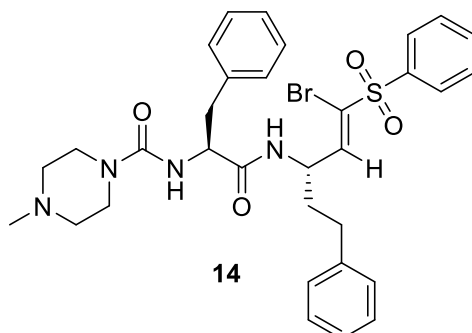
¹H NMR: (300 MHz, CD₂Cl₂) δ 7.97 – 7.84 (m, 2H), 7.73 – 7.66 (m, 1H), 7.65 – 7.54 (m, 2H), 7.36 – 7.01 (m, 11H), 6.96 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H), 5.10 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H), 4.69 – 4.44 (m, 2H), 3.36 – 3.32 (m, 4H), 3.15 – 2.93 (m, 2H), 2.60 – 2.41 (m, 2H), 2.33 – 2.26 (m, 4H), 2.22 (s, 3H), 1.93 – 1.73 (m, 2H).

¹³C NMR: (75 MHz, CD₂Cl₂) δ 172.36, 157.57, 141.16, 140.36, 137.67, 137.63, 134.84, 133.84, 129.92, 129.87, 129.36, 129.18, 128.97, 128.87, 127.46, 126.67, 56.25, 54.00, 48.86, 46.33, 44.31, 38.92, 35.39, 32.10.

Zuordnung der Signale analog zu Verbindung 12.

HR-MS (ESI⁺): *m/z* ber. [M+Na]⁺: 631.2122, gef.: 631.2126

***N*-((*S*)-1-(((*S,Z*)-1-bromo-5-phenyl-1-(phenylsulfonyl)pent-1-en-3-yl)amino)-1-oxo-3-phenylpropan-2-yl)-4-methylpiperazin-1-carboxamid (*Verbindung 14*)**



Methode: C

Ansatz:

Substanz	Äquivalente	M [g/mol]	n [mmol]	m [g]	V [mL]
VS(Br)-hPhe*TFA	1,00	494,32	0,57	0,283	-
MePip-CO-L-Phe-COOH*HCl	1,50	327,81	0,87	0,282	-
PPA (50% in DMF)	3,00	318,20	1,72	1,093	-
DIPEA	4,50	129,25	2,58	0,333	0,76

Ausbeute: 97 mg, 0,15 mmol, 26 %, farbloser Feststoff.

SC: DCM / Methanol 9:1

R_f: 0,47 (DCM / Methanol 9:1)

Smp.: 97 – 98 °C (DCM / Methanol)

[α]_D²²: 5° (c = 1, CHCl₃)

FT-IR: 3260, 3060, 3027, 2930, 2852, 2762, 1660, 1616, 1538, 1496, 1446, 1413, 1326, 1292, 1261, 1153, 1085, 1001, 866, 749, 720, 698, 686.

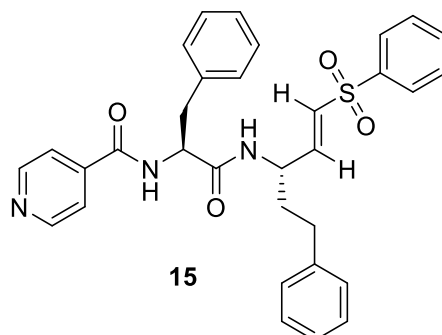
¹H NMR: (300 MHz, CD₂Cl₂) δ 7.94 – 7.83 (m, 2H), 7.74 – 7.63 (m, 1H), 7.63 – 7.51 (m, 2H), 7.36 – 7.01 (m, 12H), 5.05 (d, *J* = 7.4 Hz, 1H), 4.67 – 4.40 (m, 2H), 3.36 – 3.32 (m, 4H), 3.16 – 2.94 (m, 2H), 2.69 – 2.41 (m, 2H), 2.35 – 2.24 (m, 4H), 2.22 (s, 3H), 1.88 – 1.74 (m, 2H).

¹³C NMR: (75 MHz, CD₂Cl₂) δ 172.41, 157.62, 144.42, 141.18, 137.72, 134.72, 129.94, 129.91, 129.82, 129.46, 129.22, 128.99, 128.94, 127.48, 126.70, 124.67, 56.26, 54.00, 51.10, 46.36, 44.35, 38.83, 35.23, 32.09.

Zuordnung der Signale analog zu Verbindung 12.

HR-MS (ESI⁺): *m/z* ber. [M+Na]⁺: 653.1797, gef.: 653.1788

***N*-((*S*)-1-oxo-3-phenyl-1-(((*S,E*)-5-phenyl-1-(phenylsulfonyl)pent-1-en-3-yl)amino)propan-2-yl)isonicotinamid (*Verbindung 15*)**



Methode: C

Ansatz:

Substanz	Äquivalente	M [g/mol]	n [mmol]	m [g]	V [mL]
<i>VS(H)-hPhe</i> *TFA	1,00	415,43	0,26	0,110	-
4-Pyr-CO- <i>L</i> -Phe-COOH	1,50	270,29	0,40	0,107	-
PPA (50% in DMF)	3,00	318,20	0,79	0,506	-
DIPEA	4,50	129,25	1,19	0,154	0,20

Ausbeute: 110 mg, 0,20 mmol, 75 %, farbloser Feststoff.

SC: DCM / Methanol 19:1

R_f: 0,30 (Petrolether / Ethylacetat 1:4 + TEA)

Smp.: 198 – 199 °C (DCM / Methanol)

[α]_D²²: - 4 ° (c = 1, CHCl₃)

FT-IR: 3287, 3062, 3025, 2923, 1663, 1637, 1529, 1495, 1446, 1317, 1287, 1142, 1084, 748, 697, 682, 667.

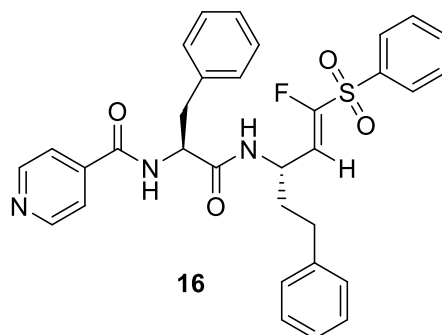
¹H NMR: (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 9.00 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H), 8.73 – 8.64 (m, 2H), 8.37 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H), 7.87 – 7.77 (m, 2H), 7.73 – 7.60 (m, 5H), 7.34 – 7.10 (m, 10H), 6.85 (dd, *J* = 15.1, 4.7 Hz, 1H), 6.46 (dd, *J* = 15.2, 1.7 Hz, 1H), 4.80 – 4.61 (m, 1H), 4.56 – 4.41 (m, 1H), 3.19 – 2.92 (m, 2H), 2.69 – 2.52 (m, 2H), 2.04 – 1.57 (m, 2H).

¹³C NMR: (75 MHz, DMSO) δ 170.72, 164.87, 150.15, 146.99, 141.09, 140.84, 140.29, 137.82, 133.66, 129.59, 129.11, 128.34, 128.27, 128.12, 127.16, 126.43, 125.85, 121.38, 55.30, 48.77, 39.52, 36.93, 34.63, 31.29.

Zuordnung der Signale analog zu Verbindung K11777.

HR-MS (ESI⁺): *m/z* ber. [M+Na]⁺: 576.1918, gef.: 576.1933

***N*-((*S*)-1-(((*S,E*)-1-fluoro-5-phenyl-1-(phenylsulfonyl)pent-1-en-3-yl)amino)-1-oxo-3-phenylpropan-2-yl)isonicotinamid (*Verbindung 16*)**



Methode: C

Ansatz:

Substanz	Äquivalente	M [g/mol]	n [mmol]	m [g]	V [mL]
<i>VS(F)</i> - <i>hPhe</i> *TFA	1,00	415,43	0,26	0,110	-
4-Pyr-CO- <i>L</i> -Phe-COOH	1,50	270,29	0,40	0,107	-
PPA (50% in DMF)	3,00	318,20	0,79	0,506	-
DIPEA	4,50	129,25	1,19	0,154	0,20

Ausbeute: 110 mg, 0,20 mmol, 75 %, farbloser Feststoff.

SC: DCM / Methanol 19:1

R_f: 0,55 (DCM / Methanol 19:1)

Smp.: 184 – 187 °C (DCM / Methanol)

[α]_D²²: 7° (c = 1, CHCl₃)

FT-IR: 3271, 3065, 2967, 2921, 2855, 2794, 1659, 1617, 1537, 1447, 1377, 1333, 1292, 1263, 1237, 1159, 1086, 1031, 1000, 953, 752, 699, 685.

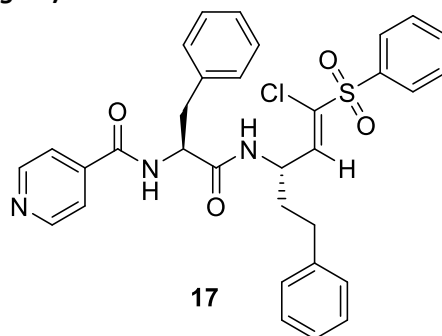
¹H NMR: (300 MHz, CD₂Cl₂) δ 8.74 – 8.58 (m, 2H), 7.96 – 7.85 (m, 2H), 7.79 – 7.48 (m, 5H), 7.40 – 7.08 (m, 9H), 7.07 – 6.92 (m, 2H), 6.43 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H), 6.03 (dd, *J* = 32.1, 9.0 Hz, 1H), 4.92 – 4.74 (m, 1H), 4.71 – 4.55 (m, 1H), 3.26 – 3.00 (m, 2H), 2.57 – 2.29 (m, 2H), 1.92 – 1.74 (m, 2H).

¹³C NMR: (75 MHz, CD₂Cl₂) δ 170.61, 165.88, 153.45, 151.14, 141.17, 140.84, 137.57, 137.46, 136.90, 136.80, 135.32, 135.25, 130.17, 130.09, 129.87, 129.38, 129.34, 129.13, 129.09, 129.01, 128.77, 128.73, 127.85, 126.75, 121.35, 117.71, 117.64, 55.71, 54.00, 45.33, 39.00, 36.03, 32.13.

Zuordnung der Signale analog zu Verbindung 12.

HR-MS (ESI⁺): *m/z* ber. [M+Na]⁺: 594.1839, gef.: 594.1850

***N*-((*S*)-1-(((*S,E*)-1-chloro-5-phenyl-1-(phenylsulfonyl)pent-1-en-3-yl)amino)-1-oxo-3-phenylpropan-2-yl)isonicotinamid (*Verbindung 17*)**



Methode: C

Ansatz:

Substanz	Äquivalente	M [g/mol]	n [mmol]	m [g]	V [mL]
<i>VS(F)-hPhe</i> *TFA	1,00	437,98	1,43	0,628	-
4-Pyr-CO- <i>L</i> -Phe-COOH	1,50	270,28	2,15	0,581	-
PPA (50% in DMF)	3,00	318,20	4,30	2,738	-
DIPEA	4,50	129,25	6,45	0,834	1,097

Ausbeute: 385 mg, 0,65 mmol, 46 %, farbloser Feststoff.

