

Entwicklung, Synthese und Charakterisierung neuer Inhibitoren der West-Nil-Virus NS2B-NS3- Protease

Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades

der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

dem

Fachbereich Pharmazie der
Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

Anton Epp

aus Koktschetaw

Marburg 2018

Eingereicht am 30.05.2018

Erstgutachter: **Prof. Dr. Torsten Steinmetzer**

Zweitgutachter: **Prof. Dr. Wibke Diederich**

Tag der mündlichen Prüfung am 13.07.2018

Hochschulkennziffer: 1180

Die Untersuchungen zur vorliegenden Arbeit wurden auf Anregung von Herrn Prof. Dr. Torsten Steinmetzer am Institut für Pharmazeutische Chemie des Fachbereichs Pharmazie der Philipps-Universität Marburg in der Zeit von Mai 2014 bis September 2017 durchgeführt.

“What we know is a drop, what we don't know is an ocean.”

Isaac Newton

Inhaltsverzeichnis

I.	Abkürzungsverzeichnis	5
II.	Abbildungsverzeichnis	9
III.	Tabellenverzeichnis.....	12
1	Einleitung	14
1.1	West-Nil-Virus	14
1.2	Replikationszyklus und Aufbau des Vorläuferpolyproteins des WNV	16
1.3	Rolle des Furins bei der Reifung des WNV	18
1.4	Behandlung der WNV-Infektionen	19
1.5	Impfstoffe	20
1.6	Bekannte Hemmstoffe der WNV-NS2B-NS3-Protease	21
1.6.1	Peptidische Inhibitoren.....	21
1.6.2	Nicht-peptidische Inhibitoren.....	24
1.7	Furinhemmung	25
1.8	Hemmung von Serinproteasen durch Metallionen	26
1.9	Zellpenetrierende Peptide.....	27
2	Ziel der Arbeit	29
3	Ergebnisse und Diskussion.....	30
3.1	Modifizierung des P2-Restes.....	30
3.2	Modifizierung des P3-Restes.....	36
3.3	Modifizierung des P1-Restes.....	37
3.4	Keton-Derivate als Inhibitoren der NS2B-NS3-Proteasen	39
3.5	Zellpenetrierende zyklische Peptidinhibitoren	42
3.6	Cholesteryl- und Dihydrocholesterylinhibitoren	46
3.6.1	Synthese der Cholesterol-Inhibitor-Konjugate.....	47
3.6.2	Synthese der Dihydrocholesterylinhibitoren	49
3.6.3	Hemmwirkung der Cholesteryl-derivate	50

3.6.4	Testung der Cholesterylinhibitoren in Zellkultur	53
3.7	Hemmstoffe mit zusätzlichem P5-Rest	55
3.8	Einbau von Gabapentin in die Inhibitorleitstruktur	58
3.9	Dockingstudien zur Erlangung neuer Inhibitorstrukturen	59
3.10	Synthese weiterer zyklischer Inhibitoren	65
3.10.1	Synthese der zyklischen Inhibitoren.....	68
3.11	Einbau eines P1-P1'-Diaminoacetone-Bausteins	70
3.12	Boronsäuren als Inhibitoren WNV-NS2B-NS3-Protease.....	71
3.13	Hemmung der WNV-Protease durch Zinkionen	73
3.13.1	Hemmung durch Zinkionen in Gegenwart von EDTA	75
3.13.2	Effekt der Zinksalze auf die DENV-2 NS2B-NS3-Protease.....	76
3.13.3	Lineweaver-Burk-Plot mit Zinkacetat als Inhibitor	77
3.13.4	Modellierung der möglichen Zink-Bindungsstelle	78
3.13.5	Enzymkinetische Messungen mit Inhibitoren in Gegenwart von Zinksalzen....	80
3.13.6	Zellkulturuntersuchungen in Gegenwart der Zinksalze	86
4	Zusammenfassung und Ausblick	87
5	Experimenteller Teil.....	92
5.1	Allgemeine Arbeitstechniken	92
5.2	Festphasenpeptidsynthese.....	92
5.3	HPLC.....	93
5.3.1	Analytische HPLC.....	93
5.3.2	Präparative HPLC	93
5.4	Dünnschichtchromatographie (DC).....	94
5.5	Massenspektrometrie.....	94
5.6	Lyophilisation.....	94
5.7	Enzymkinetische Messungen	94
5.7.1	Messungen mit der WNV-Protease.....	95

5.7.2	Messungen mit der DENV-2-Protease	96
5.7.3	IC_{50} -Bestimmung	96
5.7.4	Bestimmung der prozentualen Hemmung der DENV-2 -Protease	97
5.8	Generelle Synthesemethoden	98
5.8.1	Methode A.....	98
5.8.2	Methode A2.....	99
5.8.3	Methode B	100
5.8.4	Methode C	100
5.8.5	Methode D.....	101
5.8.6	Methode E	101
5.8.7	Methode F	101
5.8.8	Methode G.....	102
5.8.9	Methode H.....	102
5.8.10	Methode I	102
5.8.11	Methode J	103
5.8.12	Methode K.....	103
5.9	Synthese der Inhibitoren 10 - 14 mit acylierten α,γ -Diaminobutter- und α,β -Diaminopropionsäurerest in P2-Position	104
5.10	Synthese der Inhibitoren 15 - 19 mit acylierten α,γ -Diaminobutter- und α,β -Diaminopropionsäureresten in P3-Position.....	106
5.11	Synthese der Inhibitoren 20 - 23 mit acylierten α,γ -Diaminobutter- und α,β -Diaminopropionsäurerest in P1-Position	108
5.12	Synthese der Arginylketon-Derivate	111
24a	Boc-Arg(Mtr)-N-CH ₃ -O-CH ₃	111
5.13	Synthese der zyklischen Peptide	114
5.14	Synthese der Cholesteryl- und Dihydrocholesteryl-derivate	116
5.15	Synthese der Inhibitoren mit zusätzlichem P5-Rest	121

5.16	Inhibitoren mit einem Gabapentinrest in P1- oder P4-Position.....	123
5.17	Inhibitoren mit alternativen P1- und P3-Resten	125
5.18	Synthese der zyklischen Inhibitoren 52 - 56	127
5.19	Synthese symmetrischer Inhibitoren mit Diaminoaceton als Zentralbaustein.....	130
6	Literaturverzeichnis.....	132
7	Danksagung.....	141
8	Lebenslauf.....	142
9	Erklärung.....	143

I. Abkürzungsverzeichnis

Die Abkürzungen der Aminosäuren und ihrer Derivate entsprechen den Empfehlungen der IUPAC-IUBMM *Joint Commission on Biochemical Nomenclature* (JCBN) und des *Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology* (NC-IUBMB) und werden im Ein- oder Drei-Buchstabencode verwendet.

Sofern nicht anders gekennzeichnet, besitzen alle Aminosäuren und deren Derivate eine L-Konfiguration.

2-CTC	2-Chlortritylchlorid
6-Cl-HOBt	6-Chlor-1-Hydroxybenzotriazol
Å	Ångström ($1 \text{ Å} = 10^{-10} \text{ m}$)
Ac	Acetyl
ACN	Acetonitril
Amba	4-Amidinobenzylamin
AMC	7-Amino-4-methylcoumarin
AMe	Aminomethyl
AS	Aminosäure
ber.	berechnet
Boc	<i>tert</i> -Butyloxycarbonyl
Bz	Benzoyl
Bzl	Benzyl
BzlMgBr	Benzylmagnesiumbromid
CaCl ₂	Calciumchlorid
Cbz	Benzyloxycarbonyl
Cha	Cyclohexylalanin
Chg	Cyclohexylglycin

CMK	Chlormethylketon
Cpa	Cyclopropylalanin
CPP	zellpenetrierende Peptide (<i>cell-penetrating peptides</i>)
D9R	nona-DArginin-Amid
Dab	α,γ -Diaminobuttersäure
DAMCH	Diaminomethylcyclohexyl
Dap	α,β -Diaminopropionsäure
DC	Dünnschichtchromatographie
DCM	Dichlormethan
Dde	1-(4,4-Dimethyl-2,6-dioxocyclohex-1-yliden)ethyl
DENV-2	Dengue-2 Virus
Di-H-Chol	Dihydrocholesterol
DIPEA	<i>N,N</i> -Diisopropylethylamin
DMF	<i>N,N</i> -Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGL	19-Amino-5-oxo-3,10,13,16-tetraoxa-6-azanonadecanoic acid
ER	Endoplasmatisches Retikulum
EtOAc	Essigsäureethylester
EtMgBr	Ethylmagnesiumbromid
Äq.	Moläquivalente
Fmoc	9-Fluorenylmethoxycarbonyl
Fmoc-OSu	N-(9-Fluorenylmethoxycarbonyloxy)succinimid
gef.	gefunden
ges.	gesättigt

HATU	[O-(7-Azabenzotriazol-1-yl)-N,N,N',N'-tetramethyluronium-hexafluorophosphat]
HBTU	O-(Benzotriazol-1-yl)-tetramethyluronium Hexafluorophosphat
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)ethansulfonsäure
HOBt	1-Hydroxybenzotriazol
HPLC	<i>high performance liquid chromatography</i>
IC_{50}	Inhibitorkonzentration bei 50 % Hemmung
k_{cat}	Wechselzahl eines Enzyms
K_i	Dissoziationsgleichgewichtskonstante des Enzym-Inhibitor-Komplexes
K_i^*	scheinbare Dissoziationsgleichgewichtskonstante des Enzym-Inhibitor-Komplexes
KLK	Kallikrein
K_M	Michaelis-Menten-Konstante
k_{obs}	scheinbare pseudo-erster Ordnungsgeschwindigkeitskonstante
LM	Lösungsmittel/Laufmittel
M	molar (mol/L)
MeOH	Methanol
MS	Massenspektrometrie
Mtr	4-Methoxy-2,3,6-trimethylbenzenesulphonyl
Mtt	4-Methyltrityl
MW	Molekulargewicht
Nle	Norleucin
NMM	<i>N</i> -Methylmorpholin
NMR	Kernspinresonanzspektroskopie
Pbf	2,2,4,6,7-Pentamethyl-2,3-dihydrobenzofuran-5-sulfonyl
PTFE	Polytetrafluorethylen

pH	<i>potentia Hydrogenii</i>
PhAc	Phenylacetyl
PhiPr	Phenylisopropyl
pKa	negativer dekadischer Logarithmus der Säurekonstante
pNA	<i>para</i> -Nitroanilin
PyBOP	Benzotriazolyl-1-oxy-tripyrilidino-phosphonium Hexafluorophosphat
RFU	relative Fluoreszenzeinheit
RT	Raumtemperatur
RdRP	<i>RNA-dependent RNA polymerase</i>
SPPS	<i>solid phase peptide synthesis</i> – Festphasenpeptidsynthese
<i>tert</i> -BuOH	2-Methyl-2-propanol (tert-Butanol)
TFA	Trifluoressigsäure
THF	Tetrahydrofuran
TIS	Triisopropylsilan
Trt	Trityl
V_{\max}	Maximalgeschwindigkeit des Enzyms
WNV	West-Nil-Virus
Xda	Xylylendiamin

II. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Anzahl der kumulierten neuroinvasiven Krankheitsverläufe und Todesfälle nach WNV-Infektionen	15
Abbildung 2: Replikationszyklus des WNV.	16
Abbildung 3: Aufbau des WNV-Polyproteins.	17
Abbildung 4: Schematischer Aufbau des Flavivirus-Polyproteins mit den Spaltstellen der Wirtsproteasen und des NS2B-NS3-Komplexes.....	18
Abbildung 5: Schematischer Aufbau der WNV-Membranoberfläche im reifen und unreifen Zustand.....	19
Abbildung 6: Struktur des Inhibitors 1 (2,3-Dichlor-PhAc-Lys-Lys-GCMA).	23
Abbildung 7: Struktur des Furininhibitors MI-1148.....	25
Abbildung 8: Kristallstrukturen der inhibitorischen Metallbindungsstelle im KLK5 und im Ratten-KLK2.....	27
Abbildung 9: Aufnahmemechanismus zellpenetrierender zyklischer Peptide	28
Abbildung 10: Bevorzugte Spaltsequenzen der WNV NS2B-NS3-Protease.....	30
Abbildung 11: Komplex des Inhibitors 1 (links) mit der WNV-Protease	31
Abbildung 12: Vergleich der Längen der Seitenketten von Lysin, Dap(Gly) und Dab(Gly). 32	
Abbildung 13: HPLC-Chromatogramm des erhaltenen Rohproduktes der Verbindung 11 ...	33
Abbildung 14: Struktur des gewünschten Inhibitor 11 und des vermutlichen Iso-Dap-Nebenprodukts.	33
Abbildung 15: Vergleich der berechneten pK_a -Werte des Hemmstoffs 11 (links) und des Referenzinhibitors 9 (rechts).	35
Abbildung 16: Struktur des Inhibitors 1 im Komplex mit der WNV NS2B-NS3-Protease ...	36
Abbildung 17: HPLC-Chromatogramm des Rohprodukts von Inhibitor 27	44
Abbildung 18: Struktur des membrangebundenen Cholesterol-Linker-Inhibitor-Konjugats. 46	
Abbildung 19: Hemmung der WNV-Protease durch Inhibitor 31	51
Abbildung 20: Überleben der Huh-7-Zellen bei verschiedenen Konzentrationen der Cholesteryl/Dihydrocholesteryl-derivate.....	53

Abbildung 21: Reduktion der WNV-Vermehrung durch Cholesteryl/Dihydrocholesteryl-Derivate 29-34	55
Abbildung 22: Modellierter Bindungsmodus des Inhibitors 35 im aktiven Zentrum der WNV-Protease	57
Abbildung 23: Struktur der ungewöhnlichen Aminosäure Gabapentin.....	58
Abbildung 24: Mittels Docking bestimmter Bindungsmodus von zwei Fragmenten der Zinc12-Datenbank.....	60
Abbildung 25: Aktives Zentrum der NS2B-NS3 Protease des WNV,	61
Abbildung 26: Bindung des Inhibitors 1 im aktiven Zentrum der WNV-Protease.....	66
Abbildung 27: Zyklisierungsreaktion und HPLC-Chromatogramm des Ausgangsstoffs Succinyl-Lys(Boc)-Lys(Boc)-m-Xylylendiamin (m-Xda)	69
Abbildung 28: Hemmung der WNV-Protease durch Zinkacetat.	73
Abbildung 29: Hemmung der WNV NS2B-NS3-Protease durch Zinkacetat.....	74
Abbildung 30: Restaktivität der WNV-Protease in Gegenwart verschiedener Metallsalze....	75
Abbildung 31: Restaktivität der DENV-2-Protease in Gegenwart verschiedener Metallsalze	76
Abbildung 32: Doppelt reziproke Lineweaver-Burk-Auftragung der Hemmung der WNV-Protease durch Zinkacetat.	78
Abbildung 33: Berechnete potentielle Bindungsstellen für Zinkionen an der WNV-Protease.	80
Abbildung 34: Dixon-Plot der Hemmung der WNV-Protease durch den Inhibitor 24 in Gegenwart einer konstanten Konzentration von Zinkacetat.	82
Abbildung 35: Dixon-Plot der Hemmung der WNV-Protease durch Inhibitor 24 in Gegenwart einer konstanten Konzentration des Inhibitors 55	83
Abbildung 36: Hemmung der WNV-Protease bei einer Konzentration des Substrates MI-0624 von 100 μ M durch Inhibitor 24	84
Abbildung 37: Hemmwirkung der WNV-Protease durch den Inhibitor 24 allein und in Kombination mit einer konstanten Konzentration von Zinkacetat oder des Inhibitors 55	85

Abbildung 38: Auswirkung von Zinkionen und Ribavirin auf die Vermehrung des DENV-2 (links) und des WNV (rechts) in Huh7-Zellen.....	86
Abbildung 39: HPLC-Analyse des Zwischenproduktes 40a nach Aufarbeitung.	123

III. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Bekannte lineare Oligo-D-Arginin-Inhibitoren der WNV-Protease.....	22
Tabelle 2: Substratanaloge Hemmstoffe der WNV-Protease mit einem Arginal oder Boroarginin in P1-Position.....	22
Tabelle 3: Bekannte Agmatin-Inhibitoren des WNV.....	23
Tabelle 4: Strukturen und Hemmwirkung nicht-peptidischer Hemmstoffe der WNV-Protease.....	24
Tabelle 5: Hemmung der WNV- und DENV-2 NS2B-NS3-Proteasen durch Inhibitoren mit modifiziertem P2-Rest.....	35
Tabelle 6: Hemmung der WNV- und DENV-2 NS2B-NS3-Proteasen durch Inhibitoren mit modifiziertem P3-Rest.....	37
Tabelle 7: Hemmung der WNV-, DENV-2 NS2B-NS3-Proteasen durch Verbindungen der allgemeinen Struktur PhAc-Lys-Lys-P1-NH ₂	39
Tabelle 8: Synthetisierte Keton-Derivate mit den bestimmten K_i -Werten für die WNV-Protease und die prozentuale Hemmung für die Dengue-Protease.....	41
Tabelle 9: Hemmwirkung der zyklischen Peptide auf die WNV- und DENV-2 Protease.....	45
Tabelle 10: Hemmwirkung der synthetisierten Cholesteryl/Dihydrocholesteryl-Derivate.....	51
Tabelle 11: Hemmung der WNV- und DENV-2-Protease durch Inhibitoren mit zusätzlichem P5-Rest.....	56
Tabelle 12: Hemmwirkung der Gabapentin-Derivate.....	58
Tabelle 13: Hemmwirkung der erworbenen Fragmente bei einer Inhibitorkonzentration von 625 μ M im Messansatz.....	62
Tabelle 14: Hemmwirkung der Inhibitoren mit den aus Dockingstudien bestimmten Fragmenten.....	64
Tabelle 15: Hemmwirkung der synthetisierten zyklischen Inhibitoren.....	67
Tabelle 16: Hemmung durch symmetrische Inhibitoren mit dem 1,3-Diaminoaceton als zentralen Baustein.....	70
Tabelle 17: Hemmwirkung der Boronsäurederivate.....	72

Tabelle 18: Hemmung der WNV-Protease (in %) durch Zinkionen und EDTA allein und in Kombination.....	76
Tabelle 19: Auswirkung auf die prozentuale Hemmung der WNV-Protease durch den Inhibitor 24 bei zwei verschiedenen Konzentrationen des Zinksalzes.....	81
Tabelle 20: Syntheschema für die manuelle Festphasenpeptidsynthese nach Fmoc-Strategie.	98
Tabelle 21: Programmierung des Syntheseroboters für den ersten und die nachfolgenden Zyklen der SPPS.....	99

1 Einleitung

1.1 West-Nil-Virus

Die *Flaviviridae* sind eine Familie positiv einzelsträngiger RNA-Viren, die eine Vielzahl von Erkrankungen beim Menschen auslösen können. Ihr Genom ist ca. 10 kb groß und im Vergleich zu DNA-Viren besitzen sie eine ca. 100-fach erhöhte Mutationsrate. Diese Eigenschaft erklärt das Auftreten verschiedener Serotypen innerhalb eines Virus.^{1, 2} Die Familie unterteilt sich in die Gattungen *Flaviviren*, *Pestiviren* und *Hepaciviren*. Zur Gattung *Flaviviren* gehören die Dengue-Viren (DENV), das West-Nil-Virus (WNV), das Japanische-Enzephalitis-Virus und das Gelbfieber-Virus, das namensgebend für die *Flaviviren* ist (*flavus* lateinisch für gelb).³ Das West-Nil-Virus wird durch Stechmücken der Gattungen *Culex* und *Aedes* übertragen, als Reservoirwirte dienen hauptsächlich Vögel.^{4, 5} Menschen, Pferde und andere Wirbeltiere fungieren lediglich als sogenannte „*Dead End*“-Wirte des WNV.

Das Virus wurde erstmals 1937 in Uganda bei einer afrikanischen Frau isoliert.⁶ Seit den 1960er bis zu den 1990er Jahren beschränkte sich die Ausbreitung auf sporadische Ausbrüche in begrenzten Gebieten Europas, Südafrikas, Asiens und des mittleren Ostens⁷. WNV-Infektionen galten nicht als große Bedrohung,⁸ ehe es 1996 zum ersten großen Ausbruch in Rumänien, 1998 in Italien und 2002 in Frankreich kam. 1999 wurde der erste Ausbruch in den USA bestätigt, in der Folge breitete sich das Virus sehr schnell von New York über 46 Staaten der USA und Kanadas aus.^{9, 10} In den USA wurden von 1999-2013 insgesamt 780.000 Erkrankungen registriert, von denen 16.000 einen neuroinvasiven Krankheitsverlauf entwickelten und 1.500 tödlich endeten.¹¹

Das CDC (*Centers for Disease Control and Prevention*), eine hochrangige Bundesbehörde der USA, veröffentlichte 2016 die in Abbildung 1 zusammengefassten Daten zur Anzahl der mit Komplikationen verlaufenden WNV-Infektionen und deren Todesfolgen. Übergreifend registrierte das CDC zwischen 1999 und 2015 insgesamt 20.265 Patienten mit neuroinvasivem Krankheitsverlauf, von denen 1783 tödlich endeten. Das Risiko an einer WNV-Infektion mit neuroinvasivem Krankheitsverlauf zu sterben liegt demzufolge bei ca. 9 % und ist um ein Vielfaches größer als bei einem nicht neuroinvasivem Krankheitsverlauf (ca. 1 %).

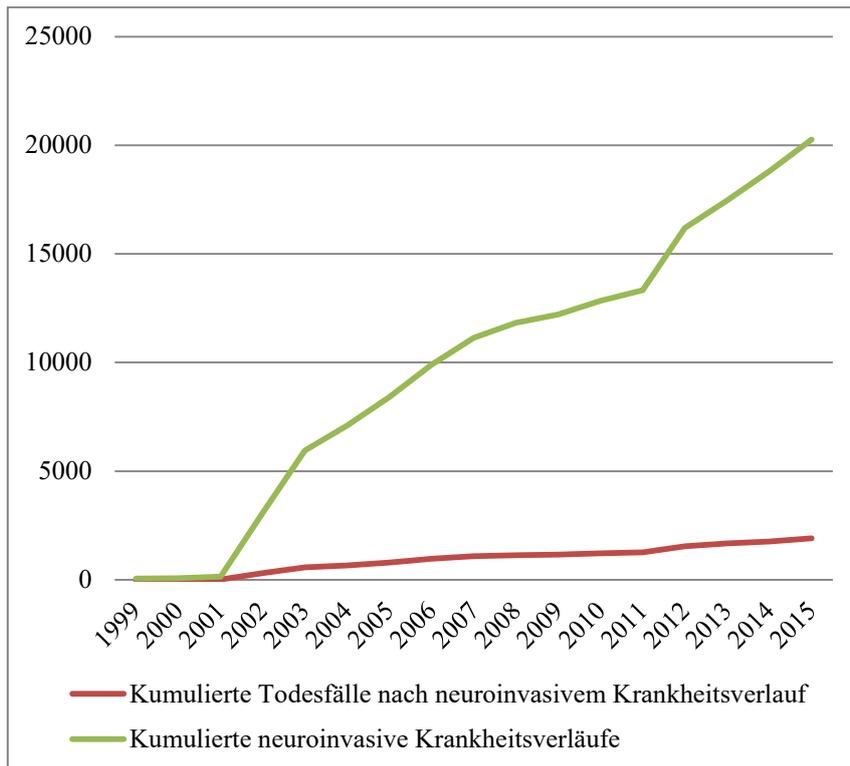


Abbildung 1: Anzahl der kumulierten neuroinvasiven Krankheitsverläufe und Todesfälle nach WNV-Infektionen in den USA von 1999-2015.

Nur 25 % der mit WNV infizierten Personen werden in der Folge auch das West-Nil-Fieber (WNF) entwickeln.¹² WNF Symptome sind unter anderem Fieber ($> 38\text{ }^{\circ}\text{C}$), Müdigkeit, Muskelschmerzen, Unwohlsein und gelegentlich auch gastrointestinale Beschwerden.^{13, 14} Bei manchen Patienten kann die Inkubationszeit mehr als einen Monat betragen.¹⁵ Die Symptome ähneln stark der eines herkömmlichen grippalen Infekts, was eine richtige Diagnose erschwert. Einer von 150-250 Patienten entwickelt nach Infektion mit dem WNV einen neuroinvasiven, schweren Krankheitsverlauf,^{16, 17} dabei kann es zu schwerwiegenden Komplikationen wie einer Meningitis, einer Enzephalitis oder einer Poliomyelitis ähnlichen Lähmung kommen, die eine künstliche Beatmung erfordern.¹⁸⁻²¹ Auch bei diesen schweren Krankheitsverläufen wird nicht immer das WNV als Infektionsursache diagnostiziert, denn selbst zu WNV-Ausbruchszeiten werden nur ca. 40 % aller Meningitis- oder Enzephalitis-Erkrankten auf WNV-Infektionen getestet. Die Dunkelziffer könnte also weitaus höher liegen.²²

1.2 Replikationszyklus und Aufbau des Vorläuferpolyproteins des WNV

Der Replikationszyklus des WNV beginnt mit der Bindung des Virus an unbekannte Rezeptoren auf der Wirtszelle (Abbildung 2). Als potentielle Rezeptoren wurden das Lektin DC-SIGNR (*dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule-3-grabbing nonintegrin*)²³ und das Integrin $\alpha_v\beta_3$ ²⁴ beschrieben (Schritt 1 in Abbildung 2). Nach endozytischer Aufnahme kommt es in der Folge zur pH-Erniedrigung im Lumen der Endosomen und anschließend zur Fusion der Virushülle mit der Endosomenmembran. Dadurch werden das Genom des Virus und die viralen Proteine ins Zytosol freigesetzt (Schritt 2)²³, die virale RNA wird in ein negativ-strängiges RNA-Template umgeschrieben (Schritt 3) und danach wieder zu positiv-strängiger RNA repliziert (Schritt 4). Der Replikationskomplex ist dabei mit der Nummer 5 versehen. Parallel dazu findet die Translation des Genoms in ein einzelnes Polyprotein statt (Schritt 6). Dieses Polyprotein wird anschließend von der viralen NS3-Protease an mehreren Stellen prozessiert, dadurch kommt es zur Bildung der viralen Proteine, die über das ER ins Golgi-Netzwerk transportiert werden. Dort kommt es zur weiteren posttranslationalen Modifizierung (Schritt 7). Anschließend erfolgt der Zusammenbau des Virus im *trans*-Golgi-Netzwerk (Schritt 8) und dessen Freisetzung (Schritt 9).²⁵

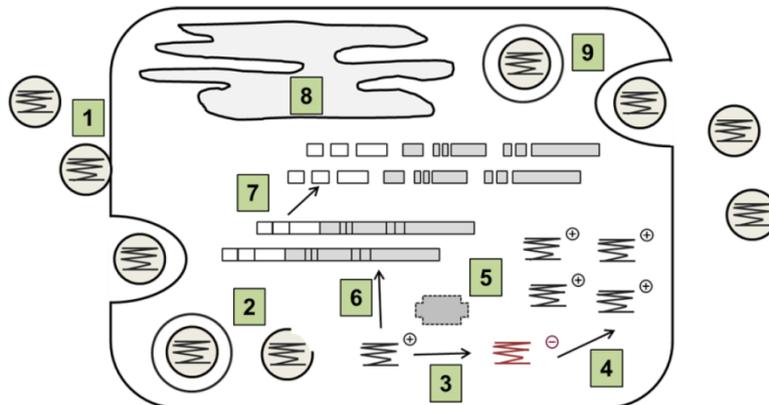


Abbildung 2: Replikationszyklus des WNV. (Abbildung aus F. Ehlert: Design, Synthese und Evaluation von Inhibitoren der bakteriellen RNase P und der Dengue-Virus-Protease, Dissertation Philipps-Universität-Marburg 2016; modifiziert nach Behnam et al.²⁶)

Das virale Polyprotein wird durch Wirts- und die virale NS3-Protease in drei Struktur- und sieben nicht-Strukturproteine gespalten (Abbildung 3).²⁶ Die Strukturproteine sind im N-terminalen Bereich des Polyproteins lokalisiert. Dazu gehören das *Envelope*-Protein E, das *Capsid*-Protein C und der Vorläufer des Membranproteins M (prM). Am C-Terminus befinden sich die sieben nicht-Strukturproteine, von denen besonders die virale Protease NS3 mit dem Co-Faktor NS2B, die Helikase NS3 und die Methyltransferase/RNA-Polymerase NS5 zu erwähnen sind, da diese mögliche Targets für eine antivirale Therapie darstellen.²⁷

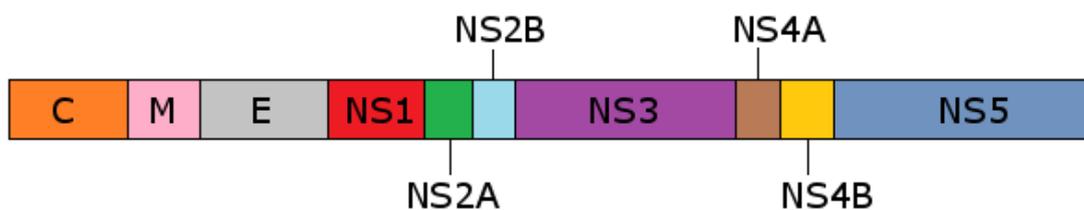


Abbildung 3: Aufbau des WNV-Polyproteins. Nach den N-terminal lokalisierten Strukturproteinen (Capsidprotein C, Membranprotein M, *Envelope*-Protein E) folgen die sieben nicht-Strukturproteine (NS1 bis NS5).

Das virale Protein NS3 und dessen Co-Faktor NS2B formen zusammen einen aktiven Heterokomplex. NS3 ist mit einer atomaren Masse von ungefähr 70 kDa ein relativ großes Protein, das zwei verschiedene enzymatische Aktivitäten aufweist. Im N-terminalen Bereich befindet sich die virale Protease²⁷⁻²⁹ und am C-Terminus die Helikase/ATPase-Domäne.^{27, 30} Die Helikase/ATPase-Domäne bewirkt zusammen mit der RNA-abhängigen RNA-Polymerase (*RdRP*) im NS5 eine Aufwindung der doppelsträngigen RNA und unterstützt dadurch die Polymeraseaktivität des NS5-Proteins.³¹ Die NS3-Protease gehört zur Familie der Serinproteasen und besitzt wie viele andere eine katalytische Triade, die aus den Resten His51, Asp75 und Ser135 besteht.³² Die NS3-Protease und Furin spalten das virale Vorläuferpolyprotein in die einzelnen, reifen nicht-Strukturproteine (Abbildung 4).³³ Sie liegt jedoch nur in Verbindung mit dem Co-Faktor NS2B in aktiver Form vor. NS2B ist ein kleines ca. 15 kDa großes Protein, welches eine zentrale hydrophile Domäne besitzt, die von zwei hydrophoben Bereichen umgeben wird. Es wird vermutet, dass diese hydrophoben Segmente die Fixierung des NS3-Proteins auf der ER-Membran ermöglichen.³⁴⁻³⁷ wie es auch für die verwandte NS2B-NS3-Protease der DENV beschrieben wurde.³⁸

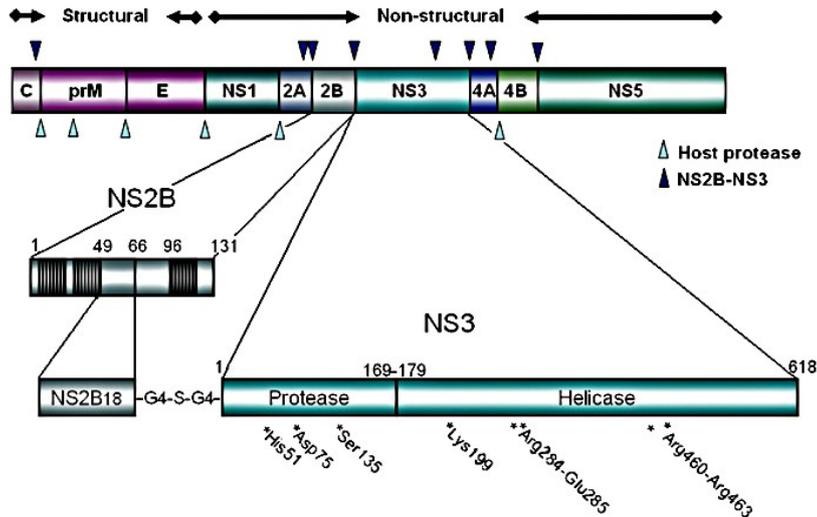


Abbildung 4: Schematischer Aufbau des Flavivirus-Polyproteins mit den Spaltstellen der Wirtsproteasen und des NS2B-NS3-Komplexes. (Abbildung aus Lescar et al.).³⁹

Um einen stabilen kovalent verknüpften Komplex zwischen dem Co-Faktor NS2B und der NS3-Protease zu erzeugen, der für enzymkinetische Studien und zur Kristallographie geeignet ist, wurde in vielen Fällen ein artifizielles Nonapeptid $[(\text{Gly})_4\text{-Ser-(Gly)}_4]$ als Verbindungssegment zwischen diesen beiden Domänen eingebaut.^{40, 41} In Kristallstrukturen der NS2B-NS3-WNV-Protease im Komplex mit substratanalogen Hemmstoffen wurde gezeigt, dass sich der NS2B-Co-Faktor wie ein Gürtel um die NS3-Protease windet. Dadurch wird die proteolytisch-wirksame Konformation der Protease mit korrekt ausgebildeter katalytischer Triade und dem Oxyanion-Loch stabilisiert.³²

1.3 Rolle des Furins bei der Reifung des WNV

Das West-Nil-Virus besteht aus einem Nucleocapsid mit ikosaedrischer Form, das von einer Lipiddoppelschicht umhüllt ist.⁴² Das Nucleocapsid ist aus vielen Kopien des Capsid-Proteins C zusammengesetzt. Das C-Protein bildet Dimere, deren hydrophober zentraler Teil an die innere Lipidschicht bindet, während im N- und C-terminalen Bereich die Bindungsregionen für die virale RNA lokalisiert sind. Auf der Außenseite des Virus befinden sich das *envelope* Protein E und das Membranprotein M. Das Protein E sorgt für die Bindung und die Fusion des Virus mit der Wirtszelle und liegt im reifen Zustand des Virus parallel auf der Lipidmembran (Abbildung 5). Das reife Membranprotein M wird aus dem unreifen *premembrane* Protein prM durch Abspaltung des pr-Segments durch die Wirtsprotease Furin

gebildet. Da in der unreifen Form das pr-Segment kovalent mit dem M-Protein verbunden ist, können sich die M- und E-Proteine nicht parallel zur Membran ausrichten, sondern bilden eine Art Spitzen (*spikes*) auf der Virusoberfläche aus. Die unreife Form des WNV ist deswegen mit einem Durchmesser von ca. 60 nm etwas größer und gezackter als die reife Form, die nur einen Durchmesser von 50 nm hat und relativ glatt erscheint.^{25, 43}

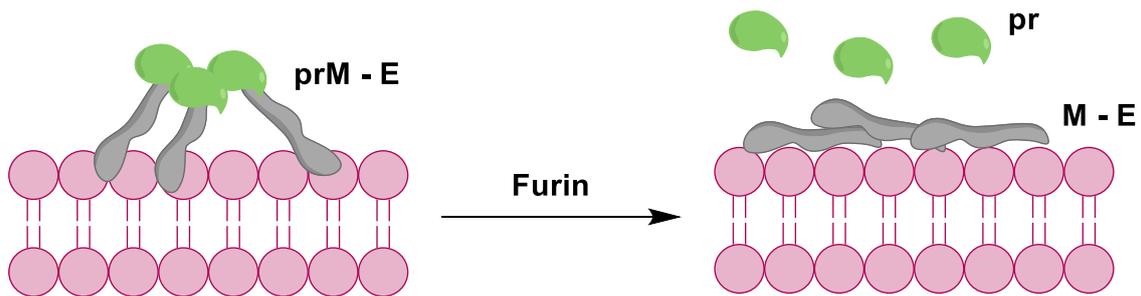


Abbildung 5: Schematischer Aufbau der WNV-Membranoberfläche im reifen und unreifen Zustand (die drei in grau dargestellten prM-E Heterodimere bilden einen Spike auf der Oberfläche des unreifen Virions aus). Nach Abspaltung des pr-Segments (grün) kommt es zu einer Umlagerung und die Membranproteine richten sich parallel zur Virushülle aus.

1.4 Behandlung der WNV-Infektionen

Bisher gibt es keine spezifischen Medikamente und Impfstoffe zur Therapie oder Prophylaxe von WNV-Infektionen. Deswegen wurde in der Vergangenheit versucht, bereits bekannte antivirale Medikamente auch zur Therapie von WNV-Infektionen einzusetzen. Da das bei HCV-Infektionen verwendete Ribavirin auch die WNV Replikation in neuronalen Zellen inhibiert,⁴⁴ wurde eine Gruppe von Personen in Israel damit behandelt.⁴⁵ Die Behandlung hatte jedoch keinen Erfolg, der Krankheitsverlauf schien sich sogar zu verschlimmern. Vergleichbare Ergebnisse wurden in einem Mäusemodell beobachtet, bei dem Ribavirin die Sterblichkeit erhöhte.⁴⁶ Erkrankte Personen können bei sehr schweren Krankheitsverläufen, bei denen die Notwendigkeit zur künstlichen Beatmung besteht, auch mit Interferon alpha (*IFN- α*) oder mit Immunglobulinen behandelt werden, die von bereits infizierten Personen isoliert wurden.^{47, 48} Da es bereits Impfstoffe gegen die nah verwandten Gelbfieber- (YFV), Japanische-Enzephalitis- und den FSME-Viren gibt, wird derzeit auch versucht, Impfstoffe gegen WNV zu entwickeln. Dabei möchte man chimäre Impfstoffe entwickeln, bei welchen das prM und E Protein des YFV durch Proteine des WNV ersetzt werden.^{49, 50} Aufgrund des Fehlens zugelassener Hemm- und Impfstoffe besteht bisher die effektivste Prävention immer noch in der Vermeidung des Besuchs von Hochrisikogebieten und vor allem in der

konsequenter Nutzung von Moskitonetzen und Repellentien.^{51, 52} Deswegen haben viele Hochrisikoländer ein Vektorkontrollprogramm installiert, um die Überträger der Viren möglichst effektiv zu bekämpfen. Im Falle der Mücke *Aedes aegypti* wird versucht, bereits dem Larvenstadium der Mücke durch verschiedene Strategien entgegenzuwirken. Dies kann dadurch geschehen, dass den Larven der Lebensraum genommen wird, zum Beispiel durch Abdecken von Regenwasserauffangbecken oder durch Zusatz von Chemikalien zu Frischwasserdepots.⁵³ Seit den 1970er Jahren wurde dafür das Organophosphat Temefos eingesetzt, aber durch erhöhte Resistenzen und die Weigerung privater Haushalte zur Verwendung dieses Acetylcholinesterasehemmers, konnte das Problem bisher nicht ausreichend eingedämmt werden.^{54, 55} Zusätzlich wurde versucht, die Mückenlarven biologisch anzugreifen, indem larvenfressende Fische und Krebse in betroffene Gewässer eingesetzt wurden.

1.5 Impfstoffe

Zur Prophylaxe von WNV-Infektionen sind bisher noch keine Impfstoffe für die Anwendung am Menschen zugelassen. Jedoch gibt es für den eng verwandten Dengue-Virus seit Dezember 2015 erstmals einen Impfstoff, der in Mexiko und einigen anderen besonders betroffenen Ländern (Philippinen, Brasilien) zugelassen wurde. Im Falle von DENV musste ein Impfstoff entwickelt werden, der gegen alle vier Serotypen des Virus (DENV-1 bis DENV-4) gleichzeitig wirksam ist. Bei Impfungen gegen einzelne Serotypen wurde festgestellt, dass bei einer später erfolgten Sekundärinfektion mit einem anderen Serotyp schwerere Krankheitsverläufe resultierten, das Risiko für Komplikationen stieg in solchen Fällen um das 10-fache an.¹ Als Ursache wurde die Bildung infektionsverstärkender Antikörper während der Primärinfektion (*antibody-dependent-enhancement*; ADE) festgestellt.^{1, 26} Bei dem zugelassenen Impfstoff handelt es sich um einen rekombinanten, tetravalenten, abgeschwächten Lebendimpfstoff gegen DENV 1-4. Als Antigen wird eine Chimäre eines speziellen Gelbfieber-Virus-Stamms (YFV-17D) verwendet, der die prM- und E-Proteine der vier DENV-Serotypen besitzt.⁵⁶ In einer Phase III Studie lag die Wirksamkeit dieses Impfstoffes bei einer Testgruppe von mehr als 35.000 Kindern bei 60,3%.^{57, 58} Inzwischen gibt es neue Erkenntnisse, die darauf hindeuten, dass eine Impfung mit dem DENV-Impfstoff erst nach überstandener Primärinfektion erfolgen sollten. Personen die ohne einen Erstkontakt mit dem DENV geimpft werden, leiden überdurchschnittlich oft an einem schwereren Krankheitsverlauf als Personen ohne Impfschutz.⁵⁹

1.6 Bekannte Hemmstoffe der WNV-NS2B-NS3-Protease

Die beschriebenen NS2B-NS3-Proteaseinhibitoren können in zwei Klassen eingeteilt werden: peptidische und nicht-peptidische Hemmstoffe.

1.6.1 Peptidische Inhibitoren

Peptidische Inhibitoren leiten sich oft von natürlichen Substraten des Zielenzyms ab. In diese substratanalogen Strukturen werden Reste eingebaut, die deren enzymatischen Abbau verhindern und idealerweise die Hemmwirkung verstärken. Neben dem Einbau von D-konfigurierten oder ungewöhnlichen Aminosäuren können zur Stabilisierung der Wirkstoffe auch Aminosäure-Ketone, α -Keto-Ketoamide oder α -Keto-Ketoester als P1-P1'-Segmente eingebaut werden.¹ Häufig werden als erste Inhibitoren natürlich vorkommende Polypeptide genutzt. Im Falle der WNV-Proteasehemmstoffe wurde Aprotinin, das aus Rindern isoliert wird und bis 2008 als Medikament zur Vermeidung von starken Blutverlusten bei Operationen am offenen Herzen eingesetzt wurde, als wirksamer Inhibitor mit einer nanomolaren Hemmwirkung identifiziert ($K_i = 26$ nM).^{60, 61} Aprotinin ist ein Polypeptid aus 58 Aminosäuren und gehört zu den Hemmstoffen vom Kunitz-Typ.^{62, 63} Es ist jedoch relativ unspezifisch und inhibiert auch zahlreiche Wirtsproteasen, wie Plasmin, Trypsin, Matriptase und Plasmakallikrein sowie einige andere Serinproteasen.^{64 63}

Da die WNV NS2B-NS3-Protease bevorzugt Substrate hinter mehreren basischen Aminosäureresten spaltet, wurden zahlreiche lineare Oligo-D-arginin-Amide hergestellt und deren Hemmwirkung untersucht, einige Beispiele sind in Tabelle 1 gezeigt.⁶⁰ Die stärkste Hemmwirkung wurde für die Undeca- und Dodeca-D-Argininderivate festgestellt, wobei nur geringe Unterschiede zu den Deca- und Nona-Peptiden beobachtet wurden.

Tabelle 1: Bekannte lineare Oligo-D-Arginin-Inhibitoren der WNV-Protease.⁶⁰

Verbindung	K_i (μM)
H-(DArg) ₆ -NH ₂	0,478
H-(DArg) ₇ -NH ₂	0,041
H-(DArg) ₈ -NH ₂	0,017
H-(DArg) ₉ -NH ₂	0,006
H-(DArg) ₁₀ -NH ₂	0,002
H-(DArg) ₁₁ -NH ₂	0,001
H-(DArg) ₁₂ -NH ₂	0,001

Eine andere Möglichkeit ist die Entwicklung von sogenannten Übergangszustandsanalogen Inhibitoren, die aus der Entwicklung von Hemmstoffen gegen andere Serinproteasen bekannt sind. Dazu gehören Verbindungen mit Boronsäure-, Aldehyd- oder Keton-Derivaten als P1-Rest.⁶⁵⁻⁶⁸ Besonders wirksame Hemmstoffe sind die substratanalogen Strukturen mit Boroarginin, die K_i -Werte im zweistellig nanomolaren Bereich besitzen.

Tabelle 2: Substratanaloge Hemmstoffe der WNV-Protease mit einem Arginal oder Boroarginin in P1-Position.

Verbindung	K_i (μM)
Bz-Nle-Lys-Arg-Arg-H	4,1
Bz-Nle-Lys-Lys-Arg-H	1,9
Bz-Ala-Lys-Arg-Arg-H	0,7
2-Naphthoyl-Lys-Lys-Arg-H	0,041
Phenylacetyl-KKR-H	0,70
4-Phenylphenylacetyl-Lys-Lys-Arg-H	0,056
Bz-Phe(4-Guanidino)-boroArg	0,065
Bz-Phe(4-AMe)-boroArg	0,082

Eine etablierte Methode zur Entwicklung substratanaloger Serinproteasehemmstoffe ist der Einbau von decarboxylierten P1-Mimetika. Diese Strategie wurde für die Entwicklung von Hemmstoffen der Gerinnungsproteasen Thrombin⁶⁹ und Faktor Xa⁷⁰, der fibrinolytischen Enzyme Urokinase⁷¹ und Plasmin⁷² sowie der Proproteinkonvertase Furin genutzt⁷³. Da die WNV-Protease Substrate mit Arginin in P1-Position bevorzugt, wurden zahlreiche Verbindungen mit einem C-terminalen Agmatinrest hergestellt, der einem decarboxylierten

Arginin entspricht Einige Beispiele bekannter Agmatin-Inhibitoren sind in Tabelle 3 zusammengefasst.^{74, 75}

Tabelle 3: Bekannte Agmatin-Inhibitoren des WNV.⁷⁴⁻⁷⁶

Verbindung	WNV K_i (μM)
Acetyl-Lys-Lys-Agmatin	$9,1 \pm 2,1$
4-phenyl-PhAc-Lys-Lys-Agmatin	$2,05 \pm 0,13$
2-Chlor-4-phenyl-PhAc-L-Lys-Lys-Agmatin	$1,3 \pm 0,2$
4-Chlor-4-phenyl-PhAc-L-Lys-Lys-Agmatin	$2,4 \pm 0,5$
2-Methyl-4-phenyl-PhAc-L-Lys-Lys-Agmatin	$3,4 \pm 0,6$
2,4-Dichlor-PhAc-Lys-Lys-Agmatin	0,6

Ausgehend von den Agmatin-Verbindungen wurden noch weitere decarboxylierte Argininmimetika in P1-Position eingebaut. Eine besonders wirksame Hemmung wurde für Verbindungen mit einem trans-(4-Guanidino)-Cyclohexylmethylamid-Rest (GCMA) festgestellt, der Inhibitor **1** (2,3-Dichlor-PhAc-Lys-Lys-GCMA) hemmt die WNV-Protease mit einem K_i -Wert von ca. $0,12 \mu\text{M}$ (Abbildung 6).⁷⁶

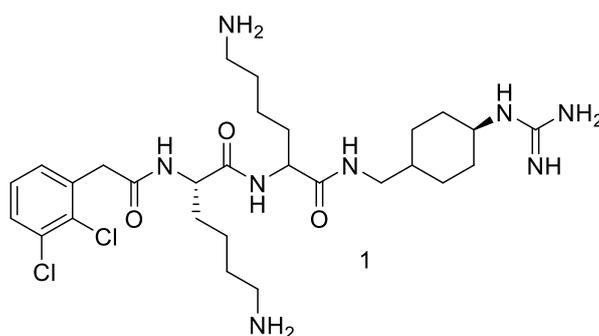
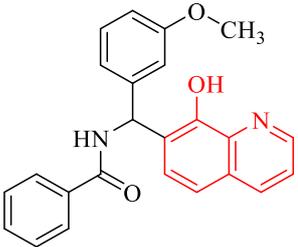
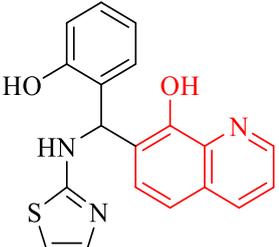
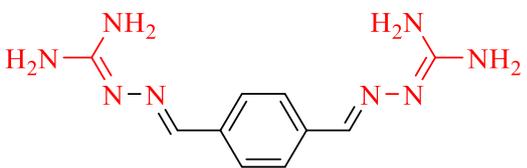
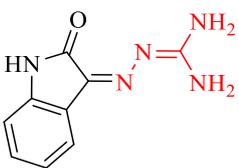
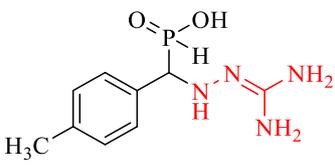
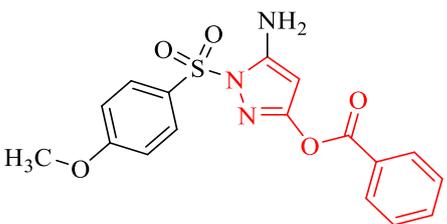
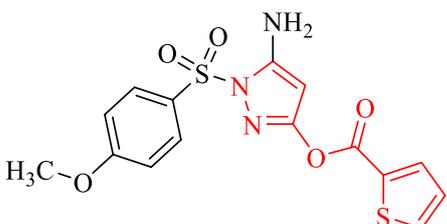


Abbildung 6: Struktur des Inhibitors **1** (2,3-Dichlor-PhAc-Lys-Lys-GCMA).