SC: DCM / Methanol 19:1

R_f: 0,61 (DCM / Methanol 19:1)

Smp.: 86 – 88 C (DCM / Methanol)

[α]_D²²: 13 ° (c = 1, CHCl₃)

FT-IR: 3272, 3062, 2922, 1641, 1601, 1539, 14995, 1447, 1409, 1330, 1157, 1085, 1030, 999, 846, 752, 721, 699, 685.

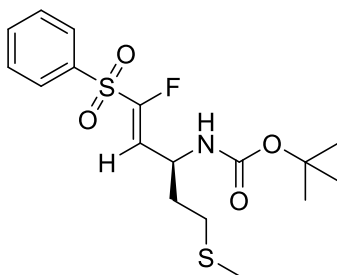
¹H NMR: (300 MHz, Chloroform-*d*) δ 8.87 – 8.60 (m, 2H), 7.91 (d, *J* = 7.6 Hz, 2H), 7.72 – 7.53 (m, 5H), 7.39 – 7.29 (m, 4H), 7.24 – 7.16 (m, 5H), 7.02 (d, *J* = 6.8 Hz, 2H), 6.90 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H), 6.17 (d, *J* = 7.1 Hz, 1H), 4.79 – 4.62 (m, 2H), 3.16 (ddd, *J* = 54.8, 13.4, 7.2 Hz, 2H), 2.64 – 2.36 (m, 2H), 1.92 – 1.78 (m, 2H).

¹³C NMR: (75 MHz, CDCl₃) δ 170.22, 164.83, 149.44, 140.13, 138.52, 136.82, 136.12, 134.57, 134.32, 129.51, 129.41, 129.26, 129.08, 128.76, 128.35, 127.76, 126.57, 121.72, 77.16, 55.61, 48.74, 38.82, 34.98, 31.76.

Zuordnung der Signale analog zu Verbindung 12.

HR-MS (ESI⁺): *m/z* ber. [M+Na]⁺: 610.1543, gef.: 610.1553

tert-butyl (S,E)-(1-fluoro-5-(methylthio)-1-(phenylsulfonyl)pent-1-en-3-yl)carbamate



Methode: G

Ansatz:

Substanz	Äquivalente	M [g/mol]	n [mmol]	m [g]	V [mL]
Diethyl(fluoro(phenylsulfonyl)methyl)phosphonat	1,00	310,28	3,00	0,930	-
LiHMDS (1M in THF)	1,05	1 M	3,15	-	3,15
BOC-L-Met-CHO	1,08	233,33	3,22	0,752	-

Ausbeute: 0,88 g, 2,26 mmol, 75 %, farbloser Feststoff

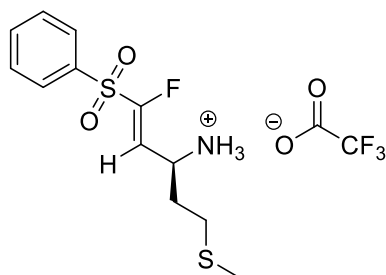
SC: Petrolether/Ethylacetat 3:1w

R_F: 0,38 (Petrolether/Ethylacetat 3:1)

¹H NMR: (300 MHz, Chloroform-*d*) δ 7.94 (dd, *J* = 7.5, 1.7 Hz, 2H), 7.82 – 7.63 (m, 1H), 7.58 (dd, *J* = 8.4, 6.9 Hz, 2H), 6.21 (d, *J* = 31.6 Hz, 1H), 4.73 (s, br, 1H), 4.56 (s, br, 1H), 2.66 – 2.35 (m, 2H), 2.07 (s, 3H), 2.00 – 1.71 (m, 2H), 1.47 – 1.26 (s, 9H).

¹³C NMR: (75 MHz, CDCl₃) δ 154.91, 152.75, 137.14, 134.73, 129.63, 128.84, 118.05, 77.36, 46.06, 33.77, 30.17, 28.33, 15.69.

(S,E)-1-fluoro-5-(methylthio)-1-(phenylsulfonyl)pent-1-en-3-aminium 2,2,2-Trifluoroacetat



Methode: E

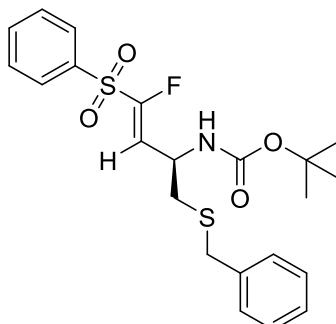
Ansatz:

Substanz	Äquivalente	M [g/mol]	n [mmol]	m [g]	V [mL]
<i>F-VS-Boc-L-Met</i>	1,00	389,50	2,26	0,88	-

Ausbeute: 596 mg, 1,477 mmol, 65 %, farbloser Feststoff

¹H NMR: (300 MHz, Chloroform-*d*) δ 7.89 – 7.82 (m, 2H), 7.82 – 7.63 (m, 1H), 7.57 – 7.52 (m, 2H), 6.21 (d, $J = 31.6$ Hz, 1H), 4.46 (m, 1H), 2.69 – 2.41 (m, 2H), 2.06 (s, 3H), 2.05 – 1.75 (m, 2H).

tert-butyl (R,E)-(1-(benzylthio)-4-fluoro-4-(phenylsulfonyl)but-3-en-2-yl)carbamate



Methode: G

Ansatz:

Substanz	Äquivalente	M [g/mol]	n [mmol]	m [g]	V [mL]
Diethyl(fluoro(phenylsulfonyl)methyl)phosphonat	1,00	310,28	1,76	0,546	-
LiHMDS (1M in THF)	1,05	1 M	1,85	-	1,85
BOC-(S-Benzyl)-L-Cys-CHO	1,08	295,12	1,89	0,558	-

Ausbeute: 438 mg, 0,94 mmol, 54 %, farbloser Feststoff.

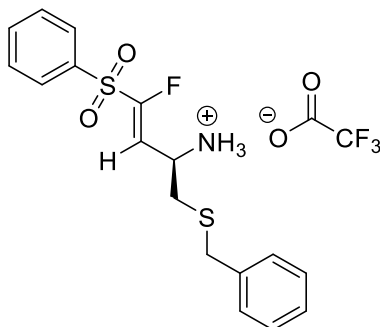
SC: Petrolether / Ethylacetat 3:1

R_F: 0,42 (Petrolether / Ethylacetat 3:1)

¹H NMR: (300 MHz, Chloroform-*d*) δ 8.00 – 7.92 (m, 3H), 7.75 – 7.53 (m, 5H), 7.30 – 7.27 (m, 3H), 6.23 (dd, *J* = 31.8, 8.5 Hz, 1H), 4.83 (s, 1H), 4.59 (s, 1H), 3.70 (s, 2H), 2.73 – 2.44 (m, 2H), 1.39 (s, 9H).

¹³C NMR: (75 MHz, CDCl₃) δ 156.91, 154.80, 137.46, 137.13, 134.96, 134.71, 129.66, 129.61, 129.18, 129.04, 128.87, 128.83, 127.51, 117.48, 80.53, 45.96, 36.71, 35.40, 28.36.

(R,E)-1-(benzylthio)-4-fluoro-4-(phenylsulfonyl)but-3-en-2-aminium 2,2,2-Trifluoroacetat



Methode: E

Ansatz:

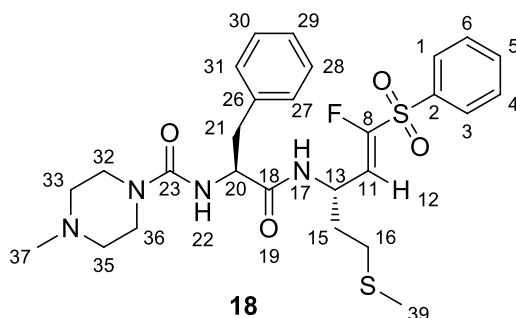
Substanz	Äquivalente	M [g/mol]	n [mmol]	m [g]	V [mL]
<i>F-VS-Boc-L-Met</i>	1,00	451,57	0,97	0,438	-

Ausbeute: 367 mg, 0,79 mmol, 81 %, farbloser Feststoff

¹H NMR: (300 MHz, Chloroform-*d*) δ 8.04 (s, 3H), 7.95 – 7.84 (m, 2H), 7.77 – 7.55 (m, 4H), 7.25 – 7.19 (m, 4H), 6.44 (dd, $J = 30.2, 9.1$ Hz, 1H), 4.20 – 4.01 (m, 1H), 3.71 (s, 2H), 2.91 – 2.62 (m, 2H).

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 161.36, 160.84, 155.51, 136.56, 135.52, 135.03, 129.88, 129.70, 129.17, 129.07, 128.89, 127.94, 117.27, 113.46, 111.13, 77.16, 46.20, 36.24, 33.25.

***N*-((*S*)-1-(((*S,E*)-1-fluoro-5-(methylthio)-1-(phenylsulfonyl)pent-1-en-3-yl)amino)-1-oxo-3-phenylpropan-2-yl)-4-methylpiperazin-1-carboxamid (*Verbindung 18*)**



Methode: C

Ansatz:

Substanz	Äquivalente	M [g/mol]	n [mmol]	m [g]	V [mL]
VS(<i>F</i>)-Met* <i>TFA</i>	1,00	403,41	0,78	0,314	-
MePip-CO- <i>L</i> -Phe-COOH*HCl	1,50	326,80	1,17	0,382	-
PPA (50% in DMF)	3,00	318,20	2,34	1,486	-
DIPEA	4,50	129,25	3,50	0,453	0,596

Ausbeute: 320 mg, 0,57 mmol, 73 %, farbloser Feststoff.

SC: DCM / Methanol 19:1

R_F: 0,31 (DCM / Methanol 19:1)

Smp.: 110 – 112 °C (DCM / Methanol)

[α]_D²²: 12 ° (c = 1, CHCl₃)

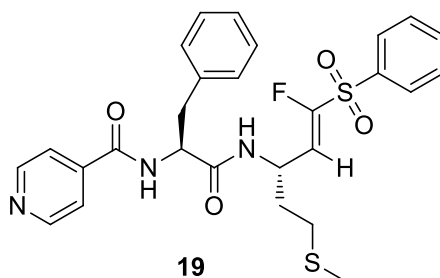
FT-IR: 3264, 3063, 2919, 2851, 2793, 1657, 1617, 1538, 1446, 1416, 1378, 1334, 1292, 1263, 1159, 1085, 1030, 1000, 753, 719, 699, 685.

¹H NMR: (300 MHz, CD₂Cl₂) δ 7.85 (*pdd*, *J* = 7.3, 1.7 Hz, 2H, H-*Ar*), 7.71 – 7.59 (*m*, 1H, H-*Ar*), 7.59 – 7.47 (*m*, 2H, H-*Ar*), 7.25 – 7.13 (*m*, 3H, H-*Ar*), 7.12 – 7.01 (*m*, 3H, H-*Ar*), 5.99 (*dd*, *J* = 32.4, 8.8 Hz, 1H, H-12), 5.06 (*d*, *J* = 7.7 Hz, 1H, H-22), 4.76 – 4.59 (*m*, 1H, H-13), 4.41 (*pq*, *J* = 7.2 Hz, 1H, H-20), 3.21 (*q*, *J* = 4.5 Hz, 4H, H-32, H-36), 3.02 – 2.79 (*m*, 2H, H-21), 2.31 – 2.25 (*m*, 2H, H-16), 2.22 (*t*, *J* = 5.1 Hz, 4H, H-32, H-36), 2.16 (*s*, 3H, H-37), 1.90 (*s*, 3H, H-39), 1.82 – 1.60 (*m*, 2H, H-15).

¹³C NMR: (75 MHz, CD₂Cl₂) δ 172.28 (C-23), 157.51 (C-18), 157.00 - 153.04 (C-8), 137.64 (C-2), 137.62 (C-26), 135.21 (C-5), 130.11 (C-*Ar*), 129.90 (C-*Ar*), 129.10 (C-*Ar*), 127.41 (C-*Ar*), 118.25 - 118.18 (C-11), 56.27 (C-13), 55.07 (C-32, C-36), 46.38 (C-37), 44.75 - 44.72 (C-33, C-35), 44.32 (C-20), 38.95 (C-21), 33.81 (C-15), 30.39 (C-16), 15.72 (C-39).

HR-MS (ESI⁺): *m/z* ber. [M+Na]⁺: 585.1981, gef.: 585.1973

***N*-((*S*)-1-(((*S,E*)-1-fluoro-5-(methylthio)-1-(phenylsulfonyl)pent-1-en-3-yl)amino)-1-oxo-3-phenylpropan-2-yl)isonicotinamid (*Verbindung 19*)**



Methode: C

Ansatz:

Substanz	Äquivalente	M [g/mol]	n [mmol]	m [g]	V [mL]
VS(<i>F</i>)-Met* <i>TFA</i>	1,00	391,52	0,70	0,273	-
4-Pyr-CO- <i>L</i> -Phe-COOH	1,50	270,28	1,05	0,283	-
PPA (50% in DMF)	3,00	318,20	2,09	1,331	-
DIPEA	4,50	129,25	3,14	0,406	0,534

Ausbeute: 98 mg, 0,18 mmol, 66 %, farbloser Feststoff.

SC: DCM / Methanol 19:1

R_f: 0,38 (DCM / Methanol 19:1)

Smp.: 64 - 66 °C (DCM / Methanol)

[α]_D²²: 21 ° (c = 1, CHCl₃)

FT-IR: 3271, 3063, 2920, 1641, 1602, 1538, 1496, 1447, 1410, 1332, 1158, 1086, 1031, 999, 846, 752, 720, 699, 685.

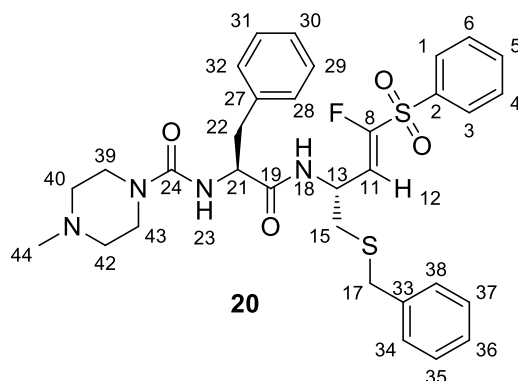
¹H NMR: (300 MHz, CD₂Cl₂) δ 8.70 (d, *J* = 4.5 Hz, 2H), 7.94 (d, *J* = 7.5 Hz, 2H), 7.76 – 7.53 (m, 5H), 7.44 – 7.15 (m, 9H), 7.07 (d, *J* = 7.3 Hz, 1H), 6.26 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H), 6.04 (dd, *J* = 32.2, 8.8 Hz, 1H), 4.92 – 4.55 (m, 2H), 3.23 – 3.00 (m, 2H), 2.44 – 2.24 (m, 2H), 2.05 – 1.91 (m, 3H), 1.88 – 1.74 (m, 2H).

¹³C NMR: (75 MHz, CD₂Cl₂) δ 169.96, 165.19, 151.40, 150.61, 140.68, 139.38, 136.95, 136.24, 134.77, 129.60, 129.29, 128.88, 128.59, 127.33, 120.79, 55.10, 45.25, 38.32, 29.80, 15.15.

Zuordnung der Signale analog zu Verbindung 18.

HR-MS (ESI⁺): *m/z* ber. [M+Na]⁺: 564.1403, gef.: 564.1411.

***N*-((*S*)-1-(((*R,E*)-1-(benzylthio)-4-fluoro-4-(phenylsulfonyl)but-3-en-2-yl)amino)-1-oxo-3-phenylpropan-2-yl)-4-methylpiperazin-1-carboxamid (*Verbindung 20*)**



Methode: C

Ansatz:

Substanz	Äquivalente	M [g/mol]	n [mmol]	m [g]	V [mL]
VS(<i>F</i>)-BnCYS* <i>TFA</i>	1,00	465,48	0,79	0,367	-
MePip-CO- <i>L</i> -Phe-COOH* <i>HCl</i>	1,50	326,80	1,18	0,386	-
PPA (50% in DMF)	3,00	318,20	2,37	1,505	-
DIPEA	4,50	129,25	3,55	0,459	0,603

Ausbeute: 98 mg, 0,18 mmol, 66 %, farbloser Feststoff.

SC: DCM / Methanol 9:1

R_f: 0,49 (DCM / Methanol 9:1)

Smp.: 64 - 66 °C (DCM / Methanol)

[α]_D²²: - 13 ° (c = 1, CHCl₃)

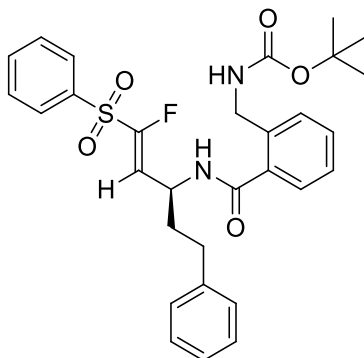
FT-IR: 3261, 3061, 3028, 2928, 2851, 2793, 1658, 1617, 1538, 1496, 1447, 1414, 1332, 1292, 1263, 1237, 1158, 1085, 1030, 1000, 750, 720, 699, 685.

¹H NMR: (300 MHz, Chloroform-*d*) δ 8.02 – 7.91 (m, 2H, H-Ar), 7.79 – 7.67 (m, 1H, H-Ar), 7.67 – 7.54 (m, 2H, H-Ar), 7.43 – 7.09 (m, 10H, H-Ar), 6.81 (dd, *J* = 47.2, 7.8 Hz, 1H, H-12), 6.16 (ddd, *J* = 43.5, 31.8, 8.6 Hz, 1H, H-23), 5.15 (dd, *J* = 14.7, 7.4 Hz, 1H, H-18), 4.93 – 4.75 (m, 1H, H-13), 4.52 (ddt, *J* = 10.8, 7.2 Hz, 1H, H-21), 3.64 (s, 2H, H-17), 3.54 – 3.30 (m, 4H, H-39, H-43), 3.18 – 2.99 (m, 2H, H-22), 2.67 – 2.47 (m, 2H, H-15), 2.50 – 2.38 (m, 4H, H-40, H-42), 2.36 (s, 3H, H-44).

¹³C NMR: (75 MHz, CDCl₃) δ 171.68 (C-24), 156.86 (C-18), 156.96, 153.03 (C-8), 137.44 (C-2), 137.02 (C-33), 136.87 (C-27), 134.78 (C-Ar), 129.65 (C-Ar), 129.46 (C-Ar), 129.04 (C-Ar), 128.91 (C-Ar), 128.85 (C-Ar), 128.76 (C-Ar), 127.45 (C-Ar), 127.26 (C-Ar), 127.18 (C-Ar), 116.57 (C-11), 55.90 (C-21), 54.43 (C-40, C-42), 45.87 (C-44), 44.48 (C-13), 43.55 (C-39, C-43), 38.78 (C-22), 36.45 (C-17), 35.13 (C-15).

HR-MS (ESI⁺): *m/z* ber. [M+Na]⁺: 647.2138, gef.: 647.2152.

(S,E)-tert-butyl 2-((1-fluoro-5-phenyl-1-(phenylsulfonyl)pent-1-en-3-yl)carbamoyl)benzylcarbamate



Methode: C

Ansatz:

Substanz	Äquivalent e	M [g/mol]	n [mmol]	m [g]	V [mL]
VS(F)-hPhe*TFA	1,00	433,42	1,55	0,672	-
2-(((Boc)amino)methyl)benzoesäure (CG03)	1,05	251,28	1,63	0,409	-
PPA (50% in DMF)	3,00	318,20	4,65	2,960	-
DIPEA	4,50	129,25	6,98	0,902	1,187

Ausbeute: 595 mg, 1,08 mmol, 69 %, farbloser Feststoff.

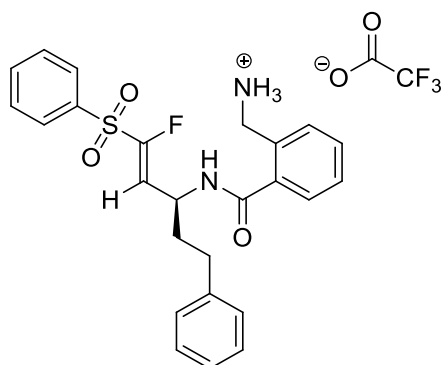
SC: Petrolether / Ethylacetat 1:1

R_F: 0,73 (Petrolether / Ethylacetat 1:1)

¹H NMR: (300 MHz, CD₂Cl₂) δ 7.92 – 7.82 (m, 2H), 7.70 – 7.59 (m, 1H), 7.59 – 7.47 (m, 2H), 7.40 – 7.02 (m, 10H), 6.26 (dd, *J* = 32.3, 8.7 Hz, 1H), 5.64 – 5.41 (m, 1H), 4.91 – 4.68 (m, 1H), 4.21 – 4.04 (m, 2H), 2.75 – 2.48 (m, 2H), 2.14 – 1.92 (m, 2H), 1.31 (s, 9H).

¹³C NMR: (75 MHz, CD₂Cl₂) δ 141.19, 137.72, 135.24, 131.33, 130.68, 130.16, 129.10, 128.88, 128.08, 126.79, 118.52, 80.07, 46.06, 36.22, 32.53, 28.65.