1.6.2 Nicht-peptidische Inhibitoren

Rein peptidische Inhibitoren besitzen einige Nachteile, sie sind in der Regel nicht oral verfügbar, häufig instabil und werden meist rasch renal eliminiert. Einige dieser Nachteile können durch die Entwicklung niedermolekularer nicht-peptischer Verbindungen vermieden werden. Die meisten nicht-peptidischen WNV-Protease-Inhibitoren wurden durch *high-throughput-screenings* (HTS) identifiziert und besitzen häufig eine Hemmwirkung im niedrig einstelligen mikromolaren Bereich, sind jedoch *in vivo* in der Regel kaum wirksam.^{77, 78} Beispiele sind verschiedene Hydroxychinoline,^{78, 79} Pyrazolylbenzoesäureester⁷⁷ und Guanylhydrazone,⁸⁰ die in Tabelle 4 zusammengefasst sind. Interessanterweise wurden die Pyrazolylbenzoesäureester in der Literatur als allosterische Inhibitoren klassifiziert.

Tabelle 4: Strukturen und Hemmwirkung nicht-peptidischer Hemmstoffe der WNV-Protease. Die namensgebenden Struktur motive sind in rot markiert.

8-Hydroxychinoline		
 <p>2</p> <p>($K_i = 3,2 \mu\text{M}$)</p>	 <p>3</p> <p>($K_i = 3,4 \mu\text{M}$)</p>	
Guanylhydrazone		
 <p>4</p> <p>($K_i = 35 \mu\text{M}$)</p>	 <p>5</p> <p>($K_i = 16,2 \mu\text{M}$)</p>	 <p>6</p> <p>($K_i = 13 \mu\text{M}$)</p>
Pyrazolester		
 <p>7</p> <p>($IC_{50} = 0,105 \mu\text{M}$)</p>	 <p>8</p> <p>($IC_{50} = 0,110 \mu\text{M}$)</p>	

Unter den bisher bekannten Verbindungen sind die peptidischen Inhibitoren etwas wirksamer als die nicht-peptidischen Derivate. Jedoch wurden in den letzten Jahren mehrere Kristallstrukturen der WNV-Protease bestimmt, dadurch wurden die Voraussetzungen für eine strukturbasierte Entwicklung niedermolekularer Wirkstoffe mittels verschiedenster *in silico* Methoden geschaffen.

1.7 Furinhemmung

Da die WNV-Protease eine sehr ähnliche Substratspezifität wie die Proproteinkonvertase Furin besitzt und Furin für die Virusvermehrung essenziell ist (Einleitung 1.3), kann eine Hemmung durch multibasische Strukturen in Zellkultur auch durch eine Hemmung des Furins erklärt werden. Die in unserem Arbeitskreis hergestellte Verbindung MI-1148 (Abbildung 7) ist ein sehr potenter Furininhibitor mit einem K_i -Wert von 5,5 pM.⁸¹ Durch seine multibasische Struktur ist diese Verbindung aber auch in der Lage die WNV- und DENV-2-Protease zu hemmen (WNV K_i -Wert= 6,45 μ M; DENV-2 K_i -Wert= 83,1 μ M). Auch im Plaque-Test in Zellkultur zeigte diese Verbindung eine Hemmung der WNV- (IC_{50} =0,44 μ M) und DENV-2-Vermehrung (IC_{50} =0,99 μ M). Die antivirale Wirksamkeit der Verbindung MI-1148 kommt jedoch nur durch die Hemmung des Furin zustande, das hauptsächlich im trans-Golgi-Netzwerk (TGN) lokalisiert ist und dort die Spaltung des prM-Peptids bewirkt. Dadurch ist die Reifung des Virus nicht mehr möglich und der Vermehrungszyklus wird unterbunden. Für einige multibasische Verbindungen ist es zudem einfacher das TGN als das Zytosol zu erreichen, da sie nach endozytotischer Aufnahme in Vesikeln vorliegen, die direkt zum TGN transportiert werden können. Aus diesen Gründen muss bei einer Hemmung der WNV- oder DENV-2-Protease durch multibasische Strukturen in Zellkulturtests auch immer eine potentielle Hemmung des Furins bedacht werden.

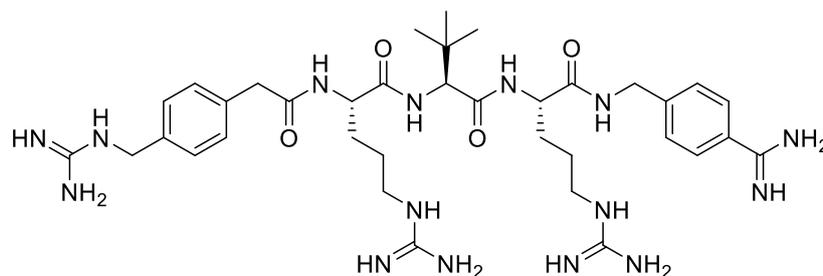


Abbildung 7: Struktur des Furininhibitors MI-1148.

1.8 Hemmung von Serinproteasen durch Metallionen

Da im Rahmen der vorliegenden Arbeit eine leichte Hemmung der WNV-Protease durch Zinkionen festgestellt wurde, soll im Folgenden auf die Beeinflussung einiger Serinproteasen durch Metallionen eingegangen werden. Die Aktivierung oder Hemmung trypsinartiger Serinproteasen durch Metallionen wurde in der Literatur mehrfach beschrieben. Im Falle des Thrombins erfolgt eine Aktivierung durch Na^+ -Ionen,⁸²⁻⁸⁴ bei Trypsin durch Ca^{2+} -Ionen.^{85, 86} Auch bei einigen Vertretern aus der Gruppe der insgesamt 15 Kallikreine (KLKs), wurde eine Aktivierung durch Ca^{2+} -, Mg^{2+} -, K^+ - und Na^+ -Ionen festgestellt.⁸⁷⁻⁸⁹ Andererseits kommt es auch zur Hemmung einiger Kallikreine durch Zn^{2+} -Ionen, die für die Prostata-Kallikreine KLK2, KLK3 und KLK4 und die epidermalen Kallikreine KLK5, KLK7 und KLK14 beschrieben wurde (K_i -Werte im Bereich von 2-24 μM).⁹⁰⁻⁹⁶ KLKs spalten Kininogene enzymatisch in die Kinine und sind somit an vielen physiologischen Prozessen im Körper beteiligt.⁹⁷ Für KLK5 wurde mittels Kristallstrukturanalyse der exakte Mechanismus der Zink-Hemmung beschrieben. Es gibt drei mögliche Fälle (Abbildung 8); auf der linken Seite sieht man die proteolytisch wirksame Konformation des KLK5 mit korrekt ausgebildeter katalytischer Triade in Abwesenheit von Zinkionen, die Seitenketten des His96 und His99 zeigen vom aktiven Zentrum weg. Im mittleren Bild sieht man die Bindung des Zinkions an die Seitenketten des His96 und des His99, die dadurch in Richtung der S2-Tasche gedreht werden. Diese wird blockiert und ist für Substrate oder Inhibitoren mit größeren S2-Resten nicht mehr zugänglich. Es kommt zu einer moderaten Hemmung des KLK5, obwohl die charakteristischen Wasserstoffbrücken der katalytischen Triade noch intakt sind. Auf dem rechten Bild ist die Struktur des KLK2 der Ratte dargestellt, das sehr ähnlich zum humanen KLK5 ist. Im Unterschied zu KLK5 mit dem Rest His96, besitzt KLK2 jedoch ein His in Position 97. Dadurch kann das Zinkion gleichzeitig an drei Imidazolreste binden (His97, His99, His57). Somit ist die Seitenkette des His57 anders ausgerichtet und es kommt zur Inaktivierung des Enzyms.

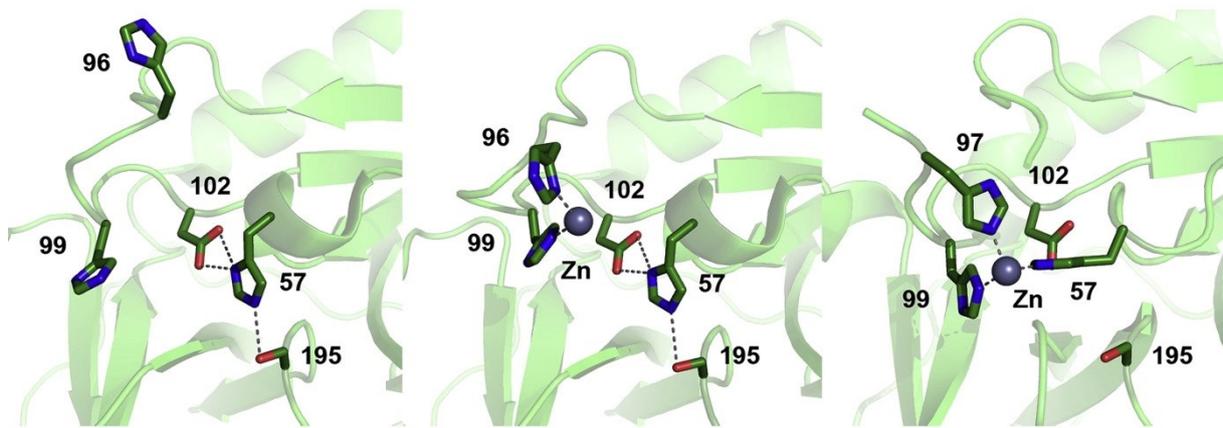


Abbildung 8: Kristallstrukturen der inhibitorischen Metallbindungsstelle im KLK5 und im Ratten-KLK2 (KLK5 links und in Mitte, KLK2 aus der Ratte rechts). Links: Aktives Zentrum des KLK5 ohne Zinkion mit korrekt ausgebildeter katalytischer Triade. Die Seitenketten des His96 und His99 drehen sich von der S2-Tasche weg und das aktive Zentrum ist relativ frei zugänglich. Mitte: Bindung des Zn^{2+} -Ions (grau) an His96 und His99 des KLK5, deren Seitenketten zur S2-Tasche gerichtet sind, die dadurch blockiert wird. Rechts: Struktur des Ratten-KLK2. Das Zn^{2+} -Ion bindet gleichzeitig an drei Histidinreste, einschließlich des His57 der katalytischen Triade, die dadurch gestört wird. Substrate können daher nicht mehr gespalten werden. (Abbildung aus Goettig, Magdolen and Brandstetter ⁹⁷).

1.9 Zellpenetrierende Peptide

Multibasische, peptidische Inhibitoren können aufgrund ihrer Polarität nur sehr schwer Zellmembranen überwinden. Diese Tatsache erschwert das optimale *Targeting* von intrazellulär lokalisierten Zielstrukturen. Eine Möglichkeit dieses Problem zu lösen, ist der Einsatz von zellpenetrierenden Peptiden (CPP). CPPs bestehen in der Regel aus 5-30 Aminosäuren und können zyklisch oder linear aufgebaut sein. Sie können entweder kovalent über Peptidbindungen, Disulfidbrücken oder Maleimid-Linker mit dem Inhibitor verbunden sein oder die CPPs binden über ionische Wechselwirkungen an den Hemmstoff.⁹⁸ Die CPPs können die Zellmembranen direkt über *barrel-stave* Poren⁹⁹, über *inverted micelles*¹⁰⁰ oder *carpet-formations*¹⁰¹ überwinden oder indirekt über Endozytose in die Zellen gelangen⁹⁸. In Abbildung 9 ist der Vorgang der Endozytose dargestellt. Zunächst lagern sich die CPPs an die Zellmembran an und können dann über Einstülpungen zu Vesikeln geschnürt werden. Diese werden dann zunächst als frühe Endosome bezeichnet. Anschließend senkt sich der pH-Wert in den Endosomen auf rund 6 ab und es können weitere Vesikel vom Endosom abgespalten werden. Diese Vesikel können entweder stabil sein und noch eine Zeit lang existieren oder sie zerfallen direkt zu Membranbestandteilen und den CPPs. Somit hätten die CPP die Membran überwunden und würden nun frei im Zytosol vorliegen.

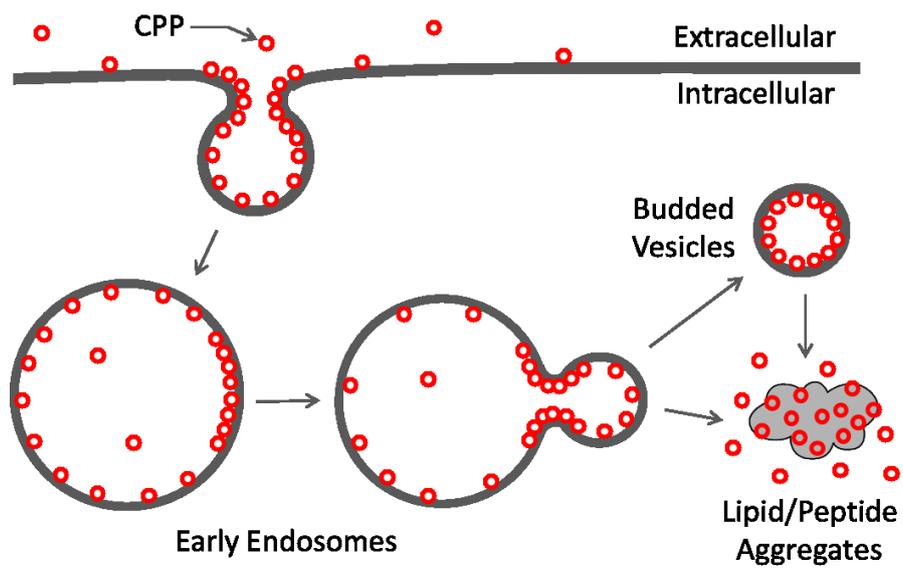


Abbildung 9: Aufnahmemechanismus zellpenetrierender zyklischer Peptide (Abbildung aus: Qian, et al. ¹⁰²).

2 Ziel der Arbeit

Da für die Behandlung und Prophylaxe der WNV-Infektionen bisher weder Wirkstoffe noch Impfstoffe zugelassen sind, ist die Entwicklung neuartiger, effektiver Hemmstoffe der WNV NS2B-NS3-Protease von großem Interesse. Obwohl es bereits einen Impfstoff gegen DENV gibt,^{103, 104} wäre ein spezifischer und effektiver Hemmstoff der viralen Protease von großer Bedeutung, da zum einen sehr junge und alte Personen, aber auch erkrankte oder immungeschwächte Patienten nicht geimpft werden können. Das Ziel der Arbeit war die Entwicklung, Synthese und Charakterisierung eines peptidischen Inhibitors der WNV NS2B-NS3 Protease. Auf Grund der Tatsache, dass die Sequenzen der viralen NS2B-NS3-Proteasen des West-Nil- und Dengue-Viren zu über 65 % identisch sind, sollten die synthetisierten Inhibitoren nicht nur mit dem WNV-Enzym, sondern auch mit der DENV-2-Protease enzymkinetisch charakterisiert werden. Dadurch können Aussagen über die Spezifität der Inhibitoren gegenüber diesen zwei NS2B-NS3-Proteasen getroffen werden. Grundsätzlich wurden die Inhibitoren jedoch zur Hemmung der NS2B-N3-Protease des WNV entworfen. Die wesentliche Aufgabe bestand darin, den K_i -Wert der bisher beschriebenen Inhibitoren weiter zu verbessern. Dies sollte durch die schrittweise Modifizierung der einzelnen Reste der substratanalogen Strukturen erfolgen. Als P1-Reste sollten unter anderem auch ketonartige Strukturen und heterozyklische Boronsäurederivate eingebaut werden. Zudem sollte die zytosolische Aufnahme der Inhibitoren durch Einbau in zellpenetrierende, zyklische Peptide oder in kleine zyklische Strukturen verbessert werden. Auch eine Verknüpfung der Inhibitoren mit Cholesterolbausteinen sollte zu einer besseren Aufnahme in die Zelle führen.

Daneben sollten durch computergestützte Dockingverfahren neue potente Inhibitorfragmente gefunden und diese in schon bestehende Startstrukturen eingebaut werden.

Alle Inhibitoren sollten an der festen Phase (SPPS) oder durch eine Kombination aus Lösungs- und Festphasensynthese hergestellt werden.

3 Ergebnisse und Diskussion

Die virale WNV-Protease NS2B-NS3 spaltet ihre natürlichen Substrate bevorzugt nach multibasischen Sequenzen, insbesondere hinter Lysin oder Arginin in P1-Position (Nomenklatur nach Schechter und Berger).¹⁰⁵ In P2-Position wird Lysin etwas besser als Arginin akzeptiert, jedoch keine anderen Reste. In einem Fall wurde auch die Spaltung mit Glutamin in P2-Position beschrieben, jedoch mit relativ geringer Effizienz (nur ca. 11 % im Vergleich zu Substraten mit basischem P2-Rest).¹⁰⁶ Auch in P3-Position sind Lysin und Arginin bevorzugt, jedoch gibt es auch natürliche Substrate mit Threonin (Spaltstelle zwischen NS2B und NS3: Y¹⁴⁹⁸TKR↓GGVL¹⁵⁰⁵), Leucin (zwischen NS4B und NS5: G²⁵²²LKR↓GGAK²⁵²⁹) oder Glutamin (Spaltstelle auf NS3: A¹⁹³⁰QRR↓GRIG¹⁹³⁷). C-terminal der Spaltstelle ist in P1' und P2' Position Glycin deutlich bevorzugt.¹⁰⁷ Die Substraterkennungssequenz der WNV-Protease ist in Abbildung 10 dargestellt.

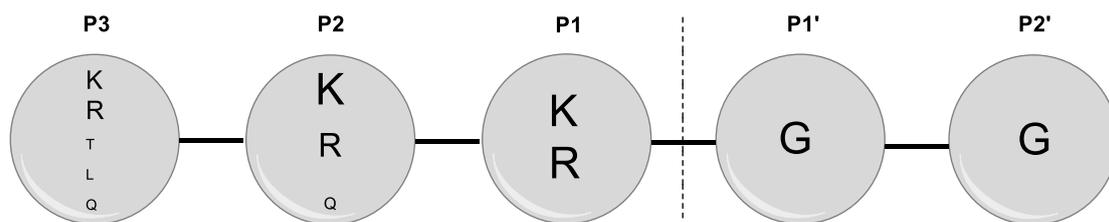


Abbildung 10: Bevorzugte Spaltsequenzen der WNV NS2B-NS3-Protease.

3.1 Modifizierung des P2-Restes

Anlehnend an die bevorzugten natürlichen Substratsequenzen¹⁰⁶ und frühere Arbeiten zu substratanalogen Inhibitoren mit C-terminalem Arginalrest⁶⁶ wurde von Hammamy *et al.* der peptidische Inhibitor **9** (PhAc-Lys-Lys-Arg-NH₂) hergestellt. Dieses Peptid diente als Leitstruktur für die in dieser Arbeit beschriebenen Hemmstoffe, da die Verbindung relativ einfach durch Festphasenpeptidsynthese (*solid-phase peptide synthesis*; SPPS) zugänglich und daher bequem modifizierbar ist. Bei diesem Peptid handelt es sich eigentlich um ein relativ schlechtes Substrat der WNV-Protease, das während der üblichen Zeitspanne enzymkinetischer Messungen (ca. 20 min) kaum umgesetzt wird und daher inhibitorisch wirkt. Aufgrund der Spaltbarkeit eignet sich dieses Peptid nicht für eine Kristallstrukturanalyse, die jedoch im Rahmen der Arbeiten von Hammamy *et al.* für die

verwandte Verbindung **1** (3,4-Dichlor-PhAc-Lys-Lys-GCMA) gelöst wurde⁷⁶ (PDB: 2YOL) (Abbildung 11).

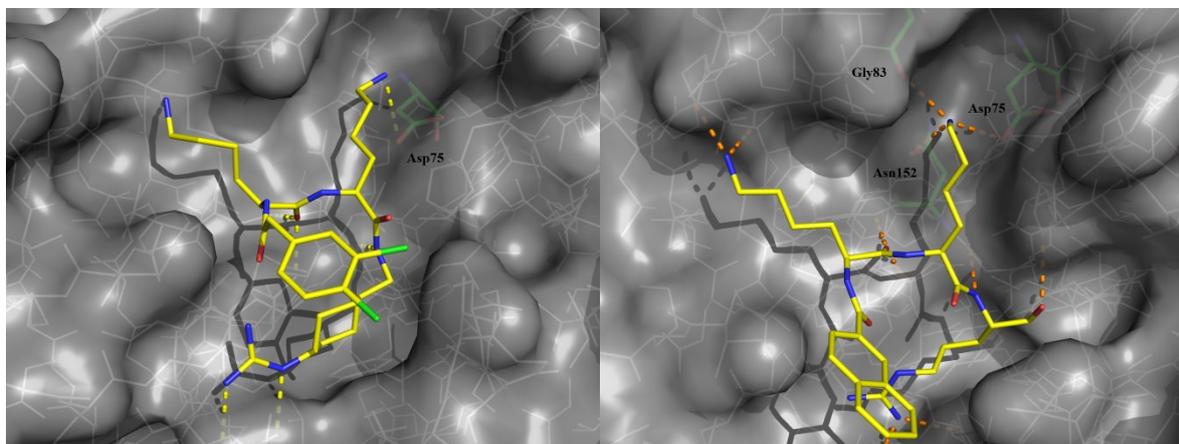


Abbildung 11: Komplex des Inhibitors **1** (links) mit der WNV-Protease (PDB: 2YOL) und rechts mit einer relativ ähnlichen kovalent bindenden substratanalogen Struktur (2-Naphthylcarbonyl-Lys-Lys-Arg-H) mit C-terminalem Arginalrest (PDB: 3E90). Der Inhibitor ist mit gelben Kohlenstoff-, blauen Stickstoff-, grünen Chlor- und roten Sauerstoffatomen gezeigt. Die links dargestellte Struktur hat eine relativ geringe Auflösung von 3,2 Å mit relativ großen B-Werten für die P2-Seitenkette, die in der rechts gezeigten Struktur mit einer Auflösung von 2,45 Å deutlich geringer sind.

In den Strukturen beider Komplexe ist erkennbar, dass um die Lysin-Seitenkette in der S2-Tasche noch etwas Platz vorhanden ist. In der links gezeigten Struktur (Abbildung 11) ist auch nur eine Wechselwirkung zwischen der ϵ -Aminogruppe des P2-Restes und der Carboxylfunktion des Asp75 erkennbar (3,2 Å). In der rechts gezeigten Struktur (PDB: 3E90) mit der etwas höheren Auflösung ist der endständige Stickstoff des P2-Lysins jedoch an drei polaren Wechselwirkungen zu Asp75, Gly83, und Asn152 beteiligt. In einer ersten Serie sollte das Lysin in P2-Position durch eine analoge Struktur ersetzt werden, die eine einfache Modifizierung gestattet. Dabei sollte an Stelle des Lysins eine α,β -Diaminopropionsäure (Dap) eingebaut werden und an deren Seitenkette ein weiterer Aminosäurerest, beispielsweise Glycin, gekuppelt werden. Es wurde vermutet, dass die terminale Aminogruppe ähnlich wie die ϵ -Aminogruppe des Lysins platziert sein könnte. Durch Einbau der zu Dap homologen α,γ -Diaminobuttersäure (Dab) kann die Seitenkette bequem um ein weiteres Atom verlängert werden (Abbildung 12).

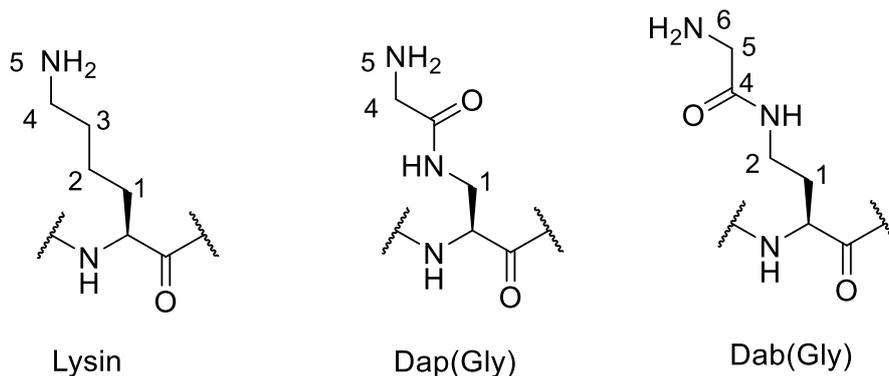


Abbildung 12: Vergleich der Längen der Seitenketten von Lysin, Dap(Gly) und Dab(Gly).

Die Synthese erfolgte ausgehend vom Fmoc-Rink-Amid-Harz. Nach Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe mit 20 % Piperidin in DMF wurde mittels manueller Festphasenpeptidsynthese (SPPS) die Sequenz PhAc-Lys-Dap/Dab(X)-Arg-NH₂ aufgebaut, wobei X ein beliebiger α -Aminosäurerest ist. Zur Synthese wurden die kommerziell erhältlichen Derivate Fmoc-Dap(Dde)-OH und Fmoc-Dab(Dde)-OH verwendet. In der Fmoc-SPPS mit dem standardmäßig verwendeten Boc/tert. Butyl-Seitenkettenschutz ist der Dde-Rest eine orthogonale Schutzgruppe, die selektiv am Harz abspaltbar ist. Nach Aufbau des P1-P4-Segments, wurde die Dde-Schutzgruppe mit 2 % Hydrazin in DMF abgespalten. Anschließend wurde an die freie Aminogruppe eine weitere Aminosäure mittels eines Standardprotokolls gekuppelt. Danach erfolgte die finale Abspaltung vom Harz und sämtlicher Schutzgruppen unter stark sauren Bedingungen (TFA/TIS/H₂O, 95/2.5/2.5 (v/v/v)). Nach ca. 1-2 h wurde das Peptid in kaltem Diethylether präzipitiert und die Reinheit mittels HPLC kontrolliert. Unerwarteter Weise wurden für die Produkte Doppelpeaks mit annähernd gleichen Flächen im HPLC-Chromatogramm und identischen Massen beobachtet. Die geringe Differenz von ca. 1 min bei den Retentionszeiten verhindert eine einfache präparative HPLC-Reinigung (Abbildung 13).

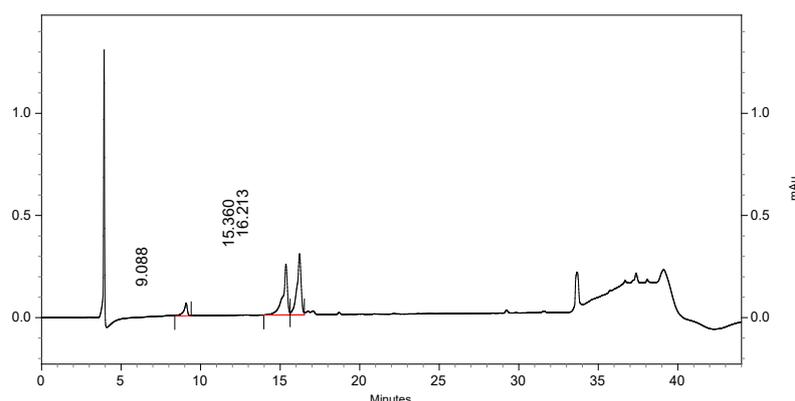


Abbildung 13: HPLC-Chromatogramm des erhaltenen Rohproduktes der Verbindung **11** (PhAc-Lys-Dap(Gly)-Arg-NH₂) nach finaler stark saurer Abspaltung. Die Analyse erfolgte mit dem im experimentellen Teil beschriebenen Standard-Gradientensystem (Start bei 1 % Laufmittel B).

In früheren Arbeiten wurde beschrieben, dass es bei der Festphasenpeptidsynthese während der Fmoc-Abspaltung von einem Peptid mit endständigem Lys(Dde) oder Dap(Dde)-Rest zur Migration der Dde-Schutzgruppe von der ϵ - bzw. β -Amino- zur α -Aminogruppe kommen kann und man dadurch zwei verschiedene Produkte erhält.^{108, 109}

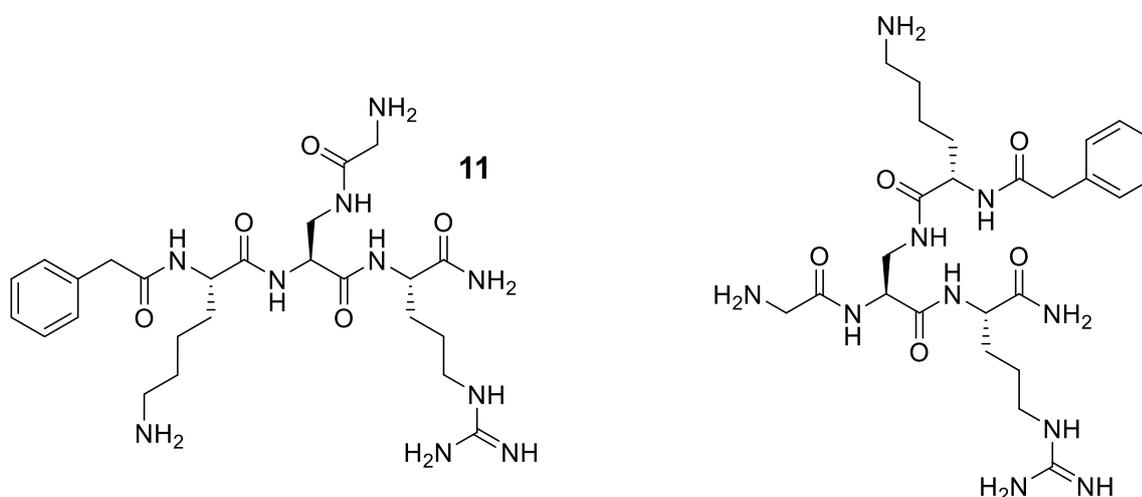
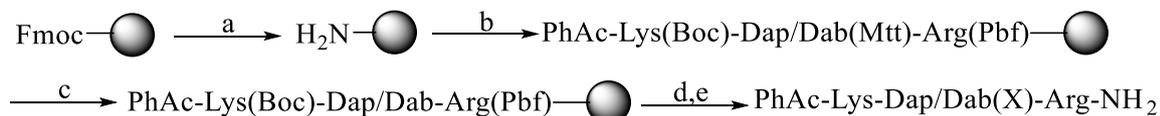


Abbildung 14: Struktur des gewünschten Inhibitor **11** und des vermutlichen Iso-Dap-Nebenprodukts.

Deswegen wurde anschließend anstatt von Fmoc-Dap(Dde)-OH das Derivat Fmoc-Dap(Mtt)-OH verwendet, wobei der Mtt-Rest eine alternative orthogonale Aminoschutzgruppe darstellt, die unter schwach sauren Bedingungen am Rink-Amid-Harz abspaltbar ist. Die Synthese erfolgte analog zum Aufbau des Peptids mit Dde-Schutz, die 4-Methyltrityl-Gruppe wurde jedoch mit 1 % TFA in DCM abgespalten. Mit dieser Strategie wurde ein relativ einheitliches

Produkte erhalten, das problemlos mittels präparativer HPLC gereinigt werden konnte. Sämtliche Peptide wurden lyophilisiert und als TFA-Salze erhalten. Im

Schema 1 ist die Synthese der Verbindungen dargestellt.



Schema 1: Synthese der Inhibitoren mit Modifikation in P2-Position. Reagenzien und Bedingungen: (a) Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe mit 20 % Piperidin in DMF, 5 + 15 min. (b) manuelle Fmoc-SPPS, Einfachkupplungen mit jeweils 4 äq. Aminosäure bzw. Phenyllessigsäure, HBTU, HOBT und 8 äq. DIPEA, in DMF, 2 h. (c) Abspaltung der Mtt-Schutzgruppe mit 2 × 30 min mit 1 % TFA in DCM. (d) manuelle SPPS, Einfachkupplung mit jeweils 4 äq. Aminosäure, HBTU, HOBT und 8 äq. DIPEA, in DMF, 2 h. (e) TFA/TIS/H₂O (95/2,5/2,5; v/v/v) 2 h. Die finalen Verbindungen wurden mittels präparativer HPLC gereinigt, und lyophilisiert.

Nach diesem Syntheschema wurden 5 unterschiedliche Inhibitoren hergestellt (Tabelle 5). Eine vernachlässigbare Hemmwirkung wurde für das verkürzte unmodifizierte P2-Dap-Derivat **13** festgestellt. Die Kupplung eines Glycinrestes in Verbindung **11** führte zu einer stärkeren Hemmung ($K_i = 12 \mu\text{M}$), jedoch ist die Verbindung deutlich weniger wirksam als der Referenzinhibitor **9** mit Lys in P2-Position. Für die reduzierte Hemmwirkung könnte es verschiedene Gründe geben. Durch den Einbau einer Amidbindung wird die Seitenkette rigider, dies könnte dazu führen, dass die terminale Aminogruppe eine etwas andere Position als im Komplex mit Inhibitor **9** einnimmt. Eine weitere Ursache könnte eine Änderung im $\text{p}K_a$ -Wert der terminalen Aminogruppe sein. Im Falle des Lysins liegt der berechnete $\text{p}K_a$ -Wert bei ca. 10,49 und für eine terminale α -Aminogruppe eines Peptids jedoch nur bei ca. 8,35. Die Berechnung der $\text{p}K_a$ -Werte erfolgte mit dem Webtool der Firma ChemAxon (<https://chemicalize.com/welcome>). Demzufolge sollte bei dem pH-Wert der enzymkinetischen Messung (pH = 8,5) die Lysinseitenkette fast vollständig protoniert sein, während die terminale Aminogruppe des Hemmstoffs **11** nur zu knapp 50 % in der protonierten Form vorliegt (Abbildung 15). Dadurch sollten die polaren Wechselwirkungen zu den Resten Asp75, Gly83 und Asn152 in der S2-Tasche deutlich reduziert sein, weil die Konzentration der inhibitorisch wirksameren protonierten Form des Inhibitors abnimmt. Der Austausch des Glycins durch Alanin oder Phenylalanin führte zu einer weiteren Verringerung der K_i -Werte, möglicherweise durch ungünstige sterische Ursachen.

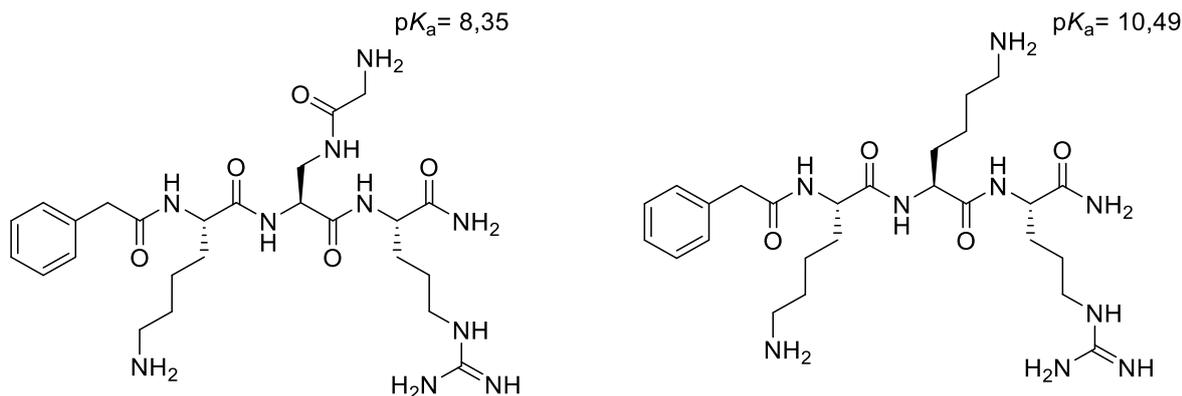


Abbildung 15: Vergleich der berechneten pK_a -Werte des Hemmstoffs **11** (links) und des Referenzinhibitors **9** (rechts).

Im Falle des Dab-Inhibitors **14** könnte eine weitere Ursache für dessen sehr schwache Hemmaktivität in der verlängerten Seitenkette liegen, wodurch die terminale Aminogruppe anders platziert ist und die in Abbildung 11 gezeigten Kontakte nicht mehr möglich sind.

Daher ist diese Strategie, das P2-Lys durch mit α -Aminosäuren acylierte Dap- oder Dab-Derivate zu ersetzen, für die Entwicklung von Hemmstoffen der WNV-Protease nicht geeignet. Eine vergleichbare Tendenz wurde für die Hemmung der DENV-2-Protease festgestellt, obwohl dort der längere Dab(Gly)-Inhibitor **14** marginal wirksamer als der Dap(Gly)-Hemmstoff **11** ist. Da die Hemmwirkung auf die DENV-2-Protease relativ gering war, wurde für dieses Enzym nur eine prozentuale Hemmung bei konstanter Substratkonzentration bestimmt (Tabelle 5).

Tabelle 5: Hemmung der WNV- und DENV-2 NS2B-NS3-Proteasen durch Inhibitoren mit modifiziertem P2-Rest der allgemeinen Struktur PhAc-Lys-P2-Arg-NH₂. Für das WNV-Enzym wurden K_i -Werte bestimmt, für das DENV-2-Enzym nur die prozentuale Hemmung bei einer Inhibitorkonzentration von 125 μ M (Substratkonzentration 125 μ M, $K_M = 60$ μ M).

Nr.	P2	WNV-	DENV-2-
		Protease	Protease
		K_i (μ M)	%-Hemmung
9	Lys	2,48	42,2
10	Dap	>200	1,0
11	Dap(Gly)	12,2	11,7
12	Dap(Ala)	134	1,0
13	Dap(Phe)	>200	6,1
14	Dab(Gly)	83,3	16,8

3.2 Modifizierung des P3-Restes

Eine analoge Strategie wurde auch zum Austausch des Lysins in P3-Position des Referenzinhibitors **9** untersucht. Die ϵ -Aminogruppe des Lysins in P3-Position bildet nur eine Wasserstoffbrückenbindung zum Carbonyl-Sauerstoff des Phe85 auf der NS2B-Kette aus (2,8 Å) (Abbildung 16). Da die S3-Tasche andererseits relativ offen ist, sollten an dieser Position auch sterisch anspruchsvollere Reste akzeptiert werden, die eventuell zusätzliche Wechselwirkungen zum Enzym ausbilden können.

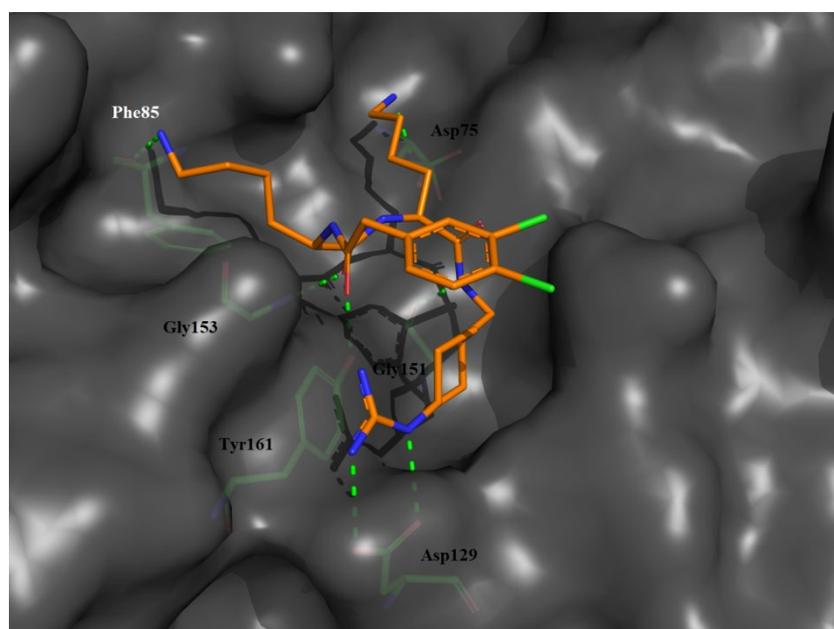


Abbildung 16: Struktur des Inhibitors **1** im Komplex mit der WNV NS2B-NS3-Protease (PDB: 2YOL). Die P3-Seitenkette bindet an den Carbonylsauerstoff des Phe85, polare Wechselwirkungen sind als grün gestrichelte Linien dargestellt. Wichtige Reste des Enzym sind als *sticks* mit grünen Kohlenstoffatomen gezeigt. Die Kohlenstoffe des Inhibitors sind in orange, die Stickstoffe in blau, die Sauerstoffe in rot und die Chloratome in grün dargestellt.

Die Synthese dieser Derivate erfolgte weitestgehend analog zu den zuvor beschriebenen Hemmstoffen mit modifiziertem P2-Rest. Das Peptid wurde mit Fmoc-SPPS am Rink-Amid-Harz hergestellt, wobei Lys(Boc) in P2- und Dap(Mtt) oder Dab(Mtt) in P3-Position eingebaut wurden. Nach Abspaltung der Mtt-Schutzgruppe mit 1 % TFA wurden verschiedene Boc-Aminosäuren an die freie Aminofunktion der P3-Seitenkette gekuppelt. Anschließend wurden die Peptide unter stark sauren Bedingungen abgespalten und mittels präparativer HPLC gereinigt. Es wurden die in Tabelle 6 aufgeführten Inhibitoren erhalten:

Tabelle 6: Hemmung der WNV- und DENV-2 NS2B-NS3-Proteasen durch Inhibitoren mit modifiziertem P3-Rest der allgemeinen Struktur PhAc-P3-Lys-Arg-NH₂. Im Falle der DENV-2-Protease wurde nur die prozentuale Hemmung bei einer Inhibitorkonzentration von 125 μ M bestimmt (Substratkonzentration 125 μ M, $K_M = 60 \mu$ M).

Nummer	P3	WNV-Protease	DENV-2-Protease
		K_i (μ M)	%-Hemmung
9	Lys	2,48	42,2
15	Dap(Gly)	33,9	21,2
16	Dap(DAla)	74,4	16,1
17	Dap(Ala)	37,4	24,1
18	Dap(Val)	30,7	24,1
19	Dab(Gly)	78,6	14,6

Tabelle 6 zeigt die K_i -Werte für die WNV-Protease und die prozentuale Hemmung des DENV-2-Enzyms. Auch in diesem Fall sind die Dap(Gly)- und Dab(Gly)-Verbindungen deutlich schwächer wirksam als der Referenzinhibitor **9**, wobei der Hemmstoff **15** wiederum etwas stärker als der um ein Atom längere Inhibitor **19** inhibiert.

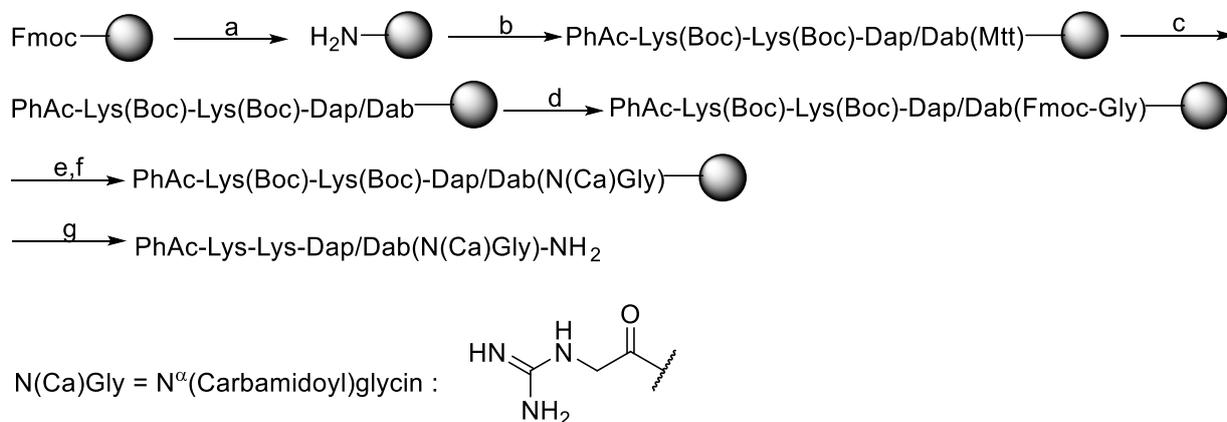
Bei den Derivaten mit Diaminopropionsäure ist der K_i -Wert relativ unabhängig von der endständig gekuppelten Aminosäure, es gibt kaum Unterschiede zwischen den Verbindungen mit Gly-, Ala- und Val, die alle Hemmkonstanten um 30 μ M besitzen. Eine reduzierte Hemmung wurde jedoch für das DAla-Derivat **16** bestimmt, dessen Wirksamkeit um den Faktor 2 verringert ist. Aufgrund der deutlich reduzierten Hemmwirkung all dieser Verbindungen im Vergleich zum Referenzinhibitor **9** erschien auch die Modifizierung der P3-Position als ungeeignet.

3.3 Modifizierung des P1-Restes

Zur Vollständigkeit sollte zusätzlich geprüft werden, ob ein Austausch des P1 Arginins durch die Dap(Gly) oder Dab(Gly)-Konstrukte toleriert wird. Zusätzlich wurde deren terminale Aminogruppe in ein Guanidin überführt.

Im folgenden Schema 2 ist die Synthese dieser Verbindungen beschrieben. Nach Aufbau des kompletten Peptids, wurde wiederum die Mtt-Gruppe am P1 Dap oder Dab unter schwach sauren Bedingungen abgespalten und anschließend Fmoc-Gly-OH gekuppelt. Nach Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe wurde ein Teil des Harzes mit 1-H-Pyrazol-

carboxamidin \times HCl und DIPEA umgesetzt und somit die terminale Aminofunktion in ein Guanidin überführt. Somit wurden am Ende sowohl die Amin-Derivate als auch deren guanilierte Verbindungen erhalten.



Schema 2: Synthese der Inhibitoren mit modifizierter P1-Position am Rink-Amid-Harz. Reagenzien und Bedingungen: (a) Fmoc-Abspaltung mit 20 % Piperidin in DMF für insgesamt 20 min. (b) manuelle Fmoc-SPPS, Einfachkupplungen mit jeweils 4 äq. Aminosäure bzw. Phenyllessigsäure, HBTU, HOBt und 8 äq. DIPEA in DMF, 2 h. (c) Mtt-Abspaltung mit 1 % TFA in DCM, 2 \times 30 min. (d) Standardkupplung von Fmoc-Glycin, DMF, 2 h. (e) Fmoc-Abspaltung mit 20 % Piperidin in DMF, 5 und 15 min. (f) 3 äq. 1-H-Pyrazolcarboxamidin \cdot HCl und 6 äq. DIPEA in DMF, 16 h. (g) TFA/TIS/H₂O (95/2,5/2,5; v/v/v), 2 h und präparativer HPLC. Bei den Verbindungen **20** und **21** wurde der Schritt f übersprungen.

Auch in diesem Fall sind die kürzeren Dap-Derivate deutlich stärker wirksam als die analogen Dab-Verbindungen (Tabelle 7). Trotzdem sind all diese Derivate im Vergleich zum Referenzinhibitor **9** weniger aktiv. Es gibt auch kaum Unterschiede zwischen der Verbindung **20** mit endständiger Aminogruppe in der P1-Seitenkette und dem entsprechenden Guanidinderivat **22**. Beide Verbindungen besitzen eine Hemmkonstante von ca. 17 μ M und sind somit um den Faktor 4 schwächer als der Referenzinhibitor **9** mit Arginin in P1-Position. Im Falle der Dab(Gly)-Verbindungen bewirkt die Umwandlung in ein Guanidin eine leichte Verstärkung der Hemmwirkung bei Inhibitor **23** (Tabelle 7).