**(S,E)-2-((1-Fluoro-5-phenyl-1-(phenylsulfonyl)pent-1-en-3-yl)carbamoyl)phenyl)methanaminium
2,2,2-trifluoroacetat**



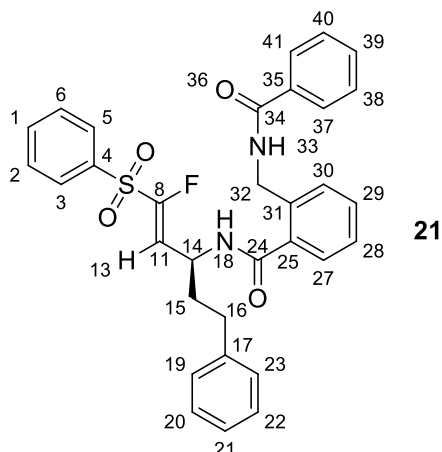
Methode: E

Ansatz:

Substanz	Äquivalente	M [g/mol]	n [mmol]	m [g]	V [mL]
VS(F)-hPhe-2-Boc-Aminomethylbenzoesäure	1,00	552,66	1,08	0,595	-

Ausbeute: 600mg, 1,06 mmol, 98 %, farbloser Feststoff

(S,E)-2-(benzamidomethyl)-N-(1-fluoro-5-phenyl-1-(phenylsulfonyl)pent-1-en-3-yl)benzamid
(Verbindung 21)



Methode: C

Ansatz:

Substanz	Äquivalente	M [g/mol]	n [mmol]	m [g]	V [mL]
VS(F)-hPhe-2-Aminomethylbenzoesäure*TFA	1,00	566,56	1,06	0,600	-
Benzoessäure	1,50	122,12	1,59	0,194	-
PPA (50% in DMF)	4,50	129,25	4,77	0,616	-
DIPEA	4,50	129,25	3,55	0,459	0,603

Ausbeute: 98 mg, 0,18 mmol, 66 %, farbloser Feststoff.

SC: Petrolether / Ethylacetat 1:1

R_f: 0,65 (Petrolether / Ethylacetat 1:1)

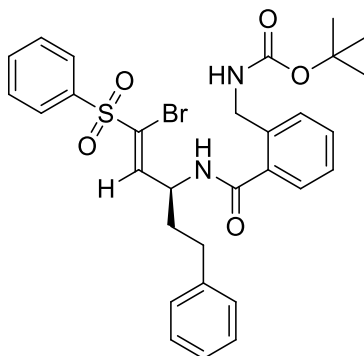
Smp.: 179 - 180 °C (Petrolether / Ethylacetat)

[α]_D²²: 35 ° (c = 1, CHCl₃)

¹H NMR: (300 MHz, CD₂Cl₂) δ 8.01 – 7.88 (m, 2H, H-Ar), 7.77 – 7.24 (m, 15H, H-Ar, H-33), 7.23 – 7.12 (m, 3H, H-Ar), 7.03 (d, J = 7.6 Hz, 1H, H-18), 6.37 (dd, J = 32.3, 8.5 Hz, 1H, H-13), 4.94 (p, J = 7.2 Hz, 1H, H-14), 4.52 (ddd, J = 34.2, 14.1, 6.2 Hz, 2H, H-32), 2.82 – 2.61 (m, 2H, H-16), 2.22 – 2.01 (m, 2H, H-15).

¹³C NMR: (75 MHz, CD₂Cl₂) δ 169.11 (C-24), 166.70 (C-34), 157.00 – 153.00 (C-8), 140.53 (C-4), 137.23 (C-Ar), 137.13 (C-Ar), 135.22 (C-Ar), 134.67 (C-Ar), 134.36 (C-Ar), 131.38 (C-Ar), 131.03 (C-Ar), 130.82 (C-Ar), 129.55 (C-Ar), 128.55 (C-Ar), 128.51 (C-Ar), 128.46 (C-Ar), 128.30 (C-Ar), 127.72 (C-Ar), 127.39 (C-Ar), 126.88 (C-Ar), 126.25 (C-Ar), 117.74 (C-11), 45.66 (C-14), 42.24 (C-32), 35.66 (C-15), 31.98 (C-16).

(S,Z)-tert-butyl 2-((1-bromo-5-phenyl-1-(phenylsulfonyl)pent-1-en-3-yl)carbamoyl)benzylcarbamate



Methode: C

Ansatz:

Substanz	Äquivalent e	M [g/mol]	n [mmol]	m [g]	V [mL]
VS(Br)-hPhe *TFA	1,00	494,32	0,57	0,280	-
2-(((Boc)amino)methyl)benzoesäure (CG03)	1,05	251,28	0,59	0,149	-
PPA (50% in DMF)	3,00	318,20	1,70	1,081	-
DIPEA	4,50	129,25	2,55	0,329	0,433

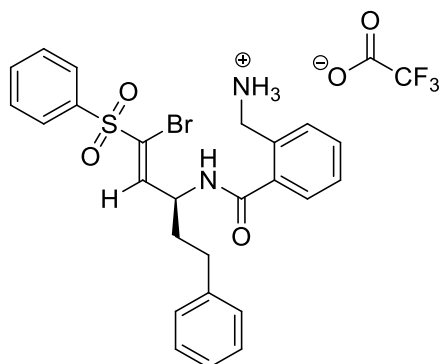
Ausbeute: 260 mg, 0,42 mmol, 72 %, farbloser Feststoff.

SC: Petrolether / Ethylacetat 1:1

R_F: 0,76 (Petrolether / Ethylacetat 1:1)

¹H NMR: (300 MHz, CDCl₃) δ 7.92 - 7.95 (m, 2H); 7.64 - 7.69 (m, 1H); 7.51 - 7.59 (m, 3H); 7.42 - 7.44 (m, 2H); 7.28 - 7.38 (m, 4H); 7.17 - 7.22 (m, 3H); 5.59 - 5.67 (m, 1H); 4.81 - 4.91 (m, 1H); 4.19 - 4.33 (m, 2H); 2.68 - 2.86 (m, 2H); 1.94 - 2.22 (m, 2H); 1.41 (s, 9H).

**(S,Z)-2-((1-bromo-5-phenyl-1-(phenylsulfonyl)pent-1-en-3-yl)carbamoyl)phenyl)methanaminium
2,2,2-trifluoroacetat**



Methode: E

Ansatz:

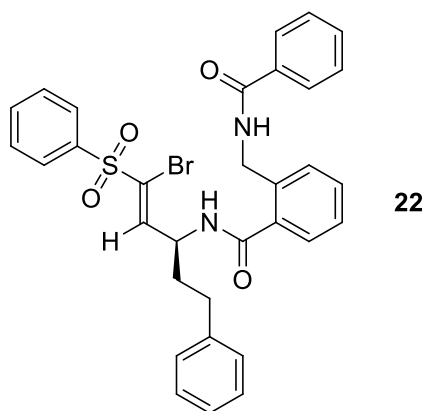
Substanz	Äquivalente	M [g/mol]	n [mmol]	m [g]	V [mL]
VS(Br)-hPhe-2-Boc-Aminomethylbenzoesäure	1,00	613,56	0,41	0,25	-

Ausbeute: 250 mg, 0,40 mmol, 97 %, braunes Öl.

R_f: 0,1 (DCM / MeOH 9:1)

¹H NMR: (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 9.15 - 9.17 (d, 1H, J = 7.5 Hz); 8.13 (s, 3H); 7.91 - 7.93 (m, 2H); 7.79 - 7.84 (m, 1H); 7.68 - 7.75 (m, 3H); 7.55 - 7.63 (m, 4H); 7.16 - 7.37 (m, 5H); 4.67 - 4.77 (m, 1H); 4.04 - 4.09 (m, 2H); 2.58 - 2.73 (m, 2H); 2.04 - 2.16 (m, 1H); 1.84 - 1.96 (m, 1H).

(S,Z)-2-(Benzamidomethyl)-N-(1-bromo-5-phenyl-1-(phenylsulfonyl)pent-1-en-3-yl)benzamid
(Verbindung 22)



Methode: C

Ansatz:

Substanz	Äquivalente	M [g/mol]	n [mmol]	m [g]	V [mL]
VS(Br)-hPhe-2-Aminomethylbenzoesäure*TFA	1,00	627,47	0,40	0,250	-
Benzoessäure	1,50	122,12	0,60	0,073	-
PPA (50% in DMF)	3,00	318,20	1,20	0,761	-
DIPEA	4,50	129,25	1,79	0,232	0,305

Ausbeute: 140 mg, 0,23 mmol, 57 %, farbloser Feststoff.

SC: Petrolether / Ethylacetat 1:1

R_f: 0,50 (Petrolether / Ethylacetat 1:1)

Smp.: 87 – 88 °C (Petrolether / Ethylacetat)

[α]_D²²: 46 ° (c = 1, CHCl₃)

¹H NMR: (300 MHz, CD₂Cl₂) δ 7.97 – 7.89 (m, 2H), 7.76 (dd, J = 5.3, 3.2 Hz, 2H), 7.72 – 7.59 (m, 2H), 7.58 – 7.39 (m, 9H), 7.38 – 7.15 (m, 7H), 4.93 – 4.74 (m, 1H), 4.70 – 4.44 (m, 2H), 2.90 – 2.64 (m, 2H), 2.26 – 1.94 (m, 2H).

¹³C NMR: (75 MHz, CD₂Cl₂) δ 196.11, 193.15, 167.51, 144.31, 141.14, 137.66, 134.80, 132.09, 131.68, 131.34, 129.84, 129.46, 129.14, 129.09, 128.95, 127.51, 126.86, 125.34, 122.39, 109.44, 54.00, 51.97, 42.89, 35.34, 32.55.

Zuordnung der Signale analog zu Verbindung 21.

9. Anhang

9.1 Abkürzungsverzeichnis

4-Pyr	4-Pyridyl
ACE	<i>Angiotensin Converting Enzyme</i>
AIDS	<i>Acquired Immune Deficiency Syndrome</i>
Ala	Alanin
AMC	7-Amino-4-Methylcoumarin
Äq.	Äquivalente
Arg	Arginin
Bn	Benzyl
Boc	<i>tert</i> -Butyloxycarbonyl
Boc ₂ O	Di- <i>tert</i> -butyldicarbonat
BuLi	Buthyllithium
Cath. B	Cathepsin B
Cath. L	Cathepsin L
CBz	Carboxybenzyl
COPD	<i>chronic obstructive pulmonary disease</i>
Cys	Cystein
DCM	Dichlormethan
DIPEA	Diisopropylethylamin
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i>
E	Enzym
EDC	1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid
Et	Ethyl
EtOAc	Ethylacetat
EtOH	Ethanol
ges.	gesättigt
Gly	Glycin
HBTU	(2-(1 <i>H</i> -benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium-hexafluorophosphat)
HCV	Hepatitis-C-Virus
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus
HOBt	1-Hydroxybenzotriazol
hPhe	Homophenylalanin
HWE	<i>Horner-Wadsworth-Emmons</i>
I	Inhibitor
Ile	Isoleucin
LC	<i>liquid chromatography</i>
Leu	Leucin
LiHMDS	Lithium-bis(trimethylsilyl)amid
Me	Methyl
MeOH	Methanol

MePip	4-Methylpiperazin
MS	Massenspektrometrie
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
n.b.	nicht bestimmt
NADPH	Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat,
NMR	<i>Nuclear Magnetic Resonance</i>
P	Produkt
PDB	<i>protein data bank</i>
Phe	Phenylalanin
PPA	Propylphosphonsäureanhydrid
QM/MM	<i>Quantum Mechanics / Molecular Mechanics</i>
Rho	Rhodesain
S	Substrat
SAM	<i>self assembled monolayer</i>
SARS	<i>Severe Acute Respiratory Syndrome</i>
sNHS	<i>N-Hydroxy sulfosuccinimid</i>
SPR	<i>Surface Plasmon Resonance</i>
<i>T.b.b.</i>	<i>Trypanosoma brucei brucei</i>
TbCatB	Trypanosoma brucei Cathepsin B
TBTU	<i>O</i> -(Benzotriazol-1-yl)- <i>N,N,N',N'</i> -tetramethyluronium tetrafluoroborat
TEA	Triethylamin
TFA	Trifluoressigsäure
THF	Tetrahydrofuran
Val	<i>Valin</i>

9.2 Literaturverzeichnis

- (1) Rawlings, N. D.; Waller, M.; Barrett, A. J.; Bateman, A. MEROPS: The database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors. *Nucl. Acids Res.* **2013**, *42*, D503-D509, DOI: 10.1093/nar/gkt953.
- (2) <http://merops.sanger.ac.uk/> Abgerufen: 03/2017
- (3) Puente, X. S.; Sánchez, L. M.; Overall, C. M.; López-Otín, C. Human and mouse proteases: a comparative genomic approach. *Nature reviews. Genetics* **2003**, *4*, 544–558, DOI: 10.1038/nrg1111.
- (4) Turk, B. Targeting proteases: Successes, failures and future prospects. *Nat Rev Drug Discov* **2006**, *5*, 785–799, DOI: 10.1038/nrd2092.
- (5) *Handbook of proteolytic enzymes*; Barrett, A. J.; Woessner, J. F.; Rawlings, N. D., Eds., 2. ed.; Elsevier Academic Press: London, **2004**.
- (6) Turk, B.; Turk, D.; Turk, V. Lysosomal cysteine proteases: More than scavengers. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology* **2000**, *1477*, 98–111, DOI: 10.1016/S0167-4838(99)00263-0.
- (7) Abbenante, G.; Fairlie, D. Protease Inhibitors in the Clinic. *MC* **2005**, *1*, 71–104, DOI: 10.2174/1573406053402569.
- (8) Schwabe, U.; Paffrath, D. *Arzneiverordnungs-Report 2010: Aktuelle Daten, Kosten, Trends und Kommentare*; Springer-Verlag Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg, **2010**.
- (9) Webb, E. C. *Enzyme nomenclature 1992: Recommendations of the Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology on the nomenclature and classification of enzymes*; Published for the International Union of Biochemistry and Molecular Biology by Academic Press: San Diego, **1992**.
- (10) Rawlings, N. D.; Barrett, A. J. Evolutionary families of peptidases. *Biochemical Journal* **1993**, *290*, 205–218.
- (11) Rawlings, N. D.; Barrett, A. J.; Bateman, A. Asparagine Peptide Lyases: A SEVENTH CATALYTIC TYPE OF PROTEOLYTIC ENZYMES. *Journal of Biological Chemistry* **2011**, *286*, 38321–38328, DOI: 10.1074/jbc.M111.260026.
- (12) Schechter, I.; Berger, A. On the size of the active site in proteases. I. Papain. *Biochemical and biophysical research communications* **1967**, *27*, 157–162.
- (13) Turk, V.; Stoka, V.; Vasiljeva, O.; Renko, M.; Sun, T.; Turk, B.; Turk, D. Cysteine cathepsins: From structure, function and regulation to new frontiers. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics* **2012**, *1824*, 68–88, DOI: 10.1016/j.bbapap.2011.10.002.
- (14) Sudhan, D. R.; Siemann, D. W. Cathepsin L targeting in cancer treatment. *Pharmacology & Therapeutics* **2015**, *155*, 105–116, DOI: 10.1016/j.pharmthera.2015.08.007.
- (15) Brömme, D.; Lecaille, F. Cathepsin K inhibitors for osteoporosis and potential off-target effects. *Expert Opinion on Investigational Drugs* **2009**, *18*, 585–600, DOI: 10.1517/13543780902832661.
- (16) Schurigt, U. Role of Cysteine Cathepsins in Joint Inflammation and Destruction in Human Rheumatoid Arthritis and Associated Animal Models. In *New Therapeutic Targets for the Control of Inflammatory Arthritis: A Pivotal Role for Endothelins*; Maria das Graças Muller de Oliveira Henriques, Ed.; INTECH Open Access Publisher, **2013**.
- (17) Tjondrokoesoemo, A.; Schips, T. G.; Sargent, M. A.; Vanhoutte, D.; Kanisicak, O.; Prasad, V.; Lin, S.-C. J.; Maillet, M.; Molkentin, J. D. Cathepsin S contributes to the pathogenesis of muscular dystrophy in mice. *J. Biol. Chem.* **2016**, jbc.M116.719054, DOI: 10.1074/jbc.M116.719054.
- (18) McKerrow, J. H.; Rosenthal, P. J.; Swenerton, R.; Doyle, P. Development of protease inhibitors for protozoan infections. *Current Opinion in Infectious Diseases* **2008**, *21*, 668–672, DOI: 10.1097/QCO.0b013e328315cca9.
- (19) Lonsdale-Eccles, J. D.; Grab, D. J. Trypanosome hydrolases and the blood-brain barrier. *Trends in parasitology* **2002**, *18*, 17–19.

- (20) Lalmanach, G.; Boulangé, A.; Serveau, C.; Lecaille, F.; Scharfstein, J.; Gauthier, F.; Authié, E. Congopain from *Trypanosoma congolense*: drug target and vaccine candidate. *Biological chemistry* **2002**, *383*, 739–749, DOI: 10.1515/BC.2002.077.
- (21) Barry, J. D.; McCulloch, R. Antigenic variation in trypanosomes: enhanced phenotypic variation in a eukaryotic parasite. *Advances in parasitology* **2001**, *49*, 1–70.
- (22) O'Brien, T. C.; Mackey, Z. B.; Fetter, R. D.; Choe, Y.; O'Donoghue, A. J.; Zhou, M.; Craik, C. S.; Caffrey, C. R.; McKerrow, J. H. A Parasite Cysteine Protease Is Key to Host Protein Degradation and Iron Acquisition. *Journal of Biological Chemistry* **2008**, *283*, 28934–28943, DOI: 10.1074/jbc.M805824200.
- (23) Steverding, D.; Sexton, D. W.; Wang, X.; Gehrke, S. S.; Wagner, G. K.; Caffrey, C. R. *Trypanosoma brucei*: Chemical evidence that cathepsin L is essential for survival and a relevant drug target. *International Journal for Parasitology* **2012**, *42*, 481–488, DOI: 10.1016/j.ijpara.2012.03.009.
- (24) Abdulla, M.-H.; O'Brien, T.; Mackey, Z. B.; Sajid, M.; Grab, D. J.; McKerrow, J. H.; Aksoy, S. RNA Interference of *Trypanosoma brucei* Cathepsin B and L Affects Disease Progression in a Mouse Model. *PLoS Negl Trop Dis* **2008**, *2*, e298, DOI: 10.1371/journal.pntd.0000298.
- (25) Barr, S. C.; Warner, K. L.; Kornreic, B. G.; Piscitelli, J.; Wolfe, A.; Benet, L.; McKerrow, J. H. A Cysteine Protease Inhibitor Protects Dogs from Cardiac Damage during Infection by *Trypanosoma cruzi*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **2005**, *49*, 5160–5161, DOI: 10.1128/AAC.49.12.5160-5161.2005.
- (26) Doyle, P. S.; Zhou, Y. M.; Engel, J. C.; McKerrow, J. H. A Cysteine Protease Inhibitor Cures Chagas' Disease in an Immunodeficient-Mouse Model of Infection. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **2007**, *51*, 3932–3939, DOI: 10.1128/AAC.00436-07.
- (27) Engel, J. C.; Doyle, P. S.; Hsieh, I.; McKerrow, J. H. Cysteine Protease Inhibitors Cure an Experimental *Trypanosoma cruzi* Infection. *The Journal of Experimental Medicine* **1998**, *188*, 725–734.
- (28) Alexander, J.; Coombs, G. H.; Mottram, J. C. *Leishmania mexicana* cysteine proteinase-deficient mutants have attenuated virulence for mice and potentiate a Th1 response. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* **1998**, *161*, 6794–6801.
- (29) Selzer, P. M.; Pingel, S.; Hsieh, I.; Ugele, B.; Chan, V. J.; Engel, J. C.; Bogyo, M.; Russell, D. G.; Sakanari, J. A.; McKerrow, J. H. Cysteine protease inhibitors as chemotherapy: lessons from a parasite target. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1999**, *96*, 11015–11022.
- (30) Ponte-Sucre, A.; Vicik, R.; Schultheis, M.; Schirmeister, T.; Moll, H. Aziridine-2,3-dicarboxylates, peptidomimetic cysteine protease inhibitors with antileishmanial activity. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **2006**, *50*, 2439–2447, DOI: 10.1128/AAC.01430-05.
- (31) Schurigt, U.; Schad, C.; Glowa, C.; Baum, U.; Thomale, K.; Schnitzer, J. K.; Schultheis, M.; Schaschke, N.; Schirmeister, T.; Moll, H. 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. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **2010**, *54*, 5028–5041, DOI: 10.1128/AAC.00327-10.
- (32) Schad, C.; Baum, U.; Frank, B.; Dietzel, U.; Mattern, F.; Gomes, C.; Ponte-Sucre, A.; Moll, H.; Schurigt, U.; Schirmeister, T. Development of a New Antileishmanial Aziridine-2,3-Dicarboxylate-Based Inhibitor with High Selectivity for Parasite Cysteine Proteases. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **2015**, *60*, 797–805, DOI: 10.1128/AAC.00426-15.
- (33) Marco, M.; Coterón, J. M. Falcipain inhibition as a promising antimalarial target. *Current topics in medicinal chemistry* **2012**, *12*, 408–444.
- (34) Wiederanders, B. The function of propeptide domains of cysteine proteinases. *Advances in experimental medicine and biology* **2000**, *477*, 261–270, DOI: 10.1007/0-306-46826-3_28.
- (35) Coulombe, R.; Grochulski, P.; Sivaraman, J.; Cygler, M. CRYSTAL STRUCTURE OF A CYSTEINE PROTEASE PROFORM, *The EMBO Journal*. **1997**, *15*, 5492-5503.
- (36) Schilling, K.; Pietschmann, S.; Fehn, M.; Wenz, I.; Wiederanders, B. Folding incompetence of cathepsin L-like cysteine proteases may be compensated by the highly conserved, domain-