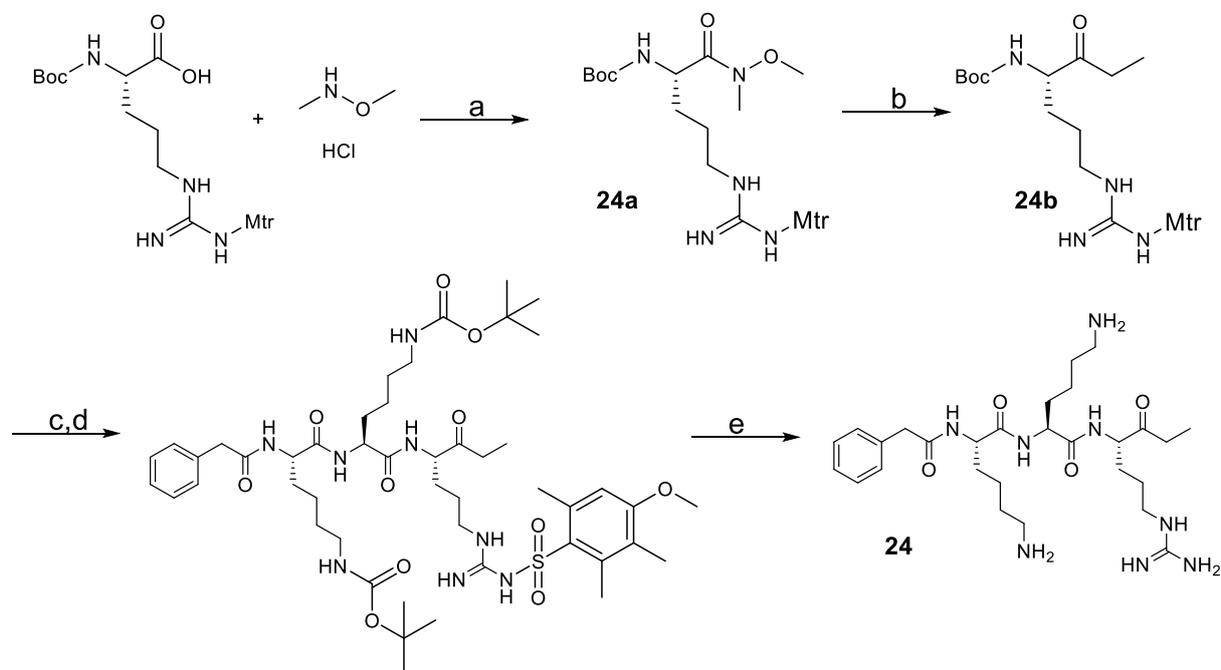
Tabelle 7: Hemmung der WNV-, DENV-2 NS2B-NS3-Proteasen durch Verbindungen der allgemeinen Struktur PhAc-Lys-Lys-P1-NH₂. Die Messungen mit dem DENV-2-Enzym erfolgten bei einer InhibitorKonzentration von 125 μ M und einer Substratkonzentration von 125 μ M ($K_M = 60 \mu$ M).

Nummer	P1	WNV-Protease K_i (μ M)	DENV-2-Protease %-Hemmung
9	Arg	2,48	42,2
20	Dap(Gly)	17,6	29,5
21	Dab(Gly)	105,9	17,0
22	Dap(N(Ca)Gly)	17,3	n.b.
23	Dab(N(Ca)Gly)	73,4	n.b.

3.4 Keton-Derivate als Inhibitoren der NS2B-NS3-Proteasen

Substratanaloge Keton- und Aldehydderivate werden vielfach als Inhibitoren für Serinproteasen genutzt. Diese Verbindungen bilden kovalente Bindungen zu den Zielproteasen aus, dadurch kommt es zu einer deutlichen Verstärkung der Hemmwirkung. Inhibitoren mit einer aktivierten Carbonyl- oder einer carbonylanalogen Struktur in P1-Position können durch die Hydroxylgruppe des Serins im aktiven Zentrum nukleophil angegriffen werden, dadurch kommt es zur Ausbildung einer kovalenten Hemiketal- oder Hemiactalbindung und in vielen Fälle zu einer deutlichen Verstärkung der Hemmwirkung. In Abhängigkeit der Art des Ketons unterscheidet man zwei verschiedene Hemmtypen. Im Falle von irreversiblen Inhibitoren, beispielsweise bei Chlormethylketonen, kommt es neben der prinzipiell reversiblen Hemiketalbindung zu einer stabilen Alkylierung des Histidins der katalytischen Triade. Dadurch können die entstandenen Inhibitor/Enzym-Komplexe nicht mehr dissoziieren. Die andere Gruppe umfasst die Übergangszustandinhibitoren (*transition-state-inhibitors*), die reversibel-kovalent binden. Dadurch kommt es zur Ausbildung eines tetraedrischen Übergangszustandes, das dabei gebildete P1-Oxyanion wird durch zwei Wasserstoffbrückenbindungen zum Enzym stabilisiert. Der Komplex kann jedoch wieder in freies Enzym und Inhibitor zerfallen. In einer früheren Arbeit wurden peptidische Arginylketonderivate als Hemmstoffe der DENV-Protease beschrieben.¹¹⁰ Daher wurde ausgehend von der Leistruktur PhAc-Lys-Lys-Arg-NH₂ **9** versucht, analoge Ketonderivate als Hemmstoffe der WNV-Protease herzustellen. Im Folgenden wird die Synthese von zwei Inhibitoren mit einem P1-P1'-Arginylketon-Segment beschrieben.

Zur Synthese des Arginylketons wurde Boc-Arg(Mtr)-OH durch Kupplung mit N-Methyl-O-Methylhydroxylamin \times HCl in das Weinrebamid **24a** überführt (Schema 3). Unter Argon-Atmosphäre wurde das Intermediat **24a** tropfenweise mit Ethylmagnesiumbromid versetzt und das entsprechende Ethylketon **24b** erhalten. Jedoch kam es zur Bildung mehrerer Nebenprodukte, basierend auf der Reaktionskontrolle mittels HPLC-Detektion bei 220 nm ist das Produkt zu etwa 50 % entstanden. Nach Reinigung mittels Kieselgelchromatographie wurde ein Rohprodukt mit einer Reinheit von 75 % erhalten, das noch ca. 25 % an Weinrebamid **24a** enthält. Im folgenden Schritt wurde mittels 15 % TFA die Boc-Schutzgruppe abgespalten. Unter diesen Bedingungen wurde keine Abspaltung der eigentlich auch säurelabilen Mtr-Schutzgruppe von der Argininseitenkette beobachtet. Das Intermediat wurde anschließend mit dem seitenkettengeschützten P4-P2-Segment (PhAc-Lys(Boc)-Lys(Boc)-OH) gekuppelt, das zuvor am 2-CTC-Harz mittels Standard-Fmoc-SPPS hergestellt wurde. Im letzten Schritt erfolgte die Abspaltung sämtlicher Schutzgruppen unter stark sauren Bedingungen und die Reinigung des Produkts **24** mittels präparativer HPLC (Schema 3). Aufgrund der Verunreinigung des Intermediats **24b** wurde bei der präparativen HPLC das zur Verbindung **24** analoge Weinrebamid **25** als Nebenprodukt erhalten (Tabelle 8).



Schema 3: Synthese der Ethylketonverbindung (Inhibitor **24**). Reagenzien und Bedingungen: (a) 1 äq. N-Methyl-O-Methylhydroxylamin \times HCl, 1 äq. BOP, 3 äq. 6-Cl-HOBT und 2-3 äq. DIPEA in DMF (5 mL/mmol), 0 °C für 30 min, 2 h bei RT. (b) Ethylmagnesiumbromid, Argon-Atmosphäre, DMF. (c) 15 % TFA in DCM für 30 min. (d) 1 äq. PhAc-Lys(Boc)-Lys(Boc)-OH, 1 äq. BOP, 3 äq. 6-Cl-HOBT und 2-3 äq. DIPEA 0 °C, für 30 min, 2 h bei RT. (e) 95 % TFA; 2,5 % TIS und 2,5 % H₂O (v/v/v) für 2 h.

Neben dem Ethylketon wurde mit der gleichen Strategie der sterisch anspruchsvollere Benzylketon-Inhibitor **26** hergestellt. Jedoch erwies sich das Ethylketon (**24**) mit einem K_i -Wert von 1,07 μM im Vergleich zum Benzylketon als ca. 20-fach stärkerer Inhibitor der WNV-Protease. Dies bestätigt frühere Ergebnisse zur Untersuchung der Substratspezifität des WNV-Enzyms, dass in P1'- und P2'-Position das sterisch wenig anspruchsvolle Glycin im Vergleich zu allen anderen Aminosäuren deutlich bevorzugt ist. Der Einbau des größeren Benzylketons wird offenbar nicht akzeptiert. Obwohl das Weinrebamid **25** wie erwartet weniger wirksam als das Ethylketon **24** ist, wurde für diese Verbindung mit einem K_i -Wert von 8 μM interessanterweise eine etwas stärkere Hemmwirkung im Vergleich zum Benzylketon **26** festgestellt.

Da für das Ethylketon eine relativ starke Hemmwirkung bestimmt wurde, sollte auch noch das analoge Methylketon hergestellt werden. Die Umsetzung des Weinrebamids **24a** mit Methylmagnesiumbromid führte jedoch zu zahlreichen Nebenprodukten, die Reinigung des gewünschten Methylketons war nicht möglich. Das Benzylketon **26** ist im Vergleich zum Ethylketon **24** ein etwas stärkerer Inhibitor der DENV-2-Protease. Aus früheren Untersuchungen zur Substratspezifität der DENV-2 Protease ist bekannt, dass im Gegensatz zur WNV-Protease auch sterisch anspruchsvollere Reste in P1' und P2'-Position akzeptiert werden, wodurch die etwas stärkere Hemmung des Benzylketons erklärbar ist. Beide Ketonderivate sind deutlich stärkere Hemmstoffe des DENV-2-Enzyms als das Weinrebamid **25**. Im Vergleich zum rein peptidischen Referenzinhibitor **9** ist im Falle der WNV-Protease gelungen, mit dem Ethylketon **24** einen ca. 2-fach stärkeren Inhibitor herzustellen. Im Falle der DENV-2 Protease sind jedoch beide Ketone deutlich weniger wirksam als Inhibitor **9**.

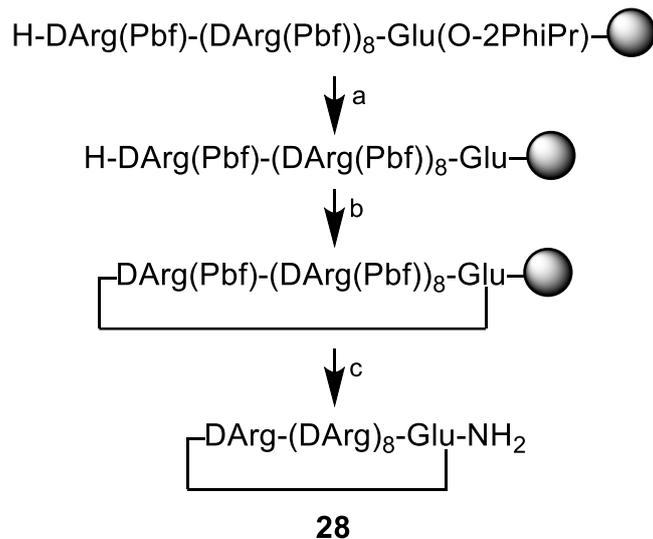
Tabelle 8: Synthetisierte Keton-Derivate mit den bestimmten K_i -Werten für die WNV-Protease und die prozentuale Hemmung für die Dengue-Protease (n = 3). Die Messungen mit dem DENV-2-Enzym erfolgten bei einer Inhibitorkonzentration von 125 μM und einer Substratkonzentration von 125 μM ($K_M = 60 \mu\text{M}$).

Nummer	Sequenz	WNV-Protease	DENV-2-Protease
		K_i (μM)	%-Hemmung
24	PhAc-Lys-Lys-Arg-Ethylketon	1,07	11,5
25	PhAc-Lys-Lys-Arg-Weinrebamid	8	3
26	PhAc-Lys-Lys-Arg-Benzylketon	24	19,1

3.5 Zellpenetrierende zyklische Peptidinhibitoren

Die WNV-NS2B-NS3-Protease ist mit dem ER assoziiert und spaltet das Polypeptid im Zytosol. Daher müssen Hemmstoffe dieser Protease ins Zytosol gelangen, die meisten Peptide sind jedoch in der Regel nicht in der Lage, die Zellmembranen durch passive Diffusion zu durchdringen. Jedoch gibt es inzwischen auch zahlreiche zellpenetrierende Peptide (CPPs), die in die Zelle aufgenommen werden. Eine Gruppe dieser CPPs sind polykationische Strukturen, die reich an Arginin- und Lysinresten sind. Innerhalb dieser Verbindungen wurden in den letzten Jahren mehrere zyklische Peptide beschrieben, für die im Vergleich zu den linearen CPPs eine noch bessere Aufnahme festgestellt wurde. Dazu gehören zyklische Verbindungen, die nur aus L-Argininen aufgebaut sind oder spezifische argininreiche Sequenzen enthalten.¹⁰² Da aus früheren Arbeiten bereits bekannt war, dass lineare Oligo-D-Arginin-Derivate wirksame Hemmstoffe der WNV-Protease sind (Tabelle 1), wurde versucht zyklische Oligo-D-Arginin-Verbindungen als WNV-Proteasehemmstoffe herzustellen. Zusätzlich sollte eine kürzlich beschriebene und für die Aufnahme besonders geeignete zyklische argininreiche Sequenz: $c[\text{Phe-2-Nal-(Arg)}_4\text{-Glu}]$ mit D-Argininresten verlängert werden.¹¹¹

Die Synthese der zellpenetrierenden zyklischen Peptide wurde mittels automatisierter SPPS nach Fmoc-Strategie am Rink-Amid-Harz durchgeführt (Schema 4). Zur Herstellung des Inhibitors **28** wurde zuerst Fmoc-Glu(O-2-PhiPr)-OH ans Harz gekuppelt, der sehr säurelabile 2-Phenylisopropylester kann am Rink-Amid-Harz selektiv mit 1 % TFA abgespalten werden. Anschließend wurden insgesamt neun Fmoc-DArg(Pbf)-OH-Reste gekuppelt und die terminale Fmoc-Schutzgruppe abgespalten. Nach schwach saurer Abspaltung der Seitenkettenschutzgruppe des Glu-Restes, wurde die Aminogruppe des endständigen Arginins mit der Glu-Seitenkette zyklisiert. Anschließend wurde das Peptid unter stark sauren Bedingungen vom Harz abgespalten und dabei vollständig entschützt. Das Rohpeptid wurde mittels präparativer HPLC gereinigt. Jedoch konnte nur 1 mg des Produktes mit einer Reinheit von 92 % isoliert werden. Da sich die Verbindung **28** im Vergleich zu dem zweiten zyklischen Inhibitor **27** in den späteren enzymkinetischen Messungen als schwächer wirksam erwies, wurde auf eine Wiederholung der Synthese verzichtet.



Schema 4: Synthese des zyklischen Inhibitors **28** am Rink-Amid-Harz. Der Inhibitor ist zwischen der N-terminalen Aminogruppe und der Seitenkette der C-terminalen Glutaminsäure zyklisiert (*head to side chain cyclization*). Zuerst wurde die Peptidkette mittels Standard-SPPS nach Fmoc-Strategie am Harz aufgebaut. (a) 1 % TFA in DCM, 3 × 30 min. (b) Zyklisierung am Harz mit 3 äq. PyBOP, 3 äq. 6-Cl-HOBT, 2-3 äq. DIPEA (pH ~8-9) (c) Abspaltung vom Harz mit 95 % TFA, 2,5 % TIS und 2,5 % H₂O (v/v/v) für 2 h.

Zur Synthese des Inhibitors **27** mit der von Pei *et al.* beschriebenen zyklischen CPP-Sequenz¹¹¹ wurden zunächst fünf Fmoc-DArg(Pbf)-Reste hintereinander ans Harz gekuppelt. Diese sollen für die hauptsächliche Hemmwirkung verantwortlich sein⁶⁰, obwohl bei dieser Verbindung auch eine Inhibierung durch die zyklische Struktur mit den vier L-konfigurierten Argininresten denkbar ist. Das C-terminale Penta-DArg-Segment sollte zusätzlich das Peptid vor enzymatischem Abbau schützen. Nach den fünf DArg-Resten wurden nacheinander die Reste des amphiphilen zellpenetrierenden zyklischen Peptids angekuppelt, das eine kurze hydrophobe (Phe-2-Nal) und eine hydrophile Sequenz aus vier Argininresten besitzt. Nach Aufbau des linearen seitenkettengeschützten Peptids am Harz und Abspaltung der N-terminalen Fmoc-Schutzgruppe, wurde wie zuvor beschrieben der 2-Phenylisopropylester an der Seitenkette der Glutaminsäure unter schwach sauren Bedingungen entfernt. Anschließend wurde das Peptid wieder am Harz mit PyBOP und 6-Cl-HOBT als Additiv zyklisiert.¹¹² Die Abspaltung unter stark sauren Bedingungen lieferte das Rohprodukt des Peptids **27** (Abbildung 17), das anschließend mittels präparativer HPLC gereinigt wurde. Jedoch konnte von diesen zyklischen Peptiden nur eine sehr geringe Ausbeute erhalten werden, die Ursache wurde nicht geklärt.

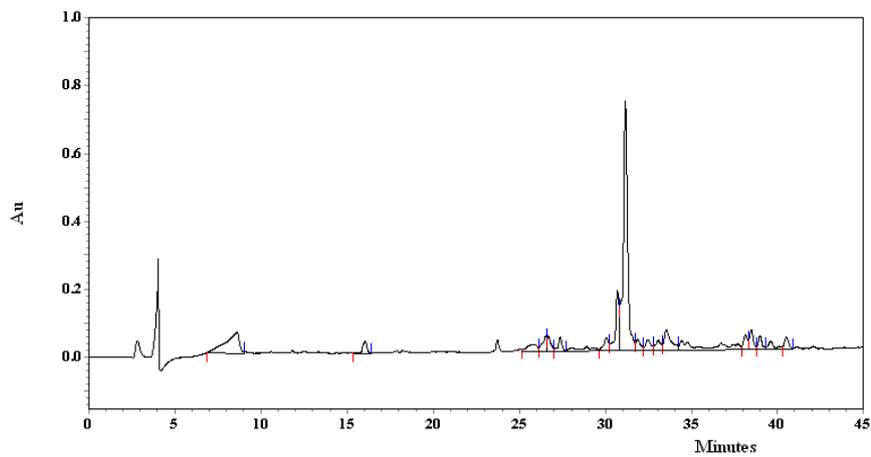
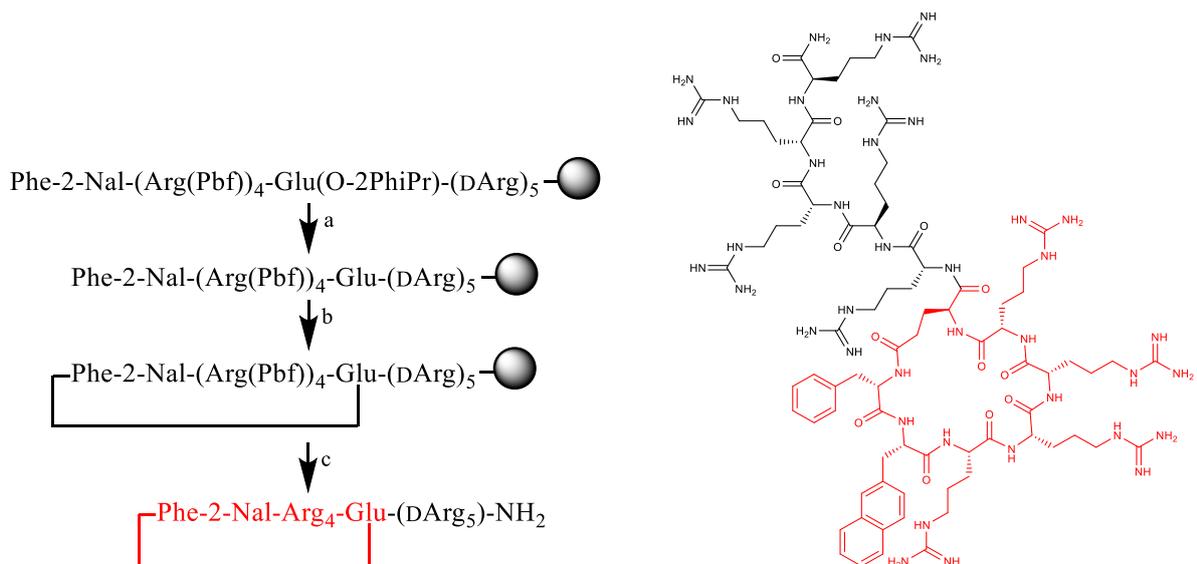


Abbildung 17: HPLC-Chromatogramm des Rohprodukts von Inhibitor **27**. Start bei 1 % ACN. Das Produkt eluiert bei 32,03 min.



Schema 5: Synthese des Inhibitors **27** am Rink-Amid-Harz. Reagenzien und Bedingungen. (a) $3 \times 1\%$ TFA, DCM, 30 min. (b) Zyklisierung am Harz: 5 äq. PyBOP, 5 äq. 6-Cl-HOBT, 10 äq. DIPEA (pH \sim 8-9) (c) 95 % TFA, 2,5 % TIS und 2,5 % H_2O (v/v/v), 2 h.

Tabelle 9: Hemmwirkung der zyklischen Peptide auf die WNV- und DENV-2 Proteasen. In beiden Fällen erfolgte die Zyklisierung zwischen dem N-Terminus und der Glu-Seitenkette.

Nummer	Sequenz	WNV-Protease	DENV-2-Protease
		K_i (μM)	K_i (μM)
27	c[Phe-2-Nal-(Arg) ₄ -Glu]-(DArg) ₅ -NH ₂	0,5	2,9
28	c[(DArg) ₉ -Glu]-NH ₂	2,5	4,75

Die Hemmwirkung des Inhibitors **27** bezüglich der WNV-Protease ist im Vergleich zur Verbindung **28** und zum Referenzinhibitor **9** (PhAc-Lys-Lys-Arg-NH₂) jeweils ca. 5-fach stärker. Der K_i -Wert von 0,5 μM ist auch sehr ähnlich zur Hemmkonstante, die für das Hexa-DArg-Amid ($K_i = 0,478 \mu\text{M}$) in früheren Arbeiten bestimmt wurde (Tabelle 1).⁶⁰ Das lässt vermuten, dass der Inhibitor **27** vor allem über sein C-terminales Penta-DArg-Segment hemmt, vermutlich ragt der zyklische Teil des Inhibitors ins Lösungsmittel. Offenbar gestattet das rigidere zyklische Nona-DArg-Segment eine weniger geeignete Bindung.

Jedoch ist bisher völlig unklar, wie das Oligo-DArg-Segment des Inhibitors **28** an das aktive Zentrum bindet. Eine normale substratanaloge Bindung in Form eines kurzen antiparallelen β -Faltblatts, wie sie für Peptidstrukturen aus L-konfigurierten Aminosäuren bekannt ist¹¹³, sollte nicht möglich sein.

Im Vergleich zu den zuvor beschriebenen Hemmstoffen wurde für die beiden zyklischen Derivate auch eine signifikante Hemmung der DENV2-Protease festgestellt. Daher konnten für beide Verbindungen K_i -Werte bestimmt werden, auch für dieses Enzym wurde eine stärkere Hemmung durch die Verbindung **27** ($K_i = 2,9 \mu\text{M}$) festgestellt. Da von beiden Verbindungen nach Reinigung nur sehr geringe Mengen erhalten wurden, konnte keine weiteren Zellkulturversuche durchgeführt werden, um deren zellpenetrierenden Eigenschaften zu bestimmen.

3.6 Cholesteryl- und Dihydrocholesterylinhibitoren

Eine weitere Möglichkeit zur Erhöhung der Zellpermeabilität und stärkerer Wirksamkeit im Zytosol ist die kovalente Kupplung von Cholesterolresten an Wirkstoffe.^{114, 115} Cholesterol ist ein Bestandteil von Zellmembranen. Aufgrund der starken Lipophilie des Cholesterols können auch kovalente Konjugate mit polaren Wirkstoffen in Membranen eingelagert werden, wobei die Wirkstoffe im extrazellulären Raum oder im intrazellulären Lumen der Zelle lokalisiert sind. Ein Teil der Konjugate kann auch freigesetzt werden, dadurch ins Zytosol gelangen und wieder in intrazelluläre Lipidmembranen eingelagert werden. Über diesen Mechanismus könnte eine Hemmung der NS2B-NS3-Protease im Zytosol möglich sein. In einer früheren Arbeit zur Entwicklung von Cholesterol-gekoppelten Hemmstoffen der β -Sekretase war die intrazelluläre Hemmwirkung von der Länge eines Oligoethylglykollinker-Derivats zwischen dem Cholesterol und dem Inhibitor abhängig. Offenbar war nur bei ausreichender Linkerlänge eine optimale Adressierung der β -Sekretase möglich.¹¹⁴ Diese Strategie wurde auf den Referenzinhibitor **9** angewendet und ist in Abbildung 18 dargestellt. Zur kovalenten Verknüpfung mit einem Linker wurde der N-terminale PhAc-Rest des Referenzinhibitors **9** durch eine 4-Aminomethyl-PhAc-Gruppe ausgetauscht.

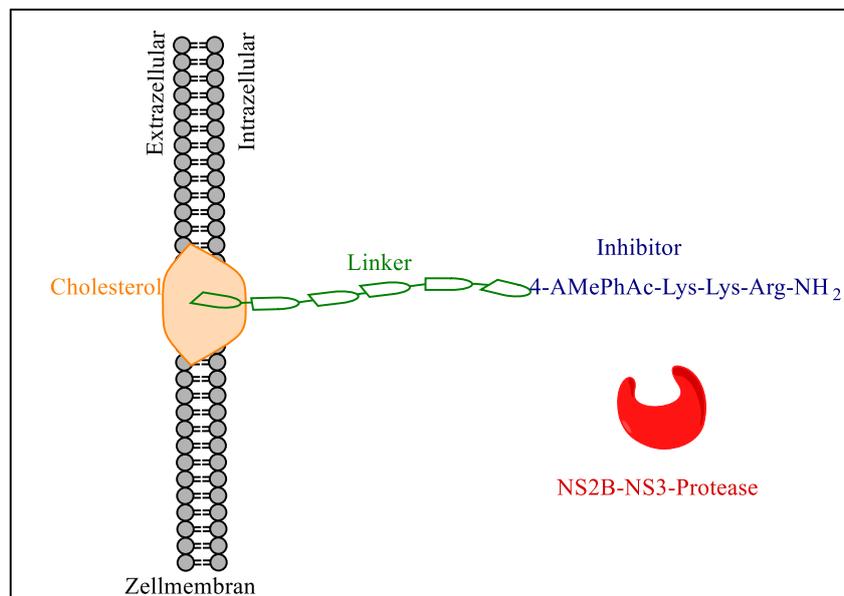
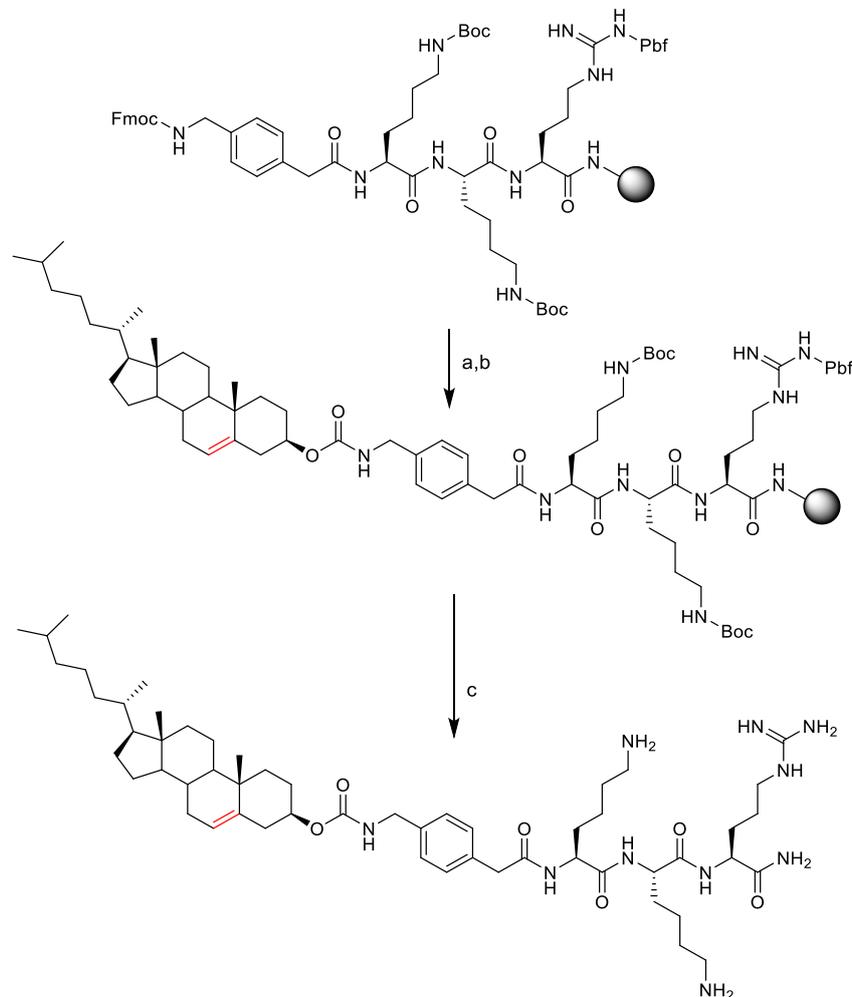


Abbildung 18: Struktur des membrangebundenen Cholesterol-Linker-Inhibitor-Konjugats. Nach Freisetzung ist auch eine Einlagerung in intrazelluläre Lipidmembranen denkbar. Das Cholesterol (in orange) ist kovalent an einen bivalenten Linker (grün) gebunden, der mit einer Inhibitorsequenz (in blau) verknüpft ist.

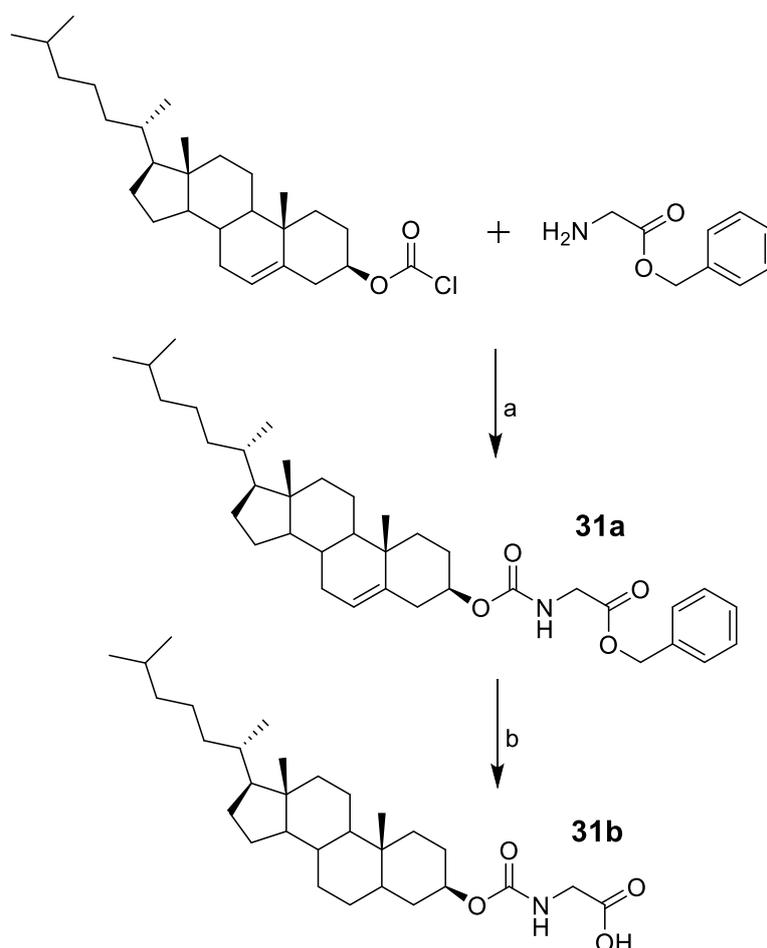
3.6.1 Synthese der Cholesterol-Inhibitor-Konjugate

Die Synthese der Cholesteryl-derivate erfolgte am Rink-Amid-Harz. Zum Vergleich wurden initial einige Derivate ohne Linker und später Verbindungen mit unterschiedlich langen Linkersegmenten hergestellt. Nach Aufbau der Peptidsequenz Fmoc-AMe-PhAc-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Arg(Pbf)-Amid-Harz mittels Fmoc-SPPS und Abspaltung der N-terminalen Schutzgruppe erfolgte die Kupplung mit Cholesterylchloroformiat in DCM, da das Cholesterylchloroformiat in DMF nur schlecht löslich ist. Anschließend wurden die Schutzgruppen und das Peptid vom Harz unter stark sauren Bedingungen abgespalten und das Rohprodukt in Diethylether gefällt. Die Reinigung mittels präparativer HPLC lieferte Produkt **30** (Schema 6), welches jedoch auf der analytischen HPLC einen Doppelpeak mit annähernd gleichen Peakflächen zeigte.



Schema 6: Synthese der Verbindung **30**. Reagenzien und Bedingungen : (a) Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe mit 20 % Piperidin in DMF für 3×15 min. (b) Cholesterylchloroformiat/DIPEA in DCM. (c) 95 % TFA, 2,5 % TIS und 2,5 % H_2O (v/v/v) für 2 h. Die Verbindung ist zu ca. 50 % mit dem Dihydrocholesteryl-Derivat verunreinigt.

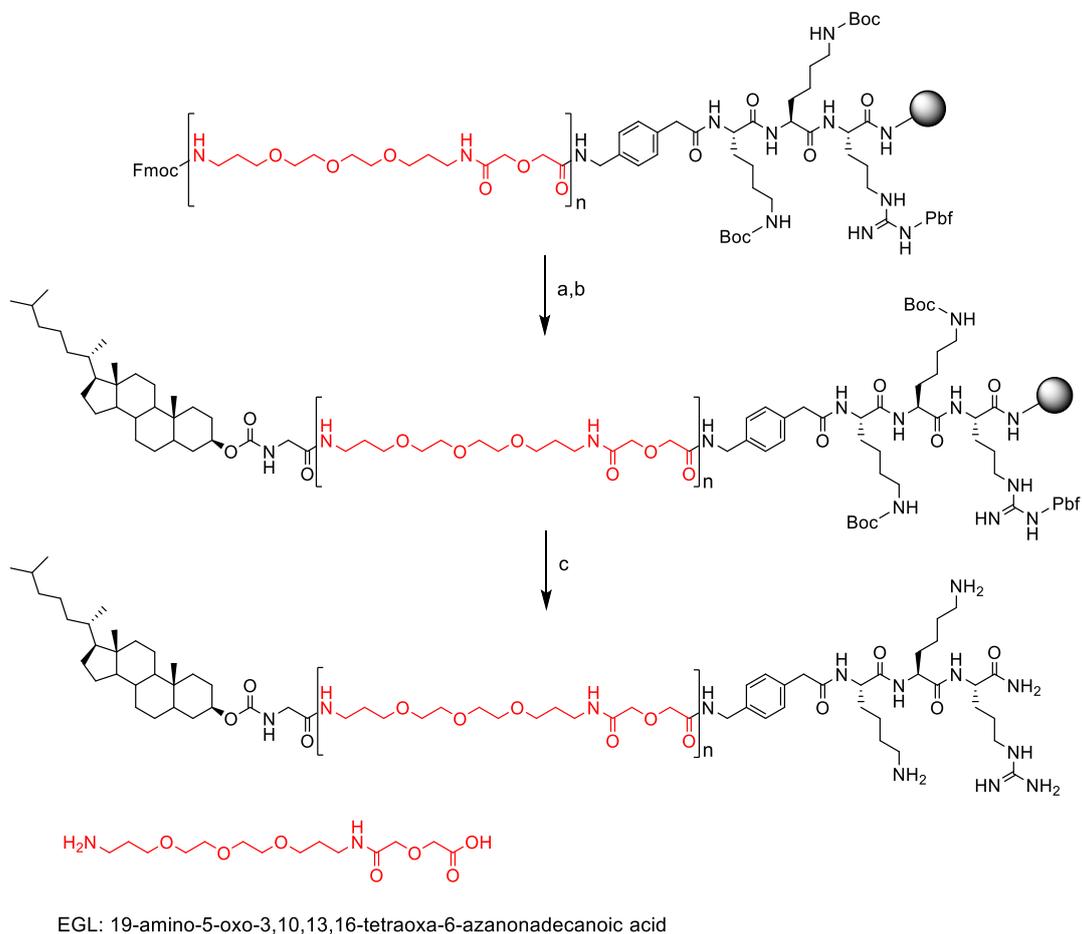
Der Unterschied der Retentionszeiten beider Signale betrug ca. 1 min. Für den hinteren Peak wurde eine um 2 größere Masse im Vergleich zum vorderen Produktpeak festgestellt. Dieser Unterschied könnte sich durch eine Sättigung der Doppelbindung des Cholesterols erklären lassen. Um ein einheitliches modifiziertes Produkt zu erhalten, wurde daher das Cholesterylchloroformiat zuerst an H-Gly-OBzl \times *p*-Tosylat in Gegenwart von *N*-Methylmorpholin als Hilfsbase gekuppelt und das erhaltene Intermediat **31a** anschließend hydriert. Dadurch kommt es zur Sättigung der Doppelbindung bei gleichzeitiger Abspaltung des Benzylesters (Schema 7). Das Dihydrocholesteryl-Gly-Intermediat **31b** konnte problemlos in der nachfolgend beschriebenen Festphasenpeptidsynthese für die Herstellung der Verbindung **31** verwendet werden.



Schema 7: Synthese des Dihydrocholesteryl-Derivates **31b**: Reagenzien und Bedingungen:(a) Cholesterylchloroformiat + H-Gly-OBzl + *N*-Methylmorpholin in DCM, 1 h (b) Pd/C in Eisessig, 3 h, 70 °C, Wasserstoff-Atmosphäre.

3.6.2 Synthese der Dihydrocholesterylinhibitoren

Die Synthese der Dihydrocholesterylinhibitoren verlief analog der Herstellung der Cholesterylinhibitoren, wobei zusätzlich verschieden lange Spacer aus unterschiedlich vielen EthylenGlykol-Linkersegmenten (abgekürzt als EGL = 19-Amino-5-oxo-3,10,13,16-tetraoxa-6-azanonadecanoic acid) eingebaut wurden. Im ersten Schritt wurde die Peptidkette aufgebaut, danach wurden die Fmoc-geschützten EGL-Bausteine als Linker gekuppelt und im letzten Schritt das Dihydrocholesteryl-glycin-Derivat **31b** (Schema 8) angeknüpft. Der Dihydrocholesterylrest ist über eine Urethanstruktur an das Glycin geknüpft, zur Bezeichnung der folgenden Verbindungen wird dieses Segment vereinfacht als Dihydrocholesterylcabonyl-Gly (Di-H-Chol-CO-Gly) bezeichnet.



Schema 8: Synthese der Inhibitoren **31-33** ($n=1-3$). Der Linker mit unterschiedlich vielen EGL-Bausteinen ist in rot dargestellt. Reagenzien und Bedingungen: (a) 20 % Piperidin in DMF, 3 × 5 min, (b) jeweils 4 äq. Dihydrocholesteryl-CO-Gly-OH **31b**, HBTU und HOBt sowie 8 äq. DIPEA, in DCM, 2 h. (c) 95 % TFA, 2,5 % TIS und 2,5 % H₂O (v/v/v) für 2 h.

3.6.3 Hemmwirkung der Cholesteryl-derivate

Beim Versuch der K_i -Wert-Bestimmung dieser Cholesteryl-derivate fiel bei den Dixon-Auftragungen auf, dass die Messdaten einem parabolischen Kurvenverlauf entsprachen und kein linearer Zusammenhang resultierte. Aus diesem Grund konnten nur IC_{50} -Werte bestimmt werden, da der Hemmmechanismus unklar war. In Abbildung 19 ist exemplarisch die Hemmwirkung des Inhibitors **31** gezeigt. Für die IC_{50} -Bestimmung wurden 12 verschiedene Inhibitor-Konzentrationen bei konstanter Substrat- und Enzymkonzentration vermessen. Aus dem sigmoidalen Kurvenverlauf kann durch Anpassung der Messdaten an Formel 2 (siehe Seite 96 im Experimentellen Teil) der IC_{50} -Wert und der Anstiegs-Koeffizient (als p abgekürzt) berechnet werden. Der Anstiegsfaktor p wird allgemein als Hill-Koeffizient bezeichnet und ist ein Wert zur Beschreibung der Kooperativität zwischen Inhibitor und Enzym. Liegt er bei 1, bindet ein Inhibitormolekül an ein Enzymmolekül (Stöchiometrie 1:1). Im Falle der Cholesterol- und Dihydrocholesteryl-derivate liegt der Hill-Koeffizient immer zwischen 3 und 4. Normalerweise ist ein größerer Hill-Koeffizient ein Hinweis, dass oligomere Enzymformen vorliegen, die mehrere ähnliche aktive Zentren besitzen und deshalb mehrere Inhibitormoleküle binden können.¹¹⁶ Jedoch existiert die WNV-Protease als Monomer, daher ist diese Erklärung nur bedingt anwendbar. Der nichtlineare Dixon-Plot und der von 1 stark abweichende Anstiegsfaktor-/Hill-Wert sind Hinweise, dass im Falle dieser Verbindungen kein reiner kompetitiver Hemmmechanismus vorliegt. Prinzipiell wäre denkbar, dass diese stark hydrophoben Cholesteryl-/Dihydrocholesteryl-Derivate unspezifisch nicht nur in das aktive Zentrum, sondern sich auch noch an andere Stellen auf der Enzymoberfläche anlagern können. Die exakte Ursache ist jedoch bisher ungeklärt. Dennoch lassen sich die Messdaten problemlos an Formel 2 anpassen, die bestimmten IC_{50} -Werte sind in Tabelle 10 zusammengefasst.

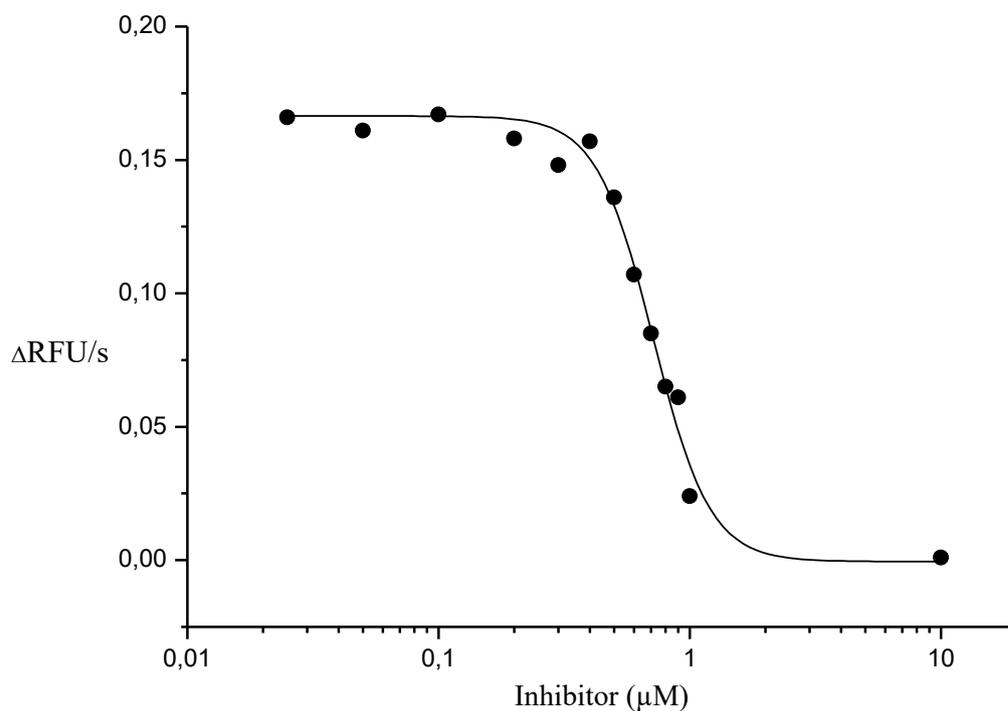


Abbildung 19: Hemmung der WNV-Protease durch Inhibitor **31**. Die Messung erfolgte mit dem Substrat PhAc-Leu-Lys-Lys-Arg-AMC \times 3 TFA bei einer Konzentration 100 μ M, die Enzymkonzentration im Messansatz betrug 8,16 nM. Die Daten wurden an Formel 2 angepasst ($IC_{50} = 0,72 \mu$ M; $p = 3,85$).

Tabelle 10: Hemmwirkung der synthetisierten Cholesteryl/Dihydrocholesteryl-Derivate auf die WNV- und DENV-2-Protease (n = 3).

Nr.	Sequenz	WNV-Protease IC_{50} (μ M)	DENV-2-Protease IC_{50} (μ M)
29*	Chol-CO -EGL-4-AMePhAc-Lys-NH ₂	4,9	2,2
30*	Chol-CO-4-AMePhAc-Lys-Lys-Arg-NH ₂	0,9	2,1
31	Di-H-Chol-CO-Gly-EGL-4-AMePhAc-Lys-Lys-Arg-NH ₂	0,6	3,16
32	Di-H-Chol-CO-Gly-(EGL) ₂ -4-AMePhAc-Lys-Lys-Arg-NH ₂	0,72	3,72
33	Di-H-Chol-CO-Gly-(EGL) ₃ -4-AMePhAc-Lys-Lys-Arg-NH ₂	0,6	4,4
34	Di-H-Chol-CO-Gly-Arg-Arg-NH ₂	2,2	3,2

* Die Verbindung enthält zu ca. 50 % das analoge Dihydrocholesteryl-Derivat.

Zum Etablieren der Synthesebedingungen wurde initial auch die Verbindung **29** hergestellt, die an Stelle der kompletten peptidischen Inhibitorsequenz nur ein kurzes C-terminales Lysinamid besitzt. Überraschenderweise besitzt sogar diese einfache monobasische Verbindung mit einem IC_{50} -Wert von $4,9 \mu\text{M}$ eine signifikante Hemmwirkung, die kaum erklärbar ist, wenn nur das 4-AMePhAc-Lysinamid-Segment in das aktive Zentrum bindet. Alle anderen Verbindungen mit vollständiger und identischer Inhibitorsequenz sind zwar deutlich stärker wirksam, jedoch liegen alle IC_{50} -Werte innerhalb der gleichen Größenordnung, d.h., die Unterschiede sind kleiner Faktor 10. Wie erwartet, wurden für alle tribasischen Verbindungen vergleichbare IC_{50} -Werte zwischen $0,6$ bis $0,9 \mu\text{M}$ bestimmt. Demzufolge hat die Länge des Linkers keinen Einfluss auf die Hemmstärke im enzymkinetischen Test, ebenso gibt es kaum Unterschiede zwischen dem Cholesteryl-derivat **30** und den Dihydrocholesteryl-Verbindungen **31** - **33**. Zum Vergleich wurde auch noch die dibasische Verbindung **34** synthetisiert, deren IC_{50} -Wert zwischen dem der monobasischen und tribasischen Derivate liegt.

Im Gegensatz zur Hemmung der WNV-Protease gibt es kaum Unterschiede bei der Inhibierung des DENV-2-Enzyms. Alle IC_{50} -Werte sind sehr ähnlich und es scheint egal zu sein, ob es sich um ein mono-, di- oder tribasisches Cholesteryl/Dihydrocholesteryl-Derivat handelt. Speziell die Werte zur Hemmung der DENV-2-Protease deuten darauf hin, dass die Hemmwirkung dieser Verbindungen relativ unspezifisch und weitestgehend unabhängig von der gekuppelten Peptidsequenz ist. Bei der Hemmung der WNV-Protease gibt es zwar Unterschiede, die jedoch relativ gering sind. Bei Verwendung der reinen Peptidsequenzen wurde in früheren Arbeiten festgestellt, dass beim Austausch des P2- oder P3-Lysins durch andere Aminosäuren (außer durch Arginin) meist drastische Aktivitätsverluste die Folge sind.¹¹⁷ Demzufolge ist auch bei der Hemmung der WNV-Protease sehr fraglich, ob die P3-P1-Peptidsequenzen der Verbindungen **30** - **33** in gewohnter Weise substratanalog binden, wie man es von den Enzym/Inhibitor-Komplexen aus Kristallstrukturen kennt und erwartet hätte.

3.6.4 Testung der Cholesterylinhibitoren in Zellkultur

Die Zellkulturuntersuchungen der Cholesteryl/Dihydrocholesteryl-derivate wurden im Arbeitskreis Prof. Bartenschlager an der Universität Heidelberg durchgeführt. In dieser Gruppe ist ein Testsystem verfügbar, um die Wirksamkeit von Verbindungen zur Hemmung der Replikation von WNV zu untersuchen. Initial wurde der Einfluss der Inhibitorkonzentration auf die Viabilität von Huh-7-Zellen mittels des CellTiter-Glo[®]- und CytoTox 96[®]-Kits der Firma Promega GmbH (Mannheim) durchgeführt. Mit diesen Tests wird der Gehalt an ATP bzw. die Freisetzung der Lactatdehydrogenase bestimmt, diese Werte gestatten Rückschlüsse auf die Anzahl der überlebenden Zellen. Als akzeptable Toleranzgrenze wurde festgelegt, dass bei der höchsten einsetzbaren Inhibitorkonzentration im antiviralen Test mindestens 80 % der Zellen überleben müssen. Es wurden für die Zellkulturtests keine höheren Konzentrationen verwendet.