- building N-terminal extension of the proregion. *Biological chemistry* **2001**, *382*, 859–865, DOI: 10.1515/BC.2001.105.
- (37) Chapman, R. L.; Kane, S. E.; Erickson, A. H. Abnormal glycosylation of procathepsin L due to N-terminal point mutations correlates with failure to sort to lysosomes. *The Journal of biological chemistry* **1997**, *272*, 8808–8816.
- (38) Nissler, K.; Kreusch, S.; Rommerskirch, W.; Strubel, W.; Weber, E.; Wiederanders, B. Sorting of non-glycosylated human procathepsin S in mammalian cells. *Biological chemistry* **1998**, *379*, 219–224.
- (39) Fox, T.; Miguel, E. de; Mort, J. S.; Storer, A. C. Potent slow-binding inhibition of cathepsin B by its propeptide. *Biochemistry* **1992**, *31*, 12571–12576.
- (40) Guay, J.; Falguyret, J.-P.; Ducret, A.; Percival, M. D.; Mancini, J. A. Potency and selectivity of inhibition of cathepsin K, L and S by their respective propeptides. *European Journal of Biochemistry* **2000**, *267*, 6311–6318, DOI: 10.1046/j.1432-1327.2000.01730.x.
- (41) Reis, F. C. G.; Costa, T. F. R.; Sulea, T.; Mezzetti, A.; Scharfstein, J.; Brömme, D.; Ménard, R.; Lima, Ana Paula C. A. The propeptide of cruzipain – a potent selective inhibitor of the trypanosomal enzymes cruzipain and brucipain, and of the human enzyme cathepsin F. *FEBS Journal* **2007**, *274*, 1224–1234, DOI: 10.1111/j.1742-4658.2007.05666.x.
- (42) Menard, R. Autocatalytic Processing of Recombinant Human Procathesin L. CONTRIBUTION OF BOTH INTERMOLECULAR AND UNIMOLECULAR EVENTS IN THE PROCESSING OF PROCATHEPSIN L IN VITRO. *Journal of Biological Chemistry* **1998**, *273*, 4478–4484, DOI: 10.1074/jbc.273.8.4478.
- (43) McGrath, M. E. The lysosomal cysteine proteases. *Annual review of biophysics and biomolecular structure* **1999**, *28*, 181–204, DOI: 10.1146/annurev.biophys.28.1.181.
- (44) Hardegger, L. A.; Kuhn, B.; Spinnler, B.; Anselm, L.; Ecabert, R.; Stihle, M.; Gsell, B.; Thoma, R.; Diez, J.; Benz, J. *et al.* Halogen Bonding at the Active Sites of Human Cathepsin L and MEK1 Kinase: Efficient Interactions in Different Environments. *ChemMedChem* **2011**, *6*, 2048–2054, DOI: 10.1002/cmdc.201100353.
- (45) Greenspan, P. D.; Clark, K. L.; Tommasi, R. A.; Cowen, S. D.; McQuire, L. W.; Farley, D. L.; van Duzer, J. H.; Goldberg, R. L.; Zhou, H.; Du Z *et al.* Identification of dipeptidyl nitriles as potent and selective inhibitors of cathepsin B through structure-based drug design. *Journal of medicinal chemistry* **2001**, *44*, 4524–4534.
- (46) Musil, D.; Zucic, D.; Turk, D.; Engh, R. A.; Mayr, I.; Huber, R.; Popovic, T.; Turk, V.; Towatari, T.; Katunuma, N. The refined 2.15 Å X-ray crystal structure of human liver cathepsin B: the structural basis for its specificity. *The EMBO Journal* **1991**, *10*, 2321–2330.
- (47) Cathers, B. E.; Barrett, C.; Palmer, J. T.; Rydzewski, R. M. pH Dependence of inhibitors targeting the occluding loop of cathepsin B. *Bioorganic chemistry* **2002**, *30*, 264–275.
- (48) Brinen, L. S.; Marion, R. *The crystal structure of rhodesain, the major cysteine protease of T. brucei rhodesiense, bound to inhibitor K777*, **2008**.
- (49) Ferreira, R. S.; Shoichet, B. K.; McKerrow, J. H. *Crystal structure of cruzain covalently bound to a purine nitrile*, **2009**.
- (50) Kerr, I. D.; Lee, J. H.; Brinen, L. S. *Crystal Structure of Falcipain-2 with Its inhibitor, E64*, **2008**.
- (51) Wu, P.; Kerr, I. D.; Brinen, L. S. *Crystal Structure of Cathepsin B from T. brucei in complex with CA074*, **2010**.
- (52) Hol, W. G. J.; van Duijnen, P. T.; Berendsen, H. J. C. The α -helix dipole and the properties of proteins. *Nature* **1978**, *273*, 443–446, DOI: 10.1038/273443a0.
- (53) 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* **2013**, *52*, 5145–5154, DOI: 10.1021/bi400629r.
- (54) 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: A Theoretical Study. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 8696–8705, DOI: 10.1021/ja711043x.
- (55) Thurmond, R. L.; Beavers, M. P.; Cai, H.; Meduna, S. P.; Gustin, D. J.; Sun, S.; Almond, H. J.; Karlsson, L.; Edwards, J. P. Nonpeptidic, noncovalent inhibitors of the cysteine protease cathepsin S. *Journal of medicinal chemistry* **2004**, *47*, 4799–4801, DOI: 10.1021/jm0496133.

- (56) Löser, R.; Abbenante, G.; Madala, P. K.; Halili, M.; Le, G. T.; Fairlie, D. P. Noncovalent tripeptidyl benzyl- and cyclohexyl-amine inhibitors of the cysteine protease caspase-1. *Journal of medicinal chemistry* **2010**, *53*, 2651–2655, DOI: 10.1021/jm901790w.
- (57) Engel, J. C.; Doyle, P. S.; Hsieh, I.; McKerrow, J. H. Cysteine Protease Inhibitors Cure an Experimental *Trypanosoma cruzi* Infection. *J Exp Med* **1998**, *188*, 725–734, DOI: 10.1084/jem.188.4.725.
- (58) Olson, J. Antimalarial effects in mice of orally administered peptidyl cysteine protease inhibitors. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **1999**, *7*, 633–638, DOI: 10.1016/S0968-0896(99)00004-8.
- (59) Conde, S.; Pérez, D. I.; Martínez, A.; Perez, C.; Moreno, F. J. Thienyl and phenyl alpha-halomethyl ketones: new inhibitors of glycogen synthase kinase (GSK-3beta) from a library of compound searching. *Journal of medicinal chemistry* **2003**, *46*, 4631–4633, DOI: 10.1021/jm034108b.
- (60) Ha, K.-H.; Byun, M.-S.; Choi, J.; Jeong, J.; Lee, K.-J.; Jue, D.-M. N-tosyl-L-phenylalanine chloromethyl ketone inhibits NF-kappaB activation by blocking specific cysteine residues of I kappa B kinase beta and p65/RelA. *Biochemistry* **2009**, *48*, 7271–7278, DOI: 10.1021/bi900660f.
- (61) Otto, H.-H.; Schirmeister, T. Cysteine Proteases and Their Inhibitors. *Chemical reviews* **1997**, *97*, 133–172.
- (62) Shaw, E. The selective inactivation of thiol proteases in vitro and in vivo. *J Protein Chem* **1984**, *3*, 109–120, DOI: 10.1007/BF01024841.
- (63) Björck, L.; Akesson, P.; Bohus, M.; Trojnar, J.; Abrahamson, M.; Olafsson, I.; Grubb, A. Bacterial growth blocked by a synthetic peptide based on the structure of a human proteinase inhibitor. *Nature* **1989**, *337*, 385–386, DOI: 10.1038/337385a0.
- (64) Scory, S.; Caffrey, C. R.; Stierhof, Y. D.; Ruppel, A.; Steverding, D. *Trypanosoma brucei*: killing of bloodstream forms in vitro and in vivo by the cysteine proteinase inhibitor Z-phe-ala-CHN2. *Experimental parasitology* **1999**, *91*, 327–333, DOI: 10.1006/expr.1998.4381.
- (65) Ambroso, J. L.; Harris, C. In vitro embryotoxicity of the cysteine proteinase inhibitors benzyloxycarbonyl-phenylalanine-alanine-diazomethane (Z-Phe-Ala-CHN2) and benzyloxycarbonyl-phenylalanine-phenylalanine-diazomethane (Z-Phe-Phe-CHN2). *Teratology* **1994**, *50*, 214–228, DOI: 10.1002/tera.1420500307.
- (66) Hanada, K.; Tamai, M.; Yamagishi, M.; Ohmura, S.; Sawada, J.; Tanaka, I. Isolation and Characterization of E-64, a New Thiol Protease Inhibitor. *Agricultural and Biological Chemistry* **1978**, *42*, 523–528, DOI: 10.1080/00021369.1978.10863014.
- (67) Powers, J. C.; Asgian, J. L.; Ekici, Ö. D.; James, K. E. Irreversible Inhibitors of Serine, Cysteine, and Threonine Proteases. *Chem. Rev.* **2002**, *102*, 4639–4750, DOI: 10.1021/cr010182v.
- (68) Yamamoto, A.; Tomoo, K.; Hara, T.; Murata, M.; Kitamura, K.; Ishida, T. Substrate specificity of bovine cathepsin B and its inhibition by CA074, based on crystal structure refinement of the complex. *Journal of biochemistry* **2000**, *127*, 635–643.
- (69) Schirmeister, T. New peptidic cysteine protease inhibitors derived from the electrophilic alpha-amino acid aziridine-2,3-dicarboxylic acid. *Journal of medicinal chemistry* **1999**, *42*, 560–572, DOI: 10.1021/jm981061z.
- (70) Barrett, A. J.; Kembhavi, A. A.; Brown, M. A.; Kirschke, H.; Knight, C. G.; Tamai, M.; Hanada, K. L-trans-Epoxy succinyl-leucylamido(4-guanidino)butane (E-64) and its analogues as inhibitors of cysteine proteinases including cathepsins B, H and L. *The Biochemical journal* **1982**, *201*, 189–198.
- (71) Hanzlik, R. P.; Thompson, S. A. Vinylogous amino acid esters: A new class of inactivators for thiol proteases. *J. Med. Chem.* **1984**, *27*, 711–712, DOI: 10.1021/jm00372a001.
- (72) Thompson, S. A.; Andrews, P. R.; Hanzlik, R. P. Carboxyl-modified amino acids and peptides as protease inhibitors. *J. Med. Chem.* **1986**, *29*, 104–111, DOI: 10.1021/jm00151a018.
- (73) Liu, S.; Hanzlik, R. P. Structure-activity relationships for inhibition of papain by peptide Michael acceptors. *J. Med. Chem.* **1992**, *35*, 1067–1075, DOI: 10.1021/jm00084a012.
- (74) Palmer, J. T.; Rasnick, D.; Klaus, J. L.; Bromme, D. Vinyl Sulfones as Mechanism-Based Cysteine Protease Inhibitors. *J. Med. Chem.* **1995**, *38*, 3193–3196, DOI: 10.1021/jm00017a002.

- (75) Govardhan, C. P.; Abeles, R. H. Inactivation of cysteine proteases. *Archives of biochemistry and biophysics* **1996**, *330*, 110–114, DOI: 10.1006/abbi.1996.0231.
- (76) Olson, J. Antimalarial effects in mice of orally administered peptidyl cysteine protease inhibitors. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **1999**, *7*, 633–638, DOI: 10.1016/S0968-0896(99)00004-8.
- (77) Abdulla, M.-H.; Lim, K.-C.; Sajid, M.; McKerrow, J. H.; Caffrey, C. R. Schistosomiasis mansoni: novel chemotherapy using a cysteine protease inhibitor. *PLoS medicine* **2007**, *4*, e14, DOI: 10.1371/journal.pmed.0040014.
- (78) Kerr, I. D.; Lee, J. H.; Farady, C. J.; Marion, R.; Rickert, M.; Sajid, M.; Pandey, K. C.; Caffrey, C. R.; Legac, J.; Hansell, E. *et al.* Vinyl sulfones as antiparasitic agents and a structural basis for drug design. *The Journal of biological chemistry* **2009**, *284*, 25697–25703, DOI: 10.1074/jbc.M109.014340.
- (79) Chen, Y. T.; Brinen, L. S.; Kerr, I. D.; Hansell, E.; Doyle, P. S.; McKerrow, J. H.; Roush, W. R. In vitro and in vivo studies of the trypanocidal properties of WRR-483 against *Trypanosoma cruzi*. *PLoS neglected tropical diseases* **2010**, *4*, DOI: 10.1371/journal.pntd.0000825.
- (80) Westerik, J. O.; Wolfenden, R. Aldehydes as inhibitors of papain. *The Journal of biological chemistry* **1972**, *247*, 8195–8197.
- (81) Frommer, W.; Junge, B.; Muller, L.; Schmidt, D.; Truscheit, E. New enzyme inhibitors from microorganisms (author's transl). *Planta medica* **1979**, *35*, 195–217, DOI: 10.1055/s-0028-1097207.
- (82) McConnell, R. M.; York, J. L.; Frizzell, D.; Ezell, C. Inhibition studies of some serine and thiol proteinases by new leupeptin analogues. *Journal of medicinal chemistry* **1993**, *36*, 1084–1089.
- (83) Sasaki, T.; Kishi, M.; Saito, M.; Tanaka, T.; Higuchi, N.; Kominami, E.; Katunuma, N.; Murachi, T. Inhibitory effect of di- and tripeptidyl aldehydes on calpains and cathepsins. *Journal of enzyme inhibition* **1990**, *3*, 195–201.
- (84) Adkison, K. K.; Barrett, D. G.; Deaton, D. N.; Gampe, R. T.; Hassell, A. M.; Long, S. T.; McFadyen, R. B.; Miller, A. B.; Miller, L. R.; Payne, J. A. *et al.* Semicarbazone-based inhibitors of cathepsin K, are they prodrugs for aldehyde inhibitors? *Bioorganic & medicinal chemistry letters* **2006**, *16*, 978–983, DOI: 10.1016/j.bmcl.2005.10.108.
- (85) Du, X.; Guo, C.; Hansell, E.; Doyle, P. S.; Caffrey, C. R.; Holler, T. P.; McKerrow, J. H.; Cohen, F. E. Synthesis and Structure–Activity Relationship Study of Potent Trypanocidal Thio Semicarbazone Inhibitors of the Trypanosomal Cysteine Protease Cruzain. *J. Med. Chem.* **2002**, *45*, 2695–2707, DOI: 10.1021/jm010459j.
- (86) Raghav, N.; Kaur, R. Synthesis and evaluation of some semicarbazone- and thiosemicarbazone-based cathepsin B inhibitors. *Med Chem Res*, **23**, 4669–4679, DOI: 10.1007/s00044-014-1036-7.
- (87) Lowe, G.; Yuthavong, Y. Kinetic specificity in papain-catalysed hydrolyses. *Biochem. J.* **1971**, *124*, 107–115, DOI: 10.1042/bj1240107.
- (88) Falgoutyret, J.-P.; Oballa, R. M.; Okamoto, O.; Wesolowski, G.; Aubin, Y.; Rydzewski, R. M.; Prasit, P.; Riendeau, D.; Rodan, S. B.; Percival, M. D. Novel, Nonpeptidic Cyanamides as Potent and Reversible Inhibitors of Human Cathepsins K and L. *J. Med. Chem.* **2001**, *44*, 94–104, DOI: 10.1021/jm0003440.
- (89) Mott, B. T.; Ferreira, R. S.; Simeonov, A.; Jadhav, A.; Ang, K. K.-H.; Leister, W.; Shen, M.; Silveira, J. T.; Doyle, P. S.; Arkin, M. R. *et al.* Identification and optimization of inhibitors of Trypanosomal cysteine proteases: cruzain, rhodesain, and TbCatB. *Journal of medicinal chemistry* **2010**, *53*, 52–60, DOI: 10.1021/jm901069a.
- (90) Ehmke, V.; Quinsaat, J. E. Q.; Rivera-Fuentes, P.; Heindl, C.; Freymond, C.; Rottmann, M.; Brun, R.; Schirmeister, T.; Diederich, F. Tuning and predicting biological affinity: aryl nitriles as cysteine protease inhibitors. *Organic & biomolecular chemistry* **2012**, *10*, 5764–5768, DOI: 10.1039/c2ob00034b.
- (91) Ehmke, V.; Heindl, C.; Rottmann, M.; Freymond, C.; Schweizer, W. B.; Brun, R.; Stich, A.; Schirmeister, T.; Diederich, F. Potent and selective inhibition of cysteine proteases from *Plasmodium falciparum* and *Trypanosoma brucei*. *ChemMedChem* **2011**, *6*, 273–278, DOI: 10.1002/cmdc.201000449.

- (92) Gauthier, J. Y.; Chauret, N.; Cromlish, W.; Desmarais, S.; Le Duong, T.; Falgueyret, J.-P.; Kimmel, D. B.; Lamontagne, S.; Leger, S.; LeRiche, T. *et al.* The discovery of odanacatib (MK-0822), a selective inhibitor of cathepsin K. *Bioorganic & medicinal chemistry letters* **2008**, *18*, 923–928, DOI: 10.1016/j.bmcl.2007.12.047.
- (93) Moon, J. B.; Coleman, R. S.; Hanzlik, R. P. Reversible covalent inhibition of papain by a peptide nitrile. Carbon-13 NMR evidence for a thioimide ester adduct. *J. Am. Chem. Soc.* **1986**, *108*, 1350–1351, DOI: 10.1021/ja00266a066.
- (94) Hughes, T. E.; Mone, M. D.; Russell, M. E.; Weldon, S. C.; Villhauer, E. B. NVP-DPP728 (1-[[[2-[(5-Cyanopyridin-2-yl)amino]ethyl]amino]acetyl]-2-cyano-(S)-pyrrolidine], a Slow-Binding Inhibitor of Dipeptidyl Peptidase IV. *Biochemistry* **1999**, *38*, 11597–11603, DOI: 10.1021/bi990852f.
- (95) Li, J.; Wilk, E.; Wilk, S. Aminoacylpyrrolidine-2-nitriles: potent and stable inhibitors of dipeptidyl-peptidase IV (CD 26). *Archives of biochemistry and biophysics* **1995**, *323*, 148–154, DOI: 10.1006/abbi.1995.0020.
- (96) Singh, J.; Petter, R. C.; Baillie, T. A.; Whitty, A. The resurgence of covalent drugs. *Nature reviews. Drug discovery* **2011**, *10*, 307–317, DOI: 10.1038/nrd3410.
- (97) Kwak, E. L.; Sordella, R.; Bell, D. W.; Godin-Heymann, N.; Okimoto, R. A.; Brannigan, B. W.; Harris, P. L.; Driscoll, D. R.; Fidias, P.; Lynch, T. J. *et al.* Irreversible inhibitors of the EGF receptor may circumvent acquired resistance to gefitinib. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2005**, *102*, 7665–7670, DOI: 10.1073/pnas.0502860102.
- (98) Hagel, M.; Niu, D.; St Martin, T.; Sheets, M. P.; Qiao, L.; Bernard, H.; Karp, R. M.; Zhu, Z.; Labenski, M. T.; Chaturvedi, P. *et al.* Selective irreversible inhibition of a protease by targeting a noncatalytic cysteine. *Nature chemical biology* **2011**, *7*, 22–24, DOI: 10.1038/nchembio.492.
- (99) Robertson, J. G. Mechanistic basis of enzyme-targeted drugs. *Biochemistry* **2005**, *44*, 5561–5571, DOI: 10.1021/bi050247e.
- (100) Bauer, R. A. Covalent inhibitors in drug discovery: from accidental discoveries to avoided liabilities and designed therapies. *Drug discovery today* **2015**, *20*, 1061–1073, DOI: 10.1016/j.drudis.2015.05.005.
- (101) Lee, C.-U.; Grossmann, T. N. Reversible covalent inhibition of a protein target. *Angewandte Chemie (International ed. in English)* **2012**, *51*, 8699–8700, DOI: 10.1002/anie.201203341.
- (102) Lammert, C.; Einarsson, S.; Saha, C.; Niklasson, A.; Bjornsson, E.; Chalasani, N. Relationship between daily dose of oral medications and idiosyncratic drug-induced liver injury: search for signals. *Hepatology (Baltimore, Md.)* **2008**, *47*, 2003–2009, DOI: 10.1002/hep.22272.
- (103) Schneider, T. Synthese von reversiblen und kovalent-reversiblen Cysteinprotease-Inhibitoren. Dissertation, Johannes Gutenberg-Universität, Mainz, **2012**.
- (104) Schneider, T. H.; Rieger, M.; Ansorg, K.; Sobolev, A. N.; Schirmeister, T.; Engels, B.; Grabowsky, S. Vinyl sulfone building blocks in covalently reversible reactions with thiols. *New J. Chem.* **2015**, *39*, 5841–5853, DOI: 10.1039/C5NJ00368G.
- (105) Bernasconi, C. F.; Ketner, R. J.; Ragains, M. L.; Chen, X.; Rappoport, Z. Unraveling Structure–Reactivity Relationships in S N V Reactions: Kinetics of the Reactions of Methoxybenzylidenemalononitrile, 2-(Methylthiobenzylidene)-1,3-indandione, 2-(Benzylthiobenzylidene)-1,3-indandione, and Methyl β-Methylthio-α-nitrocinnamate with OH⁻ and Thiolate Ions in Aqueous DMSO. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 2155–2164, DOI: 10.1021/ja003536t.
- (106) Bernasconi, C. F.; Rappoport, Z. Recent advances in our mechanistic understanding of S(N)V reactions. *Accounts of chemical research* **2009**, *42*, 993–1003, DOI: 10.1021/ar900048q.
- (107) Wu, Y.-J.; He, H.; Hu, S.; Huang, Y.; Scola, P. M.; Grant-Young, K.; Bertekap, R. L.; Wu, D.; Gao, Q.; Li, Y. *et al.* Identification of a potent and selective 5-HT₆ antagonist: one-step synthesis of (E)-3-(benzenesulfonyl)-2-(methylsulfanyl)pyrido[1,2-a]pyrimidin-4-ylidenamine from 2-(benzenesulfonyl)-3,3-bis(methylsulfanyl)acrylonitrile. *Journal of medicinal chemistry* **2003**, *46*, 4834–4837, DOI: 10.1021/jm034142q.
- (108) Hosomi, A.; Miyashiro, Y.; Yoshida, R.; Tominaga, Y.; Yanagi, T.; Hojo, M. Studies of organosilicon chemistry. 107. N-(silylmethyl)-substituted ketene N,S-acetals as a synthetic