Generell erwiesen sich diese Cholesteryl/Dihydrocholesteryl-derivate als relativ zytotoxisch, vor allem, wenn man sie mit reinen Peptidderivaten vergleicht, die in früheren Arbeiten geprüft wurden.¹¹⁷ Bei den Konzentrationen von 50 μM und 25 μM sind alle Inhibitoren toxisch für die Zellen, obwohl die Verbindungen **29** und **30** etwas weniger toxisch als die anderen Verbindungen erscheinen. Daher wurden zur einfacheren Vergleichbarkeit für alle Derivate 5 μM als höchste Konzentration zur Bestimmung der antiviralen Aktivität festgelegt.

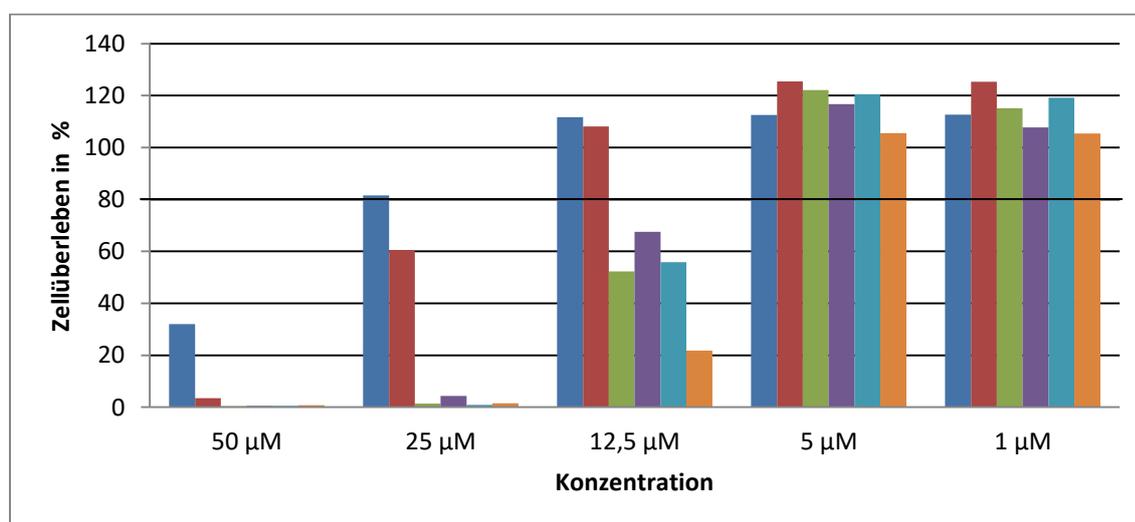


Abbildung 20: Überleben der Huh-7-Zellen bei verschiedenen Konzentrationen der Cholesteryl/Dihydrocholesteryl-derivate. ■ Verbindung 29; ■ Verbindung 30, ■ Verbindung 31, ■ Verbindung 32; ■ Verbindung 33; ■ Verbindung 34.

Die Hemmwirkung auf die WNV-Replikation wurde mittels eines Plaque-Tests bestimmt. Dafür wurden Huh-7-Zellen in 96-Well-Platten mit WNV infiziert (Stamm: New York 99; Infektion mit einem MOI von 0,2 PFU/Zelle für eine Stunde). Anschließend wurden die Inhibitoren (gelöst in Zellkulturmedium) mit unterschiedlichen Konzentrationen hinzugegeben und für 1 Stunde bei 37 °C inkubiert. Danach wurde das infektiöse Material entfernt und die Zellen wieder mit frischer Inhibitorlösung und Medium bedeckt. Nach 48 Stunden wurde die Anzahl infektiöser Viruspartikel im Überstand der Zellkulturen mittels eines Plaque-Tests mit VeroE6 Zellen bestimmt. Das Breitband-Virustatikum Ribavirin und der bereits publizierte Furin- und WNV-Proteasehemmstoff 4-Guanidinomethyl-PhAc-Arg-Lys-Arg-4-Amidinobenzylamid¹¹⁷ (MI-1230) dienten als Referenzverbindungen.

Einige Verbindungen (**29**, **33** und **34**) bewirken bei den höchsten verwendeten Konzentrationen von 5 µM eine signifikante Hemmung der Virusvermehrung. Die Virustiter wurden von $2 \cdot 10^{10}$ PFU/mL auf ca. $3 \cdot 10^7$ bis $5 \cdot 10^7$ PFU/mL reduziert, geringere Inhibitorkonzentration führten zu einer schwächeren Hemmung. Im Gegensatz dazu konnte für die Inhibitoren **30** und **32** trotz leichter Hemmwirkung keine schlüssige Konzentrationsabhängigkeit festgestellt werden, da teilweise eine stärkere Wirkung bei niedrigerer Konzentration bestimmt wurde. Verbindung **31** zeigte keinerlei Effekt.

Obwohl Verbindung **33** relativ wirksam im Plaque-Assay ist und mit den 3 EGL-Segmenten ein wirksamer IC_{50} -Wert zur Hemmung der WNV-Protease bestimmt wurde (Tabelle 10), korreliert sonst die antivirale Wirksamkeit nicht mit den Werten zur Proteasehemmung *in vitro*. Beispielsweise ist die Verbindung **29** nur ein schwacher Hemmstoff des Enzyms, zeigt aber bei einer Konzentration von 5 µM einen signifikanten Effekt im Plaque-Assay. Dies deutet eher auf einen unspezifischen Hemmeffekt auf die WNV-Vermehrung durch Anknüpfung der Cholesteryl/Dihydrocholesteryl-Gruppen hin.

Die beiden Referenzverbindungen MI-1230 und Ribavirin zeigen nur bei relativen hohen Konzentrationen von weit über 5 µM einen Hemmeffekt auf die WNV-Vermehrung.

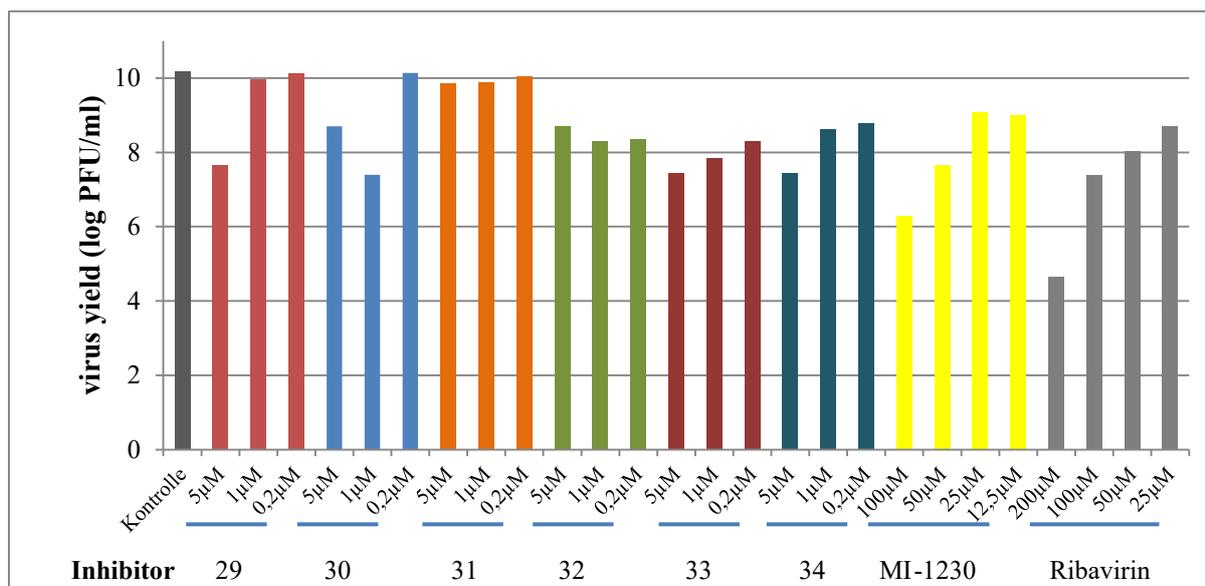


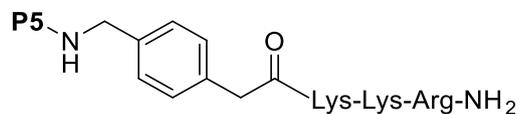
Abbildung 21: Reduktion der WNV-Vermehrung durch Cholesteryl/Dihydrocholesteryl-Derivate **29-34** (n=2). Bei der Kontrolle wurde Medium ohne Inhibitor zugesetzt. Das Experiment wurde im AK Bartenschlager (Universität Heidelberg) durchgeführt.

3.7 Hemmstoffe mit zusätzlichem P5-Rest

In der Kristallstruktur der Verbindung **1** im Komplex mit der WNV-Protease (PDB: 2YOL, Abbildung 16) nimmt das Inhibitorrückgrat eine hufeisenförmige Konformation ein, die durch eine Wechselwirkung (2,7 Å) zwischen dem P4-Carbonylsauerstoff und einem endständigen Stickstoffatom der Guanidinogruppe am P1-Rest stabilisiert wird. Dadurch legt sich der Phenylring des P4-Restes wie ein Deckel über den P1-Cyclohexylring und schirmt diesen vom Lösungsmittel ab. Es scheint, dass sich der Inhibitor durch diesen speziellen Bindungsmodus am Enzym seine eigene Bindetasche für den P1-Rest schafft. Um die Abschirmung des P1-Restes noch zu erhöhen, sollte die P4-Gruppe um einen weiteren Rest verlängert werden. Daher wurden vor allem relativ große und sterisch anspruchsvolle Reste an den P4-Rest gekuppelt.

Als einfach zu modifizierende Ausgangsstruktur wurde wieder der peptidische Inhibitor **9** (PhAc-Lys-Lys-Arg-NH₂) gewählt, bei dem der P4-Rest in para-Position des Phenylrings mit einer acylierbaren Aminomethylgruppe substituiert ist. Die Synthese erfolgte wieder am Rink-Amid-Harz mittels eines Standard-Fmoc-SPPS Protokolls. Im letzten Kupplungsschritt wurden fünf verschiedene Carbonsäuren eingesetzt, die Strukturen der hergestellten Hemmstoffe sind in Tabelle 11 zusammengefasst.

Tabelle 11: Hemmung der WNV- und DENV-2-Protease durch Inhibitoren mit zusätzlichem P5-Rest. Die Hemmung in % für die DENV-2-Protease wurde bei einer konstanten Inhibitorkonzentration von 125 μM (Substratkonzentration 125 μM , $K_M = 60 \mu\text{M}$).



Nr.	P5	WNV-Protease K_i (μM)	DENV-2-Protease %-Hemmung
35	 2-Methylphenyllessigsäure	2,1	24,2
36	 1,3-Benzodioxol-5-yllessigsäure	2,6	37,5
37	 L-Cyclopropylalanin	2,1	38,3
38	 L-Cyclohexylalanin	1,8	17,2
39	 Naphthyllessigsäure	2,2	37,5

Die Hemmkonstanten dieser Verbindungen sind alle sehr ähnlich und unterscheiden sich kaum vom K_i -Wert des Inhibitors **9** ($K_i = 2,5 \mu\text{M}$) für die WNV-Protease. Diese Werte deuten darauf hin, dass die Anknüpfung des zusätzlichen P5-Restes nicht zu der verbesserten Abschirmung des P1-Restes führt. Auch bei der Hemmung der DENV-2-Protease gibt es nur

geringe Unterschiede. Nur der Inhibitor **38** fällt in seiner Hemmwirkung etwas ab, interessanterweise ist diese Verbindung jedoch der stärkste Hemmstoff der WNV-Protease.

Als ein Beispiel wurde der Bindungsmodus des Inhibitors **35** im aktiven Zentrum der WNV-Protease (PDB: 2YOL) mit dem Programm MOE (Molecular Operating Environment) modelliert. Dazu wurde die Struktur des Inhibitors **1** aus der Kristallstruktur editiert, so dass der Inhibitor **35** erhalten wurde. Anschließend erfolgte eine Energieminimierung (Abbildung 22). Der Bindungsmodus des Inhibitors **35** ähnelt sehr stark der Struktur des Hemmstoffs **1** aus der Kristallstruktur. Man sieht, dass sich der P4-Phenylring in der modellierten Struktur etwas vom P1-Rest wegdreht, in der Konsequenz ist der gekuppelte P5-Rest recht weit von der Seitenkette des P1-Arginins entfernt. Es konnten auch keine spezifischen Wechselwirkungen zwischen dem P5-Rest und der WNV-Protease festgestellt werden. Dies erklärt, dass die Hemmwirkung der verlängerten Inhibitoren praktisch unverändert ist (Abbildung 22).

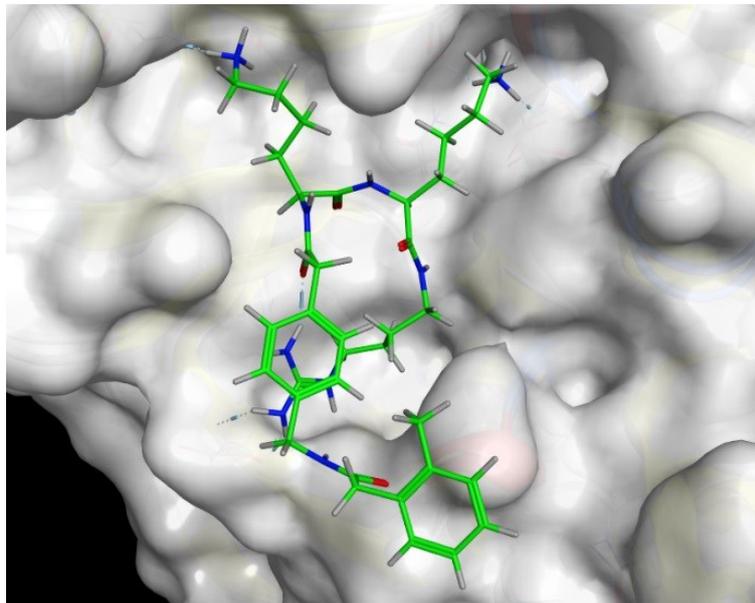


Abbildung 22: Modellierter Bindungsmodus des Inhibitors **35** im aktiven Zentrum der WNV-Protease (Kohlenstoffe in grün, Stickstoffe in blau, Sauerstoffe in rot, Wasserstoffe in grau). Intra- und intermolekulare Wechselwirkungen sind mit gestrichelten Linien dargestellt.

3.8 Einbau von Gabapentin in die Inhibitorleitstruktur

Das als Antikonvulsivum eingesetzte Gabapentin ist eine ungewöhnliche Aminosäure und kann als substituiertes Analogon der 4-Aminobuttersäure aufgefasst werden. Nach Schutz mit der Fmoc-Gruppe kann dieses Derivat bequem mittels Festphasensynthese in Peptidstrukturen eingebaut werden. Andererseits kann Gabapentin auch als am C β -Kohlenstoff mit einer Aminomethylgruppe substituiertes gesättigtes Analogon des PhAc-Restes angesehen werden, der sonst häufig als P4-Rest in die substratanalogen Hemmstoffe eingebaut wurde.⁷⁶

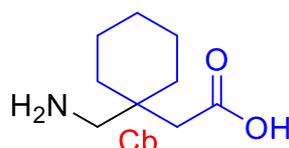


Abbildung 23: Struktur der ungewöhnlichen Aminosäure Gabapentin.

Daher wurden zwei Derivate mit Gabapentin als P4-Rest hergestellt, an einem Derivat wurde die N-terminale Aminogruppe in ein Guanidin überführt. Zusätzlich wurde Gabapentin auch noch C-terminal als P1'-P2'-Mimetikum eingebaut, die Synthese erfolgte mittels Fmoc-SPPS am Rink-Amid-Harz (Tabelle 12).

Tabelle 12: Hemmwirkung der Gabapentin-Derivate mit K_i -Werten für die WNV-Protease und %-Hemmung der DENV-2-Protease bei 125 μ M InhibitorKonzentration (Substratkonzentration 125 μ M, $K_M = 60$ μ M).

Nr.	Inhibitor	WNV-Protease	DENV-2-Protease
		K_i (μ M)	%-Hemmung
40	Gabapentin-Lys-Lys-Arg-NH ₂	55,8	14,1
41	N(Ca)Gabapentin-Lys-Lys-Arg-NH ₂	24,7	n.b.
42	Phac-Lys-Lys-Arg-Gabapentin-NH ₂	>100	13,3

Im Vergleich zum Referenzinhibitor **9** ($K_i = 2,48$ μ M, Tabelle 5) zeigten alle drei Gabapentinderivate nur eine schwache Hemmung beider Proteasen. Im Falle der WNV-Protease wurde nach Überführung der N-terminalen Aminogruppe der Verbindung **40** in ein Guanidin eine um den Faktor 2 verbesserte Hemmung von 24,7 μ M für Inhibitor **41** festgestellt. Der C-terminale Einbau des Gabapentins in Verbindung **42** wird zur Hemmung

der WNV-Protease nicht akzeptiert, die Hemmwirkung auf das DENV-2-Enzym ist vergleichbar wie für die Verbindung **40**.

3.9 Dockingstudien zur Erlangung neuer Inhibitorstrukturen

Mittels computergestützter Methoden können heutzutage Vorhersagen über die Interaktion von Rezeptor/Ligand-Komplexen getroffen werden. Wenn für die Zielenzyme Kristallstrukturen bekannt sind, können Verbindungen aus Datenbanken in das aktive Zentrum gedockt werden. Auf diese Weise können völlig neuartige Startstrukturen für Wirkstoffe identifiziert werden, die in der Folge weiter optimiert werden müssen. Mit Hilfe von Dr. J. Gunera aus der Arbeitsgruppe Kolb unseres Instituts wurden Dockingexperimente mit der WNV-Protease (PDB: 2YOL) durchgeführt. Dafür wurde initial der darin gebundene Inhibitor **1**, der aus den P1 bis P4-Resten besteht, an den Amidbindungen in vier Teile getrennt. Die entstanden Inhibitorfragmente können einzeln betrachtet werden. Da die Phenyllessigsäure ins Lösungsmittel ragt und wahrscheinlich nur dazu dient, den P1-Rest des Inhibitors vom Lösungsmittel abzuschirmen, besteht quasi kein Kontakt zum Enzym. Deswegen wurde nicht nach neuen P4-Resten gesucht und sich nur auf die Bindungsstellen P1-P3 beschränkt. In jede dieser einzelnen Bindungstaschen wurde eine Vielzahl von Verbindungen aus der Zinc12-Datenbank (University of California San Francisco) und der ChemBridge-Datenbank (ChemBridge Corporation San Diego California) gedockt und die Komplexe bewertet. Die einzelnen Fragmente wurden dabei nach ihrer Größe in unterschiedliche Gruppen eingeteilt. Die kleinsten Verbindungen wurden als *probes*, die mittleren als *shards* (<190 Da) und die größten als *building blocks* (Fragmente mit mindestens einer reaktiven chemischen Gruppe) bezeichnet. Nach einem Ranking wurden jeweils die besten 500 Verbindungen visuell auf Lage, Größe und vor allem auf potentielle polare Interaktionen bewertet. Wichtig war zudem, dass sich die infrage kommenden Fragmente bequem mit anderen Strukturen verknüpfen lassen, das heißt, sie sollten idealerweise Amino- oder Carboxylgruppen enthalten.

In Abbildung 24 sind zwei Beispiele für Fragmente gezeigt, die zahlreiche polare Interaktionen in der S3-Bindetasche ausbilden, aber für eine direkte Modifizierung ungeeignet sind. Zum Vergleich ist unter C die Kristallstruktur mit Inhibitor **1** (PDB: 2YOL) gezeigt. Das Hydrazid-Fragment in der Abbildung 24A kann vier polare Interaktionen über die Stickstoffatome und den Carbonyl-Sauerstoff ausbilden, allerdings verfügt das Fragment

sonst nur noch über einen Tetrahydropyranring mit keiner weiteren funktionellen Gruppe. Das 1,4-Benzoxazin-3-on-Fragment in Abbildung 24B besitzt in Position 5 eine bequem modifizierbare Carboxylfunktion, die zwei Wasserstoffbrücken mit Resten der S3-Tasche eingeht, jedoch in Richtung der Enzymoberfläche ausgerichtet ist. Die Modifizierung dieser Carboxylgruppe zu einem substituierten Amid sollte zu einem sterischen Konflikt führen und höchstwahrscheinlich auch den Verlust von mindestens einer Wasserstoffbrücke bewirken.

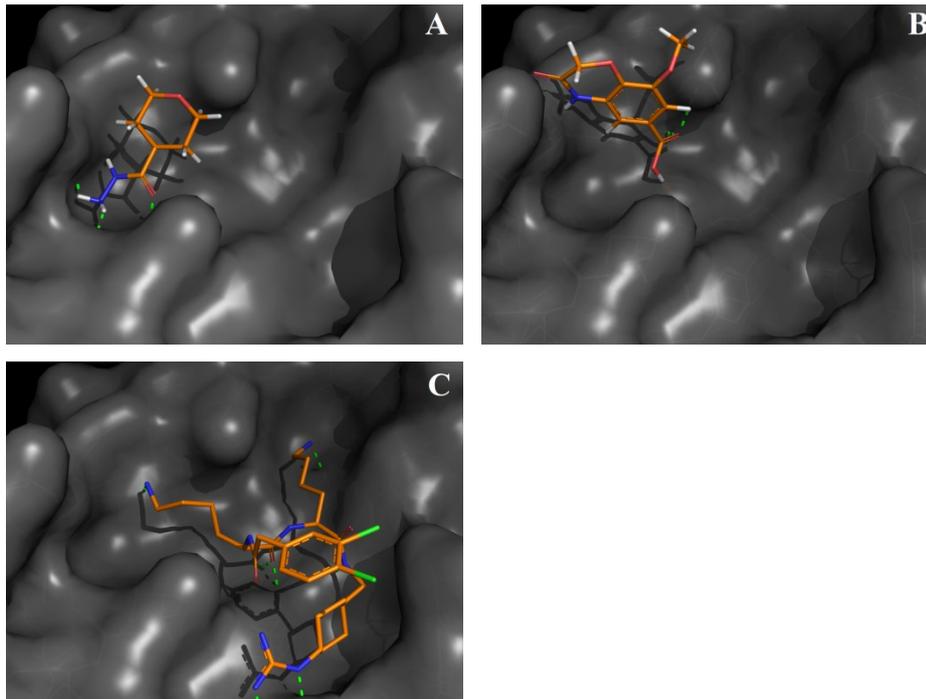


Abbildung 24: Mittels Docking bestimmter Bindungsmodus von zwei Fragmenten der Zinc12-Datenbank in der P3-Tasche (A+B). Zum Vergleich ist in Abbildung 24C die Kristallstruktur des Referenzinhibitors **1** gezeigt (Kohlenstoff orange, Stickstoff blau, Sauerstoff rot und Wasserstoff in weiß, intermolekulare Wechselwirkungen sind grün dargestellt).

Deswegen wurde nach anderen möglichen Fragmenten gesucht, die eine geeignete funktionelle Gruppe zur weiteren Modifizierung besitzen und ähnlich wie der Inhibitor **1** in der Kristallstruktur 2YOL orientiert sind. Das beispielhaft in Abbildung 25 gezeigte 5-Methyl-1,2,4-triazol-methyl-phenylamin-Fragment bindet in die S1-Tasche, zur besseren Vergleichbarkeit des Bindungsmodus wurde es mit dem Inhibitor **1** überlagert. Es wurden vier polare Interaktionen zwischen dem Fragment und dem Enzym gefunden. Am wichtigsten sollten die beiden Wechselwirkungen zum Asp129 sein (Abstände von 2,4 Å und 2,1 Å). Auch die geometrische Ausrichtung ist insgesamt ähnlich zum GCMA-Rest (gezeigt mit Kohlenstoffen in grün). Jedoch gibt es Unterschiede bei der Orientierung der terminalen Aminofunktion. Im Falle des GCMA-Baustein ist sie in Richtung der P2-Bindetasche gerichtet und durch den P2-Lysinrest acylierbar. Das gedockte Fragment müsste sich etwas

drehen, damit die anilinische Aminofunktion in eine vergleichbare Position kommt, die die Amidgruppe im acylierten GCMA-Rest einnimmt. Ein analoges Vorgehen erfolgte auch für die P3-Bindetasche. Es wurden vier geeignete Verbindungen käuflich erworben (Firma ChemBridge Corporation) und am Ende wurden die besten P1- und P3-Reste miteinander kombiniert.

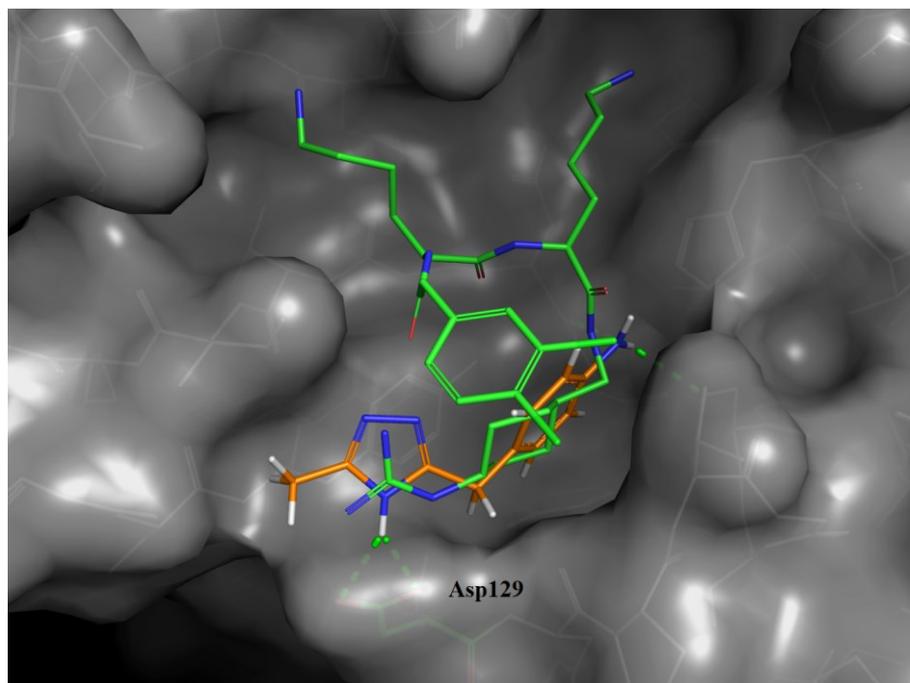
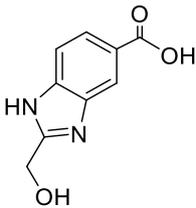
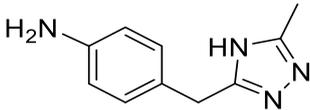
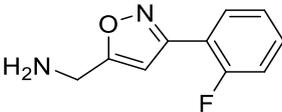
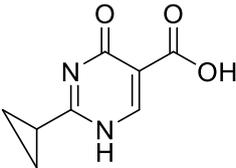


Abbildung 25: Aktives Zentrum der NS2B-NS3 Protease des WNV, unten im Bild mit der S1-Tasche und oben mit den S2- und S3-Taschen. Die Kohlenstoffe des PhAc-Lys-Lys-GCMA sind in grün, die der Verbindung 5-Methyl-1,2,4-triazolmethylphenylamin in orange dargestellt (Stickstoff blau, Sauerstoff rot und Wasserstoff in weiß).

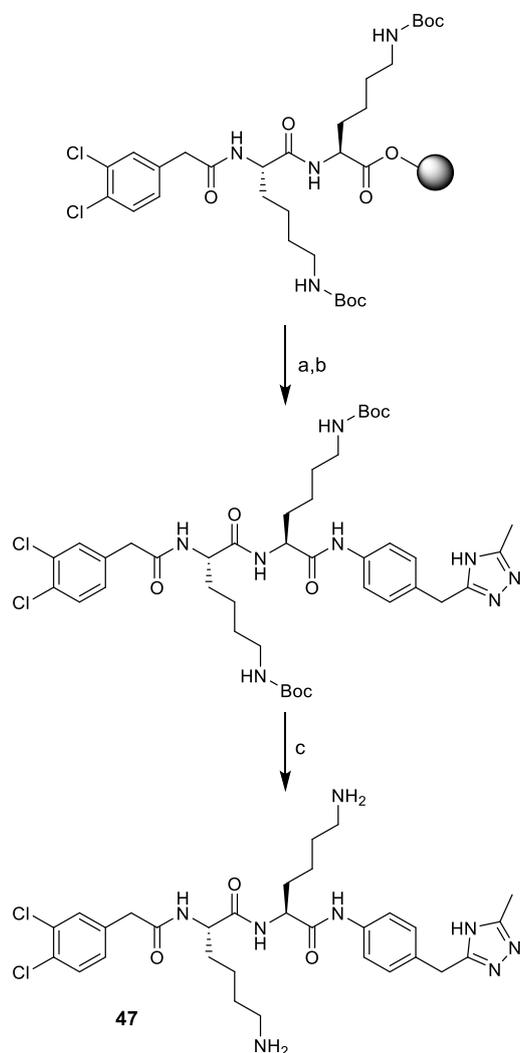
Die ausgewählten Fragmente (die Derivate **43** und **46** wurden als potentielle P3-Fragmente identifiziert und die Verbindungen **44** und **45** als P1-Gruppen) wurden unter Standardbedingungen vermessen, jedoch war zum Lösen der Verbindungen der Zusatz von 2 % DMSO notwendig. Im Vergleich zur Kontrolle ohne DMSO wurde unter diesen Bedingungen bereits eine schwache Hemmung von ca. 6 % festgestellt. Zwei Bausteine zeigten eine signifikante Hemmwirkung, im Falle der 2-Hydroxymethylbenzimidazolcarbonsäure **43** von 17 % und für das 5-Methyl-1,2,4-triazolmethylphenylamin **44** von 12 % (jeweils bei einer Konzentration von 625 μM im Ansatz, Tabelle 13). Diese bestimmten Werte wurden bereits um 6 % reduziert, um den Einfluss des DMSO auf die Hemmwirkung zu berücksichtigen. Jedoch gibt es keinen experimentellen Beweis, dass diese beiden Fragmente auch tatsächlich entsprechend dem vorhergesagten Bindungsmodus hemmen.

Tabelle 13: Hemmwirkung der erworbenen Fragmente bei einer Inhibitorkonzentration von 625 μM im Messansatz. Im Gegensatz zu den zuvor durchgeführten Messungen waren im Messansatz 2 % DMSO enthalten. Daher wurde die prozentuale Hemmwirkung dieser Fragmente auf Kontrollmessungen mit 2 % DMSO im Messansatz bezogen.

Nr.	Fragmente	%-Hemmung der WNV-Protease
43		17 %
44		12 %
45		1 %
46		2 %

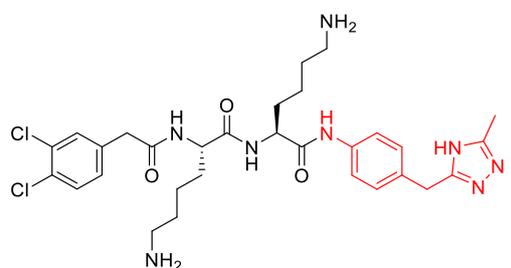
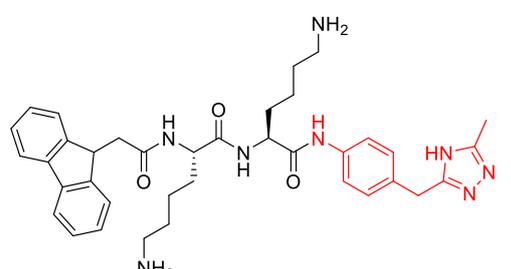
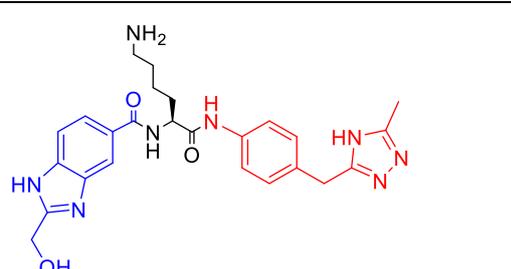
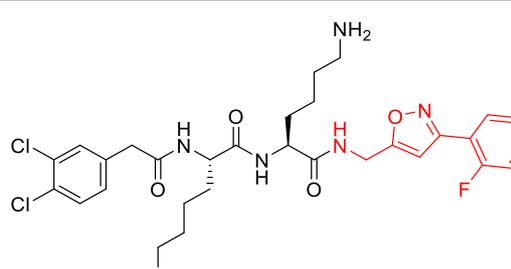
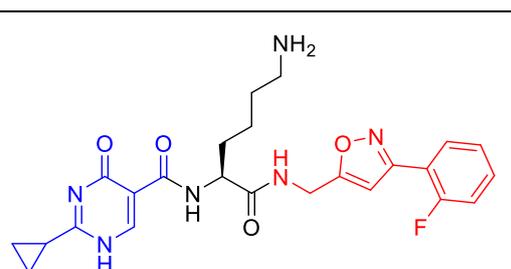
Anschließend wurde versucht, die potentiellen P1-Fragmente **44** und **45** (in Tabelle 14 rot markiert) an bekannte P4-P2-Segmente zu koppeln. Zusätzlich wurden einige P1-Gruppen an Lys in P2-Position gekuppelt und diese Segmente und einem möglichen P3-Fragment (**43** oder **46**, in Tabelle 14 blau markiert) verknüpft. Die Synthese der in Tabelle 14 zusammengefassten Hemmstoffe erfolgte ausgehend vom P2-Rest am 2-Cl-Triptyl-Chlorid-Harz. Mittels Fmoc-SPPS unter Standardbedingungen erfolgte die Kupplung der weiteren N-terminalen Reste. Anschließend wurde das Peptid unter Erhalt der Schutzgruppen mild sauer vom Harz abgespalten und der entsprechende P1-Rest in Lösung mit BOP gekuppelt. Im

finalen Schritt wurden die restlichen Schutzgruppen abgespalten und das Peptid in Diethylether gefällt. Nach präparativer HPLC und nachfolgender Lyophilisation wurden die entsprechenden TFA-Salze erhalten (Tabelle 14).



Schema 9: Synthese des Derivats 47. Reagenzien und Bedingungen : (a) Abspaltung des Peptids vom Harz mit 1% TFA in DCM für 3 × 5 min. (b) Kupplung des P1-Fragments in Lösung mit BOP + DIPEA. (c) 95 % TFA, 2,5 % TIS und 2,5 % H₂O (v/v/v) für 2 h.

Tabelle 14: Hemmwirkung der Inhibitoren mit den aus Dockingstudien bestimmten Fragmenten (n = 3). Die aus dem Datenbankscreening identifizierten P1-Fragmente sind in rot und die P3-Fragmente in blau markiert.

Nummer	Sequenz	WNV-Protease
		K_i (μM)
47		78,8
48		60,4
49		>200
50		89,7
51		>200

Zwei der fünf Verbindungen (**49** und **51**), in die gleichzeitig die P3- und P1-Fragmente eingebaut wurden, zeigen eine vernachlässigbare Wirksamkeit (Hemmkonstante $> 200 \mu\text{M}$). Offenbar ist das P3-Fragment in Verbindung **49**, obwohl es allein die stärkste Hemmung der geprüften Fragmente zeigte (Tabelle 13), nicht geeignet, um direkt an das P2-Lysin gekuppelt zu werden. Die anderen drei Inhibitoren, bei denen nur die identifizierten P1-Fragmente eingebaut wurden, zeigen zumindest eine schwache Hemmung im zweistellig mikromolaren Bereich. Für die Verbindungen mit dem 5-Methyl-1,2,4-triazol-methyl-phenylamin in P1-Position (Verbindung **47**) wurde eine marginal stärkere Hemmung im Vergleich zu Inhibitor **50** mit dem 2-Fluorophenyl-5-isoxazol-methylamin festgestellt.

3.10 Synthese weiterer zyklischer Inhibitoren

Aus natürlichen Ressourcen konnten in der Vergangenheit viele zyklische biologisch-aktive Substanzen isoliert werden. Das Immunsuppressivum Cyclosporin oder das Polypeptid-antibiotikum Bacitracin sind Beispiele für solche natürlich vorkommende zyklische Verbindungen. Durch eine Zyklisierung kommt es zu einer Konformationsstabilisierung und die Verbindungen werden rigider. Wenn durch die Zyklisierung die korrekte Bindungskonformation stabilisiert wird, kann die Affinität zum Target erhöht werden. Ein weiterer Vorteil zyklischer peptidischer Verbindungen liegt auch in ihrer erhöhten Stabilität, da ihr proteolytischer Abbau in der Regel erschwert ist. Der Inhibitor **1** nimmt im Komplex mit der WNV-Protease (PDB: 2YOL) eine hufeisenförmige Konformation ein. Dadurch kommt der P4-Rest räumlich in die Nähe der P1-Gruppe, wobei das P4-Carbonyl direkt mit dem P1-Guanidin interagiert (Abbildung 26).

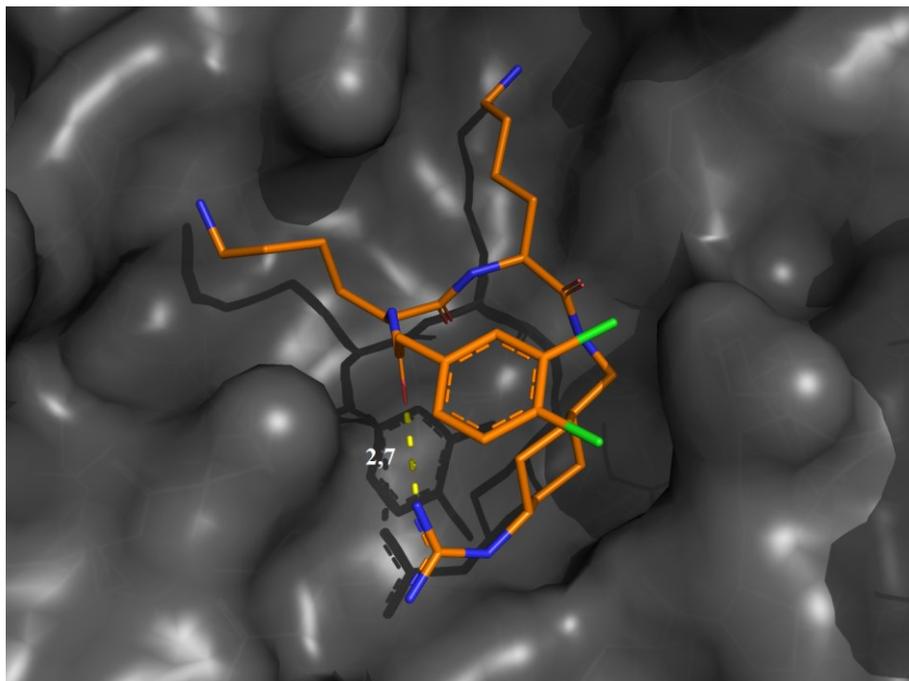


Abbildung 26: Bindung des Inhibitors **1** im aktiven Zentrum der WNV-Protease (PDB: 2YOL). In gelb ist der Abstand zwischen dem P4-Carbonylsauerstoff und der Guanidinogruppe des P1-Restes eingezeichnet (2,7 Å). Die Kohlenstoffe sind in orange, Sauerstoffe in rot, Stickstoffe in blau und die Chloratome in grün eingefärbt.

Daher sollten zusätzlich zu den bereits zuvor im Abschnitt 3.5 beschriebenen größeren und potentiell zellpenetrierenden Inhibitoren, weitere kleinere, zyklische Verbindungen hergestellt werden. Aus früheren Arbeiten zur Entwicklung von peptidischen Hemmstoffen mit von Aminosäuren abgeleiteten Aldehydderivaten in P1-Position war bekannt, dass neben Arginal trotz leicht reduzierter Hemmwirkung interessanterweise auch die nichtbasischen Aldehyde des Alanins und Tryptophans als P1-Rest akzeptiert werden.⁶⁵ Daher wurden die in Tabelle 15 zusammengefassten zyklischen Verbindungen hergestellt, obwohl diese keinen basischen P1-Rest mehr besitzen.

Die fünf hergestellten Verbindungen unterscheiden sich in dem für die P1-Position genutzten Diamin (in Tabelle 15 in blau) und dem verwendeten Bernsteinsäure- oder Glutarsäurelinker (in Tabelle 15 in rot).

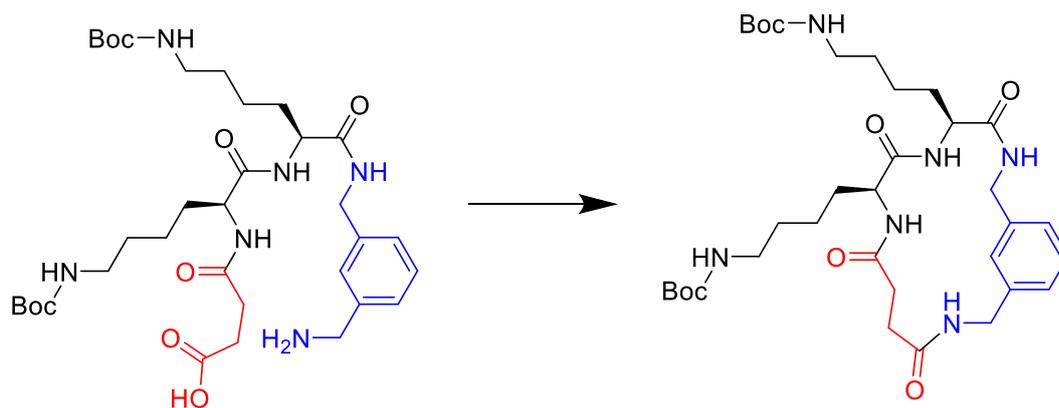
Tabelle 15: Hemmwirkung der synthetisierten zyklischen Inhibitoren mit den bestimmten K_i -Werten für die WNV- und der prozentualen Hemmung für die DENV-2-Protease (Inhibitorkonzentration von 125 μM im Ansatz) ($n = 3$).

Nr.	Struktur	WNV-Protease K_i (μM)	DENV-2-Protease %-Hemmung
52		>200	11,3
53		>200	11,3
54		81,4	26,1
55		28,8	16,5
56		>100	21,7

Die zyklischen Verbindungen **52-56** sind nur sehr schwache oder praktisch keine Hemmstoffe der WNV-Protease. Lediglich die Verbindung **55** zeigt mit einem K_i -Wert von 28,8 μM eine gewisse Wirksamkeit, während das um eine Methylengruppe verlängerte Derivat **56** deutlich schwächer inhibiert. Daher wurde auf eine weitere Verlängerung des Linkers verzichtet. Die Ursachen für die Hemmunterschiede zwischen diesen beiden Verbindungen **55** und **56** sind unbekannt. Der Grund für die generell recht schwache Inhibierung ist jedoch vermutlich auf den durch die Zyklisierung bedingten Verlust der Basizität in P1-Position zurückzuführen. Ebenso fehlt durch den Einbau des Succinyl- oder Glutarylrestes der im Ausgangsinhibitor **1** vorhandene Phenylring in P4-Position, der ebenfalls zur Hemmwirkung beiträgt. Bei der DENV-2-Protease zeigen die Inhibitoren **54** und **56** mit > 20 % die stärkste prozentuale Inhibierung. Unter Berücksichtigung der verwendeten Inhibitor- und Substratkonzentrationen und dem bekannten K_M - und V_{\max} -Werten kann für die bestimmten 26 % Hemmung der Verbindung **54** ein ungefährer K_i -Wert von ca. 240 μM für das DENV-Enzym berechnet werden. Demzufolge sind diese zyklischen Verbindungen auch vernachlässigbare Hemmstoffe der DENV-Protease.

3.10.1 Synthese der zyklischen Inhibitoren

Die Synthese wurde am Tritylchlorid-Harz durchgeführt. Nachdem das Harz mit einem Diamin beladen wurde, wurde mittels Fmoc-SPPS nach einem Standardprotokoll die Peptidkette aufgebaut. An den P3-Lys(Boc)-Rest wurde als letzter Baustein Glutarsäureanhydrid oder Bernsteinsäureanhydrid im vierfachen Überschuss gekuppelt. Danach wurde das Peptid unter Erhalt der Seitenkettenschutzgruppen mild sauer vom Harz abgespalten und das erhaltene Rohprodukt ohne weitere Reinigung mittels BOP/DIPEA zyklisiert. Da die Zyklisierung bei der Synthese dieser Verbindungen der kritische Schritt ist, sind in Abbildung 27 beispielhaft die HPLC-Chromatogramme für das Edukt und die Umsetzung zur seitenkettengeschützten, zyklischen Vorstufe des Inhibitors **52** gezeigt.



grüne Spur im HPLC-Chromatogramm

schwarze Spur im HPLC-Chromatogramm

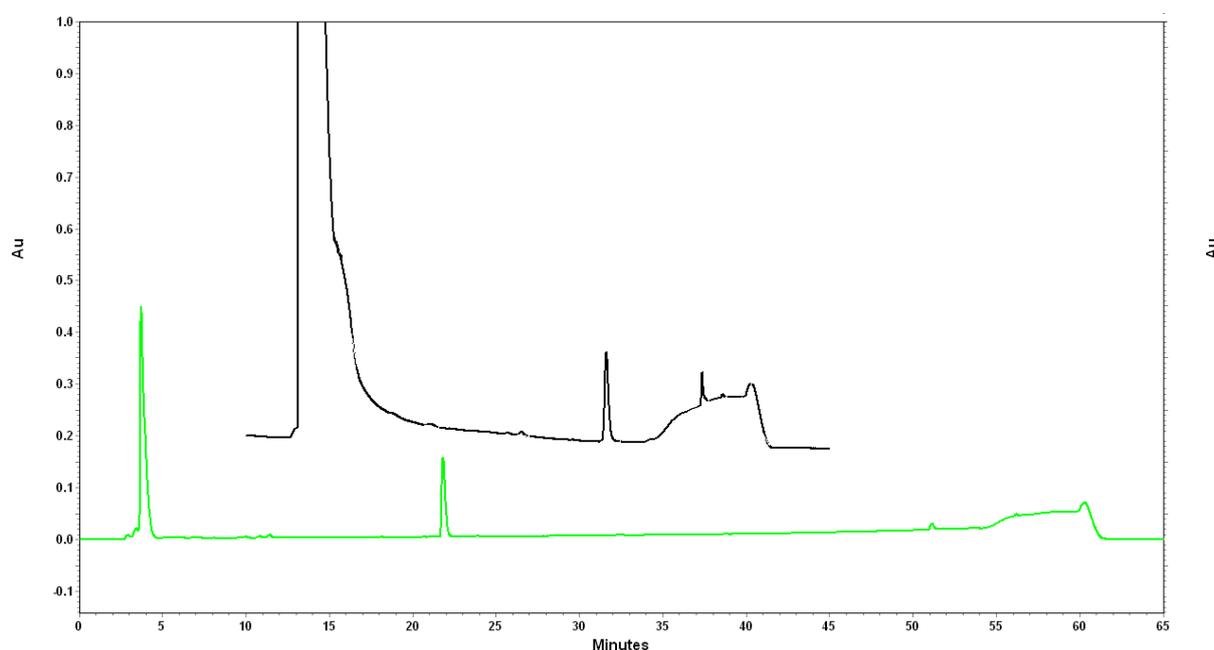


Abbildung 27: Zyklisierungsreaktion und HPLC-Chromatogramm des Ausgangsstoffs Succinyl-Lys(Boc)-Lys(Boc)-m-Xylylendiamin (m-Xda) (in grün, Start bei 20 % LM B) und der zyklischen seitenkettengeschützten Vorstufe des Inhibitors **52** (in schwarz, Start bei 30 % LM B). Beide Messungen erfolgten mit einem Standardgradienten (Zunahme LM B von 1 %/min). Aufgrund der unterschiedlichen Startbedingungen, ist das Chromatogramm für die Zyklisierungsreaktion um 10 min auf der Abszisse verschoben, das Edukt eluiert dementsprechend bei 41,82 % LM B und das zyklische Produkt bei 51,62 % LM B. Durch die Zyklisierung nimmt die Hydrophobizität des Produktes im Vergleich zum Edukt deutlich zu. Der große initiale Peak bei der Zyklisierungsreaktion ist durch das im Ansatz enthaltene DMF verursacht.

Nach der Zyklisierung wurden die beiden Boc-Schutzgruppen unter stark sauren Bedingungen abgespalten, die Rohpeptide mit Diethylether gefällt und die Produkte mittels präparativer HPLC gereinigt und als lyophilisierte TFA-Salze erhalten.

3.11 Einbau eines P1-P1'-Diaminoaceton-Bausteins

Neben den bereits beschriebenen Ketonderivaten wurde versucht, einen kommerziell erhältlichen 1,3-Diaminoaceton-Baustein als P1-P1'-Segment einzubauen, der eine C-terminale Verlängerung der Verbindungen gestatten sollte.^{118, 119} Jedoch kommt es dadurch zum Verlust der basischen P1-Seitenkette. Aufgrund des symmetrischen Aufbaus sollte ursprünglich das Diaminoaceton an ein 2-CTC-Harz gekuppelt und anschließend das zuvor hergestellte N-terminale Phac-Lys(Boc)-Lys(Boc)-OH als P4-P2-Segment gekuppelt werden. Nach mild-saurer Harzabspaltung sollte eine C-terminale Verlängerung möglich sein, um weitere potentielle Bindungsregionen zu adressieren. Es war jedoch nicht möglich, das Diaminoaceton in einem geeigneten wasserfreien Solvent für die initiale Beladung des Tritylharzes zu lösen.