- equivalent of a novel 1,3-dipolar reagent, alkylideneazomethine ylides: Synthesis and [3 + 2] cycloadditions. *J. Org. Chem.* **1990**, *55*, 5308–5310, DOI: 10.1021/jo00306a004.
- (109) Song, B.; Yang, S.; Zhong, H.; Jin, L.; Hu, D.; Liu, G. Synthesis and bioactivity of 2-cyanoacrylates containing a trifluoromethylphenyl moiety. *Journal of Fluorine Chemistry* **2005**, *126*, 87–92, DOI: 10.1016/j.jfluchem.2004.10.041.
- (110) Ouyang, G.; Song, B.; Zhang, H.; Yang, S.; Jin, L.; Li, Q.; Hu, D. A Novel Synthesis of (E)-3-Methylthio-3-Substituted Arylamino-2-Cyanoacrylates under Microwave Irradiation. *Molecules* **2005**, *10*, 1351–1357, DOI: 10.3390/10101351.
- (111) Radzicka, A.; Wolfenden, R. A proficient enzyme. *Science* **1995**, *267*, 90–93, DOI: 10.1126/science.7809611.
- (112) Michaelis, L.; Menten, M. L. Die Kinetik der Invertinwirkung. *Biochem. Z.* **1913**, *49*, 352.
- (113) Michaelis, L.; Menten, M. L.; Johnson, K. A.; Goody, R. S. The original Michaelis constant: translation of the 1913 Michaelis-Menten paper. *Biochemistry* **2011**, *50*, 8264–8269, DOI: 10.1021/bi201284u.
- (114) Briggs, G. E.; Haldane, J. B. A Note on the Kinetics of Enzyme Action. *The Biochemical journal* **1925**, *19*, 338–339.
- (115) Lineweaver, H.; Burk, D. The Determination of Enzyme Dissociation Constants. *J. Am. Chem. Soc.* **1934**, *56*, 658–666, DOI: 10.1021/ja01318a036.
- (116) Cheng, Y.; Prusoff, W. H. Relationship between the inhibition constant (K₁) and the concentration of inhibitor which causes 50 per cent inhibition (I₅₀) of an enzymatic reaction. *Biochemical pharmacology* **1973**, *22*, 3099–3108.
- (117) Tian, W. X.; Tsou, C. L. Determination of the rate constant of enzyme modification by measuring the substrate reaction in the presence of the modifier. *Biochemistry* **1982**, *21*, 1028–1032, DOI: 10.1021/bi00534a031.
- (118) Copeland, R. A. *Evaluation of Enzyme Inhibitors in Drug Discovery*; John Wiley & Sons, Inc: Hoboken, NJ, USA, **2013**.
- (119) Warshel, A.; Levitt, M. Theoretical studies of enzymic reactions: Dielectric, electrostatic and steric stabilization of the carbonium ion in the reaction of lysozyme. *Journal of Molecular Biology* **1976**, *103*, 227–249, DOI: 10.1016/0022-2836(76)90311-9.
- (120) Schirmeister, T.; Kesselring, J.; Jung, S.; Schneider, T. H.; Weickert, A.; Becker, J.; Lee, W.; Bamberger, D.; Wich, P. R.; Distler, U. *et al.* Quantum Chemical-Based Protocol for the Rational Design of Covalent Inhibitors. *Journal of the American Chemical Society* **2016**, *138*, 8332–8335, DOI: 10.1021/jacs.6b03052.
- (121) Brömme, D.; Klaus, J. L.; Okamoto, K.; Rasnick, D.; Palmer, J. T. Peptidyl vinyl sulphones: a new class of potent and selective cysteine protease inhibitors: S2P2 specificity of human cathepsin O2 in comparison with cathepsins S and L. *Biochemical Journal* **1996**, *315*, 85–89.
- (122) Jaishankar, P.; Hansell, E.; Zhao, D.-M.; Doyle, P. S.; McKerrow, J. H.; Renslo, A. R. Potency and selectivity of P2/P3-modified inhibitors of cysteine proteases from trypanosomes. *Bioorganic & medicinal chemistry letters* **2008**, *18*, 624–628, DOI: 10.1016/j.bmcl.2007.11.070.
- (123) Yang, P.-Y.; Wang, M.; He, C. Y.; Yao, S. Q. Proteomic profiling and potential cellular target identification of K11777, a clinical cysteine protease inhibitor, in *Trypanosoma brucei*. *Chemical communications (Cambridge, England)* **2012**, *48*, 835–837, DOI: 10.1039/c1cc16178d.
- (124) Fennell, B. D.; Warren, J. M.; Chung, K. K.; Main, H. L.; Arend, A. B.; Tochowicz, A.; Gotz, M. G. Optimization of peptidyl allyl sulfones as clan CA cysteine protease inhibitors. *Journal of enzyme inhibition and medicinal chemistry* **2013**, *28*, 468–478, DOI: 10.3109/14756366.2011.651466.
- (125) Kiemele, E. R.; Wathier, M.; Bichler, P.; Love, J. A. Total Synthesis of K777: Successful Application of Transition-Metal-Catalyzed Alkyne Hydrothiolation toward the Modular Synthesis of a Potent Cysteine Protease Inhibitor. *Organic letters* **2016**, *18*, 492–495, DOI: 10.1021/acs.orglett.5b03535.
- (126) Scheidt, K. A.; Roush, W. R.; McKerrow, J. H.; Selzer, P. M.; Hansell, E.; Rosenthal, P. J. Structure-based design, synthesis and evaluation of conformationally constrained cysteine protease inhibitors. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **1998**, *6*, 2477–2494, DOI: 10.1016/S0968-0896(98)80022-9.

- (127) Nahm, S.; Weinreb, S. M. N-methoxy-n-methylamides as effective acylating agents. *Tetrahedron Letters* **1981**, *22*, 3815–3818, DOI: 10.1016/S0040-4039(01)91316-4.
- (128) Davis, F. A.; Han, W.; Murphy, C. K. Selective, Electrophilic Fluorinations Using N-Fluoro-o-benzenedisulfonimide. *J. Org. Chem.* **1995**, *60*, 4730–4737, DOI: 10.1021/jo00120a014.
- (129) Differding, E.; Lang, R. W. New fluorinating reagents - I. The first enantioselective fluorination reaction. *Tetrahedron Letters* **1988**, *29*, 6087–6090, DOI: 10.1016/S0040-4039(00)82271-6.
- (130) Bryant, C.; Kerr, I. D.; Debnath, M.; Ang, K. K. H.; Ratnam, J.; Ferreira, R. S.; Jaishankar, P.; Zhao, D.; Arkin, M. R.; McKerrow, J. H. *et al.* Novel non-peptidic vinylsulfones targeting the S2 and S3 subsites of parasite cysteine proteases. *Bioorganic & medicinal chemistry letters* **2009**, *19*, 6218–6221, DOI: 10.1016/j.bmcl.2009.08.098.
- (131) Ludewig, S.; Kossner, M.; Schiller, M.; Baumann, K.; Schirmeister, T. Enzyme Kinetics and Hit Validation in Fluorimetric Protease Assays. *CTMC* **2010**, *10*, 368–382, DOI: 10.2174/156802610790725498.
- (132) Sari Sabban. Surface Plasmon Resonance (SPR) configuration.: Development of an in vitro model system for studying the interaction of Equus caballus IgE with its high- affinity FcεRI receptor.
https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/d/d5/Surface_Plasmon_Resonance_%28SPR%29.jpg. *Abgerufen: 12/2016*
- (133) Mittler-Neher, S.; Spinke, J.; Liley, M.; Nelles, G.; Weisser, M.; Back, R.; Wenz, G.; Knoll, W. Spectroscopic and surface-analytical characterization of self-assembled layers on Au. *Biosensors and Bioelectronics* **1995**, *10*, 903–916, DOI: 10.1016/0956-5663(95)99228-D.
- (134) Jürgen Worm. *Winspall*; Max-Planck-Institut für Polymerforschung, Mainz, **2006**.
- (135) Nakayama, G. R.; Caton, M. C.; Nova, M. P.; Parandoosh, Z. Assessment of the Alamar Blue assay for cellular growth and viability in vitro. *Journal of Immunological Methods* **1997**, *204*, 205–208, DOI: 10.1016/S0022-1759(97)00043-4.
- (136) *LeadIT/FlexX*; BioSolveIT GmbH: St. Augustin, Germany, **2012**.
- (137) *Molecular Operating Environment*; Chemical Computing Group Inc: 1010 Sherbooke St. West, Suite #910, Montreal, QC, Canada, H3A 2R7, **2012**.
- (138) 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. *Journal of chemical information and modeling* **2015**, *55*, 398–406, DOI: 10.1021/ci500681r.
- (139) Neudert, G.; Klebe, G. DSX: a knowledge-based scoring function for the assessment of protein-ligand complexes. *Journal of chemical information and modeling* **2011**, *51*, 2731–2745, DOI: 10.1021/ci200274q.
- (140) Reulecke, I.; Lange, G.; Albrecht, J.; Klein, R.; Rarey, M. Towards an integrated description of hydrogen bonding and dehydration: decreasing false positives in virtual screening with the HYDE scoring function. *ChemMedChem* **2008**, *3*, 885–897, DOI: 10.1002/cmdc.200700319.
- (141) Christoph Grathwol. Diplomarbeit, Johannes Gutenberg-Universität, Mainz, **2013**.
- (142) Royo, S.; Rodriguez, S.; Schirmeister, T.; Kesselring, J.; Kaiser, M.; Gonzalez, F. V. Dipeptidyl Enoates As Potent Rhodesain Inhibitors That Display a Dual Mode of Action. *ChemMedChem* **2015**, *10*, 1484–1487, DOI: 10.1002/cmdc.201500204.
- (143) Latorre, A.; Schirmeister, T.; Kesselring, J.; Jung, S.; Johe, P.; Hellmich, U. A.; Heilos, A.; Engels, B.; Krauth-Siegel, R. L.; Dirdjaja, N. *et al.* Dipeptidyl Nitroalkenes as Potent Reversible Inhibitors of Cysteine Proteases Rhodesain and Cruzain. *ACS medicinal chemistry letters* **2016**, *7*, 1073–1076, DOI: 10.1021/acsmedchemlett.6b00276.
- (144) Gottlieb, H. E.; Kotlyar, V.; Nudelman, A. NMR Chemical Shifts of Common Laboratory Solvents as Trace Impurities. *J. Org. Chem.* **1997**, *62*, 7512–7515, DOI: 10.1021/jo971176v.
- (145) Augustin, M.; Schmidt, R.; Rudolf, W.-D. Synthese und Reaktivität von Phenylsulfonyl-cyan- keten-S,S-acetalen. *Z. Chem.* **1977**, *17*, 289–290, DOI: 10.1002/zfch.19770170805.
- (146) Porte, V., Thioloy, M., Pigoux, T., Métro, T.-X., Martinez, J. and Lamaty, F. Peptide Mechanosynthesis by Direct Coupling of N-Protected α-Amino Acids with Amino Esters. *Eur. J. Org. Chem.* **2016**, 3505–3508. doi:10.1002/ejoc.201600617

- (147) Chi, Z.; Liu, S.; Sun, B.; Tian, J. Practical Peptide Synthesis Mediated by a Recyclable Hypervalent Iodine Reagent and Tris(4-methoxyphenyl)phosphine. *Organic Letters* **2015**, *17*, 4106 – 4109.
- (148) Frączak, O., Lasota, A., Tymecka, D., Kosson, P., Muchowska, A., Misicka, A., and Olma, A. Synthesis, binding affinities and metabolic stability of dimeric dermorphin analogs modified with β_3 -homo-amino acids. *J. Pept. Sci.*, **2016**, *22*, 222–227. doi: 10.1002/psc.2869.

Danksagung

Lebenslauf