Daher wurde das 1,3-Diaminoaceton in einer geringen Menge Wasser mit in DMF gelösten Peptidsegmenten mittels HATU gekuppelt, das einen gewissen Anteil von Wasser toleriert. Auf diese Weise wurden die symmetrischen Inhibitoren **57** und **58** erhalten, die entweder Lys oder Arg in P2-Position enthalten (Tabelle 16).

Aufgrund der schwachen Hemmwirkung der Inhibitoren und der Tatsache, dass nur symmetrische Strukturen möglich waren, wurde auf die Synthese weiterer Derivate verzichtet. Zumindest Inhibitor **57** zeigt eine Hemmwirkung der WNV-Protease im zweistellig mikromolaren Bereich, während Inhibitor **58** praktisch unwirksam ist (Tabelle 16).

Tabelle 16: Hemmung durch symmetrische Inhibitoren mit dem 1,3-Diaminoaceton als zentralen Baustein. Die Messungen mit dem DENV-2-Enzym erfolgten bei einer Inhibitorkonzentration von 125 μM und einer Substratkonzentration von 125 μM ($K_M = 60 \mu\text{M}$) ($n = 3$)

Nummer	Sequenz	WNV-Protease K_i (μM)	DENV-2-Protease %-Hemmung
57	(PhAc-Lys-Lys) ₂ -Diamidoaceton	61,77	12,4
58	(PhAc-Lys-Arg) ₂ -Diamidoaceton	>100	8,5

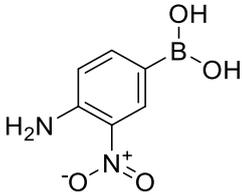
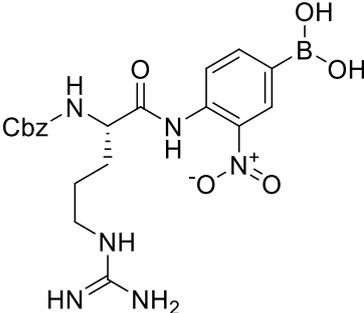
Die Synthese dieser beiden Inhibitoren verlief in zwei Schritten. Zunächst wurde am 2-CTC-Harz die entsprechende Peptidsequenz aufgebaut und anschließend unter mild sauren Bedingungen vom Harz abgespalten (z.B. PhAc-Lys(Boc)-Lys(Boc)-OH). Zwei Äquivalente dieses Segments konnten dann mit einem Äquivalent 1,3-Diaminoaceton und zwei

Äquivalenten HATU in DMF gekuppelt werden, wobei das 1,3-Diaminoaceton vorher nicht in DMF sondern in möglichst wenig Wasser gelöst wurde. Das Kupplungsreagenz HATU toleriert folglich kleine Mengen an Wasser, die Knüpfung der Amidbindung war unter diesen Bedingungen möglich. Jedoch kam es bei dieser Kupplung zu einer Racemisierung, das erhaltene racemische Gemisch des Inhibitors **58** konnte nicht komplett getrennt werden.

3.12 Boronsäuren als Inhibitoren WNV-NS2B-NS3-Protease

Es ist seit langem bekannt, dass substratanaloge Boroarginin-Derivate als wirksame Hemmstoffe der DENV-2-NS2B-NS3-Protease geeignet sind, für die Verbindung Bz-Nle-Lys-Arg-boroArg wurde ein K_i -Wert von 0,043 μM bestimmt. Die starke Hemmwirkung kommt durch die Ausbildung eines kovalent gebundenen, tetrahedralen Intermediates zwischen dem Serinrest der Protease und der trigonalen Boronsäure des Inhibitors zustande.¹¹⁰ Vor kurzem wurde eine Kristallstruktur eines Boroarginin-Derivats im Komplex mit der WNV-Protease bestimmt.⁶⁸ Interessanterweise wurde in der Kristallstruktur festgestellt, dass neben dem Ser135-Rest der Protease ein Glycerol-Molekül aus dem Kristallisationsansatz an die Boronsäure gebunden hat. Daher sollte im Rahmen dieser Arbeit ein modifizierbares Boronsäure-Fragment, das nicht von Aminosäuren abgeleitet ist, auf seine prinzipielle Hemmwirkung auf die WNV-Protease untersucht werden. Zur Synthese wurde der kommerziell erhältliche Baustein 4-Amino-3-nitrophenylboronsäurepinacolester eingesetzt. Die Pinacolschutzgruppe wurde initial mit TFA abgespalten, das erhaltene Produkt 4-Amino-3-nitrophenylboronsäure (**59**) inhibiert die WNV-Protease mit einem K_i -Wert von 102 μM (Tabelle 17). Anschließend wurde freies Cbz-Arg-OH mit Phosphorylchlorid in Pyridin an die Aminofunktion der Boronsäure gekuppelt.^{120, 121} Die erhaltene Verbindung Cbz-Arg-4-amino-3-nitrophenylboronsäure (**60**) besitzt einen nahezu identischen K_i -Wert von 103 μM (Tabelle 17).

Tabelle 17: Hemmwirkung der Boronsäurederivate (n = 3).

Nr.	Struktur	WNV-Protease
		K_i (μM)
59		102
60		103

Anschließend sollte die Nitrogruppe der Verbindung **60** zum Amin reduziert werden, um die Struktur weiter zu modifizieren. Die Reduktion wurde in Eisessig unter Zugabe eines Überschusses an Zinkpulver durchgeführt. Nachdem das Zink abfiltriert und die Essigsäure *in vacuo* entfernt wurde, wurde in einer initialen Messung mit der Rohsubstanz eine überraschend wirksame Hemmwirkung von ca. 6 μM bestimmt. Im NMR-Spektrum wurden verglichen mit der eingesetzten Menge nur sehr schwache Signale erhalten, und im Massenspektrum wurde die gesuchte Masse nur mit sehr geringer Intensität neben vielen weiteren Signalen gefunden. Aufgrund der zu hohen Rohausbeute war auch klar, dass im Rohprodukt eine Verunreinigung enthalten sein musste. Da für die Reduktion des Ausgangsstoffs nur Zink und Eisessig genutzt wurde, wurde vermutet, dass es sich dabei um Zinkacetat handeln könnte. Um diese Vermutung zu bestätigen, wurde die Hemmwirkung von reinem Zinkacetat bestimmt.

3.13 Hemmung der WNV-Protease durch Zinkionen

Nachdem bei der Synthese der Boronsäureinhibitoren die Vermutung aufgekommen war, dass Zinkacetat ein Hemmstoff für die NS2-NS3-WNV-Protease sein könnte, wurde es enzymkinetisch genauer vermessen. Im gewählten Konzentrationsbereich wurde in einem ersten Vorversuch eine lineare Abhängigkeit bei der Auftragung nach Dixon erhalten.¹²² Der Schnittpunkt der beiden Geraden deutet auf eine Hemmkonstante für die Inhibierung der WNV-Protease von 31 μM hin (Abbildung 28). Jedoch lag der Schnittpunkt relativ nah an der Abszisse und der Y-Wert des Schnittpunktes passte nicht perfekt zu dem bestimmten Wert für den Ausdruck $1/V_{\text{max}}$. Dies deutete darauf hin, dass die Hemmung der WNV-Protease durch Zinkionen nicht nach einem reinen kompetitiv-reversiblen Hemmmechanismus erfolgt.

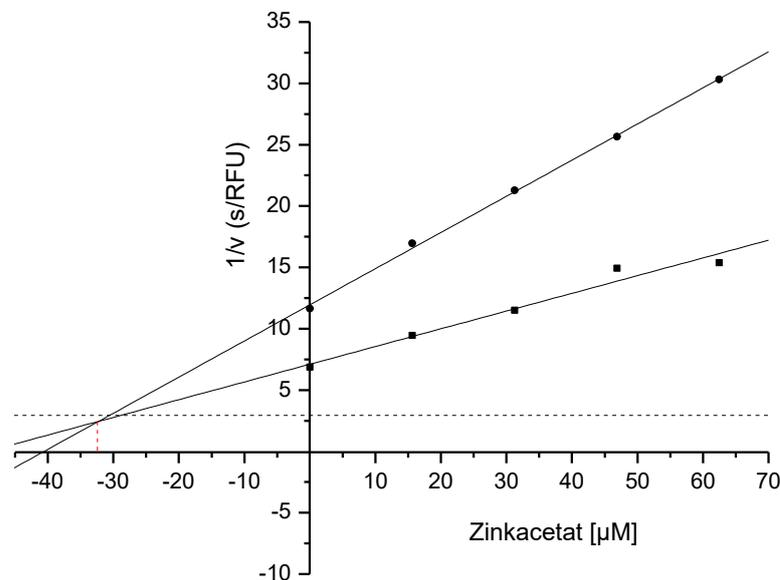


Abbildung 28: Hemmung der WNV-Protease durch Zinkacetat. Für die Messungen wurde das Substrat MI-0624 (PhAc-Leu-Lys-Lys-Arg-AMC) in den Konzentrationen 100 (■) und 50 (●) μM verwendet. Dixon-Auftragung der Messwerte; die gestrichelte Linie entspricht $1/V_{\text{max}}$, der Wert wurde parallel auf der identischen Mikrotiterplatte in Abwesenheit des Zinksalzes bestimmt.

Da der Hemmmechanismus unklar war, wurde anschließend der IC_{50} -Wert bestimmt. Die Messdaten wurden an Formel 2 angepasst, es wurde ein zum K_i -vergleichbarer IC_{50} -Wert von 30,6 μM erhalten (Abbildung 29), was zusätzlich auf einen nichtkompetitiven Hemmmechanismus hindeutet.¹²³

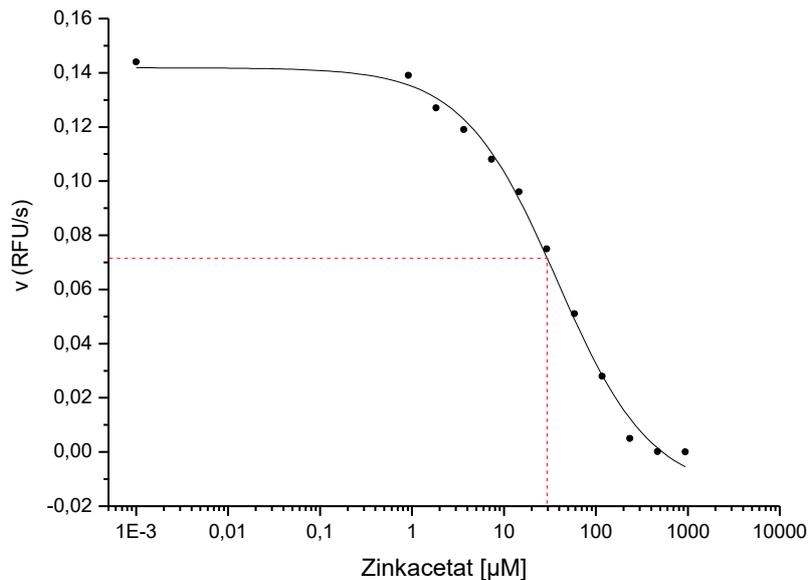


Abbildung 29: Hemmung der WNV NS2B-NS3-Protease durch Zinkacetat. Die Messdaten wurden an Formel 2 angepasst. Als Substrat wurde MI-0624 (PhAc-Leu-Lys-Lys-Arg-AMC) in einer Konzentration von 100 µM genutzt.

Um zu bestätigen, dass die Hemmung durch die Zinkionen und nicht durch Acetat verursacht wird, wurden anschließend verschiedene Zinksalze und noch weitere Salze mit anderen Metallionen untersucht. Um den Messaufwand zu reduzieren wurde im Rahmen dieses Screenings nur die Restaktivität der WNV-Protease bei zwei verschiedenen Salzkonzentrationen (125 µM und 62,5 µM) und konstanter Substratkonzentration (100 µM MI-624) im Messansatz bestimmt (Abbildung 30). Es zeigte sich, dass die Metallionen Co^{2+} , Na^+ , Fe^{2+} , Fe^{3+} , Cu^{2+} , Ca^{2+} , Mn^{2+} keine nennenswerte Hemmung bewirken, während durch die zwei Ni^{2+} -Salze: Nickelacetat und Nickelchlorid zumindest in der höheren Konzentration eine 25 %ige Hemmung resultiert (Restaktivitäten ca. 75 %). Für alle drei Zinksalze (Zinkacetat, Zinkchlorid und Zinknitrat) wurde eine vergleichbare Hemmwirkung festgestellt, die im Falle der höheren Konzentration bei ca. 80 % liegt (Abbildung 30). Somit wurde die Vermutung bestätigt, dass die Hemmwirkung nur durch die Zinkionen verursacht wird und unabhängig von der Art des Anions ist. Überraschenderweise wurde auch eine nahezu vollständige Hemmung durch Zinn(II)chlorid bei der höheren Salzkonzentration festgestellt. Unerklärlicherweise fällt die Hemmwirkung bei der niedrigeren Konzentration im Vergleich zu den Zinksalzen viel stärker ab und beträgt nur noch 25 %. Der Versuch das Zinn(II)-Salz enzymkinetisch genauer zu vermessen führte zu nicht auswertbaren Dixon- und IC_{50} -Plots (Daten nicht gezeigt). Bei niedriger Salzkonzentration ist die Hemmwirkung relativ gering und nimmt ab einer gewissen Konzentration sehr drastisch auf fast 100 % zu. Die Ursachen für dieses ungewöhnliche Verhalten sind unklar. Zinn(II)-chlorid wird jedoch in der

Synthesechemie häufig als reduzierendes Agens eingesetzt, denkbar wäre demzufolge auch eine direkte Modifizierung des Enzyms, die bei höherer Salzkonzentration zu einer signifikanten Hemmung führt.

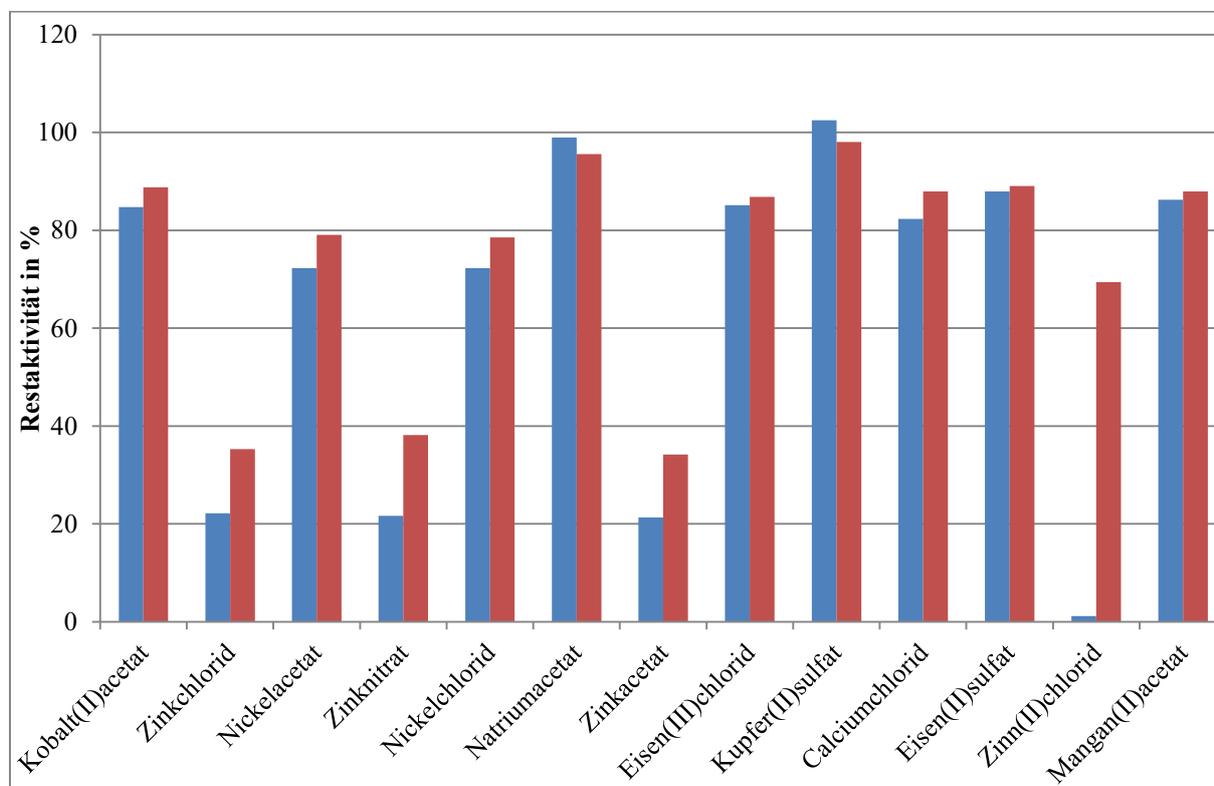


Abbildung 30: Restaktivität der WNV-Protease in Gegenwart verschiedener Metallsalze bei einer Konzentration von 125 µM (blau) oder 62,5 µM (rot). Die Messungen erfolgten bei einer Konzentration des Substrates MI-624 (PhAc-Leu-Lys-Lys-Arg-AMC) von 100 µM im Messansatz

3.13.1 Hemmung durch Zinkionen in Gegenwart von EDTA

Um nochmals zu bestätigen, dass die beobachtete Hemmung tatsächlich durch Zinkionen zustande kommt, wurden zusätzliche Messungen in Gegenwart des Komplexbildners EDTA durchgeführt. Zur Kontrolle wurde zuerst EDTA allein mit der WNV-Protease vermessen um zu prüfen, ob der Ligand selbst bereits eine Hemmwirkung zeigt. Dies war jedoch nicht der Fall (Beeinflussung der Enzymaktivität $< \pm 2\%$ bei den untersuchten EDTA-Konzentrationen von 62,5 µM und 6,25 µM) (Tabelle 18). Als nächstes wurde reines Zinkacetat unter analogen Bedingungen in Konzentrationen von 62,5 µM und 6,25 µM mit der WNV-Protease vermessen. Dies führte wieder zu einer ähnlichen Hemmung von ca. 80 % und 55 %, wie bereits in Abbildung 30 gezeigt. Im Gegensatz dazu wurde bei gemeinsamer EDTA und Zinkacetat-Zugabe (jeweils 62,5 µM im Messansatz) eine signifikant abgeschwächte

Hemmwirkung von 12,7 % festgestellt. Dieser Versuch bestätigt, dass die Hemmwirkung durch die Zinkionen verursacht wird (Tabelle 18).

Tabelle 18: Hemmung der WNV-Protease (in %) durch Zinkionen und EDTA allein und in Kombination. Als Substrat wurde MI-0624 (PhAc-Leu-Lys-Lys-Arg-AMC) in einer Konzentration von 100 μM genutzt.

	EDTA		Zinkacetat		EDTA + Zinkacetat
Konzentration [μM]	62,5	6,25	62,5	6,25	jeweils 62,5
Hemmung [%]	1,6	2,2	81,1	55,08	12,07

3.13.2 Effekt der Zinksalze auf die DENV-2 NS2B-NS3-Protease

Zusätzlich zu den bisherigen Tests wurde geprüft, ob die bereits zuvor verwendeten Metallsalze auch einen Effekt auf die NS2B-NS3-Protease des DENV-2 haben (Abbildung 31).

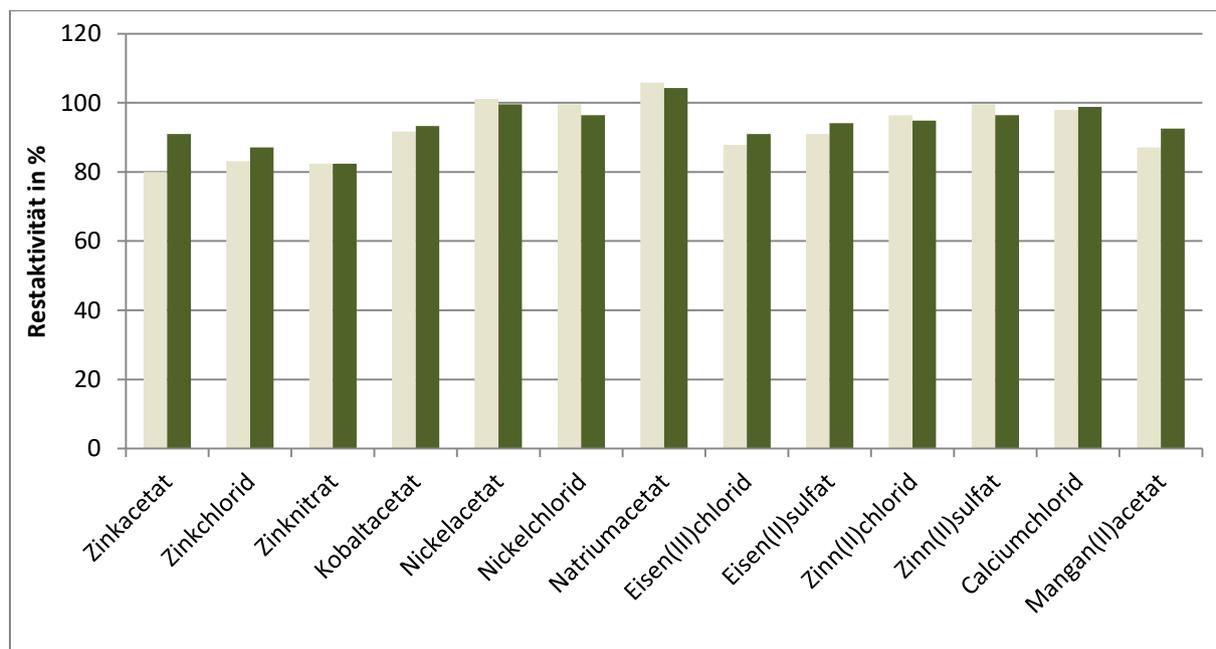


Abbildung 31: Restaktivität der DENV-2-Protease in Gegenwart verschiedener Metallsalze bei einer Konzentration von 125 μM (hellgrün) oder 62,5 μM (dunkelgrün). Die Messungen erfolgten bei einer Konzentration des Substrates MI-0084 (Phac-Lys-Arg-Arg-AMC) von 125 μM .

Bei den eingesetzten Konzentrationen der Zinksalze wurde im Gegensatz zum Effekt auf das WNV-Enzym keine signifikante Hemmwirkung auf die DENV-2-Protease festgestellt ($\leq 20\%$). Die anderen geprüften Salze zeigten eine noch schwächere Hemmung ($\leq 10\%$).

Offenbar gibt es strukturelle Unterschiede zwischen den beiden untersuchten NS2B-NS3-Proteasen, sodass nur das WNV-Enzym durch Zinkionen effektiv gehemmt wird.

3.13.3 Lineweaver-Burk-Plot mit Zinkacetat als Inhibitor

Um den Bindungsmodus eines Inhibitors zu ermitteln, können die Messdaten in Form des doppelt reziproken Lineweaver-Burk-Plots aufgetragen werden. Dazu wurden Messungen mit der WNV-Protease bei vier verschiedenen Substrat- und drei Zinkacetatkonzentrationen durchgeführt. Als Kontrolle erfolgte eine Messung in Abwesenheit des Zink-Salzes (Abbildung 32). Nach Auftragung der Messdaten wurden vier Geraden mit leicht variierenden Schnittpunkten im 2. Quadranten erhalten. Auch wenn die Geraden sich nicht perfekt schneiden, deutet dieses Ergebnis darauf hin, dass es sich nicht um einen kompetitiven Hemmmechanismus handeln kann, da in diesem Fall der Schnittpunkt aller Geraden direkt auf der Ordinate bei einem konstanten Wert für $1/V_{\max}$ liegen müsste. Liegt der Schnittpunkt der Geraden auf der Y-Achse so handelt es sich um einen kompetitiven Inhibitor, das bedeutet Substrat und Inhibitor konkurrieren um dieselbe Bindungsstelle. Sind die Geraden parallel zu einander handelt es sich um den unkompetitiven Bindungstyp, bei diesem bindet der Inhibitor nur an dem Enzym-Substrat-Komplex und nicht an das freie Enzym. Die Messergebnisse deuten darauf hin, dass eher ein gemischt nichtkompetitiver Bindungsmodus vorliegt, bei dem die Zinkionen sowohl an das freie Enzym als auch an den Enzym-Substrat-Komplex (ES-Komplex) mit unterschiedlicher Affinität binden können. Die Bindung an das freie Enzym wird durch die Gleichgewichtskonstante K_i beschrieben, die an den Enzym-Substrat-Komplex durch den Term $\alpha \cdot K_i$. Bei einem reinen nichtkompetitiven Inhibitor bindet der Inhibitor gleich stark an das Enzym oder den ES-Komplex, in diesem Spezialfall ist $\alpha = 1$ und der Schnittpunkt liegt direkt auf der Abszisse. Liegt der Schnittpunkt unterhalb der X-Achse, dann ist $\alpha < 1$ und das würde bedeuten, dass der Inhibitor stärker an den Enzym-Substrat-Komplex bindet als an das freie Enzym. Ist der Schnittpunkt dagegen oberhalb der X-Achse ($\alpha > 1$), wie im vorliegenden Fall, bindet der Inhibitor stärker an das freie Enzym als an den ES-Komplex.¹²⁴

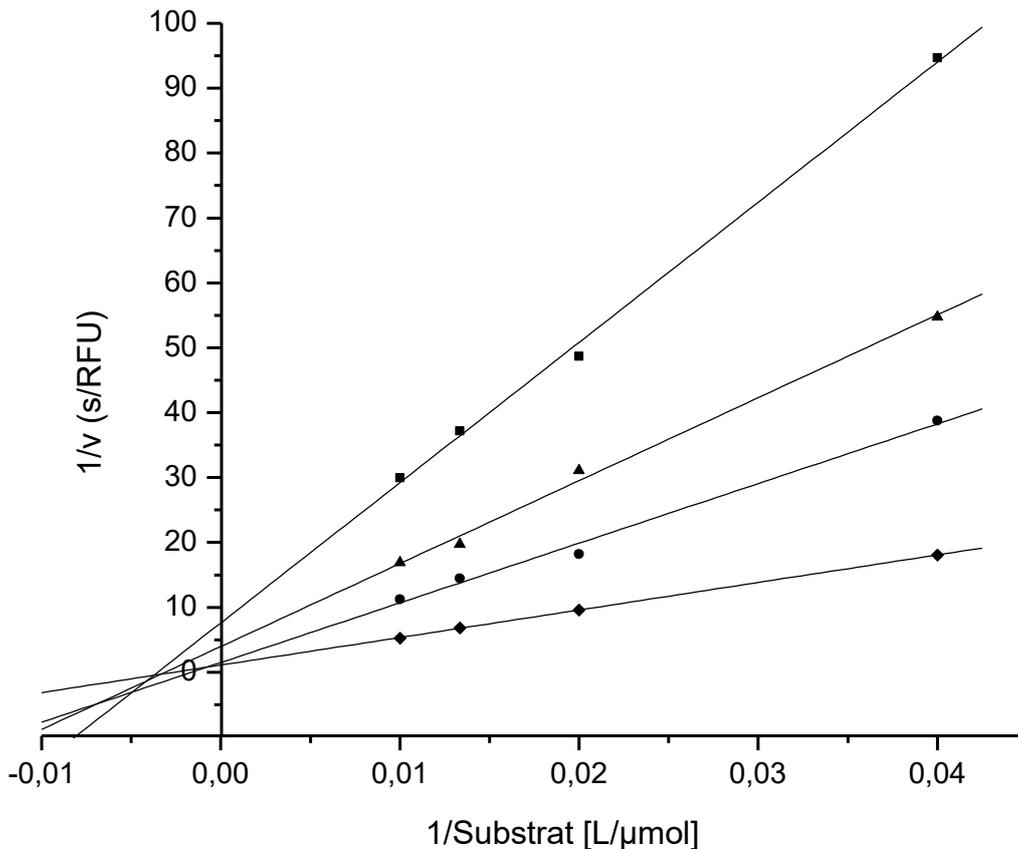


Abbildung 32: Doppelt reziproke Lineweaver-Burk-Auftragung der Hemmung der WNV-Protease durch Zinkacetat. Die Messungen erfolgten bei vier Konzentrationen des Substrates MI-624 mit drei verschiedenen Zinkacetat-Konzentrationen von 125 μM (■), 62,5 μM (▲) und 31,25 μM (●) sowie zur Kontrolle in Abwesenheit des Salzes (◆).

3.13.4 Modellierung der möglichen Zink-Bindungsstelle

Wie zuvor erläutert, handelt es sich bei den Zinkionen wahrscheinlich um einen gemischt nichtkompetitiven Inhibitor der WNV-Protease mit einer Hemmkonstante um ca. 30 μM . Jedoch ist unklar, wo genau die Zinkionen an das Enzym binden könnten. Zur Bestimmung möglicher Bindungsbereiche wurde ein Webserverdienst zur Protein-Metallion-Wechselwirkungsvorhersage der University College London genutzt^{125, 126} (<http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/structure/>). Zur Berechnung ist nur der PDB-File des Proteins notwendig. Um die Vorhersage zu validieren wurde zunächst ein Test mit einer bekannten Kristallstruktur des Furins (PDB: 4OMC) im Komplex mit dem in unserem Arbeitskreis entwickelten Inhibitor *m*-guanidinomethyl-phenylacetyl-Arg-Val-Arg-4-Amidinobenzylamid durchgeführt.¹²⁷ Es ist bekannt, dass Furin drei Calcium- und eine Natriumionenbindungsstelle besitzt. Eine Ca^{2+} -Bindungsstelle befindet sich am Boden der S1-Bindungstasche, die beiden anderen sind weiter weg vom aktiven Zentrum lokalisiert,

jedoch für die korrekte Ausbildung der aktiven Konformation des Furins essentiell.¹²⁸ Zur Validierung des Programms wurden alle drei Calcium- und die andere Metallionen aus der PDB-Datei 4OMC gelöscht und die Vorhersage mit der bearbeiteten Datei durchgeführt. Neben weiteren möglichen Stellen wurde zumindest die wichtige Metallbindungsstelle (Ca^{2+} (II)) am Boden der S1-Tasche identifiziert, jedoch nicht die beiden anderen Ca^{2+} -Bindungsstellen (Daten nicht gezeigt). Anschließend wurden die möglichen Metallbindungsstellen in der der Kristallstruktur 2YOL der WNV-Protease berechnet. Dabei wurden zwei Bindungsstellen mit insgesamt fünf Aminosäuren als mögliche Interaktionspartner für Metallionen gefunden (Abbildung 33). Der eine Bereich ist von den Aminosäuren Thr7 und Asp66 umschlossen, jedoch relativ weit vom aktiven Zentrum am äußeren Rand der Protease lokalisiert. Die zweite vorhergesagte Bindungsstelle ist von den Resten Gly38, Thr52 und Ser135 umgeben und liegt deutlich näher am aktiven Zentrum der Protease. Interessanterweise ist der Rest Ser135 Teil der katalytischen Triade, dies lässt vermuten, dass die Zinkionen eher an diesen Bereich binden und möglicherweise durch eine leichte Konformationsänderung die Enzymaktivität beeinflussen. Die Bindung eines Zinkions an diesen Bereich sollte auch mit einem ES-Komplex möglich sein, dies würde den nichtkompetitiven Hemmmechanismus erklären. Idealerweise müsste eine Kristallstruktur der WNV-Protease in Gegenwart der Zinkionen bestimmt werden. Im Arbeitskreis Hilgenfeld (Universität Lübeck) wurden Kristallisationsversuche mit der WNV-Protease in Gegenwart von Zinksalzen durchgeführt, diese waren jedoch bisher nicht erfolgreich.

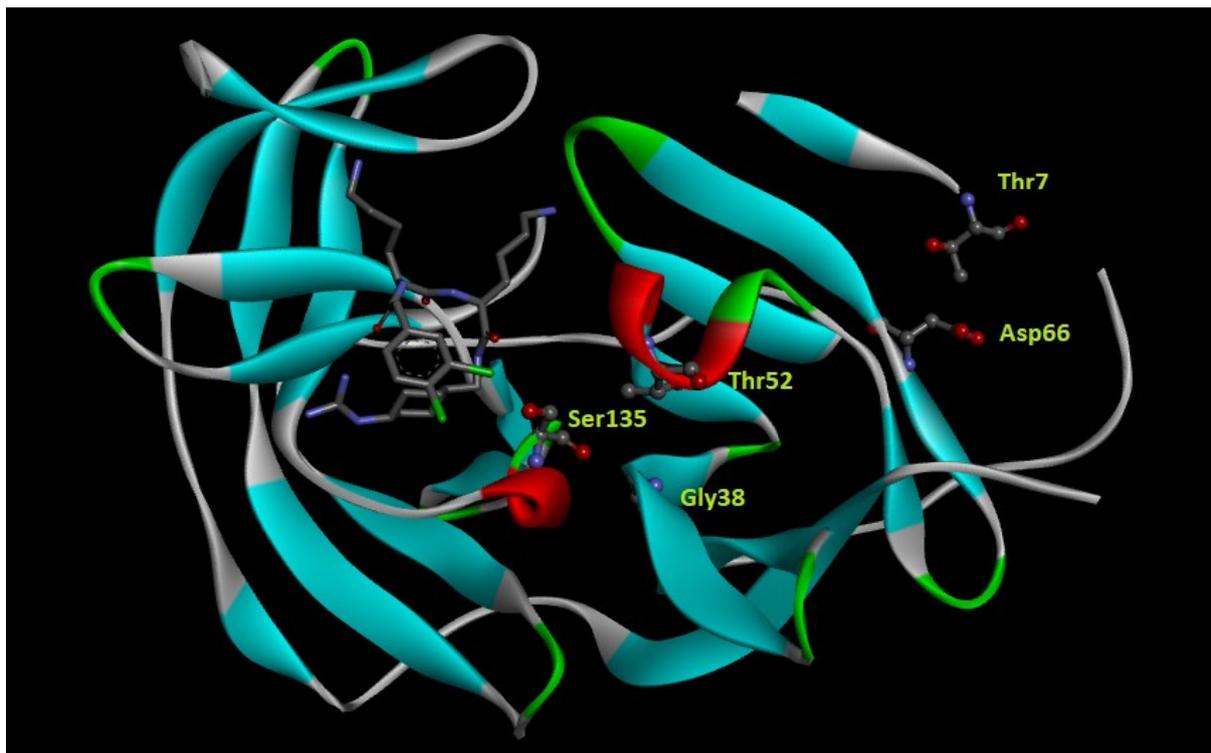


Abbildung 33: Berechnete potentielle Bindungsstellen für Zinkionen an der WNV-Protease. Zur Berechnung wurde die Kristallstruktur 2YOL im Komplex mit dem Inhibitor 3,4-Dichlor-PhAc-Lys-Lys-GCMA benutzt. Eine Bindungsstelle ist von den Resten Ser135, Gly38 und Thr52 umgeben und befindet sich in der Nähe des aktiven Zentrums. Eine zweite postulierte Bindungsstelle in der Nähe der Reste Thr7 und Asp66 ist dagegen relativ weit vom aktiven Zentrum entfernt.

3.13.5 Enzymkinetische Messungen mit Inhibitoren in Gegenwart von Zinksalzen

Aufgrund der zuvor beschriebenen Ergebnisse wurde vermutet, dass es trotz der Bindung eines Zinkions an die postulierte Bindungsstelle oberhalb des aktiven Zentrums immer noch möglich ist, dass ein substratanaloger Inhibitor parallel an den S3-S1-Bereich der WNV-Protease bindet. Deshalb sollte untersucht werden, wie sich die Zugabe von Zinkionen auf die Hemmwirkung eines kompetitiven Inhibitors auswirkt. Als Inhibitor wurde die Verbindung PhAc-Lys-Lys-Arg-Ethylketon (**24**) bei einer konstanten Konzentration von 3,125 μM ausgewählt, die zuerst allein in Abwesenheit des Zinksalzes vermessen wurde und für die ein K_i -Wert von 1,07 μM ($n=8$) bestimmt wurde. Anschließend wurde die Hemmwirkung durch den Inhibitor **24** in Gegenwart von Zinkionen bestimmt. Die verwendeten Konzentrationen und die resultierenden Hemmwirkungen sind in Tabelle 19 zusammengefasst.

Tabelle 19: Auswirkung auf die prozentuale Hemmung der WNV-Protease durch den Inhibitor **24** bei zwei verschiedenen Konzentrationen des Zinksalzes. Die Messungen erfolgten mit dem Substrat MI-0624 (PhAc-Leu-Lys-Lys-Arg-AMC) bei einer Konzentration von 100 μM .

Konzentration in μM	Hemmung in %
3,125 μM Inhibitor 24	40
3,125 μM Inhibitor 24 + 15,625 μM Zn^{2+}	59
3,125 μM Inhibitor 24 + 31,25 μM Zn^{2+}	64

Die Hemmwirkung nimmt durch den Zusatz der Zinkionen konzentrationsabhängig zu. In Gegenwart von ca. 31 μM Zn^{2+} -Ionen liegt die Hemmwirkung bei 64 %, bei halbiertes Zinkionen-Konzentration wird die Inhibierung nur geringfügig schwächer (59 %), der reine Ethylketon-Inhibitor (**24**) bei einer Konzentration von 3,125 μM bewirkt eine Hemmung von 40 %. Das heißt, dass durch den Zusatz von 15,625 μM eines Zinksalzes die Hemmwirkung um ca. 19 % verstärkt wurde. Da der Einsatz der doppelten Konzentration des Zinksalzes die Hemmung nur um weitere 5 % verstärkte, wurde die geringere Zinksalz-Konzentration für die weiteren Messungen ausgewählt. Dabei wurden verschiedene Konzentrationen des Inhibitors **24** bei einer konstanten Konzentration des Zinksalzes von 15,625 μM vermessen. Die Messdaten wurden in einem Dixon-Plot aufgetragen (Abbildung 34) und ein scheinbarer K_i -Wert von 0,66 μM bestimmt. Die Hemmkonstante des Inhibitors **24** allein lag wie zuvor beschrieben nur bei einem Wert von 1,07 μM . Jedoch waren die Plots nicht mehr perfekt linear, sondern man konnte eine leichte Krümmung erkennen (Abbildung 34). Deswegen ist auch der bestimmte scheinbare K_i -Wert von 0,66 μM kein exaktes Maß für die Hemmwirkung. Der Dixon-Plot dient an dieser Stelle nur zur grafischen Darstellung der Messdaten, der scheinbare K_i -Wert hat keine exakte Bedeutung. Die Standardabweichung des scheinbaren K_i -Wertes von acht unabhängigen Messungen lag bei dieser Auftragung bei 0,66 $\mu\text{M} \pm 0,086 \mu\text{M}$.

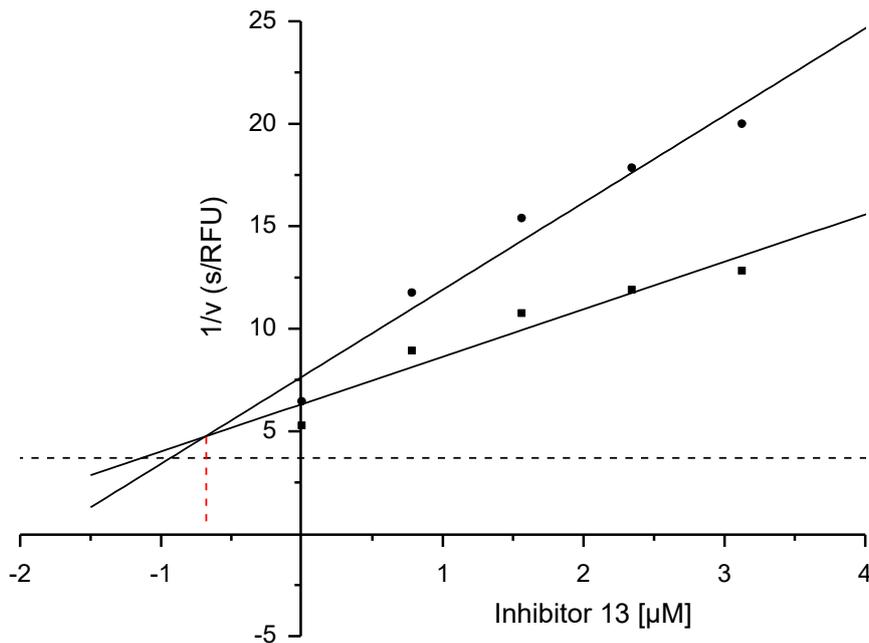


Abbildung 34: Dixon-Plot der Hemmung der WNV-Protease durch den Inhibitor **24** in Gegenwart einer konstanten Konzentration von Zinkacetat. Inhibitor **24** (3,125 μM , 2,344 μM , 1,563 μM , 0,781 μM) und Zinkacetat (15,625 μM im Messansatz). Als Substrat wurde die Verbindung MI-0624 in den Konzentrationen 100 μM (■) und 50 μM (●) eingesetzt. Die gestrichelte Linie entspricht $1/V_{\text{max}}$, der Wert wurde parallel auf der identischen Mikrotiterplatte in Abwesenheit beider Hemmstoffe bestimmt.

Es stellt sich die Frage, ob die Verbesserung des K_i -Wertes dadurch zustande kommt, dass einfach ein zweiter Inhibitor eingesetzt wird und damit lediglich die Gesamtkonzentration an Inhibitor steigt oder ob es wirklich eine zweite Bindungsstelle gibt, die durch Zinkionen besetzt wird. Daher wurde eine weitere Messung mit Inhibitor **24** durchgeführt, bei der anstelle einer konstanten Menge des Zinksalzes eine konstante Konzentration des reversibel-kompetitiven Inhibitors **55** (*c*(1,3-cis-DAMCH-Lys-Lys-Succinyl)) zugesetzt wurde, der an gleiche Bereiche wie der Inhibitor **24** binden sollte. Der Inhibitor **55** besitzt mit einem K_i -Wert von 28,8 μM eine zum Zinkacetat ähnliche Hemmwirkung, als konstante Konzentration wurde wieder 15,625 μM gewählt. Die Auftragung der Messwerte ergab in diesem Fall lineare Abhängigkeiten im Dixon-Plot, der bestimmte K_i -Wert von 1,08 μM ist praktisch identisch zur Hemmkonstante des reinen Inhibitors **24** ohne jeglichen Zusatz anderer Inhibitoren. In diesem Fall wird die Hemmwirkung bei den gewählten Konzentrationen ausschließlich durch den stärkeren Inhibitor **24** bestimmt, der zusätzlich zugesetzte schwächere Inhibitor hat praktisch keinen Einfluss (Abbildung 35). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Zinkionen sehr wahrscheinlich eine zweite Bindungsstelle besetzen, die nicht exakt mit der Bindestelle substratanaloger kompetitiver Hemmstoffe übereinstimmt und

deshalb in Kombination mit einem kompetitiven Inhibitor eine verstärkte Hemmung bewirken.

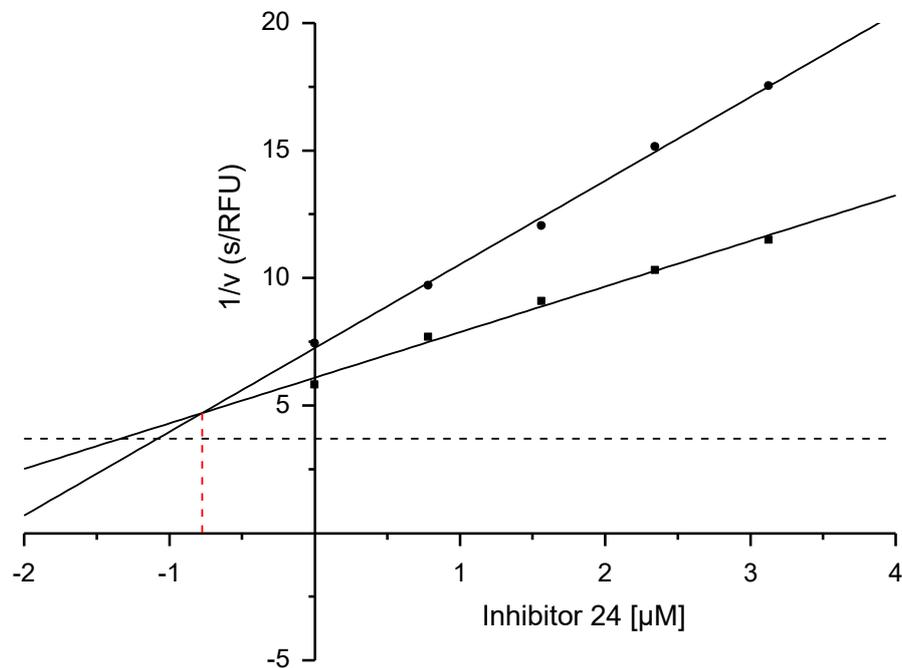


Abbildung 35: Dixon-Plot der Hemmung der WNV-Protease durch Inhibitor **24** in Gegenwart einer konstanten Konzentration des Inhibitors **55**. Inhibitor **24** (3,125 µM, 2,344 µM, 1,563 µM, 0,781 µM) mit zusätzlicher Zugabe einer konstanten Menge an Inhibitor **55** von 15,625 µM. Als Substrat wurde die Verbindung MI-0624 in den Konzentrationen 100 µM (■) und 50 µM (●) eingesetzt. Die gestrichelte Linie entspricht $1/V_{max}$, der Wert wurde parallel auf der identischen Mikrotiterplatte bestimmt. Es resultiert eine lineare Abhängigkeit der Messdaten, obwohl 2 Inhibitoren in unterschiedlichen Konzentrationen eingesetzt wurden. Vermutlich hat der Inhibitor **55** jedoch einen so geringen Einfluss, dass sich dieser praktisch nicht im Kurvenverlauf widerspiegelt.

Eine standardmäßige Bestimmung von K_i -Werten erfolgt normalerweise immer nur durch Messungen in Gegenwart eines Inhibitors und nicht mit einem Gemisch von Inhibitoren. Daher wurden zusätzlich Messungen durchgeführt, um den IC_{50} -Wert für Inhibitor **24** allein und in Kombination mit einer konstanten Konzentration des Zinksalzes oder des Inhibitors **55** zu bestimmen. Dazu wurde eine Konzentrationsreihe des Inhibitors **24** allein vermessen (■ in Abbildung 36). Zusätzlich wurden Messungen unter Zusatz einer konstanten Konzentration (15,625 µM) des Inhibitors **55** durchgeführt (○) oder der gleichen Konzentration des Zinkacetats (▲). Auch in diesem Fall wurde eine ähnliche Hemmwirkung durch den reinen Inhibitor **24** oder die Kombination des Inhibitors **24** mit dem schwächeren kompetitiven Hemmstoff **55** erhalten. Im Gegensatz dazu erkennt man eine Verschiebung der IC_{50} -Kurve bei Zusatz des Zinksalzes, vor allem im niedrigeren Konzentrationsbereich des Inhibitors **24** ist diese ausgeprägt (Abbildung 36).

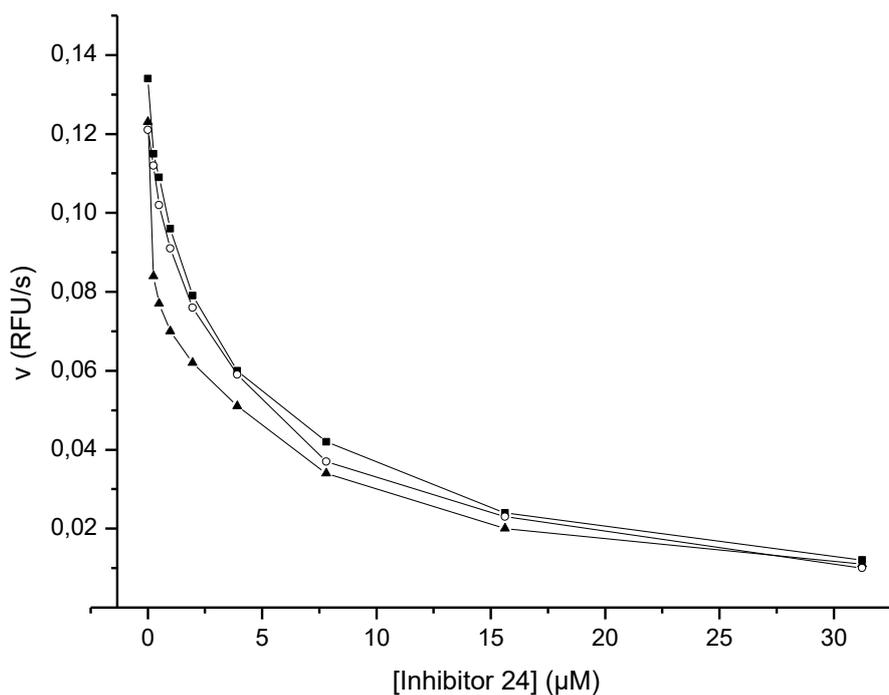


Abbildung 36: Hemmung der WNV-Protease bei einer Konzentration des Substrates MI-0624 von 100 µM durch Inhibitor **24** allein (■), durch Kombination des Inhibitors **24** mit einer konstanten Konzentration (15,625 µM) des Hemmstoffs **55** (○), sowie durch Kombination des Inhibitors **24** mit einer konstanten Konzentration (15,625 µM) an Zinkacetationen (▲).

Durch logarithmische Auftragung der Inhibitorkonzentration auf der X-Achse werden die Unterschiede zwischen den Kurven noch deutlicher sichtbar (Abbildung 37). Die Geschwindigkeit der Kontrollmessungen in Abwesenheit des Inhibitors **24** liegt bei einer Aktivität von 0,134 RFU/s, in Abwesenheit des Inhibitors **24** aber in Gegenwart von 15,625 µM des Inhibitors **55** (■) bei 0,122 RFU/s oder in Abwesenheit des Inhibitors **24** und Anwesenheit von 15,625 µM Zinkacetat (▲) bei 0,123 RFU/s. Durch Anpassung der Messwerte an die allgemeine *Formel 2* wurden die IC_{50} -Werte berechnet. Für die Hemmung der WNV-Protease durch den reinen Inhibitor **24** wurde ein IC_{50} -Wert von 3,15 µM bestimmt, in Gegenwart von zusätzlich 15,625 µM Inhibitor **55** ein fast identischer Wert von 2,95 µM und in Gegenwart des Zinkacetats in gleicher Konzentration ein Wert von 1,02 µM.

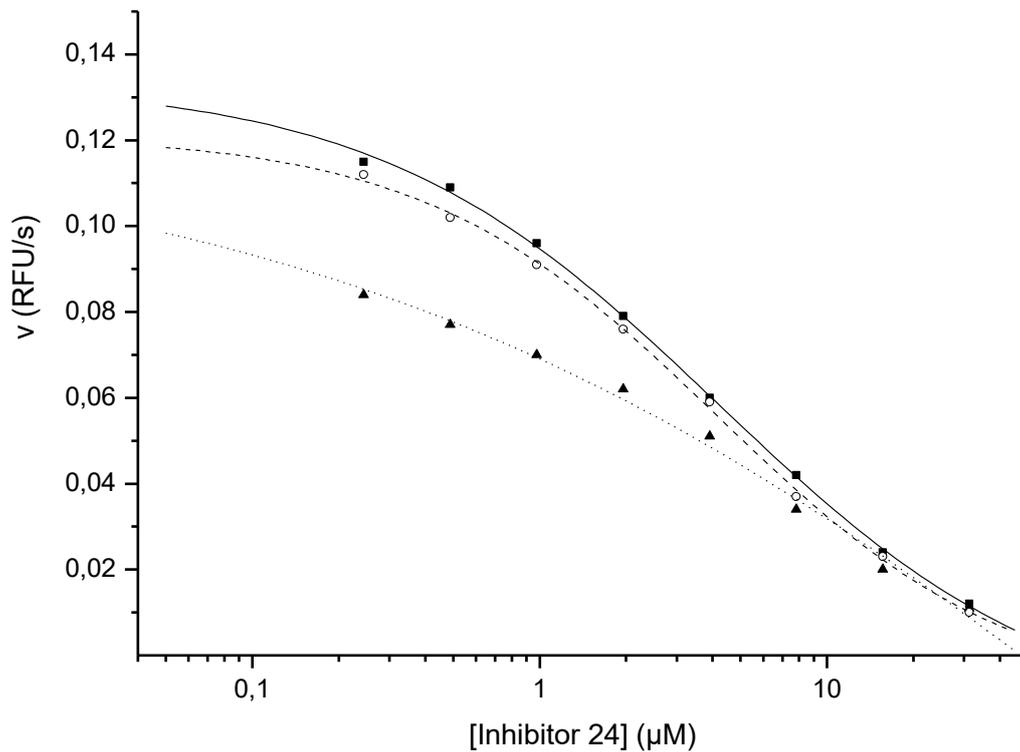


Abbildung 37: Hemmwirkung der WNV-Protease durch den Inhibitor **24** allein und in Kombination mit einer konstanten Konzentration von Zinkacetat oder des Inhibitors **55**. Sämtliche Messungen erfolgten mit dem Substrat MI-0624 bei einer Konzentration von 100 µM mit dem Inhibitor **24** allein (■), zusätzlich mit 15,625 µM an Inhibitor **55** (○) oder mit 15,625 µM Zinkacetat (▲).

Abschließend ist zu sagen, dass durch mehrere Versuche gezeigt werden konnte, dass die geprüften Zinksalze ein wirksamer Hemmstoff der NS2B-NS3-Protease des WNV sind. Sie wirken als nichtkompetitive Inhibitoren und binden vermutlich in der Nähe des aktiven Zentrums und beeinflussen dadurch die Aktivität der Protease.

3.13.6 Zellkulturuntersuchungen in Gegenwart der Zinksalze

Analog zur in Kapitel 3.6.4 beschriebenen Testung der Cholesteryl-Derivate in Zellkultur nach Virusinfektion wurde auch Zinkchlorid auf dessen antivirale Wirksamkeit untersucht. Die Untersuchungen erfolgten wieder im Arbeitskreis von Prof. Bartenschlager (Universität Heidelberg) und wurden sowohl mit WNV, als auch mit DENV-2 durchgeführt, die Ergebnisse sind in Abbildung 38 dargestellt. Als Referenzverbindung wurde in beiden Fällen das Nukleosid-Analogon Ribavirin eingesetzt, das für beide Flaviviren eine konzentrationsabhängige Hemmung der Virusvermehrung bewirkt. Obwohl Zinkionen eine signifikante Hemmung der WNV-Protease bewirken, wurde bei den eingesetzten Konzentrationen keinerlei konzentrationsabhängiger Effekt auf die Virusvermehrung in Zellkultur festgestellt. Auch im Falle des DENV-2 wurde keine signifikante Hemmung beobachtet.

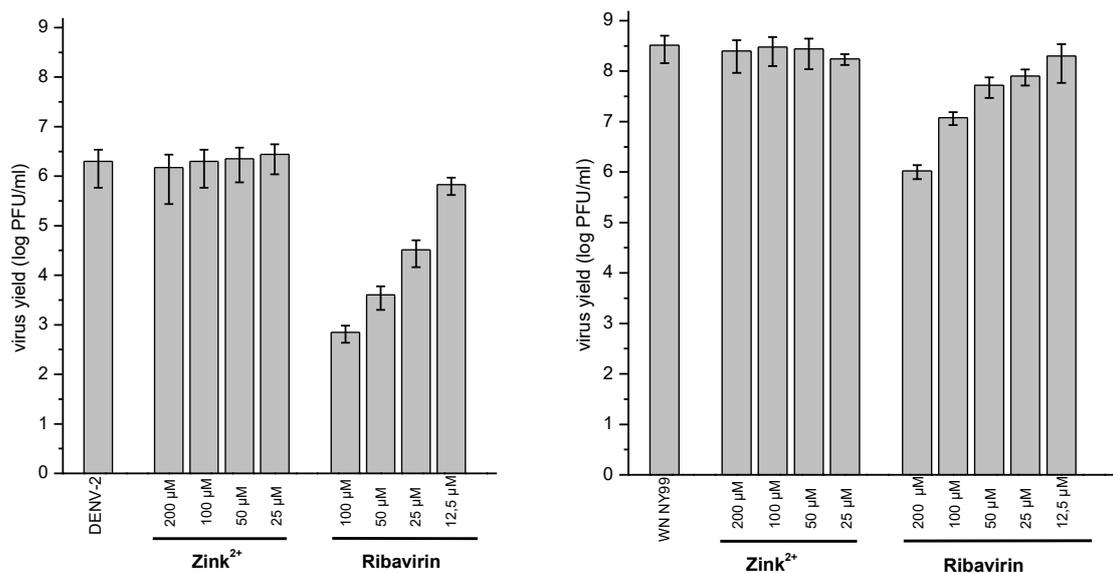


Abbildung 38: Auswirkung von Zinkionen und Ribavirin auf die Vermehrung des DENV-2 (links) und des WNV (rechts) in Huh7-Zellen. Die Virusvermehrung wurde durch einen Plaque-Test bestimmt, der linke Balken zeigt jeweils die Kontrollversuche in Abwesenheit der Hemmstoffe.¹¹⁷

Eine mögliche Erklärung für die nicht vorhandene antivirale Wirksamkeit könnte sein, dass nur marginale Konzentrationen der Zinkionen vom Virus aufgenommen werden. In Zukunft sollte trotzdem nochmals geprüft werden, ob durch eine Kombination der Zinkionen mit anderen bekannten antiviralen Wirkstoffen eine verstärkte Hemmung der WNV-Vermehrung möglich ist.

4 Zusammenfassung und Ausblick

Ersatz der P1-P3-Reste durch acylierte Diaminobutter- und Diaminopropansäure-Derivate

Aufbauend auf den Ergebnissen von Dr. Zhouhir Hammamy sollten neue substratanaloge Inhibitoren gegen die NS2B-NS3-Protease des WNV und des DEN2-Virus entwickelt und charakterisiert werden. Dabei sollten zuerst die P1-P3-Reste der Leitstruktur PhAc-Lys-Lys-Arg-NH₂ (**9**) variiert werden. Da bereits sehr viele andere proteinogene und nichtproteinogene Aminosäuren in vorherigen Arbeiten ohne Erfolg in die substratanlogen Hemmstoffe eingebaut wurden, sollte eine neue Strategie zum Aufbau ungewöhnlicher Reste untersucht werden, die prinzipiell vielfältige Variationsmöglichkeiten bietet. Dabei wurde α,γ -Diaminobutter- und α,β -Diaminopropansäure in die Inhibitoren eingebaut, die nach Acylierung mit weiteren α -Aminosäuren Seitenketten aufweisen, die der Länge des Lysin ähneln. Durch die Kupplung der unterschiedlichen Aminosäuren an Dap oder Dab sollten auf bequeme Weise zahlreiche neue Verbindungen zugänglich sein. Die Reste Dap(Gly) und Dap(N(Ca)Gly) erwiesen sich mit einem K_i -Wert von rund 17 μ M als die besten P1-Modifikationen, jedoch führt ihr Einbau im Vergleich zu Verbindungen mit P1-Arg zu deutlich schwächeren Hemmstoffen der WNV-Protease. In P2-Position wurde durch Einbau von Dap(Gly) ein Inhibitor mit einem K_i -Wert von ca. 12,2 μ M erhalten, in P3-Position führten die Verbindungen mit Dap(Gly), Dap(Val) oder Dap(Ala) zu Derivaten mit Hemmkonstanten der WNV-Protease im Bereich um 30 μ M. Im Vergleich zum Hemmstoff PhAc-Lys-Lys-Arg-NH₂ (**9**) waren diese Verbindungen jedoch durchgehend deutlich weniger wirksam. Im Vergleich zur Ausgangsverbindung **9** waren alle neuen Derivate dieser Serie ebenfalls deutlich schwächere Hemmstoffe der DENV-2-Protease. Daher hat sich diese Strategie, Lysin durch mit α -Aminosäuren acylierte Dap- oder Dab-Reste zu ersetzen, als ungeeignet erwiesen.

Ketonderivate als Inhibitoren der NS2B-NS3-Proteasen

Im Gegensatz zu den irreversibel hemmenden Chlormethylketon-Inhibitoren sind zahlreiche andere peptidische Ketonderivate übergangszustandsanaloge Inhibitoren (*transition-state-inhibitors*) von Serinproteasen, die diese durch einen reversibel-kovalenten Bindungsmodus hemmen. In dieser Arbeit wurden zwei Arginyl-Ketone aus dem entsprechenden Weinrebamid dargestellt. Das Weinrebamid wurde ausgehend von Boc-Arg(Mtr)-OH, das mit N-Methyl-O-Methylhydroxylamin umgesetzt wurde, hergestellt. Das letztendlich erhaltene peptidische Ethylketonderivat (Verbindung **24**) stellte sich mit einem K_i -Wert von 1,07 μM als wirksamer WNV Hemmstoff heraus. Das sterisch anspruchsvollere Benzylketonanalogon (Verbindung **26**) war um den Faktor 24 schwächer wirksam, das Methylketonderivat konnte nicht dargestellt werden. Bei der DENV-2-Protease war das Benzylketon mit einer Hemmung von 19,1 % die wirksamste Verbindung. Diese Hemmung entspricht einem K_i -Wert von ca. 130 μM .

Zellpenetrierende zyklische Peptidinhibitoren

Um die NS2B-NS3-Protease zu adressieren, müssen die Inhibitoren ins Zytosol und damit durch die Zellmembran gelangen. Eine prinzipielle Möglichkeit diesen Schritt zu ermöglichen, ist eine kovalente Verknüpfung der Hemmstoffe mit zellpenetrierenden, zyklischen Peptidderivaten. Im Rahmen dieser Arbeit wurden zwei zyklische, zellpenetrierende Inhibitoren (Verbindung **27**, **28**) hergestellt. Die wirksamere Verbindung **27**, enthält eine CCP-Sequenz und ein Inhibitorsegment aus fünf DArg-Resten. Die Sequenz des CCP ist an die Arbeit von Pei *et al.* angelehnt.¹¹¹ Der K_i -Wert zur Hemmung der WNV-Protease ist 0,5 μM und für die DENV-2-Protease 2,9 μM . Jedoch wurden von diesen beiden Verbindungen nur sehr geringe Mengen erhalten (siehe 3.5). Um deren Testung in Zellkultur durchzuführen, müssten die Synthesen wiederholt werden. Es ist jedoch nach Testung strukturell ähnlicher zyklischer Furininhibitoren aus unserem Arbeitskreis bekannt, dass solche relativ großen Peptidstrukturen nur eine schwache antivirale Wirksamkeit gegen WNV und DENV-2 in Zellkultur besitzen (Testung im Arbeitskreis Bartenschlager, Univ. Heidelberg).

Cholesteryl- und Dihydrocholesteryl-derivate

Durch die Kupplung des sehr lipophilen Cholesterylrestes an die Inhibitorleitstruktur 4-AMe-PhAc-Lys-Lys-Arg-NH₂ sollte die Zellpermeabilität der Verbindung verbessert werden. Während der Synthese der beiden Cholesteryl-derivate **29** und **30** fiel auf, dass es aufgrund einer Nebenreaktion zu einer Sättigung der Doppelbindung an Position 5 im Cholesterylsegment kam. Deswegen wurde diese anschließend bewusst hydriert und die Inhibitoren **31** - **34** dargestellt. Die Verbindungen **31** - **33**, die sich nur durch die unterschiedliche Anzahl der Ethylenglykollinker-Bausteine (EGL) unterscheiden, waren mit einem IC_{50} von ca. 0,6 - 0,7 μM alle ähnlich wirksame Hemmstoffe der WNV-Protease. Überraschend war, dass zum Vergleich hergestellte Cholesteryl-derivate ohne vollständiges P1-P4-Segment zwar etwas weniger wirksam waren, aber die WNV-Protease in der gleichen Größenordnung hemmen (Unterschied im IC_{50} -Wert < Faktor 10). Dies deutet eher auf eine unspezifische Hemmung durch den Cholesterylteil dieser Derivate hin.

Die Testung dieser Verbindungen in Zellkultur zeigte, dass diese Cholesteryl- bzw. Dihydrocholesteryl-derivate relativ zelltoxisch sind, bei einer Konzentration von 12,5 μM der meisten Verbindungen überlebten nur weniger als 60 % der Zellen. Daher konnten diese Verbindungen maximal bei einer Konzentration von 5 μM getestet werden. Die Reduktion der Virusvermehrung war im Vergleich zu den Referenzverbindungen MI-1230 (4-Gua-Me-PhAc-Arg-Lys-Arg-Amba) und Ribavirin schwächer ausgeprägt. Die Ergebnisse zeigten, dass die kovalente Kupplung von Cholesteryl-derivaten an die peptidischen Proteasehemmstoffe zumindest für diese Anwendung ungeeignet ist.

Inhibitoren mit zusätzlichem P5-Rest

Durch die Anknüpfung eines zusätzlichen P5-Restes an den mit einer *p*-Aminomethylgruppe substituierten P4 PhAc-Rest der Leitstruktur **9** sollte die Affinität der Verbindungen erhöht werden. Die Hemmwirkungen dieser Inhibitoren **35** - **39** waren mit K_i -Werten zwischen 1,8 bis 2,6 μM sehr ähnlich. Auch der K_i -Wert der Leitstruktur liegt in dieser Größenordnung. Durch Modellierung des Bindungsmodus konnte dieser Sachverhalt vermutlich erklärt werden. Der zusätzliche P5-Rest kommt nicht in direkten Kontakt mit der Protease und ragt ins Lösungsmittel (Abbildung 22). Daher hat er kaum Einfluss auf die Affinität der Verbindungen. Weitere P5-Modifizierungen in *para*-Position des P4-Restes sind

wahrscheinlich wenig sinnvoll. Eventuell könnte man zukünftig noch die Anknüpfung des P5-Restes an die *meta*- oder *ortho*-Position der P4-PhAc-Gruppe untersuchen.

Dockingstudien zur Erlangung neuer Inhibitorstrukturen

Mit Hilfe der Arbeitsgruppe Kolb wurden Dockingexperimente mit der WNV-Protease (PDB: 2YOL) durchgeführt. Es wurden vier potenzielle Inhibitorfragmente identifiziert und deren prozentuale Hemmwirkung auf die WNV-Protease bei einer Konzentration von 625 μM bestimmt. Zwei Fragmente zeigten mit 17 % und 12 % eine gewisse Hemmwirkung. Aus diesen Fragmenten wurden fünf Inhibitoren (47 - 51) synthetisiert. Die Hemmwirkungen dieser Verbindungen waren jedoch nur sehr schwach. Das Derivat 48 ist mit einem K_i -Wert von 60,4 μM die wirksamste Verbindung dieser Serie. Die Tatsache, dass die Einzelfragmente eine gewisse Hemmung zeigten, die dargestellten Inhibitoren jedoch wenig wirksam waren, lässt darauf schließen, dass die Verknüpfung der Fragmente verbessert werden muss.

Hemmung der WNV-Protease durch Zinkionen

Durch enzymkinetische Messungen mit der WNV-Protease wurde für Zinkionen ein K_i -Wert von ca. 31 μM ermittelt. Dabei konnte gezeigt werden, dass das korrespondierende Anion der eingesetzten Zinksalze keinen Einfluss hat, sowohl Zinkchlorid, Zinknitrat als auch Zinkacetat zeigten die gleichen Hemmwirkungen. Durch andere Metall-Kationen wurde keine oder nur eine sehr geringe Hemmung der WNV-Protease festgestellt. Für die DENV-2 NS2B-NS3-Protease konnte keine signifikante Inhibierung durch Zink- oder andere Metallkationen festgestellt werden. Mit dem Komplexbildner EDTA, der Zinkionen komplexiert, konnte die Hemmung der WNV-Protease nahezu vollständig aufgehoben werden, demzufolge kommt die Hemmung eindeutig durch die Zinkionen zustande (siehe 3.13.1). Die Hemmung der WNV-Protease durch Zinkionen wurde weiter enzymkinetisch untersucht. Die Lage des Schnittpunktes in Lineweaver-Burk-Auftragungen weist auf einen nichtkompetitiven Hemmmechanismus durch die Zinkionen hin. Mittels eines Webserverdienstes wurde nach möglichen Bindungsorten für Zink gesucht. Eine vorhergesagte Bindungsstelle bestand aus drei Aminosäuren in der Nähe des aktiven Zentrums, die das Ser135 der katalytischen Triade einschließt. Da trotz Bindung des Zinkions an diese vorhergesagte Bindungsstelle noch Platz innerhalb der Bindungstasche für einen weiteren Inhibitor besteht, wurde in weiteren

Versuchen untersucht, wie sich die Hemmwirkung von bekannten Inhibitoren in Gegenwart von Zinkionen verhält. Es wurde gezeigt, dass der IC_{50} -Wert des Inhibitors **24** (PhAc-Lys-Lys-Arg-Ethylketon) durch Zusatz von Zinkionen erniedrigt wird. Die Prüfung des Zinkchlorids in Zellkultur zeigte jedoch bei den eingesetzten Konzentrationen von 25 μ M bis 20 μ M keine signifikante Reduktion der WNV-Vermehrung. Möglicherweise werden nur unzureichende Konzentrationen der Zinkionen aufgenommen.

5 Experimenteller Teil

5.1 Allgemeine Arbeitstechniken

Die benutzten Reagenzien einschließlich der Lösungsmittel mit dem Reinheitsgrad *pro analysi* bzw. *HPLC-grade* wurden ohne weitere Aufbereitung von den Firmen ACROS, ALFA AESAR, FISHER SCIENTIFIC FLUKA, IRIS BIOTECH MERCK NOVA BIOCHEM, CARL ROTH und SIGMA ALDRICH benutzt. Das verwendete Tetrahydrofuran wurde über Natrium getrocknet und wie auch andere trockene Lösungsmittel über Molsieb und unter Argon-Schutzgas aufbewahrt. Die verwendete Trifluoressigsäure stammt aus einer Hochschullieferung der Firma Solvay GmbH (Hannover, Deutschland). Wässrige Lösungen von Säuren, Basen, Salzen oder Puffer wurden mit demineralisiertem Wasser hergestellt. Für die analytische und präparative HPLC wurde Acetonitril (HiPerSolv CHROMANORM) der Firma VWR (Darmstadt, Deutschland) verwendet, sowie Reinstwasser, das mittels einer NOWApure select Anlage (KSN Wassertechnik; Nistertal, Deutschland) hergestellt wurde. Für sämtliche wässrigen Lösungen zur Synthese wurde entionisiertes Wasser benutzt. Reaktionskontrollen erfolgten mittels Dünnschichtchromatographie (Kieselgel 60 F₂₅₄ Platten der Firma Merck, Darmstadt, Deutschland) oder durch analytische HPLC (s. unten). Auf den DC-Platten wurden die Verbindungen unter UV-Licht ($\lambda = 254 \text{ nm}$) des Desaga HP-UVIS (Desaga GmbH; Wiesloch, Deutschland) detektiert.

Die finalen Inhibitoren wurden nach Reinigung mittels präparativer HPLC und anschließender Lyophilisation aus Reinstwasser an einer Alpha 2-4 LD plus Gefriertrocknungsanlage (Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen GmbH; Osterode am Harz, Deutschland) als TFA-Salze erhalten.

5.2 Festphasenpeptidsynthese

Die automatisierte Festphasenpeptidsynthese wurde in einem Syro 2000 (MultiSynTech GmbH, Witten, Deutschland) in 2 mL Polypropylen-Spritzen mit Polyethylen-Fritten (MultiSynTech) nach einem standardmäßigen Fmoc-Protokoll (Methode A2) durchgeführt. Die manuelle Festphasenpeptidsynthese wurde nach einem ähnlichen Protokoll (Methode A) entweder in einem Schüttler (Ika, Staufen, Deutschland) in 2 bzw. 5 mL Polypropylen-Filterspritzen (MultiSynTech) oder mit einem Eigenbau-Drehschüttler in Reaktionsgefäßen (100 mL) aus Glas mit eingeschmolzener Sinterfritte durchgeführt

5.3 HPLC

Für sämtliche analytischen und präparativen HPLC-Trennungen wurden identische Laufmittel verwendet.

- Laufmittel A (LM A): 0,1 % TFA in Reinstwasser
- Laufmittel B (LM B): 0,1 % TFA in ACN

5.3.1 Analytische HPLC

Die analytischen Chromatogramme wurden mit einer Shimadzu LC-10A-Anlage (Shimadzu Deutschland GmbH, Duisburg, Deutschland), bestehend aus einem SCL-10AVP System Controller, einem SIL-10AXL Autoinjector, einem SPD-M10AVP Diodenarray-Detektor, zwei LC-10ATVP Pumpen und einem CTO-10A Säulenofen mit einer C18-Säule (Nucleodur, 5 μm , 100 \AA , 4.6 \times 250 mm, Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren, Deutschland) aufgenommen. Nur zur Analyse aller hydrophoben Cholesteryl-derivate wurde eine C4-Säule (Nucleosil, 5 μm 120 \AA , 4.6 \times 250 mm, Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren Deutschland) verwendet. Alle Trennungen erfolgten mit einer Flussrate von 1 mL/min und einem linearen Gradient, bei dem die Konzentration des LM B um 1 %/min ansteigt. Die bei den Synthesen der Verbindungen angegebenen Reinheiten basieren auf der Auswertung der HPLC-Chromatogramme bei einer Wellenlänge von 220 nm, es wurden jeweils die Prozent des LM B angegeben, bei der die Verbindungen eluieren. Je nach Hydrophobizität der Edukte und Produkte wurden für die Reaktionskontrollen und die Charakterisierung der Endprodukte unterschiedliche Startkonzentrationen des Laufmittels B gewählt. Die Detektion erfolgte bei Wellenlängen von 220 und 254 nm.

5.3.2 Präparative HPLC

Die Reinigung der Verbindungen erfolgte mit einer präparativen HPLC-Anlage der Firma Varian (Pumpen: Prep Star Modell 218 Gradienten System, Detektor: Pro Star Modell 320, Fraktionskollektor: Varian Modell 701) mit einer C8-Säule (Nucleodur, 5 μm , 100 \AA , 32 \times 250 mm, Macherey-Nagel, Düren, Deutschland). Alle präparativen Trennungen erfolgten mit einer Flussrate von 20 mL/min und mit einem linearen Gradient, bei dem die Konzentration des LM B um 0.5 %/min ansteigt (Detektion bei 220 nm).

5.4 Dünnschichtchromatographie (DC)

Für eine Dünnschichtchromatographie wurden käuflich erworbene Aluminium-DC-Fertigplatten (Kieselgel 60 F₂₅₄) der Firma Merck verwendet. Die Detektion erfolgte mittels einer UV-Lampe mit einer Wellenlänge von 254 nm.

5.5 Massenspektrometrie

Die massenspektrometrischen Messungen wurden mit einem QTrap 2000 ESI Massenspektrometer (Applied Biosystems; Foster City, CA, USA) am Institut für pharmazeutische Chemie der Philipps-Universität Marburg durchgeführt. Die Proben wurden in 100 % MeOH oder in einem Wasser/Acetonitril Gemisch mit 0,1 % TFA gelöst.

5.6 Lyophilisation

Nach präparativer Reinigung wurden alle finalen Inhibitoren und einige Zwischenstufen aus Reinstwasser oder 80 % *tert*-Butanol in demineralisiertem Wasser an einer Gefriertrocknungsanlage Alpha 2-4 LD plus (Christ, Osterode am Harz, Germany) lyophilisiert und in Form ihrer TFA-Salze als Feststoffe erhalten.

5.7 Enzymkinetische Messungen

Sämtliche Fluoreszenzmessungen wurden bei Raumtemperatur in schwarzen 96-well-FluoroNunc F96 MaxiSorp Mikrotiterplatten (*Nunc*, Langenselbold, Deutschland) an einem Fluoreszenz-Plattenleser Fluoroskan Ascent (*Thermo Scientific*, Waltham, Massachusetts, USA) bei $\lambda_{\text{ex}} = 355$ nm und $\lambda_{\text{em}} = 460$ nm durchgeführt. Der Start der Reaktion erfolgte durch die Zugabe des Enzyms, die Dauer der Messungen betrug 10 Minuten. Aus der Änderung der Fluoreszenz über die Dauer der Messung wurden aus den Anstiegen die Reaktionsgeschwindigkeiten bestimmt ($\Delta\text{Fluoreszenz}/\Delta t$).

5.7.1 Messungen mit der WNV-Protease

Die NS2B-NS3-Protease des WNV wurde von Caroline Haase (Arbeitsgruppe Hilgenfeld, Institut für Biochemie, Universität Lübeck) erhalten.⁷⁶ Das Substrat PhAc-Leu-Lys-Lys-Arg-AMC (MI-0624) wurde in Reinstwasser mit einer Konzentration von 1 mM gelöst und weiter immer mit Reinstwasser verdünnt. Für die Messungen wurde ein 100 mM TRIS-Puffer pH = 8,5 mit 32 % Glycerol und 0,01 % Triton X-100 verwendet. Die Enzymkonzentration im Messansatz war mind. 100-fach geringer als die niedrigste Konzentration der Inhibitoren. Der Messansatz setzte sich aus 125 µL Puffer mit Inhibitor, 50 µL Substratlösung und 25 µL Enzymlösung (Konzentration im Messansatz ca. 8 nM) zusammen (Gesamtvolumen des Messansatzes = 200 µL). Aus den Progresskurven wurden mittels linearer Regression die Reaktionsgeschwindigkeiten berechnet, die für die Berechnung der K_i -Werte nach der Dixon-Methode dienen. Die Messungen erfolgten mit vier verschiedenen Inhibitorkonzentrationen und drei unterschiedlichen Substratkonzentrationen, zusätzlich wurden Kontrollmessungen in Abwesenheit des Inhibitors durchgeführt. Des Weiteren wurden die berechneten *steady-state* Geschwindigkeiten als Funktion der Substrat- und Inhibitorkonzentration an die Formel 1 für eine reversibel-kompetitive Hemmung angepasst.

Formel 1: Gleichung für eine reversible und kompetitive Enzymhemmung. (v : Geschwindigkeit der Enzymreaktion, V_{max} : Maximalgeschwindigkeit der ungehemmten Enzymreaktion, S : Substratkonzentration, K_M : Michaelis-Menten-Konstante, I : Inhibitorkonzentration, K_i : Inhibitionskonstante)

$$v = \frac{V_{max} \times S}{K_M \times \left(1 + \frac{I}{K_i}\right) + S}$$

5.7.2 Messungen mit der DENV-2-Protease

Die DENV-2-Protease NS2B-NS3 wurde von Linlin Zhang aus der Arbeitsgruppe Hilgenfeld (Institut für Biochemie der Universität Lübeck) zur Verfügung gestellt. Das Substrat PhAc-Lys-Arg-Arg-AMC (MI-0084) wurde in Reinstwasser zu 1 mM gelöst und verdünnt. Der Puffer bestand aus 100 mM TRIS-HCl (pH = 8.5) mit 32 % Glycerol und 0.01 % Triton X-100. Die Enzymkonzentration im Ansatz war mind. 100-fach niedriger als die Inhibitorkonzentrationen. Die Volumina im Ansatz setzten sich aus 125 μ L Puffer mit Inhibitor, 50 μ L Substratlösung und 25 μ L Enzymlösung (39 nM) zusammen (Gesamtvolumen des Messansatzes = 200 μ L). Die Auswertung der K_i -Werte für die wirksameren Verbindungen erfolgte nach der Dixon-Methode aus vier verschiedenen Inhibitorkonzentrationen und drei unterschiedlichen Substratkonzentrationen. Zusätzlich wurden die berechneten *steady-state* Geschwindigkeiten als Funktion der Substrat- und Inhibitorkonzentration an die Formel 1 für eine reversibel-kompetitive Hemmung angepasst.

5.7.3 IC_{50} -Bestimmung

Die Bestimmung der IC_{50} -Werte für die Inhibitoren mit abweichendem unbekanntem Hemmmechanismus erfolgte unter analogen Bedingungen wie zuvor beschrieben. Jedoch wurden sämtliche Messungen nur mit einer konstanten Substratkonzentration von 100 μ M für die WNV-Protease und mit 125 μ M für das DENV-2-Enzym durchgeführt. Mittels einer geeigneten Verdünnungsreihe wurden 8-12 Inhibitorkonzentrationen hergestellt und vermessen. Zur Berechnung der IC_{50} -Werte wurden die bestimmten *steady-state* Geschwindigkeiten als Funktion der Inhibitorkonzentration an Formel 2 angepasst.

Formel 2: Gleichung zur Bestimmung des IC_{50} -Wertes (v : Geschwindigkeit der Enzymreaktion, v_0 : Geschwindigkeit der ungehemmten Enzymreaktion, I : Inhibitorkonzentration, IC_{50} : mittlere inhibitorische Konzentration, p : Steilheit der Kurve im linearen Abschnitt).

$$v = \frac{v_0}{1 + \left(\frac{I}{IC_{50}}\right)^p}$$

5.7.4 Bestimmung der prozentualen Hemmung der DENV-2 -Protease

Für die nur schwach wirksamen Verbindungen erfolgte die Bestimmung der prozentualen Hemmung der DENV-2 NS2B-NS3-Protease nur durch einen Test bei einer konstanten Inhibitorkonzentration von 125 μM im Messansatz analog der zuvor beschriebenen Bedingungen. Alle Inhibitoren, für die eine Hemmwirkung von $\geq 40\%$ bestimmt wurde, wurden anschließend nach der zuvor beschriebenen Methode vermessen und deren K_i -Werte über die Dixon-Auftragung bestimmt.

5.8 Generelle Synthesemethoden

5.8.1 Methode A

Manuelle Festphasenpeptidsynthese

Die manuelle Festphasenpeptidsynthese nach Fmoc-Strategie wurde analog zur automatisierten Synthese in einem Reaktionsgefäß mit eingeschmolzener Glassinterfritte oder in 2 mL Spritzen aus Polypropylen mit Polytetrafluorethylenfritten durchgeführt. Im Unterschied zur automatisierten Synthese wurden nur Einzelkupplungen durchgeführt und die Fmoc-Abspaltung erfolgte mit einer 20 %igen Lösung aus Piperidin in DMF (v/v). Die Synthese wurde nach den in Tabelle 20 aufgelisteten Schritten durchgeführt.

Tabelle 20: Syntheschema für die manuelle Festphasenpeptidsynthese nach Fmoc-Strategie.

Nr.	Schritt	Dauer (min)
1	Harz quellen (nur im ersten Zyklus)	1 × 10
2	Fmoc-Abspaltung (20% Piperidin in DMF)	1 × 5 und 1 × 20
3	Waschen mit DMF 1	3 × 1
4	Waschen mit DMF 2	3 × 1
5	Waschen mit DMF 3	2 × 1
6	Kupplung der Fmoc-Aminosäure (Fmoc-AS/HOBt/HBTU/DIPEA, 4/4/4/8*)	1 × 120
7	Waschen mit DMF 4	3 × 1
8	Waschen mit DMF 1	1 × 1

* Eingesetzte Stoffmengen im Verhältnis zur Harzbeladung.

5.8.2 Methode A2

Automatisierte Synthese im Syro 2000

Es wurden ca. 120 mg trockenes Harz in eine 2 mL Spritze mit PTFE-Fritte eingewogen. Die Syntheseschritte des ersten und der nachfolgenden Zyklen sind in Tabelle 21 zusammengefasst. Für die Doppelkupplungen wurde jeweils ein ca. 4-facher Überschuss der jeweiligen Fmoc-Aminosäure, des Additivs HOBt und des Kupplungsreagenzes HBTU sowie ein 8-facher Überschuss an DIPEA, bezogen auf die initiale Beladung des Harzes, verwendet. Im Normalfall wurde doppelt gekuppelt, bei speziellen Bausteinen wurden nur Einfachkupplungen durchgeführt. Nach Beendigung der Synthese wurde das Harz je dreimal mit DMF sowie DCM gewaschen und *in vacuo* getrocknet.

Tabelle 21: Programmierung des Syntheseroboters für den ersten und die nachfolgenden Zyklen der SPPS.

Primärer Zyklus:

Nr.	Schritt	Reagenzien	Zeit (min)
1	Quellen	DMF	2 × 10
2	Fmoc-Abspaltung	Piperidin/DMF/NMP ¹ (1/1/1, v/v/v)	1 × 5 und 1 × 25
3	Waschen	DMF	1 × 7
4	Kupplung	(Fmoc-AS/HOBt/HBTU/DIPEA) ²	2 × 95
5	Waschen	DMF	2 × 1

Nachfolgende Zyklen:

Nr.	Schritt	Reagenzien	Zeit (min)
1	Waschen	DMF	2 × 1
2	Fmoc-Abspaltung	Piperidin/DMF/NMP ¹ (1:1:1)	5+15 ³
3	Waschen	DMF	7 × 1
5	Kupplung	(Fmoc-AS/HOBt/HBTU/DIPEA) ²	2 × 95
6	Waschen	DMF	2 × 1

¹ versetzt mit Triton-X 100, 1 % (w/v) und 1 mol/L Ethylencarbonat im Ansatz¹²⁹

² im Molverhältnis 4:4:4:8 (bezogen auf die initiale Beladung des Harzes)

³ ab 10. Zyklus: 20 Minuten bei der 2. Abspaltung

5.8.3 Methode B

Beladung eines 2-Cl-Tritylchlorid-Harzes (2Cl-Trt-Cl) mit einer Fmoc-Aminosäure

1 äq. der Fmoc-Aminosäure wurde in trockenem DCM suspendiert und mit 4 äq. DIPEA versetzt. Die klare Lösung wurde zum 2-Cl-Tritylchlorid-Harz (Beladung 1,5 mmol/g) gegeben und 2 h bei Raumtemperatur geschüttelt. Anschließend wurde die Reaktionslösung abgesaugt und das Harz 3 × 1 min mit DCM/MeOH/DIPEA (17:2:1 (v/v/v)) gewaschen. Zum Schluss wurde noch je 3 × 1 min mit DCM, DMF und erneut mit DCM gewaschen und das Harz *in vacuo* getrocknet.

5.8.4 Methode C

Beladung des Tritylchlorid-Harzes (Trt-Cl) mit einem Diamin

4 äq. des Diamins wurden in trockenem THF oder DCM gelöst und zu 1 äq. des Harzes hinzugegeben. Der Reaktionsansatz wurde 2 h bei Raumtemperatur geschüttelt. Anschließend wurde die Reaktionslösung abgesaugt und das Harz 3 × 1 min mit DCM/MeOH/DIPEA (17:2:1 (v/v/v)) gewaschen. Zum Schluss wurde noch je 3 × 1 min mit DCM, DMF und erneut mit DCM gewaschen und das Harz *in vacuo* getrocknet.

5.8.5 Methode D

Mild saure Harzabspaltung unter Erhalt der Seitenkettenschutzgruppen

Nach Beendigung der Festphasenpeptidsynthese wurde das harzgebundene Peptid mit 1 % TFA in DCM für 3×30 min geschüttelt. Die vereinigten Reaktionslösungen wurden in einem Kolben gesammelt und jeweils sofort mit DIPEA neutralisiert. Anschließend wurde das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt.

5.8.6 Methode E

Stark saure Harz- und Schutzgruppenabspaltung

Nach Beendigung der Festphasenpeptidsynthese wurde das harzgebundene oder frei vorliegende Peptid für 2 h bei Raumtemperatur mit TFA/TIS/H₂O (95/2.5/2.5 (v/v/v)) behandelt. Die Abspalllösung wurde in einen ca. 10-fachen Überschuss an kaltem Diethylether getropft. Das Präzipitat wurde abzentrifugiert, 3×1 min mit Diethylether gewaschen und zum Schluss *in vacuo* getrocknet. Die Vollständigkeit der Abspaltung wurde mittels HPLC kontrolliert, gegebenenfalls wurde die Abspaltung wiederholt.

5.8.7 Methode F

PyBOP oder BOP Kupplung in Lösung

1 äq. Aminkomponente und 1 äq. Carbonsäurekomponente wurden in DMF (ca. 5 mL/mmol) gelöst und mit 1 äq. PyBOP oder BOP, 3 äq. 6-Cl-HOBT und 2 oder 3 äq. DIPEA (3 äq. nur, wenn die Aminokomponente als Salz vorlag) versetzt. Der pH-Wert wurde kontrolliert und bei Bedarf mittels zusätzlichem DIPEA auf 8,5 bis 9,5 eingestellt. Der Reaktionsansatz wurde für 30 min bei 0 °C und für weitere 2 h bei RT gerührt. Anschließend wird das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt. Der Rückstand wird in EtOAc aufgenommen, $3 \times$ mit KHSO₄-Lösung, $3 \times$ mit gesättigter NaHCO₃-Lösung und $3 \times$ mit ges. NaCl-Lösung gewaschen. Die organische Phase wurde über Na₂SO₄ getrocknet und das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt.

5.8.8 Methode G

Hydrierung

Die Substanz wurde in Eisessig oder MeOH gelöst und mit 10 % Pd/C-Katalysator (ca. 10 % der Masse des Eduktes) versetzt. Der Ansatz wurde über Nacht unter einer Wasserstoffatmosphäre bei Raumtemperatur gerührt. Bei erfolgreicher Reaktion (Kontrolle mit HPLC) wurde der Katalysator abfiltriert und das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt.

5.8.9 Methode H

Reduktion einer Nitrogruppe zur Aminogruppe

1 äq. einer Nitroverbindung wurde mit 20 äq. Eisessig, einige Tropfen Wasser und 30 äq. Zinkpulver versetzt und der Ansatz 2 h bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde der Ansatz durch zwei Filter filteriert, mit EtOAc verdünnt, 3 × mit KHSO₄-Lösung und 3 × mit ges. NaCl-Lösung gewaschen. Die organische Phase wurde mit MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt.

5.8.10 Methode I

Aufbau einer Guanidinogruppe aus einer Aminogruppe

1 äq. der Aminokomponente wurde in DMF gelöst (10 mL/mmol) und mit 3 äq. 1-*H*-Pyrazolcarboxamidin × HCl und 6 äq. DIPEA versetzt. Nach 16 h wurde eine Reaktionskontrolle mittels HPLC durchgeführt. Bei unvollständigem Umsatz wurde eine entsprechende Menge an 1-*H*-Pyrazolcarboxamidin × HCl und DIPEA hinzugefügt und der Ansatz weitere 12 h gerührt. Bei ausreichendem Umsatz (Kontrolle mit HPLC) wurde das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt.

5.8.11 Methode J

Intramolekulare Zyklisierung in Lösung

Das Peptid mit freier Amino- und Carboxylgruppe wurde in DMF gelöst (ca. 100 mL/0,1 mmol). Die Mischung wurde mit 3 äq. BOP und 6 äq. DIPEA für 1 h bei 0 °C gerührt. Bei Bedarf wurde der pH-Wert mit zusätzlichem DIPEA auf 8,5 – 9,5 eingestellt. Der Ansatz wurde weitere 48 - 72 h bei RT gerührt und die Zyklisierung mittels HPLC kontrolliert. Bei ausreichendem Umsatz wurde das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt.

5.8.12 Methode K

Abspaltung der am Rink-Amid-Harz gebundenen Fmoc-Schutzgruppe

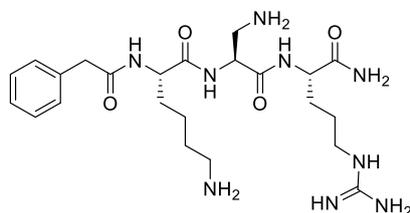
0,1 g Rink-Amid-Harz wurden 2 × mit DMF gespült und für eine Weile quellen gelassen. Danach wurde das Harz zuerst für 5 min und anschließend für 15 min mit 20 % Piperidin in DMF behandelt.

5.9 Synthese der Inhibitoren 10 - 14 mit acylierten α,γ -Diaminobutter- und α,β -Diaminopropionsäurerest in P2-Position

Die Synthese dieser Verbindungen ist in Schema 1 auf S. 34 dargestellt.

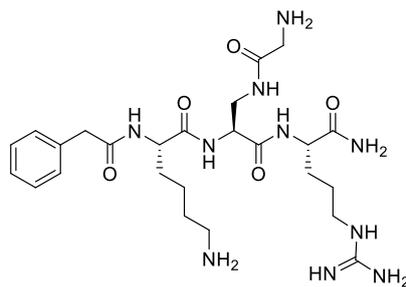
0,1 g Fmoc-Rink-Amid-Harz (Beladung 0,68 mmol/g) wurden initial mit 20 % Piperidin in DMF für insgesamt 20 min behandelt um die gebundene Fmoc-Schutzgruppe zu entfernen (Methode K). Danach wurde die Peptidkette nach Methode A aufgebaut. Als P2-Baustein wurde Fmoc-Dap(Mtt)-OH oder Fmoc-Dab(Mtt)-OH verwendet. Nachdem die Peptidsequenz aufgebaut war, wurde die Mtt-Gruppe mit 1 % TFA in DCM für 3×30 min abgespalten und an die entstandene freie Aminogruppe verschiedene Aminosäuren gekuppelt. Die entstandenen Peptide wurden anschließend nach Methode E vom Harz und den Schutzgruppen befreit, in Diethylether gefällt und zentrifugiert. Das Pellet wurde nochmal mit Ether gewaschen, das Rohprodukt abzentrifugiert und mittels präparativer HPLC gereinigt. Die produktenthaltenden Fraktionen wurden aus Reinstwasser lyophilisiert.

10 PhAc-Lys-Dap-Arg-NH₂ × 3 TFA



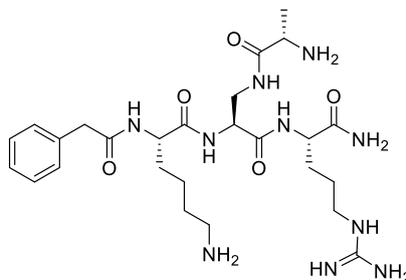
Ausbeute: 10,1 mg; weißes Pulver; Reinheit: 99 %; HPLC (% B): 17,3; MS ber. m/z: 505,31 (M), MS gef. m/z: 506,3 (M+H)⁺.

11 PhAc-Lys-Dap(Gly)-Arg-NH₂ × 3 TFA



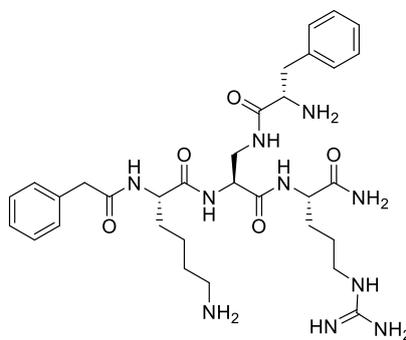
Ausbeute: 46,2 mg; weißes Pulver; Reinheit: 98,6 %; HPLC (% B): 16,0; MS ber. m/z: 562,33 (M), MS gef. m/z: 563,7 (M+H)⁺.

12 PhAc-Lys-Dap(Ala)-Arg-NH₂ × 3 TFA



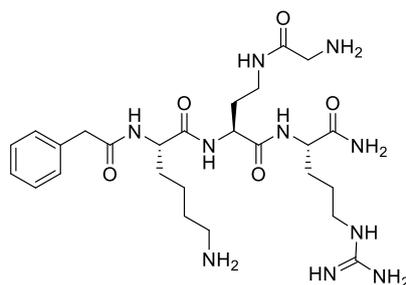
Ausbeute: 12 mg; weißes Pulver; Reinheit: 98,6 %; HPLC (% B): 16,7; MS ber. m/z: 576,35 (M), MS gef. m/z: 577,45 (M+H)⁺.

13 PhAc-Lys-Dap(Phe)-Arg-NH₂ × 3 TFA



Ausbeute: 10 mg; weißes Pulver; Reinheit > 99,5 %; HPLC (% B): 20,7; MS ber. m/z: 652,38 (M), MS gef. m/z: 653,62 (M+H)⁺.

14 PhAc-Lys-Dab(Gly)-Arg-NH₂ × 3 TFA



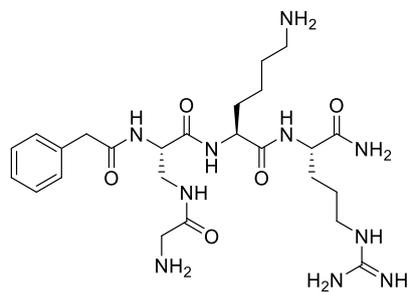
Ausbeute: 20,2 mg; weißes Pulver; Reinheit: 98,6 %; HPLC (% B): 17,86; MS ber. m/z: 576,35 (M), MS gef. m/z: 289,2 (M+2H)²⁺/2.

5.10 Synthese der Inhibitoren 15 - 19 mit acylierten α,γ -Diaminobutter- und α,β -Diaminopropionsäureresten in P3-Position

Die Synthese der sehr ähnlichen, allerdings in P2 modifizierten Verbindungen ist in Schema 1 auf S. 33 dargestellt.

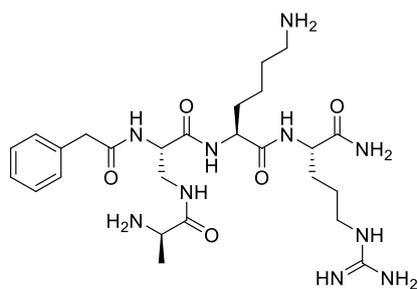
0,1 g Fmoc-Rink-Amid-Harz (Beladung 0,68 mmol/g) wurden initial mit 20 % Piperidin in DMF für insgesamt 20 min behandelt, um die Fmoc-Schutzgruppe zu entfernen (Methode K). Danach wurde die Peptidkette nach Methode A aufgebaut. Als P3-Baustein wurde Fmoc-Dap(Mtt)-OH oder Fmoc-Dab(Mtt)-OH verwendet. Nach vollständigem Aufbau der Peptidsequenz wurde die Mtt-Schutzgruppe mit 1 % TFA in DCM für 3 × 30 min abgespalten, dabei kam es zu einer stark gelblichen Verfärbung. Anschließend wurde die freigesetzte Aminogruppe mit verschiedenen geschützten D- und L-Aminosäurederivaten gekuppelt. Die Peptide wurden anschließend nach Methode E unter stark sauren Bedingungen vom Harz abgespalten und gleichzeitig die Schutzgruppen entfernt. Das Rohpeptid wurde anschließend in einem Überschuss an Diethylether gefällt und zentrifugiert. Das Pellet wurde nochmals mit Ether gewaschen, das Rohprodukt abzentrifugiert und mittels präparativer HPLC gereinigt. Die produktenthaltenden Fraktionen wurden aus Reinstwasser lyophilisiert.

15 PhAc-Dap(Gly)-Lys-Arg-NH₂ × 3 TFA



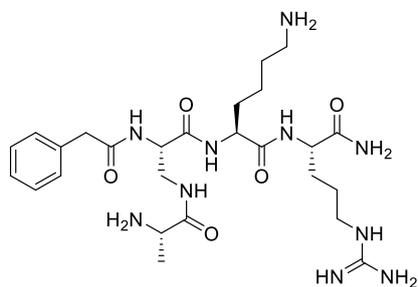
Ausbeute: 46,2 mg; weißes Pulver; Reinheit: 98,6 %; HPLC (% B): 15,5; MS ber. 562,33 (M), MS gef. m/z: 563,34 (M+H)⁺.

16 PhAc-Dap(DAla)-Lys-Arg-NH₂ × 3 TFA



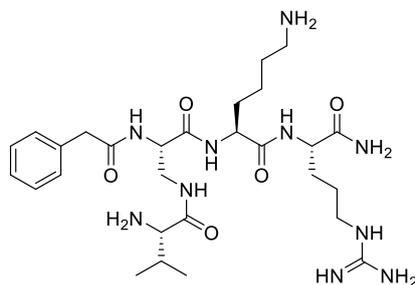
Ausbeute: 40 mg; weißes Pulver; Reinheit: 97,5 %; HPLC (% B): 16,32; MS ber. m/z: 576,35 (M), MS gef. m/z: 577,33 (M+H)⁺.

17 PhAc-Dap(Ala)-Lys-Arg-NH₂ × 3 TFA



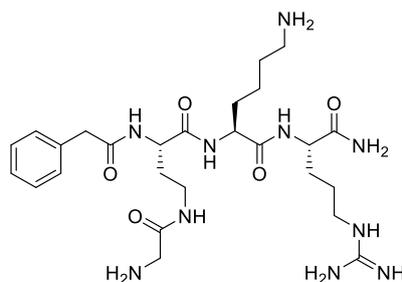
Ausbeute: 41,8 mg; weißes Pulver; Reinheit: 96,5 %; HPLC (% B): 16;0; MS ber. m/z: 576,35 (M), MS gef. m/z: 577,44 (M+H)⁺.

18 PhAc-Dap(Val)-Lys-Arg-NH₂ × 3 TFA



Ausbeute: 36,1 mg; weißes Pulver; Reinheit: 96,5 %; HPLC (% B): 19,6; MS ber. m/z: 604,38 (M), MS gef. m/z: 605,53 (M+H)⁺.

19 PhAc-Dab(Gly)-Lys-Arg-NH₂ × 3 TFA



Ausbeute: 20,5 mg; weißes Pulver; Reinheit: 97,2 %; HPLC (% B): 17,7; MS ber. m/z: 567,35 (M), MS gef. m/z: 594,4 (M+NH₄)⁺.

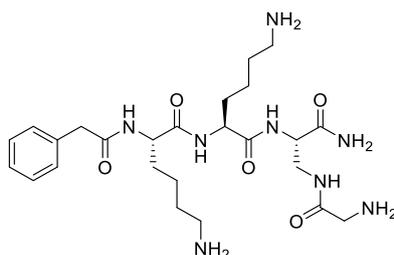
5.11 Synthese der Inhibitoren 20 - 23 mit acylierten α,γ -Diaminobutter- und α,β -Diaminopropionsäurerest in P1-Position

Die Synthese dieser Verbindungen ist in Schema 2 auf S. 38 dargestellt.

0,1 g Fmoc-Rink-Amid-Harz (Beladung 0,68 mmol/g) wurden initial mit 20 % Piperidin in DMF für insgesamt 20 min behandelt um die gebundene Fmoc-Schutzgruppe zu entfernen (Methode K). Danach wurde die Peptidkette nach Methode A aufgebaut. Als P1-Baustein wurden entweder Fmoc-Dap(Mtt)-OH oder Fmoc-Dab(Mtt)-OH verwendet. Anschließend wurde die Mtt-Schutzgruppe am P1-Rest mit 1 % TFA in DCM für 3 × 30 min abgespalten und an die entstandene Aminogruppe Fmoc-Gly-OH gekuppelt. Danach wurde die Fmoc-Gruppe wieder mit 20 % Piperidin entfernt, der Ansatz mehrfach mit DMF und DCM gewaschen und geteilt. Eine Hälfte wurde direkt nach Methode E unter stark sauren

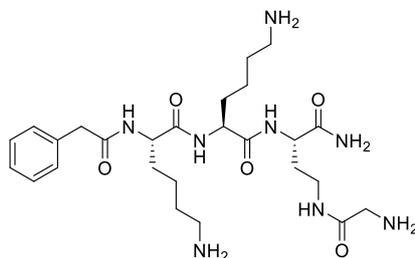
Bedingungen vom Harz und den Schutzgruppen befreit, in Diethylether gefällt und gereinigt. Die Aminogruppe am Glycin der anderen Hälfte wurde nach Methode I in ein Guanidin überführt. Danach erfolgte die stark saure Abspaltung nach Methode E und anschließend das Peptid in Diethylether gefällt und mittels präparativer HPLC gereinigt.

20 PhAc-Lys-Lys-Dap(Gly)-NH₂ × 3 TFA



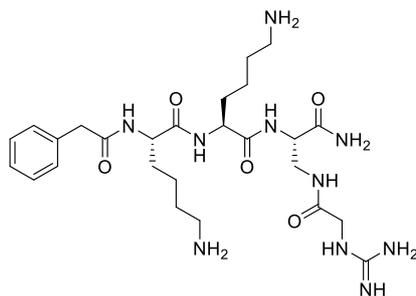
Ausbeute: 5 mg; weißes Pulver; Reinheit: 98,6 %; HPLC (% B): 15,2; MS ber. m/z: 534,33 (M), MS gef. m/z: 535,3 (M+H)⁺.

21 PhAc-Lys-Lys-Dab(Gly)-NH₂ × 3 TFA



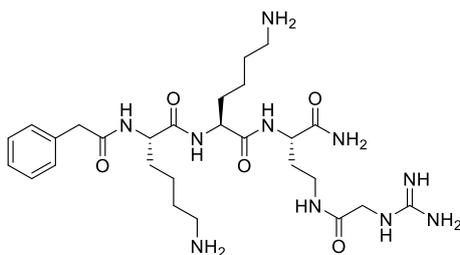
Ausbeute: 5 mg; weißes Pulver; Reinheit: 98,6 %; HPLC (% B): 16,25; MS ber. m/z: 548,34 (M), MS gef. m/z: 571,64 (M+Na)⁺.

22 PhAc-Lys-Lys-Dap(N(Ca)Gly)-NH₂ × 3 TFA



Ausbeute: 4 mg; weißes Pulver; Reinheit: 98,6 %; HPLC (% B): 16,06; MS ber. m/z: 576,35 (M), MS gef. m/z: 577,34 (M+H)⁺.

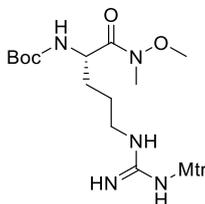
23 PhAc-Lys-Lys-Dab(N(Ca)Gly)-NH₂ × 3 TFA



Ausbeute: 4 mg; weißes Pulver; Reinheit: 93,9 %; HPLC (% B): 16,39; MS ber. m/z: 590,37 (M), MS gef. m/z: 591,38 (M+H)⁺.

5.12 Synthese der Arginylketon-Derivate

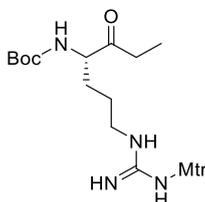
24a Boc-Arg(Mtr)-N-CH₃-O-CH₃



1,01 g (2 mmol, 1 äq.) Boc-Arg(Mtr)-OH und 0,214 g (2 mmol, 1 äq.) N-Methyl-O-Methylhydroxylamin \times HCl wurden mittels 0,918 g BOP (1 äq.) und 1,084 ml DIPEA (3 äq.) nach Methode F miteinander gekuppelt, aufgearbeitet und anschließend gereinigt (Zwischenprodukt **24a**).

Ausbeute: 1,07 g (98,35%); Reinheit: 99 %; HPLC (% B): 54,4; MS ber. m/z: 529,26 (M), MS gef. m/z: 530,30 (M+H)⁺.

24b Boc-Arg(Mtr)-CH₂-CH₃



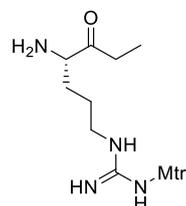
0,724 g (1,367 mmol, 1 äq.) des Weinrebamides **24a** und 0,5 g (0,1 mol) LiCl wurden in wasserfreiem THF gelöst und auf 0 °C gekühlt. Zu diesem Ansatz wurde unter Argon-Atmosphäre tropfenweise 13,67 mL (10 äq.) EtMgBr hinzugegeben. Der Ansatz wurde für 30 min bei RT weiter gerührt und der Umsatz mittels HPLC kontrolliert.

Das entstandene Zwischenprodukt **24b** wurde über eine Kieselgelsäule gereinigt (Fließmittel: 1:20 MeOH/DCM).

Ausbeute: 0,9 g; weißes Pulver; Reinheit: 75 % (Reste des Zwischenproduktes **24a** (Weinrebamid) konnten nicht vollständig abgetrennt werden und wurden ebenfalls an das nachfolgend beschriebene Peptidsegment PhAc-Lys(Boc)-Lys(Boc)-OH gekuppelt. Auf diese

Weise wurde am Ende auch das peptidische Weinrebamid **25** isoliert (siehe unten); HPLC (%B): 55,8.

24c H-Arg(Mtr)-CH₂-CH₃ × HCl



Im Anschluss wurde die Boc-Schutzgruppe des Rohproduktes **24b** (0,0705 g, 0,14 mmol) mit 15 % TFA in DCM für 30 min bei Raumtemperatur selektiv abgespalten. Danach wurde das Produkt in kaltem Diethylether gefällt, 3 × mit Diethylether gewaschen und jeweils zentrifugiert (**24c**).

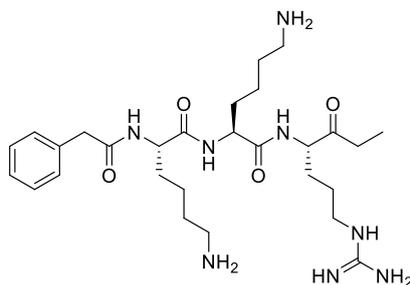
Ausbeute: 0,05 g bräunliches Öl; HPLC (% B) 35,9; MS ber. m/z: 398,2 (M), MS gef. m/z: 399,2 (M+H)⁺.

24d PhAc-Lys(Boc)-Lys(Boc)-OH

Parallel dazu wurde das Peptidsegment PhAc-Lys(Boc)-Lys(Boc)-OH am 2-Cl-Tritylchloridharz hergestellt (**24d**). Dazu wurde 1 g 2-Cl-Tritylchlorid-Harz nach Methode B mit Fmoc-Lys(Boc)-OH beladen und anschließend das Peptidsegment mittels manueller Festphasensynthese nach Methode A aufgebaut. Danach wurde das Peptid nach Methode D unter mild-sauren Bedingungen unter Erhalt der Seitenkettenschutzgruppen abgespalten und die gewonnene Lösung *in vacuo* eingeeengt.

Ausbeute: 0,75 g bräunliches Öl; Reinheit: 97 %; HPLC (% B): 57,5.

24 PhAc-Lys-Lys-Arg-Ethylketon × 3 TFA



0,084 g (ca. 0,14 mmol) des Peptidsegments **24d** wurden in DMF gelöst und mit H-Arg(Mtr)-CH₂-CH₃ × HCl **24c** nach Methode F mit 0,069 g (1,1 äq.) BOP gekuppelt. Anschließend wurden nach Methode E unter stark sauren Bedingungen sämtliche Schutzgruppen abgespalten, das Peptid mittels präparativer HPLC gereinigt und aus Wasser lyophilisiert. (Inhibitor **24**).

Ausbeute: 15 mg; weißes Pulver; Reinheit: 95 %; HPLC (% B): 21,36; MS ber. m/z: 560,38 (M), MS gef. m/z: 281,19 (M+2H)²⁺/2.

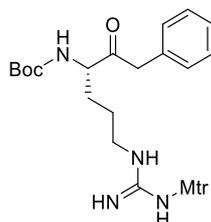
In einer parallelen Synthese wurde auf diesem Wege Inhibitor **26** dargestellt indem anstatt von EtMgBr, BzIMgBr verwendet wurde. Zusätzlich wurde das entsprechende nicht weiter umgesetzte Weinrebamid isoliert (Verbindung **25**).

25 PhAc-Lys-Lys-Arg-Weinrebamid × 3 TFA

Das Weinrebamid-Derivat **25** wurde als Nebenprodukt bei der Synthese des unten beschriebenen Ethylketons **24** erhalten. Die Reinheit betrug jedoch nur ca. 87 % (HPLC-Detektion bei 220 nm).

Ausbeute: 2 mg; weißes Pulver; Reinheit: 87 %; HPLC (% B): 19,25

26a Boc-Arg(Mtr)-CH₂-C₆H₅



0,499 g (0,944 mmol, 1 äq.) des Weinrebamides **24a** und 0,5 g (0,1 mol) LiCl wurden in wasserfreiem THF gelöst und auf 0 °C gekühlt. Zu diesem Ansatz wurde unter Argon-Atmosphäre tropfenweise 13,67 mL (10 äq.) BzLMgBr hinzugegeben.

26 PhAc-Lys-Lys-Arg-Benzylketon × 3 TFA

0,101 g (ca. 0,18 mmol) Boc-Arg(Mtr)-CH₂-C₆H₅ wurden mit 2 ml 15% TFA in DCM für 30 min bei RT gerührt und anschließend in Diethylether gefällt. Nachdem das Präzipitat getrocknet wurde, wurde es mit 0,107 g des Peptidsegments **24d** in DMF mit 0,069 g (1,1 äq) BOP nach Methode F gekuppelt. Anschließend wurden nach Methode E unter stark sauren Bedingungen sämtliche Schutzgruppen abgespalten, das Peptid mittels präparativer HPLC gereinigt und aus Wasser lyophilisiert (Inhibitor **26**).

Ausbeute: 9 mg; weißes Pulver; Reinheit: 96 %; HPLC (% B): 27,52; MS ber. m/z: 622,8 (M), MS gef. m/z: 623,23 (M+H)⁺.

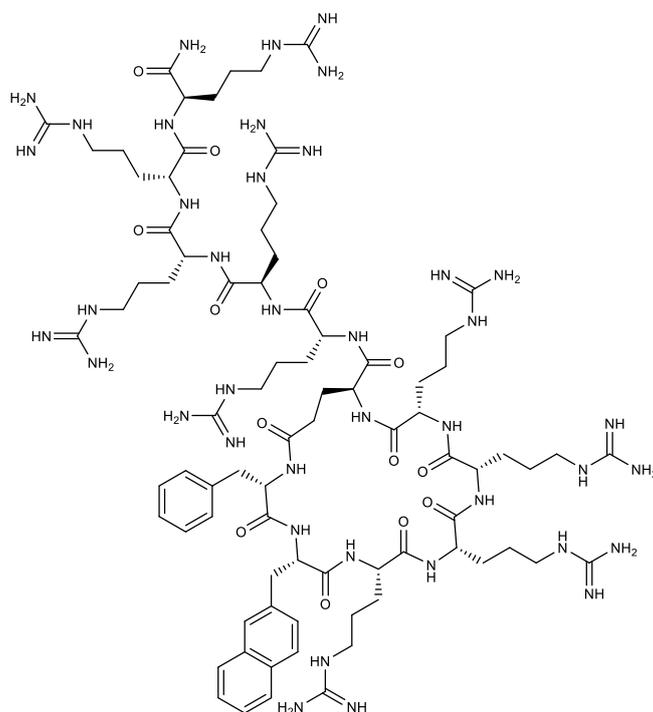
5.13 Synthese der zyklischen Peptide

Die Synthese dieser beiden Verbindungen ist in Schema 4 auf S. 43 dargestellt.

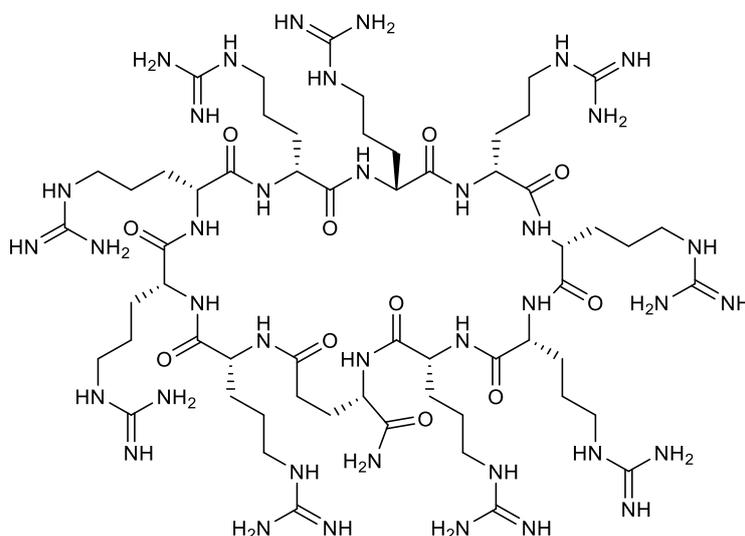
Ausgehend vom Fmoc-Rink-Amid-Harz (0,1 g, Beladung 0,68 mmol/g) wurden die Fmoc-Aminosäuren mittels automatischer Festphasenpeptidsynthese nach Methode A2 gekuppelt. Nach Kupplung der letzten Aminosäure wurde die Synthese manuell fortgesetzt. Zuerst wurde die N-terminale Fmoc-Schutzgruppe abgespalten und anschließend der Seitenkettenschutz des in der Sequenz enthaltenen Glu(O-2-PhiPr)-Restes unter mild sauren Bedingungen entfernt (3 × 1 % TFA in DCM für 30 min). Die frei gewordene Carboxylfunktion der Glutaminsäure wurde im nächsten Schritt mit der Aminogruppe des N-terminalen Restes (vom DArg bei Inhibitor **28** und vom Phe bei Inhibitor **27**) am Harz zyklisiert. Dazu wurden die 0,1 g Harz

mit 78 mg PyBOP als Kupplungsreagenz (5 äq.), 25 mg (5 äq.) des Additivs 6-Cl-HOBt und 52,5 μ L (10 äq.) DIPEA versetzt und der Ansatz 3 h geschüttelt. Nach gründlichem Waschen (3 \times DMF und 3 \times DCM) wurden alle restlichen Schutzgruppen unter stark sauren Bedingungen entfernt und gleichzeitig das Peptid vom Harz abgespalten (Methode E). Das in Diethylether gefällte Peptid wurde abzentrifugiert, mit Ether gewaschen und mittels präparativer HPLC gereinigt.

27 $c[\text{Phe-2-Nal}-(\text{Arg})_4\text{-Glu}]\text{-(DArg)}_5\text{-NH}_2$



Ausbeute: 1,5 mg; weißes Pulver; Reinheit: 99 %; HPLC (% B): 32,03; MS ber. m/z: 1878,21 (M), MS gef. m/z: 940 (M+2H)²⁺/2.



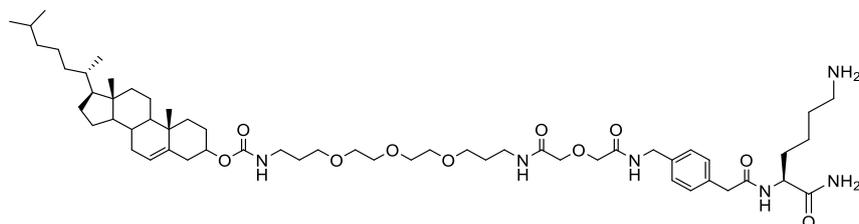
Ausbeute: 1 mg; weißes Pulver; Reinheit: 92 %; HPLC (% B): 18;2; MS ber. m/z: 1533,8 (M), MS gef. m/z: 767,9 (M+2H)²⁺/2.

5.14 Synthese der Cholesteryl- und Dihydrocholesterylderivate

Die Synthese dieser Verbindungen ist in Schema 6,7 und 8 dargestellt.

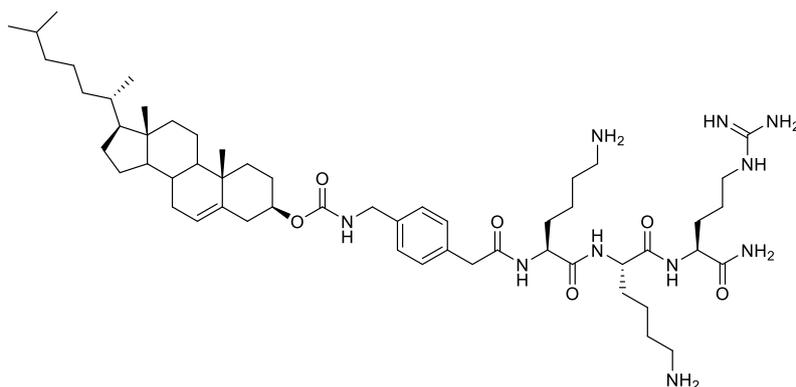
0,1 g Fmoc-Rink-Amid-Harz (Beladung 0,68 mmol/g) wurden mit 20 % Piperidin in DMF für insgesamt 20 min behandelt, um die Fmoc-Schutzgruppe zu entfernen (Methode K). Danach wurde die Peptidkette nach Methode A mittels manueller Festphasenpeptidsynthese aufgebaut. Im letzten Synthesesyklus wurde Cholesterylchloroformiat (3 äq.) für den Kupplungsschritt eingesetzt, dass zuvor in Gegenwart von DIPEA in DCM gelöst wurde. Nach 2 h wurde die Reaktion beendet und das Peptid nach Methode E unter stark sauren Bedingungen vom Harz abgespalten. Parallel dazu wurden die Schutzgruppen entfernt, das Rohprodukt in Diethylether gefällt und mittels präparativer HPLC gereinigt.

29 Chol-CO-EGL-4-AMePhAc-Lys-NH₂ × TFA



Ausbeute: 15 mg; weißes Pulver; HPLC (% B): 61,61; MS ber. m/z: 1022,7 (M), MS gef. m/z: 1023,6 (M+H)⁺. Die Verbindung ist mit dem hydrierten Dihydrocholsterylderivat verunreinigt, das mittels präparativer HPLC nicht abgetrennt werden konnte. (prozentuale Menge der Verunreinigung per HPLC ca. 50%).

30 Chol-CO-4-AMePhAc-Lys-Lys-Arg-NH₂ × 3 TFA



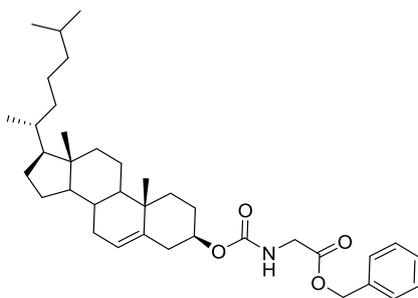
Ausbeute: 7 mg; weißes Pulver; HPLC (% B): 48,0; MS ber. m/z: 988,72 (M), MS gef. m/z: 989,7 (M+H)⁺. Die Verbindung ist mit dem hydrierten Dihydrocholsterylderivat verunreinigt, das mittels präparativer HPLC nicht abgetrennt werden konnte. (prozentuale Menge der Verunreinigung per HPLC ca. 50%).

Die beiden folgenden Verbindungen **29** und **30** zeigten einen Doppelpeak auf der analytischen HPLC. Die Nebenprodukte konnten in beiden Fällen durch präparative HPLC nicht abgetrennt werden (Unterschied in der HPLC von weniger als 0,5 %). Mittels MS wurde für beide Nebenprodukte eine um zwei Masseinheiten größere Masse im Vergleich zum jeweils gewünschten Produkt bestimmt. Vermutlich handelt es sich in beiden Fällen um Analoga mit reduziertem Cholesterylrest. Um dies zu verifizieren, wurden in der folgenden Serie hydrierte Cholesterylinhibitoren hergestellt, die nach finaler präparativer HPLC keine Doppelpeaks in den analytischen HPLC-Chromatogrammen zeigten. Die Inhibitoren **29** und **30** wurden

trotzdem enzymkinetisch zum Vergleich vermessen, da der Einfluss der Doppelbindung auf die Hemmwirkung sehr wahrscheinlich relativ gering ist.

Die hydrierten Cholesteryl-derivate wurden erhalten, indem 1 äq. Cholesterylchloroformiat (1 g) mit 1,1 äq. H-Gly-OBzl p-Tosylat (0,82 g) und 2 äq. N-Methylmorpholin (0,52 g) in DCM gelöst und für 1 h gerührt wurden. Danach wurde 3 × mit KHSO₄, 3 × mit gesättigter NaCl-Lösung gewaschen und anschließend die organische Phase mit MgSO₄ getrocknet. Nach Entfernung des Lösungsmittels am Rotationsverdampfer wurde Zwischenprodukt **31a** erhalten.

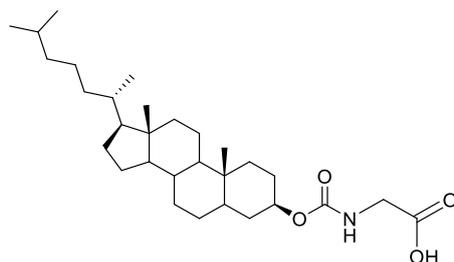
31a Chol-CO-Gly-Benzylester



Ausbeute: 1,2 g, (95 %), weißes Pulver; HPLC (% B): 72,9; MS ber. m/z: 577,41 (M), MS gef. m/z: 595,5 (M+NH₄)⁺.

1,2 g (2,1 mmol) des Zwischenproduktes **31a** wurden in reiner Essigsäure gelöst und mit 0,14 g 10 % Palladium/Kohle als Katalysator versetzt. Der Ansatz wurde bei 70 °C für 8 h unter Wasserstoffatmosphäre gerührt. Danach wurde der Ansatz filtriert und das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt. Während der Hydrierung wurde zusätzlich die Benzylestergruppe abgespalten und direkt das Intermediat **31b** erhalten.

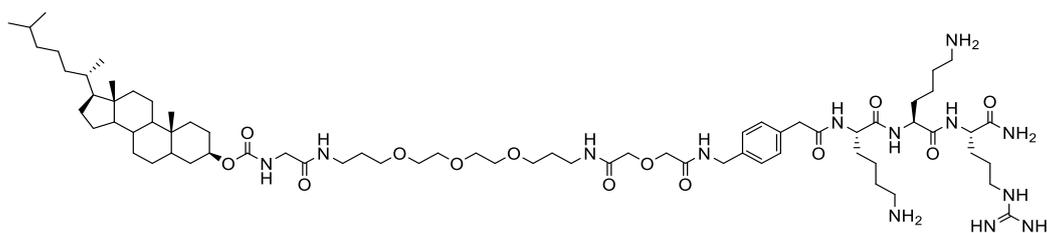
31b Di-H-Chol-CO-Gly-OH



Ausbeute: 1 g; weißes Pulver; MS ber. m/z: 489,73 (M), MS gef. m/z: 488,49 (M-H)⁻.

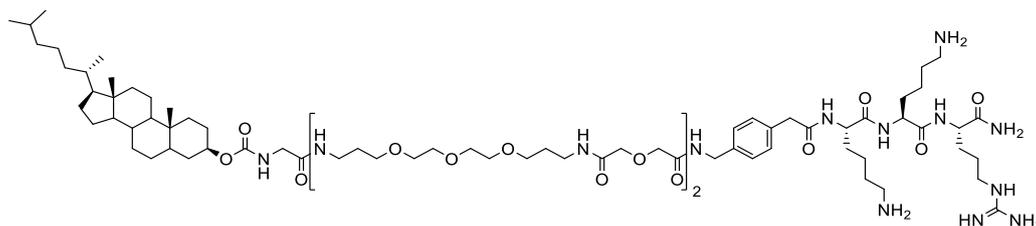
Die Dihydrocholesteryl-Inhibitoren **31** - **34** wurden nach Methode A jeweils ausgehend von 0,1 g Fmoc-Rink-Amid-Harz (Beladung 0,68 mmol/g) synthetisiert. Im letzten Zyklus wurde abweichend von den Synthesen der Inhibitoren **29** und **30** das reduzierte Dihydrocholesterylderivat **31b** verwendet, dass zuvor in DCM gelöst und mit dem Kupplungsreagenz und DIPEA versetzt wurde. Nach 2 h wurde die Reaktion beendet und das Peptid nach Methode E unter stark sauren Bedingungen vom Harz abgespalten und anschließend in kaltem Diethylether gefällt. Im Anschluss wurde die Verbindung mittels präparativer HPLC, im Gegensatz zu der analytischen HPLC (C4-Säule), auf einer C8-Säule gereinigt.

31 Di-H-Chol-CO-Gly-EGL-4-AMePhAc-Lys-Lys-Arg-NH₂ × 3 TFA



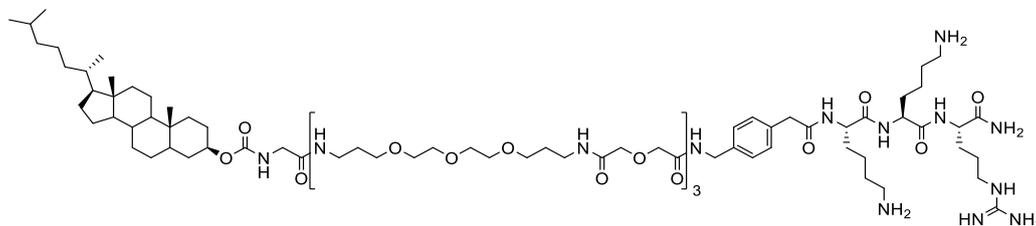
Ausbeute: 25 mg; weißes Pulver; Reinheit: 97 %; HPLC (% B): 41,45; MS ber. m/z: 1365,94 (M), MS gef. m/z: 684 (M+2H)²⁺/2.

32 Di-H-Chol-CO-Gly-(EGL)₂-4-AMePhAc-Lys-Lys-Arg-NH₂ × 3 TFA



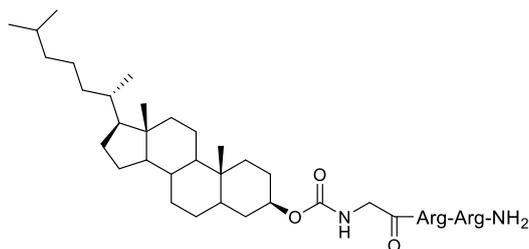
Ausbeute: 25 mg; weißes Pulver; Reinheit: 94,4 %; HPLC (% B): 45; MS ber. m/z: 1684,12 (M), MS gef. m/z: 974,18 (M+NH₄+TFA)²⁺/2.

33 Di-H-Chol-CO-Gly-(EGL)₃-4-AMePhAc-Lys-Lys-Arg-NH₂ × 3 TFA



Ausbeute: 20 mg; weißes Pulver; Reinheit: 92 %; HPLC (% B): 45,12; MS ber. m/z: 2002,29 (M), MS gef. m/z: 668,92 (M+3H)³⁺/3.

34 Di-H-Chol-CO-Gly-Arg-Arg-NH₂

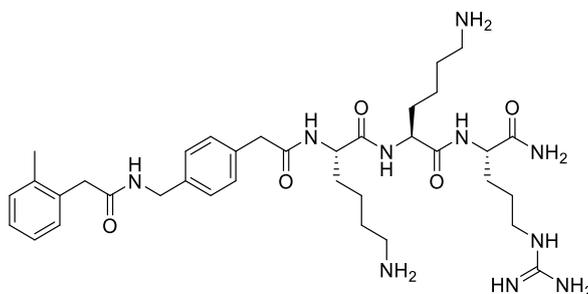


Ausbeute: 4 mg; weißes Pulver; Reinheit: 95 %; HPLC (% B): 45,12; MS ber. m/z: 800,6 (M), MS gef. m/z: 401,58 (M+2H)²⁺/2.

5.15 Synthese der Inhibitoren mit zusätzlichem P5-Rest

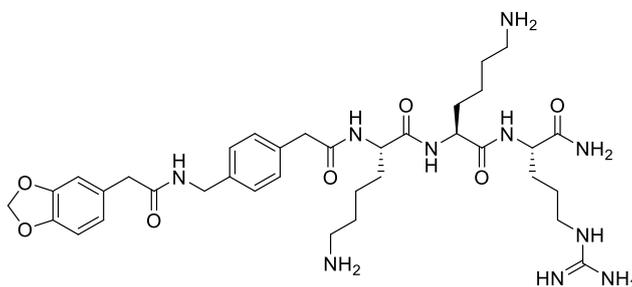
0,1 g Fmoc-Rink-Amid-Harz (Beladung 0,68 mmol/g) wurden mit 20 % Piperidin in DMF für insgesamt 20 min behandelt, um die am Harz gebundene Fmoc-Schutzgruppe zu entfernen. Danach wurde die Peptidkette mittels manueller Festphasenpeptidsynthese nach Methode A aufgebaut. Im letzten Zyklus wurden verschiedene Carbonsäurederivate als P5-Reste gekuppelt. Anschließend wurden die Peptide unter stark sauren Bedingungen nach Methode E abgespalten und die Rohprodukte in Diethylether gefällt sowie zentrifugiert. Nach präparativer Reinigung wurden die Produkte aus Reinstwasser lyophilisiert.

35 2-MePhAc-4-AMePhAc-Lys-Lys-Arg-NH₂ × 3 TFA



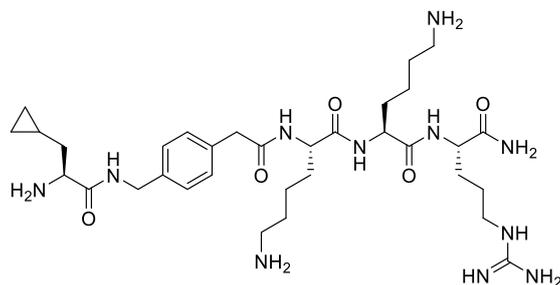
Ausbeute: 12 mg; weißes Pulver; Reinheit: 97 %; HPLC (% B): 26,3; MS ber. m/z: 708,44 (M), MS gef. m/z: 709,4 (M+H)⁺.

36 2-Benzodioxol-Ac-4-AMePhAc-Lys-Lys-Arg-NH₂ × 3 TFA



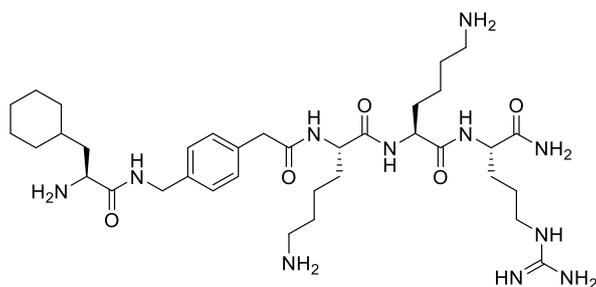
Ausbeute: 20 mg; weißes Pulver; Reinheit: 99 %; HPLC (% B): 24,65; MS ber. m/z: 738,42 (M), MS gef. m/z: 739,6 (M+H)⁺.

37 H-Cpa-4-AMePhAc-Lys-Lys-Arg-NH₂ × 4 TFA



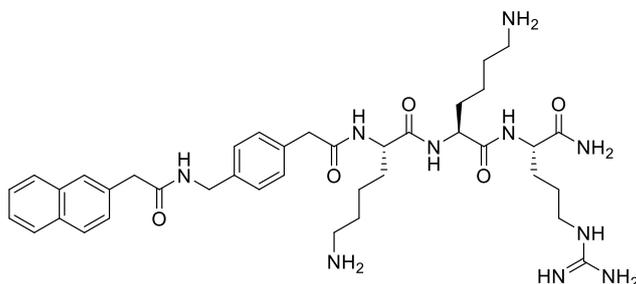
Ausbeute: 15 mg; weißes Pulver; Reinheit: 99,3 %; HPLC (% B): 16,5; MS ber. m/z: 687,45 (M), MS gef. m/z: 688,5 (M+H)⁺.

38 H-Cha-4-AMePhAc-Lys-Lys-Arg-NH₂ × 4 TFA



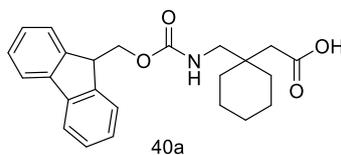
Ausbeute: 25 mg; weißes Pulver; Reinheit: 99,3 %; HPLC (% B): 22,7; MS ber. m/z: 729,5 (M), MS gef. m/z: 365,8 (M+2H)^{2+/2}.

39 Naphtylessigsäure-4-AMePhAc-Lys-Lys-Arg-NH₂ × 3 TFA



Ausbeute: 15 mg; weißes Pulver; Reinheit: 98 %; HPLC (% B): 30,6; MS ber. m/z: 744,94 (M), MS gef. m/z: 745,4 (M+H)⁺.

5.16 Inhibitoren mit einem Gabapentinrest in P1- oder P4-Position



1 äq. Gabapentin (0,4 g, 2,3 mmol) wurden in 30 ml Wasser und 25 ml ACN unter Zusatz von 0,4 mL (2,3 mmol) DIPEA (pH 8 - 9) gelöst. Zum Reaktionsansatz wurde 1 äq. (0,79 g, 2,3 mmol) in 25 ml ACN gelöstes Fmoc-OSu langsam zu getropft. Der pH-Wert wurde regelmäßig überprüft und durch zusätzliches DIPEA konstant auf 8 - 9 gehalten. Nach 2 h wurde das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt und der ölige Rückstand mit EE aufgenommen. Die organische Phase wurde 3 × mit KHSO₄ und 3 × mit ges. NaCl-Lösung gewaschen und mit MgSO₄ getrocknet. Die organische Phase wurde filtriert und das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt. Es entstand das Zwischenprodukt **40a**

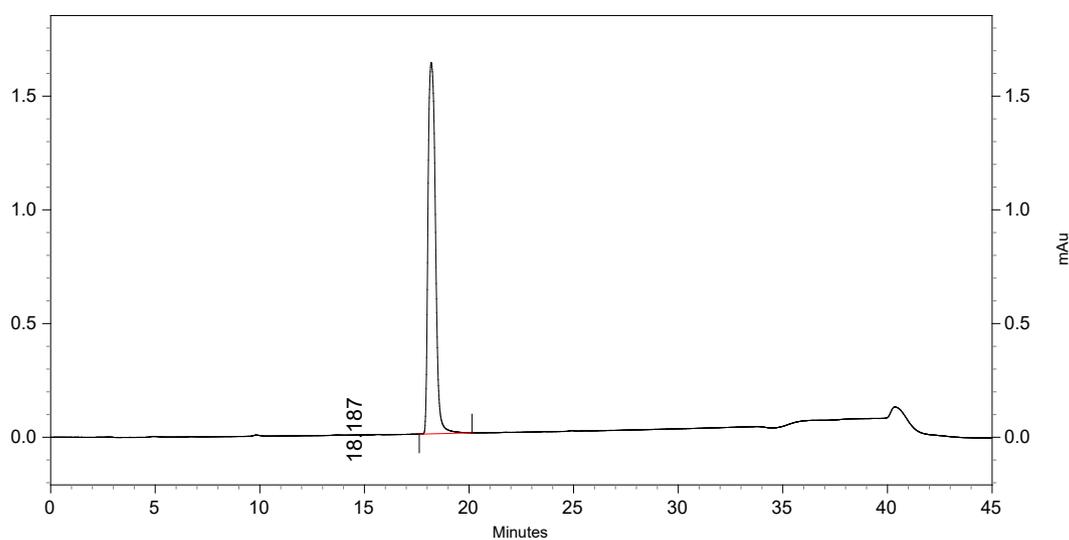


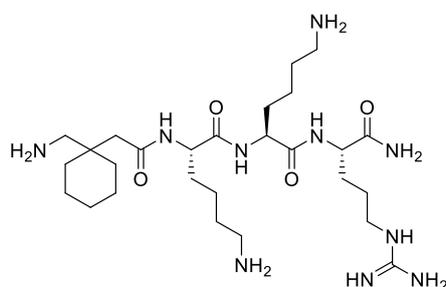
Abbildung 39: HPLC-Analyse des Zwischenproduktes **40a** nach Aufarbeitung.

(Startkonzentration 50 % LM B), die Verbindung eluiert bei 68,18 % AC (Reinheit > 99 % bei 220 nm)..

Ausbeute: 0,9 g (99,5%), weißes Pulver; Reinheit: > 99 %; HPLC (% B): 68,18; MS ber. m/z: 393,19 (M), MS gef. m/z: 394,2 (M+H)⁺.

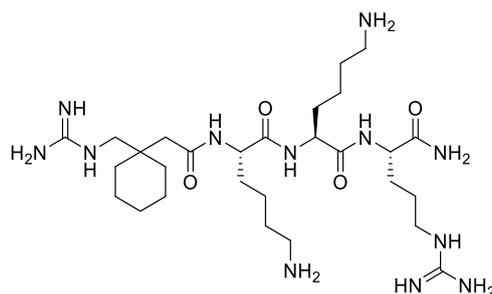
Mit dem Baustein Fmoc-Gabapentin (**40a**) wurden mittels manueller Festphasensynthese nach Methode A mehrere Peptidsequenzen synthetisiert. Nach Abspaltung der N-terminalen Fmoc-Gruppe mit 20 % Piperidin in DMF nach Standardbedingungen wurden zur Synthese der Verbindungen **40** und **42** die Seitenkettenschutzgruppen unter stark sauren Bedingungen nach Methode E abgespalten und die Peptide in Diethylether gefällt. Zur Herstellung der Verbindung **41** wurde nach Abspaltung der terminalen Fmoc-Gruppe in Analogie zur Methode I die entstandene Aminogruppe direkt am Harz mit 3 äq. 1-*H*-Pyrazolcarboxamidin \times HCl und 6 äq. DIPEA in eine Guanidinogruppe überführt.

40 Gabapentin-Lys-Lys-Arg-NH₂ \times 4 TFA



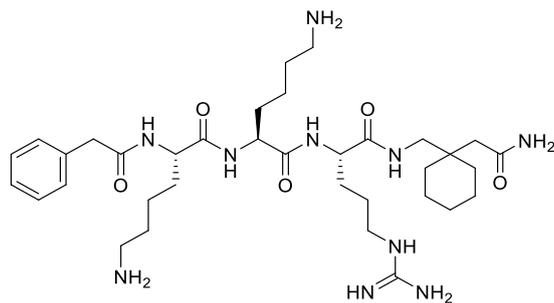
Ausbeute: 35 mg (49,59 %); weißes Pulver; Reinheit: 98 %; HPLC (% B): 14,8; MS ber. m/z: 582,43 (M), MS gef. m/z: 292,4 (M+2H)^{2+/2}.

41 N(Ca)Gabapentin-Lys-Lys-Arg-NH₂ \times 4 TFA



Ausbeute: 25 mg (34,04 %); weißes Pulver; Reinheit: 99 %; HPLC (% B): 17,7; MS ber. m/z: 624,45 (M), MS gef. m/z: 313,37 (M+2H)^{2+/2}.

42 PhAc-Lys-Lys-Arg-Gabapentin-NH₂ × 3 TFA



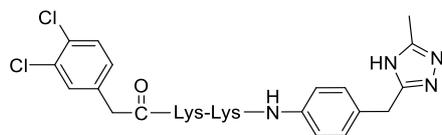
Ausbeute: 30 mg (42,3 %); weißes Pulver; Reinheit: 99 %; HPLC (% B): 24,4; MS ber. m/z: 700,93 (M), MS gef. m/z: 351,5 (M+2H)^{2+/2}.

5.17 Inhibitoren mit alternativen P1- und P3-Resten basierend auf Docking-Studien

Die Synthese dieser Verbindungen erfolgte nach der Strategie, die in Schema 9 dargestellt ist.

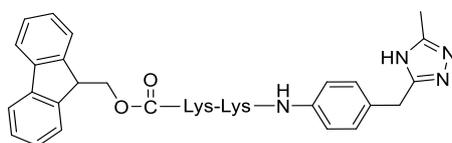
0,12 g 2-Cl-Tritylchlorid-Harz (Ausgangsbeladung 1,5 mmol/g) wurden mit Fmoc-Lys(Boc)-OH, dem P2-Rest, nach Methode B beladen. Nach der Beladung mit der ersten Aminosäure, wird von einer Harzbeladung von ca. 0,7 mmol/g ausgegangen. Diese Annahme wurde als Grundlage für die Mengenermittlung genommen. Anschließend wurde mittels manueller Peptidsynthese (Methode A) die restliche Peptidsequenz aufgebaut. Danach wurde das Peptid unter mild sauren Bedingungen unter Erhalt der Seitenkettenschutzgruppen nach Methode D vom Harz abgespalten und das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt. Im Anschluss wurde an den öligen Rückstand (0,084 mmol, 1 äq.) der P1-Baustein (0,084 mmol, 1 äq.) mittels BOP (0,092 mmol, 1,1 äq.), 6-Cl-HOBt (0,252 mmol, 3 äq.) und DIPEA (87,7 µL, 6 äq.) mit Hilfe der allgemeinen Methode F gekuppelt. Im letzten Schritt wurden nach der allgemeinen Methode E die verbliebenen Schutzgruppen unter stark sauren Bedingungen entfernt und die Rohprodukte in kaltem Diethylether gefällt und abzentrifugiert. Nach präparativer Reinigung wurden die Produkte aus Reinstwasser lyophilisiert.

47 3,4-Dichlor-PhAc-Lys-Lys-5-methyl-1,2,4-triazol-methyl-phenyl-amin × 2 TFA



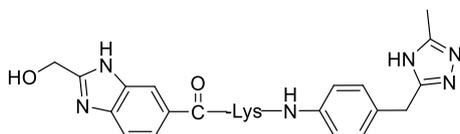
Ausbeute: 10 mg; weißes Pulver; Reinheit: 97 %; HPLC (% B): 27,66; MS ber. m/z: 630,26 (M), MS gef. m/z: 316,1 (M+2H)^{2+/2}.

48 Fmoc-Lys-Lys-5-methyl-1,2,4-triazol-methyl-phenyl-amin × 2 TFA



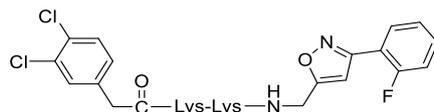
Ausbeute: 10 mg; weißes Pulver; Reinheit: 99 %; HPLC (% B): 32,8; MS ber. m/z: 650,37 (M), MS gef. m/z: 668,4 (M+NH₄)⁺.

49 2-Hydroxymethyl-benzimidazol-carboxylic-acid-Lys-5-Methyl-1,2,4-triazol-methyl-phenyl-amin × 2 TFA



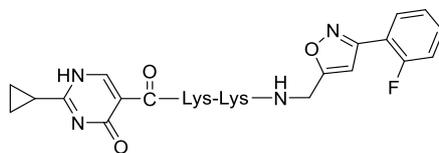
Ausbeute: 10 mg; weißes Pulver; Reinheit: 92 %; HPLC (% B): 17,24 MS ber. m/z: 490,24 (M), MS gef. m/z: 491,2 (M+H)⁺.

50 3,4-Dichlor-PhAc-Lys-Lys-2-Fluorophenyl-5-isoxazol-methamin × 2 TFA



Ausbeute: 7,5 mg; weißes Pulver; Reinheit: 95 %; HPLC (% B): 38,7 MS; ber. m/z: 634,22 (M), MS gef. m/z: 635 (M+H)⁺.

51 Cyclopropyl-6-oxo-pyrimidincarboxylicacid-Lys-2-fluorophenyl-5-isoxazolyl-methamin \times 2 TFA

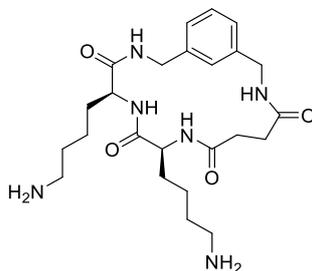


Ausbeute: 11,6 mg; weißes Pulver; Reinheit: 98,5 %; HPLC (% B): 20,04; MS ber. m/z: 482,21 (M), MS gef. m/z: 242,2 (M+2H)^{2+/2}.

5.18 Synthese der zyklischen Inhibitoren 52 - 56

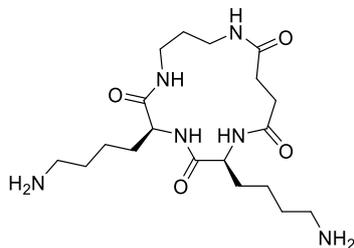
0,1 g Tritylchlorid-Harz (Beladung 1,5 mmol/g) wurde nach Methode C mit einem Diamin beladen. Anschließend wurde mittels manueller Festphasenpeptidsynthese nach Methode A die Peptidsequenz aufgebaut. Als letzter Baustein wurden entweder 4 äq. Bernsteinsäureanhydrid oder 4 äq. Glutarsäureanhydrid verwendet, die in Gegenwart äquimolarer Mengen von DIPEA gekuppelt wurden. Anschließend wurde das Peptid unter mild sauren Bedingung nach Methode D vom Harz abgespalten und in Lösung nach Methode J intramolekular mittels BOP/DIPEA zyklisiert. Nach Einengen des Lösungsmittels wurden die restlichen Schutzgruppen unter stark sauren Bedingungen nach Methode E abgespalten. Die Produkte wurden mittels präparativer HPLC gereinigt und aus Reinstwasser lyophilisiert.

52 c[Succinyl-Lys-Lys-*m*-Xylylendiamid] \times 2 TFA



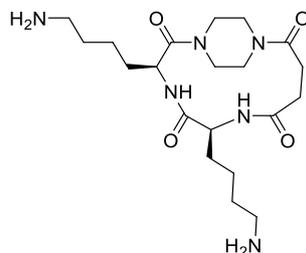
Ausbeute: 10 mg; weißes Pulver; Reinheit: 100 %; HPLC (% B): 18,1; MS ber. m/z: 474,3 (M), MS gef. m/z: 475,3 (M+H)⁺.

53 c[Succinyl-Lys-Lys-Diaminopropan] × 2 TFA



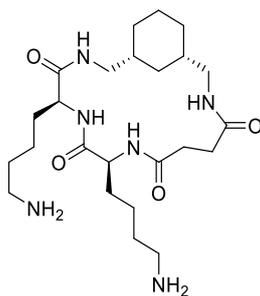
Ausbeute: 5 mg; weißes Pulver; Reinheit: 90 %; HPLC (% B): 17,1; MS ber. m/z: 412,28 (M), MS gef. m/z: 413,3 (M+H)⁺.

54 c[Succinyl-Lys-Lys-Piperazid] × 2 TFA



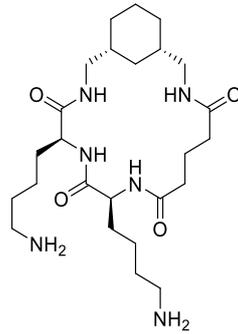
Ausbeute: 8 mg; weißes Pulver; Reinheit: 92 %; HPLC (% B): 19,8; MS ber. m/z: 424,28 (M), MS gef. m/z: 425 (M+H)⁺.

55 c[Succinyl-Lys-Lys-1,3-cis-DAMCH] × 2 TFA



Ausbeute: 3 mg; weißes Pulver; Reinheit: 94,9 %; HPLC (% B): 17,05; MS ber. m/z: 480,65 (M), MS gef. m/z: 241,27 (M+2H)^{2+/2}.

56 c[Glutaryl-Lys-Lys-1,3-cis-DAMCH] × 2 TFA

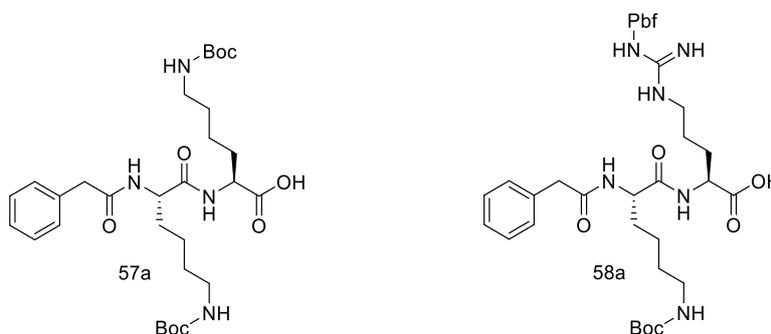


Ausbeute: 5 mg; weißes Pulver; Reinheit: 88 %; HPLC (% B): 17,1; MS ber. m/z: 494,38 (M), MS gef. m/z: 495,62 (M+H)⁺.

5.19 Synthese symmetrischer Inhibitoren mit Diaminoaceton als Zentralbaustein

Synthese der Peptidsegmente, die an Diaminoaceton gekuppelt wurden

Nach Methode B wurde 0,1 g 2-Cl-Tritylchlorid-Harz (Beladung 1,5 mmol/g) mit Fmoc-Lys(Boc)-OH oder Fmoc-Arg(Pbf)-OH beladen. Anschließend wurde mittels manueller Festphasenpeptidsynthese nach Methode A die Peptidsequenz aufgebaut. Nach mild-saurer Abspaltung mit 1 % TFA in DCM (Methode D) wurde unter Verbleib der Seitenkettenschutzgruppen, das Lösungsmittels am Rotationsverdampfer *in vacuo* entfernt. Es wurden die Zwischenprodukte **57a** und **58a** erhalten.



57a PhAc-Lys(Boc)-Lys(Boc)-OH

Ausbeute: 100 mg; öliges Rückstand; Reinheit: 91 %; HPLC (% B): 56,2; MS ber. m/z: 592,73 (M), MS gef. m/z: 593,6 (M+H)⁺.

58a PhAc-Lys(Boc)-Arg(Pbf)-OH

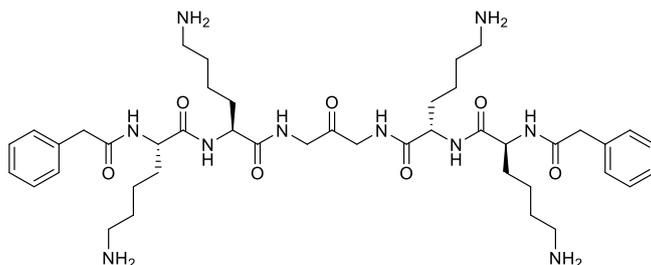
Ausbeute: 75 mg; öliges Rückstand; Reinheit: 97 %; HPLC (% B): 60,5; MS ber. m/z: 772,96 (M), MS gef. m/z: 773,26 (M+H)⁺.

Jeweils 2 äq. (0,168 mmol) der Intermediate **57a** und **58a** wurden in DMF gelöst, mit 2 äq. HATU (0,168 mmol) und 5 äq. DIPEA (0,422 mmol) versetzt und gerührt. Zu dieser Mischung wurde 1 äq. Diaminoaceton × 2 HCl (0,084 mmol) zugegeben, das zuvor in möglichst wenig Wasser gelöst wurde.

Nach 2 h Reaktionszeit wurde das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt und die restlichen Schutzgruppen unter stark sauren Bedingungen nach Methode E abgespalten. Anschließend

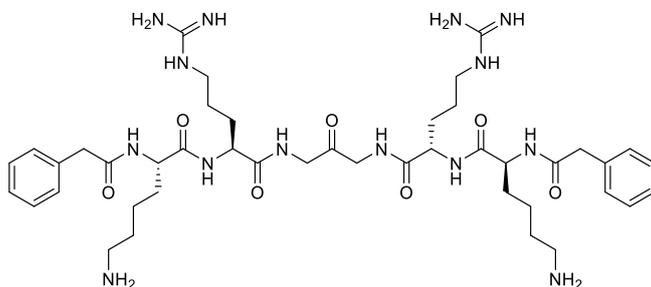
wurden die Peptide in kaltem Diethylether gefällt, abzentrifugiert und die Produkte mittels präparativer HPLC gereinigt. Nach Lyophilisation aus Wasser wurden die symmetrischen Inhibitoren **57** und **58** erhalten.

57 (PhAc-Lys-Lys)₂-Diamidoacetone × 4 TFA



Ausbeute: 2 mg; weißes Pulver; Reinheit: 73 % (Racemisches Gemisch); HPLC (% B): 23,27; MS ber. m/z: 836,53 (M), MS gef. m/z: 837,5 (M+H)⁺.

58 (PhAc-Lys-Arg)₂-Diamidoacetone × 4 TFA



Ausbeute: 75 mg; öliger Rückstand; Reinheit: 94 % (Racemisches Gemisch); HPLC (% B): 22,79; MS ber. m/z: 892,54 (M), MS gef. m/z: 299,47 (M+3H)^{3+/3}.

6 Literaturverzeichnis

1. Steuber, H.; Kanitz, M.; Ehlert, F. R.; Diederich, W. Recent Advances in Targeting Dengue and West Nile Virus Proteases Using Small Molecule Inhibitors. In *Therapy of Viral Infections*, Diederich, W. E.; Steuber, H., Eds. Springer Berlin Heidelberg: 2015; Vol. 15, pp 93-141.
2. Mustafa, M. S.; Rasotgi, V.; Jain, S.; Gupta, V. Discovery of fifth serotype of dengue virus (DENV-5): A new public health dilemma in dengue control. *Med J Armed Forces India* **2015**, 71, 67-70.
3. Bollati, M.; Alvarez, K.; Assenberg, R.; Baronti, C.; Canard, B.; Cook, S.; Coutard, B.; Decroly, E.; de Lamballerie, X.; Gould, E. A.; Grard, G.; Grimes, J. M.; Hilgenfeld, R.; Jansson, A. M.; Malet, H.; Mancini, E. J.; Mastrangelo, E.; Mattevi, A.; Milani, M.; Moureau, G.; Neyts, J.; Owens, R. J.; Ren, J.; Selisko, B.; Speroni, S.; Steuber, H.; Stuart, D. I.; Unge, T.; Bolognesi, M. Structure and functionality in flavivirus NS-proteins: perspectives for drug design. *Antiviral Res* **2010**, 87, 125-48.
4. Turell, M. J.; Dohm, D. J.; Sardelis, M. R.; Oguinn, M. L.; Andreadis, T. G.; Blow, J. A. An update on the potential of north American mosquitoes (Diptera: Culicidae) to transmit West Nile Virus. *J Med Entomol* **2005**, 42, 57-62.
5. Godsey, M. S., Jr.; Nasci, R.; Savage, H. M.; Aspen, S.; King, R.; Powers, A. M.; Burkhalter, K.; Colton, L.; Charnetzky, D.; Lasater, S.; Taylor, V.; Palmisano, C. T. West Nile virus-infected mosquitoes, Louisiana, 2002. *Emerg Infect Dis* **2005**, 11, 1399-404.
6. Smithburn, K. C.; Hughes, T. P.; Burke, A. W.; Paul, J. H. A neurotropic virus isolated from the blood of a native of Uganda. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **1940**, 20, 471-492.
7. Hubalek, Z.; Halouzka, J. West Nile fever--a reemerging mosquito-borne viral disease in Europe. *Emerg Infect Dis* **1999**, 5, 643-50.
8. Campbell, G. L.; Ceianu, C. S.; Savage, H. M. Epidemic West Nile encephalitis in Romania: waiting for history to repeat itself. *Ann N Y Acad Sci* **2001**, 951, 94-101.
9. Dauphin, G.; Zientara, S.; Zeller, H.; Murgue, B. West Nile: worldwide current situation in animals and humans. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* **2004**, 27, 343-55.
10. Granwehr, B. P.; Lillibridge, K. M.; Higgs, S.; Mason, P. W.; Aronson, J. F.; Campbell, G. A.; Barrett, A. D. West Nile virus: where are we now? *Lancet Infect Dis* **2004**, 4, 547-56.
11. Petersen, L. R.; Brault, A. C.; Nasci, R. S. West Nile virus: review of the literature. *Jama* **2013**, 310, 308-15.
12. Zou, S.; Foster, G. A.; Dodd, R. Y.; Petersen, L. R.; Stramer, S. L. West Nile fever characteristics among viremic persons identified through blood donor screening. *J Infect Dis* **2010**, 202, 1354-61.
13. Hayes, E. B.; Sejvar, J. J.; Zaki, S. R.; Lanciotti, R. S.; Bode, A. V.; Campbell, G. L. Virology, pathology, and clinical manifestations of West Nile virus disease. *Emerg Infect Dis* **2005**, 11, 1174-9.
14. Watson, J. T.; Pertel, P. E.; Jones, R. C.; Siston, A. M.; Paul, W. S.; Austin, C. C.; Gerber, S. I. Clinical characteristics and functional outcomes of West Nile Fever. *Ann Intern Med* **2004**, 141, 360-5.

15. Barzon, L.; Pacenti, M.; Franchin, E.; Martello, T.; Lavezzo, E.; Squarzon, L.; Toppo, S.; Fiorin, F.; Marchiori, G.; Scotton, G. P.; Russo, F.; Cattai, M.; Cusinato, R.; Palu, G. Clinical and virological findings in the ongoing outbreak of West Nile virus Livenza strain in northern Italy, July to September 2012. *Euro Surveill* **2012**, *17*, 20260.
16. Petersen, L. R.; Carson, P. J.; Biggerstaff, B. J.; Custer, B.; Borchardt, S. M.; Busch, M. P. Estimated cumulative incidence of West Nile virus infection in US adults, 1999-2010. *Epidemiol Infect* **2013**, *141*, 591-5.
17. Mostashari, F.; Bunning, M. L.; Kitsutani, P. T.; Singer, D. A.; Nash, D.; Cooper, M. J.; Katz, N.; Liljebjelke, K. A.; Biggerstaff, B. J.; Fine, A. D.; Layton, M. C.; Mullin, S. M.; Johnson, A. J.; Martin, D. A.; Hayes, E. B.; Campbell, G. L. Epidemic West Nile encephalitis, New York, 1999: results of a household-based seroepidemiological survey. *Lancet* **2001**, *358*, 261-4.
18. Hayes, E. B.; Gubler, D. J. West Nile virus: epidemiology and clinical features of an emerging epidemic in the United States. *Annu Rev Med* **2006**, *57*, 181-94.
19. Sejvar, J. J. The long-term outcomes of human West Nile virus infection. *Clin Infect Dis* **2007**, *44*, 1617-24.
20. Sejvar, J. J.; Haddad, M. B.; Tierney, B. C.; Campbell, G. L.; Marfin, A. A.; Van Gerpen, J. A.; Fleischauer, A.; Leis, A. A.; Stokic, D. S.; Petersen, L. R. Neurologic manifestations and outcome of West Nile virus infection. *JAMA* **2003**, *290*, 511-5.
21. Sejvar, J. J.; Leis, A. A.; Stokic, D. S.; Van Gerpen, J. A.; Marfin, A. A.; Webb, R.; Haddad, M. B.; Tierney, B. C.; Slavinski, S. A.; Polk, J. L.; Dostrow, V.; Winkelmann, M.; Petersen, L. R. Acute flaccid paralysis and West Nile virus infection. *Emerg Infect Dis* **2003**, *9*, 788-93.
22. Weber, I. B.; Lindsey, N. P.; Bunko-Patterson, A. M.; Briggs, G.; Wadleigh, T. J.; Sylvester, T. L.; Levy, C.; Komatsu, K. K.; Lehman, J. A.; Fischer, M.; Staples, J. E. Completeness of West Nile virus testing in patients with meningitis and encephalitis during an outbreak in Arizona, USA. *Epidemiol Infect* **2011**, 1-5.
23. Davis, C. W.; Nguyen, H. Y.; Hanna, S. L.; Sanchez, M. D.; Doms, R. W.; Pierson, T. C. West Nile virus discriminates between DC-SIGN and DC-SIGNR for cellular attachment and infection. *J Virol* **2006**, *80*, 1290-301.
24. Lee, J. W.; Chu, J. J.; Ng, M. L. Quantifying the specific binding between West Nile virus envelope domain III protein and the cellular receptor alphaVbeta3 integrin. *J Biol Chem* **2006**, *281*, 1352-60.
25. Yu, I. M.; Zhang, W.; Holdaway, H. A.; Li, L.; Kostyuchenko, V. A.; Chipman, P. R.; Kuhn, R. J.; Rossmann, M. G.; Chen, J. Structure of the immature dengue virus at low pH primes proteolytic maturation. *Science* **2008**, *319*, 1834-7.
26. Behnam, M. A.; Nitsche, C.; Boldescu, V.; Klein, C. D. The Medicinal Chemistry of Dengue Virus. *J Med Chem* **2016**, *59*, 5622-49.
27. Wengler, G.; Czaya, G.; Farber, P. M.; Hegemann, J. H. In vitro synthesis of West Nile virus proteins indicates that the amino-terminal segment of the NS3 protein contains the active centre of the protease which cleaves the viral polyprotein after multiple basic amino acids. *J Gen Virol* **1991**, *72* (Pt 4), 851-8.
28. Bazan, J. F.; Fletterick, R. J. Detection of a trypsin-like serine protease domain in flaviviruses and pestiviruses. *Virology* **1989**, *171*, 637-9.

29. Gorbalenya, A. E.; Donchenko, A. P.; Koonin, E. V.; Blinov, V. M. N-terminal domains of putative helicases of flavi- and pestiviruses may be serine proteases. *Nucleic Acids Res* **1989**, *17*, 3889-97.
30. Perera, R.; Kuhn, R. J. Structural proteomics of dengue virus. *Curr Opin Microbiol* **2008**, *11*, 369-77.
31. Chernov, A. V.; Shiryaev, S. A.; Aleshin, A. E.; Ratnikov, B. I.; Smith, J. W.; Liddington, R. C.; Strongin, A. Y. The two-component NS2B-NS3 proteinase represses DNA unwinding activity of the West Nile virus NS3 helicase. *J Biol Chem* **2008**, *283*, 17270-8.
32. Erbel, P.; Schiering, N.; D'Arcy, A.; Rensus, M.; Kroemer, M.; Lim, S. P.; Yin, Z.; Keller, T. H.; Vasudevan, S. G.; Hommel, U. Structural basis for the activation of flaviviral NS3 proteases from dengue and West Nile virus. *Nat Struct Mol Biol* **2006**, *13*, 372-3.
33. Wengler, G. Terminal sequences of the genome and replicative-form RNA of the flavivirus West Nile virus: absence of poly(A) and possible role in RNA replication. *Virology* **1981**, *113*, 544-55.
34. Lindenbach, B. D.; Murray, C. L.; Thiel, H.-J.; Rice, C. M. Flaviviridae, Chapter 25. In *Fields virology – 6th ed.*, David M. Knipe, P. M. H., Ed. LIPPINCOTT WILLIAMS & WILKINS: Philadelphia, PA, 2013; pp 712-746.
35. Clum, S.; Ebner, K. E.; Padmanabhan, R. Cotranslational membrane insertion of the serine proteinase precursor NS2B-NS3(Pro) of dengue virus type 2 is required for efficient in vitro processing and is mediated through the hydrophobic regions of NS2B. *J Biol Chem* **1997**, *272*, 30715-23.
36. Brinkworth, R. I.; Fairlie, D. P.; Leung, D.; Young, P. R. Homology model of the dengue 2 virus NS3 protease: putative interactions with both substrate and NS2B cofactor. *J Gen Virol* **1999**, *80* (Pt 5), 1167-77.
37. Yamshchikov, V. F.; Trent, D. W.; Compans, R. W. Upregulation of signalase processing and induction of prM-E secretion by the flavivirus NS2B-NS3 protease: roles of protease components. *J Virol* **1997**, *71*, 4364-71.
38. Luo, D.; Wei, N.; Doan, D. N.; Paradkar, P. N.; Chong, Y.; Davidson, A. D.; Kotaka, M.; Lescar, J.; Vasudevan, S. G. Flexibility between the protease and helicase domains of the dengue virus NS3 protein conferred by the linker region and its functional implications. *J Biol Chem* **2010**, *285*, 18817-27.
39. Lescar, J.; Luo, D.; Xu, T.; Sampath, A.; Lim, S. P.; Canard, B.; Vasudevan, S. G. Towards the design of antiviral inhibitors against flaviviruses: the case for the multifunctional NS3 protein from Dengue virus as a target. *Antiviral Res* **2008**, *80*, 94-101.
40. Nall, T. A.; Chappell, K. J.; Stoermer, M. J.; Fang, N. X.; Tyndall, J. D.; Young, P. R.; Fairlie, D. P. Enzymatic characterization and homology model of a catalytically active recombinant West Nile virus NS3 protease. *J Biol Chem* **2004**, *279*, 48535-42.
41. Shiryaev, S. A.; Aleshin, A. E.; Ratnikov, B. I.; Smith, J. W.; Liddington, R. C.; Strongin, A. Y. Expression and purification of a two-component flaviviral proteinase resistant to autocleavage at the NS2B-NS3 junction region. *Protein Expr Purif* **2007**, *52*, 334-9.
42. Brinton, M. A. The molecular biology of West Nile Virus: a new invader of the western hemisphere. *Annu Rev Microbiol* **2002**, *56*, 371-402.

43. Zhang, Y.; Corver, J.; Chipman, P. R.; Zhang, W.; Pletnev, S. V.; Sedlak, D.; Baker, T. S.; Strauss, J. H.; Kuhn, R. J.; Rossmann, M. G. Structures of immature flavivirus particles. *Embo j* **2003**, *22*, 2604-13.
44. Jordan, I.; Briese, T.; Fischer, N.; Lau, J. Y.; Lipkin, W. I. Ribavirin inhibits West Nile virus replication and cytopathic effect in neural cells. *J Infect Dis* **2000**, *182*, 1214-7.
45. Chowers, M. Y.; Lang, R.; Nassar, F.; Ben-David, D.; Giladi, M.; Rubinshtein, E.; Itzhaki, A.; Mishal, J.; Siegman-Igra, Y.; Kitzes, R.; Pick, N.; Landau, Z.; Wolf, D.; Bin, H.; Mendelson, E.; Pitlik, S. D.; Weinberger, M. Clinical characteristics of the West Nile fever outbreak, Israel, 2000. *Emerg Infect Dis* **2001**, *7*, 675-8.
46. Morrey, J. D.; Day, C. W.; Julander, J. G.; Blatt, L. M.; Smee, D. F.; Sidwell, R. W. Effect of interferon-alpha and interferon-inducers on West Nile virus in mouse and hamster animal models. *Antivir Chem Chemother* **2004**, *15*, 101-9.
47. Solomon, T.; Ooi, M. H.; Beasley, D. W.; Mallewa, M. West Nile encephalitis. *BMJ* **2003**, *326*, 865-9.
48. Hayes, E. B.; Komar, N.; Nasci, R. S.; Montgomery, S. P.; O'Leary, D. R.; Campbell, G. L. Epidemiology and transmission dynamics of West Nile virus disease. *Emerg Infect Dis* **2005**, *11*, 1167-73.
49. Arroyo, J.; Miller, C.; Catalan, J.; Myers, G. A.; Ratterree, M. S.; Trent, D. W.; Monath, T. P. ChimeriVax-West Nile virus live-attenuated vaccine: preclinical evaluation of safety, immunogenicity, and efficacy. *J Virol* **2004**, *78*, 12497-507.
50. Guy, B.; Guirakhoo, F.; Barban, V.; Higgs, S.; Monath, T. P.; Lang, J. Preclinical and clinical development of YFV 17D-based chimeric vaccines against dengue, West Nile and Japanese encephalitis viruses. *Vaccine* **2010**, *28*, 632-49.
51. Drebot, M. A.; Lindsay, R.; Barker, I. K.; Buck, P. A.; Fearon, M.; Hunter, F.; Sockett, P.; Artsob, H. West Nile virus surveillance and diagnostics: A Canadian perspective. *Can J Infect Dis* **2003**, *14*, 105-14.
52. Prajapati, V.; Tripathi, A. K.; Aggarwal, K. K.; Khanuja, S. P. S. Insecticidal, repellent and oviposition-deterrent activity of selected essential oils against *Anopheles stephensi*, *Aedes aegypti* and *Culex quinquefasciatus*. *Bioresource Technology* **2005**, *96*, 1749-1757.
53. WHO Guidelines Approved by the Guidelines Review Committee. In *Dengue: Guidelines for Diagnosis, Treatment, Prevention and Control: New Edition*, World Health Organization
World Health Organization.: Geneva, 2009.
54. Rodriguez, M. M.; Bisset, J. A.; Fernandez, D. Levels of insecticide resistance and resistance mechanisms in *Aedes aegypti* from some Latin American countries. *J Am Mosq Control Assoc* **2007**, *23*, 420-9.
55. Brengues, C.; Hawkes, N. J.; Chandre, F.; McCarroll, L.; Duchon, S.; Guillet, P.; Manguin, S.; Morgan, J. C.; Hemingway, J. Pyrethroid and DDT cross-resistance in *Aedes aegypti* is correlated with novel mutations in the voltage-gated sodium channel gene. *Med Vet Entomol* **2003**, *17*, 87-94.
56. Guy, B.; Barrere, B.; Malinowski, C.; Saville, M.; Teyssou, R.; Lang, J. From research to phase III: preclinical, industrial and clinical development of the Sanofi Pasteur tetravalent dengue vaccine. *Vaccine* **2011**, *29*, 7229-41.

57. Hadinegoro, S. R.; Arredondo-Garcia, J. L.; Capeding, M. R.; Deseda, C.; Chotpitayasunondh, T.; Dietze, R.; Muhammad Ismail, H. I.; Reynales, H.; Limkittikul, K.; Rivera-Medina, D. M.; Tran, H. N.; Bouckennooghe, A.; Chansinghakul, D.; Cortes, M.; Fanouillere, K.; Forrat, R.; Frago, C.; Gailhardou, S.; Jackson, N.; Noriega, F.; Plennevaux, E.; Wartel, T. A.; Zambrano, B.; Saville, M. Efficacy and Long-Term Safety of a Dengue Vaccine in Regions of Endemic Disease. *N Engl J Med* **2015**, *373*, 1195-206.
58. Sabchareon, A.; Wallace, D.; Sirivichayakul, C.; Limkittikul, K.; Chanthavanich, P.; Suvannadabba, S.; Jiwariyavej, V.; Dulyachai, W.; Pengsaa, K.; Wartel, T. A.; Moureau, A.; Saville, M.; Bouckennooghe, A.; Viviani, S.; Tornieporth, N. G.; Lang, J. Protective efficacy of the recombinant, live-attenuated, CYD tetravalent dengue vaccine in Thai schoolchildren: a randomised, controlled phase 2b trial. *Lancet* **2012**, *380*, 1559-67.
59. Dans, A. L.; Dans, L. F.; Lansang, M. A. D.; Silvestre, M. A. A.; Guyatt, G. H. Controversy and debate on dengue vaccine series-paper 3: final response to review of a licensed dengue vaccine: inappropriate subgroup analyses and selective reporting may cause harm in mass vaccination programs. *J Clin Epidemiol* **2018**, *95*, 142.
60. Shiryayev, S. A.; Ratnikov, B. I.; Chekanov, A. V.; Sikora, S.; Rozanov, D. V.; Godzik, A.; Wang, J.; Smith, J. W.; Huang, Z.; Lindberg, I.; Samuel, M. A.; Diamond, M. S.; Strongin, A. Y. Cleavage targets and the D-arginine-based inhibitors of the West Nile virus NS3 processing proteinase. *Biochem J* **2006**, *393*, 503-11.
61. Mueller, N. H.; Yon, C.; Ganesh, V. K.; Padmanabhan, R. Characterization of the West Nile virus protease substrate specificity and inhibitors. *Int J Biochem Cell Biol* **2007**, *39*, 606-14.
62. Mannucci, P. M. Hemostatic drugs. *N Engl J Med* **1998**, *339*, 245-53.
63. Ascenzi, P.; Bocedi, A.; Bolognesi, M.; Spallarossa, A.; Coletta, M.; De Cristofaro, R.; Menegatti, E. The bovine basic pancreatic trypsin inhibitor (Kunitz inhibitor): a milestone protein. *Curr Protein Pept Sci* **2003**, *4*, 231-51.
64. Mahdy, A. M.; Webster, N. R. Perioperative systemic haemostatic agents. *Br J Anaesth* **2004**, *93*, 842-58.
65. Knox, J. E.; Ma, N. L.; Yin, Z.; Patel, S. J.; Wang, W. L.; Chan, W. L.; Ranga Rao, K. R.; Wang, G.; Ngew, X.; Patel, V.; Beer, D.; Lim, S. P.; Vasudevan, S. G.; Keller, T. H. Peptide inhibitors of West Nile NS3 protease: SAR study of tetrapeptide aldehyde inhibitors. *J Med Chem* **2006**, *49*, 6585-90.
66. Stoermer, M. J.; Chappell, K. J.; Liebscher, S.; Jensen, C. M.; Gan, C. H.; Gupta, P. K.; Xu, W. J.; Young, P. R.; Fairlie, D. P. Potent cationic inhibitors of West Nile virus NS2B/NS3 protease with serum stability, cell permeability and antiviral activity. *J Med Chem* **2008**, *51*, 5714-21.
67. Schuller, A.; Yin, Z.; Brian Chia, C. S.; Doan, D. N.; Kim, H. K.; Shang, L.; Loh, T. P.; Hill, J.; Vasudevan, S. G. Tripeptide inhibitors of dengue and West Nile virus NS2B-NS3 protease. *Antiviral Res* **2011**, *92*, 96-101.
68. Nitsche, C.; Zhang, L.; Weigel, L. F.; Schilz, J.; Graf, D.; Bartenschlager, R.; Hilgenfeld, R.; Klein, C. D. Peptide-Boronic Acid Inhibitors of Flaviviral Proteases: Medicinal Chemistry and Structural Biology. *J Med Chem* **2017**, *60*, 511-516.
69. Bajusz, S.; Szell, E.; Barabas, E.; Bagdy, D. Design and synthesis of peptide inhibitors of blood coagulations. *Folia Haematol Int Mag Klin Morphol Blutforsch* **1982**, *109*, 16-21.

70. Steinmetzer, T.; Schweinitz, A.; Stürzebecher, A.; Dönnecke, D.; Uhland, K.; Schuster, O.; Steinmetzer, P.; Müller, F.; Friedrich, R.; Than, M. E.; Bode, W.; Stürzebecher, J. Secondary amides of sulfonylated 3-amidinophenylalanine. New potent and selective inhibitors of matriptase. *J Med Chem* **2006**, *49*, 4116-26.
71. Schweinitz, A.; Steinmetzer, T.; Banke, I. J.; Arlt, M. J.; Stürzebecher, A.; Schuster, O.; Geissler, A.; Giersiefen, H.; Zeslawska, E.; Jacob, U.; Krüger, A.; Stürzebecher, J. Design of novel and selective inhibitors of urokinase-type plasminogen activator with improved pharmacokinetic properties for use as antimetastatic agents. *J Biol Chem* **2004**, *279*, 33613-22.
72. Saupe, S. M.; Steinmetzer, T. A new strategy for the development of highly potent and selective plasmin inhibitors. *J Med Chem* **2012**, *55*, 1171-80.
73. Becker, G. L.; Sielaff, F.; Than, M. E.; Lindberg, I.; Routhier, S.; Day, R.; Lu, Y.; Garten, W.; Steinmetzer, T. Potent inhibitors of furin and furin-like proprotein convertases containing decarboxylated P1 arginine mimetics. *J Med Chem* **2010**, *53*, 1067-75.
74. Lim, H. A.; Joy, J.; Hill, J.; Chia, S. B. C. Novel agmatine and agmatine-like peptidomimetic inhibitors of the West Nile virus NS2B/NS3 serine protease. *Eur J Med Chem* **2011**, *46*, 3130-4.
75. Lim, H. A.; Ang, M. J.; Joy, J.; Poulsen, A.; Wu, W.; Ching, S. C.; Hill, J.; Chia, C. S. Novel agmatine dipeptide inhibitors against the West Nile virus NS2B/NS3 protease: a P3 and N-cap optimization study. *Eur J Med Chem* **2013**, *62*, 199-205.
76. Hammamy, M. Z.; Haase, C.; Hammami, M.; Hilgenfeld, R.; Steinmetzer, T. Development and characterization of new peptidomimetic inhibitors of the West Nile virus NS2B-NS3 protease. *ChemMedChem* **2013**, *8*, 231-41.
77. Johnston, P. A.; Phillips, J.; Shun, T. Y.; Shinde, S.; Lazo, J. S.; Hury, D. M.; Myers, M. C.; Ratnikov, B. I.; Smith, J. W.; Su, Y.; Dahl, R.; Cosford, N. D.; Shiryayev, S. A.; Strongin, A. Y. HTS identifies novel and specific uncompetitive inhibitors of the two-component NS2B-NS3 proteinase of West Nile virus. *Assay Drug Dev Technol* **2007**, *5*, 737-50.
78. Mueller, N. H.; Pattabiraman, N.; Ansarah-Sobrinho, C.; Viswanathan, P.; Pierson, T. C.; Padmanabhan, R. Identification and biochemical characterization of small-molecule inhibitors of west nile virus serine protease by a high-throughput screen. *Antimicrob Agents Chemother* **2008**, *52*, 3385-93.
79. Ezgimen, M.; Lai, H.; Mueller, N. H.; Lee, K.; Cuny, G.; Ostrov, D. A.; Padmanabhan, R. Characterization of the 8-hydroxyquinoline scaffold for inhibitors of West Nile virus serine protease. *Antiviral Res* **2012**.
80. Ganesh, V. K.; Muller, N.; Judge, K.; Luan, C. H.; Padmanabhan, R.; Murthy, K. H. Identification and characterization of nonsubstrate based inhibitors of the essential dengue and West Nile virus proteases. *Bioorg Med Chem* **2005**, *13*, 257-64.
81. Harges, K.; Becker, G. L.; Lu, Y.; Dahms, S. O.; Köhler, S.; Beyer, W.; Sandvig, K.; Yamamoto, H.; Lindberg, I.; Walz, L.; von Messling, V.; Than, M. E.; Garten, W.; Steinmetzer, T. Novel Furin Inhibitors with Potent Anti-infectious Activity. *ChemMedChem* **2015**, *10*, 1218-31.
82. Orthner, C. L.; Kosow, D. P. Evidence that human alpha-thrombin is a monovalent cation-activated enzyme. *Arch Biochem Biophys* **1980**, *202*, 63-75.

83. Wells, C. M.; Di Cera, E. Thrombin is a Na⁽⁺⁾-activated enzyme. *Biochemistry* **1992**, 31, 11721-30.
84. Di Cera, E.; Guinto, E. R.; Vindigni, A.; Dang, Q. D.; Ayala, Y. M.; Wuyi, M.; Tulinsky, A. The Na⁺ binding site of thrombin. *J Biol Chem* **1995**, 270, 22089-92.
85. Delaage, M.; Lazdunski, M. The binding of Ca²⁺ to trypsinogen and its relation to the mechanism of activation. *Biochem Biophys Res Commun* **1967**, 28, 390-4.
86. Bode, W.; Schwager, P. The single calcium-binding site of crystallin bovin beta-trypsin. *FEBS Lett* **1975**, 56, 139-43.
87. Lieberthal, W.; Oza, N. B.; Bernard, D. B.; Levinsky, N. G. The effect of cations on the activity of human urinary kallikrein. *J Biol Chem* **1982**, 257, 10827-30.
88. Angelo, P. F.; Lima, A. R.; Alves, F. M.; Blaber, S. I.; Scarisbrick, I. A.; Blaber, M.; Juliano, L.; Juliano, M. A. Substrate specificity of human kallikrein 6: salt and glycosaminoglycan activation effects. *J Biol Chem* **2006**, 281, 3116-26.
89. Hsieh, M. C.; Cooperman, B. S. Inhibition of prostate-specific antigen (PSA) by alpha(1)-antichymotrypsin: salt-dependent activation mediated by a conformational change. *Biochemistry* **2002**, 41, 2990-7.
90. Brattsand, M.; Stefansson, K.; Lundh, C.; Haasum, Y.; Egelrud, T. A proteolytic cascade of kallikreins in the stratum corneum. *J Invest Dermatol* **2005**, 124, 198-203.
91. Memari, N.; Jiang, W.; Diamandis, E. P.; Luo, L. Y. Enzymatic properties of human kallikrein-related peptidase 12 (KLK12). *Biol Chem* **2007**, 388, 427-35.
92. Debela, M.; Hess, P.; Magdolen, V.; Schechter, N. M.; Steiner, T.; Huber, R.; Bode, W.; Goettig, P. Chymotryptic specificity determinants in the 1.0 Å structure of the zinc-inhibited human tissue kallikrein 7. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2007**, 104, 16086-91.
93. Debela, M.; Goettig, P.; Magdolen, V.; Huber, R.; Schechter, N. M.; Bode, W. Structural basis of the zinc inhibition of human tissue kallikrein 5. *J Mol Biol* **2007**, 373, 1017-31.
94. Debela, M.; Magdolen, V.; Grimminger, V.; Sommerhoff, C.; Messerschmidt, A.; Huber, R.; Friedrich, R.; Bode, W.; Goettig, P. Crystal structures of human tissue kallikrein 4: activity modulation by a specific zinc binding site. *J Mol Biol* **2006**, 362, 1094-107.
95. Menez, R.; Michel, S.; Muller, B. H.; Bossus, M.; Ducancel, F.; Jolivet-Reynaud, C.; Stura, E. A. Crystal structure of a ternary complex between human prostate-specific antigen, its substrate acyl intermediate and an activating antibody. *J Mol Biol* **2008**, 376, 1021-33.
96. Lovgren, J.; Airas, K.; Lilja, H. Enzymatic action of human glandular kallikrein 2 (hK2). Substrate specificity and regulation by Zn²⁺ and extracellular protease inhibitors. *Eur J Biochem* **1999**, 262, 781-9.
97. Goettig, P.; Magdolen, V.; Brandstetter, H. Natural and synthetic inhibitors of kallikrein-related peptidases (KLKs). *Biochimie* **2010**, 92, 1546-67.
98. Koren, E.; Torchilin, V. P. Cell-penetrating peptides: breaking through to the other side. *Trends Mol Med* **2012**, 18, 385-93.
99. Yang, L.; Harroun, T. A.; Weiss, T. M.; Ding, L.; Huang, H. W. Barrel-stave model or toroidal model? A case study on melittin pores. *Biophys J* **2001**, 81, 1475-85.

100. Kawamoto, S.; Takasu, M.; Miyakawa, T.; Morikawa, R.; Oda, T.; Futaki, S.; Nagao, H. Inverted micelle formation of cell-penetrating peptide studied by coarse-grained simulation: importance of attractive force between cell-penetrating peptides and lipid head group. *J Chem Phys* **2011**, *134*, 095103.
101. Lundberg, P.; Langel, U. A brief introduction to cell-penetrating peptides. *J Mol Recognit* **2003**, *16*, 227-33.
102. Qian, Z.; Martyna, A.; Hard, R. L.; Wang, J.; Appiah-Kubi, G.; Coss, C.; Phelps, M. A.; Rossmann, J. S.; Pei, D. Discovery and Mechanism of Highly Efficient Cyclic Cell-Penetrating Peptides. *Biochemistry* **2016**, *55*, 2601-12.
103. Vannice, K. S.; Durbin, A.; Hombach, J. Status of vaccine research and development of vaccines for dengue. *Vaccine* **2016**, *34*, 2934-8.
104. Wilder-Smith, A.; Vannice, K. S.; Hombach, J.; Farrar, J.; Nolan, T. Population Perspectives and World Health Organization Recommendations for CYD-TDV Dengue Vaccine. *J Infect Dis* **2016**, *214*, 1796-1799.
105. Schechter, I.; Berger, A. On the size of the active site in proteases. I. Papain. *Biochem Biophys Res Commun* **1967**, *27*, 157-62.
106. Shiryayev, S. A.; Kozlov, I. A.; Ratnikov, B. I.; Smith, J. W.; Lebl, M.; Strongin, A. Y. Cleavage preference distinguishes the two-component NS2B-NS3 serine proteinases of Dengue and West Nile viruses. *Biochem J* **2007**, *401*, 743-52.
107. Shiryayev, S. A.; Ratnikov, B. I.; Aleshin, A. E.; Kozlov, I. A.; Nelson, N. A.; Lebl, M.; Smith, J. W.; Liddington, R. C.; Strongin, A. Y. Switching the substrate specificity of the two-component NS2B-NS3 flavivirus proteinase by structure-based mutagenesis. *J Virol* **2007**, *81*, 4501-9.
108. Augustyns, K.; Kraas, W.; Jung, G. Investigation on the stability of the Dde protecting group used in peptide synthesis: migration to an unprotected lysine. *J Pept Res* **1998**, *51*, 127-33.
109. Chhabra, S. R.; Hothi, B.; Evans, D. J.; White, P. D.; Bycroft, B. W.; Chan, W. C. An appraisal of new variants of Dde amine protecting group for solid phase peptide synthesis. *Tetrahedron Letters* **1998**, *39*, 1603-1606.
110. Yin, Z.; Patel, S. J.; Wang, W. L.; Wang, G.; Chan, W. L.; Rao, K. R.; Alam, J.; Jeyaraj, D. A.; Ngew, X.; Patel, V.; Beer, D.; Lim, S. P.; Vasudevan, S. G.; Keller, T. H. Peptide inhibitors of Dengue virus NS3 protease. Part 1: Warhead. *Bioorg Med Chem Lett* **2006**, *16*, 36-9.
111. Qian, Z.; Liu, T.; Liu, Y. Y.; Briesewitz, R.; Barrios, A. M.; Jhiang, S. M.; Pei, D. Efficient delivery of cyclic peptides into mammalian cells with short sequence motifs. *ACS Chem Biol* **2013**, *8*, 423-31.
112. Thakkar, A.; Trinh, T. B.; Pei, D. Global analysis of peptide cyclization efficiency. *ACS Comb Sci* **2013**, *15*, 120-9.
113. Tyndall, J. D.; Nall, T.; Fairlie, D. P. Proteases universally recognize beta strands in their active sites. *Chem Rev* **2005**, *105*, 973-99.
114. Rajendran, L.; Schneider, A.; Schlechtingen, G.; Weidlich, S.; Ries, J.; Braxmeier, T.; Schwill, P.; Schulz, J. B.; Schroeder, C.; Simons, M.; Jennings, G.; Knolker, H. J.; Simons, K. Efficient inhibition of the Alzheimer's disease beta-secretase by membrane targeting. *Science* **2008**, *320*, 520-3.

115. Radwan, A. A.; Alanazi, F. K. Targeting cancer using cholesterol conjugates. *Saudi Pharm J* **2014**, *22*, 3-16.
116. Hunter, A.; L., H. Was ist Kooperativität? *Angew. Chem.* **2009**, *121*, 7624–7636.
117. Kouretova, J.; Hammamy, M. Z.; Epp, A.; Hards, K.; Kallis, S.; Zhang, L.; Hilgenfeld, R.; Bartenschlager, R.; Steinmetzer, T. Effects of NS2B-NS3 protease and furin inhibition on West Nile and Dengue virus replication. *J Enzyme Inhib Med Chem* **2017**, *32*, 712-721.
118. Wijkmans, J.; Gossen, J. Inhibitors of cathepsin K: a patent review (2004 - 2010). *Expert Opin Ther Pat* **2011**, *21*, 1611-29.
119. McGrath, M. E.; Klaus, J. L.; Barnes, M. G.; Bromme, D. Crystal structure of human cathepsin K complexed with a potent inhibitor. *Nat Struct Biol* **1997**, *4*, 105-9.
120. Gao, Y.; Lee, Y. C. Facile Synthesis of New L-Arginine Derivatives as Substrates for Trypsin-Like Proteases. *Synthetic Communications* **2004**, *34*, 3465-3471.
121. Rijkers, D. T. S.; Adams, H. P. H. M.; Hemker, H. C.; Tesser, G. I. A convenient synthesis of amino acid p-nitroanilides; synthons in the synthesis of protease substrates. *Tetrahedron* **1995**, *51*, 11235-11250.
122. Dixon, M. The determination of enzyme inhibitor constants. *Biochem J* **1953**, *55*, 170-1.
123. Naqui, A. What does I50 mean? *Biochem J* **1983**, *215*, 429-30.
124. Copeland, R. A. Reversible modes of inhibitor interactions with enzymes. In Evaluation of enzyme inhibitors in drug discovery: a guide for medicinal chemists and pharmacologists. **2005**, 48-81.
125. Buchan, D. W. A.; Minnici, F.; Nugent, T. C. O.; Bryson, K.; Jones, D. T. Scalable web services for the PSIPRED Protein Analysis Workbench. *Nucleic Acids Research* **2013**, *41*, W349-W357.
126. Jones, D. T. Protein secondary structure prediction based on position-specific scoring matrices. *J Mol Biol* **1999**, *292*, 195-202.
127. Lu, Y.; Hards, K.; Dahms, S. O.; Böttcher-Friebertshäuser, E.; Steinmetzer, T.; Than, M. E.; Klenk, H. D.; Garten, W. Peptidomimetic furin inhibitor MI-701 in combination with oseltamivir and ribavirin efficiently blocks propagation of highly pathogenic avian influenza viruses and delays high level oseltamivir resistance in MDCK cells. *Antiviral Res* **2015**, *120*, 89-100.
128. Dahms, S. O.; Arciniega, M.; Steinmetzer, T.; Huber, R.; Than, M. E. Structure of the unliganded form of the proprotein convertase furin suggests activation by a substrate-induced mechanism. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2016**, *113*, 11196-11201.
129. Zhang, L.; Goldhammer, C.; Henkel, B.; Panhaus, G.; Zuehl, F.; Jung, G.; Bayer, E. "Magic mixture", a powerful solvent system for solid-phase synthesis of difficult peptides. In *Innovation and perspectives in solid phase synthesis*, Epton, R., Ed. Mayflower Worldwide, Ltd.: Birmingham, UK, 1994; pp 711-716.

7 Danksagung

Zunächst möchte ich meinem Betreuer Prof. Dr. Steinmetzer für die Möglichkeit meine Promotion in seinem Arbeitskreis anfertigen zu dürfen, danken. Auch für die zahlreichen fachlichen und persönlichen Gespräche, sowie der theoretischen und praktischen Betreuung während meiner gesamten Promotion bin ich sehr dankbar und auch für die umfangreichen Hilfestellungen und Korrekturen während der Ausarbeitung der Dissertation.

Bei Frau Prof. Diederich bedanke ich mich für die Übernahme des Zweitgutachtens und für die Aufnahme einiger Massenspektren durch ihren Doktoranden Fabian Ehlert.

Ein sehr großer Dank geht an alle aktuellen und ehemaligen Kollegen des Arbeitskreises Steinmetzer. Die Zeit mit euch war ausnahmslos freundlich und angenehm, und man konnte bei Problemen immer ein offenes Ohr finden.

Ein großer Dank geht an Nina Zitzer und Dr. Gabriela Laufenberg aus der massenspektrometrischen Abteilung des Fachbereichs Pharmazie und an Stefan Newel und Dr. Regina Ortmann für die Aufnahme der NMR-Spektren.

Meinen langjährigen Freunden in Eschwege danke ich dafür, dass sie bei jedem Problem für mich einsprangen und mir helfend zur Seite standen, aber besonders auch dafür, dass sie mir immer wieder zeigten, dass es noch ein Leben außerhalb der Universität gibt, welches man trotz allen Stresses und aller Aufgaben nicht vernachlässigen sollte.

Der größte Dank gilt meiner Familie, insbesondere meinen Eltern. Ohne eure Unterstützung während des Studiums und der Promotion wäre das alles nicht möglich gewesen. Auch in schlechteren Zeiten konnte ich mich immer auf euch verlassen. Vielen Dank dafür!

8 Lebenslauf

PERSÖNLICHE DATEN

Name	Anton Epp
Geburtstag	06.10.1988
Geburtsort	Koktschetaw
Familienstand	ledig

AUSBILDUNG

09/2017	Trainee Qualified Person bei EVER Pharma in Jena
06/2014 – 09/2017	Promotion am Institut für Pharmazeutische Chemie der Philipps Universität Marburg im Arbeitskreis von Prof. Dr. Steinmetzer
10/2014	Approbation als Apotheker
10/2013 – 04/ 2014	2. Hälfte des Praktischen Jahres bei NextPharma in Göttingen
04/2013 – 09/ 2013	1. Hälfte des Praktischen Jahres in der Bahnhof-Apotheke in Eschwege
09/2008 – 04/2013	Studium der Pharmazie an der Westfälischen Wilhelms-Universität in Münster
09/2005 – 06/2008	Oberstufengymnasium, Eschwege Abschluss: Abitur

9 Erklärung

Ich versichere, dass ich meine Dissertation

„Entwicklung, Synthese und Charakterisierung neuer Inhibitoren der viralen NS2B-NS3-Protease“

selbständig ohne unerlaubte Hilfe angefertigt und mich dabei keiner anderen als der von mir ausdrücklich bezeichneten Quellen bedient habe. Alle vollständig oder sinngemäß übernommenen Zitate sind als solche gekennzeichnet.

Die Dissertation wurde in der jetzigen oder einer ähnlichen Form noch bei keiner anderen Hochschule eingereicht und hat noch keinen sonstigen Prüfungszwecken gedient.

Marburg, den 30.05.2018

.....
(Unterschrift mit Vor- und Zuname)

